



Scan online to view this article

Synthesis and study of cellular and physicochemical properties of nanoliposomes containing aqueous extract of Hedera Helix

Milad Akhlaghi¹, Lida Eftekharivash², Fatemeh Parnian³, Mohammad Taebpour³, Tohid Rostamian¹, Maryam Zarezadeh Mehrizi⁴, Kazem Ansari⁵, Bibi Fatemeh Haghirosadat^{6*}

1. Department of clinical biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
2. Department of Microbiology, Maragheh Branch, Islamic Azad University. Maragheh, Iran.
3. Department of Medical Biotechnology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
4. Faculty of Dentistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
5. Nano-Biotech Foresight Company Biotechnology Campus, Science & Technology Park of Yazd, Yazd, Iran
6. Medical Nanotechnology & Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Abstract:

Aim and Background: The use of medical herbs because of their reasonable price and availability is rapidly increasing but it faces many challenges. Researchers are trying to overcome these challenges by designing nano-drug delivery carriers such as liposome. In this study, a formulation of liposomal system containing Hedera Helix extract was synthesized and its toxicity on normal cells and physicochemical characteristics were evaluated.

Material and Method: In the first step, extraction of Hedera Helix was done by succulent method. In the next step, nano-liposomes were prepared by thin film method from phosphatidylcholine and cholesterol and by using hydration inactive method the extract was loaded into them. Then the encapsulation rate and the release pattern were assayed by spectrophotometry method, the size of nanoparticles and their zeta potential were evaluated by the DLS, the non-interaction between the extract and the nanosystem was assessed by FT-IR technique and the morphology of the nanoparticles was examined by AFM microscope and finally the non-toxicity of the system on normal cells was assayed by MTT method.

Results: The results of this study showed that nano-liposomes containing Hedera Helix extract having 48.6 nm of diameter, 0.406 dispersion index, -37.3 ± 1.72 mV zeta potential and 82.67 ± 1.12 encapsulation efficiency are follow the slow releasing drug pattern. FTIR and AFM data demonstrated that there is no interaction between the extract and nanoliposomes and nanoliposomes have appropriate morphology. Finally, the results of the MTT assay confirmed the non-toxicity activity of nano-liposome.

Conclusion: In this study, physicochemical studies of nanosystems after loading Hedera Helix extract into liposomal nanosystems showed that the system is a slow-release and anionic type with acceptable size, morphology and acceptable encapsulation rate. The synthesized liposomes could be a suitable carrier for the Hedera Helix extract and increase its stability, solubility and thus improve its therapeutic performance.

Key words: liposome, slow-release, Hedera Helix extract encapsulation, viability rate, Iau Science.

Corresponding author:

Medical Nanotechnology & Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
Email: Fhaghirosadat@gmail.com



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

سنتز و بررسی ویژگی‌های سلولی و فیزیکیوشیمیایی نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره آبی گیاه عشقه

میلاد اخلاقی^۱، لیدا افتخاری وش^۲، فاطمه پرنبیان^۳، محمد طائب پور^۳، توحید رستمیان^۱، مریم زارع زاده مهریزی^۴، کاظم انصاری^۵، بی بی فاطمه حقیرالسادات^{۶*}

۱. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، مراغه، ایران
۳. گروه زیست فناوری، پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۴. دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۵. پزشکی عمومی، شرکت ریز فناوریان فردانگر، مرکز زیست فناوری، پارک علم و فناوری، یزد، ایران
۶. مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از گیاهان درمانی با توجه به قیمت مناسب و در دسترس بودن آنها به شدت در حال افزایش است اما با چالش‌هایی از جمله حلالیت پایین در آب و نیمه عمر پایین در سیستم گردش خون رو به رو است. محققین با طراحی نانو حامل‌های دارویی مثل لیپوزوم سعی بر غلبه بر این چالش‌ها دارند. در این مطالعه، فرمولاسیونی از لیپوزوم‌های حاوی عصاره گیاه عشقه ساخته و ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی و سمیت آن بر روی سلول‌های نرمال بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در قدم اول، عصاره‌گیری از گیاه عشقه به روش سوکسله انجام گردید. در مرحله بعد، نانولیپوزوم‌ها با روش فیلم نازک از فسفاتیدیل کولین و کلسترول تهیه و عصاره به صورت غیر فعال درون آنها بارگذاری گردید. سپس میزان لود عصاره و روند رهایش عصاره از سامانه با روش اسپکتروفتومتری، اندازه نانو ذرات و پتانسیل زتای آنها به وسیله دستگاه زتا سایزر، عدم بر هم کنش بین عصاره و سامانه به وسیله روش طیف‌سنجی مادون قرمز و مورفولوژی نانو ذرات نیز به وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی مورد بررسی قرار گرفت و در آخر میزان سمیت سامانه بر روی سلول‌های نرمال با روش MTT سنجیده شد.

یافته‌ها: بررسی نتایج این مطالعه نشان داد که بعد از عصاره‌گیری از گیاه عشقه و بارگذاری آنها درون نانو سیستم و مشخصه-یابی آنها مشخص شد که نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره عشقه با سایز $48/6 \text{ nm}$ شاخص پراکندگی 0.406 ، پتانسیل زتای $37 \pm 1/72$ و راندمان بارگذاری $82/67 \pm 1/12$ از نوع آهسته رهش هستند. هم‌چنین بررسی‌های FTIR و AFM نشان داد که میان عصاره و سامانه بر هم کنشی وجود ندارد و نانولیپوزوم‌ها از نظر مورفولوژی طبیعی هستند. در آخر نیز نتایج تست MTT، عدم سمیت نانولیپوزوم‌ها بر روی سلول‌های نرمال را ثابت کرد.

بحث: در این پژوهش بررسی‌های فیزیکیوشیمیایی نانو سامانه بعد از بارگذاری عصاره عشقه درون نانو سامانه‌های لیپوزومی نشان داد که سامانه ساخته شده از نوع آهسته رهش و آنیونی بوده و با داشتن سایز، مورفولوژی مناسب و میزان درون گیری قابل قبول عصاره می‌تواند به عنوان حاملی مناسب برای عصاره گیاه عشقه باشد و سبب افزایش پایداری، حلالیت و در نتیجه بهبود عملکرد آن گردد.

نتیجه گیری: سامانه لیپوزومی سنتز شده می‌تواند به حاملی مناسب برای عصاره عشقه باشد و در نتیجه باعث ارائه رویکردی بهتر در مسیر بالینی استفاده از این گیاه به عنوان یک دارو و سیستم دارو رسانی نوین معرفی گردد.

واژه‌های کلیدی: لیپوزوم، آهسته رهش، انکپسولیشن عصاره عشقه، میزان زنده‌مانی، Iau Science.

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی در جهان به دلیل عوارض جانبی کم و در دسترس بودن آنها به شدت در حال افزایش است و ایران نیز به عنوان کشوری با تنوع

نویسنده مسئول:

پژوهشکده علوم تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد

پست الکترونیکی: Fhaghirosadat@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۱

خاصیت حمل داروها و بهبود عملکرد آن‌ها مانند لیپوزوم و نیوزوم سعی بر غلبه یا کاهش این مشکلات دارد (۱۳، ۱۴).

در بین نانو ذره‌های حامل دارو، توجه و استفاده از لیپوزوم-ها، که ویزیکول‌های چند لایه، ساخته شده از ترکیب‌های لیپیدی هستند به شدت در حال افزایش است (۱۵). این ذرات دارای توانایی بارگذاری ترکیب‌های لیپوفیل در بین لایه‌های لیپیدی خود و ترکیب‌های هیدروفیل در فضاهای میان مایعی خود هستند. از جمله مزیت‌های استفاده از این ترکیب‌ها می‌توان به محافظت از ترکیب‌های فعال به وسیله لایه‌های لیپیدی موجود در ساختمان لیپوزوم‌ها، اثرگذاری بالا و سمیت پایین، رها سازی آهسته دارو، سازگاری زیستی مناسب و هدف درمانی (Target therapy) آن‌ها اشاره کرد، که همین مزایا سبب جلب توجه محققین در ساخت و استفاده از این ترکیب‌ها در دهه‌های اخیر شده است (۱۵، ۱۶).

لیپوزوم‌ها برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ و توسط Alec Bangham کشف شدند (۱۷). در ابتدا از لیپوزوم‌ها برای مطالعه و بررسی ساختار غشاء‌های زیستی مثل جهت‌گیری لیپیدها در غشای سلولی، انتقال یون‌ها از میان غشای سلول و شناخت ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی غشاء استفاده می‌شد (۱۸)، اما امروزه از این نانو ذره‌ها به دلیل داشتن ویژگی‌های مناسب و سازگار به‌عنوان حامل‌های دارویی در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود (۱۹). فسفولیپیدها و کلسترول از اصلی‌ترین اجزا ساختمان لیپوزوم‌ها هستند (۲۰). غلظت مولی فسفولیپیدها در ساختمان لیپوزوم‌ها متفاوت است و به‌طور معمول بین ۵۰ تا ۷۰٪ ساختمان لیپوزوم‌ها را شامل می‌شوند. فسفاتیدیل کولین (SPC)، رایج‌ترین فسفولیپیدی است که در ساخت لیپوزوم‌ها از آن استفاده می‌شود. کلسترول نیز بین ۳۰ تا ۴۵ درصد ساختمان لیپوزوم‌ها را شامل می‌شود و سبب ایجاد ثبات و پایداری در بین لایه‌های لیپوزوم می‌گردد (۲۱).

با توجه به خواص درمانی ثابت شده گیاه عشقه و مزایای گسترده لیپوزوم‌ها به‌عنوان حامل‌های دارویی، هدف از مطالعه حاضر، طراحی، سنتز و مشخصه یابی سامانه لیپوزومی حاوی عصاره گیاه عشقه و بررسی عدم سمیت لیپوزوم‌های فاقد عصاره بر روی سلول‌های نرمال است.

گیاهی فراوان و هم‌چنین تاریخ غنی در استفاده از گیاهان دارویی از جمله کشورهای است که مصرف گیاهان دارویی در آن رواج دارد (۱). استفاده از گیاهان دارویی با وجود پیشرفت‌های زیاد در ساخت داروهای شیمیایی هم‌چنان بسیار مورد توجه هستند، به‌طوری‌که جزیی جدایی ناپذیر از سیستم درمانی بسیاری از کشورها شده‌اند (۲).

گیاه عشقه با نام معمول Ivy، از جمله گیاهانی با خواص درمانی فراوان است که در درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد دارد. عشقه با نام علمی *Hedera Helix* و از خانواده *Araliaceae* است. این گیاه از جمله گیاهان پیچکی و همیشه سبز است که در بیشتر نقاط جهان پیدا می‌شود (۳). گیاه عشقه دارای ساقه‌ای چوبی است که در هنگام برش عرضی ساقه آن، از داخل به خارج به ترتیب استوانه مرکزی، درون پوست، بافت پارانشیم، بافت کلانشیم و روپوست دیده می‌شود (۴). عشقه دارای برگ‌هایی تناوبی، توپر و با رویه‌ای چرمی شکل است (۵). از این گیاه برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود. برگ‌های این گیاه دارای خاصیت ضد التهابی و ضد درد هستند (۶). هم‌چنین در ترکیه از جوشانده برگ‌های عشقه برای درمان بیماران دیابتی استفاده می‌کنند (۷). این گیاه هم‌چنین دارای اثر درمانی بر روی سلول‌های بافت تنفسی است و از آن در درمان سرماخوردگی همراه با سرفه‌های خشک، برونشیت و آسم نیز استفاده می‌شود (۸). خاصیت ضد افسردگی، ضد قارچی و کرم‌کشی نیز از جمله ویژگی‌های این گیاه است (۹، ۱۰). در آنالیزهای فیتوشیمیایی این گیاه مشخص شده که در عصاره این گیاه ترکیب‌های شیمیایی نظیر استرول‌های اشباع نشده، تانن، ساپونین‌ها، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها وجود دارد که می‌توان برخی از ویژگی‌های این گیاه هم‌چون خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد توموری آن را به این ترکیب‌ها نسبت داد (۱۱).

در میان تمام مزایای استفاده از گیاهان دارویی از جمله در دسترس بودن و ارزان بودن آن‌ها (۱۲) استفاده از این گیاهان و عصاره‌های آن‌ها، با چالش‌هایی نظیر اکسید شدن برخی از مواد مؤثر موجود در عصاره، اثرگذاری نامناسب بر بافت هدف و ناپایداری این ترکیب‌ها در شرایط طبیعی بدن انسان، رو به‌رو است. لذا، علم نانو با ساخت نانو ذره‌های با

روش کار

عصاره گیری

و عصاره گیاه عشقه (۲ میلی گرم) در درمای ۴۵ درجه سانتی گراد و به وسیله روتاری (هایدولف، آلمان) با دور rpm ۱۵۰ در حلال کلروفرم حل گردیدند و سپس فیلم نازک خشک، تحت شرایط خلاء تهیه گردید. عمل هیدراته کردن نیز با اضافه کردن آب مقطر استریل به مدت ۶۰ دقیقه و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انجام گرفت و بعد از آن نانو ذره های ساخته شده به منظور کاهش سایز در سونیکیت حمامی به مدت ۶۰ دقیقه با توان اولتراسونیک ۱۰۰ وات و فرکانس $28 \pm 5\%$ کیلو هرتز قرار گرفتند (۲۲).

مشخصه یابی نانو لیپوزوم های سنتز شده

ویژگی های فیزیکی و شیمیایی نانو لیپوزوم های سنتز شده شامل مقدار عصاره بارگذاری شده، اندازه و پتانسیل زتا، مورفولوژی و رهایش دارو مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین میزان عصاره ی بارگذاری شده

برای تعیین درصد بارگذاری عصاره در لیپوزوم ابتدا باید عصاره های آزاد و بارگیری نشده حذف می گردیدند که برای این منظور از روش جداسازی به وسیله کیسه دیالیز در دمای ۴ درجه سانتی گراد استفاده گردید. سپس لیپوزوم های ساخته شده را با ایزوپروپیل به نسبت های ۱/۱۰، ۱/۲۰ و ۱/۴۰ مخلوط کرده تا دیواره لیپیدی اطراف عصاره شکسته و عصاره عشقه آزاد گردد. سپس میزان جذب عصاره های ساخته شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری و در طول موج ماکزیمم عصاره تعیین گردید و در پایان با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمده و رابطه (۱) درصد بارگذاری عصاره عشقه در لیپوزوم محاسبه گردید (۲۲).

رابطه ۱:

$$\text{مقدار عصاره محصور شده} = 100 \times \frac{\text{مقدار عصاره اولیه}}{\text{مقدار عصاره اولیه}}$$

تعیین اندازه نانو ذرات و ضریب پراکندگی

محدوده توزیع اندازه ذرات و هم چنین پیک اندازه ذرات با استفاده از تکنیک تفرق دینامیکی نور (DLS) تعیین گردید. این روش تکنیکی است برای اندازه گیری ذرات محلول، با اندازه در محدوده میکرومتر تا نانومتر، که به این منظور از دستگاه نانو سایزر (Malvern Instrument مدل Nano zeta sizer ES، انگلستان) استفاده شد. هم چنین برای برای

برای به دست آوردن عصاره گیاه عشقه ابتدا این گیاه در پاییز سال ۱۳۹۹ از شهرستان یزد جمع آوری شد و نوع گونه آن به تأیید متخصصین منابع طبیعی دانشگاه یزد رسید. پس از شستشو، خشک کردن برگ های گیاه به دور از نور خورشید و در سایه انجام گرفت. پس از خشک شدن، برگ ها توسط آسیاب برقی پودر شدند. سپس ۲۰ گرم از پودر حاصله را به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه و به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق (۲۴ درجه سانتی گراد) قرار گرفت. برای فیلتراسیون از فیلتر پارچه ای استفاده شد، محتویات ظرف را در پارچه ریخته و مایع خارج شده از پارچه را جمع آوری گردید. بعد از آن سانتریفیوژ مایع با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت و به یک پلیت شیشه ای منتقل شد. به منظور تیخیر آب کامل مایع، پلیت برای ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد قرار داده شد.

تعیین طول موج ماکزیموم و رسم منحنی استاندارد

برای به دست آوردن طول موج ماکزیموم از روش اسپکتروفوتومتری استفاده شد. ابتدا استوک عصاره عشقه در حلال های PBS و ایزوپروپیل تهیه و با استفاده از آن رقت-های مختلفی از عصاره ساخته شد. سپس جذب ها در بازه ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری (Epoch، آمریکا) خوانش و طیف جذبی برای تمامی غلظت ها رسم گردید. طول موجی که بیش ترین میزان جذب در تمامی غلظت ها را داشت به عنوان طول موج ماکزیموم انتخاب شد. برای رسم منحنی استاندارد، غلظت های متفاوتی از عصاره در حلال های ایزوپروپیل (Merck، آلمان) و PBS (Sigma، آمریکا) تهیه گردید. جذب نوری آن ها در طول موج ماکزیموم و با سه بار تکرار خوانش و سپس منحنی استاندارد رسم و معادله ی خط آن نیز محاسبه گردید.

سنتز سامانه لیپوزومی حاوی عصاره عشقه

به منظور ساخت لیپوزوم های حاوی عصاره عشقه از روش آب پوشانی لایه نازک استفاده گردید. ابتدا فسفاتیدیل کولین (Merk، آلمان) (۷۰٪)، کلسترول (Merk، آلمان) (۳۰٪)

بررسی سامانه لیپوزومی توسط دستگاه طیف سنجی

مادون قرمز (FTIR)

جهت بررسی وجود و یا عدم وجود برهم کنش بین سامانه و عصاره عشقه، سامانه لیپیدی فاقد عصاره و لیپوزومهای حاوی عصاره با استفاده از دستگاه اسپکترومتر FTIR (Bruker، آلمان) مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور نمونه‌ها با نمک پتاسیم بروماید (KBr) مخلوط و فشرده شدند. طیف مادون قرمز در محدوده طول موج cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰ برای بررسی گروه‌های عاملی مورد سنجش قرار گرفت. سپس طیف FTIR لیپوزومهای فاقد عصاره و حاوی عصاره با یکدیگر مقایسه شدند.

بررسی روند رهایش دارو

برای بررسی روند رهاسازی دارو از حامل دارویی در محیط آزمایشگاهی از روش کیسه دیالیز و در شرایط فیزیولوژیک بدن (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۴) به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد. در این روش مقدار ۱ میلی‌لیتر از لیپوزومهای حاوی عصاره عشقه را درون کیسه دیالیز ریخته و سپس کیسه دیالیز را در یک محیط ایزوله حاوی بافر PBS استیرر شد. سپس در فواصل زمانی نیم، ۱، ۲، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعته مقدار مشخصی از بافر PBS اطراف کیسه را برداشته و مقدار جذب آن‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر و طول موج ماکزیموم (۳۲۰ nm) مشخص گردید. لازم به ذکر است که در هر مرحله به همان میزان بافر استفاده شده، بافر جدید هم‌دما جایگزین آن گردید. در آخر با استفاده از منحنی کالیبراسیون به دست آمده در PBS در دما و pH ذکر شده میزان رهایش دارو را در زمان‌های مختلف، حساب و نمودار آن را رسم شد (۲۳،۲۲).

تعیین سمیت سامانه و محاسبه درصد زنده‌مانی

کشت سلول

سلول‌های نرمال رده فیبروبلاست انسان (HFF) از انستیتوی پاستور تهران تهیه شد. سلول‌ها درون فلاسک‌های ۷۵ میلی‌لیتری در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ غنی شده با L-گلوتامین (۲mM) به همراه سرم گاوی ۱۰٪ (Fetal Bovine Serum)، ۱٪ پنی سیلین - استرپتومایسین (۱۰۰ U/mL) و ۱۰۰ μ g/mL پنی سیلین و

تعیین میزان بار سطحی یا همان پتانسیل زتا (Zeta-Potential) که نشان‌دهنده باری است که یک ذره در محیطی خاص کسب می‌کند از دستگاه زتا سائزر (شرکت Malvern Instrument مدل Nano-zeta sizer ES، انگلستان) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. پتانسیل زتا، پارامتری مناسب جهت نمایش میان کشش مغناطیسی بین ذرات است.

اندازه‌گیری سائز و بار سطحی نانولیپوزومها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با تابش نور لیزر با طول موج ۶۵۷ nm تحت زاویه زاویه ۹۰ درجه انجام گردید. آزمایش‌های این مرحله با سه بار تکرار و مدت زمان تقریبی ۳۰ ثانیه برای هر تکرار انجام گرفت. برای اندازه‌گیری بار سطحی نانولیپوزومها از ۱۵۰۰ μ L نمونه با غلظت ۰/۱ mg/mL و برای اندازه‌گیری سائز ذرات از ۶۰۰ μ L نمونه با غلظت‌های ۰/۵ تا ۰/۱ استفاده گردید.

بررسی مورفولوژی نانو ذرات

بهترین روش جهت اطمینان یافتن از شکل و ساختار نانو ذرات، مشاهده میکروسکوپی است. در این مطالعه از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) برای بررسی مورفولوژی نانولیپیدهای سنتز شده از نظر شکل، یکنواختی و زبری استفاده گردید. از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) برای بررسی نمونه‌ها با ابعادی در محدوده نانومتر و هم‌چنین بررسی توپوگرافی سطحی آنان استفاده می‌گردد. این میکروسکوپ مجهز به سوزنی نوک تیز سیلیکونی با قطر کمتر از ۱۰ نانومتر و طول ۲ میکرون است که بر روی اهرمی قرار دارد و در اثر نیروی بین نمونه و سوزن اهرم خم می‌شود و انعکاس نور لیزر بر روی آشکارساز جابه‌جا می‌گردد که از روی این جا به‌جایی می‌توان نیروی برهم‌کنش بین سوزن و سطح نمونه را به‌دست آورد. به‌منظور آماده‌سازی نمونه جهت عکس‌برداری با AFM، ابتدا سوسپانسونی از نمونه با آب با غلظت ۰/۱ mg/mL ساخته شد. سپس به کمک ورقه‌های تازه برش خورده از جنس میکا یک دسته نوار چسبیده به هم ایجاد گردید. یک قطره از سوسپانسیون بر روی میکا ریخته و بعد از ۵ دقیقه با جریان ثابتی از هوا قطره از روی سطح پاک گردید و بعد از آن عکس‌برداری انجام شد.

استرپتومايسين) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، 5% CO₂ و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شدند.

تعیین سمیت سلولی و زنده مانی

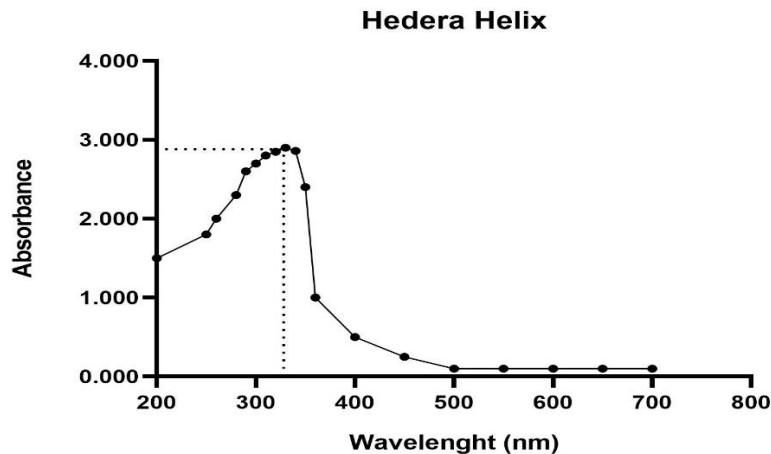
برای بررسی سمیت سلولی از روش MTT استفاده شد. برای انجام این کار ابتدا سلول‌های نرمال HFF به مدت ۴۸ ساعت با غلظت ۱۰^۴ در هر چاهک در پلیت ۹۶ تایی کشت داده شدند. سپس به منظور سنجش عدم سمیت نانو سامانه‌ی سنتز شده، لیپوزوم‌های بدون عصاره را با غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ برای ۴۸ ساعت بر سلول‌ها اثر داده شد.

بعد از آن ۲۰ میکرولیتر از نمک MTT را به هر چاهک اضافه و برای ۴ ساعت انکوباسیون انجام گرفت، سپس ۱۵۰ میکرولیتر DMSO را جهت حل کردن کریستال‌های فورمازان اضافه و به‌وسیله دستگاه الیزا ریدر جذب‌ها را در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش و با استفاده از رابطه ۲ درصد زنده‌مانی سلول‌ها محاسبه گردید.

رابطه ۲:

$$\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه آزمون} \times 100 = \frac{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت - میانگین جذب نوری در گروه کنترل}}{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت}}$$

یافته‌ها



نمودار ۱. طیف جذبی عصاره گیاه عشقه در طول موج ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر

تعیین طول موج ماکسیمم و تهیه منحنی استاندارد

عصاره عشقه

طیف جذبی گیاه عشقه در بازه ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر تهیه و رسم گردید (نمودار ۱). بررسی‌های حاصل از این طیف جذبی نشان داد که عصاره گیاه عشقه در طول موج ۳۲۰ nm بیش‌ترین جذب را دارد.

نمودار استاندارد برای عشقه در حلال PBS خطی راست با

معادله $Y=0/036X-0/1456$ است که دارای ضریب

تعیین (R^2)، ۰/۹۹۹ است (نمودار ۲). این معادله یک معادله

درجه یک بوده و رابطه خطی میان جذب و غلظت را تأیید

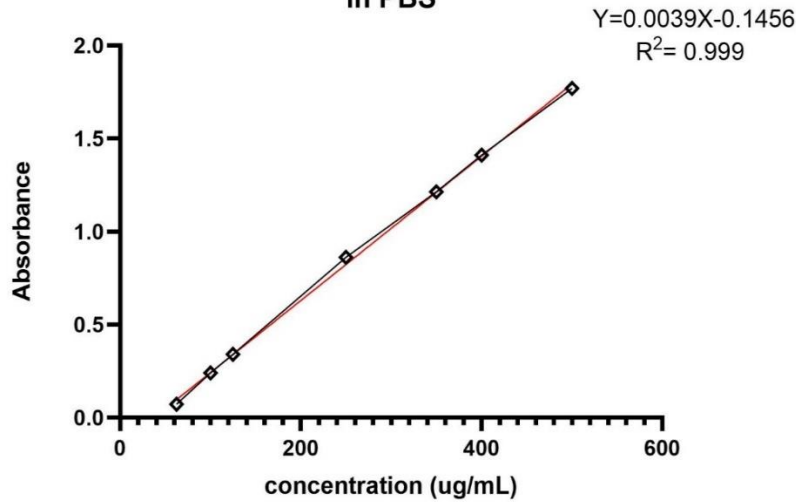
می‌کند. هم‌چنین نمودار استاندارد عشقه در بافر ایزوپروپیل

نیز خطی راست با معادله درجه یک

$Y=0/055X+0/0171$ و ضریب تعیین ۰/۹۹۹ است

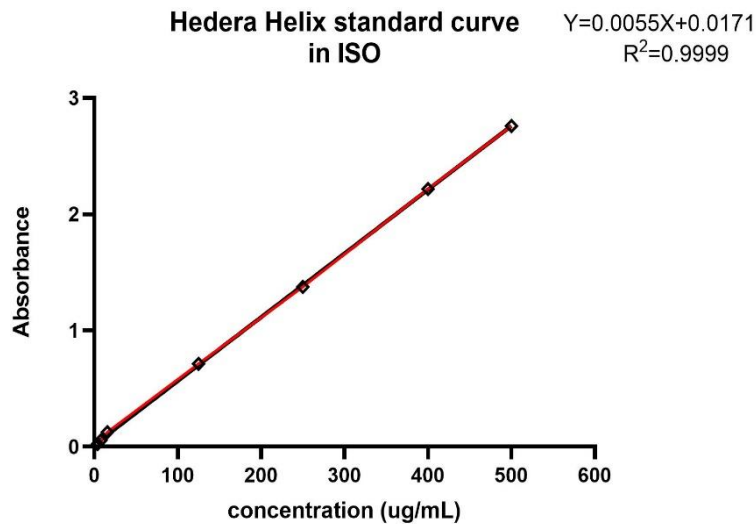
(نمودار ۳).

Hedera Helix standard curve
in PBS



نمودار ۲. نمودار استاندارد عصاره عشقه در بافر PBS

Hedera Helix standard curve
in ISO



نمودار ۳. نمودار استاندارد عصاره عشقه در بافر ایزوپروپیل

بررسی میزان بارگذاری عصاره درون سامانه و الگوی

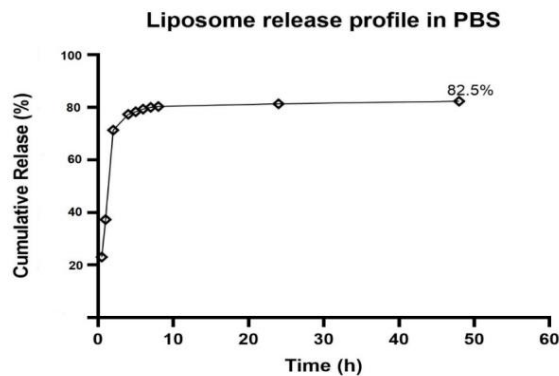
رهایش آن با استفاده از روش اسپکتروفتومتری

میزان لود عصاره عشقه درون سامانه لیپوزومی به وسیله روش اسپکتروفتومتری با استفاده از معادله خط عصاره

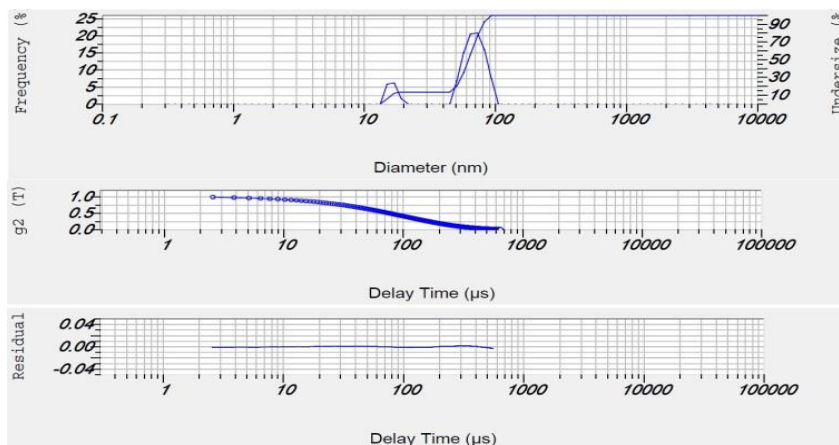
عشقه درون بافر ایزوپروپیل (نمودار ۳) و رابطه ۱، $\pm 1/12$ رهایش آن با استفاده از معادله خط عصاره عشقه در بافر PBS و روش اسپکتروفتومتری (نمودار ۲)، الگوی رهایش دارو مطابق با نمودار ۴ به دست

آمد. الگوی رهایش دارو از سامانه همان‌طور که از نمودار برداشت می‌شود دارای ۲ فاز است. در فاز اول به‌دلیل اختلاف غلظت زیاد دارو میان لیپوزوم و بافر، میزان رهایش دارو زیاد است اما در فاز دوم با کاهش اختلاف غلظت، رهایش دارو آهسته گشته و از شیب نمودار کاسته شده است. حداکثر رهایش دارو از سامانه نیز در طول ۴۸ ساعت ۸۲/۵ درصد است.

اندازه و پتانسیل زتای ذرات نانو سامانه ی لیپوزومی همان‌طور که ذکر شد اندازه نانو سامانه‌های سنتز شده به‌روش DLS تعیین گردید. نتایج حاصل از DLS (شکل ۱) نشان داد که اندازه نانو حامل‌های لیپیدی سنتز شده در حدود ۴۸/۶ نانومتر است. هم‌چنین میزان شاخص پراکندگی نیز ۰/۴۰۲ تعیین شد. آزمایش‌ها در این مرحله با سه بار تکرار انجام شد.



نمودار ۴. نمودار رهایش عصاره عشقه از سامانه لیپوزومی طی ۴۸ ساعت به‌وسیله روش اسپکتروفتومتری.



Calculation Results

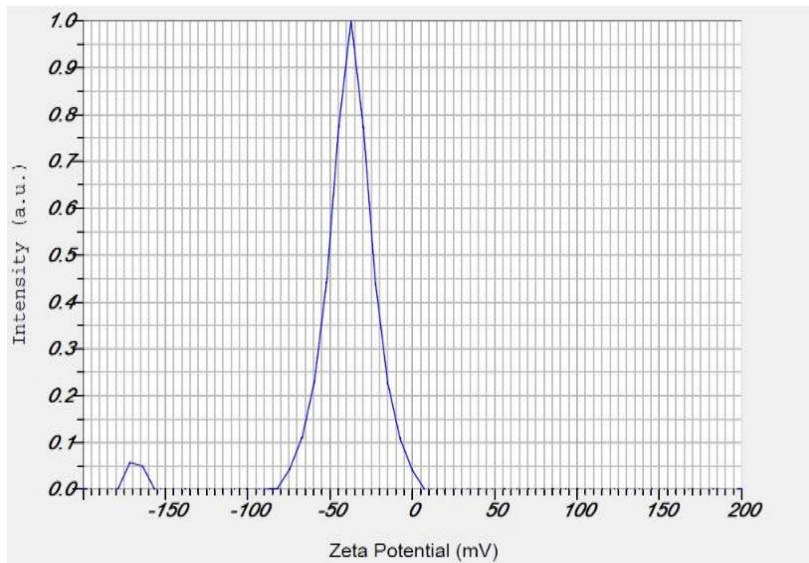
Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	0.14	15.3 nm	1.3 nm	15.2 nm
2	0.86	65.7 nm	11.2 nm	67.6 nm
3	--	-- nm	-- nm	-- nm
Total	1.00	58.9 nm	20.1 nm	67.6 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 48.6 nm
PI : 0.402

شکل ۱. نمودار و جدول اندازه نانو سامانه‌های سنتز شده بر حسب نانومتر به‌وسیله دستگاه نانوسایزر.

پتانسیل زتای نانو حامل های سنتز شده با دستگاه زتا سائزر اندازه گیری گردید. نتایج حاصل از این دستگاه نشان داد که میزان بار سطحی نانو لیپیدهای سنتز شده به طور میانگین $1/72 \pm 37/3$ mV است که نشان می دهد نانو سامانه حاصل از نوع آنیونی است که سمیت کمتری برای سلول ها دارد (شکل ۲).



Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-37.3 mV	-0.000289 cm ² /Vs
2	--- mV	--- cm ² /Vs
3	--- mV	--- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -37.3 mV

Electrophoretic Mobility Mean : -0.000289 cm²/Vs

شکل ۲: نمودار و جدول تعیین بار میزان بار سطحی سامانه ی لیپیدی بر حسب mV.

2858 cm⁻¹ نیز مرتبط با گروه عاملی -CH₂ است که در سامانه بعد از بارگذاری نیز عینا تکرار شده است.

به طور کلی، از مقایسه نمودارهای FTIR می توان به این نتیجه رسید که حضور عصاره در سامانه سبب ایجاد پیک اضافه که بیانگر تشکیل ساختاری جدید یا تجزیه ترکیب- های موجود در سامانه، نگردیده است. پس بارگیری عصاره در سامانه هیچ برهم کنش غیر طبیعی ایجاد نکرده است.

تصویربرداری از نانو ذرات با میکروسکوپ نیروی اتمی
با توجه به تصاویر (شکل ۵) به دست آمده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) می توان به این نتیجه رسید که نانولیپوزوم های حاوی عصاره عشقه دارای شکلی کروی با محدوده های به طور کامل مشخص هستند. این تصاویر نشان

بررسی نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR) نانو سامانه لیپوزومی

به منظور بررسی پایداری نانو حامل سنتز شده و عدم برهم کنش سامانه و عصاره از تکنیک FTIR استفاده گردید. با توجه به طیف های به دست آمده چنین استنباط می شود که در سامانه خالی (شکل ۳)، پیک شاخص 3440 cm⁻¹ است که نشان دهنده گروه عاملی الکی است که همین پیک با اختلافی جزئی به میزان 3305 cm⁻¹ در لیپوزوم حاوی عصاره (شکل ۴) تکرار شده است. پیک شاخص 2952 cm⁻¹ نیز شاهدهی بر وجود گروه عاملی آلکانی با پیوند کششی C-H است که این پیک نیز در سامانه حاوی عصاره با اختلافی جزئی به میزان 2956 cm⁻¹ تکرار شده است. پیک شاخص

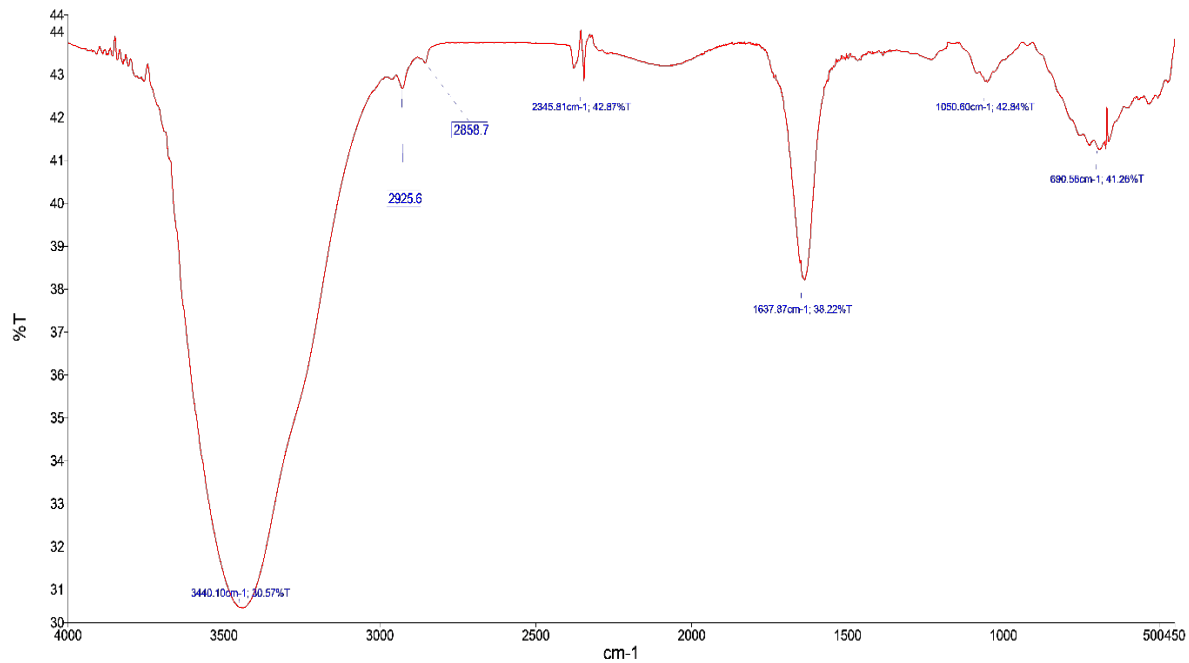
می دهد که نانو ذرات از لحاظ مورفولوژی (کروی، صافی، کلوخه نشدن) طبیعی هستند.

بررسی اثر سمیت نانولیپیدهای ساخته شده بر روی

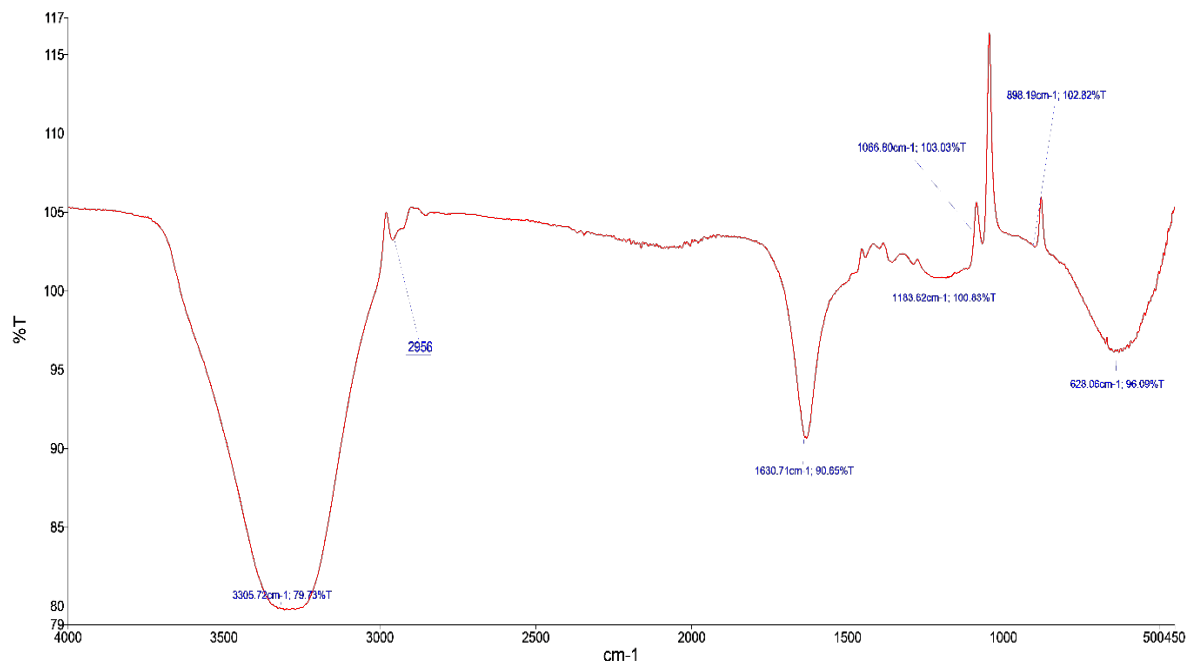
سلول های HFF

نتایج حاصل از تست MTT بر روی سلول های نرمال نشان می دهد که سامانه لیپوزومی ساخته شده دارای سمیت

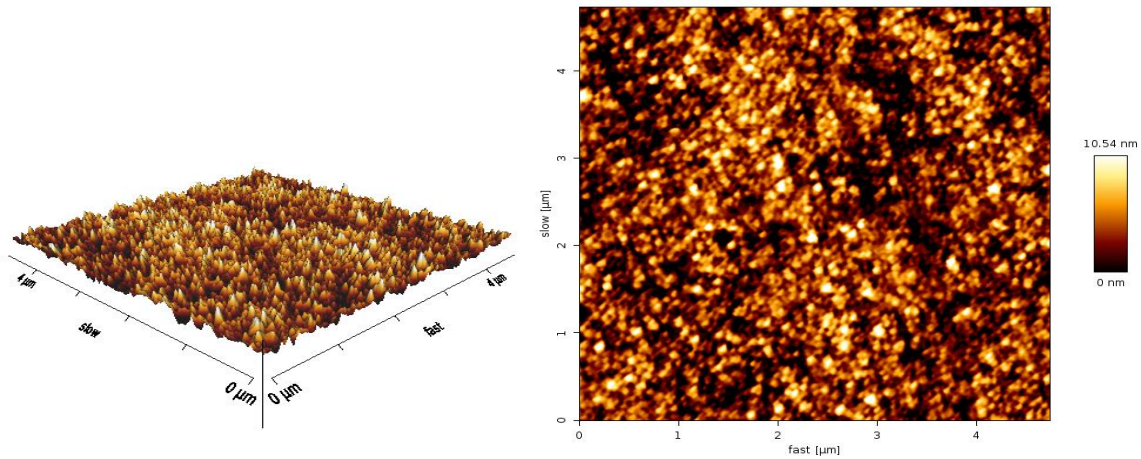
بسیار ناچیز بر روی سلول های طبیعی HFF است چرا که بر اثر تیمار این سلول ها در ۴۸ ساعت و تحت تأثیر غلظت های ۱، ۰.۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر از سامانه فاقد عصاره، میزان زنده مانده سلول ها به ترتیب برابر است با ۱۰۰، ۹۸، ۹۸، ۹۷ و ۹۷ درصد است که نشان از سمیت پایین نانو لیپوزوم های سنتز شده دارد.



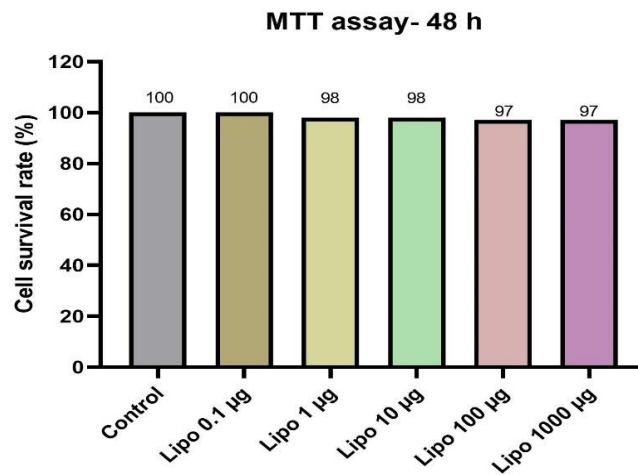
شکل ۳. طیف FTIR لیپوزوم بلاتک



شکل ۴. طیف FTIR لیپوزوم حاوی عصاره



شکل ۵. تصاویر حاصل از عکسبرداری AFM از نانو سامانه لیپوزومی حاوی عصاره عشقه.



نمودار ۵. نتایج حاصل از تست MTT بعد از ۴۸ ساعت تأثیر سامانه لیپوزومی فاقد عصاره با غلظت‌های مشخص بر روی رده سلولی HFF جهت بررسی عدم سمیت لیپوزوم‌های ساخته شده بر روی سلول‌های نرمال.

اندازه‌ایی در حدود $48/6 \text{ nm}$ و بار $1/72 \text{ mV} \pm 3/37$ هستند که این بار منفی می‌تواند سبب افزایش پایداری نانولیپیدهای سنتز شده گردد چرا که بار منفی، مانع از رسوب و اتصال لیپوزوم‌ها به یکدیگر می‌شود (۲۶،۲۵). هم-چنین بررسی و مقایسه طیف‌های FTIR سامانه فاقد عصاره با لیپوزوم‌های حاوی عصاره نشان داد که عصاره با لیپوزوم‌ها برهم‌کنش نداشته و عصاره، ساختار و موقیت دارویی خود را پس از بارگذاری درون نانو حامل‌ها حفظ کرده است. از تصاویر حاصل از میکروسکوپ انرژی اتمی (AFM) نیز می‌توان به این نتیجه رسید که نانوذره‌ها علاوه بر اندازه و توزیع مناسب بار، دارای مورفولوژی نرمال هستند. نتایج حاصل از تست MTT نیز نشان داد که نانولیپوزوم‌های سنتز شده

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که نانو لیپوزوم‌های سنتز شده، توانایی بارگذاری $1/12 \pm 82/67$ درصد از عصاره عشقه را در خود دارند. هم‌چنین دارای روندی، آهسته رهش برای رهایی دارو هستند، چرا که بعد از ۴۸ ساعت $82/5$ درصد از عصاره از سامانه جدا شد که این عدد حداکثر میزان رهش دارو ۴۸ ساعت بود. کلسترول از جمله عوامل مؤثر در میزان رهش دارو از سامانه است. همان‌طور که Haghirsadat و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نشان دادند با افزایش میزان کلسترول در ساختار لیپوزوم‌ها میزان رهش دارو افزایش می‌یابد (۲۴). هم‌چنین با بررسی‌ها به‌وسیله DLS مشخص گردید که نانولیپوزوم‌های سنتز شده در این پژوهش دارای

دارای سمیت بسیار پایینی بر روی سلول‌های نرمال HFF هستند به طوری که تحت تیمار این سلول‌ها با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از لیپوزوم‌های فاقد عصاره گیاه عشقه، میزان زنده‌مانی سلول‌ها برابر با ۹۷ درصد بود.

تاکنون مطالعه‌های زیادی بر لیپوزوم‌ها به‌عنوان حامل‌های دارویی صورت گرفته است. برای مثال Valenti و همکارانش در سال ۲۰۰۱، لیپوزوم‌های تک لایه و چند لایه حاوی اسانس سانتولیا سنتز کردند که اندازه، شاخص پراکندگی و درصد بارگذاری در لیپوزوم‌های چند لایه و تک لایه را به ترتیب $63 - 467$ nm، $0.15 - 0.33$ و $80 - 78/5$ درصد گزارش کردند (۲۶). میزان بارگذاری بیش‌تر عصاره و اندازه کوچک‌تر لیپوزوم‌ها از جمله مزیت‌های مطالعه ما نسبت به این مطالعه بود.

در سال ۲۰۰۹ نیز Detony و همکارانش لیپوزوم‌های چند لایه‌ای با اندازه 937 nm، حاوی اسانس Zanthoxylum tingoassuiba با درصد هم‌پوشانی $43/7$ درصد را با روش فیلم نازک سنتز کردند (۲۷). میزان هم‌پوشانی بیش‌تر از جمله مزیت‌های مطالعه حاضر نسبت به مطالعه Detony بود.

Celia و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۵ نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس ترنج با پتانسیل زتای -6 و اندازه 186 nm سنتز کردند که سبب افزایش حلالیت اسانس و در نتیجه افزایش خاصیت ضد سرطانی آن گردید (۲۸).

در سال ۲۰۱۴ نیز Taceo و همکارانش نیز ساخت نانو حامل‌هایی حاوی اسانس آویشن با میزان هم‌پوشانی 80 درصد و اندازه در محدوده 580 تا 3200 را گزارش کردند (۲۹).

Haghjoo و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۵ با استفاده از غلظت‌های مختلف فسفاتیدیل کولین و کلسترول لیپوزوم‌هایی با اندازه بین 81 تا 94 نانومتر، شاخص پراکندگی $0/3$ درصد و درصد هم‌پوشانی $68/83$ به‌منظور بارگیری اسانس گزنه سنتز کردند (۳۰).

Bashiri و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۵ به بررسی میزان پایداری نانو ذرات حاوی بتا کاروتن با اندازه 64 nm در گذشت زمان پرداختند. $89/77$ درصد بیش‌ترین میزان هم-

پوشانی در بهترین فرمول ساخته شده به‌وسیله Bashiri بود (۳۱).

Khosfi و همکارانش در سال ۲۰۱۵ نیز، لیپوزوم‌های حاوی اسانس آویشن شیرازی با درصد هم‌پوشانی $54/4$ درصد سنتز کردند. آن‌ها هم‌چنین گزارش کردند که لود اسانس آویشن درون نانو حامل‌های لیپوزومی سبب افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌گردد. Khosfi در مطالعه خود نیز از میزان محتوای فسفاتیدیل کولین به‌کار رفته در ساختمان لیپوزوم‌ها به‌عنوان فاکتوری مهم در درصد ریزپوشانی آن‌ها اشاره کرد (۳۲).

در سال ۲۰۱۵، Haiying Cui و همکارانش نیز گزارش کردند که موفق به سنتز نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس میخک با اندازه‌ای در محدود $78/3$ تا $156/1$ نانومتر، شاخص پراکندگی $0/196$ ، بار سطحی $24/5-$ و میزان هم-پوشانی $20/41$ شده‌اند (۳۳).

Gharah naghdeh و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۷، ساخت نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره مریم گلی با درصدهای مختلفی از فسفاتیدیل کولین و کلسترول و با اندازه‌ای بین 82 تا 88 نانومتر، شاخص پراکندگی $0/390$ و درصد هم-پوشانی بالای 70 درصد را گزارش کردند (۳۴).

در سال ۲۰۱۳ نیز Hosseini و همکارانش نیز، نانوذراتی بر پایه کیتوزان سنتز کردند که بر طبق گزارش آن‌ها این نانو ذرات توانایی انکپسوله کردن 34 درصد از اسانس پونه کوهی را داشتند (۳۵).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، سامانه لیپوزومی به‌منظور بارگذاری عصاره گیاه عشقه در جهت پایداری و افزایش خواص درمانی ثابت شده آن سنتز گردید. با توجه به قیمت مناسب و عوارض کم-تر داروهای گیاهی نسبت به داروهای شیمیایی نیاز سیستم-هایی جهت تسهیل استفاده از این ترکیب‌ها و در نتیجه جایگزینی با سیستم‌های درمانی متداول امروز بیش از پیش مورد توجه است. در این پژوهش، پس از عصاره‌گیری از گیاه عشقه، سامانه لیپوزومی به‌عنوان حامل این عصاره سنتز و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن مانند اندازه، شاخص پراکندگی، بار سطحی، میزان درون پوشانی، الگوی رهایش و

عدم برهم‌کنش با عصاره با چند آزمایش مشخص و سپس تأیید گردید. با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان بیان داشت که می‌توان از سامانه سنتز شده با داشتن خواص فیزیکوشیمیایی مناسب در مسیرهای بالینی و سیر درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده کرد، اگر چه که انجام سایر تست‌های تکمیلی از جمله تست‌های آنتی‌باکتریال و آنتی-اکسیدان پیش از هر گونه استفاده از این سامانه پیشنهاد می‌شود.

1. Kibiti CM, Afolayan AJ. Herbal therapy: A review of emerging pharmacological tools in the management of diabetes mellitus in Africa. *Pharmacognosy magazine*. 2015;11(Suppl 2):S258.
2. Liu W, Ge T, Pan Z, Leng Y, Lv J, Li B. The effects of herbal medicine on epilepsy. *Oncotarget*. 2017;8(29):48385.
3. Barakat F, Aboee-Mehrizi 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). *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2019.
4. Bezruk I, Marksa M, Georgiyants V, Ivanauskas L, Raudone L. Phytogeographical profiling of ivy leaf (*Hedera helix* L.). *Industrial Crops and Products*. 2020;154:112713.
5. Pop CE, Parvu M, ARSENE AL, Parvu AE, Vodnar DC, Tarcea M, et al. Investigation of antioxidant and antimicrobial potential of some extracts from *Hedera helix* L. *gut*. 2017;4(6):11.
6. Roşca-Casian O, Mircea C, Vlase L, Gheldiu A-M, Teuca DT, Pârvu M. Chemical composition and antifungal activity of *Hedera helix* leaf ethanolic extract. *Acta Biologica Hungarica*. 2017;68(2):196-207.
7. Hasimun P, Adnyana IK. Zingiberaceae family effects on alpha-glucosidase activity: implication for diabetes. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes: Elsevier*; 2019. p. 387-93.
8. Barnes LA, Leach M, Anheyer D, Brown D, Carè J, Lauche R, et al. The effects of *Hedera helix* on viral respiratory infections in humans: A rapid review. *Advances in integrative medicine*. 2020;7(4):222-6.
9. Kim HK, Na SS, Kim HH. Effects of Horticultural Therapy Programs on Depression and Self-esteem in Released-Convicts. *Journal of People, Plants, and Environment*. 2017;20(2):143-8.
10. Adil A, Khan SS, Naeem S, Ikram R, Jaffer N. Evaluation of acute and chronic hepatoprotective activity of *Hedera helix* L. Aqueous leaf extract on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat model. *Pak J Phytopathol*. 2017;34:1-15.
11. Sun H, Li F, Xu Z, Sun M, Cong H, Qiao F, et al. De novo leaf and root transcriptome analysis to identify putative genes involved in triterpenoid saponins biosynthesis in *Hedera helix* L. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182243.
12. Akhlaghi M, Ebrahimpour M, Ansari K, Parnian F, Zarezadeh Mehrizi M, Taebpour M. Synthesis, study and characterization of nano niosomal system containing *Glycyrrhiza glabra* extract in order to improve its therapeutic effects. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2021;11(42):65-82.
13. Haghirsadat F, Azhdari M, Kalantar SM, Naderinezhad S, Teymourizadeh K, Yazdani M, et al. Strategy of Improvements in the therapeutic index of medicinal herbs of Iranian indigenous: Synthesis and characterization of phospholipid lipid-based vesicles in incorporated *Trachyspermum copticum*. *SSU_Journals*. 2016;24(6):468-78.
14. Salem MZ, Zidan YE, Mansour MM, El Hadidi NM, Elgat WAA. Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial woods deteriorated by five common mold fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2016;106:88-96.
15. Sherry M, Charcosset C, Fessi H, Greige-Gerges H. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *Journal of liposome research*. 2013;23(4):268-75.
16. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in pharmacology*. 2015;6:286.

17. Pandey H, Rani R, Agarwal V. Liposome and their applications in cancer therapy. *Brazilian archives of biology and technology*. 2016;59.
18. Shahbazian S, Akbarzadeh A, Torabi S, Omid M. Anti-cancer activity of pegylated liposomal trans-anethole on breast cancer cell lines MCF-7 and T47D. *Biotechnology letters*. 2015;37(7):1355-9.
19. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *International journal of nanomedicine*. 2015;10:975.
20. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2015;10(2):81-98.
21. Alavi M, Karimi N, Safaei M. Application of various types of liposomes in drug delivery systems. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2017;7 (1):3.
22. 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_Journals*. 2018;25 (11):853-64.
23. Malmir and et al .Synthesis and optimization of niosomal carriers containing doxorubicin in order to achieve a final formulation with high potential in cancer cells temperature and acidity. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2019.
24. Danhier F, Feron O, Pr at V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of controlled release*. 2010;148(2):135-46.
25. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12 (2):255-64.
26. Valenti D, De Logu A, Loy G, Sinico C, Bonsignore L, Cottiglia F, et al. Liposome-incorporated *Santolina insularis* essential oil: preparation, characterization and in vitro antiviral activity. *Journal of liposome research*. 2001;11 (1):73-90.
27. Detoni C, Cabral-Albuquerque E, Hohlemweger S, Sampaio C, Barros T, Velozo E. Essential oil from *Zanthoxylum tingoassuiba* loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents. *Journal of microencapsulation*. 2009;26 (8):684-91.
28. 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 and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;112:548-53.
29. Tao F, Hill LE, Peng Y, Gomes CL. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Science and Technology*. 2014;59 (1):247-55.
30. Haghjoo S, Ghanbarzadeh B, Hamishekar H, Asni Ashari S, Dehghannia J. Evaluation of Colloidal and Antioxidant Properties of Nanoliposome Loaded with *Urtica dioica* L. Extract. *Innovative Food Technologies*. 2015;2 (3):11-23.
31. Bashiri S, GHANBARZADEH B, HAMISHEHKAR H, DEHGHANNIA J. Beta-Carotene loaded nanoliposome: effects of gama-oryzanol on particle size stability and encapsulation. 2015.
32. Ebrahimi Khosfi M, Khosravi Darani K, Hosseini H, Arabi Sh KFR, Kohi Kamali P. Production of nanoliposomes containing essential oil of *Boiss Zataria multiflora* by response surface method. *Nano Meghyas*. 2014;1 (2):119-28.
33. Cui H, Zhao C, Lin L. The specific antibacterial activity of liposome-encapsulated Clove oil and its application in tofu. *Food Control*. 2015;534-6:128.

34. Gharenaghadeh S, Samadlouie H, Sowti M, Hamisekar H, Mokaram R. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of Salvia essential oil nano liposome (Salvia multicaulis). Journal of Food Science and Technology. 2017;14 (62):271-82.

35. Hosseini SF, Zandi M, Rezaei M, Farahmandghavi F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. Carbohydrate polymers. 2013;95 (1):50-6.