



بررسی سمیت انتخابی نانوذرات کور کومین لود شده در آهن بر روی سلول‌های فیبروبلاست ایزوله شده از پوست مدل حیوانی زخم پای دیابتی

بهناز اشتری: گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه خدمات درمانی و علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
فاطمه قنبری: گروه شیمی، واحد مهاباد، دانشگاه آزاد اسلامی، مهاباد، ایران

پروانه ناصرزاده: مرکز تحقیقات غدد، انستیتو غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (* نویسنده مسئول) pnnew2011@yahoo.com
آرش جواد موسوی: دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

سلول فیبروبلاست،
استرس اکسیداتیو،
سمیت سلولی،
رادیکال آزاد اکسیژن

زمینه و هدف: زخم پای دیابتی بیماری رایجی در میان بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ و ۲ می‌باشد که معمولاً با وارد شدن یک آسیب هرچند جزئی به پاها ایجاد می‌شود. درمان این زخم‌ها در افرادی که مبتلا به دیابت نیستند معمولاً خود به خودی انجام می‌شود اما در مورد بیماران دیابتی رسیدگی سریع و توجه به این زخم امری ضروری می‌باشد. کور کومین ماده فعال زردچوبه که دارای ویژگی‌های ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، ضد دیابتی و ضد سرطانی می‌باشد به علت حلالیت کم در آب، استفاده از خواص دارویی و بیولوژیکی آن محدود شده است، اما امروزه برای بهبود عملکرد کور کومین محققین توانسته‌اند که ساختارهای نانوذرات این ترکیب را بسازند و یا در نانوذرات پر کاربرد لود بکنند. میزان کاربرد نانوذرات پس از سنتز اغلب توسط مطالعات سلولی در مکانیسم استرس اکسیداتیو نشان داده می‌شود.

روش کار: ما نانوذرات اکسید آهن سوپراپارامغناطیس بارگذاری شده با کور کومین (Fe_3O_4 magnetic-CurNPs) را برای دستیابی به یک اثر کمک درمانی طراحی کردیم. خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 با استفاده از پراش پرتو ایکس (XRD) و پراکندگی نور لیزر (DLS) پویا و پتانسیل زتا مشخص شد. علاوه بر این، برای اثبات میزان سمیت سلولی فاکتورهای سلولی مانند زنده ماندن سلولی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، تغییرات پراکسیداسیون لیپیدی و آزادسازی سیتوکروم C همچنین تغییرات هیستوپاتولوژی در بافت پوست را مشخص نمودیم.

یافته‌ها: پژوهش پیش رو نشان دادیم که درمان موثر با نانوذرات باعث کاهش یا جلوگیری از استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتوکندری در پوست حیوانات تحت مطالعه می‌شود، همچنین میزان زنده ماندن سلولی به طور قابل توجهی در سلول‌های گروه تحت مواجهه نسبت به کنترل افزایش یافت ($P < 0.05$). در نتیجه، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و لیپید پراکسیداسیون و خروج سیتوکروم C از میتوکندری به فراکسیون سیتوزولی در گروه تحت مواجهه در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجهی ($p < 0.05$) کاهش یافت. در مجموع، Fe_3O_4 -CurNPs فعالیت آنتی اکسیدان قوی در سلول‌های فیبروبلاست ایزوله شده از زخم پای دیابتی نشان داد.

نتیجه‌گیری: این رویکرد را می‌توان در مطالعات پیش بالینی مورد استفاده قرار داد و ممکن است در آینده در کاهش اثرات زخم‌های دیابتی اهمیت داشته باشند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: دانشگاه علوم پزشکی ایران

شیوه استاندارد به این مقاله:

Ashtari B, Ghanbary F, Naserzadeh P, Javad Mosavi A. Investigating the Selective Toxicity of Iron-Loaded Curcumin Nanoparticles on Fibroblast Cells Isolated from the Skin of an Animal Model of Diabetic Foot Ulcer. Razi J Med Sci. 2023(26 Nov);30.131.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/) صورت گرفته است.

Investigating the Selective Toxicity of Iron-Loaded Curcumin Nanoparticles on Fibroblast Cells Isolated from the Skin of an Animal Model of Diabetic Foot Ulcer

Behnaz Ashtari: Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Fatemeh Ghanbary: Department of Chemistry, Mahabad Branch, Mahabad, Iran

Parvaneh Naserzadeh: Endocrine Research Center, Institute of Endocrinology and Metabolism, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (* Corresponding Author) pnnew2011@yahoo.com

Arash Javad Mosavi: Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: In the world, every 20 seconds, a patient loses his leg due to diabetes. It is also known that diabetic foot ulcers develop in the feet of about 300,000 patients every year, and it is known that 20,000-30,000 of these patients lose their legs. The increasing prevalence of diabetes worldwide has caused countless personal and social problems. So that today this disease has become an epidemic. Diabetic foot ulcer is a common disease among patients with type 1 and 2 diabetes, which is usually caused by an injury, even if minor, to the feet. The treatment of these wounds in people who do not have diabetes is usually done spontaneously, but in the case of diabetic patients, it is necessary to take care of this wound quickly and pay attention to it to avoid possible risks and problems. Peripheral neuropathy and lower limb ischemia caused by peripheral artery disease are considered to be the main causes of diabetic foot ulcer. Diabetic peripheral neuropathy is one of the accelerating factors in almost 90% of diabetic foot ulcers. This wound is usually formed under the ankle as a result of a break in the skin structure and gradually involves the lower layers of the skin. It is one of the health and economic-social problems. This complication is the main cause of disability and incurs high costs for diabetic patients. Also, infections at the time of diabetic foot ulcer is another problem of sufferers, that's why researchers are trying to use different scientific fields for the best result in improving the damage caused by diabetic foot ulcer. Curcumin, the biologically active substance of turmeric, has wide biological properties, such as anti-inflammatory, antioxidant, anti-diabetic and anti-cancer. Although due to the low solubility of this substance in water, the use of its medicinal and biological properties is limited, but despite its limited availability in the level of biological activity, curcumin has shown positive and noticeable effects in the human digestive system and the body's defense systems. It inhibits various types of diseases. The effective ability of inhibiting the stringing of various proteins in the condition of fibrillation and also inhibiting the production of reactive oxygen species by this molecule have been studied. Curcumin regulates their function by reacting directly or indirectly with more than 30 proteins. The low dissolution of curcumin in water causes its use to be limited. For this reason, many studies have been done to increase its dissolution. Curcumin encapsulation using some carrier molecules, such as bovine serum albumin, increases the effectiveness of curcumin. Betacasein is among the proteins that can create nanostructured micelles that act as a carrier for hydrophobic molecules. In a study, our research group used beta-caseins from camel milk to encapsulate curcumin, the results of which show an increase in the solubility of curcumin up to 2400 times, and

Keywords

Fibroblast cell,
Stress Oxidative,
Cellular toxicity,
Reactive Radical Species

Received: 05/08/2023

Published: 26/11/2023

to improve the performance of curcumin, today researchers have been able to create nanoparticle structures of this composition. In recent years, studies in the field of nanoparticles are being carried out at a high speed. The scope of nanomedicine includes pharmaceutical applications and nanoelectronic and nanomolecular biosensors. Nanomedicine can have a significant impact on life-threatening diseases. The diseases that can be affected by nanotechnology in the next few years include cancer, diseases of the cardiovascular system, lungs, blood, brain and nerves, diabetes, inflammatory/infectious diseases, and Parkinson's disease or Alzheimer's and orthopedic problems. In recent years, researchers have investigated and scientifically studied various factors such as particle size, nanoparticle morphology, material type selection, and nanomaterial synthesis and optimization techniques to provide an ideal nanosystem for targeted and more effective drug delivery. The diverse properties of nanoparticles have made it possible to provide understandable and reassuring solutions for therapeutic, diagnostic, preventive and biological challenges in the field of nanomedicine research. However, the challenges of the physiological system are very complex and the cells show various responses at the nanoscale level, so understanding the interaction of nanomaterials and biological compounds and nanobiotechnological studies are very necessary and important. Macromolecular synthesis and polymer diversity have found wide applications in therapeutic applications. Nanocomposites and nanoparticles are used in the fields of inducing the growth of cells and also in the delivery of drugs to the target tissue. It has also been shown in cell studies that damage to the cell activates a huge amount of oxidative stress, which has irreparable effects on the systems and organs of living organisms.

Methods: We designed superparamagnetic iron oxide nanoparticles loaded with curcumin (Fe_3O_4 magnetic- CurNPs) to achieve an enhanced co-therapeutic effect. The physicochemical properties of Fe_3O_4 magnetic- CurNPs were characterized using X-ray diffraction (XRD), and dynamic laser light scattering (DLS) and zeta potential. Further, to prove Fe_3O_4 magnetic-CurNPs results in superior therapeutic effects, and also, the cell viability, reactive oxygen species production (ROS), lipid peroxidation level, cytochrome c release, as well as histopathological changes in skin tissue.

Results: We showed that effective co-treatment with nanoparticle induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the diabetic foot ulcer. Nanoparticle, as well as cell viability low level reduced in the cells of treated group compared with control ($p < 0.05$). ROS generation, lipid peroxidation and cytochrome c release were ($p < 0.05$) increased in the cells of treated group compared with control group.

Conclusion: Taken together, Fe_3O_4 magnetic-CurNPs exhibits potent antioxidant activity in fibroblast isolated from skin diabetic foot ulcer. This approach can be extended to preclinical use in skin foot ulcer treatment in the future.

Conflicts of interest: None

Funding: Iran University of Medical Sciences

Cite this article as:

Ashtari B, Ghanbary F, Naserzadeh P, Javad Mosavi A. Investigating the Selective Toxicity of Iron-Loaded Curcumin Nanoparticles on Fibroblast Cells Isolated from the Skin of an Animal Model of Diabetic Foot Ulcer. Razi J Med Sci. 2023(26 Nov);30.131.

***This work is published under CC BY-NC-SA 4.0 licence.**

مقدمه

در جهان هر ۲۰ ثانیه یک بیمار پای خود را به دلیل دیابت از دست می‌دهد. با توجه به این نسبت مشخص شده است که هر سال در پای حدود ۳۰۰ هزار نفر بیمار، زخم پای دیابتی ایجاد می‌شود که ۲۰-۳۰ هزار نفر از این بیماران پای خود را از دست می‌دهند (۱). شیوع روزافزون بیماری دیابت در سراسر جهان سبب بروز مشکلات فردی و اجتماعی بی‌شماری گردیده است. بطوری که امروزه این بیماری به صورت اپیدمی در آمده است (۲). زخم پای دیابتی بیماری رایجی در میان بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ و ۲ می‌باشد که معمولاً با وارد شدن یک آسیب هرچند جزئی به پاها ایجاد می‌شود. درمان این زخم‌ها در افرادی که مبتلا به دیابت نیستند معمولاً خود به خودی انجام می‌شود اما در مورد بیماران دیابتی رسیدگی سریع و توجه به این زخم برای جلوگیری از خطرات و مشکلات احتمالی، امری ضروری می‌باشد (۲). زخم پای دیابتی یک آسیب دیدگی یا زخم باز است که در حدود ۱۵ درصد از بیماران دیابتی رخ می‌دهد و معمولاً در کف پا قرار می‌گیرد. زخم پای دیابتی یکی از پیچیدگی‌های رایج دیابت است که ناشی از تحلیل بافت پوست و پدیدار شدن لایه‌های زیرین است (۳). علیرغم اینکه جلوگیری از ایجاد زخم پای دیابتی امکان‌پذیر است، ۵ درصد از افرادی که دچار زخم پای دیابتی می‌شوند به دلیل عفونت یا سایر مشکلات مرتبط با زخم در بیمارستان بستری می‌شوند (۴). نوروپاتی محیطی و ایسکمی اندام تحتانی ناشی از بیماری شریان محیطی از عوامل اصلی زخم پای دیابتی محسوب می‌شوند (۴). نوروپاتی یکی از عوامل تسریع کننده در تقریباً ۹۰ درصد از زخم‌های پای دیابتی است. بالا بودن مزمن سطح گلوکز خون به اعصاب حسی، حرکتی و غیرارادی آسیب می‌زند. نوروپاتی دیابتی همچنین به سیستم ایمنی صدمه وارد کرده و توانایی بدن برای مبارزه با عفونت را تضعیف می‌کند (۵) و همچنین باعث کاهش و یا از بین رفتن عکس‌العمل، به ویژه در ناحیه قوزک پا می‌شود. این موضوع می‌تواند نحوه راه رفتن فرد را تغییر داده و منجر به ناهنجاری‌ها و دفرم‌گی‌هایی مانند انحراف شست، انگشت چکشی و پای شارکو شود که این موارد نقش مهمی در مسیر زخم پای دیابتی ایفا می‌کنند زیرا در

فشارهای غیر عادی در ناحیه کف پا که مستعد زخم شدن هستند تاثیر دارند در صورت عدم درمان به موقع، زخم عفونی شده و به استخوان گسترش می‌یابد و در نتیجه، باعث مشکلی جدی به نام استئومیلیت می‌شود که ممکن است به جراحی نیاز داشته باشد (۶). کورکومین ترکیب زرد رنگی است که از گیاهی با نام علمی *longa Curcuma* به دست می‌آید. این ماده از خانواده کورکومینوئیدها بوده و قرن‌ها است که در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد و تاکنون اثر سمیتی از آن گزارش نشده است و این ماده در محیط با pH فیزیولوژیک و همچنین اسیدی پایدار بوده ولی در محیط‌های بازی (با pH بیش از ۸) به سرعت تخریب می‌شود (۷). البته افزودن سرم جنین گاوی یا مواد آنتی‌اکسیدان، مانند اسید اسکوربیک و گلوکاتایون به محیط کشت سلولها، از تخریب آن جلوگیری می‌کند. خواص بیولوژیکی فراوانی برای این ماده گزارش شده است که این خواص ناشی از ساختار مولکولی کمپلکس‌هایی است که کورکومین می‌تواند تشکیل دهد و همچنین به علت توانایی آن برای نفوذ بر مولکول‌های دیگر است (۸). مطالعات انجام شده، بیانگر توان درمانی این مولکول در گستره وسیعی از بیماریها، مانند سرطان، بیماری‌های ریوی، بیماری‌های مرتبط به شبکه عصبی، بیماری‌های کلیوی، متابولیتی، بیماریهای قلبی و سایر بیماریهای التهابی می‌باشد و همچنین خواص شیمی درمانی و فعالیت‌های شیمیایی از دیگر خواص این ماده است (۹). مدارک و شواهد موجود نشان دهنده این است که کورکومین، به شدت ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان، التیام بخش زخم و دارای فعالیت آنتی‌میکروبی است (۱۰). مطالعات این ماده بیانگر عدم خاصیت سمیت ژنی و جهش‌زایی کورکومین بوده است. کورکومین در صنعت غذا به عنوان یک افزودنی رنگ دهنده به کار می‌رود و در صنایع لبنی، روغن و چربی‌ها، فرآورده‌های قنادی، فرآورده‌های غلات، گوشت و فرآورده‌های گوشتی، ادویه‌جات استفاده می‌شود. میزان کورکومین در این مواد غذایی بین ۵ تا ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بسته به نوع ماده غذایی می‌باشد. کورکومین در ماده غذایی خشک پایدار بوده و

نانوسیستم ایده‌آل برای دارورسانی هدفمند و موثرتر، پرداخته‌اند (۱۷). یکی از نانوذراتی که به وفور در طیف وسیعی از حوزه‌های بهداشت مورد استفاده قرار گرفته است نانوذرات مغناطیسی آهن می‌باشد. نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیس دارای کاربردهای بالقوه زیست پزشکی مانند هدفمند نمودن داروها به منظور افزایش جذب ناحیه‌ای، به عنوان ماده‌ای برای وضوح بالا در تکنیک تصویربرداری تشدید مغناطیسی، ترمیم بافت، هدف‌گیری سلول و بافت می‌باشند (۱۸). سوپرپارامغناطیس در بسیاری از کاربردهای زیست پزشکی مانند دارورسانی دارای کاربرد وسیعی است زیرا نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیس را می‌توان با اثرات میدان الکتریکی به محل مورد نظر و پس از حذف میدان مغناطیسی خارجی، نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیس می‌تواند در هدف باقی بماند و خواص متنوع نانوذرات امکان ارائه راه حل‌های قابل درک و اطمینان بخش برای چالش‌های درمانی، تشخیصی، پیش‌گیرانه و بیولوژیک در زمینه تحقیقات نانوپزشکی را به وجود آورده است (۱۹). با این حال، چالش‌های سیستم فیزیولوژیک بسیار پیچیده است و سلول‌ها پاسخ‌های متنوعی را در سطح نانومقیاس از خود نشان می‌دهند که درک برهمکنش نانومواد و ترکیبات بیولوژیکی و مطالعات نانوبیوتکنولوژیک بسیار ضروری و حائز اهمیت است. نانوذرات به دلیل تنوع در روش‌های مختلف عملگر نمودن، روش‌های متنوع سنتز ماکرومولکولی و تنوع پلیمری کاربردهای گسترده‌ای در برنامه‌های درمانی پیدا کرده‌اند (۲۰).

هدف از مطالعه ارزیابی میزان اثرگذاری نانوذرات کورکومین لود شده در آهن بر فیبروبلاستهای ایزوله از پوست آسیب دیده بر اثر زخم پای دیابتی در مسیرهای استرس اکسیداتیو فعال شده توسط میتوکندری می‌باشد.

روش کار

نحوه‌ی ایجاد مدل حیوانی: ۱۸ عدد حیوان رت نر ۱۰۰ تا ۱۵۰ گرمی از پاستور خریداری و به شکل تصادفی انتخاب شدند و پس از ایجاد مدل برای

همچنین به دلیل پایداری حرارتی آن، در مواد غذایی عمل‌آوری شده با حرارت، مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). انحلال کم کورکومین در آب، باعث محدودیت استفاده از آن می‌شود. به همین دلیل مطالعات زیادی برای افزایش انحلال آن انجام شده است. کپسوله کردن کورکومین با استفاده از برخی مولکول‌های حامل، مانند آلبومین سرم گاوی، باعث افزایش بهره‌وری از کورکومین می‌شود (۱۲). مطالعات بالینی فراوانی برای استفاده از کورکومین به عنوان عامل درمانی تحت بررسی است و برای استفاده بهینه از کورکومین و افزایش بازده آن در درمان بیماری‌ها پژوهش‌های مختلفی در دست اجرا است. سیستم‌های تحویل دارو بر پایه‌ی نانوذرات، برای استفاده‌ی عوامل آنگریز مانند کورکومین مناسب می‌باشند. کاربردهای کپسوله کردن کورکومین و استفاده از نانوذرات برای اثرات دقیق در بافت‌ها از مطالعاتی است که به طور قابل توجهی مورد بررسی است (۱۳). الکترواکسید شده داروهای غی-ر-اس-تروئیدال و ضد التهابی مانند ایندومتاسین، فنمیک اسید و دیکلوفن-اک-ب-ا-اس-تفاده از الکتروکربن عمل‌آوری شده با نانوذرات وترکیب کورکومین و نیکل در محلول‌های قلیایی، باعث افزایش کارایی داروهای مذکور شده است (۱۴). مطالعه در حوزه‌ی نانوذرات با سرعت بالایی در حال انجام است و محدوده‌ی نانوپزشکی شامل برنامه‌های کاربردی دارویی و حسگرهای زیستی نانو الکترونیک و به صورت نانو مولکولی می‌باشد (۱۵). نانو پزشکی میتواند تاثیر قابل توجهی بر بیماری‌های تهدید آمیز زندگی داشته باشد بیماری‌های که می‌توانند در چند سال آینده تحت تاثیر فناوری نانو قرار بگیرند شامل سرطان، بیماری‌های سیستم قلبی عروقی، ریه‌ها، خون، مغز و اعصاب، دیابت، بیماری‌های التهابی/عفونی، بیماری پارکینسون، یا آلزایمر و مشکلات ارتوپدی است (۱۶). در سال‌های اخیر، محققان به بررسی و مطالعه علمی فاکتورهای مختلفی همچون اندازه، مورفولوژی نانوذرات، انتخاب نوع ماده و تکنیک‌های سنتز و بهینه‌سازی نانومواد جهت ارائه

نحوه‌ی ساخت کورکومین لود شده در داخل نانوذرات آهن: کورکومین (سیگما آلدریچ) (۰/۱ گرم) در استون (سیگما آلدریچ) (۱۰ میلی لیتر) حل شد و به تدریج در آب مقطر آزاد شد. پس از آن، دمای محلول تا ۳۷ درجه سانتیگراد افزایش یافت تا کورکومین در نانوذرات محصور شود. حجم کورکومین یکپارچه با محاسبه جذب مایع رویی، با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-Vis در ۴۱۶ نانومتر، پس از جداسازی سوپرپارامغناطیس آهن ها توسط میدان مغناطیسی و سانتریفیوژ، تعیین شد. راندمان بارگذاری داروی نانوذرات ۷۵ درصد بود که با معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{Total curcumin} \times 100 / (\%) =$$

Total amount of curcumin-free curcumin
Loading efficiency

برای تعیین آزادسازی کورکومین، محلول نانوذرات حاوی کورکومین (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) به ظرف دیالیز منتقل شد و در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد، با هم زدن مداوم نانوذرات Fe₃O₄ Mag-curcumin در آب دیونیزه پراکنده گردیدند. حجم کورکومین آزاد شده در محیط با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از UV-Vis اندازه گیری شد و در صد رها سازی دارو با معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{Release } (\%) =$$

$$\text{released curcumin} / \text{total curcumin} \times 100$$

۵/۴ میلی گرم نانوذره کورکومین در ۱۰۰۰۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه پراکنده شدند و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه ی ساخته شدند و به صورت زیر پوستی با فاصله ی ۵ میلی متر در چهار محل تزریق (با چهار تزریق) نزدیک به محل زخم تزریق شدند. محل های تزریق دارای فواصل مساوی از یکدیگر بودند (۲۱).

شاخصه یابی نانوذرات کورکومین لود شده در داخل نانوذرات آهن: با استفاده از دستگاه X'Pert Pro MPD الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) در محدوده ی ۲θ از ۲۰ تا ۸۰ درجه با استفاده از تابش Cu Ka اندازه گیری شد. قطر هیدرودینامیکی و توزیع اندازه

جلوگیری از هرگونه رفتار تهاجمی به هم نوع در قفس های جداگانه نگهداری شدند و سیکل ۱۲ ساعته ی تاریکی و روشنایی اعمال گردید. برای ایجاد مدل دیابت نوع ۲ به مدت دو تا چهار هفته رژیم غذایی پرچرب (غذای روتین حیوان به همراه روغن زیتون) به حیوان خورانده شد، سپس تزریق داخل وریدی و یا داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (سیگما آلدریچ) با دوز ۳۰ تا ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش صورت گرفت و مزیت این روش در القای مدل دیابت در پایدار بودن هیپرگلیسمی است. در ادامه به منظور ایجاد زخم از روش کتامین (سیگما آلدریچ) ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم بصورت تزریق درون صفاقی برای بیهوشی حیوانات استفاده گردید سپس در گروه های حیوانی در ناحیه ی پشت حیوان به اندازه ی ۱ سانتی متر زخم ایجاد گردید. (۱۸). همچنین برای پیدا کردن دوز میانه ایجاد (lethal dose: LD₅₀) مواجهه درون رگی، به گروهی از حیوانات سالم به تعداد ۵ عدد دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم (دوز کشنده ی نانوذرات آهن) را تزریق نمودیم. و بر مبنای مرگ ۱۰٪ حیوانات نصف دوز که ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم می باشد را به عنوان دوز LD₅₀ در نظر گرفته و کلیه ی فرایندهای پژوهش بر مبنای LD₅₀ سنجش و گزارش داده شد (۱۵). مدت زمان بررسی تغییرات پس از تزریق ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم از نانوذرات آهن به ترتیب روز آغاز که روز صفر محسوب می گردد، روز ۷، روز ۱۴، روز ۲۱ می باشد گروه بندی: گروه کنترل مثبت، گروهی از حیوانات که به شکل تصادفی انتخاب شدند و بر روی آنها مدل دیابت وزخم ایجاد نگردد (Control Health: CH). گروه کنترل منفی، گروهی از حیوانات که به شکل تصادفی انتخاب شدند و بر روی آنها مدل دیابت وزخم ایجاد گردید و نانوذرات دریافت نکرده بودند (Control Diseases: CD). گروهی از حیوانات که به شکل تصادفی انتخاب شدند و بر روی آنها مدل دیابت وزخم ایجاد گردید و نانوذرات را هم دریافت نموده بودند (TN). تمامی فرایندهای ایجاد و نگهداری حیوانات طبق قوانین کار با حیوانات مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد اخلاق IR.IUMS.AEC.1402.083 می باشد.

اندازه‌گیری رادیکال‌های آزاد اکسیژن: برای اندازه‌گیری میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (Reactive oxygen species; ROS) در سلول‌ها، دی‌کلروفلورسین دی‌استات (سیگما آلدریچ) را به سلول‌های ایزوله شده افزودیم. ترکیب مذکور به محض عبور از غشای سلولی هیدرولیز شده و به ترکیبی به نام دی‌کلروفلورسین تبدیل می‌گردد. این ترکیب با ROS واکنش داده و به ترکیب به شدت فلورسنت دی‌کلروفلورسین تبدیل می‌شود که از سلول خارج می‌شود. شدت فلورسانس این ترکیب توسط یک اسپکتروفتومتر فلورسانس که طول موجهای Excitation و Emission آن به ترتیب ۵۰۰ نانومتر و ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (۲۳).

اندازه‌گیری لیپید پراکسیداسیون: میزان لیپید پراکسیداسیون براساس حضور مالون دی‌آلدید تولید شده طی واکنش آلدئیدهای بوجود آمده با تیوباربتوریک اسید صورت می‌گیرد. به این منظور به ۷۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی ۲۵۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (سیگما آلدریچ) ۷۰٪ اضافه می‌شود. سپس ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به مخلوط اضافه می‌گردد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه ۱ میلی‌لیتر تیوباربتوریک‌اسید (سیگما آلدریچ) ۰/۸٪ اضافه گردیده و مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبجوش قرار داده شد. پس از ۱۰ دقیقه در دور rpm ۱۳۵۰۰ سانتریفیوژنموده و در ادامه شدت جذب به وسیله الیزاریدردر ۵۰۰ نانومتر خوانش گردید (۲۴).

اندازه‌گیری میزان آزاد شدن سیتوکروم C: برای SDS-PAGE، نمونه‌های سوپر ناتانت را که طبق پروتکل ذکر شده بدست آوردیم را به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد گرم کرده و سپس به ژل SDS-۱۵٪ پلی‌آکریل‌امید برای الکتروفورز انتقال یافته و بعد به غشای نیتروسولوزی منتقل شد. غشاها به مدت یک ساعت با شیر بدون چربی ۵٪ در بافر فسفات در درجه حرارت اتاق انکوبه شده و سرانجام با آنتی‌بادی آنتی‌سیتوکروم C انکوبه گردید. سپس غشاها را شسته و پروتئین مورد نظر با آنتی‌بادی horseradish peroxidase شده

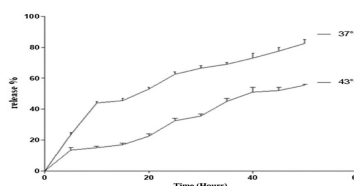
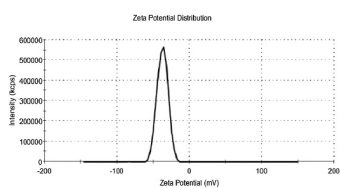
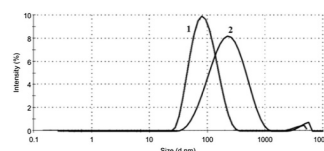
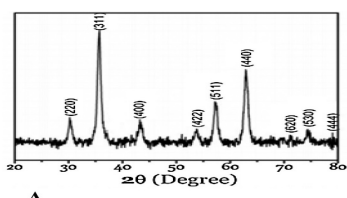
نانوذرات تغییر یافته در دماهای مختلف با پراکندگی نور لیزر (DLS Microtec ؛ ZC-2000) و پتانسیل زتا نانوذرات با (ZC-2000 Microtec) به دست آمد (۲۱).
اندازه‌گیری میزان زنده مانی سلولی: پس از ایجاد مدل و مواجهه‌ی حیوانات با دوز میانه‌ی موثر حیوانات در داخل محفظه‌ی قرار می‌گیرند بدن آنکه بدون آنکه دچار تنش رفتاری یا فیزیولوژیکی قرار بگیرد تحت مواجهه با کربن دی‌اکسید قرار گرفته و دچار مرگ راحت خواهند شد و سپس نمونه‌ی پوست را که شامل محل زخم می‌باشد را بر می‌داریم و در محیط کشت RPMI1640 (سیگما آلدریچ) قرار دادیم و آنها را هموژن نموده و سپس نمونه‌های هموژن شده را که در محیط کشت RPMI1640 قرار دادیم را به دستگاه سانتریفیوژ منتقل نمودیم در دمای ۴ درجه به مدت ۲۰ دقیقه در دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ نمودیم که دوفاز تشکیل شد که شامل فاز رسوب که محتوای سلول‌ها مورد مطالعه می‌باشد و مایع رویی (سوپر ناتانت) می‌باشد. سپس از آن مایع رویی را به ظرف دیگر منتقل نموده و رسوب فاز اول را کنار می‌گذاریم و سپس مجدد سوپر ناتانت را در دور rpm ۲۰۰۰ جی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ نمودیم و در آخر رسوبی که بدست آمد را پس از تایید نمونه‌های فیبروبلاستی توسط میکروسکوپ نوری سایر فرایندها را انجام خواهیم داد. در نهایت رسوب سلولی بدست آمده را در ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI1640 غوطه‌ور و پراکنده می‌نماییم که به این ترتیب سوسپانسیون سلولی بدست خواهد آمد. ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلول را در چاهکهای پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و تحت شرایط CO2 5٪ به مدت ۱ ساعت انکوبه نمودیم. ۵/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نمک تترازویوم بروماید (MTT) (سیگما آلدریچ) را به محتوای چاهک‌های میکروپلیت افزوده و پس از ۳ ساعت انکو باسیون ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از دی‌متیل سولفات (سیگما آلدریچ) را به چاهک‌های میکروپلیت افزودیم. جذب را در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط الیزاریدر خوانش و میزان زنده مانی یا فعالیت سوکسینات دهیدروژناز محاسبه شد (۲۲).

یافته‌ها

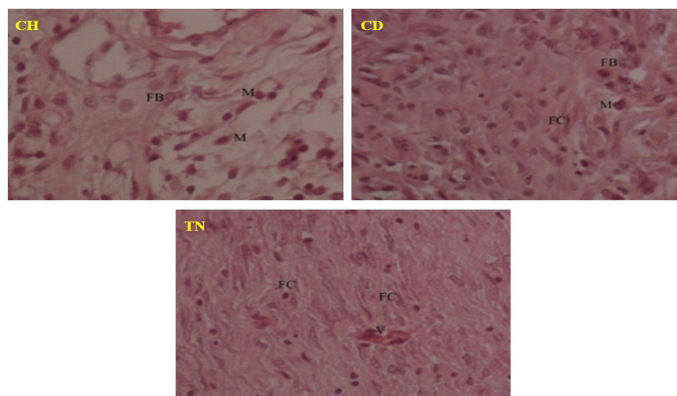
نتایج مربوط به شاخصه یابی نانوذرات در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد اندازه کریستالی نانوذرات حدود ۱۱ نانومتر است (A) و بار خالص بر روی سطح ذره بر توزیع یون و افزایش غلظت یون‌های نزدیک به سطح تأثیر می‌گذارد و در نتیجه دو لایه الکتروسیسته در ناحیه اتصال ذره تشکیل گردید، بنابراین پتانسیل باری که ایجاد شد در حدود $-37/5$ بود که نشان دهنده وجود گروه‌های کربوکسیل بالا در سطح ذرات مغناطیسی آهن است که توسط پتانسیل زتا بر حسب میلی ولت اندازه گیری و محاسبه گردید (B). در ادامه نتایج DLS نشان داد که میانگین قطر

(سیگما آلد ریچ) chemiluminescence (سیگما آلد ریچ) شناسایی شدند (۲۴).

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج برحسب میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است. همه‌ی آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار آماری Graphpad Prism 5 انجام شد. آزمایشات سه بار تکرار شد و میانگین برای مقایسه‌ی آماری استفاده شد. تست‌های آماری مورد استفاده شامل Two-Way ANOVA Test استفاده شد، و در تمامی موارد $P < 0/05$ به عنوان سطح قابل قبول برای تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد.



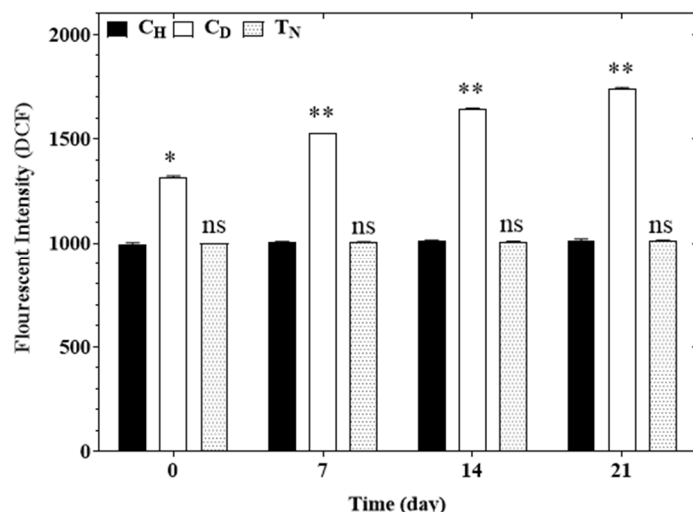
شکل ۱- شاخصه یابی نانوذرات A: تصویر XRD نانوذرات، B: زتاپتانسیل نانوذرات با پیک استاندارد نمک سدیم استات، C: تصویر DLS نانوذرات و D: نمودار آزادسازی کورکومین در دمای ۴۳ درجه‌ی سانتیگراد در ۶ ساعت.



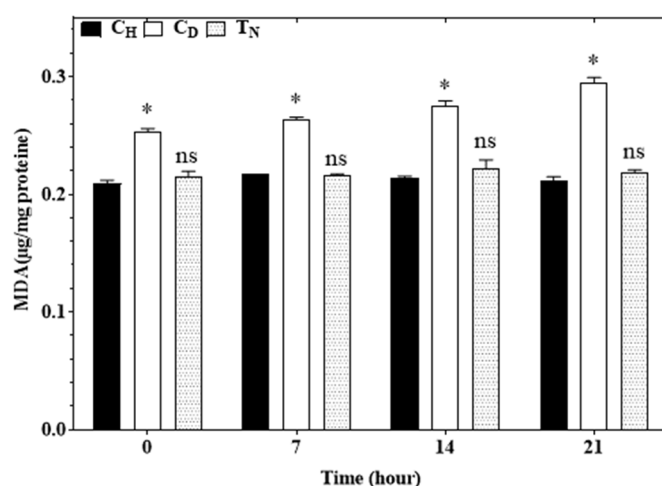
شکل ۲- پاتولوژی بافت پوست: نتایج پاتولوژی با بزرگنمایی $400\times$ در روز ۱۴ مواجه نشان داده شده اند و M, macrophage; FB, fibroblast; FC, fibrocyte، مخفف کلماتی هستند که بر روی تصاویر مورد استفاده قرار گرفته اند (کنترل سالم: CH؛ کنترل منفی: CD؛ گروه دارای مدل و دریافت کننده ی نانوذرات: TN)

شده دارو مناسب می‌کند (D).
تصاویر مربوط به پاتولوژی بافت پوست در شکل ۲ نشان داده شده است. این تصاویر نشان می‌دهد که بافت پوست از نظر مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست، فیبروسیت و ماکروفاژها در گروه CH تغییر نیافته‌اند اما در گروه CD تغییرات به دلیل ایجاد زخم قابل

هیدرودینامیکی نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده از ۱۰۵ به ۱۸۵ نانومتر با افزایش دما از ۲۵ به ۳۷ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته است (C). نکته قابل توجه این است که ناحیه تغییر دمای نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده در محدوده‌ی دمای بدن است که آنها را برای کاربردهای زیست‌پزشکی انسانی مانند تحویل کنترل



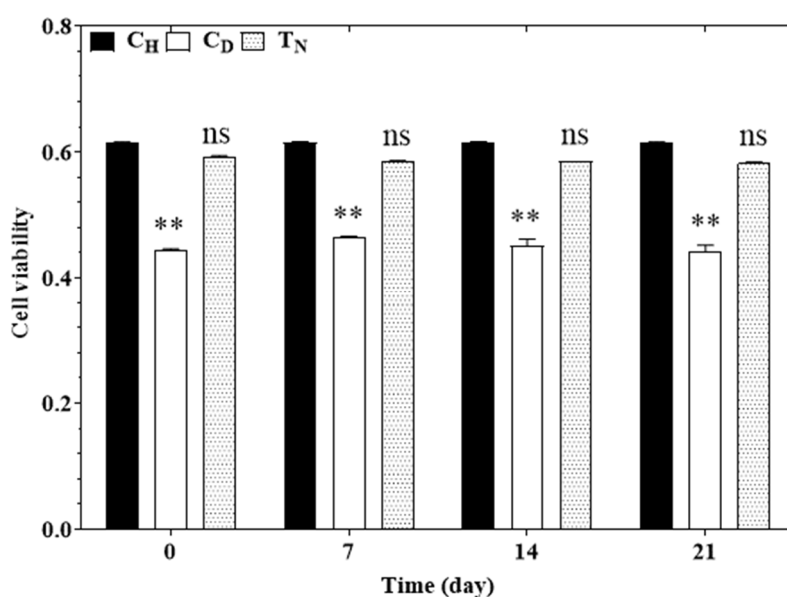
شکل ۳- بررسی میزان فعال سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن (کنترل سالم: CH; کنترل منفی: CD; گروه دارای مدل و دریافت کننده‌ی نانوذرات: TN)



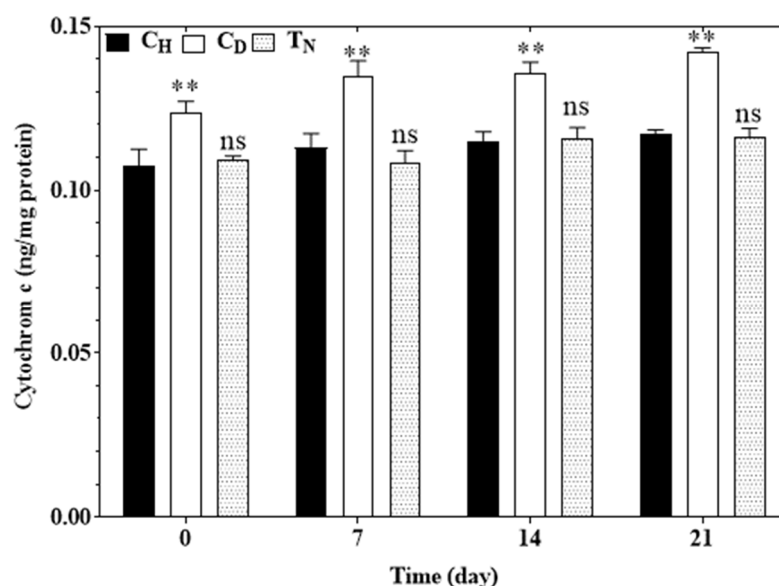
شکل ۴- بررسی میزان لیپید پراکسیداسیون (کنترل سالم: CH; کنترل منفی: CD; گروه دارای مدل و دریافت کننده‌ی نانوذرات: TN)

فیبروبلاست در گروه CD افزایش معناداری در میزان تولید گونه های فعال اکسیژن نسبت به گروه CH است ($P < 0.01$). گروه TN با نانوذرات نسبت به گروه کنترل مثبت هیچگونه اختلاف معناداری که نشان دهنده ی افزایش تولید رادیکال های ازاد اکسیژن هست نشان نداد. تغییرات مذکور در تمامی زمان های ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز به یک شکل تغییر نموده بودند.

مشاهده بود اما پس از مواجهی حیوانات با نانوذرات به (TN) منظور ترمیم زخم میزان تغییرات بسیار کم نسبت به گروه CH قابل مشاهده بود. برای بررسی دقیق مسیره های استرس اکسیداتیو، میزان تولید رادیکال فعال اکسیژن در فیبروبلاست گروه های تحت مطالعه اندازه گیری کردیم. همانطور که در شکل ۳-۳ نشان داده شده است سلول های



شکل ۵- بررسی تغییرات زنده مانی (کنترل سالم: CH; کنترل منفی: CD; گروه دارای مدل ودریافت کننده ی نانوذرات: TN)



شکل ۶- بررسی میزان آزاد شدن سیتوکروم C (کنترل سالم: CH; کنترل منفی: CD; گروه دارای مدل ودریافت کننده ی نانوذرات: TN)

تمامی زمان های ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز به یک شکل تغییر نموده بودند.

بحث

زخم پای دیابتی از جمله مشکلات بسیار جدی در حوزه‌ی خدمات پزشکی می باشد که هزینه های درمان و یا کاهش ابعاد زخم بسیار زیاد می باشد و یکی از دغدغه های مالی برای بیماران، شرکت های بیمه و دولت ها بوده است و تنها در آمریکای شمالی سالانه میلیاردها دلار هزینه را به سیستم بهداشت تحمیل می کند (۶). به همین دلایل محققین به دفعات مکانیسم های ترمیم پوست را به طور جامع مطالعه کرده اند، اما مطالعات بیشتری برای روشن شدن مکانیسم دقیق مورد نیاز است. ترمیم پوست پس از آسیب، به دلیل ساختار پیچیده و وجود انواع مختلف سلولی، به عنوان یک چالش بزرگ باقی مانده است (۷). علیرغم پیشرفت های جدید در محصولات مراقبت از زخم، مانند پانسمان زخم، پماد و محلول، نوار چسب، باند، دارو، گاز و اسفنج، و پاک کننده های زخم، درمان های قدیمی مبتنی بر ترکیبات مشتقات طبیعی، مانند عصاره های گیاهی، هنوز یک جایگزین مناسب هستند (۵). این درمان ها گزینه های جدیدی را برای مدیریت زخم ها پیشنهاد می کنند. محدودیت های درمان آسیب های پوستی موجود، محققین را ترغیب می کند تا یک فرمولاسیون بی ضرر، عملی و مقرون به صرفه را برای استفاده در ترمیم آسیب های پوستی بررسی کنند. یک درمان مؤثر به طور ایده آل بار باکتریایی را کاهش می دهد، کنترل التهابی ششیدی را ایجاد می کند (۴). از طرفی طی مطالعاتی بارها محققین نشان داده اند که کورکومین اثرات ضد باکتریایی، ضد التهابی و آنتی اکسیدانی از خود نشان داده است. مشخص شده است که کورکومین به طور معنی داری بر ترمیم زخم پوست تأثیر می گذارد. در مراحل مختلف فرآیند ترمیم پوست را تسریع می کند. همچنین در طی تحقیقات گزارش داده شد که کورکومین دارای ویژگی های بیوشیمیایی و توانایی باز سازی بافت و بسته شدن زخم را داشته و فرایند ترمیم را تسریع می نماید (۸). از سوی دیگر، در

زمانی که سلول دچار تغییر می گردد در ابتدا غشای سلول دچار آسیب می شود که منجر به پراکسیداسیون لیپیدی که حاصل تحت تاثیر قرار داده شدن اسیدهای چرب غیر اشباع می باشد که تحت تاثیر واکنش مذکور تمامیت غشای سلول تغییر می یابد. که سبب تولید رادیکال های آزاد اکسیژن می گردد. در گروه CD میزان پراکسیداسیون لیپیدی نسبت به گروه CH بسیار بالا بود ($P < 0/01$) اما در گروه TN نسبت به گروه کنترل مثبت معناداری نداشت. تغییرات مذکور در تمامی زمان های ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز به یک شکل تغییر نموده بودند.

میزان زنده مانده در فیبروبلاست های در گروه های تحت مطالعه با استفاده از رنگ MTT سنجیده شد. کاهش معناداری ($P < 0/01$) در زنده مانده سلول های به دست آمده از گروه حیوانات دارای زخم دیابتی دیده شد. اما در گروه دریافت کننده ی نانوذرات هیچگونه اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل مثبت وجود نداشت (شکل ۵). تغییرات مذکور در تمامی زمان های ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز به یک شکل تغییر نموده بودند.

برای بررسی دقیق تر م سیرهای استرس اکسیداتیو، میزان خروج سیتوکروم C از سلول اندازه گیری گردید. سیتوکروم سی یک پروتئین کوچک است که در غشای داخلی میتوکندری یافت می شود. این پروتئین، برخلاف سایر سیتوکروم ها، به شدت در آب محلول است و یکی از اجزای کلیدی زنجیره انتقال الکترون محسوب می شود که وظیفه اش حمل ۱ الکترون از کمپلکس شماره ۳ به کمپلکس شماره ۴ است. این پروتئین قابلیت اکسیداسیون و احیا را دارد. با باز شدن روزنه ی PT میتوکندری، سیتوکروم C می تواند از فضای بین غشایی میتوکندری خارج شود و آغازکننده ی فرآیند آپوپتوز باشد. نشان داده شده است، سطوح سیتوکروم سی در سیتوزول سلول های فیبروبلاست بعد از مواجهه یا نانوذرات اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل مثبت نداشت است. در حالی که در گروه هایی فقط با زخم دیابتی ازاد شدن سیتوکروم سی به فراکسیون سیتوزولی دارای اختلاف معناداری ($P < 0/01$) نسبت به گروه کنترل مثبت داشت. (شکل ۶) تغییرات مذکور در

گزارش دیگری آمده است که تجویز گاوآژ خوراکی ۴۰ میلی گرم کورکومین بر فلور باکتریایی و قدرت زخم را در موش‌های صحرایی دیابتی سالم و نوع یک افزایش می‌دهند اما پیشرفت‌ها در این زمینه و کاربرد پزشکی تاکنون به دلیل آب‌گریزی، ناپایداری، جذب ضعیف و حذف عمومی سریع آن از گردش خون و بدن، با مانع مواجه شده است (۸ و ۹). در سال‌های اخیر با گسترش دانش فیزیک و شیمی علم جدیدی با نام فناوری نانوذرات به جهان علمی معرفی گردید و کاربرد‌های آن در علم پزشکی به خوبی مشخص و مورد تایید نهاد‌های بین‌المللی ناظر بوده است (۱۵). در پژوهش پیش‌رو، ما نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیس بارگذاری شده با کورکومین را برای آسیب‌های پوستی طراحی کرده‌ایم. در پژوهش فوق‌الذکر مشخص گردید اندازه کریستالی نانوذرات حدود ۱۱ نانومتر است و همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، بار خالص بر روی سطح ذره بر توزیع یون و افزایش غلظت یون‌های نزدیک به سطح تأثیر می‌گذارد و در نتیجه دو لایه الکتریسیته در ناحیه اتصال ذره تشکیل می‌شود، بنابراین پتانسیل باری که ایجاد می‌شود در حدود ۳۷،۵- بوده است که نشان‌دهنده وجود گروه‌های کربوکسیل بالا در سطح ذرات مغناطیسی آهن می‌باشد که توسط پتانسیل زتا بر حسب میلی‌ولت اندازه‌گیری و محاسبه گردید (۲۱). در ادامه نتایج DLS نشان داد که میانگین قطر هیدرودینامیکی نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده از ۱۰۵ به ۱۸۵ نانومتر با افزایش دما از ۲۵ به ۳۷ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته است. نکته قابل توجه این است که ناحیه تغییر دمای نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده در محدوده دمایی بدن است که آنها را برای کاربردهای زیست‌پزشکی انسانی مانند تحویل کنترل شده دارو مناسب می‌کند (شکل ۱). در نتیجه، تغییر دما باعث باز شدن (حالت توسعه یافته) و بسته شدن (حالت پیچ خورده) لایه پلیمری که منجر به آزادسازی مداوم داروی لود شده می‌گردد (۲۱). خاصیت ارتجاعی پوست سبب کاهش آسیب دیدگی‌های احتمالی در افراد سالم می‌شود، به ویژه در مکان‌هایی که پوست روی مفاصل قرار دارد و حالت کشسانی

بالاتری نسبت به سایر نواحی از خود نشان می‌دهد، از طرفی یکی از مشکلات پزشکی در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی کاهش حالت گفته شده می‌باشد به همین دلیل محل زخم دیابتی با کمترین فشار باز می‌شود که در صورت عدم مراقبت به موقع و صحیح در ناحیه آسیب دیده آلودگی میکروبی گسترده‌ای ایجاد می‌گردد که در ادامه سبب کاهش سرعت بهبود زخم می‌گردد (۳). بر مبنای نتایج حاصل از ویژگی‌های نانوذره سنتز شده، ما فرض کردیم که نانوذرات طراحی شده در مدل تجربی زخم پوستی مزمن در حیوان آزمایشگاهی، ممکن است سرعت بسته شدن زخم را تسریع کند، قدرت ترمیم زخم را افزایش دهد و فلور باکتریایی را کاهش دهد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، در رابطه با بررسی پاتولوژی، نشان می‌دهد که سیستم ترمیم زخم‌های مزمن در گروه دریافت‌کننده نانوذرات حاوی کورکومین نسبت به سایر گروه‌های تحت مطالعه با سرعت بالایی اتفاق افتاده است (شکل ۲). یافته‌های پاتولوژی حاکی از آن بود که نانوذرات حاوی کورکومین توانستند آسیب بیان شده را به طرز معناداری کاهش دهند. تحقیقات علمی بسیار فراوان برای تقویت فارماکوکینتیک کورکومین، فراهمی زیستی سیستمیک و فعالیت بیولوژیکی از طریق کپسوله کردن یا بارگذاری کورکومین در نانوفرمولاسیون‌ها انجام گردیده است. در این زمینه، اخیراً ناصرزاده و همکاران. اثرات محافظت‌کنندگی کورکومین بر روی میتوکندری‌های ایزوله شده از سلول‌های نرونی بدست آمده از بافت مغز حیوانات تحت مدل اسکیزوفرنی گزارش دادند که درمان مؤثر با نانوذرات آهن که کورکومین در آن بارگذاری شده بود اختلال عملکرد میتوکندری را در مغز موش‌های مبتلا به اسکیزوفرنی تعدیل نموده است. ناصرزاده و همکاران به این نتیجه رسیدند که استفاده از کورکومین را می‌توان به استفاده پیش‌بالینی و بالینی گسترش داد (۲۱). محققین همچنین نشان دادند که نانوفیبری مخلوط با کورکومین/ژلاتین به طور مؤثر فراهمی زیستی کورکومین را برای ترمیم زخم افزایش داده است (۱۹). از طرفی دیگر در چندین مطالعه گزارش شده است که میتوکندری‌ها در پروسه‌های ترمیم زخم نقش

می‌گردد (۲۴). در سلول‌های فیبروبلاست ایزوله شده از بافت پوست حیوانات تحت مطالعه نشان داده شد که در گروه‌هایی که با نانوذرات مواجه یافته بودند میزان خروج سیتوکروم سی بسیار کم بوده است که به دلیل نقش تاثیر گذار آنتی‌اکسیدانی کورکومین لود شده در داخل نانوذرات بوده است (شکل ۶). طی مطالعات مختلفی که توسط سایر محققان انجام گردید ثابت شد که اگر طی هر آسیبی رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید گردد در حقیقت زنجیره‌ی انتقال الکترون در غشای میتوکندری آسیب می‌بیند که در نهایت فاکتورهای سیگنال مرگ سلولی به داخل سیتوزول سلولی آزاد می‌گردد که در حقیقت سرآغاز شروع آپوپتوز که نوعی از مرگ سلولی می‌گردد (۲۳)، داده‌های به دست آمده از مسیر استرس اکسیداتیو با استفاده از تکنیک‌های سلولی و مولکولی نشان می‌دهد که سمیت سلولی ناشی از جراحت زخم دیابتی در مدل حیوانات دیابتی سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کاهش فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز یا زنده‌مانی سلول و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و آزادسازی سیتوکروم سی است که منجر به فعال شدن مسیر استرس اکسیداتیو و آسیب به میتوکندری می‌گردد که در نهایت با سنتز نانوذرات کورکومین لود شده در آهن سبب کاهش میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن و در نهایت کاهش سرعت القای مسیر استرس اکسیداتیو در سلول‌های آسیب دیده گردید. در مطالعات جامعی که در حوزه‌های سلولی و مولکولی انجام گرفت گزارش داده شد که تحریک مسیر داخلی یا میتوکندریایی آپوپتوز با نفوذپذیر کردن غشای خارجی و انتقال سیتوکروم سی، فاکتور القاکننده آپوپتوز وی-۱ (Diablo/smac) پیش می‌رود که منجر به پیام‌رسانی سیتوزولی وابسته به کاسپاز یا مستقل از کاسپاز می‌گردد (۲۵). در پیام‌رسانی وابسته به کاسپاز سیتوکروم سی به همراه فاکتور فعال کننده پروتئاز آپوپتوزی (۱) Apaf-1 و پروکاسپاز ۹ کمپلکس آپوپتوزوم را تشکیل می‌دهند که فعال شدن کاسپاز ۳ و ۷ را القا می‌کند (۲۵). به علاوه، آنتاگونیست Diablo/smac اثر مهاري روی پروتئین‌های مهار کننده آپوپتوز دارد و فعالیت کاسپاز را افزایش

موثری دارند و به دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی کورکومین، مسیرهای استرس اکسیداتیو یا مدیاتوری میتوکندری محدود و یا متوقف گردیدند (۲۱). طی مطالعاتی نشان داده شده است که ایجاد زخم سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی (محتوای گلوکاتینونی) می‌گردد (۲۱). نتایج ما حاکی از آن است که نانوذرات طراحی شده پس از مواجه با محل زخم سبب کاهش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن گردیدند و زمانی که رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارای مقادیر کم باشند عملاً میزان اختلال در زنجیره‌ی انتقال الکترون در میتوکندری کمتر می‌شود (شکل ۳). از طرفی تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن سبب آسیب به غشای فسفولیپیدی می‌گردد و به دنبال فرایند مذکور پراکسیداسیون لیپیدی رخ می‌دهد (۲۴). یافته‌های سلولی و مولکولی ما حاکی از آن است که غشای فسفولیپیدی در جریان ایجاد زخم آسیب دیده بود که سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی گردید که در ادامه نانوذرات طراحی شده برای مطالعه‌ی مذکور پس از مواجه با محل زخم علاوه بر کاهش ابعاد زخم به نوعی از ادامه‌ی افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و لیپید پراکسیداسیون جلوگیری نمود (شکل ۴). همچنین در ادامه‌ی مطالعات توسط سایر محققین خاطر نشان گردید که افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب کاهش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری یا همان زنده‌مانی سلولی می‌گردد (۲۲). داده‌های حاصل از تحقیق پیش رو یافته‌های سایر محققان را تایید نمود و پس از مواجه‌ی زخم با نانوذرات طراحی شده و سنجش تست فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی، متوجه شدیم به دلیل نقش ترمیم‌کنندگی کورکومین سلول‌های تحت مواجهه دارای اختلاف معناداری کمتری در میزان زنده‌مانی سلولی نسبت به گروه کنترل مثبت بودند که نشان از بهبود زخم را داشت (شکل ۵). تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب آسیب به ساختار و عملکرد سلول‌ها می‌گردد که با ایجاد اختلال در زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی منجر به آزادسازی سیتوکروم سی و نیز کاهش میزان محتوای انرژی سلولی

می‌دهد که تولید گونه‌های فعال اکسیژن یک فرایند فیزیولوژیکی نرمال است که حضور آن برای ایمنی و ایجاد هماهنگی در مسیرهای انتقال پیام ضروری است. با این وجود، تولید بیش از حد و تصادفی گونه‌های فعال اکسیژن که طی آسیب دیدگی‌هایی مانند انواع زخم‌ها یا بیماری‌ها تولید می‌گردد به عنوان عوامل اولیه بیماری و پیری شناخته شده‌اند. تنظیم بیان ژن و نیز مکانیسم‌های سلولی در سطوح نرمال از طریق آنتی‌اکسیدانت‌ها یک روش درمانی امید بخش است. (۲۸)

نتیجه‌گیری

از مجموع داده‌هایی که در تحقیق پیش رو بدست آمد حیواناتی که دارای زخم پای دیابتی بودند زمانیکه در معرض مواجهه با نانوذرات سنتز شده قرار گرفتند در طی زمان‌های مورد مطالعه نشانه‌های معناداری از بهبود آسیب دیدگی را نشان دادند. سایر داده‌ها همچنین تایید نمودند که سرعت تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مسیر استرس اکسیداتیو کاهش یافته که سبب گردید تا سلول‌ها بتوانند ترمیم گردند که به دنبال فرایند مذکور سایر فاکتورهای مهم زنجیره‌ی انتقال الکترون مانند افزایش فعالیت سوکسینات دهیدروژناز، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و خروج سیتوکروم سی در شرایط نزدیک به نرمال (در مقایسه نسبت به گروه کنترل) قرار گرفتند که نشان از توانایی نانوذرات طراحی شده در مواجهه با مکانیسم آسیب رسان زخم بودند. نتایج تایید نمودند که شاید در آینده بتوان از نانوذرات مورد مطالعه در فازهای پیش بالینی استفاده و یا سایر کاربردهای پزشکی برای آنها تعریف نمود.

References

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37 Suppl 1:S81-90.
2. Chamberlain RC, Fleetwood K, Wild SH. Foot ulcer and risk of lower limb amputation or death in people with diabetes: a national population-based retrospective cohort study. *Diabetes Care* 2022;45:83-91.

میدهد پیام‌رسانی آپوپتوزی مستقل از کاسپاز را از طریق جابه‌جایی از سیتوزول به هسته القا میکند که موجب متراکم شدن کروماتین هسته‌ای و قطعه‌قطعه شدن DNA می‌گردد (۲۶). رهایی فاکتورهای آپوپتوزی میتوکندریایی از طریق منفذ انتقال دهنده صورت می‌گیرد و فاکتورهای آنتی آپوپتوزی و پروآپوپتوزی در نفوذپذیری غشای بیرونی میتوکندری نقش مهمی بر عهده دارند. همچنین در حضور محرک آپوپتوزی، tBid الیگومریزاسیون و تجمع Bak/Bax در غشای میتوکندری را پیش می‌برند که منجر به نفوذپذیری غشای میتوکندری می‌گردند (۲۷). آپوپتوز به عنوان روش معمولی از مرگ سلولی در فرایندهای زیستی و آسیب‌های مختلف است. یافته‌های کنونی در مورد تنظیم آپوپتوز علی‌رغم نواقص آن، گونه‌های فعال اکسیژن را به عنوان کنترل کننده پیام‌رسانی درون سلولی معرفی می‌کند (۲۶ و ۲۷). شواهد به دست آمده تاکید میکند که مکانیسم‌هایی مانند آزاد شدن سیتوکروم c از میتوکندری به سیتوزول، nitrosation-S و glutathiolation-S سیستم‌تئین جایگاه کاتالیتیکی کاسپازها که در آغاز و مهار آپوپتوز نقش دارند از مکانیسم‌های وابسته به ردوکس می‌باشند (۲۷). استرس اکسیداتیو موجب آسیب به سلول و القای جهش‌های ژنی می‌گردد که در اغلب موارد آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند نانوکورکومین با مسدود کردن جریان آپوپتوز منجر به ترمیم آسیب سلولی می‌شوند (۲۸). با این وجود، در شرایطی که تعادل ردوکس از بین رفته و سطح آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش یابد مشکلاتی گسترده در سطوح بافتی ایجاد می‌گردد. گونه‌های فعال اکسیدان - میژن در عملکرد - ای بیولوژیکی دارای تناقض هستند؛ از یک سو با کمک به سیستم ایمنی، شرکت در پیام‌رسانی سلولی و داشتن نقش ضروری در آپوپتوز - از بیمه‌سازی - اجباری - وگیری می‌کنند و از سوی دیگر می‌توانند به ماکرومولکول‌های مهم سلولی آسیب وارد کنند و ممکن است موجب سرطانزایی یا بیماری‌های قلبی عروقی گردند (۲۱). تحقیقات نشان

3. Zhang Y, Cramb S, McPhail SM. Diabetic Foot Working Group, Queensland Statewide Diabetes Clinical Network, Australia. Factors associated with healing of diabetes-related foot ulcers: observations from a large prospective real-world cohort. *Diabetes Care*. 2021;44:e143–e145.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prediabetes: Your Chance to Prevent Type 2 Diabetes. CDC; 2018.
5. Meloni M, Izzo V, Giurato L, Lázaro-Martínez JL, Uccioli L. Prevalence, clinical aspects and outcomes in a large cohort of persons with diabetic foot disease: comparison between neuropathic and ischemic ulcers. *J Clin Med*. 2020;9:1780.
6. van Netten JJ, Bus SA, Apelqvist J. International Working Group on the Diabetic Foot. Definitions and criteria for diabetic foot disease. *Diabetes Metab Res Rev*. 2020;36(Suppl. 1):e3268.
7. Mohanty C, Sahoo SK. Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. *Drug Discov Today*. 2017;22(10):1582-92.
8. Nethi, S. K., Das, S., Patra, C. R., & Mukherjee, S. Recent advances in inorganic nanomaterials for wound-healing applications. *Biomaterials Sci*. 2019;7(7):2652–2674.
9. Chopra H, Dey PS, Das D, Bhattacharya T, Shah M, Mubin S, et al. Curcumin nanoparticles as promising therapeutic agents for drug targets. *Molecules*. 2021;26(16):4998.
10. Moradi A, Kheirollahkhani Y, Fatahi P, Abdollahifar MA, Amini A, Naserzadeh P, et al. An improvement in acute wound healing in mice by the combined application of photobiomodulation and curcumin-loaded iron particles. *Lasers Med Sci*. 2019;34(4):779–791.
11. Ahmadi R, Salari S, Sharifi MD, Reihani H, Rostamiani MB, et al. Oral nano-curcumin formulation efficacy in the management of mild to moderate outpatient COVID-19: a randomized triple-blind placebo- controlled clinical trial. *Food Sci Nutr*. 2021;9(8):4068–4075.
12. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. *Mol Pharm*. 2007;4(6):807–818.
13. Chung H, Yoon SH, Cho JY, Yeo HK, Shin D, Park JY. Comparative pharmacokinetics of Theracurmin, a highly bioavailable curcumin, in healthy adult subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2021;59(10):684–690.
14. Jeffcoate WJ, Vileikyte L, Boyko EJ, Armstrong DG, Boulton AJM. Current challenges and opportunities in the prevention and management of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*. 2018;41(4):645-52.
15. Lin W, Wen W. Ultrasmall iron oxide nanoparticles cause significant toxicity by specifically inducing acute oxidative stress to multiple organs. *Part Fibre Toxicol*. 2022;19:24.
16. Singh N, Qutub, S, Khashab NM. Biocompatibility and biodegradability of metal organic frameworks for biomedical applications. *J Mater Chem. B* 2021;9:5925.
17. Rabiee N, Bagherzadeh M, Ghadiri AM, Fatahi Y, Aldhafer A, Makvandi P, Dinarvand R, et al. Turning Toxic Nanomaterials into a Safe and Bioactive Nanocarrier for Co-delivery of DOX/pCRISPR. *ACS Appl Bio Mater*. 2021;4:5336–5351.
18. Moradi A, Kheirollahkhani Y, Fatahi P, Abdollahifar MA, Amini A, Naserzadeh P, et al. An improvement in acute wound healing in mice by the combined application of photobiomodulation and curcumin-loaded iron particles. *Lasers Med Sci*. 2019;34(4):779-91.
19. Oyeboode O, Houreld NN, Abrahamse H. Photobiomodulation in diabetic wound healing: a review of red and nearinfrared wavelength applications. *Cell Biochem Funct*. 2021;39(5):596-612.
20. Naserzadeh P, Ashrafi Hafez A, Abdorahim M, Abdollahifar MA, Shabani R, Peirovi H, et al. Curcumin loading potentiates the neuroprotective efficacy of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles in cerebellum cells of schizophrenic rats. *Biomed Pharmacother*. 2018;108:1244-52.
21. Aboushoushah, S.; Alshammari, W.; Darwesh, R.; Elbaily, N. Toxicity and biodistribution assessment of curcumin-coated ironoxide nanoparticles: Multidose administration. *Life Sci*. 2021;277:119625.
22. E Afjeh-Dana, P Naserzadeh, H Nazari, F Mottaghtalab, R Shabani. Gold nanorods reinforced silk fibroin nanocomposite for peripheral nerve tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol*. 2019;129:1034-1039.
23. A Salimi, MR Neshat, P Naserzadeh, J Pourahmad. Mitochondrial permeability transition pore sealing agents and antioxidants protect oxidative stress and mitochondrial dysfunction induced by naproxen, diclofenac and celecoxib. *Drug Res*. 2019;69(11):598-605.
24. Gonzalez F, Pariselli F, Dupaigne P, Budihardjo I, Lutter M, Antonsson B, et al. tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak. *Cell Death Differ*. 2005;12(6):614-626.
25. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*. 2008;27(48):6245- 6251.
26. Mellini P, Valente S, Mai A. Sirtuin modulators: an updated patent review (2012-2014). *Expert Opin Ther Pat*. 2015;25(1):5-15.
27. Singh R, Mailloux RJ, Puiseux-Dao S, Appanna VD. Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol*. 2007;189(18):6665-6675.