

افزایش حلالیت و فراهمی زیستی کورکومین از طریق نانوحامل جدید مبتنی بر دندریمر: رویکردی امیدوارکننده برای اثربخشی درمانی

افروز علی یاری^۱، شهلا کیانامیری^۲، حسین نادری منش^{۱،۳*}

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

۲- استادیار گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* صندوق پستی ۱۷۵-۱۴۱۱۵، تهران، ایران

naderman@modares.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۲

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۷

چکیده

کورکومین، یک آنتی اکسیدان قوی استخراج شده از گیاه زردچوبه، به دلیل توانایی خود در سرکوب گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از طریق فعال‌سازی عناصر پاسخ آنتی‌اکسیدانی شناخته شده است. با این حال، کاربرد بالینی آن به دلیل حلالیت ضعیف و حذف سریع آن محدود شده است. در این مطالعه، هدف ما افزایش حلالیت و فراهمی زیستی کورکومین با کپسوله کردن آن در نانوذرات دندریمر پلی آمیدوآمین نسل پنجم بود. طیف سنجی UV-Vis و فلورسانس کپسوله سازی موفقیت آمیز را با اندازه متوسط نانوذرات ۲۷۵ نانومتر و بار سطحی مثبت ۸ میلی ولت تأیید کردند. نانوحامل ظرفیت بارگیری تقریباً ۶ مول کورکومین در هر ۱ مول دندریمر را نشان داد و در عرض ۷۲ ساعت به آزادسازی کامل دارو دست یافت. سنجش جذب سلولی با استفاده از روش زنده/مرده، جذب برتر نانوحامل را در مقایسه با کورکومین آزاد نشان داد که منجر به کاهش قابل توجهی در سطوح ROS سلولی و آپوپتوز شد. علاوه بر این، در مدل استرس اکسیداتیو القایی با استفاده از H_2O_2 ، نانوذرات دندریمر بارگذاری شده با کورکومین به طور قابل توجهی سطوح ROS سلولی را در مقایسه با کورکومین آزاد کاهش داد. این یافته‌ها پتانسیل این نانوحامل را به عنوان یک سیستم مؤثر و هوشمند برای ارائه داروهای نامحلول در آب برجسته می‌کند و رویکردی امیدوارکننده برای بهبود کارایی درمانی کورکومین ارائه می‌دهد.

کلید واژگان: دندریمر، کورکومین، آنتی اکسیدان، گونه‌های اکسیژن واکنشی، استرس اکسیداتیو

۱-مقدمه

ROSها توسط چندین فرایند درون‌زا و برون‌زا تولید و اثرات منفی آن‌ها با دفاع آنتی‌اکسیدانی خنثی می‌شود. استرس اکسیداتیو پدیده‌ای که در اثر عدم تعادل بین تولید و امحای گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) به وجود می‌آید. این پدیده منشأ بسیاری از بیماری‌ها است. نظریه استرس اکسیداتیو مبتنی بر این فرضیه است که تلفات عملکردی مرتبط با سن به دلیل تجمع آسیب‌های ناشی از ROS است. در عین حال، استرس اکسیداتیو در چندین بیماری مرتبط با سن (به عنوان مثال، بیماری‌های قلبی عروقی، بیماری مزمن انسدادی ریه، بیماری مزمن کلیوی، بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی و سرطان) نقش دارد. با توجه به موارد فوق، آنتی‌اکسیدان درمانی می‌تواند به طور مثبت سن ابتلا به چندین بیماری به تاخیر بیندازد [۱].

کورکومین، یک ترکیب پلی‌فنلی است. این ترکیب طبیعی که مهمترین جزء ریزوم‌های گیاه *Curcuma longa* L. (زردچوبه) است، برای اولین بار در سال ۱۸۷۰ به شکل کریستالی خالص از گیاه زردچوبه استخراج شد. کورکومین و مشتقات آن در دو دهه گذشته به علت خواص متعدد زیست عملکردی از جمله اثرات ضدالتهابی و ضد پیری و ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. با این حال، متابولیسم سریع و انحلال پذیری کم کورکومین و جذب سلولی کم موجب فراهمی زیستی پایین این مولکول می‌شود و همین مسئله استفاده بالینی آن را محدود کرده است [۲].

استراتژی رایج برای بهبود حلالیت کورکومین استفاده از نانوحامل مناسب است. دندریمرها به دلیل مزایایی مانند سهولت چندعملکردی، محلولیت در محیط‌های مختلف، زیست تخریب پذیری، ساختار کاملاً تعریف شده و تک پراکندگی [۳]، با قابلیت کپسوله کردن داروها و اصلاح سطح آنها با عوامل درمانی و لیگاندهای هدف، به عنوان حامل‌های دارویی مناسب در سیستم‌های دارورسانی

هدفمند بررسی شده‌اند [۴]. دندریمرها را می‌توان به عنوان حامل برای عوامل درمانی مختلف استفاده کرد. آنها می‌توانند سمیت داروها را کاهش و اثربخشی آنها را افزایش دهند [۵]. توانایی دندریمرها برای نفوذ به غشای سلولی و تجمع در بافت‌ها پتانسیل آنها را به عنوان سیستم‌های تحویل نانودارو بیشتر برجسته می‌کند [۶]. کپسوله کردن کورکومین در دندریمر می‌تواند باعث افزایش پایداری، حلالیت و زیست فراهمی [۷-۹] و بهبود خواص فارماکوکینتیک کورکومین شود [۱۰]. همچنین، اثر آنتی اکسیدانی آن را افزایش داده و به طور بالقوه پیشرفت سرطان را کند دهد [۱۱]. کورکومین کپسوله شده نسبت به فرم آزاد کورکومین به طور چشمگیری باعث افزایش ظرفیت مهار DPPH و کاهش سطح ROS و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌شود [۱۲].

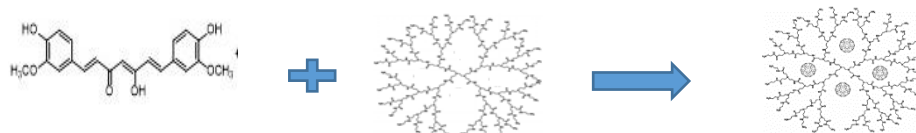
در این پژوهش برای افزایش حلالیت و فراهمی زیستی کورکومین درون دندریمر پلی آمیدوآمین (PAMAM) نسل پنجم که دارای گروه ۱۲۸ آمین سطحی و وزن مولکولی ۲۸۸۲۶ (گرم/مول) و سایز ۵٫۴ نانومتر می‌باشد کپسوله شده است. نانوسامانه‌ی کورکومین - دندریمر به واسطه‌ی بار سطحی مثبت گروه‌های آمین انتهایی با غشای سلولی برهمکنش غیر اختصاصی می‌دهد و باعث برداشت بیشتر آن در محیط *In vitro* و *In vivo* می‌شود.

۲-مواد و روش‌ها

براین این پژوهش کورکومین خلوص، ۹۵ درصد از مرک تهیه شد. همچنین، دندریمر PAMAM نسل پنجم، کیسه دیالیز (۱۰ MWCO کیلودالتونی)؛ ایالات متحده آمریکا. لاین سلولی Hela انسیتوپاستوریران. محیط کشت، DMEM تریپسین ای.دی.تی. (۲۵ درصد) سرم جنین گاو (FBS) آنتی بیوتیک پنی سیلین - استرپتومایسین (Gibco)؛ آلمان استفاده شد.

۲-۱-منحنی استاندارد غلظت کورکومین

میلی گرم/میلی لیتر) در حلال متانول اضافه شد. سپس، محلول به مدت ۴۸ ساعت شیک شد. طی این مدت زمان اجازه داده شد که متانول تبخیر شود. بعد از گذشت ۴۸ ساعت برای حذف کورکومین های آزاد محلول ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و محلول رویی برداشته شد و با استفاده از فریزدرای خشک شد و برای مراحل بعدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد و محیط تاریک نگه داری شد. (شکل ۱)



شکل ۱ شماتیک کپسوله شدن کورکومین در دندریمر

دستگاه اسپکتروفتومتری UV-Vis در طول موج ۴۲۵ نانو متر خوانده شد. نتایج به دست آمده با و فرمول زیر محاسبه شد.

= درصد راندمان بارگزاری کورکومین

$$\frac{\text{مقدار کورکومین کپسوله}}{\text{مقدار کورکومین اولیه}} \times 100$$

= درصد میزان بارگیری

$$\frac{\text{مقدار کورکومین کپسوله}}{\text{مقدار حامل دندریمر} - \text{مقدار کورکومین کپسوله}} \times 100$$

۲-۵ بررسی میزان رهایش کورکومین از دندریمر نسل پنجم

مقدار ۵ میلی لیتر از نانوسامانه کورکومین-دندریمر حل شده در آب، در کیسه دیالیز با قطر منافذ ۱۰۰۰۰ (MWCO) ریخته شد و در فسفات بافر سالین (PBS) با pH ۷٫۴ و بافر استات با pH ۵ به صورت جداگانه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به حالت تعلیق در آمد. سپس، از

برای رسم منحنی استاندارد کورکومین، محلولی با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر از آن دارو در حلال متانول تهیه و سپس به روش رقیق سازی غلظت هایی از کورکومین در دامنه غلظت ۱۰ - ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد و در ادامه با استفاده از دستگاه طیف سنجی مرئی-فرابنفش جذب ترکیب اندازه گیری شد.

۲-۲ کپسوله کردن کورکومین در دندریمر

برای این کار، ۲ میلی لیتر کورکومین (۲ میلی گرم / میلی لیتر) محلول در آب به ۱ میلی لیتر دندریمر (PAMAM) (۲)

۲-۳ بررسی خواص فتوفیزیکی کورکومین

کورکومین خاصیت فلورسانس ذاتی دارد که در طول موج ۴۲۵ نانومتر برانگیخته می شود. در نتیجه مطالعات اسپکترو سکوپ برای بررسی احتمال تغییر خواص نوری کورکومین در حین پروسه ی کپسولاسیون انجام شد. کورکومین آزاد و نانوسامانه کورکومین-دندریمر به طور جداگانه در حلال متانول، آب (به نسبت ۵۰:۵۰ حجمی/حجمی) با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد. میزان جذب نمونه ها در طول موج ۴۲۵ نانومتر توسط نانودراپ اندازه گیری شد، همچنین، طیف بازتابش فلورسانس در طول موج ۴۵۰-۷۰۰ نانومتر ثبت شد.

۲-۴ بررسی میزان کپسوله شدن مولکولهای کورکومین در دندریمر PAMAM

در این مرحله برای به دست آوردن میزان کپسوله شدن کورکومین در دندریمر به رسوب به جا مانده از مرحله ی پیشین ۱ میلی لیتر متانول اضافه شد و جذب با استفاده از

محلول PBS و استات در زمان های ۵۰، ۴۵، ۴۰، ۳۵، ۳۰، ۲۵، ۲۰، ۱۵، ۱۰، ۸، ۷، ۶، ۵، ۴، ۳، ۲، ۱، ۰ ساعت نمونه برداری شد و جذب در طول موج ۴۲۵ نانومتر خوانده شد. اعداد حاصل از این خوانش را در فرمول $y=ax+b$ قرار داده و نتایج حاصل از آن بر روی نمودار برده شد.

۲-۶ بررسی سایز و زتای نانوسامانه طراحی شده توسط دستگاه زتاسایزر

برای اندازه گیری ابعاد و بار سطحی سامانه، از دستگاه DLS (مالورن؛ ایالات متحده آمریکا) استفاده شد. برای انجام این آزمایش، غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوسامانه کورکومین-دندریمر در حجم ۱ میلی لیتر تهیه و در ادامه دو پارامتر، اندازه ذره ای و پتانسیل زتای آن ارزیابی شد.

۲-۷ کشت سلولی و ارزیابی سمیت سلولی

لایین سلولی هلا با تراکم 1×10^4 و در پلیت ۹۶ خانه ای حاوی محیط کشت DMEM به همراه FBS و آنتی بیوتیک های پنی سیلین، استرپتومایسین کشت داده شد و تا رسیدن به مورفولوژی ۷۵-۸۰ درصد سلول ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس، سلول ها با کورکومین آزاد، دندریمر و نانو سامانه ای کورکومین-دندریمر با غلظت های دارویی به کار رفته برابر با ۱۵، ۱۰، ۵ میکرومولار تیمار شدند. پس از سپری شدن بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت برای ارزیابی سمیت سامانه ها و با استفاده از آزمون زنده ماننی میزان سمیت تیمارهای مد نظر، از جمله دندریمر PAMAM کورکومین آزاد و نانوسامانه کورکومین-دندریمر ارزیابی شد.

۲-۸ ردیابی ورود نانو سامانه کورکومین-دندریمر به سلول توسط میکروسکوپ فلورسانس

برای انجام این آزمایش ابتدا سلول هلا را به میزان ۴۰ هزار سلول در پلیت ۶ خانه ای حاوی ۲ میلی لیتر محیط کشت به همراه ۱۰ درصد FBS کشت داده شد و پس از

انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محیط مرطوب با ۹۵ درصد هوا و ۵ درصد CO_2 پس از رسیدن به مورفولوژی ۷۰ درصد سلول ها را با نانو سامانه کورکومین-دندریمر و کورکومین آزاد مورد تیمار قرار داده و پس از ۸ ساعت از ورود نانوسامانه کورکومین-دندریمر و کورکومین آزاد به داخل سلول با میکرو سکوپ فلورسانس مدل Nikon Eclipse TE2000-S؛ ژاپن تصویر برداری انجام شد. برانگیخته ای در طول موج ۴۲۵ نانومتر و شناسایی در طول موج ۴۸۰-۵۰۰ نانومتر انجام شد.

۲-۹ ارز یابی میزان ROS سلولی با استفاده از فلوئورسیتومتری

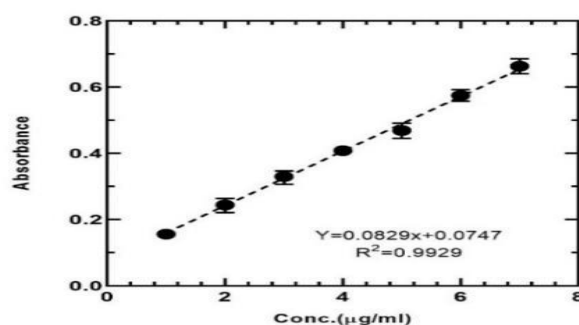
برای انجام این آزمایش ابتدا میزان IC50 توسط داده های مربوط به سنجش سمیت MTT رده ی سلولی تعیین شد. سپس، سلول ها در پلیت ۲۴ خانه ای کشت داده شدند. چاهک ها در ابتدا برای القای شرایط استرس اکسیداتیو تحت تیمار با غلظت ۴۰۰ میکرومولار از آب اکسیژنه (H_2O_2) قرار گرفتند و پس از گذشت ۸ ساعت با غلظت های دارویی برابر با ۱۵، ۲۰، ۱۰ و ۵ میکرومولار از نانو سامانه ای کورکومین-دندریمر و دندریمر و کورکومین آزاد تیمار شدند و ۱۲ ساعت در شرایط بهینه رشد انکوبه شدند. در ادامه و پس از سپری شدن بازه ی زمانی ذکر شده، مایع رویی سلول های داخل هر چاهک را دور ریخته و با PBS شستشو داده شد و سپس ماده ترپسین اضافه شد. سلول های جدا شده را در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه با دور 1600 rpm سانتریفیوژ شده و پس از حذف محیط رویی مجدداً ۵۰۰ میکرولیتر از محلول PBS به آنها اضافه کرده و برای مرتبه دوم سانتریفیوژ شدند. در ادامه و پس از حذف مایع رویی ۵۰۰ میکرولیتر از محلول 7.2 mg دی کلرو دی هیدروفلورسین دی استات (غلظت 10 mg میکرومول) به آنها اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد تا عمل رنگ آمیزی به طور کامل انجام شود. ROS های موجود در

(شکل ۲). ترسیم منحنی استاندارد برای اندازه گیری غلظت کورکومین به روش اسپکتروسکوپی نور مرئی انجام شد. محدوده خطی با تجزیه و تحلیل جذب غلظت های استاندارد کورکومین ۱۰-۱ میکروگرم بر میلی لیتر در ۴۲۵ نانومتر در برابر محلول آب و متانول به نسبت 50:50 حجمی/حجمی، به عنوان Blank تعیین شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت در برابر جذب ترسیم شد (نمودار ۱). سپس، معادله رگرسیون و ضریب همبستگی کورکومین تعیین شد. درصد بارگذاری کورکومین با احتساب فاکتور رقت به کاررفته و با کمک نمودار استاندارد مربوط به آن تعیین شده است.

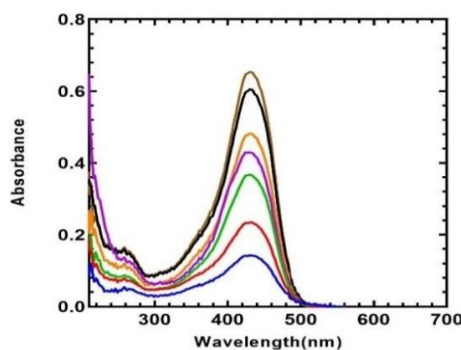
محیط سلولی باعث اکسید شدن ۲،۷ دی کلرو دی هیدروفلورسین دی استات و تبدیل آن به دی کلروفلورسین می شوند که نشر توسط دستگاه فلوسیتومتری خوانش می شود. آب اکسیژنه (H_2O_2) با غلظت ۴۰۰ میکرومولار مطابق تحقیقات پیشین [۱۳] به عنوان کنترل مثبت و سلول بدون تیمار دارویی به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

۲-۱۰ تعیین میزان بارگذاری و ظرفیت بارگیری

برای تعیین میزان بارگذاری و ظرفیت بارگیری دارو در نانوسامانه، ابتدا نمودار استاندارد کورکومین برای تعیین غلظت های نامعین آن تهیه و معادله خط رگرسیون و ضریب تعیین (R^2) برای ترسیم خط عبوری تعیین شد



شکل ۲ نمودار استاندارد کورکومین



نمودار ۱ منحنی استاندارد کورکومین

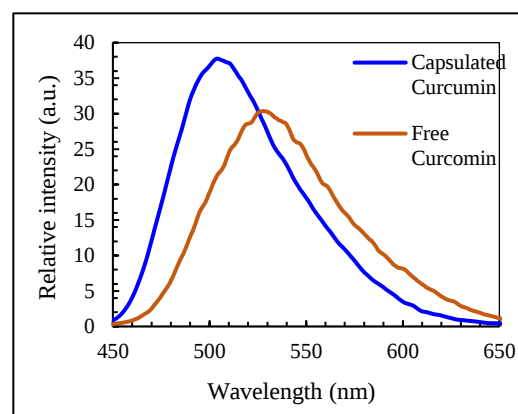
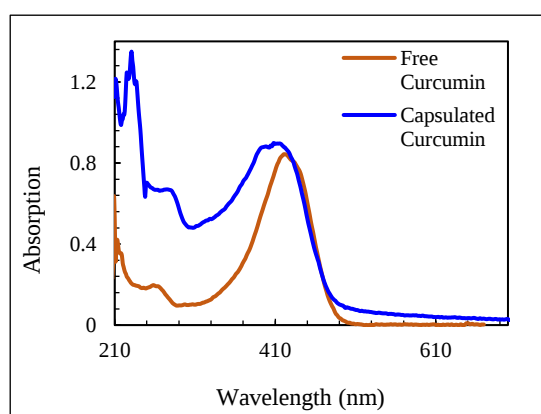
۲-۱۱ بررسی خواص فتوفیزیکی کورکومین

کورکومین به همراه نانو سامانه کورکومین - دندریمر با روش اسپکتروسکوپی مورد سنجش و آنالیز قرار گرفت. جذب در طول موج ۴۲۵ نانومتر برای کورکومین بررسی شد و در مقایسه با حالت بارگذاری شده ترکیبات به این نتایج دست یافتیم که زمانی که ترکیبات دارویی درون دندریمر بارگذاری می شوند به دلیل تحت تأثیر قرار گرفتن انتقالات $\pi-\pi^*$ شدت پیک جذبی کاهش می یابد و از سوی دیگر جذب کورکومین که در طول موج ۴۲۵ نانومتر است (به علت انتقالات $\pi-\pi^*$ مربوط ساختار کورکومین و ذات هیدروفوب حلقه های آروماتیک) پس از قرار گرفتن در دندریمر جابه جایی در بیشینه باند رخ می دهد. در نتیجه بیشینه جذب در ۴۱۳ نانومتر مشاهده شد. باتوجه به اینکه، کورکومین دارای بیشینه جذب در طول موج ۴۲۵ نانومتر و بیشینه نشر فلورسانس ۵۲۵ نانومتر است، طیف نشر فلورسانس آن برای حالت آزاد و بارگذاری شده در نانو سامانه کورکومین - دندریمر به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نمودار ۲ طیف بیشینه نشر مشاهده شده برای کورکومین آزاد در حلال متانول متفاوت

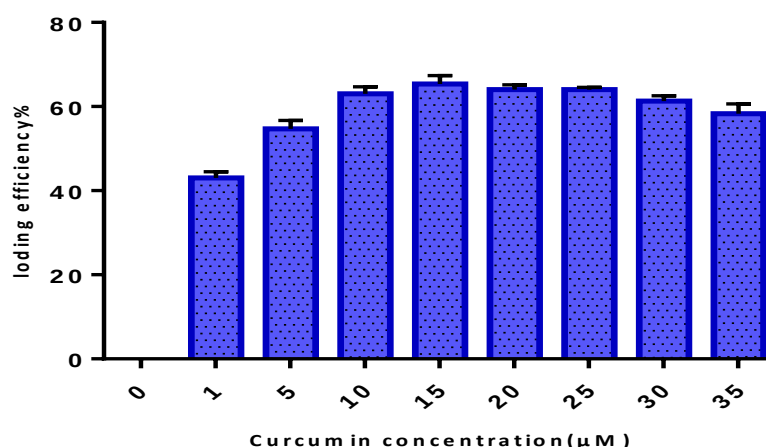
از حالت بارگذاری شده آن در در نانو سامانه کورکومین - دندریمر است. نتیجه ی برانگیختگی فلورسانس در طول موج ۴۲۵ نانومتر برای کورکومین مشاهده نشر در ۵۲۸ نانومتر بود. این در حالی است که، نشر کورکومین کپسوله شده در نانو سامانه در ۵۱۳ نانومتر با ۱۵ نانومتر جابه جایی آبی مشاهده شد که به علت تغییر قطبیت محیط از قطبی به غیرقطبی است، می توان آن را به عنوان شاهد دیگری برای بارگذاری کورکومین داخل دندریمر در نظر گرفت [۱۴].

بررسی میزان کورکومین کپسوله شده در نانو سامانه کورکومین - دندریمر

برای بررسی میزان بارگذاری کورکومین در نانو سامانه از طیف سنجی UV-Vis و طیف سنجی فلورسانس استفاده شد، در هر دو روش مبنای اندازه گیری میزان کپسوله شدن کورکومین به دندریمر براساس نسبت مول های کورکومین کپسوله شده به ازای هر مول دندریمر است. به تعداد متوسط ۶ مول از کورکومین به ازای هر ۱ مول دندریمر کپسوله شده است. راندمان بارگذاری به درصد در نمودار ۳ مشاهده می شود.



نمودار ۲ (a) طیف سنجی uv.vis (b) طیف سنجی فلورسانس



نمودار ۳ میزان راندمان بارگذاری کورکومین در نانو سامانه کورکومین-دندریمر

آزمایش نشان داد که نانوسامانه در محیط آبی، سایشیدرودینامیکی برابر با 275 ± 25 نانومتر دارد. همچنین، نشان داده شد که پتانسیل زتا به عنوان معرف بار سطحی نانوسامانه کورکومین-دندریمر تعیین کننده پایداری نانوسامانه دارویی تقریبی با برابر با 8 ± 15 میلی ولت بوده است.

۲-۱۴ ارزیابی سمیت سلولی

سنجش میزان سمیت تیمارهای دارویی روی رده سلولی هلا انجام شد و نتایج آن در نمودار ۵ ذکر شده است. تیمارهای دارویی استفاده شده در این آزمایش شامل کورکومین آزاد و نانوسامانه کورکومین-دندریمر هستند. غلظت های دارویی استفاده شده در این آزمایش از ۰ تا ۳۰ میکرومولار بوده است. مقایسه تیمارهای دارویی نشان داد که IC_{50} برای نانوسامانه کورکومین-دندریمر در غلظت ۳۰ میکرومولار ظاهر شده است. اثر این تیمارها بر سلول هلا متفاوت بوده و نشان دهنده سمیت بسیار پایین کورکومین و دندریمر و نیز نانوسامانه کورکومین-دندریمر در همه تیمارهای به کار رفته دارد.

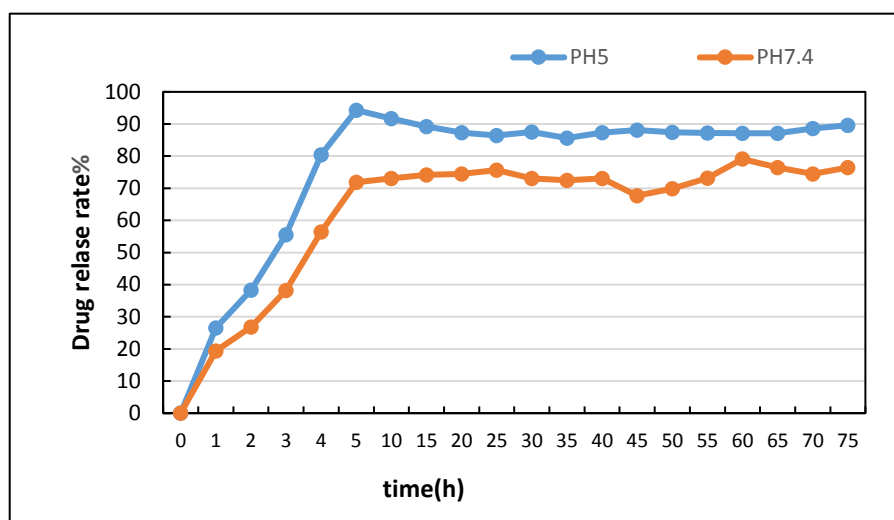
۲-۱۲ بررسی میزان رهائش کورکومین از نانوسامانه

کورکومین-دندریمر

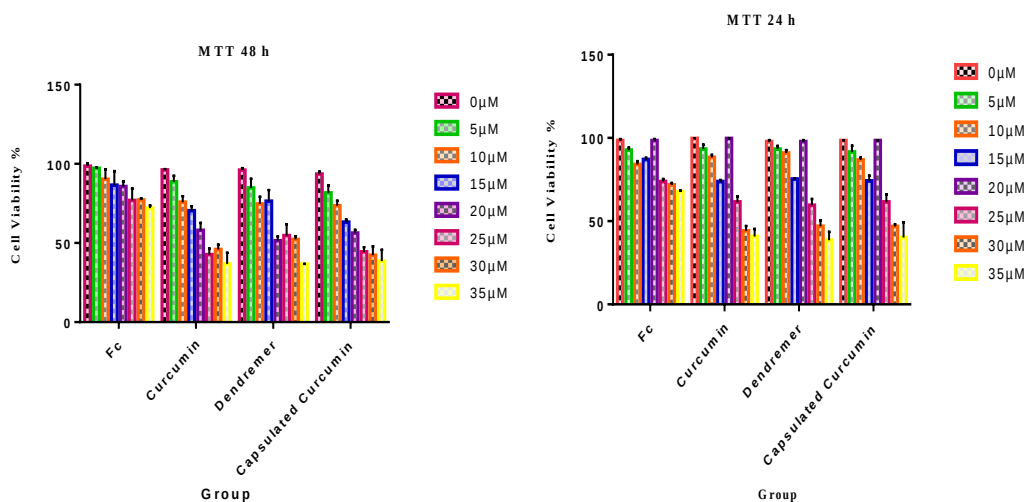
نتایج به دست آمده از بررسی میزان رهائش کورکومین از نانو سامانه کورکومین-دندریمر در نمودار ۴ آورده شده است. بررسی میزان رهائش داروی بارگذاری شده در سامانه با سپری شدن زمان در pH های ۴، ۵ و ۷ نشان می دهد که بیشترین میزان رهائش حالت انفجاری در فاصله زمانی ۵ ساعت بعد از اولین خوانش، اتفاق افتاده است. این یافته ها همچنین نشان می دهد الگوی رفتاری سامانه دارویی در هر دو pH رفتار مشابهی داشته و از یک الگو پیروی کرده اند. از سوی دیگر، میزان رهائش دارو در شرایط pH برابر با ۵ بیشتر بوده و به بالای ۸۰ درصد رسیده است.

۲-۱۳ ارزیابی سائز و بار سطحی سامانه

ارزیابی سائز و بار سطحی نانوسامانه کورکومین-دندریمر با استفاده از دستگاه زتا سائزر انجام شد. 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 زتا سائزر ارزیابی شد. نتایج به دست آمده از این



نمودار ۴ میزان رهائش کورکومین از نانو سامانه کورکومین-دندریمر

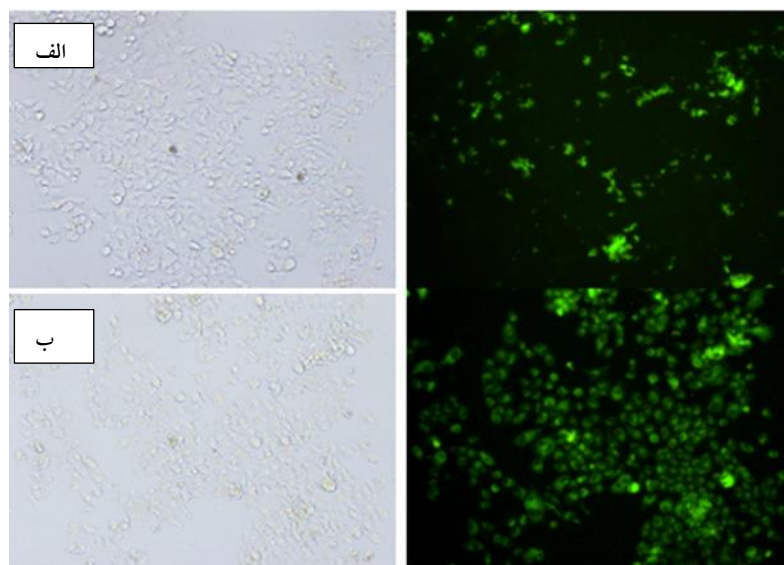


نمودار ۵ نتایج آزمون MTT (الف) ۲۴ ساعت (ب) ۴۸ ساعت

۱۵-۲ بررسی ورود سامانه با میکروسکوپ فلورسانس

همچنان که در شکل ۳ مشاهده می‌شود با توجه به خاصیت فلورسانس کورکومین در طول موج ۵۳۰ نانومتر نشر نور داشته و هنگام تصویربرداری با میکروسکوپ فلورسانس قابل ردیابی است. کورکومین آزاد به دلیل

خاصیت آگریزبودن در محیط‌های آبی و سلولی، تجمعات بزرگی ایجاد می‌کند و قادر به ورود به سلول به طور کامل نیست. با کپسوله شدن کورکومین در دندریمر همان طور که در تصویر مشاهده می‌شود ورود به سلول تسهیل شده است. این دستاورد مطابق با تحقیقات پیشین انجام شده است [۱۳].



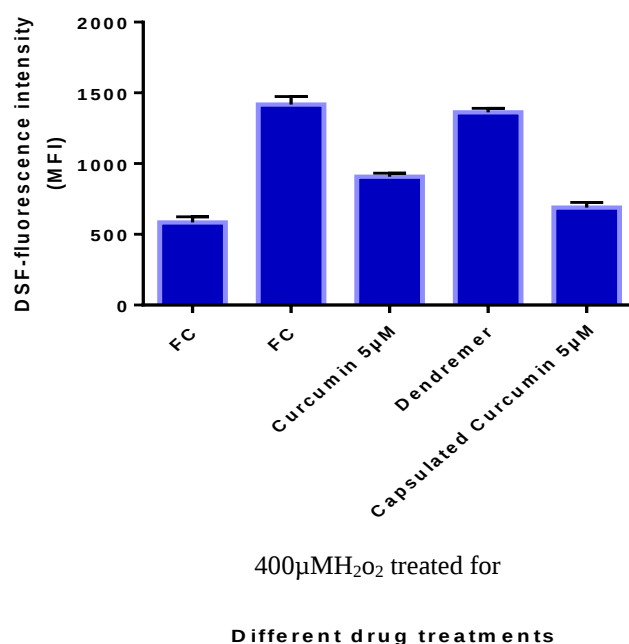
شکل ۳ تصاویر سلول های *Hela* (الف) مربوط به تیمار سلول با کورکومین از د با غلظت ۵ میکرومولار. (ب) مربوط به سامانه دارویی کورکومین دندریمر بار غظت ۵ میکرومولار کورکومین است که در دو حالت نور معمولی و نور فلورسنت تهیه شده است. داده است که تاثیر آب اکسیژنه در تولید رادیکال آزاد در رده‌ی سلولی بالا بوده است.

۲-۱۶ ارزیابی میزان ROS سلولی

میزان ROS ایجاد شده در سلول‌های تیمار شده با سامانه های دارویی با استفاده از فلوسایتومتری ارزیابی شد. همان طور که در نمودار ۶ مشاهده می‌شود بیشترین میزان ROS سلولی در غلظت ۴۰۰ میکرومولار H_2O_2 مشاهده می‌شود. همچنین، کورکومین آزاد با غلظت ۵ میکرومولار میزان ROS را کاهش داد و همچنین مقایسه رفتار نانوسامانه کورکومین- دندریمر با کورکومین آزاد در بازه زمانی ۱۲ ساعت، تفاوت معناداری در کاهش ROS ایجاد شده در اثر استرس اکسیداتیو القا شده با H_2O_2 نشان داده است. به‌طوری‌که، پس از سپری شدن این زمان، کاهش تولید رادیکال آزاد ناشی از نانوسامانه کورکومین دندریمر در مقایسه با کورکومین آزاد حدود ۴۰ درصد بوده است. همچنین، مقایسه تیمارهای دارویی با آب اکسیژنه، به‌عنوان کنترل مثبت در القای ROS تولیدی توسط سلول، نشان

۳- بحث

هدف از انجام این مطالعه بررسی بهبود خواص بیولوژیکی و فیزیکیوشیمیایی کورکومین است. برای این کار، نانو سامانه کورکومین-دندریمر ساخته شد. کورکومین تاثیرات درمانی در بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، دیابت و... نشان داده است [۱۴]. با این حال، به‌دلیل فراهمی زیستی بسیار کم، حلالیت ضعیف در آب، جذب ضعیف، نرخ متابولیک بالا و پاکسازی سریع بدن، کاربردهای کورکومین در فارماکولوژیک محدود شده است [۵]. حامل های متفاوتی برای انتقال این ترکیب دارویی استفاده شده است. با این وجود دندریمرها از حامل‌های پلیمری هستند که دارای خصوصیات بارزی همچون زیست‌تخریب پذیری، زیست سازگاری، عدم سمیت، پایداری بالا، رهایش کنترل شده ترکیبات و غیره هستند، که آنها را از دیگر نانو حامل‌ها متمایز می‌کند.



نمودار ۶ نتایج به دست آمده از آنالیز ROS تولیدی در سلول Hela مورد تیمار با سامانه‌های دارویی؛ دندریمر، کورکومین، کورکومین-دندریمر، نمونه کنترل بدون تیمار

در این مطالعه از روش کپسوله کردن برای بارگذاری کورکومین استفاده شد که یک روش ساده و مقرون به صرفه است. فرمولا سیون مذکور محلولیت کورکومین را افزایش می‌دهد و از غیرفعال شدن مولکول‌های کورکومین در اثر هیدرولیز سلولی نیز محافظت می‌کند. این مزایا سیستم‌های تحویل نانودارو را برای کاربرد های درمانی مطلوب می‌کند، زیرا می‌تواند اثربخشی عوامل درمانی را افزایش دهند و در عین حال عوارض جانبی را به حداقل برسانند [۱۵].

نانو سامانه با روش کپسولاسیون سنتز شد و صحت بارگذاری توسط تکنیک های فلورسانس و $uv-vis$ بررسی شد. میزان بارگذاری و تأثیر پلیمر بر خواص فوتوفیزیکی ترکیبات با روش طیفسنجی تجزیه و تحلیل شد.

کورکومین کپسوله شده در ساختار دندریمری یک سامانه دارویی نانو ابعاد را ارایه کرده است که ضمن داشتن

معیارهای ذکر شده در خصوص دندریمرها، این قابلیت را فراهم کرده که بتواند تمامی خواسته‌های ما را در سطح سلولی فراهم کند. همانطور که در نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داده شده است، دندریمر PAMAM نسل پنجم نسبت به نسل چهارم به علت افزایش سایز سامانه از 117 ± 25 (۱۶) به 275 ± 25 این اندازه ایده آل نانو سامانه دندریمر-کورکومین باعث شده تا در مقایسه با کورکومین آزاد رسانش بیشتر به داخل سلول داشته باشد [۱۷ و ۱۹]. میزان بارگذاری از ۴ مول کورکومین به ازای هر ۱ مول دندریمر [۱۷]، به ۶ مول به ۱ مول افزایش یافته است و در نتیجه میزان ROS سلولی را نسبت به فرم آزاد کورکومین نسبت به دندریمر نسل چهارم ۲۰٪ بیشتر کاهش می‌دهد و منجر به کاهش اثرات استرس اکسیداتیو می‌شود. همچنان که در نمودار MTT نشان داده شده است، کورکومین در غلظت‌های معینی کمتر از (۱۰ میکرومولار)

for the Delivery of Drugs Obtained from Natural Products. *Polymers*, 15(10), 2292.

[4] Aravind, M., Kumar, S. P., & Begum, A. S. (2023). An overview of dendrimers as novel carriers in drug delivery. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 16(4), 2051-2056.

[5] Wang, L., Xu, X., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhu, Y., Shi, J., ... & Huang, Q. (2013). Encapsulation of curcumin within poly (amidoamine) dendrimers for delivery to cancer cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24, 2137-2144.

[6] Nikzamid, M., Hanifehpour, Y., Akbarzadeh, A., & Panahi, Y. (2021). Applications of dendrimers in nanomedicine and drug delivery: A review. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 31, 2246-2261

[7] Ghalandaraki, N., Alizadeh, A. M., & Ashkani-Esfahani, S. (2014). Nanotechnology-applied curcumin for different diseases therapy. *BioMed research international*, 2014.

[8] Ben-Zichri, S., Meltzer, M., Lacham-Hartman, S., Kolusheva, S., Hadad, U., Papo, N., & Jelinek, R. (2022). Synergistic Activity of Anticancer 5)Polyphenols Embedded in Amphiphilic Dendrimer Nanoparticles. *ACS Applied Polymer Materials*, 4(12), 8913-8925.

[9] Babu, A., Templeton, A. K., Munshi, A., & Ramesh, R. (2014). Nanodrug delivery systems: a promising technology for detection, diagnosis, and treatment of cancer. *Aaps Pharmscitech*, 15, 709-721.

[10] Hafez Ghoran, S., Calcaterra, A., Abbasi, M., Taktaz, F., Nieselt, K., & Babaei, E. (2022). Curcumin-based nanoformulations: A promising adjuvant towards cancer treatment. *Molecules*, 27(16), 5236.

[11] Shen, D., Chen, H., Li, M., Yu, L., Li, X., Liu, H., ... & Lu, Y. (2023). Effects of Different Molecular Weight Oxidized Dextran as Crosslinkers on Stability and Antioxidant Capacity of Curcumin-Loaded Nanoparticles. *Foods*, 12(13), 2533.

[12] Mahalakshmi, L., Choudhary, P., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2023). Emulsion electrospraying and spray drying of whey protein nano and microparticles with curcumin. *Food Hydrocolloids for Health*, 3, 100122

در دو فرم آزاد و بارگذاری شده در نانوسامانه کورکومین- دندریمر، مطابق تحقیقات پیشین سمیت قابل توجهی نداشته است [۱۳]. اما با افزایش غلظت سمیت قابل ملاحظه‌ای در رده سلولی هلا مشاهده شده است [۱۷]. از سویی، میزان ROS تولید شده توسط کورکومین بارگذاری شده در سامانه نانوباعاد در غلظت ۵ میکرومولار به‌طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از فرم آزاد کورکومین بوده است. از سوی دیگر، در غلظت ۲۰ میکرومولار افزایش میزان ROS سلولی را شاهد هستیم [۲۰].

۴- نتیجه‌گیری

نشان داده شده کورکومین بارگذاری شده در نانو سامانه دندریمر-کورکومین در کاهش القای تولید ROS موفق عمل کرده است. این در حالی است که در هر دو بازه زمانی میزان ROS تولید شده ناشی از کورکومین آزاد بیشتر بوده است. با توجه به تاثیر بیشتر داروی بارگذاری شده در سامانه نانوباعاد کورکومین- دندریمر می‌توان اینگونه تصور کرد بهبود خواص فیزیکوشیمیایی و افزایش محلولیت کورکومین در این سامانه موجب افزایش پایداری و بهبود اثرات بیولوژیکی و نهایتاً باعث ورود داروی بیشتر به داخل سلول و متعاقباً القای تولید ROS کمتر می‌شود [۲۱ و ۱۳]. این نانو سامانه قابلیت رسانش هدفمند انواع داروها را دارد و می‌تواند مسیر جدیدی برای رسانش هدفمند داروها به سلول‌ها و بافت‌های مورد نظر باز کند.

۵- منابع

- [1] Gupta, R. K., Patel, A. K., Shah, N., Choudhary, A. K., Jha, U. K., Yadav, U. C., ... & Pakuwal, U. (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 15(11), 4405-4409.
- [2] Curcumin Derivative C210. *Pharmaceutics*, 15(5), 1546.
- [2] Ammon HP, Wahl MA (1991) Pharmacology of Curcuma longa. *Planta Med* 57:1-7.
- [3] An, H., Deng, X., Wang, F., Xu, P., & Wang, N. (2023). Dendrimers as Nanocarriers

Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264. 7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. *PloS one*, 14(5), e0216711.

- [13] N., Choudhary, A. K., Jha, U. K., Yadav, U. C., ... & Pakuwal, U. (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 15(11), 4405-4409.
- [14] Hu, Y., Cheng, L., Du, S., Wang, K., & Liu, S. (2024). Antioxidant curcumin induces oxidative stress to kill tumor cells. *Oncology Letters*, 27(2), 1-12.
- [15] Chen, D., Liu, X., Lu, X., & Tian, J. (2023). Nanoparticle drug delivery systems for synergistic delivery of tumor therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1111991.
- [16] Kianamiri, S., Dinari, A., Nomani, A. R., Sadeghizadeh, M., Mardi, M., & Daraei, B. (2019). 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*, 10(3), 491-502.
- [17] Kianamiri, S., Dinari, A., Sadeghizadeh, M., Rezaei, M., Daraei, B., Bahsoun, N. E. H., & Nomani, A. (2020). Mitochondria-targeted polyamidoamine dendrimer-curcumin construct for hepatocellular cancer treatment. *Molecular Pharmaceutics*, 17(12), 4483-4498.
- [18] Nair, A., Javius-Jones, K., Bugno, J., Poellmann, M. J., Mamidi, N., Kim, I. S., ... & Hong, S. (2023). Hybrid Nanoparticle System Integrating Tumor-Derived Exosomes and Poly (amidoamine) Dendrimers: Implications for an Effective Gene Delivery Platform. *Chemistry of Materials*, 35(8), 3138-3150.
- [19] Yao, Y., Zhou, Y., Liu, L., Xu, Y., Chen, Q., Wang, Y., ... & Shao, A. (2020). Nanoparticle-based drug delivery in cancer therapy and its role in overcoming drug resistance. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 193.
- [20] de Oliveira, T. V., Stein, R., de Andrade, D. F., & Beck, R. C. (2022). Preclinical studies of the antitumor effect of curcumin-loaded polymeric nanocapsules: A systematic review and meta-analysis. *Phytotherapy Research*, 36(8), 3202-3214.
- [21] Lin, X., Bai, D., Wei, Z., Zhang, Y., Huang, Y., Deng, H., & Huang, X. (2019). *Current pharmaceutical design*, 19(11), pp.1974-1993.

Enhancing Solubility and Bioavailability of Curcumin through Novel Dendrimer-based Nanocarrier: A Promising Approach for Therapeutic Efficacy

Afroz Aliyari¹, Shahla Kiyan Amiri², Hossein Naderi Manesh^{1,3*}

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

2- Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Professor Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

naderman@modares.ac.ir

Receipt: 2024/05/11

Accepted: 2024/06/16

Abstract

Curcumin, a potent antioxidant extracted from the turmeric plant, is known for its ability to suppress reactive oxygen species (ROS) through activation of antioxidant response elements. However, its clinical utility is limited by poor solubility and rapid elimination. In this study, we aimed to enhance the solubility and bioavailability of curcumin by encapsulating it in fifth-generation polyamidoamine dendrimer nanoparticles. UV-Vis and fluorescence spectroscopy confirmed successful encapsulation, with an average nanoparticle size of 275 nm and a positive surface charge of 8 mV. The nanocarrier exhibited a loading capacity of approximately curcumin 6mol per dendrimer1 mol and achieved complete drug release within 72 hours. Cellular uptake assays using a live/dead assay revealed superior uptake of the nanocarrier compared to free curcumin, leading to a significant reduction in cellular ROS levels. Furthermore, in a model of induced oxidative stress using H₂O₂, curcumin-loaded dendrimer nanoparticles significantly reduced cellular ROS levels compared to free curcumin. These findings highlight the potential of this nanocarrier as an effective and intelligent system for delivering water-insoluble drugs, offering a promising approach for improving the therapeutic efficacy of curcumin.

Keywords: Dendrimer; Curcumin, Antioxidant; Reactive Oxygen Species; Oxidative stress