

بررسی اثرات ضد سرطانی کورکومین: ساخت نانوحامل‌های لیپیدی حاوی کورکومین و بررسی سمیت آن بر رده سلولی MCF-7 سرطان سینه

مسعود زارع شحنه^۱، سیدمهدی کلانتر^۲، محمدحسن شیخها^۳، امیر عصری^۴، بی بی فاطمه حقیرالسادات^{۵*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: فناوری نانو همواره به دنبال ارائه راه کارهای نوینی جهت رسانش اثربخش داروهای شیمی درمانی به سلول های سرطانی است تا بدین وسیله کیفیت درمان سرطان را افزایش داده و عوارض جانبی شیمی درمانی را کاهش دهد. در این پژوهش، فرمولاسیون های لیپیدی مختلفی از نانولیپوزوم های حاوی کورکومین به روش لایه نازک به منظور بررسی اثرات ضد سرطانی کورکومین اثرگذاری بر رده سلولی MCF-7، مورد ارزیابی فیزیک- شیمیایی قرار گرفت.

روش بررسی: این پژوهش مطالعه توصیفی- تحلیلی است. به روش فیلم نازک، سامانه های لیپونیوزومی با فرمولاسیون های مختلف و با استفاده از Span60، SPC و کلسترول تهیه شد. داروی کورکومین درون لیپوزوم بارگذاری شد. سپس فرمولاسیون نهایی انتخاب و پگیلاسیون صورت گرفت. فرمولاسیون بهینه با استفاده از دستگاه های FT-IR، DLS، Fe-SEM و SEM بررسی شد. آنالیز آماری با نرم افزار Prism6 انجام گرفت.

نتایج: اندازه، پتانسیل زتا و راندمان انکپسولاسیون نانوسامانه بهینه به ترتیب nm9/63-، mV47/41 و ۹۵/۵۸ درصد است. هم چنین این ساماندهی حامل دارو در شرایط سلول نرمال و سرطانی، آهسته رهش بوده است. موفولوژی ذرات کروی و دارو به خوبی درون نانوسامانه انکپسوله شده است. بررسی عملکرد سلولی نانوسامانه حکایت از افزایش سمیت کورکومین کپسوله شده نسبت به کورکومین آزاد در غلظت های مشابه بر رده سلولی MCF-7 دارد.

نتیجه گیری: پژوهش حاضر نشان می دهد که نانوسامانه بهینه لیپونیوزومی دارای کورکومین با برخورداری از ویژگی های مناسب فیزیک- شیمیایی، بهبود سمیت دارو در شرایط سلول سرطانی و افزایش پایداری دارو، می تواند حامل مناسبی جهت رسانش دارو به سلول های سرطان پستان باشد.

واژه های کلیدی: لیپوزوم، کورکومین، سرطان_سینه، MCF7.

ارجاع: زارع شحنه مسعود، کلانتر سیدمهدی، شیخها محمدحسن، عصری امیر. حقیرالسادات بی بی فاطمه. بررسی اثرات ضد سرطانی کورکومین: ساخت نانوحامل های لیپیدی حاوی کورکومین و بررسی سمیت آن بر رده سلولی MCF-7 سرطان سینه. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۸؛ ۲۷ (۱): ۸۶-۱۱۷۵.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

۲- دکتری سیتوژنتیک پزشکی، مرکز پژوهشی بیوتکنولوژی، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

۳- دکتری ژنتیک پزشکی، مرکز پژوهشی بیوتکنولوژی، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

۴- دانشجوی دکتری تخصصی هماتولوژی، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۵- دکتری نانو بیوتکنولوژی، گروه علوم و فنون نوین پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸، پست الکترونیکی: Fhaghirosadat@gmail.com، کد پستی: ۸۹۱۵۱۷۳۱۶۰

کورکومین (Curcumin) ماده مؤثره استخراج شده از ریشه زردچوبه است و حلالیت آبی پایین دارد (۹). کورکومین در بیماری‌هایی مانند روماتیسم، اختلالات کبدی و صفراوی، التهاب، ناراحتی‌های عصبی، قلبی و عروقی در طب سنتی و رایج استفاده می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که کورکومین می‌تواند بر طیف وسیعی از سرطان‌ها نظیر سرطان خون، مغز و سینه مؤثر باشد. القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و مهار تکثیر چرخه سلولی، مکانیسم اصلی کورکومین در مرگ سلول‌های سرطانی است. کورکومین با مکانیسم 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 (۱۰). کورکومین می‌تواند با کاهش بیان پروتئین‌های دخیل در مقاومت دارویی چندگانه، نقش یک تعدیل‌کننده مقاومت دارویی را اجرا کند (۱۱، ۱۲).

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 (۱۳). فناوری نانو با تولید نانوحامل‌های لیپیدی از جمله لیپوزوم و نیوزوم، می‌تواند بر بسیاری از مشکلات پیش روی رسانش داروهای سیتوتوکسیک گیاهی به بافت‌های هدف غلبه نماید و با ارائه راه‌کارهای نوین در دارورسانی، داروهای آنتی‌نئوپلاسم را به صورت موثرتری در اختیار بافت‌های سرطانی قرار دهد (۱۴).

لیپوزوم‌ها ساختارهای کروی هستند که از دولایه فسفولیپیدی ساخته شده‌اند که در هسته مرکزی خود یک فضای آبی را احاطه نموده‌اند. شباهت لیپوزوم با غشای سلول، سمیت سلولی پایین، تنوع و سهولت روش‌های تولید آن، لیپوزوم را به سامانه‌ای مطلوب در دارورسانی تبدیل کرده است. لیپوزوم‌ها توانایی بدام‌اندازی داروهای هیدروفیل در فضای مابی و هیدروفوب در میان دولایه لیپیدی خود را دارد (۱۵). حفظ خواص

آمار سرطان با بالا رفتن پایدار نرخ رشد و پیری، به طور پیوسته در حال افزایش است. در این میان سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی مرگ‌آور در زنان است به گونه‌ای که از هر ۹ زن یک نفر در طول عمر خود این سرطان را تجربه می‌کند (۱). زنان ایرانی حدود یک دهه زودتر نسبت به میانگین جهانی به سرطان سینه مبتلا می‌شوند (۲). سرطان پستان در مراحل اولیه نشانه‌ای به همراه ندارد اما با رشد تومور تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای رخ می‌دهد که وجود یک توده سفت قابل لمس در پستان و یا در ناحیه آگزیلا (زیر بغل)، درد در پستان و یا نوک پستان، تغییر در فرم و یا اندازه پستان، تغییرات پوستی پستان ترشح مایع به‌خصوص مایعات خونی از نوک پستان از جمله این تغییرات است (۳). فاکتورهایی مانند افزایش سن، زمینه‌های وراثتی، هورمون‌های جنسی، سبک زندگی و نژاد، می‌تواند خطر ابتلا به این بیماری مهلک را افزایش دهد (۴).

به منظور درمان سرطان‌ها، معمولاً از سه روش جراحی، رادیودرمانی و شیمی‌درمانی استفاده می‌شود که در این بین شیمی‌درمانی با وجود داشتن محدودیت‌هایی از قبیل، هدفمند نبودن داروهای شیمی‌درمانی، نیازمند بودن به دوزهای بالای دارو برای مبارزه با سلول‌های سرطانی، مقاومت دارویی و عوارض جانبی متعدد، هنوز هم به‌عنوان یکی از روش‌های درمانی مؤثر در مبارزه با سلول‌های سرطانی به‌شمار می‌آید (۵). عوارض قلبی، تاول‌زایی، آلورسی، تاثیرات مخرب بر مغز استخوان و غیره از جمله عوارض ناخواسته حاصل از داروهای رایج شیمی‌درمانی است که هر ساله گریبان شمار زیادی از بیماران مبتلا به سرطان را می‌گیرد (۶)، یکی از راهکارهای مورد توجه پژوهش‌گران، جهت کاهش محدودیت‌های استفاده از شیمی‌درمانی، استفاده از ترکیبات سیتوتوکسیک استخراج شده 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 (۷، ۸).

نانو سامانه مورد بررسی قرار گرفت و سپس اثر آن بر روی سلول های سرطانی MCF-7 بررسی شد.

روش بررسی

۱. تهیه لیپوزوم

نوع مطالعه توصیفی-تحلیلی بود. به منظور تهیه نانولیپونیوزوم های حاوی کورکومین از روش هیدراتاسیون لایه نازک استفاده شد که خلاصه آن بدین شرح است: ابتدا فسفولیپید SPC (Merk، آلمان)، کلسترول (Merk، آلمان) و SPAN-60 (DAEJUN، کره)، را با نسبت های مولی ارائه شده در جدول ۱ به همراه کورکومین، در حلال کلروفرم و در دمای 50°C بر روی روتاری (هایدولف، آلمان) حل شده و تحت شرایط خلأ، فیلم نازک خشک تهیه گردید. سپس عمل هیدراته کردن با افزودن مقدار مشخصی آب مقطر استریل، طی مدت ۶۰ دقیقه و در دمای 60°C انجام گردید. سپس نانوذرات تهیه شده، با استفاده از سونیکیت پروبی (ChromTech، B03-ultrasonic processor، تایوان) با توان اولتراسونیک ۱۰۰ Watt، فرکانس $28 \pm 5\%$ KHz و بدون دما برای مدت ۶۰ دقیقه کاهش سایز داده شد.

فارماکوکینتیک دارو، کاهش دسترسی سایت های غیرهدف به آن، رهایش آهسته و کنترل شده از جنبه های اساسی این حامل وزیکولی است (۱۶). لیپوزوم ها برخلاف پایداری نسبی به طور معمول در RES (Reticulum Endoplasmic System) تجمع می یابند، در حالی که در اهداف درمانی، دستیابی به سیستم دارورسانی مطلوب، نیاز به ساخت لیپوزوم با نیمه عمر بالا در گردش خون است. در لیپوزوم های Stealth با استفاده از پوشاندن سطح لیپوزوم به وسیله ترکیباتی هم چون پلی اتیلن گلیکول (PEG) از مکانیسم های کلیرانس خونی تا حد بسیار زیادی پنهان خواهد ماند و نیمه عمر گردش خونی حامل حاوی دارو، افزایش پیدا می کند (۱۷). پژوهش حاضر با هدف سنتز فرمولاسیون های متفاوت از نانوذرات لیپونیوزومی حاوی کورکومین برای دستیابی به فرمولاسیونی نهایی انجام گرفته است که در طی آن، فرمولاسیون های اولیه از نقطه نظر راندمان انکپسولاسیون و الگوی رهایش دارو مورد بررسی قرار گرفته اند و بعد از انتخاب فرمول نهایی و پوشش دهی آن با PEG، فرمولاسیون پگیله شده نیز از جهت کارایی درون گیری دارو، اندازه ذرات، رهایش ۴۸ ساعته و برهم کنش میان دارو و

جدول ۱: درصد مولی ترکیبات سازنده فرمولاسیون های اولیه. SPC= soybean phosphatidylcholine

کد فرمول	کلسترول %	Span TM %60	پلی اتیل گلیکول %	SPC %80
۱	۸	۲۰	۰	۷۲
۲	۲۴	۲۰	۰	۵۶
۳	۱۶	۲۰	۰	۶۴

۲. محاسبه کارایی انکپسولاسیون

شکسته شود و دارو آزاد گردد. در مرحله بعد میزان جذب کورکومین انکپسوله شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ماکزیمم کورکومین (۴۲۷ nm) محاسبه شد. در پایان با استفاده از نمودار استاندارد کورکومین در ایزوپروپیل، و رابطه (۱)، درصد لود کورکومین در لیپونیوزوم های دارای کورکومین محاسبه گردید (۱۸).

جهت محاسبه میزان انکپسولاسیون کورکومین، ابتدا نانوحامل های حاوی کورکومین را بعد از کاهش سایز وارد کیسه دیالیز نموده و به مدت یک ساعت درون بشری محتوی بافر PBS (حجم بافر درون بشر سه برابر حجم نمونه لیپونیوزومی) و در دمای 4°C قرار داده شد تا کورکومین انکپسوله نشده حذف گردد. سپس لیپونیوزوم های دارای کورکومین با نسبت های حجمی ۱:۱۰، ۱:۲۰ و ۱:۵۰، با ایزوپروپیل مخلوط کرده تا دیواره لیپیدی اطراف کورکومین

$$\text{درصد انکپسوله شدن} (\%EE) = \frac{\text{غلظت داروی انکپسوله شده}}{\text{غلظت داروی اولیه}} \times 100$$

رابطه (۱)

۳. تعیین فرمولاسیون بهینه

با استفاده از غلظت های مولی جدول ۲، افزودن پلی اتیلن گلیکول (PEG) (Merk، آلمان) و روش هیدراتاسیون فیلم نازک بهینه گردید تا سایر تست های فیزیکوشیمیایی بر روی آن انجام گرفته و سمیت آن بر رده سلولی سرطان سینه بررسی شود.

در این مرحله با توجه به درصد انکپسولاسیون کورکومین در هر فرمول و نیز با در نظر گرفتن تاثیر غلظت کلسترول بر راندمان انکپسولاسون هریک از فرمولاسیون ها، فرمول نهایی انتخاب شد و

جدول ۲: درصد مولی ترکیبات سازنده فرمولاسیون بهینه. SPC= soybean phosphatidylcholine

کد فرمول	کلسترول %	Span %60	پلی اتیل گلیکول %	SPC %80
۴ (فرمول بهینه)	۱۵	۲۰	۵	۶۰

۶. بررسی خصوصیات سامانه لیپونیوزومی

مقدار $25 \mu\text{l}$ از نمونه حاوی داروی ساخته شده بر روی یک لام ریخته و محلول در مجاورت هوا خشک شد. نمونه ها چند ثانیه با طلا پوشش داده شده تا رسانا شوند. سپس مورفولوژی سطحی نانوحامل ها (زبری، شکل، صافی و توده ای شدن) با استفاده از دستگاه SEM (Scanning electron microscope) استفاده از دستگاه (MIRA3، PRC) با قدرت ۱۰۰ Watt بررسی گردید. پتانسیل زتای (Zeta-Potential) فرمولاسیون لیپونیوزومی و سایز آن، با استفاده از دستگاه زتا سایزر (Malver Instruments مدل Nano-ZetaSizer ES، آمریکا) در دمای اتاق و زاویه 90° اندازه گیری گردید.

۷. کشت سلول

در این مطالعه از رده سلول های پروستات (PC3) استفاده شد که از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه گردیده بودند. سلول های این رده سلولی در فلاسک های یک بار مصرف کشت سلول در محیط کشت RPMI غنی شده با Glutamine، FBS ۱۰٪، (همه مواد GIBCO، آمریکا) در دمای 37°C در حضور ۵٪ از CO_2 کشت داده شد.

۸. بررسی میزان درون گیری نانولیپوزوم

جهت بررسی ورود سامانه ساخته شده به درون سلول های MCF-7، از پلیت های ۶ خانه ای که در کف هرکدام یک عدد لامل قرار داده شده، استفاده می گردد. در مرحله بعدی سلول های توموری را تریپسینه (Gibco، آمریکا) نموده، و

۴. بررسی سنتتیک رهایش دارو از نانوسامانه های لیپونیوزومی

به منظور شبیه سازی رهایش دارو از حامل در محیط *in vivo* از PBS و دمای 37°C و 42°C استفاده شد، تا به توان شرایط سینک درون تنی را برقرار ساخت. در مرحله نخست از ۱mL محلول لیپونیوزومی حاوی کورکومین درون کیسه دیالیز قرار گرفت. در مرحله دوم کیسه دیالیز درون یک محیط ایزوله (فالکون استریل و بسته) با شرایط دمایی اشاره شده، قرار داده شد و استیرر گردید. از اطراف کیسه دیالیز در زمان های مشخص نمونه برداری شد. در خاتمه، نمودار رهایش آن در زمان-ساعت نسبت به درصد رهایش ترسیم شد.

۵. بررسی طیف سنجی مادون قرمز سامانه لیپونیوزومی

هدف این مرحله بررسی برهم کنش های شیمیایی میان سامانه لیپونیوزومی و دارو است. برای این منظور حامل های لیپونیوزومی با سانتریفیوژ از سوسپانسیون جدا شده و محلول اضافی تبخیر گردید. نمونه ها با KBr مخلوط شده و در درون پلیت فشرده می شوند. طیف FT-IR به منظور بررسی گروه های عاملی نانو لیپونیوزومی در محدوده طول موج $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ برای نمونه های جامد، و طیف AT-IR $4000-600 \text{ cm}^{-1}$ برای نمونه های مایع، اسکن گردید (PRC، WQF-510 FT-IR Spectrometer). بدین منظور طیف تمام مواد اولیه مورد استفاده در ساخت فرمولاسیون های لیپونیوزومی و کورکومین گرفته شده و با فرمولاسیون نهایی مقایسه می گردد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی آماری نتایج از نرم‌افزار prism و روش تی-تست (و یا من‌ویتنی) و ANOVA (و یا کروسکال والیس) استفاده شد و معناداری نتایج بر حسب $P\text{-value} < 0/05$ سنجیده شد. بررسی توزیع نرمال توسط تست KS صورت گرفت. میزان هم بستگی بین دو متغیر کمی هم توسط رگرسیون خطی انجام گرفت.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تایید شده است (کد اخلاق IR.SSU.MEDICINE.REC.1395.10).

نتایج

درصد بارگذاری کورکومین

راندمان انکپسولاسیون برای هریک از فرمولاسیون‌های ۱ تا ۳ با توجه به نمودار کالیبراسیون کورکومین در ایزوپروپیل محاسبه گردید و نتایج نشان می‌دهد که درصد بارگذاری دارو درون فرمولاسیون‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۸۵/۷۶، ۸۹/۵۳، ۹۱/۸۹ درصد می‌باشد و نمودار کالیبراسیون با درصد خطی بالا به دست آمد.

انتخاب فرمولاسیون نهایی

با توجه به درصد بارگذاری دارو و اثر غلظت کلسترول بر راندمان انکپسولاسیون، فرمولاسیون ۳ به عنوان فرمولاسیون نهایی جهت انجام فرایند بهینه کردن (پگیله کردن فرمولاسیون نهایی) و انجام سایر تست‌های فیزیک-شیمیایی انتخاب گردید.

بررسی انکپسولاسیون و الگوی رهایش دارو در فرمولاسیون بهینه (پگیله شده)

با توجه به نمودار کالیبراسیون کورکومین در ایزوپروپیل و رابطه ۱، درصد درونگیری کورکومین درون سامانه نانونیولیپوزومی پگیله شده ۹۵/۵۸ درصد می‌باشد که نسبت به فرمولاسیون نهایی غیرپگیله افزایش محسوسی داشته است. نمودار رهایش دارو از سامانه لیپولیپوزومی نیز با استفاده از نمودار کالیبراسیون کورکومین در بافر PBS رسم گردید، که بررسی سنتیک رهایش دارو در فرمولاسیون نهایی پگیله نشان

حدود 10^5 Cells/mL از سوسپانسیون سلولی PC3 به همراه ۳ mL محیط کشت به چاهک‌های پلیت منتقل کرده و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت انجام می‌گیرد. سپس $10 \mu\text{l}$ از سامانه لیپونیوزومی که دارای دارو و رنگ (Sigma-) Dil #42364، آمریکا) است را به هر چاهک اضافه کرده و حدود ۳ تا ۴ ساعت زمان داده تا عمل تیمار صورت گیرد. در ادامه مقدار $150 \mu\text{L}$ از اتانول ۹۵٪ برای تثبیت سلول‌ها به هر چاهک اضافه و سپس در حدود $15 \mu\text{l}$ رنگ DAPI (GIBCO)، آمریکا) برای رنگ آمیزی هسته با غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ بروی لام پخش و اسمیر می‌شود. و در نهایت بررسی نمونه‌ها جهت فرایند Uptake توسط میکروسکوپ فلورسانس (XDS-1، آلمان) انجام می‌گیرد.

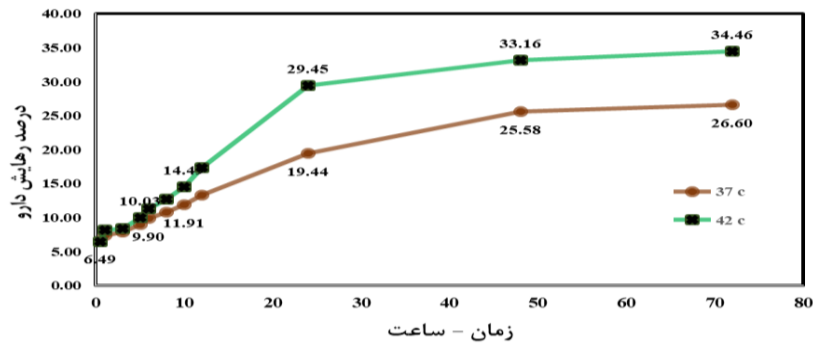
۹. تعیین سمیت سلولی

سمیت سلولی با روش MTT برای فرمولاسیون مطالعه شده به کارگرفته شد. به منظور اندازه‌گیری سمیت، سلول‌های MCF سرطان سینه به طور جداگانه با غلظت 10^4 در هرچاهک در پلیت ۹۶ تایی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با حجم یکسانی از محیط کشت تازه تیمار شدند (حجم یکسانی از محیط کشت تازه اضافه شد) و داروی کورکومین آزاد (با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) و لیپونیوزوم حاوی کورکومین (با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) به صورت چهار بار تکرار در چاهک‌ها تزریق شدند. پس از آن مجدداً به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس میزان $20 \mu\text{g/ml}$ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر به هر چاک اضافه شد و به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. بعد از آن مایع رویی خارج شد و به منظور حل کردن کریستال‌های فورمازون $180 \mu\text{g/ml}$ میکرولیتر DMSO (Sigma-Aldrich، آمریکا) اضافه گردید. در هر مرحله برای خارج کردن مایع رویی، سانتریفوژ صورت گرفت. جذب در طول موج 570 nm نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر میکروپلیت اپوک (بایوتک، آمریکا) ثبت گردید. و در نهایت با توجه به رابطه ۲ درصد زنده مانی سلول‌ها محاسبه شد.

رابطه (۲)

نیمه‌هدفمند عمل می‌کند. هم چنین این بررسی نشان می‌دهد که حداکثر رهایش دارو توسط سامانه لیپولیپونیوزومی در شرایط سلول سالم و سرطانی به ترتیب ۲۶/۶۰ و ۳۴/۴۶ درصد است.

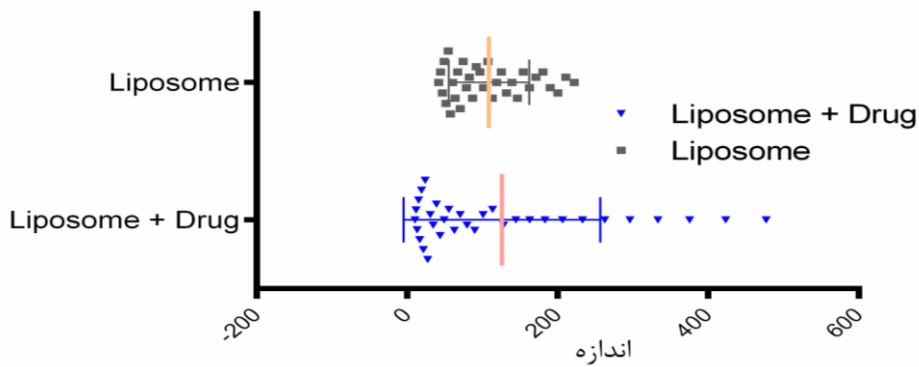
می‌دهد که الگوی رهایش دارو در شرایط سلول های سالم (۳۷C و pH 7.4) و سرطانی (۴۲° C و pH 5.4) آهسته رهش است. شیب و حداکثر رهایش دارو در شرایط سرطانی نسبت به شرایط نرمال مقداری بیشتر است که این موضوع نشان می‌دهد، نانوحامل ساخته شده در شرایط سرطانی به صورت



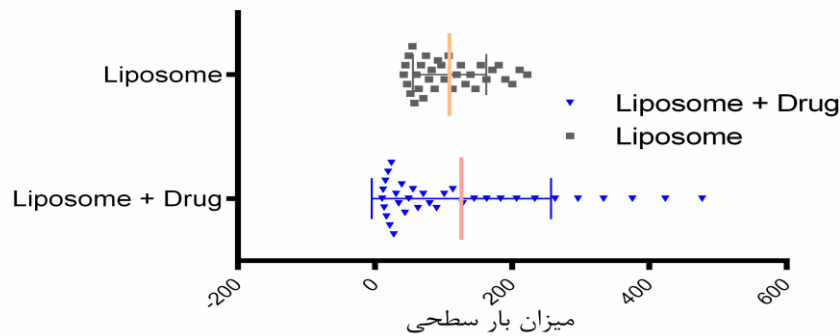
تصویر ۱: الگوی رهایش داروی کورکومین در شرایط سلول سالم (۳۷° C) و سرطانی (۴۲° C)

۴۱/۴۷- (تصویر ۲ و تصویر ۳؛ به ترتیب) نشان می‌دهد در حالی که نتایج حاصل از DLS برای این شاخصه ها در سامانه لیپونیوزومی فاقد دارو به ترتیب ۴۹/۴ nm و ۴۶/۷۴ mV- بوده است

اندازه، شاخص پراکندگی ذرات و پتانسیل زتا فرمولاسیون بهینه داده های به دست آمده از دستگاه DLS، اندازه و پتانسیل زتا برای نانوذره حاوی کورکومین به ترتیب ۶۳/۹ nm و ۶۳/۹ mV



تصویر ۲: اندازه ذرات برای سامانه بهینه لیپونیوزوم حاوی کورکومین (▼) و فاقد کورکومین (■)

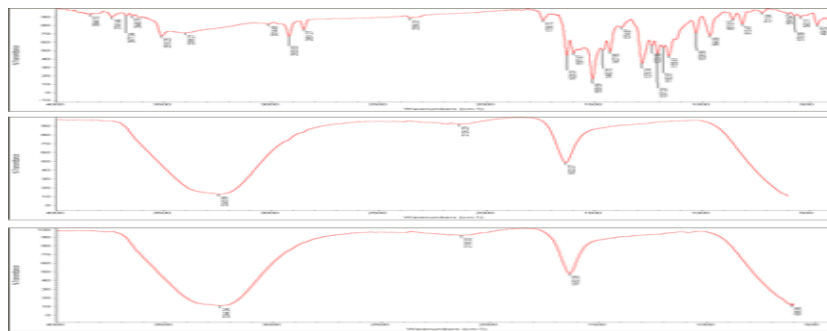


تصویر ۳: توزیع بار سطحی سامانه پگیله حاوی کورکومین. ■ سامانه بهینه لیپونیوزوم حاوی کورکومین ● فاقد کورکومین

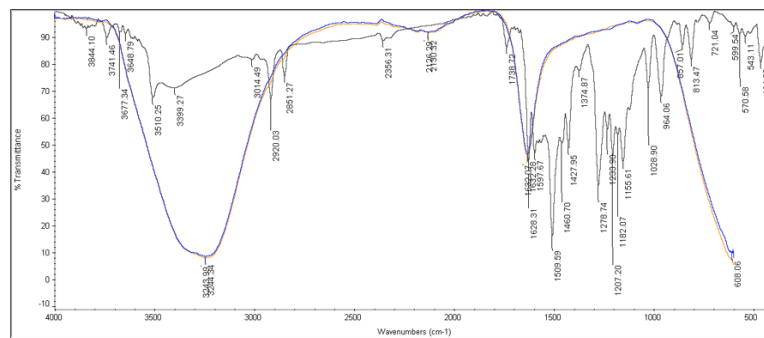
کورکومین درون لیپوزوم پیک های $2126/29$ ، $1632/07$ cm^{-1} و $3243/99$ در سامانه فاقد لیپوزوم به ترتیب با پیکهای cm^{-1} $3244/34$ و $2130/32$ ، $1632/28$ تغییرات (شیفت) اندک نشان از کپسوله شدن کورکومین درون نانوسامانه است. باتوجه به این که پیک های طیف کورکومین درون طیف نانوسامانه دارای دارو دیده نمی شود، می توان استناد کرد که دارو (کورکومین) با نانوسامانه لیپونیوزومی واکنشی نداده است و دارو به صورت مناسب درون سامانه انکپسوله شده است.

نتایج بررسی طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR) فرمولاسیون بهینه

طیف FT-IR کورکومین (تصویر ۴ بالا) دارای پیک های شاخص زیادی از جمله $1597/67$ ، $1278/74$ ، $813/47$ cm^{-1} و $3510/25$ می باشد که به ترتیب نمایانگر گروه های شیمیایی C-H، C-O، Ar C-C و OH است. هم چنین بررسی طیف های FT-IR نانولیپونیوزوم فاقد کورکومین (تصویر ۴ وسط) و دارای کورکومین (تصویر ۴ پایین) نشان می دهد که با انکپسوله شدن



طیف مادون قرمز نانو ذره و دارو

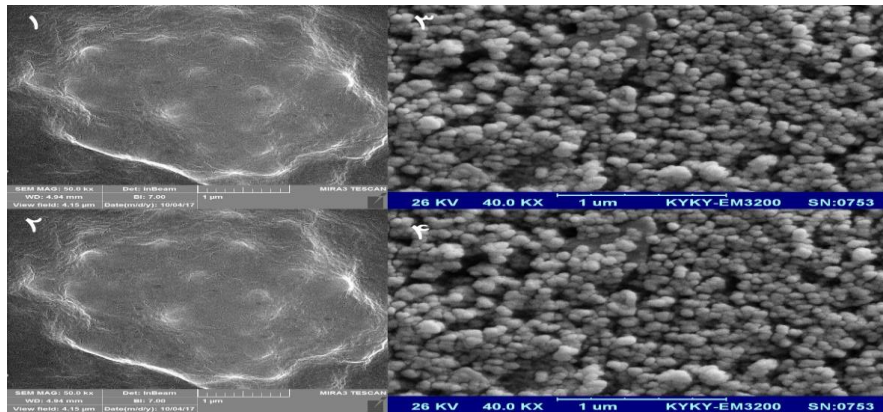


● کورکومین خالی ● نیولیپوزوم خالی ● کورکومین نیولیپوزومه

تصویر ۴: نمودارهای FT-IR کورکومین (بالا)، لیپونیوزوم فاقد دارو و لیپونیوزوم دارای دارو. در پایین مقایسه این سه طیف در یک نمودار آورده شده است.

همگن و یکنواختی هستند و مرز میان ذرات قابل تشخیص است. هم چنین این تصویر نشان می‌دهد که چسبیدگی میان ذرات مشاهده نمی‌شود و هم چنین اندازه گیری قطر نانوذره با میکروسکوپ، تأییدی بر صحت قطر اندازه گیری شده با دستگاه DLS می‌باشد.

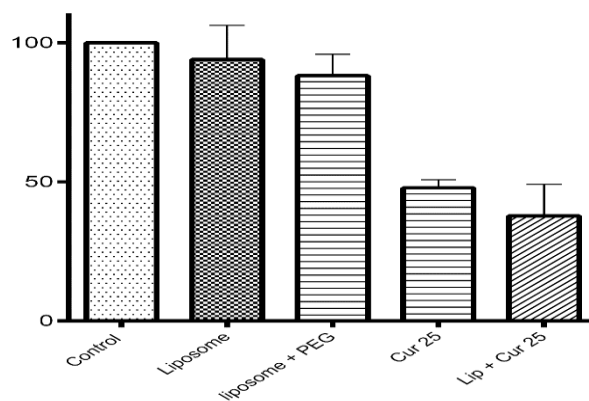
بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی فرمولاسیون بهینه
تصویر ۷، مورفولوژی نانوذرات ساخته شده با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی SEM و Fe-SEM را نمایش می‌دهد. همان گونه که در این تصویر مشخص است، ذرات دارای توزیع اندازه مناسب و ساختار کروی هستند. هم چنین بر اساس شکل مشخص می‌شود که ذرات دارای مورفولوژی



تصویر ۵: تصاویر میکروسکوپ SEM (شماره ۲ و ۴) و میکروسکوپ Fe-SEM (شماره ۱ و ۳)

زمان بیشتری دارو را در اختیار سلول های توموری قرار داده و بنابراین میزان مرگ سلول های توموری افزایش یافته است. هم چنین با توجه به تصویر مشخص می‌شود که درصد سمیت برای کورکومین انکپسوله ۶۳ درصد، برای داروی آزاد ۴۷ درصد و برای لیپوزوم بدون دارو ۹۳ درصد گزارش شد.

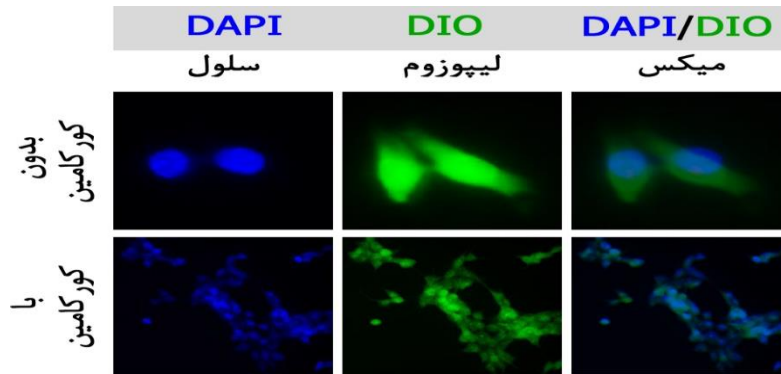
بررسی سمیت سلولی نانوسامانه بهینه دارای کورکومین
بررسی سمیت سامانه لیپونیزومی حاوی کورکومین بر رده MCF-7 نشان می‌دهد که سمیت کورکومین انکپسوله شده در مقایسه با کورکومین آزاد در غلظت مشابه (۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) افزایش یافته است. این موضوع موید این مطلب است که سامانه نانولیپوزومی، با رهایش آهسته، برای مدت



تصویر ۶: نمودار میزان سمیت کورکومین انکپسوله شده (%) و کورکومین آزاد

با رنگ DIO (رنگ سبز) است. وجود رنگ سبز در سلول آبی شده توسط DAPI در ستون سوم، نشان می‌دهد که سامانه لیپونیوزومی حاوی دارو و فاقد دارو (سبز رنگ) به درون سلول های توموری (آبی رنگ) به خوبی نفوذ کرده است.

بررسی ورود نانوسامانه بهینه حاوی کورکومین به سلول سرطانی براساس تصویر ۱۰ مشخص می‌شود که ستون اول از سمت راست، سلول رنگ‌آمیزی شده با رنگ DAPI (رنگ آبی سلول) و ستون وسط لیپوزوم‌های دارای دارو و فاقد دارو و رنگی شده



تصویر ۷: تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از چگونگی ورود سامانه به سلول

داخل لیپوزوم مهم هست. مطالعات مختلفی نشان دادند که سمیت دارو بعد از کپسوله شدن افزایش می‌یابد مانند پژوهشی که توسط بصیر ملکپور و همکاران در سال ۲۰۱۰ صورت گرفت و نشان داد که سمیت داروی دوکسوروبیسین لیپوزومه و آزاد بر رده سلولی MDA-MB-231 پستان میزان سمیت داروی لیپوزومه نسبت به شکل آزاد آن بیشتر است. سید ابراهیم علوی در سال ۲۰۱۳، نانولیپوزوم های پگیله محتوی هیدروکسی اوره به منظور اثرگذاری بر رده سلولی MCF-7، گزارش نمودند که اثرگذاری داروی لیپوزومه نسبت به داروی آزاد به مراتب بیشتر است. پژوهش‌هایی هم میزان اثرگذاری داروی کپسوله در داخل لیپوزوم را کمتر بیان کرده‌اند. در سال ۲۰۰۷، Cheng J, و همکاران داروی doxorubicin محصور در لیپوزوم را در ترکیب با سیکلوفسفامید در درمان سرطان سینه مورد بررسی قرار دادند. نتایج به دست آمده نشان از کاهش سمیت سلولی داروی دوکسوروبیسین محصور در لیپوزوم در مقایسه با فرم آزاد آن داشته است (۱۹). سید ابراهیم علوی و همکاران در سال ۲۰۱۳، اثرگذاری هیدروکسی اوره لیپوزومه را بر رده سلولی سرطان سینه ارزیابی نمودند و در ضمن این پژوهش به این نتیجه دست یافتند که سمیت داروی لیپوزومه

بحث

در این پژوهش، فرمولاسیونی جدید و بهینه جهت ساخت نانولیپونیوزوم های حاوی داروی سیتوتوکسیک کورکومین پیشنهاد شد که ضمن برخورداری از شارژ سطحی منفی (۴۱/۴۷-)، دارای انکپسولاسیون ۹۵/۵۸ درصد، اندازه nm ۶۳/۹ و رهایش کنترل شده است به گونه‌ای که حداکثر رهایش دارو برای این نانوسامانه لیپیدی در مدت زمان ۶۰ ساعت در شرایط سلول نرمال و سرطانی به ترتیب ۲۶/۶۰ و ۳۴/۴۶ درصد است. هم چنین بررسی سمیت سلولی این نانوذره حاوی دارو نشان می‌دهد که در غلظت یکسان، میزان سمیت کورکومین انکپسوله شده در مقایسه با کورکومین آزاد بر روی رده سلولی MCF-7 سرطان پستان افزایش محسوسی یافته است. کورکومین آزاد دارای حلالیت کمتری است و استفاده از آن در *in vivo* را محدود می‌کند و توانایی استفاده سلول‌های سرطانی از کورکومین هم بطبع کمتر می‌شود. برای غلبه بر آن فرمولاسیون پیشنهادی نانولیپوزومی میزان حلالیت آن را افزایش می‌دهد. در مطالعه های گذشته انواع داروها در داخل لیپوزوم‌ها کپسوله شده‌اند. از طرف دیگر؛ میزان لود کورکومین در داخل لیپوزوم و هم چنین مدت زمان حضور دارو در

سمیت داروی دوکسوروبیسین در حالت لیپوزوم نسبت به حالت آزاد بیشتر است که با نتایج مطالعه هم‌خوانی دارد هرچند داروی مورد استفاده متفاوت بوده است. علاوه بر این این پژوهش گزارش می‌دهد که سمیت دارو در نانولیپوزوم‌های کاتیونی نسبت به آنیونی بیشتر است.

نتیجه‌گیری

فناوری نانو در حوزه دارو به دنبال یافتن مدل‌ها و راهکارهای نوینی جهت رسانش دارو به سلول‌های توموری است تا از این طریق بتواند با تحویل هدفمند دارو، ضمن کاستن از عوارض جانبی آن، مبارزه موثرتری را با سلول‌های سرطانی نماید. از این رو پژوهشگران حوزه سرطان به دنبال جایگزین کردن این داروها با ترکیبات دیگری است، که ضمن برخورداری از خواص ضد توموری بالا، عوارض جانبی کمتری را به دنبال دارد. داروهای گیاهی یکی از این ترکیبات است. در پژوهش حاضر فرمولاسیون‌های بهینه شده و نیمه هدفمند از نانوسامانه‌ها لیپونیزومی دارای کورکومین ساخته شد که ضمن تایید ویژگیهای فیزیکوشیمیایی مناسب آن، دارای انکپسولاسیون بالا، رهایش کنترل شده دارو در شرایط سلول سرطانی و نرمال و افزایش سمیت دارو در حالت انکپسوله شده در مقایسه با حالت آزاد است. بنابراین با توجه به شواهد فوق میتوان نانوسامانه‌های لیپونیزومی حاضر را به عنوان ترکیباتی ضد توموری جهت درمان سرطان‌های از جمله سرطان سینه پیشنهاد نمود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه آقای مسعود زارع شحنه دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک پزشکی پردیس بین‌الملل علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد که در مرکز تحقیقات زیست‌فناوری پردیس بین‌الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد انجام گرفته و از این مرکز در خصوص تسهیل بهره‌مندی از فضای آزمایشگاهی و دستگاهی تشکر می‌گردد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

نسبت به داروی آزاد بیشتر است. در مطالعه‌ای، Tavano و همکاران در سال ۲۰۱۳ طراحی نوآورانه سیستم تحویل دارو، شامل نانو کپسول لیپونیزومی حامل داروی ضد سرطان doxorubicin hydrochloride را ارائه دادند بعد از طراحی، این نانوکپسول به ترانسفرین نیز کونژوگه شد به منظور افزایش جذب لیپونیزوم توسط سلول‌ها از طریق گیرنده ترانسفرین. سپس نانو کپسول مذکور به سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 عرضه شده در این مطالعه لیپونیزوم طراحی شده به عنوان یک داروی ضد سرطان مفید، تایید شد (۲۰).

شهابی و همکاران در سال ۲۰۱۵، ضمن بررسی اثر نانوذرات طلا را بر هیدروکسی‌اوره لیپوزوم گزارش نمودند که، نانولیپوزوم می‌تواند حامل مناسبی برای هیدروکسی‌اوره باشد. هم‌چنین این پژوهش نشان داد که استفاده از نانوذرات طلا می‌تواند کارایی داروی لیپوزوم هیدروکسی‌اوره را افزایش دهد. یوسفی‌علاشی و همکاران در سال ۲۰۱۶، سمیت نانولیپوزوم‌های مغناطیسی حاوی پاکلی‌تاکسل را بر روی سرطان تخمدان بررسی نمودند که به این نتیجه دست یافتند که داروی لیپوزوم نسبت به داروی آزاد سمیت بالاتری دارد. قنبری و همکاران در سال ۲۰۱۶، نانوذرات لیپوزومی حاوی سیس‌پلاتین جهت اثرگذاری بر HepG2 کارسینومای کبد انسانی تهیه نمودند و گزارش نمودند که، انکپسولاسیون دارو باعث افزایش کارایی آن نسبت به حالت آزاد دارو می‌شود. شیرزاد و همکاران در سال ۲۰۱۷، اثر نانولیپوزوم‌های پگیله حاوی سیس‌پلاتین را بر روی رده سلولی A2780CP تخمدان ارزیابی نمودند که گزارش نمودند که انکپسولاسیون دارو باعث افزایش کارایی آن بر سلول‌های تخمدان می‌شود. نادری‌نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۷، نانولیپوزوم‌های محتوی کورکومین به منظور اثرگذاری بر سرطان استخوان تهیه و گزارش نمودند که میزان سمیت داروی کورکومین در حالت لیپونیزوم نسبت به حالت آزاد بیشتر است. حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۸، اثرگذاری نانولیپوزوم‌های دارای دوکسوروبیسین با شارژهای سطحی متفاوت را بر روی رده سلولی سرطان استخوان بررسی نمودند که نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که میزان

References:

- 1-International Agency for Research on Cancer. World Cancer report 2008. Cancer Control 2008
- 2-Sadjadi a, Nouraiie M, Ghorbani A, Alimohammadian M, Malekzadeh R. *Epidemiology of breast cancer in the Islamic Republic of Iran: first results from a population-based cancer registry*. East Mediterr Health J 2009; 15(6): 1426-31.
- 3-Brody JG, Rudel RA. *Environmental pollutants and breast cancer*. Environmental Health Perspectives. 2003.
- 4-Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, et al. *Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes*. Pharm Res 2008; 25(9): 2097-116.
- 5-Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet. 2005;
- 6-Allen TM. *Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy*. Nat Rev Cancer 2002; 2(10):750-63.
- 7-Wanchai A, Armer JM, Stewart BR. *Complementary and alternative medicine use among women with breast cancer: A systematic review*. Clin J Oncology Nursing 2010; 14(4): E45-55.
- 8-JN L, CT W, JD W. *Prescription pattern of Chinese herbal products for breast cancer in Taiwan: A population-based study*. Evidence-based Complement Altern Med 2012; 2012: 891893.
- 9-Liu D, Chen Z. *The effect of curcumin on breast cancer cells*. J Breast Cancer 2013; 16(2):133-7.
- 10- 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.
- 11- Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakara AB, Aggarwal BB. *Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution*. Cancer Lett 2008; 267(1): 133-64.
- 12- Saraswathy M, Gong S. *Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer*. Biotechnology Adv 2013; 31(8):1397-407.
- 13- 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.
- 14- Bates S, Kang M, Meadows B, Bakke S, Choyke P, Merino M, et al. *A phase I study of infusional vinblastine in combination with the P-glycoprotein antagonist PSC 833 (Valspodar)*. Cancer 2001; 26(6): 1577-1590.
- 15- Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. *Advances and challenges of liposome assisted drug delivery*. Frontiers in Pharmacology 2015; 6: 286.
- 16- Allen TM, Cullis PR. *Liposomal drug*

- delivery systems: From concept to clinical applications*. *Advanced Drug Delivery Rev* 2013; ;65(1): 36-48.
- 17- Allen TM, Hansen CB, de Menezes DEL. *Pharmacokinetics of long-circulating liposomes*. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1995; 16(2-3): 267-284.
- 18- Haghirsadat F, Azhdari M, Kalantar SM, Nadernezhad S, Teymorizadeh K, Yazdani M, et al. *Strategy of Improvements in the rapeutic index of medicinal herbs of Iranianin digenous: Synthesis and characterization of phospholipid lipid-based vesicles in corporated Trachyspermum copticum*. *JSSU* 2016; 24(6): 468-78.
- 19- Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, et al. *Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery*. *Biomaterials* 2007; 28(5): 869-76.
- 20-Tavano L, Muzzalupo R, Mauro L, Pellegrino M, Andò S, Picci N. *Transferrin-conjugated Pluronic niosomes as a new drug delivery system for anticancer therapy*. *Langmuir* 2013; 29(41):12638-46.

Study of anti-cancer effects of Curcumin; formulation of Curcumin-loaded nano carrier and its toxicity effect on MCF-7 Cell line.

Masoud Zare Shehneh¹, Seyed Mehdi Kalantar², Mohammad Hasan Sheikhha³,
Amir Asri Kojabad⁴, Bibi Fatemeh Haghirsadat^{*5}

Original Article

Introduction: Nanotechnology introduced new methods to chemotherapy drugs delivery into cancer cells to reduce the side effect of drugs it increases the quality of cancer treatment and reduces the side effects of chemotherapy. . In this study, different lipid formulations of nucliposomes containing curcumin was prepared by thin-layer method and evaluated for chemical-physical evaluation on MCF-7 cell line.

Methods: This study was a descriptive-analytic. Various formulations of liposomes prepared from Span 60, SPC and cholesterol. Curcumin was loaded in the liposomes. Final liposome formulation selected and PEGylated. The Optimal formulation characterized by DLS, FT-IRT, Fe-SEM and SEM. Statistical analysis was performed with Prism6 software.

Results: The average size of liposomes, encapsulation efficacy of liposomal loaded curcumin and Zeta potential was about 63.9 nm, -41mV and %95.58, respectively. Liposomes exhibited the slowest release rate in normal and turmeric cell culture condition. To compare the function of free curcumin in similar concentrations, liposomal curcumin formulation was %63 toxic to MCF7 Cell line.

Conclusion: The present study shows that an optimally optimized nanoliposome with curcumin having appropriate physicochemical properties, improving drug toxicity in cancerous cell lines and increasing drug stability can be a good vector for drug delivery to breast cancer cells.

Conclusion: The present study shows that an optimally optimized nanoliposome with curcumin having appropriate physicochemical properties, improving drug toxicity in cancerous cell lines and increasing drug stability can be a good vector for drug delivery to breast cancer cells.

Keywords: Liposome, Curcumin, Breast_cancer, MCF7.

Citation: zare shehneh M, kalantar SM, Sheikhha MH, asri kojabad A, Haghirsadat F. **Study of anti-cancer effects of Curcumin; formulation of Curcumin-loaded nano carrier and its toxicity effect on MCF-7 Cell line.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 27(1): 1175-86.

¹Genetic Department, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences. Yazd, Iran.

²Genetic and Reproductive Unit, Recurrent Abortion Research Centre, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

³Department of Genetics, Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

⁴Department of Hematology and Blood Banking, Faculty of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

*Corresponding author: Tel: 09132507158, email: Fhaghirsadat@gmail.com