

## Design and Synthesis of a Novel Dendrosome and a PEGylated PAMAM Dendrimer Nanocarrier to Improve the Anticancer effect of Turmeric (*Curcuma longa*) Curcumin

Vahid Erfani-Moghadam<sup>1</sup>, Alireza Nomani<sup>2\*</sup>, Farhood Najafi<sup>3</sup>, Yaghoub Yazdani<sup>4</sup>,  
Majid Sadeghizadeh<sup>5\*\*</sup>

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Resin and Additives, Institute for Color Science and Technology, Tehran, Iran
- 4- Assistant Professor, Infectious Diseases Research Center and Laboratory Science Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
- 5- Professor, Department of Genetic, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

\*Corresponding Address: P.O.Code: 5618445139, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran  
Email: arnomani@zums.ac.ir

\*\*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Genetic, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
Email: sadeghma@modares.ac.ir

Received: 14/Jan/2014, Accepted: 12/May/2014

### Abstract

**Objective:** In recent decades, the anticancer effect of curcumin has been proven by several studies. Curcumin affects multiple cell signaling pathways and prevents cell proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis. However, the aqueous solubility of curcumin and its bioavailability are very low which restricts its anticancer properties. In this research, we have synthesized a monomethoxy poly (ethylene glycol)-Oleate (mPEG-OA) di-block copolymer and used a surface PEGylated poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimer to improve bioavailability of curcumin in cancer cells.

**Methods:** The critical micelle concentration (CMC) of mPEG-OA, drug loading efficiencies, and cytotoxicity in the human glioblastoma cell line (U87MG) of all the prepared nanodevices were thoroughly investigated.

**Results:** Atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) studies have shown that mPEG-OA have two common nanostructures, micelles and polymerosomes. mPEG-OA micelles had a very low CMC (0.03 g/l). The IC<sub>50</sub> of free curcumin (0.01 methanol solution) was 48 μM, curcumin-loaded mPEG-OA was 24 μM, and curcumin-loaded PAMAM dendrimer was 13 μM. Moreover, the PEGylated PAMAM was non-cytotoxic.

**Conclusion:** The results indicated that by using these nanocarriers, the bioavailability of curcumin significantly increased compared to free curcumin. Overall, this research revealed that these curcumin nanocarriers could be considered as appropriate drug delivery systems for curcumin delivery in cancer cells.

**Keywords:** Curcumin, Micelles, Polymersome, Dendrosome, PAMAM dendrimers

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 1, Spring 2014, Pages: 63-77

# طراحی، سنتز و مقایسه نانو حامل دندروزوم جدید و دندریمر PAMAM پگیله شده در بهبود خواص ضد سرطانی کورکومین زردچوبه (*Curcuma longa*)

وحید عرفانی مقدم<sup>۱</sup>، علیرضا نعمانی<sup>۲\*</sup>، فرهود نجفی<sup>۳</sup>، یعقوب یزدانی<sup>۴</sup>، مجید صادقی زاده<sup>۵\*\*</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
- ۳- استادیار، مؤسسه پژوهشی علوم و فن آوری رنگ، گروه پژوهشی رزین و مواد افزودنی، تهران، ایران
- ۴- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
- ۵- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، زنجان، کدپستی: ۵۶۱۸۴۴۵۱۳۹، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده داروسازی، گروه فارماسیوتیکس  
Email: arnomani@zums.ac.ir

\*\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک  
Email: sadeghma@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۲/۱۲/۲۱

دریافت مقاله: ۹۲/۱۰/۲۴

## چکیده

هدف: نقش ضد سرطان کورکومین از گیاه ادویه‌ای زردچوبه در سال‌های اخیر در تحقیقات متعددی به اثبات رسیده است. کورکومین قادر به مهار چندین مسیر پیام‌رسانی سلولی، ممانعت از تکثیر سلولی، مهاجم، متاستاز و رگ‌زایی است اما محلولیت بسیار ضعیف آن در آب، کاربرد این ماده ضد سرطانی مهم را با مشکل مواجه می‌سازد. در این تحقیق با طراحی و سنتز یک پلیمر دو بخشی نوین مونومتوکسی پلی اتیلن گلیکول-اولئات (mPEG-OA) و اضافه کردن پلی اتیلن گلیکول به سطح حامل دندریمری پلی آمیدو آمین (PAMAM)، تلاش شد زیست دسترسی کورکومین به سلول‌های سرطانی افزایش یابد.

**مواد و روش‌ها:** غلظت بحرانی تشکیل میسل، بارگیری دارو و سمیت سلولی روی رده سلولی کارسینومای گلیوبلاستوما مغزی (U87MG) بررسی شد.

**نتایج:** نتایج مطالعات میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) و پراکنش نوری پویا (DLS) نشان می‌دهد نانوذرات mPEG-OA طراحی شده دارای دو جمعیت خود آرا شامل میسل‌ها و پلیمروزوم‌ها است. غلظت بحرانی تشکیل میسل mPEG-OA بسیار پایین (۰/۰۳ گرم در لیتر) است. سمیت  $IC_{50}$  برای کورکومین آزاد، کورکومین بارگذاری شده در mPEG-OA و کورکومین بارگذاری شده در دندریمر پلی آمیدو آمین، به ترتیب ۴۸، ۲۴ و ۱۳ میکرومولار محاسبه شد. همچنین کلیه تیمارهای دندریمر پلی آمیدو آمین پگیله شده غیر سمی تشخیص داده شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج بیان می‌کند با استفاده از این نانوحامل‌ها، زیست دسترسی کورکومین به‌طور معنی‌داری نسبت به کورکومین آزاد افزایش می‌یابد. در نهایت این تحقیق نشان می‌دهد این نانوحامل‌های کورکومین می‌تواند به‌عنوان سیستم‌های دارورسان مناسب برای انتقال کورکومین به سلول‌های سرطانی در نظر گرفته شود.

**کلیدواژگان:** کورکومین، میسل، پلیمروزوم، دندروزوم، دندریمر پلی آمیدو آمین

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، صفحات: ۶۳-۷۷

در محیط درون بدنی (In vivo) سمیت کمتری دارد [۳]. یکی دیگر از ترکیبات گیاهی که اخیراً خواص زیستی آن بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته کورکومین (Curcumin) است که از گیاه زردچوبه به دست می‌آید. مهم‌ترین ماده فعال زیستی زردچوبه، پلی فنولی به نام کورکومین با فرمول شیمیایی [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) hepta-1,6-diene-3,5-dione] است که حدود ۲-۸ درصد وزنی زردچوبه را تشکیل می‌دهد. این ماده در محیط‌های با pH فیزیولوژیک و در محیط‌های بازی (با pH بیشتر از ۸) به سرعت تخریب می‌شود؛ به طوری که در مدت زمان ۳۰ دقیقه تا ۹۰ درصد در محیط آبی با pH خنثی تجزیه می‌شود [۴]. البته افزودن سرم جنین گاوی یا مواد آنتی اکسیدان نظیر اسید اسکوربیک و گلوکاتینون به محیط کشت سلول‌ها از تخریب آن جلوگیری می‌کند [۴]. به طور کلی مهم‌ترین آثار زیستی زردچوبه و کورکومین آثار ضد التهابی، ضد توموری و آنتی اکسیدانی آن‌هاست [۵، ۶]. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که کورکومین مولکولی پلی‌تروپیک (Pleiotropic) است بدین معنی که قادر است که اهداف مختلفی را در سلول شامل عوامل رونویسی سلول، گیرنده‌های سلولی، کینازهای سلولی، سیتوکین‌ها، آنزیم‌ها و عوامل رشد سلولی را شناسایی کند و به نظر می‌رسد به همین دلیل پتانسیل بالایی در درمان سرطان‌ها داشته باشد [۷]. آثار ضد سرطانی آن در سرطان‌هایی از قبیل مثانه، گردن، رحم، تخمدان، مغز، پوست و غیره مشاهده شده است. اما مشکل این جاست که با وجود آن که در حلال‌های آلی نظیر دی متیل سولفوکساید (Dimethylsulfoxide: DMSO)، اتانول، و استون حل می‌شود اما در آب در شرایط اسیدی انحلال‌ناپذیر و در شرایط خنثی و قلیایی سریعاً تجزیه می‌شود [۴]. طوری که در pH برابر با ۷/۳ تنها ۰/۰۰۰۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل می‌شود و بعد از مصرف خوراکی ۱۰ تا ۱۲ گرم کورکومین میزان آن در سرم خون تنها به حدود ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر می‌رسد [۸]. انجام آزمایش‌های فاز اول بالینی نشان داده کورکومین در دوزهای بالا حتی تا ۱۲ گرم در روز برای

علاقه فراوانی برای طراحی سیستم‌هایی دارورسانی (Drug Delivery) از طریق فناوری نانو مخصوصاً به منظور درمان سرطان وجود دارد. طراحی ایده‌آل سیستم‌هایی دارورسانی نانو، پیگیری هدفمند دارو را امکان‌پذیر می‌نماید و در نتیجه کارایی روش درمانی را افزایش و آثار مضر جانبی را به حداقل کاهش می‌دهد. محققان با کمک نانو تکنولوژی سعی می‌کنند داروهای طراحی کنند که صنعت دارویی را قادر سازد که در درجه اول دارو را به بافت هدف خاصی انتقال دهد، میزان رهایش دارو به میزان کنترل شده‌ای باشد، سیستم دارورسانی زیست تخریب‌پذیر باشد و همچنین بتواند از فرآیند تخریب و دفع توسط بدن فرار کند [۱]. داروها یا مواد فعال زیستی که در نانوذرات بارگذاری می‌شوند یا به وسیله حامل‌های نانو حمل می‌شوند زیست‌دستیابی (Bioavailability) و فعالیت زیستی (Bioactivity) بسیار زیادی را کسب می‌نمایند. از طرفی اغلب داروهای ضد سرطان آب‌گریز (Hydrophobic) و نامحلول یا کم محلول در آب است و بیش از ۷۰ درصد داروهای ضد سرطان که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرد دارای منشأ گیاهی است و در طب سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد داشته‌است. وینبلاستین (Vinblastine) و پاکلیتاکسل (Paclitaxel) دو نمونه پرکاربرد از این دسته داروهای گیاهی است [۲]. به طور کلی مواد زیستی گیاهی خوراکی آنتی اکسیدان شامل ویتامین‌ها و متابولیت‌های ثانویه شامل ترپنویدهای کاروتنوئیدی، پلی فنل‌های فلاونوئیدی، اسیدهای فنلی و استرهای آن‌ها و مواد فنلی غیرفلاونوئیدی است. اثر ضد سرطان تعدادی از این متابولیت‌ها نشان داده شده و تحقیقات برای نقش آن‌ها در مبارزه با سرطان در جریان است. به عنوان مثال اپیگالوکتسین گالات (Epigallocatechin Gallate: EGCG) ترکیب مؤثر در چای سبز اگر در نانوذرات کپسوله شود نسبت به فرم آزادش ده برابر مؤثرتر است و سیس پلاتین جاسازی شده در نانوذرات ژلاتینی خواص ضد توموری خیلی قوی‌تری نسبت به سیس پلاتین آزاد دارد و نسبت به آن

انسان ایمن است ولی زیست‌دستیایی بسیار پایینی دارد [۹]. به نظر می‌رسد دلایل اصلی مشکل سطوح پایین کورکومین در بافت‌های بدن و پلاسما خون جذب پایین، متابولیسم سریع و حذف سریع سیستماتیک است. طبق اطلاعات موجود، عمده کورکومینی که وارد بدن می‌شود، دفع شده و مقدار کمی از آن وارد جریان خون می‌شود که به دلیل غیر قابل حل بودن آن در آب، تحت شرایط خنثی یا اسیدی است. به علاوه این رنگدانه آلی داخل روده به سرعت دچار تغییر و تحول می‌شود؛ بنابراین با پیدا کردن راهی برای حفاظت از کورکومین می‌توان قابلیت دسترسی زیستی آن را افزایش داد. برای اصلاح حلالیت و در دسترس بودن زیستی کورکومین روش‌های متعددی در ده سال اخیر به کار گرفته شده است به طوری که هر سال نسبت به سال قبل افزایش چشمگیری در این زمینه تحقیقاتی مشاهده می‌شود [۸].

دندریمرها (Dendrimer) به شکل لایه لایه و مرحله به مرحله ساخته می‌شود و سطح بالایی از کنترل برای ساخت هر لایه که به عنوان نسل (Generation) شناخته می‌شود، وجود دارد. این شیوه تکرار شونده، ماکرومولکول‌هایی با توزیع وزن مولکولی خیلی کم (Monodisperse) ایجاد می‌کند که برای کاربردهای دارویی و مشابه آن بسیار مناسب است. علاوه بر آن؛ کنترل بیشتر روی ساختار دندریمرها، مخصوصاً گروه‌های پیرامونی آن می‌تواند باعث زیست سازگارپذیری بیشتر و کاهش سمیت این ماکرومولکول‌ها شود. گروه‌های سطحی می‌تواند موجب اتصال داروهای مختلف درمانی، پروب‌های (Probes) تصویربرداری و مولکول‌های هدف گیرنده (مثل آنتی‌بادی‌ها) شود. یک سیستم ایده‌آل دارورسانی از مواد یکسان، پایدار و غیر سمی تشکیل شده که اجزای چندگانه مانند دارو، ماده هدف گیرنده و حسگر فلورسنت را با هم هماهنگ می‌نماید [۱۰، ۱۱]. دندریمرها کاندیداهای بسیار مناسبی برای چنین سیستم‌هایی است زیرا سطح آن‌ها چندظرفیتی و قابل اصلاح و تعدیل است. نشان داده شده که ترکیب دارو- دندریمر محلولیت داروها در آب و نیمه عمر آن در پلاسما خون را افزایش می‌دهد [۱۲]. علاوه بر آن؛

سیستم‌های متراکم درخت مانند دندریمرها، می‌تواند برای هدف‌گیری تومورها با پدیده نفوذپذیری و ماندگاری بهینه شده یا (Enhanced Permeability and Retention) EPR که صفت اختصاصی برای بافت‌های توموری است به کار گرفته شود [۱۳].

استفاده از دندریمرها در دارورسانی بسیار مرسوم است. داروها و مولکول‌های کوچک با مکانیسم‌های مختلفی مانند اتصالات الکتروستاتیک، نیروهای هیدروفوب- هیدروفوب یا پیوندهای هیدروژنی در فضای داخلی دندریمر جای می‌گیرد. در این حالت دندریمر به عنوان یک میسل تک مولکولی (Uni-Molecular Micelle) عمل می‌نماید. اما این میسل رفتاری برخلاف میسل‌های معمولی دارد یعنی با عوامل محیطی مانند اثر حلال، اثر دما و اثر pH، کمتر دستخوش آسیب و از هم گسیختگی می‌شود. به علاوه شکل‌گیری آن‌ها وابسته به غلظت ویژه‌ای از دندریمر در محیط نخواهد بود ولی در مورد میسل‌های معمولی یک غلظت بحرانی یا (Critical Micelle) CMC (Concentration) برای شکل‌گیری میسل در محلول نیاز است که در کمتر از آن غلظت، میسل در محیط وجود نخواهد داشت [۱۰]. در واقع از دندریمرها (میسل‌های تک مولکولی) می‌توان برای افزایش داروهای کم محلول یا نامحلول در آب استفاده نمود. داروی هیدروفوب می‌تواند با مکانیسم جاذبه هیدروفوب- هیدروفوب وارد ساختار دندریمر شود. با توجه به این که مولکول دندریمر به واسطه داشتن گروه‌های قطبی در سطح خود، بسیار محلول در آب است، به همراه خود داروی کم محلول یا نامحلول را نیز وارد فاز آبی نمود و باعث افزایش محلولیت آن می‌شود.

در این تحقیق سعی می‌شود زیست‌دسترسی و پایداری بالاتری برای مولکول کورکومین با استفاده از روش‌های نانو (میسل‌ها، پلیمرزوم‌ها و دندریمرها) فراهم شود. اخیراً طهماسبی میرگانی و همکاران یک سامانه دندروزیومی برای افزایش اثر بخشی کورکومین را طراحی و استفاده کردند و نتایج موفقی در القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) در سلول‌های

### تعیین غلظت بحرانی تشکیل میسل

تعیین غلظت بحرانی تشکیل میسل (Critical Micelle Concentration: CMC) با کمک جابه‌جایی طیف جذبی پیرن از ۳۳۴ به ۳۳۹ نانومتر با دستگاه فلوریمتری (Perkin-Elmer Fluorimeter، آمریکا) انجام شد. برای این منظور محدوده‌ای از ۱-۰/۰۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از نانوذرات mPEG-OA درون محلول PBS (Phosphate Buffered Saline) (۰/۰۱ مولار، pH=۷/۴) با روش ساهو (Sahu) و همکاران بررسی شد [۱۵].

### بررسی بارگیری دارو در دندروزوم (میسل) / پلیمرزوم mPEG-OA

برای اندازه‌گیری میزان بارگیری دارو ابتدا از روش جو (Gou) و همکاران با کمی اصلاحات استفاده شد [۱۶]. نسبت‌های مختلفی از کورکومین از (دو تا ۲۵ میلی‌گرم) با مقدار ثابتی از میسل (۱۰۰ میلی‌گرم) درون استون حل شد و درون تبخیر کننده چرخان (Rotary Evaporator) در حال چرخش، استون بخار و مخلوط از صافی گذرانده شد و شدت جذب نور کورکومین در طول موج ۴۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروسکوپی نانودراپ (NanoDrop، آمریکا) خوانده شد و با منحنی استاندارد کورکومین که قبلاً تهیه شده بود مقادار سنجی شد.

### بررسی خواص فیزیکی: اندازه، شکل و پراکنش

#### اندازه نانوذرات دندروزوم (میسل) / پلیمرزوم mPEG-OA

مطالعات DLS (Dynamic Light Scattering) و AFM (Atomic Force Microscopy) برای تعیین شکل، اندازه و توزیع اندازه ذره‌ای PDI (Polydispersity Index) نانوذرات mPEG-OA انجام شد. اندازه و توزیع اندازه ذره‌ای (PDI) در محلول نمکی PBS (۰/۰۱ مولار، pH=۷/۴)

سرطان مثانه به‌دست آوردند [۱۴]. از این‌رو، در بخش اول این تحقیق، با تغییرات ساختاری شامل استفاده از منو متیل پلی اتیلن گلیکول [monomethyl Poly (Ethylene Glycol): mPEG] (وزن مولکولی ۲۰۰۰ دالتون) به جای دی متیل پلی اتیلن گلیکول (وزن مولکولی ۴۰۰ دالتون)، دندروزومی جدید طراحی و ساخته شد و در بخش دوم این تحقیق، حامل شاخه‌دار دندریمری پلی آمیدو آمین خریداری و سطح این دندریمر با اتصال پلی اتیلن گلیکول اصلاح شد. در هر دو بخش این تحقیق، تغییرات اثر ضد سرطانی این ماده با آزمون بررسی سمیت سلولی ارزیابی شد.

### مواد و روش‌ها

#### مواد

کورکومین، پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰، کلروفرم، پیرن و تری اتیل آمین از شرکت Merck (آلمان) و اولئیل کلرید، دندریمر PAMAM [Poly(amido amine)] نسل چهارم و پارا نیترو فنیل کلروفرمات (p-Nitrophenyl Chloroformate) از شرکت Sigma Aldrich (آمریکا) به‌صورت تجاری خریداری و بدون خالص‌سازی بیشتر پس از تهیه، استفاده شد. فیلتر آمیکون ۳۰۰۰ از شرکت Amicon (آمریکا) خریداری شد. تمامی حلال‌ها (کلروفرم، دی کلرومتان و متانل) با درجه خلوص بالا (مناسب برای سنتز) تهیه و استفاده شد.

#### سنتز دندروزوم (میسل) / پلیمرزوم نوین mPEG-OA

دندروزوم (میسل) / پلیمرزوم mPEG-OA (mPEG-OA) از واکنش mPEG و اولئیل کلرید (Oleate) یا OA، طراحی و سنتز شده است. حامل‌های دندروزوم (میسل) / پلیمرزوم نوین mPEG-OA طی واکنش استریفیکاسیون (Esterification) اولئیل کلرید و پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ در حضور تری اتیل آمین و کلروفرم به‌عنوان حلال سنتز شد. نتایج به‌وسیله اسپکتروسکوپی FTIR (Fourier Transform Infrared) (Perkin-Elmer، آمریکا) تأیید شد.

دندریمر، از ترکیب 4-NPC استفاده شد [۱۸]. PEG 2000 به همراه مقدار دو برابر وزنی از 4-NPC در دی کلرو متان حل شد و واکنش برای پنج روز در دمای آزمایشگاه در حضور چند قطره تری اتیلن آمین انجام شد. فعال سازی PEG با مقادیر ۰/۲ گرم از PEG و ۰/۴ گرم از 4-NPC انجام و برای جداسازی از روش رسوب PEG در ناحله دی اتیل اتر سرد استفاده شد. برای تهیه طیف H-NMR (H-Nuclear Magnetic Resonance)، نمونه واکنش داده در حلال D<sub>2</sub>O حل شد. درستی این سنتز توسط روش H-NMR ارزیابی و ثابت شد. برای اتصال مولکول های PEG 2000 فعال شده به آمین های سطحی PAMAM G4، دو نسبت مولی ۲۰ و ۴۰ درصد انتخاب شد. مقدار ۹ (برای نسبت مولی ۲۰) و ۱۸ میلی گرم (برای نسبت مولی ۴۰) از PEG فعال شده در ۵۰۰ میکرولیتر از حلال DMSO حل شده و به ۵ میلی گرم از PAMAM که در ۵۰۰ میکرولیتر DMSO حل شده بود و در حال هم خوردن بود، قطره قطره اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت پنج روز در دمای اتاق هم خورد و سپس با آب مقطر رقیق و وارد کیسه دیالیز (۱۲۰۰۰ دالتونی) شد. سپس برای پنج روز در مقابل آب دیونیزه دیالیز شد. فرآورده داخل کیسه دیالیز بعد از این مدت با استفاده از روش خشک کردن فریزری (Freeze Drying) خشک شد و تا زمان استفاده برای آزمایش های بعدی در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شد. درستی این سنتز توسط روش H-NMR ارزیابی شد.

### کشت سلولی و ارزیابی های سمیت سلولی

رده سلولی کارسینوما مغزی U87MG (U87 Human Glioblastoma Cell Line) از بانک سلولی انسیتو پاستور ایران خریداری شد سلول ها در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و یک درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین - استرپتومایسین و در شرایط انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی گراد و CO<sub>2</sub> ۵ درصد رشد داده شدند. فرمولاسیون های مختلف از دندروزوم (میسل / پلیمروزوم) نوین و کورکومین و

به وسیله دستگاه DLS (Zetasizer NanoZS, Malvern Instruments, آمریکا) در اشعه لیزر طول موج ۶۳۳ نانومتر و زاویه پراکنش ۹۰ درجه بررسی شد. شکل و اندازه نانوذرات همچنین به وسیله دستگاه AFM براساس روش درویشی و همکاران مطالعه شد [۱۷]. به این ترتیب که برای مطالعه AFM، مقدار یک میلی گرم از نمونه های سنتز شده در یک میلی لیتر آب دیونیزه حل و مجدداً توسط آب دیونیزه ۱۰۰ برابر رقیق شد. سپس حجم ۵ میکرولیتر از هر کدام از نمونه ها به روی یک ورقه ۱×۱ سانتی متری از میکا که در همان لحظه استفاده جدا شده بود (Freshly Cleaved Mica Sheet) اضافه شد و پس از انکوبه شدن به مدت ۵ دقیقه، ورقه میکا دو بار توسط ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر شستشو داده شد. سپس با استفاده از یک کاغذ از گوشه آن نمونه ها خشک شد و برای اطمینان از خشک شدن نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه نیز در معرض جریان ملایم هوا قرار داده شد و سپس نمونه ها فوراً برای بررسی های توپوگرافی توسط JPK AFM (JPK Instruments Co، آلمان) استفاده شد.

کانتیلور (Cantilever) مورد استفاده از نوع HYDRA6V-100N بود که ساخت شرکت Applied Nanostructures Inc (آمریکا) و دارای نوک مخروطی شکل بود. Force Constant آن برابر با ۰/۲۹۲ و N/m Resonance Frequency آن برابر با ۶۶ کیلوهرتز بود. سرعت اسکن کانتیلور برابر بود با ۱/۰۰ هرتز و set point در ۱/۰۰ ولت تنظیم شد. مقدار عامل IGain و PGain با توجه با شرایط نمونه و دستگاه بهینه شد تا بهترین عکس ها با کمترین نویز حاصل شود. عکس های حاصل توسط نرم افزار JPK بررسی و تجزیه و تحلیل شد (version spm- 3.4.15) (JPK Instruments Co، آلمان).

### فعال سازی PEG 2000 و اتصال به سطح

#### دندریمر PAMAM

برای اتصال مولکول متوکسی پلی اتیلن گلیکول به سطح



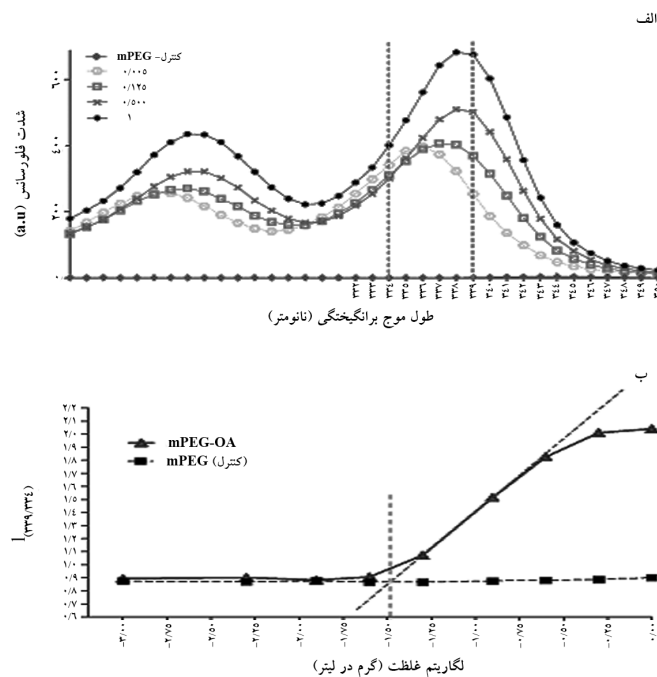
جذب ۳۳۹ به ۳۳۴ نانومتر) مقدار دقیق CMC ۰/۰۳ گرم در لیتر به دست آمد (شکل ۳). در شکل ۲ چهار سری از ده سری داده‌ها نمایش داده شده است تا در این تصویر، مشاهده تغییر طول موج برانگیختگی مولکول پیرن قبل و بعد از شکل‌گیری میسل‌ها ساده‌تر باشد.

بارگیری دارو نشان داد هرچند با افزایش غلظت دارو مقدار بارگیری کورکومین تا حدودی افزایش می‌یابد (شکل ۴ الف) ولی مقدار بارگیری شش درصد پایدار و تکرارپذیر تشخیص داده شد و کورکومین بعد از زمان طولانی در دمای اتاق یا یخچال رسوب نخواهد کرد (شکل ۴ ب). این نسبت برای تحقیقات بعدی در نظر گرفته و استفاده شد.

بخش (د) نمایش داده شده است. در واحدهای دو بخشی تشکیل دهنده این نانوساختارها قسمت‌های آب‌گریز اسید اولئیک و آب‌دوست پلی اتیلن گلیکول مشخص شده است. همچنین ساختار دندروزوم (میسل / پلیمرزوم) و چگونگی بارگذاری شدن مولکول آب‌گریز کورکومین به صورت شماتیک در شکل ۲ نمایش داده شده است. در این تصویر، یک میسل و یک پلیمرزوم نیز به صورت شماتیک نمایش داده شده است.

### تعیین CMC و بارگیری دارو در دندروزوم (میسل / پلیمرزوم) mPEG-OA

با کمک روش فلوریمتری و تغییر طیف جذبی پیرن (نسبت



شکل ۳ تعیین CMC نانوحامل mPEG-OA؛ (الف) نمایش چهار سری از ده سری داده‌ها به منظور سهولت مشاهده تغییر طول موج برانگیختگی مولکول پیرن قبل و بعد از شکل‌گیری میسل‌ها، (ب) نقطه CMC از محل تقاطع منحنی با نمودار کنترل (mPEG) حدود ۰/۰۳ گرم در لیتر به دست آمده است.

و (۵) AFM (شکل ۶) بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوذرات mPEG-OA از دو کلاس ذره‌ای تشکیل شده است، یک گروه میسل‌ها (Micelles) است که ابعادشان بین ۱۷ تا ۵۰ نانومتر

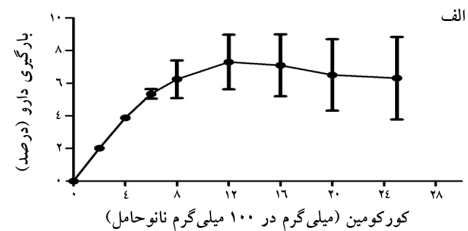
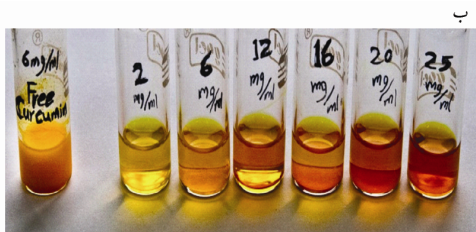
بررسی خواص فیزیکی نانوذرات دندروزوم (میسل / پلیمرزوم) mPEG-OA اندازه، شکل و توزیع اندازه ذره‌ای، با مطالعات DLS (شکل



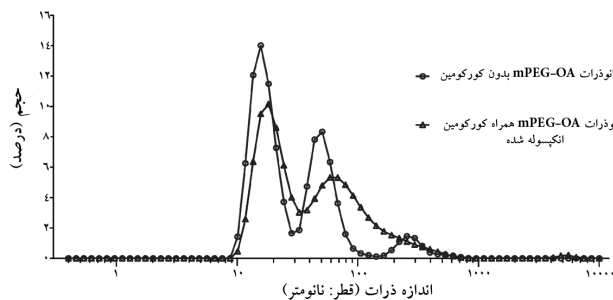
**طراحی، سنتز و مقایسه نانوحامل دندروزوم جدید و دندریمر PAMAM پیگله شده**

زیاد، در حد دهها برابر رقیق‌تر از غلظت CMC. میسل‌ها از بین می‌رود ولی پلیمرزوم‌ها پایدار می‌ماند و با اندازه‌های در حدود یکصد نانومتر دارای توزیع اندازه ذره‌ای (PDI) کمتر از ۰/۱ و بسیار یکنواخت‌تر می‌شود که از نظر دارویی بسیار مطلوب است.

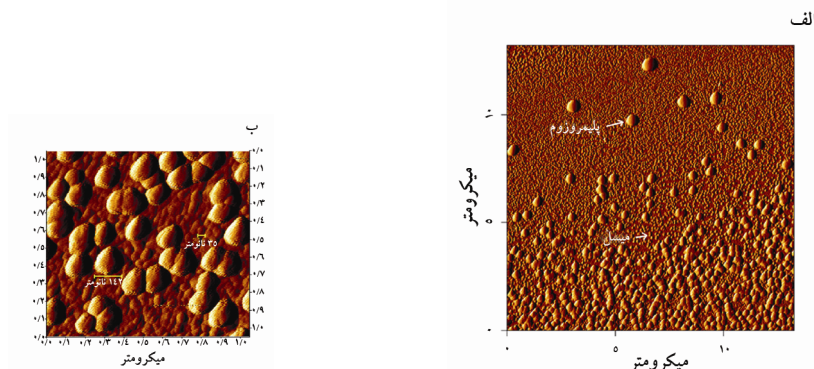
است و گروه دوم پلیمرزوم‌ها است که بزرگ‌تر از ۵۰ نانومتر است (شکل ۵ و ۶). با وجود این دو گروه، توزیع اندازه ذره‌ای (PDI) برای کل نانوذرات mPEG-OA کمتر از ۰/۳۵ اندازه‌گیری شد که بسیار کم و مناسب است. بعد از رقیق شدن



**شکل ۴** میزان کارایی بارگیری کورکومین در دندروزوم (میسل/ پلیمرزوم) mPEG-OA در نسبت‌های ۲ تا ۲۵ درصد وزنی؛ (الف) نمودار میزان کارایی بارگیری کورکومین در نانوحامل را نشان می‌دهد. در شکل دیده می‌شود که هر چند با افزایش میزان کورکومین بارگیری افزایش می‌یابد ولی بالاترین ثبات و تکرارپذیری مربوط به بارگیری در نقطه ۶ درصد است. همه آزمایش‌ها چهار بار تکرار شده است. (ب) بعد از ۳۰۰ روز دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) همچنان نانوذرات در ۶ درصد وزنی بارگیری کورکومین، پایداری بالایی نشان می‌دهد در حالی که در مقادیر بالاتر بارگیری، کمی رسوب زرد کورکومین مشاهده می‌شود.



**شکل ۵** تعیین اندازه و پراکنش اندازه نانوحامل mPEG-OA با روش دینامیک پراکنش نوری (DLS); دایره‌های قرمز در دیاگرام نشان دهنده نانوذرات mPEG-OA بدون کورکومین و مثلث‌های آبی رنگ نشان دهنده نانوذرات mPEG-OA همراه کورکومین است. به علت چند جمعیتی بودن نانوذرات از روش ترسیم اندازه براساس حجم (Volume %) استفاده شد.



**شکل ۶** تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) از نانوذرات دندروزوم (میسل/ پلیمرزوم) mPEG-OA حاوی کورکومین بارگذاری شده؛ (الف) در این تصویر ذرات کروی بزرگ‌تر پلیمرزوم‌ها و ذرات کروی کوچک، میسل‌ها است. (ب) عکسی در همان شرایط فقط با بزرگنمایی بیشتر که در آن ذرات کوچک‌تر (مثل ذره ۳۵ نانومتری) میسل‌ها و ذرات بزرگ‌تر (مانند ذره ۱۴۲ نانومتری) پلیمرزوم‌ها را نشان می‌دهد.

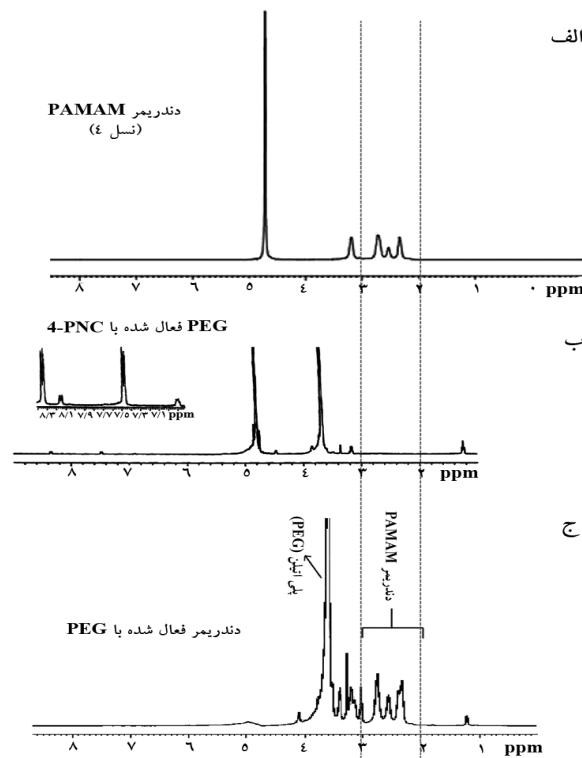
## فعال‌سازی PEG و اتصال به سطح دندریمر

### PAMAM

فعال‌سازی PEG 2000 و اتصال به سطح دندریمر PAMAM نسل چهار با موفقیت انجام شد. طیف  $^1\text{H-NMR}$  مولکول PAMAM G4-PEG در محیط  $\text{D}_2\text{O}$  درستی انجام واکنش را تأیید نمود (شکل ۷). نتایج NMR نسل چهارم

دندریمر PAMAM به این شرح است:

۳/۲۸-۳/۲۱ (۲۴۸) هیدروژن، باند چندگانه، ۲/۷۶-۲/۸۱ (۱۲۶) هیدروژن، باند چهارگانه پهن، ۲/۶۹-۲/۷۹ (۲۴۰) هیدروژن، باند چندگانه پهن، ۲/۵۸-۲/۶۱ (۲۴۷) هیدروژن، باند چندگانه پهن، ۲/۳۹-۲/۴۲ (۲۳۸) هیدروژن، باند چهارگانه پهن)



شکل ۷ طیف  $^1\text{H-NMR}$  مربوط به پلی اتیلن گلیکول اتصال یافته به دندریمر پلی آمیدوآمین نسل چهارم؛ (الف) طیف PAMAM خالص بدون واکنش که پیک‌های ۲ ppm تا ۳/۵ ppm را نشان می‌دهد. (ب) طیف پلی اتیلن گلیکول غیرفعال (پایین) و فعال شده (بالا) توسط نیتروفنیل کلرفرمات، پیک بلند تک شاخه در حوالی ۳/۸ ppm متعلق به هیدروژن‌های پل‌های تکراری اتیلن گلیکول در حضور دو پیک در ناحیه ۷/۵ ppm و ۸/۴ ppm متعلق به هیدروژن‌های آروماتیک حلقه فنیل 4-NPC نشان دهنده اتصال واسطه فعال‌سازی (4-NPC) به PEG است. (ج) طیف دندریمر فعال شده با پلی اتیلن گلیکول، پیک‌های ۲ ppm تا ۳/۵ ppm که مربوط به دندریمر است و پیک بلند هیدروژن‌های پلی اتیلن در حوالی ۳/۸ ppm که مربوط به PEG است، مشاهده می‌شود. پیک‌های ۷/۵ ppm و ۸/۴ ppm متعلق به واسطه فعال‌سازی (4-NPC) دیده نمی‌شود که نشان دهنده جدا شدن این ماده و انجام واکنش است.

۸/۴ ppm متعلق به هیدروژن‌های آروماتیک حلقه فنیل 4-NPC نشان دهنده اتصال واسطه فعال‌سازی (4-NPC) به PEG است. همچنین همان‌طور که بخش ج شکل ۷ دیده

در بخش ب شکل ۷ پیک (Peak) بلند تک شاخه در حوالی ۳/۸ ppm متعلق به هیدروژن‌های پل‌های تکراری اتیلن گلیکول در حضور دو پیک دو شاخه در ناحیه ۷/۵ ppm و

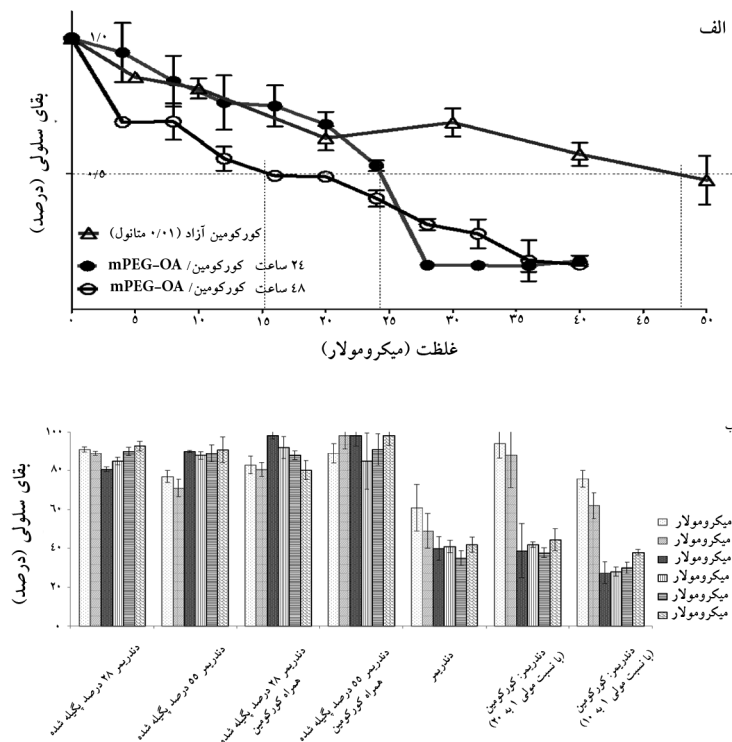
**طراحی، سنتز و مقایسه نانوحامل دندروزوم جدید و دندریمر PAMAM پیگیده شده**

شده و کورکومین (۰/۰۱ متانول) با روش آزمون سمیت سلولی MTT آثار کشندگی سلولی کورکومین در سلول‌های U87MG را افزایش داد. غلظت LD<sub>50</sub> برای نانوذرات دندروزوم (میسل/ پلیمرزوم) mPEG-OA حاوی کورکومین، ۱۶ میکرومولار برای تیمار ۴۸ ساعت، ۲۴ میکرومولار برای تیمار ۲۴ ساعت محاسبه شد (شکل ۸ الف). این در حالیست که کورکومین آزاد نیمی از سلول‌ها را در غلظت ۴۸ میکرومولار (تیمار ۲۴ ساعت) می‌کشد. از طرف دیگر ثابت شد که اتصال پلی اتیلن گلیکول به دندریمر به شدت از کشندگی این سلول‌ها کاسته است و در غلظت‌های مورد آزمایش سمیت قابل ملاحظه‌ای مشاهده نمی‌شود.

می‌شود در طیف به دست آمده از ماده حاصل از واکنش PEG فعال شده با PAMAM دندریمر، حضور پیک‌های ۲ ppm تا ۳/۵ ppm (مربوط به دندریمر) و پیک بلند پلی اتیلن در حوالی ۳/۸ ppm نشان دهنده اتصال PEG به دندریمر است. در محصول نهایی، پیک‌های ۷/۵ ppm و ۸/۴ ppm متعلق به واسطه فعال‌سازی (4-NPC) دیده نمی‌شود که نشان دهنده جدا شدن این ماده و انجام صحیح واکنش است.

**ارزیابی‌های سمیت سلولی**

فرمولاسیون‌های مختلف از نانوذرات دندروزوم (میسل/ پلیمرزوم) mPEG-OA و همچنین دندریمر و دندریمر پیگیده



**شکل ۸** ارزیابی سمیت سلولی با روش MTT؛ (الف) سمیت نانوذرات دندروزوم (میسل/ پلیمرزوم) mPEG-OA در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با کورکومین آزاد، (ب) سمیت نانوذرات دندریمری PAMAM با درصدهای مختلف پلی اتیلن گلیکول (PEG) سطحی در مقایسه با سمیت دندریمر PAMAM تنها و دندریمر PAMAM با کورکومین بارگذاری شده

حدود غلظت ۱۰ میکرومولار (محاسبه غلظت براساس وزن

همچنین مشخص شد که دندریمر PAMAM دارای LD<sub>50</sub>

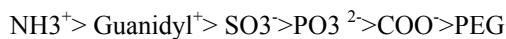
مولکولی ۱۴۲۱۴ گرم در مول دندریمر نسل چهارم) است و همچنین LD<sub>50</sub> کورکومین بارگذاری شده در دندریمر از ۴۸ میکرومولار بدون نانوحامل به ۱۳ میکرومولار برای نسبت یک مول دندریمر به ده مول کورکومین و ۱۷ میکرومولار برای نسبت یک مول دندریمر به بیست مول کورکومین کاهش یافت (شکل ۸ ب).

## بحث

با کمک نانوحامل‌های مورد استفاده در این تحقیق، افزایش زیست‌دستیابی کورکومین و در نتیجه افزایش فعالیت زیستی این مولکول نامحلول در آب حاصل می‌شود. این نانوحامل‌ها علاوه بر محلول کردن دارو باعث پایداری بیشتر در برابر تجزیه می‌شود که برای حفاظت از کورکومین ناپایدار بسیار ارزشمند خواهد بود. طهماسی میرگانی و همکاران نشان دادند نانوکورکومین دندروزومی با تغییر بیان ژن‌های دخیل در تکثیر، سلول‌های توموری را به سمت مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده هدایت می‌کند. با وجود کوچک‌تر بودن بخش PEG در دندروزوم مورد استفاده ایشان، نتایج این تحقیق با دندروزوم جدید mPEG-OA در مرگ سلول‌های سرطانی با یافته‌های ایشان مطابقت دارد [۱۴].

از طرف دیگر؛ سمیت سلولی نانوذرات دندریمرهای پگیله شده نسبت به دندریمر معمولی، آنقدر کاهش یافت که می‌توان گفت این ذرات، قادر به کشتن سلول‌های U87MG نبود. در تحقیق دیگری که توسط نویسندگان بررسی حاضر انجام شده گزارش شد که دندریمر در نسبت پگیله ۵۵ درصد توانسته است به اندازه دندروزوم mPEG-OA (دندروزومی مشابه با پلی اتیلن گلیکول کوچک‌تر ۴۰۰ دالتونی) روی سلول‌های T47D که سلول‌های توموری پستان انسانی ( Ductal breast carcinoma) هستند مؤثر واقع شده و باعث کاهش رشد و تکثیر آن‌ها شود. اما در این مطالعه نشان داده شده است که همه دندریمرهای پگیله شده برخلاف دندریمر تنها یا دندروزوم (میسل / پلیمرزوم) mPEG-OA به شدت غیرسمی

شده است. احتمالاً این به دلیل کاهش بار مثبت سطحی و در نتیجه کمتر شدن تأثیر گروه‌های آمین سطحی دندریمر بر سطح سلول‌ها است. در مطالعه ژو (Zhu) و همکارانش پتانسیل زتای نسل چهارم دندریمر PAMAM و اثر نسبت‌های مختلف پگیلاسیون بر پتانسیل زتا اندازه‌گیری شد. بر اساس آن‌ها پتانسیل زتای دندریمر (۰/۱۳ ± ۱۶/۵۶ میلی‌ولت) پس از اتصال ۱۶ و ۳۲ درصد PEG به ترتیب به ۰/۲۳ ± ۹/۶۲ و ۰/۱۱ ± ۶/۲۳ کاهش پیدا کرد [۱۹]. این نتایج کاهش بار سطحی بر اثر اتصال پلی اتیلن گلیکول را تأیید می‌نماید. همچنین این نتایج با نتایج سایر محققین مانند بواس (Boas) و همکاران مطابقت دارد زیرا در بسیاری از مطالعات برای کاهش اثر سمیت سلولی حامل‌های مورد استفاده از PEG استفاده می‌شود. بواس و همکاران [۲۰] توضیح می‌دهند که با اصلاح سطحی PEG می‌تواند LD<sub>50</sub> دندریمر تا حد ۱۰۰۰ میکرومولار (یک میلی‌مولار) روی سلول‌های اپیتلیالی (Caco-2 epithelial cells) افزایش یابد یعنی سمیت به‌طور کاملاً معنی‌داری کاهش می‌یابد. به‌طور کلی سمیت گروه‌های سطحی دندریمرها به شرح زیر است:



این کاهش سمیت با اصلاح سطحی دندریمرها احتمالاً مربوط به خنثی‌تر شدن بار سطحی آن‌ها است و بنابراین از برهمکنش‌های هیدروفوبیک و یونی با غشای سلول جلوگیری به عمل می‌آید، زمان گردش در سیستم بدن را افزایش داده و همچنین واکنش سیستم ایمنی بدن را به‌طور چشمگیری کاهش می‌دهد [۲۰]. افزایش محلولیت کورکومین در فرمولاسیون‌ها (غیر از فرمول‌های پگیله شده) موجب افزایش تأثیر ضد سرطانی کورکومین شده است. به‌طور مشابهی از مطالعه انجام یافته توسط نعمانی و همکاران مشخص است که در حضور دندریمر PAMAM نسل چهارم، محلولیت کورکومین نسبت به کورکومین تنها، کمی افزایش یافته است اما محلولیت کورکومین در حضور دندریمر پگیله شده و دندروزوم نتایج بسیار بهتری را نشان می‌دهد. دندریمر پگیله مخصوصاً در

نسبت ۵۵ درصد پیگیداسیون و دندروزوم، بهترین نتایج افزایش محلولیت کورکومین را در بین مشتقات دیگر حاصل نمود. در واقع محلولیت کورکومین به وسیله هر دو مشتق به میزان ۵/۵ برابر نسبت به کورکومین در مخلوط ۱۰ درصد آب: اتانل بیشتر شد.

از مجموع بررسی‌های صورت گرفته در مطالعه انجام شده، فرمولاسیون دندروزوم (میسسل/ پلیمرروزوم) mPEG-OA به عنوان فرمولاسیون بهینه معرفی می‌شود اما با این‌که دندروزوم (میسسل/ پلیمرروزوم) mPEG-OA بهترین نتایج را نشان می‌دهد، براساس یافته‌های این تحقیق فرمولاسیون جدیدی برای ادامه تحقیقات پیشنهاد شد که در آن از دندریمر PAMAM و اتصالات محکم کوالانی استفاده شود زیرا هر چند مطالعات بسیاری در انکپسوله کردن داروها انجام شده و در حال انجام است ولی به نظر می‌رسد در مواقعی که برهمکنش‌ها تنها براساس نیروهای بین مولکولی مانند نیروهای الکترواستاتیکی یا واندروالسی باشد، بر اثر رقابتی که نمک موجود در سرم خون (۰/۹ گرم در لیتر) با مولکول بارگذاری شده دارد، دارو قبل از رسیدن به بافت هدف در پلاسما خون رها می‌شود و اثر بخشی مطلوب را نخواهد داشت. ولی اگر حامل نانو یک مولکول بزرگ محلول در آب باشد و کورکومین با پیوند کوالانی قابل تجزیه در سلول‌ها به آن متصل شود آن‌گاه می‌توان انتظار اثر ضد سرطان کارآمدتری را از فرمولاسیون نانویی داشت. بدین منظور این روش با پلیمرهای شاخه‌دار دندریمری PAMAM در تحقیقات بعدی در نظر گرفته شد و مطالعات در این زمینه در حال انجام است.

به‌طور مثال، گروه فرچت (Frechet) دو نوع مختلف گروه‌های عاملی، زنجیره‌های کوتاه پلی اتیلن گلیکول (PEG) و داروی مدل کلسترول را روی سطح یک دندریمر با اتصال کوالانی متصل نمود. ایشان نشان دادند که عملکرد گروه‌های عاملی PEG، افزایش محلولیت در آب، پایداری و ماندگاری طولانی در پلاسما خون و گروه‌های عاملی دیگر نقش دارویی خواهد داشت [۲۱]. این سیستم‌ها نشان می‌دهد می‌توان چندین گروه عاملی روی سطح دندریمرها قرار داد که شامل

مولکول‌های دارو و گروه‌های عاملی دیگر برای افزایش محلولیت و در نهایت هدفمندسازی آن‌ها است [۲۲]. در این تحقیق دندروزوم نوین (میسسل/ پلیمرروزوم) mPEG-OA در شکل، اندازه و توزیع اندازه ذره‌ای آن (PDI) بسیار مناسب بود و می‌تواند حامل مناسبی برای دارورسانی به حساب آورده شود؛ ولی برای طراحی کارآمدتر و هوشمندتر، دندریمرها با داشتن گروه‌های سطحی فراوان (به عنوان مثال ۶۴ گروه آمینی روی سطح PAMAM نسل چهارم) پتانسیل عملی بالاتری دارد و با توجه به این‌که مشکلاتی که قبلاً پیش روی تهیه پلیمرها بوده با تکامل روش‌های سنتز برطرف شده است [۲۳] اکنون می‌توان دندریمرهای مختلفی با مدل دلخواه خود طراحی نمود و برای کاربردهای متعددی در زمینه‌های گوناگون استفاده کرد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اتصال گروه عاملی PEG به سطح دندریمر PAMAM به شدت سمیت این دندریمر را کاهش داده، در حالی‌که نتایج تأیید کرد که قدرت رسانش کورکومین و نفوذ آن به داخل سلول همانند تیمار کورکومین بارگذاری شده در دندریمر بدون گروه PEG، بسیار بالا است. بنابراین با توجه به خاصیت ذاتی کورکومین در ردیابی سلول‌های سرطانی و کشتن آن‌ها، پیشنهاد می‌شود اتصال همزمان کورکومین و PEG هر کدام به تعداد ۲۰ درصد از ۶۴ گروه آمینی سطحی دندریمر PAMAM در تحقیقات بعدی بررسی شود. احتمالاً این فرمول می‌تواند با کاهش سمیت دندریمر، افزایش پایداری و زمان در گردش و از همه مهم‌تر افزایش محلولیت بسیار زیاد ایجاد شده، نتایج بسیار موفقی در نابودی سلول‌های سرطانی با کمک پدیده انتشار EPR (Enhanced Permeability and Retention Effect) داشته باشد.

## تشکر و قدردانی

کلیه امکانات و حمایت‌های مالی این پروژه توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پژوهشگران جوان و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان تأمین شده است و بدین وسیله قدردانی ویژه از ایشان به عمل می‌آید.

## 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] Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Lett* 2008; 267(1): 133-64.
- [3] Li Z, Percival SS, Bonard S, Gu L. Fabrication of nanoparticles using partially purified pomegranate ellagitannins and gelatin and their apoptotic effects. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55(7): 1096-103.
- [4] Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, Lin JK. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal* 1997; 15(12): 1867-76.
- [5] Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004; 44(2): 97-111.
- [6] Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 2005; 41(13): 1955-68.
- [7] Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 2008; 75(4): 787-809.
- [8] Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discov Today* 2012; 17(1-2): 71-80.
- [9] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 2007; 4(6): 807-18.
- [10] D'Emanuele A, Attwood D. Dendrimer-drug interactions. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(15): 2147-62.
- [11] Wiener EC, Konda S, Shadron A, Brechbiel M, Gansow O. Targeting dendrimer-chelates to tumors and tumor cells expressing the high-affinity folate receptor. *Invest Radiol* 1997; 32(12): 748-54.
- [12] Patri AK, Kukowska-Latallo JF, Baker JR Jr. Targeted drug delivery with dendrimers: comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(15): 2203-14.
- [13] Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, Lorenz K, Frey H, Weener JW, Meijer EW, Paulus W, Duncan R. Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J Control Release* 2000; 65(1-2): 133-48.
- [14] Tahmasebi Mirgani M, Sadeghizadeh M, Najafi F, Mowla SJ. Dendrosomal curcumin induced apoptosis by suppression of pluripotency genes in 5637 bladder cancer cells. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology* 2013; 16(1): 23-39. (Persian)
- [15] Sahu A, Bora U, Kasoju N, Goswami P. Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. *Acta Biomater* 2008; 4(6): 1752-61.

- [16] Gou M, Men K, Shi H, Xiang M, Zhang J, Song J, Long J, Wan Y, Luo F, Zhao X, Qian Z. Curcumin-loaded biodegradable polymeric micelles for colon cancer therapy in vitro and in vivo. *Nanoscale* 2011; 3(4): 1558-67.
- [17] Darvishi MH, Nomani A, Amini M, Shokrgozar MA, Dinarvand R. Novel biotinylated chitosan-graft-polyethyleneimine copolymer as a targeted non-viral vector for anti-EGF receptor siRNA delivery in cancer cells. *Int J Pharm* 2013; 456(2): 408-16.
- [18] Luo D, Kraig H, Belcheva N, Han E, Saltzman WM. Poly(ethylene glycol)-conjugated PAMAM dendrimer for biocompatible, high-efficiency DNA delivery. *Macromolecules* 2002, 35(9): 3456-62.
- [19] Zhu S, Hong M, Zhang L, Tang G, Jiang Y, Pei Y. PEGylated PAMAM dendrimer-doxorubicin conjugates: in vitro evaluation and in vivo tumor accumulation. *Pharm Res* 2010; 27(1): 161-74.
- [20] Boas U, Christensen JB, Heegaard PMH. *Dendrimers in medicine and biotechnology: new molecular tools*. 2006; Available at: <http://www.springer.com/chemistry/organic+chemistry/book/978-0-85404-852-6>
- [21] Liu M, Kono K, Frechet JMJ. Water-soluble dendrimer-poly(ethylene glycol) starlike conjugates as potential drug carriers. *J Polym Sci A Polym Chem* 1999, 37(17): 3492-503.
- [22] Hourani R, Kakkar A. Advances in the elegance of chemistry in designing dendrimers. *Macromol Rapid Commun* 2010; 31(11): 947-74.
- [23] Gillies ER, Dy E, Fréchet JM, Szoka FC. Biological evaluation of polyester dendrimer: poly(ethylene oxide) "bow-tie" hybrids with tunable molecular weight and architecture. *Mol Pharm* 2005; 2(2): 129-38.