Journal of Police Medicine

Fall 2014; Vol. 3, No. 3: 183-192

Original Article

The Survey of Cytotoxic Effect of Dendrosomal Nano curcumin on 4T1 Metastatic Model of Breast Cancer

Received: 23 july 2014 **Revised:** 23 November 2014 **Accepted:** 29 November 2014

Baharak Farhangi[1]
Mohammad Javad Dehghan
Esmat Abadi[2]
Neda Soleimani[3]
Zivar Salehi[4*]

[1]MSc, Molecular Genetics, Department of Genetics, Faculty of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran.

[2]Ph.D. Student, Molecular Genetics, Faculty of Biology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[3]Ph.D. Student, Medical Bacteriology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[4]Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran.

[*]**Corresponding Author:**
Zivar Salehi
Tel: (+98)9113337003

e-mail: geneticzs@yahoo.co.uk

ABSTRACT

Background: Breast cancer is the most common type of malignancy in women. Despite dramatic achievements in the development of synthetic pharmaceutics, herbal drugs still remain as one of the leading therapeutic strategies for cancer. In the current study, we aimed to investigate the toxic effects of dendrosomal nanocurcumin on 4T1 cells derived from BALB/c mice breast tumors.

Materials and Methods: For this purpose, MTT assay was exploited to evaluate viability of 4T1 cell line and mouse skin normal fibroblasts (MEF) cells under exposure to nanocurcumin. Cultured cells were treated with different concentrations of nanocurcumin ranging from 5 to 45μM. Furthermore, the effect of nanocurcumin on cells was compared with doxorubicin as a frequently-used chemotherapeutic for breast cancer.

Results: The results of MTT assay indicated that treatment with nanocurcumin leads to a significant reduction in the viability of cancer cells in a dose- and time- dependent manner with no significant effect on normal cells. The decrease in viability of cancer cells was 35, 25 and 15μM for 24h, 48h and 72 h post-treatment, respectively. The data also shown that nanocurcumin exerts toxic effects the same as doxorubicin on cancer cells. Given less toxicity of nanocurcumin on normal cells in comparison with doxorubicin, this finding is of paramount importance.

Conclusion: Dendrosomal nanocurcumin is able to eradicate cancer cells in a dose- and time-dependent mode. This nanodrug has toxic effects on breast cancer cells with no toxicity on breast normal cells. On the other hand, this therapeutic agent is as potent as doxorubicin in killing cancer cells. While compared with doxorubicin, this compound shows less toxicity on normal cells.

Keywords: dendrosomal nanocurcumin, cell toxicity, 4T1 cell line

پاییز ۱۳۹۳- دوره ۳ - شماره ۳- صفحات ۱۹۲-۱۸۳

مجله طب انتظامی

مقاله تحقیقی

بررسی اثر سمیت سلولی نانوکورکومین دندروزومی بر مدل متاستاتیک 4T1 سرطان پستان

تاریخ دریافت: ۱ مرداد ۱۳۹۳ **تاریخ اصلاح:** ۲ آذر ۱۳۹۳ **تاریخ پذیرش:** ۸ آذر ۱۳۹۳

بهارک فرهنگی[۱]
محمد جواد دهقان عصمت آبادی[۲]
ندا سلیمانی[۳]
زیور صالحی[۴*]

[۱]کارشناس ارشد، ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی پردیس گیلان، رشت، ایران.
[۲]دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۳]دانشجوی دکتری تخصصی باکتری شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۴]استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

[*]نویسنده مسئول:
زیور صالحی
تلفن: ۰۰۳۹۱۱۳۳۳۷۰۰۳(۹۸+)
پست الکترونیک:
geneticzs@yahoo.co.uk

چکیده

مقدمه: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان است. با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در تولید داروهای سنتزی، هنوز گیاهان دارویی به عنوان یکی از راه‌کارهای مهم جهت درمان سرطان مطرح می‌باشند. هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات سمیت نانوکورکومین دندروزومی بر رده سلولی 4T1 استخراج شده از تومورهای پستانی موش BALB/c می‌باشد.

مواد و روش‌ها: آزمون MTT جهت بررسی توانایی زیستی رده سلولی 4T1 و سلول های فیبروبلاست پوستی نرمال موش (MEF) مورد استفاده قرارگرفت. سلول‌های کشت داده شده تحت تیمار با طیفی از غلظت‌های نانوکورکومین دندروزومی (μM ۴۵-۵) قرارگرفتند. همچنین اثر نانوکورکومین بر روی سلول‌ها با دوکسوروبیسین که دارویی متداول در درمان سرطان پستان می‌باشد، مقایسه گردید.

یافته‌ها: نتایج آزمون MTT بر روی رده سلولی 4T1 به ترتیب ۳۵، ۲۵ و ۱۵ میکرومول برای تیمارهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته بود. تاثیر معنی‌داری بر سلول‌های نرمال مشاهده نشد. همچنین نانوکورکومین دارای اثرات سمی مشابه دوکسوروبیسین در از بین بردن سلول‌های سرطانی است.

نتیجه‌گیری: نانوکورکومین دندروزومی قادر است به‌صورت وابسته به دوز و زمان، سلول‌های سرطانی را از بین ببرد. این نانو دارو دارای اثرات سمی بر سلول‌های سرطانی پستان ولی فاقد سمیت بر سلول‌های نرمال پستان می‌باشد. از طرف دیگر، این ترکیب دارویی دارای قابلیتی مشابه با دوکسوروبیسین در حذف سلول‌های سرطانی است. با توجه به سمیت کمتر نانوکورکومین دندروزومی بر سلول‌های نرمال در مقایسه با دوکسوروبیسین، حذف سلول‌های سرطانی یا داروی نانوکورکومین دندروزومی می‌تواند از اهمیت به سزایی برخوردار باشد.

کلید واژه‌ها: نانوکورکومین دندروزومی، سمیت سلولی، رده سلولی 4T1

مقدمه

سرطان یک فرایند چندمرحله‌ای است که دوره شروع آن طولانی بوده و در ادامه سریع و پیش‌رونده می‌باشد. سرطان پستان دومین عامل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در میان خانم‌ها است که سالیانه ۱ میلیون مورد جدید از این بیماری تشخیص داده می‌شود. سن وقوع این بیماری در کشورهای توسعه‌یافته ۵۰-۴۰ سال می‌باشد [۱]. در اتیولوژی این نئوپلاسم دو عامل ژنتیک و فاکتورهای محیطی دخیل می‌باشد. آمار و شواهد منتشر شده، حاکی از افزایش مداوم شیوع سرطان پستان از اواسط دهه ۱۹۴۰ می‌باشد [۲]. هدف اصلی در پیشگیری این نوع سرطان توسط مواد طبیعی یا سنتتیک مهار، کند و یا معکوس کردن فرایند سرطان زایی می باشد [۳]. یکی از مرسوم ترین روش های درمان سرطان، شیمی درمانی است که

Journal of Police Medicine
Fall 2014; Vol. 3, No. 3: 183-192

عوارض بسیاری دارد، ضمن آنکه سلول‌های سرطانی به‌طور کامل پاک‌سازی نمی‌شوند و غالباً نیز عودهای مکرر مشاهده می‌گردد. بنابراین امروزه معرفی داروهای جایگزین با منشأ طبیعی بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، برخی ترکیبات غذایی طبیعی نظیر کورکومین[1] به‌طور ذاتی توانایی تعدیل این مسیرها و در نتیجه درمان یا تأخیر فرایند سرطان‌زایی را در گونه‌های مختلف دارند [۵ و۴] کورکومین جزء اصلی و فعال ادویه زردچوبه می‌باشد که از ریزوم یا ساقه زیرزمینی گیاه[2] استخراج می‌شود. این ترکیب ارزشمند گیاهی، اولین بار در سال ۱۸۷۰ به‌صورت پودر کریستالی زردرنگ استخراج و به نام diferuloylmthan و با فرمول شیمیایی C21H20O6 1,7-bis(4-hydroxy-3-) (methoxyphenyl)-1-6-heptadine-3,5-dione شناخته شد. کورکومین یک مولکول فلورسنت هیدروفوبیک است که می‌تواند وارد غشای سلول شود. شواهد بسیار محکمی وجود دارد که اثر آنتی‌توموری کورکومین و عملکرد آن بر روی سلول‌های توموری را تأیید می کنند [۶ و ۵]. علیرغم داشتن خواص دارویی منحصربه فرد در درمان بیماری های مزمن از جمله سرطان، کورکومین در بدن موجود زنده زیست ماندگاری بسیار پایینی دارد و بعد از جذب شدن توسط سلول‌ها، به‌سرعت تجزیه می‌شود. به‌همین دلیل است که اثرات درمانی کورکومین در نتیجه احتباس کوتاه آن در گردش خون محدود می شود [۷]. روش های مختلفی برای افزایش کارایی و اثربخشی کورکومین صورت گرفته که یکی از آن‌ها، ساخت نانوذره دندروزوم[3] می‌باشد [۸].

هدف از مطالعه حاضر، بررسی سمیت سلولی نانوکورکومین دندروزومی[4] بر رده سلولی سرطانی 4T1 (یکی از چند رده سلولی متاستاتیک سرطان پستان) [۹] و رده سلولی نرمال فیبروبلاست‌های پوستی نرمال موشی[5] (MEF) و همچنین مقایسه میزان سمیت سلولی نانوکورکومین دندروزومی و داروی دوکسوروبیسین[6] بر این دو رده سلولی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت و تکثیر رده‌های سلولی

رده‌های سلولی توموری 4T1 و سلول‌های نرمال فیبروبلاست با منشأ پوست (MEF) از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شدند. سپس سلول‌ها را بر اساس پروتکل، دفریز و در محیط DMEM[7] حاوی ۱۰درصد سرم گاوی و ۱ درصد آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور کشت سلول با دمای ۳۷°C و هوای مرطوب حاوی ۵ درصد CO_2 رشد داده شدند.

آماده‌سازی و تهیه نانوکورکومین دندروزومی

کورکومین مورداستفاده در این تحقیق با خلوص ۹۵ درصد از شرکت Merck آلمان خریداری شد. دندروزوم های ۴۰۰-۰ به عنوان نانوحامل های دندروزومی اهدایی از دانشگاه تربیت مدرس برای افزایش حلالیت کورکومین در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. آماده سازی نانوکورکومین مطابق دستورالعمل بهینه شده صورت گرفت [۱۰]. به‌طور خلاصه طیف غلظتی از کورکومین و دندروزوم (نسبت ۱:۵۰ تا نسبت ۱:۱۰) به منظور انتخاب نسبت مناسب از دندروزوم و کورکومین توسط اسپکترومتری بررسی و درنهایت نسبت وزنی ۱:۲۵ به عنوان نسبت بهینه انتخاب شد. نانوکورکومین دندروزومی با غلظت ۲/۷ میلی‌مولار تهیه و در شرایط دور از نور و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. رقیق سازی دارو پیش از استفاده در هر روش با استفاده از محیط کشت کامل صورت گرفت [۱۰].

تعیین بررسی قدرت زیستی سلولی با استفاده از آزمون سنجش MTT

برای بررسی قدرت زیستی[8] سلول ها از آزمون MTT استفاده می شود [۱۱] که اساس آن احیای نمک زردرنگ دی متیل تیازول دی فنیل تترازولیوم برماید[9] به بلورهای نامحلول و ارغوانی رنگ فورمازان[10] می باشد که توسط آنزیم های دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های زنده انجام می گیرد. شدت رنگ ارغوانی تولیدشده با میزان سلول هایی که از نظر متابولیکی فعال هستند، نسبت مستقیم دارد. به‌منظور بررسی میزان بقای سلول‌های 4T1 و MEF تحت اثر نانوکورکومین دندروزومی، ابتدا سلول‌های مذکور در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی و ۱ درصد آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین درانکوباتور کشت سلول با دمای ۳۷°C و هوای مرطوب حاوی ۵ درصد CO2 رشد داده شدند.

پس از طی مراحل پاساژ سلولی شمارش سلول‌ها با هموسیتومتر (لام نئوبار) انجام پذیرفت و بعد از آن تعداد مناسبی از سلول‌ها برای انجام این تست در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ در خانه های موردنظر از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر محیط سرم دار کشت داده شد. تعداد سلول موردنیاز برای این تست باید حداقل ۵۰۰۰ و حداکثر ۱۰۰۰۰ سلول باشد [۱۲]. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا سلول ها به سطح آن بچسبند. سپس سلول ها به صورت تکرارهای سه گانه با طیفی از غلظت های نانوکورکومین از ۴۵ μM–۵ تحت تیمار قرار گرفتند. پس از گذشت مدت‌زمان موردنظر، محیط چاهک ها به‌طور کامل خالی و به هر چاهک ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت و ۲۰ میکرولیتر محلول MTT افزوده شد. پلیت در فویل پیچیده شد و به مدت چهار ساعت در

1: Curcumin, 2: Curcuma Longa, 3: Dendrosome, 4: Dendrosomal nano curcumin (DNC), 5: Mouse Embryonic Fibroblast Cell Line, 6: Doxorubicin, 7: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 8: Cell Viability, 9: Dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide, 10: Formazan

انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد. محیط از چاهک ها خارج و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO[1] به هر چاهک افزوده شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه الایزا[2] در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. تست ها به صورت سه بار در حضور گروه های کنترل تکرار شد. پس از خواندن جذب نهایی توسط دستگاه الایزا، نمونه کنترل منفی (فاقد تیمار دارویی یا غلظت صفر نانوکورکومین) طبق فرمول ارائه‌شده در قسمت مواد و روش‌ها، ۱۰۰ درصد در نظر گرفته‌شده و سایر نمونه‌ها نسبت به آن سنجیده شدند.

آنالیز داده‌ها

معنی‌دار بودن نتایج با نرم‌افزار SPSS18 مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه داده ها، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه[3] و برای Post Hoc آن از Lsd استفاده گردید و سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

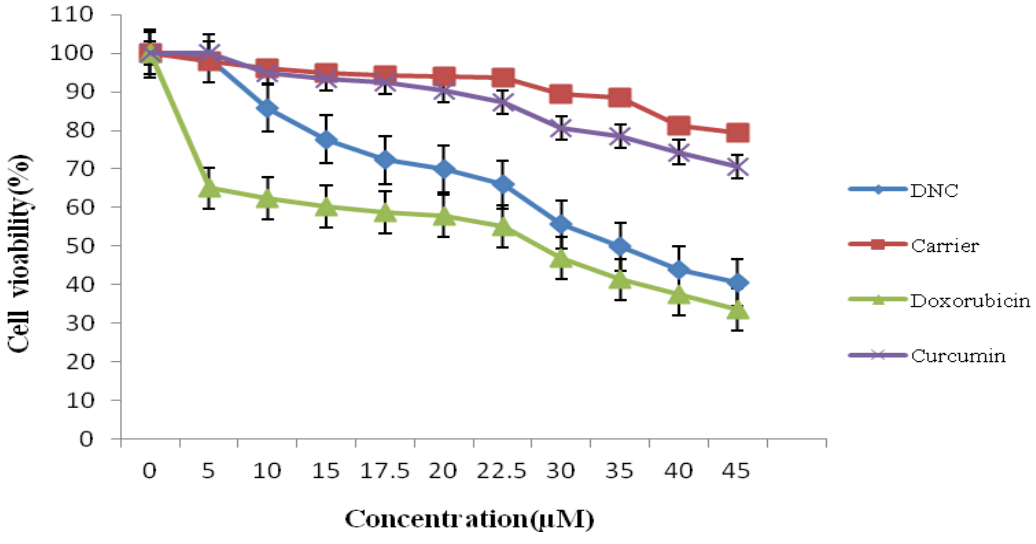
از مقایسه داده‌های به‌دست‌آمده از سنجش درصد حیات سلول‌های سرطانی تیمار شده با نانوکورکومین دندروزومی، مشخص شد تفاوت میانگین درصد حیات سلول‌ها در دوزهای متفاوت و زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل در سطح (۰/۰۵ > P) معنی‌دار می باشد. نتایج آزمون MTT سلول های سرطانی 4T1 تیمار شده با نانوکورکومین دندروزومی، کورکومین، دندورزوم و دوکسوروبیسین در بازه زمانی ۲۴ ساعت در شکل ۱ ارائه شده است. نتایج در بازه زمانی ۲۴ ساعت نشان می‌دهد که نانوکورکومین دندروزومی در غلظت ۳۵ میکرومولار دارای اثرات سمی بر ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌باشد.

نتایج آزمون MTT سلول های سرطانی 4T1 تیمار شده با نانوکورکومین دندروزومی، کورکومین، دندورزوم و دوکسوروبیسین در بازه زمانی ۴۸ ساعت در شکل۲ ارائه شده است. نتایج در بازه زمانی ۴۸ ساعت نشان می‌دهد که نانوکورکومین دندروزومی در غلظت ۲۵ میکرومولار دارای اثرات توکسیک بر ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌باشد.

نتایج آزمون MTT سلول های سرطانی 4T1 تیمار شده با نانوکورکومین دندروزومی، کورکومین، دندورزوم و دوکسوروبیسین در بازه زمانی ۷۲ ساعت در شکل ۳ ارائه شده است. نتایج در بازه زمانی ۷۲ ساعت نشان می‌دهد که نانوکورکومین دندروزومی در غلظت ۱۵ میکرومولار دارای اثرات توکسیک بر ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

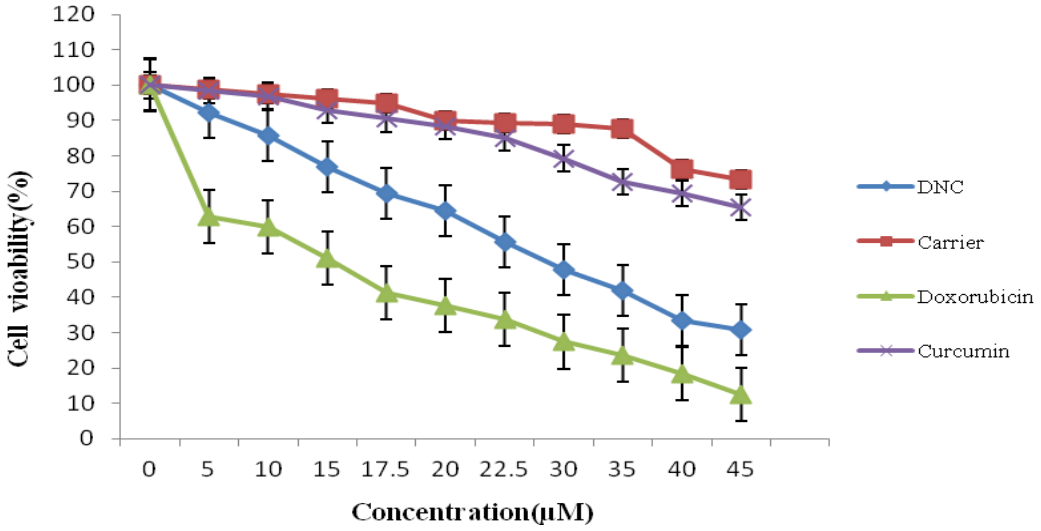
تحقیقات متعدد نشان داده اند که کورکومین از ایجاد سلول های توموری جلوگیری نموده و سرعت رشد و پیشرفت بسیاری از سرطان‌ها را کاهش می‌دهد. هم‌چنین نشان داده‌شده که کورکومین در دوزهای خاص باعث القای آپوپتوزیس در بسیاری از سلول های سرطانی می شود. میتوکندری ها نقش مهمی در پرولیفراسیون سلول ها و آپوپتوزیس دارند. کورکومین بر روی آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری و افزایش میزان نفوذپذیری غشای



شکل ۱: نتایج آزمون MTT سلول‌های سرطانی 4T1 تیمار شده با نانوکورکومین دندروزومی، کورکومین، دندورزوم و دوکسوروبیسین در بازه زمانی ۲۴ ساعت. منحنی حاصل نشان دهنده اثر بازدارندگی نانوکورکومین دندروزومی بر حیات سلول‌ها به صورت تابعی از غلظت می‌باشد. هر یک از نقاط، میانگین نتایج حاصل از ۳ آزمون مستقل می‌باشد (۰/۰۵ > p). نتایج در این بازه زمانی نشان می‌دهد که: الف) نانوکورکومین دندروزومی در غلظت ۳۵ میکرومولار دارای اثرات سمی بر ۵۰ درصد از سلول ها می‌باشد، ب) ناقل (دندروزوم) به تنهایی دارای اثر بازدارندگی بر حیات سلول‌ها نمی‌باشد، ج) منحنی اثر بازدارندگی نانوکورکومین دندروزومی مشابه داروی دوکسوروبیسین می‌باشد.

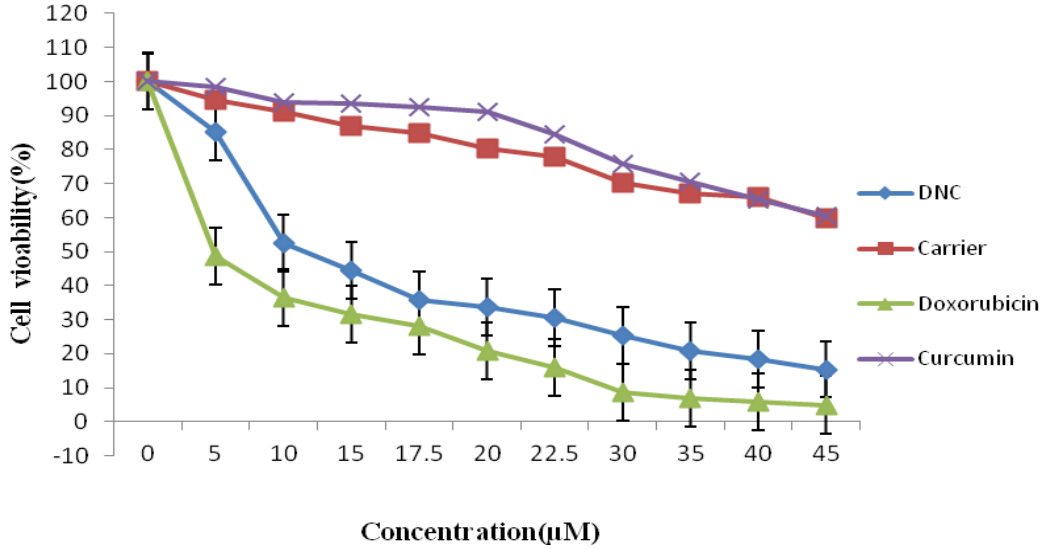
1: Dimethyl Sulfoxide, 2: ELIZA Plate Reader, 3: One-Way Analysis of Variance

Journal of Police Medicine
Fall 2014; Vol. 3, No. 3: 183-192

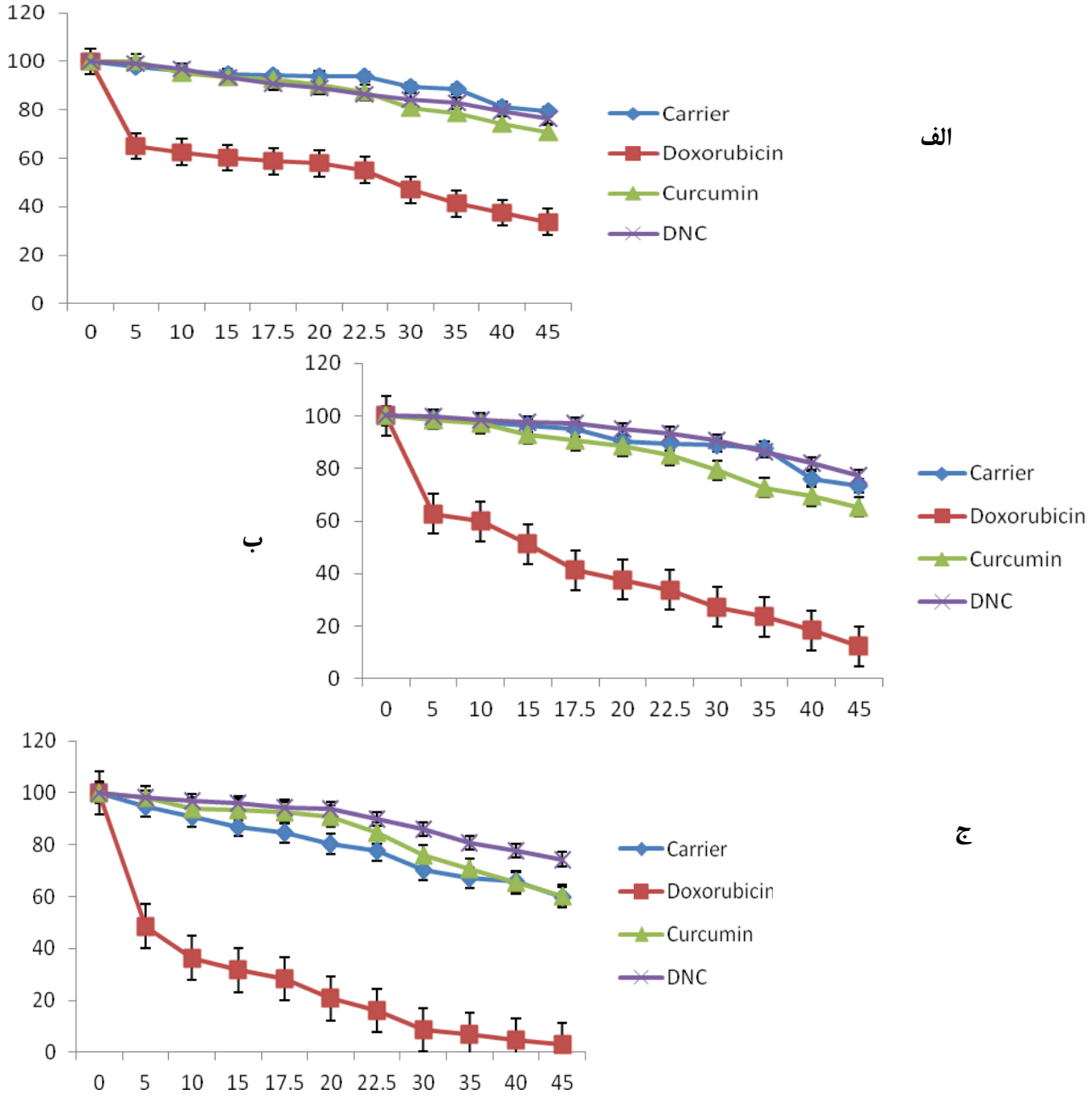


شکل ۲: نتایج آزمون MTT سلول‌های سرطانی 4T1 تیمار شده با نانوکورکومین دندروزومی، کورکومین، دندورزوم و دوکسوروبیسین در بازه زمانی ۴۸ ساعت. منحنی حاصل نشان‌دهنده اثر بازدارندگی نانوکورکومین دندروزومی بر حیات سلول‌ها به صورت تابعی از غلظت می‌باشد. هر یک از نقاط، میانگین نتایج حاصل از ۳ آزمون مستقل می‌باشد ($p < ۰/۰۵$). نتایج در این بازه زمانی نشان می‌دهد که: الف) نانوکورکومین دندروزومی در غلظت ۲۵ میکرومولار دارای اثرات سمی بر ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌باشد، ب) ناقل (دندروزوم) به تنهایی دارای اثر بازدارندگی بر حیات سلول‌ها نمی‌باشد، ج) منحنی اثر بازدارندگی نانوکورکومین دندروزومی مشابه داروی دوکسوروبیسین می‌باشد.

میتوکندری‌ها اثر می‌گذارد. بدین ترتیب اثرات آپوپتوتیک خود را نشان می‌دهد و نظیر سایر مهارکننده‌های پروتئازوم روی سلول‌های در حال پرولیفراسیون نسبت به سلول‌های تمایزیافته اثر قوی‌تری دارد. کورکومین با اثر مهاری بر آنژیوژنز بافت سرطانی، باعث کاهش رشد سلول‌های سرطانی شده و همچنین فعالیت تلومرازی را در این سلول‌ها کاهش می‌دهد. این ماده با مهار فاکتور رشد سلول‌های اندوتلیال عروقی و گیرنده اختصاصی آن (آنژیوپوئتین) از آنژیوژنز و تشکیل عروق خونی جدید در سلول‌های توموری جلوگیری نموده و رشد آن‌ها را متوقف می‌کند. به‌طورکلی کورکومین دارای اثرات ضدالتهابی و ضدسرطانی بوده و این اثرات به‌طور عمده



شکل ۳: نتایج آزمون MTT سلول‌های سرطانی 4T1 تیمار شده با نانوکورکومین دندروزومی، کورکومین، دندورزوم و دوکسوروبیسین در بازه زمانی ۷۲ ساعت. منحنی حاصل نشان‌دهنده اثر بازدارندگی نانوکورکومین دندروزومی بر حیات سلول‌ها به صورت تابعی از غلظت می‌باشد. هر یک از نقاط، میانگین نتایج حاصل از ۳ آزمون مستقل می‌باشد ($p < ۰/۰۵$) . نتایج در این بازه زمانی نشان می‌دهد که: الف) نانوکورکومین دندروزومی در غلظت ۱۵ میکرومولار دارای اثرات سمی بر ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌باشد، ب) ناقل (دندروزوم) به تنهایی دارای اثر بازدارندگی بر حیات سلول‌ها نمی‌باشد، ج) منحنی اثر بازدارندگی نانوکورکومین دندروزومی مشابه داروی دوکسوروبیسین می‌باشد.

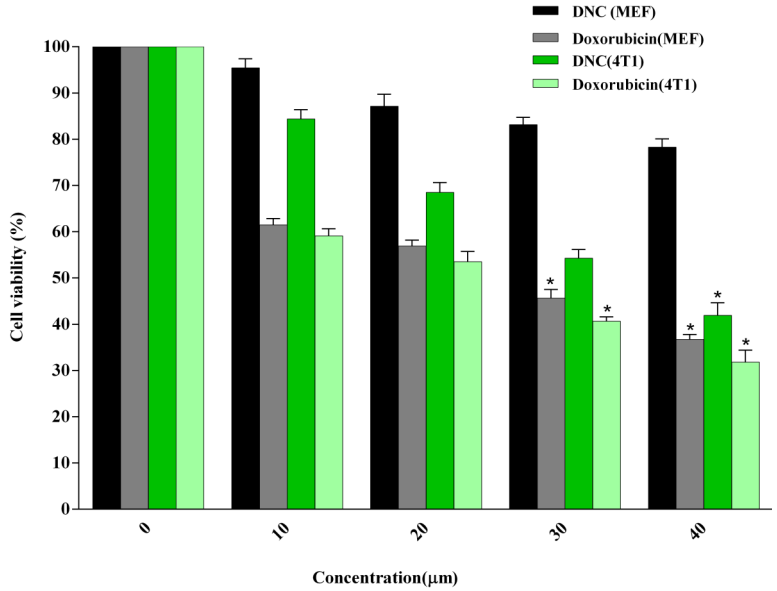


شکل۴: نتایج آزمون MTT سلول‌های فیبروبلاست نرمال موشی تیمار شده با نانوکورکومین دندروزومی، کورکومین و دندورزوم در بازه‌های زمانی ۲۴ (الف)، ۴۸ (ب)، ۷۲ ساعت (ج). نتایج در این بازه‌های زمانی نشان می‌دهد که با افزایش مدت‌زمان و غلظت تیمار نانوکورکومین دندروزومی بر سلول‌های نرمال تغییر معنی‌داری نمی‌گذارد ولی سمیت دوکسوروبیسین بر روی سلول‌های نرمال با افزایش مدت‌زمان و غلظت افزایش می‌یابد. مقایسه منحنی نانوکورکومین دندروزومی با کورکومین و ناقل (دندروزوم) نشان‌دهنده عدم سمی بودن ناقل می‌باشد.

به خاطر اثرات آنتی‌اکسیدانی و تاثیر آن بر روی آنزیم‌های سلولی، مهار مسیرهای ارسال سیگنال در سطوح مختلف، آنژیوژنز و چسبندگی سلول‌هاست [۱۸-۱۳].

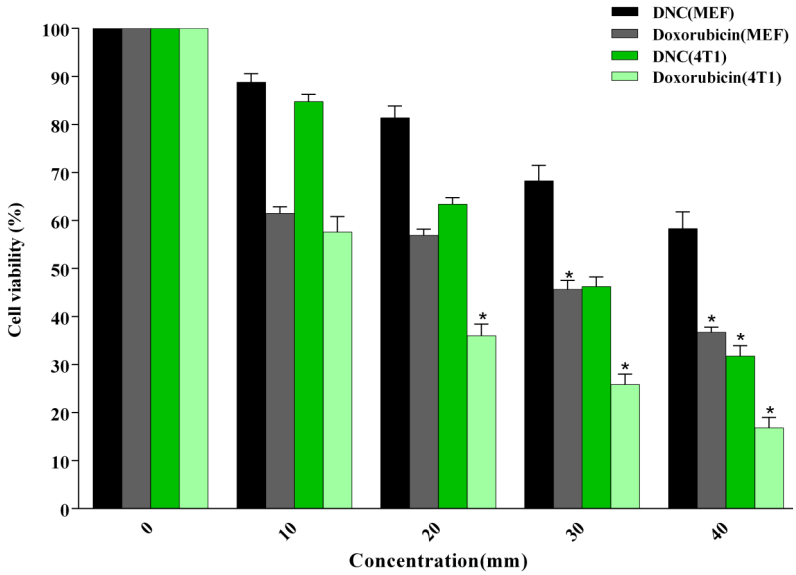
با توجه به تاثیر کورکومین بر روی نسخه برداری ژن ها و القای آپوپتوزیس به نظر می رسد که بتوان از آن در زمینه پیشگیری و شیمی‌درمانی سرطان استفاده نمود [۱۹]. از آنجاکه مشکل اصلی در استفاده از کورکومین، جذب و حذف سریع آن در بدن می‌باشد [۷]، روش های مختلفی برای افزایش کارایی و اثربخشی آن صورت گرفته که یکی از آن ها، ساخت حامل نانوپارتیکل مخصوص (دندروزوم) است [۸]. در یکی مطالعات گذشته که توسط بابایی و همکارانش در زمینه فعالیت ضد سرطانی نانوکورکومین صورت گرفت، برای اولین بار نشان داده شد که نانوکورکومین دندروزومی از

Journal of Police Medicine
Fall 2014; Vol. 3, No. 3: 183-192



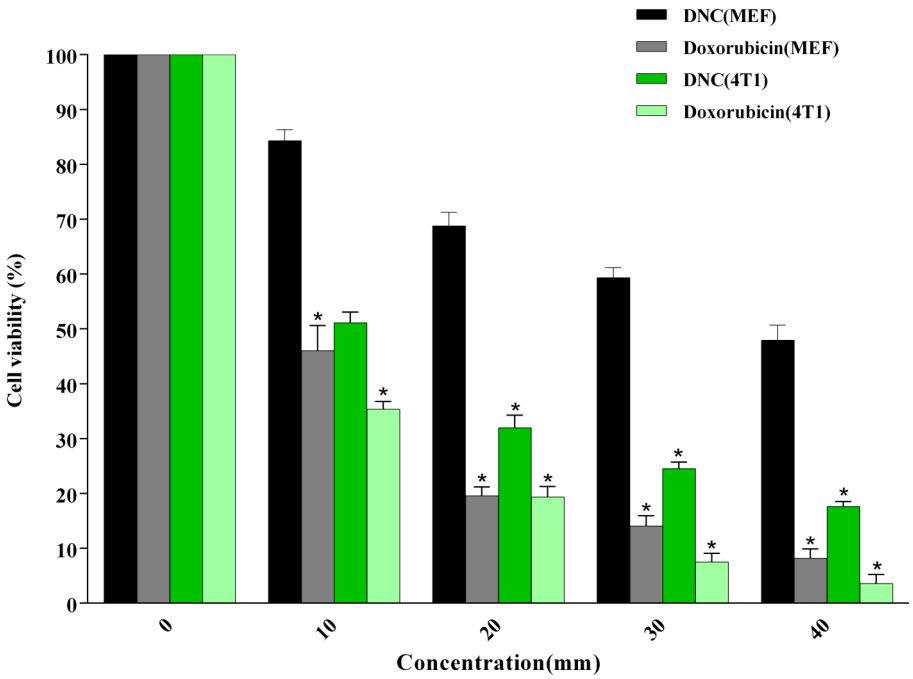
نمودار ۱: مقایسه نتایج آزمون MTT در گروه تست نانوکورکومین دندروزومی و گروه کنترل دوکسوروبیسین بر سلول‌های سرطانی 4T1 و سلول‌های نرمال فیبروبلاستی رده موشی MEF در بازه زمانی ۲۴ ساعت. نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان داد که DNC در غلظت ۳۵ μM به صورت معنی‌داری بر سلول‌های سرطانی 4T1 تاثیر می‌گذارد؛ درصورتی‌که در همین غلظت برای سلول‌های نرمال فیبروبلاستی رده موشی MEF سمی نیست. دوکسوروبیسین در غلظت‌های ۳۰ تا ۴۰ μM کاهش معنی‌داری بر سلول‌های سرطانی 4T1 و سلول‌های نرمال فیبروبلاستی رده موشی MEF نشان داد. * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میزان اختلاف ($p <$ ۰/۰۵) می‌باشد.

فرمولاسیونی امن با جذب سلولی بالا، اثرات ضد توموری قوی، پایداری بالا، قابلیت دستکاری منومورهای آن و سهولت تولید برخوردار است [۲۰]. در مطالعه حاضر که تاثیر نانوکورکومین دندروزومی بر رشد و تکثیر دو رده سلولی مورد بررسی قرار گرفت، بررسی توانایی زیستی سلول های سرطانی با استفاده از آزمون MTT نشان داد نانوکورکومین دندروزومی به شیوه‌ای وابسته به زمان و غلظت به‌صورت معناداری بر سلول‌های 4T1 اثر می‌گذارد، به‌طوری‌که با افزایش مدت‌زمان تیمار با نانوکورکومین و نیز بالا



نمودار۲: مقایسه نتایج آزمون MTT در گروه تست نانوکورکومین دندروزومی و گروه کنترل دوکسوروبیسین بر سلول‌های سرطانی 4T1 و سلول‌های نرمال فیبروبلاستی رده موشی MEF در بازه زمانی ۴۸ ساعت. نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان داد که DNC در غلظت ۲۵ تا ۴۰ μM به صورت معنی‌داری بر سلول‌های سرطانی 4T1 تاثیر می‌گذارد؛ درصورتی‌که در همین غلظت برای سلول‌های نرمال فیبروبلاستی رده موشی MEF سمی نیست. دوکسوروبیسین در غلظت‌های ۲۰ تا ۴۰ μM کاهش معناداری بر سلول‌های سرطانی 4T1 و سلول‌های نرمال فیبروبلاستی رده موشی MEF نشان داد. * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میزان اختلاف ($p <$ ۰/۰۵) می‌باشد.

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۳- دوره ۳- شماره ۳- صفحات ۱۹۲-۱۸۳



نمودار۳: مقایسه نتایج آزمون MTT در گروه تست نانوکورکومین دندروزومی و گروه کنترل دوکسوروبیسین بر سلول‌های سرطانی 4T1 و سلول‌های نرمال فیبروبلاستی رده موشی MEF در بازه زمانی ۷۲ ساعت. نتایج نشان داد که DNC در غلظت ۱۵ تا ۴۰ µM به‌صورت معناداری بر سلول‌های سرطانی 4T1 تاثیر می‌گذارد؛ درصورتی‌که در همین غلظت برای سلول‌های نرمال فیبروبلاستی رده موشی MEF سمی نیست. دوکسوروبیسین در غلظت‌های ۱۰ تا ۴۰ µM کاهش معنی‌داری بر سلول‌های سرطانی 4T1 و سلول‌های نرمال فیبروبلاستی رده موشی MEF نشان داد. نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان داد که نانوکورکومین دندروزومی به شیوه وابسته به زمان به صورت معنی‌داری بر سلول‌های سرطانی 4T1 تاثیر می‌گذارد، به‌طوری‌که با افزایش مدت‌زمان تیمار با DNC غلظت حد واسط کشنده مورداستفاده از این ترکیب به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد. * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن میزان اختلاف ($p<۰/۰۵$) می‌باشد.

رفتن غلظت مورداستفاده از این ترکیب، میزان رشد و بقای سلول‌های 4T1 به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌یابد (نمودار ۱ و ۲). بنابراین نانوکورکومین دندروزومی موجب کاهش چشمگیر توانایی زیستی سلول های سرطانی می شود. نتایج حاصل از تاثیر نانوکورکومین دندروزومی بر سلول های فیبروبلاست پوست نرمال MEF نشان داد که سلول های نرمال فیبروبلاست پوست نیز همانند سلول های سرطانی از نانوکورکومین دندروزومی تاثیر می‌پذیرند اما تاثیر کشنده دارو بر روی این سلول‌ها در غلظت‌های بالاتر یا بازه‌های زمانی بیشتر تیمار حادث می‌گردد (نمودار ۳). این امر مؤید این واقعیت است که در غلظت مهاری نانوکورکومین دندروزومی بر سلول‌های سرطانی، تاثیر کشنده بر سلول های غیر سرطانی وجود ندارد. این داده ها نشان می دهد که چنانچه نانوکورکومین دندروزومی در سطح کلینیکی استفاده شود، تاثیرات جانبی زیادی، سلول های نرمال را تهدید نخواهد کرد. در مطالعه حاضر هم‌چنین تاثیر دندروزوم و کورکومین آزاد نیز بر روی هر دو رده سلولی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن است که دندروزوم نه‌تنها تاثیری روی سلول‌های مورد آزمایش نشان نداده بلکه باعث افزایش رشد نسبی و تکثیر آن‌ها نیز می‌شود که تأییدی بر یافته‌های قبلی در این زمینه می‌باشد [۲۱]. با این‌حال دندروزوم در غلظت‌های بالاتر برای رده‌های سلولی نرمال و توموری 4T1 سمی بود. اثر سمیت سلولی نانوکورکومین دندروزومی بر روی رده سلولی متاستاتیک پستان دارای الگوی مشابه داروی دوکسوروبیسین بوده ولی سمیت کمتری بر روی سلول‌های نرمال در مقایسه با سمیت دوکسوروبیسین از خود نشان داد که می‌توان بر این اساس، در آینده از نانوکورکومین دندروزومی به‌جای دوکسوروبیسین در درمان سرطان استفاده نمود. مطالعات تکمیلی و شناخت مسیرهای سیگنالینگ جهت روشن شدن نقش این نانوذره در حال پی‌گیری و انجام می‌باشد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر با حمایت مالی و معنوی دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه گیلان انجام گرفته است که نویسندگان بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه‌های مذکور ابراز می‌دارند.

منابع

1. Yao ES, Zhang H, Chen YY, Lee B, Chew K,

Journal of Police Medicine
Fall 2014; Vol. 3, No. 3: 183-192

Moore D, et al. Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. Cancer Res 2007; 67: 659-64.
2. Spellman P, Gray J. A new treasure in the breast cancer gene hunt. Nat Med 2011; 17: 422-3.
3. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. Adv Exp Med Biol 2007; 595: 1-75.
4. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. Biochemical pharmacology 2006; 71: 1397-421.
5. Lin JK. Molecular targets of curcumin. Adv Exp Med Biol 2007; 595: 227-43.
6. Varalakshmi C, Ali AM, Pardhasaradhi BV, Srivastava RM, Singh S, Khar A. Immunomodulatory effects of curcumin: in-vivo. Int Immunopharmacol 2008; 8: 688-700.
7. Yang KY, Lin LC, Tseng TY, Wang SC, Tsai TH. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from Curcuma longa by LC-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2007; 853: 183-9.
8. Sar Bolouki MN, Sadeghizadeh M, Yaghoubi MM, Karami A, Lohrasbi T. Dendrosomes: a novel family of vehicles for transfection and therapy. J Chem Technol Biotechnol 2000; 75: 919-22.
9. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [et al] 2001; Chapter 20: Unit 20.2.
10. Tahmasebi Mirgani M, Isacchi B, Sadeghizadeh M, Marra F, Bilia AR, Mowla SJ, et al. Dendrosomal curcumin nanoformulation downregulates pluripotency genes via miR-145 activation in U87MG glioblastoma cells. Int J Nanomedicine 2014; 9: 403-17.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65: 55-63.
12. Kupcsik L. Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. Mammalian Cell Viability: Springer; 2011 13-9.
13. Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. Crit Rev Food Sci Nutr 2004; 44: 97-111.
14. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer 2005; 41: 1955-68.
15. Bengmark S. Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NFkappaB, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. JPEN J Parenter Enteral Nutr 2006; 30: 45-51.
16. Duvoix A, Morceau F, Delhalle S, Schmitz M, Schnekenburger M, Galteau MM, et al. Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1-1 inhibition. Biochem Pharmacol 2003; 66: 1475-83.
17. Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, et al. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. Cancer Lett 2005; 223: 181-90.
18. Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. AAPS J 2006; 8: E443-9.
19. Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Malone WA, Boone CW, et al. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. J Nutr 2000; 130: 467s-71s.
20. 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: 226-34.

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۳- دوره ۳- شماره ۳- صفحات ۱۹۲-۱۸۳