

اثر نانو ذرات بتاکازئینی بر دسترسی زیستی و جذب سلولی کمپلکس پلاتینی به عنوان داروی ضد سرطانی

مهديه رزمی، عادلہ دیوسالار*

گروه زیست شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۴/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: 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 پیشینه می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی اثر نانو ذرات بتاکازئینی بر دسترسی زیستی و جذب سلولی کمپلکس پلاتینی به عنوان داروی ضد سرطانی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی بررسی خصوصیات شیمی فیزیکی و اندازه نانوذرات بتاکازئینی حامل دارو با استفاده از دستگاه پراکنش دینامیک نوری و میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. سپس جهت ارزیابی سمیت کمپلکس پلاتینی، سلول‌های سرطان روده در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف کمپلکس آزاد پلاتین و نانومیسسل‌های لود شده با کمپلکس پلاتین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. مقادیر IC_{50} (غلظتی از ترکیب که باعث ایجاد ۵۰ درصد مرگ و میر در سلول می‌شود) با استفاده از روش MTT محاسبه شد. داده‌ها با آزمون آماری آنالیز واریانس و آزمون تعقیبی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بتاکازئین، نانوذرات بتاکازئینی حامل دارو در محدوده ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر سنتز شد. به علاوه، میزان مرگ و میر در سلول‌های سرطانی به وسیله کمپلکس پلاتینی به شکل رها (بدون کپسول) و با کپسول به ترتیب ۷۰ و ۲۶ میکرومولار در ۲۴ ساعت و ۶۰ و ۲۱ میکرومولار در ۴۸ ساعت بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که دسترسی زیستی کمپلکس پلاتین به شکل کپسوله افزایش می‌یابد و این سیستم دارورسانی جدید می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت درمان سرطان‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: بتاکازئین، کمپلکس پلاتین، دسترسی زیستی، نانوحامل، میسل

* نویسنده مسئول: دکتر عادلہ دیوسالار، تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

Email: divsalar@tmu.ac.ir; divsalar@khu.ac.ir

مقدمه

سرطان یکی از علل اصلی مرگ و میر در سرتاسر جهان می‌باشد. شیمی‌درمانی یکی از مؤثرترین روش‌ها جهت درمان سرطان است. با وجود پیشرفت‌های وسیع در زمینه توسعه‌ی داروهای شیمی‌درمانی، درمان اکثر سرطان‌ها به‌دلایل برهمکنش‌های ناسازگار سیستمی-مکانی این عوامل، ایجاد عوارض جانبی و انتقال پایین عوامل ضد سرطانی از غشای سلولی مشکل بوده و نیاز به رسانش هدفمند به‌منظور اثرات درمانی بیشینه می‌باشد (۱). امروزه فن‌آوری نانو در مباحثی نظیر دارورسانی، انحلال داروهای نامحلول در آب، حذف اثرات جانبی داروها و درمان مؤثر سرطان‌ها تحولی بزرگ ایجاد کرده است. نانوتکنولوژی مربوط به ساخت و کنترل مواد در محدوده ۱۰۰-۱۰۰۰ نانومتر می‌باشد. در این محدوده‌ی اندازه‌ای، مواد خصوصیات فیزیکوشیمیایی منحصر به فردی دارند، به‌طوری‌که نسبت سطح به حجم افزایش می‌یابد، خصوصیات الکتریکی، مغناطیسی و نوری ذرات به‌طور قابل توجهی تغییر می‌کنند و ترکیبات واکنش‌پذیری بالایی دارند (۲).

یکی از پرکاربرترین داروها جهت درمان سرطان، ترکیبات پلاتینی هستند. این کمپلکس‌ها در اصل با موقعیت N-7 بازهای پورین برهمکنش می‌دهند. این آسیب‌ها همانندسازی و رونویسی را معیوب می‌کنند و منجر به توقف سیکل سلولی و تحریک آپوپتوز یا نکروز می‌شوند (۳). با وجود کاربرد گسترده داروهای ضدسرطانی پلاتینی، سمیت

بالا و قابلیت نفوذ بسیار پایین این ترکیبات به بافت‌های توموری، محدودیت‌های اصلی استفاده از این ترکیبات می‌باشند. تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که رسانش هدفمند داروهای پلاتینی از طریق کپسوله کردن در داخل ماکرومولکول‌هایی از جمله کوکربیت اوریل، نانولوله‌های کربنی و فولات کانژوگه شده به پلی اتیلن گلیکول پیشرفت‌های امیدبخشی را در حل این مشکلات نشان داده‌اند (۷-۴). با این وجود، این سیستم‌های رسانش اکثراً ترکیبات سنتزی بوده و حلال‌های ارگانیک جهت انحلال داروها در محلول آبی استفاده می‌شود (۸-۴). لذا در مطالعه اخیر با توجه به فواید غذایی و ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی پروتئین‌های غذایی از پروتئین بتاکازئین شیر گاو به عنوان حامل دارو استفاده شده است. بتاکازئین پروتئین طبیعی، سالم و زیست تخریب پذیر شیر بوده و ساختار منحصر به فردش امکان تشکیل میسل و افزایش انحلال و کپسوله کردن دارو را فراهم می‌کند. هم‌چنین با کپسوله کردن ترکیبات دارویی در میسل‌های بتاکازئینی نیاز به عوامل انحلال‌ساز مصنوعی حذف خواهد شد (۹). مونومرهای بتاکازئین به دلیل ساختار دو گانه دوست مشخص آنها تحت شرایط مناسب فیزیولوژیکی در محلول‌های آبی تجمع پیدا می‌کنند و میسل‌های بتاکازئینی را تشکیل می‌دهند (۱۰).

ساختار دوگانه دوست بتاکازئین آنالوگی از کوپلیمرهای دی‌بلاک دوگانه دوست می‌باشد. میسل‌های کوپلیمر بلاک بسیار پایدارند و رهایش

NaHPO_4 (۵/۶۵ میلی مولار)، PO_2NaH_4 (۳/۰۵ میلی مولار) و نمک کلرید سدیم ۸۰ میلی مولار می باشد. کمپلکس پلاتینی با غلظت ۵ میلی مولار در آب دو بار تقطیر حل گردید (۱۵).

در این تحقیق به منظور بررسی تأثیر کمپلکس پلاتین بر ساختار پروتئین بتاکازئین، مطالعه تعداد جایگاه‌های اتصال و تمایل پیوند این کمپلکس با پروتئین از طیف سنجی فلورسانس استفاده شد. بعضی مولکول‌ها دارای کروموفورهایی هستند که قادرند نور را در طول موج مشخصی جذب و در طول موج‌های بالاتر نشر دهند. در حالت کلی وقتی نور به مولکولی برخورد می‌کند و انرژی خود را به مولکول مورد نظر می‌دهد، باعث تحریک آن می‌شود که انرژی آن از حالت پایه بیشتر می‌باشد. مولکول تحریک شده می‌تواند انرژی جذبی خود را از طریق فلورسانس از دست دهد. در واقع فلورسانس فرآیندی است که در آن انرژی اضافی به صورت فوتون نشر می‌شود تا مولکولی به حالت پایه برسد. کروموفورهای ذاتی، ترکیباتی فلوروسنت هستند که به طور طبیعی خاصیت نشر فوتون را دارند و شامل سه اسید آمینه تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین هستند. در این مطالعه، اندازه‌گیری شدت نشر فلورسانس ذاتی تریپتوفان بتاکازئین در غلظت ۵ میکرومولار بتاکازئین و غلظت‌های مختلف کمپلکس پلاتینی (۴۵-۰ میکرومولار) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و طول موج تحریک ۲۹۰ نانومتر به انجام رسید. ضخامت کووت‌های کوارتز در این آزمایش‌ها یک سانتی‌متر

مولکول‌های هیدروفوبی کپسوله شده چندین مرتبه کندتر می‌باشد. همچنین این سیستم دارورسانی جدید به داروهای هیدروفوبی این امکان را می‌دهد تا از لحاظ ترمودینامیکی در محلول پایدار باشند. نتایج تحقیقات اخیر، نانوذرات بتاکازئینی را ابزار مناسبی جهت کپسوله کردن داروهای شیمی درمانی از جمله میتروتوکسان، وین‌بلاستین، ایرینوتکان، دوسیتاکسل و پاکلیتاکسل معرفی کرده‌اند (۱۲ و ۱۳). در مطالعه‌ای دسترسی زیستی بهتر کورکومین کپسوله شده در نانوذرات بتاکازئینی نسبت به شکل بدون کپسول بر روی رده سلولی سرطان خون نشان داده شده است (۱۴).

در این پژوهش با توجه به پیشینه استفاده از ترکیبات پلاتینی در درمان سرطان‌ها، هدف بررسی میانکشی کمپلکس پلاتینی جدید سنتزی به نام بی‌پیریدین مورفولین دی‌تیو کربامات پلاتین نیترات با پروتئین بتاکازئین شیر گاو بود. در مرحله بعدی با آنالیز داده‌های به دست آمده از فلورسانس، نانوذرات بتاکازئینی لود شده با کمپلکس پلاتین سنتز شدند. سپس تأثیر نانوحامل سنتز شده بر میزان دسترسی زیستی این کمپلکس پلاتینی بر روی رده سلولی سرطان روده HCT 116 بررسی شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی بتاکازئین در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۷ آماده گردید که این بافر حاوی

می‌باشد و پهنای شکاف^(۱) مورد استفاده در تحریک و نشر به ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر تنظیم شد(۱۶).

به منظور سنتز میسل‌های بتاکازئینی حامل کمپلکس پلاتینی، ابتدا نسبت اپتیمال بتاکازئین داروی پلاتینی به وسیله طیف‌سنجی فلورسانس به دست آمد. سپس بر اساس این داده‌ها به تدریج محلول کمپلکس پلاتینی با غلظت ۵ میلی‌مولار به محلول بتاکازئینی در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در دمای اتاق و pH ۷ اضافه شد. به طوری که محلول‌های تهیه شده به مدت ۶ ساعت به وسیله شیکر مخلوط شدند. محلول‌های آماده شده به مدت یک شبانه روز به منظور پایداری نانوذرات تشکیل یافته در دمای اتاق باقی ماندند و سپس برای آنالیز بیشتر مورد بررسی قرار گرفتند(۹ و ۱۲).

با استفاده از دستگاه پراکنش دینامیک نوری^(۲) (DLS)، می‌توان پارامترهایی از قبیل توزیع اندازه نانوذرات و پتانسیل زتا را اندازه‌گیری نمود. در این تکنیک نمونه کلوئیدی در مقابل نور تکفام لیزر ۶۵۸ نانومتری قرار می‌گیرد و شدت نور پراکنده شده با دکتور فوتودیود اندازه‌گیری می‌شود(۱۷). در این پروژه نیز جهت بررسی تغییرات پتانسیل سطحی و قطر نانوذرات از دستگاه DLS و مدل Brookhaven که دارای دو آنالیزور zeta potential analyzer و particle size analyzer می‌باشد، استفاده شد.

سپس شکل نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی روبشی^(۳) (SEM) مورد بررسی قرار گرفت(مدل لئو، انگلستان). جهت آماده سازی، نمونه بر روی یک فیلم هادی، نظیر رنگ آلومینیوم، پخش شد و کاملاً خشک گردید و سطح نمونه با پلاتین پوشش

داده شد. سپس نمونه مورد مطالعه قرار گرفت (۱۸). در مرحله آخر باتوجه به اثر کشندگی کمپلکس‌های پلاتینی بر سلول‌های سرطان‌های دستگاه گوارش به خصوص سرطان روده، تأثیر نانوحامل سنتز شده بر میزان دسترسی زیستی کمپلکس پلاتینی بر رده سلولی سرطان روده HCT 116 تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران بررسی شد(۱۹):

محیط کشت^(۴) DMEM به صورت آماده از شرکت سیگما خریداری شد. آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین خریداری شده از شرکت سیگما به میزان ۱ درصد و سرم جنین گاوی به میزان ۱۰ (V/V) درصد به محیط‌ها اضافه گردید و سلول‌ها در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO₂، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در فاز لگاریتمی رشد یافتند. از تریپسین به منظور جداسازی سلول‌های چسبنده استفاده شد.

تعیین میزان سمیت سلولی با استفاده از روش MTT (۳،۴،۵) دی‌متیل‌تيازول ۲ یل ۲،۵ دی‌فنیل‌تترازولیم) مورد ارزیابی قرار گرفت(۲۰). سلول‌های کنترل و تحت درمان به میزان 1×10^5 در ظروف استریل ۲۴ تایی کشت داده شدند و این سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف کمپلکس پلاتین(با غلظت ۸۰-۰ میکرومولار) و میسل‌های لود شده با کمپلکس پلاتینی(با غلظت ۳۰-۰ میکرومولار) انکوبه شدند. پس از ۲۰ ساعت، ۵۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر

1-Excitation And Emission Slits
2- Dynamic Light Scattering(DLS)
3- Scanning Electron Microscope(SEM)
4-Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)

دست آمده از آزمایش نشر فلورسانس پروتئین بتاکازئین در محدوده‌ی طول موج ۵۰۰-۳۰۰ نانومتر در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف کمپلکس پلاتینی در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌باشد. نشر فلورسانس پروتئین با افزایش غلظت‌های مختلف کمپلکس به ترتیب کاهش می‌یابد (پدیده خاموشی^(۱)) نشر فلورسانس پروتئین بتاکازئین). به طوری‌که به تدریج غلظت کمپلکس پلاتین افزایش می‌یابد تا جایی که دیگر هیچ‌گونه تغییری در میزان نشر فلورسانس پروتئین دیده نشود.

همچنین با استفاده از نمودار F_0/F در مقابل $\frac{[Q]}{(F_0-F)}$ می‌توان مقادیر ثابت اتصال (K_A) و تعداد

پلاتین‌های متصل شده روی پروتئین (n) را محاسبه کرد (تصویر ۱). به طوری‌که در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بتاکازئین، تمایل اتصال کمپلکس پلاتین به بتاکازئین $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ به دست آمد و نسبت اتصال ۳:۱ (بتاکازئین: کمپلکس پلاتین) بود. نسبت اتصال کمپلکس پلاتین به پروتئین نشان می‌دهد که حداقل یک مکان اتصال اضافی با تمایل بالاتر یا برابر برای دارو در مقایسه با مکان ریشه تریپتوفان ۱۴۳ در پروتئین وجود دارد که این مکان‌های اضافی از قبل یا همراه با تریپتوفان اشباع می‌شوند (۲۲).

توزیع اندازه میسل‌های بتاکازئین خالص (فاقد دارو) در تصویر ۲ بر حسب درصد وزنی- حجمی برای ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پروتئین نشان داده شده است. تقریباً ۶۵ درصد ذرات را مونومرهای ۶ نانومتری و ۳۵ درصد ذرات را میسل‌های ۳۸

چاهک افزوده شد. در سلول‌های زنده، MTT محلول و زرد رنگ با شکست حلقه تترازولیم آن به وسیله آنزیم‌های دهیدروژناز، به فورمازول نامحلول و بنفش رنگ تبدیل می‌شود. برای سنجش نوری فورمازان لازم است به صورت محلول درآید. به همین دلیل در پایان انکوباسیون به هر کدام از چاهک‌ها ۱ میلی‌لیتر ایزوپروپانول ۴ درصد HCl ۱ نرمال اضافه گردید و پلیت‌ها در دمای اتاق به مدت یک شب باقی ماندند. آنگاه جذب نوری محلول درون هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر سنجیده شد. در این شرایط جذب نوری تابعی از MTT تبدیل شده به فورمازان است. مقادیر جذب نوری گروه‌های مورد مطالعه بر جذب نوری گروه‌های کنترل (بدون هیچ‌گونه تیمار) تقسیم و نتیجه به صورت درصد کنترل بیان گردید (۲۱).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

کمپلکس پلاتین به صورت خالص در بافر فسفات تجمعات مرئی تشکیل داد. درحالی‌که در حضور بتاکازئین، انحلال دارو به طور قابل توجهی افزایش یافت و هیچ نوع رسوبی مشاهده نگردید.

برهمکنش کمپلکس ضدسرطانی پلاتین و بتاکازئین به وسیله نمایش تغییرات فلورسانس تریپتوفان ۱۴۳ بتاکازئین با افزایش غلظت‌های مختلف کمپلکس پلاتین (II) (۴۵-۰ میکرومولار) مورد مطالعه قرار گرفته است. تصویر ۱ نشان دهنده‌ی نتایج به

1-Quenching Phenomenon

مقادیر IC_{50} یا غلظتی از ترکیبات فوق که ایجاد ۵۰ درصد سمیت یا مرگ و میر در سلول‌ها می‌کنند با استفاده از روش MTT محاسبه شد که نتایج در تصویر ۶ نشان داده شده است. میزان مرگ و میر در سلول‌های سرطانی به وسیله کمپلکس پلاتینی به شکل رها و با کپسول به ترتیب در ۲۴ ساعت ۷۰ و ۲۶ میکرومولار و در ۴۸ ساعت ۶۰ و ۲۱ میکرومولار بود. رشد سلول‌ها با افزایش غلظت کمپلکس‌های پلاتین و نانوحامل‌ها به شدت کاهش می‌یابد. با توجه به مقادیر IC_{50} ، نانوکپسول‌های بتاکازئینی حامل دارو نسبت به داروی آزاد در غلظت‌های کمتر موجب مهار فعالیت و رشد این سلول‌ها می‌شوند. با افزایش زمان انکوباسیون، مقادیر IC_{50} نیز به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد.

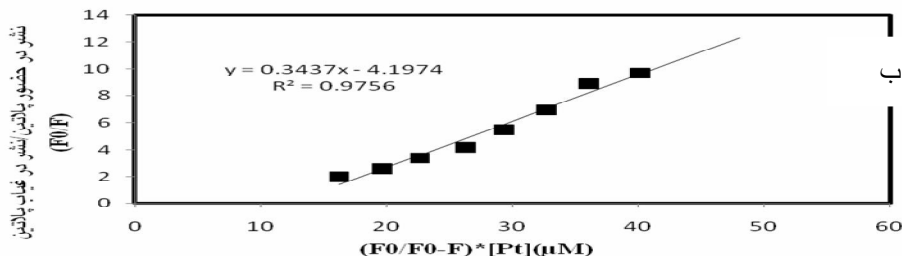
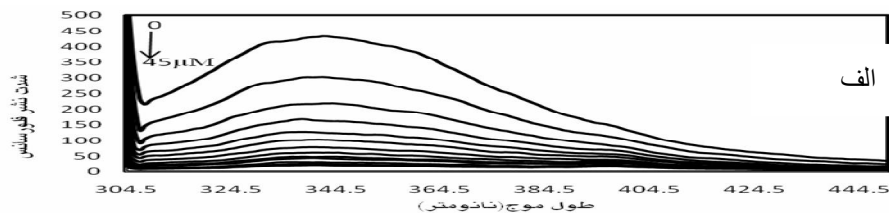
بحث

یکی از پرکاربردترین داروها جهت درمان سرطان، ترکیبات پلاتینی هستند. با وجود کاربرد گسترده داروهای ضدسرطانی پلاتینی، مطالعات نشانگر انحلال پایین، سمیت بالا و قابلیت نفوذ بسیار پایین این ترکیبات به بافت‌های توموری می‌باشند. به منظور رفع این محدودیت‌ها و افزایش دسترسی زیستی ترکیبات پلاتینی، تاکنون سیستم‌های انتقالی فراوانی پیشنهاد شده‌اند (۷-۴). لذا هدف این مطالعه بررسی اثر سیستم انتقالی بتاکازئینی در کشندگی سلولی کمپلکس پلاتینی جدید بر سلول‌های سرطان روده بود.

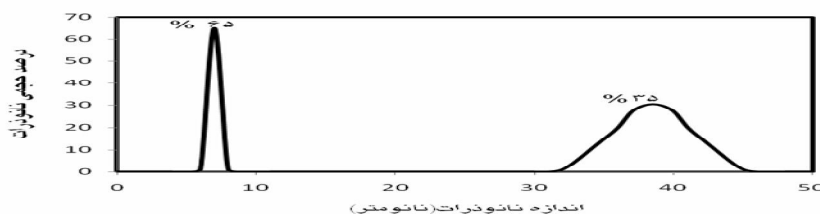
نانومتری تشکیل می‌دهند. سپس با توجه به نتایج فلورسانس، نانوذرات با نسبت مولی ۳:۱ (بتاکازئین: کمپلکس پلاتین) سنتز شدند. تصویر ۳ نشان می‌دهد که در حضور دارو اندازه نانوذرات به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد و ذراتی در محدوده ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر تشکیل می‌شوند. با توجه به افزایش اندازه نانوذرات این احتمال وجود دارد که دارو در نانوذرات میسلی به شکل کپسوله درآمده است.

به منظور سنجش پتانسیل الکتریکی سطح نانوذرات و پایداری سیستم کلئیدی پتانسیل زتا مورد بررسی قرار گرفت. محلول‌های ۵ میلی‌مولار داروی خالص در بافر فسفات، ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر میسل‌های بتاکازئینی خالص، و میسل‌های بتاکازئینی حاوی دارو با نسبت مولی ۳:۱ (بتاکازئین: کمپلکس پلاتین) جهت سنجش پتانسیل زتا ارزیابی شدند. کمپلکس پلاتینی در بافر فسفات مقادیر پتانسیل زتای نزدیک به صفر دارد که نشان‌دهنده ناپایداری آن از لحاظ کلئیدی است. اما در حضور بتاکازئین سیستم‌های پایدارتری تشکیل شد به طوری که مقدار پتانسیل زتای میسل‌های بتاکازئینی حاوی دارو تقریباً برابر با پتانسیل زتای میسل‌های بتاکازئینی فاقد دارو است. از آنجایی که pI بتاکازئین ۵/۳۳ می‌باشد این پروتئین در pH ۷ دارای بار منفی می‌باشد. این امر منجر به کاهش پتانسیل سطح نانوذرات لود شده با دارو می‌شود (تصویر ۴).

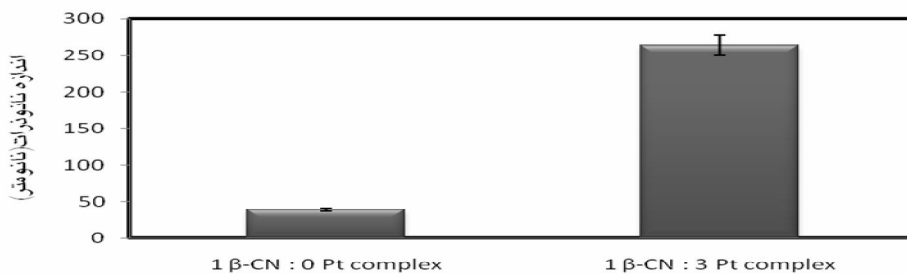
همان‌طور که در تصویر ۵ مشاهده می‌شود، در نسبت مولی $1\beta\text{-CN}: 3 [pI]$ ، نانوذراتی با توزیع اندازه-ای تقریباً یکنواخت و کروی به دست آمد.



تصویر ۱: الف) نشر فلورسانس β -CN در حضور غلظت‌های ۲۵-۴۰ میکرومولار از کمپلکس پلاتینی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. ب) نمودار F_0/F در مقابل $\frac{F_0}{F_0-F} [Pt]$ [Q] برای تعیین مقادیر ثابت اتصال و تعداد پلاتین‌های متصل شده روی پروتئین β -CN در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

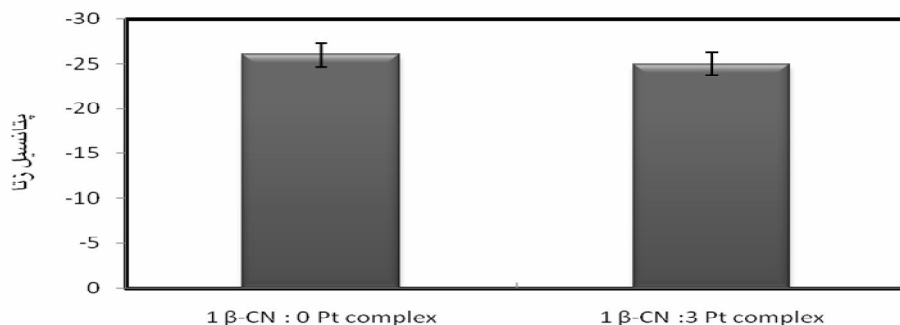


تصویر ۲: توزیع وزنی - حجمی اندازه‌ی ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر ذرات بتاکازئین خالص



نسبت مولی پروتئین بتاکازئین: کمپلکس پلاتین

الف: اندازه‌ی

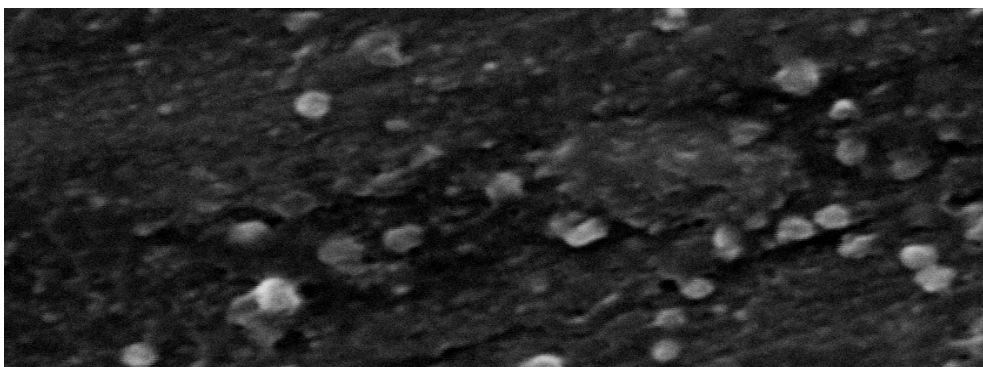


نسبت مولی پروتئین بتاکازئین: کمپلکس پلاتین

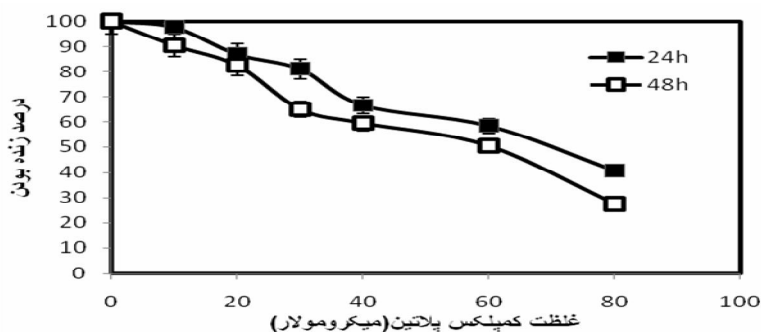
ب) پتانسیل زتای نانو ذرات

نانوذرات

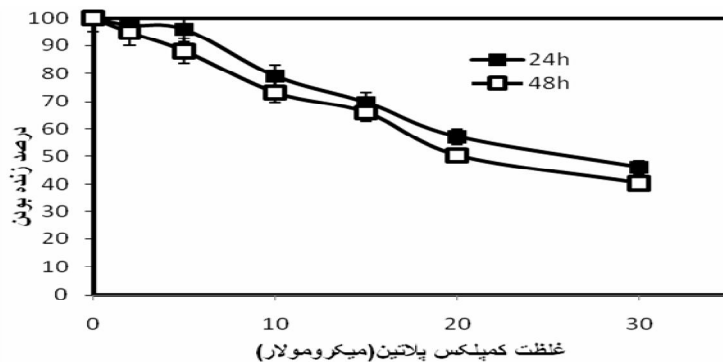
تصویر ۳: اندازه (الف) و پتانسیل زتای (ب) نانو ذرات به‌عنوان تابعی از نسبت مولی بتاکازئین: کمپلکس پلاتین.



تصویر ۴: تصویر میسل‌های بتاکازئینی حامل دارو با نسبت مولی ۳:۱ (بتاکازئین:کمپلکس پلاتین) (میکروسکوپ الکترونی روبشی، بزرگنمایی ۱۰)



الف) تأثیر کمپلکس پلاتینی رها (بدون کپسول) بر سلول‌های سرطانی



ب) تأثیر کمپلکس پلاتینی کپسوله بر سلول‌های سرطانی

تصویر ۵: فعالیت مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطان روده توسط کمپلکس پلاتین (با غلظت ۸۰-۰ میکرومولار) (الف) و میسل‌های لود شده با کمپلکس پلاتینی (غلظت ۳۰-۰ میکرومولار) (ب) پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون.

باشد. میسل‌های بتاکازئینی در محدوده نانو با موفقیت سنتز شدند و میسل‌های بتاکازئینی سنتزی نسبت به داروی بدون کپسول دارای اثر کشندگی

نتایج این مطالعه نشان داد که کمپلکس پلاتین با تمایل مناسبی با پروتئین بتاکازئین برهمکنش می‌دهد که احتمال دارد برهمکنش از نوع هیدروفوبی

و همچنین جذب الکتروستاتیکی دارو به سطح بیرونی- تر میسل‌های بتاکازئینی لود شده با دارو می‌باشد که منجر به القای تشکیل کلاستر چندین میسل چسبنده به هم می‌شود(۹).

در واقع نتایج پتانسیل زتا نیز تأیید کننده این مدل می‌باشد. پتانسیل زتا یک پارامتر برای ثبات و پایداری سیستم کلوئیدی می‌باشد. پتانسیل زتای ذرات هر قدر از صفر کوچک‌تر یا بزرگ‌تر باشد به همان اندازه نانو ذرات به دلیل دفع یکدیگر دارای پایداری بیشتری می‌باشند(۲۴). سنجش پتانسیل زتا از محلول کمپلکس پلاتینی خالص در مقابل نانومیسل‌های بتاکازئینی لود شده با دارو آشکار کرد که در حضور بتاکازئین، پتانسیل زتا کاهش می‌یابد. کاهش پتانسیل زتا به مقادیر منفی‌تر نسبت به داروی خالص نشان‌دهنده پایداری بیشتر داروی کپسوله شده در نانوحامل‌های بتاکازئینی می‌باشد. به طوری که مولکول‌های دارو به طور قابل توجهی در هسته و مابین میسل‌ها کپسوله می‌شوند و بنابراین از محلول آبی محیط محافظت می‌شوند(۹ و ۱۵).

در مطالعه‌ای که اثر کورکومین کپسوله شده در ذرات بتاکازئینی بر میزان کشندگی سلول‌های سرطان خون گزارش شده است و دارو در حالت کپسوله در دوزهای پایینی نسبت به دارو در شکل آزاد قدرت کشندگی داشت. این احتمال وجود دارد که افزایش حلالیت کورکومین، دسترسی زیستی این ترکیب را برای سلول‌های سرطان خون افزایش می‌دهد. به علاوه این پلیمر با دارا بودن ویژگی آنتی‌اکسیدانی خود از کورکومین در مقابل تنش‌های

بیشتری بر سلول‌های سرطان روده می‌باشند و منجر به افزایش دسترسی زیستی ترکیب پلاتینی می‌شوند. کمپلکس پلاتین به صورت خالص در بافر فسفات تجمعات مرئی تشکیل داد. در حالی که در همان غلظت در حضور بتاکازئین، محلولی پایدار از لحاظ کلوئیدی تشکیل شد که فاقد هر گونه تجمع دارویی بود. در مطالعه‌ای افزایش انحلال داروی ضدسرطانی پاکلیتاکسل به وسیله میسل‌های بتاکازئینی گزارش شده است. این نتایج احتمالاً بیان‌گر برهمکنش‌های مناسب بین دارو و میسل‌های بتاکازئینی، لود شدن دارو در هسته هیدروفوبی نانو ذرات و سرانجام افزایش انحلال دارو می‌باشند(۲۳).

نتایج تحقیقات اخیر نشان داده است که برهمکنش بین اکثر داروهای شیمی درمانی و پروتئین بتاکازئین اساساً از نوع هیدروفوبی می‌باشد که وابستگی شدیدی به ساختار داروی مورد استفاده دارد(۱۵).

شپیرا و همکاران(۲۰۱۰) مدلی که جهت سنتز نانو ذرات بتاکازئینی ارائه داده‌اند این است که مونومرهای بتاکازئین به دلیل ساختار دوگانه دوست مشخص خود تحت شرایط مناسب فیزیولوژیکی در محلول‌های آبی تجمع پیدا می‌کنند، مناطق هیدروفوبی آنها به صورت بین‌مولکولی در محلول برهمکنش داده و میسل‌های بتاکازئینی را تشکیل می‌دهند. با افزودن دارو اندازه نانو ذرات نسبت به میسل‌های تشکیل شده از پروتئین خالص افزایش پیدا می‌کند که به دلیل لود شدن دارو در هسته هیدروفوبی میسل‌های بتاکازئینی

اکسیداتیو مراقبت می‌کند. هم‌چنین این پروتئین در pH مربوط به محیط کشت (pH ۷/۴) باری منفی دارد. در نتیجه پروتئین حاوی کورکومین، با بار مثبت بیرونی غشای سلول تماس بیشتری خواهد یافت. به این ترتیب کورکومین قرار گرفته در درون میسل نسبت به کورکومین رها افزایش یافته و IC_{50} این کمپلکس نسبت به کورکومین بدون حامل کاسته می‌شود (۲۵ و ۱۴). هم‌چنین سلول‌های سرطانی دارای منافذ تقریباً ۴۰۰ نانومتری می‌باشند، پس نانوذرات کوچک‌تر می‌توانند از این منافذ به راحتی عبور کنند (۲۶).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از بررسی حاضر نشان داد که نانوذرات بتاکازئینی ظرفیت کپسوله کردن کمپلکس ضد سرطانی پلاتینی را دارند و می‌توانند به-عنوان نانو حامل در جهت پایدارسازی، انحلال‌سازی و رسانش هدفمند این دسته از داروهای ضد سرطانی به کار روند و هم‌چنین دسترسی زیستی کمپلکس پلاتینی قرار گرفته در درون میسل نسبت به داروی فاقد حامل افزایش یافت. بنابراین امید است با انجام مطالعات بیشتر از این نانو حامل به درمان سرطان کمک نمود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه خوارزمی بود که با حمایت مالی معاونت پژوهشی این دانشگاه انجام شد.

REFERENCES

1. Danhier F, Feron O, Préat V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* 2010; 148(2): 135–46.
2. Yoo J, Doshi N, Mitragotri S. Adaptive micro and nanoparticles: Temporal control over carrier properties to facilitate drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63(14-15): 1247–56.
3. Puch CBM, Barbier E, Kraut A, Couté Y, Fuchs J, Buhot A, et al. TOX4 and its binding partners recognize DNA adducts generated by platinum anticancer drugs. *Arch Biochem Biophys* 2011; 507 (2): 296–303.
4. Nojini ZB, Yavari F, Bagherifar S. Preference prediction for the stable inclusion complex formation between cucurbit[n=5–7]urils with anticancer drugs based on platinum (II): Computational study. *J Mol Liq* 2012; 166: 53–61.
5. Guven A, Rusakova IA, Lewis MT, Wilson LJ. Cisplatin@US-tube carbon nanocapsules for enhanced chemotherapeutic delivery. *Biomaterials* 2012; 33 (5): 1455-61.
6. Xue Y, Tang X, Huang J, Zhang X, Yu J, Zhang Y, Gui S. Anti-tumor efficacy of polymer-platinum(II) complex micelles fabricated from folate conjugated PEG-graft- α,β -poly [(N-amino acidyl)-aspartamide] and cis-dichlorodiammine platinum(II) in tumor-bearing mice. *Col Surf B: Bioint* 2011; 85 (2): 280–8.
7. Lila ASA, Doi Y, Nakamura K, Ishida T, Kiwada H. Sequential administration with oxaliplatin-containing PEG-coated cationic liposomes promotes a significant delivery of subsequent dose into murine solid tumor. *J Control Release* 2010; 142(2): 167–73.
8. Xing R, Wang X, Zhang C, Zhang Y, Wang Q, Yang Z, et al. Characterization and cellular uptake of platinum anticancer drugs encapsulated in apoferritin. *J Inorg Biochem* 2009; 103(7): 1039–44.
9. Shapira A, Markman G, Assaraf Y G, Livney Y D. β -casein-based nanovehicles for oral delivery of chemotherapeutic drugs: drug-protein interactions and mitoxantrone loading capacity. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2010; 6(4): 547–555.
10. Elzoghby AO, El-Fotoh WSA, Elgindy NA. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. *J Control Release* 2011; 153(3):206-16.
11. Horne DS. Casein structure, self-assembly and gelation. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2002; 7(5): 456–61.
12. Shapira A, Assaraf YG, Epstein D, Livney YD. Beta-casein Nanoparticles as an Oral Delivery System for Chemotherapeutic Drugs: Impact of Drug Structure and Properties on Co-assembly. *Pharm Res* 2010; 27(10): 2175–86.
13. Shapira A, Davidson I, Avni N, Assaraf Y G, Livney YD. B-Casein nanoparticle-based oral drug delivery system for potential treatment of gastric carcinoma: Stability, target-activated release and cytotoxicity. *Europ J Pharm and Biopharm* 2012; 80(2): 298–305.
14. Esmaili M, Ghaffari SM, Moosavi-Movahedi Z, Atri MS, Sharifzadeh A, Farhadi M, et al. Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin, food industry application. *Food Sci Technol-LEB* 2011; 44 (10): 2166-2172.
15. Shapira A, Assaraf YG, Livney YD. Beta-casein nanovehicles for oral delivery of chemotherapeutic drugs. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2010; 6(1): 119–26.
16. Chattopadhyay A, Raghuraman H. Application of fluorescence spectroscopy to membrane protein structure and dynamics. *Curr Sci* 2004; 87(2): 175-80.
17. Goldburg W I. Dynamic light scattering. *Am J Physics* 1999; 67(12):1152
18. Lim SF, Riehn R, Ryu WS, Khanarian N, Tung C, Tank D, Austin RH. In Vivo and Scanning Electron Microscopy Imaging of Upconverting Nanophosphors in *Caenorhabditis elegans*. *Nano Lett* 2006; 6(2): 169–74.
19. Jain A, Jain SK, Ganesh N, Barve J, Beg AM. Design and development of ligand-appended polysaccharidic nanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2010; 6(1): 179–90.
20. Mosmann TR. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
21. Divsalar A, Saboury AA, Yousefi R, Moosavi-Movahedi AA, Mansoori-Torshizi H. Spectroscopic and cytotoxic studies of the novel designed palladium (II) complexes: β -Lactoglobulin and K562 as the targets. *Int J Biol Macromol* 2007; 40(4): 381-6.
22. Liu XF, Xia YM, Fang YJ. Effect of metal ions on the interaction between bovine serum albumin and berberine chloride extracted from a traditional Chinese Herb *coptischinensisfranch* between. *Inorg Biochem* 2005; 99(7): 1449-57.
23. Bachar M, Mandelbaum A, Portnaya I, Perlstein H, Even-Chen S, Barenholz Y, et al. Development and characterization of a novel drug nanocarrier for oral delivery, based on self-assembled β -casein micelles. *J Control Release* 2012; 160(2): 164-71.
24. Ron N, Zimet P, Bargarum J, Livney YD. Beta-lactoglobulin-polysaccharide complexes as nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals in non-fat foods and clear beverages. *International Dairy J* 2010; 20 (10): 686-93.
25. Gary-Bobo M, Hocine O, Brevet D, Maynadier M, Raehm L, Richeter S. Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting, drug delivery and PDT. *Int J Pharm* 2012; 423 (2): 509-515.
26. Kim KY. Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2007; 3(2): 103–10.

The Effect of B-casein Nanoparticles on Bioavailability and Cellular Uptake of Platinum Complex as a Cancer Drug

Razmi M, Divsalar A*

Department of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Received: 30 April 2013

Accepted: 21 July 2013

Abstract

Background & aim: Due to the low solubility and high toxicity of drugs, treatment of cancers is problematic; therefore, the encapsulation and targeted delivery of therapeutic effect is required. The aim of this study was to investigate the effect of nanoparticles on cellular uptake and bioavailability of beta-casein on platinum complexes as cancer drugs.

Methods: In the present experimental study, the physicochemical properties of nanoparticles as drug carriers of beta-casein devices using dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM) were investigated. In order to evaluate the toxicity effects of platinum complexes, the colon cancer cells in the absence or presence of free platinum complex concentration and nanoparticle loaded with platinum complexes were incubated for 24 and 48 hours. LD50 Values (concentration of compound causing 50% mortality in the cells) was determined using the MTT assay. Data were analyzed by ANOVA and post-hoc test.

Results: At a concentration of 1 mg/ml, beta-casein nanoparticle drug carriers were synthesized in the range of 100 to 300 μM . In addition, the mortality rate in cancer cells by the release of platinum complexes (without and with the capsule), were 70 and 26 in 24 hours, and 60 μM and 21 μM in 48 hours respectively,

Conclusion: The study showed that the bioavailability of the encapsulated platinum complexes increases and new drug delivery system may be a good candidate for the treatment of cancer.

Key words: Beta-casein, Pt (II) Complex, Bioavailability, Nanocarrier, Micelle

*Corresponding Author: Divsalar A, Department of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
Email: divsalar@tmu.ac.ir; divsalar@khu.ac.ir