



واحد علوم پزشکی تهران  
معاونت پژوهش و فناوری



گزارش نهایی طرح:

سنتز و بررسی اثرات ضد توموری فتودینامیکی نانوذرات هیبریدی هیدروکسیدهای  
لایه مضاعف - کورکومین و کورکومین تنها در رده سلولی MDA-MB-231 سرطان  
سینه

کد

۲۳۵۵

مسئول طرح

دکتر خاطره خرسندی

محل اجرا:

جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

گروه پژوهشی لیزر پزشکی

شهریور ۱۳۹۶



واحد علوم پزشکی تهران  
معاونت پژوهش و فناوری



گزارش نهایی طرح:

سنتز و بررسی اثرات ضد توموری فتودینامیکی نانوذرات هیبریدی هیدروکسیدهای  
لایه مضاعف - کورکومین و کورکومین تنها در رده سلولی MDA-MB-231 سرطان  
سینه

کد

۲۳۵۵

مسئول طرح

دکتر خاطره خرسندی

همکاران طرح:

دکتر رضا حسین زاده

دکتر محسن فاتح

سارا کمالی

محل اجرا:

جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

گروه پژوهشی لیزر پزشکی

شهریور ۱۳۹۶

## مشخصات مسئول و همکاران طرح

ردیف	نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	تخصص	رتبه علمی	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
	خاطره خرسندی	مجری	بیوشیمی	استادیار	۵۱۸
	رضا حسین زاده	همکار اصلی طرح - سنتز نانو مواد و تعیین خصوصیات فیزیکو شیمیایی آن	بیوفیزیک	استادیار	۴۰۰
	محسن فاتح	همکار - متدولوژی طرح	پزشک عمومی	مری پژوهش	۸۰
	سارا کمالی	همکار بخش مطالعات سلولی طرح	بیوشیمی	-	۴۰

## چکیده

در میان روش های موجود در درمان سرطان، فتودینامیک درمانی (PDT) روشی جدید برای درمان سرطان و برخی از ضایعات غیر بدخیم است. این روش شامل فعال شدن یک حساسگر نوری بوسیله نور با طول موجی مشخص است که با مولکول اکسیژن واکنش داده و اکسیژن منفرد و یا گونه های فعال اکسیژن (ROS) تولید می کند که در نهایت منجر به مرگ سلول توموری می گردد.

کورکومین، ترکیب فعال زردچوبه، به عنوان یک عامل ضد سرطان قوی در برابر بسیاری از انواع مختلف سرطان ها شناخته شده است. مطالعات نشان می دهد که کورکومین می تواند به عنوان یک ترکیب حساسگر نوری در فتودینامیک درمانی مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، عمده نقطه ضعف کورکومین حلالیت آبی ضعیف آن است. در این مطالعه برای بهبود کارایی آن در درمان سرطان، کورکومین را در لایه های هیدروکسیدهای لایه مضاعف (LDH) قرار گرفت و نانو ذرات هیبریدی هیدروکسیدهای لایه مضاعف-کورکومین سنتز شد. مطالعات پراش اشعه ایکس (XRD)، SEM و TEM میکروسکوپی نشان می دهد که کورکومین در لایه میزبان تثبیت شده است. با توجه به نتایج طیف سنجی، حلالیت در آب کورکومین افزایش یافته و میزان بارگذاری کورکومین در LDH در حدود ۵۰٪ می باشد.

سپس اثرات نانوذرات هیبریدی هیدروکسیدهای لایه مضاعف-کورکومین و کورکومین تنها در رده سلولی MDA-MB-231 سرطان سینه بررسی شد

در ابتدا سلول های MDA-MB-231 با غلظت های مختلف از کورکومین تنها و نانو هیبرید کورکومین ۲۴ به مدت ساعت در پلیت های ۹۶ خانه ای کشت داده شدند. سپس سلول ها در معرض تابش منبع نوری به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از تابش نور، توان زیستی سلول ها با استفاده از روش MTT اندازه گیری شد. مطالعات میکروسکوپی جهت بررسی مورفولوژی سلول ها انجام گرفت. به منظور مشخص شدن اثر این ترکیب بر کلونی زائی سلول ها، تست کلونی انجام گرفت. در نهایت برای بررسی نوع مرگ سلولی ایجاد شده رنگ آمیزی دوگانه و بررسی با میکروسکوپ فلورسانس و تست فلوسایتومتری انجام گرفت.

نتایج این مطالعه نشان می دهد که در غیاب نور تغییرات زیادی در بقای سلول های سرطانی در حضور نانو هیبرید کورکومین و کورکومین نسبت به حالت کنترل مشاهده نمی شود. در حضور نور، تغییرات بقا سلول ها در حضور نانو هیبرید کورکومین نسبت به کورکومین بیشتر می باشد. تست کلونی زائی با غلظت IC50 از نانو هیبرید کورکومین نشان می دهد که این ماده باعث کاهش کلونی زائی سلول های سرطانی شده است. نتایج حاصل از رنگ آمیزی دوگانه EB/AO و همچنین فلوسایتومتری تائید کننده وقوع مرگ از نوع آپوپتوز در سلول های سرطانی تحت فتودینامیک درمانی با نانو هیبرید کورکومین است. این بررسی نشان می دهد که فتودینامیک درمانی با واسطه نانو هیبرید کورکومین نسبت به کورکومین، کارائی فتودینامیکی را به مقدار قابل توجهی افزایش می دهد که می تواند نشان دهنده پتانسیل LDH به عنوان حامل کورکومین در درمان فتودینامیکی سرطان سینه باشد.

کلیدواژه ها : سرطان سینه، فتو دینامیک درمانی، کورکومین ، نانو هیبرید کورکومین-LDH ، آپاپتوز

## فهرست مطالب

۳.....	فصل اول: ضرورت پژوهش.....
۴.....	فصل دوم: پیشینه پژوهش.....
۱۳.....	فصل سوم: اهداف پژوهش.....
۱۶.....	فصل چهارم: روش پژوهش.....
۲۷.....	فصل پنجم: یافته‌های پژوهش.....
۳۸.....	فصل ششم: بحث و نتیجه‌گیری.....
	فصل هفتم: فهرست
۴۳.....	منابع.....

# فصل اول

## ضرورت پژوهش

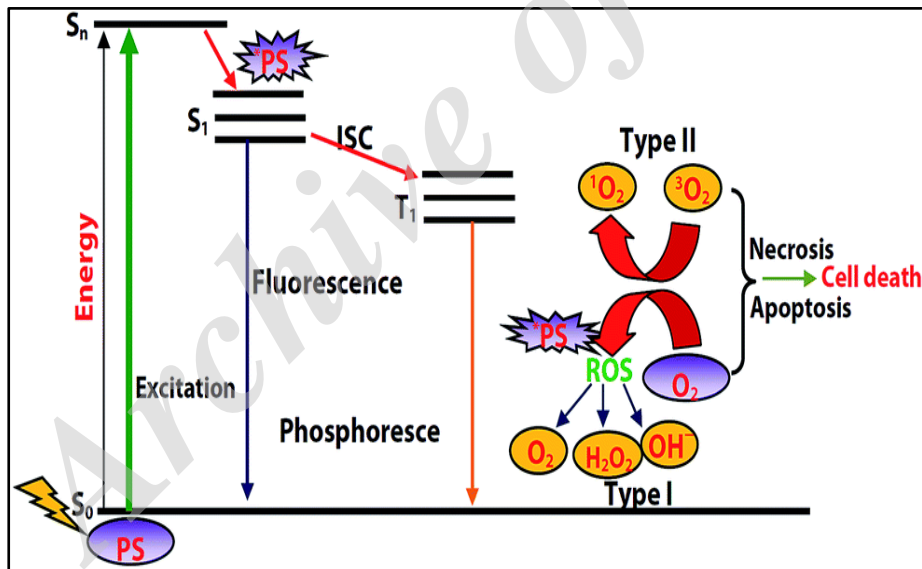
سرطان پرهزینه‌ترین بیماری جهان و مهم‌ترین عامل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و یا در حال توسعه به شمار می‌رود [۱]. بیماری‌های مزمن مانند سرطان، بیماری‌های قلبی و دیابت نزدیک به ۶۰ درصد از مرگ و میرها در جهان را شامل می‌شوند [۱]. بر اساس یک گزارش در ایالات متحده، خسارت‌های اقتصادی سرطان در سال ۲۰۰۸ نزدیک به ۸۹۵ میلیارد دلار بوده است که معادل با ۱/۵ درصد از مجموع تولید ناخالص داخلی کشورها در جهان است [۱]. همچنین بر اساس گزارش اداره سرطان وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی روزانه در کشور حدود ۲۱۹ نفر به سرطان مبتلا می‌شوند که با احتساب این رقم، سالانه ۸۰ هزار مورد سرطانی در کشور حادث می‌شود [۲]. علیرغم هزینه‌های بالای درمان‌های متداول سرطان (شیمی درمانی و پرتودرمانی) پاسخ به درمان ایده آل نبوده و به دلیل تحت تاثیر قرار گرفتن سلول‌های سالم و بروز عوارض درمان، نیاز به کاهش دوز درمان و به طبع آن کاهش پاسخ به درمان وجود دارد [۳،۴]. در میان انواع سرطان‌ها، سرطان سینه یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان زنان ایرانی محسوب می‌شود و سالانه ۷ هزار زن ایرانی به این سرطان مبتلا می‌شوند [۵] لذا با توجه به این که ۷۰ درصد این بیماران بالای ۵ سال عمر می‌کنند اکنون حدود ۷۰ هزار زن مبتلا به این بیماری در کشور داریم و این آمار کمی نیست! به ویژه آن‌که سن ابتلا به سرطان سینه در ایران ۵ سال پایین‌تر از سطح جهانی است. در زمان حاضر به طور متوسط سن ابتلا به این بیماری در ایران بین ۴۵ تا ۵۵ سال است در حالی که این سن در کشورهای غربی و اروپا بین ۵۰ تا ۶۰ سال است [۵]. بنابراین توجه به راهکارهای مفید در درمان این نوع سرطان ضروری به نظر می‌رسد.

یکی از روش‌های درمان سرطان، پرتودرمانی است. پرتودرمانی از طریق رها سازی موضعی پرتو یونیزان، به DNA سلول‌ها بصورت مستقیم، یا بصورت غیرمستقیم، از طریق تشکیل رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن، آسیب می‌زند [۳]. به منظور افزایش اثر پرتودرمانی و کاهش دوز تحویل شده به بیمار، آنرا با روش‌های دیگر درمانی (مانند هایپرترمی، شیمی درمانی و یا فتودینامیک درمانی) و حساس کننده‌های پرتویی به کار می‌برند [۶-۱۰].

فتو دینامیک درمانی (PDT) یا نورپویا درمانی یک روش تازه ظهور برای درمان انواعی از بیماری‌هاست که سلول‌های آسیب دیده (مثل سلول‌های سرطانی یا سلول‌های آلوده با میکروارگانیسم‌ها و ..) را می‌کشد و یا بافت‌های ناخواسته (برای مثال پلاک‌های آترواسکلروتیک در شریان‌ها) را از بین می‌برد. اصول فتودینامیک بر پایه تحریک یک ترکیب



حساسگر نوری غیر سمی بوسلیه نور غیر مضر برای تولید گونه های فعال اکسیژن می باشد که سلول ها را از بین می برد. یک حساسگر نوری مناسب دارای ویژگی های مانند : عدم سمیت، برداشت انتخابی و نگهداری توسط بافت تومور، تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن با جذب طول موجهایی که به راحتی بتوانند ازبافت عبورکنند، می باشد. یک حساسگر نوری مناسب قادر به واکنش با اکسیژن مولکولی اطراف توسط دو مسیر متمایز است. مسیر انتقال الکترون نوع اول شامل انتقال به یا انتقال از حساسگر نوری است که می تواند منجر به تولید انواع رادیکال های آزاد اکسیژن مثل : رادیکال های سوپراکسید، هیدروکسیل و هیدرو پراکسید شود. مسیر نوع دوم بر این اصل استوار است که مولکول اکسیژن در حالت پایه خود بصورت سه گانه می باشد و بنابراین اسپینی دارد که اجازه می دهد با حساسگر نوری سه گانه واکنش داده و دو ترکیب در حالت تک گانه تولید می کند. مولکول اکسیژن در حالت تک گانه ( $^1O_2$ ) عامل اکسید کننده بسیار قوی است [۱۱]. در شکل ۱ دیگراف ژابلونسکی و مسیر های نوع اول و دوم نشان داده شده است.



شکل ۱: دیگراف ژابلونسکی و فرایند فتودینامیک تراپی

در ابتدا با جذب یک فوتون در حالت پایه حساسگر نوری به حالت تک گانه با طول عمر کوتاه برانگیخته می شود. این حالت ناپایدار است و می تواند انرژی خود را به سه صورت فلورسانس، گرما و یا ایجاد حالت سه گانه با طول عمر بالا، از دست بدهد. حساسگر نوری در حالت سه گانه بصورت کارامدی بوسلیه انتقال انرژی به اکسیژن مولکولی (حالت سه گانه) و ایجاد حالت تک گانه اکسیژن (نوع ۲) و یا با انتقال الکترون به مولکول های زیستی و ایجاد گونه های فعال اکسیژن (نوع ۱)، خاموش می شود.

## انواع مکانیسم های تخریب تومور در فرایند فتودینامیک درمانی

### • مرگ سلول توموری بصورت مستقیم

اکسیداسیون لیپیدها، اسیدهای آمینه و پروتئین ها بوسیله  $^1O_2$  آسیب نوری غیر قابل بازگشتی به ارگانل های سلولی مثل میتوکندی، لیزوزم، دستگاه گلژی، شبکه آندوپلاسمی و غشای سلولی وارد می کند. جایگاه حساسگر نوری در درون سلول به ویژگی های ساختاری مثل بار یونی خالص که از رنج +4 تا -4 است، درجه عدم تقارن و درجه هیدروفوبیسیته بستگی دارد. مولکول های حساسگر نوری هیدروفوب با دو بار منفی یا کمتر به مقدار بالاتری جذب می شوند و می توانند به راحتی از غشای پلاسمایی انتشار پیدا کنند. حساسگر های که هیدروفوبیسیته کمتری دارند برای عبور از غشای پلاسمایی قطبی ترند و بنابراین بوسیله فرایند اندوسیتوز جذب می شوند. از آنجایی که اغلب حساسگر های نوری در هسته جمع نمی شوند، فرایند PDT شانس کمی برای ایجاد موتاسیون دارد. مرگ سلولی ایجاد شده از طیف فرایند های آپاپتوز، نکروز و یا اتوفازی اتفاق می افتد و وابسته با فاز چرخه سلولی نمی باشد. مرگ سلولی نکروزی بصورت تصادفی اتفاق می افتد و معمولا در زمانی ایجاد می شود که دوز بالایی از حساسگر یا نور مورد استفاده قرار گیرد. این نوع مرگ با ویژگی هایی از قبیل نشت اجزاء سلول از غشاء پلاسمایی آسیب دیده به بیرون و واکنش میزبان ( التهاب ) مشخص می شود. مرگ سلولی آپاپتوز ( مرگ برنامه ریزی شده) با چروکیدگی شدن سلول، جوانه زدن غشاء، شکست DNA کروموزومی و تشکیل اجسام آپاپتوزی که بوسیله فاگوسیت ها خورده شده و مانع از ایجاد پاسخ التهابی میگردند، مشخص می شود. نوع مرگ سلولی به جایگاه حساسگر نوری در سلول بستگی دارد، بطوری که وجود حساسگر در در غشای سلول یا میتوکندری به آپاپتوز منجر شده و وجود آن در غشای پلاسمایی یا لیزوزوم می تواند باعث تاخیر یا بستن فرایند آپاپتوز می گردد. در این حالت مرگ سلول از طریق نکروز یا فرایند اتوفازی اتفاق می افتد [۱۲].

### • آسیب رگی

رشد تومور های سالید به ظرفیت آنها برای القای رشد رگ های خونی (رگ زایی) برای تغذیه آنها و فراهم نمودن اکسیژن مورد نیاز بستگی دارد. اصولا به دلیل وجود مرزهای غیر کامل و ضعیف، این رگ های غیر طبیعی می توانند به عنوان یک

جایگاه اضافی برای تجمع حساسگرهای نوری در محل تومور بکار برده شوند. حساسگر نوری می تواند به مولکول های حامل مثل آلبومین، HDL، LDL و یا سلول های اندوتلیال متصل گردند. فعال شدن حساسگر نوری در جریان خون درون سلول های اندوتلیال و یا در اتصال به دیواره رگ ها منجر به آسیب سلول های اندوتلیال میگردد که با ویژگی هایی مثل از دست رفتن ارتباط محکم بین سلول ها و نمایان شدن غشا پایه رگ ها مشخص می گردد. این تغییرات اولیه در لومن رگ ها منجر به تشکیل جایگاه های ترومبوژنیک و شروع آبخاری از فرایند های مثل تجمع پلاکت ها، رها شدن مولکول های وازواکتیو، چسبندگی لوکوسیت ها، افزایش نفوذپذیری رگ ها و انقباض رگی می گردد. همه این اثرات به نابودی جزئی و یا کامل رگ ها، سکون جریان خون و یا خونریزی بافتی مداوم منجر شده و در نهایت هیپوکسی تومور بعد از فرایند PDT و کنترل بلند مدت تومور ایجاد می گردد [۱۲].

#### • پاسخ ایمنی و التهابی

علاوه بر اهمیت فرایندهای از بین بردن مستقیم تومور و آسیب رگی، پاسخ ایمنی و التهابی میزبان نیز نقش بسیار مهمی در کنترل تومور و یا از بین بردن آن ایفا می کند. از ویژگی های مهم فرایند التهابی، رها شدن میانجیگرهای التهابی در ناحیه تحت درمان می باشد. این میانجی ها شامل سیستم کمپلمان، پروتئینازها، پراکسیدازها، سایتوکاینها، فاکتورهای رشد و بقیه تنظیم کننده های سیستم ایمنی می باشند. این فرایند منجر به تحریک گلبول های سفید خون مثل نوتروفیل ها و ماکروفاژها برای رفتن به ناحیه درمان می گردد. ماکروفاژها سلول های سرطانی آسیب دیده را با فرایند فاگوسیتوز حذف می کند. بنابراین فرایند PDT سیستم ایمنی را تحریک می کند در صورتی که روش های جراحی و شیمی درمانی سیستم ایمنی را سرکوب می کند [۱۲].

برای انجام فتودینامیک درمانی مطمئن و موثر لازم است حساسگر نوری در غلظت های درمانی به سلول مورد نظر ( سلول تومور) فرستاده شود و همچنین به مقدار بسیار کمی توسط سلولهای غیر هدف جذب گردد و در این صورت اثرات جانبی ناخواسته در بافت های سالم به حداقل می رسد. دو مانع اساسی برای رسیدن به این هدف وجود دارد: (۱) اغلب حساسگر های نوری سیستم های کونژوگه  $\pi$  دارند که آنها را بسیار مسطح می کند همچنین این مولکول ها اغلب هیدروفوب هستند و

بنابراین در محیط های آبی تجمعاتی را ایجاد می نمایند. این تجمع ها، کارایی فتودینامیک درمانی و تبدیل آنها از حالت مونومر به فتواکتیو را کاهش می دهد. (۲) بطورکلی حساسگر های نوری بصورت اختصاصی به سلول های توموری انتقال و اتصال پیدا نمی کنند بنابراین در فرایند PDT، هدفمند کردن داروها به سمت سلول های توموری مطرح می باشد. تلاش های قابل توجهی برای حل این مشکلات و طراحی سیستم های حاملی که بتواند حساسگر های نوری را بدون تغییر شکل، از بین بردن فعالیت آنها و بدون ایجاد اثرات مضر حمل کند، انجام گرفته است. بسیاری از این سیستم ها ی حامل به شکل نانو مواد وجود دارند [۱۳].

زردچوبه یا زردچوبه ادویه ای است که از گیاه *Curcuma longa* تهیه می شود. ماده موثر زردچوبه کورکومین (Curcumin) نام دارد که خواص ضد التهابی دارد. چون کورکومین ماده ای است که در زردچوبه موجود است بخاطر همین از زمانهای قدیم در پزشکی از آن استفاده میشده است و اکنون نیز رواج دارد [۱۴]. مطالعات مختلف محققان نشان می دهد ماده کورکومین می تواند به کوچک شدن سلولهای سرطان سینه کمک کند. طبق پژوهشهای جدید این ماده باعث مراقبت از سلولهای سالم بخاطر ضرر نرساندن به آنها است [۱۵].

در حال حاضر نتایج بعضی پژوهشها حاکی از آن است که مصرف کورکومین به پیشگیری و یا درمان سرطان کمک می کند. این ماده سبب کاهش ورم و التهاب می شود، از آنجا که التهاب در ایجاد سرطان نقش دارد، از زردچوبه در تحقیقات مربوط به درمان سرطان استفاده شده است. نتایج پژوهشهای انجام شده در آزمایشگاه و بر روی حیوانات حاکی از آن است که مصرف کورکومین از سرطان پیشگیری کرده و از سرعت انتشار سرطان می کاهد. علاوه بر آن کورکومین تاثیر شیمی درمانی را نیز افزایش می دهد و سلول های سالم را از صدمه در درمان با اشعه محفوظ می دارد [۱۵]. از این ماده در بررسی بسیاری از انواع سرطانها استفاده شده است.

افزایش رو به رشد نرخ سرطانها در سالهای اخیر توجه بسیاری از محققین را به یافتن راهکارهایی در راستای تولید دارو های ضد سرطان معطوف کرده است و در این میان ترکیباتی با منشأ گیاهی به علت داشتن آثار جانبی کمتر از اهمیت ویژه ای برخوردار است [۱۶]. کورکومین پلی فنلی آب گریز مستخرج از گیاه زردچوبه است. تاریخچه درمانی این گیاه در طب سنتی طیف وسیعی از خواص دارویی را برای کورکومین پیشنهاد می کند. نقش آنتی اکسیدانی، ضدالتهاب و

ضد سرطانی کورکومین طی سالهای اخیر به اثبات رسیده است [۱۷]. نا محلول بودن، جذب و توزیع بافتی پایین، فعالیت کم، متابولیسم سریع و غیر فعال بودن محصولات حاصل از آن در بدن، استفاده از کورکومین را به عنوان یک دارو با محدودیت رو به رو کرده است [۱۸].

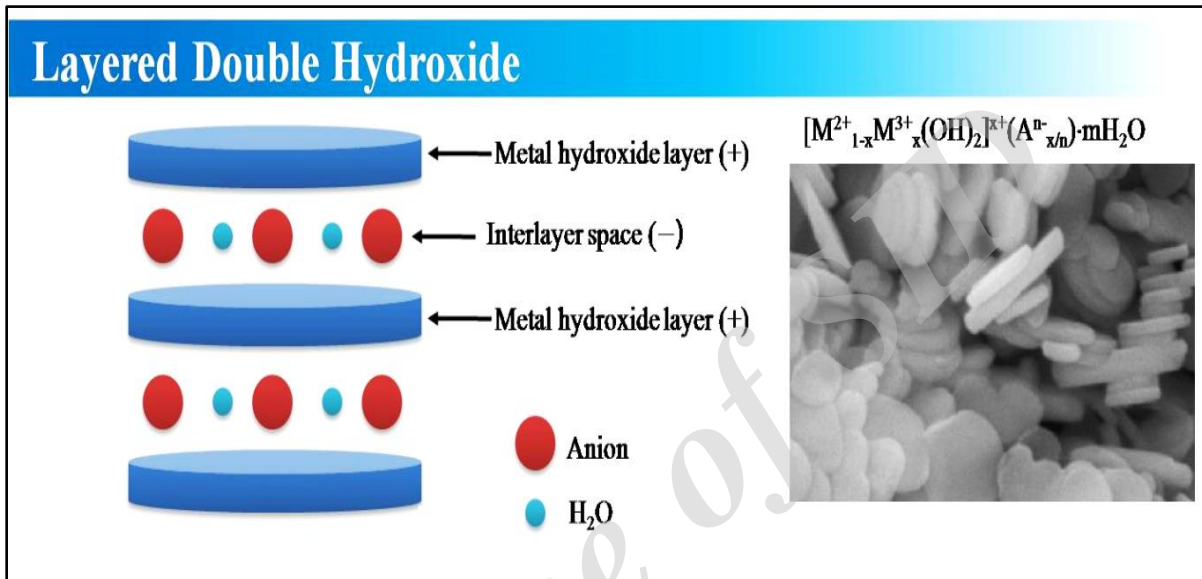
نکته اصلی در این پژوهش ها چگونگی رساندن کورکومین به سلولهای سرطانی بوده است چراکه ماده کورکومین در محیط آبی نامحلول است. عدم حلالیت این ترکیب باعث کاهش دسترسی زیستی این ماده شده است؛ اگرچه تا کنون حامل‌های مختلف برای حمل کورکومین ارائه شده است [۱۹] ولی گزارشات اندکی در مورد کارایی بالای آنها در حل این مشکل ارائه شده است.

نانوکامپوزیت های آل- معدنی یکی از زمینه های امیدوارکننده تحقیقاتی در شیمی مواد است. اخیراً ترکیبات معدنی لایه مضاعف هیدروکسیدی (LDH)، به عنوان موضوعی مهم در حوزه نانوهیبریدهای معدنی-آلی، شیمیدانها را مجذوب خواص بی نظیرش کرده است. هیدروکسیدهای لایه مضاعف، ساختاری معدنی با لایه های درونی با بار مثبت هستند که می توان ترکیبات مختلفی را در درون لایه های ایجاد شده قرار داده و در انتقال هدفمند از آنها بهره برد. چون بیشتر بیو مولکولها دارای بار منفی هستند، می توانند در فواصل این ترکیبات هیبریدی قرار بگیرند و در اهداف مختلفی نظیر تهیه بیوسنسور-آزمیهای مصنوعی-تثبیت کننده مولکول در سطح و غیره استفاده شوند. انواعی از داروها نیز میتوانند با هیدروکسیدهای لایه مضاعف به منظور رهایش کنترل شده، حمل شوند [۲۰].

طیف وسیعی از هیدروکسیدهای لایه مضاعف با تغییر کاتیونهای ساختاری و آنیونهای میانی به دست می آیند که از میان آنها، برخی زیست سازگار خواهند بود. به دلیل خصلت میان لایه سازی در هیدروکسیدهای لایه مضاعف، بیومولکولها و ترکیبات آنیونی سودمندی مثل DNA، آمینواسید، حشره کشها، تنظیم کننده های رشد گیاهان و داروها در میان آنها قرار گرفته و مطالعه شده اند. مخصوصاً به دلیل ویژگیهای برجسته ای چون افزایش خصلت انحلال پذیری، افزایش پایداری دمایی و سرعت رهاسازی کنترل شده، توجه زیادی به هیبرید هیدروکسیدهای لایه مضاعف - دارو شده است [۲۰].

علاوه براین، هیبریداسیون دارو یا بیومولکول با هیدروکسیدهای لایه مضاعف موجب افزایش راندمان قابل توجهی در انتقال و پایداری آنها می شود. بنابراین هیبریدهای هیدروکسیدهای لایه مضاعف می توانند به عنوان ذخیره کننده و حامل مفیدی

برای ژنها، داروها و سایر مولکولها باشند. هیدروکسیدهای لایه مضاعف به بسیاری از بیماریها اجازه ردیابی، تشخیص و معالجه در کمترین روشهای تهاجمی را می دهد [۲۱] و بنابراین این ترکیبات می تواند امیدهای زیادی را در ارتقاء سلامتی و زندگی طولانی مدت، ایجاد کند.



شکل ۲: ساختار شماتیک و میکروسکوپی LDH

# فصل دوم

## پیشینه پژوهش

شواهد بسیار محکمی اثر آنتی توموری کورکومین و عملکرد آن بر روی سلولهای توموری را تایید کرده اند [۲۲]. مطالعات زیادی نشان داده اند که کورکومین سرطان را در *In vivo* و *In vitro* می تواند سه مرحله پیشرفت، رگزایی (آنژیوژنز) و رشد تومور مهار کند [۲۳]. کورکومین می تواند اثر مهار سرطانی را بر روی رده های سلولی سینه، تخمدان، کولون، کبد، لوسمی، پانکراس و پروستات داشته باشد. اثر کورکومین بر ایجاد آپوپتوز بر رده های مختلف سلول توموری ثابت شده است [۲۴، ۲۵]. در این میان مطالعات مختلف حاکی از این موضوع است که کورکومین به دلیل نامحلول بودن در محلول آبی در بسیاری از موارد نمی تواند توان بالای خود در مهار رشد سلول های سرطانی را نشان دهد. علاوه بر این، مطالعات گذشته نشان دادند که زمان احتباس کورکومین در نتیجه دفع سریع آن در بدن کوتاه است بنابراین اثرات درمانی کورکومین در نتیجه احتباس کوتاه آن در گردش خون محدود می شود [۲۶]. روشهای مختلفی برای افزایش کارایی و اثربخشی کورکومین با ترکیب کردن کورکومین در یک حامل مناسب صورت گرفته است. برای مثال مطالعات اخیر استفاده از نانو ذراتی مثل PGLA و یا نانو ذرات دندرومیک و یا استفاده از ذرات میسلی را موثر می داند [۲۷، ۲۸]. در مطالعات امروزی بررسی های بسیاری برای استفاده از هیدروکسیدهای لایه مضاعف به عنوان یک حامل مناسب برای انواعی از داروها انجام گرفته است [۲۹] اما تا کنون گزارش های زیادی مبنی بر استفاده از کورکومین در فتودینامیک درمانی سلول های سرطانی انسانی و حیوانی داده نشده است و تنها چند مورد اندک در رابطه با استفاده از کورکومین به عنوان حساسگر نوری وجود دارد [۳۰]. علاوه بر آن تا کنون گزارشی مبنی بر استفاده از ترکیب هیبریدی کورکومین- هیدروکسیدهای لایه مضاعف بر روی رده سلول های سرطان سینه در فتودینامیک درمانی داده نشده است. در مطالعه حاضر برای اولین بار تاثیر نانو ذرات هیبریدی هیدروکسیدهای لایه مضاعف بر کارایی فتودینامیکی کورکومین در رده سلول های سرطان سینه مطالعه می شود. همچنین در این طرح اثر فتودینامیکی نانوذرات هیبریدی هیدروکسیدهای لایه مضاعف-کورکومین در مقایسه با کورکومین در رده سلولی MDA-MB-231 سرطان سینه بررسی می گردد.



# فصل سوم

## اهداف پژوهش

## اهداف و فرضیات

### هدف اصلی:

بررسی اثرات ضد توموری فتودینامیکی نانوذرات هیبریدی هیدروکسیدهای لایه مضاعف (LDH)-کورکومین در مقایسه با کورکومین در رده سلولی MDA-MB-231 سرطان سینه

### اهداف ویژه طرح:

۱. سنتز نانوذرات هیبریدی کورکومین - LDH
۲. بررسی خصوصیات فیزیکیوشیمیایی نانوذرات کورکومین - LDH
۳. تعیین زمان مناسب انکوباسیون با نانوذره کورکومین - LDH و کورکومین (گروه های مورد مطالعه: ۱- گروه کنترل ( فاقد دارو و نور)، ۲- گروه دارای کورکومین و بدون تابش، ۳- گروه دارای نانوذره هیبریدی کورکومین-LDH و بدون تابش ، ۴- گروه کنترل ( فاقد دارو همراه با تابش)، ۵- گروه دارای کورکومین همراه با تابش، ۶- گروه دارای نانوذره هیبریدی کورکومین-LDH همراه با تابش)
۴. تعیین زمان تابش موثر LED بر ایجاد مرگ سلولی ناشی از عملکرد فتودینامیک نانوذره کورکومین - LDH و کورکومین (گروه های مورد مطالعه: ۱- گروه کنترل ( فاقد دارو و نور)، ۲- گروه دارای کورکومین و بدون تابش، ۳- گروه دارای نانوذره هیبریدی کورکومین-LDH و بدون تابش ، ۴- گروه کنترل ( فاقد دارو همراه با تابش)، ۵- گروه دارای کورکومین همراه با تابش، ۶- گروه دارای نانوذره هیبریدی کورکومین-LDH همراه با تابش)
۵. بررسی اثر غلظت های مختلف نانوذره کورکومین - LDH و کورکومین ( محدود غلظت : ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  ) بر منحنی بقای سلولی به روش MTT در فتودینامیک درمانی (گروه های مورد مطالعه : ۱-

- گروه دارای کورکومین و بدون تابش، ۲- گروه دارای نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و بدون تابش، ۳-  
گروه دارای کورکومین همراه با تابش، ۴- گروه دارای نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH همراه با تابش)  
۶. تست کلونی زائی در گروه دارای نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH همراه با تابش در غظت  $IC_{50}$  از  
نانوذره هیبریدی  
۷. رنگ آمیزی دوگانه اتیدیوم برماید/آکریدین اورنج و بررسی با میکروسکوپ فلورسانس در گروه دارای نانو ذره  
هیبریدی کورکومین-LDH همراه با تابش در غظت  $IC_{50}$  از نانوذره هیبریدی  
۸. تست فلوسایتومتری جهت تعیین درصد سلولهای آپوپتوتیک و نکروتیک در گروه دارای نانو ذره هیبریدی  
کورکومین-LDH همراه با تابش در غظت  $IC_{50}$  از نانوذره هیبریدی

### سوالات یا فرضیات پژوهشی مقطع اول طرح (Hypothesis):

۱. آیا زمان انکوباسیون های متفاوت با نانوذره کورکومین - LDH و کورکومین بر اثرات فتودینامیک درمانی کورکومین یا نانوذره کورکومین - LDH اثری دارد؟
۲. آیا زمان تابش های متفاوت LED بر اثرات فتودینامیک درمانی کورکومین یا نانوذره کورکومین - LDH اثری دارد؟
۳. آیا فتودینامیک درمانی با غلظت های مختلف ( جهت دست یابی به غلظت موثرتر) نانوذرات هیبریدی کورکومین - LDH بر بقای سلول های سرطانی سینه در مقایسه با گروه کورکومین موثرتر است؟
۴. آیا فتودینامیک درمانی با نانوذرات هیبریدی کورکومین - LDH بر کلونی زائی سلول های سرطانی در موثر است؟
۵. آیا فتودینامیک درمانی با نانوذرات هیبریدی کورکومین - LDH بر وقوع آپوپتوز سلول های سرطانی در موثر است؟
۶. آیا فتودینامیک درمانی با نانوذرات هیبریدی کورکومین - LDH بر فراوانی آپوپتوز سلول های سرطانی در موثر است؟

# فصل چهارم

## روش پژوهش

## نوع مطالعه:

نوع این مطالعه آزمایشگاهی سلولی و در محیط *in vitro* می باشد.

## مکان و زمان مطالعه:

این مطالعه در سال ۱۳۹۵-۱۳۹۶ در گروه لیزر پزشکی جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران ، اجرا و در حال انجام است.

## جامعه مورد بررسی ، روش نمونه گیری و تعداد نمونه

مطالعه سلولی و نوع سلول : سلو های سرطانی سینه انسانی رده MDA-MB-231 .

## روش اجرای طرح در مقطع اول:

### (۱) تهیه رده سلولی:

رده سلولی MDA-MB-231 سلول سرطان سینه از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه می شود.

### (۲) کشت رده سلولی:

به منظور افزایش جمعیت سلولها برای آزمایش، کشت صورت می گیرد. کشت در محیط DMEM + FBS 10% یا RPMI حاوی آنتی بیوتیک صورت خواهد گرفت.

### (۳) سنتز نانو ذره LDH و سنتز نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH

۱۰۰ میلی لیتر محلول آبی که حاوی سود (۰/۲ مول) می باشد را بصورت قطره قطره به ۱۶۰ میلی لیتر محلولی که حاوی منیزیم نیترات ۰/۰۰۶ مولار و آلومینیوم نیترات ۰/۰۰۲ مولار می باشد تحت اتمسفر نیتروژن و در حال بهم زدن با استفاده از یک همزن مغناطیسی اضافه می کنیم تا pH نهایی محلول به ۱۰

برسد. دوغاب حاصل شده را به درون اتوکلاو تفلون لاین منتقل نموده و برای کریستالینه کردن هیدروترمال تا دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت به مدت ۲ ساعت حرارت می دهیم. پس از سرد شدن دوغاب را فیلترنموده و تا زمانی که pH فاز پایین فیلتر برابر با ۷ شود صافی را با آب تازه تهیه شده و عاری از دی اکسیدکربن شستشو می دهیم و در نهایت در خلاء در دمای اتاق به مدت ۱۲ ساعت خشک می کنیم. برای تهیه نانوذرات حاوی کورکومین بطور مشابهی عمل می شود با این تفاوت که محلول سود حاوی ۰/۰۰۰۳ مولار کورکومین می باشد که بصورت قطره قطره به محلول حاوی مخلوط نیترات منیزیم و آلومینیوم اضافه می گردد.

۴) بررسی خصوصیات ساختاری نانو ذره هیبریدی با میکروسکوپ الکترونی TEM و SEM

۵) تعیین خصوصیات ساختاری نانو ذرات هیبریدی LDH و بررسی اینترکاله شده با استفاده از روش XRD

۶) بررسی خصوصیات طیفی (مطالعات ساختاری) با روش های مختلف اسپکتروسکوپی مانند UV/Vis، فلورسانس

گروه های مورد مطالعه: در این مطالعه هشت گروه مورد مطالعه وجود دارد: ۱- گروه کنترل ( فاقد دارو و نور)، ۲- گروه دارای کورکومین و بدون تابش، ۳- گروه دارای نانو ذره و بدون تابش، ۴- گروه دارای نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و بدون تابش ، ۵- گروه کنترل ( فاقد دارو همراه با تابش)، ۶- گروه دارای کورکومین همراه با تابش، ۷- گروه دارای نانو ذره همراه با تابش، ۸- گروه دارای نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH همراه با تابش

بر روی هشت گروه مورد مطالعه آزمایشات زیر که در بخش های جداگانه توضیح داده شده است، انجام پذیرفت.

### ۷) بررسی زمان مناسب انکوباسیون با نانوذره کورکومین-LDH و کورکومین

در این تست اثر زمان های مختلف انکوباسیون با نانوذره کورکومین-LDH و کورکومین بر روی مرگ و میر سلول های سرطانی رده MDA-MB-231 سلول سرطانی سینه بررسی می شود. بدین منظور سلول ها در زمان های مختلف در معرض غلظت های معینی از نانوذره کورکومین-LDH انکوبه شده و سپس مرگ و میر سلول ها در مقایسه با گروه کورکومین بررسی می شود. این مطالعه ۵ بار تکرار می شود.

### ۸) بررسی زمان تابش موثر LED بر عملکرد نانوذره کورکومین-LDH و کورکومین

در این تست اثر زمان های مختلف تابش با LED بر عملکرد نانوذره کورکومین-LDH کورکومین با مطالعه میزان مرگ و میر سلول های سرطانی رده MDA-MB-231 سلول سرطانی سینه بررسی می شود. بدین منظور سلول ها در زمان های مختلف در معرض دوز معینی از LED قرار گرفته و سپس مرگ و میر سلول ها در مقایسه با گروه کورکومین بررسی می شود. این مطالعه ۵ بار تکرار می شود. در انتها بهترین زمان تابش که حدود ۵۰ درصد مرگ و میر را حاصل می نماید برای آزمایشات بعدی در نظر گرفته می شود.

### ۹) بررسی اثر غلظت های مختلف نانوذره کورکومین-LDH و کورکومین بر سلول های

#### سرطانی رده MDA-231

در این تست اثر غلظت های مختلف نانوذره کورکومین-LDH و کورکومین با مطالعه میزان مرگ و میر سلول های سرطانی رده MDA-MB-231 سلول سرطانی سینه بررسی می شود. بدین منظور سلول ها در زمان معینی در معرض دوز های مختلفی از نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین قرار گرفته و سپس مرگ و میر سلول ها در مقایسه با گروه کورکومین بررسی می شود. این مطالعه ۵ بار تکرار می



شود (از میانگین پنج ارزیابی استفاده می شود). در انتها بهترین غلظت که حدود ۵۰ درصد مرگ و میر را حاصل می نماید برای آزمایش آپاپتوز و تست کلونی زایی در نظر گرفته می شود.

### ۱۰) روش های ارزیابی فتودینامیک درمانی بر رده سلول های سرطانی رده MDA-231

برای بررسی فتو دینامیک تراپی گروه های مختلف مورد آزمایش با اطلاعات بدست آمده از آزمایش های فوق مورد بررسی قرار می گیرند و در نهایت به دو روش مطالعه انجام می گیرد:

#### الف) تست MTT

برای سنجش توان زیستی سلول ها از تست MTT که یک تست رنگ سنجی به شمار می آید استفاده خواهد شد. در این تست از نمک تترازولیوم استفاده می شود. اساس این تست بر جذب این نمک توسط سلول و ورود آن به زنجیره تنفسی سلول در میتوکندری ها می باشد. این مطالعه ۵ بار تکرار می شود (از میانگین پنج ارزیابی استفاده می شود).

#### ب) تعیین آپاپتوز

به منظور تعیین آپاپتوز القایی رنگ آمیزی فلورسانت (میکروسکوپ فلورسانس) و فلوسیتومتری با استفاده از کیت Annexin V و PI انجام خواهد شد. با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس وقوع آپاپتوز مشخص می گردد. با استفاده از روش فلوسایتومتری درصد سلولهای آپاپتوتیک و نکروتیک مشخص خواهد شد.

۱۱) ارزیابی کلونی زائی سلول های سرطانی تحت اثر غلظت های مختلف از نانو ذره هیبریدی کورکومین

### ۱۲) تجزیه و تحلیل آماری داده ها

با استفاده از نرم افزار excel 2015 انجام خواهد شد. به منظور تعیین تفاوت معنی داری در مورد متغیرهای کمی و تبعیت از توزیع نرمال از [Student's t-test](#) استفاده خواهد شد سطح معنی داری در این مطالعه در حد ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

Archive of SID

## فصل پنجم

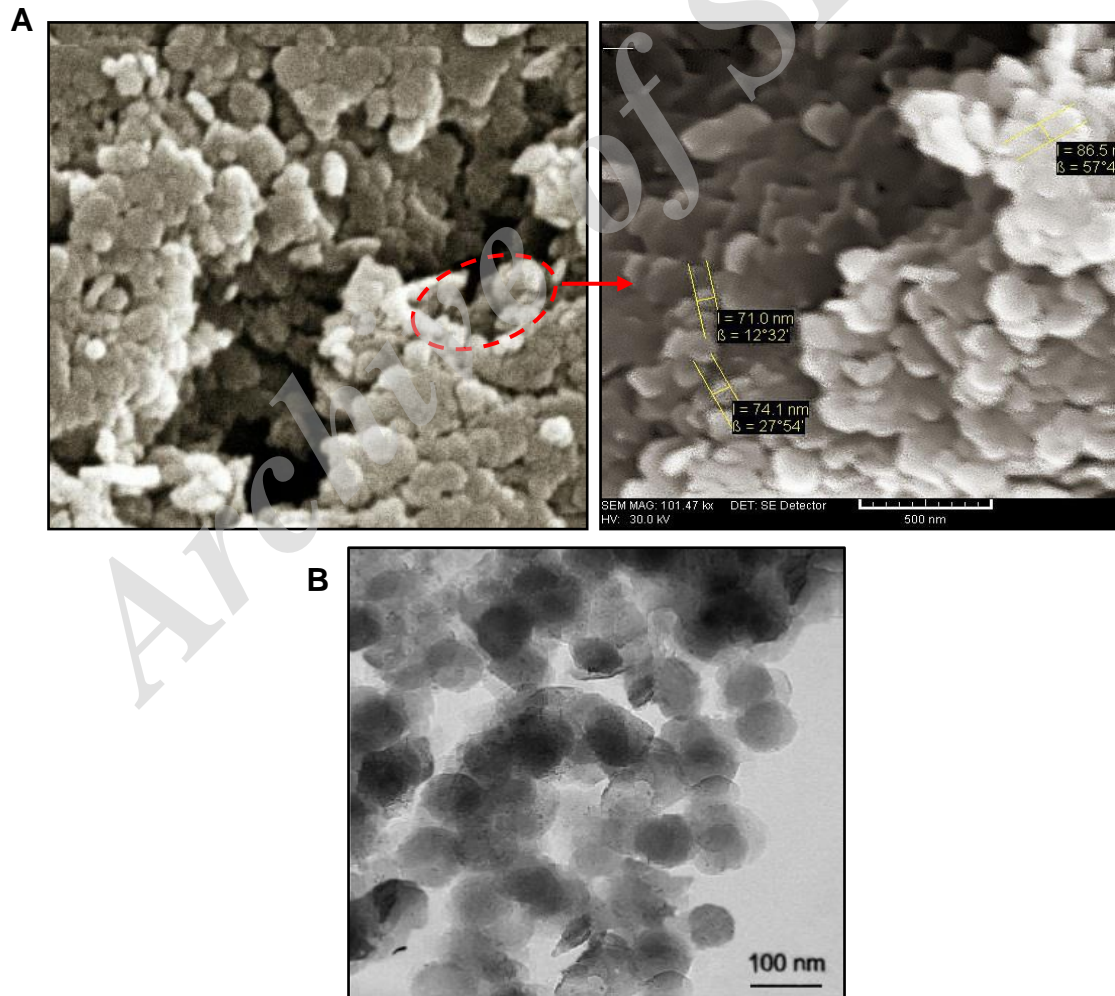
# یافته‌های پژوهش

## یافته‌ها ( نتایج )

### (۱) سنتز نانو ذره LDH و سنتز نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و بررسی خصوصیات

#### ساختاری نانو ذره هیبریدی با میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM

پس از سنتز نمونه نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH، نمونه مورد نظر با میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM بررسی شد. همانطور که در شکل‌های زیر ملاحظه می‌گردد نمونه در اندازه نانو می‌باشد و اندازه ذرات بین ۷۰ تا ۹۰ نانومتر تخمین زده شد. همچنین تصویر میکروسکوپی TEM اشکالی صفحه‌ای یکدست را نشان می‌دهد که با شکل‌های بدست آمده از مطالعات قبلی مطابقت دارد.

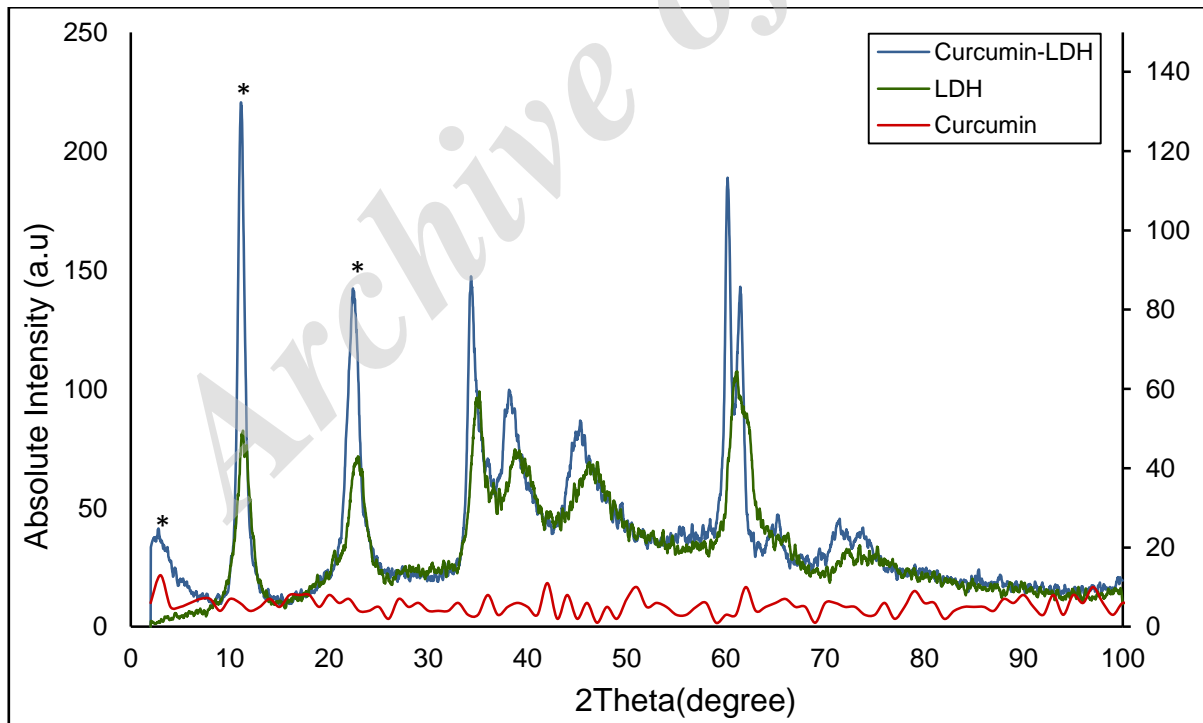


شکل ۱: تصویر میکروسکوپی نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH : (A) تصویر SEM و (B) تصویر TEM

تعیین خصوصیات ساختاری نانوذرات هیبریدی LDH و بررسی اینترکاله شده با استفاده از

### روش XRD

برای بررسی اینترکاله شده کورکومین به درون ذرات LDH مطالعه XRD انجام شد. همانطور که در شکل زیر مشاهده می کنید طیف بدست آمده از نمونه LDH تنها حاوی یک سری از پیک ها در زوایای کم ( با علامت \* نشان داده شده است) می باشد که نشان دهنده ساختار لایه ای LDH است. در این نواحی در نمونه نانو ذره هیبریدی هیبریدی کورکومین-LDH، تغییرات افزایشی و شیفت به سمت چپ مشاهده شد که مرتبط با اینترکاله شدن ذرات کورکومین و تشکیل یه ساختار هیبریدی است.



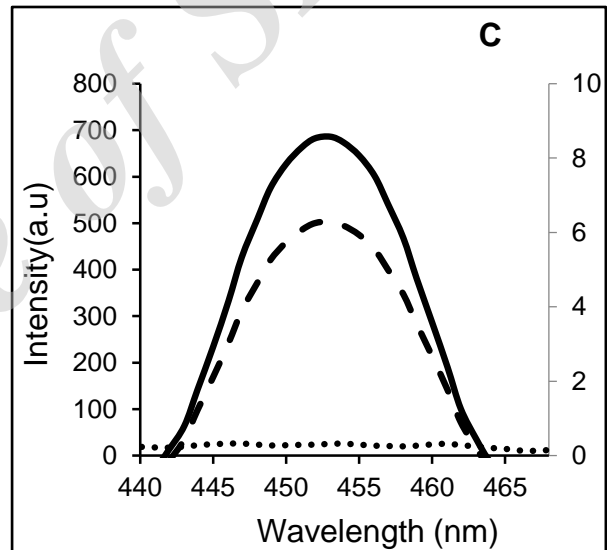
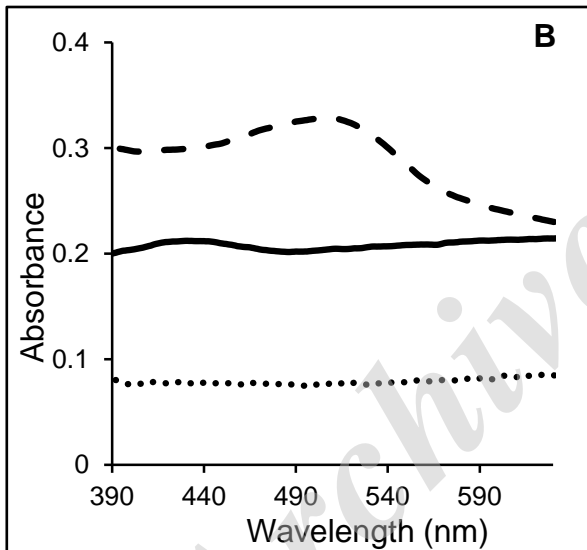
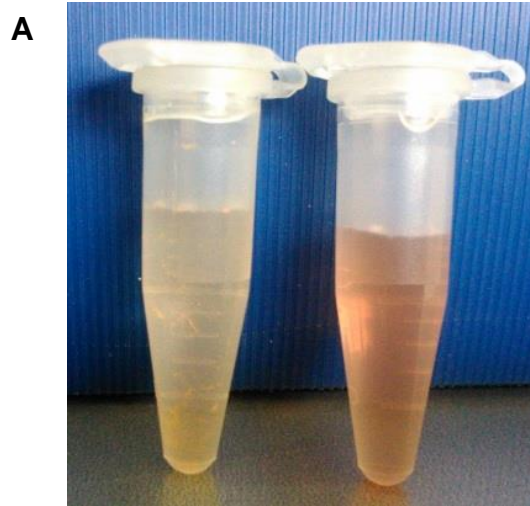
شکل ۲: الگوی XRD نمونه نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH، کورکومین و LDH

بررسی خصوصیات طیفی (مطالعات ساختاری) با روش های مختلف اسپکتروسکوپی مانند

## UV/Vis و فلورسانس

پس از بررسی ساختار، مطالعات دقیق تر برای بررسی ساختار و خواص فیزیکی شیمیایی انجام شد. همانطور که در شکل زیر مشاهده میکنید تصویر A محلول کورکومین تنها (محلول زرد رنگ) به همراه ذرات معلق در محلول را نشان می دهد در حالیکه ویال سمت راست حاوی محلول نانو ذره هیبریدی هیبریدی کورکومین-LDH نرنجی رنگ ، شفاف و فاقد هر گونه ذرات معلق است. بنابراین ذرات کورکومین در درون ساختار LDH نسبت به کورکومین تنها بهتر حل شده اند.

مطالعات طیف سنجی UV/Vis نشان داد که طیف جذبی نانو ذره هیبریدی هیبریدی کورکومین-LDH نسبت به کورکومین تنها (۴۳۰ نانومتر) و به حدود ۵۱۲ نانومتر افزایش یافته است (B). مطالعات طیف سنجی فلورسانس نشان داد که طیف نشری نانو ذره هیبریدی هیبریدی کورکومین-LDH نسبت به کورکومین تنها کاهش یافته (C) که خود دلیلی بر خاموشی کروموفور های کورکومین و قرار گرفتن آن در درون ساختار لایه ای میباشد.

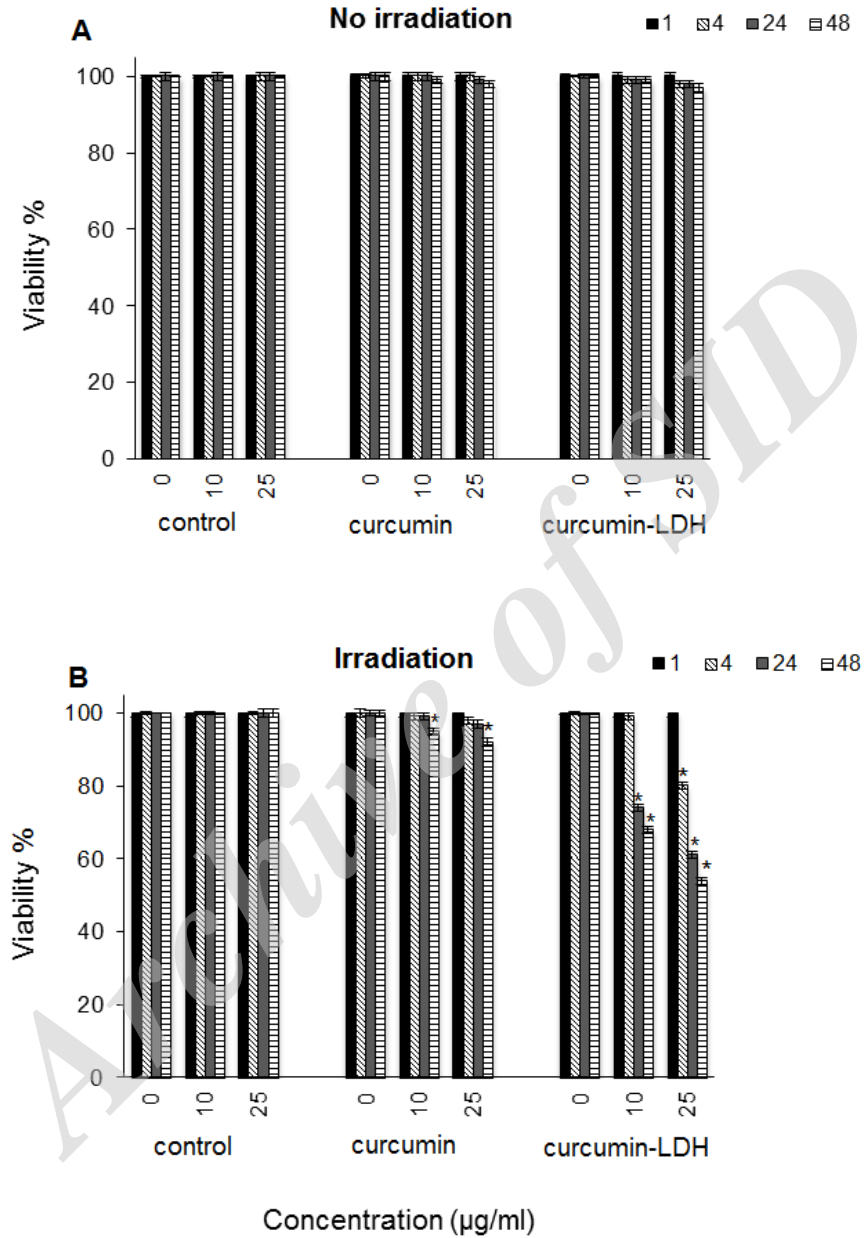


شکل ۳: مقایسه حلالیت نانوذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین . طیف جذبی (B) و نشری (C) نانوذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین در محلول آبی

## بررسی زمان مناسب انکوباسیون با نانوذره کورکومین-LDH و کورکومین

برای بدست آوردن زمان مناسب جهت تیمار سلول ها با نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH ، سلول ها با غلظت های مشخصی از نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین ( ۱۰،۰ و ۲۵  $\mu\text{g/ml}$  ) در زمان های ۱ ، ۴ ، ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و پس از زمان مورد نظر و در نظر گرفتن گروه در معرض تابش ونگه داشته در تاریکی، بقا سلول ها در حضور نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین تنها بررسی شد. نتایج در شکل زیر نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می کنید تفاوت معنا داری در بقا سلول ها در گروه تاریکی بین نمونه های تیمار شده با نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین تنها مشاهده نمی شود. نتایج بقا سلول های در معرض تابش نشان داد که زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون با نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین نسبت به زمان های دیگر درصد بهتری از مرگ و میر را ایجاد می کند. در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH سلول ها پس از تابش با نور آبی ( $34 \text{ mW cm}^{-2}$ ) کاهش بقا به میزان ۶۱٪ را نشان دادند. در زمان ۴۸ ساعت میزان کاهش بقا در نمونه نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH در غلظت ۲۵ ماکروگرم بر میلی لیتر و در معرض تابش حدود ۵۴٪ می باشد. بنابراین زمان ۲۴ ساعت به عنوان زمان بهینه انکوباسیون با نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین، جهت مطالعات بعدی در نظر گرفته شد.

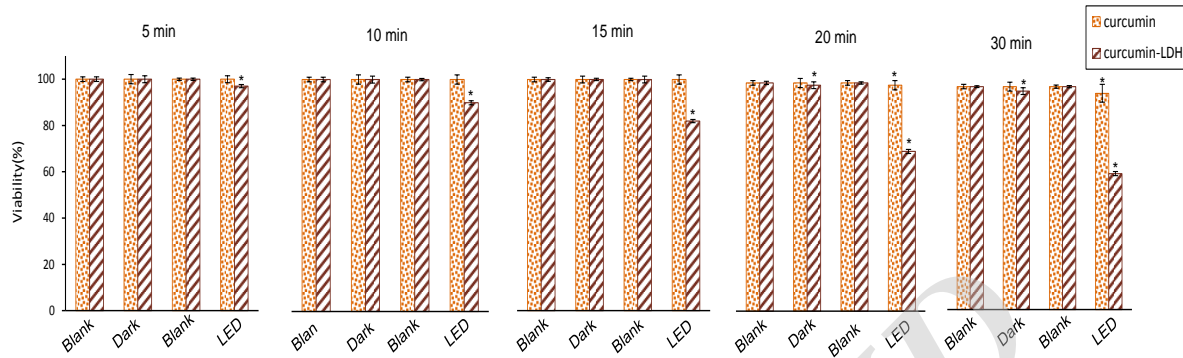




شکل ۴: مقایسه میزان بقا سلول های تیمار شده با نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین در غلظت های (۰، ۱۰، ۲۵ و ۴۰ µg/ml) و در زمان های ۱، ۴، ۲۴ و ۴۸ ساعت. (A) گروه (تاریکی). (B) گروه در معرض تابش نور LED آبی به مدت ۳۰ دقیقه. آزمایش مربوط ۵ بار تکرار شد. \*P < 0.05 در مقایسه با گروه کنترل

## بررسی زمان تابش موثر LED بر عملکرد نانوذره کورکومین-LDH و کورکومین

برای بدست آوردن زمان تابش موثر LED، سلول ها با غلظت مشخصی از نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین تنها ( $25 \mu\text{g/ml}$ ) در زمان ۲۴ ساعت تیمار شدند و پس از زمان مورد نظر در معرض تابش نور LED آبی ( $34 \text{ mW cm}^{-2}$ ) در زمان های ۱۰، ۱۵، ۲۰، و ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. گروه تاریکی (کنترل) در زمان های مشابه قرار گرفت. پس از تابش ها، بقا سلول ها در حضور نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین تنها بررسی شد. نتایج در شکل زیر نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می کنید تفاوت معنا داری در بقا سلول ها در گروه تاریکی بین نمونه های تیمار شده با نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین تنها مشاهده نمی شود. در سلول های تیمار شده با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH کاهش تدریجی در بقا در یک رفتار وابسته به دوز نور مشاهده می شود. بقا سلول ها در زمان های تابشی ۱۰، ۱۵، ۲۰، و ۳۰ دقیقه به ترتیب ۹۰٪، ۸۳٪، ۷۰٪ و ۶۱٪ می باشد. این در حالی است که بقا سلول های تیمار شده با کورکومین تنها پس از تابش تغییر معنا داری نکرده است. نمونه های کنترل (بلانک) نشان می دهد که تابش در زمانهای متفاوت بر مرگ و میر سلول ها (بدون حضور نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین تنها) اثری نداشته است. با توجه به این مشاهدات زمان تابش ۳۰ دقیقه به عنوان زمان تابش موثر برای مطالعات بعدی در نظر گرفته شد.

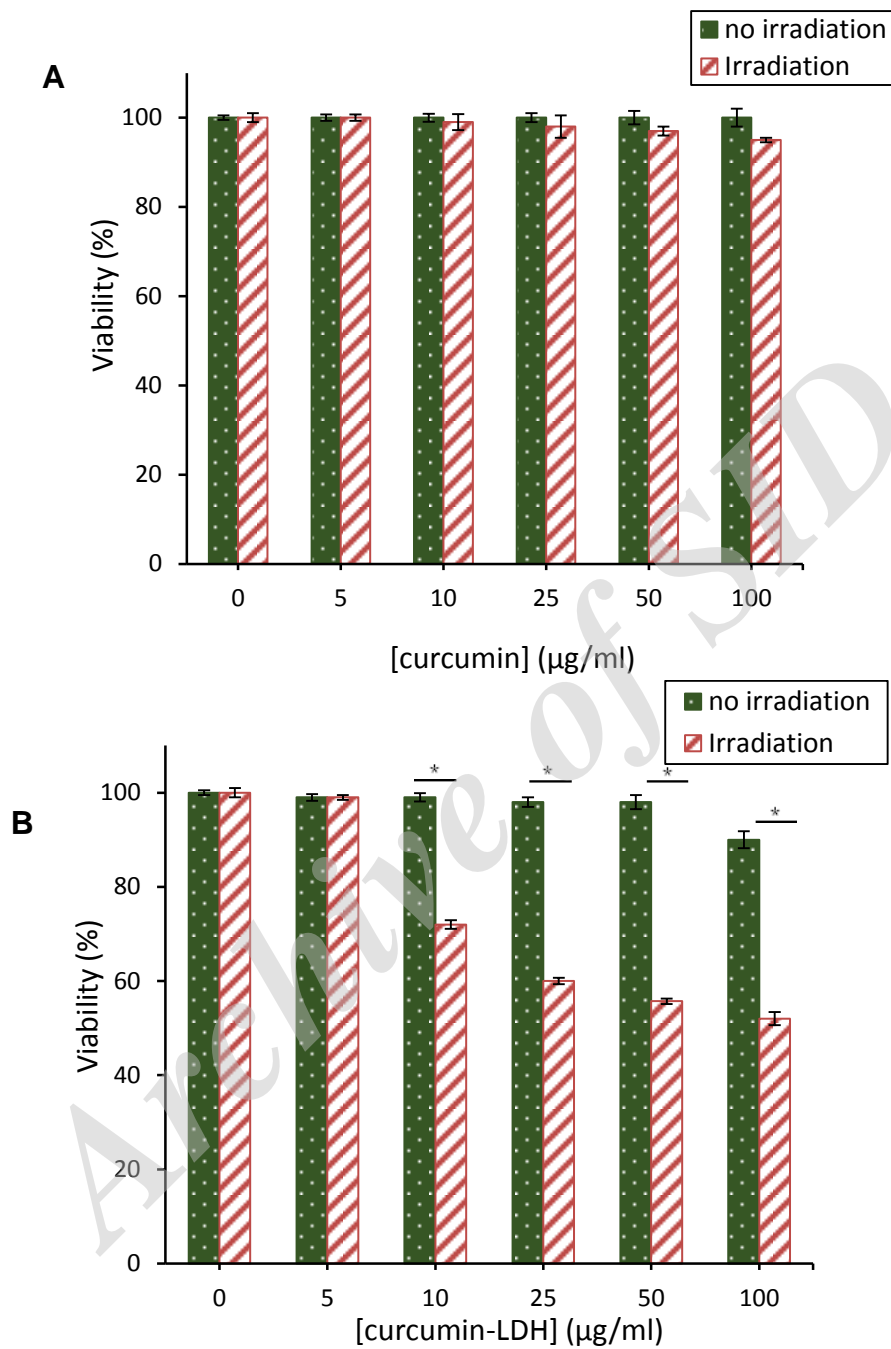


شکل ۵: بقا سلول های تیمار شده با نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین در زمان های متفاوت تابش نور LED آبی ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ دقیقه. آزمایش مربوط ۵ بار تکرار شد.  
\*P < 0.05 در مقایسه با گروه کنترل (بلانک)

## بررسی اثر غلظت های مختلف نانوذره کورکومین-LDH و کورکومین و ارزیابی فتودینامیک

### درمانی بر سلول های سرطانی رده MDA-MB-231 با روش MTT

اثر غلظت های مختلف با نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین تنها بر سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 بررسی شد. فعالیت فتودینامیکی با نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین به روش MTT مشخص شد. برای این منظور سلول ها با غلظت های مختلفی (۱۰ و ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$ ) از نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و کورکومین برای مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و پس از طی شدن زمان لازم در معرض تابش با نور LED آبی ( $465 \text{ nm} - 34 \text{ mW cm}^{-2}$ ) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس بقا سلول ها به روش MTT ارزیابی شد و نتایج در شکل زیر نشان داده شده است. بهترین فعالیت فتودینامیکی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از با نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH مشاهده شد ( شکل B ۶). مقایسه فعالیت فتودینامیکی سلول تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کورکومین تنها نشان می دهد که بقا سلول ها در حدود ۹۹٪ در حالت تاریکی و ۹۵٪ در معرض تابش با نور آبی می باشد که نشان دهنده فعالیت ضعیف فتودینامیکی کورکومین تنها می باشد ( شکل A ۶). در مورد سلول تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH در حالت تاریکی بقا ۹۰٪ است که در سلول در معرض تابش بقا به ۵۲٪ می رسد که نشان دهنده افزایش کارائی فتودینامیک نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH و قابلیت ایجاد سمیت سلولی در سلول های سرطانی سینه می باشد.

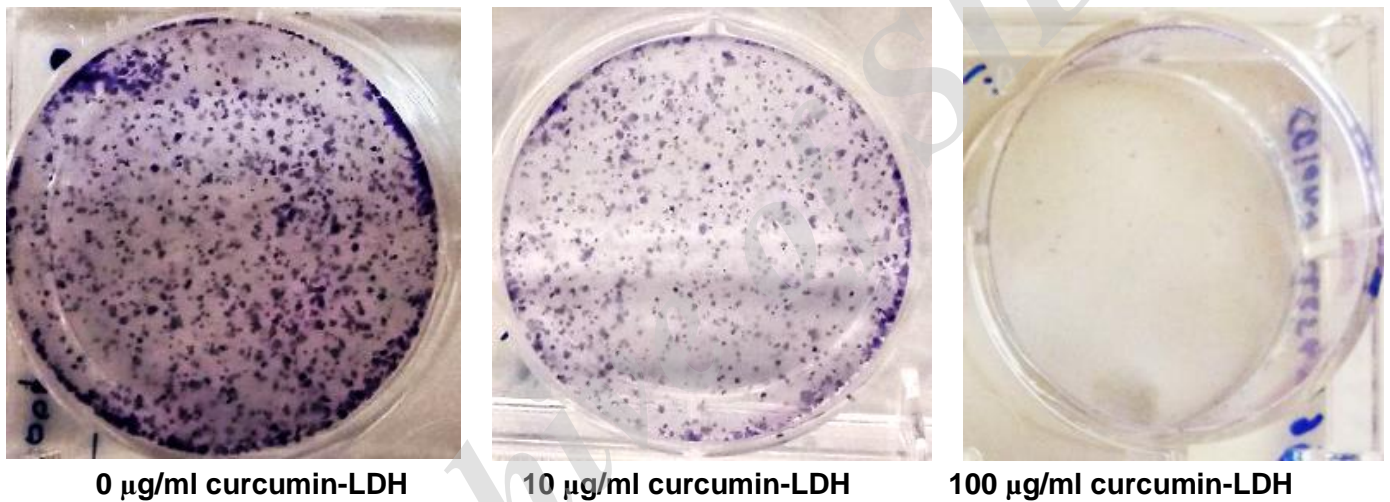


شکل ۶: فعالیت فتودینامیکی کورکومین تنها (A) و نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH (B) در غلظت های مختلف بر سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 پس از تیمار در ۲۴ ساعت.. آزمایش مربوط ۵ بار تکرار شد.  $P < 0.05$  \*در مقایسه با گروه بدون تابش (تاریکی)

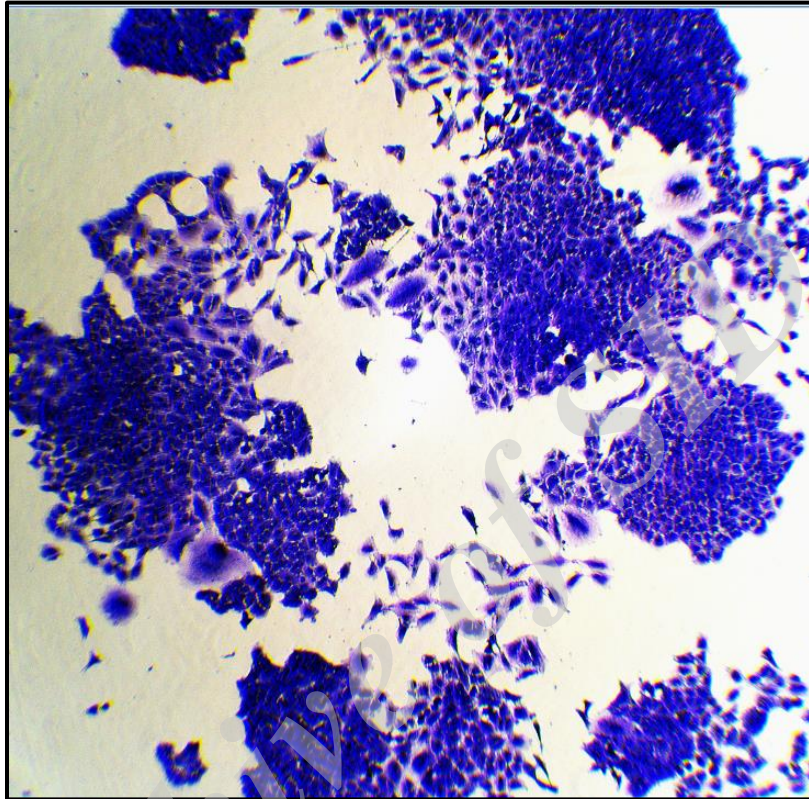
## بررسی اثر فتودینامیک تراپی با غلظت های مختلف نانوذره کورکومین-LDH بر توانایی کلونی زائی سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231

برای ارزیابی کلونی سلولی، ابتدا سلولها ی تیمار شده با غلظت های مختلف نانوذره کورکومین-LDH و تابش را ترپسینه و از کف پلیت جدا کرده و تعداد 12000 سلول را در 2 میلیلیتر محیط کشت ریخته و آن را در پلیت شش خانه به تعداد 2000 سلول در هر خانه کشت داده شدند. بعد از 10 روز سلولها با رنگ کریستال ویوله 0.5 درصد رنگ آمیزی شدند و تصاویری از هر خانه از پلیت شش خانه تهیه شد و کلونیهها بیش از 50 سلول با شمارش شدند. کلونیهایی که دارای تعداد سلولهای بیشتری هستند در رنگ آمیزی کریستال ویوله پر رنگتر و بزرگتر دیده میشوند

همانطور که در تصاویر مشاهده می شود، با افزایش اثر غلظت های مختلف نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH توانائی کلونی زایی و تکثیر سلول های سرطانی کاهش می یابد. بطوریکه در غلظت بالا ( 100 میکروگرم بر میلی لیتر) کلونی سلولی مشاهده نمی شود.



شکل ۷: سنجش کلونی زائی در سلول های تحت فتودینامیک تراپی با غلظت های مختلف نانوذره هیبریدی کورکومین - LDH

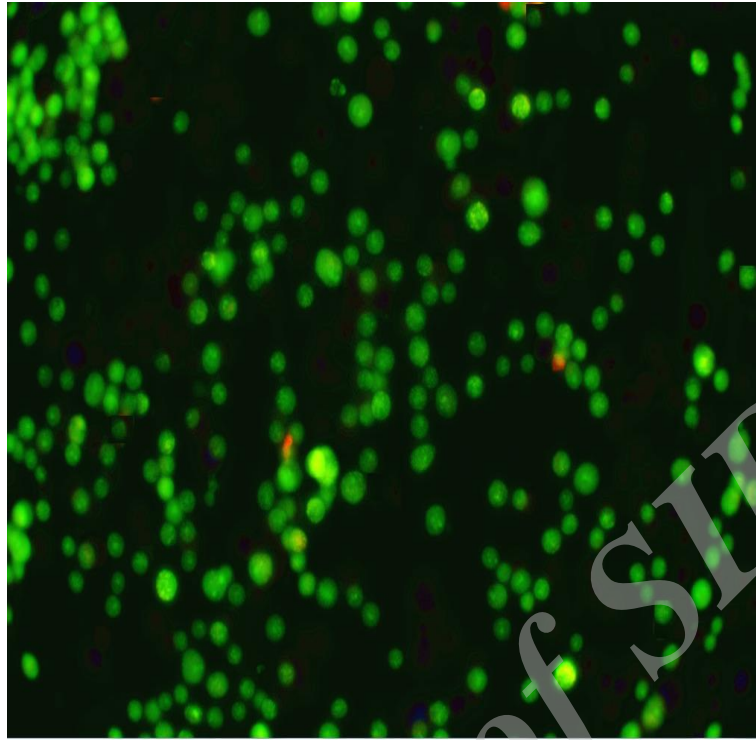


شکل ۸: تصویری از کلونی های ایجاد شده سلول های سرطانی سینه در گروه کنترل

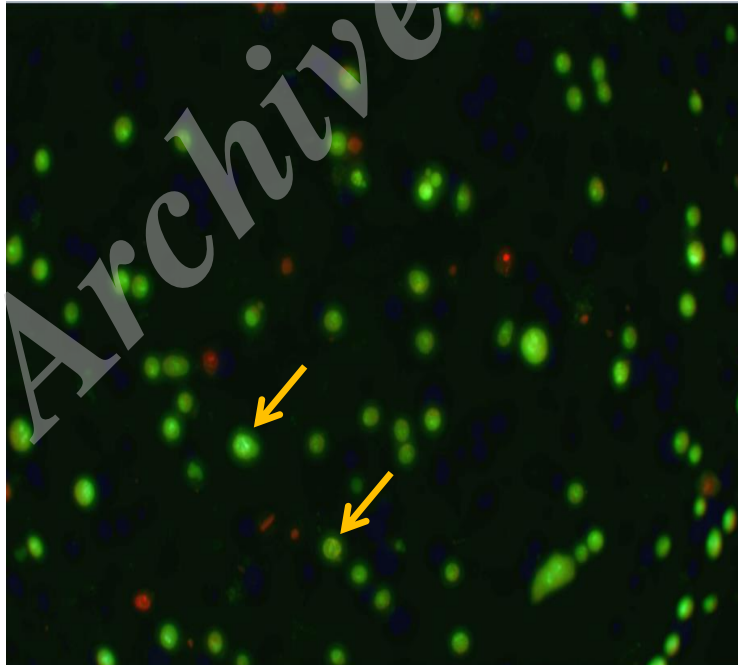


## بررسی اثر غلظت های مختلف نانوذره کورکومین-LDH بر وقوع آپاپتوز سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 با روش رنگ آمیزی دوگانه آکریدین اورنج/اتیدیوم برماید و مشاهده با میکروسکوپ فلورسانس

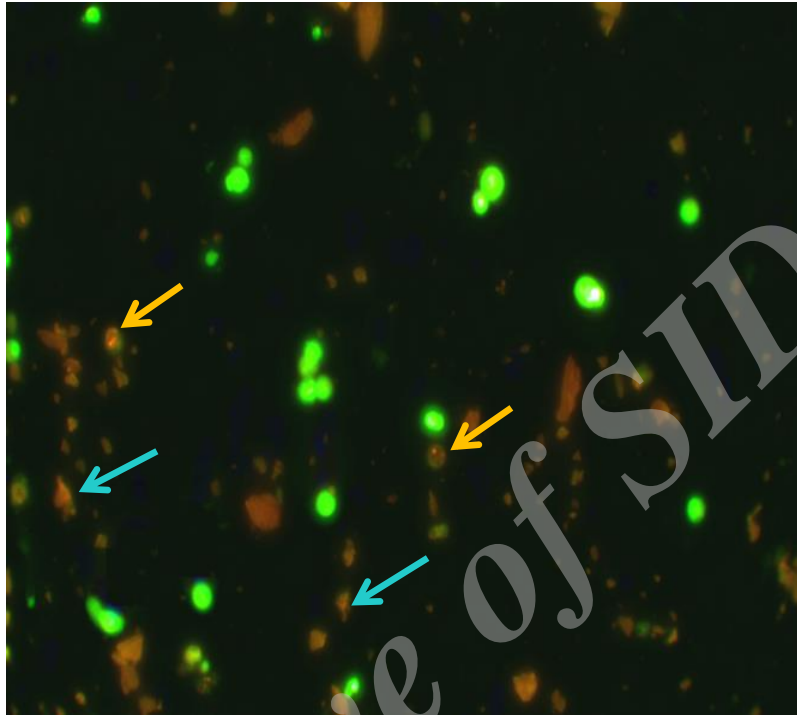
سلولهای تیمار شده با غلظت های مختلف مختلف نانوذره هیبریدی کورکومین - LDH و تحت تابش با مخلوط رنگ آکریدین اورنج ( ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و اتیدیوم بروماید (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) رنگ آمیزی شدند و ۵ دقیقه بعد با میکروسکوپ فلورسانس تصاویر تهیه گردید. هسته سلولهای آپوپتوتیک متراکم و قطعه قطعه شده و به راحتی از سلولهای طبیعی قابل تمایز هستند، علاوه بر آن در این روش، سلولهای آپوپتوتیک اولیه با هسته ی متراکم سبز کم رنگ و غشای سیتوپلاسمی سالم از سلولهای آپوپتوتیک تاخیری با هسته متراکم قرمز و قطعه قطعه قابل تفکیک میباشند. سلولهای نکروتیک نیز به رنگ زرد متمایل به قرمز و یکدست و بدون قطعه قطعه شدن هسته مشخص میباشند و سلولهای سالم نیز به رنگ سبز پر رنگ هستند. همانطور که در شکل ها مشاهده می شود، گروه فتودینامیک تراپی و تیمار با غلظت های مختلف نانوذره هیبریدی کورکومین - LDH با افزایش غلظت نسبت به گروه کنترل درصد سلولهای آپوپتوزافزایش یافته است و در غلظت بالاتر سلول با مرگ نکروز نیز مشاهده می شود.



شکل ۹: سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 با روش رنگ آمیزی دوگانه آکریدین اورنج/اتیودیوم برمایید گروه کنترل



شکل ۱۰: سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 با روش رنگ آمیزی دوگانه آکریدین اورنج/اتیودیوم برمایید (غلظت ۲۵ نانوذره کورکومین-LDH). فلش زرد نشان دهنده سلول های در مرحله اولیه آپتوز می باشد.



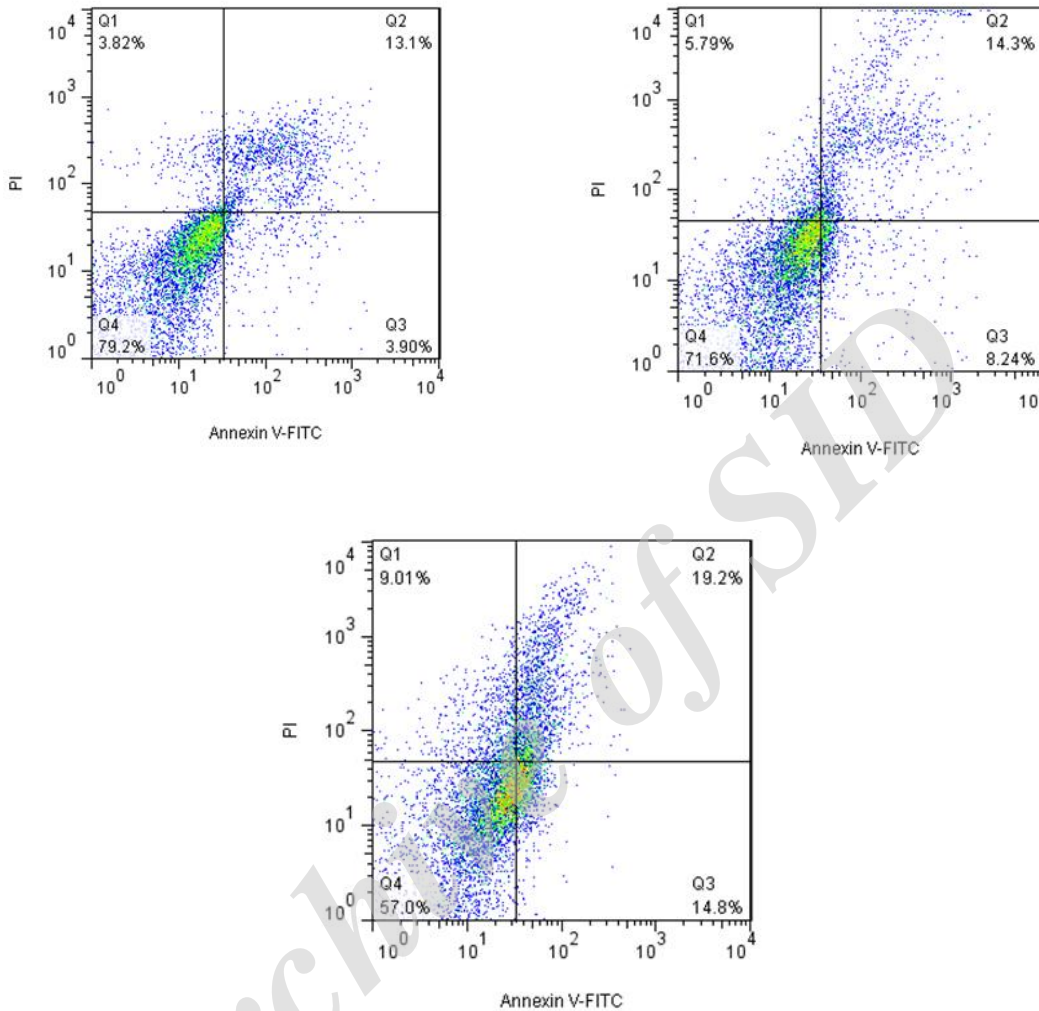
شکل ۱۱: سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 با روش رنگ آمیزی دوگانه آکریدین اورنج/تیدیوم برماید (غلظت  $100 \mu\text{g/ml}$  نانوذره کورکومین-LDH). فلش زرد نشان دهنده سلول های در مرحله نهایی آپتوز و فلش آبی نشان دهنده سلول ها در نکروز می باشد.

## بررسی اثر غلظت های مختلف نانوذره کورکومین-LDH بر وقوع آپپتوز سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 با روش فلوسایتومتری با استفاده از کیت Annexin V و PI

در پلیت 6 خانه ای در هر چاهک به طور متوسط  $5 \times 10^4$  سلول مورد تیمار با غلظت های مختلف نانوذره کورکومین-LDH و تابش قرار گرفتند. سلول های سرطانی در معرض غلظت های 100،0، 25 میکروگرم در لیتر برای 4 ساعت و سپس تابش به مدت 15 دقیقه جهت بررسی آپپتوز استفاده شد.

سلول ها را پس از شستشو با PBS با تریپسین از پلیت جدا نموده و سانتر یفوژ شدند. سلول ها با محلول 10 درصد بافر باندینگ شستشو داده 5 دقیقه در سانتر یفوژ شدند. محلول FITS متصل به Annexin-V به میزان 5 میکرولیتر به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک انکوبه شدند. رنگ Annexin به فسفاتیدیل سرین های موجود در غشای سلول آپپتوز یافته چسبیده و آنها را نشان دار می نماید. سپس با استفاده از 5 میکرولیتر محلول PI (Propidium iodide) آماده شمارش توسط دستگاه فلوسایتومتری (FACS Calibur آمریکا) می شوند.

همانطور که در شکل ها مشاهده می شود، در گروه فتودینامیک تراپی و تیمار با غلظت های مختلف نانوذره هیبریدی کورکومین - LDH با افزایش غلظت نسبت به گروه کنترل درصد سلول های آپپتوزافزایش یافته است و در غلظت بالاتر درصدی از نکروز نیز مشاهده می شود.



شکل ۱۲: تاثیر آپوپتوزی نانوذره کورکومین-LDH بر سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231. سلولها در معرض غلظت ۲۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانو ذره قرار گرفتند و پس از پایان فرایند فتودینامیک تراپی میزان و نوع مرگ سلولی القا شده توسط فلوسایتومتری سنجیده شد. گراف توزیع سلولها را در منطقه آپوپتوزی اولیه (Q2) ثانویه (Q3) نکروز و (Q1) و سلول سالم (Q4) را نشان می دهد.

# فصل ششم

## بحث و نتیجه گیری

## بحث

نتایج بدست آمده از طرح نشان دهنده سنتز کارآمد نانوذره و اینترکاله شدن ذرات کورکومین برون لایه های LDH و سنتز نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH می باشد. همچنین نتایج نشان می دهد که نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH فعالیت فتودینامیک و سیتوتوکسیک بهتری نسبت به کورکومین تنها در سلول های سرطانی سینه رده MDA-MB-231 نشان می دهد که می تواند نشان دهنده پتانسیل استفاده از LDH به عنوان حامل کورکومین در مطالعات فتودینامیکی باشد.

در مورد نحوه مرگ سلولی ایجاد شده توسط نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH مطالعات میکروسکوپ فلورسانس و فلوسایتومتری تأیید کننده این مطلب است که نوع مرگ ایجاد شد توسط نانوذره غالباً به صورت آپتوز است. همچنین مطالعه کلونی زایی نشان داد که با افزایش غلظت نانوذره ، توان کلونی زایی و تکثیر سلول های سرطانی کاهش یافته است.

در پایان این طرح پیشنهاد می کند که نانو ذره هیبریدی کورکومین-LDH می تواند به عنوان یک حساس گر نوری جدید در درمان فتودینامیک سلول های سرطانی سینه استفاده شود.

## فصل هفتم

### منابع



## منابع :

- [1] Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1893–907. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0437.
- [2] وضعیت بروز و شیوع سرطان در ایران. پایگاه خبری- اطلاع رسانی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی n.d.
- [3] Sher DJ. Cost-effectiveness studies in radiation therapy. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 2010;10:567–82. doi:10.1586/erp.10.51.
- [4] Ploquin NP, Dunscombe PB. The cost of radiation therapy. *Radiother Oncol* 2008;86:217–23. doi:10.1016/j.radonc.2008.01.005.
- [5] Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005;16:481–8. doi:10.1093/annonc/mdi098.
- [6] Nakano A, Watanabe D, Akita Y, Kawamura T, Tamada Y, Matsumoto Y. Treatment efficiency of combining photodynamic therapy and ionizing radiation for Bowen's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011;25:475–8. doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03757.x.
- [7] Saito H, Takada T, Miyazaki M, Miyakawa S, Tsukada K, Nagino M, et al. Radiation therapy and photodynamic therapy for biliary tract and ampullary carcinomas. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008;15:63–8. doi:10.1007/s00534-007-1281-y.
- [8] Montazerabadi AR, Sazgarnia A, Bahreyni-Toosi MH, Ahmadi A, Aledavood A. The effects of combined treatment with ionizing radiation and indocyanine green-mediated photodynamic therapy on breast cancer cells. *J Photochem Photobiol B* 2012;109:42–9. doi:10.1016/j.jphotobiol.2012.01.004.
- [9] Huilgol NG, Gupta S, Sridhar CR. Hyperthermia with radiation in the treatment of locally advanced head and neck cancer: a report of randomized trial. *J Cancer Res Ther* n.d.;6:492–6. doi:10.4103/0973-1482.77101.
- [10] Hurwitz MD, Hansen JL, Prokopios-Davos S, Manola J, Wang Q, Bornstein BA, et al. Hyperthermia combined with radiation for the treatment of locally advanced prostate cancer: long-term results from Dana-Farber Cancer Institute study 94-153. *Cancer* 2011;117:510–6. doi:10.1002/cncr.25619.
- [11] Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* n.d.;61:250–81. doi:10.3322/caac.20114.
- [12] Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* 2013;46:24. doi:10.5946/ce.2013.46.1.24.
- [13] Juarranz Á, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol* 2008;10:148–54. doi:10.1007/s12094-008-0172-2.
- [14] Aggarwal B, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. CURCUMIN: THE INDIAN SOLID GOLD. In: Aggarwal B, Surh Y-J, Shishodia S, editors. *Mol. Targets Ther. Uses Curcumin Heal. Dis. SE - 1*, vol. 595, Springer US; 2007, p. 1–75. doi:10.1007/978-0-387-46401-5\_1.
- [15] Liu D, Chen Z. The effect of curcumin on breast cancer cells. *J Breast Cancer* 2013;16:133–7. doi:10.4048/jbc.2013.16.2.133.
- [16] Shi M, Cai Q, Yao L, Mao Y, Ming Y, Ouyang G. Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. *Cell Biol Int* 2006;30:221–6. doi:10.1016/j.cellbi.2005.10.024.
- [17] Salvioi S, Sikora E, Cooper EL, Franceschi C. Curcumin in cell death processes: a challenge for CAM of age-related pathologies. *Evid Based Complement Alternat Med* 2007;4:181–90. doi:10.1093/ecam/nem043.
- [18] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* n.d.;4:807–18. doi:10.1021/mp700113r.

- [19] 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;35:3365–83. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.12.090.
- [20] Zümreoglu-Karan B, Ay A. Layered double hydroxides — multifunctional nanomaterials. *Chem Pap* 2012;66:1–10. doi:10.2478/s11696-011-0100-8.
- [21] Bi X, Zhang H, Dou L. Layered double hydroxide-based nanocarriers for drug delivery. *Pharmaceutics* 2014;6:298–332. doi:10.3390/pharmaceutics6020298.
- [22] Lin J-K. MOLECULAR TARGETS OF CURCUMIN. In: Aggarwal B, Surh Y-J, Shishodia S, editors. *Mol. Targets Ther. Uses Curcumin Heal. Dis. SE - 10*, vol. 595, Springer US; 2007, p. 227–43. doi:10.1007/978-0-387-46401-5\_10.
- [23] 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;269:199–225. doi:10.1016/j.canlet.2008.03.009.
- [24] Varalakshmi C, Ali AM, Pardhasaradhi BV V, Srivastava RM, Singh S, Khar A. Immunomodulatory effects of curcumin: In-vivo. *Int Immunopharmacol* 2008;8:688–700. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2008.01.008.
- [25] Ashok Khar, A. Mubarak Ali, B. V. V. Pardhasaradhi, Ch. Varalakshmi, Rana Anjum and ALK. Induction of stress response renders human tumor cell lines resistant to curcumin-mediated apoptosis: role of reactive oxygen intermediates. *Cell Stress Chaperones* 2001;6:368–76.
- [26] Yang K-Y, Lin L-C, Tseng T-Y, Wang S-C, Tsai T-H. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *J Chromatogr B* 2007;853:183–9. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.03.010.
- [27] Lv L, Shen Y, Liu J, Wang F, Li M, Li M, Guo A, Wang Y, Zhou D GS. Enhancing curcumin anticancer efficacy through di-block copolymer micelle encapsulation. *J Biomed Nanotechnol* 2014;10:179–93.
- [28] Tabatabaei Mirakabad FS, Akbarzadeh A, Milani M, Zarghami N, Taheri-Anganeh M, Zeighamian V, et al. A Comparison between the cytotoxic effects of pure curcumin and curcumin-loaded PLGA-PEG nanoparticles on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol* 2014;1–8. doi:10.3109/21691401.2014.955108.
- [29] Zhang K, Xu ZP, Lu J, Tang ZY, Zhao HJ, Good DA, et al. Potential for layered double hydroxides-based, innovative drug delivery systems. *Int J Mol Sci* 2014;15:7409–28. doi:10.3390/ijms15057409.
- [30] Park K, Lee J-H. Photosensitizer effect of curcumin on UVB-irradiated HaCaT cells through activation of caspase pathways. *Oncol Rep* 2007. doi:10.3892/or.17.3.537.

## Abstract

Curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)- 1,6-heptadiene-3,5-dione), an active compound of *Curcuma longa*, have been found to be very potent anticancer agent against many different types of cancer cells. Recent studies show that curcumin can be used as a photosensitizer in photodynamic therapy for cancer treatment. However, the major disadvantage of curcumin is its poor aqueous solubility. To improve its applicability in cancer therapy, we intercalated curcumin into layered double hydroxide (LDH) and used as a nanohybrid photosensitizer in photodynamic therapy of human breast cancer cells. Powder X-ray diffraction (XRD), TEM and SEM microscopy analyses indicate that curcumin is stabilized in the host interlayer. According to the spectroscopy results, the water solubility and dispersity of intercalated curcumin increased and loading amount of curcumin in LDH is about 50%. The photodynamic effect of curcumin and the curcumin– LDH nanohybrid was studied on the MDA-MB-123 human breast cancer cell line. The Cell viability studies revealed that the curcumin–LDH nanohybrid were able to show more effective photodynamic effects on the cancer cells as compared to free curcumin. The colony assay with IC50 concentration of curcumin nanohybrid shows the reduction of cancer cells colonization. The results of the EB /AO dual staining, as well as flow cytometry, confirm the occurrence of apoptosis in cancer cells under photodynamic therapy with curcumin nano-hybrid. These results suggest that the biocompatible layered double hydroxide can be used as the basis of a tunable curcumin delivery carrier for photodynamic therapy in breast cancer treatment.



Keywords: nano photodynamic therapy, breast cancer, curcumin-LDH  
nanohybrid. Apoptosis

Archive of SID



## Final report of project

**Synthesis and study photodynamic anticancer effects of LDH-Curcumin nano-hybrid and intact Curcumin on MDA-MB-231 human breast cell line**

**Code: 2355**

**Photodynamic Research Group  
Tehran Medical Science Branch of ACECR**

**By:**

**Dr. Khatereh Khorsandi**

**Dr. Reza Hosseinzadeh**

**Dr. Mohsen Fateh**

**Sara Kamali**

**Summer 2017**