

Construction of Polyurethane Polymeric-based Nano-carriers for Curcumin in Cancer Therapy

Sharafaldin Al-Musawi¹, Hosein Naderi-Manesh^{2*}, Zuhair Mohammad Hassan³,
Hamid Yeganeh⁴, Safura Nikzad⁵, Hamidreza Kheiri Manjili⁶

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Professor, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 4- Professor, Department of Polyurethane, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran
- 5- Assistant Professor, Department of Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
- 6- Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Nanotechnology, Faculty of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

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

Received: 14/Jan/2014, Accepted: 19/Oct/2014

Abstract

Objective: In order to improve the water solubility and bioavailability of curcumin in cancer therapy, we prepared and tested a novel waterborne cationic polyurethane (PU) as a nano-carrier for curcumin loading (CU-PU). We studied the effect of this prepared nano-drug on melanoma (F10B16) and fibroblasts cells (L929).

Methods: Morphology, size and cell internalization ability of the prepared nanoparticles were analyzed by zetasizer, SEM, AFM and fluorescent microscopy, respectively. We anticipated that curcumin was loaded in the hydrophobic core of the PU carrier. Next, the suitable dose and therapeutic effects of CU-PU for both skin cancer and normal cell lines were evaluated by the MTT assay and real-time PCR.

Results: The average diameters and polydispersity of the nanoparticles were 62.37 ± 1.7 nm and 0.080 ± 2.1 at 25°C, respectively. The drug encapsulation efficiency was $87 \pm 0.2\%$. The morphological analysis confirmed both a spherical shape and good dispersion without remarkable aggregation. The MTT assay results showed that the IC₅₀ at 24 hours was 36.2 µM, whereas it was 25.4 µM at 48 hours. Real-time PCR results indicated that the CU-PU significantly decreased mRNA expressions of VEGF, Bcl-2, MMP-9 and COX-2 genes. An increase in mRNA expression of the BAX gene was also observed.

Conclusion: Our result provided acceptable evidence for cell proliferation inhibition and the apoptotic effect of CU-PU on skin cancer cells. There were no adverse effects detected for normal cells.

Keywords: Nanoparticle, Polyurethane, Curcumin, Cancer, Nanosystem

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 17 (2014-2015), No. 4, Pages: 25-39

ساخت نانوسامانه دارویی کورکومین بر پایه نانو حامل پلیمری پلی یورتان به منظور بررسی اثر ضد سرطانی آن

سید شرف الدین الموسوی^۱، حسین نادری منش^{۲*}، زهیر محمد حسن^۳، حمید یگانه^۴، صفورا نیکزاد^۵،
حمید رضا خیری منجیلی^۶

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استاد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استاد، گروه ایمنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- استاد، گروه پلی یورتان، پژوهشگاه پتروشیمی و پلیمر ایران، تهران، ایران
- ۵- استادیار، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
- ۶- استادیار، گروه نانوفناوری دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک
Email: Naderman@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۷/۲۷

دریافت مقاله: ۹۲/۱۰/۲۴

چکیده

هدف: برای بهبود حلالیت و فراهمی زیستی کورکومین در درمان سرطان، یک پلی یورتان کاتیونی نوین و آب پایه ساخته شد و به عنوان یک نانو حامل به منظور بارگیری کورکومین، استفاده شد. در این تحقیق اثر نانو داروی آماده شده روی ملانوما (F10B16) و فیبروبلاست (L929) بررسی شد.

مواد و روش ها: ریخت شناسی، اندازه و توانایی ورود به سلول نانو ذرات ساخته شده، به ترتیب با استفاده از اندازه گیرنده زتا، میکروسکوپ الکترونی روبشی انتشار میدان، میکروسکوپ نیروی اتمی و میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد. به این ترتیب پیش بینی شد که کورکومین در هسته آب گریز حامل های پلی یورتان بارگیری شود. بعد از تعیین غلظت مناسب و انجام آزمون ورود به سلول، میزان تأثیرگذاری بر سلول های سرطانی و سالم با آزمون MTT و Real time PCR بررسی شد.

نتایج: قطر نانوذره بارگیری شده و پراکنش آن، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به ترتیب $37/62 \pm 7/1$ نانومتر $1/2 \pm 0/0$ بود. میزان بازده کپسوله سازی کورکومین در پلی یورتان $87 \pm 2/0$ درصد است. مطالعات ریخت شناختی نیز، کروی شکل بودن و پراکنش مناسب نانوذرات، بدون تجمع قابل توجه را تأیید کرد. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان می دهد که IC_{50} محاسبه شده برای زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب $2/36$ و $4/25$ مایکرومولار است. نتایج Real time PCR نشان می دهد که نانوسامانه به مقدار قابل توجهی میزان بیان mRNA ژن های Bcl-2, VEGF, MMP-9, COX-2 را کاهش و BAX را افزایش می دهد.

نتیجه گیری: نتایج بررسی حاضر شواهد قابل قبولی در مورد اثر بازدارنده تکثیر سلولی و القای مرگ برنامه ریزی شده نانوسامانه دارویی کورکومین، روی سلول های سرطان پوست نشان داد در حالی که اثر قابل توجهی روی سلول های سالم مشاهده نشد.

کلیدواژگان: نانوذره، پلی یورتان، کورکومین، سرطان، نانوسامانه

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، صفحات: ۲۵-۳۹

مقدمه

امروزه یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در جهان سرطان است، هر چند راه‌کارهای مختلفی برای درمان آن در نظر گرفته شده است اما اغلب این روش‌ها نه تنها برای سلول‌های سرطانی کشنده است بلکه سلول‌های سالم را نیز تحت تأثیر قرار داده و منجر به مرگ یا آسیب زیاد به آن‌ها می‌شود [۱، ۲]. بنابراین تحقیقات بسیار گسترده در همه علوم برای یافتن راه‌هایی در راستای کاهش این آثار و بالا بردن نسبت درمان در حال انجام است.

یکی از این روش‌ها که در سال‌های اخیر مورد توجه و استفاده قرار گرفته ارسال دارو به تومور است که عبارت از کپسوله کردن (Encapsulation) دارو در یک ماده زیست‌سازگار (Biocompatible) و ارسال آن به محل تومور و آزادسازی در محل سلول‌های سرطانی است [۳، ۴].

کورکومین (Curcumin) ماده اصلی استخراج شده از روغن ساقه زیرزمینی (ریزم) زردچوبه دارای خواص دارویی فراوانی از قبیل خاصیت ضد اکسیدانت، جهش، تومور و سرطان، رگ‌زایی تومور، کلسترول و باکتری است [۵-۱۳]. اما این ماده نمی‌تواند به‌طور گسترده در درمان بیماری‌ها استفاده شود که این ناشی از حلالیت کم آن در آب و در نتیجه ضعف در دسترس بودن زیستی آن در محیط بدن است. برای رفع این مشکل تحقیقات بسیار زیادی انجام شده است که در آن‌ها از مواد زیست‌سازگار در بدن به‌صورت ترکیب با کورکومین استفاده نموده‌اند. یکی از ترکیبات مفید، نانو ذرات پلیمری است که می‌تواند به‌صورت کپسولی اطراف ذرات کورکومین قرار گیرد و ترکیب ساخته شده در جریان خون تزریق شود [۱۴-۱۸]. یکی از انواع پلیمرهایی که می‌تواند برای این منظور استفاده شود پلی‌یورتان (Polyurethane) است که به علت خاصیت زیست‌سازگاری در داروسازی و پزشکی کاربرد فراوان دارد [۱۹، ۲۰]. پلی‌یورتان یک پلیمر چند بخشی متشکل از دو مرحله نرم و سخت است. به‌طور معمول، مرحله نرم متشکل از الیگومرهای مختوم به گروه‌های هیدروکسیل است.

مرحله سخت از واکنش ترکیبات ایزوسیاناتی با دی ال (DL) های کوچک مولکول حاصل می‌شود. تجمع گروه‌های یورتانی در مرحله سخت باعث ایجاد گروه‌های فیزیکی و جدایش مرحله - ای از بخش نرم که دارای درجه آزادی حرکت بالا است، می‌شود. از طریق ایجاد گروه‌های یونی (کاتیونی یا آنیونی) منشعب از زنجیره‌های عامل‌دار می‌توان پلی‌یورتان را به شکل نهایی آب پایه تهیه نمود. در کار حاضر با استفاده از یک دی ال حاوی گروه‌های کربوکسیلیک اسید، پلی‌یورتانی حاوی گروه‌های آویزان کربوکسیلیک اسید تهیه می‌شود. در نهایت در نتیجه خشی نمودن این گروه‌ها که در بدنه پلی‌یورتان تعبیه شده‌است با یک نوع آمین نوع سوم، گروه‌های یونی که قابلیت آب پایه بودن پلی‌یورتان را فراهم می‌کند، ایجاد می‌شود [۲۱]. پلی‌یورتان تهیه شده برای ساخت نانومایسل‌های (Nanomicelle) حاوی کورکومین استفاده شده است. به این ترتیب که مولکول‌های کورکومین، براساس برهم‌کنش‌های آب‌گریز جذب پلی‌یورتان می‌شود. نانومایسل‌های پلی‌یورتان، همان‌طور که بیان شد پلیمرهایی آب پایه است که از قسمت آب‌گریز خود با دارو برهم‌کنش داده و به کمک قسمت‌های آب دوست خود در محلول آبی پراکنده می‌ماند.

هدف از این مطالعه تهیه نانو ترکیبی از کورکومین است که بتواند به‌صورت زیست‌سازگار و پایدار در بدن عمل کند. بنابراین در ابتدا یک فرمولاسیون جدید از ترکیب نانوذره پلی‌یورتان به همراه کورکومین ساخته شد و بعد از بررسی ویژگی‌های آن از قبیل اندازه، شکل، میزان ورود به سلول و تعیین غلظت مناسب برای درمان، اثر آن بر درمان رده سلولی ملانومای موشی (F10B16) و رده سلولی سالم فیبروبلاست موشی (L929) بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

ساخت نانوذره پلی‌یورتان

۰/۰۶ مول از ماده پلی تترا متیلن اتر گلاپکول

۷۵ میلی گرم پلی یورتان وجود داشته باشد رقیق شد [۲۲].

تعیین ویژگی‌های ریخت شناختی و اندازه نانوذرات

با استفاده از میکروسکوپ‌های نیروی اتمی (Atomic Force Microscopy: AFM) و میکروسکوپ الکترونی روبشی انتشار میدان (Field Emission Scanning Electron Microscopy: FESEM) و همچنین پراکنش نوری دینامیک (Dynamic Light Scattering: DLS)، ویژگی‌های ریخت شناختی سطح و همچنین اندازه نانوذرات، بررسی شد. تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی با دستگاه CA Nanoscope III (Digital Instruments, Inc., آمریکا) در دمای اتاق و با استفاده از یک قطره محلول تازه نانوذرات پلی یورتان به دست آمد. همچنین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی انتشار میدان (مدل Hitachi S-4160، ژاپن) و روکش کردن نانوذرات پلی یورتان با طلا و قبل از انجام آزمایش، بررسی ریخت شناختی آن‌ها صورت گرفت. پراکنش و اندازه نانوذرات و همچنین بار سطحی آن‌ها با استفاده از اندازه گیرنده نانوزتا (Malvern Instruments Ltd، آمریکا) بررسی شد.

آماده‌سازی نانوذره کورکومین بارگیری شده با پلی یورتان

برای حلالیت کورکومین، به منظور کاهش و حتی از بین بردن اثر سمیت حلال‌های کورکومین، مانند DMSO (Dimethyl Sulfoxide) در تمامی فرآیندهای آزمایشی، این ماده در آب حل شد که این امر با استفاده از توین ۸۰ به عنوان امولسی فایر (Emulsifier) و به نسبت ۲ درصد حجمی/حجمی با آب، صورت پذیرفت. برای تهیه نانوسامانه با حداکثر نسبت بارگیری دارو، نسبت‌های وزنی مختلفی از پلی یورتان نسبت به کورکومین قبل از انجام آزمایش بررسی و آزمایش شد، به این صورت که با استفاده از روش امواج فراصوت و پروب سونیکاتور (Prob Sonicator) با توان

(Polytetramethylene Ether Glycol: PTMEG) (که در خلأ و در دمای زیر ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شده است)، ۰/۰۶ مول از دی ام متیلول پروپیونیک اسید (Dimethylol propionic acid: DMPA) و به میزان هم وزن از N-متیل پیرولیدین (N-Methyl-2-pyrrolidone: NMP)، در یک فلاسک واکنش چهار دهانه که با همزن مکانیکی و کندانسور رفلکس (Reflux Condenser)، قیف قطره چکان و ورودی و خروجی N₂ تجهیز شده است، قرار داده شد. مخلوط در حال واکنش، در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد و تحت فشار نیتروژن هم زده شد. بعد از انجام کامل واکنش، به میزان ۰/۱۶ مول تولوئن دی ایزوسیانات (Toluene Diisocyanate: TDI) به داخل راکتور و با سرعتی که دما از ۷۵ درجه سانتی گراد بالاتر نرود، ریخته شد. سپس دما تا ۸۵ درجه سانتی گراد بالا برده شد و واکنش تا زمانی که غلظت گروه‌های ایزوسیاناتی به مقداری مشخص برسد ادامه یافت. سپس مخلوط تا دمای زیر ۶۰ درجه سانتی گراد سرد شد و ۰/۰۸ مول فنول (که با ۱۵۰ میلی لیتر استون رقیق شده است) به صورت قطره قطره به راکتور اضافه شد تا گروه‌های ایزوسیانات آزاد از بین برود. واکنش تا زمانی ادامه می‌یابد که هیچ نقطه اوجی (Peak) مربوط به ایزوسیانات در طیف حاصل از FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) نمونه‌های جمع‌آوری شده از مخلوط واکنش مشاهده نشود. پیش پلیمرهای بلوک شده پلی یورتان (Blocked PU pre-polymers) تا ۵۰ درجه سانتی گراد خنک شد و عامل خنثی‌کننده تری اتانول آمین (۰/۰۶ مول) اضافه شد و واکنش تا تشکیل یونومر و به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. در نهایت آب دیونیزه به منظور ایجاد پراکنش در نانوذره و تحت هم زدن شدید اضافه شد. در نتیجه نانوذره پلی یورتان با پراکنش یکنواخت حاصل می‌شود که استون باقیمانده در محلول آن، تحت خلأ کم در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد خارج می‌شود. محلول نهایی با آب به طریقی که در هر میلی لیتر از محلول

که R درصد رهائش تجمعی، V حجم نمونه برداری شده، V₀ حجم ورودی، C_i و C_n غلظت کورکومین را در زمان‌های مختلف نشان می‌دهد و m_{drug} جرم کورکومین در نانو ذرات پلی‌یورتان را نشان می‌دهد.

کشت سلولی

سلول‌های ملانومای موشی (F10B16) و رده سلولی سالم فیروبلست موشی (L929) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد.

این سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)، شامل ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر جیتامایسین (Gentamicin)، ۳۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر گلوتامین (Glutamine)، ۰/۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر فونگیزون (Fungizone)، ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر استرپتومایسین (Streptomycin) و ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Penicillin) به صورت تک لایه کشت داده می‌شوند و با ۰/۵ گرم/لیتر تریپسین (Trypsin) و ۰/۲ گرم/لیتر EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) جدا شده و برای رسیدن به مرحله نمایی چند بار پاساژ داده می‌شوند. در همه مراحل سلول‌ها باید در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار CO₂ ۵ درصد انکوبه و نگهداری شوند. تمامی مواد کشت سلول از شرکت Gibco آمریکا خریداری شده‌اند.

جذب سلولی نانو ذرات توسط سلول‌ها

نور فلورسانس سبز ساطع شده از کورکومین در هنگام تحریک آن با نور فرابنفش، به عنوان روشی برای نمایش میزان ورود و جذب کورکومین به داخل سلول استفاده می‌شود. بدین منظور سلول‌ها به مدت ۴ ساعت با غلظت ۲۵ میکرومول نانو کورکومین پلی‌یورتانی تیمار شده، سپس محیط کشت حاوی دارو خارج و بعد از شستشوی سلول‌ها با PBS (Phosphate Buffered Saline)، عکس‌برداری با

۲۵۰ کیلوژول در ۱۵ ثانیه نانوسامانه پلی‌یورتان نسبت به کورکومین (۰/۷۵:۱، ۱:۱، ۱/۲۵:۱، ۱/۵:۱، ۱/۷۵:۱، ۲:۱) بارگیری و با دور ۲۱۰۰۰ و به مدت ۳۰ دقیقه سانتیفریوژ شد. میزان طیف جذبی مقدار کورکومین موجود در مایع رویی جدا شده، پس از خشک کردن کردن منجمد (Freeze Dry) و سپس حل کردن در متانول، در نهایت با استفاده از سیستم اسپکتروسکوپی فلورسانس (Fluorescence Spectroscopy) (Perkin Elmer، آمریکا) اندازه‌گیری می‌شود. نمونه‌های کورکومین در جذب ۴۲۰ نانومتر و نشر ۴۳۰ تا ۶۰۰ نانومتر و با عرض شکاف ۵ نانومتر بررسی شد.

تعیین نمایه (Profile) رهائش کورکومین از پلی‌یورتان

برای تعیین رهائش کورکومین از ذرات پلی‌یورتان از بافر فسفات (۰/۰۱ مولار و pH= ۷/۴) و بافر سیترات (۰/۰۱ مولار و pH= ۵/۴) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر از محلول میسلی داخل کیسه دیالیز (Spectrapor، MW cutoff 3500 g/mol-1) ریخته شد و در ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات (۰/۰۱ مولار و pH= ۷/۴) و بافر سیترات (۰/۰۱ مولار و pH= ۵/۴) به صورت مجزا نیز ریخته شد و توین ۸۰ (Tween 80) به عنوان یک امولسی‌فایر (Emulsifier) برای بازداري از رسوب احتمالی داروی رهاسازی شده استفاده شد. مطالعه رهائش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از یک حمام آبی ارتعاشی (Shaking Water Bath) (GFL، آلمان) انجام شد. در بازه‌های زمانی تخصیص داده شده نمونه برداری در ساعات ۰، ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ انجام شد. در هر مرتبه ۳۰۰ ماکرولیتر از هر نمونه الیکوت (Alicot)، منجمد و خشک شد و در ۲ میلی‌لیتر از متانول حل شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروسکوپی فلورسانس برای تعیین کیفیت رهائش کورکومین بررسی شد. رهائش تجمعی دارو از نانو ذره، با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$R = \frac{V \sum_{n=1}^n C_i + V_0 C_n}{m_{drug}}$$

میکروسکوپ فلورسانس انجام گرفت. به منظور بررسی کارایی عملکرد حامل های پلی یورتانی در راستای افزایش حلالیت و دسترسی زیستی کورکومین، یک گروه کنترل از سلول ها که با غلظت مساوی از کورکومین تیمار شده بودند، نیز عکس برداری شدند.

آزمون MTT برای بررسی و سنجش سمیت

MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl] tetrazoliumbromide (MTT) assay به طور گسترده برای اندازه گیری فعالیت های متابولیکی سلول ها در شرایط برون تنی (In vitro) استفاده می شود. اساس این روش بر قابلیت سلول های زنده در تبدیل نمک زرد MTT قابل حل در آب به کریستال های بنفش غیر قابل حل در آب فورمازان (Formazan) است. برای تهیه ۵ میلی گرم از پودر MTT رادر هر ۱ سی سی از بافر فسفات سالین (PBS) حل و سپس محلول به دست آمده با فیلتر ۰/۲ فیلتر شد. برای سنجش به روش MTT از پلیت ۹۶ خانه ای استفاده شد. تعداد ۱۰۰۰۰ سلول [هم سلول های سالم فیروبلست موشی (L929) و هم سلول های سرطانی ملانوما موشی (F10B16)] برای هر ۲۰۰ ماکرولیتر از محیط کشت تهیه و در هر چاهک ریخته و ۲۴ ساعت به سلول ها اجازه رشد و تکثیر داده شد. سپس مقادیر مختلف از کورکومین در حلال آلی DMSO و به نسبت ۲ در صد حجمی / حجمی نسبت به محیط کشت (از غلظت ۰ تا ۶۰ میکرومولار) و همچنین نانوسامانه کورکومین پلی یورتان با غلظت های مشابه و نانوذره پلی یورتان با همین غلظت ها به سلول ها (با تکرار حداقل ۵ چاهک حاوی سلول برای هر آزمون) تزریق شد. سپس آزمون MTT در زمان های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تزریق این مواد برای نمونه ها انجام شد و بعد از ۴ ساعت انکوباسیون، همه محلول موجود خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. ترکیب حاصل پس از ۵ دقیقه قرار گرفتن روی شیکر (Shaker)، با دستگاه قرائت گرا ابزا (Biochrom Asys Expert 96).

آمریکا) خوانده شد [۲۳-۲۸].

استخراج RNA

RNA کل از سلول های تیمار شده با PBS یا کورکومین و نانوسامانه کورکومین بارگیری شده با پلی یورتان با استفاده از محلول استخراج RNA با روش RNX PLUS (سیناژن، ایران) و بر اساس دستورالعمل ارائه شده شرکت از سلول های سرطانی استخراج شد. مقدار ۱ میکرولیتر از DNase I به منظور حذف DNA استفاده شد و به منظور بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده و حصول اطمینان از عدم آلودگی پروتئینی نمونه ها، طول موج کلیه نمونه ها در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد و نسبت A₂₆₀/A₂₈₀ برای کلیه نمونه ها به دست آمد که این نسبت برای کلیه نمونه ها ۱/۸ تا ۱/۸۵ بوده است و نشان از عدم آلودگی پروتئینی دارد. مراحل تهیه cDNA با استفاده از مخلوط آغازگرهای (Random Hexamer) و پلی A و کیت RT (Reverse Transcriptase) (Bioneer، آلمان) نسخه برداری معکوس شد. واکنش RT در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر در حالتی که ۱ میکروگرم از RNA کل استفاده شد انجام و پس از تهیه cDNA، مقدار ۵ میکرولیتر از آن برای واکنش Real Time-PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده شد.

واکنش نسخه برداری معکوس (cDNA Synthesis)

ساخته cDNA بر طبق دستورالعمل PrimScript™ RT reagent kit (Takara، ژاپن) انجام گرفت. مخلوط واکنش مطابق دستورالعمل کیت و در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر آماده و ساخت cDNA با استفاده از آغازگرهای الیگو Dt و راندوم هگزامر (Random Hexamer) صورت گرفت. واکنش نسخه برداری معکوس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. در پایان آنزیم نسخه بردار معکوس در شرایط دمایی ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه غیر فعال شد.

آزمون Real Time-PCR

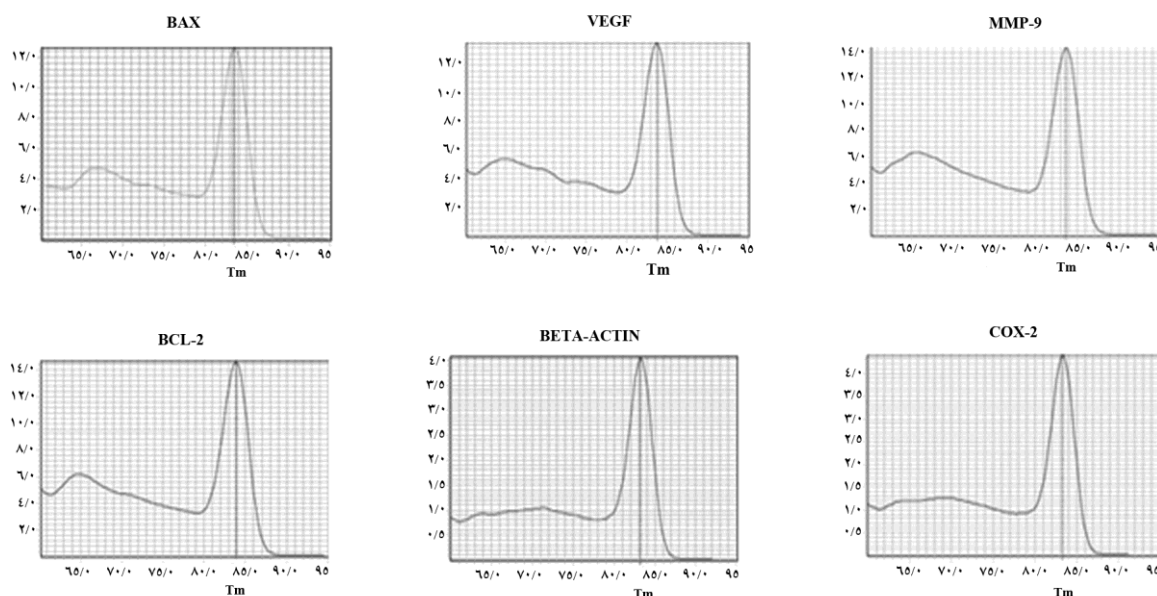
آزمون Real Time-PCR در دستگاه (Applied Biosystems آمریکا) در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به ازای هر واکنش مقدار مواد براساس جدول ۱ استفاده می شود.

جدول ۱ مقدار مواد مورد نیاز برای هر واکنش در آزمون Real-time PCR

۱۰ میکرولیتر	Master mix (2x) SYBR Green
۵ میکرولیتر	الگو
۰/۴ میکرولیتر	آغازگرها
تقریباً ۲۰ میکرولیتر	ddH ₂ O

شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال سازی

اولیه در دمایی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و در ادامه ۴۵ چرخه برای واسرشت سازی (۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد) و مرحله اتصال/طویل سازی توأم (۱ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد) است. برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب بررسی شد. نمایه دمایی مرتبط برای رسم منحنی ذوب از دمایی ۶۰ درجه به ۹۵ درجه سانتی گراد بود که افزایش دما ۰/۵ درجه سانتی گراد بر ثانیه قرار داده شده بود که در شکل ۱، منحنی ذوب تمامی ژن ها نشان داده شده است. در انتها برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ آمده است.



شکل ۱ نمودار منحنی ذوب ژن های استفاده شده در Real Time-PCR

جدول ۲ توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون Real Time-PCR

ژن	آغازگر رفت (5'-3')	آغازگر برگشت (3'-5')	طول قطعه تکثیری (جفت باز)
Beta-actin	CTGGCACCCAGCACAATG	GCCGATCCACACGGAGTACT	۸۵
COX-2	TGTACTACACCTGAATTTCTGAC	GTTGTTCACAATGTTCCAGAC	۸۷
BAX	AGCTGCAGAGGATGATTGC	GTTGAAGTTGCCGTGAGAAA	۸۸
BCL-2	TGCCTTTGTGGAAGTGTACG	GGCCAAACTGAGCAGAGTC	۹۶
VEGF	AGTCCCATGAAGTGATCAAG	ACGGCTTGAAGATGTACTC	۹۵
MMP-9	GTGTCTGGAGATTGCACTTG	ACTGGAAGATGTCGTGTGAG	۸۸

تجزیه و تحلیل آماری

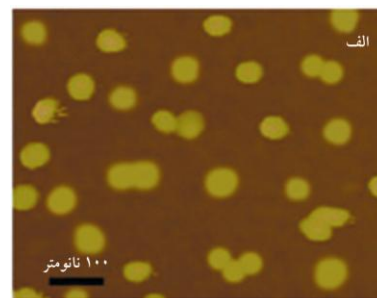
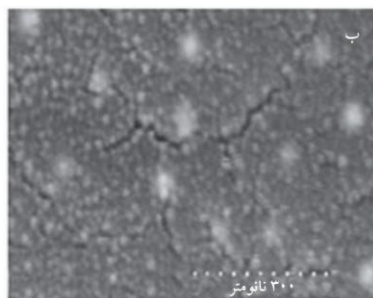
برای انجام مطالعات آماری از SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. اختلاف آماری بین گروه‌های کنترل، تیمار شده با استفاده از t-test بررسی و مقادیر به دست آمده با $P < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

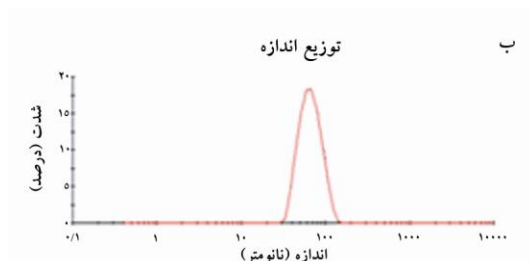
نتایج حاصل از تعیین ویژگی‌های ریخت شناختی و اندازه نانوذرات

شکل حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی انتشار میدان و میکروسکوپ نیروی اتمی نشان داد که نانوذرات حاصل دارای شکلی کروی و با پراکنش مناسب و بدون تجمع

قابل توجه است. اندازه به دست آمده از دو روش مذکور با تجزیه و تحلیل اندازه ۵۰ نانو ذره به ترتیب $2/2 \pm 61/51$ و $1/3 \pm 63/11$ است. متوسط قطر هیدرودینامیک نانو ذره بارگیری شده کورکومین و پراکنش چندگانه آن، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با استفاده از روش پراکنش نوری دینامیک، به ترتیب $1/7 \pm 62/37$ نانومتر و $2/5 \pm 0/91$ است که با متوسط پتانسیل زتای سطح نانوذره در ولتاژ $0/9 \pm 32-$ میلی‌ولت مشاهده شد. تمامی مشاهدات نشان دهنده شباهت قابل توجه داده‌های حاصل از سه آزمایش تعیین ریخت شناسی و اندازه نانوذره بود که بدین ترتیب در هر سه آزمون اندازه حدود ۶۱ تا ۶۳ نانومتر و در عکس‌های حاصل از میکروسکوپ‌های نیروی اتمی و الکترونی روبشی ریخت شناسی کروی برای نانومیسِل پلی‌پورتان تأیید شد (شکل ۲، الف و ب).

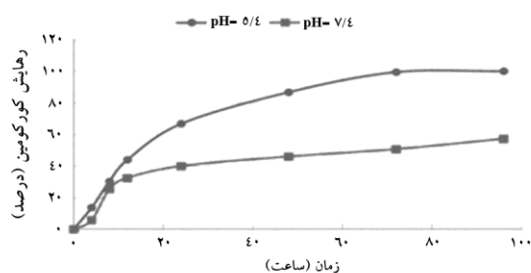


شکل ۲ تعیین ویژگی‌های ریخت شناختی و اندازه نانوذرات پلی‌پورتان با استفاده از تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی (الف) و میکروسکوپ الکترونی روبشی انتشار میدان از نانوذره پلی‌پورتان (ب)



شکل ۳ تصویر حاصل از اندازه‌گیری اندازه، بار (الف) و پراکنش چندگانه (ب) نانوذره پلی‌پورتان بارگیری شده با کورکومین با استفاده از دستگاه پراکنش نوری دینامیک

پلیمری در زمان ۹۶ ساعت اتفاق می افتد و در این زمان در $pH=7/4$ در مقایسه با $pH=5/4$ آهسته تر است. تحت شرایط مطالعه در ۴۸ ساعت رهایش کورکومین در $pH=7/4$ و $pH=5/4$ به ترتیب $86/72$ و $45/87$ درصد و در زمان ۷۲ ساعت به ترتیب $50/54$ و $99/41$ درصد و در ۹۶ ساعت به ترتیب $57/11$ و 100 درصد است.



شکل ۴: نمایه رهایش کورکومین از نانو ذره پلی یورتان در دو pH متفاوت $7/4$ (بافر فسفات) و $5/4$ (بافر سیترات)

افزایش حلالیت و دسترسی زیستی کورکومین به سلول های سرطانی توسط حامل های پلی یورتانی

عکس برداری فلورسنت برای بررسی ورود کورکومین به سلول های سرطانی و بر پایه فلورسنت ذاتی این مولکول انجام گرفت.

همان طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، سلول های تیمار شده با نانو کورکومین پلی یورتانی به واسطه ورود کورکومین در نتیجه افزایش حلالیت کورکومین، در عکس برداری با میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز دیده می شود و این در حالی است که در سلول های تیمار شده با کورکومین آزاد و به دلیل نامحلول بودن این مولکول در محیط های آبی، کورکومین به شکل ذرات نامحلول و سبز در فضای بین سلولی قابل مشاهده است.

نتایج حاصل از بارگیری کورکومین در نانو ذرات پلی یورتان

پس از آماده سازی نانو سیستم کورکومین بارگیری شده با پلی یورتان، این ترکیب سانتیفریوژ شده و مقداری از کورکومین موجود در ماده رویی جمع آوری و توسط یک طیف سنج (Amersham، سوئد) در طول موج 432 نانومتر اندازه گیری شد. میزان بازده کپسوله سازی کورکومین در نانو ذره پلی یورتان تعیین شد که حدود $0/2$ درصد ± 87 بود. فرمولاسیون میسلای پایدار کلوئیدی عالی و نگهداری دارویی خوبی در این مدت را نشان می دهد.

میزان بازده کپسوله سازی با استفاده از معادله زیر به دست می آید: درصد بازده کپسوله شدن = [(مقدار کلی کورکومین) - (کورکومین نانو کپسوله شده) / مقدار کلی کورکومین] $\times 100$ درصد در جدول ۳ نسبت های مختلف دارو به نانو ذره و بازده بارگیری حاصل از این نسبت ها آورده شده است.

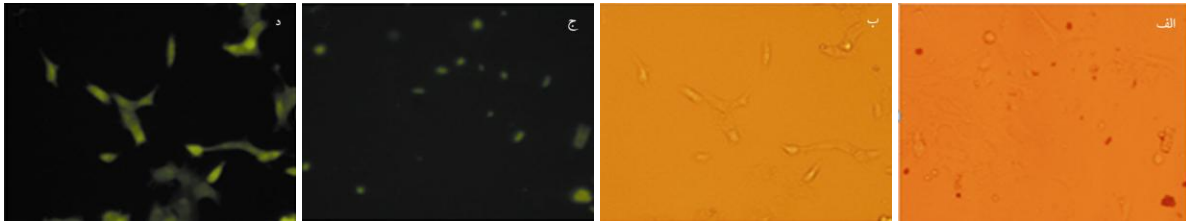
جدول ۳: نسبت های مختلف دارو به نانو ذره و بازده بارگیری

غلظت نانو ذره (میلی گرم)	غلظت دارو (میلی گرم)	بازده بارگیری (درصد)
۱	۰/۷۵	$53 \pm 2/4$
۱	۱	$62 \pm 1/7$
۱	۱/۲۵	$75 \pm 1/3$
۱	۱/۵	$87 \pm 0/2$
۱	۱/۷۵	$79 \pm 1/5$
۱	۲	$77 \pm 1/4$

بررسی نسبت های مختلف کورکومین به نسبت ثابت پلی یورتان نشان داد که بهترین نسبت برای مقدار پلی یورتان به کورکومین $1/5$ به 1 است.

نتایج رهایش کورکومین از نانو ذرات پلی یورتان

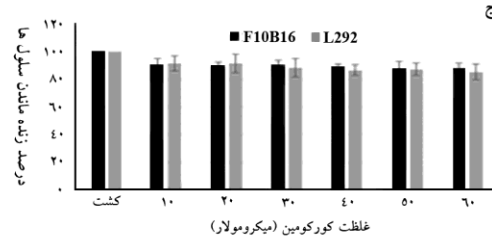
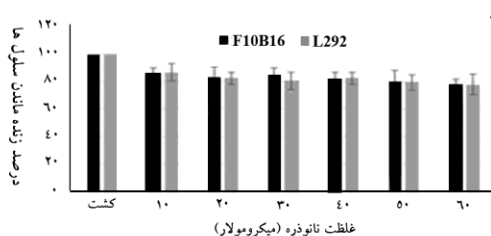
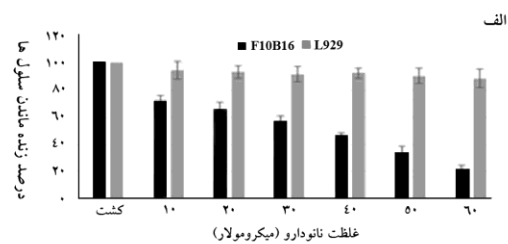
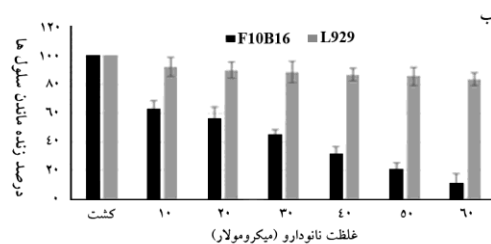
مطابق شکل ۴، رهایش کامل کورکومین از میسل های



شکل ۵ مطالعه ورود نانو کورکومین پلی یورتانی در رده سلولی F10B16 با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (بزرگنمایی ۴۰×): تصویر میکروسکوپ نوری سلول‌های تیمار شده با کورکومین (الف)، تصویر میکروسکوپ نوری سلول‌های تیمار شده با نانوکورکومین پلی یورتانی (ب)، تصویر میکروسکوپ نور فلورسنت سلول‌های تیمار شده با کورکومین (ج) و تصویر میکروسکوپ نور فلورسنت سلول‌های تیمار شده با نانوکورکومین پلی یورتانی (د)

نتایج آزمون MTT

اثر کورکومین، نانوذره پلی یورتان و نانوسامانه کورکومین بارگیری شده با پلی یورتان روی رده سرطانی ملانومای موشی F10B16 و سلول سالم فیروبلاست L929 با استفاده از آزمون MTT در زمان‌های مختلف بعد از تزریق ترکیبات مورد نظر (۲۴ و ۴۸ ساعت) بررسی و به صورت نمودار نمایش داده شده است (شکل ۶). در ابتدا غلظت‌های مختلف نانو فرمولاسیون کورکومین (۱۰ تا ۶۰ میکرومولار) فراهم و به سلول‌ها تزریق شد و بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت با استفاده از آزمون MTT سنجش و ارزیابی انجام شد. نانو داروی



شکل ۶ بررسی اثر غلظت‌های مختلف (از ۰ تا ۶۰ میکرومولار) نانوداروی کورکومین-پلی یورتان تزریق شده بعد از ۲۴ (الف) و ۴۸ ساعت (ب)، نانوذره پلی یورتان (ج) و کورکومین (د) بعد از ۴۸ ساعت بر سلول‌های سرطانی F10B16 و سالم L929

بحث

کورکومین دارای خواص دارویی بسیار زیادی از قبیل خواص ضد اکسیدانت، ضد جهش، ضد تومور و سرطان، مقابله با رگ‌زایی تومور (Angiogenesis)، ضد کلسترول و باکتری است [۵-۱۳]. 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 (Bioavailability) ضعیف آن در محیط بدن است. گزارش‌های مختلف بیان می‌کند که حلالیت کورکومین وقتی در برخی ناقل‌های دارویی حل شده یا کپسوله می‌شود افزایش می‌یابد [۴]. در این مطالعه فرض شده است که نانوذرات آب‌دوست پلی‌یورتان می‌توانند پایداری و زیست‌سازگاری کورکومین را بالا برده و زمان حضور در گردش خون را افزایش دهد و بنابراین می‌توان از آثار ضد توموری آن استفاده کرد. بنابراین در این مطالعه یک فرمولاسیون جدید از ترکیبی از نانوذره پلی‌یورتان به همراه کورکومین ساخته و اثر آن بر درمان رده سلولی ملانومای موشی و سلول سالم بررسی شده است. مطالعات نشان داده‌است که نانوذرات کوچک‌تر از ۱۰ نانومتر می‌تواند به سرعت از طریق سیستم دفع کلیوی یا نشست عروقی (Extravasation) دفع شود، حال آن‌که نانوذرات بسیار بزرگ‌تر، ممکن است با احتمال بیشتری توسط سیستم فاگوسیت‌های تک هسته‌ای (Mononuclear Phagocytes: MNP) شناسایی و دفع شود [۲۹، ۳۰] بنابراین به‌منظور هر چه بیشتر کردن اثر افزایش نفوذپذیری و نگهداری [Permeability and Retention (EPR) Effect] و همچنین گریز مؤثر از موانع فیزیولوژیکی، بسیاری از مطالعات، اندازه تقریبی بین ۱۰ تا ۲۵۰ نانومتر را به‌منظور اهداف تحویل دارو مناسب می‌دانند [۳۰]. بر این اساس نانو داروی پلی‌یورتانی که با ابعاد $1/7 \pm 62/37$ نانومتر ساخته شده است، دارای ابعادی بسیار مناسب برای اهداف تحویل دارو است. پس از بارگیری نمودن کورکومین با نانوذره پلی‌یورتان به بررسی ویژگی‌های نانوسامانه

نتایج بررسی بیان کمی ژن‌ها با Real Time RT-PCR

PCR

نتایج نشان می‌دهد که بیان ژن‌های VEGF، MMP-9 و COX-2 که زیردست عامل رونویسی NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) فعالیت می‌کنند در اکثر سرطان‌ها دچار بیش بیان شده و باعث پیشروی تومور می‌شوند. بیان این ژن‌ها متأثر از کورکومین نیز هست چرا که کورکومین در عمده سرطان‌ها عامل NF- κ B را از کار می‌اندازد که به نوبه خود در بیان ژن‌های مذکور نیز تأثیر می‌گذارد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیان ژن‌های VEGF، MMP-9 و COX-2 در هر دو گروه نانوپلی‌یورتان دارای کورکومین و کورکومین تنها، به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ($P < 0/05$) که این کاهش در گروه نانوپلی‌یورتان دارای کورکومین نسبت به کورکومین تنها شدیدتر است (شکل ۷). بیان ژن Bcl-2 به‌طور قابل توجهی در گروه نانوپلی‌یورتان دارای کورکومین و کورکومین تنها کاهش می‌یابد ($P < 0/05$) در حالی‌که در مورد ژن BAX، افزایش بیان ژن در این دو گروه نسبت به حالت PBS مشاهده شد. نسبت بیانی BAX/Bcl-2 در گروه نانوپلی‌یورتان دارای کورکومین نسبت به کورکومین تنها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$). نتایج نانوپلی‌یورتان به تنهایی مشابه با نتایج PBS بود به همین دلیل نتایج آورده نشد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد.



شکل ۷ میزان بیان ژن‌های VEGF، MMP-9، BAX، Bcl-2 و COX-2 در سه گروه کنترل PBS گروه تیمار شده با کورکومین و گروه تیمار شده با نانوسامانه حاوی کورکومین

ایجاد شده پرداخته شد.

میزان بازده کپسوله سازی کورکومین در نانوذره پلی یورتان حدود $0/2 \pm 87\%$ درصد بود که فرمولاسیون میسلای پایداری کلوییدی عالی و نگهداری دارویی خوبی در این مدت را نشان می دهد. سیستم طیف سنجی فلورسانس مقدار ۸۷ درصد را برای کپسوله کردن کورکومین در پلی یورتان نشان می دهد که این نتایج بیانگر این است که بارگیری دارو در نانوذره به خوبی انجام شده و از نسبت بالایی برخوردار است. علاوه بر این؛ نانوذرات در هنگام مجاورت با محیط اسیدی رفتار هوشمندانه ای را در رهایش دارو از خود نشان می دهد به این ترتیب که به علت قرار گرفتن در محیط اسیدی سلول های سرطانی، داروی بیشتری را از خود رهایش می کنند. در نتایج حاصل از تصاویر میکروسکپ فلورسانس برای تعیین میزان جذب و ورود دارو به درون سلول نشان می دهد که کورکومین به میزان بالایی وارد سلول ها شده است و بنابراین کشندگی ناشی از تزریق نانوسامانه به سلول ها ناشی از ورود و نفوذ کورکومین به درون سلول و آسیب به قسمت ها و بخش های حساس درون سلول است. مطالعات متعددی، اثر ضد توموری کورکومین را در رابطه با انواع مختلف سرطان ها از جمله سرطان سینه، ریه، پروستات، تخمدان، روده، پانکراس، مغز، پوست و غیره را چه در مطالعات برون تنی و چه در مطالعات درون تنی (In vivo) نشان داده است [۳۱]. در این مطالعه نتایج حاصل از بررسی های درون تنی با استفاده از آزمون MTT نشان داد که در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از درمان برای سلول های F10B16 با افزایش غلظت نانو داروی کورکومین پلی یورتانی درصد بقای سلول ها کاهش می یابد و IC_{50} برای هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت حدوداً در غلظت های $33/2$ و $25/4$ ماکرومولار اتفاق می افتد. این درحالی است که برای سلول های سالم، کشندگی حاصل از نانو دارو ناچیز بوده و برای این غلظت های به کار رفته IC_{50} ندارد. بررسی تأثیر نانوذره و داروی کورکومین به طور جداگانه و با غلظت های مختلف به هر دو رده سرطانی و سالم نشان دهنده تأثیر

کشندگی بسیار اندک آن ها است. این داده ها با نتایج حاصل از بررسی آثار تیمارهای مشابه نانو کورکومین دندروزومی مطابقت داشت [۳۲]. بنابراین تأثیر نانو دارو به طور اختصاصی فقط روی سلول های سرطانی است و روی سلول های سالم اثری ندارد که این به دلیل اختصاصی عمل کردن داروی کورکومین در مورد هدف قرار دادن مؤثرتر سلول های سرطانی نسبت به سلول های سالم است؛ به همین دلیل است که تأثیر آن روی سلول های سرطانی بیشتر است [۳۳]. از طرفی نانوذره سمیت نداشته و کاملاً زیست سازگار بوده و دارو هم اثری روی کاهش تکثیر سلول ها ندارد که این به خاطر از بین رفتن اثر دارو به علت نیمه عمر پایین آن است. اگر چه تأثیر نانو حامل های پلیمری مختلف مانند پلی اتیلن ایمین (Polyethylenimine) و پلی اکریلات (Polyacrylate) در انتقال مؤثر داروی کورکومین به سلول های هدف و تأثیر قابل توجه آن ها بررسی شده است اما ترکیب نانو داروی کورکومین - پلی یورتان نه تنها تأثیر معنی دارتری در بازداري و ممانعت از رشد سلول های سرطانی نشان داده است، بلکه شواهد نشان دهنده عدم سمیت قابل توجه آن روی سلول های سالم است [۳۴، ۳۵]. علاوه بر این نانوذره پلی یورتان برای انتقال داروهای آب گریز دیگری از جمله پاکلی تاکسول (Paclitaxel) نیز استفاده شده است که نتایج بسیار قابل توجهی را در بر داشته است [۳۶]. اما در این مطالعه برتری حاصل ناشی از هدفمند بودن نانوذره به علت وجود گروه های تری اتانول آمین روی آن و همچنین اختصاصی عمل کردن کورکومین روی سلول های سرطانی و دارا بودن اثر کشندگی بیشتر آن نسبت به سلول های سالم است [۳۳]. نتایج Real Time-PCR نیز نشان می دهد که نانوپلی یورتان دارای کورکومین به مقدار قابل توجهی میزان بیان mRNA ژن های $VEGF$ ، $Bcl-2$ ، $MMP-9$ و $COX-2$ را کاهش می دهد در حالی که باعث افزایش بیان ژن BAX می شود. تیمار کورکومین در مقایسه با فرمولاسیون نانوسامانه ای آن، به نسبت بسیار کمتری باعث کاهش بیان ژن های $VEGF$ ، $Bcl-2$ ، $MMP-9$ و $COX-2$ می شود و بیان ژن BAX را نیز کمتر از

علاوه بر آن خود نانوذره خاصیت کشندگی ندارد و کاملاً زیست سازگار است و در نتیجه اثری روی کاهش تکثیر سلول‌ها ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین محترم آزمایشگاه‌های ایمونولوژی و بیوفیزیک دانشگاه تربیت مدرس که کلیه امکانات را فراهم نمودند و همچنین مسئولین پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران و دانشگاه تهران که در این امر نقش مهمی را ایفا نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

تیمار فرمولاسیون نانویی آن افزایش می‌دهد. همچنین نتایج حاصل از نانوذرات پلی‌یورتانی با PBS مشابهت کامل داشت که نشان دهنده عدم القای آثار مرگ برنامه ریزی شده سلولی روی سلول‌های تیمار شده است.

نتایج حاصل از آزمون MTT روی سلول‌های سرطان ملانومای موشی (F10B16) و سلول‌های سالم فیروبیلاست موشی (L929) نشان دهنده تأثیر نانو دارو فرموله شده به طور اختصاصی روی سلول‌های سرطانی است در حالی که روی سلول‌های سالم کشندگی معنی داری ندارد که اختصاصی عمل کردن داروی کورکومین در از بین بردن مؤثرتر سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم دلیل عمده این یافته 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] Shapira A, Livney YD, Broxterman HJ, Assaraf YG. Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance. *Drug Resist Updat* 2011; 14(3): 150-63.
- [3] Aziz K, Nowsheen S, Georgakilas AG. Nanotechnology in cancer therapy: targeting the inhibition of key DNA repair pathways. *Curr Mol Med* 2010; 10(7): 626-39.
- [4] Bharali DJ, Siddiqui IA, Adhami VM, Chamcheu JC, Aldahmash AM, Mukhtar H, Mousa SA. Nanoparticle delivery of natural products in the prevention and treatment of cancers: current status and future prospects. *Cancers (Basel)* 2011; 3(4): 4024-45.
- [5] Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 2008; 75(4): 787-809.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(1): 40-59.
- [9] Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. *J Curr Sci* 2004; 87(1): 44-53.
- [10] Shailendiran D, Pawar N, Chanchal A, Pandey

- RP, Bohidar HB, Verma AK. Characterization and antimicrobial activity of nanocurcumin and curcumin. International Conference on Nanoscience, Technology and Societal Implications 2011; 1-7.
- [11] Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 2005; 41(13): 1955-68.
- [12] Gupta NK, Dixit VK. Bioavailability enhancement of curcumin by complexation with phosphatidyl choline. *J Pharm Sci* 2011; 100(5): 1987-95.
- [13] Shishodia S, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Role of curcumin in cancer therapy. *Curr Probl Cancer* 2007; 31(4): 243-305.
- [14] Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med* 1998; 64(4): 353-6.
- [15] Narayanan NK, Nargi D, Randolph C, Narayanan BA. Liposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice. *Int J Cancer* 2009; 125(1): 1-8.
- [16] Subramaniam D, May R, Sureban SM, Lee KB, George R, Kuppusamy P, Ramanujam RP, Hideg K, Dieckgraefe BK, Houchen CW, Anant S. Diphenyl difluoroketone: a curcumin derivative with potent in vivo anticancer activity. *Cancer Res* 2008; 68(6): 1962-9.
- [17] Bisht S, Feldmann G, Soni S, Ravi R, Karikar C, Maitra A, Maitra A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *J Nanobiotechnology* 2007; 5: 3.
- [18] Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(5): 1310-6.
- [19] Hafeman AE, Zienkiewicz KJ, Carney E, Litzner B, Stratton C, Wenke JC, Guelcher SA. Local delivery of tobramycin from injectable biodegradable polyurethane scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed* 2010; 21(1): 95-112.
- [20] Mei L, Sun H, Song C. Local delivery of modified paclitaxel-loaded poly(epsilon-caprolactone)/pluronic F68 nanoparticles for long-term inhibition of hyperplasia. *J Pharm Sci* 2009; 98(6): 2040-50.
- [21] Hung WC, Shau MD, Kao HC, Shih MF, Cherng JY. The synthesis of cationic polyurethanes to study the effect of amines and structures on their DNA transfection potential. *J Control Release* 2009; 133(1): 68-76.
- [22] Khosroushahi AY, Naderi-Manesh H, Yeganeh H, Barar J, Omidi Y. Novel water-soluble polyurethane nanomicelles for cancer chemotherapy: physicochemical characterization and cellular activities. *J Nanobiotechnology* 2012; 10: 2.
- [23] Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *J Applied Spectroscopy Reviews* 2008; 43(2): 134-79.
- [24] Price P, McMillan TJ. Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation. *Cancer Res* 1990; 50(5): 1392-6.
- [25] 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. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33(11): 813-23.
- [26] Malich G, Markovic B, Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology* 1997; 124(3): 179-92.
- [27] Kesharwani P, Tekade RK, Gajbhiye V, Jain K, Jain NK. Cancer targeting potential of some ligand-anchored poly(propylene imine) dendrimers: a comparison. *Nanomedicine* 2011; 7(3): 295-304.
- [28] Buch K, Peters T, Nawroth T, Sanger M, Schmidberger H, Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay--a comparative study. *Radiat Oncol* 2012; 7: 1.
- [29] Kim WH, Chon CY, Moon YM, Kang JK, Park IS, Choi HJ. Effect of anticancer drugs and desferrioxamine in combination with radiation on hepatoma cell lines. *Yonsei Med J* 1993; 34(1): 45-56.
- [30] Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(8): 615-27.
- [31] Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm* 2008; 5(4): 505-15.
- [32] Strimpakos AS, Sharma RA. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10(3): 511-45.
- [33] 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: 12.
- [34] Babaei E, Sadeghizadeh M, Hassan ZM, Feizi MA, Najafi F, Hashemi SM. Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol* 2012; 12(1): 226-34.
- [35] 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.
- [36] Huang MT, Newmark HL, Frenkel K. Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice. *J Cell Biochem Suppl* 1997; 27: 26-34.