

ساخت و مشخصه‌یابی نانو حامل‌های لیپوزومی حاوی اسانس زنیان، به منظور مقابله با انگل تریکوموناس واژینالیس

فرزانه میرزایی^۱ (Ph.D)، محمد مجدی‌زاده^۲ (M.Sc)، علی فتاحی بافقی^۱ (Ph.D)، راحله احسانی^۳ (M.Sc)، بی‌بی فاطمه حقیرالسادات^{۴*} (Ph.D)

۱- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۲- گروه زیست فناوری، شرکت ریز زیست فناوریان فردانگر، پارک علم و فناوری یزد، یزد، ایران

۳- پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۴- مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۲

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸ Fhaghirosadat@gmail.com

چکیده

هدف: سالیانه بخش زیادی از جمعیت دنیا به عفونت تریکومونیازیس، مبتلا می‌شوند. و از سوی دیگر داروهای رایج به‌منظور درمان این بیماری عوارض جانبی زیادی را ایجاد می‌کند. هدف از پژوهش حاضر ساخت سامانه‌ی لیپوزومی حاوی اسانس زنیان و بررسی ویژگی‌های فیزیوشیمیایی آن، جهت مقابله با عفونت تریکومونیازیس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: وزیکول‌های لیپوزومی با استفاده از فسفاتیدیل کلین (۷۰٪) و کلسترول (۳۰٪) و طی روش فیلم نازک تهیه شدند و اسانس زنیان درون لیپوزوم بارگذاری شد و میزان بارگذاری اسانس محاسبه شد. در ادامه اندازه، بار سطحی و مورفولوژی ذرات این سامانه با استفاده از دستگاه‌های زتا سایزر و میکروسکوپ نیروی اتمی و نحوه ره‌ایش اسانس در دمای ۳۵°C و pH=۶ طی ۲۴ ساعت بررسی گردید.

یافته‌ها: وزیکول‌های لیپوزومی حاوی اسانس زنیان با اندازه ۱۱۰/۱ nm، ۴۰/۱۲±۲/۷۱٪ میزان بارگذاری اسانس، پتانسیل زتا -۹ میلی‌ولت می‌باشد. سامانه لیپوزومی دارای ره‌ایش کنترل شده بوده و طی ۲۴ ساعت همه اسانس را آزاد نموده است. میکروسکوپ نیروی اتمی نیز تشکیل لیپوزوم و مورفولوژی مناسب ذرات را تایید نموده است.

نتیجه‌گیری: در پژوهش حاضر سامانه لیپوزومی حاوی اسانس زنیان، از درصد بارگذاری نسبتاً بالایی برخوردار است و بررسی شارژ سطحی، آنیونی بودن حامل را تایید می‌کند. بدین ترتیب با توجه به ره‌ایش آهسته و کامل اسانس طی ۲۴ ساعت، این نانو حامل لیپوزومی می‌تواند حاملی مناسب برای رسانش اسانس به انگل تریکومونیازیس باشد.

واژه‌های کلیدی: لیپوزوم، نانو ساختارها، تریکوموناس واژینالیس، زنیان، گیاهان دارویی

مقدمه

انسان‌ها از دیرباز فهمیده بودند که گیاهان دارای ترکیباتی هستند که می‌توان از آن‌ها به منظور درمان بیماری‌ها استفاده نمود. به گونه‌ای که یافته‌های باستان‌شناسی نشان می‌دهد که قدمت استفاده از گیاهان دارویی به بیش از ۲۶۰۰ سال پیش از میلاد بر می‌گردد [۱]. امروزه نیز از یک‌سو با آشکار شدن عوارض جانبی گسترده داروهای شیمیایی و از سوی دیگر با توجه به عوارض جانبی پایین ترکیبات گیاهی، طبیعی بودن آن‌ها و دسترسی آسان به منابع گیاهی، رجوع جوامع بشری به گیاهان دارویی و ترکیبات استخراج شده از آن‌ها به‌منظور برطرف نمودن احتیاجات دارویی، بیش از پیش افزایش یافته است [۲]. یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی در طب سنتی،

زنیان می‌باشد. این گیاه علفی، یک‌ساله، بدون کرک و معطر که بخش دارویی آن را بذر تشکیل می‌دهد، با نام علمی *Trachyspermum ammi* متعلق به خانواده *Apiaceae* بوده و دارای گل‌های همافرودیت با گل‌برگ‌های سفید است که ارتفاع ساقه‌ی آن بین ۳۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر می‌باشد. گستره‌ی رویش این گیاه مربوط به کشورهای هند، مصر، افغانستان، پاکستان و ایران می‌باشد. خراسان، اصفهان، یزد، سیستان و بلوچستان، خوزستان، فارس و کرمان از جمله استان‌هایی هستند که رویشگاه این گیاه ارزشمند دارویی هستند. در طب سنتی از گیاه زنیان و ترکیبات آن به‌منظور کاهنده کلسترول، آرام‌بخش، موثر بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ضد نفخ، ضد اسپاسم، ضد ترشی معده رفع ناراحتی‌های کبد، کلیه و گلو و

به صورت دولایه آرایش پیدا نمایند که در فضای درونی آن آب محصور گردد، در نتیجه این کره‌ی دولایه توانایی حمل داروهای آب‌دوست و آب‌گریز را دارد. زیست سازگار بودن، رهایش کنترل شده دارو، زیست تخریب‌پذیر بودن، حساسیت پایین دستگاه ایمنی به لیپوزوم‌ها از مهم‌ترین شاخصه‌های لیپوزوم‌ها به عنوان حامل‌های دارویی است. در کنار تمامی مزایای یاد شده، استفاده از لیپوزوم با مشکلاتی هم‌چون، نیمه عمر پایین، پایداری کم و هزینه بالای تولید همراه است [۱۴-۱۷].

با توجه گسترش عفونت تریکومونیاژیس، اثرات ضد انگلی اسانس زنیان و مزایای لیپوزوم به عنوان حامل ترکیبات دارویی، هدف از پژوهش حاضر، ساخت نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس زنیان و بررسی فیزیکوشیمیایی این نانوحامل‌های حاوی اسانس از منظر درصد درون‌گیری اسانس، نحوه‌ی رهایش اسانس از نانوحامل لیپیدی، اندازه و بار سطحی نانوحامل حاوی اسانس و بررسی مورفولوژی نانوحامل حاوی اسانس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر نوعی مطالعه‌ی آزمایشگاهی می‌باشد که از سال ۱۳۹۷ خورشیدی به مدت ۵ ماه در پردیس بین‌الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی با کد اخلاق IR.SSU.REC.1397.694. به انجام رسیده است.

مواد مورد استفاده، برای انجام پژوهش حاضر گیاه *Trachyspermum ammi* از کوه‌های بهاباد استان یزد جمع‌آوری گردید. هم‌چنین فسفاتیدیل کولین سویا و کلسترول متعلق به شرکت sigma-aldrich، ایزوپروپیل، متانول و کلروفرم متعلق به شرکت Merck تهیه و خریداری شد. ضمناً سایر محلول‌ها و حلال‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر دارای گرند تحقیقاتی می‌باشند.

تهیه گیاه و اسانس‌گیری. گیاه *Trachyspermum ammi* در فصل تولید میوه (بذردهی) از کوه‌های شهرستان بهاباد استان یزد جمع‌آوری شد و نوع گونه‌ی آن توسط متخصصین گیاه‌شناسی دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی دانشگاه یزد و هم‌چنین توسط متخصصین سازمان جهاد کشاورزی یزد تایید گردید. در پژوهش حاضر عمل اسانس‌گیری از بذر گیاه *Trachyspermum ammi* و به روش تقطیر در آب توسط دستگاه کلونجر استفاده شد. برای این منظور در هر مرتبه حدود ۱۰۰ گرم از بذر نمونه گیاهی را خرد کرده تا تبدیل به پودر شود. سپس پودر حاصل به همراه ۲۵۰ میلی‌لیتر آب درون بالن ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و مجموعه‌ی حاصل را

غیره استفاده می‌شود. امروزه نیز مشخص شده است که اسانس زنیان با برخورداری از ترکیبات فعال نظیر تیمول، سایمن، آلفا پینن، کارواکرول و گاما ترپینن، دارای اثرات ضد باکتری، ضد ویروسی، ضد انگلی، ضد توموری و آنتی‌اکسیدانی است [۳-۸].

تریکوموناس واژینالیس نوعی انگل تک سلولی، یوکاریوت و متعلق به فرمانرو آغازیان می‌باشد. تریکوموناس واژینالیس تک سلولی تاژکدار و شایع‌ترین انگل غیر ویروسی منتقله از طریق جنسی است که می‌تواند عفونت تریکومونیاژیس را در مجاری ادراری-تناسلی ایجاد نماید، به گونه‌ای که سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰۸، حدود ۱۷۶ میلیون مورد مبتلا به این عفونت را در سرتاسر دنیا گزارش نموده است. عفونت تریکومونیاژیس، با علائم بالینی نظیر تولید ترشحات بدبو و متعفن در مجاری ادراری-تناسلی، احساس درد هنگام ادرار و غیره همراه است که می‌تواند منجر به زایمان زودرس، پارگی زودرس کیسه آب و کمبود وزن نوزاد هنگام تولد شود. معمولاً به منظور درمان عفونت ناشی از این انگل تک‌سلولی، یوکاریوت و آغازی از داروی مترونیدازول استفاده می‌شود که خود با عوارض جانبی گسترده نظیر سردرد، استفراغ، تهوع، خشکی دهان، سرگیجه همراه می‌باشد و حتی در مواردی سرطان‌زایی بالقوه، اثرات تراژونیک بر جنین و مقاومت دارویی نیز برای این دارو گزارش شده است [۹-۱۲].

با در نظر گرفتن اثرات ضد انگلی ترکیبات استخراج شده از گیاه زنیان و عوارض جانبی پایین ترکیبات گیاهی و شیوع رو به افزون عفونت انگلی تریکومونیاژیس و عوارض جانبی داروهای شیمیایی رایج برای درمان این بیماری، به نظر می‌رسد ترکیبات موجود در اسانس بذر گیاه زنیان بتوانند در درمان کم عارضه‌ی این بیماری موثر باشد. ولی استفاده از ترکیبات گیاهی از جمله اسانس‌ها با چالش‌های مهمی از جمله اکسیدپذیری بالا، جذب پایین، اثرگذاری کم همراه می‌باشد که کاربرد آن‌ها را در مصارف بالینی با محدودیت‌هایی روبرو نموده است [۱۳]. بنابراین استفاده از استراتژی‌های نوین در رسانش ترکیبات استخراج شده از گیاهان دارویی به سلول‌های هدف ضروری می‌باشد. یکی از این استراتژی‌های نوین در رسانش ترکیبات گیاهان دارویی به مواضع هدف، نانوحامل‌های لیپیدی از جمله لیپوزوم است. لیپوزوم‌ها ترکیباتی آب‌گریز می‌باشند که بخش اصلی آن‌را فسفولیپید تشکیل می‌دهد و در ساختار آن از ترکیبات پایدارکننده از جمله کلسترول استفاده می‌شود. برای تشکیل لیپوزوم، فسفولیپیدها در محیط آبی قرار داده می‌شوند تا

دیالیز نموده و به مدت یک ساعت درون بشری با ۴۵۰cc آب مقطر و در دمای ۴°C قرار داده شد تا اسانس آزاد و درون‌گیر نشده حذف گردد. سپس لیپوزوم‌های ساخته شده را با نسبت ۱ به ۲۰ با ایزوپروپیل مخلوط کرده تا دیواره لیپیدی اطراف اسانس *Trachyspermum ammi* شکسته شود و اسانس آزاد گردد. در مرحله بعد میزان جذب اسانس برگذاری شده درون سامانه لیپوزومی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ماکزیم اسانس *Trachyspermum ammi* محاسبه شد. در پایان با استفاده از نمودار استاندارد اسانس *Trachyspermum ammi* در ایزوپروپیل، و رابطه زیر، درصد لود اسانس *Trachyspermum ammi* در سامانه لیپوزومی سنجیده شد [۱۳].

$$100 \times \frac{\text{مقدار اسانس محصور شده}}{\text{مقدار اسانس اولیه}} = \text{راندمان بارگذاری اسانس}$$

بررسی روند رهائش اسانس از سامانه لیپوزومی. بررسی رهائش اسانس از سامانه لیپوزومی با استفاده از روش کیسه دیالیز صورت گرفت. در این روش مقدار مشخصی از لیپوزوم حاوی اسانس Horiba در کیسه دیالیز ریخته شد و در مجاورت بافر PBS در دمای ۳۵°C و pH=۶ به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و در فواصل زمانی نیم، ۱، ۲، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۲۴ ساعت، مقدار مشخصی از بافر PBS اطراف کیسه دیالیز برداشته و مقدار جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و بر اساس آن، نمودار رهائش اسانس از لیپوزوم رسم گردید [۱۳].

تعیین اندازه نانوذرات و پتانسیل زتا سامانه لیپوزومی حاوی اسانس *Trachyspermum ammi*. محدوده توزیع اندازه ذرات و هم‌چنین بیک اندازه ذرات با استفاده از دستگاه تفرق دینامیکی نور (DLS) تعیین می‌شود که بدین منظور از دستگاه نانو سائزر Horiba استفاده گردید. اندازه‌گیری نانولیپوزوم‌ها در یک زاویه ۹۰ درجه و تابش نور لیزر با طول موج ۶۵۷nm در دمای ۵°C صورت گرفت نمونه مورد استفاده به صورت رقیق شده در غلظت ۰/۱ mg/ml آماده گردید. و بلافاصله پس از آماده‌سازی اندازه‌گیری صورت گرفت. هم‌چنین اندازه‌گیری نمونه‌ها در ۳ مرتبه و هر مرتبه به مدت ۳۰ ثانیه انجام گردید. هم‌چنین میزان بار سطحی (پتانسیل زتا) نانو لیپوزوم‌های حامل اسانس با استفاده از دستگاه زتا-سائزر شرکت Brookhaven Instruments Corp در دمای ۲۵°C اندازه‌گیری گردید.

تصویربرداری از سامانه لیپوزومی حاوی اسانس *Trachyspermum ammi*. از سامانه لیپوزومی با استفاده از

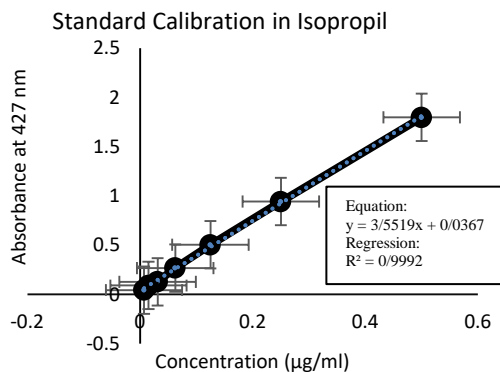
به دستگاه کلونجر متصل نموده و به مدت ۴ ساعت اسانس‌گیری انجام شد. در پایان، اسانس تولید شده، از دستگاه کلونجر خارج کرده و برای انجام مراحل بعدی جمع‌آوری گردید [۱۳].

رسم نمودار استاندارد اسانس *Trachyspermum ammi* در ایزوپروپیل و بافر (PBS (Phosphate Buffered Saline). در این مرحله ابتدا استوک ۱mg/ml اسانس *Trachyspermum ammi* در حلال متانول تهیه گردید و با استفاده از آن، سری رقت‌های مختلف اسانس زنیان در حلال ایزوپروپیل تهیه گردید. سپس به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب هر یک از رقت‌ها اندازه‌گیری شد. آزمایش در این مرحله سه مرتبه تکرار گردید و سپس با استفاده از طول موج‌های جذبی به دست آمده، نمودار استاندارد اسانس *Trachyspermum ammi* در ایزوپروپیل رسم گردید. هم‌چنین به منظور رسم نمودار استاندارد اسانس *Trachyspermum ammi* در بافر PBS، ابتدا استوک ۱mg/ml اسانس در حلال متانول تهیه گردید و سپس با استفاده از آن، سری رقت‌های مختلف اسانس در حلال PBS تهیه گردید و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب هر یک از رقت‌ها اندازه‌گیری شد. آزمایش در این مرحله نیز سه مرتبه تکرار گردید و سپس با استفاده از طول موج‌های جذبی به دست آمده، نمودار استاندارد اسانس *Trachyspermum ammi* در PBS رسم گردید [۱۳].

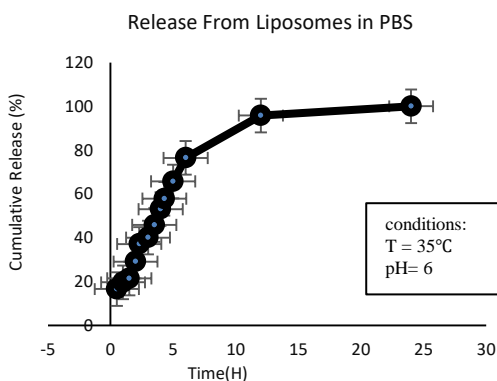
ساخت سامانه لیپوزومی حاوی اسانس *Trachyspermum ammi*. سامانه لیپوزومی حاوی اسانس *Trachyspermum ammi* به روش آب‌پوشانی لایه نازک و با ترکیبی شامل فسفاتیدیل کولین سویا (۷۰٪)، کلسترول (۳۰٪) و اسانس *Trachyspermum ammi* با غلظت ۱ mg/ml تهیه گردید، که خلاصه آن بدین شرح است: ابتدا *Trachyspermum ammi* در حلال کلروفرم و در دمای ۴۵°C بر روی روتاری (هایدولف، آلمان) حل شده و تحت شرایط خلأ، فیلم نازک خشک تهیه گردید. سپس عمل هیدراته کردن با افزودن آب مقطر استریل طی مدت یک ساعت و در دمای ۵۵°C انجام گردید. در ادامه نانوذرات تهیه شده، با استفاده از سونیکیت حمامی برای مدت ۴۰ دقیقه کاهش سایز داده شد. در پایان مخلوط کاهش سایز داده شده با استفاده از فیلترهای ۰/۴۵ و ۰/۲۰ میکرومتر، فیلتر شده تا ذرات سازنده‌ی آن همگن گردند [۱۳].

تعیین درصد بارگذاری اسانس در سامانه لیپوزومی. لیپوزوم‌ها را بعد از کاهش سایز و فیلتراسیون، وارد کیسه

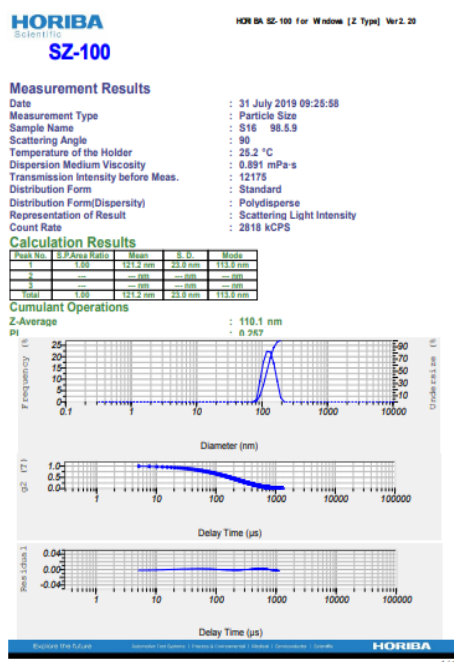
الکترونی نیروی اتمی مورد بررسی قرار گرفت و حضور و تشکیل لیپوزومها تایید شد. هم چنین تصویر حاصل از AFM نشان می دهد که نانوذرات سازنده سامانه‌ی حاوی اسانس، ضمن برخورداری از پراکنندگی مناسب و عدم تجمع ذرات سازنده، دارای مورفولوژی کروی می باشد (شکل ۶).



شکل ۲. نمودار استاندارد اسانس *Trachyspermum ammi* در PBS



شکل ۳. نمودار رهائش اسانس *Trachyspermum ammi* در PBS

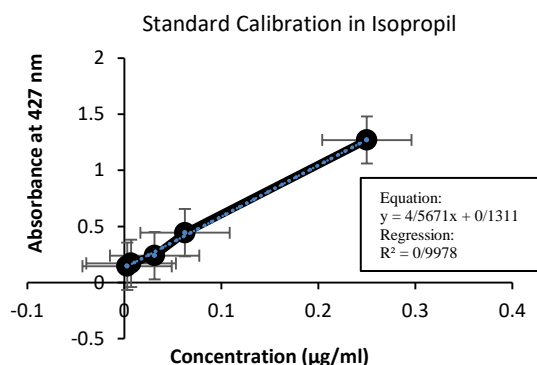


شکل ۴. اندازه ذرات سامانه لیپوزومی حاوی اسانس *Trachyspermum ammi*

میکروسکوپ نیروی اتمی (Atomic Force microscope) به منظور بررسی شکل و ساختار نانولیپوزوم‌های تولیدی حامل اسانس تصویر گرفته شد.

نتایج

بررسی میزان بارگذاری (درون گیری) اسانس درون سامانه لیپوزومی و الگوی رهائش اسانس از سامانه لیپوزومی. با استناد به نمودار استاندارد اسانس *Trachyspermum ammi* در ایزوپروپیل (شکل ۱) و با استفاده از رابطه‌ی ۱، میزان بارگذاری اسانس *Trachyspermum ammi* درون سامانه‌ی لیپوزومی استاندارد اسانس $40/12 \pm 2/71$ محاسبه گردید. هم چنین با استناد به نمودار استاندارد اسانس *Trachyspermum ammi* در بافر PBS (شکل ۲)، نمودار رهائش اسانس *Trachyspermum ammi* از سامانه لیپوزومی در دمای 35°C و $\text{pH}=6$ طی ۲۴ ساعت رسم گردید. بررسی الگوی رهائش اسانس از سامانه لیپوزومی (شکل ۳) نشان می دهد که رهائش انفجاری اسانس در ساعات اولیه (از ابتدای رهائش تا ۶ ساعت پس از رهائش) و کند شدن میزان رهائش اسانس در ساعات پایانی (بازه‌ی ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از رهائش) از مشخصه‌های رهائش اسانس از سامانه لیپوزومی در پژوهش حاضر می باشد.



شکل ۱. نمودار استاندارد اسانس *Trachyspermum ammi* در ایزوپروپیل

بررسی اندازه و بار سطحی (پتانسیل زتا) سامانه لیپوزومی حاوی اسانس *Trachyspermum ammi* نتایج حاصل از DLS نشان می دهد که اندازه ذرات سامانه لیپوزومی حاوی اسانس $110/1$ nm می باشد (شکل ۴). هم چنین میزان بار سطحی (پتانسیل زتا) سامانه لیپوزومی حاوی اسانس -9mV محاسبه گردیده است (شکل ۵). نتایج حاصل از میکروسکوپ نیروی اتمی. مورفولوژی نانو سامانه لیپوزومی حاوی اسانس به وسیله میکروسکوپ

لیپوزوم و غیره بستگی دارد. درصد بارگذاری $40/12 \pm 2/71$ در پژوهش حاضر با توجه به ماهیت فرار اسانس، می‌تواند مناسب باشد، به گونه‌ای که پژوهش‌های مشابه نیز میزان بارگذاری اسانس را در سامانه‌های لیپیدی، نزدیک به نتایج پژوهش حاضر گزارش نموده‌اند. حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۶، میزان بارگذاری اسانس زینان را در سامانه‌ی لیپوزومی ۳۵/۶٪ گزارش نموده است [۱۸].

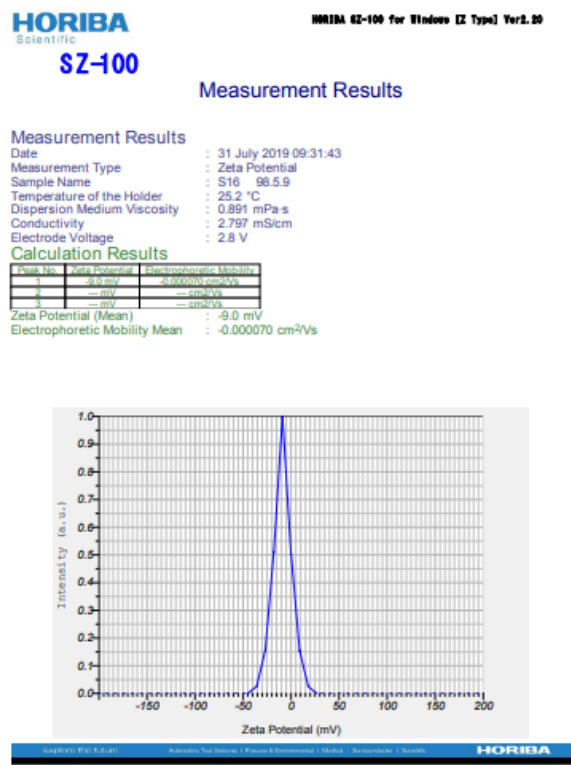
از دیگر شاخصه‌های پژوهش حاضر، الگوی رهایش اسانس *Trachyspermum ammi* از سامانه‌ی لیپوزومی می‌باشد. به گونه‌ای که اسانس زینان در دمای 35°C و $\text{pH}=6$ ضمن رهایش آهسته، در پایان ۲۴ ساعت، به‌طور کامل از سامانه‌ی لیپوزومی آزاد گردیده است. گزارش رهایش آهسته اسانس از سامانه‌های لیپوزومی را می‌توان در پژوهش‌های حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۶، مجدی‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۸ و برکت و همکاران در سال ۲۰۱۹ مشاهده نمود [۱۳، ۱۸، ۱۹].

شاخصه‌ی دیگر سامانه‌ی لیپوزومی حاصل از پژوهش حاضر بار سطحی (پتانسیل زتا) منفی آن می‌باشد. زیاد بودن بار سطحی سامانه می‌تواند منتهی به افزایش پایداری سامانه گردد. زیرا افزایش بار سطحی مشابه باعث افزایش نیروی دافعه‌ی کولنی میان ذرات نانو سامانه شده و از تجمع و رسوب ذرات سامانه جلوگیری می‌کند، بنابراین پایداری سامانه‌ی لیپوزومی افزایش می‌یابد [۲۰-۲۲].

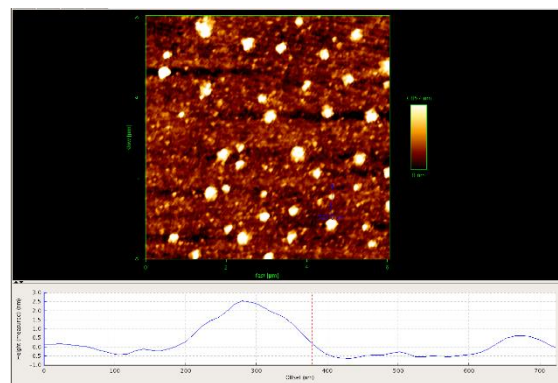
یکی از شاخصه‌های مهم مورد ارزیابی در پژوهش حاضر، اندازه ذرات سامانه‌ی لیپوزومی است که در میزان سمیت، سرنوشت بیولوژیکی و رسانش دارو در یک سامانه‌ی دارو رسانی، نقش تعیین‌کننده‌ای دارد. سامانه‌های دارویی با اندازه ذراتی در مقیاس نانو نسبت به ذرات بزرگ‌تر از جذب سلولی بالاتری برخوردار می‌باشند، زیرا این ذرات به‌واسطه اندازه کوچک، می‌توانند به شکل آسان‌تری وارد فضای سلول‌های مختلف گردند و حتی از سد‌های طبیعی بدن نظیر سد خونی- مغزی عبور نمایند [۲۳]. در پژوهش حاضر، داده‌های حاصل از DLS نشان می‌دهد که اندازه ذرات سامانه لیپوزومی حاوی اسانس از اندازه‌ای در مقیاس نانو برخوردار می‌باشد.

تاکنون پژوهش‌های متعددی در زمینه‌ی بارگذاری اسانس در سامانه‌های لیپیدی انجام گرفته است که به بخشی از آن در زیر اشاره خواهد شد.

Celia و همکاران در سال ۲۰۱۳ نانو لیپوزوم‌های حاوی عصاره ترنج را تهیه نمودند که این نانو ذرات ضمن افزایش میزان حلالیت عصاره و بهبود شاخصه‌های ضد سرطانی آن، دارای پتانسیل زتای -6 و اندازه ذرات 186 nm بودند [۲۴].



شکل ۵. بار سطحی (پتانسیل زتا) سامانه لیپوزومی حاوی اسانس *Trachyspermum ammi*



شکل ۶. تصویر حاصل از میکروسکوپ نیروی اتمی

بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر منتهی به ساخت سامانه‌ی لیپوزومی حاوی اسانس *Trachyspermum ammi* که ضمن برخورداری از بازده درون‌گیری $40/12 \pm 2/71$ ٪، دارای بار سطحی منفی و موفقولوژی مناسب می‌باشد. رهایش اسانس از این سامانه نانو مقیاس طی ۲۴ ساعت، در مجموع آهسته بوده و سامانه در پایان ۲۴ ساعت تمامی اسانس محصور شده را رها نموده است.

یکی از ویژگی‌های فیزیوشیمیایی مورد بررسی در پژوهش حاضر، بازده درون‌گیری است. این شاخصه پر اهمیت به عوامل مختلفی از جمله نوع و درصد لیپیدهای به‌کار رفته در ساختمان لیپوزوم، نوع و ماهیت ماده‌ی بارگذاری شده در

بارگذاری بیش تر و اندازه ذرات کوچک تر از جمله مزایای پژوهش حاضر نسبت به پژوهش حقیرالسادات است.

قره نقده و همکاران در سال ۲۰۱۷، نانولیبوزوم های حاوی عصاره مریم گلی با فرمول های مختلف (۹۰-، ۸۰-، ۱۰ و ۲۰- میلی گرم) تهیه نمودند که اندازه ذرات و شاخص پراکندگی ذرات به ترتیب در محدوده ۸۸-۸۲ نانومتر و ۰/۳۹ - ۰/۴۲ و میزان درون پوشانی عصاره در تمامی فرمول ها بالای ۷۰٪ گزارش شده است [۲۹].

نادری نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۷، لیپوزوم های حاوی کورکومین به منظور اثرگذاری بر سرطان استخوان تهیه کرده و گزارش نمودند که کورکومین لیپوزوم نسبت به کورکومین آزاد، به نسبت بیش تری مانع رشد سلول های سرطان استخوان می شود [۳۰]. عبدالملکی و همکاران در سال ۲۰۱۷، به بررسی اثر ضد سرطانی عصاره گیاه رزماری بر سلول های سرطانی پستان رده MCF-7 و SKBR-3 و سلول های فیروبلاست HU02 پرداختند و گزارش نمودند که، عصاره رزماری دارای اثر ضد سرطانی وابسته به غلظت و زمان بر روی رده سلولی MCF-7 و SKBR3 است، در حالی که سمیتی بر سلول های فیروبلاست نداشته است [۳۱]. پژوهش نادری نژاد و پژوهش عبدالملکی نشان می دهد که آنکپسوله کردن ترکیبات گیاهی می تواند خاصیت ضد سرطانی آن ها را افزایش دهد.

مجدی زاده و همکاران در سال ۲۰۱۸، نانولیبوزوم های آهسته رهش حاوی عصاره نعناع فلفلی را با درصد بارگذاری ۶۱/۳۸٪، اندازه ۲۴۵ nm، شاخص پراکندگی ۰/۳۲ و پتانسیل زتای ۳۴/۵۴ mV - تهیه نمودند [۱۳]. پژوهش مجدی زاده از نقطه نظر درصد درون گیری به دلیل تشابه در نوع نانو ذره، روش ساخت و ماهیت ماده آنکپسوله شده تا حدودی نزدیک به پژوهش حاضر می باشد. هرچند میزان بار سطحی و اندازه ذرات سامانه لیپوزومی در پژوهش مجدی زاده نسبت به پژوهش حاضر بیش تر می باشد.

کریمی مقدم و همکاران در سال ۲۰۱۹ سامانه لیپیدی نیوزومی حاوی سیلیبینین را تهیه نمودند و گزارش نمودند که سامانه مذکور دارای بازده درون گیری $92/87 \pm 5\%$ ، اندازه ذرات ۱۱۸ nm و $31/33 \pm 0/9$ mV - می باشد. تفاوت در نوع ترکیبات به کار رفته در ساختمان سامانه و ماهیت و نوع ماده درون گیر شده از جمله عوامل موثر بر تفاوت نتایج پژوهش کریمی مقدم با پژوهش حاضر است. هر چند رهش آهسته مادهی درون گیری شده از جمله تشابهات میان نتایج پژوهش حاضر با پژوهش کریمی مقدم است [۳۲].

اندازه کوچک تر و بار سطحی بیش تر سامانه لیپوزومی در پژوهش حاضر، از مزایای مطالعه حاضر نسبت به پژوهش Celia می باشد.

حق جو و همکاران در سال ۲۰۱۵ نانولیبوزوم های حاوی عصاره گزنه در غلظت های مختلفی از فسفاتیدیل کولین و کلسترول تهیه نمودند که حداکثر میزان درون پوشانی عصاره ۶۸/۸۳، محدوده اندازه ذرات بین ۸۱ تا ۹۴ نانومتر و شاخص پراکندگی ذرات مانند پژوهش حاضر، ۰/۳ گزارش شده است [۲۵]. اندازه ذرات کوچک تر و درصد درون گیری بالاتر از جمله مزایای پژوهش حق جو نسبت به پژوهش حاضر است. به نظر می رسد که تفاوت در ماهیت ماده بارگذاری شده و تفاوت در درصد مولی لیپیدهای سازنده سامانه لیپوزومی از جمله دلایل تفاوت در نتایج این دو پژوهش باشد.

بشیری و همکاران در سال ۲۰۱۵، نانولیبوزوم های حاوی بتاکاروتن تهیه نمودند و به بررسی میزان پایداری این ذرات با گذشت زمان پرداختند. آن ها گزارش کرده اند که اندازه نانولیبوزوم های تهیه شده در حدود ۶۴ nm بوده و میزان درون پوشانی در بهترین فرمول حدود ۸۹/۷۷٪ بوده است [۲۶]. درون گیری بیش تر و اندازه ذرات کوچک تر از مزایای پژوهش بشیری نسبت به پژوهش حاضر است که این تفاوت در نتایج می تواند به دلیل تفاوت ماهیت ماده بارگذاری شده در دو پژوهش باشد. ابراهیمی خوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۵، لیپوزوم های حاوی عصاره آویشن شیرازی تهیه نمودند که درصد درون پوشانی را در نقطه بهینه ۵۴/۴٪ گزارش نمودند. درصد درون پوشانی در پژوهش ابراهیمی خوسفی نسبت به پژوهش حاضر بیش تر است [۲۷].

Haiying Cui و همکاران در سال ۲۰۱۵ نانولیبوزوم های حاوی عصاره میخک تهیه نمودند که اندازه نانو ذرات را بین ۷۸/۳ تا ۱۵۶/۱ نانومتر، شاخص پراکندگی ذرات را ۰/۱۹۶، پتانسیل زتا ذرات را ۲۴/۵- و میزان درون پوشانی را ۲۰/۴۱٪ گزارش نمودند [۳۳]. نتایج پژوهش Haiying Cui تا حدودی نزدیک به پژوهش حاضر می باشد، هرچند میزان درون پوشانی اسانس در پژوهش حاضر نسبت به پژوهش Haiying Cui بیش تر می باشد [۲۸].

حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۶ نانولیبوزوم های حاوی عصاره زنیان تهیه نمودند که میزان آنکپسولاسیون عصاره ۳۵/۶٪ و اندازه نانوذرات حاوی عصاره ۱۸۶/۱ nm بوده است. همچنین پتانسیل زتای نانو ذرات در این پژوهش بین ۱- تا ۶/۷- گزارش شده است [۱۸]. اگرچه نوع و ماهیت ماده بارگذاری شده در پژوهش حقیرالسادات مشابه پژوهش حاضر می باشد ولی پتانسیل زتای بالاتر، درصد

- [8] Jebelli Javan A. Combinational effects of trachyspermum ammi and Zataria multiflora Boiss essential oils on some pathogenic food-borne bacteria. *Koomesh* 2016; 17: 374-383. (Persian).
- [9] Hodiwala-Bhesania A, Narayankhedkar A. Trichomoniasis-A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2016; 5(6):731-741. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.079>
- [10] Kashan ZF, Delavari M, Arbabi M, Hooshyar H. Therapeutic effects of Iranian herbal extracts against Trichomonas vaginalis. *Iran Biomed J* 2017; 21: 285. <https://doi.org/10.18869/acadpub.ijb.21.5.285>
- [11] Kissinger P. Trichomonas vaginalis: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infect Diseases* 2015; 15: 307. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1055-0>
- [12] Vazini H, Esboei BR. In vitro study of the effect of hydroalcoholic extracts of Carum copticum and Ferula asafetida against Trichomonas vaginalis. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci* 2018; 23.
- [13] Majdizadeh M, Rezaei Zarchi S, Movahedpour AA, Shahi Malmir H, Sasani E, Haghirsadat BF. A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: preparation and characterization of nano-liposomes containing Mentha piperita essential oil. *SSU J* 2018; 25: 853-864. (Persian).
- [14] Amoabediny G, Haghirsadat F, Naderinezhad S, Helder MN, Akhondi Kharanaghi E, Mohammadnejad Arough J, Zandieh-Doulabi B. Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review. *Int J Polymeric Materials Polymeric Biomaterials* 2018; 67: 383-400. <https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1332623>
- [15] Daraee H, Etemadi A, Kouhi M, Alimirzalu S, Akbarzadeh A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2016; 44: 381-391. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.955107> <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.953633> PMID:25222036
- [16] Cheraghi M, Negahdari B, Daraee H, Eatemadi A. Heart targeted nanoliposomal/nanoparticles drug delivery: An updated review. *Biomed Pharmacother* 2017; 86: 316-323. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.009> PMID:28011379
- [17] Dua JS, Rana AC, Bhandari AK. Liposome: methods of preparation and applications. *Int J Pharm Stud Res* 2012; 3: 14-20.
- [18] Haghirsadat FA, Azhdari MA, Kalantar SM, Naderinezhad SA, Teymourizadeh KE, Yazdani MO, et al. Strategy of Improvements in the reapeutic index of medicinal herbs of Iranianin digenous: Synthesis and characterization of phospholipid lipid-based vesicles in corporated Trachyspermum copticum. *SSU J* 2016; 24: 468-478. (Persian).
- [19] Barakat F, Aboee-Mehrzi F, Haghirsadat BF, Sedighi-Khavidak S, Ashkezari MD. Designing and optimization of liposomal nano-carriers containing Nepeta persica extract and study of its cytotoxicity on the breast cancer cell line (MCF-7). *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2019; 27: 1202-1215. (Persian). <https://doi.org/10.18502/ssu.v27i2.1041>
- [20] Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropic J Pharm Res* 2013; 12: 265-273. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20> <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>
- [21] Zhao W, Song Zhuang X-RQ. Comparative study of the in vitro and in vivo characteristics of cationic and neutral liposomes. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 3087. <https://doi.org/10.2147/IJN.S25399> PMID:22163162 PMCid:PMC3235029
- [22] Danhier F, Feron O, Préat V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* 2010; 148: 135-146. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.027> PMID:20797419
- [23] Shamsi F. Nanotechnology application in cancer treatment. *Koomesh* 2019; 21: 579-589. (Persian).
- [24] Celia C, Trapasso E, Locatelli M, Navarra M, Ventura CA, Wolfram J, et al. Anticancer activity of liposomal bergamot essential oil (BEO) on human neuroblastoma cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013; 112: 548-553.

پژوهش حاضر هر چند منتهی به فرمولاسیون لیپوزومی حاوی اسانس Trachyspermum ammi با ویژگی‌های فیزیوشیمیایی مناسب گردید، اما همانند بسیاری از پژوهش‌ها بدون نقص و کاستی نمی‌باشد. عدم ساخت و بررسی فرمولاسیون‌های متعدد لیپوزومی با درصد مولی متفاوتی از لیپیدهای به‌کار رفته در ساختمان آن‌ها، عدم بررسی رهائش اسانس در اسیدیته و دماهای متفاوت و عدم بررسی پایداری سامانه‌ی لیپوزومی حاوی اسانس از جمله مهم‌ترین کاستی‌های پژوهش حاضر می‌باشد که انجام آن توسط نویسندگان، به پژوهشگران بعدی پیشنهاد می‌شود.

در پژوهش حاضر سامانه‌ی لیپوزومی حاوی اسانس Trachyspermum ammi ساخته شد و ویژگی‌های فیزیوشیمیایی آن مورد ارزیابی قرار گرفت، درصد درون‌گیری بالا، رهائش کنترل شده اسانس در شرایط تعیین شده، آنیونی بودن نانوسامانه حاوی اسانس و موفولوژی مناسب ذرات از جمله شاخصه‌های مناسب سامانه‌ی لیپوزومی حاوی اسانس در پژوهش حاضر می‌باشد، بنابراین می‌توان این سامانه لیپوزومی حاوی اسانس Trachyspermum ammi را جهت بررسی‌های بیشتر به منظور مبارزه با انگل تریکوموناس واژینالیس پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری علمی شرکت ریز زیست فناوران فردانگر در انجام پژوهش حاضر سپاس‌گزاری می‌شود.

منابع

- [1] Haghirsadat F, Azhdari M, Oroojalian F, Omid M, Azimzadeh M. The chemical assessment of seed essence of three native medicinal plants of Yazd province (bunium premium, cuminum cyminum, trachyspermum copticum) and the comparison of their antioxidant properties. *SSU J* 2015; 22: 1592-1603. (Persian).
- [2] Dubey NK, Kumar R, Tripathi P. Global promotion of herbal medicine: India's opportunity. *Curr Sci* 2004; 86: 37-41.
- [3] Eblagh N, Fateh E, Farzaneh M, Osfuri M. Effect of cattle manure application, phosphate solubilizing bacteria and different phosphorus levels on yield and essence components of trachyspermum ammi L. *J Agricul Sci Sustain Product* 2014; 23: 1-15. (Persian)
- [4] Jeet K, Devi N, Narender T, Sunil T, Lalit S, Raneev T. Trachyspermum ammi (ajwain): a comprehensive review. *Int Res J Pharmacy* 2012; 3: 133-138.
- [5] Dwivedi SN, Mishra RP, Alava S. Phytochemistry, pharmacological studies and traditional benefits of Trachyspermum ammi (Linn.) Sprague. *Int J Pharmacy Life Sci* 2012; 3: 1705-1709.
- [6] Chauhan B, Kumar G, Ali M. A review on phytochemical constituents and activities of Trachyspermum ammi (L.) Sprague fruits. *Am J Pharmtech Res* 2012; 2: 329-340.
- [7] Moein MR, Zomorodian K, Pakshir K, Yavari F, Motamedi M, Zarshenas MM. Trachyspermum ammi (L.) sprague: chemical composition of essential oil and antimicrobial activities of respective fractions. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2015; 20: 50-56. <https://doi.org/10.1177/2156587214553302>

[29] Gharenaghadeh S, Samadlouie HR, Sowti M, Hamisekar H, Mokaram RR. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of Salvia essential oil nano liposome (Salvia multicaulis). JFST 2017; 14: 271-282. (Persian).

[30] Naderinezhad S, Haghirsadat BF, Amouabedini G, Naderinezhad A, Esmaili Z, Akbaezadeh A. Synthesis of biodegradable and self-assembled anionic nano-carrier: Novel approach for improvement of Curcumin- delivery to bone tumors cells & Mathematical modeling of drug-release kinetic. New Cell Mol Biotechnol J 2017; 7: 77-84. (Persian).

[31] Abdolmaleki N, Javani Jouni F, Abdolmaleki P, abdolmaleki Z. Assessment of anticancer properties of Rosmarinus officinalis L extract and gamma rays on cell viability of MCF-7, SKBR3, and HU02 cell lines. Pathobiol Res 2017; 20: 23-36. (Persian).

[32] Karimi-Moghddam A, Nikounahad-Lotfabadi N, Haghirsadat BF, Majdizadeh M. Investigating the effect of lipid nanoparticles containing silibinin anti-cancer drug on the growth of breast cancer MCF-7 cell line. J Torbat Heydariyeh Univ Med Sci 2019; 6: 1-2. (Persian).

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.017>

PMid:24099646

[25] Haghjoo S, Ghanbarzadeh B, Hamishekar H, Asnaashari S, Dehghannia J. Evaluation of colloidal and antioxidant properties of nano liposomes containing nettle extract. Innov Food Technol 2015; 2: 11-23. (Persian)

[26] Sahra Bashiri, Ghanbarzadeh B, Hamishekar H, Dehghannia J. Beta-Carotene loaded nanoliposome: effects of gamma -oryzanol on particle size stability and encapsulation. J Res Innov Food Sci Technol 2015; 4: 365-382. (Persian).

[27] Ebrahimi Khoufii M, Khosravi darani K, Hoseini H, Arabi S, Kamali Fonoud R, Kouhi Kamali P. Production of nanoliposomes containing essential oil of Boiss Zataria multiflora by response surface method. Nano Scale 2014; 1: 119-128. (Persian).

[28] Cui H, Zhao C, Lin L. The specific antibacterial activity of liposome-encapsulated Clove oil and its application in tofu. Food Control 2015; 56: 128-134.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.026>

Fabrication and characterization of liposomal nano-carriers containing essential oils of *Trachyspermum ammi* to counteract *Trichomonas vaginalis*

Farzaneh Mirzaei (Ph.D)¹, Mohammad Majdizadeh (M.Sc)², Ali Fatahi-Bafghi (Ph.D)¹, Raheleh Ehsani (M.Sc)³, Bibi Fatemeh Haghirsadat (Ph.D)^{*4}

1 - Dept of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

2 - Cellular and Molecular Biology, Dept. of Nano-Biotechnology, Nano-Biotech Foresight Company, Science & Technology Park of Yazd, Yazd, Iran

3- Biochemistry, Medical Nanotechnology&Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

4- Medical Nanotechnology & Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

* Corresponding author. +98 9132507158 Fhaghirsadat@gmail.com

Received: 28 Sep 2019; Accepted: 23 Aug 2020

Introduction: Annually, a large part of the world population is infected with trichomoniasis. On the other hand, the common medicines used to treat this disease can have many side effects. The aim of the present study was to construct a liposomal system containing essential oil of *Trachyspermum ammi* and investigate its physicochemical properties to combat trichomoniasis infection.

Materials and Methods: Liposomal vesicles were prepared using phosphatidylcholine (70%) and cholesterol (30%) by thin film method. In addition, the essential oil of *Trachyspermum ammi* was loaded into liposomes and the encapsulation efficiency of essential oil was calculated. Then, the size, surface charge and particle morphology of this system were investigated using Zeta Sizer and Atomic Force Microscopy and pattern of essential oil release was evaluated at 35 oC and pH = 6 for 24 h.

Results: Liposomal vesicles containing essential oil had a size of 110.1 nm, 40.12±2.71% essential oil loading, and zeta potential of -9 mV. The liposomal system is controlled release and releases all essential oils within 24 hours. Atomic force microscopy also confirmed the formation of liposomes and appropriate particle morphology.

Conclusion: In the present study, the liposomal system containing the essential oil of *Trachyspermum ammi* had a relatively high loading percentage and surface charge verification confirmed that the nano-carrier is anionic. Thus, given the slow and complete release of the essential oil within 24 hours, this liposomal nano-carrier can be a suitable carrier for delivering the essential oil to Trichomoniasis parasite.

Keywords: Liposome, Nanostructures, *Trichomonas vaginalis*, *Trachyspermum ammi*, Medicinal Plants.