

مقاله اصلی

سنتز نانونیوزوم‌های حاوی عصاره گیاه درمنه بیابانی (*Artemisia deserti* L.): شناسایی ترکیبات گیاهی، اثرات ضد میکروبی و سمیت سلولی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۱۲

خلاصه

مقدمه: نانونیوزوم‌ها، وزیکول‌های چندلایه‌ای هستند که امروزه به عنوان یکی از سیستم‌های نوین انتقال هدفمند دارو، مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این مطالعه، عصاره گیاه درمنه بیابانی (*Artemisia deserti* L.) در نانونیوزوم انکپسوله شد، اثرات ضد میکروبی و سمیت سلولی آن مورد مطالعه قرار گرفت.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ابتدا نانونیوزوم‌های حاوی عصاره گیاه درمنه دشتی سنتز گردید، خصوصیات ظاهری و ساختاری آن بررسی شد. پس از تایید ساختار، اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی آن بر روی سوبه‌های بیماری‌زای کلبسیلا پنومونیه بررسی شد. در انتها، به منظور بررسی سازگاری زیستی، از روش رنگ سنجی سمیت سلولی نانونیوزوم‌ها بر روی رده سلولی فیروپلاست نرمال HFF استفاده شد.

نتایج: نتایج سنتز نیوزوم‌ها نشان داد که نانونیوزوم‌های سنتز شده دارای ساختار کروی بوده و دارای اندازه $125/4 \pm 29/3$ نانومتر می‌باشند. علاوه بر آن، نتایج FTIR سنتز نیوزوم‌ها را تایید نمود. نتایج اثرات ضد میکروبی نشان داد که نانونیوزوم‌های حاوی عصاره درمنه دارای اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی معنادارتری نسبت به عصاره تنها دارند، بطوریکه حداقل غلظت مهار (MIC) نیوزوم‌ها بین ۲ تا ۴ برابر کاهش یافته بود. هم‌چنین، نتایج سمیت سلولی نشان داد که نیوزوم‌های سنتز شده دارای اثرات سمیت سلولی معناداری نیستند.

نتیجه‌گیری: بطور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که نانونیوزوم‌ها می‌توانند به عنوان یک سیستم دارورسانی مناسب برای عصاره گیاه درمنه عمل کنند، بطوریکه میزان اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی را افزایش دهند. بنابراین با مطالعات بیشتر می‌توان از این سیستم به عنوان سیستم بهینه دارورسانی جهت اهداف دارویی درمانی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: نانونیوزوم، درمنه بیابانی، کلبسیلا پنومونیه، اثرات ضد میکروبی، ضد بیوفیلمی

پی‌نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

امیر میرزایی^{۱*}

^۱گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی،
پرند، ایران

Email: Amir_mirzaie92@yahoo.com

مقدمه

نانونیوزوم‌ها سیستم‌های مبتنی بر لیپید هستند که از ساختارهای تک لایه یا چند لایه تشکیل شده‌اند. آن‌ها قادر به محصور کردن ترکیبات آبگریز و آبدوست هستند. نیوزوم‌ها زیست تخریب‌پذیر هستند، به راحتی ذخیره و نگهداری می‌شوند و سمیت کمی دارند [۱-۳]. سورفاکتانت‌های غیریونی در ساختار نیوزوم‌ها، برای ایجاد لایه وزیکولی استفاده می‌شوند و لیپیدهایی مثل کلسترول برای افزایش استحکام و سختی لایه‌ها عمل می‌کنند [۴, ۵]. نیوزوم‌ها به عنوان سیستم‌های دارورسانی جدید، حلالیت و پایداری مولکول‌های دارویی را بهبود می‌بخشند. هدف‌گیری دقیق‌تر و انتشار کنترل شده از اهداف ایجاد نیوزوم‌ها می‌باشد. آن‌ها دارای یک سر آبدوست و یک دم آبگریز هستند که بر کارایی به دام انداختن دارو تاثیر می‌گذارد. نیوزوم‌ها از نظر ساختاری به لیپوزوم شباهت دارند، ولی به خاطر ثبات شیمیایی بهتر و هزینه تولید پایین‌تر، به جایگزینی مطلوب‌تر تبدیل شدند [۶-۸]. شیوع عفونت با عامل باکتریایی گرم منفی که مقاوم در برابر چند دارو (MDR) است، تهدیدی برای سلامت جامعه جهانی محسوب می‌شود. سرعت پایین توسعه و کشف داروهای ضد میکروبی، ضرورتی برای پژوهش درباره داروهای ضد میکروبی علیه سویه‌های مقاوم به چند دارو بوجود آورده است [۹, ۱۰]. سویه‌های گرم منفی مقاوم به کارباپنم، به ویژه خانواده انتروباکتریاسه، به طور فزاینده‌ای شیوع پیدا کرده‌اند. باکتری کلبسیلا پنومونیه یک باسیل هوازی، گرم منفی و غیرمتحرک است که باعث طیف گسترده‌ای از عفونت‌های اکتسابی در بیمارستان می‌شود. بدست آوردن ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت ذاتی به چندین کلاس از آنتی بیوتیک‌ها، گزینه‌های درمانی عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه را محدود کرده است. در حال حاضر، سویه‌های کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتام‌های طیف گسترده (ESBLs) و کارباپنمازها در سطح جهانی گسترش یافته‌اند. این آنزیم‌ها، بتالاکتام‌ها را غیرفعال می‌کنند [۱۱-۱۴]. همچنین این پاتوژن قادر به تشکیل بیوفیلم میکروبی می‌باشد و ظرفیت تشکیل بیوفیلم

مقاومت بیشتری در برابر آنتی بیوتیک بوجود آورده است [۱۵]. این چالش یعنی مقاومت آنتی بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم، سبب شده است که پژوهشگران به دنبال گزینه‌های درمانی مطلوب باشند و استفاده از محصولات گیاهی یکی از رهیافت‌های حل این معضل است [۱۶]. گیاهان میزان قابل توجهی از ترکیبات زیست فعال دارند که از مهم‌ترین آن‌ها پلی فنل‌ها هستند. پلی فنل‌ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی می‌باشند و می‌توانند ایمنی میکروبیولوژیکی را افزایش دهند. همچنین می‌توان از آن‌ها به عنوان نگهدارنده طبیعی استفاده کرد [۱۷-۱۹].

گیاه درمنه (*Artemisia*) جز گیاهانی است که دارای خاصیت دارویی می‌باشد و در آب و هوای گوناگون رشد می‌کند [۲۰]. جنس *Artemisia* دارای گونه‌های متعددی است که هر گونه دارای ترکیبات ثانویه مختلفی است. این ترکیبات با توجه به شرایط محیطی رشد، میزان متفاوتی از این ترکیبات را در خود دارا است. از مهمترین گونه‌های *Artemisia* میتوان به *Artemisia annua*، *Artemisia herba alba absintium* و *Artemisia deserti* اشاره کرد. [۲۰, ۲۱]. درمنه دشتی (*Artemisia deserti*) از گونه‌های بومی جنس درمنه در ایران است. بیشترین ترکیبات شیمیایی برای عصاره آبی این گونه، مربوط به ترکیبات 1,8-cineole، camphor، piperitone-β و pinene isoborneol گزارش شده است [۲۲]. تاکنون مطالعات مختلفی در زمینه استفاده از عصاره های گیاهی محبوس شده در نیوزوم به انجام رسیده است. Emel Oyku و همکارانش نیوزوم های حاوی عصاره بره موم را سنتز و اثرات سمیت سلولی آن را علیه رده های سلولی مختلف بررسی نمودند. این محققان گزارش نمودند که نیوزوم های حاوی عصاره بره موم اثرات سمیت سلولی بیشتری نسبت به موم دارند. اثرات سمیت سلولی نیوزوم ها در زمان کوتاه تری اتفاق می افتد [۲۳]. Asmaa Abo و Elgoud Said و همکارانش در سال ۲۰۲۴، نیوزوم های حاوی عصاره Hemimycal را سنتز نمودند و اثرات سمیت سلولی آن را علیه رده سلولی سرطان سینه بررسی

استفاده به شرح زیر است: کروماتوگرافی گازی مدل GC7890-MS5975 از شرکت Agilent ساخت کشور آمریکا استفاده شد. شناسایی طیف های حاصل با رسم کروماتوگرام یک سری از پارافین های نرمال (C30-C5) تحت شرایط یکسان با تزریق عصاره انجام شد و با توجه به زمان بازداری این ترکیب ها در اندیس کواتز برای هر جزء موجود در کروماتوگرام عصاره محاسبه شد. این مقادیر با مقادیر اندیس کواتز موجود در جداول استاندارد مقایسه شد و ترکیب های موجود در عصاره درمنه براساس این داده ها و اطلاعات موجود در کتابخانه GC-MS شناسایی شد [۲۴].

تهیه نیوزوم ها به روش هیدراسیون لایه نازک

برای تهیه نمونه ها، ابتدا مقادیر مشخص از کلسترول، اسپن و توئین مورد نظر در حلال کلروفرم حل شد. سپس کاملاً محلول حاصل هم زده شد تا اجزا به طور کامل در کلروفرم حل شوند. محلول حاصل در بالن مخصوص روتاری ریخته و تحت شرایط مورد نظر (دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و دور rpm 150) تحت خلا قرار داده می شود تا حلال کاملاً تبخیر شود. سپس در مرحله هیدراسیون، به فیلم لیبیدی تهیه شده، مقادیر معینی از عصاره *Artemisia deserti* در بافر فسفات در pH برابر ۷/۲ طبق فرمولاسیون های مورد نظر در دمای بالای انتقال فاز اضافه شد و با استفاده از روتاری با سرعت rpm 120 به مدت نیم ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد برای هیدراته شدن مناسب چرخید. پس از اتمام مراحل هیدراسیون، به منظور کاهش اندازه ذره ای، عمل سونیکاسیون به مدت ۷ دقیقه انجام شد [۲۵].

نمودند. نتایج نشان داد که IC50 نیوزوم های سنتز شده 0.011128 ± 44.35 میکروگرم در میلی لیتر می باشد [۲۴]. در این مطالعه عصاره گیاه درمنه دشتی به عنوان کاندیدا جهت مطالعه انتخاب گردید. این پژوهش با هدف سنتز نانونیوزوم حاوی عصاره گیاه درمنه دشتی و بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن مانند مورفولوژی، سایز، پتانسیل زتا، فرمولاسیون بهینه، سرعت آزادسازی دارو، آنالیز ترکیبات و اثرات سمیت سلولی، ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی صورت می گیرد. همچنین آزادسازی دارو از نانونیوزوم و مقایسه آن با رهاسازی عصاره آزاد با هدف ارزیابی مقدار داروی آزادسازی شده در زمان مشخص صورت می گیرد. در انتها بررسی اثرات سمیت سلولی و همین طور بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی آن علیه سویه های بالینی مقاوم به دارو کلبسیلا پنومونیه صورت می گیرد.

مواد و روش ها

جمع آوری گیاه و عصاره گیری

این مطالعه آزمایشگاهی که از دی ماه ۱۴۰۰ تا تیرماه ۱۴۰۱ در دانشگاه آزاد اسلامی به انجام رسید، گیاه درمنه بیابانی از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران با شماره هرباریومی P1۰۰۶۹۳۱ تهیه شد. برای تهیه عصاره اتانولی درمنه بیابانی به روش ماسراسیون، میزان ۱۰ گرم پودر خشک گیاه را به ۱۲۰ میلی لیتر اتانول اضافه نموده و به مدت ۳۰ دقیقه استیرر می کنیم. در یک دوره ۳ روزه به همراه تحریک مکرر به منظور حل شدن ماده حل شونده در دمای اتاق نگهداری می شود. پس از گذشت ۳ روز، محلول را از صافی رد می کنیم. برای خشک و تغلیظ نمودن عصاره اتانولی، با استفاده از دستگاه روتاری حلال اضافی عصاره مورد نظر را تبخیر می کنیم. آنچه باقی می ماند به عنوان عصاره خالص در نظر گرفته می شود [۲۳].

آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با استفاده از

: GC-MS

ترکیب های تشکیل دهنده عصاره به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی شناسایی شد. مشخصات دستگاه مورد

نیوزومی حاوی دارو و همچنین محلول دارو (به صورت جداگانه) قرار داده می‌شود. هر یک از کیسه‌ها به صورت معلق در ۵۰ میلی لیتر بافر فسفات در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده می‌شوند. کیسه محتوی نانونیوزوم فاقد و حاوی دارو و محلول دارو بر روی استیرر قرار داده می‌شوند. در ساعت‌های مختلف نمونه‌گیری انجام می‌شود، بدین صورت که مقدار ۱ میلی لیتر از بافر فسفات حاوی کیسه دیالیز برداشته و ۱ میلی لیتر بافر فسفات با دمای ۳۷ درجه جایگزین آن می‌شود. عمل نمونه‌گیری تا ۷۲ ساعت در فواصل زمانی مشخص (۱ و ۲ و ۴ و ۸ و ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت) انجام می‌شود. در پایان، جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه UV اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۰ nm به روش کالریمتریک (روش فولین) خوانده شده و نهایتاً نمودار درصد آزادسازی تجمعی دارو از نیوزوم در طی ۷۲ ساعت رسم شد [۲۹].

بررسی گروه‌های عاملی سطح نانونیوزوم‌های حاوی عصاره سنتز شده با روش آنالیز طیف سنجی زیر مادون قرمز FTIR

در این روش جهت تشخیص و شناسایی پیوندهای شیمیایی ایجاد شده از دستگاه مادون قرمز کمپانی Thermo مدل AVATAR ساخت کشور آمریکا استفاده شد [۳۰].

جمع آوری سوبه‌ها

در این مطالعه تجربی از دی ماه ۱۴۰۰ تا تیرماه ۱۴۰۱ به انجام رسیده است، تعداد ۵۰ نمونه مشکوک به کلبسیلا پنومونیه از بیماران مراجعه کننده بیمارستان پارس، امام خمینی و شهدای تجریش شامل ادرار، زخم، مایع مغزی-نخاعی، خون و خلط جمع آوری شدند.

بررسی اثرات ضد میکروبی

تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC)

به منظور بررسی خواص ضدباکتریایی فرمولاسیون نیوزومی عصاره و فرم آزاد آن، از روش کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) استفاده شد. آزمایش MIC بر اساس استاندارد Clinical and Laboratory Standards (CLSI) (Institute) به روش رقیق سازی در میکروپلیت انجام گرفت.

تعیین اندازه و توزیع ذرات

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و

پراکندگی نور دینامیکی (DLS)

به منظور بررسی شکل ظاهری نانونیوزوم‌های سنتز شده از روش SEM استفاده شد. هم چنین جهت تعیین سایز نانونیوزوم‌های سنتز شده روش DLS مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین کارایی محصورسازی (Encapsulation Efficiency)

کارایی محصورسازی بیانگر نسبت داروی محصور شده در ساختار نانوذره نسبت به داروی اولیه مورد استفاده است. برای جدا کردن داروی آزاد از نیوزوم حاوی دارو از روش سانتریفیوژ استفاده شد به این ترتیب که فرمولاسیون نیوزومی در دمای ۴ درجه و با سرعت 14000 g به مدت ۴۵ دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار داده شد. نانوذرات حاوی دارو رسوب کرده و آنچه به عنوان سوپرناتانت می‌ماند داروی آزاد به همراه موادی که وارد واکنش نشده اند است. جذب نمونه سوپرناتانت در طول موج ۷۶۰ nm به روش کالریمتریک (روش فولین) مورد خوانش قرار می‌گیرد. با استفاده از منحنی کالیبراسیون مقدار داروی آزاد محاسبه شده و از مقدار اولیه داروی مورد استفاده در نمونه کسر می‌شود و از روی آن میزان درصد کارایی محصورسازی محاسبه می‌شود [۲۸].

$$EE = \frac{\text{میزان داروی آزاد} - \text{میزان داروی اولیه}}{\text{میزان داروی اولیه}} \times 100$$

= درصد احتباس دارو

بررسی الگوی آزادسازی عصاره از نانوحامل

میزان رهایش دارو با کیسه دیالیز سنجیده می‌شود که هدف ارزیابی مقدار داروی آزاد شده از نیوزوم در مدت زمان مشخص است. جنس کیسه دیالیز از استات سلولوز است که باید همیشه مرطوب باشد و برای این منظور در محلول حاوی سدیم آزاید ۰٫۱ درصد نگهداری می‌شود. رهایش دارو به صورت دینامیک مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. بدین صورت که در کیسه دیالیز مقدار ۲ میلی لیتر از فرمولاسیون نانو

کشت ۲۴ ساعته از ایزوله تهیه گردید و سپس با برداشتن از کلنی های کشت ۲۴ ساعته و تلقیح آن‌ها به محیط TSB حاوی ۰/۲ گلوکز، سوسپانسیون میکروبی به دست آمد که کدورت آن با کدورت نیم مک فارلند تطابق داشت. از محیط TSB بدون تلقیح باکتری به همه چاهک‌ها اضافه شد. چاهک ۱۲ کنترل منفی (بدون باکتری) و چاهک‌های ستون ۱۱ به عنوان کنترل مثبت (حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری) در نظر گرفته شد. سپس به هر یک از چاهک‌های ۱۰۰ پللیت میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی اضافه شد و به دنبال آن ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های زیر حد کشندگی نانوذره روی به آن اضافه گردید و سپس پللیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محلول رویی چاهک‌ها را خارج گردید و هر چاهک ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شسته شد. سپس باکتری‌های متصل به دیواره با ۲۵۰ میکرولیتر اتانل ۹۶٪ تثبیت شدند. بعد از ۱۵ دقیقه محتویات چاهک خالی شدند. بعد از خشک شدن پللیت‌ها به آن ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله اضافه گردید (به مدت ۱۵ دقیقه). بعد از گذشت این مدت‌زمان، رنگ‌های اضافی با استفاده از آب مقطر استریل شسته شدند. بعد از خشک کردن پللیت‌ها، سنجش کمی بیوفیلم بوسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ به هر چاهک صورت گرفت و جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA Reader (JASCO, V-530, ژاپن) خوانده شد [۳۲].

کشت سلولی و بررسی اثرات سمیت سلولی کشت سلول

رده سلولی نرمال فیروبلست انسانی ((Human foreskin fibroblasts (HFF) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران با کد NCBI461 تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین در ۵ درصد CO₂ در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند.

تست MIC بصورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکرودايلوشن در پللیت‌های ۹۶ خانه ای انجام شد. برای تعیین MIC نمونه‌ها، از محدوده غلظتی ۱۰۰۰-۷/۸ میکروگرم در میلی لیتر استفاده شد. حداقل غلظت مهاری برای میکروارگانسیم‌هایی که به فرمولاسیون نیوزومی عصاره و فرم آزاد آن حساس بودند، تعیین شد. MIC به کمترین غلظت از ترکیبات که رشد میکروارگانسیم را مهار می‌نماید، اطلاق می‌شود. به دنبال آن پللیت‌های ۹۶ چاهکی به کمک توزیع ۹۵ میکرولیتر از محیط مولر هینتون براث ۵ و میکرولیتر از تلقیح میکروبی به داخل هر یک از چاهک‌ها فراهم گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از نیوزوم حاوی عصاره و محلول آن به چاهک اول هر میکروارگانسیم اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی دیگر نمونه‌ها به داخل ۷ چاهک بعدی انتقال داده شد. چاهک آخر شامل ۹۵ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث با ۱۰۰ میکرولیتر از 0.5% DMSO و ۵ میکرولیتر از تلقیح میکروبی در هر ردیف به منزله کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. حجم نهایی در تمامی چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بود. میکروپللیت با درپوش پللیت استریل پوشانده شد. محتویات هر چاهک روی شیکر به مدت ۶۰ ثانیه با دور 100 rpm مخلوط گردید و سپس در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. رشد میکروبی با میزان جذب در طول موج 620 nm خوانده شد [۳۱].

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای بدست آوردن مقادیر حداقل غلظت کشندگی MBC از کلیه خانه‌هایی که کدورت در آن‌ها دیده نشود، ۱۰ میکرولیتر یا یک لوپ به پللیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل خواهد شد. اولین غلظتی از عصاره که در پللیت مربوط به آن رشد مشاهده نشود به عنوان MBC در نظر گرفته می‌شود [۳۱].

سنجش اثرات ضد بیوفیلمی

به منظور مطالعه کمی اثرات ضد بیوفیلمی نیوزوم حاوی عصاره از روش میکروتیتر پللیت استفاده شد. سپس یک

بررسی اثرات سمیت سلولی

به منظور بررسی اثرات سمیت سلولی نیوزوم، نیوزوم حاوی عصاره درمنه بیابانی و عصاره تنها علیه رده سلولی HFF از روش رنگ سنجی MTT (۳-۴،۵-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) استفاده شد. در ابتدا تعداد 1×10^6 سلول در پلیت ۹۶ خانه کاشته شدند و سپس سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر از نیوزوم خالی، نیوزوم حاوی عصاره درمنه بیابانی و عصاره تنها به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و به دنبال آن پس از طی زمان-های مذکور محتوی پلیت ۹۶ خانه ای تخلیه شده، سپس رنگ MTT اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت تحت شرایط ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس رنگ MTT جداسازی شد و کریستال‌های فورمازان تولید شده به وسیله سلول‌های زنده در ایزوپروپانول حل گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها توسط دستگاه الیزا ریدر (آمریکا، Bio Tek) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده و ثبت شد و میزان کشندگی سلول‌ها توسط فرمول زیر محاسبه

شد [۳۳]:

$100 \times$ جذب نوری سلول‌های کنترل بر جذب نوری سلول‌های تیمار شده = میزان بقا

آنالیز آماری

تمامی تست‌های این مطالعه به صورت ۳ بار تکرار بوده و محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism نسخه ۱۶ انجام گردید و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (one-way analysis of variance) مورد بررسی قرار گرفت و اطلاعات به صورت انحراف معیار \pm میانگین نمایش داده شده اند و سطح معنی داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

اجزا تشکیل دهنده عصاره درمنه بیابانی (A. deserti) با استفاده از روش GC/MS
تفکیک و شناسایی ترکیبات عصاره درمنه بیابانی توسط روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) انجام شد.

جدول ۱. آنالیز کروماتوگراف GC-MS عصاره گیاه درمنه بیابانی.

No	RT (min)	Area%	Name
1	4.632	1.18	2,4-Dimethylhexane
2	5.721	1.09	1-(Trimethylsilyl)-1-propyne
3	6.759	1.22	Decane
4	7.532	2.16	dl-Limonene
5	8.295	1.53	2-(1-hydroxy ethyl)-5-methyl-5-vinyl-tetrahydrofuran
6	9.125	0.69	Undecane
7	10.256	1.73	Camphor
8	10.77	0.74	Borneol
9	12.264	1.96	Naphthalene, decahydro-1,5-dimethyl-
10	12.83	0.83	2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-methylethyl)-
11	16.01	0.94	Tetradecane
12	16.586	1.03	Bicyclo[3.1.1]heptan-endo-6-ol, syn-7-bromo-
13	18.392	2.90	Phenol, 2,4-di-tert-butyl-
14	21.256	0.64	5-(hydroxymethyl)spiro[2.4]heptane-5-ol
15	22.361	12.00	cis-Hydroxydavanone
16	23.71	0.64	Octadecane
17	24.395	0.71	NEOPHYTADIENE
18	26.481	1.53	Phthalic acid, butyl isobutyl ester
19	31.457	0.78	Cyclononanone
20	33.117	1.92	Nomelidine
21	34.062	0.92	1-Eicosanol
22	34.829	1.09	Bis(2-ethylhexyl) phthalate
23	38.98	8.21	Eicosane
24	40.08	0.84	Eicosane
25	40.755	0.66	6.beta.-Methoxy-3.alpha.,5-cyclocholestan-25-ol
26	41.217	15.04	Hentriacontane
27	43.572	4.69	(24S)-24-Methyl-26,26-dimethyl-27-norcholesta-5,22-dien-3.beta.-ol
28	44.013	0.78	Octacosane \$n-Octacosane
29	44.511	7.30	(23S)-ethylcholest-5-en-3.beta.-ol
30	44.812	2.08	Pregna-5,20-dien-3.beta.-ol, 20-methyl-
31	45.124	0.85	4,7-Benzofurandione, 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-6-(2-propenyl)-
32	45.855	0.71	9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, (3.beta.)-
33	48.04	19.00	Taraxasterol

ترکیبات عصاره که دارای خاصیت ضد میکروبی هستند شامل لیمونن و کامفور هستند.

سنتز نانویوزوم حاوی عصاره درمنه بیابانی و بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن

در این مطالعه فرمولاسیون بهینه نانوحامل نیوزومی با نسبت مولی ۱:۱ (سورفکتانت/کلسترول) و نسبت مولی ۵۰:۵۰ (Span 60/Tween 60) با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر عصاره درمنه دشتی (فرمولاسیون F2) سنتز گردید (جدول ۲ و ۳).

شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده عصاره با استفاده از شاخص های بازداری و بررسی طیف های جرمی ترکیبات و مقایسه آن ها با طیف های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه های کامپیوتری و مراجع معتبر صورت گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که این گونه دارای ۳۳ ترکیب در عصاره خود است که مجموع ۹۸/۳۹ درصد کل عصاره را تشکیل می دهند. ۵ ترکیب عمده در عصاره گیاه عبارتند از : Cis-Hentriacontane, Eicosane, Hydroxydavanone و Taraxasterol و Ethylcholest-5-en3beta. مهم ترین

جدول ۲. فرمولاسیون‌های مختلف نانویوزوم سنتز شده.

Formulation	Span60/Tween60 (mol ratio)	Lipid (μmol)	Artemisia (mg/ml)	Surf/Chol (mol ratio)	Sonication time(min)
F1	75:25	200	1	1:1	7
F2	50:50	200	1	1:1	7
F3	25:75	200	1	1:1	7
F4	75:25	200	1	2:1	7
F5	50:50	200	1	2:1	7
F6	25:75	200	1	2:1	7

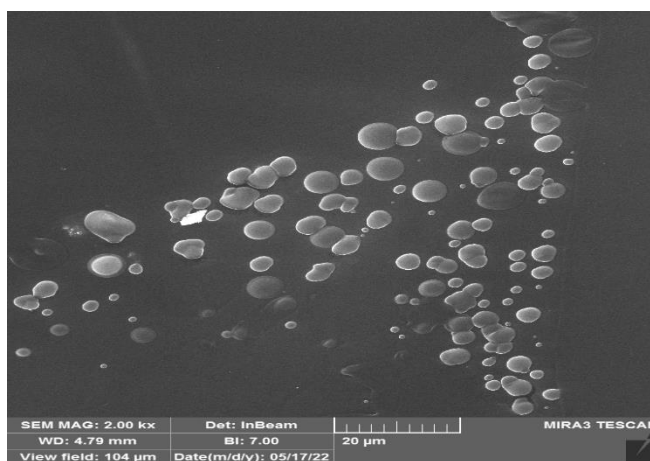
جدول ۳. اندازه و میزان درصد محصورسازی نیوزوم‌های سنتز شده حاوی عصاره.

Formulation	Vesicle Size (nm)	EE (%)
F1	259.1	51.63
F2	125.4	64.39
F3	248.3	48.11
F4	215.9	55.12
F5	169.1	61.37
F6	284.1	52.33

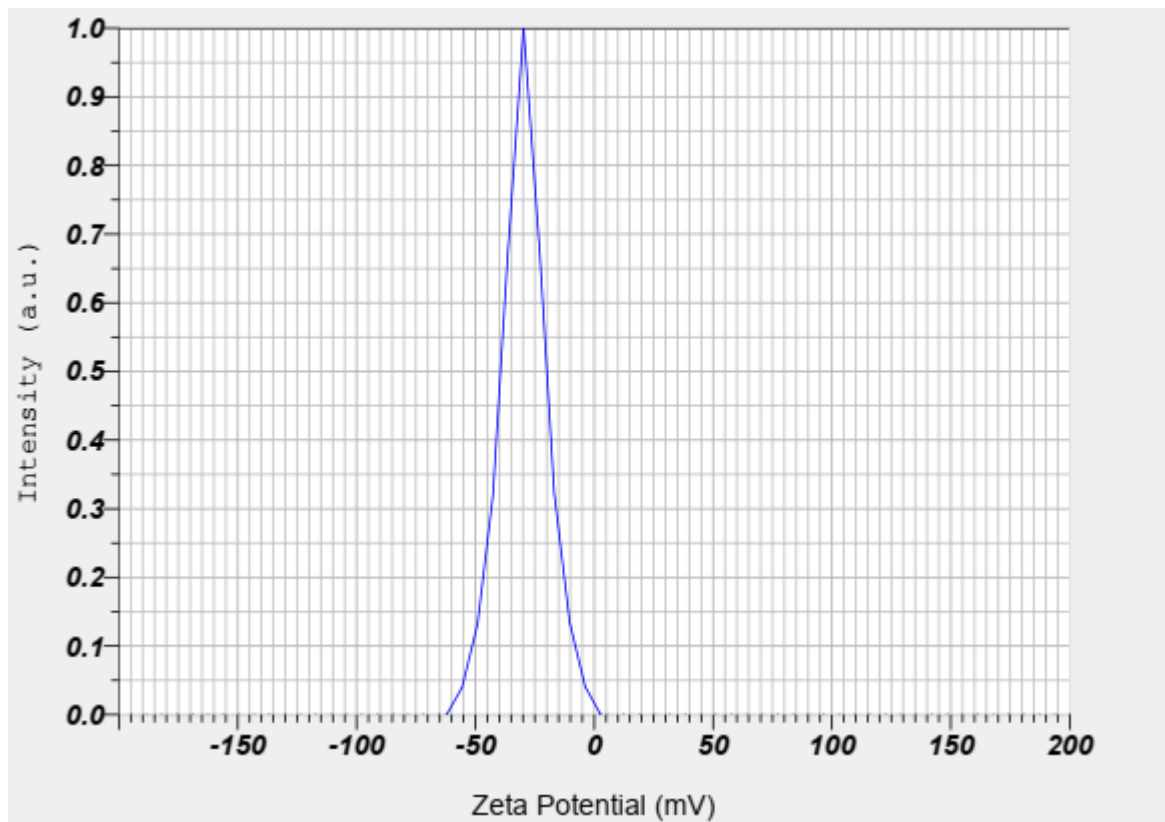
خصوصیات نانویوزوم‌های سنتز شده

به منظور بررسی پتانسیل زتا و سایز نانویوزوم‌های سنتز شده از روش زتاسایزر DLS استفاده شد. نتایج نشان داد که

پتانسیل زتا نانویوزوم‌های سنتز شده -29.7 mV می باشد (جدول ۴) و هم چنین سایز نانویوزوم‌های سنتز شده $299/3 \pm 125/4$ نانومتر می باشند (جدول ۵).



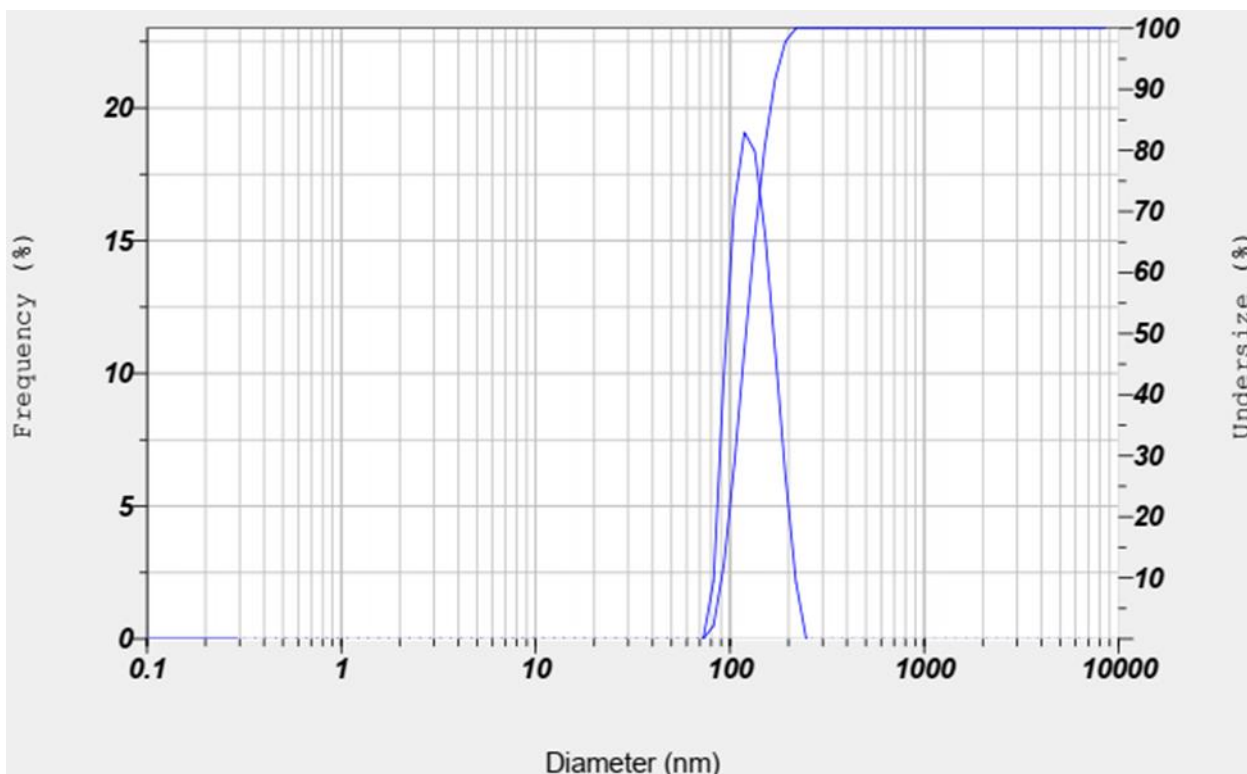
شکل ۱. مورفولوژی نانوحامل‌های نیوزوم بارگذاری شده با عصاره. همان‌طور که مشاهده می‌شود نیوزوم‌ها دارای ساختار کروی هستند.



شکل ۲. نمودار پتانسیل زتا نانولیپوزوم های سنتز شده.

جدول ۴. آنالیز پتانسیل زتا نانولیپوزوم های سنتز شده. پتانسیل زتا نانولیپوزوم بهینه سنتز شده -۲۹/۷ میلی ولت می باشد.

Peak No	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-29.7 mV	-0.000231 cm ² /Vs
2	--- mV	--- cm ² /Vs
3	--- mV	--- cm ² /Vs



شکل ۳. آنالیز اندازه میانگین نانونیوزوم های سنتز شده توسط روش DLS. نتایج نشان داد که نانونیوزوم های سنتز شده دارای سایز میانگین ۱۲۵/۴ نانومتر می باشند.

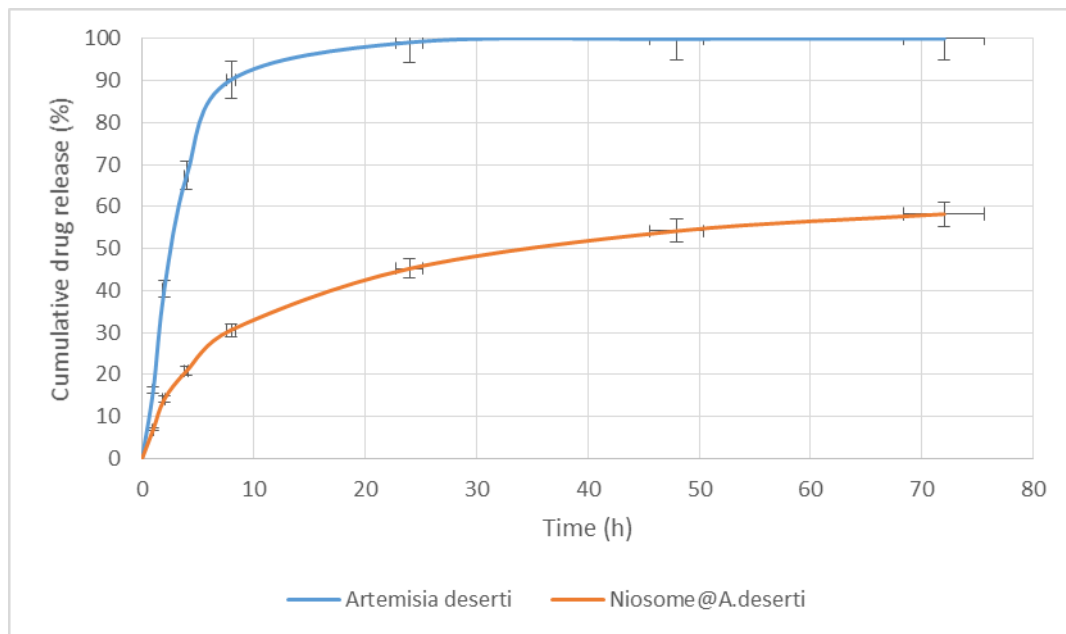
جدول ۵. سایز میانگین نانونیوزوم های سنتز شده.

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.
1	1.00	125.4 nm	29.3 nm
2	---	--- nm	--- nm
3	---	--- nm	--- nm
Total	1.00	125.4 nm	29.3 nm

نانونیوزوم (۵۸٪) کمتر از محلول عصاره (۱۰۰٪) طی مدت ۷۲ ساعت آزادسازی بود. در آزادسازی محلول عصاره، ۹۰٪ عصاره طی ۸ ساعت اول در محیط آزاد شدند ولی برای نانونیوزوم حاوی عصاره طی ۸ ساعت آزادسازی مقدار ۳۰٪ عصاره از نانوحامل نیوزوم آزاد شده است (نمودار ۳) [۳۵-۳۷].

بررسی الگوی آزادسازی عصاره از نانونیوزوم

شکل ۴ نشان دهنده روند آزادسازی تجمعی فرم محلول عصاره و نانونیوزوم حاوی عصاره در محیط آزادسازی PBS در طی ۷۲ ساعت می باشد. برای شبیه سازی و نزدیک کردن محیط آزادسازی برون تنی به شرایط واقعی و درون تنی از محیط آزادسازی PBS برای فاز گیرنده استفاده شد که همانطور که در شکل بالا مشهود است آزادسازی دارو از فرم

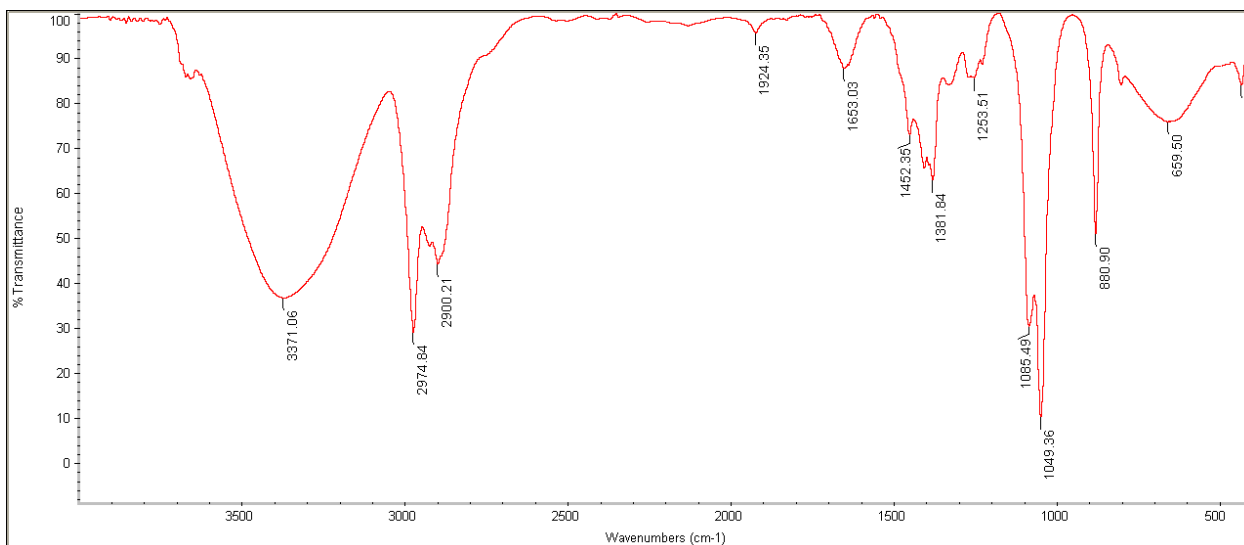


نمودار ۳. الگوی رهائش عصاره از نانوحامل نیوزومی بارگذاری شده با عصاره درمنه بیابانی و عصاره تنها. همانطور که مشاهده می شود عصاره در فرم نانونیوزوم به مراتب دارای الگوی آهسته رهش می باشد و به میزان کمتری نسبت به عصاره تنها آزادسازی شده است.

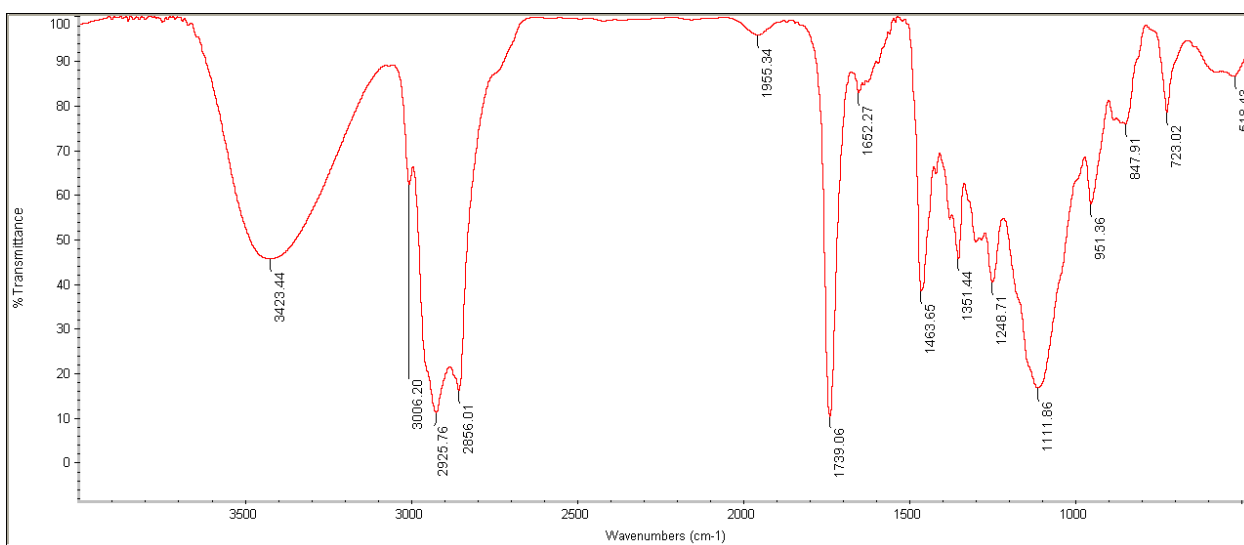
های مربوط به سامانه حاوی عصاره نسبت به سامانه فاقد نانوذره اتفاق افتاده که نشان دهنده ورود عصاره به درون سامانه است. همچنین پیک 2849 cm^{-1} نیز گروه عاملی هیدروکربنی با پیوند CH_2 را نشان می دهد که در سامانه ای که عصاره در آن انکپسوله شده است، عیناً تکرار شده است. برای مثال پیک های شاخص موجود در نانونیوزوم های 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 cm^{-1} ، 2922 ، 1622 و 1091 جا به جا شدند. هم چنین با توجه به اینکه در طیف FTIR سامانه حاوی عصاره پیکی جدیدی اضافه نشده و پیکی هم ناپدید نگشته می توان 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 مانده اند. در نتیجه حضور عصاره هیچ برهم کنش شیمیایی ناخواسته ای با سامانه برقرار نکرده است (نمودار ۴) [۳۸].

بررسی گروه های عاملی سطح نانونیوزوم های حاوی عصاره سنتز شده با روش آنالیز طیف سنجی زیر مادون قرمز FTIR

از تکنیک FTIR به منظور سنجش عدم برهمکنش سامانه نیوزومی سنتز شده با عصاره گیاه درمنه بیابانی استفاده گردید. تصاویر بدست آمده از طیف FTIR عصاره گیاهی (نمودار ۴-الف) وجود پیک های شاخصی هم چون پیک پهن موجود در ناحیه 3400 cm^{-1} که نشان دهنده گروه عاملی OH، پیک موجود در ناحیه 2900 cm^{-1} که مربوط به ارتعاش کششی C-H، پیک ناحیه 1700 cm^{-1} که مشخصه ارتعاش کششی C=O، پیک ناحیه 1450 cm^{-1} که نشاندهنده ارتعاش خمشی CH_2 و پیک ناحیه 1050 cm^{-1} که مرتبط با گروه عاملی P=O است را در ساختمان عصاره گیاهی نشان می دهد. با بررسی و مقایسه پیک های موجود در طیف FTIR نانو نیوزوم های حاوی عصاره گیاهی (شکل ب) مشاهده شد که تغییرهای جزئی در پیک



الف



ب

نمودار ۴. FTIR نانونیوزوم بارگذاری شده با عصاره. تعداد پیک‌های موجود در FTIR نشان دهنده وجود ترکیبات ساختار نیوزوم و عصاره گیاهی می‌باشد. الف: عصاره، ب: نانونیوزوم حاوی عصاره.

های تشکلی دهنده بیوفیلم و مقاوم به چند دارو (MDR) انجام گرفت. نتایج نشان داد که اثرات ضد میکروبی نانونیوزوم‌های حاوی عصاره درمنه بیایانی دارای اثرات ضد میکروبی معنادارتری نسبت به عصاره تنها بودند، بطوریه میزان MIC و MBC بین ۲ تا ۴ برابر کاهش پیدا کرده بود (جدول ۶).

بررسی اثرات مهارى نانونیوزوم حاوی عصاره و عصاره آزاد

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی از روش رقیق سازی در میکروپلیت با هدف تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) استفاده شد. بررسی اثرات ضد میکروبی علیه سویه

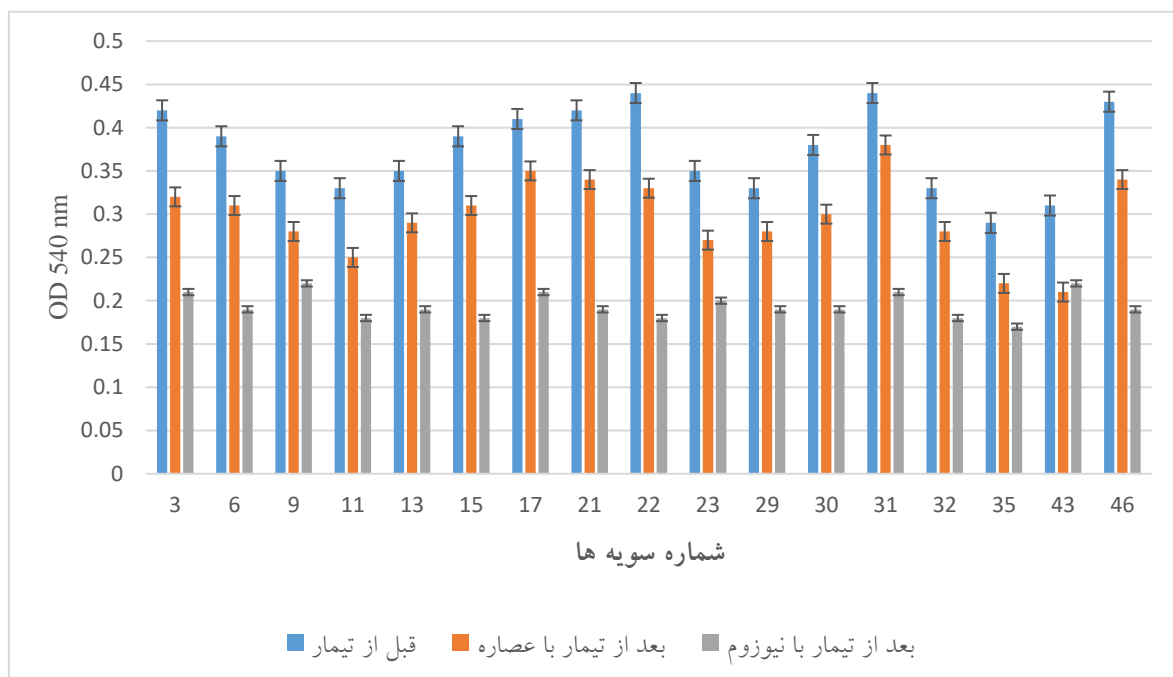
جدول ۶. بررسی اثرات ضد میکروبی نانونیوزوم‌های حاوی عصاره درمنه بیایانی و عصاره تنها.

ردیف	شماره سویه	غلظت MIC (میکروگرم در میلی لیتر) نانویوزوم	غلظت MIC (میکروگرم در میلی لیتر) عصاره	غلظت MBC (میکروگرم در میلی لیتر) نانویوزوم	غلظت MBC (میکروگرم در میلی لیتر) عصاره	Fold (میزان کاهش)
۱	۶،۳	۳۱/۲۵	۵۰۰	۳۱/۲۵	۱۰۰۰	۴
۲	۲۲،۱۱،۹	۶۲/۵	۲۵۰	۶۲/۵	۲۵۰	۲
۳	۲۹،۱۳	۱۵/۶۲	۲۵۰	۳۱/۲۵	۵۰۰	۴
۴	۴۳،۱۷،۱۵	۱۵/۶۲	۲۵۰	۱۵/۶۲	۲۵۰	۴
۵	۲۳،۲۱	۱۲۵	۵۰۰	۱۲۵	۵۰۰	۲
۶	۳۱،۳۵،۴۶	۳۱/۲۵	۵۰۰	۳۱/۲۵	۵۰۰	۴
۷	۳۰،۴۲	۳۱/۲۵	۵۰۰	۳۱/۲۵	۵۰۰	۴

سنجش مهار بیوفیلیم

به منظور مطالعه کمی اثرات ضدبیوفیلیمی نانویوزوم حاوی عصاره درمنه بیابانی و عصاره تنها از روش میکروتیتراپلیت

استفاده شد. نتایج این تست نشان داد که تمامی سویه ها در غلظت MIC نانویوزوم ها توانایی تشکیل بیوفیلیم نداشتند (نمودار ۵).



نمودار ۵. بررسی اثرات ضدبیوفیلیمی نیوزوم های حاوی عصاره و عصاره تنها علیه های سویه های کلبسیلا پنومونیه. همانطور که مشاهده می شود میزان اثرات ضدبیوفیلیمی (کاهش جذب نوری) در سویه های تیمار شده با نیوزوم ها به مراتب بیشتر می باشد. (***) $P < 0.001$

بررسی اثرات سمیت سلولی بر روی رده سلولی نرمال

نتایج تیمار سلول های نرمال HFF با غلظت های ۱۲۵-۳ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از نیوزوم خالی، عصاره درمنه بیابانی تنها و نیوزوم حاوی عصاره درمنه بیابانی نشان داد که نیوزوم خالی به

مراتب دارای اثرات سمیت سلولی ناچیزی بود بطوریکه در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر 99.85 ± 1.39 درصد سلول ها زنده بودند که نشان دهنده سازگاری زیستی نیوزوم ها می باشد، در صورتیکه در همین غلظت در اثر تیمار با عصاره تنها، تعداد

ترکیبات تشکیل دهنده عصاره گیاهی مشخص شد. بررسی ترکیبات تشکیل دهنده عصاره گیاه درمنه دشتی نشان داد که این گیاه حاوی ترکیبات موثره متعددی همچون لیمونن و کامفور است. این دو ترکیب به گیاه خاصیت ضد میکروبی می دهند. هرچند باید در نظر داشت که شرایط رشد گیاه بر روی ترکیبات تشکیل دهنده آن تاثیر گذار است. در ادامه، فرمولاسیون های مختلف نیوزوم های حاوی عصاره درمنه دشتی سنتز شد و بررسی فرمولاسیون های مختلف نیوزوم ها نشان داد که فرمولاسیون بهینه وقتی اتفاق می افتد که نانونیوزوم سنتز شده دارای نسبت مولی ۱:۱ سورفاکتانت به کلسترول باشد و فرمولاسیون بهینه F2، دارای سایز ۱۲۵,۴ nm و درصد انکپسولاسیون ۶۴,۳۹٪ بود. همچنین بررسی مورفولوژی نانوذرات نشان داد که نیوزوم ها دارای ساختار کروی هستند.

بطور کلی، اندازه ذرات و شارژ سطحی آنها، دو مشخصه مهم در سیستم های وزیکولی هستند و اثر این دو پارامتر در افزایش پایداری، تراوش پذیری و جذب سلولی به خوبی شناخته شده است. مطالعات مختلفی در زمینه سنتز نیوزوم های حاوی عصاره های گیاهی به انجام رسیده است [۴۰]. سلطانی و لطف آبادی طی تولید نانوسامانه های نیوزومی حاوی اسانس رزماری بیان نمودند که طبق نتایج میکروسکوپ الکترونی، مشخص شد که نانوذرات سنتز شده که به صورت توده ای و کروی شکل بوده و دارای اندازه ای حدود ۷۳/۶ نانومتر بودند [۴۱]. Celia و همکاران در سال ۲۰۱۳ نانولیپوزوم های حاوی اسانس ترنج را تهیه نمودند که این نانوذرات ضمن افزایش میزان حلالیت اسانس و بهبود شاخصه های ضد سرطانی آن، دارای پتانسیل زتای ۶- و اندازه ذرات ۱۸۶nm بودند. حق جو و همکاران در سال ۲۰۱۵ نانولیپوزوم های حاوی اسانس گزنه در غلظت های مختلفی از فسفاتیدیل کولین و کلسترول تهیه نمودند که حداکثر میزان درون پوشانی اسانس ۶۸/۸۳، محدوده اندازه ذرات بین ۸۱ تا ۹۴ نانومتر و شاخص پراکندگی ذرات ۰/۳ گزارش شد. ابراهیمی خوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۵ لیپوزوم های حاوی اسانس آویشن شیرازی تهیه نمودند که درصد درون پوشانی را در نقطه بهینه ۵۴/۴ درصد گزارش نمودند. هم چنین پژوهش یاد شده نشان داد که مهم ترین پارامتر موثر بر ریز پوشانی، درصد محتوای

61.25±1.65 درصد از سلول ها زنده بودند که نشان دهنده سمیت سلولی معنادار عصاره نسبت به گروه کنترل بود. اما در صورتیکه عصاره بصورت نیوزومال مورد بررسی قرار گرفت، در بالاترین غلظت یعنی ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، میزان بقای سلول 90.36±1.33 درصد بود که میزان بقای سلولی نسبت به عصاره تنها، بطور معناداری افزایش یافته بود (p<0.05).

بحث و نتیجه گیری

امروزه به دلیل استفاده بی رویه آنتی بیوتیک جهت درمان پاتوژن های میکروبی، آنها نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها مقاوم شده اند، اما با توجه به عوارض جانبی آنتی بیوتیک های موجود و ماهیت سنتتیک آنها، توجه محققان به استفاده از ترکیبات طبیعی گیاهی برای مقابله با باکتری های بیماریزا جلب شده است. عصاره های گیاهی اگرچه با وجود مزایایی که دارند، اثرات ضد میکروبی به دلیل حلالیت پایین در آب و فراهمی زیستی کمتر، دچار محدودیت هایی نیز هستند [۳۸]. استفاده از نانوتکنولوژی می تواند راه حلی برای این مشکل باشد. محصورسازی ترکیبات ضد میکروبی در نانوذرات نه تنها موجب افزایش حلالیت آنها در آب می شود، بلکه پتانسیل درمانی آنها را نیز افزایش می دهد. نیوزوم ها یکی از این نانوذرات هستند که وزیکول های مبتنی بر سورفاکتانت غیریونی می باشند. این ساختارهای دو لایه می توانند به صورت همزمان چندین داروی آبدوست و آبگریز را در خود جای دهند و به بدن بیماران منتقل کنند. در سال های اخیر، کشف شده است که این وزیکول ها می توانند فراهمی زیستی داروها را بهبود بخشند و ممکن است به عنوان یک استراتژی جدید برای ارائه چندین عامل معمولی درمانی مانند داروهای شیمیایی، داروهای پروتئینی و مواد ژنی با سمیت کم و بازده هدف گیری مطلوب عمل کنند. در مقایسه با نانوذرات دیگر همچون لیپوزوم ها، نیوزوم ها پایداری بهتر، هزینه تولید کمتر و فرموله شدن آسان تری دارند و می توانند در مقیاس های بالاتر تولید شوند. از این رو گزینه ای عالی برای حمل ترکیبات ضد میکروبی طبیعی می باشند [۳۹].

در این مطالعه از عصاره گیاه بومی کشور، درمنه دشتی جهت مطالعه استفاده شده است. ابتدا با استفاده از روش GC-MS

نمودن غشاء سلول توسط این مواد است که می‌تواند به کاتیون های سطح غشاء عوامل پاتوژن متصل شده و فعالیت های حیاتی آن‌ها را مختل کند. از طریق واکنش با غشاء میکروارگانیسم‌ها و تغییر در نفوذپذیری ترکیباتی چون پتاسیم و هیدروژن دارای اثرات ضد میکروبی است [۴۶].

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که نانونیوزوم های حاوی عصاره دارای اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی علیه سویه های بالینی کلبسیلا پنومونیه می باشند. همچنین بر روی رده سلولی نرمال فاقد هرگونه سمیت سلولی می باشند. با توجه به نتایج به دست آمده، نانونیوزوم ها می توانند به عنوان یک سیستم دارورسانی هدفمند و زیست سازگار به منظور اهداف ضد میکروبی مورد استفاده قرار گیرند. در مطالعه ای در سال ۲۰۲۱، محققان نانوذرات نیوزومی حاوی کورکومین-مس و کورکومین-نقره را به روش هیدراسیون لایه نازک آماده کردند و به بررسی اثر سینرژستیک ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی آنها علیه استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا پرداختند. آنها یافتند که این نانوذرات موجب نابودی بیشتر بیوفیلیم‌ها در مقایسه با فرم آزاد ترکیبات می شوند و پتانسیل بالایی برای کاربردهای پزشکی دارند [۴۷]. شریعتی و همکارانش اثر نانوکورکومین را بر بر سطوح بیان ژن های ویروالانس و تولید بیوفیلیم سودوموناس آئروژینوزا های مقاوم به چند دارو بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که نانوکورکومین های سنتز شده حلال در آب بودند و توانایی مهار رشد سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به چند دارو در غلظت $128 \mu\text{g/ml}$ را داشتند. همچنین، غلظت های زیر بازداری نانوکورکومین تشکیل بیوفیلیم را کاهش دادند و در غلظت $64 \mu\text{g/mL}$ ، ۵۸٪ بیوفیلیم های باکتریایی تشکیل شده را تخریب کردند. نانوذرات کورکومین باعث تنظیم پایین دست رونویسی ژن های ویروالانس نیز شدند بدون اینکه تأثیر سیتوتوکسیک بر سلول های اپیتلیال انسان بگذارند. نتایج نشان می دهند که نانوکورکومین می تواند به عنوان ماده احتمالی برای کاهش ویروالانس بیوفیلیم سودوموناس آئروژینوزا به کار رود [۴۸]. پیری و همکارانش اثرات ضد باکتریایی، ضد سرطانی

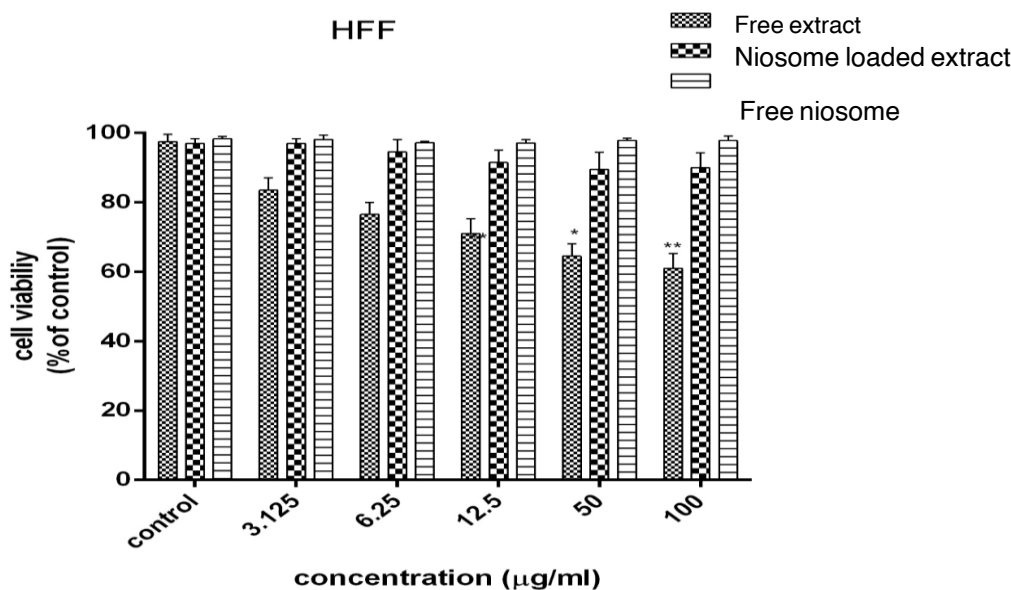
فسفاتیدیل کولین به کار رفته در سنتز لیپوزوم است و با کپسوله کردن اسانس آویشن می توان خاصیت آنتی باکتریال اسانس را افزایش داد [۴۲]. در مطالعه ای که توسط Manosroi و همکاران انجام شد اثر وجود کلسترول در فرمولاسیون نیوزومی حاوی Tween60 بررسی کردند. نتایج نشان داد که کارایی بارگذاری دارو تحت تاثیر طول زنجیره الکیل سورفکتانت غیر یونی و مقدار کلسترول به کار برده شده در تهیه وزیکولها است [۴۳]. در مطالعه ای دیگر در سال ۲۰۱۶، زو و همکارانش کورکومین را در نیوزوم انکپسوله کردند و اثر سمیت سلولی آن را بر سلول های سرطان رحم بررسی کردند. آنها نیوزوم‌ها را با استفاده از سورفکتانت های غیر یونی از جمله اسپن ۸۰، توین ۸۰ و پلوگزامر ۱۸۸ آماده کردند و کورکومین را با کارایی محصورسازی ۹۲٪ در نیوزوم‌ها جای دادند. تصاویر گرفته شده از نیوزوم‌ها به کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، ساختارهای کروی یکنواخت با سطوح صاف و فاقد توده را نشان دادند. آنها یافتند که با افزایش فشار هم‌نیزاسیون، ضخامت نیوزوم‌ها کاهش یافت. آنالیز DLS نشان داد که میانگین ضخامت نیوزوم های کورکومین در فشار ۸۰۰ بار، $4.03 \pm \text{nm}$ و کارایی محصورسازی ۹۲٫۳٪ بود. این بیانگر محصور شدن موفق کورکومین داخل نیوزوم بود [۴۴].

یکی از مزیت های نانوحامل های نیوزومی، آهسته رهش بودن آنهاست که در نتایج مطالعه ما نشان داد که نانونیوزوم های حاوی عصاره درمنه دشتی نسبت به عصاره آزاد به مراتب از الگوی آزادسازی آهسته تری پیروی می کنند و انکپسولاسیون عصاره در نانونیوزوم سبب آهسته رهش شدن رهاسازی عصاره می شود [۴۵]. هم چنین، بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی عصاره تنها و نانونیوزوم های حاوی عصاره، نشان داد که عصاره انکپسوله شده در نانونیوزوم به مراتب اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی بیشتری دارد. همین طور بررسی اثرات سمیت سلولی نشان داد که نانونیوزوم ها زیست سازگار هستند و اثرات سمیت سلولی کمتری را به نسبت عصاره تنها از خود نشان می دهند. مطالعات نشان می دهد که اثرات ضد میکروبی عصاره های گیاهی به دلیل نفوذپذیر

نتیجه‌گیری

در این مطالعه فرمولاسیون‌های مختلفی از نانووزوم‌های حاوی عصاره درمنه دشتی سنتز شد و خصوصیات ساختاری و مورفولوژیک آن بررسی شد. نتایج نشان داد که فرمولاسیون بهینه F2، دارای اندازه 125.4 نانومتر و درصد انکپسولاسیون ۶۴/۳۹ درصد بود. هم‌چنین نتایج میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نانونیوزوم‌های سنتز شده دارای ساختار کروی هستند. نتایج بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی نشان داد که نانونیوزوم‌های حاوی عصاره اثرات ضد میکروبی را افزایش داد و علاوه بر آن نانونیوزوم‌ها دارای اثرات سمیت سلولی علیه رده سلولی نرمال نبود که نشان دهنده سازگاری زیستی نانونیوزوم‌ها می‌باشد. بنابراین میتوان نانونیوزوم‌ها را به عنوان یک سیستم انتقال دارو پیشنهاد داد.

و آپویتوز عصاره خیار خلیج فارس با فرمولاسیون نیوزومی را مورد مطالعه قرار دادند. خصوصیات عصاره محصور شده با نیوزوم با میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ الکترونی عبوری ارزیابی شد. نتایج نشان داد که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیشترین اثر ضد میکروبی عصاره محصور شده با نیوزوم مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس بود. مقتدری و همکارانش اثرات ضد میکروبی عصاره اکیناسه آنگوستیفولیا محصور شده با نیوزوم را در برابر سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو بررسی نمودند. نتایج نشان داد که عصاره محصور شده در مقایسه با عصاره آزاد تا ۱۶ برابر فعالیت ضد باکتریایی بالاتری در برابر سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو نشان داد. علاوه بر این، محققان نشان دادند که نیوزوم سمیت سلولی بسیار کمی در برابر رده سلولی فیروبلاست پوست انسانی نشان داد [۴۸].



نمودار ۶. نمودار ستونی اثردهی غلظت‌های مختلف نیوزوم بارگذاری شده با عصاره درمنه بیابانی، عصاره تنها و نیوزوم فاقد عصاره در مدت زمان ۲۴ ساعت. در این نمودار، داده‌ها به صورت میانگین درصد زنده ماندن سلولی \pm انحراف معیار بیان شده‌است (*: $P < 0.05$ ، **: $P < 0.01$ ، ***: $P < 0.001$). (n=3; $P < 0.001$)

References

1. García-Díaz M, Patiño B, Vázquez C, Gil-Serna J. A novel niosome-encapsulated essential oil formulation to prevent *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin contamination of maize grains during storage. *Toxins*. 2019. 11(11): 646-652.
2. Begines B, Ortiz T, Pérez-Aranda M, Martínez G, Merinero M, Argüelles-Arias F, Alcudia A. Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects. *Nanomaterials*. 2020. 10(7): 1403.
3. Rawat M, Singh D, Saraf S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Bio Pharm Bulletin*. 2006. 29(9): p. 1790-1798.
4. Khaleghian M, Sahrayi H, Hafezi Y, Mirshafeeyan M, Moghaddam ZS. In silico design and mechanistic study of niosome-encapsulated curcumin against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Front Microbiol*. 14, 1277533.
5. Marianecchi C, Di Marzio L, Rinaldi F, Celia C, Paolino D, Alhaique F, Esposito S, Carafa M. Niosomes from 80s to present: the state of the art. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014. 205:187-206.
6. Yaghoobian, M. The impact of surfactant composition and surface charge of niosomes on the oral absorption of repaglinide as a BCS II model drug. *Int J Nanomedicine*. 2020; 15: 8767-8781.
7. Liu D, Yang F, Xiong F, Gu N. The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics*, 2016. 6(9): 1306-1323.
8. Abdelbary, A.A, AbouGhaly MH. Design and optimization of topical methotrexate loaded niosomes for enhanced management of psoriasis :application of Box- Behnken design, in-vitro evaluation and in-vivo skin deposition study. *Int J Pharm*. 2015;485(1-2):235-43.
9. Bassetti M, Canelutti A, Graziano E, Russo A. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: challenges for treatment, prevention and infection control. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018. 16(10): 749-761.
10. Fair, R.J. Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem*. 2014;6:25-64.
11. Doorduyn DJ, Rooijackers SH, van Schaik W, Bardoel BW. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology*, 2016. 221(10): 1102-1109.
12. Lam, M, Wick RR, Watts SC. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nat Commun*, 2021. 12(1): 1-16.
13. Podschun, R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, 1998. 11(4): 589-603.
14. Bengoechea JA, Pessoa JS. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS microbiology reviews*, 2019. 43(2): 123-144.
15. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Inter J Environmental Res Public Health*, 2020. 17(17): 6278.
16. Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. *J Inter Med*, 2020. 287(3): 283-300.
17. Krakowska-Sieprawska A. The influence of plant material enzymatic hydrolysis and extraction conditions on the polyphenolic profiles and antioxidant activity of extracts: A green and efficient approach. *Molecules*, 2020. 25(9): 2074.
18. Mirbehbahani FS, Hejazi F. *Artemisia annua* L. as a promising medicinal plant for powerful wound healing applications. *Prog Biomater*, 2020. 9(3): 139-151.

19. Huang J, Xu H, Huang Y. Antibacterial activity of *Artemisia asiatica* essential oil against some common respiratory infection causing bacterial strains and its mechanism of action in *Haemophilus influenzae*. *Microb Pathog*, 2018. 14: 470-475.
20. Findura, P. Extracts from *Artemisia vulgaris* L. in potato cultivation—Preliminary research on biostimulating effect. *Agriculture*, 2020. 10(8): 356.
21. Choi, EJ, Kim GH. Antioxidant and anticancer activity of *Artemisia princeps* var. *orientalis* extract in HepG2 and Hep3B hepatocellular carcinoma cells. *Chinese J Cancer Res*. 2013. 25(5): 536.
22. Rustaiyan A, Masoudi SH, A. Monfared, M. Yari, M. Kardar and A. Shahgholi, Composition of the volatile oil of *Artemisia deserti* krasch and *Artemisia oliveriana* J. Gayex DC. from Iran. *J Sci, I R Iran*. 2000. 11(3): 213-215.
23. Oyku Cetin E, Salmanoglu DS. Preparation of Ethanol extract of propolis loaded niosome formulation and evaluation of effects on different cancer cell lines. *Nutr Cancer*. 2022;74(1):265-277.
- Azwanida, N., A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 2015. 4(196): 2167-0412.
24. Elgoud Said AA, Khalaf Mahmoud B, Helmy AM. Niosomes as promising approach for enhancing the cytotoxicity of *Hemimyscale* sp. total crude extract supported with in-silico studies. *Scientific Reports*. 2024. 14: 2546.
25. Barani, M, Mirzaei M. Lawson-loaded niosome and its antitumor activity in MCF-7 breast cancer cell line: a nano-herbal treatment for cancer. *Daru*, 2018. 26(1): 11-17.
26. Ansari M. Eslami H. Preparation and study of the inhibitory effect of nano-niosomes containing essential oil from *Artemisia absinthium* on amyloid fibril formation. *Nanomed J*. 2020. 243-250.
27. Moghtaderi M, Mirzaie A, Zabet N, Moammeri A, Mansoori-Kermani A, Akbarzadeh I, Eshrati Yeganeh F, Chitgarzadeh A, Bagheri Kashtali A, Ren Q. Enhanced antibacterial activity of *Echinacea angustifolia* extract against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* through niosome encapsulation. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(6):1573.
28. Aparajay, P. Dev A. Functionalized niosomes as a smart delivery device in cancer and fungal infection. *Eur J Pharm Sci*. 2022. 168: 106052.
29. Afereydoon, S. Multifunctional PEGylated niosomal nanoparticle-loaded herbal drugs as a novel nano-radiosensitizer and stimuli-sensitive nanocarrier for synergistic cancer therapy. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022. 10: 917368.
30. Akbarzadeh, I. Preparation, optimization and in-vitro evaluation of curcumin-loaded niosome@calcium alginate nanocarrier as a new approach for breast cancer treatment. *Biology (Basel)*. 2021;10(3):173.
31. Kashef, M.T, Saleh NM, Assar NH, Ramadan MA. The antimicrobial activity of ciprofloxacin-loaded niosomes against ciprofloxacin-resistant and biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. *Infect Drug Resist*. 2020. 13: 1619-1629.
32. Mansouri M, Khayam N, Jamshidifar E, Pourseif T, Kianian S, Mirzaie A, Akbarzadeh I, Ren Q. Streptomycin sulfate-loaded niosomes enables increased antimicrobial and anti-biofilm activities. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021. 9: 745099.
33. Barani, M. Evaluation of Carum-loaded Niosomes on Breast Cancer Cells: Physicochemical Properties, In Vitro Cytotoxicity, Flow Cytometric, DNA Fragmentation and Cell Migration Assay. *Sci Rep*, 2019. 9(1): 7139.
34. Agarwal S. Formulation, characterization and evaluation of morusin loaded niosomes for potentiation of anticancer therapy. *RSC Adv*. 2018. 8(57): 32621-32636.
35. Varshosaz J. Development and physical characterization of sorbitan monoester niosomes for insulin oral delivery. *Drug Deliv*, 2003. 10(4): 251-262.

36. Qu M, Lin Q. Dopamine-loaded blood exosomes targeted to brain for better treatment of Parkinson's disease. *J Control Release*, 2018. 287:156-166.
37. Kishore, R.S. Degradation of polysorbates 20 and 80: studies on thermal autoxidation and hydrolysis. *J Pharm Sci*, 2011. 100(2): 721-731.
38. Khan, D.H. Process optimization of ecological probe sonication technique for production of rifampicin loaded niosomes. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2019. 50: 27-33.

Original Article

Synthesis of nanoniosomes loaded *Artemisia deserti* extract: identification of chemical compounds, antimicrobial effects and cytotoxicity

Received: 11/02/2024 - Accepted: 01/06/2024

Amir Mirzaie^{1*}

¹Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

Email:
Amir_mirzaie92@yahoo.com

Abstract

Introduction: Nanoniosomes are multi-layered vesicles that are used as one of the new targeted drug delivery systems today. In this study, the extract of the *Artemisia deserti* L. was encapsulated in nanoniosomes and its antimicrobial and cytotoxic effects were studied.

Method: In this experimental study, nanoniosomes containing the extract of *Artemisia deserti* were synthesized and their appearance and structural characteristics were investigated. After confirming the structure, its antimicrobial and anti-biofilm effects on *Klebsiella pneumoniae* pathogenic strains were investigated. Finally, in order to check the biocompatibility, the colorimetric method of nanoniosomes cytotoxicity was used on HFF normal fibroblast cell line.

Results: The results of niosomes synthesis showed that the synthesized nanoniosomes have a spherical structure and have a size of 125.4 ± 29.3 nm. In addition, FTIR results confirmed the synthesis of niosomes. The results of the antimicrobial effects showed that the nanoniosomes containing the medicinal extract have more significant antimicrobial and anti-biofilm effects than the extract alone, so that the minimum inhibitory concentration (MIC) of the niosomes was reduced between 2 and 4 times. Also, the cytotoxicity results showed that the synthesized niosomes do not have significant cytotoxicity effects.

Conclusion: In general, the results of this study showed that nanoniosomes can act as a suitable drug delivery system for medicinal plant extract to increase the amount of antimicrobial and anti-biofilm effects. Therefore, with further studies, this system can be used as an optimal drug delivery system for medicinal purposes.

Key words: Nanoniosome, *Artemisia deserti*, *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial effects, anti-biofilm

Acknowledgement: There is no conflict of interest