



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, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, 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: June 20, 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 NFkappaB, 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 کانجوگه کورکومین- دندریمر و مطالعه تاثیر آن بر رده سلول‌های 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 سم‌شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

آثار آنتی‌اکسیدانی، 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 کانجوگه کردن مولکول‌های کورکومین به ساختار دندریمری نسل چهار (پلی‌آمیدوآمین)، یک حامل نانوابعاد مناسب تهیه شد. مشخصه‌یابی نانوسامانه و تایید فرآیند کانجوگه شدن به وسیله روش‌های FT-IR و $^1\text{H-NMR}$ انجام شد. اندازه و بار سطحی ذرات با دستگاه DLS مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان بارگذاری مولکول‌های کورکومین روی نانوسامانه بررسی شد و در ادامه آزمایش‌های سلولی از جمله سمیت، ROS سلولی و آپاپتوز به وسیله آزمون MTT و تکنیک فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق عمل کانجوگه شدن کورکومین را تایید کرد و ذرات به دست آمده اندازه تقریبی 100nm داشتند. نتایج نشان داد که میزان بارگذاری کورکومین در این نانوسامانه حدود چهار مولکول به ازای هر مولکول دندریمر است. آزمایش‌های 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 فیزیکیوشیمیایی و افزایش محلولیت کورکومین بوده است. در مجموع، این نانوحامل به عنوان یک سامانه هوشمند و کارآمد می‌تواند برای رسانش داروهای آب‌گریز به سلول‌های سرطانی در نظر گرفته شود.

کلیدواژه‌ها: دندریمر، کورکومین، کونژوگاسیون، آپاپتوز، رادیکال آزاد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۲۷

*نویسنده مسئول: sadegh@modares.ac.ir

مقدمه

داروهای رایج درمان سرطان اغلب سنتی بوده و از سیستم‌های نوین دارورسانی پیروی نمی‌کنند. این داروها اغلب با وزن مولکولی پایین

بوده و که مقدار زیادی از آنها به‌منظور دیدن اثر درمانی دارو مورد نیاز است که این عوامل باعث ایجاد سمیت می‌شوند^[1]. مشکل دیگر این عوامل درمانی این است که به‌علت سمیت زیاد با محدودیت دوز همراه هستند. در واقع چالشی که این عوامل درمانی ایجاد می‌کنند، غیراختصاصی بودن آنها است که علاوه بر سلول سرطانی به سلول‌های سالم نیز آسیب می‌رسانند^[2]. امروزه دانش و فناوری نانو، صنعت داروسازی و پزشکی را متحول کرده است، به‌گونه‌ای که محققین زیادی را در طراحی و تولید داروهایی با خصوصیت زیست‌دسترسی، زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری بالا ترغیب کرده است. این رویکرد توانایی طراحی داروهایی که بتوانند بافت‌های خاصی (جایگاه بیماری) را مورد هدف قرار داده و دارو را به‌صورت کنترل‌شده در آن جایگاه رها کنند، را فراهم آورده است^[1]. بر پایه این یافته‌ها 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 رادیکال‌های آزاد اکسیژن نظیر آنیون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل منجر به ایجاد بیماری‌هایی مانند سرطان می‌شود. اثرات آنتی‌اکسیدانی کورکومین در غیرفعال کردن رادیکال‌های 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 بیماری‌های مزمن انسان توسعه یافته است. به‌طور کلی استفاده از نانوذرات به‌عنوان حامل، زیست‌دسترسی، هدفمندی و الگوی ره‌یابی کنترل‌شده عوامل درمانی طبیعی و آنالوگ‌های آنها را به‌تنهایی یا در فرم‌های ترکیبی فراهم آورده است^[6]. علی‌رغم فراوانی و تنوع موجود در سیستم‌های نانوذره‌ای، نانوساختارهای دندریمری و دندرون‌ها به‌عنوان نانوذراتی ایده‌آل برای آینده پزشکی امیدهای زیادی را ایجاد نموده‌اند^[7]. دندریمرها بسته به ساختار شیمیایی خود ویژگی‌های بسیار مناسبی در فرموله کردن و تهیه دارو دارند. از جمله این ویژگی‌ها می‌توان به توزیع باریک وزن مولکولی، اندازه نانوابعاد و ویژگی‌های خاص شکل، چندانعلی بودن، خواص قابل تنظیم در رابطه با پایداری pH، محلولیت در محیط‌های مختلف و زیست‌تخریب‌پذیری اشاره کرد^[8].⁹ این توانمندی‌ها دندریمرها را قادر ساخته تا به‌عنوان یک حامل مناسب برای رسانش دارو به‌صورت هدفمند قابلیت استفاده داشته باشند. در این سیستم دارورسانی، داروهای آب‌گریز در سطوح داخلی دندریمر بارگذاری شده و در محیط‌های آبگون مانند محیط سلولی زیست‌دسترسی بهینه‌ای پیدا کرده و توزیع مناسبی به دست می‌آورند. دندریمر مورد استفاده در این آزمایش از واحدهای پلی‌آمیدوآمین (PAMAM) ساخته شده و با واسطه گروه‌های 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 "برون 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، ۰/۰۳، ۰/۰۱ میلی مولار تا 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 کانجوگه 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 ۴ 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 کانجوگه 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 کانجوگه 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 کلروفورمات (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 کیلو دالتونی (آمیکون؛ آلمان) و کیسه دیالیز MWCO ۱۰ کیلو دالتونی (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 فیرو بلاست (انستیتو پاستور؛ ایران) تهیه شدند. محیط کشت DMEM، محلول تری پتین- ای. دی. تی. آ (EDTA؛ ۲۵٪)، 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 کلروفورمات (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 هوا زدایی 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 کلروفورمات 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 کلروفورمات 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 کانجوگه شدن)

مولکول های کورکومین پس از فعال سازی به سطح دندریمر های PAMAM (G4) کانجوگه 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 کانجوگه شدن مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور، بر اساس

ارزیابی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپتوز) با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری

در این آزمایش، مشابه با آزمایشات قبلی مقدار LD50 تعیین شد. رده سلولی Huh-7 و فیروبلاست برابر با 1×10^5 و $1/2 \times 10^5$ سلول در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت و طی دو مرحله جداگانه به ترتیب در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، با دندریمر PAMAM، کورکومین آزاد و نانوسامانه DC تیمار شد. بعد از سپری شدن مدت زمان 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 فعال شده (ب) نشان از حذف شدن بخشی از هیدروکسیل در طیف جذبی کورکومین فعال شده دارد (محل ظاهر شدن پیک‌های مربوط به گروه هیدروکسیل کورکومین آزاد در ناحیه $3440/64$ است). همچنین پیک ایجاد شده 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 ظاهر شده در ناحیه حدود 4ppm بیانگر فعال شدن کورکومین است که به صورت دوشاخه شدن خود را نشان داده است. بدین صورت 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 ظاهر شده در ناحیه ۷ و ۸ نیز مربوط به استخلاف‌های پارانیتروفنول بود و بیانگر نشسته شدن NPC-4 روی کورکومین است.

اتصال کورکومین به دندریمر پلی‌آمیدوآمین نسل چهار

در این مطالعه مولکول‌های کورکومین پس از فعال‌سازی به منظور اتصال در نسبت‌های مختلف از دندریمر و کورکومین مورد استفاده قرار گرفتند. در شکل ۲ مراحل شماتیک اتصال کورکومین فعال شده 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 کانجوگه شدن مورد تایید قرار گرفت. نتایج ارایه شده در نمودار ۲ (الف و ب) نشان داده شده است. در طیف FTIR پیک ظاهر شده در عدد موجی $1670/97$ (نمودار ۱- الف) مربوط به گروه

با سامانه دارویی نانوباعاد DC مورد تیمار قرار داده و پس از سپری شدن 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 به عنوان داروی شاهد استفاده شد. تمامی مراحل کاری برای کورکومین آزاد مشابه سامانه دارویی DC بوده است.

ارزیابی سمیت سلولی

به منظور ارزیابی سمیت نانوسامانه دارویی DC، ابتدا رده سلولی Huh-7 و فیروبلاست 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 سپری شدن 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 به کاررفته برابر با ۴، ۱۰، ۱۷، ۲۴ و 30mL میکرومولار بوده است.

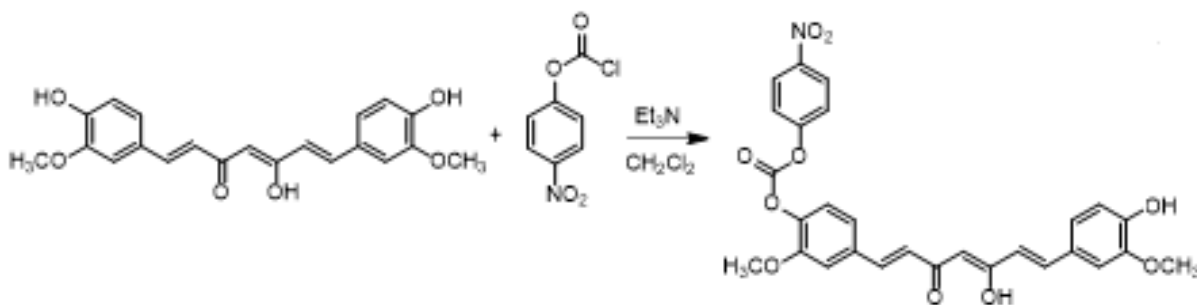
ارزیابی میزان ROS سلولی با استفاده از فلوسایتومتری

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 استفاده شده در چاهک‌های مورد تیمار برای هر کدام از رده‌های سلولی به صورت زیر بوده است:

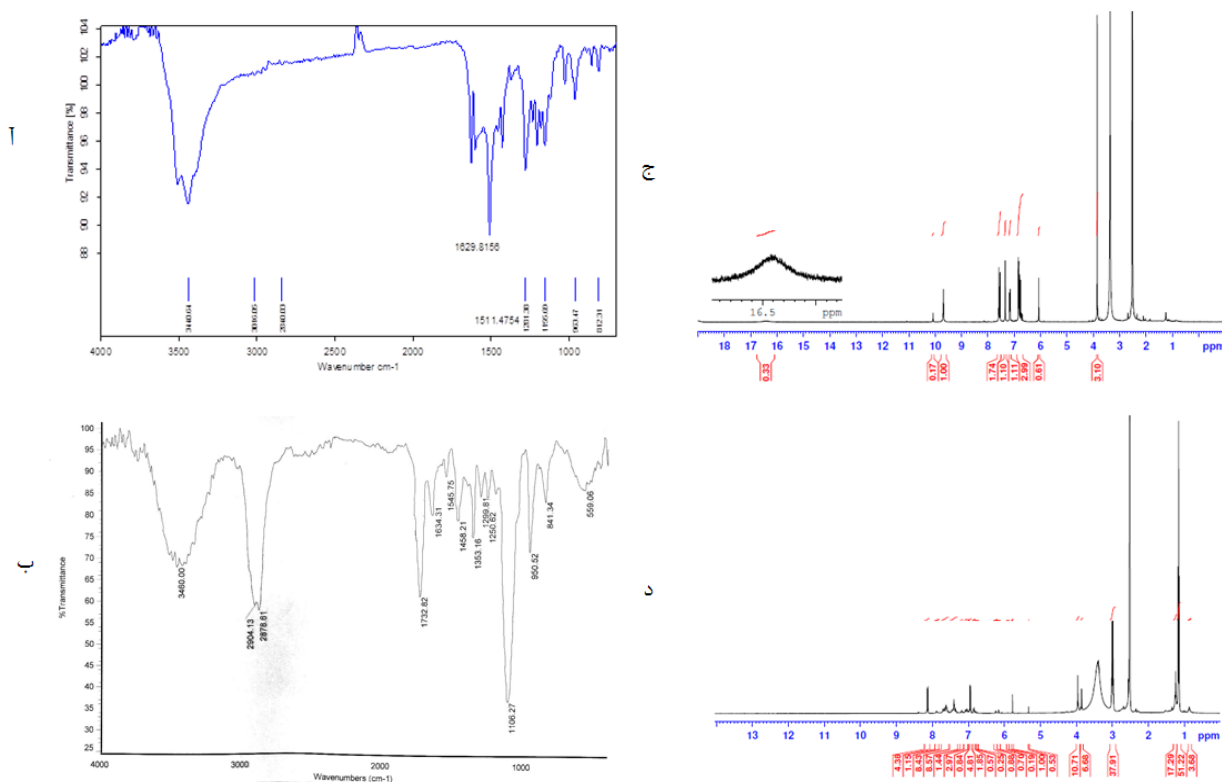
به ترتیب برای Huh-7، فیروبلاست برابر با $1/75 \times 10^4$ و $1/25 \times 10^4$ سلول در هر چاهک کشت داده شد. تیمارهای دارویی مشابه با آزمایشات سنجش سمیت روی گروه‌های آزمایشی، در دو بازه زمانی ۶ و ۱۲ ساعت اعمال و سپس در شرایط بهینه رشد انکوبه شدند. در ادامه و پس از سپری شدن بازه‌های زمانی ذکر شده، مایع رویی سلول‌های داخل هر چاهک را دور ریخته و با PBS شست و شو داده و مورد تیمار با ماده تریپسین قرار می‌گیرند. سلول‌های جدا شده 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 رنگ آمیزی به طور کامل انجام شود. محیط سلولی باعث اکسید شدن ۲، ۷ دی‌کلرو دی‌هیدروفلورسین دی‌استات توسط رادیکال آزاد سلولی و تبدیل آن به دی‌کلروفلورسین می‌شود. پس از ۴۵ دقیقه میزان رادیکال آزاد تولید شده با دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد. آب اکسیژنه (H_2O_2) با غلظت 250mL میکرومولار به عنوان کنترل مثبت رادیکال آزاد در نظر گرفته شده است.

گروه سطحی NH₂ در دندریمر PAMAM به علت اتصال به مولکول کورکومین کمی کشیده شده و به جای ظاهر شدن در ناحیه ۱ تا ۳ جابه جایی شده و در ناحیه ۲ تا ۳ ظاهر شده است. این جابه جایی گویای حذف شدن گروه عاملی پارانیتروفنیل است.

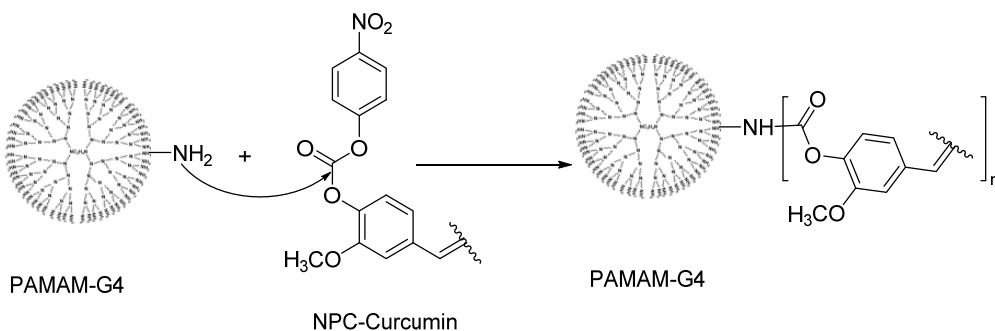
کربوکسیل (C=O) و پیک ظاهر شده در عدد موجی ۳۷۰۴/۴۶ مربوط به باند کششی آمید نوع دوم (N-H) است که هر دو نشانه تشکیل پیوند آمیدی بین کورکومین فعال و دندریمر PAMAM G4 است. از طرف دیگر آنالیز طیف NMR (نمودار ۲-ب) نشان داده شده که



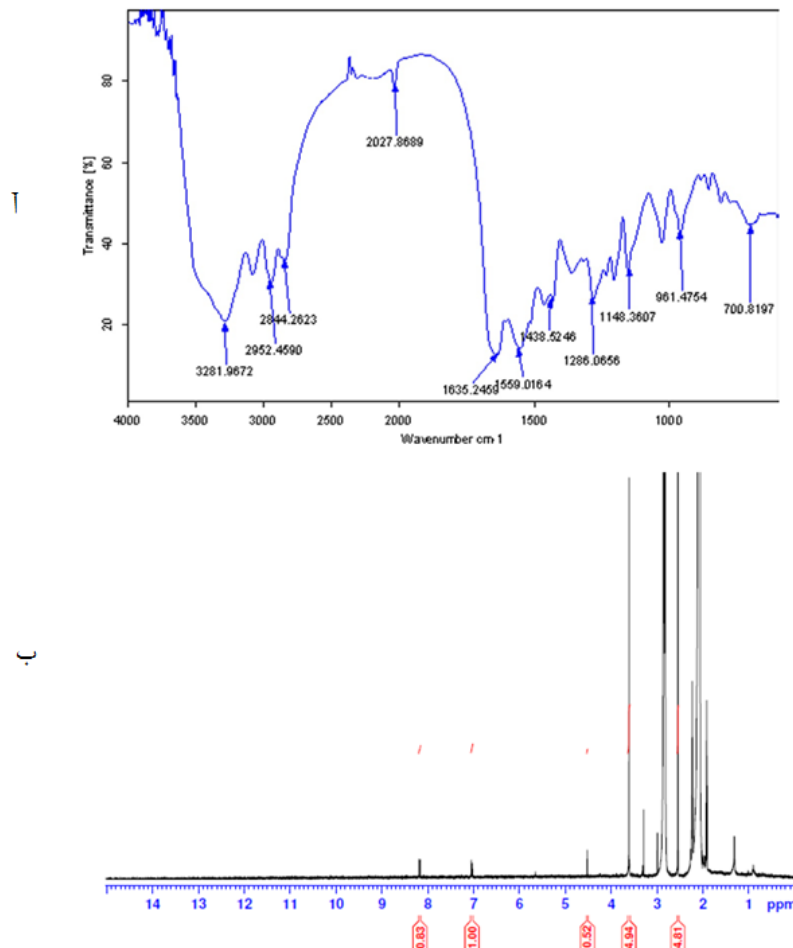
شکل ۱) شکل شماتیک مربوط به فعال نمودن گروه هیدروکسیل کورکومین توسط نیتروفنیل کلروفورمات نشان داده شده است.



نمودار ۱) طیف های FT-IR (الف- غیرفعال و ب- فعال شده به وسیله نیتروفنیل کلروفورمات) و 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 کلروفورمات (NPC-Curcumin) به دندریمر نسل چهارم و عمل کانجوجه شدن به صورت شماتیک نشان داده شده است.



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

بررسی میزان اتصال کورکومین به نانوسامانه دندریمری

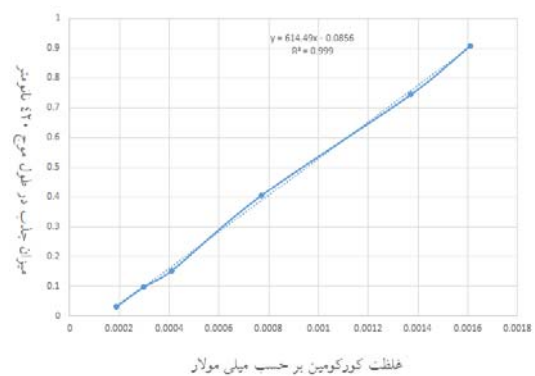
به منظور بررسی میزان اتصال کورکومین به سطح دندریمر، از دو روش اسپکتروسکوپی UV-Visible و $^1\text{H-NMR}$ استفاده شد. در هر دو روش مبنای اندازه گیری میزان اتصال کورکومین به دندریمر براساس نسبت مولهای کورکومین متصل شده به ازای هر مول دندریمر است. روش $^1\text{H-NMR}$ نشان داد که به تعداد متوسط ۴ مول کورکومین به ازای هر مول دندریمر PAMAM، در سطح دندریمر 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 پیکها 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 دندریمر 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 117 ± 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 $9/63 \pm 0/32$ میلی ولت بوده

منحنی استاندارد کورکومین

نتایج به دست آمده از آنالیز کورکومین نشان داد بهترین محدوده غلظتی قابل اندازه گیری آن در سامانه مورد نظر از ۰/۰۰۲ 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

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 استفاده‌شده در این آزمایش شامل سامانه دندریمری بدون تغییر PAMAM، کورکومین آزاد و نانوسامانه DC که حاوی کورکومین متصل‌شده به سطح دندریمر هستند. غلظت‌های دارویی استفاده‌شده 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 به‌دست‌آمده 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 هیچ‌یک از غلظت‌های استفاده‌شده 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 پایینی کورکومین و دندریمر تنها و نیز سامانه کورکومین- دندریمر (در همه تیمارهای به‌کاررفته) روی سلول نرمال فیبروبلاست دارد.

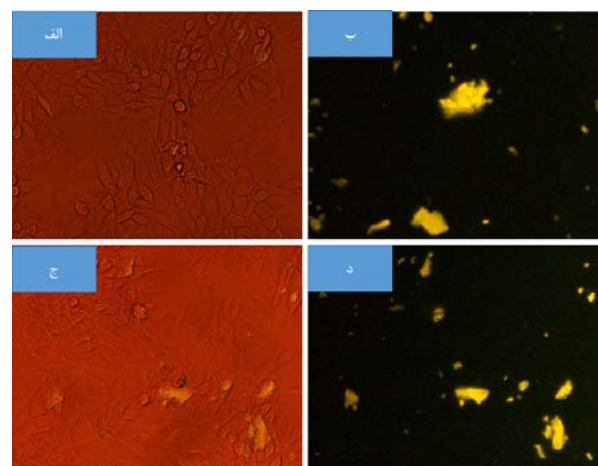
ارزیابی میزان ROS سلولی با استفاده از فلوسایتومتری

میزان ROS ایجادشده در سلول‌های تیمار شده با سامانه‌های دارویی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمون از ماده ۲، ۷ دی‌کلرو دی‌هیدروفلورسین دی‌استات استفاده شده است. این ماده با مولکول‌های ROS ایجادشده درون میتوکندری واکنش داده و موجب ایجاد ماده فلورسنت ۲، ۷ دی‌کلروفلورسئین‌اکسید 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 استفاده‌شده از نانوسامانه DC، در مقایسه با کورکومین آزاد، از لحاظ آماری به‌طور 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 ۲ ساعت، به‌وضوح تفاوت رفتار آنها را نشان داده است. به‌طوری که پس از سپری‌شدن 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 به‌عنوان یک داروی گزینه‌ی رادیکال‌آزاد بیشتری را در سلول سرطانی القا کرده است. نکته حائز اهمیت این است که نانوسامانه DC در دو رده سلول سرطانی و طبیعی به‌ترتیب عملکردی حداکثری و حداقلی داشته است. همچنین مقایسه تیمارهای دارویی با آب‌اکسیژنه، به‌عنوان کنترل مثبت در القای ROS تولیدی توسط سلول، نشان داده است که تاثیر آب‌اکسیژنه در تولید رادیکال

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

ارزیابی ورود سامانه دارویی تهیه‌شده به سلول با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت

بررسی ورود کورکومین متصل به دندریمر 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 دندریمری (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 قرارگرفتن در زیر میکروسکوپ نوری فلورسنت در طول موج ۴۸۰ نانومتر نشر نور داشته و قابل ردیابی هست. در حالی که کورکومین آزاد با قرارگرفتن در محیط‌های آبگون و سلولی مجتمع شده و در سطح سلول باقی مانده است، سامانه دارویی نانوباعاد به‌راحتی 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 به‌گونه‌ای 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 به‌دست‌آمده 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 به‌دلیل خاصیت آب‌گریز بودن در محیط‌های آبگون و سلولی، تجمعات بزرگی ایجاد می‌کند و ورود آن به داخل سلول دچار مشکل می‌شود. همان‌طور که در شکل ۳ (الف و ب) مشاهده می‌شود ایجاد تجمعات با اندازه‌های مختلف موجب می‌شود وارد سلول نشده و از سلول دور بماند. این دستاورد مطابق با تحقیقات قبلی انجام شده است [13].



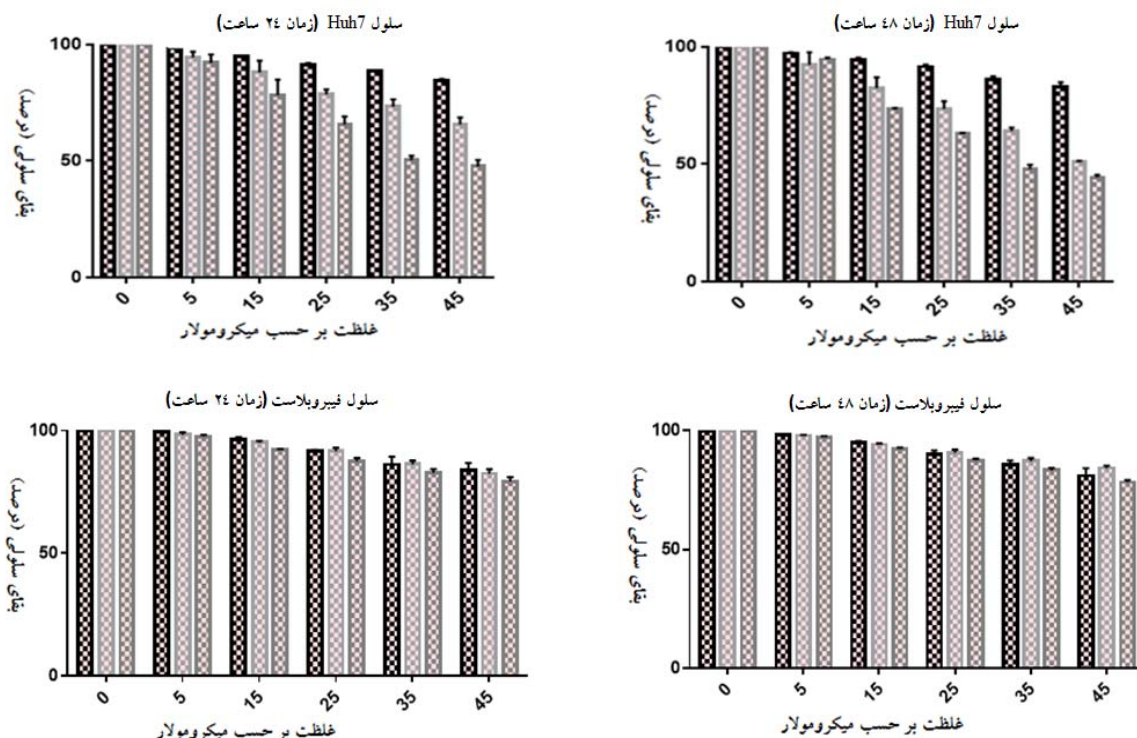
شکل ۳) تصویر الف و ب مربوط به تیمار سلول با کورکومین آزاد و تصویر ج و د مربوط به سامانه دارویی دندریمر-کورکومین است که در دو حالت نور معمولی و نور فلورسنت تهیه شده است. در حالی که کورکومین آزاد در سطح سلول باقی مانده اما عملکرد متفاوت سامانه نانوباعاد ورود به سلول را کاملاً تسهیل کرده است.

حاصل از این سنجش در نمودار ۶ ذکر شده است. میزان آپاپتوز القا شده 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 $68/15 \pm 0/14$ و $86/88 \pm 0/14$ را القا کرده است. این در حالی است که آپاپتوز ناشی از تیمار داروی کورکومین آزاد برای بازه های زمانی فوق الذکر به ترتیب $35/75 \pm 0/32$ و $78/68 \pm 0/41$ 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.

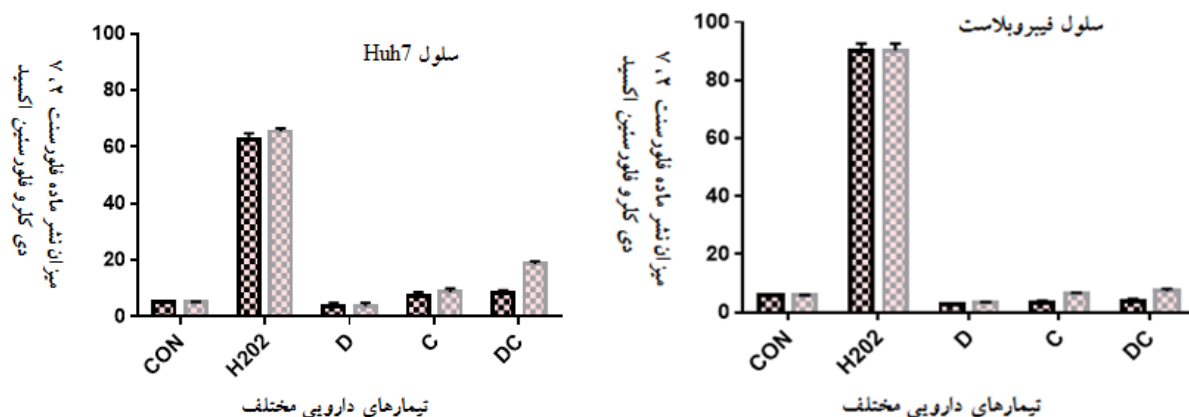
آزاد در هر دو رده سلولی طبیعی و سرطانی بسیار بالا بوده است. این در حالی است که سامانه های دارویی از جمله کورکومین آزاد و نانوسامانه DC بیشترین تاثیر را بر سلول سرطانی داشته اند و می توان گفت به صورت انتخابی عمل کرده است.

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

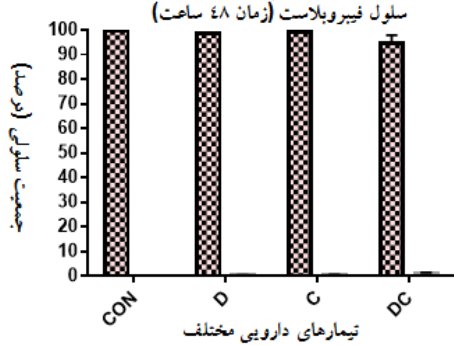
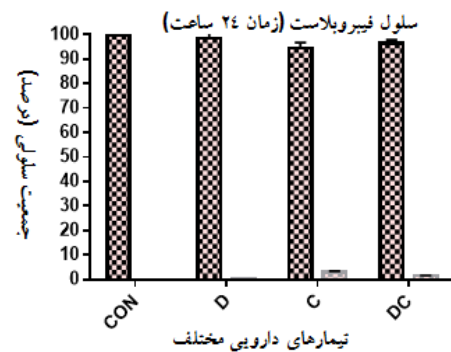
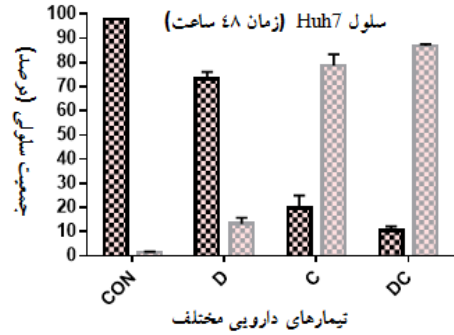
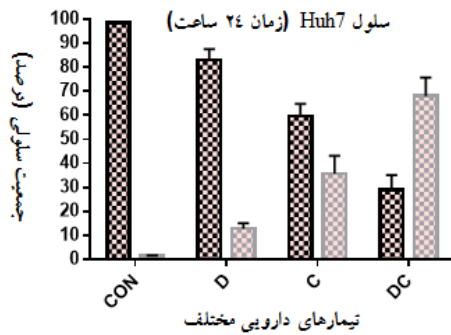
القای فرآیند آپاپتوز در اثر نانوسامانه DC در مقایسه با کورکومین آزاد مورد بررسی قرار داده شد. دو رده سلولی Huh-7 و فیبروبلاست با غلظت دارویی ۲۴ میکرومولار از کورکومین آزاد یا متصل به دندریمر در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، تیمار شد. میزان آپاپتوز در هر کدام از رده های سلولی با روش فلوسایتومتري و استفاده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

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، به دست آوردن ترکیباتی است که محلولیت کورکومین را افزایش دهند، اما با این وجود از غیرفعال شدن مولکول‌های کورکومین در اثر هیدرولیز سلولی نیز محافظت می‌کنند. یکی از انواع حاملینی که در حوضه داروسازی جایگاه برجسته‌ای به دست آورده پلیمرهای دندریمری نانوابعاد است که در جهت افزایش محلولیت و دسترسی زیستی 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 کانجوگه شده با ساختار دندریمری یک سامانه دارویی نانوابعادی را ارائه کرده است که ضمن داشتن معیارهای ذکر شده در خصوص دندریمرها این قابلیت را

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 فائق آمدن 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، بدین معنی 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 بدین ترتیب 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

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 بازسازی شده 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 بارگذاری شده در نانوسامانه DC در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌ترتیب (±۰/۱۴) و ۶۸/۱۵ و (±۰/۱۴) ۸۶/۸۸% 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 بارگذاری شده در سامانه نانوابعاد 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 نانو ذراتی 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 کاندیوگه کردن کورکومین به ساختار دندریمری سبب افزایش یافتن محلولیت، پایداری و بهبود اثرات بیولوژیکی آن می‌شود. القای فرآیند آپاپتوز ناشی از کورکومین بارگذاری شده در نانوسامانه DC در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ در مقایسه با کورکومین آزاد به مراتب بیشتر بوده است. ورود این سامانه نانوابعاد به داخل سلول موفق‌تر بوده و متعاقباً آپاپتوز بیشتری را القا کرده است. در واقع نانوسامانه دندریمری به‌واسطه بهبود خواص فیزیکوشیمیایی

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 بارگذاری شده 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 تولید شده توسط کورکومین بارگذاری شده در سامانه نانوابعاد و همچنین فرم آزاد کورکومین نیز در رفتار مشابهی 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. بدین ترتیب کورکومین با افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری‌های سلول‌های مورد هدف همانند سایر مهارکننده‌های پروتئازوم اثر

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 NFkappaB, 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 نانوبعد 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 *وتیپال بورا* عضو هیئت علمی *Indian IIT Guwahati, Institute of Technology Guwahati* (IITG) به‌دلیل فعال‌کردن کورکومین در آزمایشگاه ایشان تشکر می‌کنم.

تاییدیه 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.