[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.951]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:24 +0330 on Monday September 25th 2017

دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال نوزدهم، شماره ۶، صفحه ۹۶۱– ۹۵۱ (بهمن و اسفند ۱۳۹۵)

Iran South Med J 2017; 19(6): 951-961

نانو حامل پلیمری Diblock و کورکومین، رویکردی جدید به منظور غلبه بر مقاومت دارویی در سرطان سینه

سمیرا حاجی‌غلامی [۱]، زیبا ویسی‌ملکشاهی [۲*]

[۱] گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس
[۲] گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

(دریافت مقاله: ۹۴/۴/۱۹– پذیرش مقاله: ۹۴/۹/۱۶)

چکیده

زمینه: سرطان سینه یکی از علت‌های مرگ و میر در جهان می‌باشد. نیمی از افراد با بیماری متاستاتیک مقاومت به تاموکسیفن را گسترش می‌دهند و تقریباً تمام بیماران سرانجام به تاموکسیفن مقاومت پیدا می‌کنند. به‌منظور مقابله با تأثیرات منفی تاموکسیفن، این دارو در ترکیب با مادهٔ ضدسرطان کورکومین که سمیت کمتری نسبت به تاموکسیفن دارد، قرار گرفت. در این تحقیق به منظور بسته‌بندی تاموکسیفن در کنار کورکومین از نانو حامل پلیمری دی بلاک (دندروزوم) استفاده شد و تأثیر ترکیب حاصل شده (نانو تاموکسیفن+ کورکومین) بر سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن و سلول‌های فیبروبلاست مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: MTTAssay به منظور بررسی تأثیر ضد تکثیر و سمیت دارو مورد استفاده قرار گرفت. فلوسایتومتری و Annexin-V-FLUOS به ترتیب به منظور بررسی تأثیر ضد تکثیر و القای آپوپتوز استفاده شد.

یافته‌ها: نانو (تاموکسیفن+ کورکومین) در مقایسه با داروی تاموکسیفن تأثیرات سمی کمتری بر سلول‌های نرمال داشت و باعث افزایش فعالیت آپوپتوزی و کاهش تکثیر در سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن شد. کورکومین و تاموکسیفن با خاصیت سینرژیستی و القای آپوپتوز را در سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن نسبت به تاموکسیفن، نانو تاموکسیفن و نانو کورکومین افزایش دادند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که تغییرات اعمال شده بر تاموکسیفن توسط نانو حامل پلیمری و کورکومین به درمان مؤثرتر سرطان سینه کمک می‌کند.

واژگان کلیدی: کورکومین، تاموکسیفن، نانوحامل پلیمری، سرطان سینه

* تهران، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

E mail: zvmalekshahi@yahoo.com

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.951]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:24 +0330 on Monday September 25th 2017

مقدمه

سرطان سینه شایع‌ترین بیماری بدخیم در میان زنان و دومین علت مرگ به دنبال سرطان می‌باشد. سرطان سینه به عنوان شایع‌ترین سرطان تهاجمی در میان زنان جهان محسوب می‌شود. این سرطان در اثر چندین جهش در ژن‌های کنترل کننده مسیرهای حیاتی سلول از جمله رشد و نمو و آپوپتوز به‌وجود آمده و منجر به تولید توده‌های سلولی توموری می‌شود (۲-۱).

بر طبق مطالعات اپیدمیولوژیک، سالانه هزاران مورد جدید به بیماران اضافه می‌شود و میزان مرگ ومیر آن فراوان می‌باشد (۳). درمان‌های رایجی که در بیماری سرطان استفاده می‌گردد، شامل جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی و فناوری نانو می‌باشد (۴). سرطان‌های سینهٔ +ER تقریباً ۷۰ درصد کل سرطان‌های سینه را تشکیل می‌دهند و غالباً با تاموکسیفن که یک آنتی‌استروژن است درمان می‌شوند. اگر چه تاموکسیفن دارویی مؤثر در درمان سرطان سینه +ER محسوب می‌شود، اما مصرف طولانی مدت آن می‌تواند با آثار جانبی بر سایر ارگان‌ها همراه باشد (۵ و ۶).

یکی از مهم‌ترین تأثیراتی که مصرف طولانی مدت تاموکسیفن بر جای می‌گذارد، مقاومت ایجاد شده در سلول‌های سرطانی سینه است که حتی با وجود تاموکسیفن این سلول‌ها به رشدشان ادامه می‌دهند. ۵۰ درصد افراد با بیماری متاستاتیک به صورت جدید مقاومت به تاموکسیفن را گسترش می‌دهند و تقریباً تمام بیماران سرانجام به تاموکسیفن مقاومت پیدا می‌کنند. تقریباً ۴۰ درصد بیماران مبتلا به سرطان سینه، بعد از ۳-۱ سال درمان با تاموکسیفن به آن مقاوم می‌شوند (۷). بکار بردن یک ترکیب زیستی در کنار تاموکسیفن که سمیت کمتری نسبت به تاموکسیفن بر سلول‌های نرمال داشته باشد و در همراهی با تاموکسیفن خاصیت ضدتوموری برابر و یا بیشتری بر سلول‌های سرطانی داشته باشد، می‌تواند به درمان سرطان سینه به صورت مؤثرتر و ایمن‌تری کمک کند (۹-۸). کورکومین یک ترکیب پلی‌فنلی است که از ریشهٔ زردچوبه استخراج می‌شود. این ترکیب دارای خواص ضد سرطانی، ضد تکثیر سلولی، ضد التهاب، ضد جهش‌زایی و آنتی اکسیدانی است. کورکومین می‌تواند بر بسیاری از مکانیسم‌های شکل گرفته در سلول‌های مقاوم به تاموکسیفن غلبه کند و سلول‌های مقاوم را به سلول‌های حساس به تاموکسیفن تبدیل کند.

کاهش دوز مصرفی تاموکسیفن می‌تواند تا حدود زیادی سمیت ایجاد شده بر سلول‌های نرمال را کاهش دهد. از طرف دیگر قرار گرفتن کورکومین در کنار دوز کاهش یافتهٔ تاموکسیفن، ،خاصیت ضد توموری دوز کاهش یافتهٔ تاموکسیفن را احیا می‌کند و القای آپوپتوز را به حالت اولیه و حتی بیشتر می‌رساند.

مطالعات گسترده‌ای که در زمینه کورکومین صورت گرفته است، حاکی از حلالیت ضعیف، جذب کم و متابولیسم سریع این ترکیب دارویی و در نتیجه محدودیت استفاده از آن به دلیل زیست ماندگاری ضعیف کورکومین می‌باشد (۱۰ و ۱۱). راهکارهای مؤثر برای رفع این مشکل شامل استفاده از ادجوانت‌ها، لیپوزوم‌ها، میسل‌ها و ذرات نانو می‌باشد.

امروزه به منظور افزایش حلالیت و در نتیجه افزایش خاصیت ضد سرطانی کورکومین از ناقلین مختلفی برای رسانش دارو استفاده می‌شود. یکی از مهم‌ترین ناقلین، دندروزوم‌ها می‌باشند. دندروزوم‌ها در مقایسه با سایر ناقلین دارویی از جمله لیپوزوم‌ها، نانوذرات و غیره از مزایای متعددی از جمله پایداری، عدم سمیت و زیست تخریب‌پذیری برخوردارند. نانو حامل پلیمری صرف نظر از اینکه به پایداری کورکومین در شرایط زیستی

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.951]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:24 +0330 on Monday September 25th 2017

بدن کمک می‌کند، می‌تواند به بسته‌بندی تاموکسیفن و کورکومین در کنار هم کمک کند (۸، ۹ و ۱۲).

با توجه به مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته، خواص ضد سرطانی و سم‌زدایی بسیاری در مورد کورکومین نمایان شده است. از این رو پتانسیل بالای این دارو در امور درمانی، مطالعهٔ حاضر را به سمت ایجاد ترکیباتی از کورکومین و سایر داروهای موجود سوق داد. با توجه به شیوع سرطان سینه در ایران، در این تحقیق بر آن شدیم تا تأثیر همراهی کورکومین و تاموکسیفن به کمک نانو حامل پلیمری را بر روی سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن بررسی کنیم. رده سلولی MCF-7 به عنوان یک مدل شناخته شده برای مطالعات آزمایشگاهی (in vitro) سرطان سینه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

رده سلولی MCF-7 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. این رده سلولی در محیط کشت حاوی DMEM(Gibco ،USA)، ۱۰ درصد FBS، (GIBCO ،USA) ۱ درصد پنیسیلین و استرپتومایسین تحت شرایط ۵ درصد CO2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در در فلاسک T-75 کشت داده شد.

مقاوم سازی سلول MCF7 به داروی تاموکسیفن

بعد از کشت، این سلول‌ها به طور متناوب تحت تیمار تاموکسیفن قرار گرفتند. غلظت اولیه داروی تاموکسیفن کمتر از IC50 در نظر گرفته شد. اما با گذر زمان سلول‌ها به غلظت بیشتری از دارو نیاز داشتند تا میزان مرگ و میر سلول‌های MCF7 مشخص شوند. این عمل طی ۱۵ پاساژ به مدت ۴ ماه تکرار شد تا سلول‌هایی حاصل شد که در غلظتی تقریباً دو برابر IC50 تاموکسیفن، شروع به مرگ و میر داشتند.

آماده‌سازی ترکیبات

در این مطالعه از ۴ ترکیب دارویی استفاده شد. این ترکیبات شامل تاموکسیفن (USA، Sigma-Aldrich)، نانو کورکومین (کورکومین از شرکت Sigma-Aldrich, USA)، نانو تاموکسیفن و نانو (تاموکسیفن+ کورکومین) می‌باشند. همچنین از پلیمر Diblock به عنوان نانو حامل استفاده شد. نسبت ترکیب برای نانوترکیبات به این صورت: تاموکسیفن ۱، کورکومین ۳ و نانو حامل پلیمری ۵ بود.

غلظت‌های دارویی به کار برده شده برای داروی نانو تاموکسیفن و نانو (تاموکسیفن+کورکومین) بر اساس مقدار تاموکسیفن به کار برده شده و برای نانو کورکومین بر اساس کورکومین به کار برده شده در آن ترکیب در نظر گرفته شد.

تعیین درصد بقا سلول‌ها

میزان بقا و رشد سلولی توسط تست بیوشیمیایی MTT(methylthiazol tetrazolium) بررسی شد. جهت انجام تست، سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن و فیبروبلاست توسط تریپسینه کردن و با تراکم بیشتر از ۷۰ درصد جمع‌آوری شدند. سپس در پلیت ۹۶ خانه‌ای الایزا، تعداد ۸۵۰۰، ۶۰۰۰، ۳۵۰۰ سلول در هر چاهک، به ترتیب در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برای سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن و تعداد ۶۰۰۰، ۵۰۰۰، ۴۰۰۰ سلول در هر چاهک، به ترتیب در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برای سلول‌های فیبروبلاست منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند (تعداد سلول‌ها در هر چاهک و در هر دوره زمانی توسط منحنی استاندارد به‌دست آمده است). در واکنش جداگانه‌ای، سلول‌ها با غلظت (۳۰-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از داروی نانو

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.951]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:24 +0330 on Monday September 25th 2017

(تاموکسیفن + کورکومین)، نانو تاموکسیفن و تاموکسیفن و با غلظت (۶۰-۱۰ میگروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوکورکومین و غلظت (۲۰۰-۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوحامل پلیمری دی بلاک تحت تیمار قرار گرفتند. بعد از گذشت مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت به هر چاهک میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. در این مرحله محلول‌رویی دور ریخته شد و به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر حلال دی متیل سولفوکسید (DMSO) اضافه شد. میزان جذب نوری با استفاده از روش اسپکتروفتومتری سنجیده و جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. تمام آزمایشات ۳ بار تکرار شدند.

بررسی چرخهٔ سلولی

در ابتدا سلول‌های MCF7 مقاوم به تاموکسیفن و فیبروبلاست نرمال پوست (HFSF-PI3) در پلیت ۱۲ خانه‌ای تحت تیمار داروهای نانو (تاموکسیفن + کورکومین)، نانوکورکومین، نانوتاموکسیفن و تاموکسیفن در غلظتی برابر با (۳-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کمتر از غلظت IC50 به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در ادامه سلول‌ها ترپسینه شدند و با بافر فسفات دو بار شستشو داده شدند. سپس به منظور فیکس کردن، سلول‌ها در اتانول ۷۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. بعد از گذشت این زمان، سلول‌ها دو بار با بافر فسفات شستشو داده شدند. سپس سلول‌ها با ۴۰۰ میکرولیتر محلول رنگی (۲ درصد از محلول پروپیدیوم یدید (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ۲ درصد RNASA (۱ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) و ۰/۱ درصد تریتون X-100 رنگ‌آمیزی شدند. در پایان سلول‌ها توسط دستگاه فلوسیتومتر FACSCalibur™(BD 2 Biosciences ،USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌های به‌دست آمده از دستگاه فلوسیتومتر به کمک نرم‌افزار Flowing تفسیر شدند.

بررسی آپوپتوز

سنجش آپوپتوز با استفاده از Annexin-V-Fluos و با استفاده از کیت (Roche ،Germany)PI staining مطابق دستورالعمل کیت انجام گرفت. برای آنالیز داده‌ها از فلوسیتومتر FACSCalibur™ و نرم‌افزار Flowing استفاده شد.

آنالیز آماری

همه تست‌ها سه بار تکرار شدند. جهت آنالیز داده‌های به دست آمده از T-test، برای بررسی معنادار بودن نتایج از P-value استفاده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism انجام شد.

یافته‌ها

تعیین درصد بقا سلول‌ها

بررسی مقادیر IC50 به‌دست آمده از MTT assay test برای سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن و سلول‌های نرمال فیبروبلاستی HFSF-PI3 تحت تیمارهای دارویی تاموکسیفن، نانو تاموکسیفن، نانو کورکومین و نانو (تاموکسیفن + کورکومین) در دوره‌های زمانی مختلف نشان داده شده است (جدول ۱). IC50 برای تیمار تاموکسیفن سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن بیشتر از سلول‌های نرمال فیبروبلاستی HFSF-PI3 و این اختلاف با P=۰/۰۰۶۸ معنادار بود (جدول ۱).

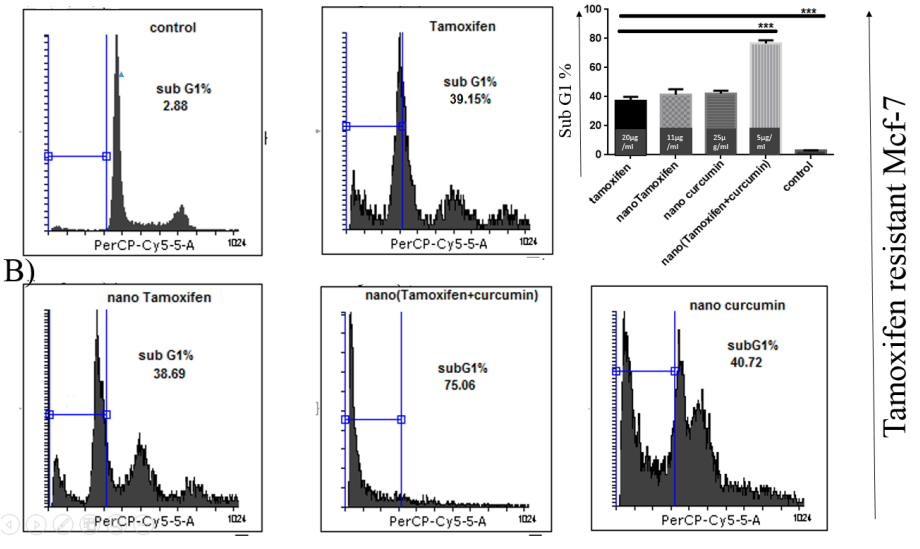
[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.951]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:24 +0330 on Monday September 25th 2017

جدول ۱) بررسی مقادیر IC50 به‌دست آمده از MTT assay test برای سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن و سلول‌های نرمال فیبروبلاستی HFSF-PI3 تحت تیمارهای داوریی تاموکسیفن، نانو تاموکسیفن، نانو کورکومین و نانو (تاموکسیفن+کورکومین) در دوره‌های زمانی مختلف

سلول / دارو	MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن (۲۴ ساعت)	MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن (۴۸ ساعت)	MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن (۷۲ ساعت)	رده سلول‌های نرمال فیبروبلاست پوست (۲۴ ساعت)	رده سلول‌های نرمال فیبروبلاست پوست (۴۸ ساعت)	رده سلول‌های نرمال فیبروبلاست پوست (۷۲ ساعت)
تاموکسیفن	۲۲	۲۰	۱۹/۵	۱۷/۵	۱۴/۵	۱۳
نانو تاموکسیفن	۱۲	۱۱/۵	۱۰	۱۸/۵	۱۶	۱۵
نانو(تاموکسیفن+ کورکومین)	۶	۴	۳/۵	۱۵	۱۳/۵	۱۲
نانو کورکومین	۲۷/۵	۲۳	۲۰	۴۲/۵	۴۰	۳۷

بررسی چرخهٔ سلولی در سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن

بررسی چرخهٔ سلولی در سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن تیمار شده با داروهای تاموکسیفن، نانو تاموکسیفن، نانو کورکومین و نانو (تاموکسیفن+ کورکومین) در غلظت‌های (۳-۱ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) کمتر از IC50 نشان داد که همه داروها توانایی القای مرگ سلولی و افزایش سلول‌ها با محتوای DNA موجود در فاز subG1 را دارند (نمودار ۱).



نمودار ۱) بررسی چرخهٔ سلولی با استفاده از فلوسایتومتری. چرخهٔ سلولی و درصد سلول‌های با محتوای DNA موجود در فاز sub G1 برای سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن در تیمارهای داروهای نانو تاموکسیفن نانو کورکومین و نانو (کورکومین + تاموکسیفن) و تاموکسیفن به ترتیب با غلظت‌های ۱۱،۲۵، ۵، ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای سلول‌های مقاوم به تاموکسیفن MCF-7. (غلظت‌های به کار برده شده زیر IC50).

Fig 1) Cell cycle analysis by using Flowcytometry. Cell cycle and the percentage of cells with DNA content for MCF-7 resistant cells to tamoxifen in nano-Tamoxifen (25 µg/ml), nano-Curcumin (11 µg/ml) and nano-(Tamoxifen+Curcumin) (5 µg/ml) and Tamoxifen(20 µg/ml) for MCF-7 resistant cells to tamoxifen (concentrations used below the IC50).

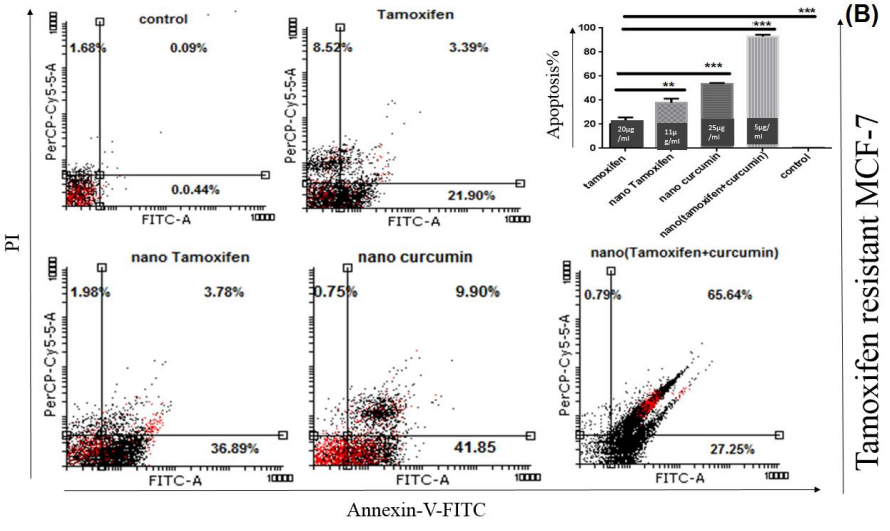
[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.951]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:24 +0330 on Monday September 25th 2017

میزان القای مرگ سلولی در تیمارهای نانو (تاموکسیفن+ کورکومین) با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تاموکسیفن و ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کورکومین توانست ۷۵/۰۶ درصد از سلول‌های MCF-7 مقاوم به دارو را به فاز مرگ وارد کند، در حالی که هیچ‌کدام از داروهای تاموکسیفن یا نانو تاموکسیفن با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و نانو کورکومین با غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به القای مرگ سلولی با مقدار مشاهده شده برای تیمار نانو (تاموکسیفن + کورکومین) نبودند (نمودار۱).

آنالیز آپوپتوزی

جهت بررسی آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده از کیت Annexin-V-Flus staining استفاده شد. نانو (تاموکسیفن+ کورکومین) با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیترتاموکسیفن +۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کورکومین توانسته آپوپتوز را در ۹۳ درصد سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن القا کند، در حالی که هیچکدام از داروهای تاموکسیفن یا نانو تاموکسیفن با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و نانو کورکومین با غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به القای آپوپتوز با مقدار مشاهده شده برای تیمار نانو (تاموکسیفن+ کورکومین) نبودند (نمودار ۲).

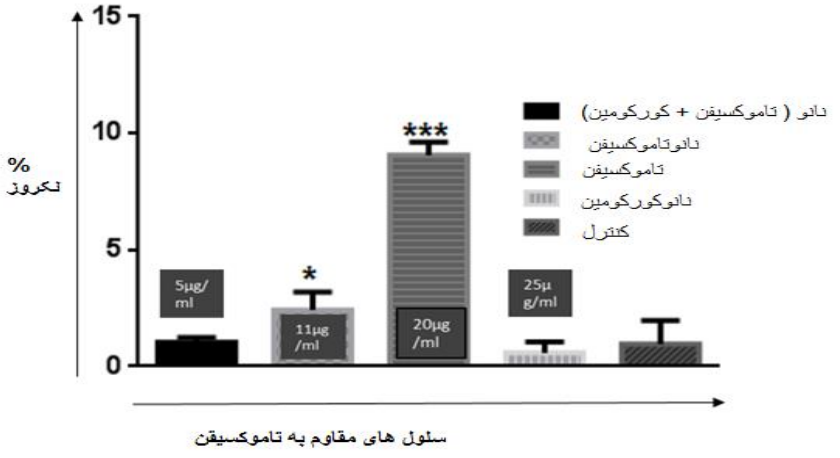
در تیمار تاموکسیفن و نانو تاموکسیفن سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن، علاوه بر آپوپتوز، دچار مرگ سلولی از نوع نکروز شدند که این مرگ به‌دلیل سمیت داروی تاموکسیفن در غلظت مورد استفاده می‌باشد. میزان نکروز مشاهده شده در تیمار تاموکسیفن با با سایر تیمارها به صورت معناداری اختلاف داشت. میزان نکروز مشاهده شده در تیمار نانو تاموکسیفن نیز نسبت به دو تیمار نانو کورکومین و نانو (تاموکسیفن + کورکومین) با معنادار به نظر می‌رسد (نمودار ۳).



نمودار ۲) بررسی آپوپتوزی توسط کیت Annexin-V-Flus Staining و دستگاه فلوسایتومتر. نتایج بررسی آپوپتوزی سلول‌های سرطانی سینهٔ MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن تحت تیمارهای دارویی، نانو تاموکسیفن، نانو کورکومین و نانو (تاموکسیفن+ کورکومین)، تاموکسیفن با غلظت‌های به ترتیب ۲۰،۵،۲۵،۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر علاوه بر تأیید مرگ سلولی آپوپتوزی.

Fig 2) Analysis of apoptosis via Annexin-V-Flus Staining kit and Flow cytometry device. The results of MCF-7 breast cancer apoptos study resistant to Tamoxifen under Treatment of TR-MCF-7 cells with Tamoxifen (20 µg/ml), nano- Tamoxifen (11 µg/ml), nano- Curcumin (25 µg/ml) and nano (Tamoxifen+ Curcumin (5 µg/ml) and Tamoxifen (20 µg/ml) in addition to the confirmation of apoptosis cell ceath.

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.951]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:24 +0330 on Monday September 25th 2017



نمودار ۳) میزان وقوع نکروز در سلول‌های مقاوم به تاموکسیفن MCF-7 تحت تیمارهای دارویی تاموکسیفن، نانو تاموکسیفن، نانو کورکومین و نانو (تاموکسیفن + کورکومین) با غلظت‌های به ترتیب ۲۰، ۱۱، ۲۵، ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر.

Fig 3) Rate of necrosis in treatment of TR-MCF-7 cells with all four compounds. Concentrations are 20 µg/ml, 11 µg/ml, 25 µg/ml, and 5 µg/ml for Tamoxifen, nanoTam, nanoCur and nanoTC respectively.

بحث

سرطان سینه شایع‌ترین بدخیمی زنان در سراسر دنیا می‌باشد (۱). امروزه روش‌های درمانی ارائه شده برای این سرطان، استفاده از داروهای ترکیبی هوشمند و چند منظوره می‌باشد. از جمله این داروها می‌توان به کورکومین اشاره نمود که توانایی مهار چندین مسیر پیام رسانی سلولی و همچنین جلوگیری از تکثیر سلولی، متاستاز و تهاجم را دارد (۱۳). کورکومین به عنوان یک ترکیب دارویی در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان کولون، سینه، تخمدان و ریه موجب القای مرگ برنامه‌ریزی شده وابسته به p53 می‌شود (۱۴). کاربرد کورکومین به عنوان یک داروی هوشمند به واسطه نامحلول بودن محدود شده است. در این راستا مطالعات زیادی در جهت محلول نمودن آن صورت گرفته است و انواع ناقلین مانند ادجوانت‌ها، لیپوزوم‌ها، میسل‌ها و ذرات نانو جهت انتقال مؤثرتر آن به کار برده شده است. در این مطالعه از دندوزوم‌ها به عنوان ناقل انتقال کورکومین استفاده می‌گردد. نانوحامل پلیمری ترکیبی زیست تخریب‌پذیر دارای پایداری بالا و عدم سمیت می‌باشد (۹).

در تحقیقات گذشتهٔ سایر محققین به منظور غلبه بر مقاومت دارویی در سلول‌های مقاوم به تاموکسیفن از ترکیب کورکومین استفاده شده است. تأثیرات مشاهده شده در تحقیقات گذشته اگر چه از لحاظ آماری معنادار بود، ولی به جهت استفاده نکردن از نانو حامل به منظور بسته‌بندی داروی لیپوفیل و زیست تخریب‌پذیر کورکومین، این ترکیب دارویی در فاز in vivo کارآمد نمی‌باشد (۱۵). در مطالعه حاضر از نانوحامل پلیمری Diblock استفاده شد و به بررسی تغییرات اثر سمی و آپوپتوزی در سلول‌های تحت تیمار داروی تاموکسیفن با تغییراتی که به دو صورت بر داروی تاموکسیفن صورت گرفت، پرداخته شد. یکی از تغییرات بارگذاری داروی تاموکسیفن در نانو حامل پلیمری Diblock و دیگری بارگذاری همزمان تاموکسیفن و کورکومین در نانو حامل پلیمری Diblock است. مقاومت ایجاد شده به تاموکسیفن مهم‌ترین عامل در ناتوانی درمان

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.951]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:24 +0330 on Monday September 25th 2017

اندوکرین این بیماری می‌باشد. مقاومت ایجاد شده در سلول‌های MCF7 باعث می‌شود که این سلول‌های مقاوم به تاموکسیفن نسبت به سلول‌های نرمال رشد و تکثیر سریع‌تر و همچنین خاصیت تومورزایی بیشتری داشته باشند. در این مطالعه به منظور تولید سلول‌های مقاوم به تاموکسیفن، سلول‌های MCF-7 تحت تیمار طولانی مدت (به تعداد ۱۵ پاساژ (۴ ماه) تاموکسیفن قرار گرفته شدند و به سلول‌ها فرصت داده شد تا جمعیت مقاوم به تاموکسیفن جایگزین جمعیت حساس به تاموکسیفن شود، بدین ترتیب که جمعیت حساس به تاموکسیفن از بین می‌روند و سلول‌های مقاوم به تاموکسیفن امکان رشد بیشتری را پیدا می‌کنند. علاوه بر این مکانیسم مقاومت، یک مکانیسم القا شده توسط تاموکسیفن نیز می‌باشد که با گذشت زمان صورت می‌گیرد. بدین معنا که دیگر تاموکسیفن قادر نیست در دوزهای درمانی قبلی، تأثیر ضد توموری داشته باشد و سلول‌های سرطانی در حضور تاموکسیفن به رشدشان ادامه می‌دهند. داروی نانو (تاموکسیفن + کورکومین) و نانو تاموکسیفن می‌توانند بر این مقاومت غلبه کنند، بدین‌صورت که می‌توانند در همان غلظتی که سلول‌های حساس به تاموکسیفن را از بین می‌برند، سلول‌های مقاوم به تاموکسیفن را نیز از بین ببرند (۱۶).

کورکومین بسیاری از مکانیسم‌های شکل گرفته در سلول‌های مقاوم به تاموکسیفن شامل src Myc، c-، cyclin D، NF-κB، MAPK، PI3K/Akt را تعدیل می‌کند و سلول‌های مقاوم به تاموکسیفن را به سلول‌های حساس به تاموکسیفن تبدیل می‌کند (۱۵). در ابتدا مهار رشد سلولی توسط فرمول‌بندی دندروزومی کورکومین، تنها سلول‌ها را در نقاط کنترل چرخه سلولی متوقف می‌نماید، در حالی که با افزایش زمان تیمار، به تدریج سلول‌های متوقف شده در این نقاط وارد مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده می‌شوند. با تداوم حضور کورکومین در محیط کشت و ورود بیشتر آن به داخل سلول، نقطه کنترلی G1 فعال شده و مکانیسم‌های مهارکننده عبور سلول از مرحله G1، موجب تجمع تدریجی سول‌ها در این مرحله و توقف در G1/S می‌شود. در ادامه افزایش زمان تیمار و تأثیر کورکومین بر مسیرهای آپوپتوزی موجب القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های متوقف شده در نقاط کنترلی می‌شود (۱۷ و ۱۸).

بارگذاری داروی تاموکسیفن در نانوحامل پلیمری، IC50 را برای سلول‌های نرمال افزایش می‌دهد. افزایش اختلاف IC50 بین سلول‌های نرمال و سلول‌های سرطانی برای یک دارو بدین معنی می‌باشد که در غلظتی که سلول‌های سرطانی با القای دارو می‌میرند، سلول‌های نرمال آسیب نمی‌بینند و دارو به صورت هدفمند فقط سلول‌های سرطانی را از بین می‌برد. بارگذاری تاموکسیفن و کورکومین درون نانو حامل پلیمری ترکیب دارویی را حاصل کرد که تأثیرات سمی بسیار کمتری به نسبت نانو تاموکسیفن و تاموکسیفن داشت.

به علت افزایش IC50 تاموکسیفن در سلول‌های MCF-7 مقاوم به تاموکسیفن، نیاز به دوز بالاتری از تاموکسیفن برای القای آپوپتوز و داشتن سلول‌هایی با محتوای DNA موجود در فاز sub G1 می‌باشد. بررسی‌های آپوپتوزی نشان داد که بخشی از مرگ القا شده در این سلول‌ها ناشی از نوع نکروز می‌باشد. تغییرات اعمال شده بر تاموکسیفن به کمک نانو حامل پلیمری و کورکومین می‌تواند بر مقاومت ایجاد شده در تاموکسیفن غلبه کند. اگرچه افزایش وقوع نکروز در تیمارهای نانو تاموکسیفن نیز مشاهده شد که این میزان کمتر از میزان مشاهده شده در تیمار تاموکسیفن می‌باشد.

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.951]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:24 +0330 on Monday September 25th 2017

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تاموکسیفن و کورکومین وقتی در کنار هم در نانو حامل پلیمری بارگذاری می‌شوند، می‌توانند اثر سینرژیستیک داشته باشند و سمیت را بر سلولهای نرمال کاهش دهند. همچنین خاصیت ضد توموری را نسبت به فرم تنهای هر دو ترکیب (تاموکسیفن یا نانو تاموکسیفن و نانو کورکومین) افزایش دهند و بر مقاومت ایجاد شده به تاموکسیفن در سلول‌های مقاوم به دارو غلبه کنند.

سپاس و قدردانی

نویسندگان مقاله از کارکنان گروه ژنتیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس که در کمک‌های مالی همکاری نموده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Fisch T, Pury P, Probst N, et al. Variation in survival after diagnosis of breast cancer in Switzerland. Ann Oncol 2005; 16(12): 1882-8.
2.Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. Breast Cancer Res 2004; 6(6): 229-39.
3.Farooq S, Coleman MP. Breast cancer survival in South Asian Women in England and Wales. J Epidemiol Community Health 2005; 59(5): 402-6.
4.Reeder JG, Vogel VG. Breast cancer prevention. Cancer Treat Res 2008; 141: 149-64.
5.Petinari L, Kohn L, de Carvalho JE, et al. Cytotoxicity of tamoxifen in normal and tumoral cell lines and its ability to induce cellular transformation in vitro. Cell Bio Int 2004; 28(7): 531-9.
6.Chen HY, Yang YM, Han R, et al. MEK1/2 inhibition suppresses tamoxifen toxicity on CNS glial progenitor cells. J Neurosci 2013; 33(38): 15069-74.
7.De Gasperi M, Cavazos D. Curcumin Modulates Tamoxifen Response in Resistant Breast Cancer Cells. Cancer Res 2009; 69(24): 3098.
8.Ireson CR, Jones DJ, Orr S, et al. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002; 11(1): 105-11.
9.Moorthi C, Kathiresan K. Curcumin–Piperine/Curcumin Quercetin/Curcumin–Silibinin dual drug-loaded nanoparticulate combination therapy: A novel approach to target and treat multidrug-resistant cancers. J Med Hypo Ideas 2013; 7(1): 15-20.
10.Hatcher H, Planalp R, Cho J, et al. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. Cell Mol Life Sci 2008; 65(11): 1631-52.
11.Grynkiewicz G, Slifirski P. Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. Acta Biochim Pol 2012; 59(2): 201-12.
12.Babaei E, Sadeghizadeh M, Hassan ZM, et al. Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. Int Immunopharmacol 2012; 12(1): 226-34.
13.Jimeno A, Hidalgo M. Multitargeted therapy: can promiscuity be praised in an era of political correctness. Crit Rev Oncol Hematol 2006; 59(2): 150-8.
14.Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancer through interaction with multiple cell signaling proteins. Cancer Lett 2008; 269(2): 199-225.
15.Jiang M, Huang O, Zhang X, et al. Curcumin induces cell death and restores tamoxifen sensitivity in the antiestrogen-resistant breast cancer cell lines MCF-7/LCC2 and MCF-7/LCC9. Molecules 2013; 18(1): 701-20.
16.Nass N, Brömme HJ, Hartig R, et al. Differential response to α-oxoaldehydes in tamoxifen resistant MCF-7 breast cancer cells. PloS One 2014; 9(7): e101473.

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.951]

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:24 +0330 on Monday September 25th 2017

17.Chaudhary LR, Hruska KA. Inhibition of cell survival signal protein kinase B/Akt byc urcumin in human prostate cancer cells. J Cell Biochem 2003; 89(1): 1-5.

18.Bush JA, Cheung KJ Jr, Li G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. Exp Cell Res 2001; 271(2): 305-14.

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.6.951]

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:24 +0330 on Monday September 25th 2017

Iran South Med J 2017; 19(6): 951-961

Original Article

Nano Packaged Diblock and Curcumin: a New Approach Inorder To Drug Resistance in Breast Cancer

S. Hajigholami [1], Z. Vaise Malekshahi [2*]

[1] Genetic group, School of biological sciences, Tarbiat Modares University Tehran, Iran

[2] Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran

(Received 10 Jul, 2015 Accepted 7 Dec, 2015)

Abstract

Background: Breast cancer is one of the causes of mortality in the world. Half of patients with metastatic extend resistance to Tamoxifen and almost all patients eventually become resistant to tamoxifen. Inorder to counteract with the negative effects of tamoxifen, this drug have been placed in combination with the curcumin. Anti-cancer substance which is less toxic than Tamoxifen. In this study, Diblock (Dendrosome) Nano polymer was used in order to tamoxifen packaging along with curcumin. Anti-cancer efficacy of the obtained compound (Diblock, Tamoxifen and Curcumin) was evaluated in Tamoxifen-resistant (TR) MCF-7 cells and Fibroblast cells.

Material and Methods: MTT Assay was used to evaluate anti-proliferation effect and drug toxicity.Flow cytometry and Annexin-V-FLUOS were used inorder to assay anti-proliferation effect and induction of apoptosis, respectively.

Results: Nano-compound has less toxicity effects on normal cells compared with Tamoxifen and increased apoptosis activity and decreased proliferation in MCF-7 cells which are resistant to tamoxifen. Curcumin and Tamoxifen have more apoptotic potential than Tamoxifen alone, Nano-Tamoxifen or Nano-Curcumin.

Conclusion: Results of this study showed that changes in Tamoxifen by curcumin polymeric nanocarrier help to more effective treatment of breast cancer.

Key words: Curcumin, Tamoxifen, Polymer Nano-carrier, Breast Cancer

©Iran South Med J. All rights reserved

Cite this article as: Hajigholami S. Vaise Malekshahi Z. Nano Packaged Diblock and Curcumin: a New Approach Inorder To Drug Resistance in Breast Cancer Iran South Med J 2017; 19(6): 951-961.

Copyright © 2017 Hajigholami, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[*]*Address for correspondence*: Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran. Iran. E.mail: zvmalekshahi@yahoo.com

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir