



Fabrication and Assessment of Novel Nano-Drug Delivery System Prepared by Conjugation of Dendrimer– Curcumin and Study of its Effect on Cancerous and Normal Cells

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Kinamiri Sh.¹ PhD,
Sadeghizadeh M.^{*2} PhD,
Nomani A.³ PhD,
Dinari A.¹ PhD,
Mardi M.⁴ PhD,
Daraei B.⁵ PhD

How to cite this article

Kinamiri Sh, Sadeghizadeh M, Nomani A, Dinari A, Mardi M, Daraei B. Fabrication and Assessment of Novel Nano-Drug Delivery System Prepared by Conjugation of Dendrimer– Curcumin and Study of its Effect on Cancerous and Normal Cells. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):491-502.

¹Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Genetics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Pharmaceutical Biomaterials Department, Pharmacy Faculty, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

⁴Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran

⁵Toxicology & Pharmacology Department, Pharmacy Faculty, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116

Phone: +98 (21) 82884409

Fax: -

sadeghma@modares.ac.ir

Article History

Received: July 11, 2018

Accepted: August 18, 2018

ePublished: September 21, 2019

ABSTRACT

Antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, and anti-microbial activities are evidences for the invaluable benefit of this herbal extract in human health and therapy. The anticancer effect of curcumin is due to the targeting of a wide range of cellular and molecular pathways involved in cancer progression. However, the limited solubility, low bioavailability and rapid metabolism of curcumin have a serious negative impact on its therapeutic application. In this research, a nano-carrier with appropriate delivery features, prepared through the conjugation of curcumin to the surface of a polyamidoamine dendrimer at generation 4 (PAMAM). The structure of the synthesized dendrimeric curcumin was confirmed by FT-IR and ¹H-NMR methods. The particles size and zeta potential were measured by Zetasizer. The loading rate of curcumin molecules on nano-carrier investigated and the cell viability, intracellular reactive oxygen species and induction of apoptosis were evaluated using MTT assay and flow cytometry technique in the follows. The results of this study showed that the prepared dendrimeric curcumin had a hydrodynamic diameter of about 100 nm. The results show that the rate of curcumin loading on this nanostructure system was about four curcumin molecules per each dendrimer. Cell experiments indicated that the toxicity, cellular reactive oxygen species (ROS), and apoptosis caused by dendrimeric nano-carrier were higher than free curcumin. Better performance of dendrimer-Nano-carrier was been through the improvement of physicochemical properties and increased curcumin solubility. Overall, it seems that the prepared dendrimeric curcumin is able to significantly improve the delivery of hydrophobic drugs on cancerous cells.

Keywords Dendrimer; Curcumin; Conjugation; Apoptosis; Reactive Oxygen Species

CITATION LINKS

[1] Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on ... [2] Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling ... [3] Curcumin: the Indian solid ... [4] Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a ... [5] Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability ... [6] Dendrimers in combination with natural products and analogues ... [7] Dendrimers in medicine: therapeutic concepts and pharmaceutical ... [8] Biomedical applications of dendrimers: a ... [9] Dendrimers in gene ... [10] Dendrimer toxicity: Let's meet the ... [11] Physicochemical and biological properties of self-assembled antisense/poly (amidoamine) ... [12] Dendrosomal nano-curcumin; The novel formulation to improve the ... [13] A novel diblock of copolymer of (monomethoxy poly [ethylene glycol]-oleate) with ... [14] Synthesis and characterization of a Nano-Polyplex system ... [15] Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and ... [16] Curcumin as "Curecumin": from kitchen to ... [17] Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells ... [18] Synthesis of water-soluble dendrimers based on melamine bearing 16 paclitaxel ... [19] ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human ... [20] Mammalian sirtuins: biological insights and disease ... [21] Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? Nat ... [22] Mitochondrial reactive oxygen species and ... [23] Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by ... [24] Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NFκB, cyclooxygenase-2 ... [25] Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: ... [26] Mitochondria and cancer: Warburg ... [27] Targeting mitochondria for cancer ... [28] Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione ... [29] Multiple molecular targets in cancer chemoprevention ... [30] Role of mitochondrial dysfunction in cancer ... [31] Mitochondrial diseases in man and ... [32] Rapid reactive oxygen species (ROS) generation induced by curcumin leads ... [33] Photosensitizer effect of curcumin on UVB-irradiated ... [34] Curcumin differentially sensitizes malignant glioma cells to TRAIL/Apo2L-mediated ... [35] Curcumin activated both receptor-mediated and ...

ساخت و ارزیابی نانوسامانه جدید تهیه شده از کانجوجه کورکومین- دندریمر و مطالعه تاثیر آن بر رده سلول های سرطانی و نرمال

شهلا کیان امیری PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مجید صادقی زاده PhD

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

علیرضا نعمانی PhD

گروه فارماسیوتیکال بیومتریال، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

علی دیناری PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

محسن مردی PhD

پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

بهرام دارایی PhD

گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

آثار آنتی اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدالتهاب و ضد میکروب کورکومین دلایلی بر ارزشمندی این ماده در تحقیقات دارویی و نقش آن در بهداشت عمومی انسان است. اثر ضدسرطانی کورکومین ناشی از تاثیر این دارو بر دامنه‌ای از مسیرهای سلولی و مولکولی درگیر در سرطان است. با این وجود، محلولیت کم، زیست‌دسترسی پایین و متابولیسم سریع آن اثر نامناسبی بر خصوصیت درمانی آن گذاشته است. در این تحقیق، به واسطه کانجوجه کردن مولکول های کورکومین به ساختار دندریمری نسل چهار (پلی آمیدوآمین)، یک حامل نانوابعاد مناسب تهیه شد. مشخصه یابی نانوسامانه و تایید فرآیند کانجوجه شدن به وسیله روش های FT-IR و $^1\text{H-NMR}$ انجام شد. اندازه و بار سطحی ذرات با دستگاه DLS مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان بارگذاری مولکول های کورکومین روی نانوسامانه بررسی شد و در ادامه آزمایش های سلولی از جمله سمیت، ROS سلولی و آپاپتوز به وسیله آزمون MTT و تکنیک فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق عمل کانجوجه شدن کورکومین را تایید کرد و ذرات به دست آمده اندازه تقریبی ۱۰۰ نانومتر داشتند. نتایج نشان داد که میزان بارگذاری کورکومین در این نانوسامانه حدود چهار مولکول به ازای هر مولکول دندریمر است. آزمایش های سلولی نشان داد که میزان سمیت، ROS سلولی و آپاپتوز ناشی از نانوحامل دندریمری در مقایسه با کورکومین آزاد بیشتر بوده است. عملکرد بهتر نانوسامانه دندریمری به واسطه بهبود خواص فیزیکی شیمیایی و افزایش محلولیت کورکومین بوده است. در مجموع، این نانوحامل به عنوان یک سامانه هوشمند و کارآمد می تواند برای رسانش داروهای آب گریز به سلول های سرطانی در نظر گرفته شود.

کلیدواژه ها: دندریمر، کورکومین، کوئوگاسیون، آپاپتوز، رادیکال آزاد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۲۷

* نویسنده مسئول: sadeghma@modares.ac.ir

مقدمه

داروهای رایج درمان سرطان اغلب سنتی بوده و از سیستم های نوین دارورسانی پیروی نمی کنند. این داروها اغلب با وزن مولکولی پایین

بوده و که مقدار زیادی از آنها به منظور دیدن اثر درمانی دارو مورد نیاز است که این عوامل باعث ایجاد سمیت می شوند [1]. مشکل دیگر این عوامل درمانی این است که به علت سمیت زیاد با محدودیت دوز همراه هستند. در واقع چالشی که این عوامل درمانی ایجاد می کنند، غیراختصاصی بودن آنها است که علاوه بر سلول سرطانی به سلول های سالم نیز آسیب می رسانند [2]. امروزه دانش و فناوری نانو، صنعت داروسازی و پزشکی را متحول کرده است، به گونه ای که محققین زیادی را در طراحی و تولید داروهایی با خصوصیت زیست دسترسی، زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری بالا ترغیب کرده است. این رویکرد توانایی طراحی داروهایی که بتوانند بافت های خاصی (جایگاه بیماری) را مورد هدف قرار داده و دارو را به صورت کنترل شده در آن جایگاه رها کنند، را فراهم آورده است [1]. بر پایه این یافته ها و اهمیت عملکرد میتوکندری در القا یا مهار سرطان، رسانش هدفمند کورکومین به میتوکندری سلولی از اهمیت بالایی برخوردار است. مطالعات مبتنی بر متابولیسم سلول مشخص کرده که میتوکندری سلول محل اثر بسیاری از داروها در داخل سلول است [3]. نقص در عملکرد میتوکندری و تولید رادیکال های آزاد اکسیژن نظیر آنیون های سوپراکسید و رادیکال های هیدروکسیل منجر به ایجاد بیماری هایی مانند سرطان می شود. اثرات آنتی اکسیدانی کورکومین در غیرفعال کردن رادیکال های آزاد ثابت شده است، ولی این اثرات اغلب وابسته به دوز و شرایط محیطی هستند [4, 5]. برای غلبه بر این مشکلات رویکردهای زیادی در فناوری نانو برای تیمار سرطان و دیگر بیماری های مزمن انسان توسعه یافته است. به طور کلی استفاده از نانوذرات به عنوان حامل، زیست دسترسی، هدفمندی و الگوی رهایش کنترل شده عوامل درمانی طبیعی و آنالوگ های آنها را به تنهایی یا در فرم های ترکیبی فراهم آورده است [6]. علی رغم فراوانی و تنوع موجود در سیستم های نانوذره ای، نانوساختارهای دندریمری و دندرون ها به عنوان نانوذرات ایده آل برای آینده پزشکی امیدهای زیادی را ایجاد نموده اند [7]. دندریمرها بسته به ساختار شیمیایی خود ویژگی های بسیار مناسبی در فرموله کردن و تهیه دارو دارند. از جمله این ویژگی ها می توان به توزیع باریک وزن مولکولی، اندازه نانوابعاد و ویژگی های خاص شکل، چندانعلی بودن، خواص قابل تنظیم در رابطه با پایداری pH، محلولیت در محیط های مختلف و زیست تخریب پذیری اشاره کرد [8]. این توانمندی ها دندریمرها را قادر ساخته تا به عنوان یک حامل مناسب برای رسانش دارو به صورت هدفمند قابلیت استفاده داشته باشند. در این سیستم دارورسانی، داروهای آب گریز در سطوح داخلی دندریمر بارگذاری شده و در محیط های آبگون مانند محیط سلولی زیست دسترسی بهینه ای پیدا کرده و توزیع مناسبی به دست می آورند. دندریمر مورد استفاده در این آزمایش از واحدهای پلی آمیدوآمین (PAMAM) ساخته شده و با واسطه گروه های عاملی آمین انتهایی (بار سطحی مثبت) خود با غشای سلول (بار سطحی منفی) پیوند غیراختصاصی ایجاد کرده و منجر به برداشت بیشتر در سطح سلولی (شرایط "غیر شیشه" و در "محیط زنده"

۵ میلی گرم از دندریمر در یک میلی لیتر از حلال DMSO و مقدار مول مور نیاز از کورکومین فعال شده، را در یک میلی لیتر از DMSO حل و به محلول اولیه اضافه شد. سپس واکنش برای مدت سه روز انجام و در نهایت با استفاده از فیلتر آمیکون خالص سازی شده و با دستگاه فریزداریر خشک شده و با استفاده از تکنیک $^1\text{H-NMR}$ و FT-IR ساختار مورد نظر تایید شد.

منحنی استاندارد غلظت کورکومین

برای انجام این آزمایش ابتدا ۵۰ میلی گرم از ماده کورکومین را وزن نموده و به یک میلی لیتر از حلال متانول اضافه شد. پس از حل شدن کامل آن محلولی با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. در ادامه از این استوک به ترتیب غلظت های ۰/۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱ میلی مولار تا ۰/۰۳ میلی مولار تهیه شد. روش استفاده شده برای سنجش منحنی استاندارد آنالیز دستگاه مبتنی بر اسپکتروسکوپی UV-visble در طول موج حداکثر ۴۲۰ نانومتر بود.

بررسی میزان اتصال مولکول های کورکومین در سطح نانو سامانه دندریمری (PAMAM)

در این آزمایش ابتدا ۵۰ میلی گرم از پودر کورکومین دندریمری (کورکومین کانجوجه شده به دندریمر PAMAM: DC) را وزن و در یک میلی لیتر متانول حل کرده و محلولی با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر فراهم شد. از این استوک در تهیه غلظت های مختلف استفاده شده است. غلظت های به کار رفته در این آزمایش نیز به ترتیب ۰/۰۱، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳ میکروگرم بر میکرو لیتر بوده است. در ادامه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری UV-Visble در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد.

علاوه بر این روش، با استفاده از طیف $^1\text{H-NMR}$ به دست آمده از کورکومین- دندریمر، میزان تقریبی کورکومین متصل به سطح دندریمر محاسبه شد. در این روش، از طریق عدد انتگرال مربوط به گروه های مربوط به دندریمر در طول موج های تقریبی بین ۲ الی ۹ ppm، عدد انتگرال هر پروتون به دست آمد و سپس از طریق پروتون های مربوط به گروه های فنیل کورکومین در فاصله ۷ الی ۸ ppm، نسبت تقریبی تعداد مول کورکومین به ازای هر مول دندریمر محاسبه شد.

بررسی سایز و زتای نانوسیستم طراحی شده به وسیله دستگاه زتاسایزر

به منظور سنجش ابعاد سامانه دارویی مورد نظر و همچنین بار سطحی آن، از دستگاه DLS (مالورن؛ ایالات متحده آمریکا) استفاده شد. برای انجام این آزمایش، غلظت ۵/۰ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوسامانه دندریمری در حجم یک میلی لیتر تهیه و در ادامه دو پارامتر، اندازه ذره ای و پتانسیل زتای آن ارزیابی شد.

ردیابی ورود سامانه نانوابعاد کورکومین- دندریمر به سلول به وسیله میکروسکوپ فلورسنت

برای انجام این آزمایش ابتدا سلول Huh7 را به میزان ۴۰ هزار سلول در پلیت ۲۴ خانه ای کشت داده و پس از رسیدن به مورفولوژی ۸۰٪

می شود^[10]. در این تحقیق کورکومین را به دندریمر نسل چهارم PAMAM کانجوجه کرده و سامانه نانوابعاد حاصل برای بارگذاری کورکومین و رسانش آن به سلول هدف استفاده شده است. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می دهد که کانجوجه کردن کورکومین به ساختار دندریمری سبب افزایش یافتن محلولیت، پایداری و بهبود اثرات بیولوژیکی آن می شود.

مواد و روش ها

کورکومین (خلوص ۹۵٪)، تری اتیل آمین، دی کلرومتان، ۴- نیترو فنیل کلروفرمات (NPC) و ماده ۲، ۷- دی کلرو دی هیدرو فلورسین دی استات (مرک؛ آلمان) تهیه شدند. دندریمر PAMAM تا نسل چهارم در آزمایشگاه و مطابق روش ذکر شده قبلی سنتز و خالص سازی شد^[11]. فیلتر آمیکون MWCO ۳ کیلودالتونی (آمیکون؛ آلمان) و کیسه دیالیز MWCO ۱۰ کیلودالتونی (سیگما؛ ایالات متحده آمریکا) به کار رفتند. تمامی حلال ها با درجه مناسبی از کیفیت "برای سنتز" مورد استفاده قرار گرفتند. لاین های سلولی Huh7 و فیبروبلاست (انستیتو پاستور؛ ایران) تهیه شدند. محیط کشت DMEM، محلول تریپسین- ای. دی. تی. آ (EDTA؛ ۲۵۰/۰٪)، سرم جنین گاو (FBS)، آنتی بیوتیک پنی سیلین- استرپتومایسین (Gibco؛ آلمان) استفاده شد. بافر نمکی فسفات (PBS؛ سیگما؛ ایالات متحده آمریکا) نیز به کار رفتند.

فعال سازی مولکول کورکومین

فعال سازی کورکومین با استفاده از ۴- نیترو فنیل کلروفرمات (4-NPC)، دی کلرومتان و تری اتیل آمین انجام شد. به این منظور، مقدار ۱۵ میلی گرم کورکومین وزن و سپس به یک بالن ژوژه ته گرد انتقال داده شد. در ادامه به مدت ۵ دقیقه بالن مربوطه با استفاده از پمپ خلا هوازداپی شده و یک میلی لیتر دی کلرومتان به آن تزریق شد. محلول دوم نیز با استفاده از ۶/۶ میلی گرم از ۴- نیترو فنیل کلروفرمات و یک میلی لیتر دی کلرومتان با شرایطی مشابه تهیه و به محلول اول اضافه شد. به منظور پیشرفت واکنش، یک قطره از تری اتیل آمین به مخلوط اضافه شد. نهایتاً با قراردادن مخلوط فوق روی استیرر برای مدت ۳ روز کاملاً واکنش فعال سازی گروه های هیدروکسیل کورکومین به وسیله ۴- نیترو فنیل کلروفرمات کامل شد. مخلوط به دست آمده با دستگاه خلا خشک شده و به منظور بررسی انجام واکنش به وسیله روش های دستگاهی $^1\text{H-NMR}$ و FT-IR ارزیابی شد.

اتصال کورکومین به دندریمر (فرآیند کانجوجه شدن)

مولکول های کورکومین پس از فعال سازی به سطح دندریمرهای PAMAM (G4) کانجوجه شد. نسبت مولی به کار رفته برای گروه های فعال سطح دندریمر ۲۰٪ بوده است. از آنجایی که تعداد گروه های آمینی در هر نسل از دندریمر مشخص است، از این رو با تعیین تعداد آمین سطحی دندریمرها که باید توسط مولکول های کورکومین عامل دار شوند، مقدار کورکومین محاسبه و در فرآیند کانجوجه شدن مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور، براساس

ارزیابی مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (آپاتوز) با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری

در این آزمایش، مشابه با آزمایشات قبلی مقدار LD₅₀ تعیین شد. رده سلولی Huh-7 و فیبروبلاست برابر با 1×10^5 و $1/2 \times 10^5$ سلول در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت و طی دو مرحله جداگانه به‌ترتیب در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، با دندریمر PAMAM، کورکومین آزاد و نانوسامانه DC تیمار شد. بعد از سپری‌شدن مدت‌زمان تیمارهای دارویی، سلول‌های کف چاهک‌ها با PBS شسته و پس از تیمار با تریپسین جمع‌آوری شدند. در ادامه در دمای 4°C به مدت ۵ دقیقه با دور 1600rpm سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی حذف و با افزودن 500mL میکرولیتر از محلول PBS مشابه مرحله قبل سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد مایع رویی را دور ریخته و مجدداً 500mL میکرولیتر از بافر AnnexinV/FLOUS-PI به آن اضافه و سپس توسط دستگاه فلوسایتومتری قرائت شد.

یافته‌ها

فعال‌سازی مولکول کورکومین

شکل شماتیک فعال‌سازی کورکومین (شکل ۱) و نتایج مرحله فعال‌سازی آن و تایید توسط FT-IR و H-NMR (نمودار ۱- الف تا د) نشان داده شده است. مقایسه طیف FT-IR کورکومین آزاد (الف) و فعال‌شده (ب) نشان از حذف‌شدن بخشی از هیدروکسیل در طیف جذبی کورکومین فعال‌شده دارد (محل ظاهرشدن پیک‌های مربوط به گروه هیدروکسیل کورکومین آزاد در ناحیه $3440/64$ است). همچنین پیک ایجادشده در ناحیه $1732/82$ نیز اشاره به اتصال NPC-4 دارد که در فرآیند فعال‌سازی کورکومین نقش دارد (نمودار ۱- الف). در طیف NMR، تفاوت پیک‌های ظاهرشده در ناحیه حدود 4ppm بیانگر فعال‌شدن کورکومین است که به‌صورت دوشاخه‌شدن خود را نشان داده است. بدین‌صورت که با اتصال NPC-4 به گروه عاملی هیدوکسیل در موقعیت ۲ مولکول کورکومین، پیک موجود در حدود $3/8\text{ppm}$ (نمودار ۱- ج) به دو پیک در ناحیه $3/8$ و $3/9$ (نمودار ۱- د) شکافته می‌شود. دو پیک اضافه ظاهرشده در ناحیه ۷ و ۸ نیز مربوط به استخلاف‌های پارانیتروفنول بود و بیانگر نشسته‌شدن NPC-4 روی کورکومین است.

اتصال کورکومین به دندریمر پلی‌آمیدوآمین نسل چهار

در این مطالعه مولکول‌های کورکومین پس از فعال‌سازی به‌منظور اتصال در نسبت‌های مختلف از دندریمر و کورکومین مورد استفاده قرار گرفتند. در شکل ۲ مراحل شماتیک اتصال کورکومین فعال‌شده به گروه‌های آمینی دندریمر نشان داده شده است. همچنان که نشان داده شده ضمن اتصال کورکومین فعال به سطح دندریمر یک مولکول حلقوی پارانیتروفنول از آن جدا می‌شود. از طرف دیگر با استفاده از دو تکنیک قدرتمند و متداول FT-IR و $^1\text{H-NMR}$ نیز این عمل کانجوگه‌شدن مورد تایید قرار گرفت. نتایج ارایه‌شده در نمودار ۲ (الف و ب) نشان داده شده است. در طیف FTIR پیک ظاهرشده در عدد موجی $1670/97$ (نمودار ۱- الف) مربوط به گروه

با سامانه دارویی نانوابعد DC مورد تیمار قرار داده و پس از سپری‌شدن بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، ورود نانوحامل DC به داخل سلول مورد نظر را با میکروسکوپ فلورسنت مدل TE2000-S (Nikon Eclipse؛ ژاپن) مورد بررسی قرار داده و از آن تصویربرداری صورت گرفت. در این آزمایش کورکومین آزاد به‌عنوان داروی شاهد استفاده شد. تمامی مراحل کاری برای کورکومین آزاد مشابه سامانه دارویی DC بوده است.

ارزیابی سمیت سلولی

به‌منظور ارزیابی سمیت نانوسامانه دارویی DC، ابتدا رده سلولی Huh-7 و فیبروبلاست با تراکم 7×10^3 و 5×10^3 در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت شد. تمامی مواد و شرایط کشت سلولی از جمله محیط کشت و مواد افزودنی آن (FBS، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین) و همچنین انکوباتور 37°C با رعایت استانداردهای مربوطه مورد استفاده قرار گرفتند. پس از سپری‌شدن بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت و رسیدن سلول به مورفولوژی $80-85\%$ ، با استفاده از آزمون MTT میزان سمیت تیمارهای مدنظر، از جمله دندریمر PAMAM، کورکومین آزاد و نانوسامانه DC ارزیابی شد. غلظت‌های دارویی به‌کاررفته برابر با ۴، ۱۰، ۱۷، ۲۴ و 30mL میکرومولار بوده است.

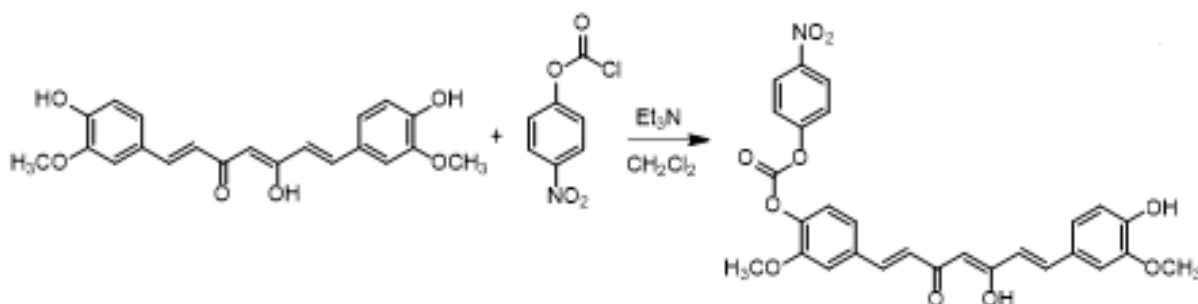
ارزیابی میزان ROS سلولی با استفاده از فلوسایتومتری

برای انجام این آزمایش ابتدا میزان LD₅₀ توسط داده‌های مربوط به سنجش سمیت MTT هر کدام از رده‌های سلولی تعیین شد. سپس سلول‌ها در پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. میزان سلول استفاده‌شده در چاهک‌های مورد تیمار برای هر کدام از رده‌های سلولی به‌صورت زیر بوده است:

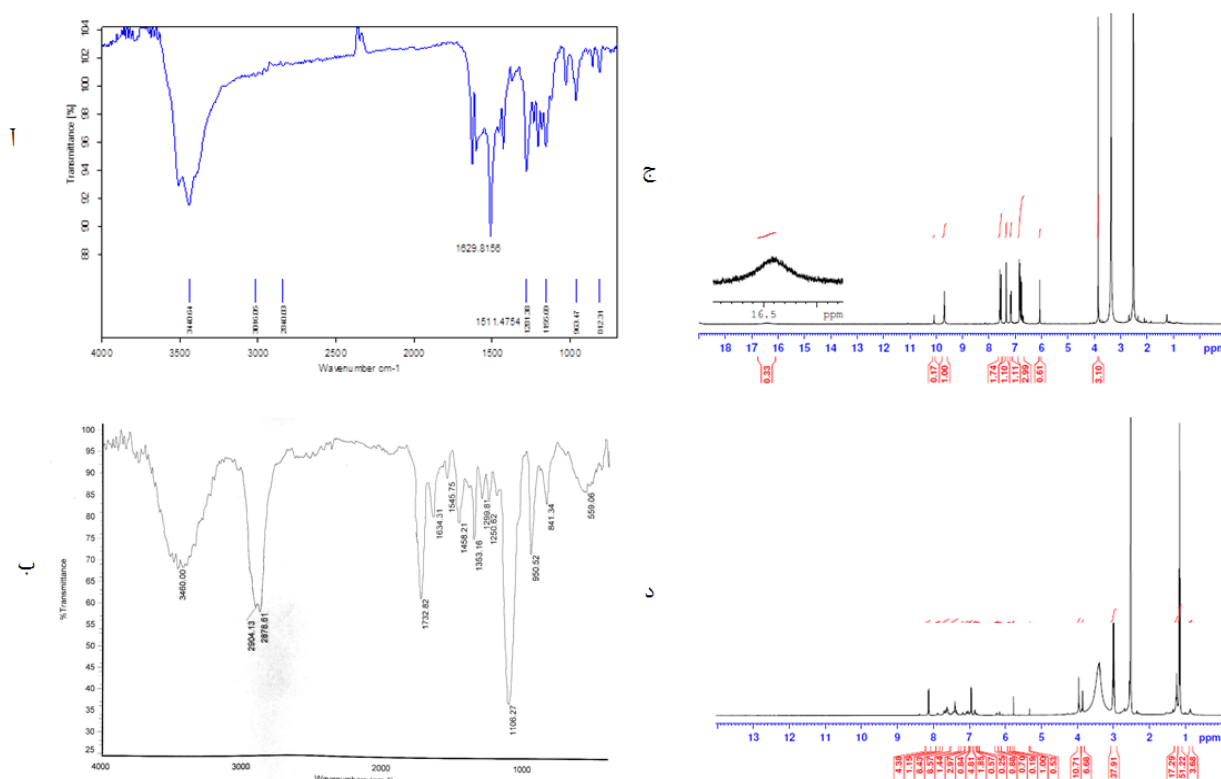
به‌ترتیب برای Huh-7، فیبروبلاست برابر با $1/75 \times 10^4$ و $1/25 \times 10^4$ سلول در هر چاهک کشت داده شد. تیمارهای دارویی مشابه با آزمایشات سنجش سمیت روی گروه‌های آزمایشی، در دو بازه زمانی ۶ و ۱۲ ساعت اعمال و سپس در شرایط بهینه رشد انکوبه شدند. در ادامه و پس از سپری‌شدن بازه‌های زمانی ذکرشده، مایع رویی سلول‌های داخل هر چاهک را دور ریخته و با PBS شست‌وشو داده و مورد تیمار با ماده تریپسین قرار می‌گیرند. سلول‌های جداشده را در دمای 4°C به مدت ۵ دقیقه با دور 1600rpm سانتریفیوژ و پس از حذف محیط رویی مجدداً 500mL میکرولیتر از محلول PBS به آنها اضافه کرده و برای مرتبه دوم سانتریفیوژ شدند. در ادامه و پس از حذف مایع رویی 500mL میکرولیتر از محلول ۲، ۷ دی‌کلرو دی‌هیدروفلورسین دی‌استات (غلظت 10mL میکرومول) به آن اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور با دمای 37°C انکوبه شد تا عمل رنگ‌آمیزی به‌طور کامل انجام شود. محیط سلولی باعث اکسیدشدن ۲، ۷ دی‌کلرو دی‌هیدروفلورسین دی‌استات توسط رادیکال آزاد سلولی و تبدیل آن به دی‌کلروفلورسین می‌شود. پس از ۴۵ دقیقه میزان رادیکال آزاد تولیدشده با دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد. آب اکسیژنه (H_2O_2) با غلظت 250mL میکرومولار به‌عنوان کنترل مثبت رادیکال آزاد در نظر گرفته شده است.

گروه سطحی NH_2 در دندریمر PAMAM به علت اتصال به مولکول کورکومین کمی کشیده شده و به جای ظاهر شدن در ناحیه ۱ تا ۳ جابه‌جا شده و در ناحیه ۲ تا ۳ ظاهر شده است. این جابه‌جایی گویای حذف شدن گروه عاملی پارانیتروفیل است.

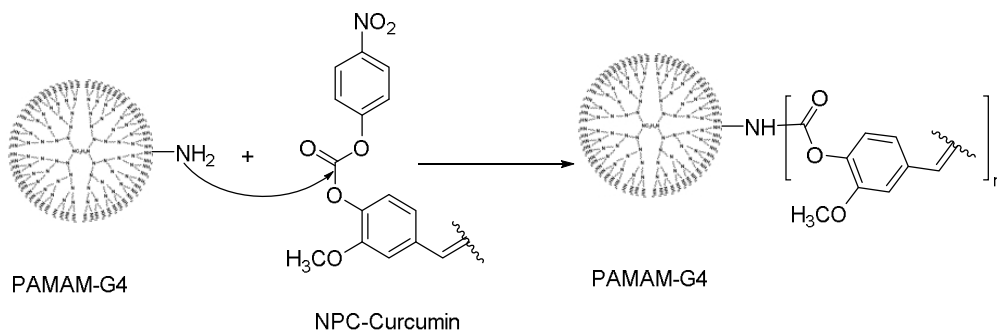
کربوکسیل ($\text{C}=\text{O}$) و پیک ظاهر شده در عدد موجی $1704/1676$ مربوط به باند کششی آمید نوع دوم (N-H) است که هر دو نشانه تشکیل پیوند آمیدی بین کورکومین فعال و دندریمر PAMAM G4 است. از طرف دیگر آنالیز طیف NMR (نمودار ۲-ب) نشان داده شده که



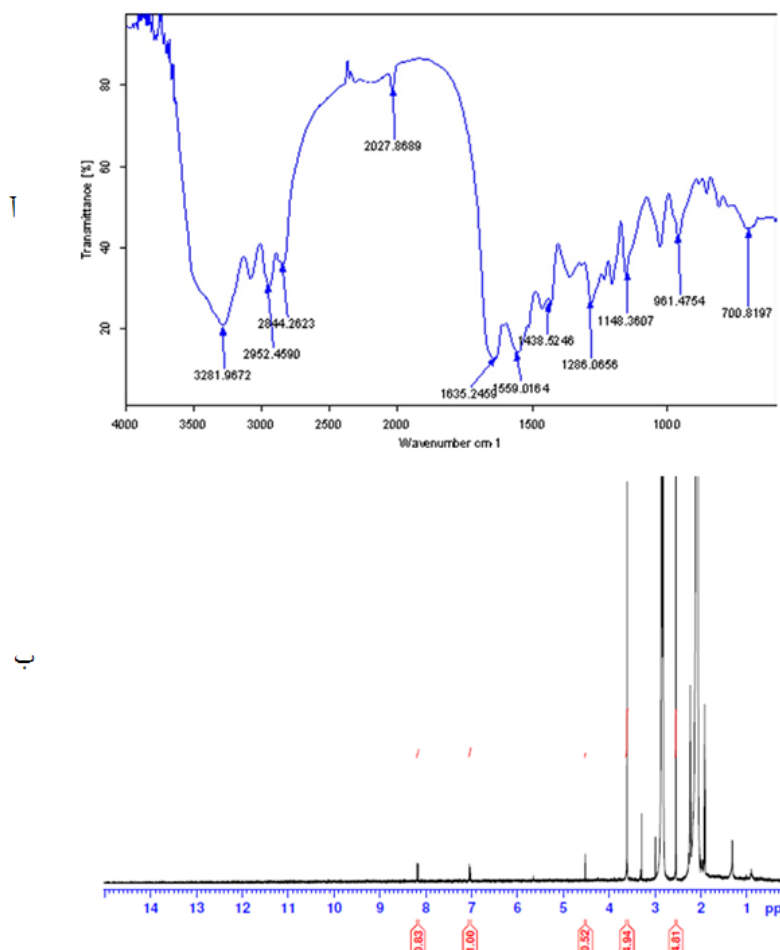
شکل ۱) شکل شماتیک مربوط به فعال نمودن گروه هیدروکسیل کورکومین توسط نیتروفنیل کلروفرمات نشان داده شده است.



نمودار ۱) طیف‌های FT-IR (الف- غیرفعال و ب- فعال شده به وسیله نیتروفنیل کلروفرمات) و $^1\text{H-NMR}$ (ج و د) مربوط به کورکومین در دو حالت آزاد (ج) و فعال شده (د)



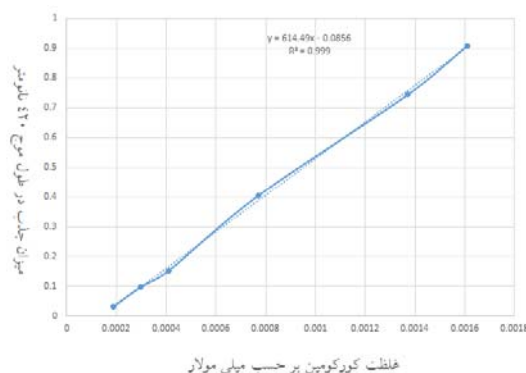
شکل ۲) در این تصویر محل اتصال کورکومین فعال شده به وسیله نیتروفنیل کلروفرمات (NPC-Curcumin) به دندریمر نسل چهار و عمل کانجوجه شدن به صورت شماتیک نشان داده شده است.



نمودار ۲) نتایج FT-IR (ا) و H-NMR (ب) مربوط به دندیرم نسل چهارم حاوی کورکومین کانژوگه شده در سطح دندیرم

منحنی استاندارد کورکومین

نتایج به دست آمده از آنالیز کورکومین نشان داد بهترین محدوده غلظتی قابل اندازه گیری آن در سامانه مورد نظر از ۰/۰۰۰۲ تا ۰/۰۰۲ میلی مولار است. مبتنی بر تحقیقات پیشین [12] این روش اندازه گیری غلظت استاندارد کورکومین (اسپکتروسکوپی UV- visible) در مقایسه با روش مبتنی بر فلورسنس مناسب تر تشخیص داده شده است. براساس این یافته ها غلظت های بالاتر از این دامنه برای بارگذاری داروی کورکومین در نانوسامانه DC نیاز به رقت سازی خواهد داشت و غلظت های پایین تر، به وسیله این روش قابل اندازه گیری نخواهد بود (نمودار ۳).



نمودار ۳) منحنی استاندارد کورکومین

بررسی میزان اتصال کورکومین به نانوسامانه دندیرم

به منظور بررسی میزان اتصال کورکومین به سطح دندیرم، از دو روش اسپکتروسکوپی UV-Visible و $^1\text{H-NMR}$ استفاده شد. در هر دو روش مبنای اندازه گیری میزان اتصال کورکومین به دندیرم براساس نسبت مول های کورکومین متصل شده به ازای هر مول دندیرم است. روش $^1\text{H-NMR}$ نشان داد که به تعداد متوسط ۴ مول کورکومین به ازای هر مول دندیرم PAMAM، در سطح دندیرم اتصال یافته است. روش اسپکتروسکوپی UV-Visible از طرف دیگر با اختلاف ۱۵٪ همین موضوع را تایید نمود. با توجه به این که $^1\text{H-NMR}$ و انتگرال پیک ها روش دقیق تر و ارجح تر است، نتایج این روش در مورد سایر محاسبات در نظر گرفته شد.

ارزیابی سایز و بار سطحی سامانه های نانوسامانه دندیرم DC با استفاده از دستگاه زتاسایزر

در این آزمایش ابتدا غلظت مورد نظر در محیط آب مقطر تهیه و پس از انحلال کامل، اندازه و بار سطحی آنها با استفاده از دستگاه زتاسایزر ارزیابی شد. نتایج به دست آمده از این آزمایش نشان داد که سازه نانوسامانه DC رد محیط آبی، سایز هیدرودینامیکی برابر با 172 ± 25 نانومتر دارد. همچنین نشان داده شد که پتانسیل زتا به عنوان معرف بار سطحی نانوسامانه DC و تعیین کننده پایداری این نانوسامانه دارویی تقریباً برابر با 9.63 ± 0.32 میلی ولت بوده

ارزیابی سمیت سلولی

سنجش میزان سمیت تیمارهای دارویی روی رده سلولی Huh-7 و فیبروبلاست انجام شد و نتایج آن در نمودار ۴ ذکر شده است. الگوی تغییر گرافهای موجود در نمودار بیانگر تفاوت تیمارهای دارویی در سلولهای طبیعی و سرطانی است. تیمارهای دارویی استفاده شده در این آزمایش شامل سامانه دندیرم بدون تغییر PAMAM، کورکومین آزاد و نانوسامانه DC که حاوی کورکومین متصل شده به سطح دندیرم هستند. غلظت‌های دارویی استفاده شده در این آزمایش از صفر تا ۳۰ میکرومولار بوده است. مقایسه تیمارهای دارویی نشان داد که IC50 برای نانوسامانه DC در غلظت ۲۴ میکرومولار ظاهر شده است. میزان IC50 به دست آمده برای رده سلولی Huh7 در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظت ۲۴ میکرومولار به دست آمد و بیانگر میزان یکسان از سمیت سامانه دارویی DC در هر دو زمان بوده است. این در حالی است که معیار IC50 برای کورکومین آزاد در هیچ یک از غلظت‌های استفاده شده به دست نیامده است. از طرف دیگر مقایسه سمیت تیمارهای دارویی بین سلول Huh7 و سلول فیبروبلاست نشان می‌دهد که اثر این تیمارها بر سلول فیبروبلاست متفاوت بوده و حکایت از عدم سمیت یا سمیت بسیار پایین کورکومین و دندیرم تنها و نیز سامانه کورکومین- دندیرم (در همه تیمارهای به کار رفته) روی سلول نرمال فیبروبلاست دارد.

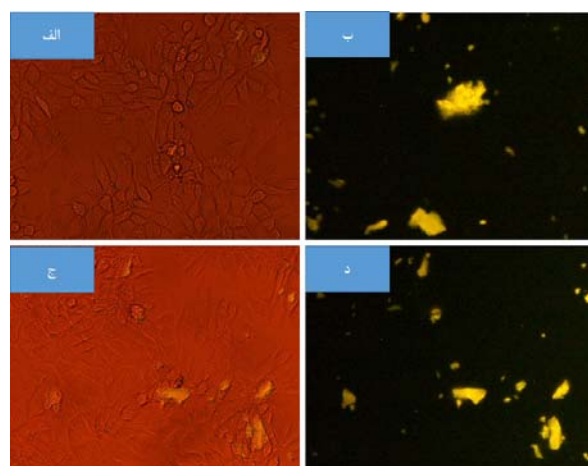
ارزیابی میزان ROS سلولی با استفاده از فلوئوسایتمتری

میزان ROS ایجاد شده در سلول‌های تیمار شده با سامانه‌های دارویی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمون از ماده ۲، ۷ دی‌کرو دی‌هیدروفلورسین دی‌استات استفاده شده است. این ماده با مولکولهای ROS ایجاد شده درون میتوکندری واکنش داده و موجب ایجاد ماده فلورسنت ۲، ۷ دی‌کروفلورسین اکسید می‌شود. تولید گونه‌های فعال اکسیژن در اثر تیمارهای دارویی مد نظر بیانگر تاثیر بیشتر دارو و هدایت سلول به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده است و احتمالاً نشانگر تاثیر بهتر دارو است. در غلظت استفاده شده از نانوسامانه DC، در مقایسه با کورکومین آزاد، از لحاظ آماری به طور مشخص، تاثیر بیشتری در القای تولید رادیکال آزاد بیشتر در سلول‌های Huh7 داشته است (نمودار ۵). مقایسه رفتار نانوسامانه DC با کورکومین آزاد در بازه زمانی ۱۲ ساعت، به وضوح تفاوت رفتار آنها را نشان داده است. به طوری که پس از سپری شدن این زمان، تولید رادیکال آزاد ناشی از نانوسامانه DC در مقایسه با کورکومین آزاد بیشتر از دوبرابر بوده است. از طرفی مقایسه رده سلولی فیبروبلاست با رده سلولی سرطانی Huh7 بیانگر این است که کورکومین به عنوان یک داروی گزینه‌ای، رادیکال آزاد بیشتری را در سلول سرطانی القا کرده است. نکته حائز اهمیت این است که نانوسامانه DC در دو رده سلول سرطانی و طبیعی به ترتیب عملکردی حداکثری و حداقلی داشته است. همچنین مقایسه تیمارهای دارویی با آب اکسیژنه، به عنوان کنترل مثبت در القای ROS تولیدی توسط سلول، نشان داده است که تاثیر آب اکسیژنه در تولید رادیکال

است. این دو معیار می‌توانند دلیلی بر ارزشمندی این سامانه در مقایسه با کورکومین آزاد باشند.

ارزیابی ورود سامانه دارویی تهیه شده به سلول با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت

بررسی ورود کورکومین متصل به دندیرم به سلول‌های Huh7 در شکل ۳ نشان داده شده است. همچنان که در شکل مشاهده می‌شود مقایسه بین دو سامانه دارویی کورکومین آزاد (الف و ب) با نانوکورکومین دندیرم (ج و د) بیانگر تفاوت رفتاری دو سامانه در برخورد با محیط‌های زیستی و سلولی است. با توجه به این که کورکومین خاصیت فلورسنت دارد بنابراین با قرار گرفتن در زیر میکروسکوپ نوری فلورسنت در طول موج ۴۸۰ نانومتر نشر نور داشته و قابل ردیابی هست. در حالی که کورکومین آزاد با قرار گرفتن در محیط‌های آبگون و سلولی مجتمع شده و در سطح سلول باقی مانده است، سامانه دارویی نانوبعد به راحتی وارد سلول شده و در هر دو مد تصویری (ساده و فلورسنت) درون سلول قابل مشاهده است. اگر به دقت بررسی شود حضور نانوسامانه DC در داخل سلول به گونه‌ای است که شکل سلول را به خود گرفته است. در واقع درخشش ماده دارویی کورکومین تحت تاثیر نور فلورسنت باعث می‌شود که ضمن حضور آن در داخل سلول نواحی مختلف سلول درخشش داشته باشد و شکل به دست آمده منطبق با نواحی باشد (شکل ۳- ج و د) که نانوسامانه DC در سلول حضور دارد. حال آن که این ویژگی در رابطه با کورکومین آزاد قابل دستیابی نیست. کورکومین آزاد به دلیل خاصیت آب‌گریز بودن در محیط‌های آبگون و سلولی، تجمع‌های بزرگی ایجاد می‌کند و ورود آن به داخل سلول دچار مشکل می‌شود. همان‌طور که در شکل ۳ (الف و ب) مشاهده می‌شود ایجاد تجمع‌های با اندازه‌های مختلف موجب می‌شود وارد سلول نشده و از سلول دور بماند. این دستاورد مطابق با تحقیقات قبلی انجام شده است [13].



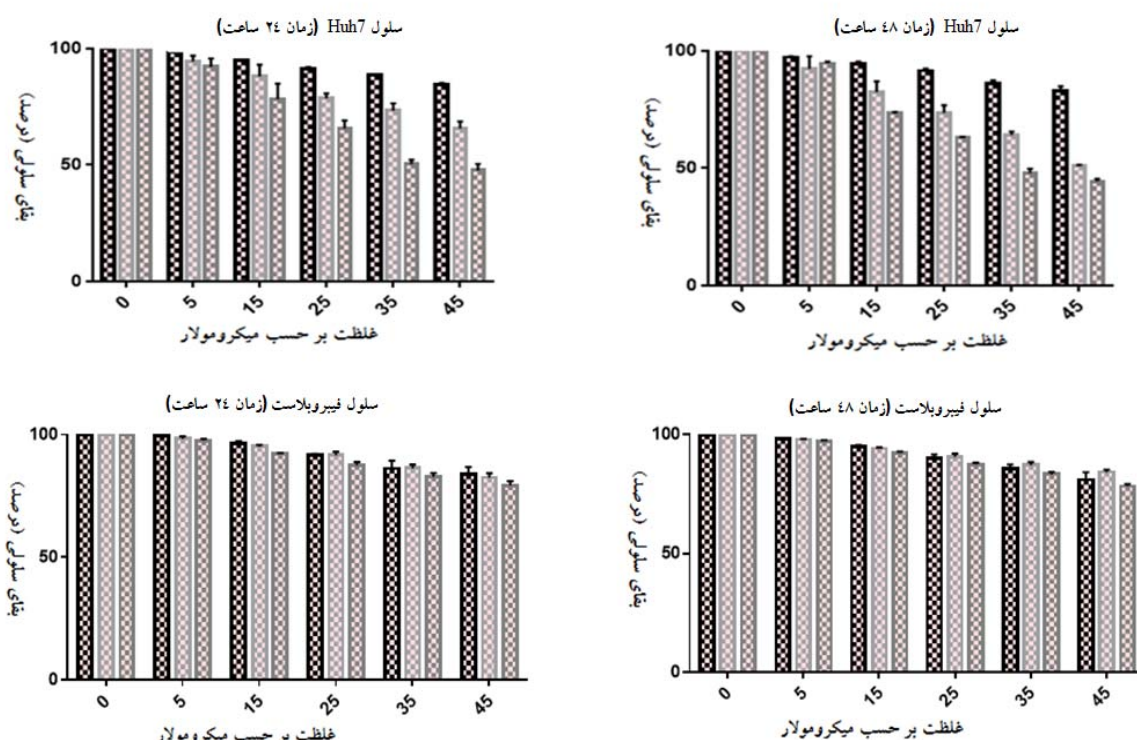
شکل ۳) تصویر الف و ب مربوط به تیمار سلول با کورکومین آزاد و تصویر ج و د مربوط به سامانه دارویی دندیرم-کورکومین است که در دو حالت نور معمولی و نور فلورسنت تهیه شده است. در حالی که کورکومین آزاد در سطح سلول باقی مانده اما عملکرد متفاوت سامانه نانوبعد ورود به سلول را کاملاً تسهیل کرده است.

حاصل از این سنجش در نمودار ۶ ذکر شده است. میزان آپاپتوز القاشده در گروه تیمار شده با نانوسامانه DC در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری ($p < 0.0001$) داشته است. این الگوی رفتاری در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده شد، همچنین مشخص شد که تیمار رده سلولی Huh7 با نانوسامانه DC برای دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب میزان آپاپتوزی برابر با 68.15 ± 0.14 و 86.88 ± 0.14 را القا کرده است. این در حالی است که آپاپتوز ناشی از تیمار داروی کورکومین آزاد برای بازه های زمانی فوق الذکر به ترتیب 35.75 ± 0.32 و 78.68 ± 0.41 گزارش شد که در مقایسه با نانوحامل DC کمتر بوده است. از طرفی نشان داده شده که تغییرات آپاپتوزی ناشی از تیمار سلول فیبروبلاست با کورکومین آزاد و نانوسامانه DC بسیار ناچیز و قابل اغماض است.

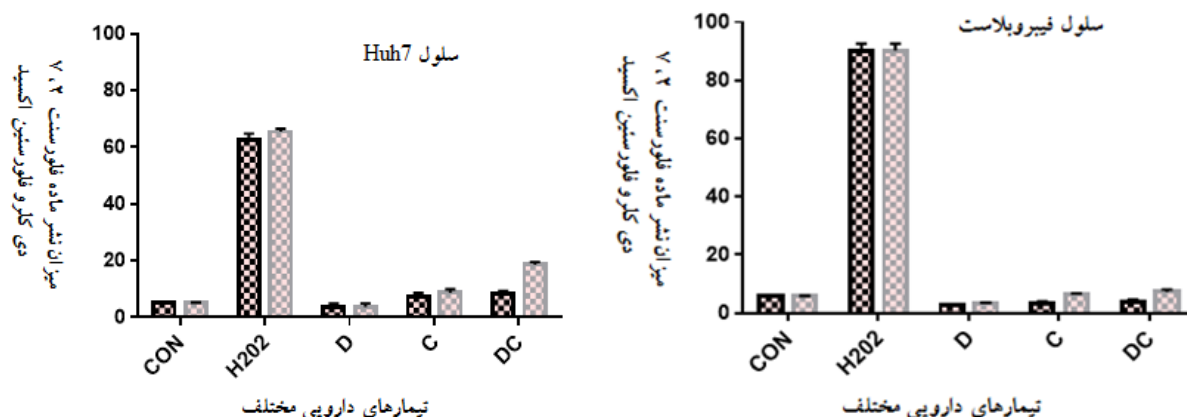
آزاد در هر دو رده سلولی طبیعی و سرطانی بسیار بالا بوده است. این در حالی است که سامانه های دارویی از جمله کورکومین آزاد و نانوسامانه DC بیشترین تاثیر را بر سلول سرطانی داشته اند و می توان گفت به صورت انتخابی عمل کرده است.

ارزیابی فرآیند مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپاپتوز) با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری

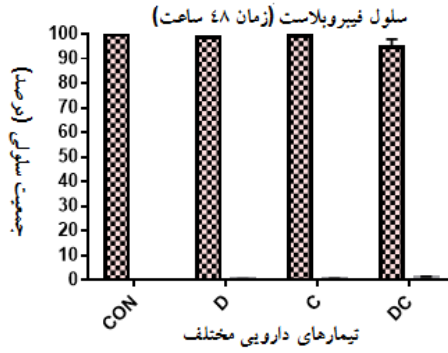
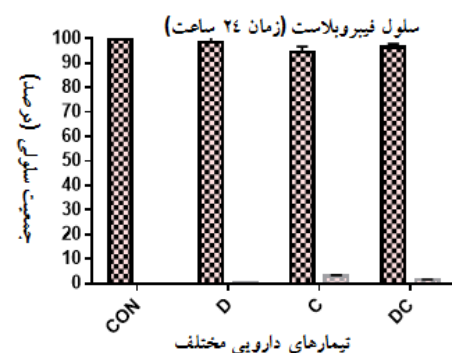
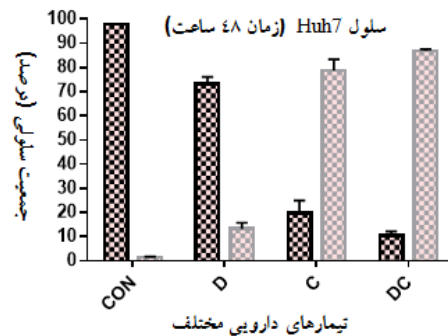
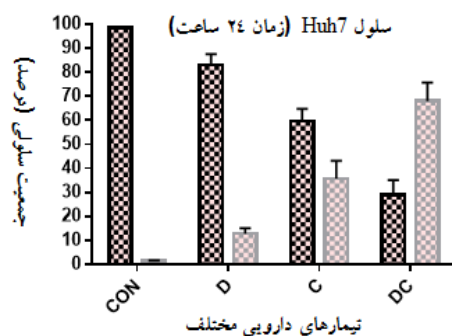
القای فرآیند آپاپتوز در اثر نانوسامانه DC در مقایسه با کورکومین آزاد مورد بررسی قرار داده شد. دو رده سلولی Huh-7 و فیبروبلاست با غلظت دارویی ۲۴ میکرومولار از کورکومین آزاد یا متصل به دندریمر در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، تیمار شد. میزان آپاپتوز در هر کدام از رده های سلولی با روش فلوسایتومتری و استفاده از کیت رنگ آمیزی Annexin-V و PI اندازه گیری شد. داده های



نمودار ۴) سامانه های دارویی حاوی کورکومین و تاثیر آن روی رده های سلولی Huh-7 و فیبروبلاست: D: دندریمر، C: کورکومین، DC: کورکومین-دندریمر



نمودار ۵) نتایج به دست آمده از آنالیز ROS تولیدی در سلول مورد تیمار با سامانه های دارویی: D: دندریمر، C: کورکومین، DC: کورکومین-دندریمر، CON: نمونه کنترل بدون تیمار



نمودار ۶ سامانه‌های دارویی حاوی کورکومین و تاثیر آن روی رده‌های سلولی نرمال و سرطانی: D: دندریمر، C: کورکومین، DC: کورکومین- دندریمر، CON: نمونه کنترل بدون تیمار

بحث

فناوری نانو با ارایه ابزارها و روش‌های درمانی جدید به‌عنوان رویکردی چندمنظوره در حوضه پزشکی بسیاری از معضلات تشخیصی و درمانی را مرتفع کرده است. این فناوری راهگشای مسیری جدید برای فائق‌آمدن به نگرانی‌های مربوط به روش‌های درمانی سنتی بوده است^[14]. نانوحامل‌های دارویی با داشتن ابعاد بسیار کوچک (به‌طور معمول بین ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر) می‌توانند برای افزایش محلولیت و همچنین رسانش بهتر مولکول‌های درمانی به محل التهاب و نقاط توموری بسیار کارآمد عمل کنند. این فرمولاسیون جدید دارویی قادر است زمان گردش در خون دارو را افزایش داده و باعث تجمع ذرات دارو در جایگاه آسیب‌دیده شوند. میسل‌های پلیمری، نانوذرات، لیپوزوم‌ها، پپتیدها، دندریمرها و غیره انواعی از این حامل‌ها هستند^[15]. مطالعات نشان داده که کورکومین یک مولکول چندمنظوره است، بدین‌معنی که قادر است اهداف مختلف سلولی از جمله فاکتورهای رونویسی، فاکتورهای رشد و گیرنده‌های آنها، سایتوکین‌ها، آنزیم‌ها، ژن‌های تنظیم‌کننده تکثیر سلولی و آپاپتوز را شناسایی کند و در درمان سرطان‌ها پتانسیل بالایی داشته باشد^[16]. کورکومین به‌واسطه حلقه‌های فنلی خاصیت چربی‌دوست داشته و محلولیت آن در محیط‌های آبگون بسیار پایین است، و بدین‌ترتیب زیست‌دسترسی پایین، جذب کم و متابولیسم سریع این ماده توسط سلول‌ها، کاربرد ضدسرطانی آن را محدود ساخته است. از طرفی تمایل آن به سلول‌های سرطانی در

مقایسه با انواع سلول طبیعی، نقش آن را در مطالعات سرطان برجسته‌تر کرده است^[17]. تحقیقات نشان داده است که استفاده از حامل‌های نانوابعاد برای افزایش زیست‌دسترسی کورکومین و رسانش آن به جایگاه توموری کارایی بسیار زیادی داشته است. با وجودی که عمده اهمیت فرمولاسیون‌های مورد استفاده در تولید نانوکورکومین، به‌دست‌آوردن ترکیباتی است که محلولیت کورکومین را افزایش دهند، اما با این وجود از غیرفعال‌شدن مولکول‌های کورکومین در اثر هیدرولیز سلولی نیز محافظت می‌کنند. یکی از انواع حاملینی که در حوضه دارورسانی جایگاه برجسته‌ای به دست آورده پلیمرهای دندریمری نانوابعاد است که در جهت افزایش محلولیت و دسترسی‌زیستی کورکومین پتانسیل زیادی داشته است. در واقع دندریمرها ساختارهای پلیمری با معماری چندمنظوره، خصوصیتی مشابه مولکول‌های زیستی دارند. این ساختارهای نانویی حاملینی بی‌نظیر در پزشکی مدرن محسوب می‌شوند که علت آن معماری متنوع شاخه‌دار و منعطف آنها است. همچنین انعطاف‌پذیری بالایی آنها برای اصلاح ساختاری با انواعی از روش‌ها امکان‌پذیر است^[10]. دندریمرها با داشتن خواصی از قبیل فضای داخلی آب‌گریز و محیط پیرامونی آب‌دوست، حلالیت و زیست‌دسترسی داروهای که در محیط آبی حلالیت پایینی دارند را فراهم می‌کند^[18]. در این تحقیق، کورکومین کانجوجه‌شده با ساختار دندریمری یک سامانه دارویی نانوابعادی را ارایه کرده است که ضمن داشتن معیارهای ذکرشده در خصوص دندریمرها این قابلیت را

فراهم کرده که بتواند تمامی خواسته‌های ما را در سطح سلولی فراهم کند. همان‌طور که در نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داده شده است سمیت کمتر این سامانه، میزان ROS بالاتر و نهایتاً القای آپاپتوز بیشتر در سلول سرطانی Huh7 را ارایه داده است. اندازه ایده‌آل نانوسامانه DC باعث شده تا در مقایسه با کورکومین آزاد در رسانش بیشتر مولکول درمانی کورکومین به داخل سلول Huh7 عملکرد بهتری داشته باشد. بررسی اثر سمیت سامانه نانویی DC روی دو رده سلولی سرطانی و سالم به وضوح تفاوت عملکرد این سامانه را در این دو رده سلولی نشان می‌دهد. همچنان که در نمودار MTT نشان داده شده داروی کورکومین در هیچ‌کدام از دو فرم آزاد و بارگذاری‌شده در نانوسامانه DC، روی سلول سالم فیبروبلاست تاثیر قابل توجهی نداشته است. اما در غلظت‌های معینی باعث سمیت قابل ملاحظه‌ای در رده سلولی Huh7 شده است. از طرفی میزان ROS تولیدشده توسط کورکومین بارگذاری‌شده در سامانه نانوباعاد و همچنین فرم آزاد کورکومین نیز در رفتار مشابه‌ای تاثیر متفاوتی روی دو رده سلولی سالم و سرطانی نشان داده‌اند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که میزان ROS سلولی در اثر فرآیندهای درون‌سلولی مانند فسفریلاسون اکسیداتیو میتوکندریایی یا برهم‌کنش سلول و اندامک‌های آن با منابع محرک خارجی مانند ترکیبات دارویی ایجاد می‌شود. این تنش اکسیداتیو منجر به آسیب مستقیم و غیرمستقیم ترکیبات درشت مولکولی داخل سلول مانند اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌شود و متعاقباً ایجاد بیماری‌هایی از جمله سرطان، بیماری‌های عصبی-عروقی، دیابت و پیری می‌کند^[19-21]. عملکرد میتوکندری و میزان ROS تولیدی به‌گونه‌ای است که سطوح پایین ROS می‌تواند به‌عنوان پیام‌رسان و در نتیجه تغییر دادن ساختار و عملکرد پروتئین عمل کرده و سطوح بالای آن به‌صورت غیراختصاصی به مولکول‌های DNA، پروتئین و چربی‌ها آسیب زده و منجر به تخریب زنجیره انتقال الکترون میتوکندری و متعاقباً اختلال در عملکرد میتوکندری و تهدید بقای سلول شود. القای موتاسیون در DNA میتوکندری یا نقص آنزیمی میتوکندری منجر به افزایش تولید ROS می‌شود^[22]. کورکومین به‌عنوان یک عامل درمانی موثر در تیمار بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، بیماری‌های عفونی، عصبی، قلبی-عروقی، دیابت و غیره استفاده شده است^[23, 24]. تاثیر این دارو در تیمار سرطان از طریق مهار چندین مسیر پیام‌رسان سلولی، القای آپاپتوز، ممانعت از تکثیر سلولی، متاستاز و رگ‌زایی اعمال می‌شود^[25]. در واقع علت اصلی بروز سرطان نقص در عملکرد ژن‌های مختلف به‌خصوص ژن‌های مرتبط با میتوکندریایی است^[2]. این اندامک در تنظیم آپاپتوز سلول، مهار تولید رادیکال‌های آزاد و القا آپاپتوز برای درمان سرطان ایفای نقش می‌کند^[26, 27]. تحقیقات نشان داده که اثر کورکومین در فرآیند آپاپتوز با تولید رادیکال‌های آزاد و در ادامه رهایش سیتوکروم C از غشای میتوکندری اعمال می‌شود. بدین‌ترتیب کورکومین با افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری‌های سلول‌های مورد هدف همانند سایر مهارکننده‌های پروتئازوم اثر

قوی‌تری را روی سلول‌های در حال تکثیر در مقایسه با سلول‌های تمایز یافته اعمال می‌کند^[28, 29]. پیشنهاد می‌شود که اختلالات میتوکندریایی یک نقش کلیدی در پیشرفت سرطان بازی می‌کنند و هدف قراردادن تغییرات میتوکندری و سیگنالینگ بازسازی‌شده میتوکندری می‌تواند یک استراتژی امیدوارکننده برای توسعه درمان سرطان باشد^[30]. از آنجایی که آسیب به DNA میتوکندری یا آنزیم‌های درگیر در آن منجر به افزایش رادیکال آزاد تولیدی توسط میتوکندری می‌شود بنابراین داروهایی که بتوانند به‌طور انتخابی وارد میتوکندری شوند، در تولید رادیکال آزاد و نهایتاً القای آپاپتوز در سلول‌های سرطانی کارایی بالاتری خواهند داشت. با توجه به نقش محوری میتوکندری در شروع آپاپتوز^[27, 31] با آغاز این فرآیند و پیوستن مولکول‌های پروتئینی Apaf-1، سیتوکروم C و مولکول‌های dATP، به همدیگر، کمپلکس آپاپتوزوم ایجاد می‌شود و سلول را به سمت مرگ خود خواسته هدایت می‌کند. بنابراین عوامل دارویی که آپاپتوز را مورد هدف قرار دهند می‌توانند کاندید امیدوارکننده‌ای در درمان سرطان باشند^[17]. تحقیقات زیادی نقش کورکومین در القای فرآیند آپاپتوز و توانایی آن در فعال کردن مسیرهای مختلف در این فرآیند را بررسی تایید کرده‌اند^[32-35]. در این تحقیق نیز نتایج به‌دست‌آمده در راستای پژوهش‌های پیشین بوده است و به‌طوری که نشان داده شده کورکومین بارگذاری‌شده در نانوسامانه DC در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌ترتیب (± 0.14) و $68/15$ و (± 0.14) از $86/88\%$ در القای فرآیند آپاپتوز موفق عمل کرده است. این در حالی است که در هر دو بازه زمانی میزان آپاپتوز ناشی از کورکومین آزاد کمتر بوده است. با توجه به تاثیر بیشتر داروی بارگذاری‌شده در سامانه نانوباعاد DC می‌توان این‌گونه تصور کرد که ابعاد کوچک‌تر این سامانه موجب ورود بیشتر این سامانه و نهایتاً داروی بیشتر به داخل سلول و متعاقباً القای آپاپتوز بیشتر بوده است.

نتیجه‌گیری

سیستم‌های سنتی در درمان سرطان از برنامه‌های نوین دارورسانی پیروی نمی‌کنند. داروی مورد استفاده در آنها وزن مولکولی پایین داشته و مقدار زیادی از آن مورد نیاز است که منجر به سمیت می‌شود. نانو ساختارهای دندریمری عنوان نانوذراتی ایده‌آل برای آینده پزشکی امیدهای زیادی را ایجاد نموده‌اند. اتصال کورکومین به این دندریمرهای نسل چهارم رسانش آن را به سلول هدف را تسهیل کرده است. نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که کاندوگه کردن کورکومین به ساختار دندریمری سبب افزایش یافتن محلولیت، پایداری و بهبود اثرات بیولوژیکی آن می‌شود. القای فرآیند آپاپتوز ناشی از کورکومین بارگذاری‌شده در نانوسامانه DC در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ در مقایسه با کورکومین آزاد به مراتب بیشتر بوده است. ورود این سامانه نانوباعاد به داخل سلول موفق‌تر بوده و متعاقباً آپاپتوز بیشتری را القا کرده است. درواقع نانوسامانه دندریمری به‌واسطه بهبود خواص فیزیکوشیمیایی

- 9- Dufes C, Uchegbu IF, Schätzlein AG. Dendrimers in gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(15):2177-202.
- 10- Jain K, Kesharwani P, Gupta U, Jain N. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int J Pharm.* 2010;394(1-2):122-42.
- 11- Nomani A, Haririan I, Rahimnia R, Fouladdel S, Gazori T, Dinarvand R, et al. Physicochemical and biological properties of self-assembled antisense/poly (amidoamine) dendrimer nanoparticles: the effect of dendrimer generation and charge ratio. *Int J Nanomedicine.* 2010;5:359-69.
- 12- Tahmasebi Birgani M, Erfani-Moghadam V, Babaei E, Najafi F, Zamani M, Shariati M, et al. Dendrosomal nano-curcumin; The novel formulation to improve the anticancer properties of curcumin. *Prog Biol Sci.* 2015;5(2):143-58.
- 13- Erfani-Moghadam V, Nomani A, Zamani M, Yazdani Y, Najafi F, Sadeghizadeh M. A novel diblock of copolymer of (monomethoxy poly [ethylene glycol]-oleate) with a small hydrophobic fraction to make stable micelles/polymersomes for curcumin delivery to cancer cells. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:5541-54.
- 14- Dinari A, Moghadam TT, Abdollahi M, Sadeghizadeh M. Synthesis and characterization of a Nano-Polyplex system of GNRs-PDMAEA-pDNA: an inert self-catalyzed degradable carrier for facile gene delivery. *Sci Rep.* 2018;8(8112):1-12.
- 15- Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers RM, Hennink WE. Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials.* 2014;35(10):3365-83.
- 16- Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(4):787-809.
- 17- Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS J.* 2009;11(3):495-510.
- 18- Lim J, Simanek EE. Synthesis of water-soluble dendrimers based on melamine bearing 16 paclitaxel groups. *Org Lett.* 2008;10(2):201-4.
- 19- Shukla RK, Sharma V, Pandey AK, Singh S, Sultana S, Dhawan A. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol In Vitro.* 2011;25(1):231-41.
- 20- Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Ann Rev Pathol.* 2010;5:253-95.
- 21- Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(7):579-91.
- 22- Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab.* 2014;2(1):17.
- 23- Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol.* 2008;76(11):1590-611.
- 24- Bengmark S. Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NfκB, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. *J Parenter Enteral Nutr.* 2006;30(1):45-51.
- 25- López-Lázaro M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and

و افزایش محلولیت کورکومین عملکرد بهتری داشته است. در مجموع، این نانوحامل به‌عنوان یک سامانه هوشمند و کارآمد می‌تواند برای رسانش داروهای آب‌گریز به سلول‌های سرطانی در نظر گرفته شود. روی‌هم‌رفته این سامانه دارویی می‌تواند راهگشای مسیر جدیدی در طراحی و سنتز سامانه‌های دارورسان نانوبعاد باشد.

تشکر و قدردانی: از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی به‌دلیل مساعدت و همکاری که در طول دوره دکتری با اینجانب داشته‌اند کمال تشکر را دارم. از دکتر/وتیال بورا عضو هیئت علمی Indian IIT Guwahati, Institute of Technology Guwahati (IITG) به‌دلیل فعال‌کردن کورکومین در آزمایشگاه ایشان تشکر می‌کنم.

تابیدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: شهلا کیان‌امیری (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی (۳۵٪)؛ علی دیناری (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/نگارنده بحث (۱۵٪)؛ علیرضا نعمانی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۱۵٪)؛ محسن مردی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ بهرام دارایی (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ مجید صادقی‌زاده (نویسنده ششم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۱۵٪)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- 1- Bharali DJ, Khalil M, Gurbuz M, Simone TM, Mousa SA. Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers. *Int J Nanomedicine.* 2009;4:1-7.
- 2- Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett.* 2008;269(2):199-225.
- 3- Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol.* 2007;595:1-75.
- 4- Bonifácio BV, Silva PB, Ramos MA, Negri KM, Bauab TM, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:1-15.
- 5- Thilakarathna SH, Rupasinghe HP. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients.* 2013;5(9):3367-87.
- 6- Mignani S, Rodrigues J, Tomas H, Zablocka M, Shi X, Caminade AM, et al. Dendrimers in combination with natural products and analogues as anti-cancer agents. *Chem Soc Rev.* 2018;47(2):514-32.
- 7- Wu LP, Ficker M, Christensen JB, Trohopoulos PN, Moghimi SM. Dendrimers in medicine: therapeutic concepts and pharmaceutical challenges. *Bioconjug Chem.* 2015;26(7):1198-211.
- 8- Mintzer MA, Grinstaff MW. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chem Soc Rev.* 2011;40(1):173-90.

- 31- Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 1999;283(5407):1482-8.
- 32- Thayyullathil F, Chathoth S, Hago A, Patel M, Galadari S. Rapid reactive oxygen species (ROS) generation induced by curcumin leads to caspase-dependent and-independent apoptosis in L929 cells. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(10):1403-12.
- 33- Park K, Lee JH. Photosensitizer effect of curcumin on UVB-irradiated HaCaT cells through activation of caspase pathways. *Oncol Rep*. 2007;17(3):537-40.
- 34- Gao X, Deeb D, Jiang H, Liu YB, Dulchavsky SA, Gautam SC. Curcumin differentially sensitizes malignant glioma cells to TRAIL/Apo2L-mediated apoptosis through activation of procaspases and release of cytochrome c from mitochondria. *J Exp Ther Oncol*. 2005;5(1):39-48.
- 35- Karmakar S, Banik NL, Patel SJ, Ray SK. Curcumin activated both receptor-mediated and mitochondria-mediated proteolytic pathways for apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Neurosci Lett*. 2006;407(1):53-8.
- chemotherapeutic agent. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52 Suppl 1:S103-27.
- 26- Wallace DC. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005;70:363-74.
- 27- Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(6):447-64.
- 28- Duvoix A, Morceau F, Delhalle S, Schmitz M, Schnekenburger M, Galteau MM, et al. Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1-1 inhibition. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(8):1475-83.
- 29- Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J*. 2006;8(3):E443-9.
- 30- Hsu CC, Tseng LM, Lee HC. Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression. *Exp Biol Med*. 2016;241(12):1281-95.