

بهبود پایداری و خواص ضد سرطانی نانو کیبوزوم‌های کورکومین پوشش داده شده با اودراژیت در برابر سلول‌های سرطانی کولورکتال HT-۲۹

مریم سالک نجات^۱، زهرا امام جمعه^{۲*} و غلامرضا عسگری^۳

۱ و ۲* - به ترتیب: دانشجوی دکتری تخصصی پردیس بین الملل ارس دانشگاه تهران، استاد و دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۱۱/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۷

چکیده:

نانو کیبوزوم‌ها مجموعه‌ای از ذرات لیپیدی هستند که می‌توان از آنها در فرایند تهیه نانو داروها استفاده کرد. در این پژوهش، ما به دنبال امکان‌سنجی تولید نانو کیبوزوم‌های کورکومین با پوشش روده‌ای و بررسی تأثیر درون پوشانی بر پروفایل رهایش و همچنین سمیت سلولی آن در شرایط آزمایشگاهی هستیم. در این مطالعه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کورکومین محصور شده و پروفایل رهایش آن در شرایط شبیه‌سازی شده گوارشی از طریق نانوحامل‌های پوشش داده شده ارزیابی شد. دو شکل آزاد و محصور شده در نانوحامل‌های پوشش داده شده روده برای تعیین اثر درون پوشانی بر پایداری آنتی‌اکسیدان‌ها مطالعه و اثر آنها بر زنده ماندن سلولی سلول‌های سرطانی روده بزرگ بررسی شد. تجزیه و تحلیل ویژگی‌ها، میانگین اندازه ذرات و اندازه پتانسیل زتا نانو کیبوزوم‌ها برابر با $53/54 \pm 9/17$ نانومتر و $-7/46 \pm 4/54$ میلی‌ولت گزارش شده است. نتایج تحقیق نشان داد که نانو کیبوزوم‌های حامل کورکومین می‌توانند میزان IC_{50} سمیت سلولی را $1/55$ برابر بیشتر از کورکومین آزاد پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون بهبود بخشند.

واژه‌های کلیدی: کورکومین، نانو کپسول، نانو کیبوزوم، دارورسانی خوراکی، سرطان روده بزرگ

مقدمه

زیستی کم آن در سلول‌های سرطانی می‌شود. تاکنون برای افزایش اثربخشی درمانی کورکومین تلاش‌های زیادی با روش‌های مختلف شده است (Suo *et al.*, 2017, Sahibzada *et al.*, 2018). برای مثال، سیستم‌های دارورسانی مبتنی بر نانو ذرات به یک رویکرد امیدوار کننده برای غلبه بر محدودیت‌های کورکومین تبدیل شده‌اند. بنابراین، محصور کردن فیزیکی کورکومین در داخل نانو ذرات می‌تواند انحلال پذیری آن را در آب و زیست‌سازگاری آن را نیز افزایش دهد و از تخریب آن جلوگیری و سرانجام زمان گردش آن در خون را طولانی کند. محصور کردن فیزیکی کورکومین می‌تواند تجمع آن را در بافت‌های تومور به علت افزایش نفوذپذیری آن افزایش دهد (Wang *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2018). در نتیجه، استفاده از نانو سامانه‌های مبتنی بر چربی‌ها برای دارورسانی کورکومین می‌تواند به منظور کاهش محدودیت‌های انتقال کورکومین به بافت سرطانی متمرکز به ثمر باشد (Radbeh *et al.*, 2020). از مهم‌ترین نانو حامل‌های بر پایه لیپید می‌توان به نانوامولسیون، نانولیپوزوم، نانوکویبوزوم، نانو ذرات چربی^۱ و حامل لیپیدی نانوساختار^۲ اشاره کرد. ساختار نانوکویبوزوم‌ها از مواد لیوتروپیک تشکیل شده‌است و در واقع کریستال‌های مایع مکعبی شکل هستند و برخلاف مایعات، ساختار منظم خود را حفظ می‌کنند. در سال‌های اخیر در زمینه پایداری کورکومین مطالعات متعددی شده و از انواع روش‌ها و حامل‌ها برای درون‌پوشانی این ترکیب استفاده شده است و درون‌پوشانی را روشی مناسب برای افزایش پایداری این ترکیبات گزارش کرده‌اند که باعث افزایش کاربرد ترکیبات زیست‌فعال در زمینه‌های غذایی، دارویی و آرایشی می‌گردد. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات حاصل از نانوکویبوزوم‌ها برای درون‌پوشانی ترکیبات زیست‌فعال نشان می‌دهد که این

سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در جهان است و شیوع آن در کشورهای توسعه یافته بیشتر است (Mansoori *et al.*, 2020). جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی از روش‌های رایج درمان سرطان روده بزرگ هستند (Zeinali *et al.*, 2020). با این حال، ویژگی‌های فارماکوکینتیکی ضعیف اکثر داروهای ضد سرطان و بروز عوارض جانبی محدودکننده دوز، اغلب منجر به شکست شیوه‌های درمانی می‌شوند (Abedi Gaballu *et al.*, 2021). زیان‌های شیمی‌درمانی با داروهای سیتوتوکسیک باعث افزایش میل جامعه به استفاده از داروهایی با پایه گیاهی و محصولات طبیعی در دنیای مدرن شده است (Efferth *et al.*, 2017). کورکومین ترکیب فنلی طبیعی است که در زردچوبه به وفور یافت می‌شود (Park *et al.*, 2016, Adiwidjaja *et al.*, 2017, Alibolandi *et al.*, 2018). کورکومین خواص مفیدی مانند اثر ضد سرطانی قوی و القای مؤثر مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) در سلول‌های سرطان‌های سینه، دهانه رحم و ملانوما دارد. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که این تأثیر ناشی از برهمکنش کورکومین با انواع مولکول‌ها است مانند: فاکتورهای رشد، آنزیم‌ها، پروتئین‌های حامل، یون‌های فلزی، سرکوب‌کننده‌های تومور، فاکتورهای رونویسی، انکوپروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک (Kujundžić *et al.*, 2019). علاوه بر این، سمیت کم آن نسبت به سلول‌ها و بافت‌های سالم توجه زیادی را در درمان سرطان به خود جلب کرده است (Banik *et al.*, 2017, Zhang *et al.*, 2018). با این حال، کاربرد بالینی کورکومین به دلیل انحلال‌پذیری کم آن در آب و ناپایداری بالای آن محدود شده است؛ این ویژگی‌ها منجر به فراهمی

بالاترین خلوص بودند. سلول‌های سرطانی کولورکتال انسانی (HT-۲۹) از انسیتیتو پاستور (تهران، ایران) خریداری گردید.

تهیه نانو کیبوزوم حاوی کورکومین

نانو کیبوزوم‌ها به روش ترکیبی هوموژنیزاسیون داغ با نیروی برشی بالا (Silent crusher M, Heidolph, Nuremberg, Germany) تهیه گردید. به این منظور، ابتدا گلیسرول مونو اولئات به عنوان فاز چربی و پلوکسامر ۴۰۷ به عنوان سورفکتانت فاز آبی در حمام آب گرم با دمای ۷۰ درجه سلسیوس به طور جداگانه حرارت داده شدند. پس از آن ۱۰ میلی گرم از کورکومین در ۱ میلی لیتر اتانول حل شد و محلول به دست آمده به ۲۰۰ میلی گرم گلیسرول مونو اولئات اضافه شد. سپس مخلوط به مدت یک دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ rpm در ۱۰ هوموژنیزه شد و ۱۰ میلی لیتر محلول پلوکسامر ۴۰۷ با غلظت ۷/۵ mg/ml، (هم‌دمای شده با دمای مخلوط لیپیدی) قطره قطره به فاز لیپید اضافه گردید و پس از اتمام آن به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ rpm تحت هوموژنیزاسیون قرار گرفت (Radbeh, Asefi et al. 2020).

پوشش‌دهی نانو کیبوزوم‌های حاوی کورکومین با پوشش رودهای

نانو کیبوزوم‌های حاوی کورکومین با محلول ادرائیت^۶ به روش Dip-coating پوشش‌دهی شدند و از محلول ۱/۵ درصد ادرائیت^۷ S۱۰۰ استفاده شد که با حل کردن پودر آن در ترکیب ۱:۱ استون و ایزوپروپیل الکل تهیه شده بود. به این منظور نانو کیبوزوم آماده شده قطره قطره به محلول پوشش‌دهی اضافه شد (Radbeh et al., 2020).

نانوحامل‌ها حامل‌های مناسبی برای درون‌پوشانی ترکیبات حساس هستند و باعث افزایش پایداری آنها در برابر شرایط مخرب محیطی در نگهداری از مواد غذایی می‌شوند. در زمینه پوشش‌دهی نانوحامل‌ها با روکش روده‌ای نیز مطالعاتی شده و این نوع پوشش را گزینه‌ای مناسب برای افزایش پایداری نانوحامل‌ها در شرایط اسیدی معده و بهبود جذب روده‌ای داروهای بارگیری شده گزارش کرده‌اند.

هدف از مطالعه حاضر، امکان‌سنجی درون‌پوشانی کورکومین با نانو کیبوزوم‌ها و پوشش‌دهی آن با روکش روده‌ای و همچنین بررسی پایداری، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و پروفایل رهاپس کنترل شده آنها در محیط‌های گوارشی شبیه سازی شده است؛ قابلیت مهاری آن در دو صورت آزاد و درون‌پوشانی شده بر سلول‌های سرطانی کولون نیز بررسی و مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

مواد

RPMI 1640، تریپسین 0.25 EDTA درصد، پنی‌سیلین-استرپتومایسین (۱۰۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین)، سرم جنین گاوی^۱ از شرکت Gibco خریداری شد. دی‌متیل سولفوکسید^۲، متانول، (۴-۵-دی‌متیل تیازول-۲-یل)-۲،۵-دی‌فنیل تترازولیو^۳ و α -دی‌فنیل- β -پیکریل هیدرازیل^۴، پپسین، پانکراتین، قرص‌های نمکی بافر فسفات^۵، Eudragit®S100، poloxamer®407 و اتانول ۹۶ درصد از شرکت سیگما الدریج خریداری شد. گلیسرول مونو اولئات از شرکت Gattefosse تهیه شد. سایر مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده در این مطالعه دارای

تعیین اندازه، پتانسیل زتا و مورفولوژی نانو کیبوزوم‌ها

برای تعیین اندازه ذرات، شاخص پراکندگی ذرات و پتانسیل زتا که از ویژگی‌های مهم هر سیستم کلوئیدی به حساب می‌آیند، از دستگاه اندازه‌گیری ذرات بر اساس پراکنش نور لیزر (Malvern، انگلستان) استفاده شد. نمونه‌ها قبل از قرارگیری در دستگاه با آب دی‌یونیزه ده برابر رقیق و میانگین اندازه ذرات بر مبنای قطر حجمی بیان گردید.

تعیین کارایی درون‌پوشانی

کارایی انکپسولاسیون درون‌پوشانی و میزان بارگذاری کورکومین با استفاده از رابطه‌های ۱ و ۲ به ترتیب محاسبه شد. برای اندازه‌گیری مقدار کورکومین کپسوله نشده، ۲ میلی‌لیتر از نانوفرمولاسیون آماده شده با ۲ میلی‌لیتر متانول مخلوط و با استفاده از فیلتر آمیکون به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰rpm فیلتر شد. میزان کورکومین بارگذاری نشده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری UV-VIS اندازه‌گیری شد (Mansoori *et al.*, 2020).

(۱)

$$\text{کارایی درون پوشانی (درصد)} = \frac{\text{میزان کورکومین درون پوشانی شده}}{\text{میزان کورکومین کل}} \times 100$$

(۲)

$$\text{میزان کورکومین بارگذاری شده (درصد)} = \frac{\text{میزان کورکومین بارگذاری شده}}{\text{وزن کل ذرات نانو}} \times 100$$

با چسب کربنی هادی الکتریکی دو طرفه پوشانده به سطح پایه چسبانده شد. کل سطح آنها با لایه‌ای بسیار نازک از طلا پوشش داده شده و برای آنالیز تصویر در دستگاه SEM با ولتاژ ۲۶ کیلو ولت قرار گرفت (Mahoutforoush *et al.*, 2021).

تعیین پایداری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (AOC) نمونه‌های کورکومین آزاد و درون‌پوشانی شده تحت شرایط استاندارد با استفاده از روش اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدانی DPPH ارزیابی شد. برای اندازه‌گیری پایداری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آزاد و درون‌پوشانی شده، ۳ تکرار از محلول‌های کورکومین آزاد و درون‌پوشانی شده با غلظت ۶۰ میکرو مولار تهیه و در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میزان توانایی مهار رادیکال‌های آزاد آنها بررسی و ارزیابی شد. بدین منظور در روزهای معین شده، به ۱۰۰ میکرولیتر از تیمارها ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول DPPH افزوده و پس از هم‌زدن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. تغییرات جذب بعد از انکوباسیون در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر نور مرئی خوانده شد و با قرار دادن مقادیر به دست آمده در رابطه ۳ درصد بازدارندگی DPPH به دست آمد (Zeinali *et al.*, 2021).

$$\text{بازدارندگی DPPH} = 100 \times \frac{\text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \quad (۳)$$

بررسی میزان رهایش کورکومین در محیط‌های شبیه‌سازی

شده معده و روده

برای بررسی رهایش کورکومین در محیط‌های شبیه‌سازی شده گوارشی، ابتدا دو محیط شبیه‌سازی شده معده با pH=۱/۲ و روده با pH=۷/۴ تهیه گردید. محیط معده متشکل از سدیم کلرید (۲ گرم بر لیتر)، هیدروکلریداسید ۳۷

بررسی با میکروسکوپ الکترونی روبشی

به منظور مطالعه ساختار و مورفولوژی نمونه‌های کیبوزومی، از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. ابتدا مقداری از نمونه روی ورق آلومینیمی خشک و نمونه

بررسی اثر سمیت با آزمون MTT

برای ارزیابی زنده‌مانی سلولی بعد از تیمار با کورکومین آزاد و کورکومین نانو فرموله‌شده، از روش ارزیابی MTT استفاده شد. این آزمون که یک روش رنگ‌سنجی است بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی "۳- (۴) و ۵ دی متیل تیاژول-۲ (ایل) - ۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم برماید" به وسیله آنزیم سوکسینات‌دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های بنفش رنگ انحلال‌ناپذیر اجرا می‌شود. تعداد 1.5×10^4 سلول از سلول‌های HT-۲۹ در داخل هر یک از خان‌های پلیت ۹۶ چاهک کشت داده شدند. سلول‌ها با غلظت ۵ تا ۶۰ میکرومولار از کورکومین آزاد و کورکومین نانو فرموله‌شده تیمار شدند. چهل و هشت ساعت بعد از تیمار، محیط کشت هر یک از پلیت‌ها با ۱۵۰ میکرولیتر محیط تازه حاوی ۵۰ میکرولیتر از محلول MTT ۲ mg/ml جایگزین شدند، بعد از ۴ ساعت انکوباسیون محیط انکوبه شده با ۲۰۰ میکرولیتر DMSO جایگزین شد. طی زمان انکوباسیون MTT توسط سیستم سوکسینات‌دهیدروژناز احیا می‌شود که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری است. احیا و شکسته شدن این حلقه موجب تولید کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان می‌شود که در زیر میکروسکوپ به راحتی قابل تشخیص هستند. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی رابطه مستقیم دارد که از نظر متابولیک فعال هستند. کریستال‌های فورمازان در آب انحلال‌ناپذیرند و باید پیش از رنگ‌سنجی توسط ماده حلالی مانند دی‌متیل‌سولفوکسید به حالت محلول درآیند. میزان جذب نمونه هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با TCAN الیزا ریدر اندازه‌گیری و IC_{50} سمیت سلولی محاسبه شد (Radbeh et al., 2020).

درصد (۰/۰۰۸ لیتر بر لیتر) و آنزیم پیسین (۳/۲ گرم بر لیتر) و محیط روده نیز حاوی سدیم هیدروکسید (۰/۸۹۶ گرم بر لیتر)، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (۶/۸ گرم بر لیتر)، پانکراتین (۴/۷۶ گرم بر لیتر) و نمک صفراوی (۵/۱۶ گرم بر لیتر) بود. برای اندازه‌گیری میزان رهائش کورکومین از فرمولاسیون نانوکیوبوزوم، از روش دیالیز استفاده شد. چهار میلی‌لیتر محلول کورکومین درون‌پوشانی شده در ساختار نانوکیوبوزوم با ۴ میلی‌لیتر PBS با pH برابر ۷/۴ رقیق شد و در کیسه‌های دیالیز (۲۰۰۰۰ kDMWCO) قرار داده شدند و در داخل ۵۰ میلی‌لیتر از محیط‌های شبیه‌سازی شده معده و روده غوطه‌ور شدند. دمای رهائش در سیستم شبیه‌سازی شده $in vitro$ ۳۷ درجه سلسیوس و سرعت هم‌زدن ۳۰۰ rpm تنظیم شد. طی آزمایش در زمان‌های مختلف ۰، ۰.۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۱ میلی‌لیتر نمونه‌گیری شد و ۱ میلی‌لیتر محیط تازه اضافه شد. میزان کورکومین آزاد شده از دیالیز با اسپکتروفتومتری UV-VIS اندازه‌گیری شد (Radbeh et al., 2020).

بررسی‌های سلولی روی سلول‌های سرطانی کولورکتال متاستاتیک HT-۲۹

کشت سلولی

سلول‌های سرطانی کولورکتال انسانی (HT-۲۹) از انستیتو پاستور (تهران، ایران) خریداری گردید. سلول‌ها در RPMI ۱۶۴۰ محیط حاوی ۱۰ درصد سرم نگهداری و دمای انکوباسیون کشت سلول ۳۷ درجه سلسیوس با ۵ درصد CO_2 بود. سلول‌ها بعد از ۴۸ ساعت از انکوباسیون با جمعیت اولیه 4×10^4 سلول در میلی‌لیتر مجدد کشت داده شدند. در همه آزمایش‌ها از سلول‌هایی استفاده شد که در فاز لگاریتمی رشد بودند.

آنالیز آماری

غذاهای فراسودمند می‌توانند خواسته‌ها را تأمین کنند و نقش حیاتی در زندگی بهتر ایفا کنند.

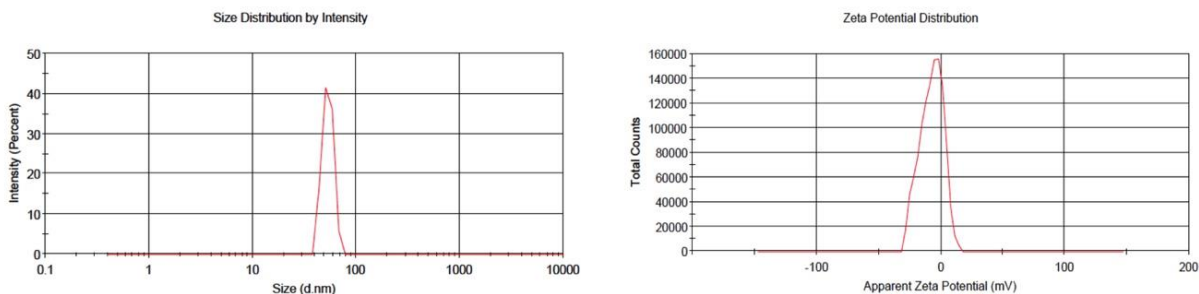
تهیه و تعیین خصوصیات نانوکیبوزوم‌های حامل کورکومین

در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که ترکیبات زیست فعال طبیعی دارای ویژگی‌های ضد سرطانی کولورکتال هستند. در این مطالعه با موفقیت نانوکیبوزوم‌های بارگذاری شده با کورکومین برای تقویت فعالیت‌های ضد سرطانی آنها در شرایط آزمایشگاهی آماده شد. همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، متوسط اندازه ذرات و بار سطحی ذرات به ترتیب $53/54$ نانومتر و $-7/46$ mV است. همچنین نتایج مربوط به PDI عدد $0/203$ را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج تجزیه و تحلیل ویژگی‌ها، اندازه ذرات یک PSD باریک (توزیع اندازه ذرات) را گزارش می‌کند که با مطالعه PDI شناسایی می‌شود. با توجه به تصویربرداری SEM از نانوذرات کیبوزوم، نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل DLS پشتیبانی شد (شکل ۲). نتایج بررسی‌ها نشان داد که روش آماده‌سازی پیشنهاد شده در این تحقیق، به اندازه ذرات باریک و توزیع همگن ذرات نانوذرات دست می‌یابد؛ طبق یافته‌های سالم و همکاران (Salem et al., 2018)، نتیجه‌گیری تحقیق حاضر تأیید شد.

با استفاده از نرم‌افزار گراف پد، آزمون‌های آماری بر اساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. نتایج به دست آمده بر حسب میانگین با انحراف از معیار ($\pm SD$) بیان شد. برای تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و دوطرفه ANOVA و آزمون مقایسه میانگین چندگانه دانت در سطح ۵ درصد استفاده شد (Prism, version 9.0, GraphPad software, INC).

نتایج و بحث

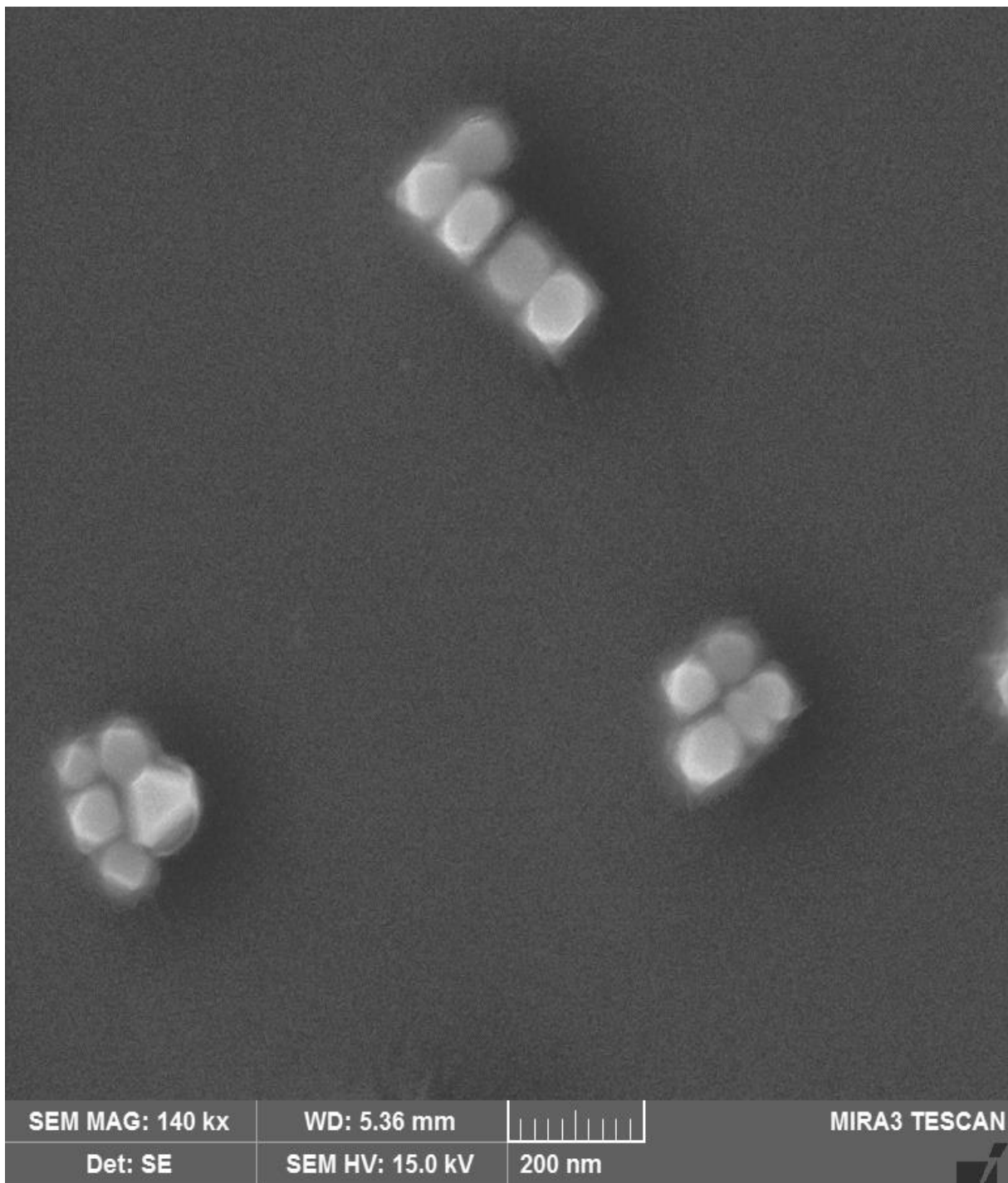
در قرن بیست و یک غذا فراتر از تأمین‌کننده مواد مغذی مطرح است؛ غذا موادی شناخته می‌شوند که ضمن تأمین مواد مورد نیاز بدن، فواید سلامتی بخش در زمینه کاهش خطر بیماری‌ها و همین‌طور در زمینه پوست و زیبایی داشته باشند. به همین دلیل غذاهای فراسودمند مورد تقاضای مشتریان قرار گرفته است. در سال‌های گذشته، به دلیل افزایش غذاهای فوری و غذاهایی با کالری بالا و مواد مغذی پایین، نداشتن تحرک فیزیکی، و پرداختن به بازی‌های نشسته، باعث بروز بیماری‌های مربوط به سبک زندگی از جمله چاقی، دیابت و فشار خون بالا از سنین پایین در حد هشدار شده است.



شکل ۱. نشان‌دهنده نتایج به دست آمده از دستگاه DLS، بیانگر اندازه ذرات و بار سطحی نانوکیبوزوم‌های تهیه شده

Figure 1 Represents a) mean size of the CUC-NCs, b) zeta Potential of the CUC-NCs. CUC Curcumin, and NC; Nanao Cubosomes. CUC Curcumin, and NC; Nanao Cubosomes.

بهبود پایداری و خواص ضد سرطانی نانو کیبوزوم‌های کورکومین پوشش داده شده با...



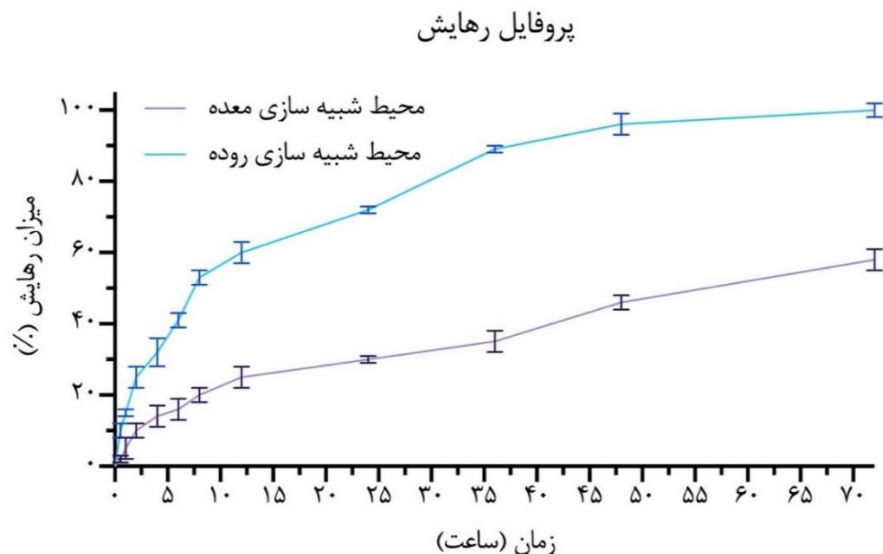
شکل ۲. نشان‌دهنده تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی از مورفولوژی ذرات نانو ذرات کیبوزومی تهیه شده

Figure 2. represents SEM imaging of the CUC-NCs. CUC Curcumin, and NC; Nanao Cubosomes

نگاهی دقیق‌تر به نتایج به‌دست‌آمده پس از ۱ ساعت از شروع آزمایش، ۱۵ درصد کورکومین در محیط شبیه‌سازی شده روده و یک سوم این میزان از کورکومین در محیط شبیه‌سازی شده معده آزاد شد. پس از گذشت ۸ ساعت از شروع فرایند (برابر حداکثر زمانی که غذا می‌تواند در معده باقی بماند) میزان رهایش فقط ۲۰ درصد بود. در ادامه آزمایش نتایج به دست آمده نشان داد که طی ۷۲ ساعت حداکثر میزان ۵۸ درصد از کورکومین می‌تواند در شرایط شبیه‌سازی شده معده رهایش داشته باشد. حداکثر زمانی که غذا می‌تواند در روده حضور داشته باشد در حدود ۳۶ ساعت است. نتایج رهایش به‌دست‌آمده از این مطالعه پس از ۳۶ ساعت نشان داد که در حدود ۸۹ درصد از کورکومین در محیط شبیه‌سازی شده روده آزاد شده‌است. بر اساس این یافته‌ها، میانگین حجم کورکومین آزاد شده از نانو کیبوزوم‌های پوشش داده شده ادراژیت در محیط شبیه‌سازی شده روده، ۲۷/۶۶ درصد بیشتر است تا دراز محیط شبیه‌سازی شده معده. در نتیجه، استفاده از ادراژیت S ۱۰۰ برای اصلاح سطح نانو حامل‌ها و افزایش انتشار کورکومین در محیط روده و در عین حال کاهش آن در محیط اسیدی می‌تواند مؤثر باشد (شکل ۳). در پژوهش‌های رادبه و همکاران (Radbeh et al., 2020) نشان داده شد که پوشش ادراژیت می‌تواند به صورت مؤثری میزان رهایش مواد زیست فعال عصاره زغال‌اخته را در شرایط مشابه با این پژوهش کنترل کند. نتایج به دست آمده از این تحقیق هم‌راستاست با نتایج با نتایج به دست آمده از تحقیقات آن محققان.

تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که ذرات با قطر کمتر از ۱۰۰ نانومتر بهترین نفوذ سلولی را دارند [۱۷]. نانوکیبوزوم‌های کورکومین تهیه شده دارای اندازه زیر ۱۰۰ نانومتر بودند و فعالیت سمیت سلولی بالاتر آنها را می‌توان به این دلیل توجیه کرد. تحقیقات نشان داد که بار سطحی نانو ذرات عامل مهمی است که بر پایداری ذرات نانو تأثیر می‌گذارد. طبق تحقیقات ژیلت و همکاران (Gillet et al., 2011)، نانو ذرات کوچک‌تر مقادیر بار سطحی بالاتری داشتند و بنابراین پایداری بودند. با وجود مزایای بار سطحی منفی، برهمکنش با سطوح بیولوژیکی با کاهش بار سطحی به مقدار کمتر افزایش می‌یابد. شاخص‌های کارایی درون‌پوشانی و میزان کورکومین بارگیری شده در فرمولاسیون نانوکیبوزوم تهیه شده به ترتیب $12/11 \pm 5/12$ و $25/25 \pm 4/25$ درصد بود. در پژوهش عابدی و همکاران (Abedi Gaballu, et al. 2021) داروی اربوتنوب توسط نانو ساختارهای لیپیدی درون‌پوشانی شد، نتایج تحقیقات آنها نشان داد که در نمونه بهینه ۸۷ درصد از دارو درون نانو ساختارها بارگیری شده است. مقایسه نتایج به دست آمده از پژوهش‌های آنها با نتایج این بررسی‌ها نشان داد در میزان بارگیری حداکثر دارو درون نانو کیبوزوم‌ها و نانو ساختارهای لیپیدی تفاوت چشمگیری نیست.

مشخصات رهایش هسته یکی از شاخص‌های مهم نانو فرمولاسیون‌ها است. در پژوهش حاضر، هدف طراحی سیستم رهایش کنترل شده برای محافظت از کورکومین در برابر شرایط گوارشی معده و انتقال آن به محیط روده با کمترین میزان رهایش بود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، پوشش روده‌ای بر پایه ادراژیت می‌تواند به طور مؤثر میزان رهاسازی کورکومین را در محیط شبیه‌سازی شده معده کاهش دهد. با



شکل ۳. بیانگر پروفایل رهائش کورکومین نانو فرموله شده در محیط‌های شبیه سازی شده روده‌ای و معده

Figure 3. Represents CUC release from the eudragit S100 coated NCs in simulated bowel and stomach environments. CUC Curcumin, and NC; Nanao Cubosomes

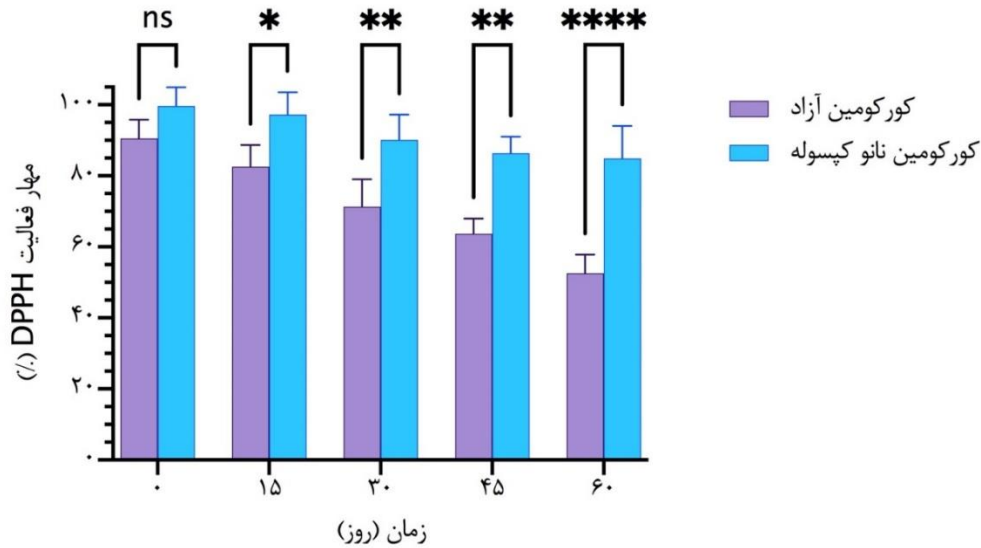
دست داده بود. اما برای نانو فرمولاسیون‌ها این میزان ۱۵ درصد بود (شکل ۴). در پژوهشی توسط رادبه و همکاران (Radbeh, 2020) نشان داده شد که بارگذاری عصاره زغال‌اخته درون نانو کیبوزوم‌ها می‌تواند منجر به افزایش قابل توجه پایداری زمانی ترکیبات فنلی و خواص آنتی‌اکسیدانی آن شود. نتایج تحقیقات ما نیز با نتایج تحقیقات این محققان هم‌راستا است. زینالی و همکاران (Zeinali et al., 2021)

در پژوهشی نشان دادند که بارگیری گاما اوریزانول درون نانو لیپوزوم‌ها می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن را در مدت یک سال از نگهداری به صورت چشمگیری حفظ کند. با بررسی کلی نتایج می‌توان گفت که درون پوشانی مواد حساس آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به طور چشمگیری نیمه عمر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها را افزایش دهد، بنابراین از درون‌پوشانی می‌توان به عنوان روشی مؤثر در حفظ ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی مواد استفاده کرد.

سنجش پایداری آنتی‌اکسیدانی سیستم نانو کیبوزومی

در این مطالعه، تأثیر درون‌پوشانی کورکومین در میزان پایداری آنتی‌اکسیدانی آن بررسی شده است. بدین منظور فعالیت آنتی‌اکسیدانی کورکومین آزاد و کورکومین نانو فرموله هر ۱۵ روز به مدت دو ماه اندازه‌گیری شد تا تأثیر درون‌پوشانی در حفظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی کورکومین بررسی شود. یافته‌ها نشان داد که کورکومین آزاد ۱۹ درصد از فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را پس از ۱۵ روز نگهداری از دست می‌دهد، اما این کاهش برای کورکومین نانو فرموله تنها ۵ درصد است؛ همچنین پس از ۳۰ روز نگهداری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کورکومین به میزان معنی‌داری کاهش می‌یابد (حدود ۲۴ درصد)، اما تنها ۸ درصد از فعالیت آنتی‌اکسیدانی کورکومین نانو فرموله شده کاهش نشان می‌دهد. پس از ۶۰ روز، نمونه آزاد ۴۲ درصد از عملکرد آنتی‌اکسیدانی خود را از

پایداری آنتی اکسیدانی انبارش



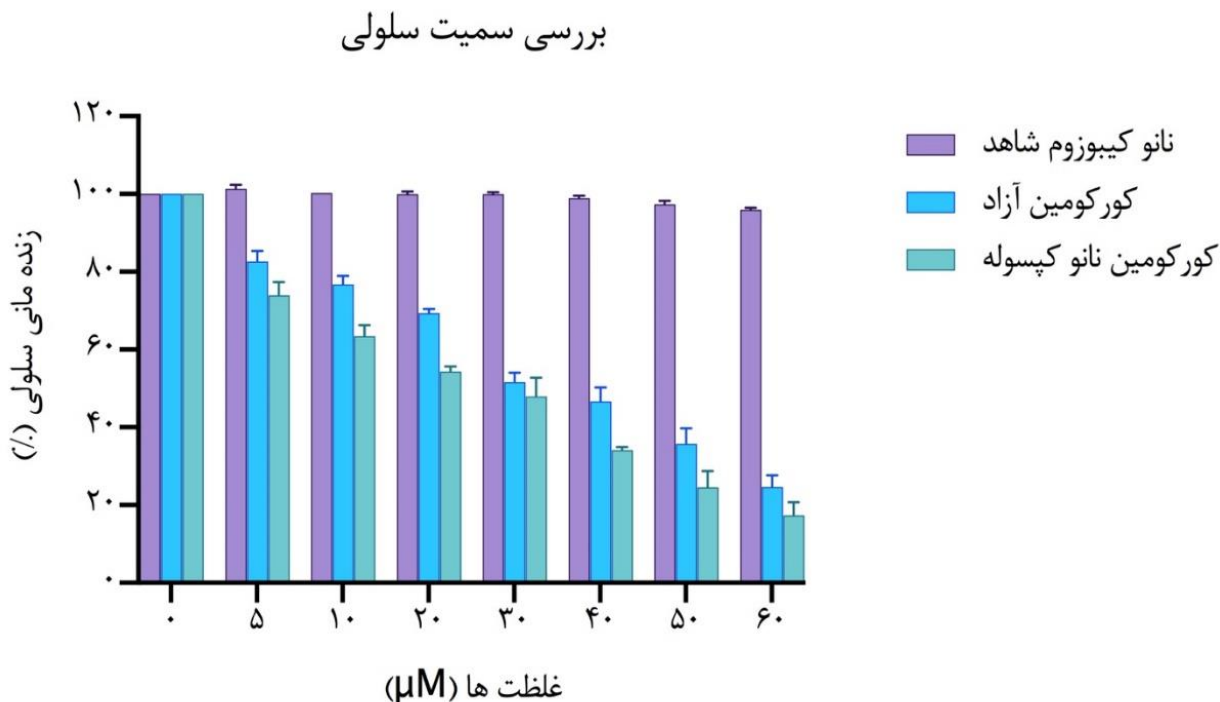
شکل ۴. بررسی پایداری آنتی اکسیدانی کورکومین آزاد و نانو فرموله شده در مدت نگهداری ۶۰ روزه

Figure 4. Showing the antioxidant storage stability of CUC and CUC-NCs in the refrigerator (4–8 °C temperature) during 60 days of storage. CUC Curcumin, and NC; Nanao Cubosomes.

و تأکیدی باشد بر اثر نفوذ بهتر نانو ذرات مخصوصاً ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر به درون سلول. در مطالعه‌ای توسط زینالی و همکاران (Zeinali, et al. 2020) نشان داده شد که بارگذاری گاما اوریزانول درون نانو اتوزومها می‌تواند منجر به افزایش سمیت سلولی به صورت معنی‌داری شود. این نتیجه‌گیری با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق همخوانی دارد. در مطالعه‌ای توسط ماهوت فروش و همکاران (Mahoutforoush et al., 2021) نشان داده شد که با درون‌پوشانی داروی دوسه تاکسل می‌توان میزان سمیت سلولی آن را در حدود دو برابر، در مقایسه با فرم آزاد آن، افزایش داد. با بررسی کلی نتایج سمیت سلولی می‌توان گفت که استفاده از درون‌پوشانی می‌تواند به‌صورت مؤثری میزان ورود و تجمع دارو را درون سلول‌ها افزایش و در نتیجه میزان کارایی دارو را افزایش دهد.

اندازه‌گیری سمیت سلولی در شرایط آزمایشگاهی

تکثیر سلولی جزء حیاتی رشد، نمو و بازسازی موجودات یوکاریوتی است ضمن اینکه این دلیل اصلی برخی از بیماری‌های ناتوان‌کننده مانند سرطان نیز هست. در این پژوهش، سنجش تکثیر سلولی به روش MTT برای ارزیابی اثرهای نانوکیوبوزوم‌های بارگذاری شده با کورکومین و کورکومین آزاد بر زنده‌مانی رده‌های سلولی کارسینوم کولون HT-29 انسانی اجرا شد. کورکومین آزاد و نانو فرموله پس از ۴۸ ساعت کاهش قابل توجهی در زنده ماندن سلول نشان دادند (شکل ۵). شکل ۵ نشان می‌دهد که کورکومین آزاد در غلظت ۳۱ میکرومولار کورکومین نانو فرموله در غلظت ۲۰ میکرومولار توانستند زنده‌مانی سلولی را تا ۵۰ درصد در ۴۸ ساعت کاهش دهند؛ این نتایج ممکن است به دلیل نفوذ سلولی بهتر عصاره نانو فرموله شده، در مقایسه با عصاره آزاد،



شکل ۵. بررسی سمیت سلولی کورکومین آزاد و نانو فرموله شده به روش MTT assay

Figure 5. Represents the in-vitro cellular cytotoxicity of the CUC and CUC-NCs against HT-29 cancer cells over 48 h. CUC Curcumin, and NC; Nanao Cubosome

نتیجه‌گیری

کند. مطالعات *invitro* بیانگر این نکته هستند که درون‌پوشانی کورکومین میزان سمیت سلولی را افزایش می‌دهد و به تبع آن سیستم کورکومین نانو فرموله شده می‌تواند به‌طور مؤثر رشد سلول‌های سرطان کولورکتال را مهار کند. فرمولاسیون جدید تهیه شده را می‌توان به عنوان یک ترکیب جدید برای غنی‌سازی غذاها و تهیه غذاهای فراسودمند و کمپرونتیو^۱ پیشنهاد داد.

این مطالعه نشان داد که سیستم دارورسانی مبتنی بر نانوکیبوزوم‌ها می‌تواند به‌طور مؤثری از کورکومین در برابر شرایط محیطی ناشی از انبارش طولانی مدت حفاظت کند و همچنین پوشش مبتنی بر ادراژیت می‌تواند به‌طور مؤثری پروفایل رهایش کورکومین را در شرایط شبیه‌سازی معده کاهش دهد و از آن در برابر شرایط اسیدی معده محافظت

تعارض منافع

نویسندگان در خصوص مقاله ارائه شده به طور کامل از سوء اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند و منافعی تجاری در این راستا وجود ندارد.

مراجع

- Abedi Gaballu, F., W. C.-S. Cho, G. Dehghan, A. Zarebkohan, B. Baradaran, B. Mansoori, S. Abbaspour-Ravasjani, A. Mohammadi, N. Sheibani, A. Aghanejad and J. Ezzati Nazhad Dolatabadi. 2021. Silencing of HMGA2 by siRNA loaded methotrexate functionalized polyamidoamine dendrimer for human breast cancer cell therapy. *Genes*. 12(7): 1102.
- Adiwidjaja, J., A. J. McLachlan and A. V. Boddy. 2017. Curcumin as a clinically-promising anti-cancer agent: pharmacokinetics and drug interactions. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 13(9): 953-972.
- Alibolandi, M., F. Hoseini, M. Mohammadi, P. Ramezani, E. Einafshar, S. M. Taghdisi, M. Ramezani and K. Abnous. 2018. Curcumin-entrapped MUC-1 aptamer targeted dendrimer-gold hybrid nanostructure as a theranostic system for colon adenocarcinoma. *International Journal of Pharmaceutics*. 549(1-2): 67-75.
- Banik, U., S. Parasuraman, A. K. Adhikary and N. H. Othman. 2017. Curcumin: The spicy modulator of breast carcinogenesis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 36(1):1-16.
- Efferth, T., M. E. M. Saeed, E. Mirghani, A. Alim, Z. Yassin, E. Saeed, H. E. Khalid and S. Daak 2017. Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. *Oncotarget* 8(30): 50284-50304.
- Gaballu, F. A., S. Abbaspour-Ravasjani, B. Mansoori, R. Yekta, H. Hamishehkar, A. Mohammadi, G. Dehghan, B. Shokouhi, S. G. Dehbokri and B. Baradaran 2019. Comparative of in-vitro evaluation between erlotinib loaded nanostructured lipid carriers and liposomes against A549 lung cancer cell line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 18(3): 1168-1179.
- Gillet, A., P. Compère, F. Lecomte, P. Hubert, E. Ducat, B. Evrard and G. Piel (2011). Liposome surface charge influence on skin penetration behaviour. *International Journal of Pharmaceutics*. 411(1-2): 223-231.
- Kujundžić, R. N., V. Stepanić, L. Milković, A. Č. Gašparović, M. Tomljanović and K. G. Trošelj 2019. Curcumin and its potential for systemic targeting of inflamm-aging and metabolic reprogramming in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(5):1180.
- Mahoutforoush, A., A. Solouk, H. Hamishehkar, M. Haghbin Nazarpak and S. Abbaspour-Ravasjani 2021. Novel decorated nanostructured lipid carrier for simultaneous active targeting of three anti-cancer agents. *Life Sciences*. 279, 119576.
- Mansoori, B., A. Mohammadi, F. Abedi-Gaballu, S. Abbaspour, M. Ghasabi, R. Yekta, S. Shirjang, G. Dehghan, M. R. Hamblin and B. Baradaran. 2020. Hyaluronic acid-decorated liposomal nanoparticles for targeted delivery of 5-fluorouracil into HT-29 colorectal cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*. 235(10): 6817-6830.
- Park, B. H., J. E. Lim, H. G. Jeon, S. I. Seo, H. M. Lee, H. Y. Choi, S. S. Jeon and B. C. Jeong 2016. Curcumin potentiates antitumor activity of cisplatin in bladder cancer cell lines via ROS-mediated activation of ERK1/2. *Oncotarget*. 7(39): 63870-63886.
- Radbeh, Z., N. Asefi, H. Hamishehkar, L. Roufegarinejad and A. Pezeshki (2020). Novel carriers ensuring enhanced anti-cancer activity of Cornus mas (Cornelian cherry) bioactive compounds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 125, 109906.
- Sahibzada, M. U. K., A. Sadiq, H. Sfaidah, M. Khurram, M. U. Amin, A. Haseeb and M. Kakar 2018. Berberine nanoparticles with enhanced in vitro bioavailability: Characterization and antimicrobial activity. *Drug Design, Development and Therapy*. 12, 303-312.

- Salem, D. S., M. A. Sliem, M. El-Sesy, S. A. Shouman and Y. Badr. 2018. Improved chemo-photothermal therapy of hepatocellular carcinoma using chitosan-coated gold nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 182, 92-99.
- Suo, A., J. Qian, M. Xu, W. Xu, Y. Zhang and Y. Yao. 2017. Folate-decorated PEGylated triblock copolymer as a pH/reduction dual-responsive nanovehicle for targeted intracellular co-delivery of doxorubicin and Bcl-2 siRNA. *Materials Science and Engineering. C*, 76, 659-672.
- Wang, L., X. Xu, Y. Zhang, Y. Zhang, Y. Zhu, J. Shi, Y. Sun and Q. Huang. 2013. Encapsulation of curcumin within poly(amidoamine) dendrimers for delivery to cancer cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 24(9): 2137-2144.
- Zeinali, M., S. Abbaspour-Ravasjani, M. Ghorbani, A. Babazadeh, T. Soltanfam, A. C. Santos, H. Hamishehkar and M. R. Hamblin. 2020. Nanovehicles for co-delivery of anticancer agents. *Drug Discov. Today*. 25(8): 1416-1430.
- Zeinali, M., S. Abbaspour-Ravasjani, T. Soltanfam, A. C. Paiva-Santos, H. Babaei, F. Veiga and H. Hamishehkar. 2021. Prevention of UV-induced skin cancer in mice by gamma oryzanol-loaded nanoethosomes. *Life Sciences*. 283, 119759.
- Zhang, H., Y. Zhang, Y. Chen, Y. Zhang, Y. Wang, Y. Zhang, L. Song, B. Jiang, G. Su, Y. Li and Z. Hou. 2018. Glutathione-responsive self-delivery nanoparticles assembled by curcumin dimer for enhanced intracellular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 549(1-2): 230-238.



Original Research

Improving the Stability and Anti-Cancer Properties of Curcumin Loaded Eudragit Coated Cubosomes Against HT-29 Colorectal Cancer Cells

Maryam Salek Najat, Zahra Emam-Djomeh*, Gholamreza Askari

*** Corresponding Author:** Professor Zahra Emam-Djomeh, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: emamj@ut.ac.ir
Received: 29 January 2022 Accepted: 8 July 2022
[http://doi: 10.22092/FOODER.2022.357636.1327](http://doi:10.22092/FOODER.2022.357636.1327)

Abstract

Nanocubosomes are a collection of lipid particles that can be used in the preparation of nanoparticles. In this study, we seek to investigate the feasibility of producing curcumin nanocubosomes by intestinal lining and to investigate the effect of encapsulation on release profile and in vitro cell cytotoxicity. In this study, the antioxidant activity of encapsulated curcumin and its release profile in simulated gastrointestinal conditions through coated nanocarriers were evaluated. Two free and encapsulated forms in coated intestinal nanocarriers were studied to determine the effect of encapsulation on antioxidant stability. Then their effects on the cell viability of colon cancer cells were investigated. Character analysis reported that the mean particle size and zeta potential value of the nanocubosomes were 53.54 ± 9.17 nm and -7.46 ± 4.54 mV. The results showed that nanocubosomes carrying curcumin could improve IC₅₀ cytotoxicity by 1.55 times higher than free curcumin after 48 hours of incubation.

Keywords: Curcumin, Nanocapsules, Nanocubosomes, Oral drug delivery, Colon cancer