



Synthesis, study and characterization of nano niosomal system containing Glycrrizha glabra extract in order to improve its therapeutic effects

Milad Akhlaghi¹, Marziyeh Ebrahimpour², Kazem Ansari³, Fatemeh Parnian⁴, Maryam Zarezadeh Mehrizi⁵, Mohammad Taebpour⁶, Bibi fatemeh Haghrosadat^{2*}

1- Department of clinical biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

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

3- Nano-Biotech Foresight Company Biotechnology Campus, Science & Technology Park of Yazd, Yazd, Iran

4- Department of Medical Biotechnology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

5- Faculty of Dentistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

6- Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical sciences, Yazd, Iran

Abstract

Aim and Background: The use of medical herbs and their extracts because of their low side effects is increasing all over the world. Glycrrizha glabra is one of these plants with proven therapeutic effects, but conventional prescribing of them faces challenges. Using of drug delivery nanocarriers such as Niosome is one of the new strategies to overcome these challenges. The aim of this study was to synthesis and characterization of nano niosomal system containing Glycrrizha glabra extract in order to improve its therapeutic effects.

Material and methods: Nanoniosome were synthesized using Tween-60 (70%) and cholesterol (30%) by thin film method and by using inactive method, Glycrrizha glabra extract was loaded into them. Their physico-chemical features were assayed by Zeta sizer, AFM and FTIR and at last the release rate of extract and toxicity of Nanoniosome on normal cells were assayed.

Results: Data showed that the synthesized nanoniosomes are anionic with -21.2 ± 1.64 mV zeta potential, size of 90.7 ± 3.6 nm, dispersion index of 0.53 and 55.36% encapsulation efficiency. The nanoniosomal system presented slow and controlled release of the extract. AFM and FTIR analysis demonstrated that nanoparticles have appropriate morphology and the system does not interact with the extract. The results of MTT assay also approved that the system has not toxicity effects on normal cells.

Conclusion: The results indicated that synthesized nanoniosome vesicles because of their appropriate features, could be good carrier for delivering of Glycrrizha glabra extract and thus improve its therapeutic effects.

Key words: Niosome, Slow release, Glycrrizha glabra Encapsulation, Cell survival, IAU science.

Corresponding author:

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

برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

تولید، بررسی و مشخصه‌یابی نانو سامانه نیوزومی حاوی

عصاره شیرین بیان به منظور بهبود خواص درمانی آن

میلاذ اخلاقی^۱، مرضیه ابراهیم پور^۲، کاظم انصاری^۳، فاطمه پرنیان^۴، مریم زارع زاده مهریزی^۵محمد طائب پور^۴، بی بی فاطمه حقیرالسادات^{۲*}

- ۱- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
- ۲- مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
- ۳- شرکت ریز فناوران فردانگر، مرکز زیست فناوری، پارک علم و فناوری، یزد، ایران
- ۴- گروه زیست فناوری، پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
- ۵- دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از گیاهان دارویی و عصاره آن‌ها به دلیل عوارض جانبی کم در سرتاسر دنیا در حال افزایش است. شیرین بیان از جمله این گیاهان با خواص درمانی ثابت شده است اما استفاده از آن با روش‌های سنتی با چالش‌هایی رو به رو است. استفاده از نانوحامل‌های دارویی مثل نیوزوم از جمله استراتژی‌های نوین برای غلبه بر این چالش‌ها است. هدف از این مطالعه، تولید و بررسی خواص نانو نیوزوم‌های حاوی عصاره شیرین بیان به منظور ارتقاء خواص درمانی آن است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پس از عصاره‌گیری از ریشه گیاه شیرین بیان به روش سوکسله، ویزیکول‌های نیوزومی با استفاده از توئن-۶۰ (۷۰٪) و کلسترول (۳۰٪) به روش فیلم نازک سنتز و عصاره شیرین بیان به صورت غیرفعال در آن بارگذاری گردید. سپس با استفاده از دستگاه‌های زتا سایزر، AFM و FTIR به ترتیب اندازه و بار، مورفولوژی و عدم برهم کنش سامانه با نانو ذره تعیین و در آخر میزان رهایش عصاره در دمای ۳۷ °C و عدم سمیت آن بر روی سلول‌های نرمال با استفاده از تست MTT مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: سامانه سنتز شده، آنیونی با بار سطحی $1/64 \pm 21/2$ mV - اندازه $3/6 \pm 90/7$ نانومتر، شاخص پراکندگی $0/53$ و میزان درون‌گیری $55/36$ ٪ است. هم‌چنین سامانه ساخته شده از نوع آهسته رهش و با حداکثر میزان رهایش $57/3$ درصد در ۴۸ ساعت است. بررسی‌های AFM و FTIR نیز نشان می‌دهد که نانوذرات دارای مورفولوژی مناسب است و سامانه با عصاره بر هم کنشی نداشته است. هم‌چنین نتایج تست MTT نشان دهنده عدم سمیت سامانه بر روی سلول‌های نرمال بود.

بحث: در این مطالعه عصاره شیرین بیان درون حامل‌های نانو نیوزومی بارگذاری و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت. بررسی داده‌ها نشان داد که سامانه آهسته رهش و آنیونی سنتز شده بدون تغییر در ماهیت عصاره و اثر جانبی بر روی سلول‌های نرمال سبب افزایش پایداری عصاره گردیده است.

نتیجه‌گیری: سامانه نیوزومی سنتز شده، می‌تواند حامل مناسبی برای عصاره شیرین بیان باشد و سبب افزایش پایداری و در نتیجه بهبود عملکرد آن گردد.

واژه‌های کلیدی: نیوزوم، آهسته رهش، انکپسولیشن شیرین بیان، درصد زنده‌مانی، IAU science

مقدمه

نویسنده مسئول:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد

پست الکترونیکی: Fhaghirosadat@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۰۱

باعث ایجاد خواص درمانی آن مانند خاصیت ضدتوموری، ضد التهابی، ضد ویروسی و آنتی‌اکسیدانی آن می‌گردند. هم‌چنین مطالعه‌های زیادی تأثیر شیرین‌بیان و عصاره آن را بر سلول‌های دستگاه تنفسی و بهبود بیماری‌های دستگاه تنفسی تصدیق می‌کند (۱۸،۱۹).

امروزه خواص درمانی مناسب و اثرهای زیان‌بار کم داروهای گیاهی، مصرف آن‌ها در سرتاسر دنیا را افزایش داده اما استفاده آن‌ها به شکل سابق با مشکلاتی همانند اثرگذاری بر بافت غیر هدف و یا اثرگذاری کم بر بافت هدف و هم‌چنین اکسید شدن برخی مواد مؤثر موجود در عصاره و یا اسانس گیاه روبه‌رو است که همین امر نیاز به استفاده از نانو حامل‌های دارویی نظیر لیپوزوم و نیوزوم روشن می‌سازد که بتواند این دشواری‌ها را رفع و استفاده از داروهای گیاه را تسهیل بخشد و باعث اثرگذاری بهتر و بهبود عملکرد درمانی گیاهان دارویی شود (۲۰،۲۱).

نیوزوم برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ در صنعت آرایشی به‌عنوان یک فاکتور کاربردی معرفی شد و سپس کاربرد آن برای حامل‌های دارو مورد بررسی قرار گرفت. نیوزوم‌ها حامل‌های لیپیدی هستند که از تجمع سورفاکتانت‌های غیریونی در محیط آبی شکل گرفته و ساختار دو لایه‌ای محصور را ایجاد می‌کنند و می‌توان به‌عنوان حامل داروهای چربی‌دوست و آب‌دوست از آن‌ها استفاده شود. در بسیاری از موارد برای تهیه نیوزوم از کلسترول و مشتقات آن استفاده می‌شود. از جمله مزایای این نانو حامل دارویی می‌توان به طراحی آسان، زیست‌سازگاری، انعطاف‌پذیری و رهایش آهسته دارو اشاره کرد (۲۲،۲۳).

باتوجه‌به استفاده گسترده و ثابت شده از عصاره شیرین‌بیان در درمان بسیاری از بیماری‌ها و هم‌چنین مزایای نیوزوم‌ها به‌عنوان نانو حامل‌های دارویی، هدف از مطالعه حاضر، ساخت و مشخصه‌یابی نانو حامل‌های نیوزومی حاوی عصاره شیرین‌بیان به‌روش آب‌پوشانی لایه نازک و بررسی سمیت نانو نیوزوم‌ها بر روی سلول‌های نرمال بدن انسان است.

گیاهان دارویی در ترکیب‌های شیمیایی خود دارای مقدار مشخصی ماده مؤثره هستند که می‌تواند در پیشگیری، تشخیص، کمک به روند درمانی و در مجموع حفظ حالت فیزیولوژیک طبیعی بدن کمک کنند (۳-۱). طب سنتی و استفاده از آن از ابتدای تاریخ مورد توجه انسان‌ها بوده است. در بسیاری از کشورها و ملیت‌ها با فرهنگ‌های مختلف استفاده از گیاهان برای درمان بسیاری از بیماری‌ها و افزایش سلامت جامعه رایج است (۴،۵،۶). مطالعه‌های اخیر نتایج سودمند استفاده از گیاهان در درمان و پیش‌گیری بیماری‌هایی هم‌چون دیابت (۷،۸)، آترواسکلروزیس (۹،۱۰)، بیماری‌های عصبی (۱۱، ۱۲) و سرطان (۱۳) را تأیید می‌کند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان از جمله مکانیسم‌های مهم آن‌ها است که در درمان بسیاری از بیماری‌ها می‌توان از آن استفاده کرد (۱۴،۱۵). مصرف گیاهان دارویی و عصاره آن‌ها به دلیل قیمت مناسب، عوارض جانبی کم و هم‌چنین فراوانی و در دسترس بودنشان در حال افزایش است (۱۶). هم‌چنین منشأ طبیعی داروهای گیاهی سبب سازگاری بهتر آن‌ها با ارگانسیم‌های زنده از جمله بدن انسان نسبت به داروهای شیمیایی می‌گردد (۱۷). شیرین‌بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* که دارای ریشه یونانی و از دو کلمه glykos به معنای شیرین و rhiza به معنای ریشه مشتق شده است. در هند به آن *mulaithi* و در خاورمیانه به آن شیرین‌زبان (*locarice*) می‌گویند. این گیاه از خانواده Fabaceae است که طول آن به یک متر می‌رسد. دارای برگ‌های پنبه‌ای حدود ۷-۱۵ سانتی‌متر با ۹ تا ۱۷ کاسبرگ و با گل‌هایی با طول ۸/۰ تا ۲/۱ سانتی‌متر و رنگ بنفش تا آبی کم‌رنگ مایل به سفید است. ریشه و ساقه‌های زیرزمینی این گیاه مصرف دارویی دارند. بررسی‌های فتوشیمیایی نشان می‌دهد که گلیسیریزین که یک ترکیب تری‌ترپنوئید است باعث ایجاد طعم شیرین ریشه این گیاه و هم‌چنین ترکیب‌های فلاونوئید مثل لیکریتین و ایزولیکریتین سبب ایجاد رنگ زرد این گیاه می‌شوند که همین ترکیب‌های شیمیایی مثل فلاونوئیدها و ساپونین‌ها

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری

پس از تهیه گیاه شیرین‌بیان و قبل از عصاره‌گیری، نوع و گونه گیاهی آن به تأیید کارشناسان حوزه گیاه‌شناسی دانشگاه یزد رسید. عصاره‌گیری از ریشه گیاه شیرین‌بیان انجام گرفت که برای این منظور، ابتدا ریشه گیاه در درمای محیط در سایه و به‌دور از نور خورشید خشک گردید و سپس با استفاده از آسیاب برقی، پودر آن به‌دست آمد. به‌منظور عصاره‌گیری از روش سوکسله استفاده گردید. سوکسله از رایج‌ترین روش‌های عصاره‌گیری در آزمایشگاه‌ها است. دستگاه سوکسله شامل ۴ قسمت عمده گرم‌کن، بالن، محفظه استخراج و کندانسور است. ابتدا ۵۰ گرم از پودر حاصل شده داخل محفظه کارتوش فشرده شد و سپس درون ستون سوکسله قرار داده شد. سپس ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ در درون بالن ریخته و سوکسله به آن متصل گردید، در آخر با نصب کندانسور و ورودی و خروجی آب عملیات عصاره‌گیری انجام گرفت. بعد از کامل شدن سیکل ششم، عصاره درون بالن را توسط کاغذ واتمن صاف گردید و به‌منظور خشک شدن و تبخیر حلال، عصاره درون ظرف‌های شیشه‌ای و به‌دور از نور خورشید در دمای محیط قرار گرفت. در آخر عصاره به‌دست آمده وزن شد و تا زمان استفاده درون یخچال قرار گرفت.

تعیین طول موج ماکسیموم و رسم منحنی استاندارد

از روش اسپکتروفوتومتری به‌منظور تعیین طول موج ماکسیموم عصاره شیرین‌بیان استفاده گردید. در این روش ابتدا محلول استوک عصاره شیرین‌بیان با غلظت ۱ mg/mL در حلال PBS (Sigma، آمریکا) و ایزوپروپیل (Merck، آلمان) ساخته شد. سپس با استفاده از محلول استوک، غلظت‌های مختلفی از عصاره (۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲٫۵، ۳۰، ۱۵ و ۷٫۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با استفاده از روش‌های

رقت‌سازی درون حلال‌های PBS و ایزوپروپیل ساخته شد. سپس طیف جذبی به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (Epoch، آمریکا) در محدود ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر برای تمام رقت‌ها خوانش شد. طول موج ماکسیموم، طول موجی بود که بیش‌ترین مقدار جذب در آن در تمام رقت‌ها صورت پذیرفته شده بود. سپس با استفاده از جذب‌های به‌دست آمده از رقت‌های مختلف در طول موج ماکسیموم، منحنی استاندارد عصاره Glycrrizha glabra در بافر PBS و ایزوپروپیل رسم گردید و با استفاده از نمودار حاصل شده معادله خط عصاره در PBS و ایزوپروپیل محاسبه گردید. آزمایش‌ها در این مرحله با سه بار تکرار انجام شد.

تهیه نانو نیوزوم‌های حاوی عصاره Glycrrizha

glabra

روش آب‌پوشانی لایه نازک (Thin Film hydration)، روشی بود که برای سنتز نانو سامانه مورد آزمایش از آن استفاده گردید. به‌منظور ساخت نانو نیوزوم‌ها، ابتدا توئن ۶۰ و کلسترول به نسبت مولی ۷۰ به ۳۰٪ و عصاره شیرین‌بیان با غلظت ۲ mg/mL در کلروفرم حل گردیدند و سپس محلول حاصل در دمای ۴۵ °C بر روی روتاری (Heidolph، آلمان) با دور rpm ۱۵۰ قرار داده شد تا فیلم نازک خشک تحت شرایط خلاء ساخته شود. هیدراتاسیون فیلم نازک لیپیدی به‌منظور ایجاد نیوزوم‌های کروی حاوی عصاره، در دمای ۶۰ °C و به‌مدت ۱ ساعت با اضافه کردن بافر PBS به نسبت 1x انجام گرفت. کاهش اندازه نانوذره‌ها نیز به‌وسیله سونیکیت حمامی با توان اولتراسونیک ۱۰۰ وات و فرکانس ۲۸ ± ۵٪ کیلوهرتز در مدت زمان یک ساعت انجام گرفت (۲۴).

بررسی میزان درون‌گیری سامانه

برای بررسی میزان عصاره بارگذاری شده ابتدا عصاره‌های بارگذاری نشده و آزاد در محلول، به‌وسیله روش کیسه دیالیز

ساختار و اندازه گیری گونه های شیمیایی به کار می رود (۲۵). در این روش، از عصاره شیرین بیان، نیوزوم های فاقد عصاره و سامانه نیوزومی حاوی عصاره شیرین بیان استفاده شد و طیف FTIR هر سه نمونه به صورت جداگانه به دست آمد. برای این منظور ابتدا مقدار ۱ میلی گرم از هر نمونه با نسبت ۱ به ۱۰۰ را به نمک پتاسیم برماید (KBr) اضافه و در یک هاون پودر و به وسیله دستگاه پرس هیدرولیک و تحت فشار ۵ تا ۸ تن بر سانتی متر مکعب فشرده گردید (روش قرص-سازی) و با ضخامتی در حدود ۰/۱ سانتی متر بر روی صفحه ای قرار گرفت و هر نمونه در طول موج 4000 cm^{-1} -۴۰۰ توسط دستگاه FT-IR (Brucker، آلمان) مورد بررسی قرار گرفت و گروه های عاملی آن شناسایی گردید.

بررسی مورفولوژی نانوسامانه سنتز شده

برای بررسی مورفولوژی و به دست آوردن شکل و ساختار نانوسامانه سنتز شده نیز از مشاهده میکروسکوپی استفاده شد. میکروسکوپ انرژی اتمی (AFM)، میکروسکوپ مورد استفاده در این مطالعه بود که با آن مورفولوژی نانوذرات از نظر زبری، شکل و توده ایی بودن بررسی گردید. میکروسکوپ نیروی اتمی برای مشاهده نمونه ها با ابعاد نانومتری و بررسی توپوگرافی سطحی آنها است. این میکروسکوپ نمونه ها را با یک سوزن تیز به طول ۲ میکرون و قطر کم تر از ۱۰ نانومتر مورد آنالیز قرار داد (۲۶).

بررسی سایز و پتانسیل زتای ذرات سنتز شده

برای اندازه گیری قطر نانو ذره ها و بار سطحی (پتانسیل زتا) آنها از دستگاه زتا سایزر (Malvern Instrument مدل Nano zeta sizer ES، انگلستان) استفاده گردید. اندازه گیری نانو نیوزومها در یک زاویه ۹۰ درجه و تابش نور لیزر با طول موج ۶۵۷ nm در دمای ۲۵ سانتی گراد صورت گرفت. هم چنین اندازه گیری نمونه ها در ۵ مرتبه و هر مرتبه با مدت زمان ۳۰ ثانیه انجام گردید. جهت تعیین اندازه از $60\ \mu\text{L}$ نمونه با غلظت ۰/۵ تا ۰/۱ mg/mL استفاده شد. تعیین پتانسیل زتا/بار سطحی نانو نیوزومها در دمای اتاق با

(Mw cut off = 12000 Da) و توسط فرآیند انتشار در دمای $4\ ^\circ\text{C}$ در درون بشری حاوی بافر فسفالین سالیین حذف گردیدند. اساس روش کیسه دیالیز از خصوصیت های غشاء های نیمه تراوا که بین محلول و بافر دیالیز قرار می گیرد نشأت می گیرد. این غشاها که به طور معمول از جنس سلولزی دارند دارای حفره هایی هستند که اجازه عبور به مولکول های کوچک تر را می دهند و از عبور مولکول های بزرگ جلوگیری می کنند. به منظور پرورده کردن کیسه دیالیز، ابتدا کیسه دیالیز به مدت ۱۰ دقیقه با بافر کیسه دیالیز (۱ mM از EDTA، سدیم بی کربنات ۰/۲٪) جوشانیده شد (دما $80\ ^\circ\text{C}$). در مرحله بعد برای حذف مواد بافر، کیسه دیالیز به مدت ۱۰ دقیقه دیگر در آب مقطر جوشانده شد. سپس، نیوزوم های حاوی عصاره به نسبت های ۱ به ۱۰، ۱ به ۲۰ و ۱ به ۴۰ با ایزوپروپیل مخلوط شدند تا دیواره لپیدی آنها شکسته شود و عصاره محبوس در آنها آزاد گردد. در آخر میزان جذب عصاره آزاد شده در رقت های ذکر شده و در طول موج ماکسیموم تعیین شده به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر به دست آید و با استفاده از منحنی استاندارد عصاره در ایزوپروپیل و رابطه ۱، درصد بارگذاری عصاره در نیوزومها تعیین گردید (۲۱).

رابطه ۱)

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

بررسی عدم برهم کنش سامانه به عصاره شیرین بیان

برای بررسی تعامل و عدم برهم کنش میان سامانه نیوزومی سنتز شده با عصاره شیرین بیان از تکنیک طیفسنجی مادون قرمز (FTIR) استفاده گردید. طیفسنجی مادون قرمز یا FTIR بر اساس جذب تابش و بررسی جهش های ارتعاشی مولکولها و یون های چند اتمی صورت می گیرد. این روش به عنوان روشی پر قدرت و توسعه یافته برای تعیین

استفاده از $1500 \mu\text{L}$ نمونه با غلظت 0.1 mg/mL تعیین گردید و برای جلوگیری از آلوده شدن ذرات با گرد و غبار که تأثیر به‌سزایی در نتایج ایجاد می‌کند نمونه‌ها بلافاصله بعد از آماده‌سازی مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش‌ها در این مرحله نیز با ۳ بار تکرار صورت گرفت.

تعیین الگوی رهایش عصاره شیرین‌بیان از سامانه نیوزومی

روند رهایش عصاره از سامانه سنتز شده با استفاده از روش کیسه دیالیز مورد بررسی قرار گرفت. در این روش مقدار 20 mL از لیپوزوم‌های حاوی عصاره درون کیسه دیالیز قرار گرفت و به مدت ۴۸ ساعت در مجاورت 200 mL بافر PBS (نسبت ۱ به ۱۰) و در دمای 37°C و $\text{pH} = 7.4$ (شرایط فیزیولوژیکی بدن) قرار گرفت. به فواصل زمانی منظم و متناوب (۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) مقدار 1 mL از بافر PBS اطراف کیسه دیالیز برداشته و به همان مقدار (1 mL) بافر جدید با دما و pH یکسان اضافه گردید سپس جذب نمونه‌های برداشت شده با استفاده از دستگاه اسپکترومتری در طول موج ماکسیموم تعیین شده، خوانده و نمودار رهایش عصاره از نانو ذره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد عصاره در بافر PBS رسم گردید.

سنجش سمیت سامانه بر روی سلول‌های نرمال

برای سنجش میزان سمیت سامانه در این مطالعه از روش MTT استفاده گردید. آزمون MTT که یک آزمون بر پایه رنگ‌سنجی است. اساس این آزمون احیاء کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم (فرمول شیمیائی 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)) توسط ردوکتازهای میتوکندریایی سلول‌های زنده است. سلول‌های مورد استفاده در این مطالعه، از نوع سلول‌های نرمال رده‌ی فیبروبلاست پوست انسان (HFF) بودند که از انستیتوی پاستور تهران تهیه گردیدند و طبق پروتکل‌های کشت سلولی در محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰٪، در دمای 37°C و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شدند. برای انجام

تست MTT این سلول‌ها برای ۴۸ ساعت در پلیت‌های ۹۶ تایی کشت داده شدند، بعد از رسیدن تعداد سلول‌ها به میزان مورد نیاز (1×10^4)، سلول‌ها برای ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف ($1000, 100, 10, 1, 0.1 \text{ mg/mL}$) از نانو سامانه لیپونیوزومی فاقد عصاره تیمار شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر از نمک MTT با غلظت ۰/۵ میکرولیتر به هر چاهک اضافه و آنکوباسیون ۴ ساعت انجام گرفت. سپس مایع‌رویی خارج و به‌منظور حذف کریستال‌های فورمازون 150 میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه گردید و ۳۰ دقیقه ریگر آنکوباسیون انجام گرفت. بعد از آن جذب چاهک‌ها در طول موج 570 نانومتر و با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (synergy HTX, Bio Tek, USA) خوانده و میزان زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از رابطه ۲ به محاسبه گردید.

رابطه ۲)

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

یافته‌ها

تعیین طول موج ماکسیموم و نمودار استاندارد

بررسی‌های طیف جذبی عصاره شیرین‌بیان در طول موج‌های ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر نشان داد که بیش‌ترین مقدار جذب مشترک در غلظت‌های مختلف عصاره ریشه این گیاه در طول موج 330 نانومتر است (نمودار ۱). سپس با استفاده از این طول موج نمودارهای استاندارد شیرین‌بیان در بافرهای PBS و ایزوپروپانول رسم گردید. نمودار استاندارد شیرین‌بیان در بافر PBS (نمودار ۲) خطی راست با معادله $Y=0.0012X-0.0053$ و ضریب تعیین (R^2) ۰/۹۹۹ است. این نمودار در بافر ایزوپروپانول نیز خطی راست با معادله $Y=0.0017X-0.0067$ و ضریب تعیین ۰/۹۹۹۶ است.

راندمان آنکپسولاسیون سامانه نیوزومی و بررسی الگوی رهایش دارو

میزان آنکپسولاسیون عصاره شیرین‌بیان درون سامانه نیوزومی سنتز شده با توجه به نمودار استاندارد شیرین‌بیان

۱۲۱۳ که مرتبط با گروه عاملی P=O است را در ساختمان عصاره ریشه گیاه شیرین بیان نشان می‌دهد. با بررسی و مقایسه پیک‌های موجود در طیف FTIR نانو نیوزوم‌های حاوی عصاره شیرین بیان (شکل C-۳) و نانو نیوزوم‌های فاقد عصاره (شکل B-۳) مشاهده شد که تغییرهای جزئی در پیک‌های مربوط به سامانه حاوی عصاره نسبت به سامانه فاقد عصاره اتفاق افتاده که نشان‌دهنده ورود عصاره به درون سامانه است. برای مثال پیک‌های شاخص موجود در نانو نیوزوم‌های فاقد عصاره مثل پیک نواحی 3445 cm^{-1} ، $2925/6$ ، 1638 و 1101 بعد از ورود عصاره به سامانه با اندکی تغییر به ترتیب به نواحی 3437 ، 2922 ، 1622 و 1091 جا به جا شدند. همچنین با توجه به این که در طیف FTIR سامانه حاوی عصاره پیک جدیدی اضافه نشده و پیک هم ناپدید نگشته می‌توان به این نتیجه رسید که میان سامانه و عصاره بر هم کنش شیمیایی رخ نداده و هر دو ماهیت خود را حفظ و از تغییر به دور مانده‌اند.

تصویربرداری با میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

با توجه به تصاویر به دست آمده (شکل ۴) از نانوذرات به-وسيله میکروسکوپ نیروی اتمی می‌توان به این نتیجه رسید که نیوزوم‌ها یکنواخت، کروی شکل و متراکم هستند که این خود نشان از مورفولوژی مناسب این نانوذرات جهت به-کارگیری آن‌ها به عنوان حامل‌های دارویی است.

بررسی اثر سمیت نانو نیوزوم‌های سنتز شده بر روی

سلول‌های رده HFF

بعد از تیمار سلول‌های رده HFF با نیوزوم‌های فاقد عصاره به منظور سنجش میزان سمیت این نانو ذره‌ها تست MTT انجام گرفت. نتایج این تست بعد از ۴۸ ساعت تأثیر نیوزوم‌ها نشان داد که سامانه سنتز شده دارای سمیت ناچیزی بر روی سلول‌های نرمال است چرا که بعد از تیمار سلول‌ها با سامانه نیوزومی فاقد دارو با غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر میزان زنده‌مانی سلول‌ها به-

در بافر ایزوپروپیل و رابطه ۱ محاسبه گردید، که مقدار عددی آن برابر با $55/36$ درصد بود. همچنین با استفاده از نمودار استاندارد شیرین بیان در بافر PBS، الگوی رهائش عصاره آن از سامانه در زمان‌های مختلف و تحت شرایط فیزیولوژیک بدن تعیین و رسم گردید (نمودار ۴). بررسی الگوی رهائش عصاره نشان داد که سامانه دارای رهائش آهسته و نیمه هدفمند است و بیش‌ترین میزان رهائش در ۴۸ ساعت برابر با $57/3$ درصد است. همچنین از نمودار به-دست آمده این‌گونه نتیجه‌گیری می‌شود که رهائش عصاره از سامانه در دو فاز صورت می‌گیرد. فاز اول که رهائش سریع‌تر است و در ۱۰ ساعت اول اتفاق می‌افتد به دلیل اختلاف غلظت زیاد عصاره در سامانه با محیط پیرامون آن است و فاز دوم که شیب نمودار کاهش یافته و به دلیل کاهش این اختلاف غلظت ایجاد می‌شود.

بررسی اندازه و میزان بار سطحی سامانه نیوزومی

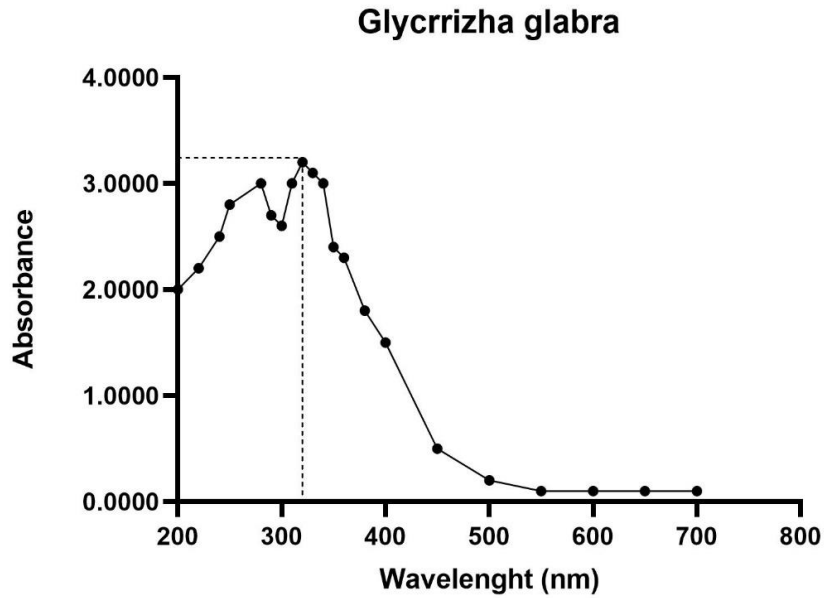
مطابق با شکل ۱، بررسی نتایج حاصل از دستگاه زتا سایزر نشان داد که سایز ذرات نیوزومی حاوی عصاره شیرین بیان برابر با $3/6 \pm 90/7$ نانومتر و شاخص پراکندگی آن برابر با $0/53$ بود. همچنین با توجه به شکل ۲، پتانسیل زتای سامانه سنتز شده برابر با $1/64 \pm 21/2$ mV است که نشان‌دهنده این است که سامانه از نوع آنیونی و دارای بار منفی است، که همین امر سبب کاهش سمیت سامانه می‌گردد.

بررسی طیف‌های مادون قرمز حاصل از تکنیک FTIR

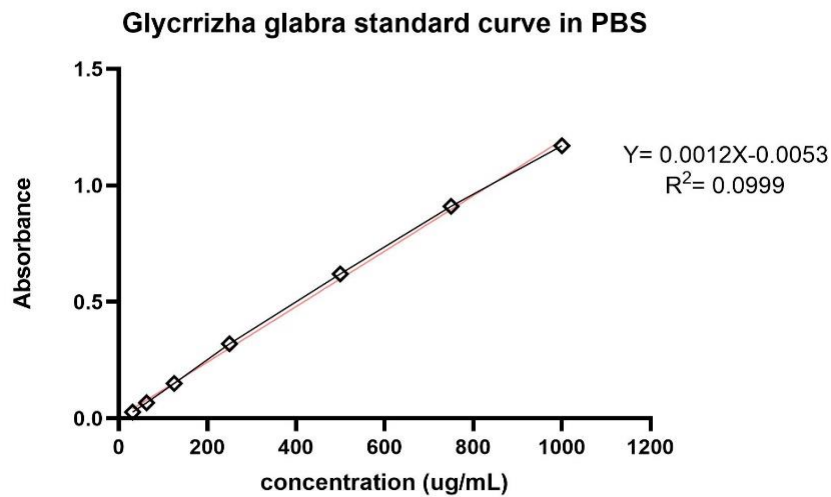
از تکنیک FTIR به منظور سنجش عدم بر هم کنش سامانه نیوزومی سنتز شده با عصاره شیرین بیان استفاده گردید. تصاویر به دست آمده از طیف FTIR عصاره شیرین بیان (شکل A-۳) وجود پیک‌های شاخصی هم‌چون پیک پهن موجود در ناحیه 3300 cm^{-1} که نشان‌دهنده گروه عاملی OH، پیک موجود در ناحیه 2924 cm^{-1} که مربوط به ارتعاش کششی C-H، پیک ناحیه 1700 cm^{-1} که مشخصه ارتعاش کششی C=O، پیک ناحیه 1664 cm^{-1} که نشان‌دهنده ارتعاش خمشی CH_2 و پیک ناحیه cm^{-1}

ترتیب برابر بود با ۹۹، ۹۸، ۹۶، ۹۶ و ۹۵ درصد که نشان از سمیت پایین سامانه دارد (نمودار ۵).

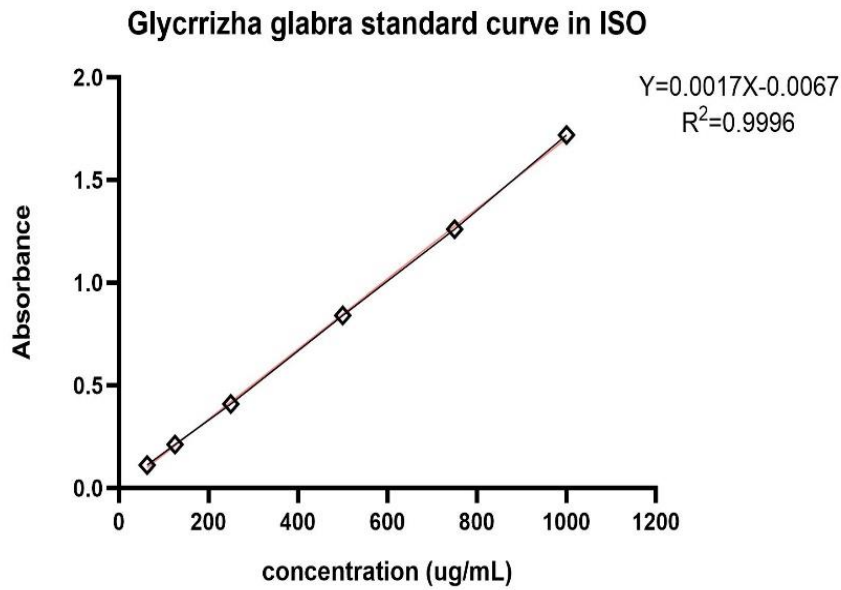
نمودار ۱: طیف جذبی حاصل از عصاره شیرین بیان در طول موج های ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر. بیشترین مقدار جذب در طول موج ۳۲۰ nm است.



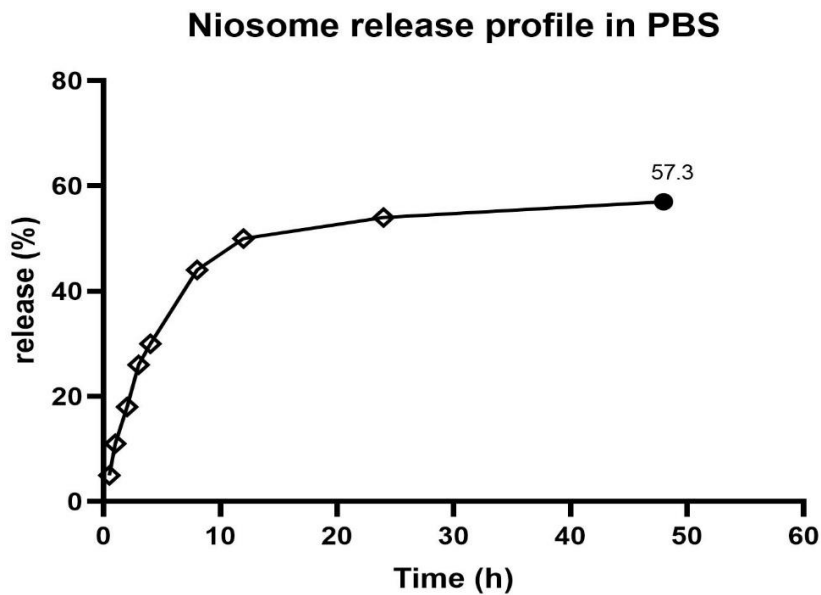
نمودار ۲: منحنی استاندارد عصاره شیرین بیان در بافر فسفات سالین که حاصل از بررسی طیف جذبی غلظت های مختلف از عصاره در طول موج ماکسیسوم آن است.



نمودار ۳: منحنی استاندارد عصاره شیرین بیان در بافر ایزوپروپیل که حاصل از بررسی طیف جذبی غلظت‌های مختلف از عصاره در طول موج ماکسیموم آن است.



نمودار ۴: الگوی رهائش عصاره شیرین بیان از سامانه لیپوزومی طی ۴۸ ساعت. نمودار نشان‌دهنده آهسته رهش بودن سامانه است. هم‌چنین بیش‌ترین میزان رهائش عصاره از سامانه ۵۷/۳ درصد در طول ۴۸ ساعت است.

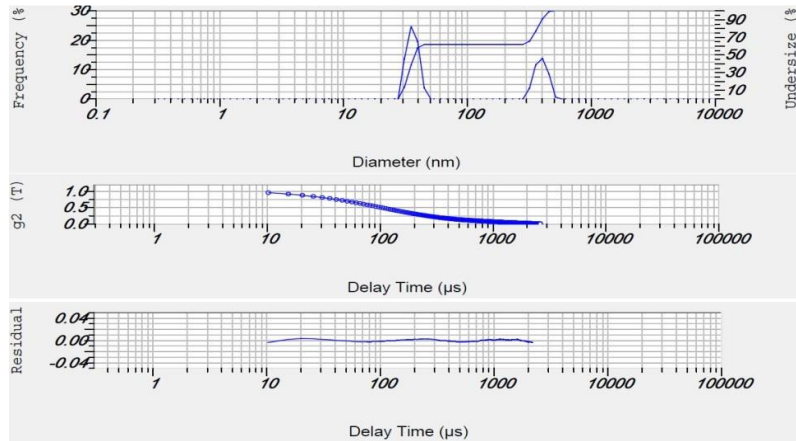


Calculation Results

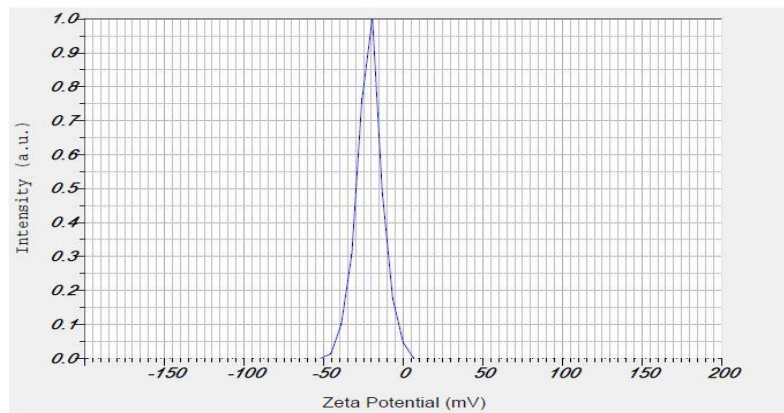
Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	0.62	34.0 nm	3.6 nm	33.4 nm
2	0.38	370.2 nm	43.1 nm	373.3 nm
3	---	--- nm	--- nm	--- nm
Total	1.00	162.4 nm	165.5 nm	33.4 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 90.7 nm
PI : 0.530



شکل ۱- داده‌های حاصل از تجزیه سامانه نیوزومی به وسیله دستگاه زتا سایزر. براساس این داده‌ها میانگین اندازه نانوذرات برابر با 90.7 نانومتر و شاخص پراکندگی آن‌ها برابر با 0.530 است.



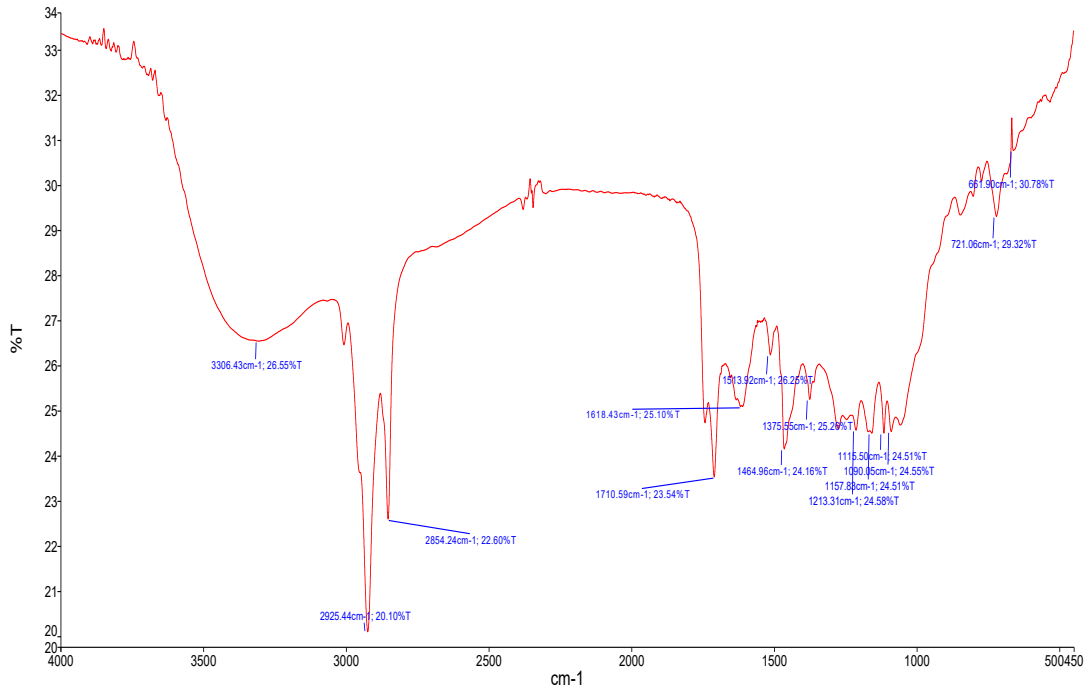
Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-21.2 mV	-0.000164 cm ² /Vs
2	--- mV	--- cm ² /Vs
3	--- mV	--- cm ² /Vs

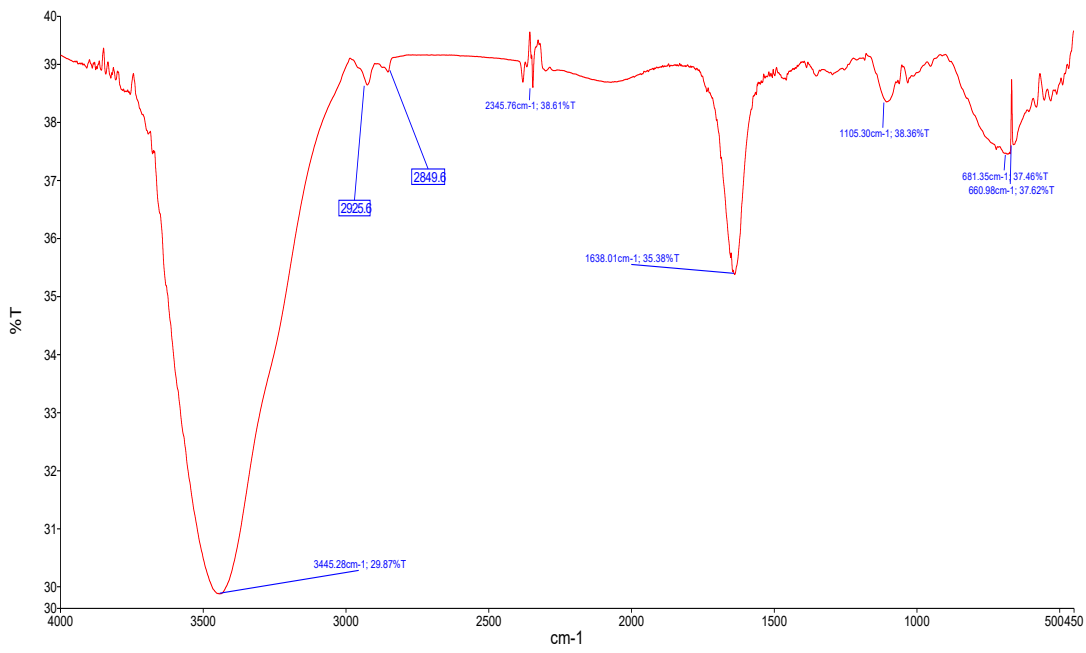
Zeta Potential (Mean) : -21.2 mV
Electrophoretic Mobility Mean : -0.000164 cm²/Vs

شکل ۲- نمایش میانگین پتانسیل زتای ذرات بر حسب میلی‌ولت. داده‌ها نشان می‌دهد پتانسیل زتای ذرات برابر با 21.2 ± 1.64 mV است.

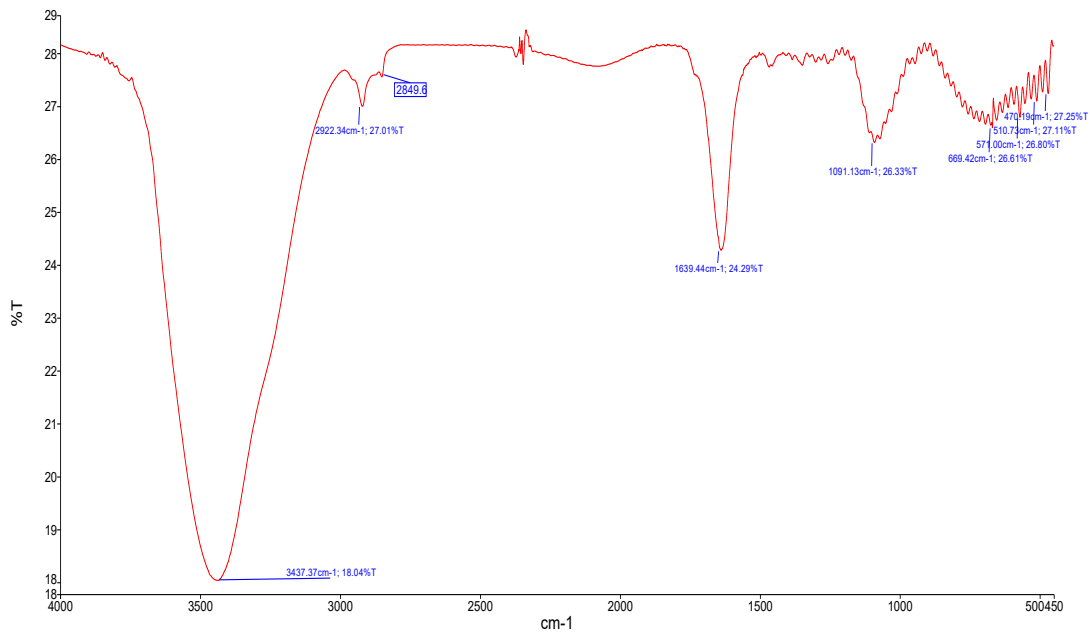
(A)



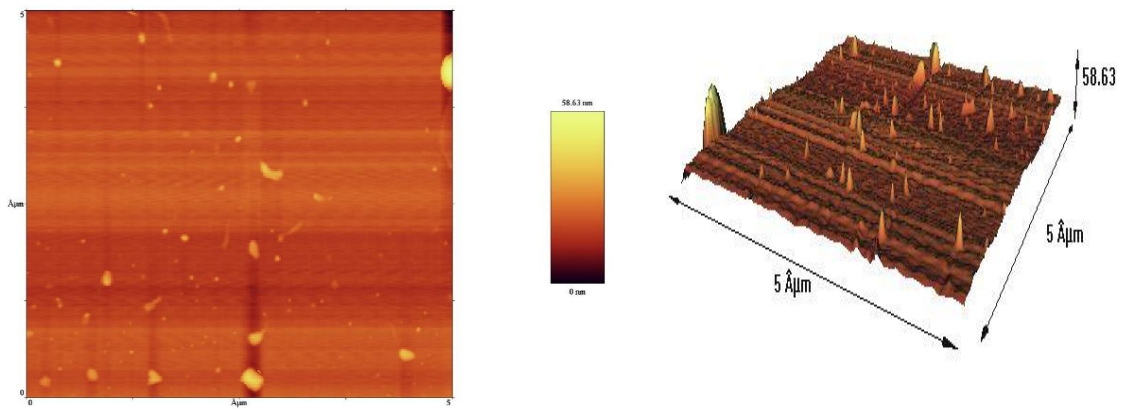
(B)



(C)



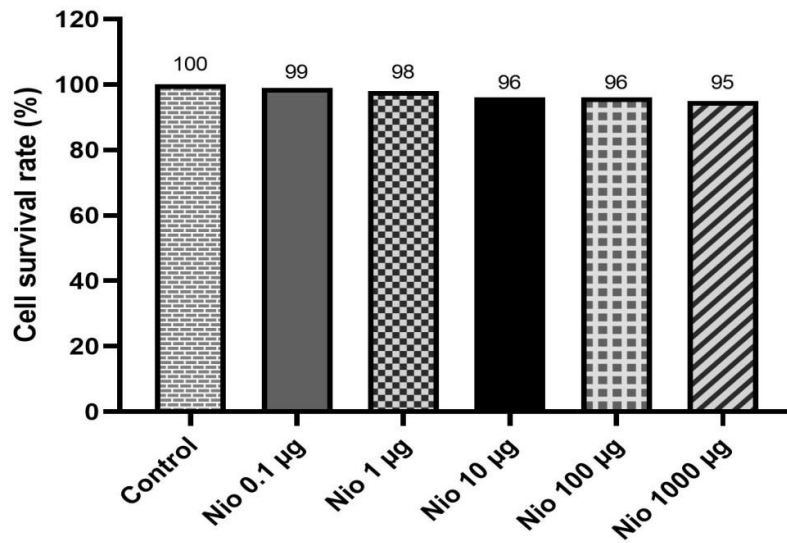
شکل ۳ - طیف‌های مادون قرمز حاصل از آنالیز به روش طیف سنجی مادون قرمز. (A) عصاره گیاه شیرین بیان (B) سامانه نیوزومی فاقد عصاره. (C) سامانه نیوزومی حامل عصاره. با توجه به حضور پیک‌های شاخص نمودار A و B در نمودار C می‌توان دریافت عصاره و سامانه سنتز شده با هم بر هم کنش ندارند.



شکل ۴- تصاویر حاصل از عکس‌برداری توسط میکروسکوپ نیروی اتمی. عکس‌ها نشان‌دهنده مورفولوژی مناسب نانو نیوزوم‌ها است. نانو ذرات دارای شکلی کروی و سطحی صاف هستند.

نمودار ۴: نتایج حاصل از تست MTT بر روی رده سلولی HFF بعد از ۴۸ ساعت تیمار با سامانه نانونیوزومی فاقد عصاره در غلظت‌های مختلف. داده‌ها نشان از عدم سمیت سامانه سنتز شده بر روی سلول‌های نرمال دارد.

MTT assay- 48H- HFF cell line



Majdizadeh بود. بررسی‌های DLS حاکی از این بود که اندازه این نانوذرات ۹۰/۷ nm و شاخص پراکندگی آن نیز برابر با ۰/۵۳ بود. همچنین مشخص شد که نانوسامانه سنتز شده از نوع آنیونی (بار منفی) بوده و پتانسیل زتای آن نیز برابر با $1/64 \pm 21/2$ mV بود که این بار منفی با جلوگیری از تجمع و رسوب نانوذرات سبب کاهش سمیت سامانه و بهبود عملکرد آن می‌گردد (۲۸). بررسی‌های طیف FTIR نیز بر هم‌کنش سامانه سنتز شده با عصاره شیرین- بیان را رد و تأییدی بر حفظ ماهیت عصاره و سامانه بعد از بارگذاری آن بود. نتایج حاصل از AFM هم مورفولوژی مناسب نانوذرات رو تأیید کرد و نشان داد که ذرات دارای شکلی کروی، یکنواخت و صاف هستند که این به‌نوبه خود می‌تواند مهر تأییدی برای استفاده از این سامانه به‌عنوان نانوحامل دارویی باشد. عدم سمیت سامانه بر روی سلول‌های نرمال نیز با توجه به نتایج تست MTT تأیید گشت.

بحث

در این مطالعه، نانو سامانه نیوزومی حاوی عصاره شیرین‌بیان تهیه گردید. بررسی نتایج فیزیکوشیمیایی نشان داد که سامانه سنتز شده دارای راندمان انکپسولاسیون ۵۳/۳۶٪ و رهایش آهسته و نیمه هدفمند (کنترل شده) است و حداکثر میزان رهایش عصاره از سامانه در طول ۴۸ ساعت برابر با ۵۷/۳٪ بود. راندمان انکپسولاسیون از پارامترهای در نانوسامانه‌ها هستند که به‌عوامل مهمی از جمله، اندازه ذرات، ماهیت ماده درون‌گیری شده، نوع لیپیدهای به‌کار رفته و غلظت آن‌ها در ساختار نانوذرات وابسته است (۲۷). در گزارشی که در سال ۲۰۱۸ منتشر شد، Majdizadeh و همکارانش اعلام کردند که موفق به ساخت نانو سامانه حاوی اسانس menthe piperita با راندمان انکپسولاسیون ۶۱/۳۸٪ شدند (۲۰). نتایج مطالعه ما نیز از نظر میزان درون‌گیری سامانه نزدیک به نتایج گزارش شده توسط

تاکنون مطالعه‌های متعددی بر روی ساخت و مشخصه‌یابی نانو حامل‌های دارویی انجام شده است. همان‌طور که ذکر شد، راندمان انکپسولاسیون یا همان میزان درون‌گیری سامانه از پارامترهای مهم در انتخاب نانو حامل‌های دارویی است (۲۰،۲۸). در سال ۲۰۱۹، Barakat و همکارانش گزارش کردند که نانوسامانه لیپیدی حاوی عصاره آویشن سنتز و اثر سمیت آن را بر روی سلول‌های سرطان پستان بررسی کردند. میزان درون‌گیری در مطالعه آن‌ها ۶۷/۱۱٪ گزارش شد (۱). در سال ۲۰۱۳ نیز Fang و همکارانش سامانه لیپیدی با درصد درون‌گیری ۵۱٪ و اندازه ۷۰ nm را گزارش کردند (۲۹). Babaei و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶، نیوزوم‌های حاوی سیس پلاتین با راندمان انکپسولاسیون ۴۳/۶ درصد را به‌منظور اثردهی بر سلول‌های سرطان سینه سنتز کردند (۳۰). در سال ۲۰۱۵ نیز، Ebrahimi Khosfi و همکارانش نیز نانوسامانه لیپیدی حاوی عصاره آویشن شیرازی سنتز کردند و گزارش کردند که میزان درون‌گیری سامانه در بهترین حالت برابر با ۵۴/۴٪ است (۳۱). همسو با مطالعه‌های فوق مطالعه ما نیز اهمیت میزان انکپسولاسیون نانوسامانه‌های حامل دارویی را تأیید می‌کند. میزان انکپسولاسیون در مطالعه ما بیش‌تر و یا نزدیک به درصد هم‌پوشانی در مطالعه‌های بالاست که این خود از مزایای پژوهش حاضر است.

میزان رهایش، عدم تعامل سامانه و دارو با یکدیگر، مورفولوژی و بار سطحی مناسب نیز از پارامترهای مهم در انتخاب نانو حامل‌های دارویی است (۳۲). Haghirsadat و همکاران در سال ۲۰۱۷، پیشنهاد فورمولاسیون جدیدی از نانوسامانه لیپیدی حاوی دوکسوروبیسین با پتانسیل زتای ۲۳-، اندازه ۹۳/۶۱ nm و راندمان انکپسولاسیون ۸۲/۸٪ را ارائه کردند (۳۳). اندازه کوچک‌تر نانوذرات در مطالعه حاضر از مزایای آن نسبت به مطالعه Haghirsadat است.

Shah و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶، فرمولاسیون‌های مختلفی از نانو نیوزوم‌های حاوی ناپروکسین با ویژگی‌های فیزیوشیمیایی از جمله سایزی ۳۸۱ تا ۴۱۴ نانومتر، لود

۶۰/۳۶ تا ۷۱/۹۸ درصد و میزان رهایش ۶۵/۹۱ تا ۷۵/۲۴ را گزارش کردند (۳۴). از مزایای مطالعه ما نسبت به مطالعه Shah، اندازه کوچک‌تر نانوذرات است که سبب افزایش زیست‌سازگاری آن می‌شود.

در سال ۲۰۱۷ Naderinezhad و همکارانش، نیوزوم‌های حاوی کورکومین با اندازه ۲۴۲ نانومتر، راندمان انکپسولاسیون ۹۵/۲٪، بار سطحی ۳۸ mV - و شاخص پراکندگی ۰/۱۷ با حداکثر میزان رهایش ۴۳/۸۷ درصد سنتز کردند (۳۵). اندازه کوچک‌تر و درصد رهایش بیش‌تر از مزیت‌های مطالعه ما نسبت به مطالعه Naderinezhad است اما راندمان انکپسولاسیون بیش‌تر و بار سطحی مناسب‌تر از ویژگی‌های مطلوب مطالعه Naderinezhad نسبت به مطالعه ما است.

در سال ۲۰۱۹ نیز Hemati و همکاران، نانو نیوزومی حاوی کوئرستین با ویژگی‌های فیزیوشیمیایی هم‌چون اندازه ۱۰۰ نانومتر، پتانسیل زتای ۶- تا ۳۵+ میلی‌ولت و درون‌گیری بین ۷۱ تا ۹۵ درصد سنتز کردند (۳۶). از مزیت‌های مطالعه ما نسبت به مطالعه Hemati می‌توان به اندازه کوچک‌تر و بار سطحی مطلوب‌تر اشاره کرد اما میزان درون‌گیری کم‌تر از ضعف‌های مطالعه حاضر نسبت به مطالعه Hemati است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، ما موفق به ساخت نانو حامل‌های نیوزومی جهت رسانش عصاره شیرین بیان با راندمان انکپسولاسیون بالا، رهایش هدفمند و ویژگی‌های فیزیوشیمیایی مطلوب شدیم که این خود گواهی بر مناسب بودن عملکرد این نانوسامانه به‌عنوان یک حامل دارویی مناسب است و لذا انجام تحقیقات تکمیلی جهت کاربرد بالینی و تجاری از این سامانه پیشنهاد می‌گردد. هم‌چنین اگر چه در این مطالعه، ما موفق به ساخت و سنتز نانو نیوزوم‌های حاوی عصاره شیرین بیان با ویژگی‌های فیزیوشیمیایی مناسب شدیم، اما این مطالعه نیز مانند سایر پژوهش‌ها دارای نقص و کاستی‌هایی هم بود. عدم بررسی الگوی رهایش و تأثیر آن در

شرایط سلول‌های سرطانی، عدم بررسی پایداری نانونیوزوم‌ها در شرایط مختلف، عدم سنتز فرمولاسیون‌های مختلف از نیوزوم‌ها با درصدهای مولی متفاوت از لیپیدها و کلسترول و همچنین عدم بررسی ورود سامانه به بافت هدف از جمله معایب مطالعه حاضر است که پیشنهاد بررسی آن‌ها به سایر پژوهشگران علاقمند به این زمینه می‌گردد.

- 1- 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 University of Medical Sciences. 2019.
- 2- Yakhchi V, Jahanizadeh S, Yazdian F, Rashedi H, Haghirsadat BF. Synthesis and Evaluation of Lipid-based Nanoparticle Containing Ginger Extract against *Aspergillus* Species. SSU_Journals. 2020;28(6):27.80-66
- 3- Van Wyk B-E, Wink M. Medicinal plants of the world: CABI; 2018.
- 4- Al-Snafi AE. Glycyrrhiza glabra: A phytochemical and pharmacological review. IOSR Journal of Pharmacy. 2018;8(6):1-17.
- 5- More VV. Niosomal drug delivery-a comprehensive review. Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm. 2019;12(04).
- 6- Thangadurai K, Amani P, Jeeva Gladys R, Rengasundari GM, Lenin M, Yuvaraj M. A review on hepatoprotective and Anti-HIV action of traditional herbs to reduce the hepatotoxicity of highly active anti-retroviral therapy (HAART).
- 7- Mustafa SB, Akram M, Muhammad Asif H, Qayyum I, Hashmi AM, Munir N, et al. Antihyperglycemic activity of hydroalcoholic extracts of selective medicinal plants *Curcuma longa*, *Lavandula stoechas*, *Aegle marmelos*, and *Glycyrrhiza glabra* and their polyherbal preparation in Alloxan-induced diabetic mice. Dose-Response. 2019;17(2):1559325819852503.
- 8- Batiha GE-S, Beshbishy AM, El-Mleeh A, Abdel-Daim MM, Devkota HP. Traditional uses, bioactive chemical constituents, and pharmacological and toxicological activities of *Glycyrrhiza glabra* L.(Fabaceae). Biomolecules. 2020;10(3).
- 9- Zaigham M, Hamiduddin M, Ikram M. Aslussoos (*Glycyrrhiza glabra* Linn): A root with immense pharmaceutical potential and its utilization in Unani system of medicine. International J. Herbal Medicine. 2019;7(5):27-34.
- 10- Sedighi M, Bahmani M, Asgary S, Beyranvand F, Rafieian-Kopaei M. A review of plant-based compounds and medicinal plants effective on atherosclerosis. J. research in medical sciences: the official j. Isfahan University of Medical Sciences. 2017;22.
- 11- Pastorino G, Cornara L, Soares S, Rodrigues F, Oliveira MBP. Licorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review. Phytotherapy research. 2018;32(12):2323-39.
- 12- Paudel YN, Angelopoulou E, Semple B, Piperi C, Othman I, Shaikh MF. Potential neuroprotective effect of the HMGB1 inhibitor Glycyrrhizin in neurological disorders. ACS chemical neuroscience. 2020;11(.500-485:(4
- 13- Gioti K, Papachristodoulou A, Benaki D, Beloukas A, Vontzalidou A, Aligiannis N, et al. *Glycyrrhiza glabra*-Enhanced Extract and Adriamycin Antiproliferative Effect on PC-3 Prostate Cancer Cells. Nutrition and cancer. 2020;72(2):320-32.
- 14- Sekhon-Loodu S, Rupasinghe H. Evaluation of antioxidant, antidiabetic and antiobesity potential of selected traditional medicinal plants. Frontiers in nutrition. 2019;6:53.

- 15- Unuofin JO, Lebelo SL. Antioxidant effects and mechanisms of medicinal plants and their bioactive compounds for the prevention and treatment of type 2 diabetes: an updated review. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020;2020.
- 16- Nastić N, Švarc-Gajić J, Delerue-Matos C, Barroso MF, Soares C, Moreira MM, et al. Subcritical water extraction as an environmentally-friendly technique to recover bioactive compounds from traditional Serbian medicinal plants. *Industrial Crops and Products*. 2018;111:579-89.
- 17- Mehrbod P, Abdalla MA, Njoya EM, Ahmed AS, Fotouhi F, Farahmand B, et al. South African medicinal plant extracts active against influenza A virus. *BMC complementary and alternative medicine*. 2018;18(1):1-10.
- 18- Alagawany M, Elnesr SS, Farag MR, El-Hack A, Mohamed E, Khafaga AF, et al. Use of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) herb as a feed additive in poultry: Current knowledge and prospects. *Animals*. 2019;9(8):536.
- 19- Ashraf A, Ashraf MM, Rafiqe A, Aslam B, Galani S, Zafar S, et al. In vivo antiviral potential of *Glycyrrhiza glabra* extract against Newcastle disease virus. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2017;30.
- 20- 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.
- 21- Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug discovery today*. 2008;13(3-4):144-51.
- 22- Shirsand S, Keshavshetti GG. Recent advances in niosomal drug delivery—a review. May–June *RJLBPCS*. 2019;5(3).
- 23- Ge X, Wei M, He S, Yuan W-E. Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(2):55.
- 24- Shahi MH, Kalantar SM, Sasani E, Asgari M, HAGHIRALSADAT BF. Synthesis and optimization of niosomal carriers containing doxorubicin in order to achieve a final formulation with high potential in cancer cells temperature and acidity. 2019.
- 25- Petit T, Puskar L. FTIR spectroscopy of nanodiamonds: Methods and interpretation. *Diamond and Related Materials*. 2018;89:52-66.
- 26- Liu X, Song D, He X, Wang Z, Zeng M, Deng K. Nanopore structure of deep-burial coals explored by AFM. *Fuel*. 2019;246:9-17.
- 27- 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.
- 28- Mohawed OA, El-Ashmoony M, Elgazayerly ON. Niosome-encapsulated clomipramine for transdermal controlled delivery. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014;6(9):567-75.
- 29- Fang Y, Wu XG, Chen J, Dang SC, Jiang DL, Chen M, et al., editors. Preparation and characterization of mpeg modified magnetic long-circulating doxorubicin hydrochloride liposomes. *Advanced Materials Research*; 2013: Trans Tech Publ.

- 30- Babaei M, Arjmand M, Seifkordi A. Evaluation the effect of nanoniosomal cisplatin on brain cancer cell line C6. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2016;6(23):61-4.
- 31- 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.
- 32- Gharbavi M, Amani J, Kheiri-Manjili H, Danafar H, Sharafi A. Niosome: a promising nanocarrier for natural drug delivery through blood-brain barrier. *Advances in pharmacological sciences*. 2018;2018.
- 33- Haghirsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Zandieh-doulabi B, Naderinezhad S, Helder MN, et al. New liposomal doxorubicin nanoformulation for osteosarcoma: drug release kinetic study based on thermo and pH sensitivity. *Chemical biology & drug design*. 2017;90(3):368-79.
- 34- Shah N. Characterization, optimization and formulation of niosome containing naproxen. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*. 2016;5(1):1-6.
- 35- Naderinezhad S, Haghirsadat F, Amoabediny G, Naderinezhad A, Esmaili Z, Akbarzade 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 Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2017;7(27):77-84.
- 36- Hemati M, Haghirsadat F, Yazdian F, Jafari F, Moradi A, Malekpour-Dehkordi Z. Development and characterization of a novel cationic PEGylated niosome-encapsulated forms of doxorubicin, quercetin and siRNA for the treatment of cancer by using combination therapy. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2019;47(1):1295-311.