



Promoting the Effects of Curcumin Toxicity on Different Cancer Cell Lines by Developing the β -Cyclodextrin-Curcumin Inclusion Complex

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Roozbehi S.¹ MSc,
Dadashzadeh S.² PhD,
Sajedi R.^{*1} PhD

How to cite this article

Roozbehi S, Dadashzadeh S, Sajedi R. Promoting the Effects of Curcumin Toxicity on Different Cancer Cell Lines by Developing the β -Cyclodextrin-Curcumin Inclusion Complex. Pathobiology Research. 2019;22(4):211-220.

¹Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
²Department of Pharmaceutics & Nanotechnology, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 82884717
Fax: +98 (21) 82884717
sajedi_r@modares.ac.ir

Article History

Received: January 20, 2020
Accepted: May 10, 2020
ePublished: June 8, 2020

ABSTRACT

Aims Curcumin (CUR) is a hydrophobic polyphenol compound and possesses a wide range of biological applications including cancer therapy. However, its prominent application in cancer treatment is limited due to poor solubility and bioavailability. Cyclodextrins (CDs) as natural nanocapsules are comprised of glucose units. One of the characteristics of them is to create complex with hydrophobic guest molecules in nanopores. In the current study, in order to improve the solubility, bioavailability, and efficacy of CUR, β -cyclodextrin-curcumin (β -CD-CUR) inclusion complexes were prepared and its effect on cancer and normal cells was examined.

Materials & Methods In this study, first, β -CD-CUR complexes were prepared using freeze-drying method and the formation of these complexes was characterized by fluorescence spectroscopy. The encapsulation efficiency of CUR in β -CD was calculated for each concentration. After investigating the release of CUR from β -CD at different temperatures, the therapeutic effects of β -CD-CUR inclusion complexes for cancer and normal cell lines were evaluated by MTT assay.

Findings The CUR encapsulation efficiency in β -CD was $33.92 \pm 1.32\%$. Fluorescence spectroscopic studies confirmed the formation of stable inclusion complex. The results also showed that CUR release from β -CD was higher in thermal conditions of cancer cells (42°C) than in normal cells and ambient temperatures. The results of MTT assay depicted that encapsulated CUR in β -CD has a significant inhibitory effect on proliferation of cancer cells compared to free CUR.

Conclusion The results provided acceptable evidence for cell proliferation inhibition of β -CD-CUR complexes on cancer cells. There were no adverse effects detected for normal cells.

Keywords Curcumin; β - cyclodextrin; Inclusion Complexes; Cancer

CITATION LINKS

[1] Epidemiology and histopathology ... [2] Effects of chemotherapy ... [3] Ligand-targeted therapeutics in ... [4] Complementary and alternative medicine ... [5] Prescription pattern of Chinese herbal ... [6] Nanotechnology in ... [7] Nanoparticle delivery of natural products in the prevention ... [8] The effect of curcumin on breast ... [9] Curcumin as "Curecumin": From kitchen ... [10] Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic ... [11] Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and ... [12] Advances in nanotechnology-based delivery systems ... [13] Curcumin and cancer: An "old-age" disease with an ... [14] Different strategies to overcome multidrug resistance ... [15] Curcumin nanoformulations: A review of ... [16] Fluorescence enhancement of curcumin upon inclusion ... [17] Self-assembled cyclodextrin aggregates and ... [18] Cyclodextrins and their uses: A ... [19] Inclusion compounds in water: Thermodynamics ... [20] Synthesis and pharmacological evaluation of ... [21] Cyclodextrins as a potential carrier in drug ... [22] Cyclodextrins in drug delivery: An ... [23] β -Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery ... [24] The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to ... [25] Fluorescence enhancement of benzene derivatives by forming ... [26] Polymeric nanoparticle-encapsulated ... [27] Normal and twisted intramolecular charge-transfer ... [28] Dual AO/EB staining to detect apoptosis in ... [29] Study on the inclusion complex between ... [30] Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold ... [31] Influence of α - and γ -cyclodextrin lipophilic derivatives on ... [32] Cyclodextrin complexes: An approach to improve the physicochemical ... [33] Synthesis and inclusion study of a novel ... [34] Electrospinning of cyclodextrin functional ... [35] Effect of buffer species on the ... [36] Factors affecting the clearance and ... [37] The solubility-permeability interplay ... [38] Characterization of curcumin/cyclodextrin ... [39] Curcumin: A review of anti-cancer properties ... [40] Curcumin and cancer cells ... [41] Effect of curcumin on normal and tumor...

ارتقای اثرات سمیت کورکومین روی رده‌های سلولی سرطانی مختلف با ایجاد کمپلکس گنجایشی β -سیکلودکسترین-کورکومین

سحر روزبهی MSc

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

سیمین داداش‌زاده PhD

گروه داروسازی و نانوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید

بهشتی، تهران، ایران

رضا حسن‌ساجدی PhD

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

چکیده

اهداف: کورکومین (CUR)، یک ترکیب پلی‌فنولی آب‌گریز و دارای طیف گسترده‌ای از کاربردهای بیولوژیکی از جمله درمان سرطان است. اما کاربرد برجسته آن در معالجه سرطان به دلیل حلالیت و فراهمی زیستی ضعیف محدود شده است. سیکلودکسترین‌ها (CDs) نانوکپسول‌های طبیعی تشکیل‌شده از واحدهای گلوکوزی هستند که یکی از خصوصیات آنها ایجاد کمپلکس با مولکول‌های مهمان آب‌گریز در نانوحفره خود است. در مطالعه حاضر، به‌منظور بهبود حلالیت، فراهمی زیستی و اثربخشی کورکومین، کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترین-کورکومین تهیه و اثر آن روی سلول‌های سرطانی و نرمال بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ابتدا کمپلکس‌های β -سیکلودکسترین-کورکومین توسط روش فریزدرای تهیه و تشکیل این کمپلکس‌ها توسط طیف‌سنجی فلوروسانس بررسی شد. سپس بازده انکیپسولاسیون کورکومین در β -سیکلودکسترین در هر غلظت محاسبه شد. بعد از بررسی رهایش کورکومین از β -سیکلودکسترین در دماهای مختلف، میزان تاثیرگذاری این کمپلکس‌ها روی سلول‌های سرطانی و سالم با استفاده از آزمون MTT بررسی شد.

یافته‌ها: بازده کپسوله‌سازی کورکومین در β -سیکلودکسترین $33\% \pm 9.2$ بود. مطالعات طیف‌سنجی فلوروسانس تشکیل یک کمپلکس گنجایشی پایدار را تایید کرد. نتایج نشان داد که رهایش کورکومین از β -سیکلودکسترین در شرایط دمایی سلول‌های سرطانی (42°C) نسبت به سلول‌های سالم و دمای محیط بیشتر است. نتایج آزمون MTT نشان داد که کورکومین کپسوله‌شده در β -سیکلودکسترین اثر مهارکنندگی چشمگیری نسبت به کورکومین آزاد بر تکثیر سلول‌های سرطانی دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج، شواهد قابل قبولی را در مورد اثر بازدارنده تکثیر سلولی کمپلکس‌های β -سیکلودکسترین-کورکومین، روی رده‌های سرطانی نشان داد، در حالی که اثر قابل توجهی روی سلول‌های سالم مشاهده نشد.

کلیدواژه‌ها: کورکومین، β -سیکلودکسترین، کمپلکس‌های گنجایشی، سرطان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۱

نویسنده مسئول: sajedi_r@modares.ac.ir

مقدمه

آمار سرطان با بالا رفتن پایدار نرخ رشد و پیری، به‌طور پیوسته در حال افزایش است و امروزه یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر در جهان مربوط به همین بیماری است [1]. به‌منظور درمان سرطان‌ها، راهکارهای مختلفی از قبیل جراحی، رادیودرمانی و شیمی‌درمانی

استفاده می‌شوند که در این بین شیمی‌درمانی با وجود داشتن محدودیت‌هایی از قبیل هدفمند نبودن داروهای آن، نیازمند بودن به دوزهای بالای دارو برای مبارزه با سلول‌های سرطانی، مقاومت دارویی و عوارض جانبی متعدد، هنوز هم یکی از روش‌های درمانی موثر در مبارزه با سلول‌های سرطانی به شمار می‌آید [2]. عوارض قلبی، ناول‌زایی، آلپوسی، تاثیرات مخرب بر مغز و استخوان و غیره از جمله عوارض جانبی ناخواسته حاصل از داروهای رایج شیمی‌درمانی هستند که هر ساله گریبان شمار زیادی از بیماران مبتلا به سرطان را می‌گیرند [3]. بنابراین تحقیقات گسترده‌ای در همه علوم برای یافتن راه‌هایی در راستای کاهش این آثار و بالابردن نسبت درمان در حال انجام است.

یکی از راهکارهای مورد توجه پژوهشگران برای کاهش محدودیت‌های استفاده از شیمی‌درمانی، استفاده از ترکیبات سیتوتوکسیک استخراج‌شده از گیاهان به جای داروهای رایج شیمی‌درمانی است تا از این طریق بتوانند ضمن کاهش عوارض جانبی شیمی‌درمانی، کارایی این درمان آنتی‌نئوپلاستی را در مبارزه با سلول‌های سرطانی افزایش دهند [4, 5]. اما از دیگر روش‌هایی که در سال‌های اخیر مورد توجه و استفاده قرار گرفته ارسال دارو به تومور است که شامل کپسوله کردن دارو در یک ماده زیست‌سازگار و ارسال آن به محل تومور و آزادسازی در محل سلول‌های سرطانی است [6, 7].

کورکومین ماده موثر استخراج‌شده از ریشه زردچوبه است و حلالیت آبی پایینی دارد [8]. کورکومین در بیماری‌هایی مانند روماتیسم، اختلالات کبدی و صفراوی، التهاب، ناراحتی‌های عصبی و قلبی و عروقی در طب سنتی رایج استفاده می‌شود [9, 10]. مطالعات نشان داده‌اند که کورکومین می‌تواند بر طیف وسیعی از سرطان‌ها نظیر سرطان خون، مغز و سینه موثر باشد. القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و مهار تکثیر چرخه سلولی، مکانیزم اصلی این ماده در مرگ سلول‌های سرطانی است. کورکومین با مکانیزم عمل خود در مهار رگ‌زایی، متاستاز و چرخه سلولی، همچنین به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان قوی، اثرات درمانی خود را در مهار سرطان اعمال می‌کند. از مزایای استفاده از کورکومین می‌توان این نکته را برشمرد که حتی در دوزهای بالا برای سلول‌های سالم، سمیتی به همراه ندارد [11, 12]. کورکومین می‌تواند با کاهش بیان پروتئین‌های دخیل در مقاومت دارویی چندگانه، نقش یک تعدیل‌کننده مقاومت دارویی را اجرا کند [13, 14]. در مقابل، جذب دهانی پایین کورکومین، انحلال‌پذیری پایین آن در شرایط اسیدی و خنثی، حذف سریع آن از سیستم گردش خون و پایین آمدن زیست در دسترس‌پذیری آن، از چالش‌های پیش روی استفاده از این ترکیب گیاهی سیتوتوکسیک است [15]. رفع این مشکلات تحقیقات بسیار زیادی انجام شده است که در آنها از مواد زیست‌سازگار در بدن به‌عنوان حامل برای کورکومین استفاده کرده‌اند. یکی از حامل‌های مفید، نانوکپسول‌های سیکلودکسترینی هستند که می‌توانند بر بسیاری از مشکلات پیش

حل شد. سپس مقادیر برابری از کورکومین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در ۷۰ میکرولیتر استون حل و به‌صورت قطره‌قطره به بشرهای حاوی β -سیکلودکستین در حال چرخش اضافه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای محیط استیر شد. همه بشرها با فویل آلومینیومی پوشانده شدند و به‌منظور تبخیر شدن استون در یک محیط تاریک و بدون درپوش قرار گرفتند. پس از ۱۶ ساعت که یک محلول شفاف به دست آمد، این محلول به مدت ۵ دقیقه و با دور $2300 \times g$ سانتریفیوژ و مایع رویی حاوی کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکستین-کورکومین محلول با استفاده از روش خشک‌کردن انجمادی خشک شد. این کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکستین-کورکومین در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شدند. پس از آماده‌سازی این کمپلکس‌ها به‌منظور بررسی حلالیت کورکومین، ترکیبات β -سیکلودکستین، کورکومین، ترکیب فیزیکی β -سیکلودکستین-کورکومین و کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکستین-کورکومین (با غلظت کورکومین یکسان) به‌صورت جداگانه در بافر PBS حل شدند و حلالیت آنها بررسی شد.

بررسی بازده کپسوله‌سازی کورکومین در نانوکپسول‌های β -سیکلودکستین

برای محاسبه بازده کپسوله‌سازی کورکومین، ۱ میلی‌گرم از کمپلکس گنجایشی β -سیکلودکستین-کورکومین در ۵ میلی‌لیتر DMSO حل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط و در تاریکی به آرامی هم زده شد. پس از ۲۴ ساعت محلول DMSO که حاوی کورکومین خارج‌شده از β -سیکلودکستین و β -سیکلودکستین است، به‌منظور حذف β -سیکلودکستین‌ها به مدت ۵ دقیقه و با دور $10000 \times g$ سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی شفاف DMSO که حاوی کورکومین است جدا شد. جذب کورکومین موجود در این محلول توسط دستگاه طیف‌سنجی فرابنفش در ۴۲۱ نانومتر اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی کالیبراسیون غلظت کورکومین در محلول نهایی مشخص شد. به‌منظور رسم منحنی استاندارد غلظت‌های متفاوتی از کورکومین (صفر تا ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در DMSO تهیه شد. جذب این محلول‌ها با استفاده از روش اسپکتروسکوپی، در طول موج ۴۲۱ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمودار جذب بر حسب غلظت این محلول‌ها رسم شد و در مطالعات رهایش دارو و سایر مطالعات مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت بازده کپسوله‌سازی کورکومین در β -سیکلودکستین با استفاده از معادله زیر محاسبه شد [23].

معادله ۱

$$\times 100 = \frac{\text{غلظت داروی انکپسوله‌شده}}{\text{غلظت داروی اولیه}} = \text{بازده کپسوله‌سازی دارو (درصد)}$$

مطالعه برهم‌کنش بین کورکومین و β -سیکلودکستین در کمپلکس‌های گنجایشی از طریق طیف‌سنجی فلوئورسانس
تشکیل کمپلکس گنجایشی میان کورکومین و β -سیکلودکستین از طریق طیف‌سنجی فلوئورسانس مورد بررسی قرار گرفت. بررسی

روی رسانش داروهای سیتوتوکسیک گیاهی به بافت‌های هدف غلبه کنند و با ارایه راهکارهای نوین در دارورسانی، داروهای آنتی‌نئوپلاسم را به‌صورت موثرتری در اختیار بافت‌های سرطانی قرار دهند [16].

سیکلودکستین‌ها (CDs) نوعی نانوکپسول‌های حلقوی از جنس الیگوساکارید هستند که می‌توانند توده‌هایی در اندازه نانو در محیط‌های آبی تشکیل دهند. سه نوع α ، β و γ بیشترین کاربرد را دارند که به ترتیب دارای ۶، ۷ و ۸ واحد گلوکز هستند. در این میان، β -سیکلودکستین به‌دلیل قیمت پایین، سازگاری بهتر با بدن انسان و واکنش‌های ساده‌تر نسبت به دو نوع دیگر به‌طور گسترده‌تری مورد توجه پژوهشگران این حوزه قرار گرفته است [17].
[18]. سیکلودکستین‌ها دارای خصوصیات ساختاری منحصر به فردی هستند. ساختار سیکلودکستین‌ها به شکل یک مخروط ناقص است که دارای یک سطح آب‌دوست خارجی و یک حفره داخلی آب‌گریز هستند. مهم‌ترین خصوصیت سیکلودکستین‌ها توانایی تشکیل کمپلکس‌های گنجایشی جامد با طیف وسیعی از ترکیبات جامد، مایع و گاز (آب‌گریز) است [19]. در این کمپلکس‌ها مولکول مهمان درون نانوحفره سیکلودکستین میزبان نگه داشته یا گنجانده می‌شود. این فرآیند "در هم جای گرفتن" نامیده می‌شود. بنابراین، به‌دلیل توانایی منحصر به فرد این سوپرماکرومولکول‌ها در جای‌دادن مولکول‌ها در حفره داخلی خود و نیز خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی دیگر آنها، سیکلودکستین‌ها و مشتقات آنها در سیستم‌های دارورسانی کاربرد وسیعی پیدا کرده‌اند [20، 21]. از این نانوکپسول‌ها می‌توان برای بهبود انحلال، پایداری، افزایش فعالیت بیولوژیکی داروها و همچنین کاهش اثرات جانبی و سمیت داروها استفاده کرد [22]. پژوهش حاضر با هدف تهیه فرمولاسیونی برای کورکومین انجام گرفته است که بتواند به‌صورت زیست‌سازگار و پایدار در بدن عمل کند. بنابراین ابتدا از β -سیکلودکستین به‌عنوان حاملی برای کورکومین در جهت ساخت کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکستین-کورکومین استفاده شد، سپس ورود ترکیب کورکومین به درون حفره β -سیکلودکستین، حلالیت کورکومین و بازده کپسوله‌سازی (EE) کورکومین در β -سیکلودکستین بررسی شد. آنگاه رفتار سلول‌های سرطانی مختلف SKBR3، BT474، MCF-7 و Huh-7 در مقایسه با سلول‌های نرمال L929 تحت تیمار با کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکستین-کورکومین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکستین-کورکومین

برای تهیه کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکستین-کورکومین با حداکثر نسبت بارگیری دارو، ابتدا مقادیر مختلفی از β -سیکلودکستین (صفر تا ۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌صورت جداگانه در آب دیونیزه در یک بشر حاوی مگنت در حال چرخش

آب فورمازان است [24]. بدین منظور، سلول‌ها با تعداد بهینه‌شده ۵۰۰۰ سلول برای رده‌های MCF-7 و Huh-7، ۲۰۰۰ سلول برای رده سلولی نرمال L929 و ۱۰۰۰۰ سلول برای رده‌های سلولی SKBR3 و BT474 در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه با حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل اختصاصی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس غلظت‌های دارویی (کورکومین آزاد و کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترین-کورکومین با غلظت کورکومین ۸۰-۱۰۰ میکرومولار) به هر چاهک اضافه شد. هر غلظت به‌صورت تکرار سه‌تایی مورد آزمایش قرار گرفت. پس از مدت زمان مورد نظر (۴۸ و ۷۲ ساعت برای این رده‌های سلولی)، ۱۰۰ میکرولیتر معرف MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (حل‌شده در بافر PBS) به هر چاهک اضافه و پلیت ۹۶ خانه در انکوباتور 37°C با ۵٪ دی‌اکسیدکربن به مدت ۴ ساعت نگهداری شد. سپس چاهک‌ها تخلیه شدند و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه و پس از ده دقیقه قرارگرفتن روی شیکر، جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط پلیت ریدر μQuant (BioTek؛ ایالات متحده) برای هر چاهک خوانده شد. درصد سمیت و بقای سلولی با استفاده از معادله‌های ۲ و ۳ محاسبه شدند:

معادله ۲

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب سلول‌های تیمارشده} - 1}{\text{میانگین جذب سلول‌های کنترل}} = \text{سمیت سلولی (درصد)}$$

معادله ۳

$$\text{درصد سمیت سلولی} = 100 - \text{بقای سلولی (درصد)}$$

داده‌ها به‌صورت میانگین آماری از سه آزمایش مستقل ارائه شدند.

رنگ‌آمیزی هسته با اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید

ابتدا سلول‌های MCF-7 در پلیت ۱۲ خانه‌ای به تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول با حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر محیط کشت کامل اختصاصی کشت داده شدند. پلیت ۱۲ خانه در انکوباتور 37°C با ۵٪ دی‌اکسیدکربن نگهداری شدند. پس از اتصال سلول‌ها به سطح فلاسک و رسیدن به مورفولوژی با نمونه‌های کورکومین آزاد و کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترین-کورکومین با غلظت کورکومین ۳۵ میکرومولار برای ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از این مدت سلول‌ها با ۲۰ میکرولیتر محلول اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید (نسبت حجمی ۱:۱ هر کدام از رنگ‌ها) با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رنگ‌آمیزی شدند و سپس با میکروسکوپ فلوروسانس مورد عکس‌برداری و بررسی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل انجام شدند. برای تعیین میانگین و انحراف معیار و رسم نمودارها از بسته‌های نرم‌افزاری Excel 2016 و GraphPad Prism 6 استفاده شد.

اندازه‌گیری تغییرات شدت فلوروسانس کورکومین در اثر افزودن β -سیکلودکسترین و تشکیل کمپلکس کورکومین با β -سیکلودکسترین در دمای اتاق، در طول موج برانگیختگی ۴۲۱ نانومتر و محدوده طول موج نشر از ۴۳۰ تا ۷۰۰ نانومتر انجام شده است.

مطالعه رهایش کورکومین از کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترین-کورکومین

مقدار رهایش کورکومین از کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترین-کورکومین در شرایط در شیشه به وسیله روش طیف‌سنجی فلوروسانس انجام شد. ۸ میلی‌گرم از کمپلکس‌های گنجایشی بتاسیکلودکسترین-کورکومین که حدوداً حاوی ۲۰۰ میکروگرم کورکومین است با بافر فسفات ($\text{pH} = 7.4$) به حجم ۴ میلی‌لیتر رسید و در دمای ۲۵، ۳۷ و 42°C به آرامی هم زده شد. سپس آزمایش رهایش دارو در فواصل زمانی ۱۰-۵/ ساعت انجام گرفت. در بازه‌های زمانی متفاوت مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از هر نمونه برداشته و نشر آن در ۴۲۱ نانومتر توسط دستگاه فلوروسانس اسپکتروسکوپی اندازه‌گیری شد. نمونه‌گیری تا زمان رسیدن به نشر ثابت ادامه پیدا کرد.

کشت سلولی

در مطالعه حاضر، سلول‌های سرطان سینه انسانی HER2 منفی (MCF7)، سلول‌های سرطان سینه انسانی HER2 مثبت (SKBR3 و BT474) و سلول‌های سرطان کبد انسانی (Huh-7) به همراه یک رده سلولی غیرسرطانی فیبروبلاست موشی (L929) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. رده‌های سلولی Huh-7، SKBR3 و L929 در محیط کشت H-DMEM، رده سلولی MCF7 در محیط کشت DMEM/F12 و رده سلولی BT474 در محیط کشت RPMI1640 شامل ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱٪ پنی‌سیلین-استرپتومایسین به‌صورت تک‌لایه کشت داده شدند و با ۵/۰ گرم بر لیتر تریپسین و ۲/۰ گرم بر لیتر EDTA جدا و برای رسیدن به مرحله نمایی چند بار پاساژ داده شدند. در همه مراحل سلول‌ها باید در انکوباتور در دمای 37°C و فشار ۵٪ دی‌اکسیدکربن انکوبه و نگهداری شوند. مواد کشت سلولی از شرکت‌های Gibco ایالات متحده و Bio-Idea ایران خریداری شدند.

مطالعه سمیت سلولی با استفاده از آزمون سمیت سلولی (MTT)

سمیت سلولی کورکومین آزاد و کمپلکس‌های β -سیکلودکسترین-کورکومین با روش آزمون سمیت سلولی MTT روی رده‌های سلولی سرطانی و همچنین روی رده‌های سلولی نرمال مورد ارزیابی قرار گرفتند. معرف MTT (۳- (۵-و۴-دی‌متیل‌تيازول-۲-یل)-۵، ۰-دی‌فنیل‌تترازولیم بروماید) به‌طور گسترده برای اندازه‌گیری فعالیت‌های متابولیسی سلول‌ها در شرایط در شیشه استفاده می‌شود. اساس این روش بر قابلیت سلول‌های زنده در تبدیل نمک زرد MTT قابل حل در آب به کریستال‌های بنفش غیر قابل حل در

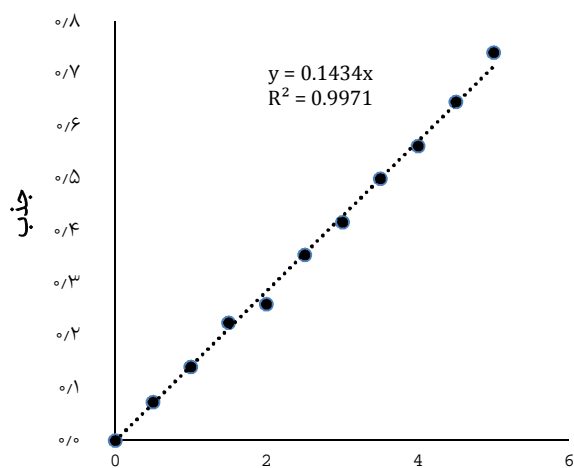
طیف‌سنجی فلورسانس

طیف‌سنجی فلورسانس یک روش آسان، سریع و حساس و برای مطالعه تشکیل کمپلکس‌های گنجایشی میان β -سیکلودکسترتین و مولکول‌های مهمان فلورسنت مفید است. در این مطالعه کورکومین آزاد در طول موج ۴۲۱ نانومتر تهیه شد و طیف نوری پهن و ضعیفی را با حداکثر نشر فلورسانس در ناحیه ۵۰۳ نانومتر نشان داد. با این حال افزایش شدت فلورسانس کورکومین در حضور β -سیکلودکسترتین پس از وارد شدن کورکومین به درون حفره β -سیکلودکسترتین بیانگر تشکیل یک کمپلکس گنجایشی پایدار میان β -سیکلودکسترتین و کورکومین است [16,27].

نمودار ۲ طیف‌های فلورسانس مربوط به کورکومین آزاد (طیف سیاه‌رنگ) و کمپلکس گنجایشی β -سیکلودکسترتین-کورکومین (طیف طوسی‌رنگ) را نشان می‌دهد.

بررسی الگوی رهایش کورکومین از نانوکپسول‌های β -سیکلودکسترتین

نمودار ۳ الگوی رهایش ترکیب کورکومین از β -سیکلودکسترتین در شرایط دمایی سلول‌های سالم (37°C)، سلول‌های سرطانی (42°C) و دمای محیط (25°C) را در شرایط در شیشه نشان می‌دهد. شیب و حداکثر رهایش کورکومین از β -سیکلودکسترتین در شرایط دمایی سلول‌های سرطانی (42°C) نسبت به شرایط سلول‌های سالم و دمای محیط بیشتر است که این موضوع نشان می‌دهد کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترتین-کورکومین در سلول‌های سرطانی می‌توانند به‌صورت نیمه‌هدفمند عمل کنند. همچنین این بررسی نشان می‌دهد که حداکثر رهایش کورکومین توسط کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترتین-کورکومین در شرایط دمایی سلول‌های سرطانی، سلول‌های سالم و دمای محیط پس از ۱۰ ساعت به ترتیب برابر ۸۲، ۷۱ و ۵۲٪ است.



نمودار ۱) منحنی استاندارد کورکومین در DMSO

نمودار ۱) منحنی استاندارد کورکومین در DMSO

یافته‌ها

افزایش حلالیت کورکومین پس از کمپلکس شدن با نانوکپسول‌های β -سیکلودکسترتین

پس از تهیه کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترتین-کورکومین، ابتدا حلالیت کورکومین کمپلکس شده با نانوکپسول‌های β -سیکلودکسترتین در بافر PBS بررسی شد. شکل ۱ یکنواختی و همگن بودن کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترتین-کورکومین در بافر PBS را نشان می‌دهد. در حالی که در همان غلظت، کورکومین و ترکیب فیزیکی β -سیکلودکسترتین-کورکومین در محلول PBS بلافاصله رسوب می‌کند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که β -سیکلودکسترتین باعث بالارفتن حلالیت کورکومین در محیط‌های آبی مثل PBS می‌شود.



شکل ۱) حلالیت بتاسیکلودکسترتین (الف)، کورکومین (ب)، مخلوط فیزیکی β -سیکلودکسترتین-کورکومین (ج) و کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترتین-کورکومین در آب (د)

محاسبه بازده کپسوله‌سازی کورکومین در نانوکپسول‌های β -سیکلودکسترتین

پس از آماده‌سازی کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترتین-کورکومین، بازده انکپسولاسیون (EE) در این کمپلکس‌ها محاسبه شد. بدین منظور ابتدا منحنی استاندارد کورکومین در DMSO ترسیم و بازده انکپسولاسیون با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد (نمودار ۱).

بازده انکپسولاسیون کورکومین در کمپلکس‌های گنجایشی مختلف با مقادیر متفاوتی از β -سیکلودکسترتین و مقدار ثابتی از کورکومین در جدول ۱ قابل مشاهده است. براساس این نتایج، حداکثر میزان بازده انکپسولاسیون برابر با ۳۳/۹۲٪ است که این مقادیر مربوط به کمپلکسی است که نسبت β -سیکلودکسترتین به کورکومین در آن ۱۲:۱ (وزنی/وزنی) است. این میزان از انکپسولاسیون کورکومین در حفره‌های β -سیکلودکسترتین بیشتر از میزان انکپسولاسیون در برخی از حامل‌های معمولی است [25].²⁶ بنابراین این نسبت از β -سیکلودکسترتین-کورکومین نسبتی مناسب برای تهیه کمپلکس‌های گنجایشی برای انجام مطالعات بعدی است.

جدول ۱) بازده انکیپسولاسیون (EE) کورکومین در نانوکپسول های β -سیکلودکسترین

کمپلکس های گنجایشی	β -سیکلودکسترین (میلی گرم)	کورکومین (میلی گرم)	بازده انکیپسولاسیون (درصد)
۱	۲/۵	۱	۴/۹۴±۰/۸۳
۲	۵	۱	۹/۳۶±۱/۰۴
۳	۷	۱	۱۴/۶۲±۰/۹۶
۴	۹	۱	۲۱/۷۷±۱/۱۲
۵	۱۰	۱	۲۴/۷۰±۰/۷۹
۷	۱۲	۱	۳۳/۹۲±۱/۳۲
۸	۱۴	۱	۳۱/۷۲±۰/۹۹

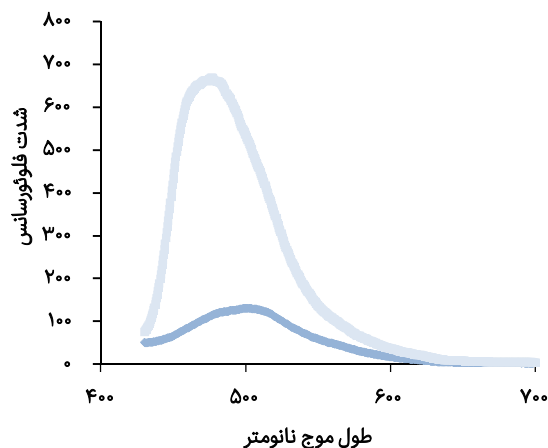
۸۰ میکرومولار کورکومین مورد ارزیابی و سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوکپسول های β -سیکلودکسترین هیچ گونه سمیتی بر روی این لاین های سلولی حتی در غلظت ۸۰ میکرومولار بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون ندارند (نمودار ۴).

نتایج نشان می دهد که سلول های سرطانی نسبت به کمپلکس های گنجایشی β -سیکلودکسترین- کورکومین بسیار حساس هستند و این فرمولاسیون در یک حالت وابسته به دوز و زمان در مقایسه با کورکومین تنها و نانوکپسول های β -سیکلودکسترین تکثیر سلول های سرطانی را کاهش می دهند اما تغییر معنی داری در تکثیر سلول های سالم L929 پس از اعمال هر یک از سه تیمار مذکور مشاهده نشد. مقدار IC₅₀ برای کمپلکس های گنجایشی β -سیکلودکسترین- کورکومین پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، در سلول های MCF-7 حدود ۴۰ میکرومولار و برای سلول های Huh-7 و SKBR حدود ۸۰ میکرومولار بود، در حالی که این فرمولاسیون در سلول های BT-474 حدود ۵۵% سلول ها را در بالاترین غلظت دارو (۸۰ میکرومولار) مهار کرد. علاوه بر این، نتایج انکوباسیون ۴۸ و ۷۲ ساعته این رده های سلولی با غلظت های مختلف کورکومین، حاکی از عدم سمیت این ترکیب بود.

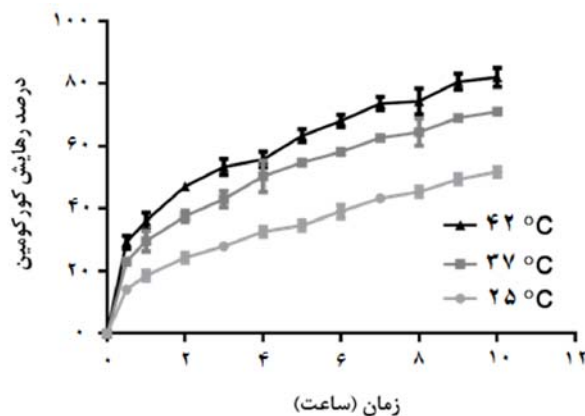
بررسی القای آپوپتوز توسط رنگ آمیزی اکریدین اورنج- اتیدیوم بروماید

به منظور بررسی القای آپوپتوز در سلول های سرطانی MCF-7 تیمار شده با کورکومین و کمپلکس های گنجایشی β -سیکلودکسترین- کورکومین از روش رنگ آمیزی دوگانه اکریدین اورنج- اتیدیوم بروماید استفاده شد. اکریدین اورنج توسط سلول های زنده و نرمال که غشای آنها سالم است جذب می شود و هنگامی که به DNA دو رشته وصل می شود، رنگ فلوروسانس سبز را ساطع می کند. اتیدیوم بروماید توسط سلول هایی که در آنها آپوپتوز رخ داده و غشای آنها آسیب دیده است جذب می شود و هنگامی که به قطعات متراکم DNA یا اجسام آپوپتوزی وصل می شود، رنگ فلوروسانس نارنجی- قرمز را ساطع می کند [28].

شکل ۲ تصاویر فلورسنت مربوط به سلول های سرطانی MCF-7 تیمار نشده (به عنوان کنترل) و تیمار شده با کورکومین و کمپلکس های گنجایشی β -سیکلودکسترین- کورکومین را پس از رنگ آمیزی با اکریدین اورنج- اتیدیوم بروماید نشان می دهد. همان طور که شکل ۲- الف نشان داده است، هیچ گونه خصوصیات آپوپتوزی قابل توجهی در سلول های کنترل منفی مشاهده نشد، در حالی که سلول های MCF-7 تیمار شده با کورکومین و کمپلکس های گنجایشی β -سیکلودکسترین- کورکومین، آپوپتوز و نکروز (پیکان سفید) را نشان می دهند (شکل های ۲- ب و ۲- ج). با این حال، بیشترین تعداد سلول های آپوپتوزی در سلول های تیمار شده با کمپلکس های گنجایشی β -سیکلودکسترین- کورکومین مشاهده می شوند که به طور چشمگیری بیشتر از تعداد سلول های آپوپتوزی القاشده توسط کورکومین بود.

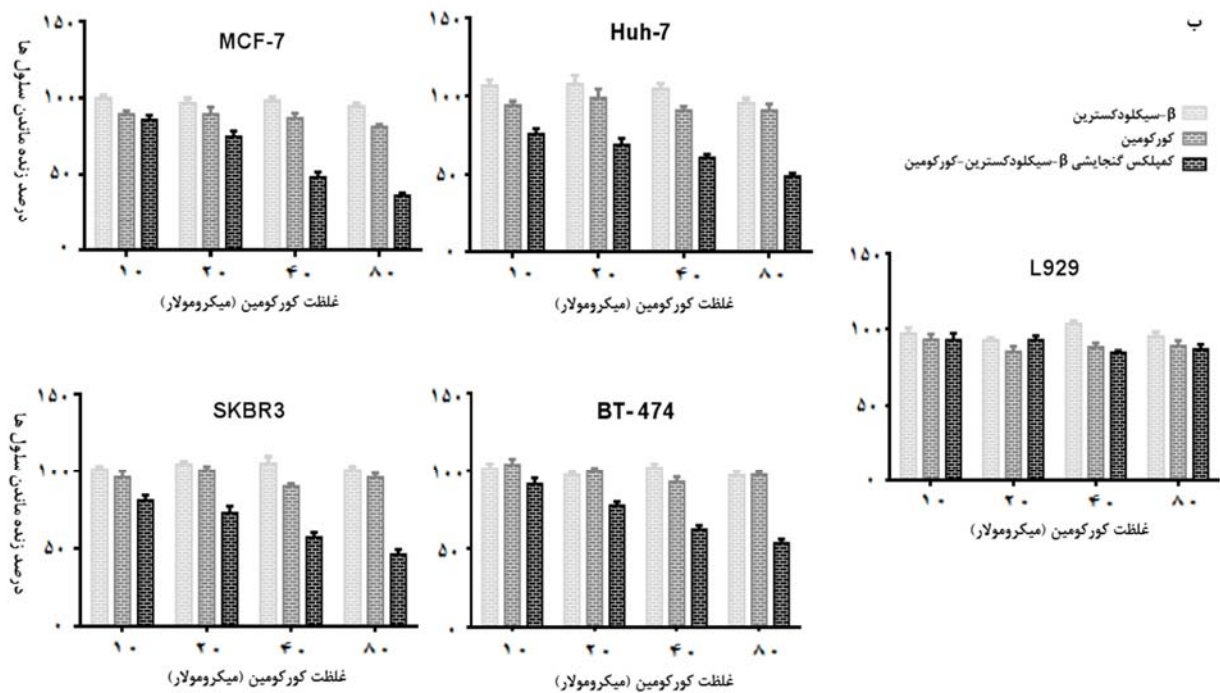


نمودار ۲) طیف های فلوروسانس مربوط به کورکومین آزاد (طیف سیاه رنگ) و کمپلکس گنجایشی β -سیکلودکسترین- کورکومین (طیف طوسی رنگ)

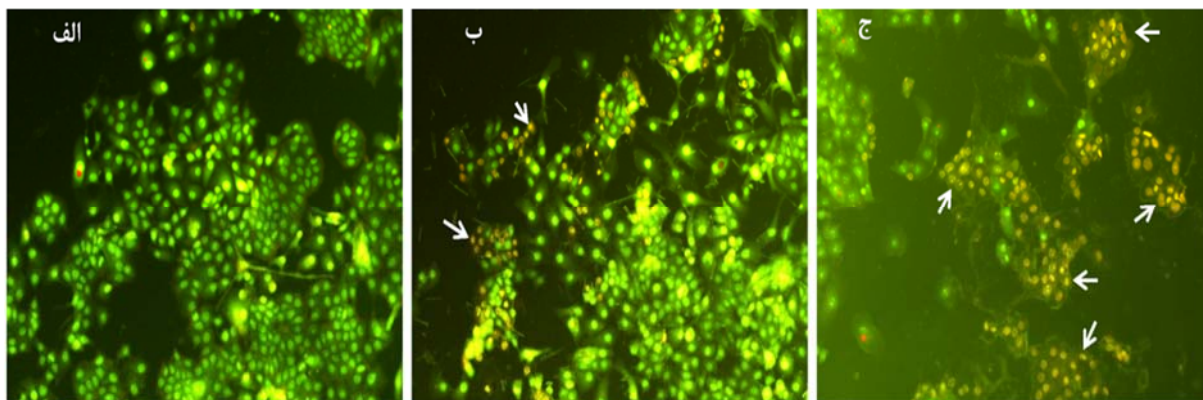


نمودار ۳) رهايش کنترل شده کورکومین از β -سیکلودکسترین در شرایط دمایی سلول های سرطانی (۴۲°C)، سلول های سالم (۳۷°C) و دمای محیط (۲۵°C)

نتایج آزمون MTT روی سلول های نرمال و سرطانی
 اثر کورکومین، نانوکپسول های β -سیکلودکسترین و کمپلکس های گنجایشی β -سیکلودکسترین- کورکومین بر سلول های سرطان سینه انسانی MCF-7، SKBR3، BT-474، سلول های سرطان کبد انسانی Huh-7 و سلول های نرمال فیبروبلاست موشی L929 با استفاده از آزمون MTT، در غلظت های مختلف ۱۰ تا



نمودار ۴) آزمون MTT بر روی لاین‌های سلولی MCF-7, Huh-7, SKBR3, BT-474 و L929 برای بررسی سمیت نانوکپسول‌های β -سیکلودکسترین، کورکومین و کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترین-کورکومین؛ الف) انکوباسیون ۴۸ ساعت؛ ب) انکوباسیون ۷۲ ساعت



شکل ۵) تصاویر میکروسکوپ فلورسانس حاصل از رنگ‌آمیزی دوگانه اکریدین اورنج- اتیدیوم پروماید سلول‌های سرطانی MCF-7 (بزرگنمایی $\times 10^3$: سلول‌های سرطانی MCF-7 تیمار نشده (الف)؛ سلول‌های تیمار شده با کورکومین آزاد (ب) و کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترین-کورکومین (ج)

کورکومین آزاد و کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترین-کورکومین بر روی رده‌های سلولی سرطانی مختلف MCF-7, Huh-7, SKBR3, BT-474 و سلول‌های نرمال موشی L929 انجام شد تا به این سؤال پاسخ داده شود که ترکیب کورکومین در کدام حالت (حالت آزاد یا در نانوکپسول‌های β -سیکلودکسترین) بر سلول‌ها تاثیر بیشتری دارد؟.

در این پژوهش ابتدا سنتز کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترین-کورکومین انجام شد. سپس با استفاده از طیف‌سنجی فلورسانس تشکیل کمپلکس گنجایشی میان β -سیکلودکسترین و کورکومین بررسی شد. نتایج نشان داد که ایجاد کمپلکس میان کورکومین و β -سیکلودکسترین بر شدت فلورسانس تاثیر می‌گذارد و از طریق این تغییر می‌توان به

بحث

کورکومین دارای خواص دارویی بسیار زیادی از قبیل خواص ضداکسیدان، ضدجوش و ضدتومور، مقابله با رگ‌زایی تومور، ضدکلسترول و ضدباکتری است [9, 11]. اما این ماده با وجود خواص دارویی بسیار قوی نمی‌تواند به‌طور گسترده در درمان بیماری‌ها استفاده شود که این ناشی از عدم قابلیت انحلال آن در آب و در نتیجه فراهمی زیستی ضعیف آن در محیط زیستی است. گزارش‌های مختلف بیان می‌کند که حلالیت کورکومین وقتی در برخی ناقل‌های دارویی حل یا کپسوله می‌شود افزایش می‌یابد [7]. در این مطالعه با استفاده از نانوکپسول‌های زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر، سعی شد حلالیت و پایداری کورکومین افزایش داده شود. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی و ارزیابی اثر

به افزایش حلالیت دارو در محیط آبی و همچنین پایداری کمپلکس‌های گنجایشی سیکلودکستین-دارو می‌شود [32]. در تحقیق دیگری کارایی انکپسوله‌شدن کورکومین در β -سیکلودکستین را حدود ۲۶٪ برای نسبت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین به ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر β -سیکلودکستین گزارش داده‌اند. بنابراین، نتایج نشان می‌دهد که کارایی انکپسوله‌شدن کورکومین در پژوهش حاضر بالاتر بوده است [23].

در نتایج حاصل از رهایش ترکیب کورکومین از β -سیکلودکستین در دماهای مختلف نشان داده شد که کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکستین-کورکومین در دماهای بالا رفتار هوشمندانه‌ای را در رهایش دارو از خود نشان می‌دهند. به این ترتیب که به علت قرارگرفتن در شرایط دمایی سلول‌های سرطانی، داروی بیشتری را از خود رهایش می‌کنند. در مطالعه دیگری اثر شرایط دمایی مختلف را بر آزادسازی داروی دوکسوروبیسین موجود در کمپلکس‌های گنجایشی γ -سیکلودکستین-دوکسوروبیسین مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که با افزایش دما از ۲۵ تا ۵۰°C رهایش داروی دوکسوروبیسین از کمپلکس‌های گنجایشی افزایش یافته و بیشترین افزایش رهایش دارو در دمای ۵۰°C بوده است. محققان در این مطالعه با محاسبه ثابت اتصال دوکسوروبیسین به γ -سیکلودکستین به این نتیجه دست یافتند که با افزایش دما از ۲۵ به ۵۰°C ثابت اتصال حدود ۵/۵ برابر کاهش یافته و در نهایت منجر به رهایش بیشتر دوکسوروبیسین از کمپلکس‌های گنجایشی شده است [33]. بررسی‌های دیگری نیز نشان دادند که افزایش دما منجر به رهایش بیشتر دارو از کمپلکس‌های گنجایشی سیکلودکستین-دارو می‌شود، به این علت که پایداری این کمپلکس‌ها به شدت وابسته به pH، قدرت یونی و درجه حرارت محیط است و با تغییر این شرایط مولکول‌های مهمان به دلیل وضعیت نامساعد انرژی حفره سیکلودکستین را ترک می‌کنند [34, 35].

مطالعات متعددی، اثر ضدتوموری کورکومین برای انواع مختلف سرطان‌ها از جمله سرطان سینه، ریه، پروستات، تخمدان، روده، پانکراس، مغز، پوست و غیره را چه در مطالعات در شیشه و چه در مطالعات در محیط زنده نشان داده‌اند [36]. در این پژوهش نتایج حاصل از بررسی‌های در شیشه با استفاده از آزمون MTT نشان داد که کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکستین-کورکومین، اثرات مهارکنندگی معنی‌داری بر روی تکثیر سلول‌های سرطانی MCF-7، Huh-7، SKBR3 و BT-474 دارند. علاوه بر این، بررسی تاثیر نانوکپسول‌های β -سیکلودکستین و ترکیب کورکومین به‌طور جداگانه و با غلظت‌های مختلف بر روی رده‌های سلولی سرطانی نشان‌دهنده عدم سمیت و کشندگی آنها است. همان‌طور که مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند نانوکپسول‌های β -سیکلودکستین نه تنها روی سلول‌ها تاثیر منفی ندارند بلکه رشد آنها را به‌طور نسبی افزایش می‌دهند که دلایل احتمالی آن، سهولت جذب مواد غذایی از غشا در اثر β -سیکلودکستین و

تشکیل کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکستین-کورکومین پی برد. هنگامی که سیکلودکستین دارو را در فضای داخلی خود می‌پذیرد، مانع اتلاف انرژی بر اثر برخورد مولکول‌ها در محلول می‌شود. در واقع پوشش دارو توسط سیکلودکستین اثر پدیده خاموشی که در محلول‌ها بر اثر برخورد مولکول‌ها ایجاد می‌شود را کاهش می‌دهد و در نتیجه انرژی به‌صورت نورانی آزاد می‌شود و نشر فلئورسانس افزایش می‌یابد. پس افزایش شدت فلئورسانسی به معنی تشکیل کمپلکس و مناسب‌بودن سایز دارو و فضای داخلی سیکلودکستین است [29]. در پژوهش حاضر، کمپلکس β -سیکلودکستین-کورکومین افزایش شدت فلئورسانس مناسبی را نشان داد که به معنی جای‌گیری مناسب و کاهش درجات آزادی کورکومین و کاهش احتمالی عبور غیرتابشی و در نتیجه افزایش فلئورسانس بود. مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند که تشکیل کمپلکس میان کورکومین و β -سیکلودکستین باعث افزایش شدت فلئورسانس و تغییر می‌شود [16, 25].

علاوه بر این، در پژوهش حاضر نسبت مناسبی از کورکومین و β -سیکلودکستین برای تشکیل کمپلکس‌های گنجایشی به دست آمد که در آن رسوب کورکومین پس از سانتریفیوژ به میزان حداقل بود. این نسبت شامل ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین و ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر β -سیکلودکستین است. با افزایش غلظت β -سیکلودکستین کارایی انکپسولاسیون کورکومین در β -سیکلودکستین به تدریج افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده دسترسی کورکومین به مکان‌های هیدروفوب بیشتر است. در این پژوهش کارایی انکپسولاسیون کورکومین ۳۳/۹۲٪ برای نسبت ۱ کورکومین به ۱۲ β -سیکلودکستین به دست آمد. این در حالی است که میزان کارایی انکپسولاسیون به دست آمده برای β -سیکلودکستین در مقایسه با برخی نانوذرات پلیمری (مانند نانوذرات PLGA) بیشتر است، به گونه‌ای که طبق گزارشات قبلی میزان کارایی انکپسولاسیون در نانوذرات PLGA با توجه به وزن نانوذرات حدود ۵ تا ۱۰٪ به دست آمد [26, 30, 31]. این ظرفیت بارگذاری دارویی پایین تنها برای عوامل شیمی‌درمانی مانند دکسوروبیسین، پاکلیتاکسل، سیس‌پلاتین، دسیتابین و غیره مناسب است، زیرا حتی غلظت نانومولار این داروها برای از بین بردن سلول‌های سرطانی موثر است. اما از سویی دیگر ترکیبات گیاهی مانند کورکومین برای از بین بردن سلول‌های سرطانی به دوز نسبتاً بیشتری نیاز دارند. بنابراین در صورت استفاده از این نانوذرات به‌منظور دارورسانی این ترکیبات گیاهی نیاز به مقادیر بیشتری از نانوذرات وجود دارد که می‌تواند منجر به سمیت سلولی و عوارض جانبی شود. یکی از عوامل موثر در بازده بالای انکپسولاسیون این نانوکپسول‌های سیکلودکستینی که می‌توان به آن اشاره کرد، ماهیت آمفی‌فیلیک سیکلودکستین‌ها است که منجر به بارگذاری و دربرگرفتن مقدار بالایی از داروی آب‌گریز در مرکز آب‌گریز خود می‌شود. این خصیصه متعاقباً منتهی

انیدیدوم پروماید نشان داد که نانوکپسول‌های β -سیکلودکسترینی حاوی کورکومین به صورت قابل توجهی القای آپوپتوز در این رده سلولی را در مقایسه با کورکومین آزاد افزایش می‌دهند. این نتایج با نتایج حاصل از تست سمیت سلولی (MTT) مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، براساس مطالعات انجام شده در پژوهش حاضر بر روی سلول‌های سرطانی و نرمال، مشخص شد که نانوکپسول‌های β -سیکلودکسترینی حاوی کورکومین قادر هستند که بقای سلول‌های سرطانی مختلف را به صورت معنی‌داری نسبت به کورکومین آزاد تحت تاثیر قرار دهند. این نتیجه همراه با نتایج دیگر مربوط به فعالیت‌های درمانی کورکومین علیه برخی از بیماری‌ها، شواهد مستدلی هستند که سیکلودکسترین‌ها و سایر نانوذره‌ها می‌توانند عوامل مفیدی در سیستم‌های دارورسانی در ارتباط با سرطان باشند.

تشکر و قدردانی: از حمایت‌های معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تشکر و قدردانی می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود نداشته است.

سهم نویسندگان: سحر روزبهی، (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۴۰٪)؛ سیمین داداش‌زاده، (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ رضا حسن‌ساجدی، (نویسنده سوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪)

منابع مالی: مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه دکتری است و با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

- 1- Lee KW, Bode AM, Dong Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(3):211-8.
- 2- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365(9472):1687-717.
- 3- Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(10):750-63.
- 4- Wanchai A, Armer JM, Stewart BR. Complementary and alternative medicine use among women with breast cancer: A systematic review. *Clin J Oncol Nurs*. 2010;14(4):E45-55.
- 5- Lai JN, Wu CT, Wang JD. Prescription pattern of Chinese herbal products for breast cancer in Taiwan: A population-based study. *Evid Based Complement Altern Med*. 2012;2012:891893.
- 6- Aziz K, Nowsheen S, Georgakilas A. Nanotechnology in cancer therapy: Targeting the inhibition of key DNA repair pathways. *Curr Mol Med*. 2010;10(7):626-39.
- 7- Bharali DJ, Siddiqui IA, Adhami VM, Chamcheu JC, Aldahmash AM, Mukhtar H, et al. Nanoparticle delivery of natural products in the prevention and treatment of cancers: Current status and future prospects. *Cancers*.

همچنین زیست‌سازگاری، ماهیت طبیعی و غیرسمی بودن آنها گزارش شده است [30-32]. بنابراین سمیت‌هایی که از نانوکپسول‌های β -سیکلودکسترینی حاوی کورکومین بر روی سلول‌های سرطانی مشاهده شد تنها بر اثر ترکیب کورکومین است. از طرفی عدم سمیت کورکومین به این دلیل است که زمان در معرض قرارگیری کورکومین در سلول‌ها به دلیل حلالیت ناکافی و متعاقباً رسوب در سطح سلول‌ها کاهش می‌یابد. با این حال سیتوتوکسیستی افزایش‌یافته کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترین- کورکومین ممکن است طی افزایش حلالیت کورکومین و متعاقباً جذب آنها در سلول‌های توموری باشد، به این دلیل که سیکلودکسترین‌ها نقش مهمی در پایداری و افزایش حلالیت داروها در محل جذب دارند که ممکن است باعث افزایش نفوذپذیری بدون تغییر در خصوصیات فیزیکوشیمیایی داروها شوند [32, 37]. در مطالعه دیگری اثر کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترین- کورکومین بر روی سلول‌های سرطانی پروستات مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کمپلکس‌های β -سیکلودکسترین- کورکومین اثرات سمیت قابل توجهی بر روی این سلول‌ها دارند و حدود ۶۰٪ سلول‌ها را در بالاترین غلظت دارو (۴۰ میکرومولار) مهار کردند. این نتایج مطابق با سمیت سلولی حاصل از کمپلکس‌های β -سیکلودکسترین- کورکومین بر روی سلول‌های سرطانی مختلف در پژوهش حاضر است [23]. بررسی دیگری نشان داد که کمپلکس‌های پلیمری β -سیکلودکسترین- کورکومین فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی از طریق مهار رادیکال‌های آزاد دارند و همچنین فعالیت ضدتکثیری روی سلول‌های سرطانی A375 نشان دادند، اما مقدار IC_{50} گزارش شده برای کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترین- کورکومین پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در این مطالعه حدود ۴۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده که این مقدار در مقایسه با پژوهش حاضر بسیار بالاتر است [38].

از سوی دیگر، طبق نتایج کمپلکس‌های گنجایشی β -سیکلودکسترین- کورکومین مورد مطالعه، به هیچ وجه تاثیر سمی معنی‌داری روی سلول‌های فیبروبلاست موشی نرمال (L929) اعمال نکرد. بنابراین تاثیر این کمپلکس‌های گنجایشی به طور اختصاصی فقط روی سلول‌های سرطانی است و روی سلول‌های نرمال اثری ندارد که این یافته‌ها با طبیعت سلول‌های سرطانی که دارای غشای نسبتاً نفوذپذیرتری هستند و همچنین اختصاصی عمل کردن کورکومین در مورد هدف قراردادن موثرتر سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم هم‌خوانی دارد [39]. مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند که کورکومین در سلول‌های سرطانی بهتر از انواع نرمال جذب می‌شود [40]. نتایج این پژوهش نیز تاییدی دیگر بر عدم سمیت کورکومین بر روی سلول‌های سالم است، همان‌طور که اکثر یافته‌ها حاکی از عدم سمیت کورکومین بر انواع سلول‌های نرمال است [41]. نتایج بررسی القای آپوپتوز بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7 توسط رنگ‌آمیزی اکریدین‌اورنج-

- forming inclusion complexes with. beta.-cyclodextrin in aqueous solutions. *J Phys Chem.* 1981;85(13):1820-3.
- 26- Bisht S, Feldmann G, Soni Sh, Ravi R, Karikar C, Maitra A, et al. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): A novel strategy for human cancer therapy. *J Nanobiotechnol.* 2007;5(1):3.
- 27- Al-Hassan KA, Klein UK, Suwaiyan A. Normal and twisted intramolecular charge-transfer fluorescence of 4-dimethylaminobenzonitrile in α -cyclodextrine cavities. *Chem Phys Lett.* 1993;212(6):581-7.
- 28- Liu K, Liu PC, Liu R, Wu X. Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. *Med Sci Monit Basic Res.* 2015;21:15-20.
- 29- Manzoori JL, Abdolmohammad-Zadeh H, Amjadi M. Study on the inclusion complex between β -cyclodextrin and celecoxib by spectrofluorimetry and its analytical application. *Il Farmaco.* 2005;60(6-7):575-81.
- 30- Shaikh J, Ankola DD, Beniwal V, Singh D, Kumar MR. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *Eur J Pharm Sci.* 2009;37(3-4):223-30.
- 31- Chirio D, Gallarate M, Trotta M, Carlotti ME, Gaudio EC, Cravotto G. Influence of α - and γ -cyclodextrin lipophilic derivatives on curcumin-loaded SLN. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2009;65(3-4):391.
- 32- Vikas Y, Sandeep K, Braham D, Manjusha Ch, Budhwar V. Cyclodextrin complexes: An approach to improve the physicochemical properties of drugs and applications of cyclodextrin complexes. *Asian J Pharm.* 2018;12(2):394-409.
- 33- Xu D, Wang L, Gourevich D, Kabha E, Arditti F, Athamna M, et al. Synthesis and inclusion study of a novel γ -cyclodextrin derivative as a potential thermo-sensitive carrier for doxorubicin. *Chem Pharm Bull.* 2014;62(7):627-35.
- 34- Topuz F, Uyar T. Electrospinning of cyclodextrin functional nanofibers for drug delivery applications. *Pharmaceutics.* 2019;11(1):6.
- 35- Al Omari MM, Zughul MB, Davies JE, Badwan AA. Effect of buffer species on the complexation of basic drug terfenadine with β -cyclodextrin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2007;58(3-4):227-35.
- 36- Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm.* 2008;5(4):505-15.
- 37- Dahan A, Miller JM, Hoffman A, Amidon GE, Amidon GL. The solubility-permeability interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers: Mechanistic modeling and application to progesterone. *J Pharm Sci.* 2010;99(6):2739-49.
- 38- Chen J, Qin X, Zhong S, Chen S, Su W, Liu Y. Characterization of curcumin/cyclodextrin polymer inclusion complex and investigation on its antioxidant and antiproliferative activities. *Molecules.* 2018;23(5):1179.
- 39- Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2011;10(1):12.
- 40- Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and cancer cells: How many ways can curcumin kill tumor cells selectively?. *AAPS J.* 2009;11(3):495-510.
- 41- Syng-ai Ch, Kumari AL, Khar A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: Role of glutathione and bcl-2. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(9):1101-8.
- 2011;3(4):4024-45.
- 8- Liu D, Chen Z. The effect of curcumin on breast cancer cells. *J Breast Cancer.* 2013;16(2):133-7.
- 9- Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curcumin": From kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(4):787-809.
- 10- Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: An age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(2):85-94.
- 11- 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.
- 12- Sun M, Su X, Ding B, He X, Liu X, Yu A, et al. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. *Nanomedicine.* 2012;7(7):1085-100.
- 13- Anand P, Sundaram Ch, 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.
- 14- Saraswathy M, Gong Sh. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotechnol Adv.* 2013;31(8):1397-407.
- 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- Baglole KN, Boland PG, Wagner BD. Fluorescence enhancement of curcumin upon inclusion into parent and modified cyclodextrins. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2005;173(3):230-7.
- 17- Messner M, Kurkov SV, Jansook P, Loftsson T. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *Int J Pharm.* 2010;387(1-2):199-208.
- 18- Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process biochemistry.* 2004;39(9):1033-46.
- 19- Barone G, Castronuovo G, Di Ruocco V, Elia V, Giancola C. Inclusion compounds in water: Thermodynamics of the interaction of cyclomaltohexaose with amino acids at 25°. *Carbohydr Res.* 1989;192:331-41.
- 20- Bertolla C, Rolin S, Evrard B, Pochet L, Masereel B. Synthesis and pharmacological evaluation of a new targeted drug carrier system: β -Cyclodextrin coupled to oxytocin. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18(6):1855-8.
- 21- Evrard B, Bertholet P, Guéders M, Flament MP, Piel G, Delattre L, et al. Cyclodextrins as a potential carrier in drug nebulization. *J Controll Release.* 2004;96(3):403-10.
- 22- Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech.* 2005;6(2):E329-57.
- 23- Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. β -Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010;79(1):113-25.
- 24- Sieuwerts AM, Klijn JG, Peters HA, Foekens JA. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC₅₀-values and cell survival. *Clin Chem Lab Med.* 1995;33(11):813-24.
- 25- Hoshino M, Imamura M, Ikehara K, Hama Y. Fluorescence enhancement of benzene derivatives by