مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۹، شماره ۱/ فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶/ ۱۰۴-۹۳

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات ضد توموری نانوکپسول سیکلودکسترین حاوی بتولینیک اسید بر رده سلولی MCF_7

خدیجه شاهرخ آبادی[1*]، سعیده ظفر بالانژاد[1]، جواد بهارآرا[2]، مصطفی نصیریان شکیب[3]

[1]گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران؛ [2]مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران؛ [3]گروه علوم سلولی مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران.

تاریخ دریافت: ۹٤/۱۲/۱٦ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۲٤

چکیده:

زمینه و هدف: **ساخت و ترکیب داروهای جدید گیاهی و شیمیایی علیه بیماری هایی مثل سرطان، از جمله تلاش های مهم سال های اخیر محسوب می شود. ترکیبات ترپنی از جمله ترکیبات مهمی هستند که خواص بیولوژیکی و فارماکولوژیکی متعددی دارند، اما به دلیل حلالیت کم آن ها در محلول های آبی کمتر مورد توجه بوده اند. سیکلودکسترین ها نیز نانوکپسول های طبیعی تشکیل شده از واحدهای گلوکزی هستند که می توانند ایجاد نانوحفره نمایند. در این تحقیق ابتدا سعی گردید نانوکپسول حاوی دارو تهیه و سپس اثر آن بر روی سلول های سرطانی رده MCF_7 و در مقایسه با رده سلولی L_{929} مورد بررسی قرار گیرد.**

روش بررسی: **در این مطالعه تجربی ابتدا محلول های ۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪ سیکلودکسترین تهیه و با مقدار مساوی بتولینیک اسید ترکیب و به مدت ۲٤ ساعت توسط دستگاه روتاری همگن شد و با استفاده از HPLC مقدار بتولینیک اسید در هر غلظت محاسبه گردید. سپس رده های سلولی نرمال و سرطانی در محیط کشت مناسب آماده و به گروه های کنترل، تیمار یک، تیمار دو، و تیمار سه تقسیم شدند. سلول ها از نظر مورفولوژی، میزان تکثیر و بقای سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به کمک نرم افزار SPSS و آزمون های آماری در سطح ($P<۰/۰۵$) تجزیه و تحلیل گردید.**

یافته ها: **نتایج HPLC نشان داد که مقدار BT در محلول ۵٪ ۵۱ میکروگرم، در محلول ۱۰٪ ۵۸ میکروگرم و در محلول ۱۵٪ ۵۷ میکروگرم است. نتایج مرفولوژی و بقای سلولی نیز نشان داد که نانوذره حاوی BT، اثر مهارکنندگی معنی داری ($P<۰/۰۵$) نسبت به دو تیمار دیگر بر تکثیر سلول های سرطانی دارد.**

نتیجه گیری: **سیکلودکسترین، به عنوان نانوذره، می تواند ترکیب BT را در خود جای داده و با افزایش نفوذ به درون سلول تکثیر و بقای سلولی را مهار نماید.**

واژه های کلیدی: **بتولینیک اسید، سیکلودکسترین، نانوذره، L_{929} Cell Line، MCF_7 Cell Line.**

مقدمه:

ترپنوئیدها گروهی از ترکیبات هستند که خاصیت ضد سرطانی آن ها به اثبات رسیده و به طور وسیعی در طبیعت یافت می‌شوند. تاکنون حدود۴۰ هزار ترکیب ترپنی از گیاهان، جانوران و میکروب‌ها جدا شده‌اند (۱). در میان آن ها می‌توان به تری ترپن‌هایی با فعالیت‌های ضد سرطانی اشاره نمود که بتولین (Betulin) و بتولینیک اسید (Betulinic acid) از آن جمله است (۲،۱). این ترکیبات از گونه‌های مختلف گیاهی جدا شده‌اند، اما منبع اصلی آن ها درخت توس یا غان (Birch با نام علمی Betula) می‌باشد (۳).

*نویسنده مسئول: مشهد- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد- گروه زیست شناسی- تلفن: ۰۵۱-۳۸٤۳۵۰۵۰، E-mail: shahrokhabady@yahoo.com

سیکلودکسترین‌ها (CDs) نوعی نانوذرات از جنس الیگوساکاریدند که می‌توانند توده هایی در اندازه نانو در محیط های آبی تشکیل دهند. سه نوع α، β و γ بیشترین کاربرد را دارند که به ترتیب دارای ۶، ۷ و ۸ واحد گلوکزند. β سیکلودکسترین سازگاری بیشتری با بدن انسان دارد و به شکل گسترده تری مورد بررسی پژوهشگران است. در حالی که از β سیکلودکسترین بیشتر در فرمولاسیون دارویی استفاده می شود، از فرم γ به عنوان افزودنی غذایی استفاده می گردد (۶-۴). مهم ترین خاصیت CDs تشکیل کمپلکس های درونی (Inclusion Complexes) با مولکول های کوچک ترکیبات آلی و غیر آلی می باشد و همچنین دارای این خاصیت هستند که تعدادی از گروه های هیدروکسیل آن ها برای تعدیل و اصلاح با گروه های عاملی، تعویض شوند (۹-۷). مولکول‌های متعددی می‌تواند داخل حفره سیکلودکسترین‌ها شده و تشکیل Inclusion Complexes بدهند (۱۰). مهم ترین خصوصیت سیکلودکسترین ها توانایی تشکیل کمپلکس میزبان- مهمان است. مولکول مهمان درون نانوحفره نگه داشته شده یا گنجانده می شود، این فرایند را "در هم جای گرفتن" می نامند (۱۱).

به خاطر توانایی منحصر به فرد این سوپرماکرومولکول ها در جای دادن مولکول ها در حفره داخلی شان و نیز خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی دیگر آن ها، CDs ها و مشتقات شان در سیستم‌های دارورسانی (Drug Delivery) کاربرد وسیعی پیدا کرده اند (۱۳،۱۲). از این نانوذرات می توان برای بهبود انحلال، پایداری، افزایش فعالیت بیولوژیکی داروها و همچنین کاهش اثرات جانبی و سمیت استفاده کرد (۱۴). از طرفی CD ها انحلال داروها و مولکول های هیدروفوبیک را با اینکپسوله کردن آن ها در داخل حفره خود و یا تشکیل ساختارهای مخروطی شکل افزایش می دهند. در کپسوله کردن (پوشش دار کردن) یک دارو، تعیین مقدار دارو در اینکپسولاتور یا به عبارتی نانوذره، امری ضروری است. این موضوع از این جهت حائز اهمیت است که باید مقدار دارویی که بر روی رده سلولی اثر می گذارد، به طور واضح مشخص باشد. رده سلولی مورد استفاده از سرطان پستان انتخاب گردید. با توجه به این که شیوع سرطان پستان در سال های اخیر افزایش یافته است (۱۶،۱۵). همچنین این سرطان دومین عامل مرگ و میر در زنان، بعد از سرطان ریه بوده و بر اساس گزارشات کشوری شایع ترین سرطان در زنان است (۱۸،۱۷). بنابراین تدوین و بررسی راهکارهای جدید درمانی ضروری به نظر می رسد. در این تحقیق ابتدا نانوکمپلکس های حاوی بتولینیک اسید تهیه گردید، سپس مقدار دارو در نانوکمپلکس توسط HPLC اندازه گیری شد. آنگاه رفتار سلول های سرطانی در مقایسه با سلول های نرمال تحت تیمار این نانوکمپلکس ها مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی:

آزمایشات در دو مرحله انجام شد. ابتدا محلول های ۵، ۱۰ و ۱۵٪ (w/v) سیکلودکسترین (شرکت سازنده Purem) تهیه گردید و سپس با مقدار مساوی از بتولینیک اسید (Sigma) تا حد اشباع ترکیب شد. ترکیب حاصل از CD و بتولینیک اسید نانوکمپلکس BT نامیده شد. بعد از ترکیب برای ایجاد نانوکمپلکس BT، محلول های حاصل به وسیله‌ی دستگاه روتاتور به مدت ۲۴ ساعت هم زده شد تا از جایگزینی بتولینیک اسید در فضاهای خالی نانوذره اطمینان حاصل شده و نانوکمپلکس ها به بهترین نحو تشکیل گردند. از پرکاربردترین روش های تعیین مقدار دارو در نانوکمپلکس، اسپکتروفتومتری و HPLC می باشد (۱۹).

به منظور تعیین مقدار دارو از کروماتوگرافی با کارایی بالا مجهز به آشکارساز فلورسانس استفاده شد. ست کردن روش برای دستگاه HPLC، یکی از مراحل زمان بر و پر هزینه در روند تعیین مقدار دارو در HPLC است. بنابراین مراحل کروماتوگرافی و طیف سنجی شامل

انتخاب فاز ساکن ستون C18، انتخاب فاز متحرک (اتانول، آب و استونیتریل)، انتخاب طول موج مناسب (بتولینیک اسید دارای طول موج ۱۸۰ نانومتر است)، تهیه محلول های استاندارد و تزریق غلظت ها به دستگاه صورت گرفت (۲۰).

از این رو محلول های تهیه شده نانوکمپلکس در میکروتیوب های استریل فیلتر شد تا برای تعیین مقدار دارو در دستگاه HPLC مدل Breeze, USA مورد استفاده قرار گیرند. پس از مخلوط کردن بتولینیک اسید با CD اندازه گیری مقدار مولکول مهمان در حفره نانوذره نیز بسیار مهم است، زیرا مقدار دارویی که بر روی رده سلولی اثر می گذارد باید مشخص باشد. بنابراین ۲۰ میکرولیتر از محلول فیلتر شده به دستگاه تزریق شد. در این تحقیق زمان اقامت یا نگهداری (Retention Time)، ۱۰ دقیقه و فاز متحرک حاوی استونیتریل، اتانل و آب (تمام واکنشگرهای مورد استفاده از کمپانی Merk و با خلوص کروماتوگرافی) انتخاب شد. پس از تزریق در مدت زمان ۱۰ دقیقه دارو بر اساس زمان بازیابی خود که متناسب با میل ترکیبی آن با ستون فاز ثابت است به صورت پیک (Peak) روی صفحه مانیتور نمایان شد. دستگاه سطح زیر پیک را محاسبه کرده و بر اساس آن به طور خودکار میزان دارو را بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه و اعلام می نماید. قبل از هر آزمایش دستگاه کالیبره شده و دقت آن بررسی شد. برای افزایش ضریب اطمینان (R^2) و کاهش خطا تعداد دفعات آزمایش افزایش داده شد.

برای رسم نمودار سه غلظت بالا، متوسط و پایین (غلظت ۳۳۳ppm، ۶۶۶ppm و ۱۰۰۰ppm) و هر غلظت ۵ بار تکرار شد. بعد از رسم نمودار و تعیین مقدار R^2، معادله خطی به دست می آید که از آن برای تعیین مقدار بتولینیک اسید در نانوکمپلکس های سیکلودکسترین استفاده می شود. در مرحله بعد انجام کشت و تیمار سلولی صورت گرفت. رده های سلولی L_{929} و MCF_7 (تهیه شده از انیستیتوپاستور تهران) در محیط کشت DMEM به همراه ۱۰٪ FBS و ۰/۵ cc پنی سیلین- استرپتومایسین در دمای ۳۷° و در انکوباتور ۵٪ CO_2 با RH=۱۰۰ رشد داده شدند.

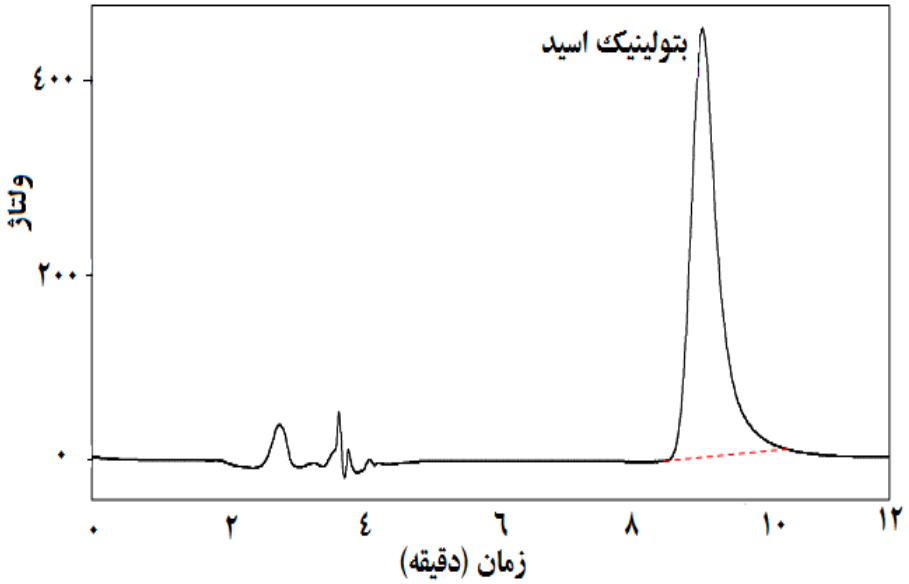
برای هر رده سلولی (L_{929} و MCF_7) ۷ فلاسک T_{25}، هر یک حاوی 5×10^5 سلول در ۵ cc محیط کشت، پیش‌بینی شد. پس از ۲۴ ساعت که از چسبندگی سلول‌ها اطمینان حاصل شد، فلاسک ها به صورت تصادفی به گروه های زیر تقسیم شدند: تیمار قندی ۵٪ و تیمار قندی ۱۰٪، تیمار بتولینیک اسید حاوی ۵۸ میکروگرم و تیمار بتولینیک اسید حاوی ۵۱ میکروگرم، دو گروه تیمار بتولینیک اسید انکپسوله شده (نانوکمپلکس BT، ۵٪ و ۱۰٪) و فلاسک کنترل یا شاهد که هیچ گونه تیماری در آن انجام نشد. برای مقایسه مورفولوژی سلول‌ها، میزان چسبندگی و میزان گرانوله شدن سلول‌ها از هر ۷ فلاسک حاوی سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت و به مدت ۵ روز با دوربین دیجیتال (Nikon) و با درشت‌نمایی ۲۰X میکروسکوپ معکوس (Nikon) عکس گرفته شد. عکس‌ها برای مقایسه نتایج مورفولوژی ذخیره گردید. همچنین شمارش تعداد سلول به روش تریپان بلو انجام گردید.

برای مقایسه میزان تکثیر و بقای سلولی از روش رنگ سنجی با رنگ MTT استفاده شد. ترکیب MTT نمک دی متیل تترازولیوم بروماید است که در حضور آنزیم دهیدرژناز میتوکندریایی تولید کریستال های فرمازون می کند. فرمازون در حضور دی متیل سولفوکسید (DMSO Biogen) حل شده و تولید رنگ ارغوانی می نماید. هرچه رشد و تکثیر سلولی بیشتر باشد، جذب رنگ بیشتر خواهد شد. آزمایش MTT برای هر دو رده سلولی و در غلظت‌های متفاوت دارو، به صورت سه تایی طبق پروتکل ذیل صورت گرفت: سه پلیت ۹۶خانه ای برای سه روز جداگانه در نظر گرفته شد. از هر رده سلولی سوسپانسیون سلولی تهیه شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید، برای این که در هر ول حتماً تعداد 5×10^3 سلول قرار گیرد، انجام تست تریپان بلو و شمارش تعداد سلول‌ها صورت گرفت)، پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت برای اطمینان از چسبیدن سلول ها به کف، در انکوباتور ۵٪ CO_2 و با رطوبت ۱۰۰٪ انکوبه شدند،

سپس تیمار بتولینیک اسید، سیکلودکسترین و تیمار نانوکمپلکس BT، به هر ردیف سه تایی ول های حاوی سلول کشت شده انجام گردید. بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۲۰ میکرولیتر MTT به ترتیب به چاهک های هر پلیت افزوده شد، سپس هر پلیت به مدت ۴ ساعت در تاریکی انکوبه شده و در نهایت پس از خالی کردن پلیت، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر، DMSO به هر ول اضافه و خوب مخلوط گردید. سپس جذب نوری چاهک ها توسط دستگاه Plate Eliza Reader (Stat-Fax. USA) قرائت شد. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS توسط آزمون آماری ANOVA و توکی در سطح P<۰/۰۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها:

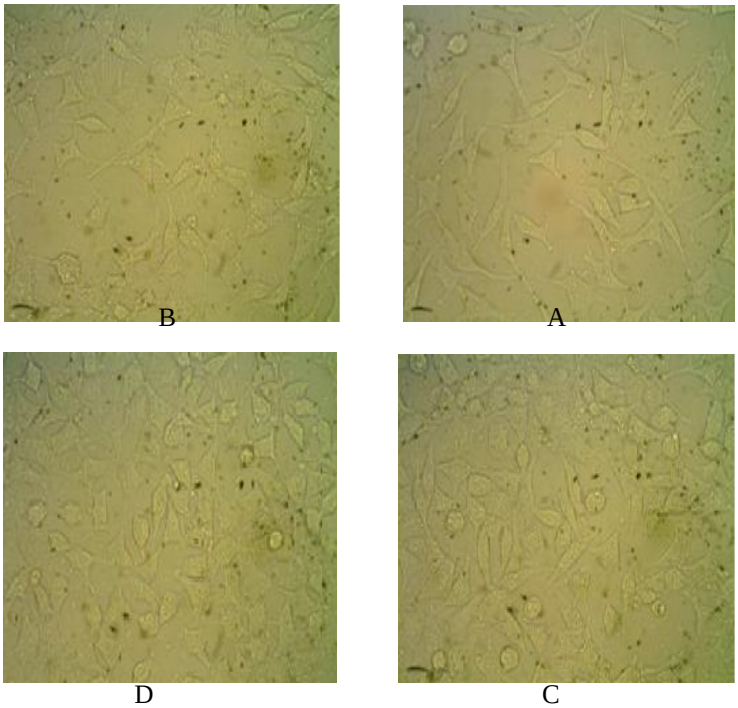
در مرحله اول تعیین مقدار دارو به روش HPLC، و با انجام محاسبات مشخص شد که در کمپلکس ۵٪ نانوذره، مقدار بتولینیک اسید ۵۱ میکروگرم و در کمپلکس ۱۰٪، مقدار آن ۵۸ میکروگرم است. برخلاف انتظار ما مبنی بر افزایش مقدار بتولینیک اسید در کمپلکس ۱۵٪، مقدار آن ۵۷ میکروگرم گزارش گردید؛ لذا به دلیل تکرار مقدار کمپلکس ۱۵٪، نتایج این کمپلکس بر روی رده های سلولی گزارش نشده است. رسم منحنی کالیبراسیون و تعیین مقدار R^2 (معادله رگرسیون) به وسیله نرم افزار اکسل انجام پذیرفت. پس از رسم نمودار با استفاده از معادله ی خطی Amount= A × Area + b مقدار بتولینیک اسید در نانوکمپلکس های سیکلودکسترین به دست آمد. نمودار شماره ۱ کروماتوگرام حاصل از تزریق بتولینیک اسید به دستگاه HPLC را نشان می دهد. اغلب برای ارزیابی داده ها با استفاده از دستگاه HPLC و برنامه آن از سطح زیر منحنی استفاده می‌شود که سطح زیر منحنی یا زیر پیک نیز به اندازه ذرات داخل ستون بستگی دارد.



نمودار شماره ۱: کروماتوگرام حاصل از تزریق بتولینیک اسید و تشکیل سطح زیر منحنی در روش HPLC

فلاسک های حاوی سلول های نرمال (L_{929}) و سرطانی (MCF_7) در روزهای اول تا پنجم پس از کشت مورد مطالعه مورفولوژیکی قرار گرفتند. تصاویر ۱ و ۲ تغییرات مورفولوژی سلول ها را در زمان های مختلف نشان می دهند. بررسی سلول های نرمال (L_{929}) نشان داد که نمونه های تیمار در روزهای اول، دوم و سوم هیچ گونه تفاوتی با سلول های کنترل نداشتند. در روزهای ۴ و ۵ به علت افزایش تعداد سلول ها و به واسطه‌ی کاهش سطح،

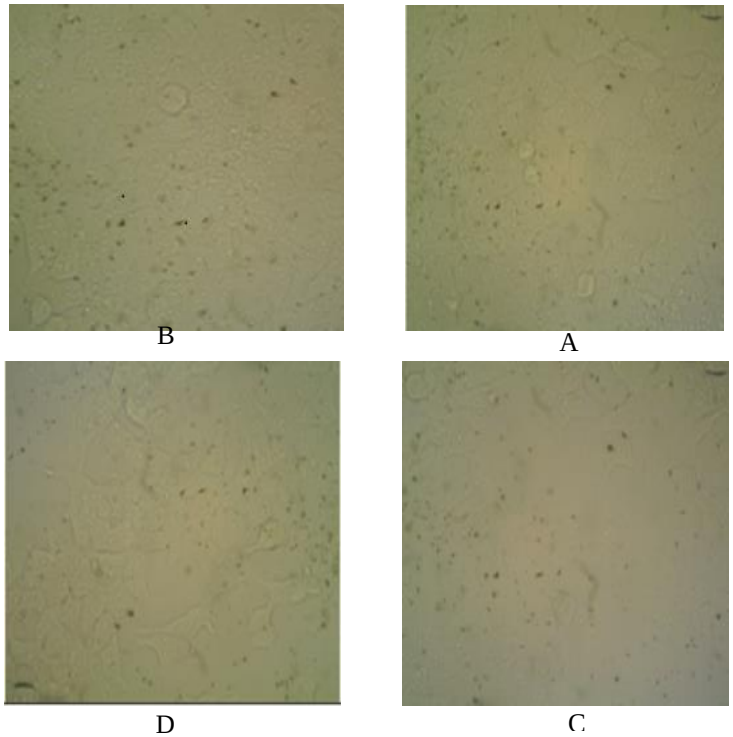
تراکم سلول ها زیاد شده و این مسأله در تمام فلاسک ها قابل مشاهده بود؛ اما تغییراتی که نشان دهنده گرانوله شدن هسته و سیتوپلاسم، افزایش زوائد سیتوپلاسمی و واکوئله شدن باشد، در این ۵ روز در سلول‌های نرمال دیده نشد. تصویر شماره ۱ سلول های L_{929} را در روز سوم در تیمارهای مختلف نشان می دهد.



تصویر شماره ۱: سلول های L_{929}، در تیمارهای مختلف نسبت به نمونه کنترل در روز سوم کشت

*تفاوت تکثیری میان نمونه کنترل و تیمارهای مختلف مشاهده نمی شود؛ **A**: نمونه کنترل؛ **B**: تیمار بتولینیک اسید (**BT**) ۱۰٪؛ **C**: تیمار سیکلودکستران (**CD**) ۱۰٪؛ **D**: تیمار کمپلکس انکپسوله شده ۱۰٪؛ بزرگنمایی ۲۰X اینورت میکروسکوپ.*

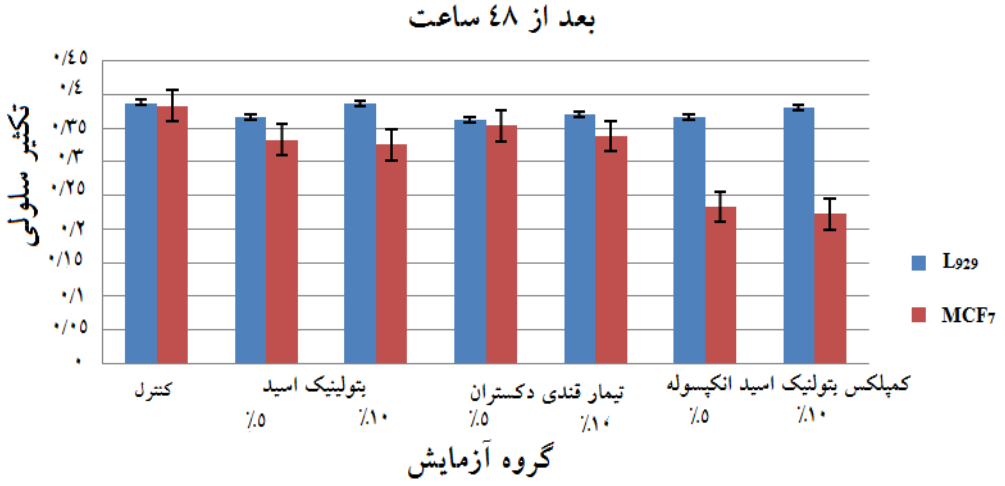
مقایسه و بررسی سلول‌های MCF_7 در روزهای مختلف کشت تغییرات و تفاوت های بارزی از نظر مورفولوژی نشان داد. مهار رشد و مهار تکثیر سلولی به طور دسته جمعی یا منفرد با مورفولوژی ستاره ای شکل، تحلیل و کوچک شدن سلولی، افزایش اندازه واکوئل درون سلولی، کاهش سیتوپلاسم و پیگمانه شدن هسته، از جمله این تغییرات بود. مقایسه شکل‌ها و تغییرات ظاهری درون سیتوپلاسمی و هسته ای نشان داد که تیمار "نانوکمپلکس BT" می تواند اثر سایتوتوکسیسیتی بر سلول‌های توموری داشته باشد. مقایسه مورفولوژی و تکثیر سلولی در فلاسک ها نشان داد که در تیمارهای قندی توقف تکثیر یا کم شدن اجتماع سلول ها وجود ندارد، اما مورفولوژی سلول ها تحت تیمار بتولینیک اسید و تیمار نانوکمپلکس BT بسیار متغیر بود. به نظر می رسد قدرت نفوذ نانوکمپلکس BT به درون سلول ها و سپس تأثیر از طریق مکانیسم درون سلولی از عوامل مهار رشد و عدم تکثیر سلول های توموری باشد. سلول های تیمار شده با نانوکمپلکس BT تغییرات واضحی از نظر گرانوله شدن هسته و تخریب سیتوپلاسم نسبت به سایر تیمارها نشان دادند. این نتایج همچنین امکان این که اثر ضد توموری ترکیب انکپسوله شده ممکن است به علت عوامل و ترکیبات موثر بتولین علیه سلول های سرطانی باشد را افزایش می دهد. تصویر شماره ۲ نتایج تغییرات مورفولوژیکی سلول های سرطانی را در نمونه کنترل و تیمارها نشان می دهد.



تصویر شماره ۲: سلول های MCF7 در تیمارهای مختلف در مقایسه با نمونه کنترل در روز سوم کشت

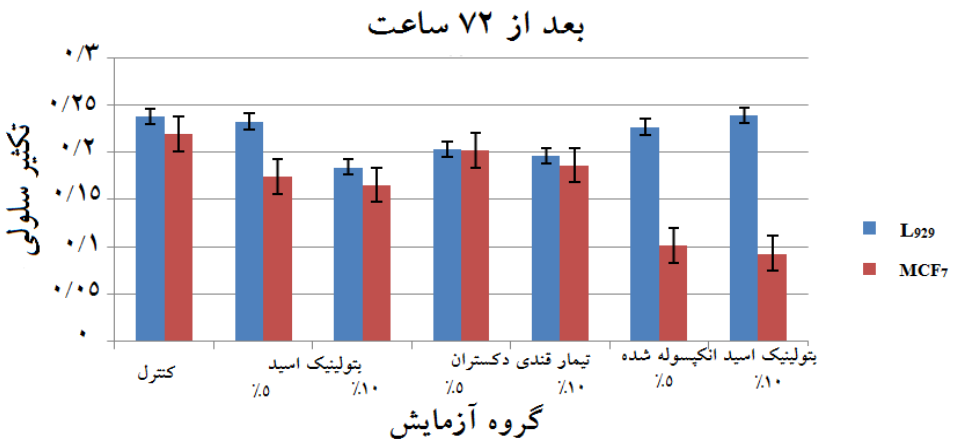
*تفاوت تکثیر میان نمونه کنترل نسبت به تیمارهای مختلف مشاهده می گردد؛ **A**: کنترل؛ **B**: تیمار بتولینیک اسید (**BT**) ۱۰٪؛ **C**: تیمار سیکلودکستران (**CD**) ۱۰٪؛ **D**: تیمار کمپلکس انکپسوله شده ۱۰٪؛ کاهش تعداد سلول ها و مورفولوژی تغییر یافته در تیمار انکپسوله شده مشاهده می گردد؛ بزرگنمایی ۲۰X اینورت میکروسکوپ.*

نمودارهای شماره ۲ و ۳ نتایج تست MTT را ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت نشان می دهد (نتایج مربوط به پلیت ۲۴ ساعته گزارش نگردید). نمودار تکثیر سلولی ۴۸ ساعته نشان می دهد که بقای سلولی در نانوکمپلکس های ۵٪ و ۱۰٪ نسبت به کنترل به صورت معنی دار (P<۰/۰۵) کاهش یافته است. این کاهش پس از ۷۲ ساعت نیز معنی دار است که در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است (P<۰/۰۵).



نمودار شماره ۲: نتایج حاصل از آزمون MTT پس از ٤٨ ساعت

مقایسه تکثیر سلولی نمونه های تیمار با نمونه کنترل؛ کاهش تعداد سلول ها در تیمار انکپسوله شده معنی دار است (P<۰/۰۵).



نمودار شماره ۳: نتایج حاصل از آزمون **MTT** پس از ۷۲ ساعت

مقایسه تکثیر سلولی نمونه های تیمار با نمونه کنترل؛ کاهش تعداد سلول ها در تیمار انکپسوله شده معنی دار است (P<۰/۰۵).

بحث:

این پژوهش با هدف بررسی و ارزیابی اثر نانوکمپلس‌های سیکلودکسترین حامل بتولین یا بتولینیک اسید بر روی رده سلولی MCF_7 و L_{929} انجام شد. برای این منظور سلول‌های سرطانی و نرمال رشد داده شدند و پس از تیمار از نظر مورفولوژی و میزان تکثیر و بقای سلولی بررسی گردیدند. در این تحقیق با استفاده از نانوذره‌های زیست سازگار و زیست تخریب پذیر، سعی کردیم هم محلولیت BT را افزایش دهیم و هم اثرات این ترکیب را بر روی رده های سلولی نرمال و سرطانی بررسی کنیم و به این سوال پاسخ دهیم که ترکیبات ترپنی در کدام حالت بر سلول ها تأثیر بیشتری دارد: حالت آزاد یا در نانوکمپلکس سیکلودکسترین حاوی BT.

در این تحقیق ابتدا با استفاده از تزریق بتولینیک اسید و استفاده از HPLC نمودار کالیبراسیون R_2 رسم و رابطه خطی به دست آمد و سپس با استفاده از اطلاعات مربوط به تزریق نانوکمپلکس BT، مقدار BT جای گرفته در حفره ترکیبات سیکلودکسترین محاسبه گردید. سپس تغییرات مورفولوژیکی سلول ها تحت تیمارهای مختلف بررسی و مشخص شد که سلول های سرطانی تحت تأثیر نانوکمپلکس BT تغییرات مورفولوژی بیشتری نشان دادند، در حالی که در سلول های نرمال تغییرات معنی دار نبود. همچنین نتایج سنجش MTT نشان داد که نانوکمپلکس BT، با توجه به نفوذ بیشتر به درون سلول ها، اثرات مهارکنندگی معنی داری بر روی تکثیر سلولی دارد، در حالی که سلول های تحت تأثیر دکسترین و همچنین سلول های تحت تیمار BT به تنهایی، مهار کمتری را نشان دادند که نشان از اثر موفقیت آمیز بتولینیک اسید انکپسوله شده بر ممانعت از تکثیر و از بین بردن سلول های سرطانی است. این تغییرات همچنین بیانگر آن است که در سطح مولکولی نیز بتولینیک اسید میتواند سنتز اسید نوکلئیک را مهار کند (۲۱). یکی دیگر از موارد فرآوری داروهای گیاهی، افزایش حلالیت آن هاست، به عنوان مثال مدتی است بتولینیک اسید به عنوان ماده ضد سرطان معرفی شده، ولی به دلیل کاهش حلالیت آن در محیط آبی، هنوز توفیقات لازم جهت تبدیل شدن به یک داروی مفید را به دست نیاورده است (۲). بتولینیک اسید از جمله ترکیبات گیاهی است که خواص درمانی متعددی برای آن ذکر شده و در طب سنتی کاربرد فراوان داشته است (۳). در طی سالیان اخیر مطالعات و تحقیقات متعددی در زمینه های مختلف در ارتباط با بتولین و مشتقات آن صورت گرفته است. بعضی از این مطالعات در خصوص سنتز ترکیبات متعدد و مشتقات قابل حل در حلال های آلی و معدنی بوده و برخی فعالیت بیولوژیکی این ترکیبات و مشتقات سنتز

شده و اثرات آن ها را بر روی رده های متعدد و مختلف سرطانی بررسی نموده اند. در همین راستا، Kim و همکاران اثر ترکیبات بتولین را بر روی چند رده سلول سرطانی (از جمله سلول های سرطانی کلون، پروستات و ملانوما) بررسی کردند. آنان سعی کردند با تغییرات شیمیایی در استخلاف کربن شماره ۲۰ بتولینیک اسید حلالیت ترکیب را تغییر داده و نفوذپذیری این ترکیب را به درون سلول ها افزایش دهند. بنابراین موقعیت کربن شماره ۲۰ و تغییرات آن کاندیدی برای افزایش حلالیت و نفوذپذیری بتولینیک اسید به درون سلول گردید (۲۲). Mukherjee و همکاران به مطالعه اثر ضد سرطانی مشتقات بتولینیک اسید بر روی چندین رده سلول سرطانی پرداخته و همچنین فعالیت ضدرگزایی مشتقات بتولینیک اسید را گزارش کردند. آنان ابتدا مشتقات اسیل، برومو و دی برومو بتولینیک اسید را سنتز و سپس میزان فعالیت ترکیبات سنتز شده را بر روی نه رده سلول سرطانی مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن ها نشان داد که بعضی از مشتقات اثرات موثرتری بر تکثیر سلول های سرطانی نشان دادند. بنابراین آن ها ارتباط میان ساختار ترکیب با میزان فعالیت ترکیب را گزارش کردند (۲۳).

همچنین Gauthie و همکاران به دلیل اهمیت خواص فارماکولوژیکی و پزشکی بتولین، با استخراج آن و ترکیبات تری ترپنی از گونه های مختلف درخت بتولا و گلیکوزیلاسیون این ترکیبات، قصد افزایش محلولیت این ترکیبات را داشتند. آنان با توجه به محلولیت ضعیف بتولینیک اسید در آب که مانع فعالیت طبیعی این ترکیب است، اقدام به افزایش واحدهای گلیکوزیدی متنوع به بتولین و مشتقات آن کردند. سپس در محیط *in vitro* خواص سایتوتوکسی سیتی آن ها را بر روی سه رده سلولی بررسی کردند. نتایج آن ها نشان داد که بر اساس افزایش نوع واحد قندی و همچنین مکان آن در ترکیبات سنتز شده، میزان افزایش یا کاهش فعالیت بر علیه سلول های سرطانی متفاوت است (۲۴). از طرفی Santos و همکاران اقدام به سنتز مشتقات ایمیدازولی بتولین و بتولینیک اسید نمودند تا علاوه بر بررسی رفتار آن ها، اثر این ترکیبات را بر روی چند رده سلولی سرطانی نیز بررسی کنند. نتایج آن ها نشان داد که بعضی از ترکیبات ساخته شده IC_{50} کمتر از ۲ میکرومول نشان دادند. بنابراین ارتباط بین ساختار ترکیبات و میزان فعالیت آن بر روی رده های سلولی گزارش گردید (۲). تیم Dehelean و همکاران استخراج مواد موثر از پوسته درخت Brich را مورد هدف قرار داده و خلوص ترکیبات استخراج شده را با استفاده از روش های HPLC-MS، اسپکتروفتومتری Raman و NMR در حدود ۹۰٪ اندازه گیری کردند. سپس در *in vitro* اثرات مهارکنندگی ترکیبات استخراج شده را بر روی سلول های سرطانی پوست (A431)، کارسینومای تخمدان (A2780)، و سلول های هلا مورد بررسی قرار داده و میزان سیتوتوکسی سیتی آن را گزارش کردند. تمام ترکیبات استخراج شده خاصیت ضدتکثیری بر روی سل لاین های سرطانی نشان داد (۲۵). همچنین Tijjani و همکاران با توجه به خصوصیات گیاه *Adenium obesum* از خانواده خرزهره، با استفاده از ترکیبات آلی و مواد موثره نفتی، ترکیباتی را از پوست ساقه این گیاه استخراج کرده و با استفاده از روش NMR و اسپکتروفتومتری نشان دادند بیشترین مواد موثره در ترکیبات استخراج شده بتولین بود. ترکیبی که با توجه به داده های NMR منتظر آن بودند. بنابراین گزارش کردند به جز درخت Brich (توس) این خانواده نیز می توانند به فراوانی حاوی بتولین باشند (۲۶). محققان دیگری مشتقات استیلیک کربن های ۶-۳ بتولین را سنتز کرده و با هدف افزایش حلالیت و نفوذپذیری درون سلولی، تمام ترکیبات سنتز شده را بر روی سلول های سرطانی بررسی کردند. نتایج آن ها نیز نشان داد ترکیبات جدید مشتق شده در استخلاف های کربن بتولین اثرات سایتوتوکسی سیتی بهتری نسبت به بتولین بر روی سلول های آدنوکارسینومای کلورکتال (SW707)، لوکمیا (CEM)، و رده های سلولی P388 و T47D سرطان سینه نشان دادند (۲۷). همان گونه که مطالعات گزارش شده نشان می دهد، به دلیل حلالیت کم بتولین و بتولینیک اسید در محلول های آبی، محققان

سعی در ایجاد تغییر در ساختمان آن و افزایش حلالیت، نفوذپذیری، پایداری و همچنین افزایش اکتیویته آن داشته اند. در این تحقیق سعی شده است با وارد کردن BT به درون نانوذره میزان حلالیت و نفوذپذیری ترکیب را به درون سلول افزایش داده و اثرات آن را بر روی سلول های سرطانی بررسی گردد. همچنین با توجه به مطالعات انجام شده در سیکلودکسترین ها به عنوان حامل دارویی پروستاگلاندین B/E_2 و همچنین سیکلودکسترین حاوی قرص پیروکسیکام β، به نظر می رسد امروزه استفاده از سیکلودکسترین ها به عنوان مولکول های دارورسان همچنان رواج داشته باشد (۲۸). از مهم ترین زمینه های دیگری که نانوکپسول سیکلودکسترین در آن ها کاربرد دارد، می توان به مواردی همچون داروسازی، اغذیه و موادغذایی، وسایل آرایشی، مدل های آنزیمی و کاتالیستی اشاره کرد. همچنین کاربرد این نانوکپسول ها در زمینه هایی مثل بهبود فعالیت شیمیایی مولکول مهمان، ثبات بخشیدن به مواد خیلی فرار، بهبود حلالیت مواد آب گریز با حلالیت کم در آب و ... نیز فراهم است (۲۹،۳۰). از طرف دیگر، با توجه به تحقیقات انجام شده اثبات این که بتولینیک اسید در مهار رشد واریته های مختلف سلول های سرطانی اثر بازدارنده دارد یا خیر نیاز به تحقیقات بیشتر و جامع تری دارد، اما در سنجش سایتوتوکسیسیتی به صورت *in vitro* نشان داده شد که بتولینیک اسید می تواند رشد و تکثیر سلولی و همچنین سنتز اسید نوکلئیک را در سلول های توموری مهار کند که این نتایج با نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نیز مطابقت دارد (۲۱). بنابراین به نظر می رسد ترکیبات ترپنی که منبعی از عوامل ضد توموری هستند و نیز ترکیبات استخراج شده از گیاهان می تواند به عنوان برخی منابع جدید دارویی مطرح شده و با توجه کارآیی زیاد نانوکپسول های سیکلودکسترین، امید زیادی برای کشف داروهای جدید باشند.

نتیجه‌گیری:

بر اساس مطالعه انجام شده در پژوهش حاضر بر روی سلول های طبیعی و سرطانی، مشخص گردید که نانوکمپلکس حاوی BT قادر است مورفولوژی و بقای سلول های سرطانی را به صورت معنی داری نسبت به تیمارهای دیگر تحت تأثیر قرار دهد. این نتیجه همراه با نتایج دیگر مربوط به فعالیت های درمانی بتولینیک اسید علیه برخی از بیماری ها، شواهد مستدلی هستند که سیکلودکسترین و نانوذره ها می تواند عامل مفیدی در سیستم دارورسانی و در ارتباط با سرطان باشد.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش نتیجه ی طرح تحقیقاتی شماره ۳۱۸، مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی است. بدین وسیله از کلیه همکاران و همچنین آزمایشگاه تحقیق و تکوین جانوری و نیز مدیریت گروه زیست شناسی تشکر و قدردانی می گردد.

منابع:

1. Bishayee A, Ahmed S, Brankov N, Perloff M. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. Front Biosci. 2011; 16: 980-96.

2. Santos RC, Salvador JA, Marin S, Cascante M. Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity. Bioorg Med Chem. 2009; 17(17): 6241-50.

3. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. J Ethnopharmacol. 2005; 100(1-2): 72-9.

4. Messner M, Kurkov SV, Jansook P, Loftsson T. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. Int J Pharm. 2010; 387(1): 199-208.

5. Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: A review. Process biochemistry. 2004; 39(9): 1033-46.

6. Lien NR, Telford JR. An investigation of the inclusion complex of cyclomaltoheptaose (beta-cyclodextrin) with N-methylanthranilic acid in the solid state. Carbohyd Res. 2009; 344: 606-16.
7. Naseri NG, Ashnagar A, Yousefian L. Study of the inclusion complexation of [beta]-cyclodextrin-chloramphenicol and determination of its stability constant. Chem Asian J. 2007; 19(1): 255.
8. Eguchi M, Du Y-Z, Taira S, Kodaka M. Functional nanoparticle based on β-cyclodextrin. Nanobiotechnol. 2005; 1(2): 165.
9. Csuk R, Barthel A, Kluge R, Strohl D. Synthesis, cytotoxicity and liposome preparation of 28-acetylenic betulin derivatives. Bioorg Med Chem. 2010; 18(20): 7252-9.
10. Li J, Loh XJ. Cyclodextrin-based supermolecule architecture: Syntheses, structure, and application for drug and gene delivery. Advance Drug Delivery. 2008; 80(9): 1000-17.
11. Witlicki EH, Andersen SS, Hansen SW, Jeppesen JO, Wong EW, Jensen L, et al. Turning on resonant SERRS using the chromophore-plasmon coupling created by host-guest complexation at a plasmonic nanoarray. J Am Chem Soc. 2010; 132(17): 6099-107.
12. Bertolla C, Rolin S, Evrard B, Pochet L, Masereel B. Synthesis and pharmacological evaluation of a new targeted drug carrier system: Beta-cyclodextrin coupled to oxytocin. Bioorg Med Chem Lett. 2008; 18(6): 1855-8.
13. Evrard B, Bertholet P, Gueders M, Flament MP, Piel G, Delattre L, et al. Cyclodextrins as a potential carrier in drug nebulization. J Control Release. 2004; 96(3): 403-10.
14. Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. AAPS Pharm Sci Tech. 2005; 6(2): E329-57.
15. Kamali E, Tavassoli M, Hemmati S. Association between the polymorphism of CA dinucleotide repeat in intron 1 of NFκB1 gene and risk of breast cancer. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(3) 47-51.
16. Rezaianzadeh A, Heydari ST, Hosseini H, Haghdoost AA, Barooti E, Lankarani KB. Prevalence of breast cancer in a defined population of iran. Iran Red Crescent Med J. 2011; 13(9): 647-50.
17. Jalali Nadoushan M, Davati A, Akhavan F. Expression of E-cadherin in primary breast cancer and its correlation with prognostic factors. J Shahrekord Univ Med Sci. 2009; 11(3): 55-60.
18. Iranian Cancer Office. [Center for diseases managment. Iranian cancer registery report in 2005. 1st ed. Tehran: Center for Diseases Management Pub; 2007: 67-104.
19. Siddiqui MR, Alothman ZA, Rahman N. Analytic techniques in pharmaceutical: A Review. Arab J Chem. 10(Suppl 1), 2017: S1409-S1421.
20. Rouessac F, Rouessac A. Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques. USA: John Wiley and Sons; 2013.
21. Drag-Zalesinska M, Kulbacka J, Saczko J, Wysocka T, Zabel M, Surowiak P, et al. Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells. Bioorg Med Chem Lett. 2009; 19(16): 4814-7.
22. Kim JY, Koo HM, Kim DS. Development of C-20 modified betulinic acid derivatives as antitumor agents. Bioorg Med Chem Lett. 2001; 11(17): 2405-8.
23. Mukherjee R, Jaggi M, Siddiqui MJ, Srivastava SK, Rajendran P, Vardhan A, et al. Synthesis and cytotoxic activity of 3-O-acyl/3-hydrazine/2-bromo/20, 29-dibromo betulinic acid derivatives. Bioorg Med Chem Lett. 2004; 14(15): 4087-91.
24. Gauthier C, Legault J, Lebrun M, Dufour P, Pichette A. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent *in vitro* cytotoxic agents. Bioorg Med Chem. 2006; 14(19): 6713-25.
25. Dehelean CA, Soica C, Ledeti I, Aluas M, Zupko I, A GL, et al. Study of the betulin enriched birch bark extracts effects on human carcinoma cells and ear inflammation. Chem Cent J. 2012; 6(1): 137.

26. Tijjani A, Ndukwe I, Ayo R. Isolation and characterization of Lup-20 (29)-ene-3, 28-diol (Betulin) from the Stem-Bark of Adenium obesum (Apocynaceae). Trop J Pharm Res. 2012; 11(2): 259-62.
27. Boryczka S, Bebenek E, Wietrzyk J, Kempinska K, Jastrzebska M, Kusz J, et al. Synthesis, structure and cytotoxic activity of new acetylenic derivatives of betulin. Molecules. 2013; 18(4): 4526-43.
29. Namazi H, Kanani A. Investigation diffusion mechanism of β-lactam conjugated telechelic polymers of PEG and β-cyclodextrin as the new nanosized drug carrier devices. Carbohydr Polym. 2009; 76(1): 46-50.
30. Namazi H, Bahrami S, Entezami AA. Synthesis and controlled release of biocompatible prodrugs of beta-cyclodextrin linked with PEG containing ibuprofen or indomethacin. Iran Polym J. 2005; 14(10): 921.

.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2017; 19(1): 93-104. **Original article**

Evaluation of the antitumor effect of betulin-containing cyclodextrin nanocapsules on MCF_7 Cell Line

Shahrokhabadi KH[1*], Zafar Balanezhad S[1], Baharara J[2], Nasirian Shakib M[3]
[1]Biology Dept., Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I.R. Iran; [2]Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University Mashhad, I.R. Iran; [3]Biology Dept., Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, I.R. Iran.
Received: 6/Mar/2016 Accepted: 13/Jun/2016

Background and aims: Production and synthesis of new phitochemical drugs against diseases such as cancer are the important efforts that happened recently. Triterpens compounds are important in biological and pharmacological properties, but because of low solubility in aqueous solutions, are less considered. Cyclodextrins as natural nanocapsules are comprised of glucose units. One of the characteristics of them are create complex with hydrophobic guest molecules in nanopores its. In this study it was tried to provide betulinic acid combined with cyclodextrin and nanocapsules containing medicines and its effect on cancer cell line MCF7 was examined.
Methods: In this experimental study, first 5, 10 and 15% cyclodextrin solutions were prepared and combined with an equal amount of betulinic acid and then was stirred for 24 hours by rotary devices. Then, by HPLC, betulinic acid value was calculated for each concentration. Then normal and cancer cell lines were prepared and were divided in the control group, treated with CD, treatment with betulinic acid, and treated with nanocapsules containing BT. The cell morphology, cell proliferation and cell survival rate were studied. Results by SPSS software ANOVA and t-test at $P<0.05$ were analyzed.
Results: The results of HPLC showed that BT amount is 51 micrograms in 5% of solution, 58 micrograms in 10% of solution and 57 micrograms in 15% of solution. The results of morphology and cell survival showed that the nanoparticles containing BT compared to other treatments have inhibitory effect on the proliferation of cancer cells ($P<0.05$).
Conclusion: Using cyclodextrin nanocapsules can be increased solubility of insoluble compounds and it can be used as a drug delivery system and increase the solubility of the drug.

Keywords: **Betulinic acid, Cyclodextrin, Nanoparticles, MCF_7 cell line.**

Cite this article as: Shahrokhabadi KH, Zafar Balanezhad S, Baharara J, Nasirian Shakib M. Evaluation of the antitumor effect of betulin-containing cyclodextrin nanocapsules on MCF_7 cell line. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 19(1): 93-104.

[*]**Corresponding author:**
Biology Dept., Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I.R. Iran. Tel: 00985138435050, E-mail: shahrokhabady@yahoo.com