

## بررسی تاثیر فولات بر خواص فیزیوشیمیایی و ضد سرطانی نانوکپسول‌های بتالاکتوگلوبولینی بر روی رده سلول‌های سرطانی کولون

مهديه گرشاسبی<sup>۱</sup> و عادلۀ دیوسالار<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران؛ <sup>۲</sup> گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: عادلۀ دیوسالار، divsalar@khu.ac.ir

چکیده. سیستم‌های دارورسانی مبتنی بر نانوتکنولوژی دارای پتانسیل بسیار مناسبی در کاربردهای پزشکی و درمانی هستند. لذا در این پژوهش طراحی و مشخصه‌یابی نانودارویی با پوشش پروتئین بتالاکتوگلوبولین حاوی اگزالی پالادیوم در حضور و غیاب فولات بررسی شده است. همچنین خواص ضدسرطانی این نانوداروی هدفمند با فولات علیه سلول‌های سرطان کولون مطالعه شدند. تکنیک‌های پراکندگی دینامیکی نور، میکروسکوپ الکترونی روبشی و جذب اتمی به منظور تعیین ویژگی‌های نانوکپسول سنتز شده به کار گرفته شدند. سپس جهت بررسی سمیت سلولی و مکانیسم القای مرگ نانو دارو بر روی رده سلول‌های سرطانی کولون HCT116 از تست‌های MTT و فلوسایتومتري استفاده شد. نتایج آزمایش‌های پراکندگی نور دینامیک، میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ نیروی اتمی نشان داد نانوکپسول‌های حاوی دارو و هدفمند با فولات اندازه‌های حدود ۴۰ نانومتر و ساختار کروی شکل دارند. نتایج سنجش MTT و فلوسایتومتري بیانگر آن بود که نانو دارو هدفمند شده با فولات در الگوی وابسته به زمان و دوز، بقا و تکثیر را در سلول‌های HCT116 القای می‌کند. نتایج نشان داد که فولیک اسید قادر است اثر بخشی دارو نسبت به داروی بدون فولات بر سلول‌های سرطانی را افزایش دهد که می‌تواند به‌عنوان گزینه‌ای جدید در روش‌های تولید داروهای جدید در درمان سرطان مطرح گردد.

واژه‌های کلیدی. پروتئین بتالاکتوگلوبولین، پکتین، نانودارو، فولات، Hct116

## Investigation of presence of folate on physicochemical and anticancer properties of beta-lactoglobulin nanocapsules against human colon cancer cell line of HTC116

Mahdieh Garshasbi<sup>1</sup> & Adeleh Divsalar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran; <sup>2</sup>Department of Cell & Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Corresponding author: Adeleh Divsalar, divsalar@khu.ac.ir

**Abstract.** Nanotechnology-based targeting drug delivery systems have a considerable potential in medicine. Therefore, the present study aimed to design, synthesise and characterize a nanodrug with beta lactoglobulin coating including oxali-palladium with and without folate and to compare their anti-cancer effects. The physicochemical properties of nanocapsules were studied by Dynamic light scattering (DLS), atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). Finally, the anticancer activities of nanodrugs were investigated against human colorectal cancer cell line of HCT116 by MTT and flowcytometry methods. The results of Dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) showed that the average size of nanocapsules with folate were less than 40 nm. Cytotoxicity results proved the dose- and time-dependent antiproliferation and anticancer activities of nanocapsules (with folate) against HCT116. Finally, it could be concluded that folate increase anticancer activity of nanodrugs and it might be considered as a new candidate in the design and synthesis of new drugs in cancer treatment.

**Key word:** beta lactoglobulin protein, HCT116, folate, pectin, nanodrug

## مقدمه

سرطان به دلیل داشتن درصد بسیار زیاد میزان مرگومیر اهمیت زیادی از نظر پیگیری به جهت درمان و پیشگیری پیدا کرده است. در میان انواع سرطان‌ها، سرطان روده و کولون به عنوان یکی از کشنده‌ترین سرطان‌ها شناخته شده است. روش‌های درمانی زیادی برای درمان سرطان وجود دارد که شیمی درمانی با داشتن عوارض زیاد یکی از درمان‌های موثر در درمان سرطان است. محققین در پی یافتن روش‌هایی بهتر و هدفمندتر و بدون عوارض شیمی درمانی هستند (Chaudhary et al., 2011). درمان اکثر سرطان‌ها به دلایل انحلال پایین و سمیت بالای داروها مشکل بوده و نیاز به کپسوله کردن و رسانش هدفمند به منظور اثرات درمانی بیشینه است (Prince et al., 2016). سیستم‌های دارورسانی مبتنی بر نانو تکنولوژی دارای پتانسیل بسیار مناسبی در کاربردهای پزشکی هستند. سیستم‌های انتقال دارو در مقیاس نانو بر مشکلات مقاومت دارویی در سلول‌های هدف غلبه کرده و حرکت دارو در عبور از موانع برای افزایش تاثیر سلول‌ها و مولکول‌های درگیر در فرایند بیماری را تسهیل می‌نمایند. رهایش کنترل شده دارو، حفظ غلظت دارو در محدوده درمانی برای مدت زمان مناسب و انتقال اختصاصی دارو به بافت هدف است (Peppase et al., 2017; Peer et al., 2007; Trujillo et al., 2016; Mishra et al., 2010; Shi et al., 2010). امروزه فناوری نانو به عنوان یک چالش اصلی علمی و صنعتی پیش روی جهانیان است. درمان توسط نانو ذرات، سبب افزایش اثر بخشی و کاهش عوارض جانبی داروهای معمول شیمی درمانی می‌شوند. نانو ذرات، توانایی انتقال هدفمند دارو را به سلول‌های توموری بدلیل داشتن تعامل بین داروهای ضد سرطان و دیگر پروتئین‌های انتقال دهنده، دارا هستند (Surendiran et al., 2009). داروهای پلاتینی نقش کلیدی را بین عوامل ضد سرطان بر پایه فلزی بازی می‌کنند و اولین نسل این داروها سیس پلاتین بوده ولی به دلیل اثرات جانبی شدید و یکسری عوارض غیر قابل برگشت دیگر کمپلکس‌های پلاتینی مورد بهره برداری قرار گرفت و بعد از آن به ترتیب کربوپلاتین و اگزالی پلاتین به بازار عرضه شدند و این داروها نیز توانمندی حضور برای داروهای نام برده را دارند (Malekzadeh et al., 2009; Naghavi et al., 2004; Florea et al., 2011; Franco et al., 2005). کمپلکس پالادیومی اهمیت زیادی در فعالیت‌های زیستی، شیمی درمانی و پتانسیل ضد نئوپلاسمی در مقایسه با داروهای سیس پلاتینی داشته است به این دلیل که ترکیبات پالادیومی تعامل بهتری با مولکول‌های زیستی داشته است و عوارض کمتری نسبت به داروهای پلاتینی بر کلیه دارند و

حدود ۱۰۰ هزار مرتبه واکنش پذیرتر و سمیت کمتری نسبت به داروهای پلاتینی دارند. ساختار داروی اگزالی پالادیوم بسیار شبیه ساختار اگزالی پلاتین است به همین دلیل می‌تواند جایگزین اگزالی پلاتین باشد (Stewart et al., 2003; Jae et al., 2010; Zhang et al., 2010; Ghalandari et al., 2014; Divsalar et al., 2007a).

پروتئین بتا-لاکتوگلوبولین پروتئین کروی و کوچکی است که در شیر بیشتر پستانداران (به غیر از انسان) وجود دارد. یکی از ویژگی‌های این پروتئین این است که در شرایط اسیدی معده پایدار است و تقریباً بدون تغییر همراه با ثبات ساختاری در مقابل فرایند تخریبی هضم معده از آن عبور می‌کند (Divsalar et al., 2007b). این پروتئین موجود در شیر به عنوان حاملی مناسب برای ترکیبات زیستی مثل ویتامین‌ها و مواد غذایی استفاده می‌شود. بتا-لاکتوگلوبولین پروتئینی است که دارای چندین جایگاه برای اتصال چندگانه لیگاندها و نقش مهمی در کپسوله کردن، انتقال ترکیبات زیستی و محافظت در برابر تجزیه شدن ترکیبات، اکسیداسیون و جلوگیری از رهاسازی محتویات القایی دارد. (Ghalandari et al., 2013; Zimet et al., 2009; Kontopidis et al., 2004; Renard et al., 1998). فولات یک ویتامین گروه B محلول در آب است. انسان‌ها نمی‌توانند آن را در شرایط محیط زنده تولید کنند. منابع مهم فولات در میوه‌ها، سبزیجات، حبوبات، جگر و دانه‌ها است و فعالیت کوفاکتوری در چندین واکنش بیوشیمیایی از طریق دادن و گرفتن یک کربن دارد (Waxman et al., 1975). فولیک اسید (فولات) یکی از مهمترین و پرکاربردترین مولکول‌های هدف‌گیرنده است. گیرنده فولات در انواع زیادی از سرطان‌ها از جمله سرطان سینه، رحم، ریه، مغز و روده بزرگ به میزان بالا بیان می‌شود. فولات به طور اختصاصی به گیرنده فولات متصل می‌شود. این مولکول هدف‌گیرنده به انواع مختلفی از دارو‌سازان‌ها از جمله لیپوزوم‌ها، نانوذرات پلیمری و دندریمرها متصل شده است (Crott et al., 2008; D'Angelica et al., 2011; Ebbing et al., 2009; Liang et al., 2010). با مرور کارهای گذشته درباره تحویل اگزالی پالادیوم به جایگاه هدف نشان داده شد که تمرکز محققین بر تحویل هدفمند و هوشمند داروهای شیمی درمانی (اگزالی پالادیوم به عنوان یک داروی مدل در این تحقیق) به جایگاه هدف هستند لذا سامانه تحویل اگزالی پالادیوم توسط نانو کپسول‌های بتالاکتوگلوبولینی هدفمند با فولیک اسید طراحی شد. پژوهش حاضر به منظور تولید و مقایسه توانمندی اثر ضد سرطانی دارو به همراه فولات و بدون فولات بر روی رده سلولی HCT116 سرطان کولون مورد بررسی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

پروتئین بتا-لاکتوگلوبولین خالص (درجه خلوص بالای ۹۸ درصد)، پکتین با وزن مولکولی پایین و اسید فولیک از سیگما خریداری شد. همچنین نمک‌های فسفات سدیم از مرک خریداری شده و داروی اگزالی پالادیوم براساس پروتوکل‌های موجود در آزمایشگاه سنتز شد.

### سنتز نانوذرات

محلول فولیک اسید با غلظت ۲mg/ml در بافر فسفات با غلظت ۱۰ میلی مولار در سه pH مختلف در سه لوله آزمایش آماده شد. سه pH (۳، ۴/۵ و ۷) با توجه به نقطه ایزوالکتریک (pH) بتالاکتوگلوبولین انتخاب شده‌اند. برای سنتز نانوکپسول‌ها نخست محلول پروتئین بتالاکتوگلوبولین با غلظت تعیین شده در محلول بافر فسفات تهیه شد سپس در بازه زمانی ۱۰ دقیقه‌ای به مدت کلی ۸۰ دقیقه لیگاند اگزالی پالادیوم به محلول حاوی بتالاکتوگلوبولین در حال هم خوردن روی شیکر انکوباتور (مدل KTG، ساخت کره) اضافه شد. ۱۰ دقیقه پس از آخرین تزریق لیگاند، در دو مرحله فولیک اسید، در مرحله اول به تنهایی و ۱۰ دقیقه بعد به همراه پکتین با درجه متیلاسیون پایین به هر نمونه اضافه شد. تمام مراحل سنتز نانوکپسول روی شیکر با سرعت ۱۲۰ rpm در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انجام شد. سپس مطالعات فیزیکی و شیمیایی جهت مشخصه یابی نانوکپسول‌ها انجام شد.

### مطالعات پراکندگی دینامیکی نور

اندازه نانوکپسول‌های تولید شده و پتانسیل زتا با استفاده از تکنیک پراکنش نور دینامیک (DLS) (مدل Brokhaven، ساخت کشور آمریکا) انجام گرفت. سنجش اندازه نانوذرات در طول موج ۶۶۰ نانومتر و در زاویه شناسایی ۹۰ درجه انجام شده است. برای تخمین بار سطحی و پتانسیل زتای نانوکپسول‌های تولید شده رابطه اسمولوچسکی با استفاده از مدل کالسیکی به کار گرفته شد. به منظور اطمینان از همگن بودن محلول حاوی نانوکپسول‌های پروتئینی هدفمند با فولیک اسید، همه نمونه‌ها پیش از انجام مطالعه پراکندگی دینامیکی نور سه بار و هر بار به مدت ۵ ثانیه با ورتکس هم زده شدند. پس از این مرحله همه نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه تحت تابش امواج فرا صوت در حمام آبی قرار گرفتند. سپس اندازه ذرات و پتانسیل زتا نانوکپسول‌های فولیک اسیدی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد اندازه گیری شد.

### مطالعه میکروسکوپ الکترونی پویشی

برای مطالعه ریخت شناسی و تعیین محدوده اندازه نانو کپسول‌های سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی پویشی مدل ۴۴۰ i LEO، محصول مشترک کشورهای آلمان و انگلستان

استفاده شد. برای این کار بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه پراکندگی دینامیکی نور بهترین نمونه انتخاب شد. سپس ۲ میکرولیتر از محلول بهترین نمونه حاوی نانوکپسول هدفمند با فولیک اسید بر روی ورقه از جنس پلاتین به اندازه ۳ سانتی متر قرار داده شد. نمونه در دمای اتاق قرار داده شد تا خشک شود و سپس توسط آلیاژی از فلز طلا پوشش داده شد. بعد از مراحل آماده سازی، نمونه توسط میکروسکوپ الکترونی پویشی مورد بررسی قرار گرفت.

### مطالعه میکروسکوپ نیروی اتمی

مطالعه میکروسکوپ نیروی اتمی مدل Nano Wizard II، ساخت کشور آلمان به منظور تعیین ویژگی ریختی و توپوگرافی سطح و بر اساس نتایج حاصل از مطالعه میکروسکوپ الکترونی روبشی بر روی بهترین نمونه در pH اپتیمم ۴/۵ انجام شد.

### بررسی میزان بازده کپسوله شدن دارو

میزان درصد بازده کپسوله شدن دارو (EE) در نانوکپسول‌های پروتئینی هدفمند با فولیک اسید توسط اسپکتروفتومتر (مدل Carry ساخت کشور استرالیا)، در طول موج ۲۲۰ نانومتر که مربوط به جذب ماکزیمم اگزالی پالادیوم است انجام گرفت و با کمک رابطه (۱) محاسبه شد. پیش از خواندن جذب، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. همه اندازه گیری‌ها در دمای محیط انجام شد.

$$EE (\%) = \frac{\text{Total drug} - \text{free drug}}{\text{Total drug}} \times 100 \quad (1)$$

### بررسی اثرات ضد سرطانی نانودارو

سلول‌های اپی‌تلیالی HCT116 سرطان روده از انیستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها بر روی محیط کشت DMEM کشت داده شدند. سلول‌های HCT116 با نانوکپسول‌های سنتزی حاوی داروی اگزالی پالادیوم به همراه فولات با غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۷ و ۱۰ میکرومولار)، نانوکپسول‌های سنتزی حاوی داروی اگزالی پالادیوم فاقد فولات با غلظت‌های (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۴۵۰ و ۷۵۰ میکرومولار) به چاهک‌ها اضافه شدند و به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون مورد نظر، سنجش MTT (۳-۴، ۵-دی‌متیل تیازول-۲-ایل)-۲،۵-دی‌فنیل تترازولیوم برومید) به منظور بررسی درصد بقای سلول‌ها انجام گردید. که بدین ترتیب ۱۰۰ میکرو لیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به دور از نور انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون، جهت نورسنجی به هر کدام از

توجه به بررسی توان حیاتی سلول‌ها و تغییرات القا شده با روش‌های MTT و فلوسایتومتری بررسی می‌گردد.

#### مطالعات خصوصیات فیزیکیوشیمیایی نانوکپسول‌ها

تکنیک پراکندگی دینامیکی نور (DLS) تکنیکی برای سنجش اندازه، بار سطحی و پتانسیل زتای ذرات و اطلاعاتی در مورد شکل ذرات و پتانسیل سطح آن‌ها در محدوده زیر میکرون است. همانطوری که نتایج مطالعات DLS در جدول ۱ نشان می‌دهد نانوکپسول‌های پروتئینی هدفمند با فولیک اسید حاوی داروی اگزالی پالادیوم در حضور پکتین با درجه متیلاسیون پایین در pH برابر با ۴/۵ تهیه شده با پوشش فولات دارای اندازه کمتر از ۵۰ نانومتر هستند و در مقایسه با نانو کپسول بتالاکتوگلوبین فاقد فولات که اندازه‌ای حدود ۱۶۴ نانومتر دارند بسیار کوچکتر شده است و توزیع همگن‌تری دارد.

همچنین نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بر روی بهترین نمونه در pH ایتیمم ۴/۵ به دست آمده از نتایج DLS انجام شد و نشان داد که نانوکپسول‌های بتالاکتوگلوبولینی با پوشش فولات (شکل A۱) دارای اندازه کمتر از ۴۰ نانومترند و در مقایسه با نانو کپسول بتالاکتوگلوبولینی فاقد فولات (شکل B۱) که اندازه‌ای کوچکتر از ۲۰۰ نانومتر دارد اندازه کوچکتری دارند و کروی‌تر و همگن‌تر هستند. نتایج میکروسکوپ الکترونی کاملاً در تایید نتایج حاصل از مطالعات پراکنش دینامیکی نور است.

نتایج میکروسکوپ نیروی اتمی بر روی بهترین نمونه در pH ایتیمم ۴/۵ به دست آمده نشان داد که نانوکپسول بتالاکتوگلوبولینی در حضور فولات اندازه‌ای کمتر از ۴۰ نانومتر دارد (شکل A۲) و در مقایسه با نانوکپسول بتالاکتوگلوبولینی فاقد فولات که اندازه‌ای کمتر از ۱۷۰ نانومتر دارد (شکل B۲) بسیار کوچکتر و سطح کروی‌تری دارد. همچنین اندازه آنها مجزا و به طور کاملاً همگن توزیع شده‌اند. نتایج اندازه‌گیری اندازه نانوکپسول‌های فولیک اسیدی به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی پوششی و میکروسکوپ نیروی اتمی به طور کامل همگرا با نتایج سنجش اندازه توسط روش پراکندگی دینامیکی نور است. همچنین نتایج میزان کپسوله شدن در سطح pH بهینه برابر با ۴/۵ محاسبه شده برای نانوکپسول بتالاکتوگلوبولینی در حضور فولات بیانگر مقدار ۷۵/۲ درصد است که این عدد بیشتر از ۵۰ درصد است و برای نانوکپسول بتالاکتوگلوبولینی در غیاب فولات ۶۹/۶ درصد است. نتایج نشان داد بهره کپسوله شدن اگزالی پالادیوم در نانوکپسول سنتزی در سطح pH برابر با ۴/۵ در حضور فولات بیشتر از دیگر شرایط در غیاب فولات است که طبق این نتایج می‌توان نتیجه گرفت که حضور فولات بر مقدار بازده و میزان بهره کپسوله شدن اگزالی پالادیوم در نانوکپسول سنتزی اثر گذار است.

چاهک‌ها ۱ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکسید اضافه گردید آنگاه دانسیته نوری محلول درون هر چاهک با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج ۵۷۰ نانومتر سنجیده شد و نهایتاً مقادیر  $CC_{50}$  یا غلظتی از ترکیبات فوق که ایجاد ۵۰ درصد مرگ و میر در سلول‌ها می‌کنند محاسبه گردید.

#### مطالعات فلوسایتومتری

به منظور بررسی درصد القای آپوپتوز در سلول‌های رده سلولی HCT116 تیمار شده با نانوکپسول‌های هدفمند با فولات از دستگاه فلوسایتومتری (مدل Sysmex cyflow space، ساخت کشور آلمان) و کیت آپوپتوز یا کیت تعیین مرگ سلولی استفاده شد. ابتدا تعداد ۳۰۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند سپس سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور دارای  $CO_2$  ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با محیط فوق محیط رویی را خالی کرده و سلول‌ها با نانودارو در غلظت‌های صفر و  $CC_{50}$  از داروها تیمار شدند. برای بررسی تعداد سلول‌های واکنش داده با annexinV و PI با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر و تحت تأثیر تابش ۴۸۸ نانومتر پرتوهای ساطع شده در طول موج‌های ۵۳۰ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. مقایسه سلول‌های آپوپتوتیک (FITC-v-annexin مثبت و PI/ منفی) و سلول‌های نرمال غیرآپوپتوتیک (FITC-v annexin منفی و PI/منفی) هر گروه با گروه‌های دیگر و گروه کنترل انجام شد.

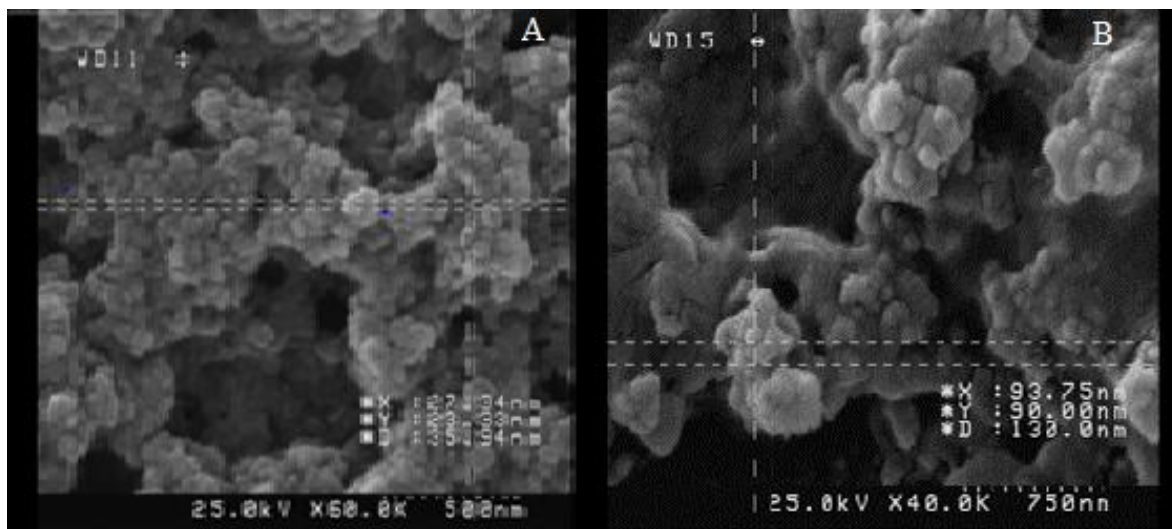
#### نتایج

به منظور سنتز نانوکپسولی شکل یافته از ماکرومولکول‌های حیاتی با ویژگی عملکردی مشخص و پایدار نخست لازم است ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی نانو کپسول پروتئینی حاوی دارو و هدفمند با فولیک اسید بر پایه نانو و سپس عملکرد نانو دارو بر روی رده سلولی سرطانی HCT116 سنجیده شود. از این‌رو نتایج به دو بخش اساسی تقسیم می‌شوند. در بخش نخست به بررسی ویژگی فیزیکیوشیمیایی نانوکپسول‌های پروتئینی تولید شده و توانمندی آنها به عنوان سامانه دارورسانی نوین در مقیاس نانو پرداخته می‌شود. از این‌رو نتایج حاصل از مطالعه پراکندگی دینامیکی نور، مطالعه ریخت شناسی نانوکپسول‌های هدفمند با فولیک اسید با تکنیک‌های مختلف میکروسکوپ الکترونی و نیروی اتمی بررسی می‌شود. در بخش دوم با توجه به نتایج به دست آمده از بخش اول به بررسی عملکرد نانوکپسول‌های پروتئینی هدفمند با فولیک اسیدی روی سلول‌های سرطان کولون رده سلول سرطانی HCT116 پرداخته شد و اثر دارو را با

جدول ۱- ویژگی‌های نانوکپسول‌های بتالاکتوگلوبولینی حاوی اگزالی پالادیوم در حضور و غیاب فولات.

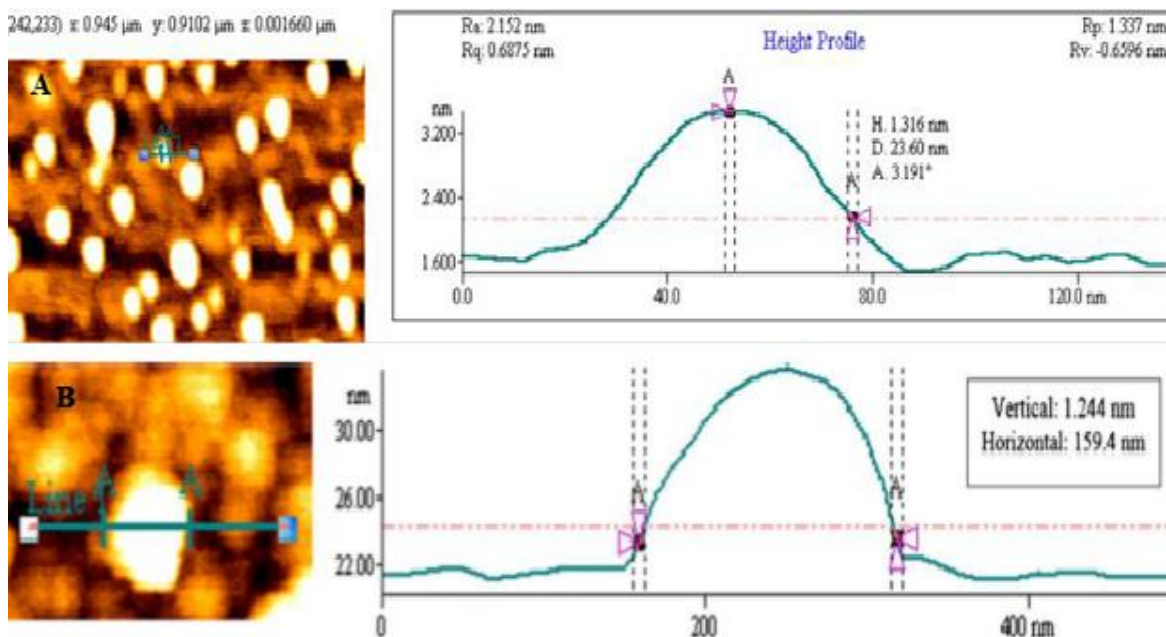
**Table 1.** Properties of beta lactoglobulin nanocapsules including Oxali-Palladium in the presence and absence of folate.

$\beta$ -LG nanocapsules	Mean particle size (nm)	$\zeta$ -Potential(mV)
$\beta$ -LG nanocapsules with folate	40	-10.53
$\beta$ -LG nanocapsules without folate	164	-8.88



شکل ۱- تصاویر ریخت شناسی در pH برابر با ۴/۵ از نانوکپسول‌های پروتئینی هدفمند با فولیک اسید (A) و فاقد فولیک اسید (B) در حضور پکتین با درجه متیلاسیون پایین توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی.

**Figure 1.** Field emission scanning electron microscopy of protein targeted nanocapsules with folic acid (A) and nanocapsules without folic acid (B) in the presence of low methyl pectin at pH 4.5.



شکل ۲- تصاویر ریخت شناسی در سطح pH برابر با ۴/۵ از نانوکپسول‌های پروتئینی هدفمند با فولیک اسید (A) و فاقد فولیک اسید (B) در حضور پکتین با درجه متیلاسیون پایین توسط میکروسکوپ نیروی اتمی.

**Figure 2.** Atomic Force Microscopy image of protein nanocapsules with folic acid (A) and without folic acid (B) in the presence of low methyl pectin at pH 4.5.

## مطالعات سمیت سلولی نانو کپسول ها

بررسی خواص ضدسرطانی و سمیت سلولی، کمپلکس نانوذرات اگزالی پالادیوم در پوشش پروتئین بتالاکتوگلوبولین هدفمند شده با فولیک اسید و مقایسه آن با ترکیب اگزالی پالادیوم در حالت بدون کپسول (داروی آزاد) و داروی متداول اگزالی پلاتین بر روی رشد و تکثیر سلول‌های سرطان کولون، رده HCT116 پرداخته شد. سلول‌های HCT116 در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف از دارو (اگزالی پالادیوم) کپسوله و آزاد انکوبه شدند. در نهایت آزمون MTT انجام و میزان درصد بقای سلولی محاسبه گردید و در شکل‌های ۳ A-C نشان داده شده است. مقادیر  $CC_{50}$  یا غلظتی از ترکیبات فوق که ایجاد ۵۰ درصد مرگ و میر در سلول‌ها می‌کنند محاسبه گردید. همانطور که شکل ۳ A نشان می‌دهد نانو کپسول‌های حاوی اگزالی پالادیوم و هدفمند با فولات در یک الگوی وابسته به دوز و زمان موجب القای مرگ سلولی در این رده سلولی می‌گردند. رشد سلول‌ها با افزایش غلظت کمپلکس دارویی به شدت کاهش می‌یابد. از طرفی منحنی‌های مهار رشد در HCT116 در سه مورد فوق یک مهار وابسته به غلظت را نیز نشان می‌دهند اما نتایج  $CC_{50}$  نشان داد که دارو در حالت کپسوله شده حاوی فولات دوزهای بسیار پایین تری نسبت به دارو در شکل آزاد قدرت کشندگی داشته است. به طوری که میزان  $CC_{50}$  نانوذرات سنتز شده هدفمند با فولات، پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون به ترتیب ۸/۶ و ۶/۹ میکرومولار محاسبه شده است که در مقایسه با این مقدار در مورد داروی معمول اگزالی پلاتین که ۱۱۰۰ میکرومولار به دست آمده است حدود ۱۲۷ مرتبه فرم نانو دارای توانایی سمیت سلولی بالاتری است. در حقیقت با غلظتی حدود ۱۲۷ مرتبه فرم نانوذرات سنتزی توانایی القای مرگ در این رده سلول سرطانی را دارا هستند. همچنین مقایسه نتایج  $CC_{50}$  نانوذرات سنتز شده با ترکیب اگزالی پالادیوم آزاد فاقد فولیک اسید نشان داد که دارو در فرم نانو فاقد فولیک اسید (۶۰۰ میکرومولار) قدرت سمیت سلولی حدود ۶۹ مرتبه بالاتری از خود نشان داده است.

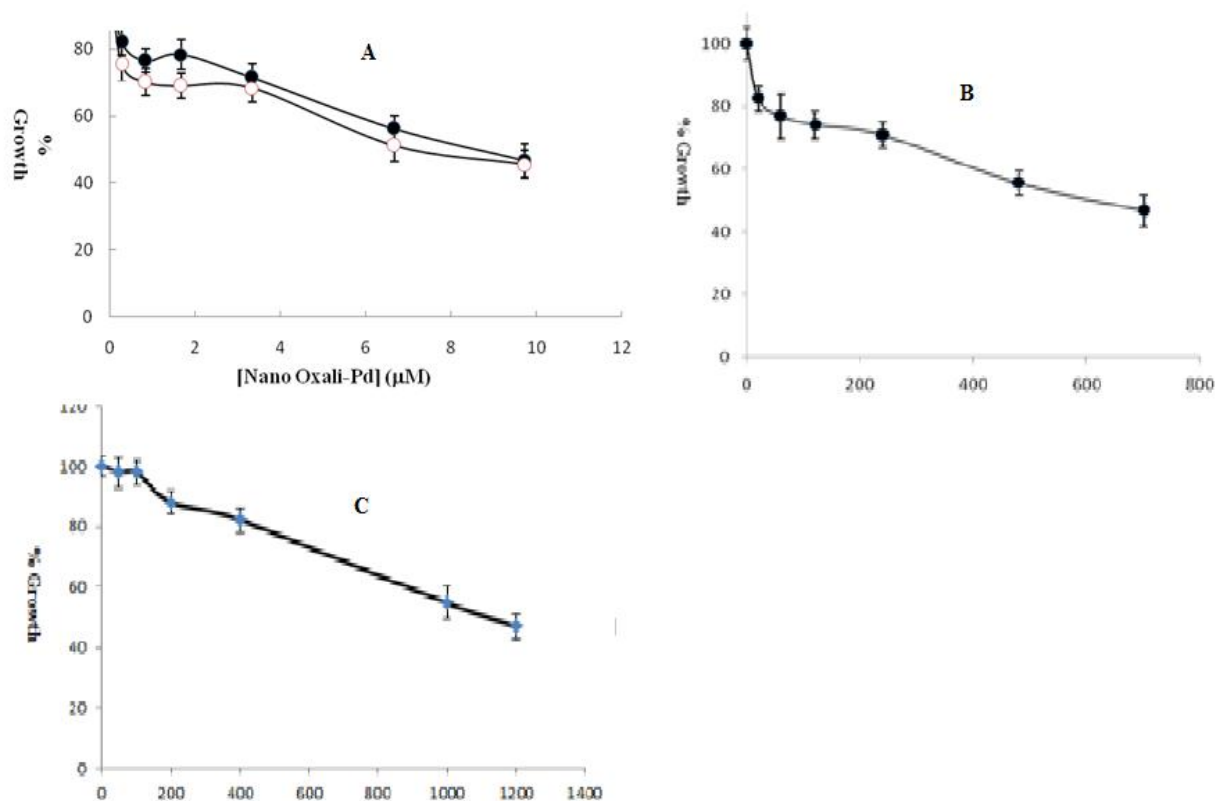
لذا نتایج فوق نشان می‌دهند که خواص سمیت پایین کمپلکس پکتین با درجه متیلاسیون پایین و فولیک اسید که به عنوان پوششی روی سطح نانوذرات بتالاکتوگلوبولینی حاوی اگزالی پالادیوم پوشش گذاری شده در فرم نانو بشدت تقویت شده است و موجب افزایش قابل توجهی در سمیت اگزالی پالادیوم موجود در نانوذرات گردیده است. همچنین با استفاده روش فلوسایتومتری، میزان درصد آپاپتوز القا شده در سلول‌های تیمار شده با غلظت بازدارنده تکثیر ناشی از تیمار با نانو کپسول‌های هدفمند با فولات و فاقد فولات و سلول‌های کنترل (تیمار نشده با هیچ دارویی) مطالعه شدند که نتایج در شکل‌های ۴

A-C و جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج مطالعات فلوسایتومتری نشان داد که نانو ذرات اگزالی پالادیومی سنتز شده در حضور فولات سبب القای آپاپتوز در حدود ۴۰ درصد (شکل A) و در غیاب فولات سبب القای آپاپتوز در حدود ۱۲ درصد (شکل B۴) در سلول‌های سرطان کولون می‌شوند. این نتایج در مقایسه با نمونه کنترل (شکل C۴) نشان می‌دهد که حضور فولات در نانو کپسول بتالاکتوگلوبولینی سبب القای آپاپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی بیشتری می‌شود. قابل ذکر است که سلول‌ها در هر مورد با غلظت  $CC_{50}$  از هر نمونه تیمار شدند و سپس مطالعات فلوسایتومتری روی هر نمونه انجام شد.

## بحث

شیمی درمانی از روش‌های پر کاربرد در درمان سرطان است ولی به دلیل عوارض جانبی و سمیت بالا، اثر داروهای شیمی درمانی به صورت نامطلوب است زیرا این داروها به صورت هدفمند به سمت سلول‌های سرطانی هدایت نمی‌شوند. به منظور رفع این مشکلات، محققین به داروهای ضد سرطان کولورکتال حامل‌هایی اضافه کرده‌اند تا از اثرات جانبی و همچنین اثرات سمی دارو نسبت به داروهای دوره‌های گذشته بکاهد (Peer et al., 2007; Trujillo et al., 2010; Mishra et al., 2016). ولی با این وجود هنوز داروها به صورت هدفمند به سمت سلول‌های سرطانی هدایت نمی‌شوند از این‌رو محققین در پی یافتن راهی بهتر برای تحویل هدفمند دارو به سلول‌های سرطانی هستند. در میان داروها، داروهای بر پایه فلزی پالادیوم وجود دارند که مشابه داروهای بر پایه فلزی پلاتین هستند ولی دارای اثرات جانبی و سمیت کمتر بر دیگر سلول‌ها هستند. در مطالعات گذشته بیشتر از داروهای نظیر - 5 فلوروئوراسیل و داروهای پلاتینی برای درمان سرطان به ویژه سرطان کولون استفاده شده است که دارای اثرات سمی و جانبی فراوانی بر دیگر بافتهای بدن داشته‌اند از این‌رو در این مطالعه از داروی اگزالی پالادیوم که دارای سمیت کمتری است استفاده شده است.

محققین در سال ۲۰۱۷ با استفاده از افزودن فولات به ترکیب بوفالین و سیکلودکسترین خواص ضد توموری را افزایش دادند (Zou et al., 2017). در پژوهشی دیگر از فولیک اسید به همراه پلیمر طلا جهت درمان لیزری فوتودرمال در درمان سرطان ریه استفاده نموده‌اند و در بررسی دیگری از داروی دکسوروبیسیسین پوشیده شده با نانو ذره آلومین برای درمان سرطان کولون استفاده شده است (Banu et al., 2015). در سال ۲۰۰۷، تعامل داروی اگزالی پالادیوم و پروتئین بتالاکتوگلوبولین توسط روش‌های مختلف میکروسکوپی و پراکندگی دینامیک نوری بررسی شد (Divsalar et al., 2007b; Chanasttru et al., 2009).



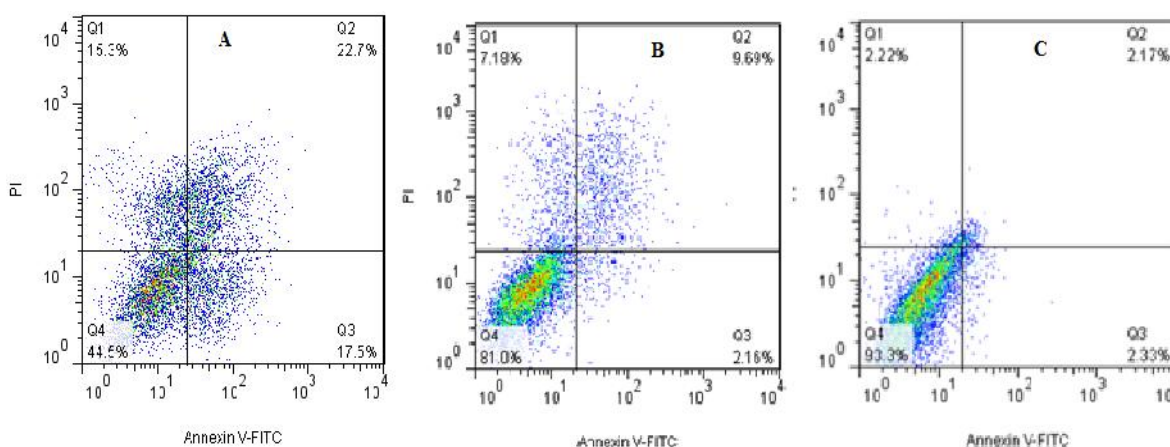
شکل ۳- منحنی درصد زنده ماندن سلول‌های رده سلولی HCT116 (تست MTT) در بازه‌های زمانی ۲۴ ( ) و ۴۸ ( ) ساعت که با نانوکپسول‌های بتالاگتوگلوبولینی در حضور فولات و پکتین با درجه متیلاسیون پایین (A)، نتایج حاصل از تیمار ۲۴ ساعت با نانوکپسول‌های بتالاگتوگلوبولینی در غیاب فولات (B) و نتایج حاصل از تیمار با محلول آزاد اگزالی پالادیوم پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (C).

**Figure 3.** Cell viability (MTT test) data of protein nanocapsules with folic acid in the presence of low methyl pectin line after different incubation times of 24 ( ) and 48 ( ) hours (A), without folic acid after 24 hours incubation times (B) and free Oxali-Palldium after 24 h (C) against HCT116 cancer cell.

جدول ۲- درصد القای آپاتوز، نکروز و سلول‌های سالم پس از تیمار با نانوکپسول‌های هدفمند با فولیک اسید، در غیاب اسید فولیک و حالت کنترل (تیمار نشده با دارو) بر سلول‌های رده سلولی HCT116.

**Table 2.** Percentage of induction of apoptosis, necrosis and normal cells after treatment with targeted nanocapsules with folic acid, without folic acid and control (untreated with drug) against cancer cell line of HCT116.

Samples	% Normal cell	% Necrotic Cells	% Apoptotic Cells
nanocapsules with folic acid	44.5	15.3	40.2
nanocapsules without folic acid	81.0	7.2	11.85
Control	93.3	2.22	4.5



شکل ۴- نمودار dot plot نتیجه فلوسایتومتری نانوکپسول‌های هدفمند با فولیک اسید (A)، در غیاب اسید فولیک (B) در حضور پکتین با درجه متیلاسیون پایین و حالت کنترل (تیمار نشده با دارو) (C) را بر سلول‌های رده سلولی HCT116 سلول‌های سرطان کولون پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون. سلول‌ها با غلظت Cc50 از هر نمونه انکوبه شده‌اند.

**Figure 4.** Dot plot curve of protein nanocapsules with folic acid (A), without folic acid (B) in the presence of low methyl pectin and control sample (untreated HCT116 cancer cell line with drug) (C) against HCT116 cancer cell line after 18 hours. The cells were incubated with the concentrations equal to Cc<sub>50</sub> of each sample.

مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده از نوع آپتوز بر سلول‌های سرطانی HCT116 ارائه کرده بودند همگراست (Izade et al., 2016).

### نتیجه گیری

از این بررسی‌ها می‌توان نتیجه گرفت که در این مطالعه نانوکپسول‌های بتالاکتوگلوبولینی هدفمند با فولات حاوی اگزالی پالادیوم کمپلکس شده با پکتین با درجه متیلاسیون پایین سنتز و تولید شده‌اند و نسبت به نانو کپسول بتالاکتوگلوبولینی فاقد فولات، قابلیت نفوذ این نانوذرات به داخل سلول‌های سرطانی به دلیل داشتن گیرنده فولات بیشتر بر روی سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم توانایی اثر بخشی این سامانه دارویی را بالا می‌برد و این سامانه دارویی بدون تغییر ساختاری چشمگیر و رهایش قابل توجه دارو از معده عبور می‌کند که نشان دهنده پایداری بالای این سامانه دارویی است. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات پروتئینی حاوی فولات می‌تواند به عنوان گزینه‌ای امیدوارکننده و سامانه‌ای نوین در مقیاس نانو و قابل دسترس در تحویل داروی ضد سرطان در درمان سرطان کلورکتال پیشنهاد گردد.

### سپاسگزاری

بدینوسیله، نویسندگان مقاله، از معاونت پژوهشی دانشگاه خوارزمی جهت حمایت از این پژوهش کمال تشکر و قدرانی دارند.

در سال ۲۰۰۹ نیز، برای بررسی اتصال فولات با فلزهای روی و منیزیم از روش AFM و DLS استفاده گردید (Ebbing et al., 2009). در پژوهش‌های پیشین جهت بررسی اندازه و شکل نانوذرات سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ نیروی اتمی استفاده شده است که با نتایج حاصل از بررسی‌های حاضر مطابقت دارد. میزان سمیت بیوفلورونئید و فولات هدفمند شده بر نانوذرات کیتوزان بر سلول‌های سرطان دهانه رحم توسط تست MTT نیز بررسی شد (Cai et al., 2017). همچنین درصد بقای سلولی سلول‌های سرطان پروستات توسط نانوذرات سیکلودکسترین هدفمند شده با فولات بررسی شده است (Evanse et al., 2016). اما در این پژوهش سنتز یک حامل مناسب جهت انتقال داروی ضد سرطان برای سرطان روده انجام شد و در مرحله سلولی مقایسه فعالیت کشندگی دارو در دو حالت نانوکپسول در حضور فولات و بدون حضور فولات انجام گرفت. اما نتایج Cc<sub>50</sub> نشان داد که دارو در حالت کپسوله شده در دوزهای بسیار پایین تری نسبت به دارو در شکل آزاد قدرت کشندگی داشته است. اثر بخشی دارو با پوشش فولیک اسیدی بر روی سلول‌های رده سرطانی HCT116 چندین برابر بیشتر از اثر بخشی دارو بدون پوشش فولیک اسیدی است و همچنین اثر غلظت‌های مختلف این دارو بر روی رده سلولی HCT116 نشان دهنده عملکرد بسیار عالی نانو دارو است. این نتایج با آنچه که مطالعات قبلی درباره ویژگی عملکرد نانو ذرات بتالاکتوگلوبولینی (حاوی یکی از مشتقات اگزالی پلاتین) و القای



## REFERENCES

- Banu, H., Sethi, D.K., Edgar, A., Sheriff, A., Rayees, N., Renuka, N., Faheem, S.M., Premkumar, K. & Vasanthakumar, G.** 2015. Doxorubicin loaded polymeric gold nanoparticles targeted to human folate receptor upon laser photothermal therapy potentiates chemotherapy in breast cancer cell line. *Journal of Photobiology* 5: 116-128.
- Cai, L., Yu, R., Hao, X. & Ding, X.** 2017. Folate receptor-targeted bioflavonoid genistein-loaded chitosan nanoparticles for enhanced anticancer effect in cervical cancers. *Nanoscale research Letters* 12: 509-518.
- Chanasttru, W., Jones, O.G., Decker, E.A. & McClements, D.J.** 2009. Impact of cosolvents on formation and properties of biopolymer nanoparticles formed by heat treatment of beta-lactoglobulin-pectin complexes. *Food Hydrocolloids* 23: 2450-2457.
- Chaudhary, A., Sutaria, D., Huang, Y., Wang, J. & Prabhu, S.** 2011. Chemoprevention of colon cancer in a rat carcinogenesis model using a novel nanotechnology-based combined treatment system. *Cancer Prevention Research* 4: 1655-64.
- Crott, J.w., Liu, Z., Keyes, M.K., Choi, S. W., Jang, H. & Moyer, M.P.** 2008. Moderate folate depletion modulates the expression of selected genes involved in cell cycle, intracellular signaling and folate uptake in human colonic epithelial cells line, Mason J B, *Journal of Nutritional Biochemistry* 19: 328-335.
- D'Angelica, M., Ammori, J., Gonen, M.S., Klimstra, D.S., Low, P., Murphy, L.R., Weiser, M. B., Paty, I., Fong, Y.P., DeMatteo, R., Allen, P. R. & Jarnagin, J.** 2011. Folate receptor-a expression in resectable hepatic colorectal cancer metastases: patterns and significance. *Modern Pathology* 24: 1221-1228.
- Divsalar, A., Saboury, A.A., Mansouri-Torshizi, H. & Moosavi-Movahedi, A.A.** 2007a. Binding properties of a new anti-tumor component (2, 2'-bipyridin octylglycinato Pd (II) nitrate) with bovine Beta-lactoglobulin-A and B. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 25: 173-182.
- Divsalar, A., Saboury, A.A., Yousefi, R., Mansouri-Torshizi, H. & Moosavi-Movahedi, A.A.** 2007b. Spectroscopic and cytotoxic studies of the novel designed Palladium (II) complexes: Beta-lactoglobulin and K562 as the targets. *International Journal of Biological Macromolecules* 40: 381-386.
- Ebbing, M., Bønaa, K.H., Nygard, O., Arnesen, E., Ueland, P.M., Nordrehaug, J.E., Rasmussen, K., Njølstad, I., Refsum, H., Nilsen, D.W., Tverdal, A., Meyer, K. & Vollset, S.E.** 2009. Cancer incidence and mortality after treatment with folic acid and vitamin B12. *The Journal of American Medical Association* 302: 2119-2126.
- Evans, J.C., Malhotra, M., Guo, J., O'Shea, J., Handrahan, K.O'Neill, A., Landry, W.D., Griffine, B.T., Darcy, R., Waston, W. & O'Driscoll, C.M.** 2016. Folate-targeted amphiphilic cyclodextrin siRNA nanoparticles for prostate cancer therapy exhibit PSMA mediated uptake, therapeutic gene silencing in vitro and prolonged circulation in vivo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 12: 2341-2351.
- Florea, A.N. & Busselberg, D.** 2011. Cis platin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance & induced side effects. *Cancer* 3:1351-1371.
- Franco, A., Sikalidis, J.A. & Herruzo, S.** 2005. Colorectal cancer: influence of diet and lifestyle factors. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas* 97: 432-448.
- Ghalandari, B., Divsalar, A., Saboury, A.A. & Parivar, K.** 2014. The new insight into oral drug delivery system based on metal drugs in colon cancer therapy through b-lactoglobulin/oxali-palladium nanocapsules. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 140: 255-265.
- Ghalandari, B., Divsalar, A., Saboury, A.A., Haertlé, T., Parivar, K., Bazl, R., Eslami-Moghadam, M. & Amanlou, M.** 2013. Spectroscopic and theoretical investigation of oxali-palladium interactions with -lactoglobulin, *Spectrochim Acta. A Molecular Biomolecular Spectroscopy Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 118: 1038-46.
- Izadi, Z., Divsalar, A., Saboury, A.A., Sawyer, L.** 2016. Beta Lactoglobulin-pectin nanoparticle-based oral drug delivery system for potential treatment of colon. *Chemical Biology Drug Design* 88: 209-216.
- Jae Lee, S., Hoon, Y., Heon, L.S. & Sig Kim, S.** 2012. Oxali-platin nanoparticles and method for preparing same, Bio-Synectics, Inc., Jw Pharmaceutical Corporation, US 20120177728 A1.
- Kontopidis, G., Holt, C. & Sawyer, L.** 2004. Beta lactoglobulin: Binding properties, structure and function. *Journal of Dairy Sciences* 87: 785-796.
- Liang, L. & Subirade, M.** 2010. Beta lactoglobulin/folic acid complexes. Formation, characterization, and biological implication. *Journal of Physical Chemistry: B* 114: 6707-6712.
- Lim, E., Jang, E., Lee, K., Haam, S. & Huh, Y.** 2013. Delivery of cancer therapeutics using nanotechnology. *Pharmaceutics* 5: 294-317.
- Malekzadeh, R., Bishehsari, F., Mahdavinia, M. & Ansari, R.** 2009. Epidemiology and Molecular Genetics of Colorectal Cancer in Iran: A Review. *Achieve Iranian Medicine* 12: 161-169.
- Mishra, B.** 2010. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, type and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine/ Nanotechnology, Biology and Medicine* 6: 9-24.
- Peer, D., KarP, J. M., Hong, S., farokhzad, O.C., Margalit, R. & langer, R.** 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* 2: 751-760.
- Peppase, B. & Blanchette, J. O.** 2017. Nanoparticle and targeted system for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56: 1649-1659.
- Prince, A., Debaprotim, D., Suravi, P. & Nazneen, D.** 2016. A promising approach to support appropriate colon target drug delivery system. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5: 556-568.
- Renard, D., Lefebvre, j., Griffin, M.C.A. & Griffin, W.G.** 1998. Effects of pH and salt environment on the association of Beta-lactoglobulin revealed by intrinsic

- fluorescence studies. *International Journal of Biological Macromolecules* 22: 139-150.
- Shi, J., Votruba, A.R., Farokhzad, O.C. & Langer, R.** 2010. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications. *Nano Letter* 10: 3223-3230.
- Surendiran, A., Sandhiya, S. & Adithan, C.** 2009. Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian Journal of Medical Research* 130: 689-701.
- Trujillo, L.E., Ávalos, R., Granda, S., Santiago, G.L. & País-Chanfrau, J.M.** 2016. Nanotechnology applications for food and fioprocessing industries. *Biological Medicine* 8: 1-6.
- Waxman, S. & Schereiber, C.** 1975. The isolation of the folate binding protein from commercially purified bovine beta lactoglobulin. *Febs Letters* 75: 244-248.
- Zimet, P. & Livney, Y.D.** 2009. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for u-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids* 23: 1120-1126.
- Zhang, J., Wang, L., Xing, Z., Liu, D., Sun, J., Li, X. & Zhang, Y.** 2010. Status of bi- and multi-nuclear platinum anticancer drug development. *Anticancer Agent in Medicinal Chemistry* 10: 272-282.
- Zou, A., Zhao, X., Ulrich, A.H. & Vasil, M.G.** 2017. Folate receptor targeted bufalin / B-cyclodextrin supramolecular inclusion complex for enhanced solubility and anti-tumor efficiency of bufalin. *Materials Science and Engineering C* 78: 609-618.

\*\*\*\*\*

**How to cite this article:**

**Garshasbi, M. & Divsalar, A.** 2021. Investigation of presence of folate on physicochemical and anticancer properties of beta-lactoglobulin nanocapsules against human colon cancer cell line of HTC116. *Nova Biologica Reperta* 8: 173-182. (In Persian).

گرشاسبی، م. و دیوسالار، ع. ۱۴۰۰. بررسی تاثیر فولات بر خواص فیزیکیوشیمیایی و ضد سرطانی نانوکپسول‌های بتالاکتوگلوبولینی بر روی رده سلول‌های سرطانی کولون. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۸: ۱۸۲-۱۷۳.