

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فهرست مطالب	دو
فهرست اشکال	شش
چکیده	هشت

فصل اول: مقدمه

۱-۱ داروهای گیاهی و اهمیت آن در داروسازی نوین	۱
۲-۱ زردچوبه و ترکیبات آن	۱
۱-۲-۱ ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی کورکومین	۳
۲-۲-۱ اثرات دارویی کورکومین	۴
۱-۲-۲-۱ خاصیت آنتی اکسیدانی	۴
۲-۲-۲-۱ ترمیم زخمها	۵
۳-۲-۲-۱ اثرات ضدسرطانی کورکومین	۶
۱-۳-۲-۲-۱ رگزایی	۷
۲-۳-۲-۲-۱ تومورهای روده کوچک	۸
۳-۳-۲-۲-۱ سرطان لوزالمعده	۹
۴-۳-۲-۲-۱ سرطان کبد	۹
۵-۳-۲-۲-۱ سرطان راست روده	۹
۶-۳-۲-۲-۱ سرطانهای خون و مغز استخوان	۱۰
۳-۱ متابولیسم کورکومین	۱۱
۴-۱ ویژگیهای فارماکوکینتیک و فارمودینامیکی کورکومین	
۱-۴-۱ دسترسی زیستی و عوامل موثر در آن	۱۲
۲-۴-۱ پراکندگی بافتی	۱۳
۳-۴-۱ نیمه عمر کورکومین	۱۳
۴-۴-۱ آزمایشات پزشکی در حال انجام	۱۴
۵-۴-۱ راهکارهایی که تاکنون برای افزایش دسترسی زیستی کورکومین پیشنهاد شده اند	۱۴
۵-۱ کارژنهای شیر	
۱-۵-۱ ویژگیهای توالی و تکاملی	۱۵
۲-۵-۱ ویژگیهای ساختاری کارژننها	۱۷
۳-۵-۱ خود تجمعی کارژننها	۱۸
۶-۱ مواد غذایی پروتئینی، اساسی برای طراحی سیستم های انتقالی	۲۰
۷-۱ میسلهای پلیمری	
۱-۷-۱ اهمیت میسلها در صنایع دارویی	۲۲
۲-۷-۱ ساختار میسلها	۲۳
۳-۷-۱ انحلال پذیری در میسلها	۲۴
۴-۷-۱ میسلهای پلیمری دوگانه دوست	۲۵

۲۶	۵-۷-۱ عوامل موثر در میانکنش دارو و میسل
۲۶	۱-۵-۷-۱ حالت فازی بخش مرکزی
۲۷	۲-۵-۷-۱ نوع میانکنش های دارو و میسل
۲۷	۳-۵-۷-۱ پایداری ترمودینامیکی و کینتیکی
۲۸	۸-۱ پپتیدها و اهمیت آنها در صنایع دارویی و غذایی
۲۸	۱-۸-۱ پپتیدهای آمفی پاتیک و اهمیت دارویی آنها
۲۹	۲-۸-۱ پپتیدها در صنایع غذایی
۳۰	هدف از انجام این پایان نامه

فصل دوم : مواد و روشها

	۱-۲ تهیه ژل پلی اکرلامید و انجام الکتروفورز SDS-PAGE
۳۱	۱-۱-۲ تهیه ژل Stacking
۳۱	۲-۱-۲ تهیه ژل جداکننده
۳۱	۳-۱-۲ بافر تانک
۳۲	۴-۱-۲ تهیه بافر نمونه
۳۲	۵-۱-۲ تهیه محلول رنگ آمیزی
۳۲	۶-۱-۲ تهیه محلول رنگبر
	۲-۲ سنجش پروتئین
۳۲	۱-۲-۲ تهیه محلول برادفورد
۳۳	۲-۲-۲ رسم منحنی استاندارد سنجش پروتئین به روش برادفورد
۳۳	۳-۲ آماده سازی کیسه های دیالیز
	۴-۲ استخراج بتاکازئین از شیر شتر
۳۳	۱-۴-۲ چربی زدایی
۳۳	۲-۴-۲ جداسازی مخلوط کازئینها
۳۴	۳-۴-۲ مرحله دوم تخلیص
۳۴	۱-۳-۴-۲ بافر مرحله دوم تخلیص
۳۴	۲-۳-۴-۲ آماده سازی نمونه و جداسازی اجزا
	۴-۴-۲ دیالیز نمونه های ناخالص مرحله دوم
۳۵	۱-۴-۴-۲ بافر مرحله اول دیالیز (pH ۷/۳)
۳۵	۲-۴-۴-۲ بافر مرحله دوم (pH ۷/۳)
۳۵	۳-۴-۴-۲ بافر مرحله سوم دیالیز (pH ۷/۳)
۳۵	۵-۴-۲ بافر تعادل و شستشوی ستون مرحله سوم
۳۶	۶-۴-۲ بافر تعادل و شستشوی ستون مرحله دوم تخلیص
۳۶	۷-۴-۲ قرار دادن نمونه ها و جداسازی اجزا
۳۶	۵-۲ تعیین غلظت پپتیدها
۳۷	۶-۲ رسم منحنی استاندارد تعیین غلظت پپتیدها
۳۷	۷-۲ هیدرولیز پروتئین بتاکازئین
۳۸	۸-۲ اولترافیلتراسیون و جداسازی پپتیدها براساس وزن مولکولی

۹-۲ تعیین میزان آنتی اکسیدانی به روش ABTS

- ۳۸ ۱-۹-۲ محلول ABTS
- ۳۹ ۲-۹-۲ رسم منحنی استاندارد آنتی اکسیدانی
- ۳۹ ۱۰-۲ آماده سازی محلولهای کورکومین و بتاکازئین
- ۳۹ ۱۱-۲ طیف سنجی ماورای بنفش و رسم منحنی اتصال همدمای ۰.۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد
- ۴۰ ۱۲-۲ طیف سنجی فلورسانس
- ۴۰ ۱-۱۲-۲ فلورسانس ذاتی پروتئین
- ۴۰ ۲-۱۲-۲ Synchronous فلورسانس
- ۴۰ ۳-۱۲-۲ ANS فلورسانس
- ۴۰ ۴-۱۲-۲ Pyrene فلورسانس
- ۴۱ ۱۳-۲ طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی
- ۴۱ ۱۴-۲ کشت سلول
- ۴۱ ۱-۱۴-۲ تهیه محیط کشت سلولی
- ۴۲ ۲-۱۴-۲ خصوصیات رده سلولی K۵۶۲
- ۴۲ ۳-۱۴-۲ تعیین میزان سمیت سلولی
- ۴۲ ۱۵-۲ بررسی میزان حلالیت کورکومین در درون میسل

فصل سوم: نتایج

- ۴۴ ۱-۳ استخراج پروتئین بتاکازئین از شیر شتر
- ۴۶ ۲-۳ تعیین مقادیر CAC مربوط به پلیمرهای بتاکازئین
- ۴۸ ۳-۳ طیف سنجی ماورای بنفش و بررسی میانکنش بین بتاکازئین و کورکومین
- ۴۸ ۴-۳ طیف سنجی فلورسانس
- ۵۶ ۱-۴-۳ فلورسانس پروتئین در حضور کورکومین
- ۶۱ ۲-۴-۳ تعیین پارامترهای ترمودینامیکی میانکنش کورکومین و بتاکازئین
- ۶۳ ۳-۴-۳ Synchronous پروتئین بتاکازئین در حضور کورکومین
- ۶۴ ۴-۴-۳ فلورسانس کورکومین
- ۶۵ ۵-۴-۳ ANS در دماهای مختلف و در حضور و عدم حضور کورکومین
- ۶۶ ۵-۳ دو رنگ نمایی دورانی
- ۶۶ ۶-۳ حلالیت کورکومین
- ۶۷ ۱-۶-۳ طیف جذبی کورکومین در حضور و عدم حضور پروتئین بتاکازئین
- ۶۸ ۲-۶-۳ تعیین حلالیت کورکومین قبل و بعد از انحلال در پروتئین بتاکازئین
- ۶۸ ۷-۳ میانکنش پپتیدها و کورکومین
- ۶۹ ۱-۷-۳ رسم منحنی استاندارد تعیین غلظت پپتیدها
- ۷۰ ۲-۷-۳ میانکنش بین کورکومین و پپتیدهای حاصل از هیدرولیز با آنزیم تریپسین
- ۷۱ ۳-۷-۳ میانکنش بین کورکومین و پپتیدهای حاصل از هیدرولیز با آنزیم کیمو تریپسین
- ۷۱ ۸-۳ اندازه گیری خواص آنتی اکسیدانی
- ۷۲ ۱-۸-۳ خواص آنتی اکسیدانی پپتیدها
- ۷۳ ۲-۸-۳ خواص آنتی اکسیدانی مخلوط بتاکازئین و کورکومین

۷۴ ۹-۳ بررسی میزان ورود کمپلکس کورکومین- بتاکارنئین
۷۵ فصل چهارم: بحث
۸۱ نتیجه گیری کلی
۸۲ چشم اندازی به آینده
۸۳ منابع

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱: ساختار کورکومینوئیدهای طبیعی ۲
- شکل ۲-۱: تائومری کورکومین در محلول ۳
- شکل ۳-۱: اهداف مولکولی کورکومین ۱۱
- شکل ۴-۱: مسیرهای متابولیسمی کورکومین در جوندگان و در محیط *ex vivo* بر روی هیپاتوسیت‌های موشی و انسانی ۱۲
- شکل ۵-۱: ساختار میسلی بتاکازئین ۱۸
- شکل ۶-۱: ساختار میسلی α S۱ کازئین ۱۹
- شکل ۷-۱: انواع میسل‌های پلیمری ۲۵
- شکل ۸-۱: دو مدل فرضی از چگونگی میانکنش پپتیدهای دوگانه دوست با غشای سلول ۲۹
- شکل ۱-۲: میانکنش OPA و آمین‌های نوع اول با یکدیگر در حضور بتامرکاپتواتانول و سدیم دودسیل سولفات ۳۷
- شکل ۲-۲: ساختار شیمیایی ABTS ۳۸
- شکل ۳-۲: ساختار شیمیایی ANS ۴۰
- شکل ۴-۲: ساختار شیمیایی Pyrene ۴۱
- شکل ۵-۲: شمایی از روش تیخیر حلال ۴۳
- شکل ۱-۳: تصویر SDS-PAGE از مراحل اول (الف)، دوم (ب) و سوم (ج) تخلیص پروتئین بتاکازئین ۴۴
- شکل ۲-۳: کروماتوگرام مرحله سوم تخلیص بتاکازئین ۴۵
- شکل ۳-۳: نمودار سیگموئیدی تعیین CAC در دماهای ۲۵ (الف)، ۳۰ (ب) و ۳۷ (ج) درجه سانتیگراد ۴۶
- شکل ۴-۳: تغییر مقادیر CAC پروتئین بتاکازئین (β -CN) در دماهای مختلف ۴۷
- شکل ۵-۳: منحنی اتصال هم‌دمای کورکومین و پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد ۵۰
- شکل ۶-۳: منحنی ΔG_v در مقابل V و بررسی نوع میانکنشها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد ۵۰
- شکل ۷-۳: منحنی هیل و بررسی تعاونی جایگاه‌های اتصال کورکومین بر روی کازئین در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد ۵۱
- شکل ۸-۳: منحنی اتصال هم‌دمای پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد ۵۲
- شکل ۹-۳: منحنی ΔG_v در مقابل V و بررسی نوع میانکنشها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد ۵۲
- شکل ۱۰-۳: منحنی هیل و بررسی تعاونی جایگاه‌های اتصال کورکومین بر روی بتاکازئین در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد ۵۳
- شکل ۱۱-۳: منحنی اتصال هم‌دمای پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ۵۴
- شکل ۱۲-۳: منحنی ΔG_v در مقابل V و بررسی نوع میانکنشها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ۵۴
- شکل ۱۳-۳: منحنی هیل و بررسی تعاونی جایگاه‌های اتصال کورکومین بر روی کازئین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ۵۵
- شکل ۱۴-۳: نمودار استرن-ولمر (الف) و تغییر یافته استرن-ولمر (ب) پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در حضور غلظت‌های مختلف کورکومین ($16/8 - 0 \mu\text{M}$) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد ۵۷
- شکل ۱۵-۳: نمودار استرن-ولمر (الف) و تغییر یافته استرن-ولمر (ب) پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در حضور غلظت‌های مختلف کورکومین ($21 - 0 \mu\text{M}$) در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد ۵۸
- شکل ۱۶-۳: نمودار استرن-ولمر (الف) و تغییر یافته استرن-ولمر (ب) پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در حضور غلظت‌های مختلف کورکومین ($14 - 0 \mu\text{M}$) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ۵۹
- شکل ۱۷-۳: تغییرات ثابت‌های استرن-ولمر نسبت به دما ۶۰

شکل ۳-۱۸: تغییر فلورسانس ذاتی پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در دماهای مختلف (۲۵، ۳۰، ۳۷، ۴۷، ۵۷ و ۶۷ درجه سانتیگراد) ۶۰

شکل ۳-۱۹: نمودار وانت هوف ۶۲

شکل ۳-۲۰: فلورسانس Synchronous و بررسی تغییر محیط ریشه های تایروزیل پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در دمای ۲۵ درجه، در حضور و عدم حضور کورکومین ($9/28$ و $18/56$ میکرومولار) ۶۳

شکل ۳-۲۱: طیف فلورسانس کورکومین ($10 \mu\text{M}$) در حضور غلظت‌های مختلف پروتئین بتاکازئین ۶۴

شکل ۳-۲۲: تغییر در حداکثر طول موج (λ_{max}) و حداکثر نشر کورکومین ($10 \mu\text{M}$) در حضور غلظت‌های مختلف بتاکازئین ۶۴

شکل ۳-۲۳: فلورسانس ANS (200 میکرومولار) پروتئین بتاکازئین ($25 \mu\text{M}$) در حضور غلظت‌های مختلف کورکومین ۶۵

شکل ۳-۲۴: فلورسانس ANS (200 میکرومولار) پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۷ درجه سانتیگراد ۶۵

شکل ۳-۲۵: دو رنگ‌نمایی دورانی و بررسی تغییرات ساختارهای ثانویه بتاکازئین در حضور غلظت‌های مختلف کورکومین ۶۶

شکل ۳-۲۶: تغییر ساختار ثانویه پروتئین بتاکازئین ($10 \mu\text{M}$) در دماهای مختلف (۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۷ درجه سانتیگراد) ۶۶

شکل ۳-۲۷: طیف جذبی کورکومین ($10 \mu\text{M}$) به تنهایی (خط) و در حضور پروتئین بتاکازئین ($40 \mu\text{M}$) (نقطه چین) ۶۷

شکل ۳-۲۸: میزان انحلال مقادیر برابری از کورکومین در بافر فسفات (a) و بافر فسفات حاوی بتاکازئین ۱٪ (b) ۶۸

شکل ۳-۲۹: منحنی استاندارد تعیین غلظت پپتیدها با استفاده از روش OPA ۶۹

شکل ۳-۳۰: فلورسانس کورکومین در حضور غلظت‌های یکسان ($0/45 \text{ mg/ml}$) از پپتیدهای کمتر از ۳ کیلودالتون (الف)، بین ۳ و ۵ کیلودالتون (ب) و بیش از ۵ کیلودالتون (ج) پروتئین بتاکازئین که از هیدرولیز با آنزیم تریپسین بدست آمده اند ۷۰

شکل ۳-۳۱: فلورسانس کورکومین در حضور غلظت‌های یکسان ($0/45 \text{ mg/ml}$) از پپتیدهای کمتر از ۳ کیلودالتون (الف)، بین سه و ۵ کیلودالتون (ب) و بیش از ۵ کیلودالتون (ج) پروتئین بتاکازئین که از هیدرولیز با آنزیم کیموتریپسین بدست آمده اند ۷۱

شکل ۳-۳۲: آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز بتاکازئین با آنزیم تریپسین. داده‌ها به صورت آنتی‌اکسیدانی مقادیر معادل ترولوکس (TEAC) بیان شده است ۷۲

شکل ۳-۳۳: آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز بتاکازئین با آنزیم کیموتریپسین ۷۳

شکل ۳-۳۴: مقایسه آنتی‌اکسیدانی مقادیر یکسانی از کورکومین و بتاکازئین ($0/45$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و مخلوط آنها ۷۳

شکل ۳-۳۵: سمیت سلولی کورکومین (نمودار میله ای خاکستری) و کورکومین قرار گرفته در درون میسل‌های بتاکازئین (نمودار میله ای سفید). ** و * به ترتیب $P_{\text{value}} < 0/01$ و $P_{\text{value}} < 0/05$ را نشان می‌دهند. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ۱۰ تایی هستند ... ۷۴

چکیده

کورکومین ترکیب پلی فنولی آبگریزی است که علیرغم خواص دارویی ثابت شده، استفاده از آن در صنایع دارویی و غذایی به دلیل عدم حلالیت در محلولهای آبی به شدت محدود شده است.

در این مطالعه تاثیر میسل های بتاکازئین بدست آمده از شیر شتر را بر میزان انحلال و دسترسی زیستی کورکومین بررسی کردیم. پس از تخلیص بتاکازئین، CAC این پلیمر در سه دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد با استفاده از فلورسانس پابرن بررسی شد. منحنی های اتصال هم دمای مربوط به میانکنش بین پروتئین و کورکومین در سه دمای مذکور با استفاده از طیف سنجی ماورای بنفش رسم گردید. این نمودارها نشان میدهند که تقریباً ۲۰٪ مولکولهای کورکومین با استفاده از میانکنش های غیرآبگریز با پروتئین میانکنش میکنند و جایگاههای اتصال نیز به صورت تعاونی این لیگاند را در خود میپذیرند. این مطلب با بررسی بیشتر از طریق طیف سنجی فلورسانس و استفاده از معادله وانت هوف تایید گردید. همچنین افزایش دما علاوه بر افزایش ثابتهای استرن-ولمر، میزان ثابتهای اتصال را نیز بیشتر میکند و نیز فلورسانس ذاتی خود پروتئین را خاموش مینماید. بررسی میزان هیدروفوبیسیستی سطحی بتاکازئین در دماهای مختلف حاکی از آنست که با افزایش دما بخشهای آبگریز بیشتری در دسترس لیگاند قرار میگیرند. بررسی های انجام گرفته با استفاده از دورنگ نمایی دورانی نشان میدهند افزایش دما ساختار ثانویه این پروتئین را تغییر نمیدهد و به علاوه کورکومین نیز بدون هیچ گونه تغییری در ساختار ثانویه پروتئین با آن میانکنش میکند. این پلیمر زیستی حلالیت کورکومین را به میزان ۲۵۷۸ بار بهبود می بخشد. بررسی سمیت کورکومین بر روی رده سلول سرطانی K۵۶۲، در حضور و عدم حضور میسل های بتاکازئین نشان میدهد که IC_{۵۰} این ترکیب در حضور میسل بتاکازئین از ۲۶ میکرومولار به میزان ۱۷ میکرومولار کاسته میشود. به علاوه خواص آنتی اکسیدانی مخلوط بتاکازئین و کورکومین نیز به میزان قابل توجهی نسبت به کورکومین حل شده در محیط آبی افزوده میشود، این موضوع نشانه ای از افزایش میزان حلالیت و نیز احتمالاً میانکنش بین این دو ترکیب میباشد. اکثر پپتیدهایی که از هیدرولیز پروتئین بتاکازئین با آنزیمهای تریپسین و کیموتریپسین بدست آمده اند آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده نشان میدهند و تنها یکی از آنها با کورکومین میانکنشی بارز دارد.

مقدمه

۱-۱ داروهای گیاهی و اهمیت آن در داروسازی نوین

در طول تاریخ بشر، از ابتدا تاکنون تولیدات طبیعی گیاهی به دلایل مختلف مورد استفاده قرار گرفته اند. دهها هزار مورد از آنها متابولیت‌های ثانویه ای هستند که در گیاهان به منظور مقابله با بیماری و عفونت‌ها ساخته میشوند [۱]. در طی سالهای ۱۹۸۱ تا ۲۰۰۲ تقریباً ۸۷۷ مولکول کوچک دارویی در کل جهان معرفی شدند که منشا بیشتر آنها (۶۱٪) به محصولات طبیعی باز میگردد. این امر چندان تعجب برانگیز نیست زیرا داروهای گیاهی برای انسان حداقل از نظر بیوشیمیایی سودمندتر از داروهای سنتزی هستند. ۸۰٪ مردم کشورهای در حال توسعه نیازهای بهداشتی-دارویی خود را از این ترکیبات تامین میکنند، این استفاده در کشورهای توسعه یافته نیز رونق دارد به گونه ای که مطابق گزارشات سازمان غذا و داروی آمریکا سالانه ۲۴۰۰ تن زردچوبه به این کشور وارد میشود [۲].

الهام گرفتن از ترکیبات گیاهی، استفاده از آنها در فرمولاسیونهای دارویی و انتقال دانش پزشکی از تجارب قدیمی درمانی به سمت آزمایشگاهها را "داروسازی معکوس" مینامند [۳].

۱-۲ زردچوبه و ترکیبات آن

زردچوبه از ریزوم^۲ گیاه^۱ Turmeric، در طبقه بندی لینه^۳ *Curcuma longa*، تخلیص میشود و مدتهای مدیدی (از ۲ هزار سال پیش از میلاد) است که در طب سنتی کشورهای چین و هند و آسیای جنوب شرقی به طور گسترده ای برای درمان بیماریهای مختلف به کار میرود. جایگاه تاکسونومی این گیاه به صورت زیر است [۴].

Class Liliopsida
Subclass Commelinids
Order Zingiberales
Family Zingiberaceae
Genus *Curcuma*
Species *Curcuma longa*

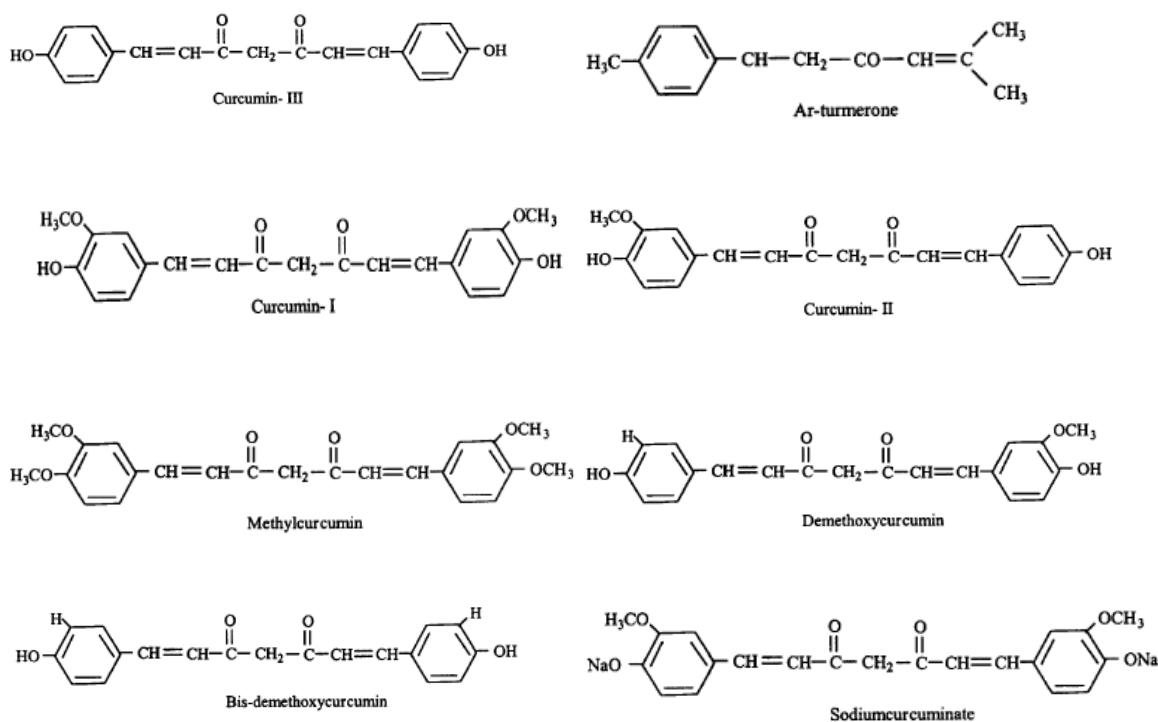
مهمترین کورکومینوئیدهای موجود در زردچوبه عبارتند از متوکسی کورکومین (کورکومین II) ، بیس دمتوکسی کورکومین (کورکومین III) و سیکلو کورکومین (شکل ۱-۱). به طور سنتی از این ترکیبات به عنوان مواد غذایی، آرایشی و دارویی استفاده می شود. اسنادی وجود دارد که نشان میدهند در طب سنتی

^۱ Reverse pharmacology

^۲ Rhizome

^۳ Linnaeus

کشور هند^۱ از این ماده برای درمان بیماریهای تنفسی (مثل آسم، بیش فعالی برونشیت ها^۲ و آلرژی)، بیماریهای کبدی، کم اشتها^۳، روماتیسم، زخمهای دیابتی، آبریزش بینی، سرفه و سینوزیت^۴ استفاده میشود است [۳]. این ماده در طب سنتی کشور چین نیز برای درمان بیماریهای مرتبط با دردهای شکمی^۵ به کار میرفته است. امروزه در طب مدرن اثرات دیگری از این ترکیب از قبیل ضد آرتروز روماتیسمی^۶، ضد انعقاد خون^۷، کم کننده قند خون، ضد سرطانی، کاهش دهنده کلسترول، ضد التهاب لوزالمعده^۸ و ضد رگزایی نیز نیز شناسایی شده است. مهمترین عاملی که جهان امروز را به استفاده از این ترکیب ترغیب می نماید، عدم سمیت آن است. به دلیل اثرات فراوان و مفید کورکومین گاهی آن را Curcumin نیز نامیده اند [۵].



شکل ۱-۱: ساختار کورکومینوئیدهای طبیعی [۱].

^۱ Ayurvedic

^۲ Bronchial -Hyper Activity

^۳ Anorexia

^۴ Sinusitis

^۵ Abdominal Pain

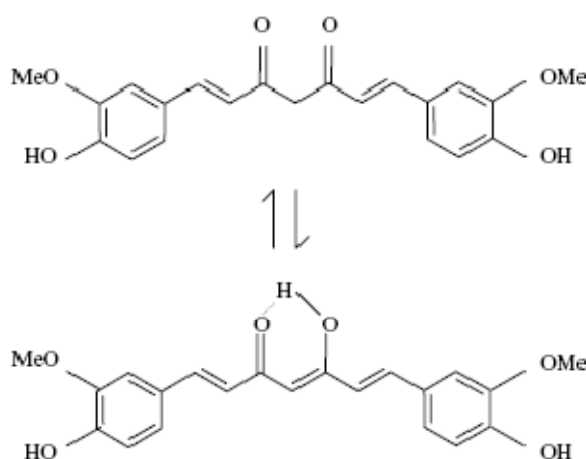
^۶ Anti Arthritic

^۷ Thrombo Suppressive

^۸ Pancreatitis

۱-۲-۱ ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی کورکومین

کورکومین مهمترین کورکومینوئید است. کورکومین (دی فروئولیل متان) یک ترکیب پلی فنولی است که نام IUPAC آن ۷-بیس (۴ هیدروکسی-۳ متوکسی فنیل)-۱،۶-هپا دی ان-۵-دی آن می باشد و تاتومری انول-کتو نشان میدهد بطوریکه این مولکول در محلولهای اسیدی و خنثی به شکل کتو و در محلولهای قلیایی عمدتاً به صورت انول وجود دارد (شکل ۱-۲). کورکومین تجاری تقریباً ۷۷٪ دی فروئولیل متان، ۱۷٪ دی متوکسی کورکومین و ۶٪ بیس دی متوکسی کورکومین دارد. کورکومین در تعادل بین اشکال دی کتو و کتو-انول به دلیل پیوند هیدروژنی درون مولکولی پایدارتر است. این ترکیب دو فنولی آنقدر ساده است که می توان آنرا در طی یک واکنش منفرد ساخت [۶].



شکل ۱-۲: تاتومری کورکومین در محلول. در pH اسیدی و خنثی شکل دی کتونی و در pH های قلیایی فرم انولی غالب است.

عمده ترین ترکیباتی که در کورکومین تجاری وجود دارند عبارتند از ۷۷٪ کورکومین I، ۲۰٪ کورکومین II و حدود ۳٪ کورکومین III. گاهی به مجموعه کورکومینوئیدها زعفران هندی و یا ginger زرد نیز اطلاق میشود [۷]. نخستین بار کورکومین در سال ۱۸۱۵ تخلیص و در سال ۱۸۷۰ به حالت کریستالی (بلوری) تهیه شد ولی ساختار شیمیایی آن در سال ۱۹۷۳ توسط Whiting و Roughley تعیین شده بود. در سال ۱۹۲۰، Lampe اسکلت فروئیل متان کورکومین را ساخت. این ترکیب در آب و اتر نامحلول ولی در اتانول، دی متیل سولفوکسید و استون قابل حل میباشد. نقطه ذوب آن ۱۷۷-۱۷۶ درجه سانتیگراد، فرمول مولکولی $C_{21}H_{20}O_6$ و وزن مولکولی اش ۳۶۹/۳۷ است. بیشینه جذب این ترکیب در متانول، در طول موج ۴۲۶ نانومتر و در استون بین ۴۳۰-۴۱۵ نانومتر می باشد. کورکومین در pH بین ۷-۲/۵ زرد درخشان و در pH بالاتر از ۷ قرمز رنگ است. حلالیت کورکومین در محیط مائی با pH بیش از ۱۱/۷ افزایش می یابد. در حلالهای آلی از قبیل DMSO، اتانول و یا استون بیشتر حل میگردد ولی در آب حداکثر به میزان

۱۱ ng/ml (معادل ۰/۰۳ میکرومولار) حل میشود [۸]. این ترکیب در pH های اسیدی پایدار ولی در pH های خنثی و یا قلیایی ناپایدار است در اینحالت کورکومین به فرولوئیک اسید و فروئولیل متان و وانیلین تجزیه میشود. قسمت عمده کورکومین (بیش از ۹۰٪) سریعاً در طی ۳۰ دقیقه ماندن در بافر فسفات، با ۷/۲ pH تجزیه میگردد. آنتی اکسیدان هایی مثل آسکوربیک اسید، N-استیل سیستئین (NAC) و گلوتاتیون از این فرایند ممانعت میکنند، این مشاهده حاکی از آنست که مکانیسم هایی اکسیداتیو در این شرایط دخیل هستند. تجزیه کورکومین در ۶-۱ pH بسیار اندک است. در مقابل تترا هیدروکورکومین یا THC، یکی از متابولیت های مهم کورکومین، در pH های خنثی و قلیایی پایدار می باشد و همچنان ویژگی آنتی اکسیدانی خود را حفظ میکند. کورکومین در محیط های کشت سلولی، حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گوساله و نیز در خون پایدار است و ۲۰٪ آن در طی یک ساعت و تقریباً ۵۰٪ آن در مدت ۸ ساعت تجزیه میگردد. ترانس-۶-(۴' -هیدروکسی-۳' -متوکسی فنیل)-۴،۲-داکسی-۵ هگزانال ترکیب عمده حاصل از تجزیه کورکومین است و وانیلین^۱، فرولیک اسید و فرولوئیل متان ترکیبات دیگری هستند که به میزان اندک بدست می آیند.

۲-۲-۱ اثرات دارویی کورکومین

۱-۲-۲-۱ خاصیت آنتی اکسیدانی

تنش اکسیداتیو نقش مهمی در بیماریزایی دارد به گونه ای که در سگته های قلبی و مغزی، همورازی، شوک، آسیب های عصبی، هیپوکسیا و سرطان میتوان همواره ردپایی از این عامل اساسی را دید. تحقیقات نشان میدهند که کورکومین نسبت به ویتامین های E و C خواص آنتی اکسیدانی بیشتری دارد و یک به دام انداز^۲ بالقوه برای گونه های فعال اکسیژن^۳ از قبیل رادیکال های آنیون سوپراکسید و رادیکال های هیدروکسید میباشد.

این ترکیب اکسیداسیون چربیها را در مدل های مختلف حیوانی مهار کرده و سلول های کلیوی (LLC-PK₁) را از آسیب های ناشی از تخریب چربیها محافظت میکند. سلول های اندوتلیال عروقی که با کورکومین تیمار شده بوده اند از طریق افزایش تولید همواکسیژناز، از آسیب های اکسیداتیو محافظت میشوند.

مطالعات آزمایشگاهی نشان داده اند که تیمار قبلی با کورکومین، میزان سیتوکین های کبدی IL-1 α و IL-1 β ، IL-2، IL-6، IL-10 را به سطح اولیه باز میگرداند و میزان NF- κ B و AP-1 را که به ترتیب پس از ۲ و ۲۴ ساعت فعال میشوند، مهار میکند. میزان آسپاراتات ترانس آمیناز در حیواناتی که با کورکومین تیمار شده اند، نشان میدهد که آسیب های ناشی از همورازی کبد در آنها کاسته شده است. این مطالب بیانگر

^۱ Vanillin

^۲ Scavenger

^۳ Reactive oxygen species (ROS)

آنست که کورکومین از طریق غیرفعال ساختن فاکتورهای رونویسی و تنظیم میزان سیتوکینها به سطح مکفی، از آسیبهای هموراژی ممانعت میکند. مصرف روزانه این ترکیب در وعده های غذایی از ابتلا به بیماریهای تحلیل برنده عصبی مثل آلزایمر پیشگیری مینماید زیرا پراکسیداسیون چربیها را مهار کرده و آنزیمهای آنتی اکسیدانی دفاعی و کاهش تشکیل پراکسی نترات را افزایش میدهد. [۹, ۱۰]

کورکومین یک دی انول دی فنولی متقارن است. گزارشات ضد و نقیضی در مورد اساس الکترونیکی- ساختاری فعالیت آنتی اکسیدانی کورکومین وجود دارد. بسیاری از آنالوگهایی که حلقه فنولی را در ساختار خود دارند، فعالیت آنتی اکسیدانی مشابهی از خود بروز میدهند اما برخی از آنالوگهایی که این حلقه را ندارند نیز از نظر آنتی اکسیدانی فعال هستند و قادرند رادیکالهای پایدار از کربن سه گانه بوجود آورند. گزارشاتی وجود دارد مبنی بر اینکه هیدروژنهای متصل به گروه های متیلن وسطی و حلقه های فنولی سبب ویژگی آنتی اکسیدانی این ترکیب میگرددند. البته آنتی اکسیدانی این ترکیب به تعداد کربنهای میانی و تقارن موجود در این ساختار مرتبط است. این مطالعات نشان داده اند که حتی اگر گروه های فنولی از آنالوگهای کورکومین حذف شوند باز هم خاصیت آنتی اکسیدانی آن حفظ میگردد، این امر به دلیل تشکیل رادیکالهای کربنی است. EF-۲۴ یکی از آنالوگهای کورکومین است که علیرغم نداشتن گروه های فنولی، در مقابل تنشهای اکسیداتیو فعال بوده و در سلولهای سرطانی اثراتی مشابه کورکومین دارد. این امر نشاندهنده آنست که بجز مسیرهای وابسته به اکسایش و احیا^۱ راههای دیگری برای ظهور این طیف وسیع از ویژگیها وجود دارد [۱۱].

۱-۲-۲-۲-۲-۲ ترمیم زخمها

ترمیم زخمها و بافتها فرایندهای پیچیده ای هستند که التهاب، ایجاد گرانولها و تغییر بافتی را به همراه دارند. در طب سنتی از کورکومین به طور موضعی به عنوان مرهم در محل گزش حشرات، بیماریهای پوستی و آبله مرغان استفاده میشود. وجود سلولهای فراوان فیروبلاست در محل زخمهایی که با کورکومین مرهم شده اند، نشان میدهد که زخم به سرعت در حال بهبود است. سلولهای مختلف سریعاً مهاجرت کرده و منبعی از فاکتورهای رشدی را فراهم می آورند. کورکومین بیان فیرونکتین و کلاژن را افزایش میدهد به علاوه این ماده بیان TGF-۸۱ و گیرنده آن و نیتریک اکسید سنتاز را افزایش میدهد. به این ترتیب رگزایی و تشکیل سلولهای اپیتلیال را تسریع میکند. میزان فعالیت NF-κB در سلولهای ماهیچه ای، که در اثر ضربه^۲ دچار آسیب شده اند، افزایش یافته و در نتیجه بازسازی این سلولها شدت میابد [۱۲, ۱۳].

^۱ Redox-dependent process

^۲ Trauma

کورکومین تولید کلاژن، هگزوآمین، DNA و نیترات را افزایش می‌دهد. کورکومین تشکیل این سلولها را بهبود میبخشد و مصرف خوراکی این ماده زخمهای دستگاه هاضمه را به گونه ای وابسته به دوز مهار میکند زیرا کورکومین فعالیت MMP-9 را کاهش داده و فعالیت MMP-2 را افزایش می‌دهد. این مطالعات همگی بیانگر آنند که کورکومین از مسیرهای مختلفی فعالیتهای خود را انجام می‌دهد و بررسی های بیشتر امکان به کارگیری این ماده را در فرمولاسیون داروهای پوستی فراهم خواهد نمود [۱۶, ۱۵, ۱۴].

۱-۲-۳-۲-۳ اثرات ضدسرطانی کورکومین

سرطان یک بیماری با نیمه عمر طولانی است و هم اکنون شیوه زندگی^۱ به عنوان عاملی مهم در ابتلا به بسیاری از سرطانها شناخته شده است. فرمولاسیون های دارویی که توسط طبیعت برگزیده شده و باقی مانده اند، همواره بر درمانهای کنونی (شیمی درمانی، رادیو تراپی، هدف درمانی) برتری دارند. بیماری دیرینه ای مثل سرطان به درمانی "کهنه کار" نیاز دارد^۲. مطالعات نشان داده اند که تنها ۱۰-۵٪ بیماریهای انسانی ناشی از عوامل ژنتیکی است و باقی در اثر شیوه زندگی کسب میگردند. علیرغم جستجوی درمانهای موثر و ایمن برای سرطان، هم اکنون از مواد خطرناکی استفاده میشود که از آن جمله میتوان به Masturd ها، شیمی درمانی و هدف درمانی^۳ نام برد که به ترتیب در سالهای ۱۹۴۰، ۱۹۷۱ و ۱۹۹۱ معرفی شدند. پیشرفتهای انجام گرفته در زمینه سرطان را میتوان تا حدودی از طریق تعداد داروهای متوجه شد که مورد تایید سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA)^۴ قرار گرفته اند. به طوریکه این تعداد در سال ۱۹۷۰ بسیار اندک بود، در سال ۱۹۸۷ هفت عدد، در سال ۱۹۹۶ ۱۶ عدد، در سال ۱۹۹۸ ۲۴ عدد و ۲۸ عدد در سال ۲۰۰۶ بوده است. ریشه بیش از ۷۰٪ از داروهای که توسط FDA پذیرفته شده اند به محصولات طبیعی برمیگردد که به طور سنتی به عنوان مرهم از آنها استفاده میشده است. از جمله آنها میتوان به وینبلاستین (از گیاه *vicna rosea*) و palitaxal (از گیاه چینی *yew*) اشاره کرد [۱۷, ۱۸].

در فرایند تشکیل سرطان بسیاری از مسیرهای پیام رسانی سلول (درون و برون سلولی) تغییر میابند اما اغلب داروهای که هم اکنون در درمان این بیماری مورد استفاده قرار گرفته اند تنها یک عامل (مسیر) را هدف قرار میدهند در نتیجه بسیاری از شرکتهای داروسازی بیشتر به داروهای علاقمندند که چندین مسیر را هدفگیری کنند. بسیاری از ترکیبات طبیعی (با ویژگی ضدسرطان) به طور ذاتی چندین هدف^۵ دارند، ارزان قیمت هستند و برخلاف داروهای سنتزی اثرات جانبی کمتری دارند. علیرغم این ویژگی به دلیل آنکه بسیاری از

^۱ Life Style

^۲ An Old Disease Such As Cancer Requires An Old Age Treatment.

^۳ Target Therapy

^۴ U.S Food And Drug Administration

^۵ Multi Target

شرکتهای داروسازی نمیتوانند این ویژگیهای بالقوه را در فرایند آماده سازی حفظ کنند، داروهای ضدسرطان مبتنی بر مواد گیاهی، هنوز جایگاه خود را در صنایع دارویی بدست نیاورده اند.

کورکومین چندین مسیر پیام رسانی را تحت تاثیر قرار میدهد، از فاکتورهای رونویسی، گیرنده های سلولی، کینازها، سیتوکینها و آنزیمها گرفته تا چندین فاکتور رشد. این ترکیب در مقابل انواع مختلفی از سرطانها مثل لوکمیما و لنفوما، سرطانهای دستگاه گوارش، سرطانهای سینه و تخمدان، سر و گردن، پوست و دستگاه عصبی ویژگیهای بالقوه بروز میدهد. ثابت شده است که کورکومین میتواند رشد تومور را در هر سه مرحله، پیشرفت، رگزایی و رشد تومور جلوگیری کند [۱۹، ۵].

۱-۲-۲-۳-۱ رگزایی^۱

رگزایی عبارتست از رشد کانالهای عروقی از رگهای از پیش موجود^۲. این فرایند در مراحل نموی حیوانات، بازسازی، ترمیم زخمها^۳ و استخوانها^۴ بسیار دخیل است ولی اگر به صورت کنترل نشده انجام گیرد یک رویداد بیمارگونه خواهد بود و اغلب با رشد تومور، آرتريت روماتوئید و اختلالات شبکه ای ناشی از دیابت^۵ و رشد غیر طبیعی ناشی از پیدایش عروق خونی^۶ همراه میباشد. تحقیقات انجام گرفته در طی سه دهه اخیر حاکی از نقش مهم رگزایی در گسترش سلولهای توموری و متاستاز آنها می باشند.

کورکومین تمایز سلولهای اندوتلیال عروق بطنی^۷ به سلولهای Matrigel و اندوتلیال تراوشی^۸، تشکیل مویرگها در انسان و نیز ساخت رگهای جدید، که ناشی از القای فاکتور رشد فیروبلستی است، را در موش مهار میکند. این فرایند وقتی کورکومین در رژیم غذایی موش فراهم باشد قابل مشاهده است [۲۰]. آزمونهای Invasion، غشای Chorio allantonic جوجه و تشکیل مجرا نشان داده اند که بسیاری دیگر از مشتقات کورکومین نیز چنین اثر مهاری را از خود بروز میدهند. آنالوگهای کورکومین از این جنبه با یکدیگر متفاوتند به گونه ای که آنالوگهای آروماتیک انون و آروماتیک دی انونی بیشترین خواص ضد رگزایی را دارند این اثرات از کاهش بیان ژنهای رگزایی، فاکتورهای رشد اندوتلیال^۹ و MMP-۹ منشا میگیرد [۲۱، ۱۸].

^۱ Angiogenesis

^۲ Pre Existing

^۳ Wound Healing

^۴ Bone Repair

^۵ Diabetic Retinopathy

^۶ Hemangiomas

^۷ Umbilical

^۸ Infiltration

^۹ Vgef

۱-۲-۲-۳-۳ سرطان کبد^۱

کارسینومای سلولهای کبدی^۲ (HCC)، سرطان وخیمی است که میزان وقوع آن در ایالات متحده و کشورهای دیگر جهان در حال افزایش است. مطالعات بسیاری تاثیر کورکومین را بر سلولهای سرطانی کبد در شرایط *in vitro* نشان داده اند و بسیاری از نشانه های آپوپتوز از قبیل فشردگی و شکست کروماتین و برش مختص آپوپتوز در RNA های ۲۸S و ۱۸S در آنها مشاهده شده است. مهار ترشح MMP-۹، افزایش سطح GSH، ممانعت از متاستاز، مهار چرخه سلولی، مهار آنزیم سولفوترانسفراز کبدی (SULT1A1)، برش PARP در سلولهای هپاتوما از دیگر مشاهداتی هستند که در رده های سلولی مختلف مورد توجه قرار گرفته اند. کورکومین مصرف شده در رژیم غذایی فعالیت آنزیمهای UGT را افزایش میدهد این آنزیم مسئول سم زدایی از عوامل سرطانزا است.

ترکیبات گلوکورونیدی و سولفات، محصولات عمده تبدیل زیستی کورکومین هستند و هگزاهیدرو کورکومین (HHC) و هگزاهیدروکورکومین گلوکورونید به میزان اندکی یافت میشوند. در بررسی های انجام گرفته، عملکرد ضد رگزایی کورکومین در سلولهای سرطانی کبد، از راه کاهش مارکرها VEGF مشخص شده است [۱۷، ۲۳].

۱-۲-۲-۳-۴ سرطان لوزالمعده

این بیماری مسئول ۶٪ کل مرگ و میرهای ناشی از سرطان است و نرخ متوسط بقای ۵ ساله^۳ مبتلایان به این بیماری ۵٪ است. تحقیقات دهه گذشته نشان داده اند که کورکومین بر انواع رده های سلولی پانکراسی اثر ضد سرطانی دارد. این ترکیب در رده سلولی MIA Paca-۲، فارنسیل پروتئین ترانسفراز را مهار کرده و میزان بیان NF-κB را در بافتهای توموری لوزالمعده و سلولهای سرطانی افزایش می یابد. همچنین از بسیاری از فعالیتهای IL-۸ ممانعت میکند. این ماده در ترکیب با Celecoxib اثرات دیگری نیز خواهد داشت که از آن جمله میتوان به کاهش بیان Cox-۲، EGFR، ERK1/۲ و Notch-۱ اشاره کرد. مشاهده شده است که همراهی کورکومین با gemcitabine بر این روند اثر سینرژیسم خواهد داشت [۲۴، ۲۵، ۲۶].

۱-۲-۲-۳-۵ سرطان راست روده

^۱ Hepatic Cancer

^۲ Hepato Cellular Carcinoma

^۳ Five-Years Survival Rate

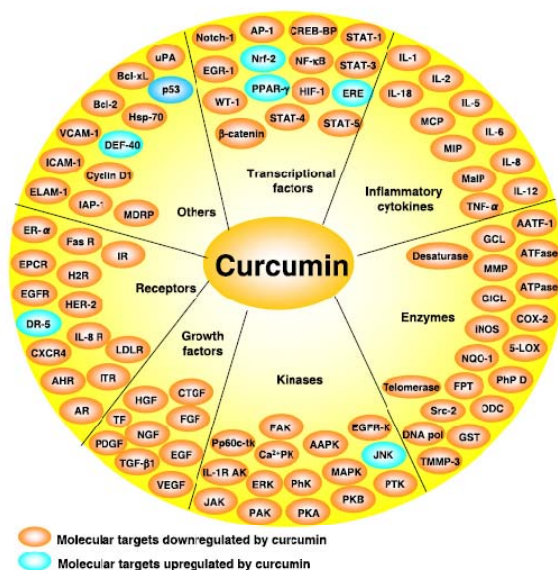
کورکومین رشد این نوع از سلولهای سرطانی را در فاز G_2/M و S متوقف کرده و مسیرهای Wnt و اتصال سلولها را مسدود میکند. آپوپتوز ناشی از کورکومین به دلیل برش $PARP$ و کاسپاز ۳، کاهش سطح $BCL-xL$ و افزایش فعالیت کاسپاز ۸ می باشد. افزایش فعالیت این کاسپاز مسیر Fas را در آپوپتوز به راه می اندازد. به علاوه بیان $mRNA$ های $NAT1$ در این سلولها کاهش می یابد. از اثرات دیگر کورکومین آنست که بیان $hsp70$ را در این سلولها به شدت مهار مینماید. مشتقات کورکومین نیز مثل $EF24$ ، آنالوگ سنتزی کورکومین، از طریق واکنشهای وابسته به اکسایش و احیا سبب القای آپوپتوز میگردند. کورکومینوئیدها، تکثیر سلولی را هدف قرار میدهند و مرگ برنامه ریزی شده را در سلولهای سرطانی کلون القا مینمایند. ثابت شده است که برخی از مشتقات کورکومین مثل دمتوکسی کورکومین اثرات مهاری بهتری بر رده سلولی $HCT116$ دارند [۲۷, ۲۸, ۲۹].

اثرات فارماکوکینتیک و فارماکودینامیکی عصاره کورکومین در بیماران مبتلا به سرطان کلون ارزیابی شده است. ۱۵ بیمار دچار سرطان بدخیم کلون به مدت چهار ماه عصاره گیاه کورکومین را دریافت کردند. نتایج نشان داد مصرف خوراکی این ماده در دوزهای بالا سمیتی نداشته و کورکومین و متابولیتهای آن، هیچ یک در خون و ادرار یافت نشدند و در مقابل بیشتر در مدفوع وجود دارند [۱۷].

۱-۲-۲-۳-۶ سرطانهای خون و مغز استخوان

کورکومین با غلظت ۱۰ میکرومولار (به مدت ۴۸ ساعت) تکثیر سلولهای $HL-60$ را به شدت کاهش داده و تمایز آنها را شدت میبخشد. اگر ترکیبات دیگری مثل رتینوئیک اسید، ویتامین D_3 و آنالوگهای آن نیز به همراه کورکومین تجویز گردند این اثرات چندین برابر خواهد شد. در سلولهای $Raji$ نیز کورکومین با مسدود کردن مراحل G_0/G_1 و G_2/M ، به صورت وابسته به دوز، میزان بیان هیستون $H4$ استیله شده را تشدید و با تجزیه $I\kappa-Ba$ و $Notch1$ از تکثیر آنها جلوگیری میکند [۱۷].

کورکومین در رده سلولی $K562$ فعالیت آنزیم تلومراز را از بین برده و بیان $STAT3$ ، $STAT5a$ و $STAT5b$ را کاهش داده و اتصال $AP-1$ و $NF-\kappa B$ را به پروموتورهای $GSTP1-1$ ، برش $PARP$ و القای پروکاسپازهای ۹ و ۸ را تحت تاثیر قرار میدهد. آنالوگهای کورکومین نیز، فعال شدن $NF-\kappa B$ و تکثیر سلولهای $KBM-5$ را متوقف میکنند و آنزیمهای $COX-I$ و $COX-II$ توسط کورکومینوئیدها مهار میشوند. بررسی های *in vitro* در موشهای شش هفته ای نشان داده است که تجویز ۲٪ کورکومین در رژیم غذایی منجر به کاهش ۵۳٪ی سرطانهای لنفوما و لوکمیا میگردد. در ۳۵ نفر از کودکان مبتلا به لوکمیا، کورکومین بیان ژن $WT1$ را در تمامی ۳۵ مورد کاهش داد [۱۷, ۳۰, ۳۱, ۳۲].



شکل ۱-۳: اهداف مولکولی کورکومین .

۳-۱ متابولیسم کورکومین

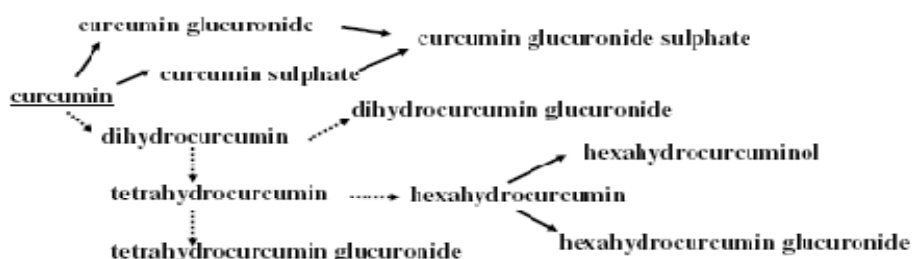
کورکومین پس از جذب تحت واکنشهای conjugation قرار میگیرد که از آن جمله میتوان به سولفوردار شدن^۱ و گلوکورونیداسیون^۲ در بافتهای مختلف اشاره کرد. کبد مهمترین اندامی است که در متابولیسم کورکومین وارد میشود. مهمترین متابولیتهای صفراوی کورکومین گلوکورونیدهای تتراهیدروکورکومین (THC)، و هگزاهیدروکورکومین (HHC) هستند. یک متابولیت ناچیز این ماده اسید دی هیدروفرولیک است که با میزان کمی اسید فرولیک همراه میباشد. علاوه بر گلوکورونیدها، ترکیبات سولفاتیه نیز در ادرار موشهای تیمار شده با کورکومین مشاهده شده اند. ۹۹٪ متابولیتهای کورکومین در پلاسمای خون به صورت گلوکورونیدی هستند. مطالعات نشان داده اند که کورکومین-گلوکورونیدها، دی هیدرو کورکومین-گلوکوزید، تترا هیدروکورکومین-گلوکوزید و تترا هیدروکورکومین(THC) عمده ترین متابولیتهای این ترکیب هستند. بالاترین سطح متابولیتهای پلاسمایی پس از ۱ ساعت از زمان مصرف بروز می یابند. اشکال احیا شده کورکومین مثل THC، HHC و اکتا هیدروکورکومین (OHC) در قطعات بافت کبد موش یافت شده اند به طوریکه در موشهای نر OHC و در موشهای ماده THC فراوان هستند [۶].

کورکومین واکنشهای احیایی بسیاری را (عمدتاً از طریق واکنشهای الکل دهیدروژناز) متحمل میشود. هنوز به درستی مشخص نیست که آیا متابولیتهای کورکومین نیز به اندازه خود آن خواص دارویی داشته باشند زیرا

^۱ Sulfation

^۲ Glucuronidation

بررسی ها نتایج متناقضی را نشان میدهند این امر به دلیل نوع آزمونهایی است که به کار گرفته میشود مثلاً برخی آزمایشات بیان میدارند THC اثر ضد دیابتی و ضدسرطانی بهتری از کورکومین دارد در حالیکه گروهی دیگر نشان داده اند فعالیت ضد سرطانی و ضد التهابی THC نسبت به کورکومین پایین تر است و از سویی دیگر ترکیبات احیا شده کورکومین نیز نمیتوانند به خوبی کورکومین بیان COX-2 را کاهش دهند (شکل ۱-۵) [۳۳].



شکل ۱-۴ : مسیرهای متابولسمی کورکومین در جوندگان و در محیط *ex vivo* بر روی هپاتوسیت‌های موشی و انسانی. فلشهای با خطوط پیوسته بیانگر این مسیرها در هپاتوسیت‌های موشی (rat) و انسانی هستند و فلشهای با خطوط گسسته مسیرهایی را نشان میدهند که در بدن موش (Mouse) به اثبات رسیده اند.

۱-۴-۱ ویژگیهای فارماکوکینتیک و فارمودینامیکی کورکومین

۱-۴-۱-۱ دسترسی زیستی^۱ و عوامل موثر در آن

دسترسی زیستی هر ترکیبی به دلیل فعالیت اندک آن در درون بدن، جذب اندک، سرعت بالای متابولیسم، و غیر فعال بودن محصولات حاصل از متابولیسم و حذف ماده موردنظر از بدن میباشد. مطالعات انجام گرفته، اثرات بسیار زیاد کورکومین را نشان داده اند اما بررسیهایی که در طی سه دهه اخیر بر روی جذب، متابولیسم، پراکندگی بافتی و دفع این ماده انجام گرفته اند بیانگر آنند که این نقص^۲ کورکومین بر اثرات مفید آن سایه افکنده است. از اینرو این ترکیب علیرغم ایمنی و کارایی بسیار بالا هنوز به عنوان یک دارو^۳ مطرح نیست.

^۱ Bio Availability

^۲ Disadvantage

^۳ Therapeutic Agent

یکی از مهمترین مشاهدات آنست که سطح سرمی کورکومین پایین است، این امر نشان میدهد که کورکومین به میزان اندکی توسط روده جذب میگردد. وقتی کورکومین از راه خوراکی به میزان 2 mg/kg تجویز گردد، پس از گذشت $0/83$ ساعت، میزان آن در سرم به مقدار $1/35 \pm 0/23 \text{ } \mu\text{g/ml}$ در هر میلی لیتر از خون میرسد، این عدد در انسانها بسیار کمتر است ($0/006 \pm 0/005 \text{ } \mu\text{g/ml}$ پس از یک ساعت). مطالعات فارماکوکینتیکی انجام شده بر روی موشها نشان میدهد که میزان حداکثر این ترکیب وقتی از راه خوراکی مصرف شود با هنگامی که از راه زیرجلدی مورد استفاده قرار گیرد، متفاوت است بطوریکه با تجویز خوراکی کورکومین (1 gr/kg) سطح پلاسمایی پس از یک ساعت به حداکثر مقدارش میرسد ($22 \text{ } \mu\text{g/ml}$) در حالیکه از طریق مصرف زیرجلدی این میزان پس از ۱۵ دقیقه به بیشینه مقدار خود میرسد ($2/22 \text{ } \mu\text{g/ml}$). در مطالعه ای که به تازگی توسط Yang و همکاران انجام گرفته، نشان داده شده است که مصرف درون رگی کورکومین با دوز 10 mg/ml ، سطح این ماده را در خون به میزان $0/36 \pm 0/05 \text{ } \mu\text{g/ml}$ میرساند این در حالیست که تجویز آن از راه دهانی به میزان ۵۰ برابر بیشتر، سطح سرمی را به $0/56 \pm 0/01 \text{ } \mu\text{g/ml}$ میرساند. به عبارت دیگر چگونگی مصرف کورکومین تاثیری بر سطح سرمی آن ندارد.

۱-۴-۲ پراکندگی بافتی

جذب و پراکندگی کورکومین در بافتهای بدن با فعالیت زیستی آن رابطه ای مستقیم دارد. Ravindranath و همکارانش اثبات کردند که پس از آنکه کورکومین به میزان ۴۰۰ میلی گرم به موشها خورانده میشود، تنها مقدار اندکی از آن به صورت تغییر نیافته در کبد و در کلیه حضور دارد. ۳۰ دقیقه پس از مصرف، ۹۰٪ آن در معده و روده کوچک یافت می شود ولی پس از ۲۴ ساعت این میزان به ۱٪ خواهد رسید. مطالعه ای دیگر که با استفاده از کورکومین نشاندار شده با تریتیوم انجام گرفت، نشان داد که در دوزهای ۴۰۰، ۸۰ و ۱۰ میلی گرم، رادیواکتیویته در خون، کبد و کلیه قابل مشاهده است و پس از ۱۲ ساعت از مصرف دوز ۴۰۰ میلی گرمی، مقدار قابل توجهی از محصولات رادیواکتیو در بافتها یافت میشوند. این آزمایشات بیانگر آن بود که تجویز دوزهای بالا منجر به جذب بیشتر (بیشتر از ۶۶-۶۰٪ دوز مصرفی) نخواهد شد. این بررسیها یک محدودیت وابسته به دوز را برای دسترسی زیستی این ماده اثبات میکرد [۳۳، ۳۴، ۳۵].

۱-۴-۳ نیمه عمر کورکومین

حذف یا پاکسازی یک ماده از تمامی بدن^۱ عامل مهمی است که فعالیت زیستی داروها را متاثر میکنند. Wahlstorn و همکارانش نشان دادند که ۷۵٪ کورکومین که به طریق خوراکی دریافت شده، از راه مدفوع دفع میشود و دفع آن از طریق ادرار، به گونه ای غیر وابسته به دوز، اندک میباشد. نیمه عمر جذب و حذف

^۱ Systematic Elimination

کورکومین (که به میزان 2 mg/kg از راه دهان جذب شود) به ترتیب عبارتست از 0.7 ± 0.31 و 0.5 ± 0.17 ساعت. البته این گزارشات در مورد انسان صادق نیست. به علاوه دوزهای کمتر از 1 gr/kg نیز در موش همین میزان نیمه عمر را دارند. این امر حاکی از عدم وابستگی نیمه عمر کورکومین به میزان کورکومین مصرف شده است [۳۶].

۱-۴-۴ آزمایشات پزشکی در حال انجام

علاقه بسیاری به بررسی بیشتر خواص اثرات درمانی کورکومین وجود دارد. اخیراً سه آزمون آغاز شده اند که نتایج آنها تاکنون منتشر نشده است. حداقل از سال ۲۰۰۸ به بعد ۱۲ آزمون در ایالات متحده، اسرائیل و هنگ کنگ در حال انجام است که در تعدادی از آنها کورکومین به تنهایی و در برخی دیگر این ترکیب با موادی دیگر مثل Quercetin و Sulindac مورد آزمون قرار دارند [۵، ۳۷].

۱-۴-۵ راهکارهایی که تاکنون برای افزایش دسترسی کورکومین پیشنهاد شده اند

در میان ترکیبات مغذی، پلی فنولها و بویژه کورکومین، به دلیل ویژگیهای آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی خود، توجه بسیاری را از سوی محققین به خود جلب کرده اند.

کورکومین در روغن سویا به میزان ۱٪ حل میشود، امولسیون کردن آن در فاز روغنی تری گلیسرولی قادر بوده است نه تنها حلالیت آن را به میزان ۱٪ برساند که به طور چشمگیری ویژگی ضدالتهابی آن را بهبود بخشد [۳۸]. کپسوله کردن در یک نوع سیکلودکستران موسوم به هیدروکسی پروپیل- γ -سیکلودکستران (HP γ CD) توانسته است حلالیت آن را در آب به میزان 2 mg/ml برساند [۳۹، ۴۰]. به علاوه استفاده از کوپلیمرهای تصادفی N-(NIPAAm) isopropylacrilamid و تولید نانوکورکومین [۴۱]، پلیمرهای سنتزی دبلوکی (PEO-b-PCL و متوکسی پلی اتیلن گلیکول) [۴۲، ۴۳]، قرار دادن کورکومین در درون لیپوزوم [۴۴]، میسل های مخلوط کازئین [۴۵]، میسل های HSA [۴۶]، میسل های یونی CTAB و SDS و DTAB [۴۷]، هیدروژلهای پلی وینیل الکل [۴۸] از دیگر این کوششها هستند.

تغییرات شیمیایی مثل ساخت آنالوگهای کورکومین نیز در این مسیر به کار گرفته شده اند. افزودن گروه گلوکز به کورکومین در محیط کشت گیاهی از آن جمله است، پیش-داروی^۱ بدست آمده (curcumin ϵ' , ϵ'' -O- β -D-diagentiobioside) در آب حلالیتی برابر با 240 mg/ml دارد [۴۹].

^۱ Prodrug

بجز نشاسته های تغییر یافته با گروههای آبگریز [50] و میسل های مخلوط کازئینی (هر دو با غلظتهای بحرانی میسلی شدن بسیار زیاد به ترتیب (w/v) 0.5٪ و 1 mg/ml) بقیه موارد را نمیتوان در صنایع غذایی به کار برد.

۱-۵ کازئین های شیر

۱-۵-۱ ویژگیهای توالی و تکاملی

کازئین ها خانواده ای بزرگ از فسفو پروتئینها هستند که در شیر همه پستانداران یافت میشوند و کلاً به صورت تجمعات یا میسل هایی از پروتئین و فسفات کلسیم وجود دارند. این پروتئینها با استفاده از فرایند جذب کلسیم میتوانند غلظت فسفات کلسیم محیط را تنظیم نمایند. اخیراً ثابت شده است که آنها عضوی از خانواده بسیار بزرگ فسفو پروتئینهای متصل شونده به کلسیم و ترشح شونده هستند. همه اعضای این خانواده از یک جد مشترک منشا میگیرند، از جمله آنها میتوان به پروتئینهای ماتریکس مینا و عاج دندان، پروتئینهای بزاقی و پروتئینهای ماتریکس خارج سلولی استخوان اشاره کرد. ژن همه این پروتئینها هنوز پس از واگرایی^۱ بسیار، ویژگیهای ساختاری و توالی خود را حفظ کرده است. به نظر میرسد ژن کازئینها سالها پیش از ظهور Monotreme ها (نوعی پستاندار تخمگذار) در دوره ژوراسیک، از ژن پروتئینهای ماتریکس مینای دندان اشتقاق یافته باشد.

کازئین های شیر غنی از کلسیم و فسفات هستند و این مواد معدنی در محیط میسل های کازئینی از خلال غدد پستانی عبور میکنند. با در نظر گرفتن این میسل ها به عنوان توده ای کلوئیدی، میتوان بسیاری از ویژگی های فیزیکی و تکنولوژی میسل های کازئین (مثل انتشار، ویسکوزیتی و پراکنش نور) را توصیف کرد [51، 52].

مجموعه ای از چهار پروتئین $\alpha S1$ ، $\alpha S2$ ، β و κ کازئین، همراه با خوشه های کلسیم فسفات، از طریق میانکنشهای یونی و الکترواستاتیک با یکدیگر پیوند می یابند و این میسل ها را بوجود می آورند. برای چنین اتصالی چندین مدل پیشنهاد شده است که معتبرترین آنها مدل اتصال دوگانه^۲ است [53].

کازئین ها نیز مانند سایر پروتئینهای خانواده فسفو پروتئینهای ترشح شونده، ویژگیهای ساختاری و توالی مشترکی دارند. یکی از این ویژگیها موتیف Ser-Xaa-Glu است (Xaa هر آمینواسیدی میتواند باشد)، این توالی ها به عنوان یک شاخص فسفریلاسیون پس از ترجمه هستند که در غدد پستانی توسط کازئین کینازها

^۱ Divergence

^۲ Dual Binding

فسفریله میگردند و ریشه های سرین آنها به صورت خوشه های سرینی دو، سه و چهارتایی حضور دارند. چنین مجموعه هایی در αS و β کازئین به خوبی حفظ شده اند. خوشه های سرینی و ریشه های اسیدگلوتامیک بعدی سبب میشوند در نقشه های هیدروفویسیتی پروتئینهای کازئین، مناطقی با شیب سرپایینی^۱ مشاهده شود. در pH طبیعی شیر (۶/۷) تراکم بارهای منفی بر روی این پروتئینها افزایش می یابد. این پروتئینها در محیط شیر با استفاده از نانو خوشه های کلسیم-فسفات به صورت میسل هایی با قطر حدود ۳۰۰ نانومتر آرایش می یابند به گونه ای که پس از حذف این ذرات معدنی، بیشتر سدیم کازئینات به صورت مخلوطی از منومرها و نانوذرات کازئین (۱۰-۲ نانومتر) در میآیند. میزان دقیق تجمع سدیم کازئینات به چندین عامل بستگی دارد که عبارتند از نسبت کازئینهای منومری مختلف، دما، pH، قدرت یونی و غلظت یون کلسیم [۵۴].

کازئین ها آبگریز نیز هستند، چنین آرایشی از ریشه های آبدوست و آبگریز، به کازئین ها طبیعتی دوگانه دوست بخشیده است به گونه ای که ویژگی این پروتئینها در عمل به عنوان شوینده های روغن در آب^۲ به این خصیصه اشاره دارد.

پراکندگی ریشه های باردار، خوشه های فسفوسرین، تعداد و پراکندگی ریشه های غیرقطبی همگی سبب میگردند تا اشکال مختلفی از خودتجمعی را در مورد این کازئین ها شاهد باشیم. به گونه ای که میسل های بتاکازئین را همانند یک میسل جوجه تیغی مانند^۳ توصیف میکنند، که در بین منومر و میسل آن تعادل وجود دارد، از تجمع پروتئین $\alpha S1$ کازئین نیز پلیمرهایی خطی و کرمی شکل بوجود می آید [۵۵].

علاوه بر میانکنشهای آبگریز، دافعه الکترواستاتیک نیز در تجمع این پروتئینها نقش دارد، این برهمکنشها برخلاف میانکنشهای آبگریز، دور بعد هستند و در مطالعه میانکنشهای پروتئین-پروتئین اهمیت به سزایی دارند و در میانکنش کازئینها نیز به وضوح بروز می یابند. میانکنشهای یونی میزان پلیمریزاسیون را تعریف کرده و از رشد توده پروتئینی جلوگیری مینمایند. بنابراین تغییر pH، از طریق افزایش یا کاهش بار پروتئین، اندازه پلیمر را تغییر خواهد داد. افزایش قدرت یونی محلول نیز محدوده دافعه الکترواستاتیک را کاهش داده و امکان تشکیل پلیمرهای بزرگتر را فراهم میآورد [۵۱].

کازئین های آلفا ($\alpha S1$ و $\alpha S2$) و بتاکازئین را کازئین های حساس به کلسیم می نامند زیرا این پروتئینها در حضور کلسیم رسوب میکنند و شدت حساسیت آنها نیز به ترتیب فوق الذکر است. کاهش دما پیوندهای

^۱ Downward Spike

^۲ Oil In Water

^۳ Hedgehog

آبگریز را کاهش داده و بنابراین انتظار داریم منومرهای بتاکازئین در دماهای پایین و تجعات میسلی آن در دمای اتاق و بالاتر مشاهده گردند.

۱-۵-۲ ویژگیهای ساختاری کازئینها

اطلاعات ساختار سه بعدی یک پروتئین به طور آزمایشگاهی از دو راه مختلف بدست میآید، کریستالوگرافی اشعه ایکس (و گاهی نوترونی) و طیف سنجی رزونانس هسته^۱ (NMR). تاکنون بیش از ۱۲۰۰۰ عدد از ساختارهای پروتئینی در داده پایگاه های پروتئینی مثل PDB قرار داده شده اند که از ساختار کریستالی بدست آمده اند و ۲۰۰۰ مجموعه نیز از طریق NMR حاصل شده اند، البته هر یک از این فایلها مخصوص یک پروتئین نیست و برخی پروتئینها چندین ساختار دارند که در شرایط مختلف pH، دما و مواد افزودنی متفاوت و توالیهای دچار جهش تعیین گشته اند.

یکی از شاخصه هایی که کازئین ها را از پروتئینهای دیگر شیر مجزا میکند آنست که کازئین ها ساختاری باز و منعطف دارند و نمی توان برایشان یک دمای دناتوراسیون مشخصی پیشنهاد کرد، ساختار سه بعدی آنها برحسب شرایط محیطی متغیر است از این خصیصه با عنوان ساختار Rheomorphic نام میبرند. چنین ساختاری در بسیاری از پروتئینهای دیگر از قبیل سینوکلئین^۲، تاو^۳ و انتهای کربوکسیل پروتئین پرئون^۴ نیز مشاهده میگردد. ثابت شده است که چنین ساختاری در بسیاری از توالیهایی که ریشه های محافظت شده با زوایای فی و سای^۵ دارند و در ناحیه ماریچ پلی پرولینی II قرار میگیرند مشاهده میگردد. اساساً دو تا از این ماریچها قادرند با تشکیل پیوند هیدروژنی (از طریق زنجیره اصلی پروتئین) یک صفحه بتا با پیچش چپگرد را بوجود آورند. اما این رویداد در کازئینها روی نمیدهد و اصولاً ساختار آنها منجر به ویژگیهای Foaming، شویندگی، تشکیل شبکه های ژل مانند و پایداری بسیار آنها به حرارت میگردد. مدلهایی تئوری برای ساختار کازئین ها پیشنهاد شده است ولی نمیتوان این پروتئینها را به درستی جزء پروتئینهای کروی بحساب آورد. به علاوه سیستم ایمنی نیز به دلیل چنین ساختاری به سختی قادر است بر علیه کازئین ها آنتی بادی تولید کند [۵۶].

کازئین ها از جنبه های مختلفی مثل بار ($\beta > \kappa > \alpha S1 > \alpha S2$)، هیدروفوبیسیستی ($\beta > \kappa > \alpha S1 > \alpha S2$) و حساسیت به کلسیم ($\alpha S2 > \alpha S1 > \beta > \kappa$) با یکدیگر متفاوتند. ساختار ثانویه آنها نیز بالطبع متنوع خواهد بود. پراکندگی بار در طول رشته های کازئین های آلفا S1 و S2 همگن است در حالیکه پروتئینهای

^۱ Nuclear Magnetic Resonance

^۲ Synuclein

^۳ Tau

^۴ Prion protein

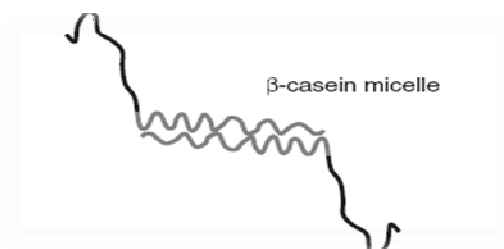
^۵ Phi-Psi

کاپا و بتا از نظر بار، دو منطقه کاملاً مجزا دارند و بنابراین از ساختاری دوگانه دوست تشکیل شده اند، بتاکازئین در (pH ۶/۷) انتهای آمین، بسیار آبدوست و باردار (آمینواسیدهای یک الی ۲۱) است در حالیکه انتهای کربوکسیل بار اندکی دارد و یا بدون بار است در نتیجه رفتارهای تجمعی این کازئین ها و عوامل موثر بر آنها با یکدیگر متفاوت خواهد بود.

۳-۵-۱ خودتجمعی کازئین ها

کازئین ها کوپلیمرهای دوگانه دوست پیچیده ای هستند که تمایل بسیاری به خودتجمعی و چسبیدن به سطوح آبگریز دارند و در حالت مجزا معمولاً به صورت کلوئیدهای مجتمع^۱ یافت میشوند.

بتاکازئین یک شوینده و پایدارکننده کلوئیدی بسیار خوب است و برخلاف بیشتر پروتئینها هیچ پیوند متقاطع درونی در آن تشکیل نمیگردد و بنابراین هیچ تمایلی به پلیمریزه شدن از طریق پیوندهای دی سولفیدی بین مولکولی ندارد [۵۷]. پراکندگی ناهمسان^۲ ریشه های غیرقطبی و آبدوست، ساختار دوگانه دوست شاخصی را در این مولکول بوجود می آورد به گونه ای که این مولکولها در غلظتی بالاتر از غلظت بحرانی، میسل هایی شبیه به شوینده ها^۳ و تقریباً کروی را بوجود می آورند. نیروی پیش برنده این خودتجمعی نیروهای آبگریزی هستند و میزان تجمع با افزایش دما و قدرت یونی بیشتر میگردد (شکل ۱-۶) [۵۸].



شکل ۱-۵ : ساختار میسلی بتاکازئین.

میسلی شدن پروتئینهای بتا و کاپاکازئین به طور سنتی به صورت تعادل "همه یا هیچ" و یا نوع "اتصال بسیار نزدیک"^۴ در بین منومرها و میسل تعریف میگردد. چنین تعادلی شدیداً تحت تاثیر دما است ولی قدرت یونی بر آن اثری ندارد. تصور میشود تعداد مولکولهای سازنده میسل^۵ (n) در این تعادل ثابت باشد (n تقریباً

^۱ Associational Colloids

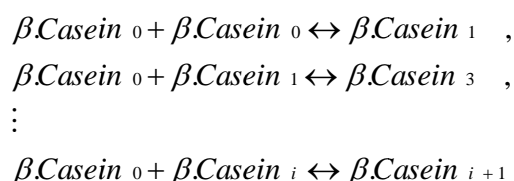
^۲ Non-Uniform

^۳ Surfactant- Like

^۴ Close Association

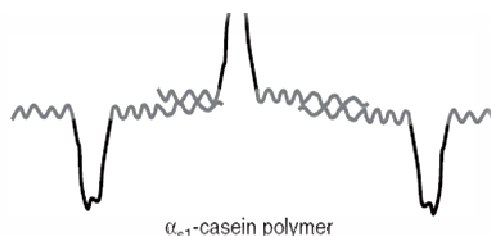
^۵ Micellisation Number

۲۰-۵۰). Mikheeva و همکارانش نشان دادند که میسلی شدن بتاکازئین را میتوان تقریباً به درستی با استفاده از مدل موسوم به پوسته توصیف کرد. در این مدل با نصف حداکثر تعداد مولکولهای بتاکازئین در تشکیل میسل ($n/2$) میتوان یک میسل ایجاد کرد، بنابراین



یافته های آزمایشگاهی بدست آمده نیز مدل پوسته ای را تایید میکنند [۵۹].

کازئین α_1 نیز دوگانه دوست است اما پراکندگی ریشه های غیرقطبی و آبدوست آن از نظر آماری کمی تصادفی تر از ریشه های معادل در بتاکازئین می باشد و ریشه های آبگریز در انتهای مولکول پراکنده شده اند به گونه ای که برخلاف بتاکازئین از طریق مجموعه ای از میانکنشهای آبگریزی و یونی به صورت زنجیره های بلند کرمی شکل^۱ در کنار هم قرار میگیرند (شکل ۱-۶). قدرت یونی شدیداً بر این تعادل اثر میگذارد ولی دما تاثیر اندکی بر آن دارد.



شکل ۱-۶: ساختار میسلی α_1 کازئین.

چنین ویژگیهای خودتجمعی و فعال سطحی پلیمرهای کازئین، آنها را برای ایجاد فورمولاسیونهای ژلی، Foam و امولوسیونی بسیار مناسب میسازد. این پروتئینها در شرایط ویژه از نظر pH، قدرت یونی (و در نتیجه) بار سطحی قادرند به قطرات چربی خواص پایدارکننده فضایی^۲ ببخشند [۶۰].

^۱ Long Chain –Worm Like Aggregates

^۲ Steric stabilizing properties

۱-۶ مواد غذایی پروتئینی^۱، اساسی برای طراحی سیستم های انتقالی

پروتئینها به دلیل خواص فیزیوشیمیایی خود، ویژگیهای عملکردی منحصر به فردی دارند که از آن جمله میتوان به توانایی شان به تشکیل ژل و امولسیون ها اشاره کرد. از این قابلیت میتوان برای کپسوله کردن ترکیبات زیستی مفید در قالب هیدروژل ها، میکرو و نانوذرات بهره برد.

غذای کاربردی^۲ یکی از جدیدترین چشم اندازهای پیش روی علوم و فناوری غذایی است. براساس تعریف کمیته بین المللی داده های غذایی^۳ (IFIC) این گونه غذاها عبارتند از آنهایی که فوایدی فراتر از بحث صرفاً تغذیه ای^۴ دارند و در سالهای اخیر از نظر جوامع علمی، مصرف کنندگان و صنایع غذایی بسیار مورد توجه گرفته اند و فهرست آنها (ویتامینها، پروبیوتیکها^۵، پپتیدهای فعال زیستی، آنتی اکسیدانها و ...) بی انتها است. قرار دادن این ترکیبات در ماتریکسهای غذایی راهی ساده است تا به این ترتیب بتوان به طور روزمره از آنها در طول حیات افراد جامعه استفاده کرد. تاثیر مواد مغذی در جلوگیری از انواع بیماری بستگی به این دارد که دسترسی زیستی این ترکیبات حفظ گردد. این امر خود چالش بزرگی را برمی انگیزد زیرا تنها تعداد بسیار اندکی از مولکولها پس از مصرف از طریق خوراکی فعال باقی میمانند چرا که زمان باقی ماندن شان در دستگاه گوارش، نفوذ پذیری و حلالیت کم آنها در روده، ناپایداری و شرایط آماده سازی غذا (اکسیژن، دما و نور) یا درون دستگاه گوارش (pH، آنزیمها، حضور سایر مواد) همگی فعالیت آنها را محدود میکنند. بنابراین انتقال این مولکولها نیاز به فرمولاسیونهای غذایی دارند و کارخانه ها نیز باید مکانیسمهایی را فراهم کنند که شکل فعال مولکول تا زمان مصرف حفظ گردد و به علاوه آن ترکیب را به درستی به مکان فعالیت هدف فیزیولوژیکی انتقال دهد. در سالهای اخیر کوششهای فراوانی به منظور کشف و طراحی روشها و مواد لازم برای کپسوله کردن چنین ترکیباتی و قرار دادن آنها در ترکیبات غذایی آغاز شده است. برای این منظور از راههای مختلفی استفاده میشود که امولسیون کردن، تغییر شیمیایی و قرار دادن آنها در سیستمهای حامل از آن جمله اند [۶۱].

سیستم هایی انتقالی، مبتنی بر پلیمرها^۶ طراحی شده اند که با به دام اندازی مولکول مورد نظر در درون شبکه خود، نه تنها از آن محافظت میکنند بلکه ویژگی های منحصر به فردی نیز به آن میبخشند، این پلیمرها را میتوان به دو دسته عمده طبقه بندی کرد؛ پلیمرهای سنتزی و طبیعی (غیر سنتزی).

^۱ Protein-Based Food

^۲ Functional Food

^۳ International Food Information Council (IFIC)

^۴ Health Benefits Beyond Basic Nutrition

^۵ Probiotic

^۶ Polymer- Based Delivery System

از جمله پلیمرهای غیر سنتزی میتوان به پروتئینها و کربوهیدراتهایی مثل سیکلودکستران، نشاسته و ... اشاره کرد. علیرغم آنکه تعداد پلیمرهای سنتزی فراوان است اما نمیتوان از آنها در صنایع غذایی استفاده کرد زیرا لازم است این ترکیبات بسیار ایمن^۱ باشند. در این بین اخیراً نشاسته هایی تغییر یافته با گروههای آبگریز^۲ طراحی شده اند که قادر هستند حلالیت کورکومین را به میزان ۱۶۷۰ برابر افزایش دهند و اثرات سیتوتوکسیک کورکومین را نیز بهبود بخشند اما غلظت بحرانی میسلی شدن آنها بسیار بالا است. بیوپلیمرهای غذایی بویژه پروتئینها به طور گسترده ای در فرمولاسیون های غذایی به کار میروند و GRAS نیز هستند. مقالات بسیاری به طور برجسته به خواص کاربردی پروتئینهای غذایی پرداخته اند [۶۱, ۶۲].

بدون شک هیدروژلهای پروتئینی مطلوب ترین و پرکاربردترین ماتریکسهای به کار گرفته شده در صنایع غذایی اند اما در مورد محصولات غذایی غیر جامد و یا نیمه جامد^۳ لازم است اندازه ماتریکس کوچک گردد تا به این ترتیب بدون تحت تاثیر قرار دادن مراحل تعیین کیفیت غذا، در فرمولاسیون جای بگیرند به علاوه با کاهش اندازه ماتریکس از میکرومولار به نانومولار میتوان پروتئینهای ناقل جدیدی بدست آورد که ویژگیهای انتقالی و مکانیسم رهایش آنها بهبود یافته باشد. برای این منظور دو شیوه به کار گرفته میشود، روش Top down و روش Bottom up. در روش اول از طریق شکستن مواد اولیه، ساختارهای مورد نظر بدست می آیند اما در روش دوم از موادی استفاده میشود که قادر به خود تجمعی^۴ هستند. از اینرو علاوه بر هیدروژلها، سیستمهای مبتنی بر پلیمرهای ذره ای نیز به عنوان ابزارهای مولکولی انتقالی فعال، بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. این میکروذرات معمولاً اندازه ای کمتر از ۱۰۰۰ میکرون دارند و ترکیبات جامد، مایع و یا گازی در درون این ماتریکسها کپسوله شده و یا به سطح آنها جذب گردیده اند.^۵ در گذشته از این مواد به طور گسترده ای برای پوشاندن مزه یا بوی نامطلوب ترکیبات غذایی و یا سهولت تبدیل مواد جامد به مایع استفاده میشد [۶۳].

ویژگیهای فیزیکی شیمیایی پروتئینها آنها را به عنوان پوشاننده هایی مطلوب تبدیل کرده است به گونه ای که در طی دو دهه اخیر علاقه بسیاری به استفاده از پروتئینهای حیوانی و گیاهی متمرکز شده است که از آن جمله میتوان به ژلاتین [۶۴]، کلاژن [۶۵]، کازئین [۶۶]، پروتئینهای Whey در جانوران [۶۷] و پروتئینهای گیاهی مثل Glycinin سویا [۶۸]، زئین و گلیادین^۶ گندم [۶۹] اشاره کرد. به علاوه ذرات حاوی ماتریکسهای چندین ترکیبی^۷ از قبیل پروتئین- پلی ساکارید [۷۰]، پروتئین- پلیمرهای سنتزی [۷۱] نیز ساخته

^۱ Generally Recognized As Safe (GRAS)

^۲ Hydrophobically Modified Starch

^۳ Semi Solid

^۴ Self- Assambly

^۵ Adsorb

^۶ Gliadin

^۷ Multi- Component

ساخته شده اند. همچنین این پروتئینها را میتوان با استفاده از گروههای آمینی نوع اول و یا گروههای سولفیدی به ترکیبات متعددی متصل کرد. هم اکنون محققین به منظور افزایش دسترسی زیستی این ترکیبات در تلاشند تا از طریق پوشاندن سطوح آنها با پروتئین زمان گردش شان را در مسیر لوله گوارش افزایش دهند و به این ترتیب ویژگیهای چسبندگی این ناقلین را شدیداً بهبود بخشند [۶۱].

برخی پروتئینها اختصاصاً به جایگاههای حاوی ریشه های قندی، که بر سطح سلولهای اپیتلیالی جای گرفته اند، متصل میشوند از جمله آنها میتوان لکتین ها را نام برد که به حاملین PVM/MA اتصال یافته اند. در مقابل ذرات پوشانیده شده با BSA ظرفیت بسیاری برای اتصال به موکوس معده دارند به علاوه سطوح غنی شده از پروتئین^۱ میتوانند اثرات عمده ای بر جذب اختصاصی یک ترکیب به درون جمعیت ویژه ای سلولها داشته باشند و از تاثیرات نامطلوبی که ممکن است یک ترکیب در طول لوله گوارش داشته باشند پیشگیری کنند، از انواع آنها میتوان به نانوذرات کیتوزان اشاره کرد که با بتا لاکتاگلوبین (Blg) پوشانیده شده اند. این پروتئین در حالت طبیعی اجازه رهایش ترکیب برموفنل بلو را در محیط اسیدی معده نمی دهد و به علاوه در مقابل فعالیت کاتالیتیکی آنزیم پپسین و pH بسیار پایین درون معده مقاوم است. در مقابل اشکال غیرطبیعی این پروتئین چنین ویژگی ندارد. Blg در درون روده کوچک توسط آنزیمهای پانکراسی تجزیه شده و پلیمر کیتوزان، که به دلیل ویژگیهای چسبندگی مطلوب پروتئین به جداره سلول نزدیک شده است، به تدریج ترکیب درون خود را به درون سلول روده منتقل میکند [۷۲، ۷۳]. با این حال نمیتوان به درستی اهمیت نانوتکنولوژی را در صنایع غذایی درک کرد زیرا در مورد ویژگیهای فیزیکیوشیمیایی و آرایش سیستم های نانو و میانکنش میان آنها و ترکیبات مغذی دانش کافی نداریم. از این رو برای دستیابی به یک روش عملی مبتنی بر واقعیت، لازم است درک ما از اصول میانکنشهای پروتئین- پروتئین و پروتئین- ترکیبات مغذی (در سطح مولکولی) و تاثیر آن بر ویژگیهای عملکردی پروتئین افزایش یابد تا به این ترتیب طراحی ناقلین مورد استفاده در صنایع غذایی به گونه ای مطلوبی تضمین گردد [۶۱].

۷-۱ میسل های پلیمری

۱-۷-۱ اهمیت میسل ها در صنایع دارویی

به منظور کاهش تخریب و از دست رفتن داروها، حذف اثرات جانبی نامطلوب، افزایش دسترسی زیستی آنها، هدف گیری شان به مکانی خاص در بدن، سیستم های مختلفی برای انتقال دارو طراحی شده اند که از آن جمله میتوان به پلیمرهای محلول، میکروذرات ساخته شده از پلیمرهای طبیعی و سنتزی، میکروکپسولها،

^۱ Protein-Enriched Surfaces

سلولها، اشباح سلولی^۱، لیو پروتئینها، لیپوزومها^۲، دندروزومها^۳ و میسل ها اشاره کرد. هر یک از این ناقلین عیوب و محاسن ویژه خود را دارند از اینرو برای انتخاب یک حامل دارویی باید چندین عامل را در نظر گرفت که چگونگی تجویز (مصرف) دارو، نیمه عمر دارو، نیمه عمر حامل در درون بدن، اندام مورد هدف، نوع و شیمی داروی مورد نظر و ... از آن جمله اند [۷۴، ۷۵].

میسل ها محسنات زیادی دارند، آنها قادرند (برخلاف دندروزومها و لیپوزومها) داروهای نامحلول در آب را به خوبی در بخش درونی خود پذیرفته، حل کرده و حمل نمایند. اندازه کوچک میسل ها امکان تجمعشان را در رگهای ظریف بافتهای بیمار (بویژه بافتهای سرطانی) فراهم میآورد. لیپوزومها و دندروزومها نیز از این نظر حائز اهمیت اند اما یافته های آزمایشگاهی ثابت کرده اند که این حاملین بیشتر توسط سیستم ماکروفاژی مورد حمله قرار میگیرند و از اینرو سریعتر از میسل ها از سیستم زیستی حذف خواهند شد [۷۶].

۱-۷-۲ ساختار میسل ها

میسل ها اجسامی تک لایه و معمولاً کروی، با منومرهایی دوگانه دوست هستند که بخش آبدوست آنها در محیط مائی به سمت بیرون قرار گرفته و در درون میسل قسمتهای آبگریز از طریق میانکنش با هم (عمدتاً آبگریزی) آنتروپی محیط را افزایش میدهند. این سیستمهای کلوئیدی به خانواده ای بزرگ از سیستمهای dispersed تعلق دارند. سیستمهای dispersion را از نظر اندازه میتوان به سه دسته تقسیم کرد، dispersion های مولکولی (کمتر از ۱ nm)، کلوئیدی (۵۰-۱۰۰ nm) و dispersion های بزرگ^۴ (با اندازه ای بیش از ۰/۵ میکرون). dispersion های کلوئیدی را از منظر دیگر میتوان به سه دسته لیوفیلی^۵، لیوفوبی^۶ و کلوئیدهای تجمعی^۷ تقسیم بندی کرد که میسل ها در گروه سوم جای میگیرند [۷۷].

منومرهایی دوگانه دوست در غلظتهای پایین به سطح محلول- هوا رفته و دمهای غیرقطبی شان را به سمت محیط بیرونی قرار میدهند تا به این ترتیب میزان آنتروپی سیستم را افزایش دهند، با افزایش تدریجی غلظت مولکولهای دوگانه دوست، این منومرها علاوه بر قرارگیری در سطح، توسط مولکولهای آب به سمت هم رانده شده و به ناچار از طریق میانکنشهای آبگریز در کنار یکدیگر قرار میگیرند و این گونه از کاهش آنتروپی سیستم جلوگیری میشود.

^۱ Cell Ghost

^۲ Liposome

^۳ Micelle

^۴ Coarse Dispersion

^۵ Lyophilic

^۶ Lyophobic

^۷ Associated Colloids

کمترین غلظتی از مولکولها که برای تشکیل این تجمعات لازم است، را غلظت بحرانی میسل^۱ شدن^۱ و تعداد مولکولهای سازنده یک میسل را **Aggregation number** (عدد تجمعی) مینامند، در نقطه CMC نواحی حذفاصل سطح- هوا و محیط درونی محلول از منومر اشباع شده اند. تشکیل این اجتماعات مولکولی وابسته به دما است، دمایی که در آن میسل ها ایجاد میشوند را دمای بحرانی تشکیل میسل^۲ مینامند، در دمای بیش از دمای بحرانی، تجمعات مولکولی و در دمای کمتر از آن منومرها به میزان بیشتری وجود دارند.

۱-۷-۳ انحلال پذیری در میسل ها

مهمترین ویژگی میسل ها که اهمیت چشمگیری در داروسازی دارد عبارتست از توانایی آنها در حل کردن مواد نامحلول در درون خود. معمولاً میسل های غیر یونی به عنوان میسل های دارو رسانی استفاده میشوند. پراکندگی آب در طول ساختار این میسل ها **Anisotropic** است، به عبارت بهتر غلظت آب از سمت سطحی به سمت مرکز (هسته) آن به تدریج کاهش می یابد از اینرو چنین میسل هایی یک شیب قطبیت دارند، از سطح هیدراته شده تا هسته آگریز. در نتیجه موقعیت فضایی یک ماده محلول (مثل یک ترکیب غیر قطبی دارویی) در میسل به قطبیت آن بستگی دارد. مولکولهای کاملاً غیر قطبی در هسته میسل حل میشوند و مولکولهای غیر قطبی بر سطح میسل میچسبند^۳ و موادی با قطبیت متوسط در مکانی حدواسط هسته و سطح قرار میگیرند. ظرفیت پذیرش مولکولهای غیر قطبی در شوینده ها به عوامل بسیاری بستگی دارد که از آن جمله میتوان به ساختار شیمیایی دارو و سورفکتانت^۴، طبیعت دارو، جایگاه قرارگیری دارو، دما، pH و ... بستگی دارد. بدیهی است با افزایش قطر بخش هسته میسل، فشار لاپلاس^۵ کاسته می شود زیرا انحنای سطحی میسل کاهش می یابد و به این ترتیب ترکیب غیر قطبی راحتتر به درون بخش مرکزی وارد میگردد.

تا همین اواخر از کلوئیدهای لیوفیلی در فرمولاسیونهای دارویی استفاده میشد اما این کلوئیدها از نظر ترمودینامیکی ناپایدارند و تجمعات آنها بسیار بزرگتر است. پس از چندی کلوئیدهای خود تجمع یابنده که در محیط *in vivo* به صورت طولانی تری پایدار هستند مورد توجه قرار گرفتند. اندازه کوچک چنین کلوئیدهایی (حدود ۱ nm) امکان ورودشان را به بافتهای مختلف فراهم کرده و به علاوه هیچ واکنش زیستی را در بدن تحریک نمیکند [۷۷].

^۱ Critical Micelle Concentration (CMC)

^۲ Critical Micelle Temperature (CMT)

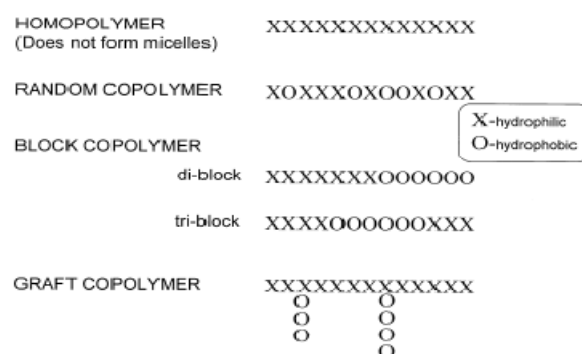
^۳ Adsorb

^۴ Surfactant

^۵ Laplas Pressure

۱-۷-۴ میسل های پلیمری^۱ دوگانه دوست

میسل های پلیمری گروهی مجزا از میسل ها هستند که از کوپلیمرهای حاوی دو بخش آبدوست و آبگریز ساخته میشوند. این پلیمرها را میتوان به چندین گروه طبقه بندی کرد. منومرهای سازنده هموپلیمرها^۲ یکسان بوده و به همین دلیل قادر به تشکیل تجمعات میسلی نیستند، در مقابل کوپلیمرها^۳ از دو نوع منومر ساخته شده اند که از نظر حلالیت با یکدیگر تفاوت دارند و به چندین حالت میتوانند در کنار یکدیگر قرار بگیرند، به این ترتیب پلیمرهایی با ویژگی متفاوت را ایجاد میکنند. کوپلیمرهای تصادفی^۴، کوپلیمرهای دوبلوکی (پلیمرهای AB) و سه بلوکی (پلیمرهای ABA) و کوپلیمرهای Graft از انواع این پلیمرها هستند (شکل ۱-۷).



شکل ۱-۷: انواع میسل های پلیمری.

هر یک از انواع پلیمرهای ذکر شده برای مصارف خاصی استفاده میگردند و در این میان کوپلیمرهای بلوکی اهمیت بیشتری نسبت به نوع graft دارند زیرا در پلیمرهای graft، زنجیره های آبگریزی به طور نسبتاً سست تری به پلیمرهای بلوکی با یکدیگر میانکنش میکنند و احتمال آنکه با زنجیره های آبگریزی از نوع خود میانکنش کنند افزایش می یابد، از این رو احتمال توده ای شدن^۵ آنها بیشتر میشود. کوپلیمرهای تصادفی میسل های بسیار کوچکی میسازند که پایداری اندکی دارند و عدد تجمع آنها^۶ نیز پایین است. پلیمرهای دو و سه بلوکی از نظر دارورسانی اهمیت خاصی دارند و معمولاً CMC پلیمرهای سه بلوکی از دو بلوکی ها بیشتر است و در بخش آبدوست آنها غالباً زنجیره های پلی اتیلن گلیکول^۷ و یا پلی اتیلن

^۱ Polymeric Micelle

^۲ Homo Polymer

^۳ Copolymer

^۴ Random Copolymer

^۵ Aggregation

^۶ Aggregation Number

^۷ Poly Ethylen Glycol (PEG)

اوکساید^۱ قرار می‌گیرد. چنین رشته‌هایی بسیار محلول بوده و به خوبی هیدراته میشوند و قادر هستند ساختار میسلی را از نظر فضایی در محیط زیستی محافظت نمایند [۷۸].

در غلظت بحرانی تشکیل میسل و کمی بالاتر از آن میسل‌ها هنوز سست و شل^۲ هستند و در بخش درونی خود آب دارند با افزایش غلظت پلیمرهای دوگانه دوست، میسل‌ها پایدارتر و فشرده‌تر شده و اندازه آنها کوچک میگردد. در مباحث دارورسانی، میسل‌هایی مورد توجه هستند که CMC آنها در حد میکرومولار باشد زیرا تعادل نسبی^۳ موجود در بین میسل و منومرها، با اندکی رقیق کردن محلولهای حاوی میسل به راحتی جابجا میگردد. گزارشات در مورد میسل‌های سیکلودکستران حاکی از آنست که این پلیمرها در خون به میزان ۱۰۰ برابر رقیق میگردند، در نتیجه داروی محصور، رها خواهد شد و در خون رسوب کرده و یا توسط پروتئینها و سلولهای خونی پوشیده خواهد شد. پوشیدگی اجسام خارجی پدیده اوسونیزه شدن^۴ مینامند و مولکولهایی که این عمل را انجام میدهند اوسون^۵ خوانده میشوند [۷۷].

۱-۷-۵ عوامل موثر در میانکنش دارو و میسل

۱-۷-۵-۱ حالت فازی بخش مرکزی

همه میسل‌ها دو بخش مهم دارند، یکی پوشش آبدوست بیرونی و دیگری یک هسته مولتن گلوبول مایع^۶. طبیعت مایع هسته میسلی امکان مخلوط شدن موثر بلوکهای آبگریز را فراهم میکنند. برخی مشاهدات ثابت کرده اند که بخش مرکزی میسل حالت Glassy دارد و میتواند در شرایط خاص دچار گذار از حالت Glassy به مایع گردد. این دو فاز از نظر میزان تخلخل^۷ و توانایی به دام اندازی مولکولهای آب و یا ترکیبات دارویی با یکدیگر تفاوت دارند. دمایی که در آن پلیمرها از حالت glassy به مایع تغییر می‌یابند را Tg مینامند این دما با دمای ذوب تفاوت دارد، Tg معمولاً برای پلیمرهای بدون شکل^۸ تعریف میگردد و از اینرو معمولاً پلیمرهای به کار رفته در ساختن میسل‌ها را از مخلوطی از حالات کریستالی و آمورف طراحی میکنند.

^۱ Poly Ethylen Oxide (PEO)

^۲ Loose

^۳ Quasi Equilibration

^۴ Opsonisation

^۵ Opson

^۶ Liquid Molten Globol

^۷ Porosity

^۸ Amorph

۱-۷-۵-۲ نوع میانکنشهای دارو و میسل

معمولاً یکسری قواعد ثابت بر پلیمرهای دوگانه دوست دو و سه بلوکی حکمفرما است به گونه ای که بخش PEG آنها بین ۱-۱۵ کیلو دالتون وزن دارد و طول قسمت آگریز آنها نیز تقریباً هم اندازه بخش آبدوست است. پیوندهای یونی، غیر قطبی (آگریز) و میانکنشهای $\pi - \pi$ در میانکنش دارو و میسل اهمیت بسیار دارند. گاهی برای تسهیل ورود دارو یا ترکیب غیرقطبی به درون میسل، تعدادی از مولکولهای غیرقطبی را به پلیمرها می چسبانند. با این کار میانکنشهای $\pi - \pi$ بین میسل و دارو افزایش می یابد و سازگاری^۱ بین آنها را افزایش میدهند. هرچه سازگاری شدت یابد، بالطبع پایداری ترمودینامیکی و کینتیکی^۲ میسل و میزان اتصال دارو به میسل^۳ نیز افزایش خواهد یافت. بنابراین ترکیب غیرقطبی کمتر به مناطق نزدیک به سطح میسل اتصال یافته و بنابراین امکان رهایش آن در فاز لگاریتمی کاهش می یابد به این ترتیب امکان رهایش کنترل شده تر آن ترکیب فراهم خواهد شد.

۱-۷-۵-۳ پایداری ترمودینامیکی و کینتیکی

پایداری ترمودینامیکی و کینتیکی با یکدیگر تفاوت دارند. پایداری ترمودینامیکی تنها نشاندهنده آنست که در چه غلظتی تعادل میسل-منومر به سمت تشکیل منومر جابجا میگردد و پایداری کینتیکی در مورد زمان دقیق از هم پاشیده شدن میسل و تبدیل آن به منومر اطلاعاتی میدهد به گونه ای که حتی با ترقیق منومرها به غلظتی کمتر از CAC نیز میسل های موجود قادرند تا مدت زمان مشخص عملکرد ناقل بودن خود را انجام دهند. به عبارت بهتر زمان واقعی پاشیدن میسل در غلظتی پایین تر از CAC را میتوان در فاکتور پایداری کینتیکی جستجو کرد. این عامل به حالت فیزیکی بخش هسته میسل، میزان حضور محلول در بخش مرکزی، بزرگی واحدهای آگریز و نسبت بخشهای آگریز به آبدوست، سازگاری میسل و دارو، کیفیت اتصال دارو به میسل (بزرگی ثابت اتصال و تعداد مولکولهای متصل شده به میسل) بستگی داشته و خود مبتنی بر قطبیت، آگریزی، بار و حالت فازی^۴ دارو در درون پلیمر می باشد.

امروزه میتوان فاکتور سازگاری را با استفاده از برنامه های کامپیوتری و به صورت مجازی^۵ محاسبه کرد و به این ترتیب بهترین پلیمر را برای حمل ترکیب موردنظر انتخاب نمود [۷۹, ۸۰].

^۱ Compatibility

^۲ Thermodynamic And Kenetic Stability

^۳ Loading Capacity

^۴ Phase State

^۵ In Silico

۸-۱ پتیدها و اهمیت آنها در صنایع دارویی و غذایی

۱-۸-۱ پتیدهای آمفی پاتیک و اهمیت دارویی آنها

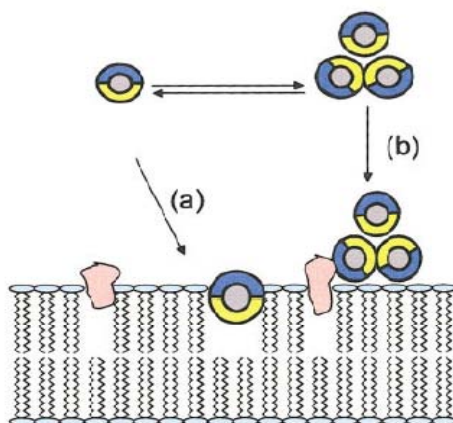
نخستین بار در سال ۱۹۹۴ مشخص گردید که سومین مارپیچ پروتئین هموئودومین آنتا‌پدیا قادر است از درون غشاها عبور کند. بحث استفاده از پتیدها در انتقال دارو از آن زمان مطرح گردید و تاکنون پتیدهای بسیاری برای این منظور طراحی شده اند.

برخی از مزایای استفاده از پتیدها نسبت به سایر سیستمهای انتقالی عبارتند از سهولت سنتز آنها، عدم سمیت و عدم تحریک سیستم ایمنی.

حاملین پتیدی را میتوان به دو گروه حاملین آمفی پاتیک اولیه و ثانویه طبقه بندی کرد. دوگانه دوستی اولیه از وجود دو ناحیه آبدوست و آبگریز ناشی میشود بطوریکه ناحیه اول مخصوص حمل لیگاند موردنظر و بخش دوم برای میانکنش با غشای سلول می باشد.

دوگانه دوستی ثانویه در ساختارهای دوم مشاهده میشود مثلاً مارپیچ آلفایی که گروههای آبدوست و آبگریز آن به طور دوره ای تکرار میشوند و به این ترتیب در یک سمت گروههای آبگریز و در سمت دیگر گروههای هیدروفیل قرار خواهند گرفت این حاملین عمدتاً با تغییر پتانسیل غشای سلول و ایجاد شیب و برخی با ایجاد کانالهای یونی ایجاد سمیت میکنند و یا ترکیب سمی حمل شونده را به درون سلول انتقال میدهند. بین میزان دوگانه دوستی و ورود به سلول رابطه ای مستقیم وجود دارد.

محققین دو مکانیسم را برای ورود پتیدها پیشنهاد کرده اند اول آنکه انتقال ناقلین پتیدی با تجمع پتیدها در کنار هم همراه است مثلاً هورمون کلسیتونین انسانی با خودتجمعی و تشکیل ساختارهای میسل مانند و ایجاد آشفتگی در غشا به اپیتلیوم مجاری تنفسی وارد میشود. ثانیاً خود پتید دوگانه دوست میتواند در درون غشا جای بگیرد (شکل ۸-۱). با این حال پتیدهایی بدست آمده اند که دوگانه دوست نبوده ولی به راحتی به سلول وارد میشوند از این رو به نظر میرسد دوگانه دوست بودن برای ورود ضروری نیست. همچنین نمیتوان به درستی مکانیسمی برای ورود پتیدها به درون سلول پیشنهاد کرد و چه بسا پتیدهایی متعلق به یک خانواده از مکانیسمهای متفاوتی برای عبور استفاده کنند [۸۱, ۸۲].



شکل ۱-۸: دو مدل فرضی از چگونگی میانکنش پپتیدهای دوگانه دوست با غشای سلول

۱-۸-۲ پپتیدها در صنایع غذایی

پپتیدهای بسیاری را به عنوان غذای فعال طراحی کرده اند که از آن جمله پپتیدهای جذب کننده کلسیم، کاهش دهنده فشارخون، ضد دیابتی، یا کنترل کننده سطح کلسترول پلاسما و پپتیدهای آنتی اکسیدان مورد توجه قرار دارند [۸۳].

تولید رادیکالهای آزاد مثل O^{-2} و OH^{\bullet} از عواقب جدایی ناپذیر تنفس موجودات بیهوازی است. این ترکیبات با اکسیداسیون لیپیدها و تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع عمده ترین دلیل فساد بسیاری از مواد غذایی هستند به طوریکه این گونه تغییرات اکسایشی منجر به تغییر رنگ، بو، طعم، و بافت غذاها خواهند شد. به علاوه گونه های فعال اکسیژن، بسیاری از مولکولهای زیستی مثل DNA، پروتئین و سایر مولکولهای کوچک سلولی را تغییر میدهند. به همین دلیل در وقوع بیماریهای قلبی-عروقی، دیابت و بیماریهای عصبی نقش مهمی دارند. به دام اندازه های این رادیکالها را آنتی اکسیدان مینامند. آنتی اکسیدانها را به دو دسته سنتزی و طبیعی میتوان تقسیم کرد. آنتی اکسیدانهای ذاتی^۱ سلول مثل اسید آسکوربیک، گلوتاتیون، آنزیم SOD، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، و از انواع سنتزی میتوان به BHA^۲، BHT^۳ و PG^۴ اشاره کرد. استفاده از این ترکیبات شیمیایی تحت کنترل شدیدی است زیرا آسیبهای فراوانی برای سلامتی دارند، از این رو تلاش گسترده ای برای جستجوی آنتی اکسیدانهای طبیعی در حال انجام است [۸۴، ۸۵].

^۱ Endogenous Antioxidant

^۲ Butylated Hydroxy Anisole

^۳ Butylated Hydroxy Toluene

^۴ Propyl Galate

یکی از این منابع پروتئینها و پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنها هستند. اکسیداسیون پروتئینها یکی از دلایل وقوع فرایند پیری است با این حال طبیعت با قراردادن اسیدهای آمینه با خواص آنتی اکسیدانی، آنها را تا حدودی از این آسیبها حفظ کرده است. اسیدهای آمینه متیونین، هیستیدین، لیزین، تیروزین و تریپتوفان و فنیل آلانین و پرولین از آن جمله محسوب میشوند. در این میان زنجیره های جانبی آمینواسیدهای تیروزین و فنیل آلانین (گروه فنولی)، هیستیدین (گروه ایمیدازول) و تریپتوفان (گروه ایمیدازول) به عنوان گروههای دهنده هیدروژن فعالیت میکنند. این گروهها با دادن H به ذرات رادیکالی آنها را پایدار کرده و خود به خاطر رزونانشان پایدار باقی میمانند.

ریشه متیونین را به عنوان آنتی اکسیدان ذاتی پروتئینها میدانند زیرا بسیاری از اکسیدانها به راحتی با این اسیدآمینه واکنش داده و تولید متیونین اکساید مینمایند. این محصول توسط آنزیم متیونین سولفیداکساید ردوکتاز دوباره به متیونین احیا میگردد. این امر امکان بازیابی فعالیت متیونین را (در حالت آزاد و یا متصل به پروتئین) فراهم می آورد. موقعیت درونی ریشه های متیونین و میزان دسترس بودن فیزیکی آنها در مقدار آنتی اکسیدانی آنها موثر است [۸۶].

فعالیت آنتی اکسیدانی هیستیدین میتواند به سه دلیل باشد، توانایی اعطای هیدروژن، به دام اندازی رادیکال پراکسی لیپیدها و توانایی به دام اندازی یونهای فلزی. این قابلیت به دلیل گروه ایمیدازول این آمینواسید است. گاهی عنوان میشود توانایی پروتئینهای مختلف به دلیل محیط احاطه کننده این گروه است. این گروه در مواجهه با رادیکالهای آزاد به ۲-ایمیدازولون تبدیل میگردد. محققین دریافته اند که جایگزینی L-His با D-His فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئینها را تغییر میدهد از اینرو میتوان نتیجه گرفت که جایگاه دقیق موقعیت حلقه ایمیدازول در ایجاد اشکال فعال آنتی اکسیدانی موثر است [۸۷, ۸۸].

هدف از انجام این پایان نامه

با توجه به ایمن بودن، فواید غذایی و ویژگیهای فیزیکی- شیمیایی پروتئینها بر آن شدیم تا تاثیر میسلهای پروتئین بتاکازئین شیر شتر و پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آن را بر افزایش انحلال کورکومین و بنابراین افزایش دسترسی زیستی و آنتی اکسیدانی این ترکیب مورد مطالعه قرار دهیم.

مواد و روشها

۱-۲ تهیه ژل پلی اکریلامید و انجام الکتروفورز SDS-PAGE^۱

Stacking ۱-۱-۲ تهیه ژل

APS (μl)	TEMED(μl)	بیس اکریلامید (%۰/۸) %۳۰	آب	بافر تریس ۰/۵M (pH ۶/۸)
۵۰	۱۰	۰/۷۵ ml	۲ ml	۲/۵ ml

۲-۱-۲ تهیه ژل جداکننده^۲

Acrylamid (%)	%۱۰	%۱۵	%۲۰
Acrylamid ۳۰% (ml)	۳/۳۳	۵	۶/۶۶
Tris ۱/۵M (pH ۶/۸) (ml)	۲/۵	۲/۵	۲/۵
SDS %۱۰ (ml)	۰/۱	۰/۱	۰/۱
Water (ml)	۲/۷۵	۱/۵	۰/۰۳۳
APS %۱۰ (μl)	۳۳	۳۳	۳۳
TEMED (μl)	۵	۵	۵
Bis acrylamid (ml)	۱/۳	۰/۸۷	۰/۶۶

۳-۱-۲ بافر تانک^۳

Tris (base)	۰/۲۵ M
Glycin	۰/۱۹۲ M
SDS	%۰/۱

پس از حل کردن مقادیر مربوطه در آب دوبار تقطیر، pH را می سنجیم. این میزان بدون استفاده از اسید کلریدریک یک مولار باید ۸/۳ واحد باشد.

^۱ Sodium Dodesyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis

^۲ Resolving Gel

^۳ Running Buffer

۴-۱-۲ تهیه بافر نمونه^۱

Tris ۱ M (pH ۶/۸)	۲/۴ ml
SDS %۲۰	۳ ml
Glycerol %۱۰۰	۳ ml
Beta-mercapto ethanol	۱/۶ ml
Bromophenol blue	۶ mg
حجم نهایی	۱۰ ml

۵-۱-۲ تهیه محلول رنگ آمیزی^۲

Coomassi blue R۲۵۰	۰/۵ gr
متانول	۲۵۰ ml
اسید استیک	۵۰ ml
آب دوبار تقطیر	۲۰۰ ml

۶-۱-۲ تهیه محلول رنگبر^۳

آب دو بار تقطیر	۷۵ ml
اسید استیک	۱۰ ml
متانول	۱۵ ml
حجم نهایی	۱۰۰ ml

۲-۲ سنجش پروتئین

۱-۲-۲ تهیه محلول برادفورد

برای این منظور ۲۰ میلی گرم آبی کوماسی G۲۵۰ را در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۹۵٪، ۲۰ میلی لیتر اسید فسفوریک ۸۵٪ حل کرده و سپس حجم آن با آب مقطر به ۲۰۰ میلی لیتر رسانده شد. این محلول پس از عبور از فیلتر (کاغذ Wattmann) در دمای ۴°C نگهداری گردید.

^۱ Sample Buffer

^۲ Staining Solution

^۳ Destainig

۲-۲-۲ رسم منحنی استاندارد سنجش پروتئین به روش برادفورد

این منحنی را براساس پروتئین بتاکازئین خالص شتر^۱ رسم کردیم. ثابت خاموشی این پروتئین در طول موج ۲۸۰ نانومتر و در آب، با غلظت یک mg/ml برابر است با ۰/۳۰۲ (۰/۳۰۲ mg/ml: ۱. ۴۲۸).

پس از تهیه یک محلول ۱ mg/ml از این پروتئین، مقادیر ۲/۵، ۳/۸، ۵، ۶/۸، ۱۲/۶ و ۱۲/۲ میکرولیتر از آن را به ترتیب با میزان ۹۷/۵، ۹۶/۲، ۹۳/۷، ۸۷/۴ و ۷۴/۸ میکرولیتر آب مخلوط کرده و به هر کدام یک میلی لیتر محلول برادفورد افزوده شد. به این ترتیب در هر آزمون ۲/۵، ۳/۸، ۵، ۶/۳، ۱۲/۶ و ۲۵/۲ میکروگرم از پروتئین مربوطه خواهیم داشت. جذب نمونه ها را در طول موج ۵۹۵ نانومتر میخوانیم.

از محلول حاوی یک میلی لیتر برادفورد و ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر به عنوان شاهد استفاده گردید.

۳-۲ آماده سازی کیسه های دیالیز

این کیسه ها را به اندازه های ۲۰ سانتیمتری بریده و در سه نوبت، هر بار ۱۵ دقیقه، در محلول کربنات سدیم ۵٪ جوشانده و پس از آب کشی با آب مقطر، سه بار به مدت ۱۵ دقیقه در محلول EDTA (۵٪) جوشانده شد و مجدداً با آب مقطر آب کشی گردید و تا زمان استفاده در محلول اتانول ۲۰٪ در یخچال نگهداری شد.

۴-۲ استخراج بتاکازئین از شیر شتر

استخراج بتاکازئین از شیر شتر مطابق منبع [۸۹] در سه مرحله چربی زدایی، جداسازی مخلوط کازئین ها، جداسازی نسبی و در نهایت تخلیص کامل بتاکازئین انجام گرفت.

۱-۴-۲ چربی زدایی

شیر تازه تهیه شده را در ظروف ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و در دمای ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید.

۲-۴-۲ جداسازی مخلوط کازئین ها^۲

pH شیر بدون چربی را با استفاده از اسید کلریدریک یک مولار، به میزان ۴/۶ رسانده (pH ایزوالکتریک متوسط کازئینها) و سپس در دمای ۴°C به مدت ۶۰ دقیقه در دور ۵۸۴۰ سانتریفیوژ گردید. به منظور حذف تمامی پروتئینهای ناخواسته، رسوبات مرحله قبل سه بار دیگر در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار حل و پس از رساندن به pH ۴/۶، رسوب داده شد. مخلوط کازئینی بدست آمده با استفاده از Freeze drier خشک و در دمای ۲۰°C نگهداری شد.

^۱ Bovine Beta Casein

^۲ Whole Casein

۲-۴-۳ مرحله دوم تخلیص

۲-۴-۳-۱ بافر مرحله دوم تخلیص^۱

PMSF	Beta-mercapto ethanole	EDTA	اوره	بافر سدیم استات (pH ۶/۸)
۱ mM	۱۰ mM	۳۵ mM	۳/۳ M	۲۰ mM

به منظور به تعادل رساندن رزینها^۲، ستون DEAE- Cellulose با استفاده از این بافر چندین بار شستشو داده شد.

۲-۴-۳-۲ آماده سازی نمونه و جداسازی اجزا^۳

یک گرم از مخلوط کازئین ها را در ۵۰ میلی لیتر بافر استات ۲۰ mM حل و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰°C با دور ۴۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید.

با استفاده از این محلول، رزینهای ستون را خارج کرده و به مدت ۲۰ دقیقه آنها را با هم در ۴۰°C مخلوط میکنیم. سپس ستون را دوباره از رزین پر کرده و اجازه میدهیم ته نشین گردد.

خروجی های ستون با عناوین FT_۱^۴، FT_۲ و FT_۳، به ترتیب به میزان ۳۰، ۳۰ و ۴۰ میلی لیتر، جمع آوری شد. ستون را با ۱۰۰ میلی لیتر بافر شسته و خروجی را با عناوین W_۱^۵ و W_۲، هر یک به میزان ۵۰ میلی لیتر، جمع گردید. در مرحله آخر ستون با ۵۰ میلی لیتر بافر حاوی کلرید سدیم یک مولار شستشو داده شد و خروجی را با نام WI_{NaCl} جمع آوری شد.

۲-۴-۴ دیالیز نمونه های ناخالص مرحله دوم

فراکشنهای^۶ حاوی مخلوط آلفا و بتاکازئین را در طی سه مرحله با بافر ایمیدازول ۲۰ میلی مولار (pH ۷/۳) دیالیز میکنیم. هر یک از مراحل دیالیز حداقل به مدت ۱۲ ساعت انجام شد.

^۱ Batch Purification

^۲ Equilibration

^۳ Fraction

^۴ Flow Through

^۵ Wash Through

^۶ Fraction

۱-۴-۴-۲ بافر مرحله اول دیالیز (pH ۷/۳)

Immidazole	۲۰ mM
Sodium Azid	٪۰/۰۱
Beta mercapto ethanole	۱۰ mM

۲-۴-۴-۲ بافر مرحله دوم (pH ۷/۳)

Immidazole	۲۰ mM
Sodium Azid	٪۰/۰۱

۳-۴-۴-۲ بافر مرحله سوم دیالیز (pH ۷/۳)

Immidazole	۲۰ mM
Urea	۳/۳M
Beta mercapto ethanole	۱۰ mM

۴-۴-۲ بافر تعادل^۱ و شستشوی^۲ ستون مرحله سوم

Immidazole	۲۰ mM
Urea	۳/۳ M
Beta mercapto ethanole	۱۰ mM

^۱ Equilibration

^۲ Elution

۲-۴-۶ آماده سازی ستون مرحله دوم کروماتوگرافی

این ستون حاوی رزین های DEAE-Cellulose است که با بافر ذکر شده به تعادل رسیده است. این رزینها دارای بار مثبت هستند و پروتئین بتاکازئین (با pI ۵/۷) در این pH باری منفی دارد. از این رو این نوع کروماتوگرافی را تعویض آنیونی مینامیم.

۲-۴-۷ قرار دادن^۱ نمونه ها و جداسازی اجزا

نمونه های دیالیز شده را بر روی ستون دوم ریخته و اجازه می دهیم به آهستگی از داخل ستون عبور کنند. در این حین نمونه های پروتئینی مطلوب به ستون میچسبند و پروتئینهای ناخواسته از ستون عبور میکنند.

سپس ستون را با ۳۰۰ میلی لیتر بافر، شستشو می دهیم. با استفاده از ۱۰۰ میلی لیتر بافر شستشوی حاوی سدیم کلرید ۰/۲۵ M و ۱۰۰ میلی لیتر بافر بدون نمک، شیبی^۲ نمکی بین صفر الی ۰/۲۵ M ساخته و پروتئینهای موجود در ستون را با استفاده از پمپ پری استاتیک با سرعت ۰/۷۵-۰/۵ میلی لیتر در دقیقه جمع آوری میکنیم. در پایان ستون را با ۵۰ میلی لیتر بافر حاوی کلرید سدیم دو مولار شستشو داده و خروجی را جمع آوری میکنیم.

۲-۵ تعیین غلظت پپتیدها

محلول OPA^۳ به شرح زیر تهیه شد:

OPA	۴۰ mg
Sodium tetra borate ۱۰۰ mM (pH ۹/۷)	۲۵ ml
SDS %۲۰	۲/۵ ml
Beta mercapto ethanole	۰/۱ ml
Total volume	۵۰ ml

^۱ Load

^۲ Gradient

^۳ O-Phthaldialdehyd

OPA ترکیبی است که پس از واکنش با آمین نوع اول پپتیدها (صرف نظر از نوع آمینو اسیدهای موجود در آنها) در طول موج ۳۴۰ نانومتر جذب نشان میدهد و آزمونهای مبتنی بر این ترکیب نسبت به آزمونهای دیگر (از قبیل نین هیدرین، فلورسامین و...) حساستر، دقیق تر و ساده تر است.

این روش براساس واکنش ترکیب OPA و بتامرکاپتواتانول با آمینهای نوع اول استوار است که با ادامه واکنش ترکیب ۱-alkylthio-۲-alkylisoindole ایجاد میگردد (شکل ۱-۲). در حضور SDS کلیه واکنشهای آنزیمی احتمالاً فعال، کاملاً غیرفعال میشوند و به علاوه، ساختار پپتیدهای حاصله به خوبی در دسترس واکنشگر قرار میگیرند [۹۰].



شکل ۱-۲: میانکنش OPA و آمینهای نوع اول با یکدیگر در حضور بتامرکاپتواتانول و سدیم دودسیل سولفات.

۶-۲ رسم منحنی استاندارد تعیین غلظت پپتیدها

تریپتون مخلوطی از پپتیدهایی است که برای غنی کردن محیط کشت باکتریها بکار برده میشوند. در اینجا از محلول یک میلی گرم در میلی لیتر این ترکیب به عنوان استاندارد استفاده گردید. مقادیر متفاوتی از این ماده را با یک میلی لیتر محلول OPA مخلوط کرده و پس از یک دقیقه جذب آنها را در ۳۴۰ نانومتر خوانده شد. از محلول فاقد OPA به عنوان شاهد استفاده گردید.

۷-۲ هیدرولیز پروتئین بتاکازئین

پس از تهیه یک محلول ۵ mg/ml از بتاکازئین، محلول آنزیمهای کیموتریپسین و تریپسین را جداگانه به آنها افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. سپس ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد تا آنزیم به طور کامل غیرفعال گردد. نسبت وزنی آنزیم به سوبسترا در هر مرحله از هیدرولیز یک به ۱۰۰ است.

۸-۲ اولترافیلتراسیون^۱ و جداسازی پپتیدها براساس وزن مولکولی

کل هیدرولیزات بدست آمده، از طریق سانتریفیوژ پی در پی در دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه، با استفاده از غشاهای دارای Cut off ۵ و ۳ کیلودالتون به سه گروه پپتیدهای بالای ۵ کیلودالتون، پپتیدهای کمتر از ۳ کیلو دالتون و بین ۳ و ۵ کیلو دالتون جدا گردیدند.

پپتیدهای بدست آمده از هر دو نوع هیدرولیز، تا زمان استفاده به طور جداگانه، در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شد.

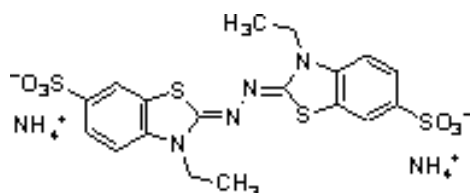
برای اطمینان از میزان هیدرولیز شدن، محصولات بدست آمده با استفاده از ژل ۲۰٪، الکتروفورز گردید [۹۱].

۹-۲ تعیین میزان آنتی اکسیدانی به روش ABTS

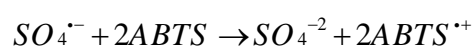
۱-۹-۲ محلول ABTS

ABTS	۷ mM
Potassium per sulphate	۲/۴۵ mM

ABTS (۲' و ۲'-آزینو- بیس (۳-اتیل تiazولین-۶-سولفونات) در حضور پتاسیم پرسولفات به شکل رادیکالی در می آید. این ساختار در طول موج ۷۳۴ و ۶۵۰ نانومتر جذب نشان میدهد و در حضور آنتی اکسیدانها این میزان جذب به تدریج کاهش می یابد. از این ویژگی به منظور تعیین میزان آنتی اکسیدانی یک ترکیب استفاده میگردد [۹۲].



شکل ۲-۲: ساختار شیمیایی ABTS.



^۱ Ultrafiltration

این ویژگی را نسبت به یک ترکیب آنتی اکسیدان استاندارد مثل ویتامین E و C میسنجیم. از آنجایی که ویتامین E خود در محلول مائی قابل حل نیست از آنالوگ محلول در آب آن استفاده میشود، نام IUPAC این ترکیب ۶ هیدروکسی، ۲، ۵، ۷ و ۸ تترا متیل کرومانز می باشد و به طور تجاری آن را ترولوکس مینامند.

۲-۹-۲ رسم منحنی استاندارد آنتی اکسیدانی

برای این منظور غلظتهای مختلفی از ترولوکس ($30-125 \mu\text{M}$) تهیه کرده و در هر بار سنجش، ۱۰ میکرولیتر از آن به محلول ABTS با جذب اولیه 0.2 ± 0.07 اضافه شد. تغییر جذب محلول بدست آمده را در طی شش دقیقه به طور دوره ای میخوانیم. درصد کاهش جذب این محلول در مقابل غلظت ترولوکس رسم گردید. به این ترتیب نمودار استاندارد آنتی اکسیدانی بدست می آید.

۲-۱۰ آماده سازی محلولهای کورکومین و بتاکازئین

در تمامی آزمایشات، ابتدا میزان مورد نظر از کورکومین را در اندکی اتانول ۹۶٪ حل کرده و سپس با آب مقطر به حجم می رسانیم. به طوریکه غلظت اتانول در تمامی آزمون ها کمتر از یک درصد است.

در تمامی آزمایشات پروتئین بتاکازئین در بافر فسفات با قدرت یونی ۰/۱ (pH ۷) حاوی Na_2HPO_4 (۵/۶۵ mM)، NaH_2PO_4 (۳/۰۵ mM) و نمک کلرید سدیم ۸۰ mM حل گردید [۹۳].

۲-۱۱ طیف سنجی ماورای بنفش^۱ و رسم منحنی اتصال هم دما در دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۷°C

در تمامی آزمونها غلظت پروتئین کمتر از غلظت بحرانی میسلی شدن است^۲. طیف سنجی افتراقی^۳، مطابق روش ذکر شده در منبع [۹۴] انجام گرفت. به طور خلاصه، پس از گرفتن Baseline از بافر شاهد، در کووت آزمون میزان لازم از پروتئین را ریخته و جذب در محدوده ۷۰۰-۲۰۰ نانومتر خوانده شد. در دفعات بعدی میزان مورد نظر از لیگاند را هم به کووت آزمون و هم به کووت شاهد افزوده و پس از دو دقیقه طیف ثبت گردید. داده های حاصله با استفاده از معادلات بخش ۳-۳ مورد بررسی قرار گرفت.

^۱ UV-Vis Spectroscopy

^۲ Critical Micelle Concentration (CMC)

^۳ Differential UV-Visible Spectroscopy

۱۲-۲ طیف سنجی فلورسانس^۱

۱-۱۲-۲ فلورسانس ذاتی پروتئین^۲

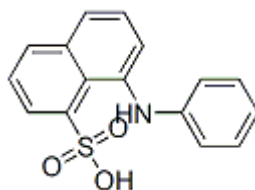
از آنجایی که پروتئین مورد بررسی فاقد تریپتوفان است، تهییج فقط در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام گرفت ($\lambda_{ex} 280 \text{ nm}$) که بیشتر مربوط به فلورسانس اسیدآمینه تیروزین و اندکی فنیل آلانین است. گشودگی دریاچه های عبور اشعه تهییجی و نشری^۳ هر دو پنج نانومتر انتخاب شد.

۲-۱۲-۲ Synchronous فلورسانس

طیفهای فلورسانس همزمان^۴ در غیاب و حضور کورکومین، در محدوده نشری ۳۱۰-۴۵۰ نانومتر و در طول موج تهییج ۲۸۰ نانومتر و محدوده اسکن ($\Delta\lambda = \lambda_{det} - \lambda_{ex}$) ۱۵ نانومتر، با گشودگی دریاچه ۵ نانومتر انجام گرفت [۹۵].

۳-۱۲-۲ ANS فلورسانس

۱-anilino naphthalene-۸-sulfonate (ANS) ترکیبی است که در طول موج ۳۹۰ نانومتر تهییج میشود ولی در محیط قطبی نشری ندارد و فقط با اتصال به مناطق آبگریز^۵، نشری در محدوده ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر نشان میدهد. از این ماده در غلظت ۲۰۰ میکرومولار (۰/۲ میلی مولار) استفاده شد و گشودگی دریاچه های نشری و تهییجی هر دو ۵ نانومتر انتخاب گردید.



شکل ۲-۳: ساختار شیمیایی ANS.

۴-۱۲-۲ Pyrene فلورسانس

phenanthrene Benzo [۹۰]، ترکیب بسیار آبگریزی (حلالیت در آب 7×10^{-7}) است که از منومر آن به عنوان نشانگر فلورسانس برای ردیابی تغییر محیط آبگریز استفاده میشود، با تهییج محلول مائی این ترکیب

^۱ Fluorescence Spectroscopy

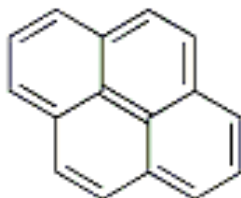
^۲ Intrinsic Fluorescence

^۳ Excitation And Emission Slits

^۴ Synchronous

^۵ Hydrophobic Patch

(۱-۲) میکرومولار) در طول موج ۳۳۸ نانومتر، سه بیشینه نشر^۱ در محدوده نشری ۶۰۰-۳۵۰ (طول موجهای ۳۷۳، ۳۸۳ و ۳۹۳) بروز میابد. نسبت بیشینه های اول (۳۷۳ نانومتر) و سوم (۳۹۳ نانومتر) قطبیت محیط قرارگیری پایرن را نشان میدهد. از این ویژگی، به عنوان روشی بسیار حساس و دقیق، به طور گسترده برای تعیین غلظت بحرانی میسلی شدن پلیمرهای زیستی و سنتزی استفاده میشود [۹۶].



شکل ۲-۴: ساختار شیمیایی Pyrene.

۱۳-۲ طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی^۲

به منظور بررسی تغییرات ساختاری، که در شرایط مختلف بر ساختارهای دوم پروتئین القا میشود از Far-CD در محدوده طول موج ۲۶۰-۱۹۰ نانومتر استفاده گردید [۹۷]. طیفهای حاصله با استفاده از برنامه CDNN آنالیز شد.

۱۴-۲ کشت سلول

۱-۱۴-۲ تهیه محیط کشت سلولی

محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ از شرکت Invitrogen (Gibco) خریداری شد. مقادیر ۱۰/۴۳ گرم از محیط و ۰/۴ گرم سدیم بی کربنات را در یک لیتر آب دوبار تقطیر اتوکلاو شده، حل گردید. pH محلول حاصل را با استفاده از اسید کلریدریک یک مولار به ۷/۵ رسانیده و سپس با استفاده از فیلترهای میلیپور با قطر منافذ ۰/۲ میکرومتر فیلتر شد.

آنتی بیوتیکهای استرپتومايسين و پنی سیلین خریداری شده از شرکت Biosera به میزان ۱٪ و سرم جنین گاوی^۳ به میزان ۱۰٪ (v/v) به محیطها اضافه گردید و سلولها در انکوباتور حاوی ۵٪ CO₂، رطوبت ۹۵٪ و دمای ۳۷°C در فاز لگاریتمی رشد یافتند.

^۱ Fluorescence Intensity Peak

^۲ Circular Dicroism Spectroscopy

^۳ Fetal Bovine Serum(FBS)

۲-۱۴-۲ خصوصیات رده سلولی K۵۶۲

این رده سلولی مربوط به اریترو لوکمیا انسانی^۱ است. این سلولها یک کروموزوم موسوم به فیلادلفیا^۲ دارند که از ترانسلوکیشن^۳ کروموزومهای ۹ و ۲۲ بوجود آمده است. از اینرو ژنهای Ab1 و Bcr در آن با یکدیگر ترکیب شده و یک ژن مرکب^۴ را بوجود آورده اند. ترکیب این دو ژن چندین مسیر دخیل در سرطانزایی مثل Myc، Ras، Raf، PI3K، AKT، Jun و Myc میتوان آپوپتوز را مهار کرد [۹۸، ۹۹، ۱۰۰].

۳-۱۴-۲ تعیین میزان سمیت سلولی^۵

برای این منظور از تست MTT^۶ استفاده شد. سلولهای زنده، میتوکندریهای سالم دارند و آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی آنها فعال است، در نتیجه ترکیب ۳-(۴-۵ دی متیل-۲ تیازولیل)-۲-۵ دی فنیل-۲ هیدروترا زولیوم برماید (MTT) را احیا و به کریستالهای فورمازون تبدیل میکنند. این ترکیب بنفش رنگ در طول موج ۵۹۵ جذب دارد.

سلولهای کنترل و تحت تیمار به میزان 2×10^4 در ظروف استریل ۹۶ تایی کشت داده شد و پس از سه ساعت، در معرض غلظت های مختلف کورکومین و کمپلکس کورکومین-کازئین قرار گرفتند.

پس از ۲۰ ساعت، ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ mg/ml PBS) به هر چاهک افزوده شد. پس از چهار ساعت رشد در انکوباتور (با دمای 37°C و $5\% \text{CO}_2$)، غشای سلولها با استفاده از محلول حاوی $10\% \text{SDS}$ و $50\% \text{DMF}$ تخریب شده، کریستالهای فورمازون در این محلول حل و جذب آنها با استفاده از دستگاه Elisa Reader در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد [۱۰۱].

۲-۱۵ بررسی میزان حلالیت^۷ کورکومین در درون میسل ها

برای این منظور از روش تبخیر حلال^۸ استفاده شد.

^۱ Human Erythroleukemia Cell Line

^۲ Philadelphia Chromosome

^۳ Translocation

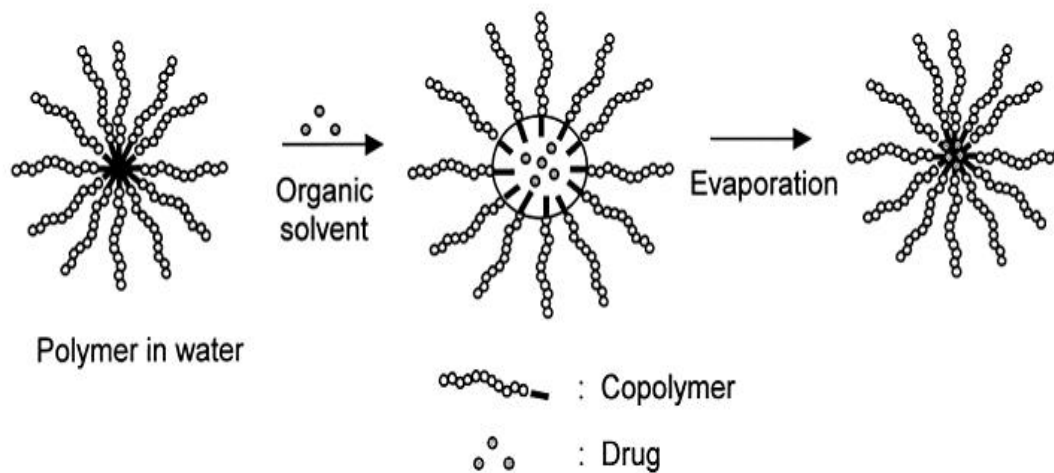
^۴ Fusion Gene

^۵ Cell Toxicity

^۶ MTT Assay

^۷ Micelle Solubility

^۸ Solvent Evaporation



شکل ۲-۵: شمایی از روش تبخیر حلال.

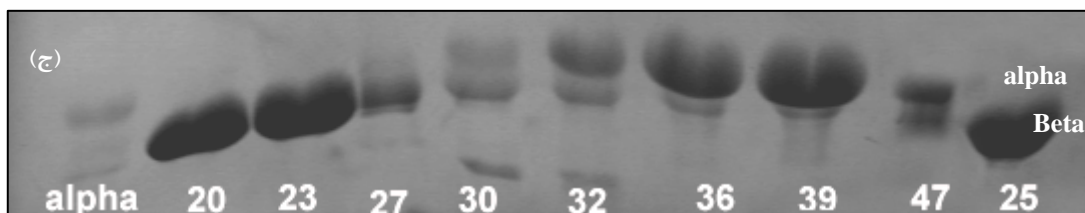
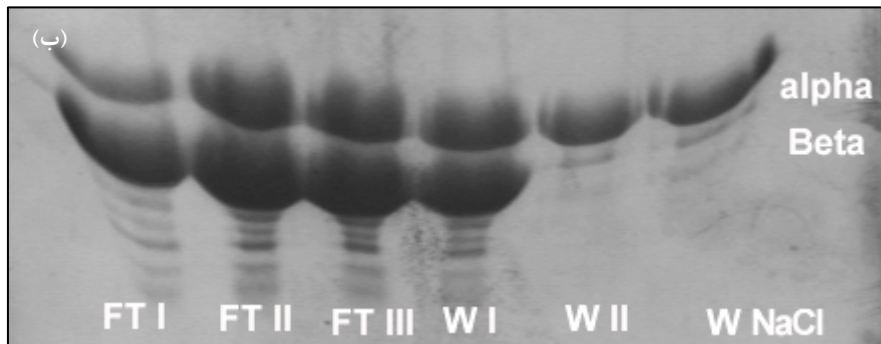
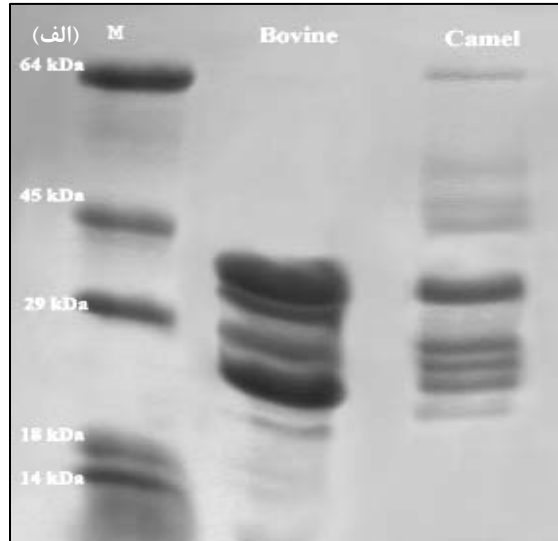
محلول ۱۲ میلی مولاری کورکومین (که در درون اتانول حل شده است) را اندک اندک به درون محلول پروتئین بتاکازئین (۱٪) می افزاییم. درصد نهایی الکل در محلول نهایی ۱۵٪ خواهد بود. این مخلوط را به مدت دو ساعت در درون حمام آب ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده و سپس حلال در دمای ۳۰ درجه به مدت شش ساعت تحت خلا از این مخلوط حذف میگردد. به رسوب بدست آمده بافر فسفات (pH ۷) می افزاییم و پس از ۱۰ دقیقه ورتکس، به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه میکنیم. مخلوط به دست آمده را در دور ۱۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را در متانول به میزان مکفی رقیق میکنیم و جذب آن را در طول موج ۴۲۶ نانومتر میخوانیم. با دانستن ضریب خاموشی کورکومین در درون متانول ($48000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)، غلظت این ترکیب را در درون بافر فسفات (pH ۷) اندازه میگیریم.

با دانستن میزان حلالیت کورکومین در حلال آبی ($2/99 \times 10^{-8} \text{ M}$) افزایش یا کاهش حلالیت را درون میسل ها برآورد مینماییم [۱۰۲].

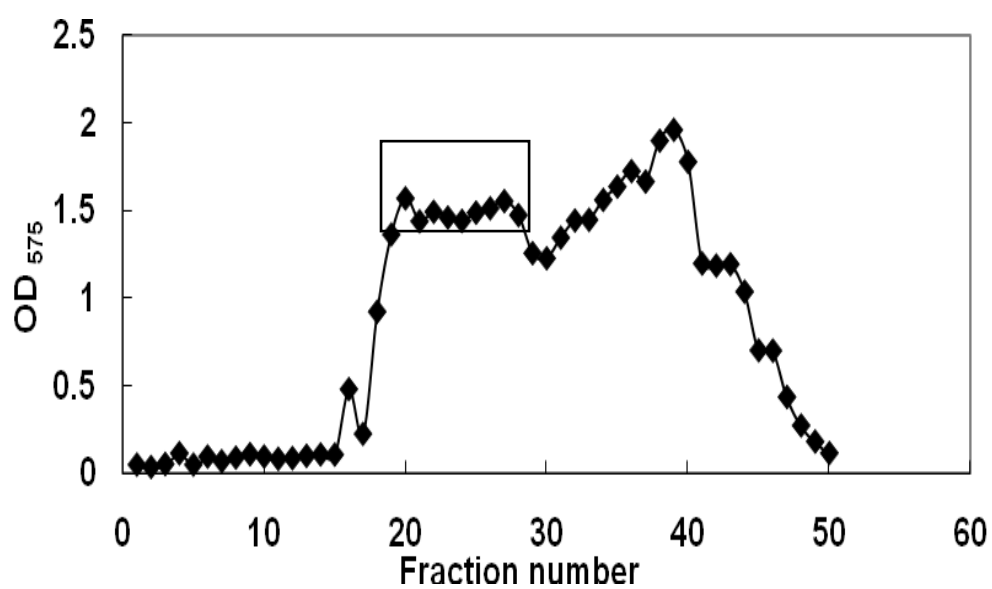
نتايج

۱-۳ استخراج پروتئین بتاکازئین از شیر شتر

پروتئین در طی سه مرحله تخلیص شد. به منظور مقایسه ای از الگوی حرکت الکتروفورزی پروتئین مربوط به شیر گاو و شتر مخلوط کازئینهای این دو گونه را در یک ژل جداگانه بررسی کردیم.



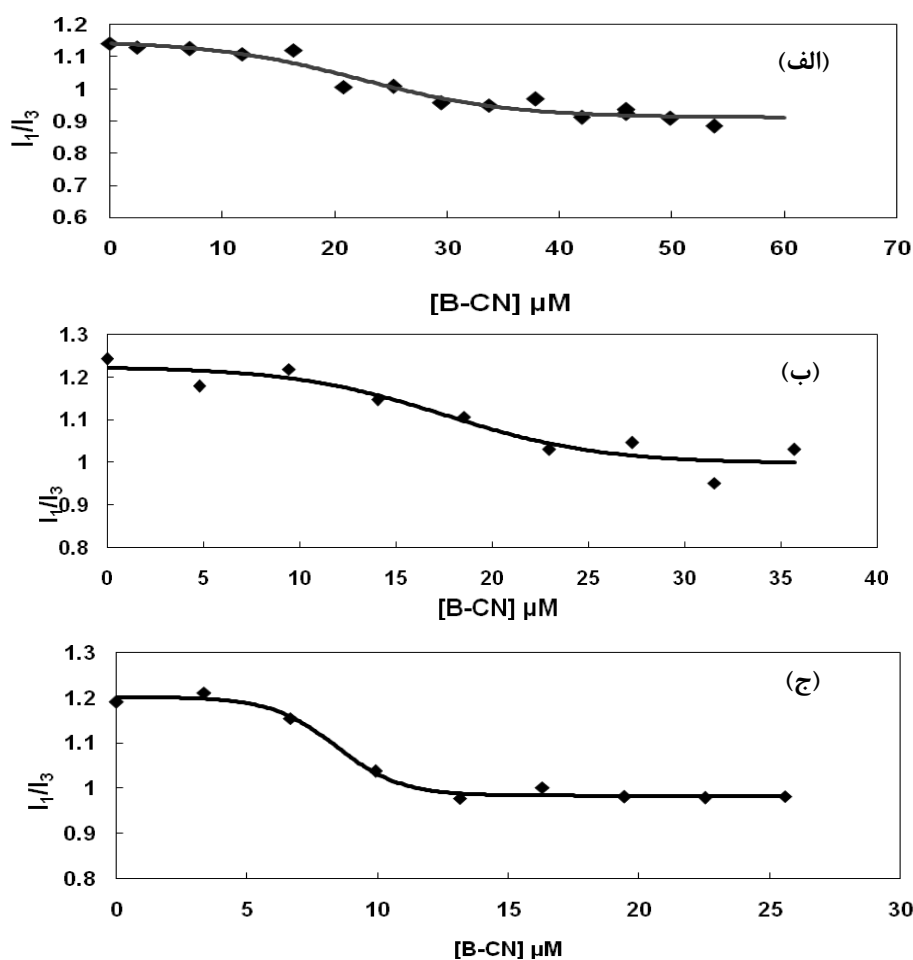
شکل ۱-۳: تصویر SDS-PAGE از مراحل اول (الف)، دوم (ب) و سوم (ج) تخلیص پروتئین بتاکازئین.



شکل ۳-۲: کروماتوگرام مرحله سوم تخلیص بتاکازئین.

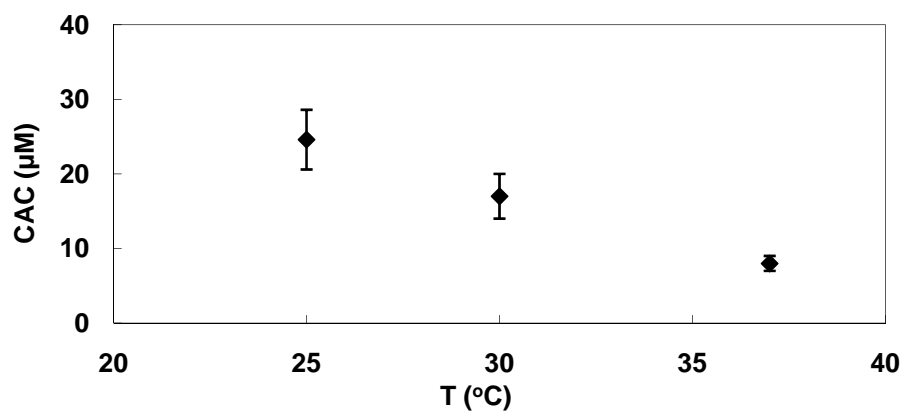
۲-۳ تعیین مقادیر CAC مربوط به پلیمرهای بتاکازئین

برای این منظور تغییرات فلورسانس طول موج ۳۳۹ نانومتر نسبت به شدت فلورسانس ۳۷۳ نانومتر در مقابل غلظت‌های مختلف پروتئین رسم گردید. نقطه عطف منحنی سیگموئیدی بدست آمده غلظت بحرانی میسلی شدن^۱ را در دمای موردنظر بیان می کند. این آزمون حداقل سه بار در دماهای مذکور تکرار و نتیجه به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان میشود. نقاط بدست آمده با استفاده از نرم افزارهای MATLAB و Sigma Plot به منحنی های رسم شده تنظیم شد.



شکل ۳-۳: نمودار سیگموئیدی تعیین CAC پروتئین بتاکازئین (B-CN) در دماهای ۲۵ (الف)، ۳۰ (ب) و ۳۷ (ج) درجه سانتیگراد.

^۱ CAC



شکل ۳-۴: تغییر مقادیر CAC پروتئین بتاکازئین در دماهای مختلف.

۳-۳ طیف سنجی ماورای بنفش و بررسی میانکنش بین بتاکازئین و کورکومین

در این تئوری اتصال تغییرات جذب کورکومین را در طول موج ۴۲۶ نانومتر و در محلول حاوی پروتئین، طی دفعات متعدد تیتراژ کردن سل شاهد و آزمون میسنجیم. غلظت پروتئین در تمامی آزمایشات کمتر از غلظت بحرانی انتخاب شد (۵ μM). با استفاده از روابط زیر تعداد کورکومین اتصال یافته به هر مولکول از پروتئین بررسی گردید.

$$\Delta A = \epsilon \times [C_{bound}] \quad (1-3)$$

$$\frac{\Delta A_{saturation}}{[pro]_{saturation \times n}} = \epsilon_{bound} \quad (2-3)$$

$$n = \frac{[lig]_{saturation}}{[pro]_{saturation}} \quad (3-3)$$

$$\Delta A = (\epsilon_{free} - \epsilon_{bound}) C_{bound} \quad (4-3)$$

$$v = \frac{[C_b]}{[Pro]} \quad (5-3)$$

در این بررسی جذب پروتئین بر طیف جذبی کورکومین تاثیری ندارد. با استفاده از مقادیر v بدست آمده و محاسبه غلظت کورکومین آزاد در محلول، منحنی های v را در مقابل لگاریتم غلظت کورکومین آزاد (یا همان اتصال هم دما) رسم گردید.

با استفاده از این منحنی میتوان ثابت اتصال ظاهری را از انرژی پتانسیل اتصال وایمن^۱ محاسبه کرد. انرژی پتانسیل (π) را از طریق محاسبه سطح زیر منحنی معادله اتصال هم دما بدست آمد:

$$\pi = RT \int_{v_i=0}^{v_i} v_i \partial \ln [curcumin]_f \quad (6-3)$$

برای این محاسبات از نرم افزار MATLAB استفاده کردیم.

رابطه بین ثابت اتصال ظاهری و انرژی پتانسیل به صورت زیر است:

$$\pi = RT \ln \left(1 + K_{app} [curcumin]_f^{v_i} \right) \quad (7-3)$$

که در آن R ثابت گازها^۲ و T دما بر حسب کلوین است. از روابط ۶ و ۷ رابطه بین ثابت اتصال و v را میتوان بدست آورد.

ΔG^0 و ΔG_v را با استفاده از روابط ذیل بدست آمد:

^۱ Wyman Binding Potential Energy

^۲ Gas Constant

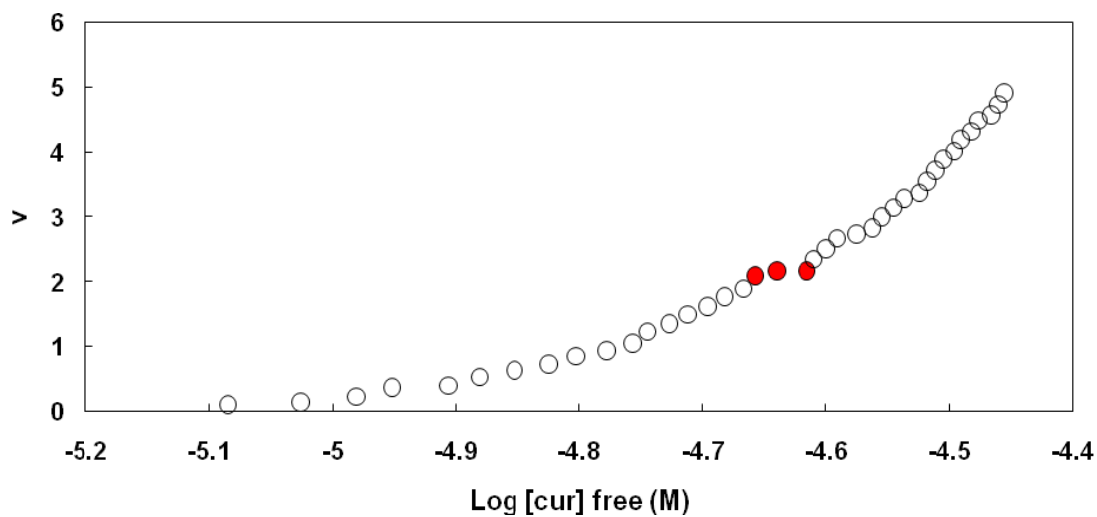
$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{app} \quad (3-8)$$

$$\Delta G_v^0 = \frac{\Delta G^0}{\nu} = -\frac{RT \ln K_{app}}{\nu} \quad (3-9)$$

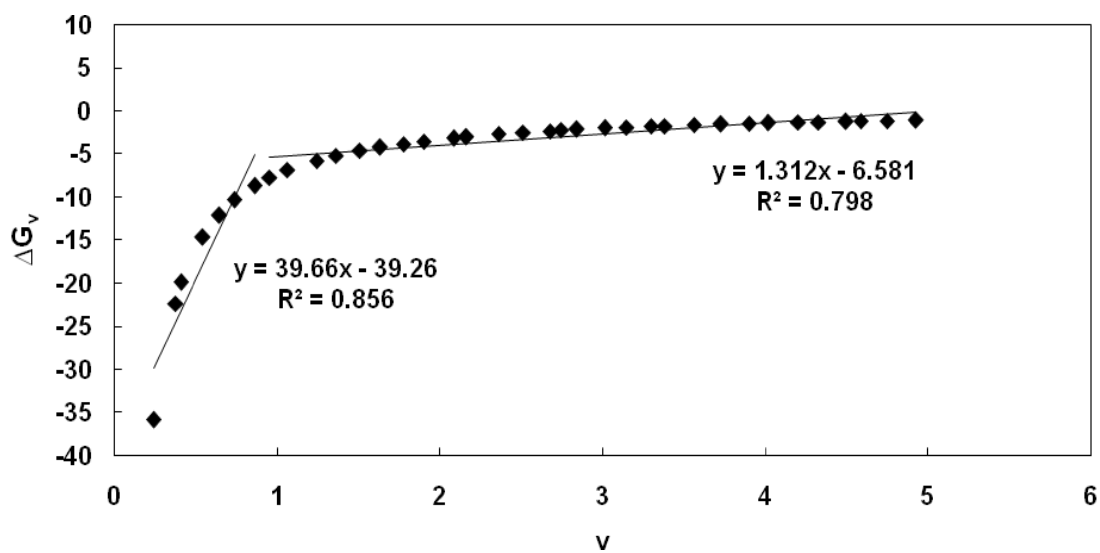
با استفاده از تعداد جایگاههای پر شده و کل جایگاههای موجود در پروتئین میتوان تعاونی جایگاهها را مورد بررسی قرار داد. برای این منظور از رابطه هیل^۱ استفاده گردید:

$$\text{Log} \left(\frac{\theta}{1-\theta} \right) = n \text{Log} [L] + \text{Log} K_a \quad (3-10)$$

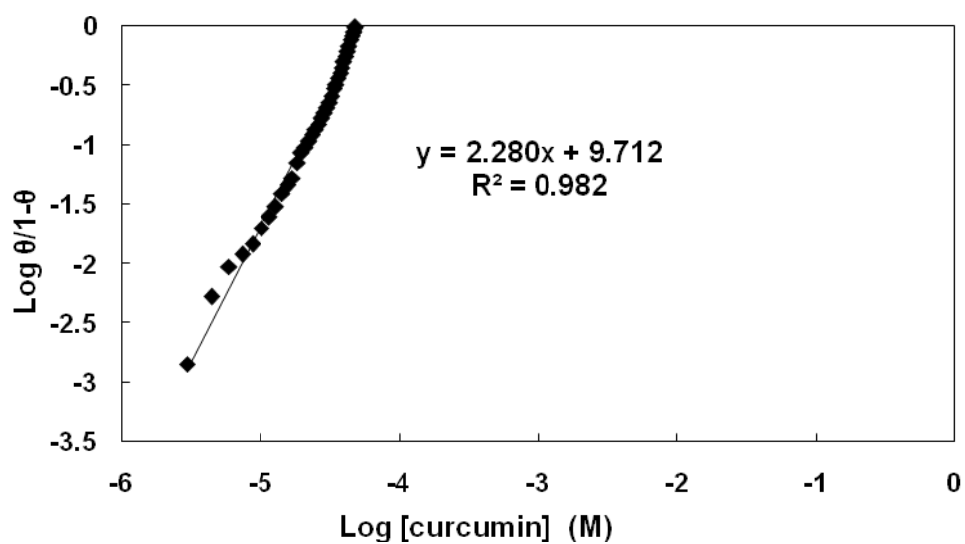
^۱ Hill Equation



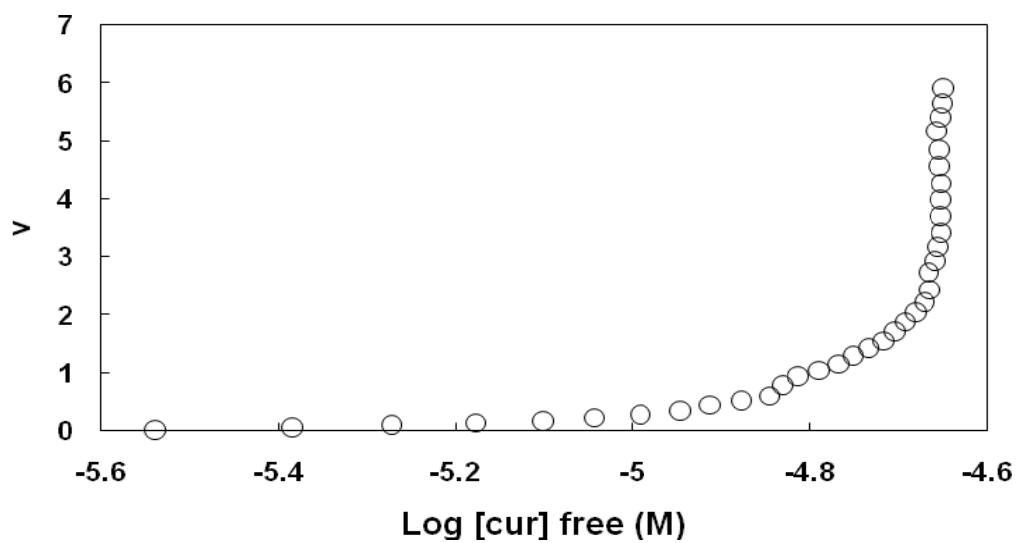
شکل ۳-۵: منحنی اتصال هم دمای کورکومین و پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در دمای 25°C سانتیگراد.



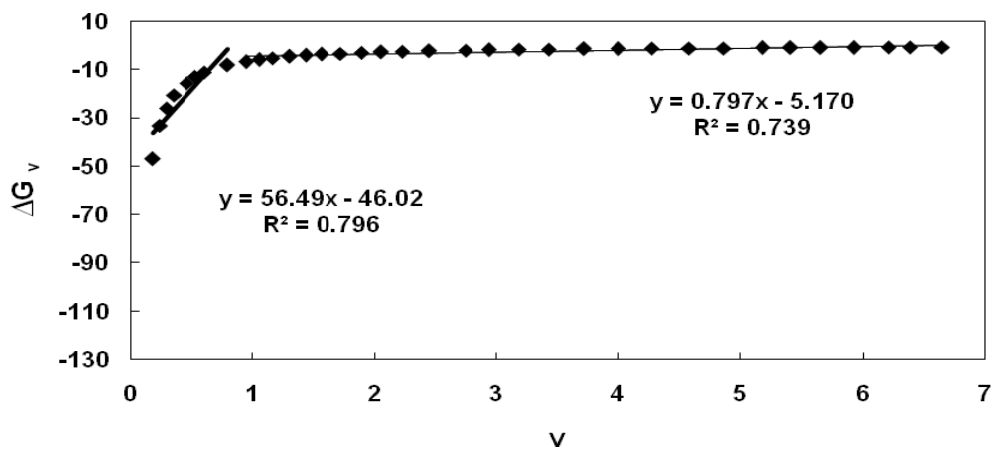
شکل ۳-۶: منحنی ΔG_ν در مقابل ν و بررسی نوع میانکنشها در دمای 25°C سانتیگراد.



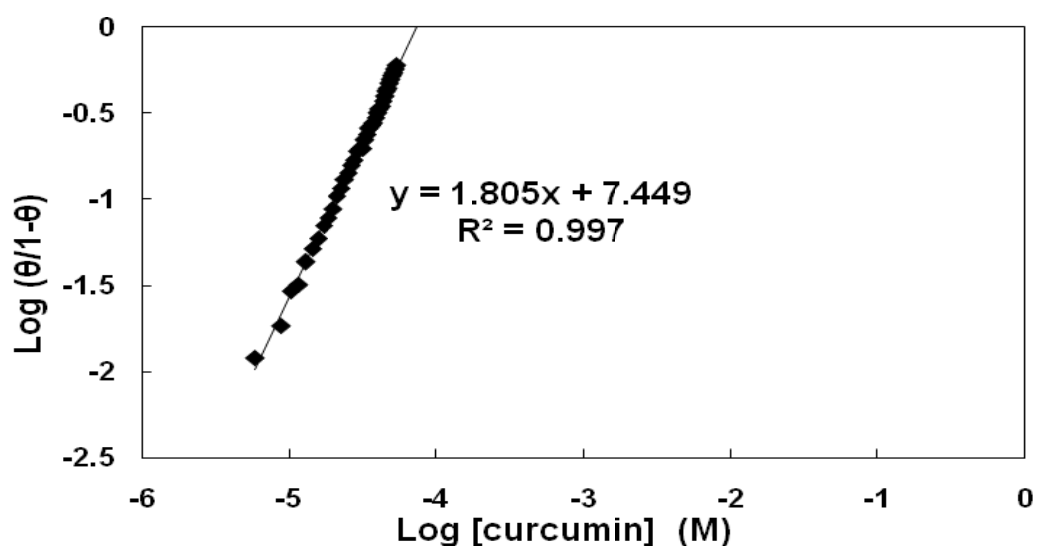
شکل ۳-۷: منحنی هیل و بررسی تعاونی جایگاههای اتصالی کورکومین بر روی بتاکازئین در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد.



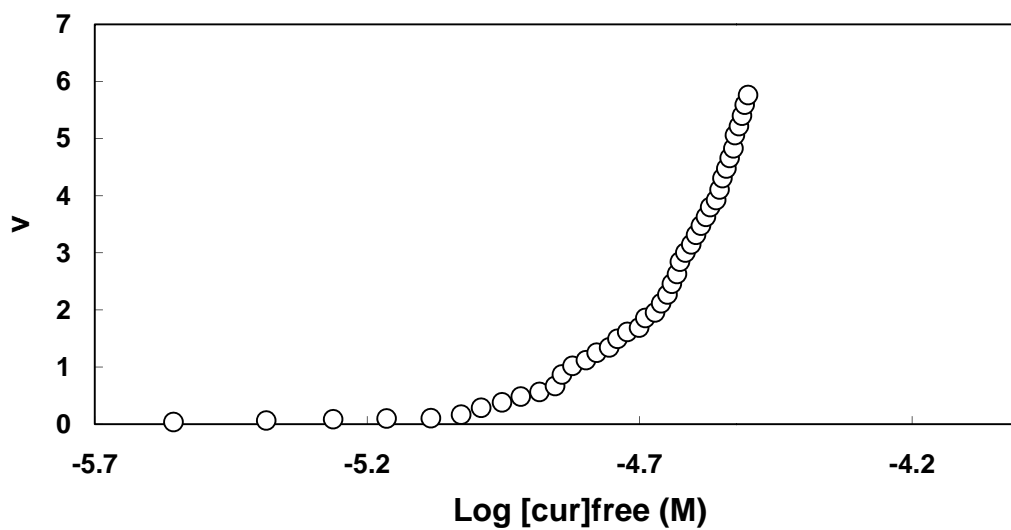
شکل ۳-۸: منحنی اتصال هم دمای کورکومین و پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در دمای 30°C سانتیگراد.



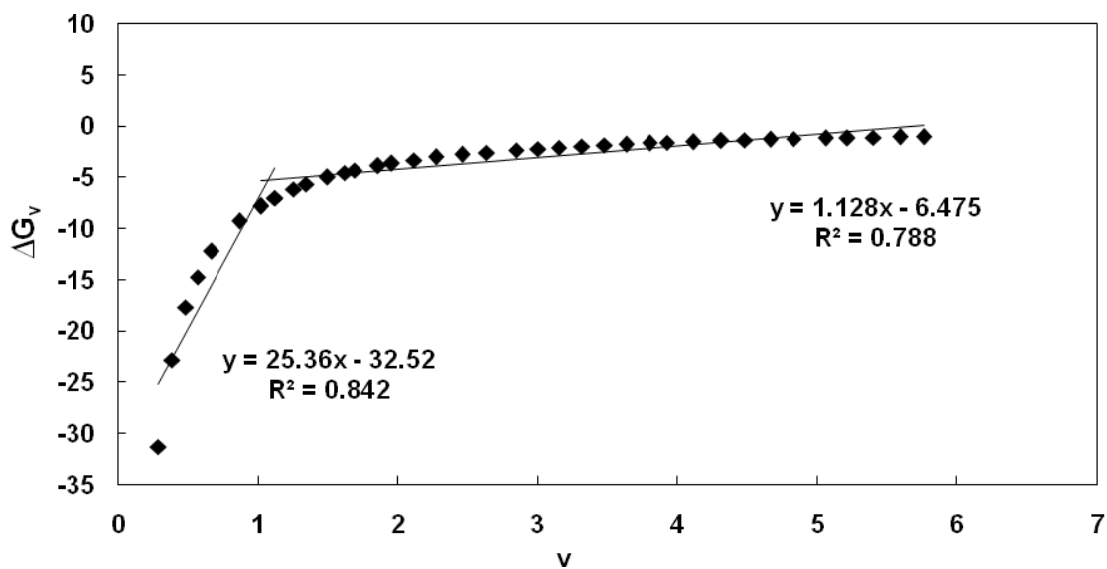
شکل ۳-۹: منحنی ΔG_v در مقابل v و بررسی نوع میانکنشها در دمای 30°C سانتیگراد.



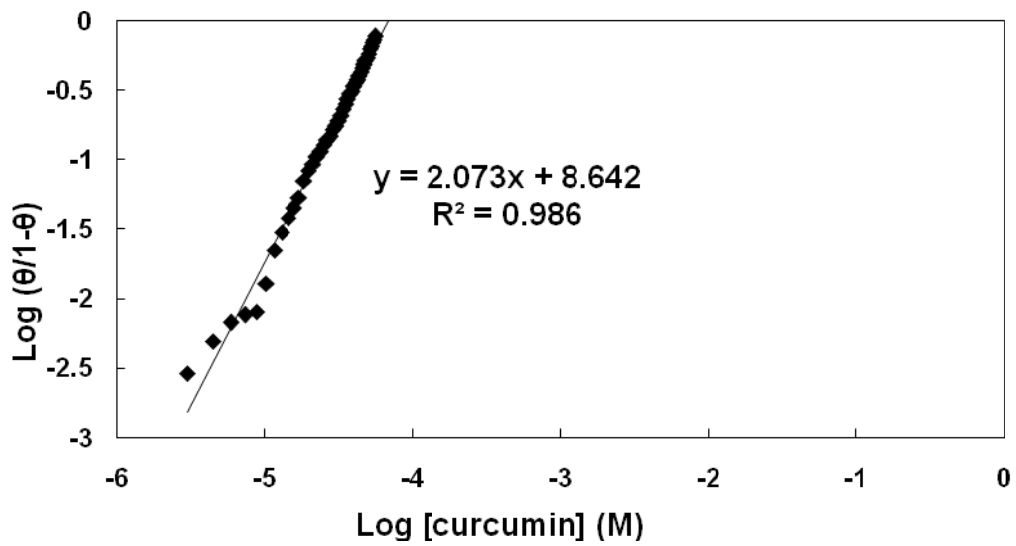
شکل ۳-۱۰: منحنی هیل و بررسی تعاونی جایگاههای اتصالی کورکومین بر روی بتاکازئین، در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد.



شکل ۳-۱۱: منحنی اتصال هم دمای کورکومین و پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در دمای 37°C درجه سانتیگراد.



شکل ۳-۱۲: منحنی ΔG_ν در مقابل ν و بررسی نوع میانکنشها در دمای 37°C درجه سانتیگراد.



شکل ۳-۱۳: منحنی هیل و بررسی تعاونی جایگاههای اتصال کورکومین بر روی بتاکازئین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد.

۳-۴ طیف سنجی فلورسانس

۳-۴-۱ فلورسانس پروتئین در حضور کورکومین

فلورسانس ذاتی غلظتهای برابری از پروتئین بتاکازئین، در دماهای مختلف و در حضور غلظتهای متفاوت کورکومین مطالعه شد. با توجه به اینکه کورکومین در محدوده مرئی دارای جذب است از رابطه ۳-۱۱ برای تصحیح شدت فلورسانس استفاده گردید:

$$F_{cor} = F_{obs} \times 10^{-0.5(A_{ex} + A_{emi})} \quad (۱۱-۳)$$

در این رابطه F_{obs} و F_{cor} به ترتیب شدت فلورسانس تصحیح شده و در ابتدا مشاهده شده را نشان میدهند و A_{emi} و A_{ex} جذب محلول را در طول موجهای تحریکی و نشری نشان میدهند. با استفاده از معادله ۳-۱۲، ثابت استرن-ولمر در سه دما محاسبه و از این طریق مکانیسم خاموشی مشخص شد:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_{sv} [Q] \quad (۱۲-۳)$$

در این رابطه F_0 شدت فلورسانس در عدم حضور کورکومین، F شدت خاموشی در غلظت مشخص از کورکومین، Q غلظت خاموش کننده^۱ (در اینجا کورکومین) و K_{sv} ثابت استرن-ولمر هستند.

از تغییرات ثابت استرن-ولمر نسبت به دما میتوان استاتیک یا دینامیک بودن مکانیسم خاموشی را دریافت.

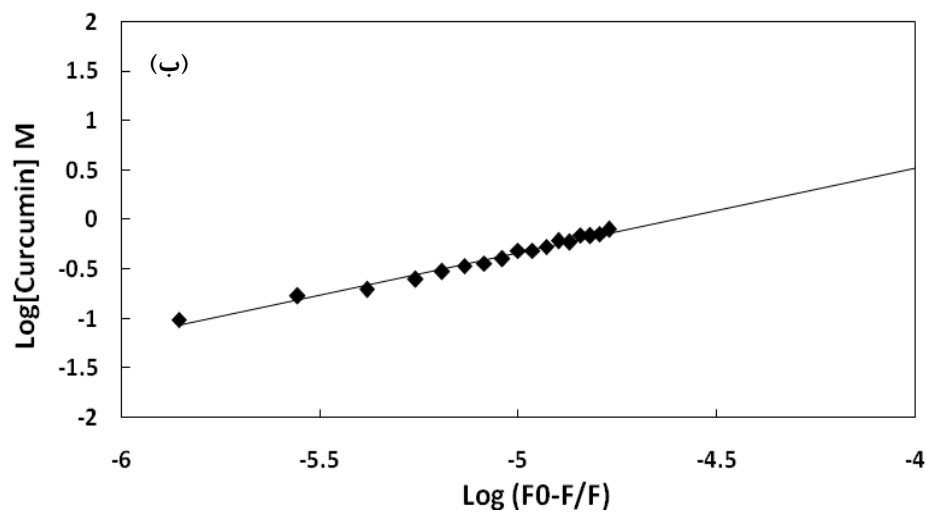
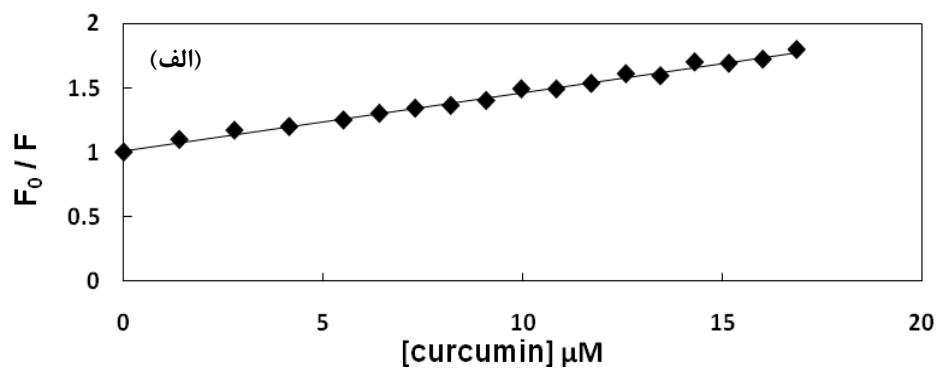
برای تعیین تعداد جایگاهها و تعیین ثابت اتصال کورکومین در دماهای مختلف با استفاده از فلورسانس از روابط متعددی میتوان استفاده کرد. رابطه ۳-۱۳ از آن جمله است که به معادله تغییر یافته استرن-ولمر^۲ نیز معروف میباشد:

$$\text{Log} \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \text{Log} K_b + n \text{Log} [lig] \quad (۱۳-۳)$$

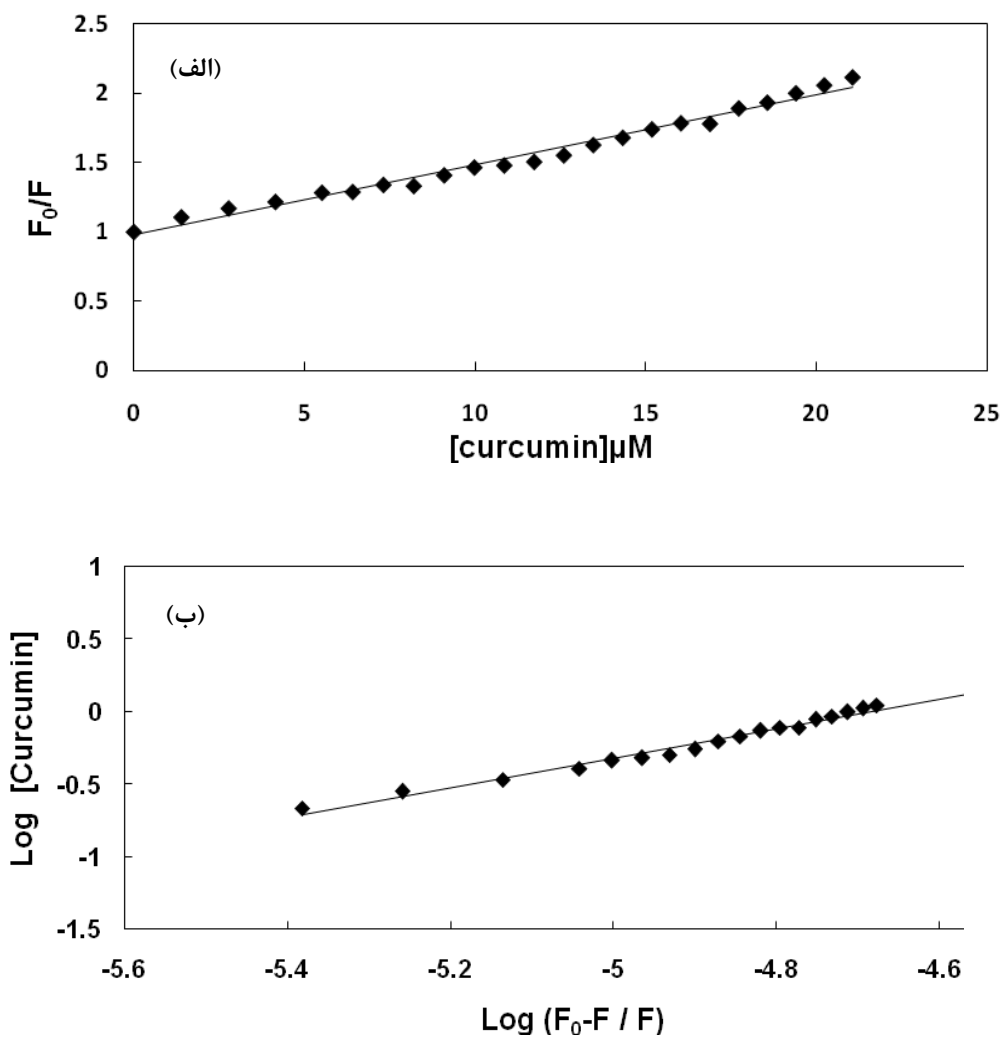
K_b ثابت اتصال لیگاند و پروتئین را نشان میدهد. در تمامی آزمایشات لیگاند، همان کورکومین است.

^۱ Quencher

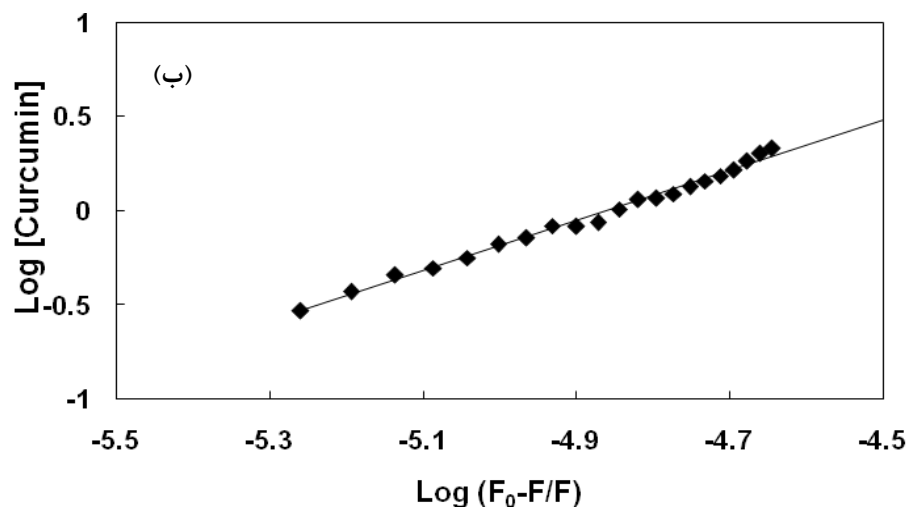
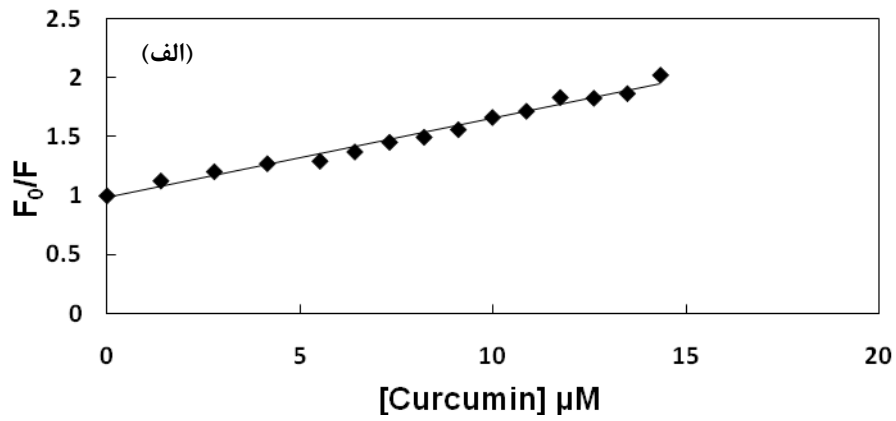
^۲ Modified Stern-Volmer Equation



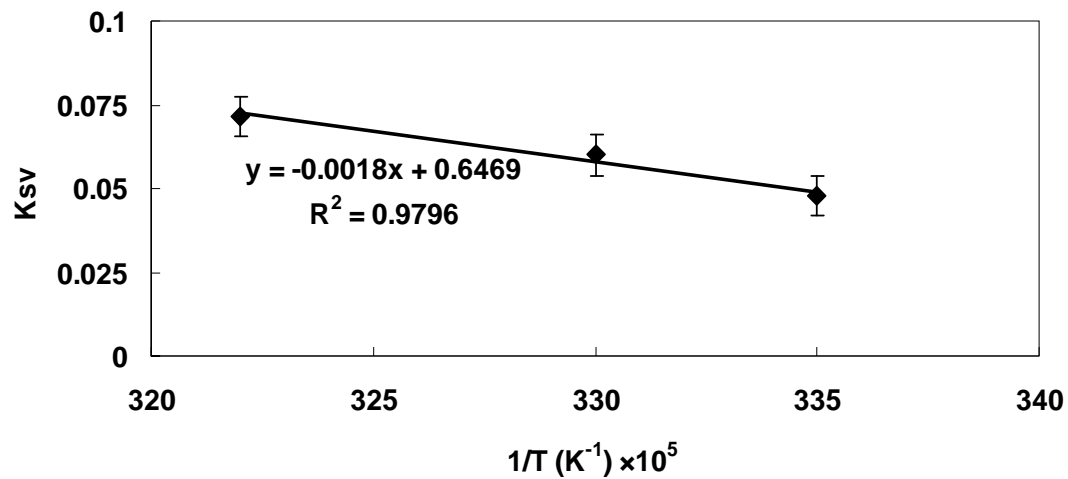
شکل ۳-۱۴ : نمودار استرن-ولمر (الف) و نمودار تغییر یافته استرن-ولمر (ب) پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در حضور غلظتهای مختلف کورکومین ($0 - 16/8 \mu\text{M}$) و در دمای 25 درجه سانتیگراد.



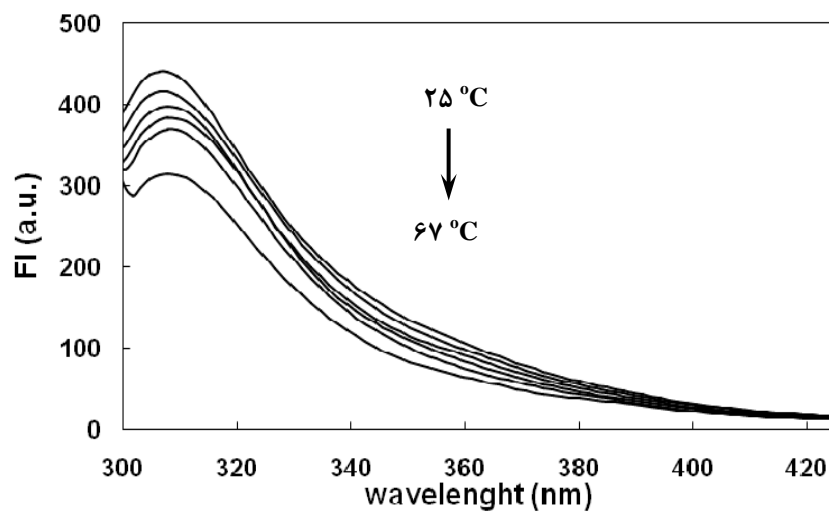
شکل ۳-۱۵ : نمودار استرن - ولمر (الف) و نمودار تغییر یافته استرن - ولمر (ب) پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در حضور غلظتهای مختلف کورکومین ($0 - 21 \mu\text{M}$) و در دمای 30°C سانتیگراد.



شکل ۳-۱۶ : نمودار استرن-ولمر (الف) و نمودار تغییر یافته استرن-ولمر (ب) پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در حضور غلظتهای مختلف کورکومین ($0 - 14 \mu\text{M}$) و در دمای 37°C درجه سانتیگراد.



شکل ۳-۱۷: تغییرات ثابت های استرن-ولمر بدست آمده برای پروتئین بتاکازئین در حضور کورکومین، نسبت به دما.



شکل ۳-۱۸: تغییر فلورسانس ذاتی پروتئین بتاکازئین ($5 \mu M$) در دماهای مختلف (۲۵، ۳۰، ۳۷، ۴۷، ۵۷ و ۶۷ درجه سانتیگراد).

۲-۴-۳ تعیین پارامترهای ترمودینامیکی میانکنش کورکومین و بتاکازئین

برای تایید نوع میانکنشها از رابطه وانت هوف^۱ استفاده شد:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (۱۴-۳)$$

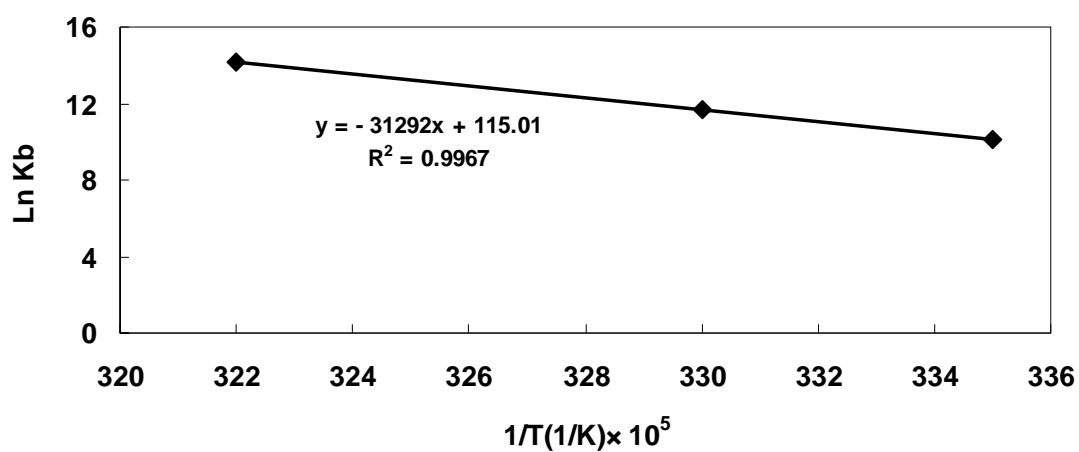
که در آن ΔH و ΔS به ترتیب تغییرات مربوط به آنتالپی و آنتروپی را نشان میدهند، R ثابت گازها و T دما بر حسب کلوین است. نمودار $\ln K_b$ را در مقابل $1/T$ را رسم میکنیم. با استفاده از شیب و عرض از مبدا این منحنی میتوان به ترتیب ΔH و ΔS را محاسبه کرد.

با استفاده از رابطه گیبس^۲ میتوان ΔG را در دماهای مختلف محاسبه کرد:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (۱۵-۳)$$

^۱ Vant Hoff

^۲ Gibbs Equation



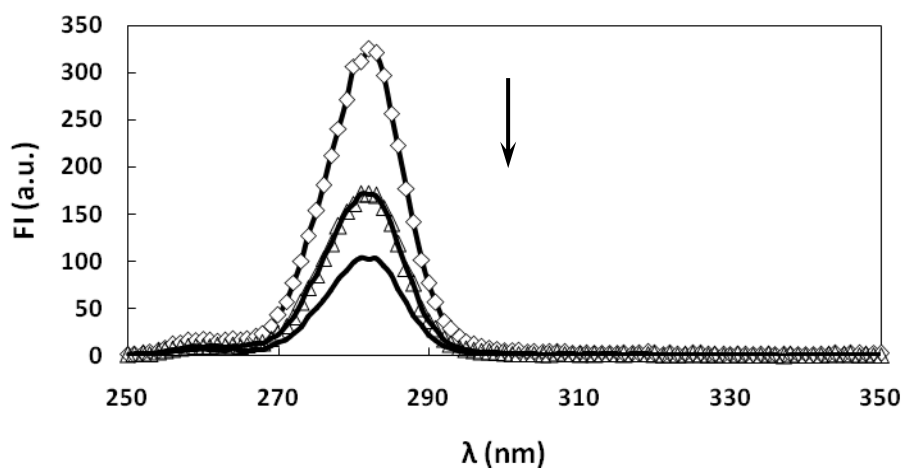
شکل ۳-۱۹: نمودار وانت هوف میانکنش پروتئین بتاکازئین و کورکومین .

جدول ۳-۱: تعدادی از پارامترهای محاسبه شده از میانکنش بین کورکومین و بتاکازئین.

دمای (K)	ΔG	$K_{binding} (M^{-1})$	K_{sv}	n
۲۹۸	-۳۳۹/۶	$(1/8 \pm 0/4) \times 10^4$	$0/048 \pm 0/01$	$0/92 \pm 0/1$
۳۰۳	-۳۴۵/۲	$(2/2 \pm 0/7) \times 10^5$	$0/0633 \pm 0/03$	$1/14 \pm 0/1$
۳۱۰	-۳۵۳/۱	$(8/3 \pm 0/7) \times 10^5$	$0/076 \pm 0/01$	$1/23 \pm 0/1$

۳-۴-۳ فلورسانس Synchronous پروتئین بتاکازئین

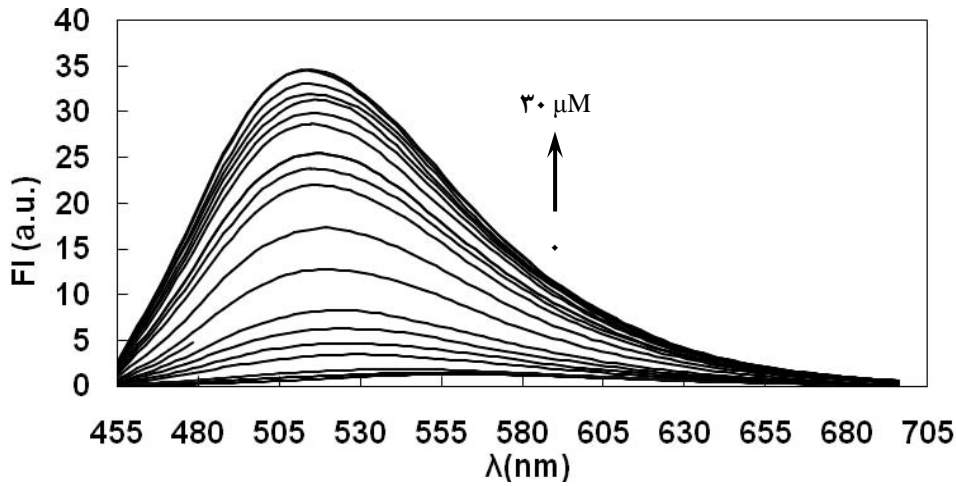
برای بررسی دقیقتر ترکیباتی که در یک طول موج تحریک کننده چندین گروه نشر کننده دارند معمولاً از فلورسانس Synchronous استفاده می شود. به گونه ای که در یک $\Delta\lambda$ مشخص تنها نشر گروههای مورد نظر مطالعه میگردد. علاوه بر فلورسانس ذاتی که میتواند در مورد تغییرات محیط اطراف ریشه های فلوتوفور اطلاعاتی دهد، از این روش نیز برای بررسی دقیقتر تغییرات ساختار سوم پروتئین استفاده کردیم. $\Delta\lambda=60$ و $\Delta\lambda=15$ به ترتیب تغییر محیط اطراف ریشه های تریپتوفان و تایروزین را نشان میدهند.



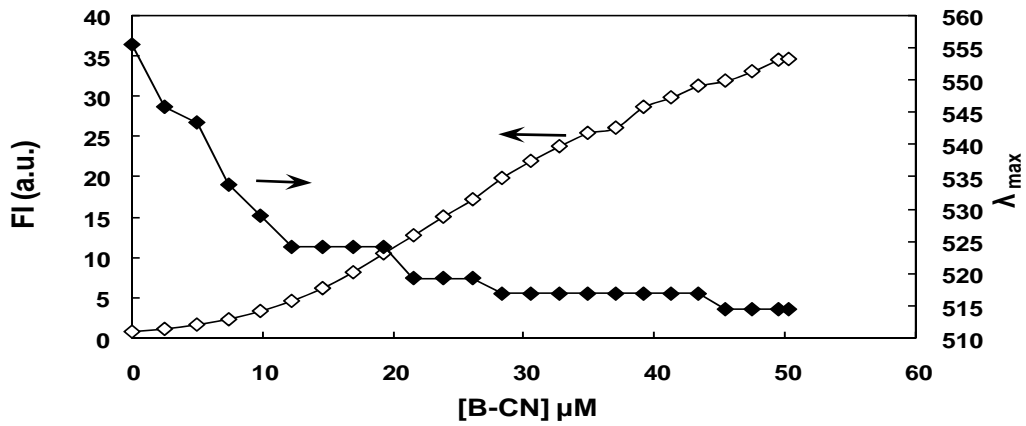
شکل ۳-۲۰: فلورسانس Synchronous و بررسی تغییر محیط ریشه های تایروزین پروتئین بتاکازئین ($5 \mu\text{M}$) در دمای ۲۵ درجه، در حضور و عدم حضور کورکومین ($9/28$ و $18/56$ میکرومولار).

۴-۴-۳ فلورسانس کورکومین

کورکومین خود در طول موج ۴۲۰ نانومتر تحریک شده و شدت نشر فلورسانس و حداکثر طول موج نشری (λ_{max}) آن به گونه ای است که نسبت به تغییرات قطبیت محیط تغییر میکند.

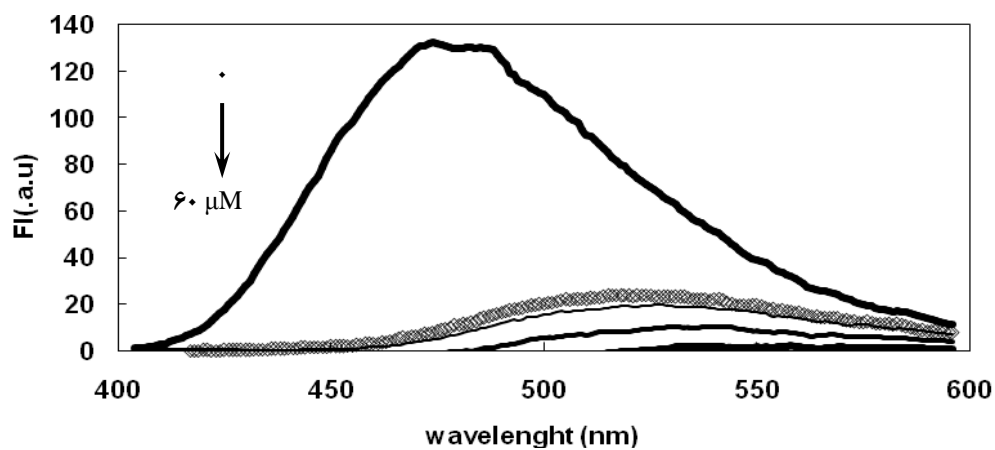


شکل ۳-۲۱: طیف فلورسانس کورکومین ($10 \mu\text{M}$) در حضور غلظتهای افزایشی پروتئین بتاکازئین.

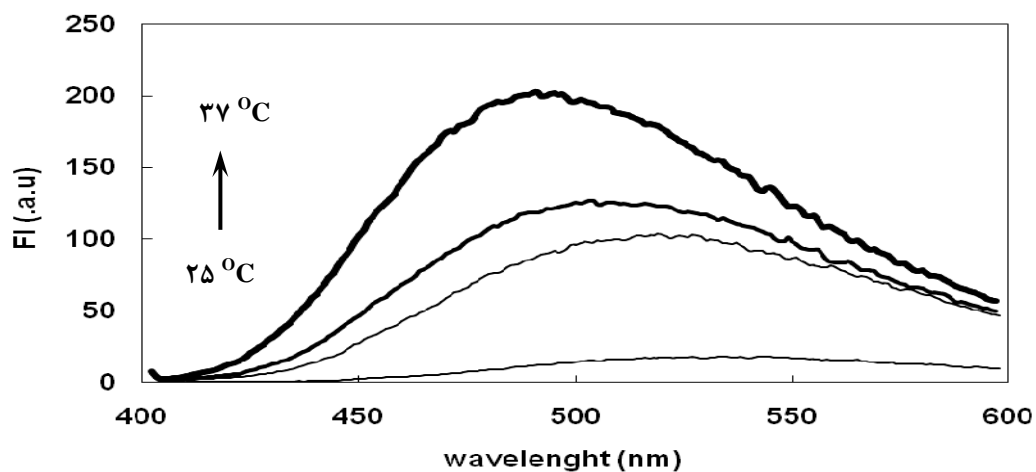


شکل ۳-۲۲: تغییرات حداکثر طول موج (λ_{max}) و حداکثر نشر کورکومین ($10 \mu\text{M}$) در حضور غلظتهای مختلف پروتئین بتاکازئین.

۳-۴-۵ فلورسانس ANS پروتئین در دماهای مختلف و در حضور و عدم حضور کورکومین

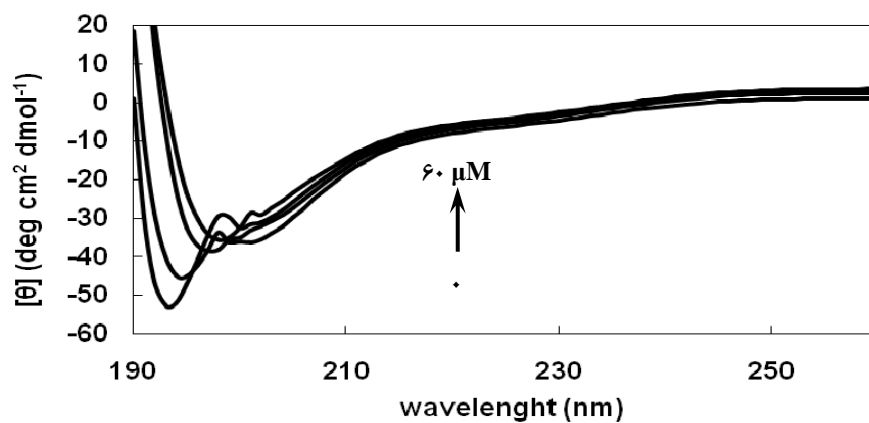


شکل ۳-۲۳: فلورسانس ANS (۲۰۰ میکرومولار) پروتئین بتاکازئین (۲۵ μM) در حضور غلظتهای مختلف کورکومین.

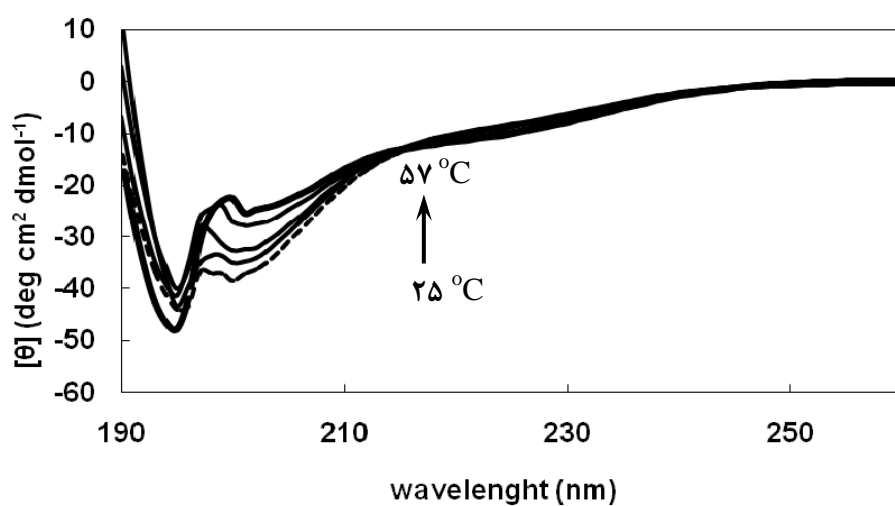


شکل ۳-۲۴: فلورسانس ANS (۲۰۰ میکرومولار) پروتئین بتاکازئین (۵ μM) در دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد.

۵-۳ دورنگ نمایی دورانی



شکل ۳-۲۵: دورنگ نمایی دورانی و بررسی تغییرات ساختارهای ثانویه بتا کاروتین ($10 \mu\text{M}$) در حضور غلظت‌های مختلف کورکومین.

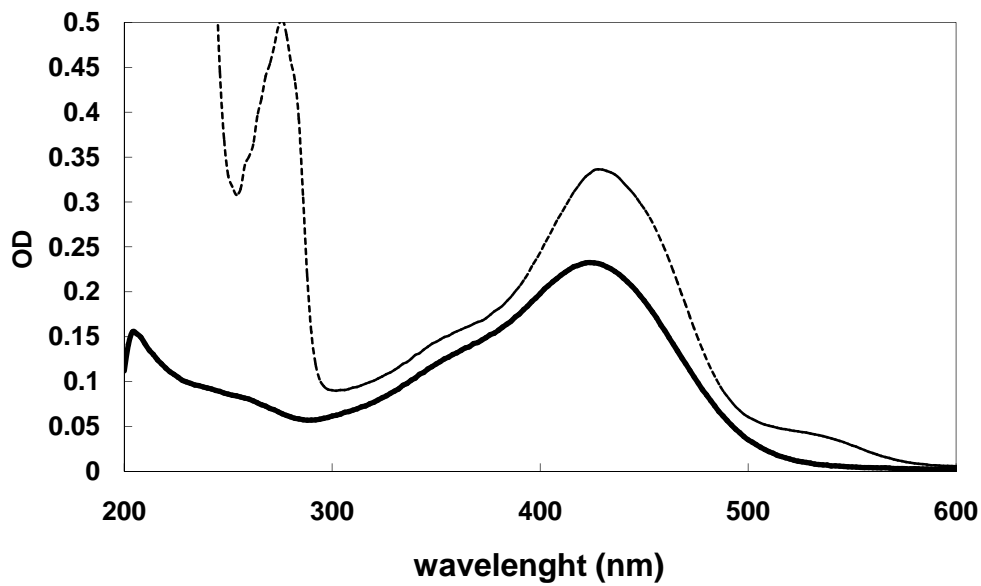


شکل ۳-۲۶: تغییر ساختار ثانویه پروتئین بتا کاروتین ($10 \mu\text{M}$) در دماهای مختلف (۲۵، ۳۰، ۳۷، ۴۷ و ۵۷ درجه سانتیگراد).

۳-۶ حلالیت کورکومین

۳-۶-۱ طیف جذبی کورکومین در حضور و عدم حضور کورکومین

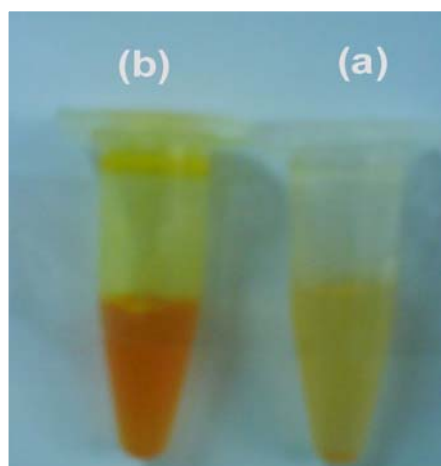
طیف جذبی کورکومین برخلاف نشر فلورسانس این ترکیب به تغییر پلاریته محیط حساس نیست.



شکل ۳-۲۷ : طیف جذبی کورکومین (۱۰ μM) به تنهایی (خط) و در حضور پروتئین بتاکازئین (۴۰ μM) (نقطه چین).

۳-۶-۲ حلالیت کورکومین قبل و بعد از انحلال در پروتئین بتاکازئین

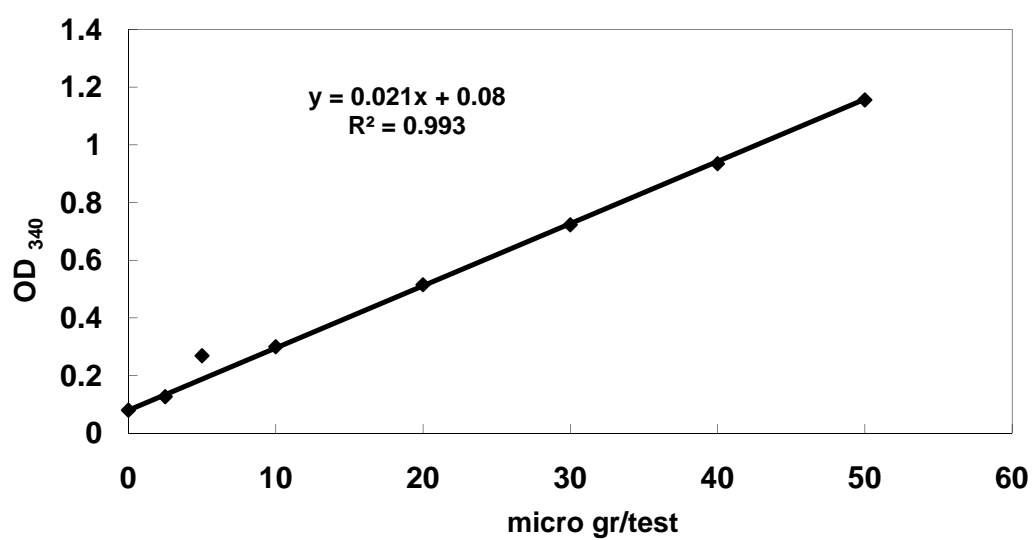
حلالیت کورکومین در درون پلیمر بتاکازئین (۱ W/v٪) با استفاده از روش تبخیر حلال سنجیده شد.



شکل ۳-۲۸ : میزان انحلال مقادیر برابری از کورکومین در بافر فسفات (a) و بافر فسفات حاوی بتاکازئین ۱٪ (b).

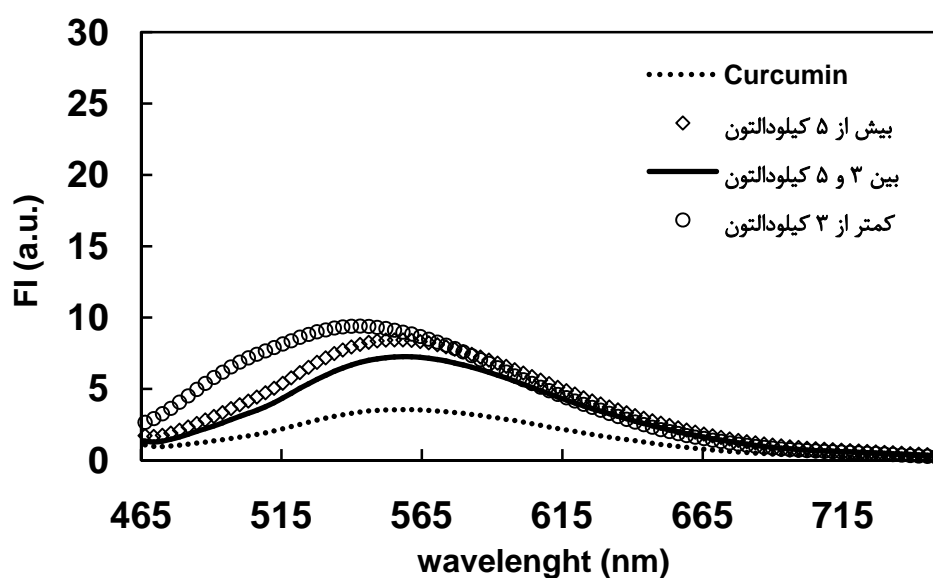
۷-۳ میانکنش پتیدها و کورکومین

۱-۷-۳ رسم منحنی استاندارد تعیین غلظت پتیدها



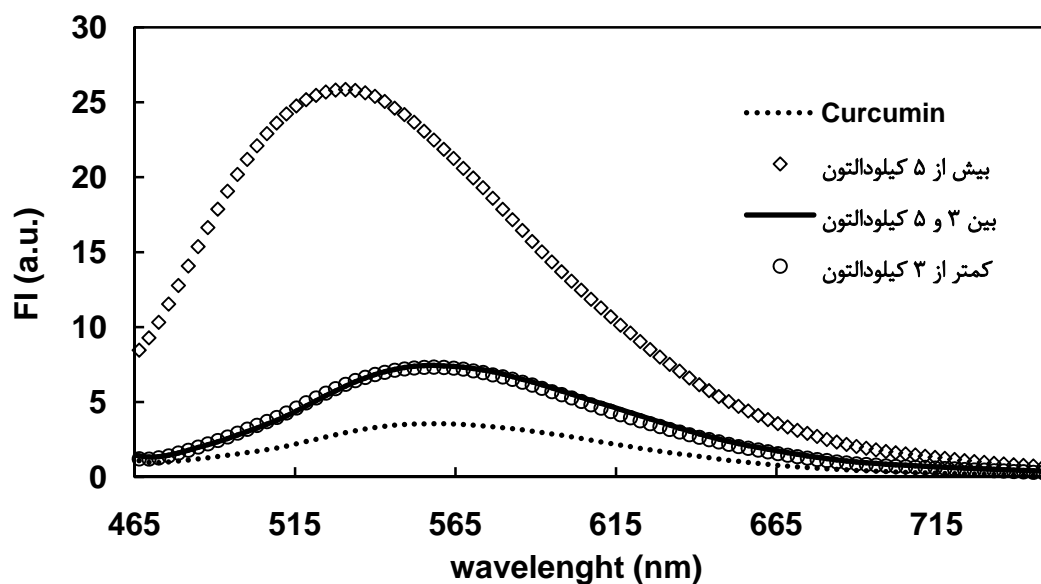
شکل ۳-۲۹: منحنی استاندارد تعیین غلظت پتیدها با استفاده از روش OPA.

۲-۷-۳ میانکنش بین کورکومین و پپتیدهای حاصل از هیدرولیز با آنزیم تریپسین



شکل ۳-۳۰: فلورسانس کورکومین در حضور غلظتهایی یکسان (۰/۴۵ mg/ml) از پپتیدهای کمتر از ۳ کیلو دالتون، بین ۳ و ۵ کیلو دالتون و بیش از ۵ کیلو دالتون پروتئین بتاکازئین که از هیدرولیز با آنزیم تریپسین بدست آمده اند.

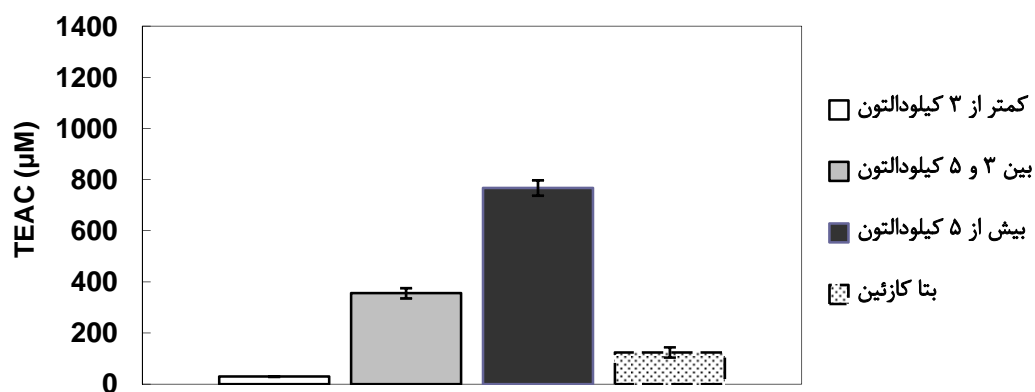
۳-۷-۳ میانکنش بین کورکومین و پپتیدهای حاصل از هیدرولیز با آنزیم کیموتریپسین



شکل ۳-۳۱: فلورسانس کورکومین در حضور غلظت‌های یکسان (۰/۴۵ mg/ml) از پپتیدهای کمتر از ۳ کیلو دالتون (الف)، بین ۳ و ۵ کیلودالتون (ب) و بیش از ۵ کیلو دالتون (ج) پروتئین بتاکازئین که از هیدرولیز با آنزیم کیموتریپسین بدست آمده اند.

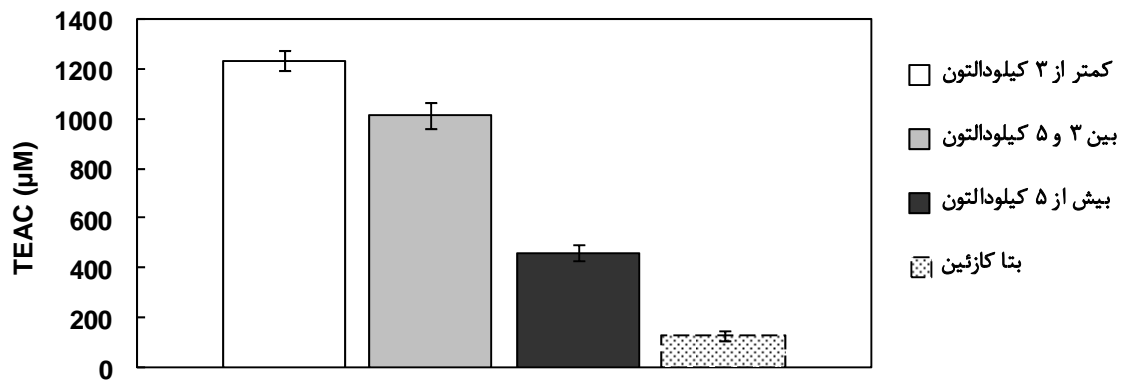
۸-۳ اندازه گیری خواص آنتی اکسیدانی

۱-۸-۳ خواص آنتی اکسیدانی پتیدها



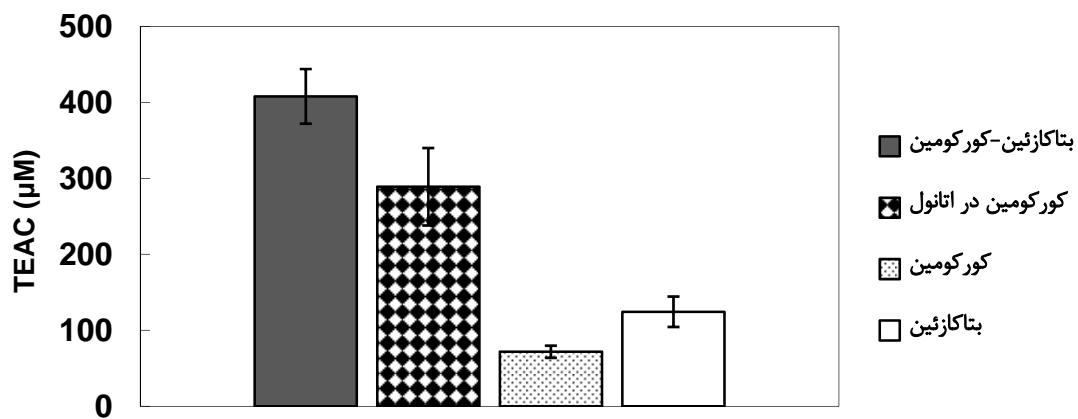
شکل ۳-۳۲: آنتی اکسیدانی پتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین بتاکارژین با آنزیم تریپسین. داده ها به صورت آنتی اکسیدانی مقادیر معادل ترولوکس^۱ (TEAC) بیان شده است.

^۱ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)



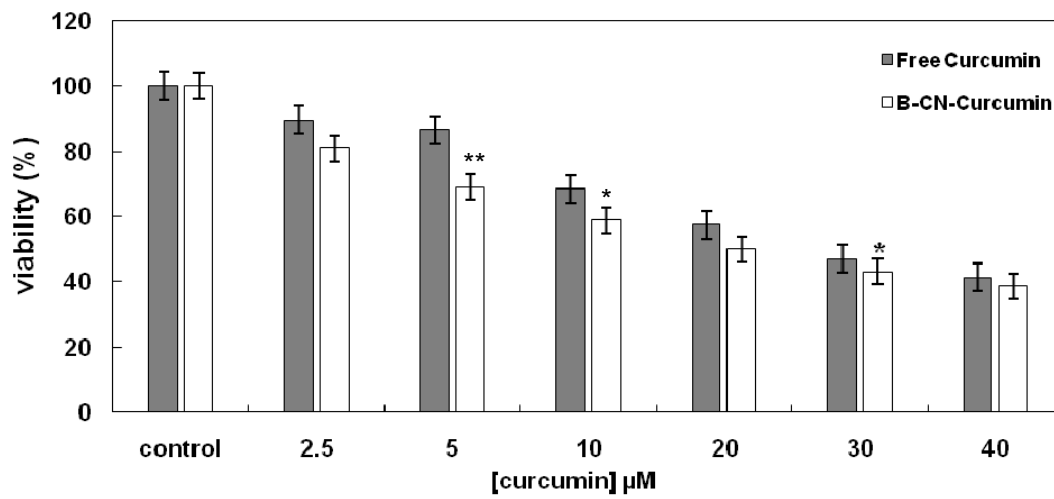
شکل ۳-۳۳: آنتی اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز بتاکارژنین با آنزیم کیموتریپسین.

۳-۸-۲ آنتی اکسیدانی مخلوط بتاکارژنین و کورکومین



شکل ۳-۳۴: مقایسه آنتی اکسیدانی مقادیری یکسان از کورکومین و بتاکارژنین (۰/۴۵ میلی گرم در میلی لیتر) و مخلوط آنها.

۹-۳ بررسی میزان ورود کمپلکس کورکومین-بتاکازئین



شکل ۳-۳۵: سمیت سلولی کورکومین (نمودار میله ای خاکستری) و کورکومین قرار گرفته در درون میسلهای بتاکازئین (نمودار میله ای سفید). ** و * به ترتیب $P_{\text{value}} < 0.01$ و $P_{\text{value}} < 0.05$ را نشان می‌دهند. داده‌ها میانگین سه تکرار ۱۰ تایی هستند.

بحث

ترکیبات دارویی بسیاری وجود دارند که علیرغم اثرات مطلوب، استفاده از آنها به دلیل ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی شان محدود شده است. در این مطالعه با توجه به پیشینه تاریخی استفاده از کورکومین در کشورهای آسیایی و بخصوص آنکه در کشور هند این ماده را به همراه شیر برای درمان زخمها و التهابات پوستی استفاده میکنند، بر آن شدیم تا میانکنش این ماده را با میسلهای پروتئین بتاکازئین شیر شتر بررسی کنیم.

در گونه های مختلف جانوری شیر ترکیب تقریباً یکسانی دارد اما پروتئینهای آنها کاملاً مشابه نیستند مثلاً همانطور که در شکل ۱-۳ الف، قابل مشاهده است، پروتئینهای کازئینی شیر گاو و شیر شتر حرکت الکتروفورزی کاملاً متفاوتی دارند اما به طور متوسط وزن مولکولی یکسانی را برای مجموعه آنها در نظر میگیرند. اصولاً از آنجایی که پروتئینهای کازئینی دچار تغییرات پس از ترجمه ای^۱ مثل فسفریلاسیون و گلیکوزیلاسیون میشوند، مکان آنها در روی ژل نشاندهنده وزن واقعی شان نیست. علاوه بر تنوع موجود در توالی پروتئینهای گونه های مختلف، چنین تغییرات پس از ترجمه ای نیز در جانوران مختلف متفاوت است.

مطالعه ای که در ابتدا بر روی میانکنش کورکومین با میسلهای مخلوط (مخلوطی از $\alpha S1$ ، $\alpha S2$ ، β و κ کازئین) انجام گرفت، نشان میداد که اتصال این ترکیب آبگریز (کورکومین) به کازئینهای شیر شتر به میزان ۱۳ برابر بیشتر است. کورکومین ترکیبی فلورسانس است و از این رو نشر فلورسانس آن در درون میسلهای مختلف (و بنابراین ثابت اتصال بدست آمده) نشانی از محیط مرکزی و آبگریز میسلها خواهد بود. تاکنون مطالعات اندکی به منظور بررسی میسلهای کازئینی گونه های مختلف انجام گرفته است اما همین بررسی به درستی تفاوت میسلها را از نظر هیدروفوبیسیته نشان میدهد.

پروتئینهای سازنده یک میسل، نسبت ریشه های آبگریز و هیدروفیل این پروتئینها، میزان تغییرات پس از ترجمه ای آنها، جایگاه انجام این تغییرات بر روی پروتئین و ساختار ثانویه این پروتئینها همگی بر محیط میسلی تاثیر گذار خواهد بود.

پروتئینهای $\alpha S2$ و κ در بخش بیرونی میسلها و پروتئینهای $\alpha S1$ و β بخش درونی میسل را تشکیل میدهند (آبگریزترین جایگاه). پروتئینهای $\alpha S1$ به دلیل نحوه توزیع ریشه های آبگریز خود میسلهایی کرمی شکل میسازند در حالیکه پروتئین بتاکازئین میسلهایی کروی با قطر ۱۳ نانومتر ایجاد میکنند.

پروتئین بتاکازئین گاوی (Q9TVD a.c)^۲ ۲۰۹ اسیدآمینو و وزنی معادل ۲۳/۵۸ کیلودالتون دارد در حالیکه این پروتئین در گونه شتری (P۰۲۶۶۶ a.c) اندکی بزرگتر و حاوی ۲۱۷ اسید آمینو (۲۴/۶۵ کیلودالتون) می باشد. این دو پروتئین ۸۴/۵٪ شباهت^۳ و ۶۷/۲٪ همسانی^۴ توالی دارند. تعداد ریشه های آبگریز این دو پروتئین نیز تقریباً مشابه است به علاوه تعداد گروههای احتمالی پذیرنده گروه فسفات در بتاکازئین

^۱ Post Translation

^۲ Accession Number (A.C)

^۳ Similarity

^۴ Identity

گاوی ۱۱ عدد و در در نوع شتری ۱۳ تا است. این دو پروتئین نقشه های هیدروفوبیسیته بسیار مشابهی را به نمایش میگذارند [۸۹].

اما بررسی مربوط به تغییرات هیدروفوبیسیته سطحی مربوط به این دو پروتئین در دماهای مختلف بیانگر آنست که در غلظت های یکسان پروتئین، این پارامتر در پروتئین گاوی به میزان قابل توجهی از پروتئین معادل شتری بیشتر است اما روند تغییرات هیدروفوبیسیته در هر دوی آنها یکسان است. نکته جالب در مورد هیدروفوبیسیته موثر این دو پروتئین آنست که داشتن برخی از گروههای آمینواسیدی مثل ریشه های گلايسين (که تعداد آنها در پروتئین گاوی ۳ برابر بیشتر از گونه شتری است) امکان تغییر ساختار سه بعدی و انعطاف پذیری بیشتر پروتئین گاوی را فراهم میکند اما هر دو نوع پروتئین با افزایش دما گروههای آبگریز بیشتری را در سطح قرار میدهند و از این رو امکان میانکنش بیشتر پروتئینها و خودتجمعی آنها افزایش می یابد.

CAC بتا کازئین گاوی با استفاده از DSC^۱ و ITC^۲ مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات ما بر روی CAC این پروتئین از گونه شتری با استفاده از فلورسانس پیرن انجام گرفت. از این رو مقایسه این اعداد که با روشهای مختلف بدست آمده اند چندان صحیح به نظر نمی رسد. این پارامتر در هر دوی این پروتئینها با افزایش دما به شدت کاهش می یابد.

منحنی اتصال همدمای رسم شده این پروتئین در سه دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه به صورت دو فازی است، این مطلب وجود دو نوع جایگاه^۳ را میرساند به طوریکه جایگاه اول یک ناحیه اتصالی و جایگاه دوم چهارالی پنج ناحیه برای اتصال^۴ دارد اما در هر سه دما تمامی جایگاههای بالقوه برای اتصال کورکومین (۱۱ الی ۱۳ جایگاه) پر نمی شوند. ضریب خاموشی^۵ کورکومین در هنگام اتصال به پروتئین از ϵ آن در حالت آزاد (cm^{-1} $19000M^{-1}$) کمتر است، ϵ_{b1} و ϵ_{b2} به ترتیب برابرند با ۱۳۲۱۲ و $7000 \text{ cm}^{-1} M^{-1}$. این مقادیر بیانگر آنست که کورکومین به مکانی آبگریزتر از محیط بافری پیوند میشود. این اعداد در دماهای مختلف چندان تغییر نمیکنند.

کورکومین دو حلقه آروماتیک و ده پیوند دوگانه دارد و بیشینه جذب آن در طول موج ۴۲۶ نانومتر است. تغییرات جذبی کورکومین در این طول موج دو فازی است. منحنی انرژی آزاد (ΔG_v) در مقابل v در هر سه دما دویبخشی است و به این ترتیب تقریباً در هر دما یک پنجم از مولکولهای کورکومین پیوند شده به پروتئین از طریق میانکنشهای غیرآبگریز با آن میانکنش میکنند.

ϵ_{b1} نسبت به ϵ_{b2} کوچکتر است به عبارت دیگر منطقه اتصال اول آبگریزتر از جایگاه دوم است. با در نظر داشتن مطالب فوق میتوان اینگونه جمع بندی کرد که ابتدا کورکومین ها از طریق میانکنشهای غیرآبگریز (میانکنشهای دور بعد) به پروتئین نزدیک میشوند اما جایگاهی که در آن قرار میگیرند عمدتاً آبگریز است. در

^۱ Differential Scanning Calorimetry

^۲ Isothermal Titration Calerimetry

^۳ Site

^۴ Set

^۵ Extinction Coefficient

هر سه دما ثابت اتصال ظاهری جایگاه اول کوچکتر از ثابت اتصال جایگاه دوم است. نمی توان انتظار داشت جایگاههای با هیدروفوبیسیته بیشتر ثابت اتصال بزرگتری نیز داشته باشند چرا که علاوه بر گروههای درون جایگاه، شکل فضایی آنها نیز در ایجاد اتصال محکم موثر است. از این رو بررسی تاثیر جایگاهها بر یکدیگر اهمیت می یابد. منحنی هیل مربوط به این میانکنش نشان میدهد که در بین جایگاهها تعاونی مثبت وجود دارد.

به عبارت دیگر اتصال به جایگاه اول هر چند کمی سست تر از جایگاه دوم است ولی به اتصال مولکولهای کورکومین به جایگاه های دیگر کمک میکند. افزایش دما تعداد لیگاندهای متصل به ماکرومولکول را تغییر نمیدهد.

پروتئین بتاکازئین شتر فاقد تریپتوفان است ولی پنج تیروزین و ۱۰ ریشه فنیل آلانین دارد. اتصال کورکومین به پروتئین در هر سه دما جذب ۲۸۰ نانومتر پروتئین را افزایش میدهد، به عبارت بهتر گروههای آروماتیکی که در درون پروتئین هستند (اسیدهای آمینه تیروزین و فنیل آلانین) بیشتر در معرض حلال قرار میگیرند. بررسی بیشتر این اتصال از طریق طیف سنجی فلورسانس نشان میدهد که کورکومین (به عنوان یک خاموش کننده خارجی^۱) با چسبیدن به نواحی آبگریز (که در نزدیکی گروههای آروماتیک قرار دارند) نشر فلورسانس پروتئین را (در طول موج تهییجی ۲۸۰ نانومتر) کاهش میدهد. در این طول موج گروههای تیروزین و به میزان بسیار اندکی فنیل آلانین از خود نشر نشان میدهند به عبارت بهتر ریشه های فلوئوفور به سطح میآیند و در محیط قطبی تری قرار میگیرند. در این شرایط هیچ گونه جابجایی در بیشینه طول موج نشری پروتئین مشاهده نمیشود و ساختار سه بعدی پروتئین تغییر نمی یابد.

منحنی خاموشی استرن-ولمر در هر سه دما خطی است (بنابراین مکانیسم خاموشی از نوع همگن^۲ است). با توجه به اینکه با افزایش دما ثابت خاموشی نیز بیشتر میگردد میتوان بیان داشت که این خاموشی از نوع دینامیک^۳ است و یا به عبارت بهتر، سهم خاموشی دینامیک در این میانکنش بیشتر است. خاموشی دینامیک فرایندی است که در آن لیگاند مستقیماً با ماکرومولکول برخورد نکرده و از طریق تشکیل حدواسطهایی نشر گروههای فلوئوفور را متاثر میکند. در این شیوه مولکول خاموش کننده به سمت عامل فلوئوفور دیفیوز میشود و در فاصله زمانی لازم برای نشر، فلورسانس آن را خاموش میکند. افزایش دما سبب شدیدتر شدن حرکت مولکولها شده و در نتیجه امکان خاموشی بیشتر فلورسانس گروه فلوئوفور را فراهم می آورد [۱۰۳].

با استفاده از این پدیده میتوان نوع میانکنشها را دقیقتر تعیین نمود. برای این منظور ثابت اتصال کورکومین در دماهای مختلف با استفاده از معادله تغییر یافته استرن-ولمر بررسی شد. با افزایش دما تعداد لیگاندهای پیوند شده به ماکرومولکول بدون تغییر مانده و در مقابل ثابت اتصال تقریباً ۴۶ برابر بیشتر میگردد (جدول ۳-۱). با استفاده از رابطه وانت هوف میتوان میزان ΔH و ΔS این میانکنش را بدست آورد.

^۱ Extrinsic Fluorescence

^۲ Homogenous Quenching

^۳ Dynamic Quenching

با افزایش دما آنتروپی سیستم افزایش می یابد و میانکنشهای آبریز با افزایش آنتروپی، پیشرفت بیشتری دارند^۱ و قویتر میگردند از این رو ΔH این نوع میانکنشها منفی و ΔS آنها مثبت است. ΔS این میانکنش $4/5 \pm 0/8 \text{ KJ mol}^{-1}$ بدست آمد. در تمامی دماهای بررسی شده ΔG عددی منفی است در نتیجه این اندرکنش آگزوترم به طور خود به خودی پیشرفت میکند و مشارکت نیروهای آبریز در آن غالب است. این نتیجه، نتایج بدست آمده از رسم منحنی های اتصال همدم را تایید میکند.

کورکومین در ساختار خود دو عامل OH فنولی دارد (با pK برابر با ۸/۳۸ و ۹/۸۸) که این دو گروه بسته به pH محیط بین حالت های انولی و کتونی تغییر میکنند. در pH خنثی حدود ۱۰٪ از مولکولهای کورکومین باردار هستند از این رو میتوان انتظار داشت که یک پنجم مولکولهای چسبیده به پروتئین از طریق پیوندهای غیرآبریز (میانکنشهای $\pi-\pi$ ، الکتروستاتیک) با پروتئین میانکنش داشته باشند [۱۱۰].

مولکول کورکومین در طول موج ۴۲۰ نانومتر تحریک شده و در محدوده ۷۰۰-۴۵۰ نانومتر نشر دارد. نشر فلورسانس کورکومین بسیار به تغییرات محیطی حساس است به طوریکه در محیطهای آبی این میزان بسیار کم است. از این رو با ردیابی طیف نشری کورکومین میتوان از موقعیت آن در درون میسلهای پروتئینی اطلاع یافت. با افزایش بیشتر پروتئین و اتصال کورکومین به نواحی آبریز پروتئین شدت نشر افزوده شده و به علاوه طیف حاصله به سمت طول موجهای کوتاه تر جابجا میگردد^۲ (در مورد پروتئینهایی مثل BSA، HSA و نیز نشاسته و سیکلودکسترین نیز چنین فرایندی مشاهده میشود). این مشاهدات بیانگر آنند که کورکومین هرچه بیشتر از محیط آبدوست بافوری به درون محیطهای آبریز جابجا میگردد تا جایی که کاملاً در محیط آبریز قرار بگیرد.

با افزایش دما، هیدروفوبیسیته سطحی بتاکازئین افزایش می یابد. در حضور غلظتهای افزایشی کورکومین و در دمای ۲۵ درجه این میزان به تدریج کاسته میشود به عبارت دیگر کورکومین برای کسب جایگاههای آبریز با ANS رقابت میکند. به علاوه با افزایش دما شدت فلورسانس ذاتی کارئین نیز کاهش می یابد و این تغییر ساختارهای ثانویه پروتئین را دگرگون نمیکند. از این رو فرضیه ایجاد ساختار مولتن گلوبول بوجود می آید که برای آزمون این فرضیه لازم است بررسیهای بیشتری بر روی تغییر نسبی اندازه این مولکول در دماهای مختلف انجام بگیرد.

مولتن گلوبول ساختاری است که در آن نواحی آبریز اندکی از موقعیت درونی خود خارج شده اند بطوریکه بدون تغییر عناصر ثانویه، ساختار سوم متحول میشود. چنین فرایندی عملکرد طبیعی یک آنزیم یا پروتئین دارای فعالیت مشخص را مختل میکند زیرا جایگاههای حیاتی و مهم یک پروتئین و نیز موقعیت فضایی نسبی آنها از حالت طبیعی و صحیح خارج میشوند.

علیرغم تغییر طیف نشری کورکومین نسبت به تغییرات محیطی، طیف جذبی آن وابسته به محیط نیست به گونه ای که λ_{\max} کورکومین آزاد نسبت به کورکومین متصل به پروتئین (در غلظتهای افزایشی پروتئین)

^۱ Entropy Driven
^۲ Blue Shift

یکسان است ولی این دو، شدت جذب متفاوتی نشان می‌دهند. چنین مشاهده ای حاکی از آنست که کورکومین قرار گرفته در میسل نسبت به کورکومین آزاد در محیط بیشتر حل شده است. زیرا ثابت خاموشی کورکومین آزاد در بافر $19000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ است در حالیکه نشان دادیم در حالت اتصال یافته این میزان کمتر خواهد بود بنابراین با در نظر گرفتن رابطه بیر-لامبرت^۱ ($A=\epsilon Cl$)، فقط در حالتی این جذب افزایش می‌یابد که غلظت (C) افزایش یافته باشد یعنی انحلال کورکومین در درون سیستم افزوده شده باشد. وقتی کورکومین در درون سیکلودکسترین قرار می‌گیرد نیز این تغییر مشاهده میشود، سیکلودکسترین ها ترکیباتی حلقوی هستند که درونی آگریز و برونی آبدوست دارند (شبهه میسلها). بنابراین لازم است بررسی بیشتری بر روی میزان انحلال کورکومین در این پلیمر طبیعی انجام بگیرد.

در نتیجه انحلال کورکومین را در درون میسل ها نسبت به محیط آبی (3×10^{-8} مولار) با استفاده از روش تبخیر حلال مقایسه کردیم. این میزان در درون میسلهای بتاکازئین (۱٪) تقریباً ۲۵۷۸ برابر افزوده میشود به عبارت دیگر میزان انحلال در درون محلول حاوی یک درصد بتاکازئین $7/7 \times 10^{-5}$ مولار است.

احتمالاً این میزان تغییر در افزایش حلالیت کورکومین، دسترسی زیستی این ترکیب را نیز برای سلولهای K۵۶۲ افزایش میدهد. به علاوه این پلیمر با دارا بودن ویژگی آنتی اکسیدانی خود از کورکومین در مقابل تنشهای اکسیداتیو مراقبت میکند و در نتیجه خواص آنتی اکسیدانی این ترکیب را حفظ خواهد کرد. این پروتئین برابر است با ۵/۷ واحد و این پلیمر در pH مربوط به محیط کشت ($7/4 \pm 0/1$) باری منفی دارد. در نتیجه پروتئین حاوی کورکومین، با بار مثبت بیرونی غشای سلول تماس بیشتری خواهد یافت. به این ترتیب سمیت کورکومین قرار گرفته در درون میسل نسبت به کورکومین رها افزایش یافته و IC_{50} این کمپلکس ($17/7 \pm 4$ میکرومولار) نسبت به کورکومین بدون حامل ($26/5 \pm 3/4$ میکرومولار) کاسته میشود. این داده ها از میانگین سه آزمون مستقل از هم^۲ بدست آمده اند و از نظر آماری اختلاف معنی داری بینشان وجود دارد (P value کمتر از ۰/۰۱ و ۰/۰۵). به عبارت دیگر سمیت سلولی در حضور میسل به میزان ۳۳٪ بهبود یافته است.

کورکومین سبب می‌گردد خودتجمعی این پروتئین در غلظتهای بالاتری روی دهد (CAC افزایش یابد) به عبارتی دیگر کورکومین میسلهای بتاکازئین را ناپایدار میکند^۳. تاثیر ترکیبات دارویی بر پایداری ترمودینامیکی میسلها از مواردی است که در هنگام کاربرد آنها بویژه در درون بدن (دمای ۳۷ درجه سانتیگراد) اهمیت بسیاری پیدا میکند. به همین دلیل غلظت بحرانی میسلی شدن پروتئین را در حضور دو غلظت از کورکومین (۱۵ و ۳۰ میکرومولار) و در دمای ۳۷ درجه بررسی کردیم. نتایج حاکی از آنست که میزان CAC بیشتر میگردد بطوریکه این پارامتر در دو غلظت ۱۵ و ۳۰ میکرومولار به ترتیب برابر است با ۱۶ و ۲۰ میکرومولار، یعنی غلظتهای بیشتر کورکومین میسلها را ناپایدارتر میکنند.

^۱ Beer Lambert Equation

^۲ Independent

^۳ Destablize

تاکنون سیستمهای انتقالی بسیاری برای کورکومین پیشنهاد شده است اما بتاکازئین نسبت به سایر ناقلین مزایایی دارد. این پلیمر طبیعی و زیست تخریب پذیر را با قابلیت خودتجمعی بالا و CAC بسیار اندکی (در حد ۷ میکرومولار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، دمای بدن) که دارد به راحتی و با اطمینان میتوان در صنایع غذایی استفاده کرد. تا به امروز فقط نشاسته های تغییر یافته با گروههای آبگریز و کازئینهای مخلوط شیر را به عنوان حامل برای کورکومین در صنایع غذایی معرفی کرده اند چرا که FDA استفاده از کاپلیمرهای سنتزی (هر چند زیست تخریب پذیر)، سیکلودکسترین و سایر پلیمرهای شیمیایی را برای به کارگیری در محصولات غذایی مجاز نمیداند. این کاپلیمر پیچیده^۱ نسبت به میسلهای نشاسته ای و کازئینهای مخلوط CAC بسیار پایینی دارد و به راحتی دماهای بالا را تحمل میکند و انحلال پذیری کورکومین را نیز بیشتر افزایش میدهند، نشاسته و یک نوع از سیکلودکسترینهای تغییر یافته با گروههای آبگریز به ترتیب حلالیت را ۱۴۷۰ و ۱۷۰۰ بار بهبود میبخشند.

به کارگیری این میسلها در مسیر دهانی و انتقال آنها به روده کوچک چندان ممکن نیست زیرا انتقال موثر داروهای پروتئینی از راه خوراکی تاکنون تنها به میزان ۳۰٪ محقق شده است چرا که آنزیم پپسین معده و پروتئینازهای ابتدای روده کوچک سبب هیدرولیز آنها خواهند شد [۱۰۴] ولی به راحتی میتوان داروهای آبگریزی را در درون این پلیمر حل کرده و فورمولاسیونهایی برای استفاده جلدی از کورکومین طراحی کرد.

آنزیمهای تریپسین و کیمو تریپسین سرین پروتئازهایی هستند که به ترتیب بعد از اسیدآمینوهای باردار مثبت (لیزین و آرژنین) و اسیدآمینوهای بسیار بزرگ آبگریزی (تیروزین، تریپتوفان و فنیل آلانین) برش ایجاد میکنند. خواص آنتی اکسیدانی پپتیدهایی که از هیدرولیز بتاکازئین با این آنزیمها بدست آمده اند با یکدیگر متفاوت است و همه آنها از این نظر بهتر از بتاکازئین نیستند. مثلاً پپتید کمتر از ۳ کیلودالتون تریپسین، آنتی اکسیدانی کمتری دارد ($P_{value} < 0.05$) ولی گروههای دیگر به طور معنی داری از پروتئین سالم بیشتر هستند. این پپتیدها براساس جرم مولکولی از یکدیگر جدا شده اند و تفاوت در آنتی اکسیدانی آنها حاکی از تفاوت توالی، اختلاف در تعداد اسیدآمینوهای آنتی اکسیدان مثل تیروزین، هیستیدین، پرولین، متیونین و ... و نیز موقعیت نسبی این اسیدآمینوها نسبت به یکدیگر و نسبت به سایر ریشه ها می باشد.

بررسیها بر روی آنتی اکسیدانی هیدرولیزات سایر پروتئینها نشان داده است که معمولاً پپتیدهای کوچکتر از این لحاظ قویتر از پپتیدهای بزرگتر هستند زیرا برش بیشتر، گروههای آنتی اکسیدانی را بهتر در معرض قرار میدهد [۱۰۵]. در این مطالعه نیز این الگو در مورد هیدرولیزات کیموتریپسین مشاهده میشود ولی در پپتیدهای تریپسینی چنین نیست و بالعکس آنتی اکسیدانی پپتیدهای بیش از ۵ کیلودالتون به طور معنی داری از دو گروه دیگر بیشتر است ($P_{value} < 0.01$). این الگو در مورد تعدادی از پپتیدهایی که از منابع دیگر بدست آمده اند و یا حتی پپتیدهای سنتزی نیز مشاهده شده است. این گروه میانکنش خوبی با کورکومین نشان میدهد از اینرو به نظر میرسد هیدروفوبیسیته آن بیش از دو گروه دیگر باشد. طبق گزارشات آبگریزی یک ترکیب در به دام اندازی گروههای رادیکالی آبگریز تاثیر میگذارد (رادیکال ABTS نیز یک منبع پایدار و

^۱ Complex Copolymer

آبگریز از رادیکالها است) و از این رو به نظر میرسد در بررسی بیشتر با استفاده از تستهای آنتی اکسیدانی مرتبط با پراکسیداسیون لیپیدها این گروه نتیجه بهتری نسبت به دو گروه دیگر داشته باشد.

آزمون ABTS فعالیت آنتی اکسیدانی کلی را میسنجد و در نتیجه ما از آن برای طبقه بندی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها استفاده کردیم. تستهای دیگر از قبیل DPPH، فریک تیوسیانید و ORAC ویژگیهای دیگری از این پپتیدها را آشکار خواهند کرد [۱۰۶].

مقایسه آنتی اکسیدانی بتاکازئین و کورکومین با غلظتهای برابر (۰/۴۵ mg/ml) نشان میدهد که آنتی اکسیدانی بتاکازئین به طور معنی داری از کورکومین بیشتر است ($P_{value} < 0/01$). آنتی اکسیدانی مخلوط این دو ماده (محلول حاوی کورکومین و بتاکازئین با همان غلظتهای قبلی) نیز بررسی شد، همانگونه که در نمودار ۳-۳۴ مشاهده میشود این مقدار به میزان زیادی از تک تک این ترکیبات بیشتر است به طوری که میتوان آنرا یک سینرژیسم^۱ دانست و نه یک اثر افزایشی^۲.

مطابق گزارشات موجود، پلی فنولها از ترکیباتی هستند که در ترکیب با مواد آنتی اکسیدانی دیگر ممکن است سینرژیسم داشته باشند مثلاً اسید سیتریک آنتی اکسیدانی آنها را میافزاید.

مکانیسمهای مختلفی منجر به این مشاهده میشوند از آن جمله میتوان به فرایند بازسازی^۳، استفاده از مکانیسم های مختلف برای به دام اندازی رادیکالها و افزایش حلالیت و ترکیبی از این مکانیسمها اشاره کرد [۱۰۷، ۱۰۸، ۱۰۹]. آنتی اکسیدانی کورکومین حل شده در محلول آبی نسبت به کورکومین حل شده در اتانول بسیار کمتر است ($P_{value} < 0/01$) در حالیکه مخلوط بتاکازئین و کورکومین در محلول آبی این ویژگی را بهبود بخشیده اند. این مخلوط نسبت به طور معنی داری از کورکومین اتانولی بیشتر است ($P_{value} < 0/05$). بنابراین میتوان این ویژگی را نسبت به کورکومین در محلول آبی یک سینرژیسم دانست که حداقل یکی از دلایل آن افزایش حلالیت کورکومین در محلول بتاکازئینی می باشد.

میسلهای پپتیدی اهمیت بسیاری در انتقال دارو دارند به گونه ای که پپتیدهای طراحی شده از روی تکرارهای توالی پروتئین الاستین و کراتین^۴ علاوه بر حل کردن ترکیبات آبگریز در درون خود، میانکنش و انتقال آنها را به درون سلول تسهیل میکنند و ناقلین خوبی نیز برای پلاسمیدها و DNA می باشند. بررسی بیشتر بر روی پپتید میانکنش کننده با کورکومین این قابلیت را به آزمون خواهد گذاشت.

نتیجه گیری کلی

مولکول آبگریز کورکومین بتاکازئین عمدتاً از طریق میانکنش های آبگریز و اندکی یونی با پروتئینهای بتاکازئین میانکنش میکند، این میانکنش خودبه خودی است و احتمالاً در دمای بدن به دلیل القای ساختار مولتن گلوبول روی میدهد به علاوه قرار گیری آن در درون میسلهای بتاکازئین از طریق فلورسانس اثبات شد.

^۱ Synergism Effect

^۲ Additive Effect

^۳ Regeneration

^۴ Elastin And Keratin Like Peptides

این مجموعه حلالیت کورکومین را به میزان ۲۵۷۸ بار بهبود بخشیده، دسترسی زیستی آن را در محیط کشت برای سلولهای سرطانی K۵۶۲ بیشتر کرده و آنتی اکسیدانی آن را در محلولهای آبی افزایش میدهد. از میان پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین بتاکازئین با آنزیمهای تریپسین و کیموتریپسین نیز تنها پپتیدهای بیش از ۵ کیلودالتون بدست آمده از هیدرولیز با تریپسین با این ترکیب میانکنش دارند. الگوی آنتی اکسیدانی این دو گروه پپتیدی حاکی از تفاوت توالی آنها می باشد از این رو گروه پپتیدی میانکنش کننده با کورکومین هیدروفوبیسیته بالاتری نیز خواهد داشت.

چشم اندازی به آینده

با توجه به اثرات این پلیمر طبیعی بر حل نسبی مشکل انحلال کورکومین در سیستم های آبی، لازم است جایگاه دقیق این ترکیب و سینتیک رهایی این ترکیب از درون میسل بتا کازئین مطالعه شود. به علاوه مخلوط پپتیدی با وزن بیش از پنج کیلو دالتون را باید با استفاده از HPLC براساس هیدروفوبیسیته جدا کرد و سپس میانکنش پپتیدهای حاصله را با کورکومین و میزان CAC آنها را مورد بررسی قرار داد تا به این ترتیب توانایی بهترین کمپلکس را در انتقال کورکومین به درون سلول مطالعه کرد. همچنین لازم است بررسی بیشتری بر روی مکانیسم افزایش آنتی اکسیدانی مخلوط کورکومین - بتاکازئین انجام بگیرد.

به منظور تایید یا رد ساختار مولتن گلوبول این پروتئین در دماهای مختلف، لازم است اندازه قطر مولکول در دماهای بالاتر مورد بررسی قرار بگیرد.

به علاوه این مطالعه و مطالعات دیگر انجام گرفته بر روی ترکیبات شیر شتر، نویدبخش توسعه پرورش این گونه جانوری، صنعتی کردن این محصول و ترغیب مصرف کنندگان به استفاده از آن می باشند.

منابع

- 1- I. Chattopadhyay, K. Biswas, U. Bandyopadhyay, and R.K. Banerjee, Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications, *Current Science* 87(2004) 1325-1330.
- 2- S. Singh, From exotic spice to modern drug? *Cell* 130(2007) 765-768.
- 3- B. Patwardhan, and R.A. Mashelkar, Traditional medicine-inspired approaches to drug discovery: can Ayurveda show the way forward? *Drug Discovery Today* 14(2009) 804-811.
- 4- A. Niranjana, and D. Prakash, Chemical constituents and biological activities of turmeric (*Curcuma longa* L.) - A review. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* 45(2008) 109-116.
- 5- A. Goel, A.B. Kunnumakkara, and B.B. Aggarwal, Curcumin as "Curcumin": From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology* 787-809. 75(2008)
- 6- P. Anand, A.B. Kunnumakkara, R.A. Newman, and B.B. Aggarwal, Bioavailability of curcumin: Problems and promises. *Molecular Pharmaceutics* 4(2007)807-818 .
- 7- H. Hatcher, R. Planalp, J. Cho, F.M. Tortia, and S.V. Torti, Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(2008) 1631-1652.
- 8- K. Letchford, R. Liggins, and H. Burt, Pharmaceutics, preformulation and drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97(2008) 1179-1190.
- 9- Y.B. Liu, R. Dargusch, P. Maher, and D. Schubert, A broadly neuroprotective derivative of curcumin. *Journal of Neurochemistry* 105(2008) 1336-1345.
- 10- R.K. Maheshwari, A.K. Singh, J. Gaddipati, and R.C. Srimal, Multiple biological activities of curcumin :A short review. *Life Sciences* 78(2006) .2081-2087.
- 11- J.Y. Feng, and Z.Q. Liu, Phenolic and Enolic Hydroxyl Groups in Curcumin: Which Plays the Major Role in Scavenging Radicals? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(2009) 11041-11046.
- 12- M .Panchatcharam, S. Miriyala, V.S. Gayathri, and L. Suguna, Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Molecular and Cellular Biochemistry* 290(2006) 87-96.
- 13- R.L. Thangapazham, A. Sharma, and R.K. Maheshwari, Beneficial role of curcumin in skin diseases. *Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease* 595(2007) 343-357.
- 14- S. Swarnakar, K. Ganguly, P. Kundu, A. Banerjee, P. Maity, and A.V. Sharma, Curcumin regulates expression and activity of matrix metalloproteinases 9and 2during prevention and healing of indomethacin-induced gastric ulcer. *Journal of Biological Chemistry* 280(2005) 9409-9415.
- 15- R.L. Thangapazham, A. Sharma, and R.K. Maheshwari, Biomarkers of angiogenesis in wound healing and cancer: Role of botanicals and phytochemicals. *Proceedings of the Fourth International Conference on Quality and Safety Issues Related to Botanicals* 46(2006) 129-136.

- 16- H. Yasui, A. Andoh, S. Bamba, O. Inatomi, H. Ishida, and Y. Fujiyama, Role of fibroblast growth factor- 2 in the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human intestinal myofibroblasts. *Digestion* 69(2004) 34-44.
- 17- P. Anand, C. Sundaram, S. Jhurani, A.B. Kunnumakkara, and B.B. Aggarwal, Curcumin and cancer: An "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Letters* 267(2008) 133-164.
- 18- J. Ravindran, S. Prasad, and B.B. Aggarwal, Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively ? *Aaps Journal* 11 (2009) 495-510.
- 19- A. Goel, S. Jhurani, and B.B. Aggarwal, Multi-targeted therapy by curcumin: how spicy is it? *Molecular Nutrition & Food Research* 52(2008) .1010-1030.
- 20- S. Stigiliani, S. Caviglia, I. Sogno, and A. Albin, Dietary products and angiogenesis. *Angiogenesis: basic science and clinical applications* 26(2007) 350-358.
- 21- O.P. Rafiee, M.F. Otterson, and D.G. Binion, Curcumin inhibits angiogenesis of human intestinal microvascular endothelial cells (HIMEC) through COX- 2 inhibition. *Gastroenterology* 134(2008) 217-227.
- 22- Y.J. Surh, and K.S. Chun, Cancer chemopreventive effects of curcumin. *Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease* 595(2007) 149-172.
- 23- A.B. Kunnumakkara, P. Anand, and B.B. Aggarwal, Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Letters* 269 (2008) 199-225 .
- 24- S. Aggarwal, W. Hansel, M.W. Ndinguri, R. Solipuram, Q. Wang, and R.P. Hammer, LHRH-Curcumin Conjugate Inhibits Pancreatic Cancer Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Pancreas* 38 (2009) 980-988 .
- 25- M. Youns, A. Bauer, J. Reichling, T. Efferth, and J.D. Hoheisel, Expression profiling and network-based analysis for the effect of curcumin on pancreatic cancer cells. *Planta Medica* 75 (2009) 1081-1088 .
- 26- W. Zhang, J. Xu, and W. Huang, The effects of curcumin on cellular cycle of pancreatic carcinoma cells in vitro. *China Tropical Medicine* 8 (2008) 2115-2116 .
- 27- E. Half, and N. Arber, Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 10 (2009) 211-219.
- 28- S.M. Johnson, P. Gulhati, I. Arrieta, X.F. Wang, T. Uchida, T.Y. Gao, and B.M. Evers, Curcumin Inhibits Proliferation of Colorectal Carcinoma by Modulating Akt/mTOR Signaling. *Anticancer Research* 29 (2009) 3185-3190.
- 29- A.B. Kunnumakkara, P. Diagaradjane, P. Anand, H.B. Kuzhuvelil, A. Deorukhkar, J. Gelovani, S. Guha, S. Krishnan, and B.B. Aggarwal, Curcumin sensitizes human colorectal cancer to capecitabine by modulation of cyclin

- D1, COX-2, MMP-9, VEGF and CXCR 4 expression in an orthotopic mouse model. *International Journal of Cancer* 125 (2009) 2187-2197.
- 30- A.C. Bharti, N. Donato, S. Singh ,and B.B. Aggarwal, Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* 101(2003) 1053-1162 .
 - 31- R. Blasius, S. Reuter, E. Henry, M. Dicato, and M. Diederich, Curcumin regulates signal transducer and activator of transcription (STAT) expression in K 562 cells. *Biochemical Pharmacology* 72 (2006) 1547-1554.
 - 32- S. Chakraborty, U .Ghosh, N.P. Bhattacharyya, R.K. Bhattacharya, and M. Roy, Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by curcumin in K-562 cells. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 596 (2006) 81-90.
 - 33- V. Ravindranath, and N. Chandrasekhara, Absorption And Tissue Distribution Of Curcumin In Rats. *Toxicology* 16 (1980) 259-265.
 - 34- V. Ravindranath, and N. Chandrasekhara, Invitro Studies On The Intestinal Absorption Of Curcumin In Rats. *Toxicology* 20(1981) 251-257.
 - 35- V. Ravindranath, and N. Chandrasekhara, Metabolism Of Curcumin Studies With [H-3] Curcumin. *Toxicology* 22(1981) 337-344.
 - 36- R.A. Sharma, W.P. Steward, and A.J. Gescher, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease* 595 (2007) 453-470
 - 37- C. Mancuso, and E. Barone, Curcumin in clinical practice: myth or reality? *Trends in Pharmacological Sciences* 30(2009) 333-336.
 - 38- K. Sou, S. Inenaga, S. Takeoka, and E. Tsuchida ,Loading of curcumin into macrophages using lipid-based nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 352 (2008) 287-293.
 - 39- B. Tang, L. Ma, H.Y. Wang, and G.Y. Zhang, Study on the supramolecular interaction of curcumin and beta-cyclodextrin by spectrophotometry and its analytical application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002) 1355-1361.
 - 40- M.A. Tomren, M. Masson, T. Loftsson, and H.H. Tonnesen, Studies on curcumin and curcuminoids XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids : Stability, activity and complexation with cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics* 338(2007) 27-34.
 - 41- R.L. Thangapazham, A. Puri, S. Tele, R. Blumenthal, and R.K. Maheshwari, Evaluation of a nanotechnology-based carrier for delivery of curcumin in prostate cancer cells. *International Journal of Oncology* 3232(2008) 1119-1123.
 - 42- Z.S. Ma, A. Haddadi, O. Molavi, A. Lavasanifar, R. Lai, and J. Samuel, Micelles of poly(ethylene oxide)-b-poly(epsilon-caprolactone) as vehicles for the solubilization, stabilization, and controlled delivery of curcumin. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 86 (2008) 300-310.

- 43- A. Sahu, U. Bora, N. Kasoju, and P. Goswami, Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 1752-1761.
- 44- L. Li, F.S. Braiteh, and R. Kurzrock, Liposome-encapsulated curcumin - In vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. *Cancer* 104 (2005) 1322-1331.
- 45- A. Sahu, N. Kasoju, and U. Bora, Fluorescence Study of the Curcumin-Casein Micelle Complexation and Its Application as a Drug Nanocarrier to Cancer Cells. *Biomacromolecules* 9 (2008) 2905-2912.
- 46- J.S. Mandeville, E. Froehlich, and H.A. Tajmir-Riahi, Study of curcumin and genistein interactions with human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49 (2009) 468-474.
- 47- M.O. Iwunze, Binding and distribution characteristics of curcumin solubilized in CTAB micelle. *Journal of Molecular Liquids* 111 (2004) 161-165.
- 48- C.P. Shah, B. Mishra, M. Kumar, K.I. Priyadarsini, and P.N. Bajaj, Binding studies of curcumin to polyvinyl alcohol/polyvinyl alcohol hydrogel and its delivery to liposomes. *Current Science* 95 (2008) 1426-1432.
- 49- Y. Kaminaga, A. Nagatsu, T. Akiyama, N. Sugimoto, T. Yamazaki, T. Maitani, and H. Mizukami, Production of unnatural glucosides of curcumin with drastically enhanced water solubility by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *FEBS Letters* 555 (2003) 311-316.
- 50- H.L. Yu, and Q.R. Huang, Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch. *Food Chemistry* 119 (2010) 669-674.
- 51- D.S. Horne, and C.M. Davidson, the effect of environmental-conditions on the steric stabilization of casein micelles. *Colloid and Polymer Science* 264 (1986) 727-734.
- 52- D.S. Horne, steric stabilization and casein micelle stability. *Journal of Colloid and Interface Science* 111(1986) 250-260.
- 53- C. Holt, and D.S. Horne, The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 50(1996) 85-111.
- 54- D.J. McMahon, and B.S. Oommen, Supramolecular structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science* 91(2008) .1709 -1721
- 55- E. Dickinson, Structure formation in casein-based gels, foams, and emulsions. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 288(2006) 3-11.
- 56- L. Sawyer, P.N. Barlow, M.J .Boland, L.K. Creamer, H. Denton, P.J.B. Edwards, C. Holt, G.B. Jameson, G. Kontopidis, G.E. Norris, S. Uhrinova, and S.Y. Wu, Milk protein structure - what can it tell the dairy industry? *International Dairy Journal* 12 (2002) 299-311.

- 57- L.K. Rasmussen ,L.B. Johnsen, A. Tsiora, E.S. Sorensen, J.K. Thomsen, N.C. Nielsen, H.J. Jakobsen, and T.E. Petersen, Disulphide-linked caseins and casein micelles. *International Dairy Journal* 9 (1999) 215-218.
- 58- E. Bouguyon, C. Beauvallet, J.C. Huet, and E. Chanut ,Disulphide bonds in casein micelle from milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343 (2006) 450-458.
- 59- L.M. Mikheeva, N.V. Grinberg, V.Y. Grinberg, A.R. Khokhlov, and C.G. de Kruif, Thermodynamics of micellization of bovine beta-casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. *Langmuir* 19 (2003) 2913-2921.
- 60- C.G. de Kruif, and V.Y. Grinberg, Micellisation of beta-casein. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 210 (2002) .183-190.
- 61- L.Y .Chen, G.E. Remondetto, and M. Subirade, Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology* 17 (2006) 272-283.
- 62- N. Sozer, and J.L. Kokini, Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology* 27(2009) 82-89.
- 63- P.R. Srinivas, M. Philbert, T.Q. Vu, Q.R. Huang, J.L. Kokini, E. Saos, H.D. Chen, C.M. Peterson, K.E. Friedl, C. McDade-Ngutter, V. Hubbard, P. Starke-Reed, N. Miller, J.M. Betz, J. Dwyer, J. Milner, and S.A. Ross , Nanotechnology Research: Applications in Nutritional Sciences. *Journal of Nutrition* 140 (2008) 119-124.
- 64- J. Franz, D. Pokorova, J. Hampl, and M. Dittrich, Adjuvant efficacy of gelatin particles and microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 168(1998) 153-161.
- 65- R. Alex, and R. Bodmeier, encapsulation of water-soluble drugs by a modified solvent evaporation method .1. effect of process and formulation variables on drug entrapment. *Journal of Microencapsulation* 7(1990) 347-355.
- 66- M.S. Latha ,A.V. Lal, T.V. Kumary, R. Sreekumar, and A. Jayakrishnan, Progesterone release from glutaraldehyde cross-linked casein microspheres: In vitro studies and in vivo response in rabbits. *Contraception* 61(2000) 329-334.
- 67- L. Beaulieu, L. Savoie, P. Paquin, and M. Subirade, Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process: Application for the protection of retinol. *Biomacromolecules* 3 (2002) 239-248.
- 68- J. Lazko, Y. Popineau, and J. Legrand, Soy glycinin microcapsules by simple coacervation method. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 37(2004) 1-8.
- 69- I. Ezpeleta, J.M. Irache, S. Stainmesse, C. Chabenat, J. Gueguen, Y. Popineau, and A.M. Orecchioni, Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid. *International Journal of Pharmaceutics* 131 (1996) 191-200.

- 70- L.Y. Chen, and M. Subirade, Chitosan/beta-lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers. *Biomaterials* 26(2005) 6041-6053.
- 71- P. Arbos, M.A. Arangoa, M.A. Campanero, and J.M. Irache, Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVM/MA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 242(2002) 129-136.
- 72- C.V. Morr, and E.Y.W. Ha, whey-protein concentrates and isolates - processing and functional-properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33(1993) 431-476.
- 73- T.M. Goppert, and R.H. Muller, Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting. *International Journal of Pharmaceutics* 302(2005) 172-186.
- 74- A.S. Mikhail, and C. Allen, Block copolymer micelles for delivery of cancer therapy: Transport at the whole body, tissue and cellular levels. *Journal of Controlled Release* 138(2009) 214-223.
- 75- R. Singh, and J.W. Lillard, Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology* 86(2009) 215-223.
- 76- F. Alexis, E. Pridgen, L.K. Molnar, and O.C. Farokhzad, Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* 5(2008) 505-515.
- 77- V.P. Torchilin, Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 73(2001) 137-172.
- 78- T. Demina, I. Grozdova, O. Krylova, A. Zhirnov, V. Istratov, H. Frey, H. Kautz, and N. Melik-Nubarov, Relationship between the structure of amphiphilic copolymers and their ability to disturb lipid bilayers *Biochemistry* 44(2005) 4042-4054.
- 79- H.C. Shin, A.W.G. Alani, D.A. Rao, N.C. Rockich, and G.S. Kwon, Multi-drug loaded polymeric micelles for simultaneous delivery of poorly soluble anticancer drugs. *Journal of Controlled Release* 140(2009) 294-300.
- 80- T. Yamamoto, M. Yokoyama, P. Opanasopit, A. Hayama, K. Kawano, and Y. Maitani, What are determining factors for micelle carriers? Consideration stable drug incorporation into polymeric on physical and chemical characters of the micelle inner core. *Journal of Controlled Release* 123(2007) 11-18.
- 81- J. Fernandez-Carneado, M.J. Kogan, S. Pujals, and E. Giralt, Amphipathic peptides and drug delivery. *Biopolymers* 76 (2004) 196-203.
- 82- M.J. Kogan, I. Dalcol, P. Gorostiza, C. Lopez-Iglesias, R. Pons, M. Pons, F. Sanz, and E. Giralt, Supramolecular properties of the proline-rich gamma-zein N-terminal domain. *Biophysical Journal* 83 (2002) 1194-1204.
- 83- S.K. Kim, H.G. Byun, P.J. Park, and F. Shahidi, Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001) 2992-2997.
- 84- X.Y. Peng, Y.L.L. Xiong, and B.H. Kong, Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry* 113 (2009) 196-201.

- 85- H.H. Szeto, Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants. *Aaps Journal* 8 (2006) 277-283.
- 86- R.L. Levine, L. Mosoni, B.S. Berlett, and E.R. Stadtman, Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996) 15036-15040.
- 87- H.M. Chen, K. Muramoto, F. Yamauchi, and K. Nokihara, Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1996) 2619-2623.
- 88- J.H. Zhang, H. Zhang, L. Wang, X.N. Guo, X.G. Wang, and H.Y. Yao, Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide. *European Food Research and Technology* 229 (2009) 709-719.
- 89- A. Barzegar, R. Yousefi, S. Ahmad, M. Dalgalarondo, J.M. Chobert, M.R. Ganjali, P. Norouzi, M.R. Ehsani, A. Niasari-Naslaji, A.A. Saboury, T. Haertle, and A.A. Moosavi-Movahedi, Chaperone activities of bovine and camel beta-caseins: Importance of their surface hydrophobicity in protection against alcohol dehydrogenase aggregation. *International Journal of Biological Macromolecules* 42(2008) 392-399.
- 90- M.S. Vigo, L.S. Malec, R.G. Gomez, and R.A. Llosa, spectrophotometric assay using ortho-phthaldialdehyde for determination of reactive lysine in dairy-products. *Food Chemistry* 44(1992) 363-365.
- 91- M. Salami, R. Yousefi, M.R. Ehsani, S.H. Razavi, J.M. Chobert, T. Haertle, A.A. Saboury, M.S. Atri, A. Niasari-Naslaji, F. Ahmad, and A.A. Moosavi-Movahedi, Enzymatic digestion and antioxidant activity of the native and molten globule states of camel alpha-lactalbumin: Possible significance for use in infant formula. *International Dairy Journal* 19(2009) 518-523.
- 92- R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(1999) 1231-1237.
- 93- I. Portnaya, U. Cogan, Y.D. Livney, O. Ramon, K. Shimoni, M. Rosenberg, and D. Danino, Micellization of bovine beta-casein studied by isothermal titration microcalorimetry and cryogenic transmission electron microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(2006) 5555-5561.
- 94- Z. Moosavi-Movahedi, S. Safarian, M. Zahedi, M. Sadeghi, A.A. Saboury, J. Chamani, H. Bahrami, A. Ashraf-Modarres, and A.A. Moosavi-Movahedi, Calorimetric and binding dissections of HSA upon interaction with bilirubin. *Protein Journal* 25(2006) 193-201.
- 95- J.C. Jang, H. Liu, W. Chen, and G.L. Zou, Binding of mitomycin C to blood proteins: A spectroscopic analysis and molecular docking. *Journal of Molecular Structure* 928(2009) 72-77.

- 96- E. Gabellieri, and G.B. Strambini, ANS fluorescence detects widespread perturbations of protein tertiary structure in ice. *Biophysical Journal* 90(2006) 3239-3245.
- 97- F. Mohammadi, A.K. Bordbar, A. Divsalar, K. Mohammadi, and A.A. Saboury, Analysis of Binding Interaction of Curcumin and Diacetylcurcumin with Human and Bovine Serum Albumin Using Fluorescence and Circular Dichroism Spectroscopy. *Protein Journal* 28(2009) 189-196.
- 98- R. Blasius, S. Reuter, E. Henry, M. Dicato, and M. Diederich, Curcumin regulates signal transducer and activator of transcription (STAT) expression in K 562 cells. *Biochemical Pharmacology* 72(2006) 1547-1554.
- 99- A. Duvoix, F. Morceau, S. Delhalle, M. Schmitz, M.L. Schnekenburger, M.M. Galteau, M. Dicato, and M. Diederich, Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P 1-1 inhibition. *Biochemical Pharmacology* 66(2003) 1475-1483.
- 100- S. Reuter, J. Charlet, T. Juncker, M.H. Teiten, M. Dicato, and M. Diederich, Effect of Curcumin on Nuclear Factor kappa B Signaling Pathways in Human Chronic Myelogenous K 562 Leukemia Cells. *Natural Compounds and Their Role in Apoptotic Cell Signaling Pathways* 1171(2009) 436-447.
- 101- A.C. Bharti, N. Donato, S. Singh, and B.B. Aggarwal, Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* 101 (2003) 1053-1062.
- 102- K. Letchford, R. Liggins, and H. Burt, Pharmaceuticals, preformulation and drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97(2008) 1179-1190.
- 103- J. Lakowicz, and B. Masters, Principles of fluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics* 13(2008) 29901
- 104- M. Morishita, and N.A. Peppas, Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery. *Drug Discovery Today* 11(2006) 905-910.
- 105- J.Z. Wang, H. Zhang, M. Zhang, W.T. Yao, X.Y. Mao, and F.Z. Ren, antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of porcine plasma albumin and globulin. *Journal of Food Biochemistry* 32(2008) 693-707.
- 106- T. Ak, and I. Gulcin, Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions* 174(2008) 27-73.
- 107- A. Altunkaya, E.M. Becker, V. Gokmen, and L.H. Skibsted, Antioxidant activity of lettuce extract (*Lactuca sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. *Food Chemistry* 115(2009) 163-168.
- 108- C.D. Capitani, A.C.L. Carvalho, P.B. Botelho, M.M. Carrapeiro, and I.A. Castro, Synergism on antioxidant activity between natural compounds optimized by response surface methodology. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111(2009) 1100-1110.
- 109- A. Djeridane, M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker, and N. Vidal, Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97(2006) 654-660.

- 110- A. Kunwar, A. Barik, R. Pandey, and K.I. Priyadarsini, Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: An absorption and fluorescence spectroscopic study. *Biochemica et Biophysica Acta* 176(2006) 1513-1520.

Abstract

Curcumin is a natural polyphenole that its very low solubility in water-based solutions (3×10^{-8} M) has restricted the usage in pharmaceutical and nutritional industries.

In this study we investigated the influence of beta casein (B-CN) nano -micelles derived from camel milk on the solubility and hence bioavailability of curcumin.

After purification of β -casein, critical association concentration (CAC) values calculated at three temperatures using pyrene fluorescence. Binding isotherm and Hill plots related to the interaction between B-CN and curcumin were drawn using UV-vis spectroscopy at the aforementioned temperatures. These data revealed that the interaction occurs via two sets of binding sites, which show positive cooperativity including hydrophobic and non-hydrophobic interactions. Increasing the temperatures makes the association constants to enhance by the factor of 46; these data are in good accordance with the increased surface hydrophobicity as assessed by ANS fluorescence. Intrinsic fluorescence and far-CD spectroscopies in the presence or absence of curcumin showed that the quenching occurred via dynamic mechanism and these interactions do not change the secondary and tertiary structure of the protein. Along with incorporation of curcumin into B-CN micelles, its fluorescence intensity is enhanced and the existed blue shift that is demonstrated the insertion into hydrophobic inner core.

Curcumin solubility was assessed using solvent evaporation method in the presence of 1% β -CN solution at phosphate buffer (pH 7). The result implies that curcumin solubility is enhanced about 2578-folds. Cytotoxicity of curcumin against human lymphoma cell line (K562) was evaluated using MTT assay. In the presence of protein micelle, IC_{50} value is decreased to about 17 μ M showing the increased bioavailability of curcumin.

Antioxidant activity of β -Casein and the obtained peptides (resulted from hydrolysis by trypsin and chymotrypsin enzymes and then sequestered using ultrafiltration) showed that some hydrolyasates are more potent antioxidant than non-hydrolysed protein but they show different pattern. The interaction between the peptides and curcumin was studied by fluorescence spectroscopy; trypsin-hydrolysed peptides with weight more than five kDa could have the resonable interaction with curcumin.