

مهار سمیت کورکومین با پپتید نفوذگر سلولی تترآرژنین-تتراتیروزین روی سلول‌های رده Jurkat T-cell

مهسیما حیدری^۱، نجف اللهیاری فرد^۲، ریحانه خسروی^۱ و امیر نوروزی^{۱*}

۱- گروه مهندسی زیست فرآیند، پژوهشکده صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

۲- گروه زیست فناوری سامانه ای، پژوهشکده صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۸/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۲/۲۳

چکیده

کورکومین عضوی از خانواده کورکومینوئیدها و مهم‌ترین ترکیب فعال در زردچوبه می‌باشد. کورکومین با وجود فواید درمانی و زیستی گسترده، بدلیل ویژگی آبرگریزی و در نتیجه حلالیت پایین اغلب نمی‌تواند یک عامل درمانی موثر باشد و استفاده از آن با محدودیت همراه است. بمنظور غلبه بر این موضوع از پپتید آمفی‌پاتیک نفوذگر سلولی با توالی FAM-YYYYRRRR که در مطالعه متاخری سنتز شده بود استفاده شد. تتراتیروزین بعنوان بخش آبرگریز پپتید به کورکومین متصل می‌شود در حالی که تترآرژنین با دارا بودن چهار بار مثبت بخش هیدروفیل پپتید است و انحلال‌پذیری کمپلکس پپتید/کورکومین و متعاقباً نفوذپذیری سلولی آن را افزایش می‌دهد. ساختار سه‌بعدی پپتید مذکور در PEP-FOLD-4 طراحی و برهمکنش پپتید-کورکومین در MVD ۷.6 بررسی شد که نشان دهنده امتیاز مناسب ۱۰/۴- می‌باشد. اتصال پپتید به کورکومین بصورت طیف‌سنجی با رسم منحنی ایزوترم اتصال و توسط نرم افزار OriginLab محاسبه گردید و ثابت اتصال پپتید به کورکومین معادل $3 \times 10^5 M^{-1}$ گزارش می‌شود. اثر سمیت کورکومین به تنهایی و کمپلکس پپتید/کورکومین بصورت مجزا روی سلول‌های Jurkat T-cell توسط تست MTT سنجیده شد و نشان داد که سمیت پپتید در کمپلکس با کورکومین بطور معنی داری روی سلول‌ها کاهش می‌یابد. لذا پپتید در اتصال با کورکومین از سلول‌های T محافظت می‌کند.

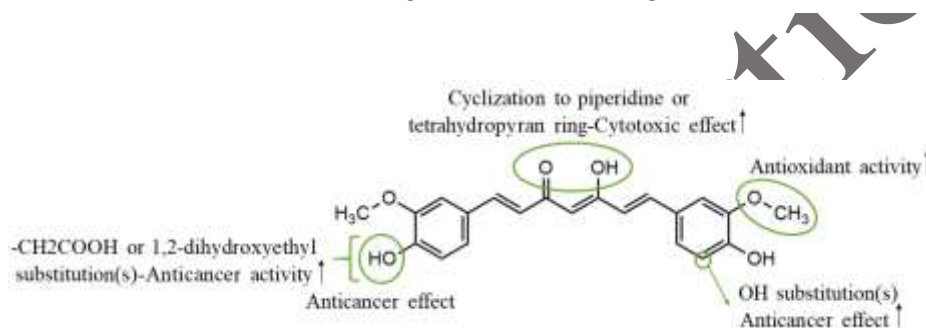
واژه های کلیدی: کورکومین، پپتید نفوذگر سلولی، اتصال سوپرامولکولی، حلالیت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۳۴۹، پست الکترونیکی: a.norouzy@nigeb.ac.ir

مقدمه

کورکومین یا دی‌فرولونیل‌متان ترکیبی طبیعی و نارنجی رنگ می‌باشد که از ریزوم (ساقه‌های زیر زمینی) گیاه زردچوبه بدست می‌آید (۳، ۵). کورکومین از خانواده کورکومینوئیدها و مهم‌ترین ترکیب فعال زیستی در زردچوبه است. کورکومین با فرمول شیمیایی $C_{21}H_{20}O_6$ ، یک دی‌فنول آبرگریز، متقارن، بسیار حساس به تغییر pH و با وزن مولکولی ۳۶۸/۳۸ گرم بر مول می‌باشد (۲۴). این مولکول دارای دو گروه ارتومتوکسی‌فنول است که توسط یک بتا-دی‌کتون غیراشباع بهم متصل شده‌اند. کورکومین دارای اشکال مختلف ایزومری و تاتومری (کتو-انول) می‌باشد و تعادل ساختاری آن به عوامل زیادی مانند pH، دما و قطبیت حلال بستگی دارد (۱۸). پس از گزارش آگاروال (۲۵) و همکاران در دهه ۱۹۹۰ درباره اثر ضدسرطانی کورکومین، تحقیقات روی آن به سرعت افزایش پیدا کرد (۵). امروزه طیف گسترده‌ای از خواص دارویی کورکومین مانند خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدالتهابی، ضدآپوپتوز، ضد میکروبی و ضدانعقاد به اثبات رسیده‌است (۴، ۴۶). همچنین تحقیقات گسترده‌ای در رابطه با خواص پیشگیری‌کننده و درمانی کورکومین در بیماری‌های مختلفی مانند

پارکینسون، آلزایمر، مالتیپل اسکلروزیس، آترواسکلروزیس، پسوریازیس، آرتريت روماتوئید، بیماری‌های قلبی عروقی، فیروز ریوی، دیابت شیرین نوع ۲ (۶)، اختلالات دستگاه گوارش و ایدز بررسی شده‌است (۴، ۳۶). همچنین مطالعات مختلف *in vitro* و *in vivo* در بیش از ۸۰۰ گزارش نشان می‌دهد که کورکومین می‌تواند رشد انواع سلول‌های سرطانی در اندام‌های مختلف را مهار کند (۲۷). این اثرات و خواص دارویی متعدد توجه پژوهشگران را برای کشف اهداف سلولی و مکانیسم‌های مولکولی کورکومین به خود جلب کرده‌است. شواهد نشان می‌دهد که اثرات پلی‌تروپیک (۴۳) کورکومین به ظرفیت آن در تعامل و تنظیم اهداف مولکولی متعدد بستگی دارد. این اهداف مولکولی شامل فاکتورهای رونویسی، فاکتورهای رشد، کینازها، سایتوکین‌های التهابی، مولکول‌های چسبندگی، پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز و غیره هستند (۵). متاسفانه، مکانیسم عملکرد کورکومین بدلیل کمبود داده‌های طیفی در محیط‌های آبی بطور کامل شناخته نشده‌است (۵۰). فعالیت‌های مفید کورکومین به گروه‌های هیدروکسیل حلقه‌های بنزن، پیوندهای دوگانه در قسمت آلکن و بخش بتا-دی‌کتون مرکزی مرتبط می‌باشد (۷). شکل ۱ ساختار کورکومین و خواص بیولوژیکی هر قسمت را نمایش می‌دهد (۴۸).



شکل ۱- ساختار شیمیایی کورکومین و خواص شیمیایی بیولوژیکی هر بخش آن (اقتباس از (۱۴)).

برخلاف این خواص دارویی، کاربرد بالینی کورکومین به دو دلیل محدودیت دارد. اول اینکه، کورکومین حلالیت ناچیزی در آب با pH اسیدی و خنثی دارد که بطور قابل توجهی زیست-فراهمی (Bioavailability) آن را در سیستم‌های زیستی کاهش می‌دهد. دوم اینکه، کورکومین در pH خنثی و قلیایی ناپایدار است و تحت این شرایط به ترانس ۶- (۴-هیدروکسی-۳-متوکسی فنیل)-۲،۴-دی‌اکسو-۵-هگزانال، وانیلین، فرولیک‌اسید و فروولیل‌متان تجزیه می‌شود (۱۴). استراتژی‌های متعددی برای غلبه بر این محدودیت‌ها به کار گرفته شده‌است اما هیچ یک از آن‌ها بطور کامل موفق نبودند.

کاربرد و زیست-فراهمی مواد فعال دارویی (Active Pharmaceutical Ingredients, APIs) مستلزم انحلال آن‌ها در محیط‌های آبی در مسیر تجویز دارو است. بنابراین، مشکل حلالیت محدود داروها در آب به یک موضوع مهم تبدیل می‌شود. زیرا همان‌طور که مطالعات نشان می‌دهد بخش قابل توجهی از داروهای جدید تولید شده را می‌توان عملاً نامحلول در نظر گرفت. این مسئله نیاز به توسعه استراتژی‌های جدید برای غلبه بر مشکل حلالیت ضعیف API‌ها را ایجاد می‌کند. اهمیت این موضوع در این واقعیت نهفته است که حلالیت محدود نه تنها از زیست-فراهمی دارو جلوگیری می‌کند، بلکه می‌تواند منجر به عوارض جانبی قابل توجهی نیز شود. این عوارض ناشی از افزایش دوز است که در مورد داروهای کم‌محلول ضروری است و می‌تواند موجب تحریک دستگاه گوارش شود (۴۸).

روش‌های بهبود حلالیت داروها را می‌توان به تغییرات فیزیکی، تغییرات شیمیایی و سایر روش‌ها طبقه‌بندی کرد. تغییرات فیزیکی شامل کاهش اندازه ذرات (مانند میکرونیزاسیون و نانوسوسپانسیون)، تغییر شکل کریستال (مانند اشکال پلی‌مورف،

آمورف و تبلور)، پراکندگی دارو (Drug dispersion) در حامل‌هایی مانند مخلوط‌های یوتکتیک (Eutectic mixtures)، پراکندگی جامد (Solid dispersions) و روش‌های برودتی (Cryogenic) می‌باشد. تغییرات شیمیایی نیز شامل تغییر pH، استفاده از بافر، مشتق‌سازی، تشکیل کمپلکس (۳۱) و تشکیل نمک می‌باشد. استراتژی‌های دیگری با هدف افزایش حلالیت دارو مثل فرآیند سیال فوق بحرانی (Supercritical fluid process)، استفاده از ادجوانت مانند سورفکتانت، حل‌کننده‌ها (Solubilizers) (۴۰)، هیدروتروپی و استفاده از حلال‌های یوتکتیک عمیق طبیعی (Natural deep eutectic solvents, NADES) وجود دارد. همچنین استفاده از پپتید آمفی‌فیلیک بعنوان سیستم دارورسانی برای افزایش حلالیت مولکول‌های آبگریز مثل کورکومین گزارش شده است (۴۱).

در زمینه دارورسانی، پپتیدهای نفوذگر سلولی (Cell-Penetrating Peptides, CPPs) در مقایسه با برخی از روش‌های مرسوم باعث از بین رفتن یکپارچگی و انسجام غشاهای سلولی نشده و بسیار کارآمد و ایمن تلقی می‌شوند؛ بنابراین زمینه‌های جدیدی را برای تحقیقات و کاربردها در علوم مختلف فراهم می‌کنند (۱۰). در سال‌های اخیر پپتیدهای نفوذگر سلولی توجه زیادی را بعنوان حامل‌های تحویل سلولی کارآمد با توجه به توانایی ذاتی آن‌ها برای ورود به سلول جلب کرده‌اند (۴۹). آن‌ها قادر به حمل طیف گسترده‌ای از ماکرومولکول‌ها مانند پلاسمید، DNA، RNAهای کوچک تداخلی (siRNA)، داروها (مانند داروهای ضدسرطان)، نانوذرات، پروتئین‌ها، ویروس‌ها، ترکیبات فلورسنت یا رادیواکتیو برای تصویربرداری داخل سلول هستند (۱۱، ۱۳). این پپتیدها که همچنین بعنوان دمین‌های انتقال پروتئین (Protein transduction domains, PTDs) یا پپتیدهای تروجان (Trojan peptides) شناخته می‌شوند پپتیدهایی کوتاه شامل ۵ الی ۳۰ اسیدآمینه هستند که ساختار و خصوصیات فیزیکوشیمیایی متنوعی دارند (۱۷). پپتیدهای نفوذگر سلولی را می‌توان براساس خصوصیات فیزیکوشیمیایی به سه دسته اصلی شامل پپتیدهای کاتیونی، آبگریز و آمفی‌پاتیک طبقه بندی کرد.

پپتیدهای کاتیونی دسته‌ای از پپتیدها با بار مثبت هستند که معمولاً از اسیدهای آمینه آرژینین و لیزین ساخته شده‌اند. اولین CPP مشتق از پروتئین Tat و ویروس HIV-1 یک پپتید کاتیونی است. اکثر پپتیدهای کاتیونی توالی‌های پپتیدی طبیعی هستند. اخیراً چندین پپتید کاتیونی مصنوعی از جمله هموپلیمرهای آرژینین و لیزین (۲۳) ساخته شده‌است. مطالعات روی پپتیدهای مبتنی بر آرژینین نشان داده‌است که حداقل ۶ آرژینین برای نفوذ پپتید به سلول لازم است و افزایش تعداد آرژینین موجب افزایش نفوذ پپتید می‌شود. همچنین رزیدوهای آرژینین نسبت به لیزین در نفوذ سلولی نقش بیشتری دارند. فرض بر این است که رزیدوهای دارای بار مثبت، برهمکنش‌های الکترواستاتیک قوی (۳۸، ۳۰، ۲۸) با غشای سلولی دارای بار منفی ایجاد می‌کنند. مطالعات بر روی مقایسه لیگوارژینین و لیگولیزین نشان می‌دهد که گروه گوانیدینیوم آرژینین از اتصال و میل ترکیبی آن به پروتئوگلیکان‌های غشای سلولی پشتیبانی می‌کند (۱۵).

پپتیدهای آمفی‌پاتیک دارای دو ناحیه از اسیدهای آمینه قطبی (آبدوست) و غیرقطبی (آبگریز) می‌باشند. این گروه از پپتیدها علاوه بر لیزین و آرژینین، غنی از اسیدهای آمینه آبگریزی مثل والین، لوسین، ایزولوسین، آلانین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین هستند. اتصال CPP های آمفی‌پاتیک به غشای پلاسمایی و ورود آن‌ها به سلول کاملاً متفاوت با CPP های کاتیونی است. ویژگی بارز پپتیدهای آمفی‌پاتیک برهمکنش قوی آن‌ها با قسمت‌های آبگریز غشا و وارد شدن آن‌ها به دولایه لیپیدی است که در CPP های کاتیونی مشاهده نشده‌است و بعنوان نیروی اصلی برهمکنش در نظر گرفته می‌شود. برخلاف CPP های کاتیونی که عمدتاً در سیتوپلاسم قرار دارند CPP های آمفی‌پاتیک تمایل دارند با وزیکول‌ها مرتبط باشند (۳۰، ۴۱).

پپتیدهای آنگریزی که از توالی سیگنال پپتیدها (Signal peptide sequences) مشتق شده‌اند شامل اسیدهای آمینه غیرقطبی هستند و در نتیجه بار خالص پایینی دارند. این موتیف‌های آنگریز و تمایل زیاد آن‌ها به دمین‌های آنگریز غشاهای سلولی در فرآیند ورود به سلول بسیار مهم هستند. تاکنون تنها چند CPP آنگریز از جمله SG3، Pep-7.C105Y و فاکتور رشد فیروبلست گزارش شده‌است. در مقایسه با پپتیدهای کاتیونی و آمفی‌پاتیک، کاربرد و مکانیسم انتقال CPP آنگریز کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌است. پیشنهاد شده‌است که این خانواده از پپتیدها می‌توانند بطور خودبه‌خودی در یک روش غیروابسته به انرژی از عرض غشا عبور کنند و در نتیجه رفتارهایی نشان می‌دهند که با سایر رده‌های CPP متفاوت است (۱۵، ۴۱).

همچنین پپتیدهای نفوذگر سلولی را می‌توان براساس منشا به سه گروه پپتیدهای طبیعی (که توسط موجودات زنده تولید می‌شوند)، پپتیدهای کایمری (که پروتئین‌های طبیعی اصلاح شده هستند) و پپتیدهای مصنوعی (که بطور کامل در آزمایشگاه طراحی و سنتز شده‌اند) تقسیم کرد.

به رغم تحقیقات گسترده، مکانیسم ورود به سلول CPP ها و محموله آن‌ها بطور کامل روشن نشده‌است. زیرا به نظر می‌رسد ورود این پپتیدها به سلول به عوامل مختلفی مانند اندازه، غلظت، ویژگی فیزیکوشیمیایی، ساختارهای اوکیه و ثانویه پپتید و ماهیت محموله بستگی دارد. این ویژگی‌ها در واقع می‌توانند تاثیر قابل توجهی در ورود پپتید به سلول داشته باشند. با این وجود مشخص شده‌است که یک CPP می‌تواند از مسیرهای مختلفی برای ورود به سلول استفاده کند. این مسیرهای ورود بطور کلی به دو گروه تقسیم می‌شوند: نفوذ مستقیم مستقل از انرژی و اندوسیتوز وابسته به انرژی (۱۵).

در مطالعه قبلی پپتید آمفی‌پاتیک با توالی FAM-YYYYRRRR بمنظور افزایش انحلال‌پذیری و حمل داروهای کم‌محلول مانند کورکومین طراحی و سنتز شد (۲۰). FAM نام تجاری رنگ فلورسنت (۶/۵) -کربوکسی فلورسین است که به صورت گسترده ای برای نشاندار کردن پپتیدها به کار می‌رود (۲). همچنین از کورکومین بعنوان یک داروی آنگریز برای بررسی اتصال به پپتید مذکور و محاسبه ثابت اتصال استفاده شده‌است. پپتید مورد نظر دارای دو ناحیه آبدوست (تتراآرژنین) و آنگریز (تتراایروزین) است و انتظار می‌رود تترایروزین بسبب دارا بودن ماهیت آنگریز با برهمکنش آنگریز-آنگریز به کورکومین متصل شود.

پپتیدهای نفوذگر سلولی یکی از کارآمدترین روش‌های دارورسانی به سلول‌ها هستند. پپتیدهای نفوذگر سلولی مختلفی بعنوان حامل برای بسیاری از مولکول‌ها و داروها مورد بررسی قرار گرفته‌اند. این پپتیدها می‌توانند خطی و یا حلقوی باشند. پپتید حلقوی نفوذگر سلولی (WR)₅ با تشکیل کمپلکس پپتید-کورکومین در مقایسه با اتصال کووالانسی پپتید به کورکومین موجب نفوذ بیشتر کورکومین به سلول می‌شود و کارایی بیشتری دارد (۲، ۱۵). بعلاوه این پپتید حامل مناسبی برای دوکسوروبیسین نیز هست و با تشکیل کمپلکس موجب نفوذ آن به سلول می‌شود (۵۱).

پپتید نفوذگر سلولی اکتاآرژنین (R₈) با تشکیل کمپلکس پپتید-کورکومین موجب افزایش انحلال‌پذیری کورکومین در محیط آبی شده و نیز خاصیت آنتی‌باکتریال کورکومین را افزایش می‌دهد (۴۴).

در این مطالعه تلاش شد که پپتید نفوذگر سلولی FAM-YYYYRRRR بعنوان حاملی مناسب جهت افزایش انحلال‌پذیری و نفوذپذیری داروهای کم محلول مانند کورکومین طراحی و سنتز گردد. زیرا با توجه به آنچه گفته شد بسیاری از داروها بدلیل انحلال‌پذیری کم و نفوذپذیری پایین اغلب نمی‌توانند بعنوان یک عامل درمانی موثر عمل کنند و استفاده از آن‌ها با

محدودیت همراه است. بنابراین نیاز به استفاده از حامل‌هایی کارآمد با سمیت و ایمنی‌زایی کم جهت افزایش انحلال‌پذیری و نفوذپذیری سلولی داروهای کم محلول احساس می‌شود.

مواد و روش‌ها

رزین ۲-کلروتیریتیل کلرید (RTZ001، 2-CTC)، O-(بنزوتری‌آزول-۱-ایل)-N'-N'-N-N، تترامیل اورونیوم‌هگزافلوئوروفسفات (HBTU)، N-N-دی‌ایزوپروپیل‌اتیل‌آمین (DIPEA، 8008940250)، پیریدین (8222990100)، فنول (8222960500)، تری‌فلوئورواستیک‌اسید (TFA، 1082621000)، تری‌ایزوپروپیل‌سیلان (TIPS، 8413590010) و کورکومین از شرکت مرک خریداری شدند. دی‌متیل‌فرمامید (DMF، 1030342511)، دی‌کلرومتان (DCM، 1060502500) و متانول (1135512500) از شرکت هانی‌ول تهیه شدند. اسیدهای آمینه محافظت شده (-Fmoc Arg(Pbf)-OH، AFR105 و Fmoc-Tyr(tBu)-OH، AFY105) از شرکت اپتک و رنگ فلورسنت (۶/۵)-کربوکسی‌فلورسین (FAM، 76823-03-5) از شرکت کایمن خریداری شدند. محیط کشت RPMI 1640، سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین از شرکت بیوایده (Bio-idea) تهیه شدند.

بررسی و طراحی ساختار سه بعدی پپتید و کورکومین

طراحی ساختار سه بعدی پپتید YYYYYRRRRR با استفاده از سرور PEP-FOLD-4 در $pH=7$ انجام شد. PEP-FOLD-4 یک رویکرد جدید با هدف پیش‌بینی ساختارهای پپتیدی از توالی‌های اسیدآمینه است. پیش‌بینی دقیق و سریع ساختار پپتیدهای کمتر از ۴۰ اسیدآمینه در محلول آبی کاربردهای زیستی فراوانی دارد اما ترکیبات آن‌ها وابسته به pH (۵۱) و غلظت نمک است. در این راستا، PEP-FOLD-4 یک قدم فراتر از بسیاری از رویکردهای یادگیری ماشینی مانند AlphaFold2، TrRosetta و RaptorX است و نتایج را در فرمت PDB ارائه می‌نماید تا در سایر ابزارها و نرم‌افزارهای محاسباتی قابل استفاده باشد. PEP-FOLD-4 در آدرس <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD4> موجود و قابل دسترسی است (۳۸). ساختار سه بعدی کورکومین از پایگاه داده PubChem استخراج شد. بزرگترین پایگاه داده مولکول‌های شیمیایی است که بازبازی داده‌ها براساس نام، فرمول، ساختار و غیره قابل انجام است و در آدرس <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> موجود و در دسترس است (۳۹).

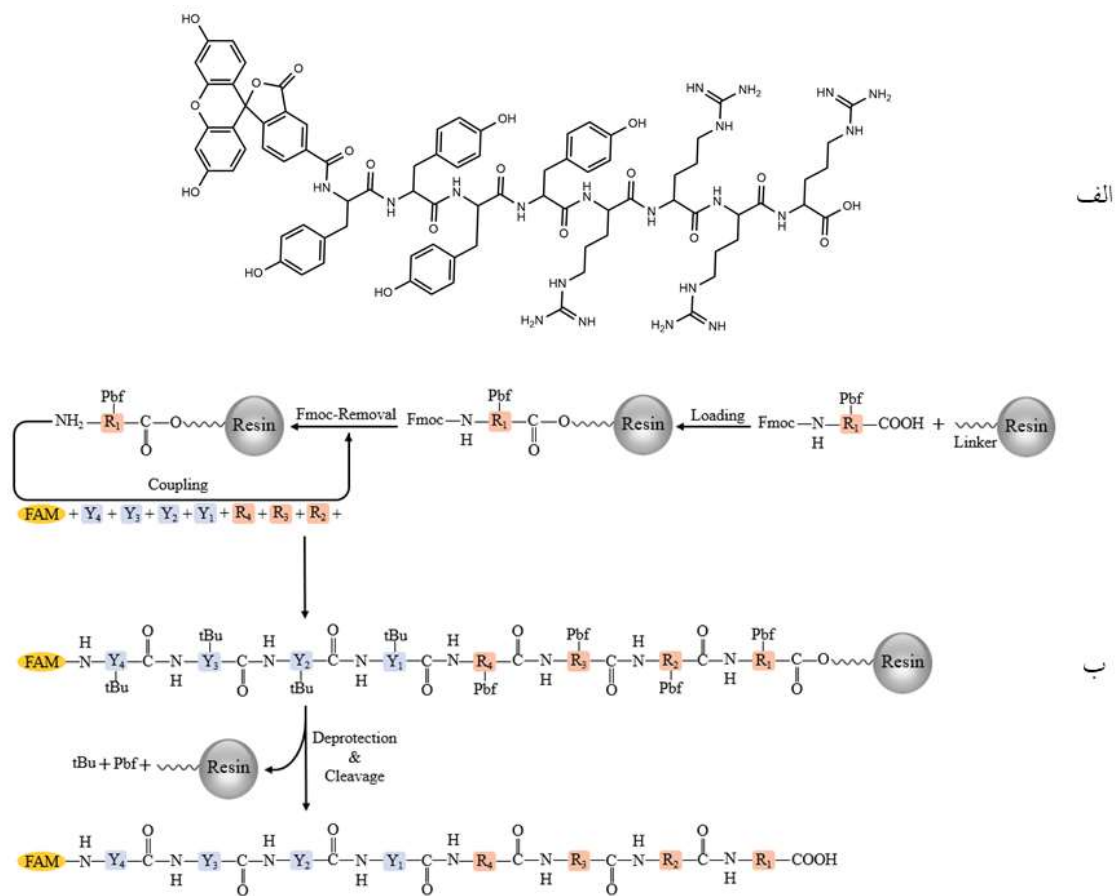
بررسی برهمکنش و داکینگ پپتید-کورکومین با استفاده از نرم‌افزار MVD (Molegro Virtual Docker) ویرایش ۶ انجام شد. داکینگ روشی است که وضعیت فضایی، چگونگی اتصال و جهت‌گیری ترجیحی دو مولکول، بویژه پروتئین-لیگاند را ارائه می‌دهد. در فرآیند داکینگ، مراحل آماده‌سازی، نمونه‌گیری، امتیازدهی و تعیین مکان‌های بالقوه و بالفعل اتصال پپتید-کورکومین بررسی شد. MVD v.6 براساس یک روش بهینه‌سازی و محاسبات خود، یک اتصال با کیفیت بالا و بهینه ارائه می‌دهد. برای مطالعه برهمکنش و چگونگی اتصال، از فایل PDB خروجی پپتید PEP-FOLD-4 و فایل SDF از پایگاه داده PubChem استفاده شد. روش محاسبه در MVD v.6 با تابع امتیازدهی MolDock-GRID و الگوریتم MolDock SE انجام شد. نقطه مرکزی در موقعیت فضایی $X=61/13$ ، $Y=-85/11$ و $Z=-49/05$ برای

انجام داکینگ با توسعه به تمام بخش‌های پپتید و شعاع ۱۵ آنگستروم در نظر گرفته شد تا امکان اتصال کورکومین در همه موقعیت‌های ممکن پپتید لحاظ شود.

سنتز پپتید آمفی پاتیک

پپتید *FAM-YYYYRRRR* (شکل ۲-الف) به روش سنتز در فاز جامد (Solid-Phase Peptide Synthesis, SPPS) تهیه شد (۱۲). در این روش، سنتز بر روی یک بستر جامد (رزین) صورت می‌گیرد. بدین منظور سنتز پپتید روی رزین با اتصال اولین اسید آمینه از انتهای کربوکسیل پپتید آغاز می‌شود و اتصال آمینواسیدها یکی پس از دیگری تا انتهای آمین ادامه می‌یابد.

بمنظور بارگذاری اولین اسید آمینه بر روی رزین، ابتدا ۳۰۰ میلی‌گرم رزین توسط حلال DMF متورم (Swelling) شد. یک اکی‌والان از اسید آمینه محافظت شده *Fmoc-Arg(Pbf)-OH* (۸۶ mg، ۰/۱۱۹ mmol) در ۴/۵ میلی‌لیتر محلول DMF:DCM با نسبت ۹ به ۱ حجمی-حجمی حل و به رزین اضافه شد. سپس ۵ اکی‌والان DIPEA با غلظت ۰/۴ مولار (۱/۴۸ ml، ۰/۵۹۵ mmol) به آن افزوده شد. بعد از گذشت ۵ دقیقه ۱/۵ اکی‌والان DIPEA با غلظت ۰/۴ مولار (۰/۴۴۶ ml، ۰/۱۷۸۵ mmol) به رزین اضافه شد. بعد از ۶۰ دقیقه محلول‌ها با فیلتراسیون خارج شدند و رزین با DMF شسته شد. بمنظور اطمینان از اتصال حداکثری اولین اسید آمینه به جایگاه‌های فعال روی سطح رزین، مرحله قبل بار دیگر تکرار شد. بعد از اتصال اولین اسید آمینه، مرحله کلاهک‌گذاری (Capping) بمنظور مسدود کردن سایر جایگاه‌های فعال باقی‌مانده روی رزین صورت گرفت؛ بنابراین ۶۰۰ میکرولیتر متانول (۲ میلی‌لیتر به ازای هر گرم رزین) به رزین افزوده و بعد از ۱۵ دقیقه رزین فیلتر و با DMF شسته شد. برای اتصال دومین اسید آمینه می‌بایست محافظت‌زدایی صورت گیرد و گروه محافظ *Fmoc* از انتهای آمین اسید آمینه بارگذاری شده بر روی رزین جداگردد. بدین منظور آنکوباسیون رزین توسط ۳ میلی‌لیتر پیپریدین ۲۰٪ بمدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. ۴ اکی‌والان از اسید آمینه محافظت‌شده *Fmoc-Arg(Pbf)-OH* به همراه ۲/۵ اکی‌والان DIPEA و ۰/۹۵ اکی‌والان HBTU به رزین اضافه گردید. اتصال اسیدهای آمینه بعدی و محافظت‌زدایی آن‌ها تا کامل شدن توالی بهمین ترتیب ادامه می‌یابد. برای اتصال اسیدهای آمینه چهارم تا هشتم، ۴ اکی‌والان از اسید آمینه محافظت شده *Fmoc-Tyr(tBu)-OH* استفاده شد. در تمامی مراحل اتصال و محافظت‌زدایی اسیدهای آمینه، توسط تست کایزر مورد تایید قرار گرفت. پس از کامل شدن توالی پپتید، بمنظور نشاندار کردن آن ۲۰۰ میلی‌گرم رنگ FAM در ۲/۵ اکی‌والان DIPEA با غلظت ۰/۴ مولار (۱/۴۸ ml) اضافه گردید. سپس محلول حاوی FAM ۳، ۰/۹۵ اکی‌والان HBTU با غلظت ۰/۵ مولار (۹۰۰ μl، ۱/۱۹ mmol) حل شد. سپس محلول حاوی FAM فعال شده به همراه ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به رزین اضافه گردید. بعد از گذشت ۲۱ ساعت رزین بترتیب با DCM، DMF و متانول ۳ مرتبه شسته شد. پس از خشک کردن رزین بمنظور جدا کردن پپتید از رزین و همچنین جدا شدن گروه‌های محافظت‌زدایی از اسیدهای آمینه از ۳ میلی‌لیتر مخلوط تجزیه‌گر (Cleavage cocktail) شامل ۹۰٪ TFA، ۵٪ فنول، ۲/۵٪ TIPS، ۲/۵٪ آب دیونیزه استفاده شد و رزین بمدت ۴۵ دقیقه آنکوبه گردید. بعد از فیلتر کردن رزین، محلول حاوی پپتید و مخلوط تجزیه‌گر بمدت ۱۰ ساعت روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. برای رسوب دادن پپتید محافظت‌زدایی شده به محلول پپتیدی ۴۵ میلی‌لیتر دی‌اتیل‌اتر سرد اضافه گردید و بمدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۵۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس رسوب توسط RP-HPLC خالص و صحت سنتز پپتید توسط طیف‌سنجی جرمی تایید شد. شکل ۲-ب مراحل سنتز پپتید *FAM-YYYYRRRR* را بطور خلاصه نشان می‌دهد.



شکل ۲- الف) ساختار پپتید FAM-YYYYRRRR با وزن مولکولی $653/75 \text{ g mol}^{-1}$ (ب) مراحل کلی سنتز پپتید FAM-YYYYRRRR به صورت شماتیک (FAM نام تجاری رنگ فلورسانس است).

تعیین ثابت اتصال کورکومین به پپتید

ابتدا طیف جذب نوری پپتید FAM-YYYYRRRR و کورکومین در مخلوط اتانول/بافر فسفات سالین ۲۰ میلی‌مولار (v/v) (۲/۳) توسط دستگاه طیف‌سنج فرابنفش-مرئی Analytik Jena ثبت شد. برای تعیین ثابت اتصال، تیتراسیون طیف جذبی در ناحیه مرئی بصورت زیر انجام پذیرفت.

محلول پپتیدی با غلظت ۱۰ میکرومولار و کورکومین ۱ میلی‌مولار در مخلوط مذکور ساخته شد. با ثابت نگه‌داشتن غلظت پپتید در ۱۰ میکرومولار و تغییر غلظت کورکومین از ۱۲/۳۴ تا ۲۸۵/۷ میکرومولار طیف جذبی ضبط و بررسی شد. بمنظور حذف اثر رقابتی تیتراسیون، محلول کورکومین تیتراکننده فوق‌الذکر حاوی ۱۰ میکرومولار پپتید نیز بود. پس از انجام تیتراسیون، منحنی ایزوترم اتصال پپتید-کورکومین در طول موج ۵۰۵ نانومتر رسم شد و ثابت اتصال توسط نرم افزار OriginLab محاسبه گردید.

کشت سلولی

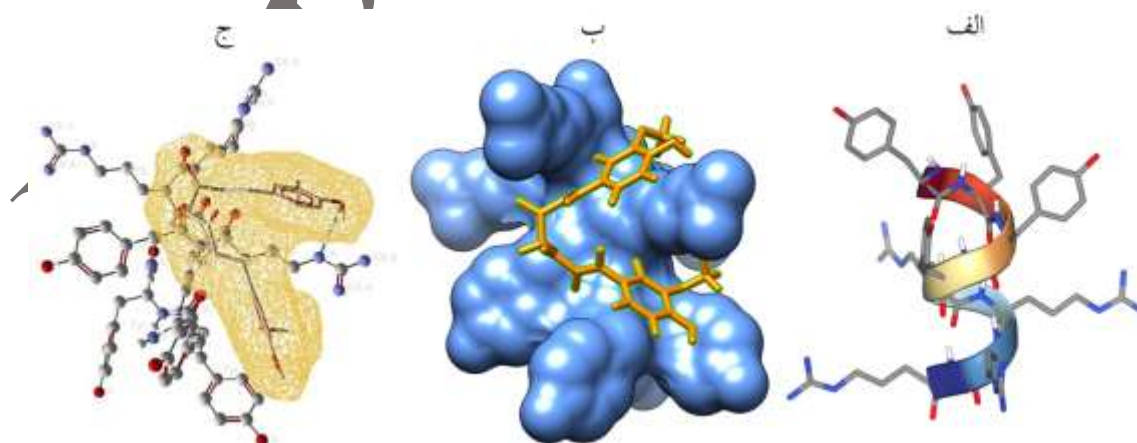
رده سلولی Jurkat T-cell از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) خریداری شد. برای کشت سلول‌های Jurkat از محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (100X) استفاده شد. سلول‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسیدکربن کشت داده شدند.

تست MTT

MTT یک نمک تترازولیوم زرد رنگ و محلول در آب است. شکستن حلقه تترازولیوم با آنزیم‌های دهیدروژناز فعال در میتوکندری سلول‌های زنده، محلول را به فورمازان نامحلول و بنفش رنگ تبدیل می‌کند. هر چه تعداد سلول‌های زنده در ته چاهک بیشتر باشند، شدت رنگ بیشتر است (۳۴، ۴۰). در این تست، ابتدا بیست هزار سلول Jurkat همراه با محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ FBS در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. سلول‌ها با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکرومولار از کورکومین و کمپلکس پپتید/کورکومین به نسبت ۱:۱ با غلظت‌های مذکور تیمار شدند. برای افزایش دقت در آزمایش، هر کدام از تیمارها با پنج تکرار انجام شد و سپس پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۵ mg/ml به همراه ۹۰ میکرولیتر محیط کشت به هر چاهک افزوده و پس از اتمام زمان انکوباسیون بمدت ۴ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول SDS-HCl به هر چاهک افزوده شد و پلیت بمدت ۱۷ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نموده و بعد خوانش پلیت توسط دستگاه ELISA Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر صورت گرفت.

نتایج

شکل ۳-الف ساختار سه بعدی پپتید YYYRRRR، پیش‌بینی و مدل شده در PEP-FOLD-4 در $pH=7$ را نشان می‌دهد. همچنین نتایج برهمکنش برترین وضعیت قرارگیری (پوز) پپتید-کورکومین با امتیاز $-108/4$ در نرم‌افزار MVD v.6 نشان داد که پپتید مذکور و کورکومین اتصال مناسبی دارند (شکل ۳-ب). در این اتصال، اسید آمینه آرژنین در موقعیت ۵، پیوند هیدروژنی برقرار نموده است. همچنین اثرات فضایی در موقعیت‌های تیروزین ۱، تیروزین ۴ و آرژنین ۵ گزارش می‌شود که به نحوه اتصال منجر شده‌اند (شکل ۳-ج).



شکل ۳-الف) ساختار سه بعدی پپتید YYYRRRR، پیش‌بینی و مدل شده در PEP-FOLD-4 (ب) ساختار سه‌بعدی برهمکنش

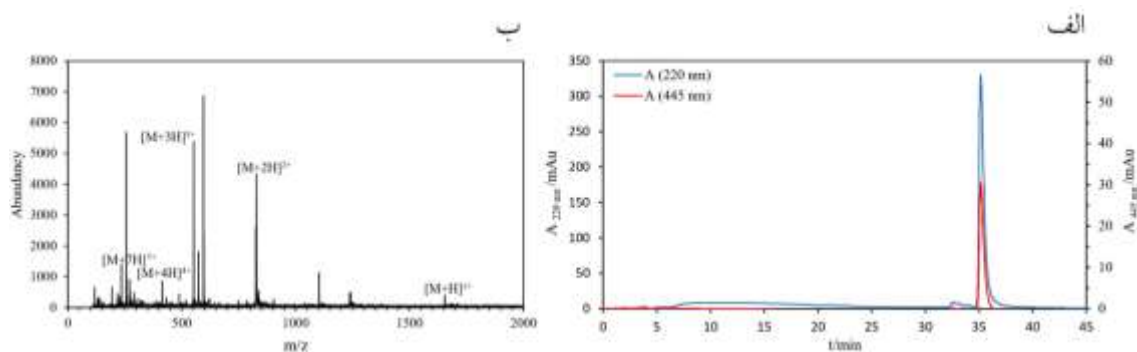
پپتید-لیگاند؛ آبی: پپتید و زرد: کورکومین-برترین پوز در MVD v.6، (ج) برهمکنش‌های هیدروژنی و فضایی میان پپتید-لیگاند؛ که پپتید به رنگ

خاکستری و کورکومین به رنگ زرد مشخص شده است.

بررسی اولیه، خالص‌سازی و تعیین درصد خلوص پپتید سنتز شده توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) ساخت شرکت Agilent آمریکا، مدل A1260 صورت گرفت. به این منظور پپتید ناخالص در آب/استونیتریل به نسبت حجمی ۱:۱ حل شد و سپس به ستون C_{18} نیمه تهیه‌ای (Semi Preparative) به ابعاد $21/2 \times 150$ mm، با قطر ذرات ۵ میکرون تزریق شد. همچنین آشکارساز DAD در طول موج‌های ۲۲۰ و ۴۴۵ نانومتر تنظیم گردید. سرعت جریان فاز متحرک ml/min ۸ بود و برنامه تغییرات گرادیان فاز متحرک مطابق جدول ۱ تنظیم گردید. سپس پپتید خالص شده جهت تعیین درصد خلوص به ستون C_{18} تجزیه‌ای (Analytical) به ابعاد $4/6 \times 250$ mm تزریق شد. سطح زیر پیک کروماتوگرام حاصل نشان‌دهنده خلوص ۹۷٪ پپتید است (شکل ۴-الف). بمنظور تایید صحت سنتز پپتید نشاندار FAM-YYYYRRRR از دستگاه طیف‌سنجی جرمی ساخت شرکت Agilent آمریکا، مدل Triple Quadrupole 6410 استفاده شد. نتایج حاصل از جرم‌سنجی پپتید نشاندار با وزن مولکولی $1653/75 \text{ g.mol}^{-1}$ در شکل ۴-ب نشان داده شده‌است. در این طیف پیک‌ها نشان‌دهنده نسبت جرم به بار (m/z) هستند.

جدول ۱- برنامه تغییر گرادیان فاز متحرک در واحد زمان برای خالص‌سازی پپتید در دستگاه RP-HPLC

زمان (دقیقه)	درصد استونیتریل	درصد آب
۰	۱۰	۹۰
۱۸	۴۸	۵۲
۳۰	۴۹	۵۱
۴۰	۹۵	۵
۵۰	۱۰	۹۰



شکل ۲- (الف) کروماتوگرام تجزیه‌ای پپتید خالص شده FAM-YYYYRRRR. سطح زیر نمودار نشان دهنده خلوص ۹۷٪ می‌باشد. (ب) طیف جرمی

پپتید FAM-YYYYRRRR

طیف جذب نوری پپتید و کورکومین بترتیب با غلظت‌های ۱۰۰ و ۵ میکرومولار در شکل ۵-الف نشان داده شده‌است. بمنظور دستیابی به این طیف، پپتید و کورکومین در حلال اتانول/بافر سالین فسفات ۲۰ میلی‌مولار (۲/۳ v/v) حل شدند و طیف مذکور از طول موج ۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت گردید. کورکومین مولکولی بسیار آبگریز می‌باشد و انحلال‌پذیری بسیار کمی در آب دارد، بنابراین استفاده از آب یا بافر سالین فسفات به تنهایی برای حل کردن کورکومین کافی نبود و افزودن اتانول مشکل انحلال‌پذیری را حل کرد. همان‌طور که در شکل ۵-الف مشاهده می‌شود پیوند پپتیدی دارای جذب قوی در حدود ۱۹۰ نانومتر ($\epsilon \approx 7000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) و جذب ضعیف بین ۲۲۰-۲۱۰ نانومتر ($\epsilon \approx 100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) می‌باشد (۴۲). زنجیره جانبی تیروزین نیز در حدود ۲۷۵ نانومتر ($\epsilon \approx 1420 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) جذب دارد (۳۵). همچنین بعلاّت آن که پپتید با رنگ فلورسنت FAM نشاندار شده است در محدوده ۴۰۰-۵۳۰ نانومتر نیز دارای جذب است که در این محدوده دارای دو قله در ناحیه ۴۵۸ و ۴۸۵ نانومتر می‌باشد. کورکومین دارای سه قله با حداکثر جذب در طول موج‌های ۱۹۲، ۲۵۴ و ۴۲۰ نانومتر می‌باشد که بترتیب مربوط به کروموفور $\text{C}=\text{C}$ ، حلقه بنزن و بتا-دی‌کتون‌های جایگزین می‌باشد (۱۶).

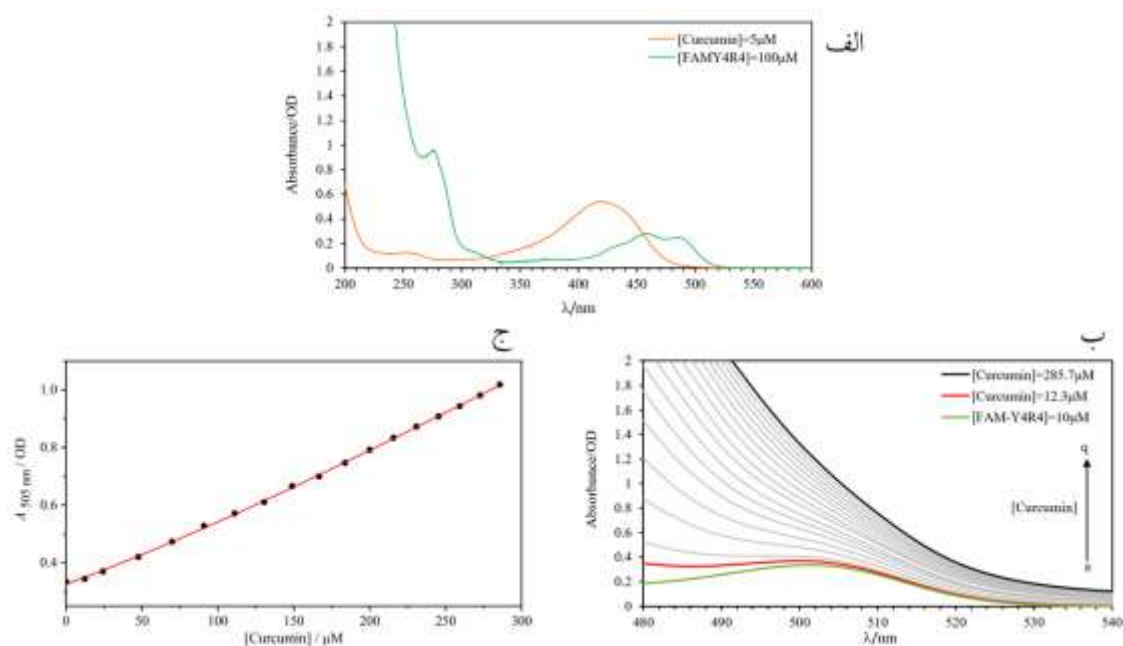
بمنظور بررسی برهمکنش و تعیین ثابت اتصال بین کورکومین و پپتید، تیتراسیون با ثابت نگه‌داشتن غلظت پپتید و افزایش غلظت کورکومین صورت گرفت. به این منظور مقادیر مختلفی از محلول پپتید/کورکومین (بترتیب با غلظت ۱۰ میکرومولار/۱ میلی‌مولار) به محلول ۱۰ میکرومولار پپتید مطابق توضیحات قسمت مواد و روش‌ها اضافه شد. بسبب وجود غلظت یکسان پپتید در هر دو محلول تیتراشونده و تیتراکننده، اثر رقّت (که موجب کاهش جذب نور در طیف می‌شود) حذف گردید (۳۳). همان‌طور که در شکل ۵-ب مشاهده می‌شود با افزودن مقادیر مختلف کورکومین به پپتید شاهد افزایش در طیف جذب بویژه در ناحیه ۴۸۰ الی ۵۲۰ نانومتر هستیم که مربوط به جذب نور توسط کورکومین است.

برای محاسبه ثابت اتصال، تیتراسیون باید در ناحیه‌ای از طیف جذب بررسی گردد که پپتید مذکور دارای بیشینه جذب باشد. به همین علّت نمودار ایزوترم اتصال در طول موج ۵۰۵ نانومتر رسم شد (شکل ۵-ج).

ثابت اتصال حاصل از این تیتراسیون با مدل دو میزبان-یک میهمان (Two Host-One Guest)، با استفاده از نرم‌افزار OriginLab و توسط معادله ۱ محاسبه گردید. در اینجا پپتید مولکول میهمان (G) و کورکومین مولکول میزبان (H) می‌باشند. در این معادله G_0 ، I_g ، I_{gh} بترتیب بیانگر غلظت اولیه پپتید، جذب پپتید و حداکثر جذب مجموعه پپتید-کورکومین در طول موج ۵۰۵ نانومتر می‌باشند. ثابت اتصال نیز با نماد K نشان داده شده است.

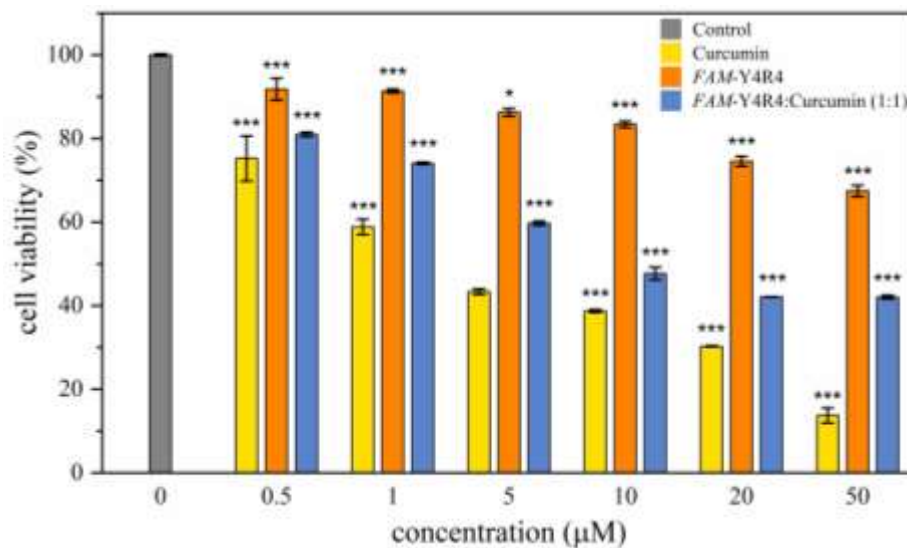
$$Y = \frac{I_g / (1 + K_1 * \text{net}(K_1, K_2, x, \text{Go})) + K_1 * K_2 * (\text{net}(K_1, K_2, x, \text{Go}))^2 + (I_{gh} * K_1 * \text{net}(K_1, K_2, x, \text{Go})) / (1 + K_1 * \text{net}(K_1, K_2, x, \text{Go})) + K_1 * K_2 * (\text{net}(K_1, K_2, x, \text{Go}))^2 + (I_{ghh} * K_1 * K_2 * (\text{net}(K_1, K_2, x, \text{Go}))^2) / (1 + K_1 * \text{net}(K_1, K_2, x, \text{Go})) + K_1 * K_2 * (\text{net}(K_1, K_2, x, \text{Go}))^2}{(1 + K_1 * \text{net}(K_1, K_2, x, \text{Go}))^2} \quad (1)$$

ثابت اتصال پپتید به کورکومین برای یک مولکول پپتید $K_{a(1)} = 2/714 \text{ M}^{-1}$ و برای دومین مولکول پپتید $K_{a(2)} = 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ محاسبه شد. با توجه به ناچیز بودن ثابت اتصال پپتید اول می‌توان گفت هرچند به کاربردن مدل دو میزبان-یک میهمان برای محاسبه رگرسیون ضروری بود اما در عمل اتصال به صورت یک به یک یا یک میزبان-یک میهمان اتفاق می‌افتد.



شکل ۵- (الف) طیف جذب فرابنفش-مرئی پپتید *FAM-YYYYRRRR* و کورکومین در حلال اتانول/ بافر فسفات سالین. (ب) تیتراسیون پپتید *FAM-YYYYRRRR* توسط کورکومین در $pH=7$. طیف های a تا q مربوط به افزایش جذب کمپلکس پپتید-کورکومین در پی افزایش تدریجی غلظت کورکومین می‌باشد. (ج) نمودار ایزوترم اتصال کورکومین به پپتید در طول موج ۵۰۵ نانومتر.

مطالعاتی مختلف نشان داده‌اند که کورکومین موجب القای آپوپتوز در بسیاری از سلول‌های سرطانی می‌شود (۴، ۱۰). اثر کورکومین بنهایی و همراه با پپتید *FAM-YYYYRRRR* بر زنده‌مانی سلول‌های Jurkat توسط روش MTT بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۶ نشان داده شده‌است با افزایش غلظت کورکومین، زنده‌مانی سلول‌ها کاهش می‌یابد اما همراه شدن کورکومین با پپتید، موجب کاهش اثر سمیت کورکومین و بقاء (زنده‌مانی) بیشتر سلول‌های Jurkat T-cell می‌شود.



شکل ۶- بقاء سلول‌های Jurkat T-cell در حضور غلظت‌های مختلف کورکومین، پپتید و کمپلکس پپتید-کورکومین به نسبت ۱:۱. هر آزمایش در پنج تکرار انجام شد و داده‌ها بصورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند. علامت‌های * و *** بترتیب تفاوت معنی‌داری در حد $P \leq 0.05$ و $P \leq 0.001$ را نسبت به نمونه کنترل نشان می‌دهند.

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که در بالا اشاره شد پپتید طراحی شده در این پروژه آمفی‌پاتیک بوده و متشکل از دو قسمت تترآرژنین (هیدروفیل) و تتراتیروزین (آبگریز) می‌باشد. در اکثر مطالعات انجام شده پپتیدهای نفوذگر سلولی، غنی از آرژنین بوده و ساده‌ترین آن‌ها پلی‌آرژنین‌هایی با طول متفاوت می‌باشند که بسبب وجود گروه گوانیدینوم در زنجیره جانبی اسیدآمینه آرژنین به سلول نفوذ می‌کنند (۴۵). بنابراین با توجه به مطالعات انجام شده، بخش تترآرژنین پپتید طراحی شده منجر به نفوذپذیری پپتید می‌شود (۲). از طرفی پپتید مذکور دارای بخش تتراتیروزین با ماهیت آبگریز می‌باشد. داروهای کم‌محلول به سبب وجود دو نوع گروه آروماتیک یا آلیفاتیک در ساختار شیمیایی خود خواص آبگریزی پیدا می‌کنند. از آنجایی که پپتید طراحی شده دارای اسیدهای آمینه تیروزین می‌باشد برهمکنش آبگریزی آن‌ها با گروه‌های آروماتیک امکان‌پذیر است. در نتیجه این پپتید برای اتصال به داروهای کم‌محلول با ساختار شیمیایی آروماتیک مانند کورکومین مناسب است.

پپتیدهای نفوذگر سلولی را می‌توان بصورت کووالانسی یا غیرکووالانسی به محموله متصل کرد. در ابتدا برهمکنش کووالانسی رایج‌ترین روش بود و هنوز هم برای تحویل داروهای کوچک و اتصال رنگ‌های فلورسنت به پپتید مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مورد محموله‌های بزرگ و باردار مانند الیگونوکلوئوتیدها، تشکیل کمپلکس غیرکووالانسی بسیار مورد استقبال قرار گرفته است. مزایای این روش سهولت در آماده‌سازی آن است؛ اینکه می‌توان از یک توالی پپتیدی برای طیف وسیعی از محموله‌های مختلف بدون آنکه در ساختار شیمیایی ماده حمل شونده تغییرات شیمیایی داده شود و فرمولاسیون آن تغییر کند استفاده کرد (۳۸). از طرفی اتصال کووالانسی می‌تواند در عملکرد مولکول‌های فعال زیستی تداخل داشته باشد یا با ایجاد ممانعت فضایی در اتصال دارو به هدف مشکلاتی ایجاد کند (۱). بنابراین برای محموله‌های ماکرومولکولی، کمپلکس‌های غیرکووالانسی موجب تحویل بهتر دارو می‌شوند (۳۷). چهار نوع از برهمکنش‌های غیرکووالانسی که می‌توانند نقش مهمی در اتصال لیگاند به پروتئین‌ها داشته باشند شامل پیوندهای هیدروژنی، نیروی واندروالس، نیروهای الکترواستاتیک و

برهمکنش‌های آبریز هستند (۹). در اینجا نیز اتصال پپتید FAM-YYYYRRRRR به کورکومین از نوع برهمکنش نیروهای لاندن و واندروالسی است. از آنجایی که اتصال پپتید به کورکومین سوپرامولکولی و برگشت‌پذیر است فرمول شیمیایی کورکومین در اثر اتصال به پپتید دستخوش تغییر نمی‌شود (واکنش ۱).

واکنش ۱: Peptide + Curcumin ↔ Peptide/Curcumin

پپتید در محیط کشت و در سیتوپلاسم بصورت برگشت‌پذیر به کورکومین متصل می‌شود. اما در سمت سیتوپلاسم چنانچه کورکومین به پروتئین هدف متصل شود واکنش ۱ طبق اصل لوشاتلیه به سمت چپ، یعنی آزاد کردن کورکومین‌های بیشتر سوق داده می‌شود. بنابراین کمپلکس پپتید/کورکومین بعنوان مخزن ذخیره‌سازی کورکومین هم عمل می‌کند.

چهار روش برای اندازه‌گیری ثابت اتصال وجود دارد. این چهار روش عبارتند از: طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی (۸)، طیف-سنجی نشر فلورسانس، طیف‌سنجی NMR و کالری‌سنجی ایزوترمال یا ITC (Calorimetry Isothermal) (۳۱). مطالعات بسیاری در زمینه اتصال کورکومین به انواع حامل‌ها صورت گرفته است. روش طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی (UV-Visible spectroscopy) بطور موثر برای توصیف نیروهای برهمکنش کورکومین با پپتید، فلز، پروتئین، نانوذرات و میسل استفاده شده است (۳۷).

در این پژوهش نیز به کمک روش طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی، اتصال کورکومین به پپتید بررسی شد. در مطالعه قبلی اتصال کورکومین به مولکول‌های تیروزین و فنول به عنوان شبیه ساز بخش YYYY مورد بررسی قرار گرفت و ثابت‌های اتصال در محدوده 10^5 M^{-1} گزارش شدند (۲۰). در این مطالعه نیز ثابت اتصال $K_{a(2)} = 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ گزارش می‌شود. نزدیکی مقادیر ثابت اتصال در دو مطالعه نشان می‌دهد که احتمالاً کورکومین تنها به ناحیه آبریز تتراتیروزین متصل می‌شود و یا در صورت اتصال به سایر نواحی مانند FAM یا ناحیه آبدوست تترآرژینین ثابت‌های اتصال تقریباً به یک اندازه هستند.

در پی تیتراسیون پپتید-کورکومین با افزودن کورکومین به غلظت ثابتی از پپتید شاهد افزایش جذب در ناحیه ۵۰۵ نانومتر هستیم که این افزایش، بعلاّت اتصال کورکومین به پپتید می‌باشد. از آنجا که غلظت پپتید در تیتراسیون ثابت نگه‌داشته شده است هر گونه افزایش جذب در ناحیه ویژه پپتید، بسبب ایجاد کمپلکس می‌باشد. همان‌طور که قبلاً اشاره شد کورکومین یک مولکول بشدت آبریز می‌باشد که بخش بتا-دی‌کتون آن توسط دو گروه فنول احاطه شده است و با توجه به تفکیک سه پروتون اسیدی، دارای مقادیر pK_a ۸/۳۸، ۹/۸۸، ۱۰/۵۱ در محلول آبی می‌باشد (۳۷). کورکومین به لحاظ بارالکتریکی خنثی بوده و در ساختار خود دارای گروه‌های آروماتیک است لذا اتصال آن به زنجیره جانبی تیروزین توسط برهمکنش آبریز صورت می‌گیرد. همان‌گونه که قبلاً اتصال آبریزی گروه‌های آریل در ترکیبات پلی‌فنلی به قسمت‌های آبریزی پروتئین توسط راول و همکاران با افزودن اوره برای از بین بردن برهمکنش‌های غیرکووالانسی شناسایی شده بود (۱۹).

با روش رگرسیون غیرخطی (Non-linear regression) دو ثابت اتصال با مقادیر $2/714 \text{ M}^{-1}$ و $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ برای برهمکنش پپتید و کورکومین محاسبه شده است اما از آنجا که ثابت اتصال $2/714 \text{ M}^{-1}$ بسیار ناچیز و قابل اغماض است عملاً پپتید تنها با یک مولکول کورکومین برهمکنش موثر دارد. لازم بذکر است که ثابت اتصال (K_a) بیانگر قدرت اتصال دو مولکول بصورت غیرکووالانسی می‌باشد و هر چه مقدار ثابت اتصال بزرگتر باشد نشان دهنده آن است که دو مولکول محکم‌تر به یکدیگر متصل می‌شوند. عکس ثابت اتصال، ثابت جدایی (K_d) است که طبق رابطه $K_a = 1/K_d$ بدست می‌آید و هرچه ثابت جدایی

کوچکتر باشد مولکول‌ها محکم‌تر به یکدیگر متصل می‌شوند. ثابت اتصال و جدایی همواره اعدادی بزرگتر از صفر هستند. ثابت اتصال همواره از یک بزرگتر و ثابت جدایی مقادیری بین صفر تا یک را شامل می‌شود.

در مطالعات مشابه مقادیر K_a برای اتصال کورکومین به رزیدوهای تریپتوفان در میسل‌های کازئین توسط معادله شماره ۲ در محدوده $10^3-10^4 M^{-1}$ گزارش شده‌است (۲۱، ۴۸). در این معادله F_0 و F بترتیب حداکثر شدت فلورسنت کازئین در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف کورکومین، $C_{curcumin}$ غلظت کورکومین، K_b ثابت اتصال و n تعداد محل‌های اتصال است.

$$\log \frac{(F_0-F)}{F} = \log K_b + n \log C_{curcumin} \quad (2)$$

همچنین نادى (۲۶) و همکاران مقادیر بالای K_a را برای اتصال کورکومین به BSA و کازئین گزارش کرده‌اند (۲۶). مقادیر متغیر K_a ممکن است بدلایلی مانند خواص ذاتی ملکول میزبان، شرایط آزمایش و مدل‌های انطباق (Fitting models) نسبت داده‌شود. همچنین در تجزیه و تحلیل داده‌ها و محاسبه ثابت اتصال نباید از روش‌های رگرسیون خطی قدیمی مانند بنسی-هیلدبراند (Benesi-Hildebrand)، لینیور-برک (Lineweaver-Burk) (۲۹)، اسکات (۲۲)، هانس-ولف (Hanse-Woolf)، اسکچارد (Scatchard) استفاده کرد. این روش‌ها قبل از اینکه کامپیوتر و برنامه‌های مدرن در دسترس قرار گیرند مفید بودند. استفاده از این روش‌ها منجر به بروز خطاهای محاسباتی می‌شود که می‌توان با روش‌های جدید رگرسیون غیرخطی از آن‌ها اجتناب کرد (۴۷).

در این مطالعه اثر سمیت کورکومین و کمپلکس پپتید-کورکومین بر رده سلولی Jurkat T-cell توسط روش MTT بررسی شد. نتایج ما نشان می‌دهد که پپتید FAM-YYYYRRRR باعث کاهش اثر سمیت کورکومین بر رده سلولی Jurkat T-cell می‌شود. در نتیجه همراه شدن این پپتید با کورکومین، ضمن کاهش اثر سمیت کورکومین بر روی سلول‌های T، موجب کاهش مرگ سلولی می‌شود. در واقع این پپتید با تشکیل کمپلکس با کورکومین، بعنوان بازدارنده‌ای مناسب برای حفظ عملکرد سلول‌های T و پاسخ ایمنی می‌شود.

در این مقاله با استفاده از داده‌های طیف جذب، اتصال کورکومین به پپتید FAM-YYYYRRRR با روش پیشرفته رگرسیون غیرخطی بررسی شد. ثابت اتصال محاسبه شده با مقدار $3 \times 10^5 M^{-1}$ نشان‌دهنده میل اتصال بسیار بالای کورکومین به زنجیره جانبی تیروزین پپتید می‌باشد. براساس مطالعات صورت گرفته، برهمکنش‌های آبگریز بین گروه فنول کورکومین و زنجیره جانبی اسیدآمینه تیروزین عامل ایجاد این اتصال می‌باشد. پپتید مذکور بدلیل حضور رنگ فلورسانس در انتهای آمین قابلیت ردیابی درون سلول را دارد. همچنین قسمت تترارژنین موجب افزایش انحلال‌پذیری کمپلکس پپتید-کورکومین شده و به پپتید خاصیت نفوذپذیری به سلول را نیز می‌دهد. این مطالعه نشان می‌دهد که همراه شدن این پپتید با کورکومین موجب کاهش سمیت کورکومین و افزایش زنده‌مانی سلول‌های Jurkat T-cell می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بابت حمایت این پروژه با طرح شماره ۸۲۰ تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

- ۱- یاسمن خوارزمی خراسانی، احمد آسوده. ۱۳۹۹. به کارگیری پپتیدهای ضدسرطانی و نفوذپذیر سلولی در درمان سرطان. مجله پژوهش های علوم سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). دوره ۳۵. شماره ۲. ص ۱۸۳-۱۹۷.
- ۲- ریحانه خسروی، مرتضی دلیری، زهرا عزیزی، محمد حسین صنعتی، مریم محقق و امیر نوروزی. ۱۴۰۱. بهینه سازی واکنش های اتصال آمینو اسید به رزین ونگ و نشاندار کردن پپتید با کروموفور (۶/۵)-کربوکسی فلورسین. مجله پژوهش های علوم سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). دوره ۳۵. شماره ۴. ص ۶۱۱-۵۹۵.
- ۳- مرضیه چوری؛ سهراب بوذرپور؛ عبدالوهاب مرادی؛ عیسی جرجانی. ۱۳۹۷. بررسی اثر نانوکورکومین دندروزومی بر روی بیان ژن های POU5F1 و NANOG در رده سلولی Caco-2 سرطان کولون. مجله پژوهش های علوم سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). دوره ۳۱. شماره ۳. ص ۳۰۱-۲۹۳.
4. Abdel-Hafez, S., Hathout, R.M. and Sammour, O., 2020. Attempts to enhance the anti-cancer activity of curcumin as a magical oncological agent using transdermal delivery. *Advances in Traditional Medicine*. **21**(1): p. 15-29.
5. Aggarwal, B.B. and Harikumar, K.B., 2009. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **41**(1): p. 40-59.
6. Azizi, Z., Abbaszadeh, R., Sahebhasagh, R., Norouzy, A., Motevaseli, E., and Maedler, K., 2022. Bone marrow mesenchymal stromal cells for diabetes therapy: touch, fuse, and fix? *Stem Cell Research & Therapy*. **13**(348): p. 1-10.
7. Bhatia, N.K., Kishor, S., Katyal, N., et al., 2016. Effect of pH and temperature on conformational equilibria and aggregation behaviour of curcumin in aqueous binary mixtures of ethanol. *Royal Society of Chemistry Advances*. **6**(105): p. 103275-103288.
8. Carvalho, C.P., Norouzy, A., Ribeiro, V., et al., 2015. Cucurbiturils as supramolecular inhibitors of DNA restriction by type II endonucleases. *Organic & biomolecular chemistry*. **13**(10): p. 2866-2869.
9. Dai, Y., Hou, C., Cao, J., et al., 2021. Interaction between curcumin and a peptide and their protective effects against hepatic steatosis in mice. *Food Bioscience*. **39**: p. 100817.
10. Darwish, S., Mozaffari, S., Parang, K., et al., 2017. Cyclic peptide conjugate of curcumin and doxorubicin as an anticancer agent. *Tetrahedron Letters*. **58**(49): p. 4617-4622.
11. Durzynska, J., Przysiecka, L., Nawrot, R., et al., 2015. Viral and other cell-penetrating peptides as vectors of therapeutic agents in medicine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **354**(1): p. 32-42.
12. Fattahi, P., N. Salehi, Z. Azizi, J. Mohammadi, A. Norouzy and S.M. Moazzeni, 2023. Fluorescence labeling of anchor-modified Mart-1 peptide for increasing its affinity for HLA-A*0201: Hit two targets with one arrow. *Journal of Peptide Science*. **29**(9): p. e3480.
13. Gestin, M., Dowaidar, M. and Langel, Ü. 2017. Uptake mechanism of cell-penetrating peptides, in *Peptides and peptide-based biomaterials and their biomedical applications*. Springer. p. 255-264.
14. Golonko, A., Lewandowska, H. Świsłocka, R., et al., 2019. Curcumin as tyrosine kinase inhibitor in cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **181**: p. 111512.
15. Guidotti, G., Brambilla, L. and Rossi, D. 2017. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends in Pharmacological Sciences*. **38**(4): p. 406-424.
16. Gunasekaran, S., Natarajan, R., Natarajan, S., et al., 2008. Structural investigation on curcumin. *Asian Journal of Chemistry*. **20**(4): p. 2903.
17. Guo, Z., Peng, H., Kang, J., et al., 2016. Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications. *Biomedical reports*. **4**(5): p. 528-534.

18. Haque, A.N.M.A., Hussain, M., Smriti, S.A., Siddiqua, F. and N. Farzana, 2018. Kinetic Study of Curcumin on Modal Fabric. *Tekstilec*. 61(1): p. 27-32.
19. Hegde, A.H., Sandhya, B. and Seetharamappa, J. 2013. Investigations to reveal the nature of interactions of human hemoglobin with curcumin using optical techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*. 52: p. 133-8.
20. Heydari, M., Salehi, N., Zadmard, R., Nau, W.M., et. al., 2024. P-Sulfonatocalix [4] arene turns peptide aggregates into an efficient cell-penetrating peptide. *RSC advances*. 14(44): p. 32460-32470.
21. Khandelwal, P., Alam, A., Choksi, A., et. al, 2018. Retention of Anticancer Activity of Curcumin after Conjugation with Fluorescent Gold Quantum Clusters: An in Vitro and in Vivo Xenograft Study. *American Chemical Society Omega*. 3(5): p. 4776-4785.
22. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A et al, 2008. *Molecular cell biology*. Macmillan.
23. Madani, F., S. Lindberg, S., Langel, Ü., et. al, 2011. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *Journal of biophysics*. p. 414729.
24. Malik, P. and Mukherjee, T.K. 2014. Structure-Function Elucidation of Antioxidative and Prooxidative Activities of the Polyphenolic Compound Curcumin. *Chinese Journal of Biology*, p. 1-8.
25. Mareeswaran, M.P., E. Babu, V. Sathish, B. Kim, S.I. Woo and S. Rajagopal, 2014. p-Sulfonatocalix[4]arene as a carrier for curcumin. *New Journal of Chemistry*. 38(3): p. 1336-1345.
26. Nadi, M., Ashrafi Kooshk, M.R., Mansouri, K., et. al, 2015. Comparative spectroscopic studies on curcumin stabilization by association to bovine serum albumin and casein: a perspective on drug-delivery application. *International Journal of Food Properties*. 18(3): p. 638-659.
27. Noorafshan, A. and Ashkani-Esfahani, S., 2013. A review of therapeutic effects of curcumin. *Current Pharmaceutical Design*. 19(11): p. 2032-46.
28. Norouzy, A., Karimi-Jafari, M.H., Lazar, A.I., Firouzi, R. and Nau. W. M., 2022. Electrostatically induced pK_a shifts in 475 oligopeptides: the upshot of neighboring side chains. 54(2): p. 277-287
29. Norouzy, A., Qujeq, D. and Habibi-Rezaei, M., 2009. The inhibitory effect of dissolved carbaryl in dioxane on physically adsorbed acetylcholinesterase. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*. 98(2): p. 391.
30. Norouzy, A., Assaf, K.I., Zhang, S., Jacob, M.H. and W.M. Nau, 2014. Coulomb Repulsion in Short Polypeptides. *The Journal of Physical Chemistry B*. 119(1): p. 33-43.
31. Norouzy, A. and Werner, N., 2014. Synthetic macrocyclic receptors as tools in drug delivery and drug discovery. *Drug Target Review*.
32. Norouzy, A., Qujeq, D. and Habibi-Rezaei, M., 2015. Evaluation and Characterization of Free and Immobilized Acetylcholinesterase with Fluorescent Probe, Differential Scanning Calorimetry and Docking. *International Biological and Biomedical Journal*. 1(3): p. 103-111.
33. Norouzy, A., Azizi, Z. and Nau, W. M., 2015. Indicator displacement assays inside live cells. *Angewandte Chemie International Edition*. 54(3): p. 792-795.
34. Pourbaferani, M., Modiri, S., Norouzy, A., Maleki, H., et. al., 2021. A Newly Characterized Potentially Probiotic Strain, *Lactobacillus brevis* MK05, and the Toxicity Effects of its Secretory Proteins Against MCF-7 Breast Cancer Cells. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 13: p. 982-992.
35. Prasad, S., I. Mandal, I., Singh, S., Paul, A., et. al, 2017. Near UV-Visible electronic absorption originating from charged amino acids in a monomeric protein. *Chemical Science*. 8(8): p. 5416-5433.
36. Priyadarsini, K.I., 2014. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*. 19(12): p. 20091-112.
37. Ratrey, P., Dalvi, SV., and Mishra, A., 2020. Enhancing Aqueous Solubility and Antibacterial Activity of Curcumin by Complexing with Cell-Penetrating Octaarginine. *American Chemical Society Omega*. 5(30): p. 19004-19013.
38. Regberg, J., Srimanee, A. and Langel, Ü., 2012. Applications of cell-penetrating peptides for tumor targeting and future cancer therapies. *Pharmaceuticals*. 5(9): p. 991-1007.
39. Rey, J., Murail, S., de Vries, S., et. al., 2023. PEP-FOLD4: a pH-dependent force field for peptide structure prediction in aqueous solution. *Nucleic Acids Research*. 51(W1): p. W432-W437.

40. Safaei, M., Maleki, H., Soleimanpour, H.R., Norouzy, A., et. al., 2019. Development of a novel method for the purification of C-phycocyanin pigment from a local cyanobacterial strain *Limnothrix* sp. NS01 and evaluation of its anticancer properties. *Scientific Reports*. 9(1): p. 9474.
41. Sajid, M.I., Moazzam, M., Stueber, R., et. al., 2021. Applications of amphipathic and cationic cyclic cell-penetrating peptides: Significant therapeutic delivery tool. *Peptides*. 141: p. 170542.
42. Shahabi, M., Hajihosseini, R., Nau, W.M., Noghabi, K.A., and Norouzy, A., 2020. Augmenting Peptide Flexibility by Inserting Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) in Their Sequence. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 26(4): p. 2633–2640.
43. Shamsian, A., Sahebnasagh, R., Norouzy, A., et. al., 2022. Cancer cells as a new source of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 13(1): p. 1-10.
44. Shirazi, A.N., El-Sayed, N.S., Tiwari, R.K., et. al., 2016. Cyclic Peptide Containing Hydrophobic and Positively Charged Residues as a Drug Delivery System for Curcumin. *Current Drug Delivery*. 13(3): p. 409-17.
45. Sikora, E., A. Bielak-Zmijewska, A., Magalska, A., et. al., 2006. Curcumin induces caspase-3-dependent apoptotic pathway but inhibits DNA fragmentation factor 40/caspase-activated DNase endonuclease in human Jurkat cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 5(4): p. 927-34.
46. Soltani, S. and Badoei-Dalfard, A., 2023. Controlled Release of Curcumin by Graphene Oxide/Chitosan/Sodium Alginate Hydrogel Multilayer Nanocomposites and Evaluate its Synergistic Antibacterial Activity. *Journal of Genetic Resources*. 9(2): p. 232-243.
47. Thordarson, P., 2011. Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chemical Society Reviews*. 40(3): p. 1305-1323.
48. Wu, Y. and X. Wang, 2017. Binding, stability, and antioxidant activity of curcumin with self-assembled casein-dextran conjugate micelles. *International Journal of Food Properties*. 20(12): p. 3295-3307.
49. Zhang, D., J. Wang and D. Xu, 2016. Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 229: p. 130-139.
50. Zhou, H., C.S. Beevers and S. Huang, 2011. The targets of curcumin. *Current Drug Targets*. 12(3): p. 332-47.
51. Zoghebi, K., H.M. Aliabadi, R.K. Tiwari and K. Parang, 2022. [(WR)(8) WKbetaA]-Doxorubicin Conjugate: A Delivery System to Overcome Multi-Drug Resistance against Doxorubicin. *Cells*. 11(2): p. 301.

Inhibiting the Toxicity of Curcumin with Tetraarginine-tetratyrosin Cell-penetrating Peptide on Jurkat T-cells

Mahsima Heydari^{1†}, Najaf Allahyari Fard^{2†}, Reihaneh Khosravi¹ and Amir Norouzy^{* 1}

- 1- Bioprocess Engineering Department, Institute of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran
- 2- Systems Biotechnology, Institute of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran

† M. Heydari and N. Allahyari Fard contributed equally to this work.

*Corresponding author: Amir Norouzy, a.norouzy@nigeb.ac.ir

Tell: +98-21-44787349

Abstract

Curcumin is a member of the curcuminoid family and the most important active ingredient in turmeric. Despite its wide therapeutic and biological benefits, curcumin often cannot be an effective therapeutic agent due to its hydrophobic nature and as a result low solubility, and its use is limited. In order to overcome this issue *FAM-YYYYRRRR*, an amphipathic cell-penetrating peptide that was synthesized in a previously study, was used. The tetra-tyrosine as a hydrophobic moiety of the peptide binds to curcumin, while the tetra-arginine with four positive charges—which is highly hydrophilic and electrostatically charged— moiety increases the solubility of the peptide/curcumin complex and at the same time enhance its cellular permeability. The three-dimensional structure of the mentioned peptide in PEP-FOLD-4 and peptide-curcumin interaction was investigated in MVD v.6, which shows a suitable score of -108.4. The binding of peptide to curcumin was calculated spectroscopically by plotting the binding isotherm curve and using OriginLab software. The binding constant of peptide molecule to curcumin is reported as $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. The toxicity effect of curcumin alone and the peptide/curcumin complex separately on Jurkat T-cells was assayed by MTT test and showed that the toxicity of the peptide in the complex with curcumin is significantly reduced on the cells. Therefore, the peptide protects T cells upon binding with curcumin.

Keywords: curcumin, cell-penetrating peptide, supramolecular binding, solubility