Research Article

Nova Biologica Reperta 8(3): 173-182 (2021)

Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115

https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.8.3.173

مقاله پژوهشی

یافته‌های نوین در علوم زیستی

جلد ۸، شماره ۳، صفحات ۱۷۳ الی ۱۸۲ (۱۴۰۰)

انتشارات دانشگاه خوارزمی

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

مهدیه گرشاسبی[۱] و عادله دیوسالار[۲]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران؛ [۲]گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: عادله 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 فلوسایتومتری استفاده شد. نتایج آزمایش‌های پراکندگی نور دینامیک، میکروسکوپ الکترونی پویشی و میکروسکوپ نیروی اتمی نشان داد نانوکپسول‌های حاوی دارو و هدفمند با فولات اندازه‌ای حدود۴۰ نانومتر و ساختار کروی شکل دارند. نتایج سنجش MTT و فلوسایتومتری بیانگر آن بود که نانو دارو هدفمند شده با فولات در الگوی وابسته به زمان و دوز، بقا و تکثیر را در سلول‌های HCT116 القا 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 بتالاکتوگلوبین، 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[1] & Adeleh Divsalar[2]

[1]Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran; [2]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 designe, 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 anicancer 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

Received 20.11.2020/ Revised 24.11.2020/ Accepted 27.06.2021/ Published 22.10.2021

دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۳۰/ اصلاح: ۱۳۹۹/۰۹/۰۴/ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۶/ انتشار: ۱۴۰۰/۰۷/۳۰

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2026-06-11]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.2.5]

[DOI: 10.52547/nbr.8.3.173]

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 به‌دلایل 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 نانوتکنولوژی 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 به‌این 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 تقریبا 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 نمی توانند 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). فولیک‌اسید (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 دارورسان‌ها 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 نانوکپسول‌های 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.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2026-06-11]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.2.5]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.173]

مواد و روش‌ها

پروتئین بتا-لاکتوگلوبولین خالص (درجه خلوص بالای ۹۸درصد)، 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 ۱۰میلی مولار در سه pH مختلف در سه لوله آزمایش آماده شد. سه pH (۳، ۴/۵ و۷) 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 ۱۰دقیقه 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 فیزیکوشیمیایی 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 i Leo ۴۴۰، 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 ورقی 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.

$$EE\ (\%) = \frac{\text{Total drug} - \text{free drug}}{\text{Total drug}} \times 100 \qquad (۱)$$

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، ۴۵۰و ۷۵۰ میکرومولار) به چاهک‌ها اضافه شدند و به مدت ۲۴ و۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون مورد نظر، سنجش MTT (۳-(۴،۵ دی‌متیل تیازول-۲-ایل)-۲،۵-دی فنیل تترازولیوم بromید) 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

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2026-06-11]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.2.5]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.173]

چاهک‌ها ۱میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکسید اضافه گردید آنگاه دانسیته نوری محلول درون هر چاهک با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج ۵۷۰ نانومتر سنجیده شد و نهایتا مقادیر Cc_{50} یا غلظتی از ترکیبات فوق که‌ایجاد 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 و۶۰۰ نانومترخوانده 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 فیزیکوشیمیایی 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 این‌رونتایج به دو بخش اساسی تقسیم می شوند. در بخش نخست به بررسی ویژگی فیزیکوشیمیایی نانوکپسول‌های پروتئینی تولید شده و توانمندی آنها به عنوان سامانه دارورسانی نوین در مقیاس نانو پرداخته می شود. از این‌رونتایج حاصل از مطالعه پراکندگی دینامیکی نور، مطالعه ریخت شناسی نانوکپسول‌های هدفمند با فولیک اسید با تکنیک‌های مختلف میکروسکوپ الکترونی و نیروی اتمی بررسی می شود. 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 توجه به بررسی توان حیاتی سلول‌ها و تغییرات القا شده با روش‌های MTT و فلوسایتومتری بررسی می‌گردد.

مطالعات خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوکپسول‌ها

تکنیک پراکندگی دینامیکی نور (DLS) تکنیکی برای سنجش اندازه، بارسطحی 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 می دهد 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 اندازه‌ایی حدود ۱۶۴ نانومتر دارند بسیار کوچکتر شده است و توزیع همگن‌تری دارد.

همچنین نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بر روی بهترین نمونه در pH اپتیمم ۴/۵ به دست آمده از نتایج DLS انجام شد و نشان داد که نانوکپسول‌های بتالاکتوگلوبولینی با پوشش فولات (شکل۱A) دارای اندازه کمتراز ۴۰ نانومترند و در مقایسه با نانو کپسول بتالاکتوگلوبولینی فاقد فولات (شکل۱B) که اندازه‌ای کوچکتر از ۲۰۰ نانومتر دارد اندازه کوچکتری دارند و کروی‌تر و همگن‌تر هستند. نتایج میکروسکوپ الکترونی کاملا در تایید نتایج حاصل از مطالعات پراکنش دینامیکی نور است.

نتایج میکروسکوپ نیروی اتمی بر روی بهترین نمونه در pH اپتیمم ۴/۵ به دست آمده نشان داد که نانوکپسول بتالاکتوگلوبولینی در حضور فولات اندازه‌ایی کمتر از ۴۰ نانومتر دارد (شکل A۲) و در مقایسه با نانوکپسول بتالاکتوگلوبولینی فاقد فولات که اندازه‌ایی کمتر از ۱۷۰ نانومتر دارد (شکل B ۲) بسیار کوچکتر و سطح کروی‌تری دارد. همچنین اندازه آنها مجزا و به طور کاملا همگن توزیع شده‌اند. نتایج اندازه‌گیری اندازه نانوکپسول‌های فولیک اسیدی به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی پویشی و میکروسکوپ نیروی اتمی به طور کامل همگرا با نتایج سنجش اندازه توسط روش پراکندگی دینامیکی نور است.

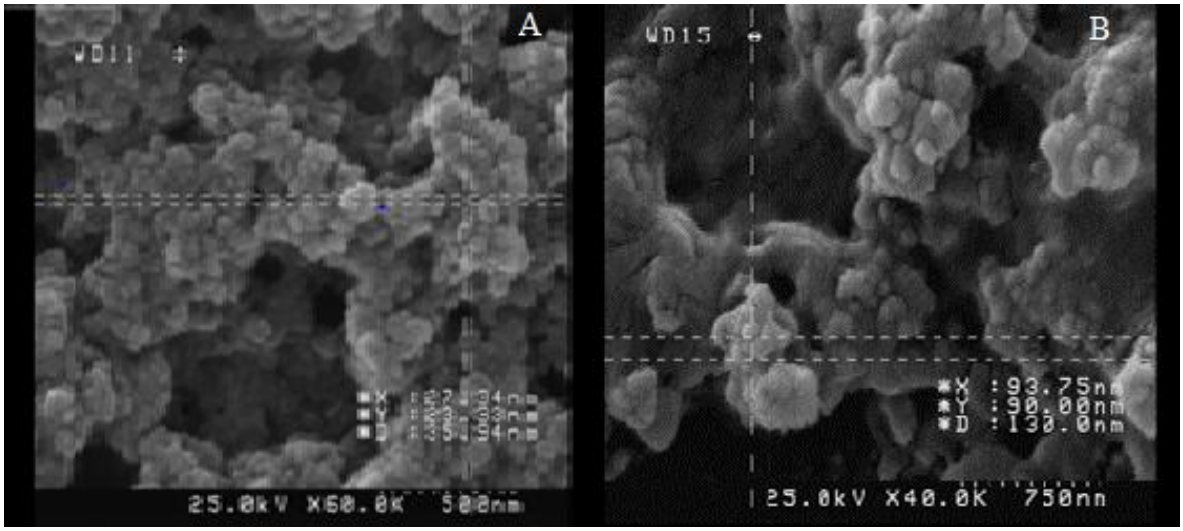
همچنین نتایج میزان کپسوله شدن در سطح pH بهینه برابر با ۴/۵ محاسبه شده برای نانوکپسول بتالاکتوگلوبولینی در حضور فولات بیانگر مقدار ۷۵/۲ درصد است که این عدد بیشتر از ۵۰ درصد است و برای نانوکپسول بتالاکتوگلوبولینی در غیاب فولات ۶۹/۶ درصد است. نتایج نشان داد بهره کپسوله شدن اگزالی پالادیوم در نانوکپسول سنتزی در سطح pH برابربا 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.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2026-06-11]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.2.5]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.173]

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

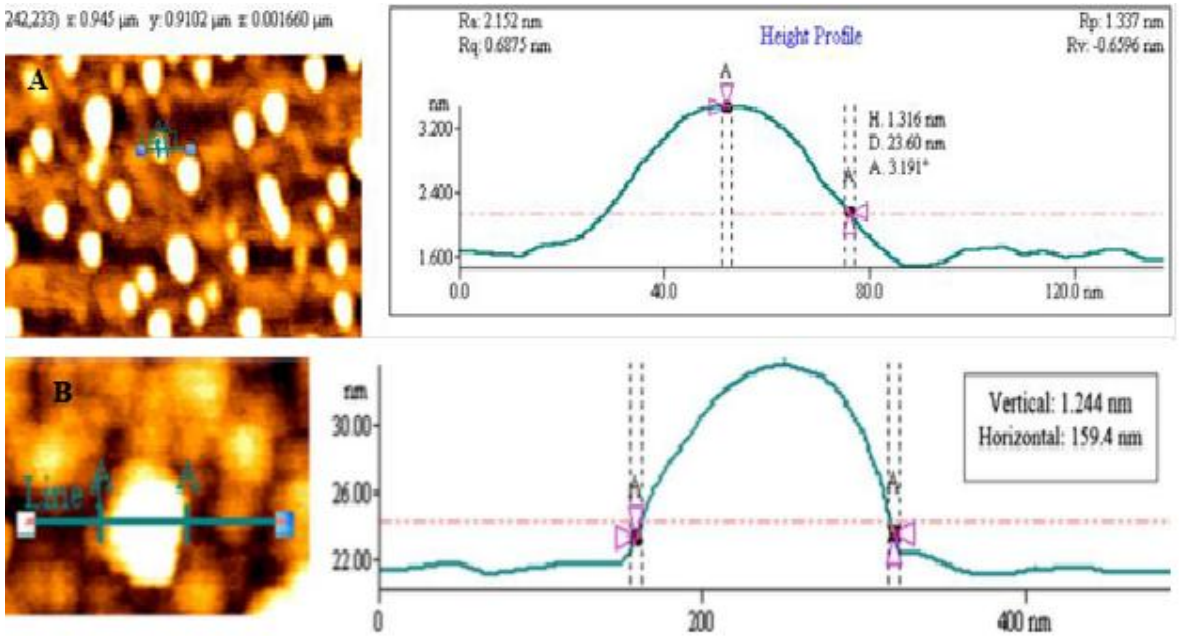
Table 1. Properties of beta lactoglobulin nanocapsules including Oxali-Palladium in the presence and absence of folate.

β-LG nanocapsules	Mean particle size (nm)	ζ-Potential(mV)
β-LG nanocapsules with folate	40	-10.53
β-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.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2026-06-11]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.2.5]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.173]

مطالعات سمیت سلولی نانوکپسول‌ها

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 HTC116پرداخته 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 که‌ایجاد ۵۰ درصد مرگ و میر در سلول‌ها می کنند محاسبه گردید. همانطور که شکل ۳ A نشان می دهد نانوکپسول‌های 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 می یابد. از طرفی منحنی‌های مهار رشد در HCT116 در سه مورد فوق یک مهار وابسته به غلظت را نیز نشان می دهند 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. به‌طوری‌که 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 اگزلی پالادیوم موجود در نانوذرات گردیده است.

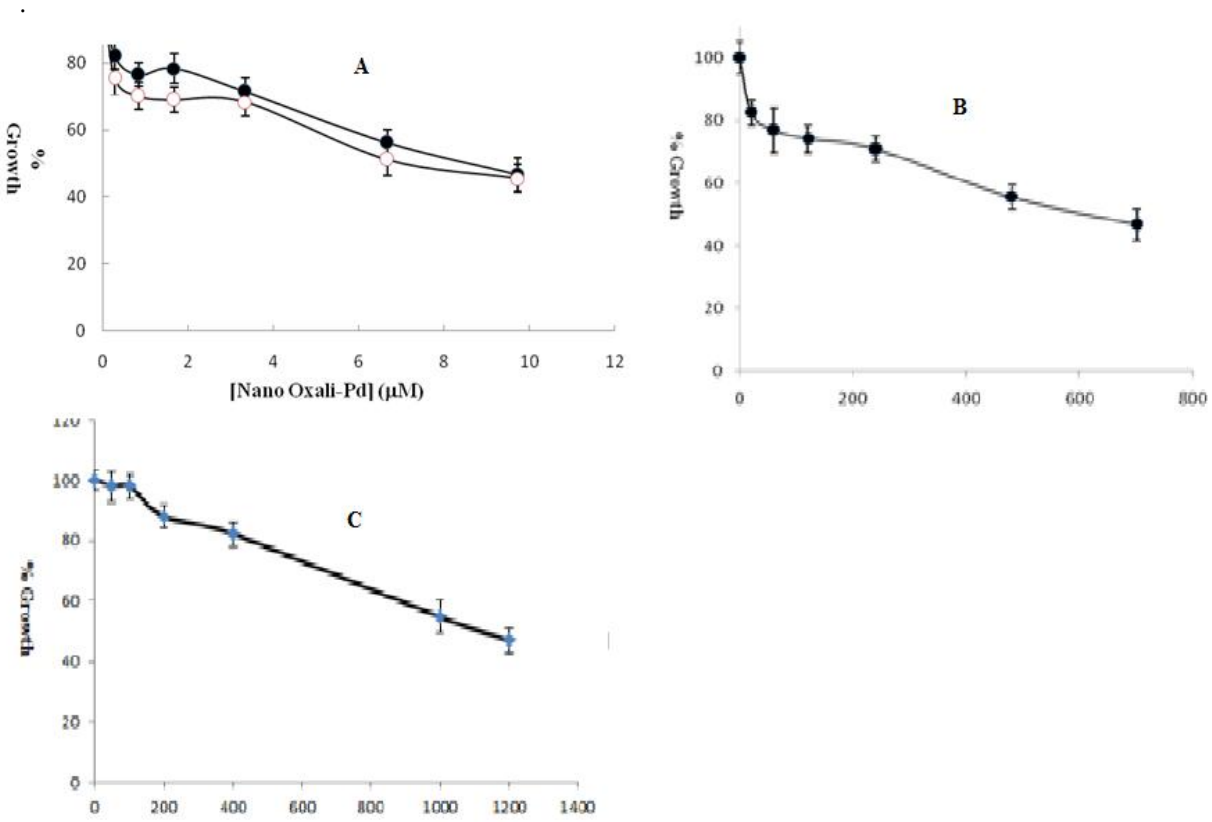
همچنین با استفاده روش فلوسایتومتری، میزان درصد آپاپتوز القا شده در سلول‌های تیمار شده با غلظت بازدارنده تکثیر ناشی از تیمار با نانوکپسولهای هدفمند با فولات و فاقد فولات و سلواهای کنترل (تیمار نشده با هیچ دارویی) مطالعه شدند که نتایج در شکل‌های ۴ A-C و جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج مطالعات فلوسایتومتری 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 (شکلB۴) در سلول‌های سرطان کولون می‌شوند. این نتایج در مقایسه با نمونه کنترل (شکل C۴) نشان می‌دهد که حضور فولات در نانوکپسول 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 نمی شوند. 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 بکاهند (Peer et al., 2007; Trujillo et al., 2016; Mishra et al., 2010). ولی با این وجود هنوز داروها به صورت هدفمند به سمت سلول‌های سرطانی هدایت نمی شوند از این‌رومحققین در پی یافتن راهی بهتر برای تحویل هدفمند دارو به سلول‌های سرطانی هستند. در میان داروها، داروهایی 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 داروهایی 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 این‌رودر 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., 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 دکسوروبیسین پوشیده شده با نانو ذره آلبومین 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).

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2026-06-11]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.2.5]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.173]



شکل ۳- منحنی درصد زنده ماندن سلول‌های رده سلولی HCT116 (تستMTT) 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).

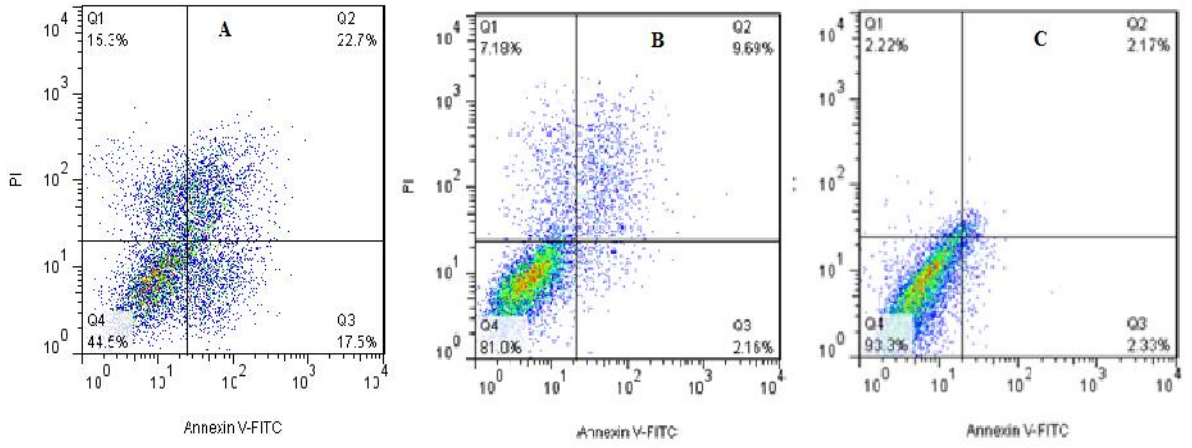
Figure 3. Cell viability (MTT test) data of protein nanocapsules with folic acid in the presence of low methyl pectin line after different incubation times of 24 (●) and 48 (○) hours (A), without folic acid after 24 hours incubation times (B) and free Oxali-Palldium after 24 h (C) against HCT116 cancer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

جدول ۲- درصد القای آپاپتوز، 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

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2026-06-11]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.2.5]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.173]



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_{50} of each sample.

در سال ۲۰۰۹ نیز، برای بررسی اتصال فولات با فلزهای روی و منیزیوم 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 حاضرمطابقت دارد. میزان سمیت بیوفلونوئید و فولات هدفمند شده بر نانوذرات کیتوزان بر سلول‌های سرطان دهانه رحم توسط تستMTT 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_{50} 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 مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده از نوع آپاپتوز 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 می توان 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 قدردانی دارند.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2026-06-11]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.2.5]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.173]

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2026-06-11]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.2.5]

[DOI: 10.52547/nbr.8.3.173]

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. & McClelements, 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 nbanotechnology-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.

Evanse, 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 mediat uptake, therapeutice 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 β-lactoglobulin, Spectrochim Acta. A Molecular Biomolecular Spectroscopy Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 118: 1038-46.126.

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 Macromulecules 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 supramolecolar 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 فیزیکوشیمیایی و ضد سرطانی نانوکپسول‌های بتالاکتوگلوبولینی بر روی رده سلول‌های سرطانی کولون. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۸: ۱۸۲-۱۷۳.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2026-06-11]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.2.5]

[DOI: 10.52547/nbr.8.3.173]