بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم زیستی

رساله دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته نانوبیوتکنولوژی

عنوان:

طراحی و استفاده از برخی نانو حاملهای شاخه دار در بهبود خواص ضد سرطانی کورکومین گیاه زردچوبه(*Curcuma longa*)

وحید عرفانی مقدم

استاد راهنما:

دکتر مجید صادقی زاده

دکتر علیرضا نعمانی

استاد مشاور:

دکتر یعقوب یزدانی

ماه و سال دانش آموختگی(دفاع)

خرداد ۱۳۹۳

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای وحید عرفانی مقدم دانشجوی مقطع دکتری رشته نانو بیوتکنولوژی به شماره دانشجویی۸۸۵۱۱۲۲۰۰۲ رساله واحدی خود را با عنوان " **بررسی استفاده از برخی حاملهای نانوی شاخه دار در بهبود خواص ضدسرطانی کورکومین گیاه زردچوبه (Curcuma longa)** درتاریخ ۹۳/۳/۲۱روز چهارشنبه ساعت ۱۰ دراتاق ۵۰۰۹ دانشکده علوم زیستی ارائه کردند .

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبهٔ علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	آقای دکتر مجید صادقی زاده	استاد	
۲ -استادراهنمای دوم	آقای دکتر علیرضا نعمانی	استادیار	
۳- استاد مشاور	آقای دکتر یعقوب یزدانی	استادیار	غایب
۴-استاد ناظرداخلی	آقای دکتر حسین نادری منش	استا د	
۵-استاد ناظر داخلی	خانم دکتر مریم نیکخواه	استادیار	
۶-استاد ناظر خارجی	خانم دکتر فاطمه رهبری زاده	دانشیار	
۷-استاد ناظر خارجی	آقای دکتر فرامرز مهرنژاد	استادیار	
۸- نماینده تحصیلات تکمیلی	خانم دکتر مریم نیکخواه	استادیار	

طراحی و استفاده از برخی ناقل های شاخه دار به منظور بهبود خواص ضد سرطانی کورکومین

تهیه زردچوبه (curcuma longa)

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **وحید عرفانی مقدم** دانشجوی رشته **نانوبیوتکنولوژی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۸** مقطع دکتری دانشکده **علوم زیستی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:

تاریخ:

۲۷ مرداد ۱۳۹۳

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته **نانوبیوتکنولوژی** است که در سال ۱۳۸۸ در دانشکده **علوم زیستی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر **مجید صادقی زاده** ، جناب آقای دکتر**علیرضا نعمانی** و مشاوره جناب آقای دکتر **یعقوب یزدانی** از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

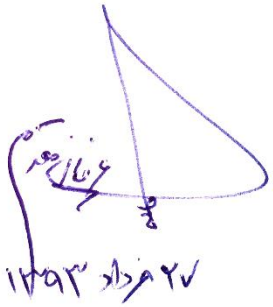
ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب **وحید عرفانی مقدم** دانشجوی رشته **نانوبیوتکنولوژی** مقطع **دکتری** تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: وحید عرفانی مقدم

تاریخ و امضا:



با تشکر و سپاس فراوان از:

استاد فرهیخته جناب آقای **دکتر مجید صادقی زاده** که با حمایتهای شایسته خود مرا در به انجام رساندن این پایان نامه یاری نمودند و با محبت های بی دریغ خویش اینجانب را مورد لطف و عنایت قرار دادند.

استاد بزرگوار جناب آقای **دکتر علیرضا نعمانی** که در طول انجام پروژه از راهنمایی شبانه روزی ایشان بهره مند بودم و از هیچ گونه راهنمایی، همفکری و کمکی دریغ ننمودند و شخصیت اخلاقی و علمی ایشان الگوی اینجانب خواهد بود.

استاد گرامی جناب خانم دکتر **مریم نیکخواه** که راهنمائی های ارزنده شان در دفاع از پروپوزال و در طول این پروژه بسیار ارزشمند بود.

استاد گرامی جناب خانم دکتر **مریم نیکخواه، دکتر نادری منش، دکتر رهبری زاده و دکتر فرامرز مهرنژاد** که زحمت داوری پایان نامه اینجانب را پذیرفتند.

با تشکر ویژه از برادر عزیزم دکتر **مجید عرفانی مقدم** که همیشه پشتیبان من بوده و مرا در ویرایش مقاله انگلیسی یاری دادند.

با تشکر فراوان از تمامی دوستان عزیز و ارجمندم **بابک بخشی نژاد، مهشید ملکوتیان، مریم طهماسبی، مینا زمانی، مینو کریمی، آرمان شهریسا و عالمه حیدرزاده** در گروه ژنتیک و **علیرضا نادری سهی، فرهاد بانی، حمید خیری، آسیا مجیدی و سعیده ابراهیمی** در گروه نانوبیوتکنولوژی دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس که تضارب افکار بسیار خوبی با هم داشتیم و کمک های فکری و عملی شان همواره راهگشای مشکلاتم در طول مسیر انجام پروژه بوده است.

تشکر ویژه از خانواده خودم و همسرم، مخصوصا مادربزرگ عزیزمان **"اقدس کاریار"** که در این مدت چندساله حمایتهای عاطفی و مالی فراوانی نسبت به ما داشتند و بدون این حمایتهای مالی انجام این پژوهش امکان پذیر نبود و درنهایت بیشترین و خالصانه ترین سپاس را از همسرم دکتر **"ماهرخ شربت خواری"** به عمل می آورم که در طول این چند ساله با تحمل مشکلات فراوان مرا همواره یاور و پشتیبان بود.

چکیده:

محققان نانوتکنولوژی سعی می کنند داروهایی طراحی کنند که دارای زیست دسترسی بالا، زیست سازگار و یا زیست تخریب پذیر باشد. نقش ضد سرطان کورکومین از گیاه ادویه ای زردچوبه، در سالهای اخیر در تحقیقات متعددی به اثبات رسیده است. اما محلولیت بسیار ضعیف آن در آب، کاربرد این ماده ضد سرطانی مهم را با مشکل مواجه می سازد. در این تحقیق تلاش گردید مولکول کورکومین زردچوبه به کمک ابزار نانوبیوتکنولوژی یعنی نانوحاملهای شاخه دار دندروزومی و دندریمری اصلاح شده، در دسترس رده سلولی توموری گلیوبلاستوما و رده سلولهای نرمال فیبروبلاستی قرار گیرد و تاثیرات کاربرد این ابزار بر بروز بهتر خواص ضد سرطان این مولکول مورد بررسی قرار گیرد. در این تحقیق در بخش اول با طراحی و سنتز یک پلیمر دو بخشی نوین monomethoxy poly (ethylene glycol)-Oleate (mPEG-OA) تنها به روش انکپسوله کردن و در بخش دوم با اتصال کوالانی(کانجوگه کردن) کورکومین و پلی اتیلن گلیکول(PEG) به سطح حامل دندریمری پلی آمیدوآمین(PAMAM)، تلاش شد با دو روش انکپسوله کردن و کانجوگه کردن دارو به نانوحاملها، زیست دسترسی کورکومین برای سلولهای سرطانی افزایش یابد. در بخش اول، سنتز حامل دوبخشی mPEG-OA و تایید ساختار، تعیین غلظت بحرانی تشکیل میسل(CMC)، بارگیری دارو و سمیت سلولی(آزمون MTT) و بررسی چرخه سلولی با روش PI و میزان آپوپتوز با روش PI/Annexin-V-FLUOS بر روی رده سلولی کارسینومای مغزی (U87MG) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، در بخش اول، نتایج مطالعات میکروسکوپ الکترونی نیروی اتمی (Atomic force microscopy)(AFM) و آنالیز دینامیک پراکنش نوری(DLS) (Dynamic light scattering) نشان می‌دهد نانوذرات دندروزومی mPEG-OA طراحی شده دارای دو جمعیت خود آرا با ساختارهای کروی با میانگین اندازه ذرات میسلی ۱۸/۳۳±۵/۳۲ نانومتر و پلیمروزومی ۹۹/۴±۶۵ نانومتر و پایداری فیزیکی بالایی می باشد. غلظت بحرانی تشکیل میسل mPEG-OA بسیار پایین(۰/۰۳ گرم در لیتر) است. مقدار IC_{50} از ۴۸ میکرومولار برای کورکومین آزاد به ۲۴ میکرومولار برای کورکومین انکپسوله شده در mPEG-OA کاهش می یابد و مطالعات چرخه سلولی و آپوپتوز نشان می دهد استفاده از کورکومین به همراه این ناقل mPEG-OA باعث افزایش جمعیت سلولی Sub G1 و آپوپتوز می گردد. در بخش دوم، کانجوگه کردن PEG و کورکومین به سطح دندریمر PAMAM با روشهای FTIR و NMR تایید گردید و درصد میزان اتصال تخمین زده شد. سپس، سمیت سلولی(MTT) و بررسی چرخه سلولی با روش PI و میزان آپوپتوز با روش PI/Annexin-V-FLUOS بر روی رده سلولی کارسینومای مغزی (U87MG) مورد بررسی قرار گرفت. مقدار IC_{50} از ۴۸ میکرومولار برای کورکومین آزاد به ۰/۹ و ۲/۵ میکرومولار به ترتیب برای دندریمر ۲۰ و ۴۰ درصد کانجوگه با کورکومین و ۱۳/۵ میکرومولار برای کورکومین انکپسوله شده در دندریمر PAMAM، کاهش معنی داری یافت. در بخش دوم، مطالعات چرخه سلولی و آپوپتوز نشان می دهد استفاده از کورکومین به شکل کانجوگه و انکپسوله با دندریمر باعث افزایش جمعیت سلولی Sub G1 و آپوپتوز می گردد. سپس در بخش دوم، واکنش کمی Real-time PCR نیز به منظور بررسی بیان ژن های ضد آپوپتوزی Xiap، RB1 و P21 پس از تیمار داروئی مورد استفاده قرار گرفت و نشان داده شد بیان ژنهای Xiap و P21 بطور معنی داری کاهش می یابند. در مجموع، نتایج حاصل نشان داد که نانوکورکومین دندروزومی و دندریمری با افزایش غلظت حامل و کورکومین، مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوز) را در رده سلولی توموری U87MG القا می کند. نتایج بیان می کند با استفاده از این نانوحاملها، زیست دسترسی کورکومین به طور معنی داری نسبت به کورکومین آزاد افزایش می یابد و هر سه روش انکپسوله کردن در میسل/پلیمروزوم mPEG-OA و انکپسوله و کانجوگه کردن کورکومین در حاملهای دندریمری PAMAM موجب پایداری و بهبود انحلال کورکومین می گردد. هرچند کورکومین کانجوگه شده به دندریمر به نظر تیمار پایدارتر و مناسبتری نسبت به حالتهای انکپسوله شده می باشد. در نهایت، این تحقیق نشان می دهد این نانوحاملها می توانند به عنوان سیستمهای داورسان مناسب برای انتقال کورکومین به سلولهای سرطانی U87MG در نظر گرفته شوند و می توانند کاندید مناسبی برای ادامه تحقیقات سرطان در مدلهای حیوانی در نظر گرفته شوند.

واژگان کلیدی: کورکومین، دندروزوم، میسل، پلیمروزوم، دندریمر، دندریمر پلی آمیدوآمین، افزایش محلولیت، سرطان

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱ نانوتکنولوژی و استفاده از گیاهان داروئی در درمان سرطان ۱

۱-۲ تاریخچه گیاه دارویی زردچوبه ۴

۱-۳ کورکومین و آنالوگ های ساختاری آن ۴

۱-۴ اثرات آنتی اکسیدانی کورکومین ۶

۱-۵ اثرات ضد التهابی کورکومین ۷

۱-۶ اثرات ضدسرطانی کورکومین ۸

۱-۷ افزایش طول عمر ۱۰

۱-۸ زیست ماندگاری و متابولیسم کورکومین در بدن ۱۰

۱-۹ بهبود ویژگی های زیست دسترسی کورکومین ۱۲

۱-۹-۱ آنالوگ های سنتتیک کورکومین ۱۲

۱-۹-۲ ادجوآنت ها ۱۳

۱-۹-۳ امولیسیون ها ۱۳

۱-۹-۴ نانوذرات و نانوحاملها ۱۴

۱-۹-۴-۱ لیپوزوم ها ۱۴

۱-۹-۴-۲ میسل ها و پلی مروزومها ۱۴

۱-۹-۴-۳ دندریمرها ۱۶

۱-۱۰ دندریمرها و تاریخچه دندریمرها ۱۸

۱-۱۰-۱ دندریمرهای پلی آمیدوآمین ۱۹

۱-۱۰-۲ امکان سنتز از پیش تعیین شده، مرحله به مرحله و کنترل شده ۲۰

۱-۱۰-۳ توزیع اندازه و وزن مولکولی یکنواخت ۲۰

۱-۱۰-۴ ابعاد نانو ۲۱

۱-۱۰-۵ چند ظرفیتی بودن ۲۱
۱-۱۰-۶ ویژگی های فیزیکو شیمیایی ۲۱
۱-۱۰-۷ عامل دار کردن سطح دندریمرها ۲۴
۱-۱۰-۷-۱ دندریمرها با یک گروه عاملی ۲۴
۱-۱۰-۷-۲ دندریمرهایی با گروههای عاملی چندگانه ۲۵
۱-۱۰-۷-۳ دندریمرهای آرایش شده با پلیمرها ۲۷
۱-۱۱ سینتیک دارویی ۲۸
۱-۱۲ دارورسانی ۲۸
۱-۱۲-۱ دندریمرها با داروی کپسوله شده ۲۸
۱-۱۲-۲ اتصال کئولانی دارو به دندریمرها ۲۹
۱-۱۳ اهداف و سوالات اصلی تحقیق ۳۱
فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳۴
۲-۱ مواد ۳۴
۲-۲ ترسیم منحنی استاندارد برای اندازه گیری غلظت کورکومین ۳۴
۲-۳ بخش اول تحقیق - بخش دندروزومی (میسل/پلیمروزومی) ۳۴
۲-۳-۱ سنتز نانوحامل های دندروزومی جدید mPEG-OA ۳۴
۲-۳-۲ تعیین غلظت بحرانی تشکیل میسل(CMC) برای دندروزوم mPEG-OA ۳۶
۲-۳-۳ بررسی لودینگ دارو در دندروزوم (میسل/پلیمروزوم) mPEG-OA ۳۷
۲-۳-۴ بررسی خواص فیزیکی: اندازه، شکل و پراکنش اندازه نانوذرات دندروزوم (میسل/پلیمروزوم ۳۷
۲-۳-۵ محاسبه اندازه و بار سطحی دندروزوم نوین با استفاده از تکنیک روش تفرق نور پویا(DLS) ۳۸
۲-۳-۶ بررسی اندازه نانوکورکومین دندروزومی با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی ... ۳۹
۲-۳-۷ بررسی پایداری فیزیکی نانوکورکومین دندروزومی ۴۰

۲-۴ بخش دوم تحقیق : بخش دندریمری (کونژوگاسیون کورکومین و پلی اتیلن گلیکول به دندریمر .. ۴۱

۲-۴-۱ فعال سازی مولکول کورکومین ۴۱

۲-۴-۲ فعال سازی پلی اتیلن گلایکول (PEG)..... ۴۲

۲-۴-۳ اتصال کورکومین به دندریمر پلی آمیدوآمین نسل چهارم..... ۴۴

۲-۴-۳-۱ اتصال کورکومین فعال شده به سطح دندریمر های پلی آمیدو آمین نسل چهارم در نسبت ۲۰ درصد مول‌های آمین سطحی دندریمر..... ۴۴

۲-۴-۳-۲ اتصال کورکومین فعال شده به سطح دندریمر های پلی آمیدو آمین نسل چهارم در نسبت ۴۰ درصد مول‌های آمین سطحی دندریمر..... ۴۶

۲-۴-۴ تهیه مشتقات پگیله از دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین نسل چهارم ۴۶

۲-۴-۴-۱ اتصال PEG فعال شده به سطح دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین نسل چهارم در نسبت مولی ۲۰ درصد آمین‌های سطح دندریمر..... ۴۷

۲-۴-۴-۲ اتصال PEG فعال شده به سطح دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین نسل چهارم در نسبت مولی ۴۰ درصد آمین‌های سطح دندریمر..... ۴۷

۲-۴-۵ بررسی خصوصیات فیزیکی محصولات سنتز شده ۴۸

۲-۴-۵-۱ بررسی انجام مراحل سنتز و کونژوگاسیون توسطNMR ۴۸

۲-۴-۵-۲ بررسی صحت انجام اتصال محصولات سنتز توسط روش FTIR..... ۴۸

۲-۴-۶ انکپسوله‌کردن و افزایش انحلال کورکومین در آب بوسیله مشتقات مختلف دندریمرهای پلی-آمیدو آمین نسل چهارم..... ۴۸

۲-۵ کشت سلولی..... ۴۹

۲-۵-۱ روش تهیه محیط کشت های مورد استفاده..... ۴۹

۲-۵-۱-۱ محیط کشت RPMI..... ۴۹

۲-۵-۱-۲ محیط کشت DMEM ۵۰

۲-۵-۲ رده های سلولی ۵۰

۲-۵-۲-۱ رده سلولی توموری ۵۰

۲-۵-۲-۲ رده سلولی نرمال..... ۵۰

۲-۵-۳ کشت رده های سلولی سرطانی و نرمال ۵۰
۲-۶ بررسی بقای سلولی با استفاده از آزمون MTT ۵۲
۲-۷ آنالیز کیفی جذب سلولی با استفاده از تکنیک میکروسکپ فلورسانس معکوس ۵۴
۲-۸ آنالیز چرخه سلولی با استفاده از تکنیک فلوسیتومتری و رنگ آمیزی PI ۵۴
۲-۹ آشکار سازی مرگ اپوپتوزی با استفاده از رنگ آمیزی AnnexinV/FLOUS-PI ۵۶
۲-۱۰ ارزیابی بیان ژن توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز کمی در زمان واقعی..... ۵۸
۲-۱۰-۱ استخراج RNAتام از سلول با استفاده از معرف تریزول..... ۵۸
۲-۱۰-۲ ارزیابی کمی RNA استخراج شده با استفاده از روش های اسپکتروفوتومتری... ۶۰
۲-۱۰-۳ ارزیابی کیفی RNA استخراج شده با استفاده الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۶۱
۲-۱۰-۴ انتخاب ژن های مربوط به آپوپتوز، ژن های Xiap، P21 و RB1..... ۶۲
۲-۱۰-۵ ارزیابی بیان mRNA ژنهای مربوط به آپوپتوز ۶۴
۲-۱۰-۵- ۱ واکنش نسخه برداری معکوس: سنتز cDNA تک رشته از الگوی mRNA ۶۴
۲-۱۰-۵-۲ طراحی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمراز کمی . ۶۵
۲-۱۰-۵-۳ واکنش زنجیره ای پلیمراز کمی در زمان واقعی ۶۵
۲-۱۰-۵-۴ محاسبه کارائی تکثیر آغازگرها در واکنش Real-time PCR ۶۹
۲-۱۰-۵-۵ آنالیز داده ها با استفاده از روش ارزیابی نسبی ۶۹
۲-۱۱ آنالیز آماری داده ها ۶۹
فصل سوم: نتایج..... ۷۱
۳-۱ ترسیم منحنی استاندارد برای اندازه گیری غلظت کورکومین..... ۷۱
۳-۲ بخش اول تحقیق :مطالعات دندروزومی(میسل/پلیمروزم) ۷۲
۳-۲-۱ سنتز دندروزوم mPEG-OA و تایید ساختار با آنالیز داد ه های FT-IR ۷۲
۳-۲-۲ آنالیز داده های NMR ۷۴

۳-۲-۳ تعیین غلظت بحرانی تشکیل میسل(CMC) ۷۵

۳-۲-۴ ساختارهای دندروزومی حلالیت کورکومین را افزایش می دهد ۷۶

۳-۲-۵ محاسبه بارگیری دارو و کارایی انکپسولاسیون کورکومین در دندروزوم mPEG-OA۷۷

۳-۲-۶ بررسی خواص فیزیکی نانوذرات دندروزوم mPEG-OA: اندازه، مورفولوژی و پتانسیل زتا ۷۹

۳-۲-۷ مطالعه بقای سلولی رده های سلولی پس از تیمار با نانوکورکومین دندروزومی..... ۸۴

۳-۲-۷-۱ رده سلولی توموری U87MG گلیوبلاستوما ۸۴

۳-۲-۷-۲ سلول های نرمال فیبروبلاست پوست(HFSF-PI3) ۸۶

۳-۲-۸ مطالعات جذب سلولی با کمک میکروسکپ فلورسانس ۸۷

۳-۲-۹ تاثیر نانوکورکومین دندروزومی بر چرخه سلولی رده سلولی توموری U87MG ۸۹

۳-۲-۱۰ تاثیر نانوکورکومین دندروزومی بر القای اپوپتوسیس در رده های توموری گلیوبلاستوما ۹۰

۳-۳ بخش دوم - تحقیقات دندریمری(PAMAM Cojugation) ۹۳

۳-۳-۱ کونژوگاسیون کورکومین فعال شده به سطح دندریمر در نسلهای مختلف ۹۳

۳-۳-۱-۱ بررسی فعال سازی کورکومین توسط نیتروفنیل کلرفرمات..... ۹۳

۳-۳-۱-۲ کونژوگاسیون کورکومین به دندریمرهای پلی آمیدو آمین..... ۹۷

۳-۳-۲ اتصال پلی اتیلن گلایکول فعال شده در نسبتهای مختلف به سطح دندریمر پلی آمیدوآمین ۱۰۳

۳-۳-۲-۱ بررسی فعال سازی پلی اتیلن گلایکول توسط نیتروفنیل کلرفرمات ۱۰۳

۳-۳-۲-۲ اتصال پلی اتیلن گلایکول فعال شده به سطح دندریمر پلی آمیدوآمین .۱۰۴

۳-۳-۳ بررسی های مربوط به اندازه و پتانسیل زتا ذرات توسط دستگاه زتاسایزر.....۱۰۶

۳-۳-۴ بررسی های مربوط به مورفولوژی ذرات توسط AFM.....۱۰۹

۳-۳-۵ تاثیر نانوکورکومین کونژوگه و انکپسوله بر رده سلولی توموری U87MG.....۱۱۰

۳-۳-۶ تاثیر نانوکورکومین دندریمری بر سلول های نرمال فیبروبلاست HFSFPI3.....۱۱۳

۳-۳-۷ انکپسولاسیون و افزایش انحلال کورکومین با استفاده از دندریمر پلی آمیدوآمین و مشتقات آن ۱۱۴

۳-۳-۸ بررسی میکروسکوپ فلورسنت از برداشت سلولی نانوذرات در محیط کشت ۱۱۸

۳-۳-۹ تاثیر نانوکورکومین دندریمری بر چرخه سلولی رده سلولی U87MG ۱۲۱

۳-۳-۱۰ تاثیر نانوکورکومین دندریمری بر القای اپوپتوسیس در رده های توموری گلیوبلاستوما ۱۲۴

۳-۳-۱۱ استخراج RNA ۱۲۵

۳-۳-۱۲ تاثیر نانوکورکومین دندریمری بر میزان بیان ژن های درگیر در آپوپتوز ۱۲۷

۳-۳-۱۲-۱ بررسی میزان بیان ژنهایXiap ، RB1و P21 ..... ۱۲۹

فصل چهارم: بحث ۱۳۲

۴-۱ مطالعات دندروزومی (میسل/پلیمروزومی) ۱۳۲

۴-۱-۱ نانوکورکومین دندروزومی روشی در راستای درمان سرطان ها ۱۳۵

۴-۱-۲ نانوکورکومین دندروزومی و گلیوبلاستوما ۱۳۶

۴-۲ مطالعات دندریمری ۱۳۷

۴-۲-۱ دندریمرها به عنوان حامل نانو مناسب ۱۴۱

فصل پنجم: پیشنهادات ۱۴۴

منابع ۱۴۵

فصل اول:

مقدمه

فصل اول: مقدمه

۱-۱ نانوتکنولوژی و استفاده از گیاهان داروئی در درمان سرطان

علاقه فراوانی در توسعه سیستمهایی دارورسانی که قبلاً در بازار موجود بوده اند به طریق نانو مخصوصاً برای درمان سرطان وجود دارد. سیستمهای انتقال نانو ، اگر ایده آل طراحی شوند پیگیری هدفمند دارو را امکان پذیر می نماید و در نتیجه کارایی روش درمانی را افزایش و اثرات مضر جانبی را به حداقل کاهش می دهد. محققان با کمک نانوتکنولوژی سعی می کنند داروهایی طراحی کنند که صنعت دارویی نانو را قادر سازد که در درجه اول دارو را به بافت هدف خاصی انتقال دهد، میزان رهایش دارو به میزان کنترل شده ای باشد، سیستم دارورسانی زیست تخریب پذیر باشد و همچنین بتواند از فرایند تخریب و دفع توسط بدن فرار کند[۱]. بر اساس آمار مجمع سرطان امریکا(American Cancer society) (ACS) احتمال رشد سرطان در زندگی انسانها یک نفر از دو نفر در مردان و یک نفر از سه نفر در زنان است[۲]. اغلب مواد دارویی شیمیایی امروز در بازار در دنیا اغلب موادی با وزن مولکولی پایین هستند که در حجم زیادی توزیع می شوند که هر دو این عوامل باعث سمیت زیاد آنها می شوند. علاوه بر آن، وزن مولکولی پایین این مواد شیمیایی باعث می شود آنها به راحتی از بدن به بیرون رانده می شوند و بنابراین نهایتاً غلظت بالاتری از آنها مورد نیاز خواهد بود که متعاقباً سمیت بیشتر اجتناب ناپذیر می شود. به دلیل میزان درمانگری پایین آنها افزایش غلظت برای درمان موثر نیاز است که متاسفانه اغلب از سطوح درمانی هم تجاوز می کند. علاوه بر آن زمانیکه این داروها به تنهایی وارد بدن می شوند اختصاصی نیستند و آسیبهای بسیار جدی به بافتهای غیر سرطانی وارد می آورد مانند اثرات جانبی ناخواسته و خیلی جدی توقف رشد بافت استخوانی ، ریزش موهای بدن (Alopecia) و پوست اندازی سلولهای اپی تلیال احشاء

(دل و روده). به دلیل آنکه اغلب مواد دارویی شیمیایی حلالیت کمی دارند ، دسترسی زیستی آنها در بدن موجود زنده کم است و در حلالهای آلی سمی فرمول بندی می شوند. بنابراین استفاده از حاملهای نانو کمک می کند داروهای ضد سرطان که حلالیت کمی دارند به شکل جامد یا مایع فرموله و استفاده شوند. داکسیل(Doxil) و آبراکسان (Abraxane) با فرمولاسیون نانو دو داروی شناخته شده ضد سرطان هستند که توسط موسسه دارو و غذای امریکا (FDA) اعتبار دریافت نموده اند. و اکنون در بازار درمانهای سرطان در دسترس هستند. داکسیل به وسیله لیپوزومهای در گردش(Circulating liposomal) داروی دوکسوروبیسین (Doxorubicin) را داخل خود انباشت می کند و نشان داده شده است کارایی آن نسبت به دوکسوروبیسین آزاد به طور معنی داری بهبود یافته است. داروی دیگر آبراکسان (شرکت Abraxis Bioscience، لس آنجلس) نانوذراتی از آلبومین که داروی پاکلیتاکسل (Paclitaxel) را در خود انباشت کرده است و برای درمان سرطان سینه با کمک نانوتکنولوژی به کار می رود. آبراکسان به شکل سوسپانسیون تزریق می شود به دلیل وجود کروموفور ای ال (Chromophor E L) که یک سورفکتات بسیار بی ضرر برای افزایش پایداری نانوذرات و انحلال پاکلیتاکسل است از واکنش حساسیت بدن می گریزد. این نانوذره با ابعادی حدود یکصد نانومتر کمک می کند داروهای غیر قابل حل یا کم حل شونده ، حل شوند و نیاز به حلالهای آلی سمی از بین می رود[۱]. داروها یا مواد فعال بیولوژیکی که در نانوذرات کپسوله می شوند یا به وسیله حاملهای نانو حمل می شوند زیست دستیابی(bioavailability) و فعالیت زیستی(bioactivity) بسیار زیادی را کسب می نمایند. از طرفی، بیش از ۷۰٪ داروهای ضد سرطان که امروزه مورد استفاده قرار می گیرند دارای منشاء گیاهی هستند و در طب سنتی جهت درمان بسیاری از بیماری ها کاربرد داشته اند. وینبلاستین(Vinblastine) و پاکلیتاکسل(paclitaxel) دو نمونه پرکاربرد از این دسته داروهای گیاهی هستند[۳].

به طور کلی مواد بیولوژیک گیاهی خوراکی انتی اکسیدان شامل ویتامینها و متابولیتهای ثانویه شامل ترپنوئیدهای کاروتنوئیدی، پلی فنلهای فلاونوئیدی، اسیدهای فنلی و استرهای آنها و مواد فنلی غیر فلاونوئیدی

می باشد. اثر ضد سرطان تعدادی از این متابولیتها نشان داده شده و تحقیقات برای نقش آنها در مبارزه با سرطان در جریان است. برای مثال تانن‌ها Tannin ، پلی فنلهای گیاهی با وزن مولکولی زیاد هستند که به دو گروه شیمیایی و بیولوژیکی تقسیم بندی می شوند. تانن های فشرده یا پروآنتوسیانینها که مثلا در چای و انگور موجود می باشند و تانن‌های قابل هیدرولیز یا الاجیتانن ها که به طور مثال در توت فرنگی و انار موجود هستند. اخیرا ، تانن ها به دلیل فعالیتهای بیولوژیکی متعددی که دارند و اهمیتی که به صورت بالقوه در سلامتی انسان دارند به شدت کانون توجه واقع شده اند. در مثال دیگر، اپیگالوکتسین گالات (epigallocathecin gallate) یا (EGCG)) ترکیب موثر در چای سبز اگر در نانوذرات کپسوله شود نسبت به فرم آزادش ده برابر موثرتر است و سیسپلاتین جاسازی شده در نانوذرات ژلاتینی خواص ضد توموری خیلی قویتری نسبت به سیسپلاتین آزاد دارد و نسبت به آن در محیط in vivo سمیت کمتری دارد[۴]. یکی دیگر از ترکیبات گیاهی که اخیرا خواص بیولوژیک آن بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته کورکومین است که از گیاه زردچوبه بدست می آید. مهمترین ماده فعال بیولوژیک زردچوبه پلی فنولی بنام کورکومین با فورمول شیمیائی [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) hepta-1,6-diene-3,5-dione] می باشد که حدود ۲-۸ درصد وزنی زردچوبه را تشکیل می دهد. این ماده در محیطهای با pH فیزیولوژیک پایدار بوده ولی در محیطهای بازی (با pH بیشتر از ۸) به سرعت تخریب می شود. البته افزودن سرم جنین گاوی یا مواد آنتی اکسیدان نظیر اسید اسکوربیک و گلوتاتیون به محیط کشت سلولها از تخریب آن جلوگیری می کند. بطور کلی مهمترین اثرات بیولوژیکی زردچوبه و کورکومین اثرات ضدالتهابی، ضدتوموری و آنتی اکسیدانی آنهاست [۵, ۶]. بررسی های انجام شده نشان می دهد که کورکومین مولکولی پلیوتروپیک است بدین معنی که قادر است که اهداف مختلفی را در سلول شامل فاکتورهای رونویسی سلول، گیرنده های سلولی، کینازهای سلولی، سیتوکین ها، آنزیم ها و فاکتور های رشد سلولی را شناسائی کند و به نظر می رسد به همین دلیل پتانسیل بالائی در درمان سرطان ها داشته باشد[۷]. آثار ضد سرطانی آن در سرطان هایی از قبیل مثانه، گردن، رحم، تخمدان، مغز، پوست و غیره مشاهده شده است. اما مشکل اینجاست که با وجود آن که در حلال های آلی نظیر دی متیل سولفوکساید، اتانول، و استون حل

(Dimethylsulfoxide: DMSO) می شود اما در آب، در شرایط اسیدی انحلال ناپذیر و در شرایط خنثی و قلیایی سریعاً تجزیه می شود[۸]. طوریکه در pH برابر با ۷,۳ تنها ۰,۰۰۰۴ mg/ml حل می شود و بعد از مصرف خوراکی ۱۰ تا ۱۲ گرم کورکومین میزان آن در سرم تنها خون به حدود ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر می رسد[۹].

۱-۲ تاریخچه گیاه دارویی زردچوبه

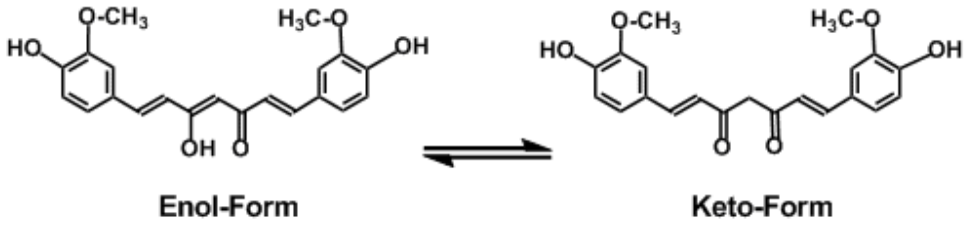
زردچوبه(Turmeric) با نام علمی*Curcuma longa* از قدیم الایام در آسیا مصرف می شده است. قدیمی ترین مدرک مربوط به آثارواودا یکی از چهارودای مقدس هندوئیسم در ۶۰۰۰ سال قبل از میلاد می باشد که در آن زردچوبه دارویی برای درمان یرقان و جذام معرفی شده است. در طب سنتی هندی، آیوریدا به زبان سانسکریت ۲۵۰ سال قبل از میلاد رساله ای وجود داردکه ساختن مرهمی را از زردچوبه برای خنثی کردن غداهای سمی شرح و پیشنهاد می دهد[۱۰]. پزشکان چینی و هندی از هزاران سال پیش آن را برای درمان چشم درد و زخمهای جلدی به کار می بردند. زردچوبه گیاه علفی پایا به ارتفاع یک تا یک و نیم متر و دارای ریزوم متورمی است که از آن ساقه هوایی خارج می شود؛ این گیاه در نواحی شرق هندوستان و چین می روید، تکثیر آن از طریق کاشت قطعات ریزوم جوانه دار گیاه صورت می گیرد، قسمت مورد استفاده این گیاه ریزوم آن می باشد که ساقه ریشه مانندی است که با رویش بر روی خاک یا زیر خاک نقش ساقه و ریشه را به طور توأم ایفا می نماید و زرد چوبه خوراکی از آن گرفته می شود.

۱-۳ کورکومین و آنالوگ های ساختاری آن

کورکومین در سال ۱۸۱۵ از ریشه گیاه زردچوبه استخراج و در سال ۱۹۱۰ فورمولاسیون شیمیائی آن به صورت $C_{21}H_{20}O_6$ تائید شد[۱۱]. این پلی فنل هیدروفوب دارای نقطه جوش ۱۸۳ درجه سانتیگراد است و هر مول آن جرمی حدود ۳۶۸/۳۷ گرم دارد[۱۲]. کورکومین دارای تاتومریزاسیون[1] کتو-انولی است و فرم کتو شکل غالب در محیط های اسیدی-خنثی و فرم انول شکل پایدار در محیط قلیائی است (شکل۱-۱). کورکومین در

[1] Tautomerism

آب نامحلول و در حلال های شیمیائی نظیر اتانول، دی متیل سولفوکسید و استن حل می شود. بافر فسفات با pH=۷/۲ در عرض ۳۰ دقیقه متابولیزه می گردد با این حال ترکیبات آنتی اکسیدانتی نظیر آسکوربیک اسید، N استیل سیستئین و گلوتاتیون مانع روند تجزیه کورکومین می شوند که نشان دهنده وجود مکانیسم های اکسیداتیو در این فرآیند است[۱۲]. کورکومین همچنین در محیط کشت های حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو پایدار است. امروزه کورکومین به فرم تجاری و به صورت مخلوطی از کورکومینوئیدها شامل ۷۷٪ دی فرولویل متان (کورکومینI)، ۱۸٪ دمتوکسی کورکومین (کورکومینII) و ۵٪ بیس دمتوکسی کورکومین (کورکومینIII) عرضه می گردد[۱۲].



شکل ۱-۱

کورکومین از دسته دی آریل هپتانوئیدهای خطی است که در آن دو استخلاف اکسی آریل توسط یک زنجیره ۷ کربنه شامل دو گروه کتون به یکدیگر متصل می شوند. زنجیره کربنی قادر به شرکت در واکنش های جایگزینی است. جایگزینی معمولا از نوع اکسی همانند هیدروکسی و متوکسی است[۱۳]. زردچوبه دارای سه آنالوگ اصلی کورکومین، دی متوکسی کورکومین و بیس دی متوکسی کورکومین است و با یکدیگر کورکومینوئید ها را می سازند. تفاوت این سه ساختار در استخلاف متوکسی قرار گرفته بر حلقه آروماتیک است. همان طور که پیشتر اشاره شد، کورکومین دارای دو استخلاف متقارن متوکسی فنل می باشد که توسط یک زنجیره ۷ کربنه با دو گروه کتونی بهم متصل شده اند. بیس دی متوکسی کورکومین نیز ساختاری متقارن دارد با این تفاوت که در گروه های آریل استخلاف o-متوکسی گروه های وجود ندارد. علیرغم کورکومین و بیس دی متوکسی کورکومین، دی متوکسی کورکومین دارای ساختمانی نامتقارن با یک حلقه فنیل دارای استخلاف o-متوکسی می باشد. از میان کورکومینوئیدهای زردچوبه، بخش اعظم به کورکومین و پس از آن به ترتیب به دی

متوکسی کورکومین و بیس دی متوکسی کورکومین اختصاص دارد[۱۳]. اگرچه این سه ساختار بخش عمده کورکومینوئیدهای زردچوبه را تشکیل می دهند، ترکیبات دیگری نیز جداسازی و گزارش شده است. یکی از این ترکیبات سیکلوکورکومین است که اولین بار توسط Kiuchi و همکاران جداسازی و تعیین ساختار شد. در سیکلوکورکومین گروه های کتونی با استخلاف و دی هیدروپیرانون جایگرین شده است. در دهه های اخیر مطالعات بسیاری در راستای نقش های بیولوژیک طیف وسیعی از کورکومینوئید ها انجام گرفته است. کورکومینوئیدها رادیکال های آزاد و گروه های واکنشگر اکسیژنی، رادیکالهای پراکسیل و پراکسی نیتریل تولیدی طی استرس های اکسداتیو تولید می شوند را به دام می اندازند. در این بین، کورکومین بیش از دو آنالوگ اصلی دیگر موثر می باشد. تاثیر درمانی مثبت کورکومینوئیدها بر بیماری های قلبی-عروقی نظیر آرتریواسکلروسیس، دیابت و بیماری های مرتبط با سیستم عصبی نیز گزارش شده است [۱۳].

۱-۴ اثرات آنتی اکسیدانی کورکومین

رادیکالهای فعال اکسیژن نظیر آنیونهای سوپراکسید و رادیکالهای هیدروکسیل در ایجاد آترواسکلروزیس و کارسینوژنز نقش دارند لذا پاکسازی این عوامل در جلوگیری از بروز بیماریهای قلبی عروقی و سرطان مفید است. اثرات آنتی اکسیدانی کورکومین در غیرفعال کردن رادیکالهای آزاد ثابت شده است، ولی این اثرات اغلب وابسته به دوز و شرایط محیطی هستند. نیتریک اکسید (NO) نیز مولکولی با نیمه عمر کوتاه می باشد که توسط سیستم آنزیمی نیتریک اکسید سینتاز از L-آرژنین تولید می شود. نیتریک اکسید جزء رادیکالهای آزاد بوده و باعث تشکیل رادیکاهای نیتروژنی می شود که می توانند به DNA آسیب وارد نموده و باعث ایجاد سرطان شوند. از نظر فیزیولوژیکی نیتریک اکسید در پاسخهای ایمنی، تونیسیته عروق، اگریگاسیون پلاکتی، انتقال تحریکات عصبی و ارسال سیگنالهای داخل سلولی نقش دارد و از نظر پاتولوژیکی می تواند در ایجاد بیماریهای قلبی عروقی و سرطان موثر باشد. کورکومین در غلظتهای پائین، بیان ژن نیتریک اکسید سینتاز قابل القاء (iNOS) را مهار نموده و از مراحل اولیه کارسینوژنز جلوگیری می کند. همچنین کورکومین در غلظتهای خاصی بدن را از آسیب های سلولی ناشی از تشعشعات رادیواکتیو محافظت می کند. تجویز زردچوبه به هامستر