

Study of Loading, Cytotoxicity, Uptake, and Release of Curcumin from a Novel Gemini Surfactant Nanocarrier

Maral Rahimzadeh¹, Majid Sadeghizadeh^{2*}, Farhood Najafi³, Seyed Shahriar Arab⁴,
Hamid Mobasher⁵

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Resin and Additives, Institute for Color Science and Technology, Tehran, Iran
- 4- Assistant Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 5- Associate Professor, Laboratory of Membrane Biophysics, Institute of Biochemistry and Biophysics, Tehran University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: sadeghma@modares.ac.ir*

Received: 14/Aug/2016, Accepted: 06/Nov/2016

Abstract

Objective: Numerous researches have been conducted to comprehend the anti-cancer effects of curcumin (Cu). Although the anti-proliferative properties of Cu on cancerous cells is known, the clinical application of this gold substrate is limited. This limitation is mostly due to low solubility, inefficient bioavailability, rapid metabolism, and improper uptake. In this study, we have synthesized a novel biodegradable gemini surfactant (Gs), after which the curcumin (Cu) molecules were encapsulated within the polymer to overcome its physicochemical limitations.

Methods: We prepared Gs-Cu nanoparticles by the nanoprecipitation method. Size and polydispersity index of the nanoparticles were determined by the dynamic light scattering (DLS) technique. The release profile of Cu from the polymer matrix was studied, and the MTT assay and cellular uptake of Gs-Cu on MDA-MB-231 cells were investigated in vitro.

Results: The Gs polymer had the capability to form polymersomes in an aqueous solution; a narrow size distribution was obtained ($PDI \cong 0.3$). The encapsulation efficiency approximated 87%. We observed a sustained release profile due to incorporation of Cu into the polymer matrix. The Gs-Cu complex showed more cytotoxicity compared to free Cu because of the higher rate of cellular internalization.

Conclusions: The data indicate that Gs polymersomes can be regarded as nanocarriers for hydrophobic curcumin molecules.

Keywords: Curcumin, Anti-cancer, Gemini surfactant, Nanocarrier, Polymersome

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No. 1, Pages: 13-27

مطالعه بارگزاری، سمیت، جذب و رهایش کورکومین از نانوحامل جدید جمینی سورفکتانت

مارال رحیمزاده^۱، مجید صادقیزاده^{۲*}، فرهود نجفی^۳، سید شهریار عرب^۴، حمید مباحثی^۵

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، مؤسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ، گروه پژوهشی رزین و مواد افزودنی، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵- دانشیار، گروه بیوفیزیک، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB)، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

Email: sadeghma@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۵/۰۸/۱۶

دریافت مقاله: ۹۵/۰۵/۲۴

چکیده

هدف: در دهه‌های اخیر پژوهش‌های بسیاری در راستای بررسی خواص ضد سرطانی کورکومین انجام شده‌است اما با وجود تمام خواص کشندگی کورکومین بر سلول‌های سرطانی استفاده بالینی از این ماده‌ی طلایی طبیعی محدود باقی مانده است. علت این محدودیت را می‌توان در محلولیت پایین، زیست دسترس‌پذیری کم، متابولیسم سریع و عدم جذب جست و جو کرد. در این مطالعه، برای بهبود خواص فیزیک و شیمیایی کورکومین، یک جمینی سورفکتانت زیست تخریب‌پذیر جدید ساخته شد و مولکول‌های کورکومین داخل آن بارگزاری شد.

مواد و روش‌ها: نانو ذرات جمینی سورفکتانت- کورکومین با روش رسوب‌دهی نانو تهیه شد و اندازه و توزیع اندازه ذرات آن به کمک روش پراکندگی دینامیکی نوری تعیین شد. همچنین رهایش دارو از بستر پلیمر بررسی شد و در نهایت آزمون سمیت MTT و جذب سلولی به‌صورت برون‌تنی روی سلول‌های MDA-MB-231 صورت گرفت.

نتایج: پلیمر جمینی سورفکتانت قادر است در محیط آبی، پلیمروزوم با توزیع اندازه ذره‌ای ($PDI \approx 0.3$) تشکیل دهد. بازده بارگزاری حدود ۸۷ درصد محاسبه شد. در اثر پیوستن کورکومین به بستر پلیمر رهایش کنترل شده مشاهده شد. همچنین به علت جذب سلولی زیاد، کمپلکس جمینی سورفکتانت-کورکومین سمیت سلولی بیشتری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان داد که پلیمروزوم‌های جمینی سورفکتانت می‌تواند به‌عنوان نانو حامل برای مولکول‌های آب‌گریز کورکومین در نظر گرفته شود.

کلیدواژگان: کورکومین، ضد سرطان، جمینی سورفکتانت، نانو حامل، پلیمروزوم

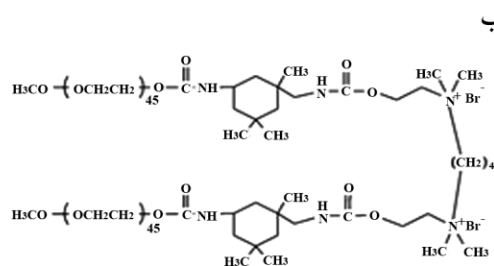
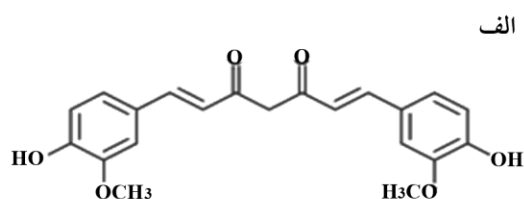
پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵، صفحات: ۱۳-۲۷

مقدمه

به تغییر سریع سلول‌هایی که از حدود طبیعی خود بیشتر رشد و تقسیم می‌شوند، و سپس در سراسر بدن پخش شده و به سایر اندام‌ها حمله می‌کنند، سرطان گفته می‌شود [۱]. سرطان یکی از علل اصلی مرگ و میر در جهان است در نتیجه

مطالعه اثر بخشی نانوحامل جمینی سورفکتانت حاوی کورکومین

سبب القا خاصیت پنهان کنندگی (Stealth) می شود که از برهم کنش با آپسونین (Opsonin) خون جلوگیری می کند [۱۲-۱۴]. نانوذرات Gs قادر است مولکول های کورکومین را در آب حل کند و آن ها را در برابر تجزیه محافظت کند. سورفکتانت Gs به عنوان یک ناقل جدید ساخته شد و توانایی آن برای حمل مولکول های کورکومین به عنوان یک ماده آب گریز بررسی شد. در واقع هدف از این پژوهش، بهبود خواص فیزیکی شیمیایی کورکومین برای گسترش استفاده از این داروی گیاهی در درمان سرطان سینه است.



شکل ۱ ساختار مولکولی (الف) کورکومین و (ب) Gs یورتانی پگیله

مواد و روش ها

مواد

سلول های سرطان سینه انسانی (MDA-MB-231) که از قدرت متاستازی و تهاجمی خوبی برخوردارند برای این مطالعه انتخاب شدند. این سلول ها که در محیط کشت RPMI 1640 رشد داده شده بودند، از مؤسسه پاستور خریداری شدند. محیط رشد توسط ۱۰ درصد (حجمی/حجمی) FBS (Fetal Bovine Serum)، ۱ درصد ال-گلوتامین و ۱ درصد پنی سیلین/استرپتومایسین کامل شد.

روش های مقابله با سرطان در دهه های اخیر مورد توجه بسیاری از محققان بوده است.

با وجود محدودیت هایی که داروهای شیمیایی دارند از جمله، به گزینی (Selectivity) کم، نیاز به دوز دارویی بالا، مقاومت دارویی و آثار جانبی ناخواسته، همواره شیمی درمانی یکی از روش های اصلی درمان سرطان بوده است [۲، ۳]. در نتیجه استفاده از داروهای با منشأ گیاهی که در مقایسه با داروهای شیمیایی یا صناعی غیر سمی و ارزان هستند، بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است [۴]. کورکومین (Curcumin) مسؤل رنگ زرد و جز فعال ادویه زردچوبه است [۵]. برخلاف خواص دارویی بسیاری که کورکومین دارد استفاده از این ماده به علت محلولیت آبی کم، جذب سلولی پایین، در دسترس پذیری زیستی (Bioavailability) کم، متابولیسم شدید در pH خنثی و حذف سریع همواره با محدودیت مواجه بوده است [۶-۹].

بسیاری از محققان برای غلبه بر این محدودیت های کورکومین به استفاده از سیستم های نانویی انتقال دارو روی آورده اند [۱۰]. نانو حامل های بر پایه لیپید و نیز نانو حامل های بر پایه پلیمر جز محبوب ترین ناقل ها برای داروهای ضد سرطانی در پژوهش های بالینی هستند [۷، ۱۱].

در این مطالعه، یک جمینی سورفکتانت یورتانی پگیله شده (mPEG urethane gemini surfactant) ساخته شد و به عنوان ناقل کورکومین بررسی شد. جمینی سورفکتانت یورتانی پگیله شده (Gemini surfactant: Gs)، یک کوپلیمر دوگانه دوست (Amphiphilic) و زیست تخریب پذیر (Biodegradable) است که از پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰، یورتان، آمین نوع سوم و اتصال دهنده هیدروکربنی ساخته شده است. ساختار مولکولی (Gs) و کورکومین (Cu) در شکل ۱ نمایش داده شده است.

نانو ذرات Gs قادر به خودآرایی و تشکیل پلیمر و زوم در محیط آبی است و این در حالی است که مولکول های پلی اتیلن گلیکول (PEG) ساختارهای پُرز ماندی (Brush) را در سطح به وجود می آورد [۱۲]. وجود مولکول های PEG در سطح،

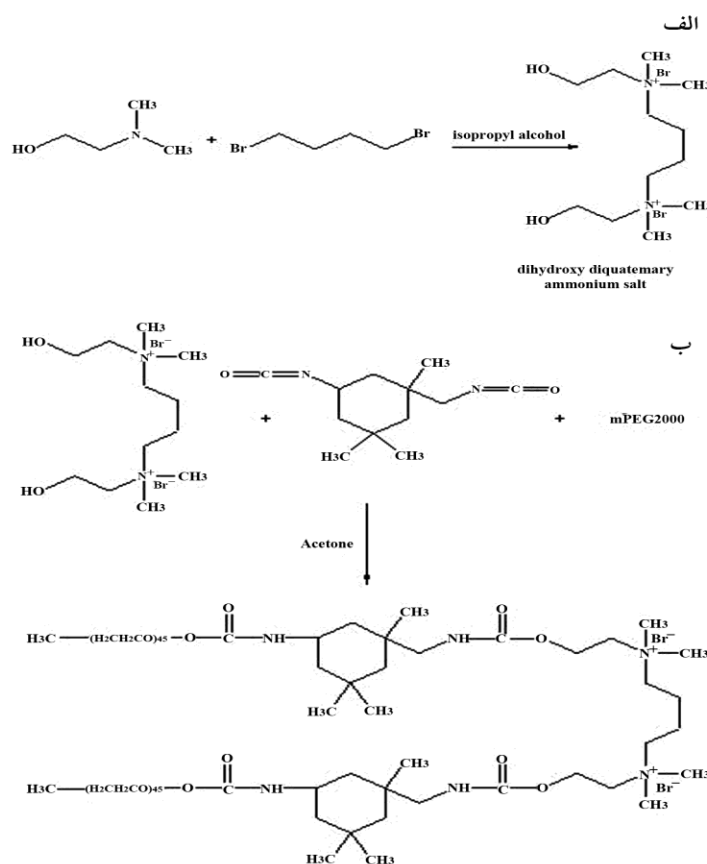
FBS، درصد ال-گلوتامین و پنی سیلین/استرپتومایسین از شرکت Thermo Fisher Scientific (آمریکا) خریداری شد. کورکومین و پایرن (Pyrene) از شرکت EMD Millipore (آمریکا) و پلی اتیلن گلیکول متیل اتر با وزن مولکولی ۲۰۰۰ از شرکت Sigma Aldrich (آمریکا) تهیه شد. ۴ و ۱-دی بروموبوتان، ۲-دی متیل آمینو اتانول، ایزو فورون دی ایزو سیانات، ایزو پروپیل الکل، متانول و استون از شرکت Merck (آمریکا) خریداری شد.

روش سنتز Gs

۱/۷۸ گرم از دی متیل آمینو اتانول (۰/۰۲ مول) و ۲/۱۵ گرم از ۱،۴-دی بروموبوتان (۰/۰۱ مول) در ۳۰ میلی لیتر از ایزوپروپیل الکل مخلوط شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۸۰ درجه

سانتی گراد حرارت داده شد. نمک دی هیدروکسی دی کواترنری (DiHydroxy DiQuaternary Ammonium: DHDQA) در دی اتیل اتر رسوب داده شد، فیلتر شد و در آون تحت شرایط خلأ در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت خشک شد. به طور متوسط بازده محصول ۹۴ درصد در اکثر سنتزها به دست آمد.

در مرحله بعد، واکنش یورتانی در استون حاوی DHDQA (۰/۱ مول/لیتر)، پلی اتیلن گلیکول متیل اتر ۲۰۰۰ و ایزو فورون دی ایزو سیانات (۰/۲ مول/لیتر) در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت انجام شد. Gs یورتانی پگیله شده با رسوب دهی در دی اتیل اتر خالص شد و سپس در آون تحت خلأ در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت خشک شد و متوسط بازده محصول ۹۲ درصد ~ به دست آمد (شکل ۲).



شکل ۲ (الف) سنتز DHDQA (ب) تولید جبینی سورفکتانت یورتانی پگیله (Gs) از طریق واکنش یورتانی

محلول حاصل با شدت ۸۰ درصد و به مدت ۱ دقیقه سونیکیت شد (GmbH, Ultrasonic UP200H, آلمان) تا محلول کاملاً یکنواخت شود. در مرحله بعد، محلول از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد تا آلودگی‌های احتمالی باکتریایی و کورکومین اضافی از محلول جدا شود. داخل تبخیر کننده چرخان (Rotary evaporator)، متانول از محلول جدا شد و پلیمر و زوم‌های حاصل به صورت انجمادی خشک شد (Freeze-dry) و برای آزمایش‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بازده بارگزاری و میزان بارگیری

پودر لیوفیلیزه (Lyophilized) پلیمر و زوم‌های Gs-Cu در متانول (به نسبت ۱:۱۰، وزنی/حجمی) حل شد و به شدت به مدت ۵ دقیقه تکان داده شد. سپس محلول به مدت ۵ دقیقه با شدت ۸۰ درصد سونیکیت شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۸۰۰۰ Dragon Laboratory (D3024R)، سانتریفوژ (Instruments Limited، چین) شد. در نتیجه کورکومین که داخل پلیمر محصور شده بود رها شده و Gs رسوب کرد. شدت جذب نوری کورکومین در طول موج ۴۲۵ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop 1000، آمریکا) خوانده شد و از روی منحنی استاندارد کورکومین مقدار آن محاسبه شد. بازده بارگزاری (Encapsulation Efficiency: EF) و میزان بارگیری (Drug Loading: DL) به ترتیب بر اساس معادله (۱) و (۲) به دست آمد.

$$\text{درصد بازده بارگزاری} = \frac{\text{مقدار کورکومین بارگزاری شده}}{\text{مقدار کورکومین اولیه}} \times 100\%$$

$$\text{درصد بازده بارگیری} = \frac{\text{مقدار کورکومین بارگزاری شده}}{\text{مقدار کورکومین بارگزاری شده} + \text{مقدار سورفکتانت}} \times 100\%$$

پراکندگی نور دینامیکی (Dynamic Light Scattering: DLS) استفاده شد. نانو ذرات Gs-Cu و Gs خالی با غلظت ۱

بررسی ساختار شیمیایی

ساختار شیمیایی Gs توسط H-NMR (دستگاه Bruker، آمریکا) در کلروفرم (CDCl₃) تأیید شد.

تعیین غلظت بحرانی تشکیل میسل

غلظت بحرانی تشکیل میسل (Critical Micelle Concentration: CMC) برای پلیمر Gs بر اساس شدت طیف برانگیختگی پیرن (پروب آب‌گریز) به دست آمد [۱۵-۱۷]. محلول پیرن در استون با غلظت 6×10^{-6} مولار تهیه شد و در ۱۰ لوله آزمایش تقسیم شد تا استون آن تبخیر شود. سپس غلظت‌های مختلف از Gs حل شده در بافر فسفات (Phosphate Buffer Saline: PBS) (pH=۷/۴، ۰/۰۱ مولار) به هر لوله اضافه شد و به شدت مخلوط شدند و یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تکان (Shake) داده شد. غلظت نهایی پیرن در هر لوله به 6×10^{-7} مولار رسید. با استفاده از دستگاه فلوریمتر PerkinElmer نمونه‌ها در طول موج ۳۰۰-۳۵۰ نانومتر برانگیخته شد و طول موج بازتاب در ۳۹۰ نانومتر ثبت شد [۱۸].

تهیه نانو ذرات Gs-Cu

پلیمر و زوم‌های Gs-Cu از روش رسوب‌دهی نانو (Nano precipitation) تهیه شد [۱۹]. مقادیر مختلف از کورکومین و ۱۰۰ میلی گرم از Gs همزمان در ۳ میلی لیتر متانول حل شد و سپس ۳ میلی لیتر آب مقطر به آرامی به محلول اضافه شد.

اندازه، پتانسیل زتا و پراکنش اندازه

برای تعیین اندازه و پتانسیل زتا نانوذرات Gs-Cu از روش

میلی گرم / میلی لیتر در دو pH=۷/۴ و pH=۵ تهیه شد. اندازه، پتانسیل زتا و پراکندگی اندازه (Poly Dispersity Index) توسط دستگاه (Malvern Instruments, Zetasizer Nano ZS) انگلیسی) با استفاده از پرتو لیزر آرگون در ۶۳۳ نانومتر و زاویه پراکندگی ۹۰ مشخص شد.

مطالعه رهایش در برون تنی

میزان رهایش کورکومین از نانوذرات Gs-Cu با استفاده از روش انتشار مستقیم (Direct dispersion) مطالعه شد [۲۰]، [۲۱]. آزمایش به مدت ۷۲ ساعت و در دو pH=۷/۴ و pH=۵ انجام شد. پودر لیوفیلیزه Gs-Cu در بافر فسفات (۱۵۰:۱، وزنی/حجمی) حل شد؛ سپس در اپندورفها (Eppendorf) تقسیم شدند (در هر کدام ۵۰۰ میکرولیتر) و آزمایش به صورت سه بار تکرار انجام شد. اپندورفها در بن ماری لرزان در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. از آنجایی که کورکومین کاملاً در آب نامحلول است، در زمانهای مشخص شده یک ست (set) از اپندورفها برداشته شد و در دور ۱۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد تا داروی رها شده از کمپلکس جدا شود. رسوب کورکومین در ۵۰۰ میکرولیتر متانول حل شد و میزان جذب کورکومین رها شده در ۴۲۵ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد.

بررسی سمیت سلولی

اثر سمیت کورکومین آزاد، Gs و نانوذرات Gs-Cu بر سلولهای MDA-MB-231 توسط آزمون MTT ارزیابی شد. سلولها با تراکم 1×10^4 در پلیت ۹۶ خانه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و دی اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، سلولها با مقادیر متفاوتی از کورکومین، Gs و Gs-Cu در PBS (۱۰۰ میکرومولار، pH=۷/۴) تیمار شدند. کورکومین آزاد با کمک متانول در PBS (کمتر از ۰/۴ درصد حجمی/حجمی) حل شد [۱۸]. در زمانهای مشخص (بعد از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت) محیط کشت برداشته شده و با

محیط کشت جدید حاوی محلول MTT (۵ میلی گرم/میلی لیتر) جایگزین شد. سپس سلولها به مدت ۴ ساعت انکوبه و محیط کشت خارج شد؛ سپس ۱۵۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه شد. میزان جذب فورمازان در ۴۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا (EnzyMed-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) اندازه گرفته شد.

تجزیه و تحلیل جذب سلولی (Cellular uptake)

سلولهای MDA-MB-231 در محیط کشت کامل با تراکم 1×10^6 در پلیت ۶ خانه سید (Seed) و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سلولها با ۵۰ میکرولیتر از پلیمر روزومهای Gs، کورکومین آزاد و نانوذرات Gs-Cu به صورت جداگانه تیمار شدند و بعد از ۳ ساعت انکوباسیون، سلولها ترپسینه و جدا شدند. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. پلت سلولی به آرامی دو بار با PBS شستشو داده شد و در ۵۰۰ میکرولیتر PBS حل شد [۲۲]. جذب سلولی کورکومین در طول موج ۴۸۸ نانومتر توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD FACSCanto™ II, Biosciences, آمریکا) اندازه گیری شد. تجزیه و تحلیل نتایج توسط نرم افزار Flowing Software 2 انجام شد.

تحلیل آماری

آزمایشها به صورت ۳ بار تکرار انجام و دادهها به صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار گزارش شد. نمودارها توسط نرم افزار Excel 2010 رسم شد.

نتایج

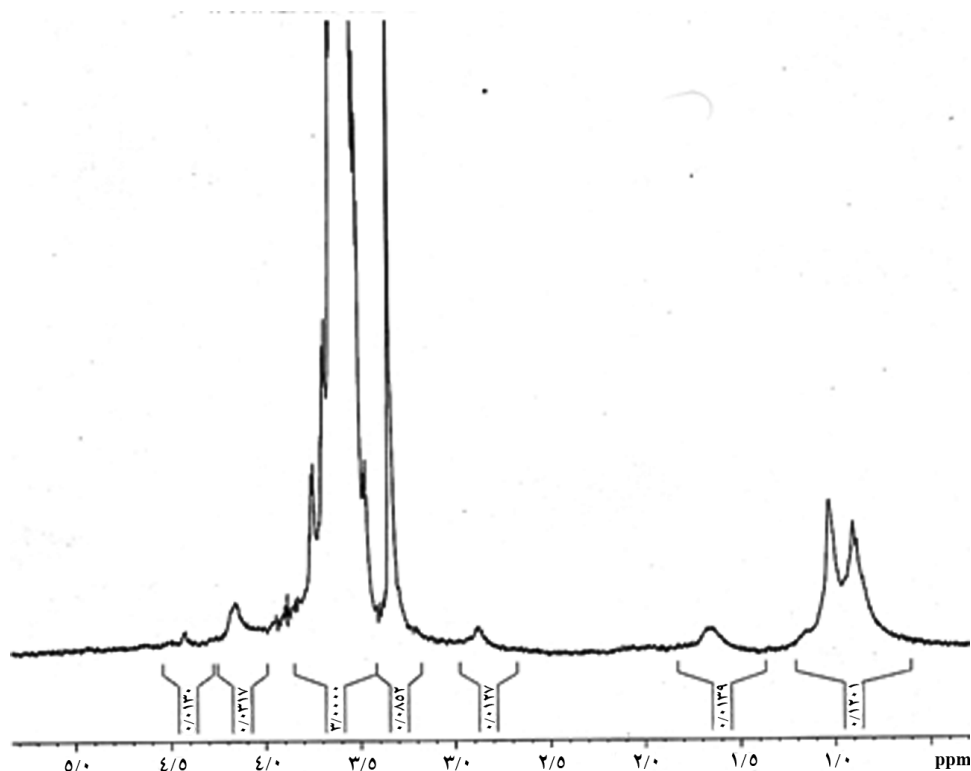
ساختار شیمیایی Gs

ساختار Gs سنتز شده توسط طیف NMR پروتون (H-NMR) تأیید شد. همانطور که در شکل ۳ مشاهده

مطالعه اثر بخشی نانوحامل جمینی سورفکتانت حاوی کورکومین

قسمت انتهایی اتصال دهنده باعث جابه‌جایی این نقطه اوج به $\delta = 2/8 \text{ ppm}$ شده است. پروتون‌های متیلن که به اتم‌های اکسیژن متصل‌است و در واقع اتصال نمک آمونیوم به ایزو فورون دی ایزوسیانات را تأیید می‌کند در ناحیه $\delta = 4/2 \text{ ppm}$ نمایان شده است. نقاط اوج ناحیه $\delta = 0/9 \text{ ppm}$ و $\delta = 1/1 \text{ ppm}$ به ترتیب به پروتون‌های متیل و متیلن ایزو فورون دی ایزوسیانات مربوط هستند.

می‌کنید، نقطه اوج (Peak) رزونانسی پهن در $\delta = 3/5 - 3/8 \text{ ppm}$ به پروتون‌های متیلن گروه پلی‌اتیلن گلیکول و همچنین پروتون‌های گروه متیل انتهایی مربوط می‌شود. نقطه اوج شدید در ناحیه $\delta = 3/3 \text{ ppm}$ ، پروتون‌های CH_3 در DHDQA را نشان می‌دهد. پروتون‌های متیلن در قسمت اتصال دهنده (Linker) مولکول از طریق $\delta = 1/64 \text{ ppm}$ قابل شناسایی است، در حالی که اتصال گروه CH_2 به اتم‌های نیتروژن در دو



شکل ۳ تأیید ساختار سنتز شده GS با استفاده از $^1\text{H-NMR}$

پایرن در نتیجه افزایش غلظت پلیمر GS بررسی شد و طیف فلورسانس پایرن خالص به عنوان کنترل در محیط قطبی ارزیابی شد.

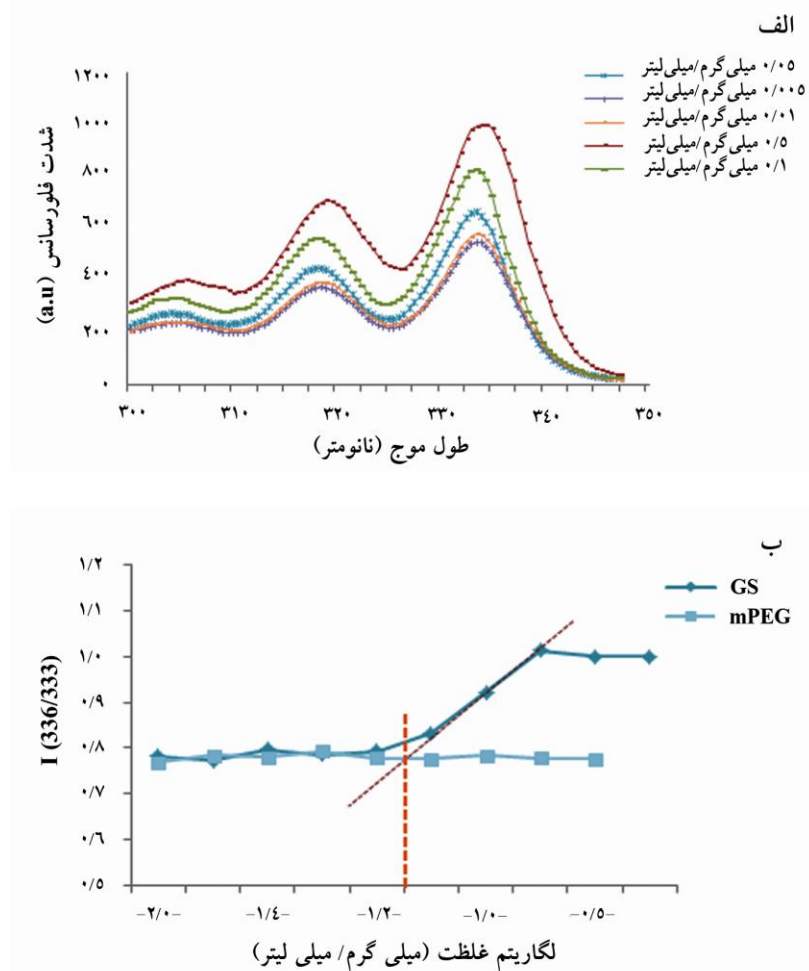
انتقال پایرن از محیط آبی به داخل پلیمرزوم‌های کمتر قطبی GS، سبب جابه‌جایی طیف برانگیختگی از ۳۳۳ نانومتر به ۳۳۶ نانومتر شد. در غلظت‌های پایین‌تر پلیمر، شدت نقطه

تعیین CMC

برای تعیین CMC پلیمر از طیف برانگیختگی فلورسانس پایرن استفاده شد. از آنجایی که پایرن در محیط قطبی خاصیت خود خاموش کنندگی (Self-quenching) دارد، نقطه اوج شدید فلورسانس زمانی دیده می‌شود که پایرن در محیط غیر قطبی قرار گیرد. در این مطالعه، شدت فلورسانس

به صورت نمایی افزایش پیدا کرد. از محل تقاطع دو نمودار شکل ۴ مقدار CMC پلیمر ۱۵/۰۹ میکرولیتر محاسبه شد.

اوج ۳۳۶ به ۳۳۳ ($I_{336/333}$) تقریباً ثابت باقی ماند، در حالی که با افزایش غلظت به مقدار بالاتر از CMC شدت نقطه اوج

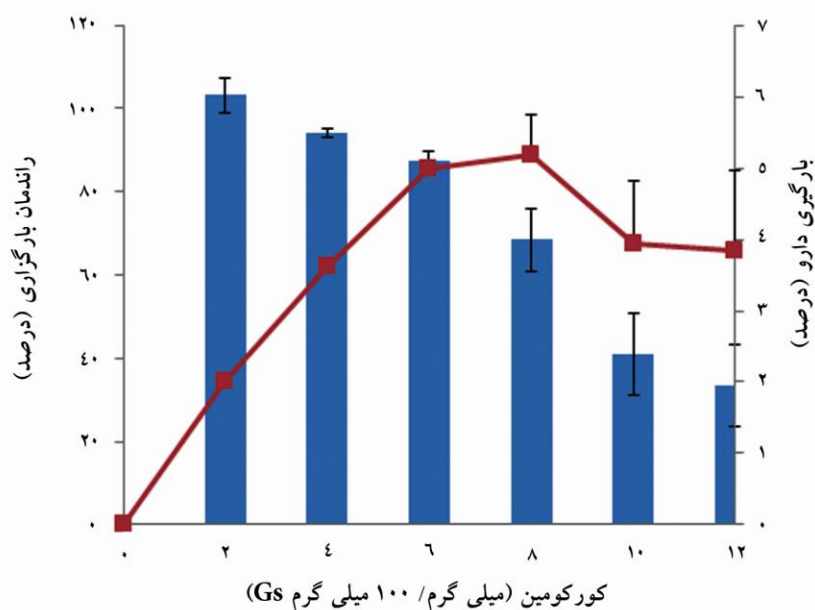


شکل ۴ (الف) تغییرات شدت فلورسانس پیرن در ۵ غلظت انتخابی از GS به منظور سهولت مشاهده تغییر طول موج برانگیختگی مولکول پیرن قبل و بعد از شکل گیری پلیمر و زوم ها (ب) نمودار شدت فلورسانس ($I_{336/333}$) پیرن به عنوان تابعی از لگاریتم غلظت mPEG و GS

به نمونه با نسبت ۱۰۰:۸ (کورکومین: پلیمر وزنی/وزنی) متعلق بود؛ اما در نمونه با نسبت ۱۰۰:۶ (کورکومین: پلیمر وزنی/وزنی) حداکثر بازده بارگزاری به دست آمد. در نتیجه نمونه ۱۰۰:۶ با بازده بارگزاری $87.45 \pm 2.3\%$ درصد و میزان بارگیری $4.98 \pm 0.12\%$ درصد برای آزمایش های بعدی انتخاب شد.

بازده بارگزاری و میزان بارگیری

کورکومین با موفقیت داخل نانو ذرات GS بارگزاری شد. برای به دست آوردن مقدار بهینه برای بازده بارگزاری و میزان بارگیری غلظت های مختلف کورکومین در ۱۰۰ میلی گرم پلیمر محصور شد و نتایج آن در شکل ۵ نشان داده شده است. حداکثر میزان بارگیری



شکل ۵: بازده بارگذاری و بارگیری کورکومین داخل Gs

(Rapid swelling) رخ داده است.

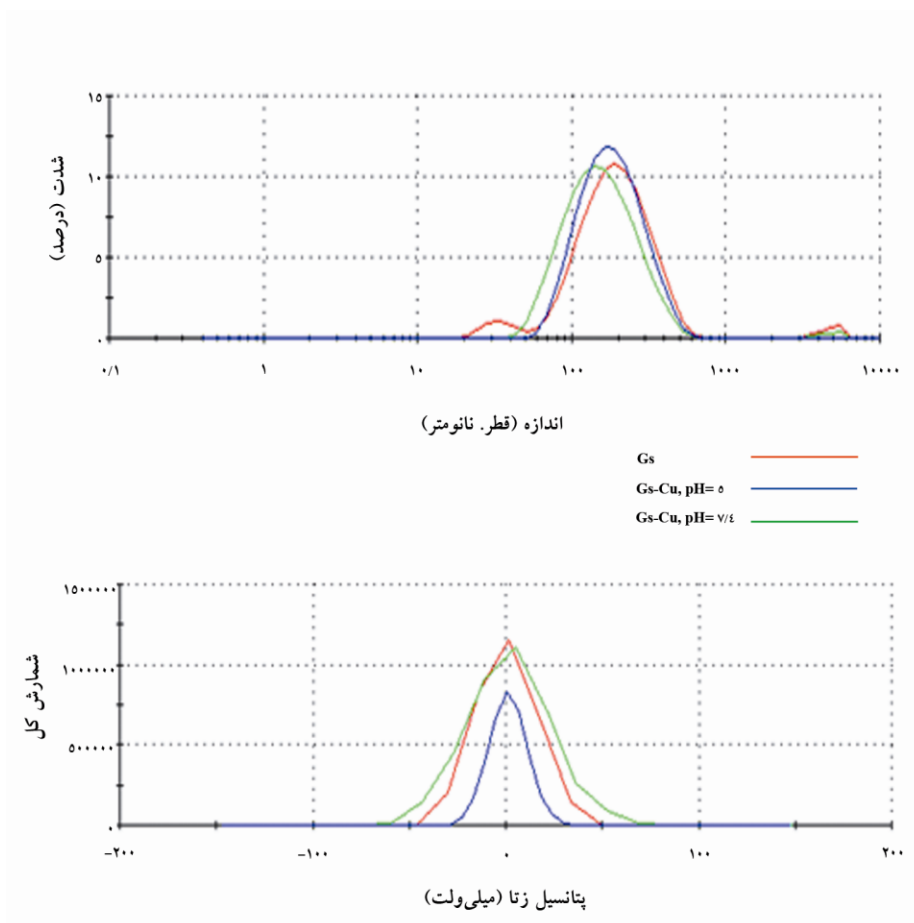
مطالعه رهایش در برون تنی

نمودار (Profile) رهایش کورکومین از روش انتشار مستقیم در دو pH (۷/۴ و ۵) مورد تجزیه و تحلیل شد. در طول زمان مطالعه (۷۲ ساعت)، مقدار کورکومین رهایش یافته فقط ۲۴ درصد در pH=۵ و ۱۵ درصد در pH=۷/۴ بود. همان‌طور که شکل ۷ نشان داده شده است، در ۴ ساعت اول مطالعه رهایش انفجاری (Burst) به علت جدا شدن کورکومین‌های متصل به سطح رخ داد [۲۳، ۲۰]. بعد از رهایش سریع اولیه، رهایش کنترل شده در نتیجه پیوستن کورکومین به ماتریکس پلیمر مشاهده شد. همچنین در محیط اسیدی، به علت وجود باندهای یورتانی و پروتونه شدن آن‌ها در pH پایین کل ساختار متورم شد و در نتیجه کورکومین محصور شده، سریع‌تر رهایش می‌یابد.

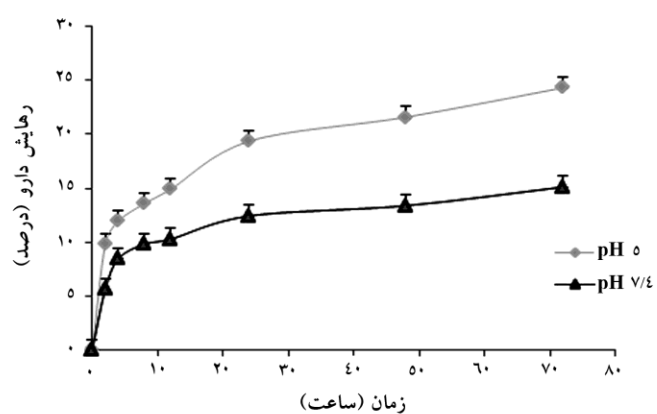
اندازه، پتانسیل زتا و پراکنش اندازه

پودر لیوفیلیزه نانوذرات Gs-Cu در بافر فسفات در دو pH (۷/۴ و ۵) و نیز پلیمر و زوم‌های Gs در بافر فسفات با pH=۵ حل شد و اندازه و پتانسیل زتا آن‌ها با روش پراکندگی دینامیکی نوری بررسی شد. نتایج در شکل ۶ نمایان شده است.

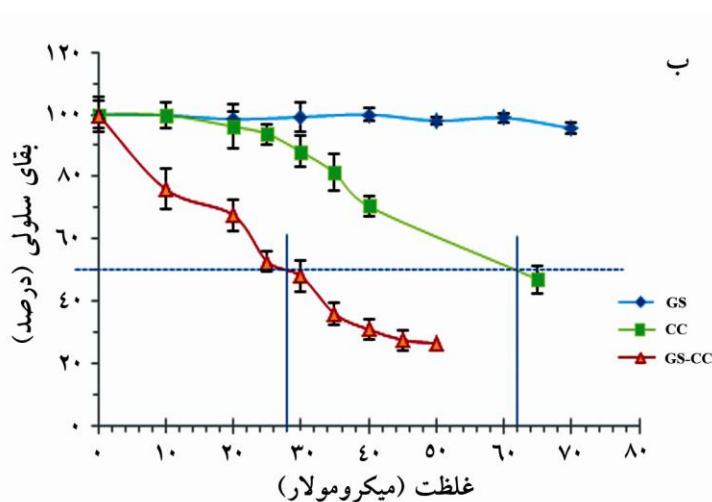
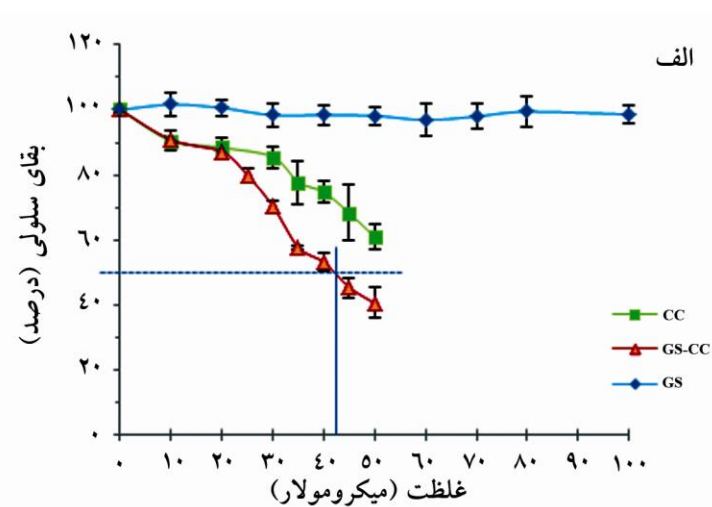
نانو حامل‌های Gs توزیع اندازه ذره‌ای مناسبی ($PDI=0.2$) با میانگین قطر هیدرودینامیکی 181.06 ± 21.05 نانومتر داشت. قابل توجه است که با بارگذاری کورکومین داخل پلیمر حدود ۴۰ نانومتر کاهش در اندازه نانو ذره مشاهده شد. از بررسی این داده‌ها می‌توان به این نتیجه رسید که حضور کورکومین سبب ایجاد ساختارهای فشرده‌تر و محکم‌تری (Tighter) می‌شود. نکته جالب توجه دیگری که باید به آن اشاره کرد، افزایش اندازه نانوذره Gs-Cu در pH=۵ است که در نتیجه تورم سریع



شکل ۶ توزیع اندازه ذرات و زتا پتانسیل پلیمر و زوم‌های Gs و نانو ذرات Gs-Cu در دو pH مختلف توسط روش DLS



شکل ۷ نمودار رهایش دارو از نانو ذرات Gs-Cu در دو pH مختلف (به صورت برون تن)



شکل ۸ سمیت Gs خالی، کورکومین آزاد و پلیمرزوم‌های Gs-Cu بر سلول‌های MDA-MB-231 به صورت برون تن (الف) بعد از ۲۴ ساعت (ب) بعد از ۴۸ ساعت

بررسی سمیت سلولی

آزمون MTT برای ارزیابی میزان سمیت سیستم انتقال و تأثیر آن بر میزان مرگ و میر سلولی انجام شد. میزان زنده بودن سلول‌های MDA-MB-231 بر محور yها و غلظت‌های مختلف Gs، Cu و Gs-Cu روی محور xها در شکل ۸ نمایش داده شده است. نانوحامل Gs حتی بعد از تیمار ۴۸ ساعته هم تأثیر زیادی بر میزان مرگ و میر سلولی نداشت و میزان زنده بودن سلول در غلظت ۷۰ میکرومولار $95 \pm 1/79$ درصد گزارش شد. در تیمار ۴۸ ساعته سلول‌ها، IC_{50} (Half

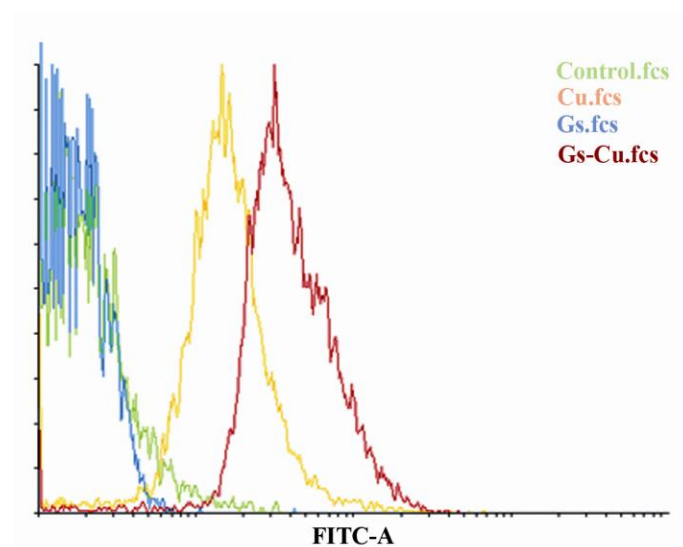
maximal inhibitory concentration) توسط روش نقطه-به-نقطه (point-to-point) توسط نرم‌افزار اکسل محاسبه شد. IC_{50} برای کورکومین آزاد و کورکومین محصور شده به ترتیب ۶۲ و ۲۸ میکرومولار محاسبه شد. میزان IC_{50} برای پلیمرزوم‌های Gs-Cu بعد از ۲۴ ساعت تیمار ۴۲ میکرومولار به دست آمد که تأیید کننده تأثیر افزایش زمان تیمار، در کاهش مقدار IC_{50} است. همچنین میزان کورکومین مورد نیاز برای کشتن ۵ درصد از سلول‌ها زمانی که داخل نانوحامل به دام می‌افتد، به دلیل افزایش در دسترس‌پذیری زیستی و جذب

سلولی کاهش می‌یابد.

گرفتند. نتایج نشان داد که محصور کردن کورکومین داخل پلیمر Gs باعث افزایش جذب سلولی آن می‌شود. مقدار میانه جذب سلولی برای کورکومین آزاد و کورکومین محصور شده داخل Gs به ترتیب برابر با ۱۵/۱۲ و ۳۶/۵۲ بود. در نتیجه به دام انداختن کورکومین داخل نانوحامل می‌تواند ورود آن را به سلول تا میزان ۲/۴ برابر در غلظت ۵۰ میکرومولار افزایش دهد (شکل ۹).

تجزیه و تحلیل جذب سلولی

ورود کورکومین به داخل سلول، به دلیل خاصیت فلورسانس ذاتی آن، به صورت کمی توسط روش فلوسایتمتری بررسی شد. سلول‌های MDA-MB-231 به طور جداگانه در معرض نانوحامل Gs، Cu آزاد و نانوذرات Gs-Cu قرار



شکل ۹ بررسی کمی مقدار جذب درون سلولی توسط کورکومین آزاد و کمپلکس Gs-Cu

ساخته و با دستگاه NMR ساختار آن تأیید شد. CMC ۱۵/۰۹ میکرومولار (۰/۱۲ میلی گرم/میلی لیتر) محاسبه شد که این مقدار از CMC سورفکتانت‌های با وزن مولکولی کم (به عنوان مثال ۲/۳ میلی گرم/میلی لیتر برای سدیم دو دسیل سولفات) پایین تر است. کوچک تر بودن CMC گواه آن است که پلیمر Gs از لحاظ ترمودینامیکی پایدارتر بوده و از زمان گردش خون بیشتری نیز برخوردار است [۱۶، ۱۸].

کورکومین به عنوان یک داروی آب‌گریز داخل این پلیمر بارگزاری شد و بازده بالای حدود ۸۷ درصد به دست آمد. این روش ساده بارگزاری محاسن زیادی از جمله، توزیع اندازه

بحث

پلیمرزوم‌ها یکی از ساختارهای ابر مولکولی است که ویژگی‌های جالبی دارد. پلیمرزوم‌ها این قابلیت را دارد که هم داروهای آب‌دوست و هم آب‌گریز را حمل کند؛ مولکول‌های آب‌گریز را در غشای خود محصور می‌کند. همچنین پلیمرزوم‌ها در مقایسه با میسل‌ها از پایداری بیشتری برخوردارند. وجود مولکول‌های پلی اتیلن گلیکول در سطح پلیمرزوم سبب افزایش سازگاری زیستی و نیز افزایش زمان گردش در خون می‌شود. در این پژوهش، جمینی سورفکتانت یورتانی پگیله (Gs)

مطالعه اثر بخشی نانوحامل جمیینی سورفکتانت حاوی کورکومین

کشندگی و سمی حتی در غلظت‌های بسیار بالا ندارد و همچنین IC_{50} در کمپلکس Gs-Cu کمتر از کورکومین آزاد بود که اغلب به دلیل تفاوت در جذب سلولی کورکومین است. روش‌های مختلف ورود دارو به سلول نقش مهمی در خاصیت کشندگی آن دارد. کورکومین آزاد به صورت انتشار از غشای سلولی عبور کرده و داخل آن می‌شود پس زمانی که داخل سیتوپلاسم از کورکومین اشباع شود از ورود مجدد آن به داخل سلول جلوگیری به عمل می‌آید که در نتیجه این عمل، تمام خواص کورکومین در مدت زمان کوتاهی از حضورش در سیتوپلاسم مشاهده می‌شود. این در حالی است که نانوذرات Gs-Cu به صورت اندوسیتوز وارد سلول می‌شود که این امکان را فراهم می‌آورد تا سلول همواره ذخیره مناسبی از کورکومین داشته باشد و به صورت تدریجی آزاد می‌شود [۲۹]. به علاوه؛ مطالعات گذشته نشان داده‌است که پایداری و حفظ دارو درون سلول به طور مستقیم با خاصیت کشندگی آن ارتباط مستقیم دارد [۲۳].

در نتیجه پلیمرزوم‌های Gs کاندیدهای مناسبی برای انتقال داروهای آب‌گریز با پتانسیل انتقال داروهای آب‌دوست است. همچنین انجام مطالعات درون تنی (In vivo) برای پلیمرزوم‌های Gs-Cu ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

کلیه امکانات و حمایت‌های مالی این پروژه توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است و بدین وسیله قدردانی ویژه از ایشان به عمل می‌آید.

ذره‌ای کم، افزایش زیست دسترس‌پذیری، محلولیت بالا، پایداری مناسب را به همراه دارد.

یکی از پلیمرهایی که توجه بسیاری از محققین را برای استفاده به عنوان نانوحامل به خود جلب کرده‌است، پلی‌لاکتیک-کو-گلیکول (Poly lactic co glycol: PLGA) است. این پلیمر از زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری خوبی برخوردار است. شیخ و همکاران کورکومین را داخل پلیمر PLGA با استفاده از روش تبخیر-مولسیون بارگذاری کردند و به بازده بارگذاری ۷۷ درصد دست یافتند و اندازه ذرات حاصل نیز ۲۶۴ نانومتر بود [۲۴]. در مقایسه نانوحامل Gs با PLGA درمی‌یابیم که بازده بارگذاری حدود ۱۰ درصد در Gs بیشتر بوده و همین‌طور اندازه ذرات در حدود ۱۰۰ نانومتر کوچک‌تر است. کوچک‌تر بودن اندازه ذرات به همراه کروی بودن ساختار سبب تسهیل ورود کمپلکس پلیمر-کورکومین به داخل سلول‌ها می‌شود.

رهایش کورکومین از نانوذرات Gs-Cu در دو pH خنثی و اسیدی به صورت کنترل شده بود که علت آن محصور شدن دارو در غشای آب‌گریز پلیمر است. در محیط اسیدی، گروه آمین Gs پروتونه شده و ماتریکس پلیمر به اصطلاح متورم می‌شود که در نتیجه آن نرخ رهایش سریع‌تر می‌شود [۲۵، ۲۰]. محیط اطراف تومورها به علت افزایش متابولیسم گلوکز، هیپوکسی و گردش ناکافی خون اسیدی است؛ پس در نتیجه کورکومین محصور شده سریع‌تر در این محیط آزاد می‌شود و سلول‌های عادی نیز کمتر در معرض داروی ضد سرطان قرار می‌گیرند [۲۶-۲۸].

تجزیه و تحلیل سمیت سلولی نشان داد که این پلیمر اثر

منابع

- [1] Cancer. World Health Organization. Fact sheet N 297. Updated February 2015. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- [2] Das M, Mohanty C, Sahoo SK. Ligand-based

targeted therapy for cancer tissue. Expert opinion on drug delivery. Expert Opin Drug Deliv 2009; 6(3): 285-304.

- [3] Poste G, Kirsh R. Site-Specific (Targeted) Drug Delivery in Cancer Therapy. Nature

- Biotechnology 1983; 1: 869-78.
- [4] 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.
- [5] Higdon J, Howells L. Curcumin. Linus Pauling Institute, Oregon State University 2016. Available from: <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/curcumin>.
- [6] Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol* 2007; 595: 1-75.
- [7] Li J, Shin GH, Lee IW, Chen X, Park HJ. Soluble starch formulated nanocomposite increases water solubility and stability of curcumin. *Food Hydrocolloids* 2016; 56: 41-9.
- [8] Kumar A, Kaur G, Kansal SK, Chaudhary GR, Mehta SK. Enhanced solubilization of curcumin in mixed surfactant vesicles. *Food Chem* 2016; 199: 660-6.
- [9] Sanphui P, Goud, NR, Khandavilli UBR, Bhanoth S, Nangia, A. New polymorphs of curcumin. *Chem Commun* 2011; 47: 5013-5.
- [10] Akl MA, Kartal-Hodzic A, Oksanen T, Ismael HR, Afouna MM, Yliperttula M, Samy AM, Viitala T. Factorial design formulation optimization and in vitro characterization of curcumin-loaded PLGA nanoparticles for colon delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2016; 32(Part A): 10-20.
- [11] Wang X, Yang L, Chen ZG, Shin DM. Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging. *CA Cancer J Clin* 2008; 58(2): 97-110.
- [12] Lee JS, Feijen J. Polymersomes for drug delivery: design, formation and characterization. *J Control Release* 2012; 161(2): 473-83.
- [13] Vertut-Doi A, Ishiwata H, Miyajima K. Binding and uptake of liposomes containing a poly(ethylene glycol) derivative of cholesterol (stealth liposomes) by the macrophage cell line J774: influence of PEG content and its molecular weight. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1278(1): 19-28.
- [14] He G, Ma LL, Pan J, Venkatraman S. ABA and BAB type triblock copolymers of PEG and PLA: a comparative study of drug release properties and "stealth" particle characteristics. *Int J Pharm* 2007; 334(1-2): 48-55.
- [15] Piñeiro L, Novo M, Al-Soufi W. Fluorescence emission of pyrene in surfactant solutions. *Adv Colloid Interface Sci* 2015; 215: 1-12.
- [16] 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.
- [17] Kalyanasundaram K, Thomas JK. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *Journal of the American Chemical Society* 1977; 99(7): 2039-44.
- [18] Erfani-Moghadam V, Nomani A, Zamani M, Yazdani Y, Najafi F, Sadeghizadeh M. A novel diblock of copolymer of (monomethoxy poly [ethylene glycol]-oleate) with a small hydrophobic fraction to make stable micelles/polymersomes for curcumin delivery to cancer cells. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 5541-54.

- [19] 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.
- [20] Anitha A, Maya S, Deepa N, Chennazhi KP, Nair SV, Tamura H, Jayakumar R. Efficient water-soluble biodegradable polymeric nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells. *Carbohydrate Polymers* 2011; 83(2): 452-61.
- [21] 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.
- [22] Huang F, Cheng R, Meng F, Deng C, Zhong Z. Micelles Based on Acid Degradable Poly(acetal urethane): Preparation, pH-Sensitivity, and Triggered Intracellular Drug Release. *Biomacromolecules* 2015; 16(7): 2228-36.
- [23] Mohanty C, Sahoo SK. The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. *Biomaterials* 2010; 31(25): 6597-611.
- [24] Shaikh J, Ankola DD, Beniwal V, Singh D, Kumar MN. 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.
- [25] Rejinold NS, Muthunayanan M, Divyarani VV, Sreerekha PR, Chennazhi KP, Nair SV, Tamura H, Jayakumar R. Curcumin-loaded biocompatible thermoresponsive polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. *J Colloid Interface Sci* 2011; 360(1): 39-51.
- [26] Justus CR, Dong L, Yang LV. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Front Physiol* 2013; 4: 354.
- [27] Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornnell HH, Ibrahim-Hashim A, Bailey K, Balagurunathan Y, Rothberg JM, Sloane BF, Johnson J, Gatenby RA, Gillies RJ. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res* 2013; 73(5): 1524-35.
- [28] Yang X, Li Z, Wang N, Li L, Song L, He T, Sun L, Wang Z, Wu Q, Luo N, Yi C, Gong C. Curcumin-encapsulated polymeric micelles suppress the development of colon cancer in vitro and in vivo. *Sci Rep* 2015; 5: 10322.
- [29] Acharya S, Dilnawaz F, Sahoo SK. Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. *Biomaterials* 2009; 30(29): 5737-50.