



Synthesis, Characterization and Optimization of Self-Assembled Nanoparticles of Polyethyleneglycol-Polycaprolactone Diblock Copolymer as the Efficient Nanocarriers for in Vitro Curcumin Delivery into Breast Cancer Cells of MCF-7 Cell Line

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Ansari Dezfouli E.¹ PhD,
Danafar H.*² PhD,
Nomani A.R.² PhD,
Sadeghizadeh M.³ PhD

How to cite this article

Ansari Dezfouli E, Danafar H, Nomani A.R, Sadeghizadeh M. Synthesis, Characterization and Optimization of Self-Assembled Nanoparticles of Polyethyleneglycol-Polycaprolactone Diblock Copolymer as the Efficient Nanocarriers for in Vitro Curcumin Delivery into Breast Cancer Cells of MCF-7 Cell Line. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):415-423.

¹Nanobiotechnology Department, Bioscience Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Pharmaceutical Chemistry Department, Pharmacy Faculty, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

³Genetics Department, Bioscience Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Pharmacy Faculty, Next to Ayatollah Mousavi Hospital, Gava-zang Road, Zanjan, Iran. Postal Code: 4513956184

Phone: +98 (24) 33473635

Fax: +98 (24) 33473639

danafar@zums.ac.ir

Article History

Received: July 10, 2018

Accepted: November 5, 2018

ePublished: September 21, 2019

ABSTRACT

Nanotechnology is currently one of the promising approaches for cancer diagnosis and treatment. Among different materials that so far have been used for drug delivery, the systems based on the polymers are more attractive, due to their simple manufacturing processes and diversity in polymer functionalization and modification methods. Polyethyleneglycol (PEG) and polycaprolactone (PCL) are two FDA approved and biocompatible synthetic polymers which frequently have been used in the pharmaceutical industry. Apart from the delivery carriers, the active ingredient's safety is also very challenging in case of cancer therapeutics. The chemotherapy agent's side effects are one of the main patients' death in many cancers. The naturally extracted curcumin is one of the most interesting anti-cancer agents with a proven selective effect on the cancerous cells which results in minimum side effects during the treatment. Curcumin has been tested as the main agent or in combination therapy of various cancers. Numerous studies have shown the safety and efficacy of curcumin at different administered doses. However, the main obstacle in the application of curcumin is its low aqueous solubility and low and variable bioavailability after administration. For that, in this study, we tried to enhance the solubility of curcumin using a novel diblock copolymer of PEG-PCL nanoparticulate system. At first, the PEG-PCL copolymer was synthesized and then characterized by GPC, FTIR, and ¹H NMR methods. After that, curcumin was loaded in the micellar structure of PEG-PCL at an optimized encapsulation approach and then the toxicity of the prepared nanoparticles was assessed in MCF-7 cell culture. The results showed that the prepared nanoparticles could efficiently entrap the hydrophobic molecules of curcumin, improve its solubility and increase in vitro activity against cancer cell line.

Keywords Polymersome nanoparticles; Polymeric micelles; Di-block co-polymers; Curcumin; In Vitro; MCF-7 Cell Line

CITATION LINKS

[1] Curcumin, a promising anti-cancer therapeutic: a review of its chemical properties ... [2] Curcumin: from ancient medicine to current clinical ... [3] Effectiveness of biofeedback and relaxation training in reducing the side effects of cancer ... [4] Novel drug delivery systems to improve bioavailability of ... [5] A supramolecular curcumin vesicle and its application in controlling curcumin ... [6] Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery ... [7] Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted ... [8] Modifying the hydrophilic-hydrophobic interface of PEG-b-PCL to increase micelle ... [9] Encapsulation of hydrophobic drugs in polymeric micelles through ... [10] Linolenic acid-modified PEG-PCL micelles for curcumin ... [11] Oral delivery of capsaicin using MPEG-PCL ... [12] Polymer molecular weight analysis by ¹H NMR ... [13] Thermo-induced shape-memory PEG-PCL copolymer as a dual-drug-eluting biodegradable ... [14] Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for ... [15] Curcumin, a component of turmeric: from farm to ... [16] (2017) Curcumin mediates anticancer effects by modulating multiple ... [17] Curcumin in various ... [18] A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles ... [19] Exosome and polymersome for potential theranostic ... [20] Amphiphilic block copolymers for drug ... [21] Comparative evaluation of polymersome versus micelle ... [22] Oligoalanine-modified Pluronic-F127 nanocarriers for the delivery ... [23] Curcumin-encapsulated MePEG/PCL diblock copolymeric ... [24] Nanotechnology in drug ... [25] Thermosensitive hydrogel containing dexamethasone micelles for preventing ... [26] In vitro evaluation of poly (ethylene glycol)-block-poly ... [27] Polymeric micelles: authoritative aspects for drug ... [28] Mechanistic evaluation of the signaling events regulating ... [29] Curcumin: the story so ... [30] Bioavailability of curcumin: problems and ... [31] Polymeric curcumin nanoparticle pharmacokinetics ...

سنتز، ارزیابی و بهینه‌سازی نانوذره خودمجمع‌شونده از دی‌بلاک‌کوپلیمر حاصل از پلی‌اتیلن‌گلایکول و پلی‌کاپرولاکتون به‌عنوان نانوحامل به‌منظور انتقال موثر کورکومین به سلول‌های سرطانی پستان از رده سلولی MCF-7

احسان انصاری دزفولی PhD

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

حسین دانافر* PhD

گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

علیرضا نعمانی PhD

گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

مجید صادقی‌زاده PhD

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

چکیده

فناوری نانو در حال حاضر یکی از رویکردهای امیدبخش برای تشخیص و درمان سرطان است. سیستم‌های مبتنی بر پلیمرها به دلیل فرآیندهای تولید ساده و تنوع در عملکرد و روش‌های اصلاح پلیمر، جذاب‌تر هستند. پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) و پلی‌کاپرولاکتون (PCL) دو پلیمر سنتزی زیست‌سازگار مورد تایید FDA بوده که اغلب در صنایع دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. غیر از حامل‌های دارورسانی، در درمان سرطان بحث ایمنی مواد تشکیل‌دهنده فعال نیز بسیار چالش‌برانگیز است. عوارض جانبی شیمی‌درمانی یکی از مهم‌ترین علل مرگ‌ومیر بیماران در بسیاری از سرطان‌ها است. کورکومین استخراج‌شده به‌طور طبیعی، یکی از جالب‌ترین عوامل ضدسرطان است که اثرات انتخابی اثبات‌شده روی سلول‌های سرطانی داشته و منجر به حداقل عوارض جانبی در طول درمان می‌شود. کورکومین به‌عنوان عامل اصلی، در درمان ترکیبی سرطان‌های مختلف آزمایش شده است. مطالعات متعدد ایمنی و کارکرد کورکومین در دوزهای مختلف تجویز شده را نشان می‌دهند. با این حال، مانع اصلی در استفاده از کورکومین، حلالیت پایین آن در آب و قابلیت دسترسی بیولوژیک کم و متغیر پس از تزریق است. بنابراین در این مطالعه سعی شد حلالیت کورکومین با استفاده از یک سیستم نانوذره دی‌بلاک‌کوپلیمر نوین PEG-PCL افزایش یابد. ابتدا کوپلیمر PEG-PCL سنتز و سپس خصوصیاتش با روش‌های GPC، FTIR و ¹H-NMR مشخص شد. پس از آن، کورکومین در ساختار میسل PEG-PCL به‌صورت بهینه کپسوله و سمیت نانوذرات تهیه‌شده در کشت سلول MCF-7 ارزیابی شد. طبق نتایج نانوذرات آماده‌شده می‌توانند مولکول‌های هیدروفوب کورکومین را به‌طور موثری به دام انداخته، حلالیت آن را بهبود بخشیده و باعث افزایش فعالیت آن در از بین بردن سلول سرطانی در شرایط برون‌تنی شوند.

کلیدواژه‌ها: نانوحامل‌های پلی‌مرزومی، میسل‌های پلیمری، دی‌بلاک‌کوپلیمر، کورکومین، آزمون برون‌تن، رده سلولی MCF-7

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۱۴

*نویسنده مسئول: danafar@zums.ac.ir

مقدمه

برای چندین دهه گذشته، گرایش به استفاده از محصولات طبیعی به‌عنوان کاربردهای پزشکی به‌طور چشم‌گیری افزایش یافته است [1].

اگرچه این ایده خیلی جدید به نظر می‌رسد ولی نیاکان و اجداد ما به‌طور گسترده‌ای از ترکیبات طبیعی به‌منظور مبارزه با بیماری‌ها استفاده می‌کردند [2]. توسعه و گسترش داروهای مصنوعی انقلاب نوینی را در صنعت پزشکی در یک قرن اخیر به وجود آورد، اما خصوصیات نامطلوب و اثرات جانبی این داروها الهام‌بخش تحقیق برای یافتن روش‌های طبیعی برای پیشگیری و درمان بیماری‌ها شد با این امید که ترکیبات طبیعی در بدن عملکرد بهتری نسبت به ترکیبات مشابه مصنوعی خود دارند. علاقه ویژه‌ای که نسبت به کورکومین، به‌عنوان ماده موثره ادویه زردچوبه، وجود دارد به‌دلیل رنگ، طعم و خصوصیات ویژه شیمیایی و زیستی این ماده است. کورکومین از گیاه کورکوما لانگا (*Curcuma longa*) استخراج می‌شود که یکی از گیاهان خانواده زنجبیل است [1]. انگیزه اصلی برای استفاده از کورکومین در درمان سرطان نه‌تنها به‌علت اثرات درمانی آن بوده بلکه به‌علت دانستن این مطلب است که بدن بیماران کورکومین را بهتر تحمل می‌کند، در حالی که داروهای شیمی‌درمانی اثرات جانبی شدید و مضر از قبیل تهوع و استفراغ، اسهال، ریزش مو و در طولانی‌مدت اثرات جدی‌تری مانند نارسایی کبد را به همراه دارند [3].

کورکومین محلولیت بسیار کمی در محیط آبی دارد و پس از تزریق تحت متابولیسم سریع قرار گرفته و به سرعت از سیستم بدن حذف می‌شود و به همین دلیل دسترسی زیستی بسیار پایینی دارد [4]. به‌منظور برطرف‌نمودن این مشکلات، راهکارهای مختلفی مورد بررسی و استفاده قرار گرفته است که از جمله این موارد می‌توان به استفاده از نانوحامل‌ها مانند دندروزوم، نانوذرات، نانولیپوزوم، میسل و آگروزوم‌ها اشاره نمود. از این نانوحامل‌ها برای انکپسوله کردن و حمل کورکومین استفاده شده که سبب افزایش محلولیت، پایداری و فعالیت زیستی این ماده در محیط آبی می‌شود [5]. یکی از پرکاربردترین حامل‌های نانو مربوط به میسل‌های پلیمری و پلیمرزوم‌ها است که از دی یا تری‌بلاک‌کوپلیمرها تشکیل شده است. این حامل‌ها متعلق به گروهی از کلئوئیدهای با اندازه نانو است که به‌وسیله تجمع خودبه‌خودی بلوک‌های کوپلیمر دوگانه‌دوست در محیط آبی به وجود می‌آیند. قسمت مرکزی آب‌گریز میسل برای تجمع و نگهداری داروهای آب‌گریز عمل می‌کند و پوسته آب‌دوست آن موجب پایداری هسته آب‌گریز می‌شود. این مساله سبب می‌شود که این ذره برای استفاده در محیط درون‌تن مناسب باشد. قطر این ذرات در حدود ۵ تا ۱۰۰ نانومتر است. به نظر می‌رسد که میسل‌ها از جمله مناسب‌ترین سیستم‌های نانوذره‌ای به‌منظور انجام آزمایشات بالینی هستند و در حال حاضر ابزار مناسبی برای انتقال داروهای آب‌گریز و DNA هستند که قابلیت عامل‌دارشدن با لیگندهای مختلفی را دارند [6].

پلیمرزوم‌ها سیستم‌های مخزن ماندنی هستند که با الگوبرداری از ساختمان غشای سلولی ساخته می‌شوند و از دو سر آب‌دوست و آب‌گریز تشکیل شده‌اند و قطرشان از ۱۰ نانومتر تا ۱۰۰ میکرومتر متنوع است. بلاک‌های آب‌گریز هر کوپلیمر برای به حداقل رساندن تماس

با آب، با هم جمع می‌شوند، در حالی که سرهای آب‌دوست قسمت‌های درونی و بیرونی را تشکیل می‌دهند. به این ترتیب از این حامل‌ها هم برای انتقال داروهای آب‌دوست در درون محیط آبی و داروهای آب‌گریز بین غشا می‌توان استفاده نمود. در صورت بارگذاری مناسب دارو و کارایی بالای نانوحامل‌های مورد نظر می‌توان از آنها به‌منظور انتقال داروهای مشابه دیگر یا ژن استفاده کرد [7].

در مطالعه حاضر با استفاده از نانوذرات پلیمری اقدام به افزایش محلولیت کورکومین شده است. ابتدا دی‌بلاک mPEG-PCL با استفاده از روش پلیمریزاسیون حلقه باز (ROP) سنتز شد و توسط روش‌های دستگاهی مناسب از قبیل NMR و DSC مورد تایید قرار گرفت. بارگذاری کورکومین در نانوذرات با استفاده از روش تبخیر محلول دو حلالی صورت گرفت و میزان داروی بارگذاری‌شده با استفاده از HPLC اندازه‌گیری شد. سمیت نانوذرات توسط روش MTT assay و میزان جذب کورکومین توسط رده سلول سرطان سینه MCF-7 مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: متوکسی‌پلی‌اتیلن‌گلیکول (mPEG؛ آلمان؛) با متوسط وزن مولکولی ۵۰۰۰ دالتون و ۲- اتیل‌هگزانات (Sn(Oct)؛ سیگما؛ آلمان) کاپرولاکتون (آکروس؛ ایالات متحده آمریکا)، کورکومین (مرک؛ آلمان) و دیگر مواد شیمیایی و محلول‌ها با درجه خلوص آزمایشگاهی (امرتات شیمی؛ ایران) خریداری شدند. به‌منظور تهیه محلول‌ها و در طول انجام آزمایشات، آب دوبار تقطیر دیونیزه فیلترشده (با فیلتر ۰/۴۵ میکرون) به کار رفتند.

روش‌ها

سنتز کوپلیمرهای mPEG-PCL: کوپلیمرهای mPEG-PCL براساس روش پلیمریزاسیون حلقه باز [8] از کاپرولاکتون و متوکسی‌پلی‌اتیلن‌گلیکول به‌عنوان مواد اولیه واکنش و در حضور Sn(Oct) به‌عنوان کاتالیزور سنتز شدند. به‌طور خلاصه کاپرولاکتون به میزان ۵ گرم، mPEG به میزان یک گرم و ۰/۱ میلی‌مول از Sn(Oct) درون یک بالن ته‌گرد ریخته شدند و به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای ۱۲۰°C در شرایط فاقد اکسیژن برای انجام پلیمریزاسیون قرار داده شد. پس از ۱۲ ساعت دمای کوپلیمرهای حاصل تا دمای محیط پایین آورده شد، سپس در کلروفرم حل و توسط دی‌اتیل‌اتر سرد رسوب‌گیری صورت گرفت. محلول رویی که حاوی مونومرها بود حذف و رسوب برای خشک‌شدن، به‌مدت ۲۴ ساعت در آون خلا قرار داده شد.

تعیین خصوصیات کوپلیمرهای mPEG-PCL: ساختار شیمیایی کوپلیمرها توسط طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) (Bruker؛ آلمان) و رزونانس مغناطیس هسته (H-NMR) در کلروفرم دوتره در ۴۰۰ مگاهرتز (Bruker؛ آلمان) شناسایی و همچنین از نتایج تکنیک NMR برای تعیین میانگین وزن مولکولی نیز استفاده شد. گرماسنجی روبشی تفاضلی (DSC) با دستگاه مدل

تهیه میسل‌های حاوی کورکومین: کورکومین در نانوحامل‌های میسلی براساس روش تبخیر حلال دوگانه ذکرشده در مقاله علی‌آبادی و همکاران [9] با تغییرات جزئی بارگذاری شد. میزان ۳۰ میلی‌گرم از mPEG-PCL و ۶ میلی‌گرم از کورکومین به‌صورت جداگانه در یک میلی‌لیتر استون حل، سپس با هم مخلوط و به‌صورت قطره‌قطره به ۱۲ میلی‌لیتر آب در شرایط هم‌زدن به‌آرامی اضافه شدند. به‌منظور حذف استون، مخلوط برای مدت ۴ ساعت در دمای اتاق هم‌زده و سپس استون باقی‌مانده توسط پمپ خلا از حلال آبی حذف شد. محلول زردرنگ برای حذف کورکومین آزاد بارگذاری‌نشده برای مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و پس از حذف محلول رویی، باقی‌مانده حلال توسط فریز درایر تحت فشار ۱۴ پاسکال و دمای ۷۸°C- به‌مدت ۴۸ ساعت حذف شد.

خصوصیات میسل‌ها

مورفولوژی ذرات: مورفولوژی میسل‌ها توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) مدل نانویژارد (PK؛ آلمان) تعیین شد. برای بررسی نمونه‌ها، میسل‌ها در آب رقیق شده و به میزان یک میکرولیتر روی یک لایه تازه میکا به ابعاد یک سانتی‌متر مربع قرار داده و توسط جریان هوا خشک شد. اندازه‌گیری‌های میکروسکوپی در حالت تماسی متناوب صورت گرفت.

تعیین اندازه ذرات: توزیع اندازه ذرات میسلی توسط روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) با دستگاه نانو/زتا‌سایزر (مالورن؛ انگلستان) انجام شد.

تعیین کارایی بارگذاری: به‌منظور تعیین کارایی بارگذاری دارو در میسل‌ها، دو شاخص نرخ بارگذاری دارو و کارایی به دام‌انداختن مشخص شدند. کارایی به دام‌اندازی از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times \frac{\text{وزن دارو}}{\text{وزن}} = \text{بازده به دام}$$

که وزن دارو و وزن میسل به‌ترتیب مشخص‌کننده وزن داروی به‌دام‌افتاده و وزن کل میسل‌های حاوی دارو است. برای تعیین نرخ بارگذاری دارو، یک میلی‌گرم از میسل حاوی دارو در یک میلی‌لیتر

کلروفرم حل و کورکومین با اسپکتروفتومتر مدل GENESYS10S (ترموفیشر؛ ایالات متحده آمریکا) در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه میزان دارو منحنی استاندارد به کار رفت. درصد بارگذاری دارو از طریق فرمول زیر به دست آمد:

$$100 \frac{\text{وزن دارو}}{\text{وزن}} = \text{درصد بارگذاری دارو}$$

آنالیز FT-IR: بررسی FT-IR به منظور به دست آوردن اطلاعات بیشتر در مورد میان‌کنش بین مواد در یک سیستم نانوحامل انجام شد. معمولاً میان‌کنش بین دارو و پلیمر براساس تغییر پیوندها محاسبه می‌شود که توسط گروه‌های عاملی و عریض شدن طیف‌های IR نسبت به طیف اختصاصی محاسبه می‌شود. برای تایید حضور هر گونه میان‌کنش بین دارو و پلیمر، طیف FT-IR میسل‌های جامد با دارو و پلیمر خالص مقایسه شد. نمونه‌های فریزدرایر شده به همراه KBr به خوبی مخلوط شدند تا پودر یکنواختی تشکیل شود و سپس از آنها دیسک ساخته و طیف FT-IR در محدوده ۶۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر ثبت شد.

آزمون DSC: آزمون گرماسنجی روبشی تفاضلی DSC برای به دست آوردن اطلاعات بیشتر از ارتباط پلیمر-دارو و میان‌کنش‌های ممکن میان دارو-پلیمر و همچنین تغییرات فیزیکی که در دارو یا پلیمر توسط تغییرات دمایی قابل شناسایی هستند، انجام شد. آنالیز DSC روی دارو و پلیمر خالص و میسل‌های حاوی دارو صورت گرفت. نمونه‌ها با سرعت ۱۰°C در دقیقه گرم و اطلاعات از دمای صفر تا ۲۰۰°C ثبت شدند.

بررسی قدرت بقای سلول توسط آزمایش MTT: این آزمایشات روی سلول‌های سرطان سینه انسان (MCF-7؛ انیستیتو پاستور؛ ایران) انجام شد. سلول‌ها در محیط DMEM با گلوکز بالا حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ پنی‌سیلین-استرپتومایسین در دمای ۳۷°C در انکوباتور حاوی ۵٪ دی‌اکسیدکربن کشت داده شدند. پس از رسیدن تراکم سلول‌ها به ۷۵٪، برای برداشت، به مدت ۳ تا ۵ دقیقه با ۵/۵ گرم بر لیتر تریپسین در دمای ۳۷°C قرار داده شدند.

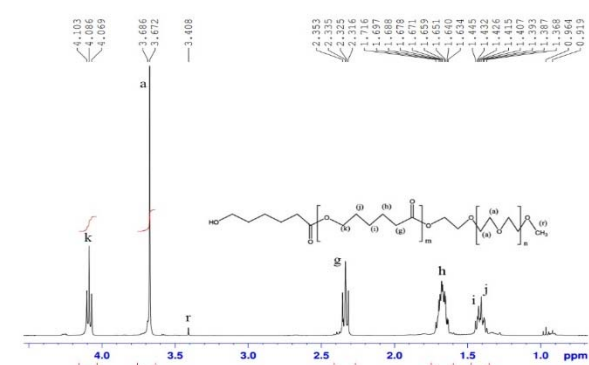
به منظور انجام آزمون MTT (۳- (۴، ۵- دی‌متیل‌تيازول-۲- ایل)-۲، ۵- دی‌فنیل‌تترازولیوم بروماید) پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به کار رفتند، ابتدا سلول‌ها درون پلیت‌ها کاشته شدند و یک شبانه‌روز اجازه داده شد تا چسبیده و رشد کنند. در هر چاهک به تعداد ۶۰۰۰ سلول ریخته شد. سپس سلول‌ها در محیط کشت تازه شامل رقت‌های مختلفی از کورکومین خالص، میسل‌های حاوی کورکومین و میسل‌های خالی برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اینکوبه شدند. به عنوان شاهد، از محیط کشت کامل و عاری از دارو یا میسل استفاده شد. پس از اتمام بازه‌های زمانی مشخص شده، به میزان ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه و پلیت‌ها برای مدت ۴ ساعت در CO₂-انکوباتور در دمای ۳۷°C و رطوبت ۹۵٪ و ۵٪ جریان دی‌اکسیدکربن اینکوبه شدند. در مرحله بعد محیط کشت حاوی محلول MTT از چاهک‌ها حذف و به میزان

۱۰۰ میکرولیتر از حلال دی‌متیل‌سولف‌اکساید (DMSO) به منظور حل کردن کریستال‌های فورمازان به هر چاهک اضافه شد. برای افزایش محلولیت، پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در شیکر در تاریکی تکان داده شد. مقدار جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر توسط پلیت ریدر اندازه‌گیری و به چاهک‌های کنترل (که فاقد سلول و محیط کشت بودند) نیز به همان میزان DMSO اضافه شد. در هر آزمون تمامی نمونه‌ها در سه تکرار در پلیت اضافه و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شدند. نتایج MTT نشان‌دهنده تعداد سلول‌های زنده موجود در پلیت است.

آنالیز آماری: آنالیز آماری توسط نرم‌افزار SPSS 25 صورت گرفت و تمامی داده‌ها براساس میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شدند. تجزیه و تحلیل آماری براساس آنالیز تحلیل واریانس یک‌طرفه انجام شد. نتایج آزمون MTT و تعیین IC50 توسط نرم‌افزار Graph pad 6 صورت گرفت.

یافته‌ها

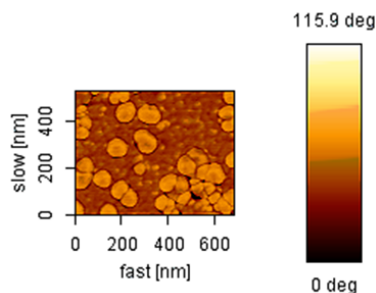
سنتز و تعیین خصوصیات کوپلیمر mPEG-PCL: دی‌بلاک کوپلیمر mPEG-PCL توسط پلیمریزاسیون حلقه باز کاپرولاکتون در حضور mPEG سنتز شد، گروه انتهایی هیدروکسیل آغازکننده واکنش حلقه باز است [8]. ساختار و ترکیب دی‌بلاک کوپلیمر mPEG-PCL توسط H-NMR در کلروفرم دوتره تعیین شد (شکل ۱). متیلن موجود در PCL در حدود ۱/۳ ppm (i, j)، ۱/۶ ppm (h)، ۲/۳ ppm (g) و ۴/۶ ppm (k) و متوکسی و پروتون‌های متیلن در متوکسی (OCH₃) و گروه‌های متیلن (CH₂) مربوط به PEG به ترتیب در منطقه ۳/۳۸ ppm (r) و ۳/۶۴ ppm (a) حضور داشتند [10]. خصوصیات کوپلیمر سنتز شده در جدول ۱ ذکر شده است. طیف FT-IR مربوط به mPEG-PCL در نمودار ۱ نشان داده شده است. در این طیف باندهای تند و قوی در ۱۷۲۸/۷۰ cm⁻¹ و ۱۱۸۹/۲۵ cm⁻¹ مربوط به حضور استر کربوکسیلیک (C=O) و گروه‌های اتر (C-O) است که نشان‌دهنده تشکیل کوپلیمر mPEG-PCL است [11]. نتایج GPC نشان داد که جرم مولکولی متوسط وزنی کوپلیمر ۲۰۵۴۳ دالتون است (جدول ۱).



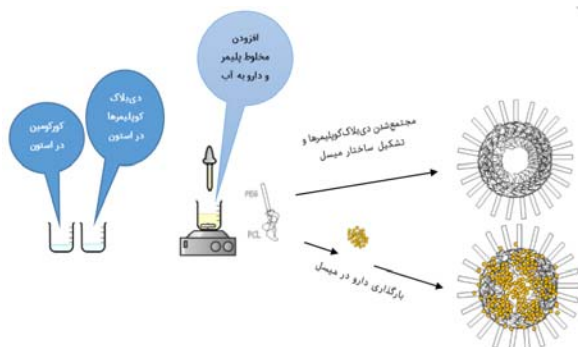
شکل ۱ (الف) شکل شماتیک سنتز mPEG-PCL پیک هر اتم، (ب) نتایج ¹H-NMR محصول سنتز

کورکومین در هسته نانوذرات تجمع یافته ولی بر فرآیند خودآرایی دی‌بلاک‌کوپلیمرها تأثیری نداشته است.

آنالیز دمایی DSC: نمودار آنالیز دمایی DSC مربوط به کوپلیمر mPEG-PCL، کورکومین و میسل‌های بارگذاری‌شده در نمودار ۳ نشان داده شده است. نمودار دمایی میسل حاوی کورکومین یک پیک هم‌دمایی در $55/00^{\circ}\text{C}$ نشان داد که مربوط به بخش کریستالی PCL است و نمودار دمایی کورکومین در دمای $173/56^{\circ}\text{C}$ یک پیک اندوترمیک نشان داد که در نمودار دمایی نانوذره حاوی کورکومین مشاهده نشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کورکومین در میسل‌ها در فاز کریستالی بدون شکل یا در حالت محلول جامد است و میسل‌های خالی یک پیک اندوترمیک در $59/59^{\circ}\text{C}$ نشان دادند که مربوط به ذوب شدن کوپلیمرهای مجتمع‌شده در میسل بود. این پیک تایید کرد که بین کوپلیمر و کورکومین در خلال بارگذاری دارو در میسل‌ها یک میان‌کنش فیزیکی میان دارو و میسل به وجود می‌آید و سبب می‌شود تا نقطه ذوب میسل‌ها از دی‌بلاک‌کوپلیمر پایین‌تر باشد [10].



شکل ۲) تصویر AFM از میسل‌های کروی هسته-پوسته حاوی کورکومین

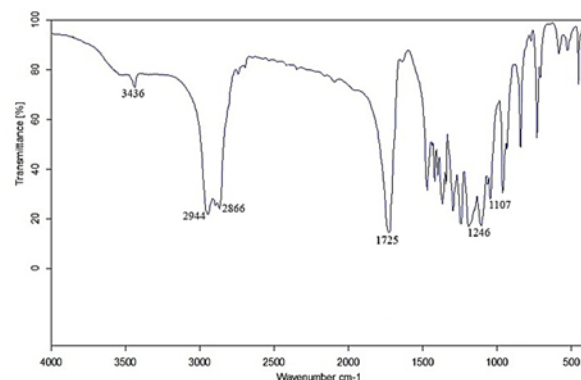


شکل ۳) تصویر شماتیک تشکیل میسل از دی‌بلاک‌کوپلیمر و بارگذاری دارو

جدول ۲) اطلاعات مربوط به ذرات میسلی بارگذاری‌شده با دارو (در دو تکرار انجام شد)

نام	mPEG-PCL	mPEG-PCL-Cur
Cur/mPEG-PCL****	۰/۲	۰/۲
EE (%)**	۸۷/۹۷±۰/۶	۹/۶۷±۱/۵
DL (%)**	۵۷/۵۴±۲/۷۱	۶۰/۵۹±۱/۳
سایز (نانومتر)	-۱۱/۹±۰/۷۱	-۱۲/۲±۱/۹
زتا (میلی‌ولت)	۰/۲۹۵±۰/۱۸	۰/۲۷۷±۰/۰۴
PDI***		

*کارایی کپسوله‌کردن: درصد بارگذاری دارو؛ **پراکندگی؛ ****نسبت کورکومین به پلیمر؛ تعیین EE و DL با دو تکرار و آزمون DLS و زتا با سه تکرار انجام شد ($p < 0.05$).



نمودار ۱) طیف FT-IR مربوط به mPEG-PCL

جدول ۱) مشخصات دی‌بلاک‌کوپلیمر mPEG-PCL سنتز شده

وزن قسمت PEG	۵۰۰۰
وزن کل پلیمر	۲۰۰۵۴۳
Mn(Da)*	۲۱۰۹۹۸
وزن کل پلیمر Mn(Da)***	۱/۰۷
PDI**	۵۵/۰۰
Tm (°C)	۱۳۶/۳۶
DP _{PEG} ****	۱۴۸/۳۴
DP _{PCL}	

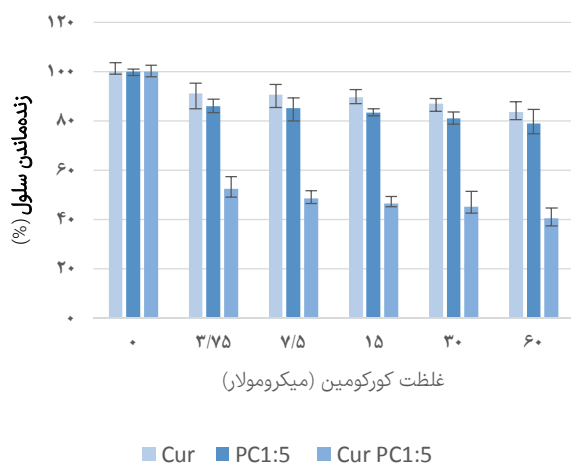
*براساس نتایج GPC با استفاده از استانداردهای پلی‌استایرن؛ **محاسبه PDI براساس نتایج GPC؛ ***براساس اطلاعات NMR؛ ****درجه پلی‌مریزاسیون

از نتایج NMR همچنین برای تعیین میانگین وزن مولکولی استفاده شد [12]. مطابق محاسبات از طریق انتگرال مربوط به پروتون‌ها در طیف NMR، وزن مولکولی پلیمر در حدود ۲۲ کیلودالتون به دست آمد. این عدد نشان‌دهنده تنها کمتر از ۵٪ اختلاف با روش GPC است که بدین‌ترتیب روش NMR خود تاییدی بر صحت وزن مولکولی اندازه‌گیری‌شده به روش GPC است [13].

آماده‌سازی و تعیین خصوصیات میسل‌های کوپلیمر: تشکیل نانوساختارهای میسلی توسط AFM تایید شد و در این بررسی، میسل‌های mPEG-PCL مورفولوژی کروی همگن نشان دادند (شکل ۲). اندازه میسل‌هایی که توسط AFM به دست آمد در حدود $45/434 \pm 0/665$ نانومتر بود. همچنین اندازه و بار الکتریکی نانو ذرات توسط دستگاه زتاسایزر اندازه‌گیری شد.

بارگذاری کورکومین در دی‌بلاک کوپلیمرهای mPEG-PCL: پس از بارگذاری نانوذرات میسلی با کورکومین به روش تبخیر حلال دوگانه (شکل ۳)، میزان کارایی بارگذاری و به دام‌اندازی محاسبه و اندازه ذرات، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی پلیمر (PDI) اندازه‌گیری شدند (جدول ۲). همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، z-average، پتانسیل زتا و شاخص PDI مربوط به میسل‌های mPEG-PCL و میسل‌های mPEG-PCL بارگذاری‌شده با کورکومین به‌ترتیب حدود $53/10$ و $60/69$ نانومتر با پتانسیل زتای $-11/9$ و $-12/2$ میلی‌ولت و با PDI برابر با $0/182$ و $0/277$ به دست آمد (نمودار ۲). براساس نتایج به‌دست‌آمده، اندازه ذرات پس از بارگذاری افزایش یافت ولی براساس PDI محاسبه‌شده، توزیع یکنواختی ذرات افزایش بسیار کمی داشته که نشان می‌دهد

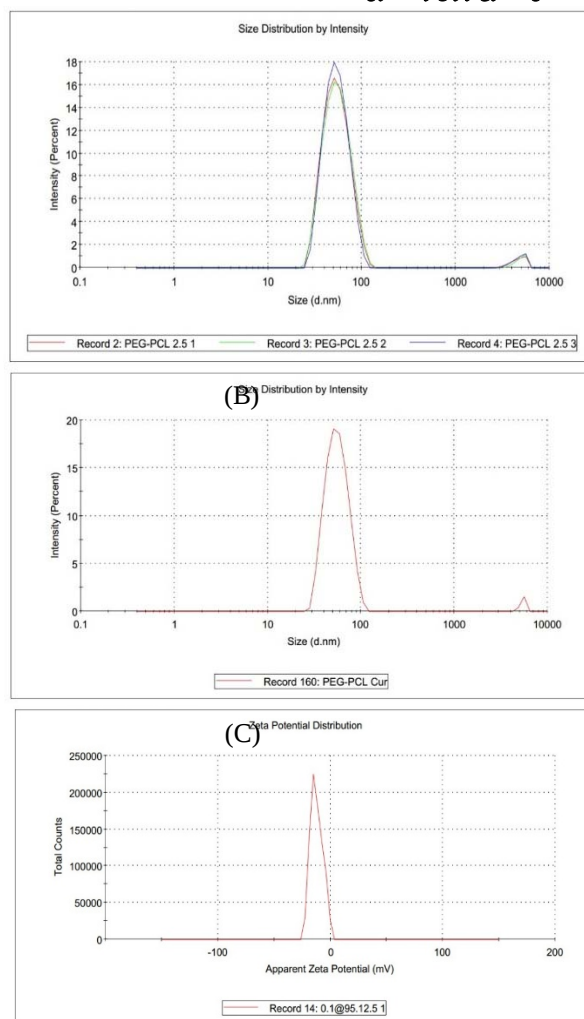
میزان کورکومین بارگذاری شده در میسل محاسبه شد و به همان میزان از میسل فاقد دارو برای تیمار سلولها استفاده شد. بعد از تیمار سلول در بازه‌های زمانی مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با میسل خالی، میزان زنده ماندن سلولها بیش از ۸۵٪ محاسبه شد. این نتایج نشان داد که میسل فاقد کورکومین تاثیر مشهودی روی زنده ماندن و تکثیر سلولهای MCF-7 نداشته‌اند^[14]. به بیان دیگر مواد پلیمری هیچ‌گونه فعالیت و تاثیری روی تعیین سمیت میسل‌های حاوی کورکومین ندارند^[15]. در آزمون MTT میسل‌های حاوی کورکومین با کورکومین خالی مقایسه شد تا تاثیر میسل روی میزان جذب و به تبع آن میزان افزایش سمیت سلولی کورکومین مشخص شود، زیرا آزمایشات نشان داد که کورکومین اثرات ضدسرطانی قابل ملاحظه‌ای روی سلول‌های سرطان پستان دارد^[16]. میسل حاوی کورکومین در غلظت‌های بالاتر از ۳۰ میکرومولار سبب کاهش بقای سلول MCF-7 (به کمتر از ۴۰٪) شد در حالی که کورکومین خالی در غلظت‌های بیش از ۶۰ میکرومولار سبب کاهش بقا به ۸۰٪ شد که میزان معنی‌داری نیست. براساس این نتایج می‌توان اعلام نمود که سمیت سلولی ارتباط مستقیمی با غلظت کوپلیمر حاوی کورکومین دارد. علاوه بر این نتایج نشان داد که دارو و میسل به‌تنهایی در اکثر غلظت‌ها فاقد سمیت بوده یا میزان سمیت بسیار کمی دارند (نمودار ۴).



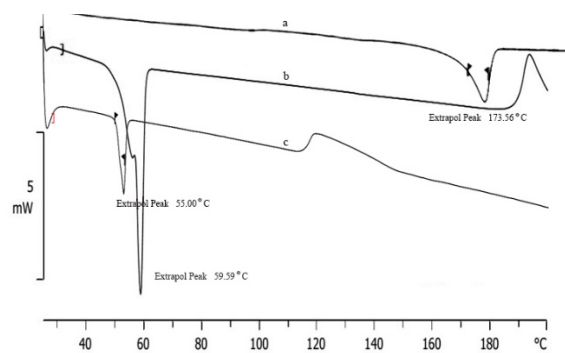
نمودار ۴ نتایج آزمون MTT برای کورکومین، میسل mPEG-PCL و میسل حاوی کورکومین در MCF-7 پس از انکوبه کردن در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (محور X مربوط به غلظت کورکومین خالی و mPEG-PCL حاوی کورکومین (براساس غلظت کورکومین) و پلیمر خالی (هموزن پلیمر بارگذاری شده) و محور Y نشان‌دهنده درصد قابلیت زنده ماندن سلول است) آزمون در سه تکرار انجام شد ($p < 0.05$).

غلظتی که در آن، رشد ۵۰٪ سلولها مختل شد (IC_{50}) به وسیله نرم‌افزار GraphPad Prism 6 تعیین شد که در جدول ۳ نشان داده شده است. سمیت سلولی نسبی (RCT) از طریق فرمول زیر به دست آمد:

$$RCT = \left(\frac{A_{sample} - A_{control}}{A_{control}} \right) * 100$$



نمودار ۲ توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا از (A) میسل mPEG-PCL، (B) توزیع اندازه ذرات میسل CUR/mPEG-PCL و (C) پتانسیل زتا CUR/mPEG-PCL (در دو تکرار انجام شد)



نمودار ۳ طیف DSC: a کورکومین، b مربوط به mPEG-PCL و c میسل های حاوی کورکومین

سمیت میسل‌های حاوی کورکومین در محیط برون تن: بررسی میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی بعد از تیمار با میسل‌های mPEG-PCL بارگذاری شده با کورکومین، میسل‌های خالی و کورکومین خالی در غلظت‌های مختلف روی لاین سلول سرطان سینه MCF-7 توسط آزمون MTT صورت گرفت (نمودار ۴). غلظت براساس

اختلاف می‌تواند به این دلیل باشد که قطر میسل‌های محاسبه‌شده توسط DLS معرف قطر هیدرودینامیک است، در حالی که میزان به‌دست‌آمده از AFM مربوط به میسل چروکیده است که از تبخیر آب در هنگام آماده‌سازی نمونه ناشی می‌شود [21]. نانوذرات با این اندازه می‌توانند از طریق مکانیزم اثر افزایش نفوذ و بقا (EPR effect) در بافت تومور به‌صورت انتخابی تجمع یابند [22]. ضمناً برای به‌دست‌آوردن گردش خون طولانی می‌بایست ذرات به اندازه کافی کوچک باشند (زیر ۲۰۰ نانومتر) تا از حذف مکانیکی آنها توسط فیلترشدن در ریه‌ها و طحال جلوگیری شود [23]. همچنین درصد بارگذاری دارو در حدود ۹/۶۷ و کارایی کپسوله‌شدن در حدود ۸۷/۹۷ محاسبه شد. براساس اندازه ذرات میسلی به‌دست‌آمده در این تحقیق با نتایج مندرج در منابع مختلف برای دی‌بلاک‌کوپلیمرهای mPEG-PCL که معمولاً کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر است، مطابقت دارد [24-26]. براساس نتایج شاخص PDI در حدود ۰/۲۷۷ است که به شاخص PDI میسل‌های mPEG-PCL ذکرشده در منابع (در حدود ۰/۱ تا ۰/۲)، نزدیک است [27]. اندازه ذرات بستگی مستقیم به اندازه دی‌بلاک‌کوپلیمر دارد و از ۲۴ نانومتر تا ۲۰۰ نانومتر متفاوت است [23, 27, 10].

به علاوه ذرات میسل mPEG-PCL حاوی کورکومین میزان بار منفی کمی در حدود ۱۲/۲- میلی‌ولت داشتند که این میزان بار منفی سبب افزایش مدت گردش دارو در بدن می‌شود. بار سطحی در تشکیل خوشه نانوذرات در جریان خون یا اتصال و چسبیدن به سطوح حاوی بار مخالف نقش بسزایی ایفا می‌کند. پلاسما و خون بار منفی دارند و به همین دلیل نانوذرات با بار سطحی منفی برخورد غیراختصاصی کمتری براساس میان‌کنش‌های الکترواستاتیک با این ترکیبات خواهند داشت [8-11]. رهایش کورکومین از میسل‌های mPEG-PCL باعث افزایش مدت‌زمان چرخش کورکومین در محیط درون بدن و نیز در داخل سلول‌ها و پس از اندوسیتوز، می‌شود [28]. رهایش اولیه کورکومین از میسل‌های mPEG-PCL به‌صورت انفجاری بوده که در اکثر موارد قابل مشاهده است و رهایش در مرحله دوم به‌صورت پایدار و تدریجی بوده که می‌تواند ناشی از انتشار کورکومین به‌علت تجزیه و هیدرولیز میسل‌ها باشد [10, 29]. به‌طور خلاصه میسل‌های mPEG-PCL مورد استفاده در کپسوله‌کردن کورکومین، سبب تشکیل ساختارهای میسل می‌شوند. میسل‌های mPEG-PCL حاوی کورکومین سبب بهبود حلالیت کورکومین شده و در درمان سرطان قابل استفاده هستند [30]. همچنین آزمون‌های برون‌تن نشان داد که این ذرات میسلی سمیت کمی روی سلول‌ها نسبت به کورکومین خالی داشتند که نشان‌دهنده سمیت سیستمیک پایین است. بر همین اساس تمامی نتایج تایید کرد که میسل‌های mPEG-PCL حاوی کورکومین کارایی درمانی بهتری را روی سلول‌های تومور و سمیت سیستمی کمتر نسبت به کورکومین خالی دارند. مهم‌ترین دستاورد این تحقیق افزایش حلالیت کورکومین در محیط آبی و بدن نام برد. کورکومین آزاد به

که در این فرمول A میزان جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر است. این افزایش اثر سمیت سلولی توسط میسل‌های حاوی کورکومین می‌تواند به‌علت جذب سلولی بیشتر کورکومین انکپسوله‌شده نسبت به کورکومین خالی باشد، زیرا جذب کورکومین بیشتر از طریق انتشار است که پس از اشباع‌شدن سیتوپلاسم از دارو سبب کاهش جذب دارو می‌شود. مسیر اندوسیتوز سبب افزایش جذب میسل‌های حاوی کورکومین و به موازات آن رهایش پایدار سبب افزایش ماندگاری کورکومین در سلول شده که مجموعاً سبب افزایش سمیت کورکومین در سلول می‌شود [17].

جدول ۳) مقایسه مقادیر IC50 برای کورکومین و کوپلیمر به‌تنهایی و میسل حاوی کورکومین در بازه‌های زمانی ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در برابر سلول‌های MCF7 به‌وسیله آزمون MTT (واحد داده‌ها براساس میکرومولار است) سه تکرار انجام شد (p < ۰/۰۵).

	۷۲ساعت	۴۸ساعت	۲۴ساعت
mPEG-PCL	۲۱/۰۰±۲/۹۸	۲۵/۰۰±۱/۶۴	۳۳/۶۱±۲/۴۵
Cur	۱۹/۰۰±۱/۳۷	۲۶/۰۰±۰/۹۱	۳۸/۰۰±۳/۱۸
mPEG-PCL Cur	۱۰/۰۰±۱/۶۷	۱۵/۰۰±۱/۸۴	۲۲/۰۰±۲/۳۷

بحث

تاکنون، روش‌های متنوعی برای انکپسوله‌کردن کورکومین در ساختارهای میسلی دی‌بلاک‌کوپلیمرها مورد استفاده قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به تبخیر حلال دوگانه، ریز ترسیب و جایگزینی بحرانی حلال اشاره نمود. در این تحقیق تلاش شد تا با استفاده از پلیمرهای از جنس پلی‌کاپرولاکتون- پلی‌اتیلن‌گلیکول برای انتقال کورکومین استفاده شود. کورکومین و دی‌بلاک‌کوپلیمر mPEG-PCL به‌صورت جداگانه در استون حل و سپس به یکدیگر اضافه شدند و محلول فوق به‌صورت قطره‌قطره به آب دیونیزه افزوده و حلال آلی از طریق تبخیر حذف شد. براساس تحقیقات در صورتی که درصد بخش آب‌دوست بیش از ۴۰٪ کل دی‌بلاک‌کوپلیمر باشد [18, 19]، موجب تشکیل میسل‌های پلیمری می‌شود. همچنین روش تهیه نانوذرات نیز در ساختار آنها موثر است. در این تحقیق نانوذرات میسلی به‌وسیله خودآرایی بلوک‌های کوپلیمر دوگانه‌دوست در محلول آبی تشکیل شده که هسته آب‌گریز و پوسته آب‌دوست سبب پایداری ساختار آن می‌شود، کورکومین به‌علت آب‌گریزبودن در هسته آب‌گریز خودآرایی کرده و متمرکز می‌شود [20]. دی‌بلاک‌کوپلیمر mPEG-PCL دارای خصوصیات زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری، غیرسمی، دوگانه‌دوست و با اندازه کوچک، باعث شده تا تبدیل به یکی از بهترین گزینه‌ها برای انتقال دارو شود. به‌منظور افزایش محلولیت کورکومین در آب، کورکومین با استفاده از تکنیک خودآرایی در میسل‌های mPEG-PCL انکپسوله شد.

اندازه ذرات میسل mPEG-PCL به‌دست‌آمده از AFM در حدود ۴۵ نانومتر و از طریق نتایج DLS حدود ۶۱ نانومتر است که این

- 6- Elsabahy M, Wooley KL. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2545-61.
- 7- Nicolas J, Mura S, Brambilla D, Mackiewicz N, Couvreur P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem Soc Rev.* 2013;42(3):1147-235.
- 8- Zhu X, Fryd M, Tran BD, Ilies MA, Wayland BB. Modifying the hydrophilic-hydrophobic interface of PEG-b-PCL to increase micelle stability: Preparation of PEG-b-PBO-b-PCL triblock copolymers, micelle formation, and hydrolysis kinetics. *Macromolecules.* 2012;45(2):660-5.
- 9- Aliabadi HM, Elhasi S, Mahmud A, Gulamhusein R, Mahdipoor P, Lavasanifar A. Encapsulation of hydrophobic drugs in polymeric micelles through co-solvent evaporation: the effect of solvent composition on micellar properties and drug loading. *Int J Pharm.* 2007;329(1-2):158-65.
- 10- Song Z, Zhu W, Liu N, Yang F, Feng R. Linolenic acid-modified PEG-PCL micelles for curcumin delivery. *Int J Pharm.* 2014;471(1-2):312-21.
- 11- Peng W, Jiang XY, Zhu Y, Omari-Siaw E, Deng WW, Yu JN, et al. Oral delivery of capsaicin using MPEG-PCL nanoparticles. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36(1):139-48.
- 12- Izunobi JU, Higginbotham CL. Polymer molecular weight analysis by ¹H NMR spectroscopy. *J Chem Educ.* 2011;88(8):1098-104.
- 13- Yang CS, Wu HC, Sun JS, Hsiao HM, Wang TW. Thermo-induced shape-memory PEG-PCL copolymer as a dual-drug-eluting biodegradable stent. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013;5(21):10985-94.
- 14- Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discov Today.* 2012;17(1-2):71-80.
- 15- Gupta SC, Kismali G, Aggarwal BB. Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. *Biofactors.* 2013;39(1):2-13.
- 16- Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Harsha C, Banik K, Gupta SC, Aggarwal BB. (2017) Curcumin mediates anticancer effects by modulating multiple cell signaling pathways. *Clin Sci.* 2017;131(15):1781-99.
- 17- Shehzad A, Lee J, Lee YS. Curcumin in various cancers. *Biofactors.* 2013;39(1):56-68.
- 18- Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;65(3):259-69.
- 19- Rhim T, Lee KY. Exosome and polymersome for potential theranostic applications. *Macromol Res.* 2016;24(7):577-86.
- 20- Adams ML, Lavasanifar A, Kwon GS. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J Pharm Sci.* 2003;92(7):1343-55.
- 21- Alibolandi M, Ramezani M, Abnous K, Sadeghi F, Hadizadeh F. Comparative evaluation of polymersome versus micelle structures as vehicles for the controlled release of drugs. *J Nanopart Res.* 2015;17(2):1-16.
- 22- Peng S, Hung WL, Peng YS, Chu IM. Oligoalanine-modified Pluronic-F127 nanocarriers for the delivery of curcumin with enhanced entrapment efficiency. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2014;25(12):1225-39.
- 23- Mohanty C, Acharya S, Mohanty AK, Dilnawaz F, Sahoo SK. Curcumin-encapsulated MePEG/PCL diblock copolymeric micelles: a novel controlled delivery vehicle for cancer therapy. *Nanomedicine.* 2010;5(3):433-49.

سرعت از بدن حذف می‌شود در حالی که پس از بارگذاری کورکومین در دی‌بلاک کوپلیمرها سبب افزایش بقا و همچنین بیشتر شدن دسترسی زیستی برای سلول‌ها و به دنبال آن برای بدن شد [31]. پیشنهاد می‌شود تا نانوذرات حاصل در شرایط درون تن نیز مورد آزمایش و بررسی قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق کورکومین با استفاده از پلیمرهای از جنس پلی‌کاپرولاکتون- پلی‌اتیلن‌گلیکول به سلول‌های سرطانی پستان از رده سلولی MCF-7 انتقال داده شدند. براساس بهینه‌سازی روش سنتز و همچنین بارگذاری دارو در نانوحامل‌ها با استفاده از تغییر در حلال و همچنین انتخاب نسبت‌های مناسب دارو به پلیمر، بهترین نانوذرات حاوی کورکومین به دست آمد. و پس از تاثیر بر سلول‌های سرطانی، میزان زنده ماندن این سلول‌ها بررسی شد که در مقایسه با کورکومین خالی تفاوت معنی‌داری را نشان داد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی افراد و پژوهشگران دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس و دانشکده داروسازی زنجان که در این تحقیق یاری رساندند اعلام می‌دارد.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: احسان انصاری دزفولی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۵٪)، حسین دانافر (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۰٪)، علیرضا نعمانی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۱۵٪)، مجید صادقی‌زاده (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۳۰٪)

منابع مالی: منابع مالی از محل اعتبار پژوهشی پایان‌نامه نویسنده اول در دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است.

منابع

- 1- Salem M, Rohani S, Gillies ER. Curcumin, a promising anti-cancer therapeutic: a review of its chemical properties, bioactivity and approaches to cancer cell delivery. *RSC Adv.* 2014;4(21):10815-29.
- 2- Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti SV. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(11):1631-52.
- 3- Burish TG, Jenkins RA. Effectiveness of biofeedback and relaxation training in reducing the side effects of cancer chemotherapy. *Health Psychol.* 1992;11(1):17-23.
- 4- Dutta AK, Ikiki E. Novel drug delivery systems to improve bioavailability of curcumin. *J Bioequiv Bioavailab.* 2013;6(1):001-9.
- 5- Ma M, Sun T, Xing P, Li Z, Li S, Su J, et al. A supramolecular curcumin vesicle and its application in controlling curcumin release. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects.* 2014;459:157-65.

28- Vinod BS, Antony J, Nair HH, Puliappadamba VT, Saikia M, Narayanan SS, et al. Mechanistic evaluation of the signaling events regulating curcumin-mediated chemosensitization of breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Cell Death Dis.* 2013;4:e505.

29- Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer.* 2005;41(13):1955-68.

30- Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.* 2007;4(6):807-18.

31- Zou P, Helson L, Maitra A, Stern ST, McNeil SE. Polymeric curcumin nanoparticle pharmacokinetics and metabolism in bile duct cannulated rats. *Mol Pharm.* 2013;10(5):1977-87.

24- De Villiers MM, Aramwit P, Kwon GS, editoes. *Nanotechnology in drug delivery.* Berlin: Springer; 2008.

25- Wu Q, Wang N, He T, Shang J, Li L, Song L, et al. Thermosensitive hydrogel containing dexamethasone micelles for preventing postsurgical adhesion in a repeated-injury model. *Sci Rep.* 2015;5:13553.

26- Rusen L, Neacsu P, Cimpean A, Valentin I, Brajnicov S, Dumitrescu LN, et al. In vitro evaluation of poly (ethylene glycol)-block-poly (ϵ -caprolactone) methyl ether copolymer coating effects on cells adhesion and proliferation. *Appl Surf Sci.* 2016;374:23-30.

27- Kulthe SS, Choudhari YM, Inamdar NN, Mourya V. Polymeric micelles: authoritative aspects for drug delivery. *Des Monom Polym.* 2012;15(5):465-521.