



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

بهنazar اشتربی: 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 گند، انسنتیو گند درون ریز و متاپولیسیم، 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 زخمهای 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. کورکومین 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 کورکومین محققین توانسته‌اند که ساختارهای نانوذرات این ترکیب را ترکیب رساناند و یا در نانوذرات پرکاربرد لود بکنند. میزان کاربرد نانوذرات پس از سنتز اغلب توسط مطالعات سلوکی در مکانیسم استرس اکسیداتیو نشان داده می‌شود.

روش کار: ما نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیسی بارگذاری شده با کورکومین (Fe_3O_4 magnetic-CurNPs) را برای دستیابی به یک انر کمک طراحی کردیم. خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات مغناطیسی با استفاده از پراش پرتو ایکس (XRD) و پراکنندگی نور لیزر (DLS) پویا و پتانسیل زتا مشخص شد. علاوه بر این، برای اثبات میزان سمیت سلولی فاکتورهای سلولی مانند زنده مانی 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 مانی سلولی به طور قابل توجهی در سلول‌های گروه تحت مواجه نسبت به کنترل افزایش یافت ($P<0.05$). در نتیجه، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و لیپید پراکسیدا سیون و خروج سیتوکروم C از میتوکندری به فرآکسیون سیتوزولی در گروه تحت مواجه در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجهی ($p<0.05$) کاهش یافت. در مجموع، فعالیت Fe_3O_4 -CurNPs آنتی اکسیدان قوی در سلول‌های فیبروبلاست ایزوله شده از زخم پای دیابتی نشان داد.

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

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کنندۀ: دانشگاه علوم پزشکی ایران

شیوه استناد به این مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۱۴
تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۰۹/۰۵

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 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 Ghanbari: 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, Ghanbari 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

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 آنتی اکسیدان، مانند اسید اسکوربیک و گلوتاتیون 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، آنتی اکسیدان، التیام بخش زخم و دارای فعالیت آنتی میکروبی است^(۱۰). مطالعات این ماده بیانگر عدم خاصیت سمیت ژنی و جهش زایی 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

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 ۳۰-۲۰ هزار نفر از این بیماران پای خود را از دست می‌دهند^(۱). شیوع روزافرون 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 رایج در میان بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ و ۲ می‌باشد که عمولاً با وارد شدن یک آسیب هرچند جزئی به پاها ایجاد می‌شود. درمان این زخم‌ها در افرادی که مبتلا به دیابت نیستند عمولاً 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 عمولاً 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 تسريع 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 دفرم گی‌هایی مانند انحراف شست، انگشت چکشی و پای شارکو شود که این موارد نقش مهمی در مسیر زخم پای دیابتی ایفا می‌کنند زیرا در

نانوسیستم ایده‌آل برای دارورسانی هدفمند و موثرتر، پرداخته‌اند (۱۷). یکی از نانوذراتی که به وفور در طیف و سیعی از حوزه‌های بهداشت مورد استفاده قرار گرفته است نانوذرات مغناطیسی آهن می‌باشد. نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیس دارای کاربردهای بالقوه زیست پژوهشی مانند هدفمند نمودن داروها به منظور افزایش جذب ناچیه‌ای، به عنوان ماده‌ای برای وضعح بالا در تکنیک تسویه‌برداری تشدید مغناطیسی، ترمیم بافت، هدف گیری سلول و بافت می‌باشد (۱۸). سوپرپارامغناطیس در بسیاری از کاربردهای زیست پژوهشی 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 متعدد نانوذرات امکان ارائه راه حل‌های قابل درک و اطمینان بخش برای چالش‌های درمانی، تشنیعی صی، پیش‌گیرانه و بیولوژیک در زمینه تحقیقات نانوپژوهشی را به وجود آورده است (۱۹). با این حال، چالش‌های سیستم فیزیولوژیک بسیار پیچیده است و سلول‌ها پاسخ‌های متعددی 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 سنتر روش‌های مختلف عملکرنا نمودن، روش‌های متعدد سنتز ماکرومولکولی و تنوع پلیمری کاربردهای گستردۀای در برنامه‌های درمانی پیدا کرده‌اند (۲۰).

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

روش کار

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

همچنین به دلیل پایداری حرارتی آن، در مواد غذایی عمل آوری 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 بهره وری از کورکومین می‌شود (۱۲). مطالعات بسیاری 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 تحويل دارو برپایه این نانوذرات، برای استفاده ای عوامل آبگریز 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). الکترواکسیلید شدن داروهای غیر-راس-تروئیدال و ضد التهابی مانند ایندومتاسین، مفنامیک اسید و دیکلوفن-اک با استفاده از الکتروود کربن عملاً اوری شده با نانوذرات و ترکیب 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 نانو پژوهشی شامل برنامه‌های کاربردی داروئی و حسگرهای زیستی نانو الکترونیک و به صورت نانو مولکولی می‌باشد (۱۵). نانو پژوهشی 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/اعفونی، بیماری پارکینسون، یا آزالیم 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 بهینه سازی نانومواد جهت ارائه

نحوه‌ی ساخت کورکومین لود شده در داخل نانوذرات آهن

نانوذرات آهن: کورکومین (سیگما آلدیریج) ۰/۰۱ گرم) در استون (سیگما آلدیریج) (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 اسپکتروفوتومتر 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 (۱۱ میلی گرم بر میلی لیتر) به ظرف دیالیز منتقل شد و در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد، با هم زدن مدادوم نانوذرات Fe3O4 Mag-curcumin در آب دیونیزه پراکنده گردیدند. حجم کورکومین آزاد شده در محیط با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر با استفاده از UV-Vis اندازه گیری شد و در صدرها سازی دارو با معادله زیر محاسبه شد:

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

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

۵/۴ میلی گرم نانوذره کورکومین در ۱۰۰۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه پراکنده شدند و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ی ساخته شدند و به صورت زیر پوستی با فاصله‌ی ۵ میلی متر در چهار محل تزریق (با چهار تزریق) نزدیک به محل زخم تزریق شدند. محل‌های تزریق دارای فواصل مساوی از یکدیگر بودند (۲۱).

شاخصه‌ی یابی نانوذرات کورکومین لود شده در داخل نانوذرات آهن: با استفاده از دستگاه Xpert Pro MPD Pro الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) در محدوده ۲۰ 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 قفسه‌های جداگانه نگهداری شدند و سیکل ۱۲ ساعته‌ی 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 یا داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (سیگما آلدیریج) 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 کتابخانه (سیگما آلدیریج) با ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم بصورت تزریق درون صفاقی برای بیهوشی حیوانات استفاده گردید سپس در گروههای حیوانی در ناحیه‌ی پشت حیوان به اندازه‌ی ۱ سانتی متر زخم ایجاد گردید. (۱۸). همچنین برای پیدا کردن دوز میانه ایجاد LD₅₀ (lethal dose: LD₅₀) مواجه درون رگی، به گروهی از حیوانات سالم به تعداد ۵ عدد دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم (دوز کشنه‌ی نانوذرات آهن) را تزریق نمودیم. و بر مبنای مرگ ۱۰۰٪ حیوانات نصف دوز که ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم می باشد را به عنوان دوز LD₅₀ در نظر گرفته و کلیه‌ی 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 اغاز 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 و زخم ایجاد گردید (Control Health: CH). گروه کنترل منفی، گروهی از حیوانات که به شکل تصادفی انتخاب شدند و بر روی آنها مدل دیابت و زخم 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 و زخم ایجاد گردید و نانوذرات را هم در یافته 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.

اندازه گیری رادیکال های آزاد اکسیژن: برای اندازه گیری میزان تولید رادیکال های 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 فلورسانست دی‌کلروفلورسین تبدیل می‌شود که از سلول خارج می‌شود. شدت فلورسانس این ترکیب توسط یک اسپکتروفوتومتر فلورسانس که طول موجه‌ای Excitation و Emission آن به ترتیب ۵۰۰ و ۵۲۰ نانومتر اندازه گیری گردید (۲۳).

اندازه گیری لپید پراک سیدا سیون: میزان لپید پراکسیداسیون براساس حضور مالون دی‌آلدهید تولید شده طی واکنش آلدهیدهای بوجود آمده با تیوباربیتویریک اسید صورت می‌گیرد. به این منظور به ۷۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی ۲۵۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید (سیگما آلدریچ) ۰٪/۰٪ اضافه می‌شود. سپس ۱ میلی لیتر آب مقطر به محلوت اضافه می‌گردد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه ۱ میلی لیتر تیوباربیتویریک اسید (سیگما آلدریچ) ۰٪/۰٪ اضافه گردیده و محلوت حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبجوش rpm قرارداده شد. پس از ۱۰ دقیقه در دور ۱۳۵۰۰ سانتریفیوژ نموده و در ادامه شدت جذب به وسیله الایزریدر در ۵۰۰ نانومتر خوانش گردید (۲۴).

اندازه گیری میزان آزاد شدن سیتوکروم C: برای SDS-PAGE، نمونه های سوپر ناتانت را که طبق پروتکل ذکر شده بدست آوردیم را به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت ۹۵ درجه ی سانتیگراد گرم کرده و سپس به ژل ۱۵-۱۵ SDS-% پلی آکریل آمید برای الکتروفوروز انتقال یافته و بعد به غشای نیتروسلولزی منتقل شد. غشاها به مدت یک ساعت با شیر بدون چربی ۵٪ در بافر فسفات در درجه حرارت اتاق انکوبه شده و سرانجام با آنتی بادی آنتی سیتوکروم C انکوبه گردید. سپس غشاها را شسته و پروتئین مورد نظر با آنتی بادی horseradish peroxidase با شده.

نانوذرات تغییر یافته در دماهای مختلف با پراکندگی نور لیزر (DLS Microtec ؛ ZC-2000) و پتانسیل ز تا نانوذرات با (ZC-2000 Microtec) به دست آمد (۲۱).

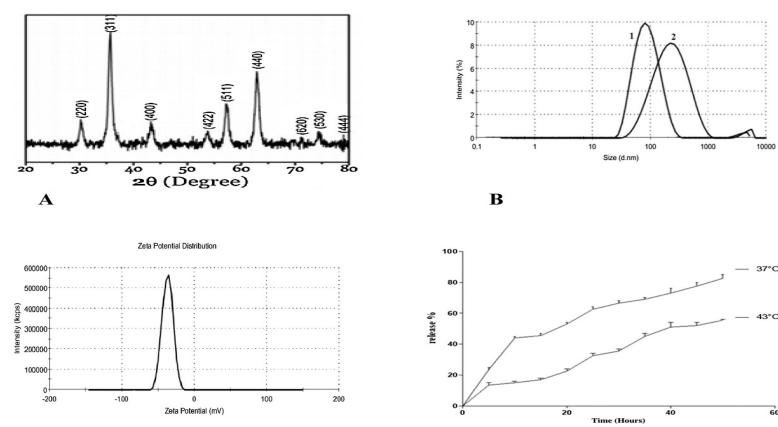
اندازه گیری میزان زنده مانی سلولی: پس از ایجاد مدل و مواجهی حیوانات با دوز میانه‌ی موثر حیوانات در داخل محفظه ای قرار می‌گیرند بدن آنکه بدون آنکه دچار تنفس رفتاری یا فیزیولوژیکی قرار بگیرد تحت مواجه با کربن دی‌اکسید قرار گرفته و دچار مرگ راحت خواهند شد و سپس نمونه‌ی پوست را که شامل محل زخم می‌باشد را 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 قراردادیم را به دستگاه سانتریفیوژ منتقل نمودیم در دمای ۴ درجه به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ نمی‌یعنی که دوفاز تشکیل شد که شامل فاز رسوب که محتوای سلول‌ها مورد مطالعه می‌باشد و مایع رویی (سوپر ناتانت) می‌باشد. و پس 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 ۲۰۰۰ جی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ نمودیم و در اخر رسوبی که بدست امده 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 غوطه ور و پراکنده می‌نماییم که به این ترتیب سوسپانسیون سلولی بدست خواهد آمد. ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی را در چاهکهای پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و تحت شرایط CO₂ ۵٪ به مدت ۱ ساعت انکوبه نمودیم. ۰٪/۰٪ میلی گرم بر میلی لیتر از نمک تترزازویوم بروماید (MTT) (سیگما آلدریچ) را به محتوای چاهک‌های میکروپلاست افزوده و پس از ۳ ساعت انکو باسیون ۵ میلی گرم بر میلی لیتر از دی متیل سولفات (سیگما آلدریچ) را به چاهکها میکروپلیت افزودیم. جذب را در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط الایزریدر خوانش و میزان زنده مانی یا فعالیت سوکسینات دهیدروژناز محاسبه شد (۲۲).

یافته‌ها

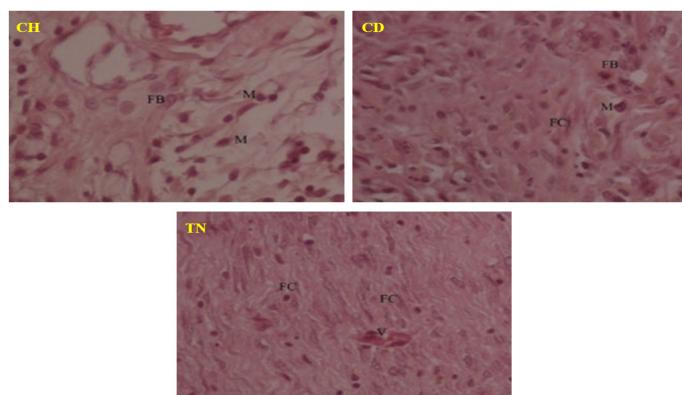
نتایج مربوط به شاخصه یابی نانوذرات در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد اندازه کریستالی نانوذرات حدود ۱۱ نانومتر است (A) و بار خالص بر روی سطح ذره بر توزیع یون و افزایش غلظت یون‌های نزدیک به سطح تأثیر می‌گذارد و در نتیجه دو لایه الکتریسیته در ناحیه اتصال ذره تشکیل گردید، بنابراین پتانسیل باری که ایجاد شد در حدود $-37/5$ بود که نشان دهنده وجود گروه‌های کربوکسیل بالا در سطح ذرات معناتیسی 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 آلدریچ) با chemiluminescence (سیگما آلدریچ) شناسایی شدند (۲۴).

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج بر حسب 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.



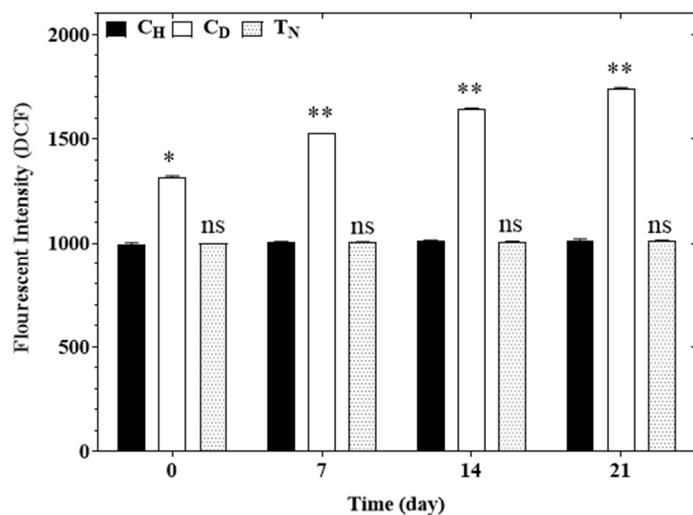
شکل ۱- شاخصه یابی نانوذرات A: تصویر XRD نانوذرات، B: زاتپتانسیل نانوذرات با پیک استاندار نمک سدیم است، C: تصویر DLS نانوذرات و D: نمودار آزادسازی کورکومین در دمای ۴۳ درجه‌ی سانتیگراد در ۶ ساعت.



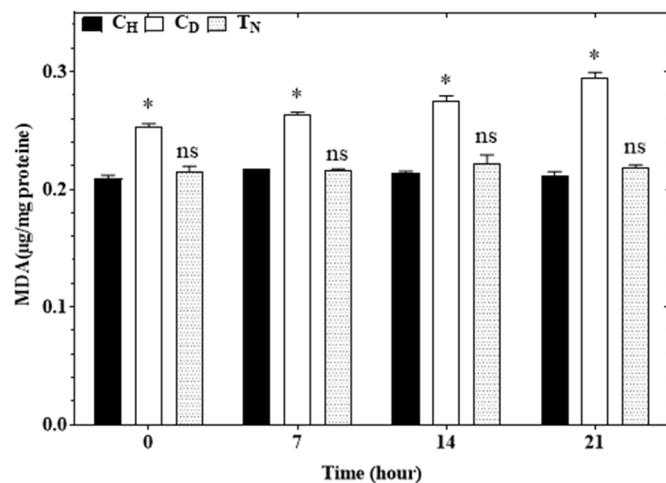
شکل ۲- پاتولوژی بافت پوست: نتایج پاتولوژی با بزرگنمایی $\times 400$ در روز ۱۴ مواجه نشان داده شده اند و M: macrophage; FB: fibroblast; FC: fibrocyte, CH: کنترل سالم؛ TN: گروه دارای مدل و دریافت کننده‌ی نانوذرات؛ CD: مخفف کلماتی هستند که بر روی تصاویر مورد استفاده قرار گرفته اند (کترل سالم: CH؛ کنترل منفی: 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 نیافته ذاست 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 سانتی گراد افزایش یافته است (C). نکته قابل توجه این است که ناحیه تغییر دمای نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده در محدوده دمای بدن است که آنها را برای کاربردهای زیست پزشکی از سانی مانند تحويل کنترل



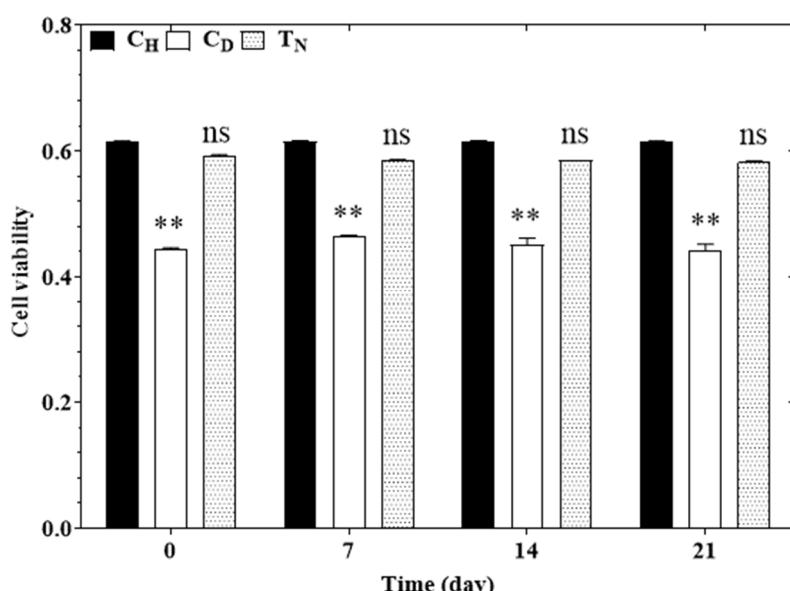
شکل ۳- بررسی میزان فعال سازی رادیکال های آزاد اکسیژن (کنترل سالم: CH؛ گروه دارای مدل و دریافت کننده نانوذرات: TN)



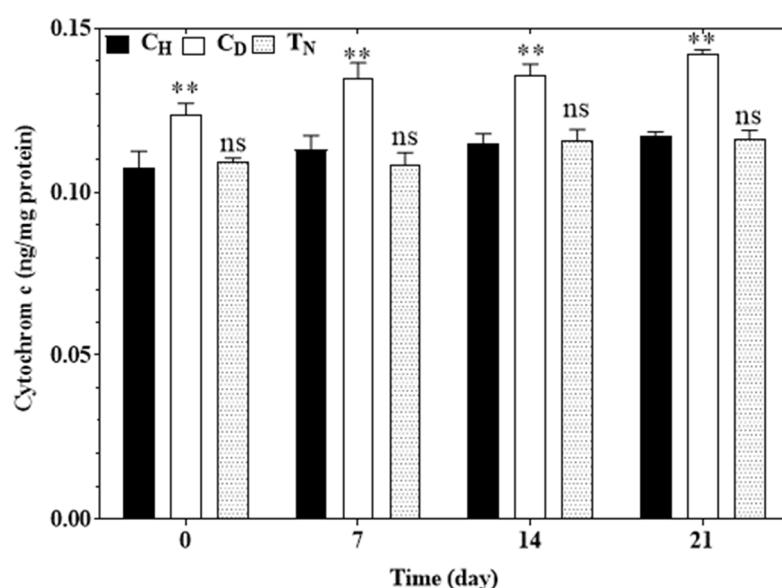
شکل ۴- بررسی میزان لیپید برآکسیداسیون (کنترل سالم: CH؛ گروه دارای مدل و دریافت کننده نانوذرات: TN)

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 ای 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 مسیرهای استرس اکسیداتیو، میزان تولید رادیکال فعال اکسیژن در فیبروبلاست گروههای 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 و دریافت کننده نانوذرات: TN)



شکل ۶- بررسی میزان آزاد شدن سیتوکروم C (کنترل سالم: CH؛ کنترل منفی: CD؛ گروه دارای مدل و دریافت کننده نانوذرات: TN)

تمامی زمان‌های ۱۴، ۷ و ۲۱ روز به یک شکل تغییر نموده بودند.

بحث

زخم پای دیابتی از جمله مشکلات بسیار جدی در حوزه خدمات پزشکی می‌باشد که هزینه‌های درمان و یا کاهش ابعاد زخم بسیار زیاد می‌باشد و یکی از دغدغه‌های مالی برای بیماران، شرکت‌های بیمه و دولتها بوده است و تنها در آمریکای شمالی سالانه میلیاردها دلار هزینه را به سیستم بهداشت تحمیل می‌کند (۶). به همین دلایل محققین به دفعات مکانیسم‌های ترمیم پوست را به طور جامع مطالعه کرده‌اند، اما مطالعات بیشتری برای روشن شدن مکانیسم دقیق مورد نیاز است. ترمیم پوست پس از آسیب، به دلیل ساختار پیچیده وجود انواع مختلف سلولی، به عنوان یک چالش بزرگ باقی مانده است (۷). علیرغم پیشرفت‌های جدید در محصولات مراقبت از زخم، مانند پانسمان زخم، پماد و محلول، نوار چسب، باند، دارو، گاز و اسفنج، و پاک کننده‌های زخم، درمان‌های قدیمی مبتنی بر ترکیبات مشتقات طبیعی، مانند عصاره‌های گیاهی، هنوز یک جایگزین مناسب هستند (۵). این درمان‌ها گزینه‌های جدیدی را برای مدیریت زخم‌ها پیشنهاد می‌کنند. محدودیت‌های درمان آسیب‌های پوستی موجود، محققین را ترغیب می‌کند تا یک فرمولاسیون بی‌ضرر، عملی و مقرون به صرفه را برای استفاده در ترمیم آسیب‌های پوستی بررسی کنند. یک درمان مؤثر به طور ایده آل بار باکتریایی را کاهش می‌دهد، کنترل التهابی شدیدی را ایجاد می‌کند (۴). از طرفی طی مطالعاتی بارها محققین نشان داده‌اند 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 می‌گذارد. در مراحل مختلف فرآیند ترمیم پوست را تسریع می‌کند. همچنین در طی تحقیقات گزارش داده شد که کورکومین دارای ویژگی‌های بیو شیمیایی و توانایی باز سازی بافت و بسته شدن زخم را داشته و فرایند ترمیم را تسریع می‌نماید (۸). از سوی دیگر، در

زمانی که سلول دچار تغییر می‌گردد در ابتدا غشای سلول دچار آسیب می‌شود که منجر به پراکسیداسیون لیپیدی که حاصل تحت تاثیرقرار داده شدن اسیدهای چرب غیر اشباع می‌باشد که تحت تاثیر واکنش مذکور تمامیت غشای سلول تغییر می‌یابد. که سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌گردد. در گروه CD میزان پراکسیدا سیون لیپیدی نسبت به گروه CH بسیار بالا بود ($P < 0.01$) اما در گروه TN نسبت به گروه کنترل مشبّت معناداری نداشت. تغییرات مذکور در تمامی زمان‌های ۷، ۱۴ و ۲۱ روز به یک شکل تغییر نموده بودند.

میزان زنده مانی در فیبروبلاست‌های در گروههای تحت مطالعه با استفاده از رنگ MTT سنجیده شد. کاهش معناداری ($P < 0.01$) در زنده مانی سلول‌های به دست آمده از گروه حیوانات دارای زخم دیابتی دیده شد. اما در گروه دریافت کننده‌ی نانوذرات هیچگونه اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل مشبّت وجود نداشت (شکل ۵). تغییرات مذکور در تمامی زمان‌های ۷، ۱۴ و ۲۱ روز به یک شکل تغییر نموده بودند.

برای بررسی دقیق‌تر مسیرهای استروس اکسیداتیو، میزان خروج سیتوکروم C از سلول اندازه گیری گردید. سیتوکروم سی یک پروتئین کوچک است که در غشای داخلی میتوکندری یافت می‌شود. این پروتئین، برخلاف سایر سیتوکروم‌ها، به شدت در آب محلول است و یکی از اجزای کلیدی زنجیره انتقال الکترون محسوب می‌شود که وظیفه‌اش حمل ۱ الکترون از کمپلکس شماره ۳ به کمپلکس شماره ۴ است. این پروتئین قابلیت اکسیدا سیون و احیا را دارد. باز شدن روزنی‌ی PT میتوکندری، سیتوکروم C می‌تواند از فضای بین غشایی میتوکندری خارج شود و آغاز کننده‌ی فرآیند آپوپتوز باشد. نشان داده شده است، سطوح سیتوکروم سی در سیتوزول سلول‌های فیبروبلاست بعد از مواجهه با نانوذرات اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل مشبّت نداشته است. در حالی که در گروههایی فقط با زخم دیابتی از افزایش سیتوکروم سی به فراکسیون سیتوزولی دارای اختلاف معناداری ($P < 0.01$) نسبت به گروه کنترل مشبّت داشت. (شکل ۶) تغییرات مذکور در

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 گستردگی ایجاد می‌گردد که در ادامه سبب کاهش سرعت بهبود زخم می‌گردد (۳). بر مبنای نتایج حاصل از ویژگی‌های نانوذرات سنتر شده، ما فرض کردیم که نانوذرات طراحی شده در مدل تجربی زخم پوستی مزمن در حیوان آزمایش‌گاهی، ممکن است سرعت بسته شدن زخم را تسريع 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 در یافت کننده‌ی 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 توازن‌ستنده‌ی آسیب بیان شده را به طرز معناداری کاهش دهنده. 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 محافظت کننده‌ی 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 موثر 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

گزارش دیگری آمده است که تجویز گاواز خوراکی ۴۰ میلی گرم کورکومین بر فلور باکتریایی و قدرت زخم را در مosh‌های صحرایی دیابتی سالم و نوع یک افزایش می‌دهند اما پیشرفت‌ها در این زمینه و کاربرد پزشکی تاکنون به دلیل آب گریزی، ناپایداری، جذب ضعیف و حذف عمومی سریع آن از گردش خون و بدن، با منع 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 کاربرد های آن در علم پزشکی به خوبی مشخص و مورد تایید نهادهای بین المللی ناظر بوده است (۱۵). در پژوهش پیش رو، ما نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیس بارگذاری شده با کورکومین را برای آسیب‌های پوستی طراحی کردیم. در پژوهش فوق الذکر 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 دلایه الکتروسیته در ناحیه اتصال ذره تشکیل می‌شود، بنابراین پتانسیل باری که ایجاد می‌شود در حدود ۳۷,۵- بوده است که نشان دهنده وجود گروه‌های کربوکسیل بالا در سطح ذرات مغناطیسی آهن می‌باشد که توسط پتانسیل زتا بر حسب میلی ولت اندازه گیری 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 سانتی گراد افزایش یافته است. نکته قابل توجه این است که ناحیه تغییر دمای نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده در محدوده دمای بدن است که آنها را برای کاربردهای زیست پزشکی انسانی مانند تحويل کنترل شده دارو مناسب می‌کند (شکل ۱). در نتیجه، تغییر دما باعث باز شدن (حالت توسعه یافته) و بسته شدن (حالت پیچ خورده) لایه‌ی 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

می‌گردد (۲۴). در سلول‌های فیبروبلاست ایزوله شده از بافت پوست حیوانات تحت مطالعه نشان داده شد که در گروه هایی که با نانوذرات مواجه یافته بودند میزان خروج سیتوکروم سی بسیار کم بوده است که به دلیل نقش تاثیر گذار آنتی اکسیدانی 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 غشاء 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 انزیم سوکسینات دهیدروژناز یا زنده مانی سلول و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و آزادسازی سیتوکروم سی است که منجر به فعل شدن مسیر استرس اکسیداتیو و آسیب به میتوکندری می‌گردد که در نهایت با سنتز نانوذرات کورکومین لود شده در آهن سبب کاهش سرعت رادیکال‌های فعل 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 نفوذ پذیر کردن غشای خارجی و انتقال سیتوکروم ۵، فاکتور القاکننده آپوپتوز ویـ۱ـ Diablo/smـac پیش می‌رود که منجر به پیام رسانی سیتوزولی وابسته به کاسپاز یا مستقل از کاسپاز می‌گردد (۲۵). در پیام رسانی وابسته به کاسپاز سیتوکروم ۵ به همراه فاکتور فعل کننده پروتئاز آپوپتوزی (۱) Apaf-۱ و پروکاسپاز ۹ کمپلکس آپوپتوزوم را تشکیل میدهد که فعل شدن کاسپاز ۳ و ۷ را القا می‌کند (۲۵). به علاوه، آنتاگونیست Diablo/smـac اثر مهاری روی پروتئینهای مهار کننده آپوپتوز دارد و فعالیت کاسپازرا افزایش

موثری دارد و به دلیل ویژگی‌های آنتی اکسیدانی کورکومین، مسیرهای استرس اکسیداتیو با مدیاتوری میتوکندری محدود و یا متوقف گردد (۲۱). طی مطالعاتی نشان داده شده است که ایجاد زخم سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کاهش دفاع آنتی اکسیدانی (محتوای گلوتاچونی) 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 با شند عمل میزان اختلال در زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری کمتر می‌شود (شکل ۳). از طرفی تولید رادیکال‌های فعل 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 ادامه 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 زنده مانی سلولی می‌گردد (۲۲). داده‌های حاصل از تحقیق پیش رو یافته‌های سایر محققان را تایید نمود و پس از مواجهه‌ی زخم با نانوذرات طراحی شده و سنجش تست فعالیت سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی، متوجه شدیم به دلیل نقش ترمیم کننده‌گی کورکومین سلول‌های تحت مواجهه دارای اختلاف معناداری کمتری در میزان زنده مانی 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 دیدگی هایی مانند انواع زخم‌ها یا بیماری‌ها تولید می‌گردد به عنوان عوامل اولیه بیماری و پیروی شناخته شده‌اند. تنظیم بیان ژن و نیز مکانیسم‌های سلولی در سطوح نرمال از طریق آنتی اکسیدانت‌ها یک روش درمانی امید بخش است. (۲۸)

نتیجه گیری

از مجموع داده‌هایی که در تحقیق پیش رو بدست آمد حیواناتی که دارای زخم پای دیابتی بودند زمانیکه در معرض مواجه با نانوذرات سنتر 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 درم سیر استرس اکسیداتیو کاهش یافته که سبب گردید تا سلول‌ها بتوانند ترمیم گردد 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 مواجه با مکانیسم آسیب رسان از نانوذرات مورد مطالعه در فازهای پیش بالینی استفاده و یا سایر کاربردهای پزشکی برای آنها تعریف نمود.

References

- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37 Suppl 1:S81-90.
- 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. پیام رسانی آپوپتووزی مستقل از کاسپاز را از طریق جابه جایی از سیتوزول به هسته القا می‌کند که موجب متراکم شدن کروماتین هسته‌ای و قطعه قطعه شدن DNA می‌گردد (۲۶). رهایی فاکتورهای آپوپتووزی میتوکندریایی از طریق منفذ انتقال دهنده صورت می‌گیرد و فاکتورهای آنتی آپوپتووزی و پروآپوپتووزی در نفوذپذیری غشاء بیرونی میتوکندری نقش مهمی بر عهده دارد. همچنین در حضور محرک آپوپتووزی، tBid الیگومریزاسیون و تجممع Bak/Bax در غشای میتوکندری را پیش می‌برند که منجر به نفوذپذیری غشاء میتوکندری می‌گردد (۲۷). آپوپتووز به عنوان روش معمولی از مرگ سلولی در فرایندهای زیستی و آسیبهای مختلف است. یافته‌های کنونی در مورد تنظیم آپوپتووز علیرغم نوافص آن، گونه‌های فعال اکسیژن را به عنوان کنترل کننده پیام رسانی درون سلولی معرفی می‌کند (۲۶ و ۲۷). شواهد به دست آمده تاکید می‌کند که مکانیسم‌هایی مانند آزاد شدن nitrosation- سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوزول، glutathiolation-S و S کاتالیتیک کاسپازها که در آغاز و مهار آپوپتووز نقش دارند از مکانیسم‌های واپسخانه به روکوس می‌باشند (۲۷). استرس اکسیداتیو موجب آسیب به سلول و القای جهش‌های ژنی می‌گردد که در اغلب موارد آنتی اکسیدان‌هایی مانند نانوکورکومین با مسدود کردن جریان آپوپتووز منجر به ترمیم آسیب سلولی می‌شوند (۲۸). با این وجود، در شرایطی که تعادل روکوس از بین رفتہ و سطح آنتی اکسیدان‌ها کاهش یابد مشکلاتی گستره در سطوح بافتی ایجاد می‌گردد. گونه‌های فعال اکسیدیشن در عملکرده سای بیولوژیکی دارای تنافق هستند؛ از یک سو با کمک به سیستم ایمنی، شرکت در پیام‌رانی سلولی و داشتن نقش ضروری در آپوپتووز از بیم‌ساری‌ها گل‌وگیری می‌کند و از سوی دیگر می‌توانند به ماکرومولکول‌های مهم سلولی آسیب وارد کنند و ممکن است موجب سرطان‌زاوی یا بیماری‌های قلبی عروقی گردد (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, Kheirullahkhani 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,¹ 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, Aldaher 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, Kheirullahkhani 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. Oyebode O, Hourelid 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 Mottaghitalab, 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. Gonzalvez 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.