

ORIGINAL RESEARCH

Design and Production of A Wound Cover Containing Essence of *Ajwain* (*Trachyspermum*) by Nanoliposome Technique, and Assessment of Its Physical, Chemical, Antibacterial and Cytotoxicity Properties

Mahmoud Bahreloloum Tabatabai¹, Mohammad Mirjalili¹, Fatemeh Yazdiyan², Seyedhossein Hekmatimoghaddam^{3*}

1. Department of Textile and Polymer Engineering, Faculty of Textile and Polymer, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.

2. Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran.

3. Department of Laboratory Sciences, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history

Received: 28 May 2018

Accepted: 29 August 2018

Published online: 20 April 2019

Keywords

Ajwain

Cytotoxicity

Essence

Liposome

Textile

Wound cover

* Corresponding Author:

Seyedhossein Hekmatimoghaddam; P.O. Box 8916188635, Department of Laboratory Sciences, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Imam Reza Complex, Daneshjoo Blv, Yazd, Iran.

Fax: +98 35 3623 8561

Email: hekmati@ssu.ac.ir

ABSTRACT

Background and Aim: The aim of this study was to assess the applied characteristics of wound covers containing nanoliposomal essential oil of *ajwain*, with suitable antimicrobial properties and lack of cytotoxicity.

Materials and Methods: Liposomal formulations of the *ajwain* essential oil containing DSPE-PEG, cholesterol, span60 and SPC80 were prepared using a thin layer method. The rooting and spray methods on a cellulose fabric were used to produce skin wound cover. In addition to in vitro intracellular penetration and measurement of minimum inhibitory concentration of the product, textile characteristics, antimicrobial activity and 96 hours release of the essence in the wound cover were studied.

Ethical Considerations: In this study, all principles of research ethics were considered.

Findings: The loading efficiency of the liposomal formulation was more than 85%. The small particle dispersion index (PDI = 0.02) in the form of the PEGylated formulation indicates optimal dispersion of the particles which reduces the buildup of the drug in the cutaneous application. The standard AATCC microbial test showed inhibitory effect of the wound cover on bacteria, especially *E. coli*. Textile tests indicated acceptable properties of the produced wound cover, too.

Conclusion: Altogether, this wound cover showed acceptable features in combating the two selected bacteria responsible for infectious skin ulcers.

© Copyright (2019) Arak University of Medical Sciences

Cite this article as:



Bahreloloum Tabatabai M., Mirjalili M., Yazdiyan F., et al. Design and Production of A Wound Cover Containing Essence of *Ajwain* (*Trachyspermum*) by Nanoliposome Technique, and Assessment of Its Physical, Chemical, Antibacterial and Cytotoxicity Properties. *J Arak Uni Med Sci.* 2019; 22(1): 1-14.



JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و دو، شماره یک، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸

journal homepage: <http://jams.arakmu.ac.ir>



مقاله پژوهشی

طراحی و ساخت زخم‌پوش حاوی اسانس زنیان (*Trachyspermum*) با استفاده از فن

نانولیپوزوم و بررسی ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، ضد باکتریایی و سمیت سلولی آن

محمود بحر العلوم طباطبایی^۱ ID، محمد میرجلیلی^۱ ID، فاطمه یزدیان^۲ ID، سید حسین حکمتی مقدم^۳ ID*

۱. گروه مهندسی نساجی و پلیمر، دانشکده نساجی و پلیمر، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.

۲. گروه مهندسی علوم طبیعی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: این پژوهش با هدف بررسی ویژگی‌های کاربردی زخم‌پوش‌های بارگذاری شده با نانو لیپوزوم حاوی اسانس زنیان با اثرات ضد میکروبی مناسب و سمیت سلولی اندک انجام شد. **مواد و روش‌ها:** فرمولاسیون‌های لیپوزومی اسانس زنیان حاوی Cholesterol, DSPE-PEG, Span60 و SPC80 که به روش فیلم لایه نازک تهیه شده، با روش‌های رقیق‌کنی و اسپری به منظور تولید زخم‌پوش پوستی، روی پارچه‌ی پنبه‌ای پوشش داده شد. علاوه بر بررسی میزان انتقال به سلول در محیط برون تن و همچنین کمترین غلظت مهاری، آزمون‌های نساجی و آزمون ضدمیکروبی و هم‌چنین ره‌آیش ۹۶ ساعته اسانس در زخم‌پوش انجام گرفت. **ملاحظات اخلاقی:** در این پژوهش، تمامی اصول اخلاق در پژوهش رعایت شده است. **یافته‌ها:** درصد بارگذاری دارو در فرمولاسیون لیپوزومی بالای ۸۵ درصد بود. کوچک بودن شاخص پراکندگی ($PDI=0.02$) در فرم پگیله شده‌ی فرمولاسیون، نشان‌دهنده‌ی پراکندگی مطلوب ذرات است که عدم تجمع دارو را در کاربرد پوستی به دنبال دارد. آزمون میکروبی زخم‌پوش بر اساس استاندارد AATCC عدم رشد باکتری به‌ویژه اش‌ریشیا کلی را در حضور زخم‌پوش نشان داد. آزمون‌های نساجی نیز نشان از خواص قابل قبول زخم‌پوش تولیدی دارد. **نتیجه‌گیری:** در مجموع، این زخم‌پوش توانست نتایج قابل قبولی در از بین بردن دو باکتری انتخابی عامل زخم‌های عفونی نشان دهد.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۰۷

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۰۷

تاریخ انتشار: ۹۸/۰۱/۳۱

واژگان کلیدی

اسانس

زخم‌پوش

زنیان

سمیت سلولی

لیپوزوم

نساجی

* نویسنده مسئول:

سید حسین حکمتی مقدم

آدرس پستی: ایران، یزد، بولوار دانشجو، مجتمع

امام رضا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی

یزد، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم

آزمایشگاهی، کد پستی: ۸۹۱۶۱۸۸۶۳۵.

تمایز: +98 35 3623 8561

E-mail: hekmati@ssu.ac.ir

۱. مقدمه

میکروب‌ها در اثر آسیب دیدن پوست، به راحتی به بدن حمله می‌کنند که می‌تواند سبب بروز عفونت شدید، تداخل در مراحل درمان و حتی بروز عوارض تهدیدکننده زندگی شود. تلاش‌های بسیاری برای به کارگیری مواد نوین به منظور حفاظت از پوست آسیب‌دیده در برابر عفونت و کم‌آبی انجام یافته است (۱). برای درمان عفونت‌های پوستی، استفاده از برچسب‌هایی که در ساختمان آن‌ها از پلیمرهای طبیعی خاص استفاده شده و می‌توانند به وسیله نانو حامل‌های ضدباکتری پوشش داده شوند مؤثر است. این باندها، هم خاصیت ضدعفونی دارند و مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش می‌دهند و هم سریع‌تر زخم را التیام می‌دهند و حتی در صورتی که این پلیمرها جذب بافت‌های بدن شوند، مشکلی برای بیمار ایجاد نمی‌کنند (۲). در این میان، لیپوزوم‌ها و نیوزوم‌ها از پرمصرف‌ترین سامانه‌های نوین دارورسانی می‌باشند. لیپوزوم‌ها، گویچه‌های ریزی هستند که از مولکول‌های چربی و عمدتاً فسفولیپید تشکیل شده‌اند. مشخصه‌های دما، pH و قدرت یونی، روی پایداری لیپوزوم‌ها تأثیر دارد و با کاهش اندازه لیپوزوم و تعدیل بار سطحی می‌توان لیپوزوم‌های جدیدی با اندازه‌های کمتر از ۱۰۰ نانومتر و با بار منفی یا خنثی تولید کرد که توسط بدن جذب می‌شوند (۳). از مزایای استفاده از نانو ذرات هدفمند به عنوان سامانه رهایش دارو می‌توان به افزایش بازده دارورسانی، تقویت تأثیرگذاری دارو، کاهش مقدار داروی موردنیاز، پذیرش بهتر عامل درمانی توسط بدن بیمار، توانایی عبور ذرات از سامانه مویرگی، کاهش غلظت دارو در موقعیت‌های غیر هدف به منظور کاهش عوارض دارو و جلوگیری از آسیب بافت‌های سالم، قابلیت هدف‌گذاری مواضع مشخص و رهایش آهسته دارو اشاره کرد (۴). از داروهای لیپوزومی می‌توان تاموکسیفن (۵)، دانوروبیسین (۶)، داکسوروبیسین (۷) که در درمان سرطان کاربرد دارند و داروی آموتریپسین (۸) که به عنوان داروی لیپوزومی آمیبوزوم برای درمان بیماری‌های قارچی در بازار است را نام برد. روش‌های معمول ضد میکروب نمودن، به دلیل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضد میکروبی می‌تواند باعث بروز عوارض جانبی برای

سلامت بدن شود (۹). همچنین مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها باعث کاهش کارایی بسیاری از مواد ضد میکروبی شده است (۱۰). پس کاربرد روش‌های کمکی از جمله استفاده از اسانس‌های گیاهی اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. اسانس‌ها، ترکیبات معطری هستند که بعضاً ضد عفونی‌کننده نیز بوده و مانع از رشد میکروب‌ها می‌شوند. از طرف دیگر، این اسانس‌ها با بدن انسان سازگاری داشته و هنگام تماس با پوست، عموماً غیر سمی هستند (۱۱، ۱۲). اکثر این اسانس‌ها دارای نقطه جوش نسبتاً کم بوده و در برابر هوا، نور، رطوبت و دمای بالا، فرار و از نظر شیمیایی ناپایدار هستند (۱۳). با نگاهی به ساختار اسانس‌ها درمی‌یابیم که آن‌ها دارای ترکیبات شیمیایی متنوعی هم‌چون آلدهیدها، الکل‌ها، فنل‌ها، کتون‌ها، استرها، اکسید و اپوکسیدها، متیل اتر و ترپن‌ها هستند (۱۴). مکانیسم اثر اسانس بر باکتری، بیشتر به خاصیت آب‌گریزی اجزای تشکیل‌دهنده اسانس برمی‌گردد که موجب نفوذ به لیپیدهای دیواره سلولی باکتری و از این رو نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلولی می‌شود. اگرچه خروج مقادیر محدود این مواد برای باکتری قابل تحمل است، ولی در قابلیت زیستی آن اثر گذاشته و خروج مقادیر وسیع محتویات سلولی یا خروج یون‌ها و مولکول‌های حیاتی موجب مرگ باکتری خواهد شد. همچنین اسانس با تأثیراتی نظیر اختلال در انتقال الکترون، سنتز پروتئین و اسید نوکلئیک می‌تواند بازدارنده‌ی رشد و تکثیر باکتری باشد. به‌طور کلی، هرچه مقادیر مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، فعالیت ضد میکروبی اسانس با افزایش قدرت تخریب لایه لیپیدی باکتری و نفوذپذیری سلول افزایش می‌یابد (۱۵). پیش از قرن نوزدهم، زخم با مواد طبیعی مانند الیاف کتان، شاهدانه و کنف پوشانده می‌شد. این زخم پوش‌ها با وجود جاذب بودن معایبی نیز داشتند. به عنوان مثال، این مواد طبیعی اغلب ترشحات زخم را نگه نمی‌داشتند و در اثر چسبندگی به محل زخم سبب التهاب و عفونت آن می‌شدند و روند بهبود را به تأخیر می‌انداختند (۱۶، ۱۷). این موضوع سبب شد تا در سال ۱۸۸۰، سامسون زخم‌پوش جدیدی را با نام Gamgee اختراع کند. هسته این زخم‌پوش جاذب، پنبه بود که بین دو لایه گاز

یزدباف یزد تهیه شد. برای آزمون میکروبی محیط کشت‌های نوترینت براث و نوترینت آگار از Himedia (هند) خریداری شد. تمامی مواد شیمیایی دیگر مورد استفاده در این مطالعه دارای گرید آنالیتیکال بوده و بدون خلوص بیشتر استفاده شدند.

طراحی تحقیق

این پژوهش، به دو بخش: (۱) ساخت نانو کپسول لیپوزومی حاوی اسانس زنیان (که جزئیات آن در دست چاپ است) و (۲) کاربرد آن به صورت زخم پوش و انجام آزمون‌های نساجی تقسیم شده که مراحل انجام آزمایش به ترتیب در زیر آمده است.

آماده‌سازی داروی بارگذاری شده حاوی اسانس زنیان با

لیپوزوم

به منظور آماده‌سازی زنیان بارگذاری شده در لیپوزوم از روش لایه‌نازک استفاده شد. برای این کار ابتدا فسفاتیدیل کولین سویا (SPC) با کلسترول و پلی‌اتیلن گلیکول دسیله شده، با ضرایب مولی متفاوت در کلروفورم حل شد. سپس محلول حاصل به مدت ده دقیقه در دستگاه روتاری، هم‌دمای شد. آنگاه اسانس زنیان با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به فلاسک اضافه و به مدت ۲ ساعت در خلأ کامل تحت روتاری قرار گرفت. وزیکول‌های چندلایه (multilamellar vesicles, MLVs) تشکیل شده پس از هیدراتاسیون، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تحت اولتراسونیک حمامی قرار گرفت تا به وزیکول‌های تک لایه تبدیل شود. برای جدا شدن لیپوزوم‌های بزرگ‌تر از حد انتظار، به ترتیب از دو فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر و ۰/۲۲ میکرومتر استفاده شد.

تعیین راندمان بارگذاری اسانس زنیان در نانو کپسول

برای جداسازی اسانس زنیان که به سطح دیواره کپسول چسبیده، از کیسه‌ی دیالیز با جنس غشای سلولزی با حفاظت دمایی زیر ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده شد (cutoff: 12-14 kDa). برای اطمینان از جدا شدن زنیان بارگذاری نشده، از سالین بافر شده با فسفات (PBS) اطراف کیسه دیالیز با دستگاه اسپکتروفتومتر جذبی در طول موج ۲۲۱ نانومتر تا حصول عدد ثابت جذب گرفته شد. مقدار اسانس زنیان بارگذاری شده در همان طول موج، پس از حل شدن نانو سامانه حاوی لیپوزوم

کتان قرار می‌گرفت. پانسمن طراحی شده، جاذب، سفت و خشک و دارای قابلیت استفاده طولانی‌مدت بود. امروزه، هم‌چنان این پانسمن به‌عنوان جایگزین زخم پوش‌های اولیه به کار می‌رود (۱۶). زخم پوش‌های سنتی خشک مانند پشم، کتان، باندهای طبیعی یا مصنوعی و گاز که به‌عنوان زخم پوش‌های اولیه برای زخم استفاده می‌شوند، به سبب خشک بودن محیط مرطوب برای زخم ایجاد نمی‌کنند. در نتیجه، به زخم می‌چسبند و هنگام برداشتن از روی زخم، به آن آسیب می‌زنند (۱۸). امروزه زخم پوش‌های مدرن هم‌چون زخم پوش هیدروکلوئیدی، هیدروژنی، اسفنجی، آلژیناتی، زیستی، نانولیفی و دارورسان با قابلیت مدیریت ترشحات و مرطوب نگه‌داشتن محیط زخم تولید شده است (۱۹) که مصرف بالایی در بیمارستان و خانه دارند. در پژوهش حاضر، نانو سامانه‌های لیپوزومی حاوی اسانس زنیان که قبلاً سازگاری سلولی و عدم سمیت سلولی آن‌ها روی فیبروبلاست‌های پوستی، توسط آزمون حیات سلولی (MTT test) بررسی و میزان انتقال به سلول در محیط برون‌تن تعیین شده و هم‌چنین کمترین غلظت مهارتی (minimum inhibitory concentration, MIC) آن نیز بررسی شده بود، به دو روش اسپری و غوطه‌وری روی پارچه پنبه‌ای پوشش داده شد و آزمون‌های نساجی و هم‌چنین رهایش دارویی و آزمون میکروبی زخم پوش حاصله انجام گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

محیط کشت RPMI 1640 از شرکت Invitrogen (آمریکا) و رده سلولی HFF (فیبروبلاست پوستی انسان) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سورفکتانت غیر یونی (span 60)، پلی‌اتیلن گلیکول (Lipoid PE 18:0/ 18:0 -)، فسفولیپید دانه سویا دارای فسفاتیدیل کولین ۷۵ درصد (soybean Lipoid GmbH از (phosphatidylcholine, SPC80 (Ludwigshafen, Germany) تهیه شدند. کلسترول از شرکت Sigma Aldrich (St. Louis, USA) خریداری گردید. پارچه‌ی پنبه‌ای ریزبافت خام و بدون آهار از کارخانه‌ی

بررسی میزان انتقال اسانس به سلول در محیط برون تن

(In vitro transfection)

تعداد $10^5 \times 5$ عدد سلول فیبروبلاست پوستی در هر یک از پلیت‌های ۶ تایی به صورت تک لایه برای ۲۴ ساعت رشد داده شدند. سلول‌ها با محیط کشت RPMI-1640 شسته شدند و با نانو سامانه (نانو لیپوزوم دارای اسانس) حاوی رنگ فلورسنت به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس سلول‌ها سه مرتبه به وسیله PBS شستشو شده و با محلول پارافرمالدهید ۴ درصد (Thermo Scientific, USA) تثبیت شدند. به منظور رنگ‌آمیزی هسته‌ای از DAPI (۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. جذب سلولی نانو سامانه به وسیله میکروسکوپ فلورسنت (Olympus, Japan) ارزیابی شد.

پوشش دهی نانو کپسول روی پارچه به روش رmq کشی

و اسپری و مشخصه یابی آن

در این روش، ابتدا نمونه پارچه در ابعاد ۸ در ۱۰ سانتی‌متر برش داده شده و به صورت شل پیچ و بدون تاخوردگی داخل لوله فالکن که به حجم ۷ میلی‌لیتر از نانو کپسول لیپوزومی حاوی اسانس زنیان پر شده، قرار گرفته و به مدت ۸ ساعت در این محلول غوطه‌ور شد. سپس فالکن درون یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در روش اسپری، پارچه در ابعاد ۲۰ در ۲۰ برش داده شده و در وسط نمونه، کادری به ابعاد ۱۰ در ۱۵ سانتی‌متر مشخص کرده و در همان کادر به صورت یکنواخت با یک وسیله پاشش معمولی (افشانه) اسپری محلول نانوکپسول حاوی اسانس زنیان انجام گرفت. سپس نمونه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد خشک شد (۲۱).

با استفاده از دستگاه ثبات سایشی rubtester میزان مقاومت سایشی زخم پوش مطابق استاندارد ASTM D3885 مورد بررسی قرار گرفت. تعیین میزان نفوذپذیری هوا برای زخم پوش با استفاده از دستگاه Air permeability مطابق استاندارد ASTM D73 انجام شد.

بررسی خواص ضد میکروبی زخم پوش

حاوی اسانس زنیان با نسبت‌های مختلف ایزوپروپیل، بررسی شد. همچنین نمودار استاندارد اسانس زنیان در محلول ایزوپروپیل رسم شد.

$$\text{میزان داروی بارگذاری شده} \times 100 = \frac{\text{میزان داروی مورد استفاده برای انجام بارگذاری}}{\text{راندمان کپسوله شدن}}$$

آزمایش برون‌تنی رهایش نانو کپسول حاوی اسانس

زنیان در فواصل زمانی مختلف

شبیه‌سازی رهایش اسانس زنیان از حامل‌ها در محیط برون‌تنی با کیسه‌ی دیالیز (MW cutoff=12 kDa, Sigma, Germany) در برابر PBS، به مدت ۷۲ ساعت در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. به این منظور یک میلی‌لیتر از حامل داخل کیسه دیالیز ریخته و کیسه، درون فالکنی که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات بود قرار داده شد. سپس فالکن درون یک بشر پر از آب قرار گرفت و در فواصل زمانی صفر، ۱۲ ساعت، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت، ۷۲ ساعت، دو میلی‌لیتر از آب فالکن برداشته و دو میلی‌لیتر بافر اضافه شد و به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر، جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۲۱ نانومتر خوانده شده و رهایش در فواصل مختلف زمانی محاسبه شد (۲۰).

تعیین سایز و محدوده توزیع نانولیپوزوم حاوی اسانس

زنیان

محدوده توزیع اندازه ذرات و همچنین پیک اندازه ذرات با استفاده از DLS و با دستگاه نانوسایزر Brookhaven Instruments, USA تعیین شد. اندازه‌گیری نانولیپوزوم در یک زاویه ۹۰ درجه و تابش نور لیزر با طول موج ۶۵۷ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

تعیین پتانسیل زتا در نانولیپوزوم حاوی اسانس زنیان

میزان بار سطحی و پتانسیل زتا نانولیپوزوم با استفاده از دستگاه زتاسایزر شرکت Brookhaven Instruments, USA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد.

آزمون میکروبی MIC و تست زنده‌مانی سلولی MTT مطابق استانداردهای رایج مربوطه انجام شد.

از قطره و دارای نرم‌افزار سنجش زاویه تماس قطره با سطح موردنظر انجام شد.

برای اثبات حضور زنیان روی زخم پوش، بررسی طیف‌سنج مادون قرمز (FTIR) پارچه استفاده شد. برای بررسی حضور نانو کپسول‌ها روی زخم پوش از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد و تصاویر آن با بزرگ‌نمایی‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

تحلیل آماری

برای بررسی آماری نتایج نرم‌افزار GraphPad Prism و روش آنوای یک‌طرفه را به کار گرفتیم و معناداری اختلاف گروه‌ها برحسب $p < 0/05$ تعیین شد.

۳. ملاحظات اخلاقی

در این پژوهش، تمامی اصول اخلاق در پژوهش رعایت شده است.

۴. یافته‌ها

پس از آزمایش‌های مربوطه، فرمولاسیونی که در آن از ترکیبات کلسترول، اسپان ۶۰، فسفولیپید و پلی‌اتیلن گلیکول دسیله شده استفاده شده بود به‌عنوان بهینه انتخاب شد که نتیجه‌ی آزمون‌های آن در جدول ۱ آمده است.

خواص ضد میکروبی زخم پوش با استاندارد نساجی AATCC 100-1993 (American association of textile chemists and colorists) انجام شد که در آن شمارش کلنی‌های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی رشد یافته روی محیط نوترینت آگار بیان‌گر اثر ضد میکروبی پارچه ای است که قبلاً با آن باکتری‌ها در تماس بوده است.

ارزیابی میزان رهایش نانو کپسول از زخم پوش با استفاده

از روش اسپکتروفوتومتری جذبی

میزان رهایش داروی زنیان از زخم پوش، در طی ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار ابتدا زخم پوش را به ابعاد ۲ در ۷ سانتی‌متر برش داده و درون بافر فسفات قرار داده و از محلول بافر در زمان‌های ۱ تا ۱۰ ساعت و ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت دو میلی‌لیتر نمونه با میکرو پیپت برداشت کرده و دو میلی‌لیتر بافر، جایگزین نمودیم. سپس با دستگاه اسپکتروفوتومتر جذبی، میزان جذب در طول موج ۲۲۱ نانومتر اندازه‌گیری و در آخر محاسبات رهایش در نرم‌افزار اکسل انجام شد (۲۰).

آزمون زاویه قطره آب (سرعت نفوذ و پخش قطره)

برای بررسی میزان آب‌دوستی، آب‌گریزی سطح، اندازه‌گیری زاویه تماس صرفاً با قطره آب (با حجم ۴ میکرو لیتر) توسط دستگاهی مجهز به یک دوربین CCD با قابلیت عکس‌برداری

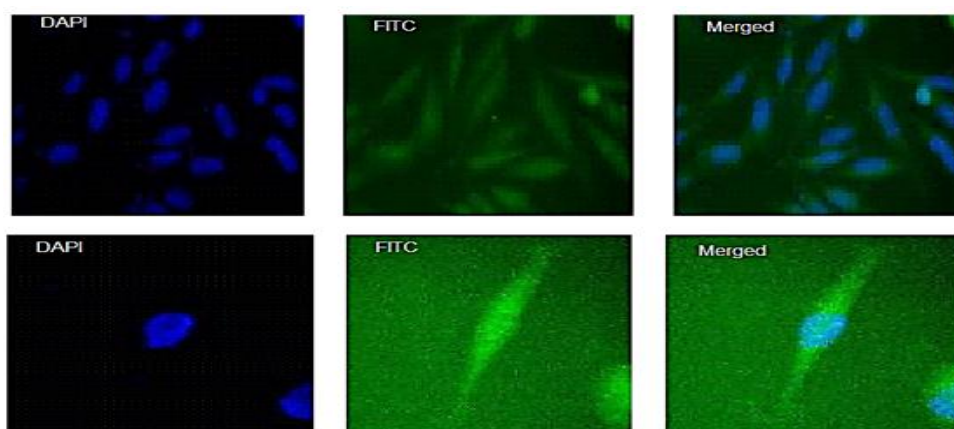
جدول ۱. نتایج آزمون‌های مختلف روی فرمولاسیون بهینه نانو کپسول لیپوزومی حاوی اسانس زنیان

راندمان (درصد)	اندازه ذرات (نانومتر)	پتانسیل زتا	پراکندگی	درصد رهایش	زنده‌مانی سلول (درصد)	MIC ₉₀ (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
۸۵/۹	۱۷۰	-۲۳/۵۳	۰/۲۵۸	25 °C: 6.73-63 37 °C: 11.4-71	۹۶/۳۹	۰/۰۵: E. coli ۰/۰۸: S. aureus

سامانه با پلی‌اتیلن گلیکول دسیله شده و اصلاح سطح نانو کپسول دلیلی برآهسته بودن رهایش است. هم‌چنین ورود نانو سامانه ترکیبی (حاوی لیپوزوم پیگیده) به داخل سلول‌های فیبروبلاست در زیر میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد. در سلول‌هایی که فقط رنگ DAPI داشتند صرفاً هسته به رنگ آبی درآمده بود (به‌عنوان کنترل) و در سلول‌هایی که با نانو سامانه متصل به رنگ فلورسنت (سبز رنگ) مجاور شده بودند

همان‌طور که در جدول بالا مشخص است، فرمول آهسته رهش بوده و کوچک بودن شاخص پراکندگی ($PDI = 0/02$) در این فرم پیگیده شده، نشان‌دهنده‌ی پراکندگی مطلوب در ذرات است که عدم تجمع دارو را در کاربرد پوستی به دنبال دارد و این فرمولاسیون به دلیل این‌که برای کاربردهای ضد عفونی پوست و تولید زخم پوش تهیه شده، حداقل رهایش را در ساعات اول دارد که برای زنده ماندن ماکروفاژها مناسب است. پوشش‌دهی

سیتوپلاسم به رنگ سبز درخشندگی داشت که نشانه‌ی ورود به سلول بود. کنتراست رنگ سبز و آبی در شکل ۱ مشخص است.



شکل ۱. رنگ‌آمیزی هسته و سیتوپلاسم سلول فیبروبلاست

نسبت به نمونه اسپری شده به غوطه‌وری دوازده‌ساعته نمونه پنبه‌ای درون لیپوزوم برمی‌گردد که کاهش ثبات سایشی را در پی دارد. هم‌چنین مطابق جدول ۳ نمونه خام به دلیل نداشتن پوشش، قابلیت انتقال هوای بیشتری دارد و در نمونه اسپری شده به دلیل پاشش روی یک‌طرف سطح، نفوذپذیری بیشتری نسبت به نمونه رmq کشی شده دارد. در نمونه رmq کشی، به دلیل غوطه‌وری پارچه در نانو کپسول و پوشش دوطرفه، قابلیت انتقال هوای کمتری نسبت به نمونه اسپری شده و خام وجود دارد.

بررسی ثبات سایشی و نفوذپذیری هوا در زخم پوش

همان‌طور که در جداول ۲ و ۳ مشخص است، نمونه خام به دلیل نداشتن پوشش لیپیدی از استحکام سایشی کمتری برخوردار هست و در دور بر دقیقه پایین‌تر (۳۷۰) نسبت به دو نمونه دارای پوشش، دچار پارگی ناشی از سایش شده و با کاهش وزن بالاتری نسبت به دو نمونه پوشش داده‌شده قرار می‌گیرد. نمونه رmq کشی شده نیز در دور بر دقیقه کمتری (۴۷۰) نسبت به نمونه اسپری شده (۵۷۰) دچار پارگی ناشی از سایش شده و کاهش وزنی معادل ۳ درصد بیش از نمونه اسپری شده دارد. دلیل کاهش استحکام ناشی از سایش نمونه رmq کشی شده

جدول ۲. نتایج آزمون ثبات سایشی در سه نمونه خام، اسپری و رmq کشی

کاهش وزن (درصد)	وزن ثانویه (گرم)	وزن اولیه (گرم)	دور بر دقیقه	روش
۲۰	۰/۸۷	۱/۰۸	۳۷۰	خام
۱۶	۰/۸۹	۱/۰۵	۴۷۰	رmq کشی
۱۳	۰/۸۹	۱/۰۲	۵۷۰	اسپری

بررسی طیف فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR) از سطح

زخم پوش

در بررسی طیف فروسرخ از سطح زخم پوش (شکل ۲) با توجه به ساختار شیمیایی ترکیبات موجود در لیپوزوم که در قسمت قبل تر نتایج به آن اشاره شد، در نمونه اسپری‌شده، گروه O-H در طول موج ۳۲۷۶ نانومتر دیده می‌شود و گروه‌های متیل

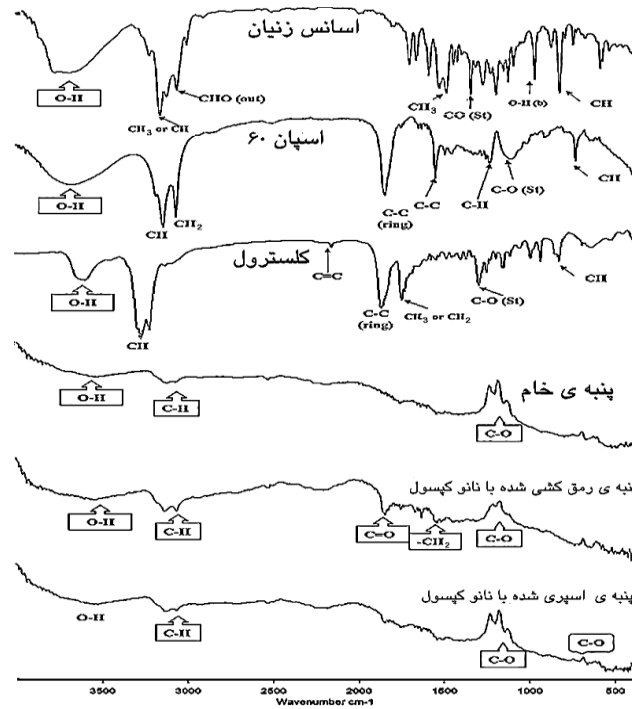
جدول ۳. محاسبه درصد نفوذپذیری هوا در زخم پوش

درصد نفوذ هوا	دبی جریان هوا*	روش
۲۸/۳۳	۱۴۳۰	خام
۱۶/۳۳	۹۸۰	رmq کشی
۱۷/۵	۱۰۵۰	اسپری

*واحد دبی: مترمکعب هوای ورودی از مترمربع سطر در زمان یک ساعت در اختلاف فشار ۱۰۰ پاسکال، $Q=q/60$

رنگ کشی شده، طول موج‌های بالا با شدت بیشتری نمایان است که نشان از درصد بالاتر ترکیبات پوشش داده‌شده روی نمونه دارد.

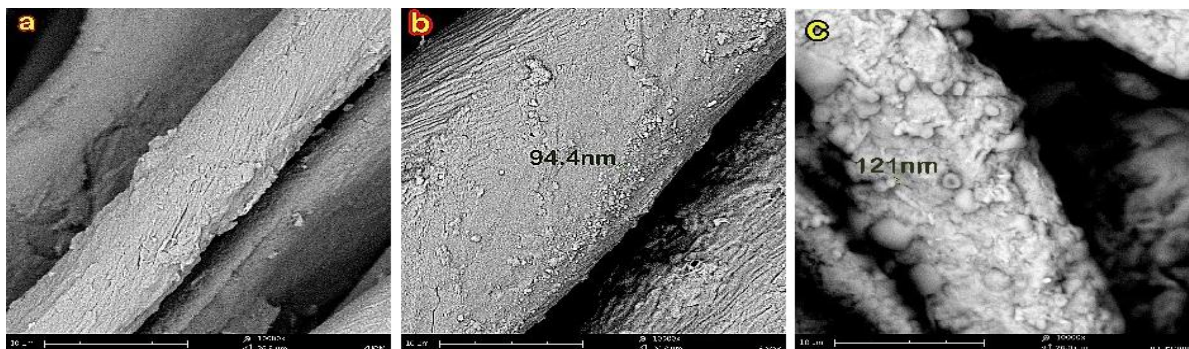
موجود در زنیان، در طول موج ۲۹۱۳ دیده می‌شود. همچنین گروه‌های آروماتیک مربوط به $C=C$ موجود در زنیان در بازه‌ی ۱۴۰۰ تا ۱۶۰۰ مشهود است و طول موج‌های زیر ۱۰۰۰ نیز مربوط به گروه‌های آلیفاتیک است. در طیف مربوط به نمونه



شکل ۲. مقایسه نمودارهای طیف‌سنجی فرورسرخ تبدیل فوریه زخم پوش پوشش داده‌شده به‌وسیله کپسول حاوی اسانس زنیان

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی

تصاویر SEM از سطح نمونه خام و نمونه‌های پوشش داده‌شده به دو روش رنگ کشی و اسپری با گرفته شد که در شکل ۳ آمده است.



شکل ۳. میکروگراف الکترونی روبشی (SEM) از نمونه‌ها (a): خام، (b): اسپری، (c): رنگ کشی

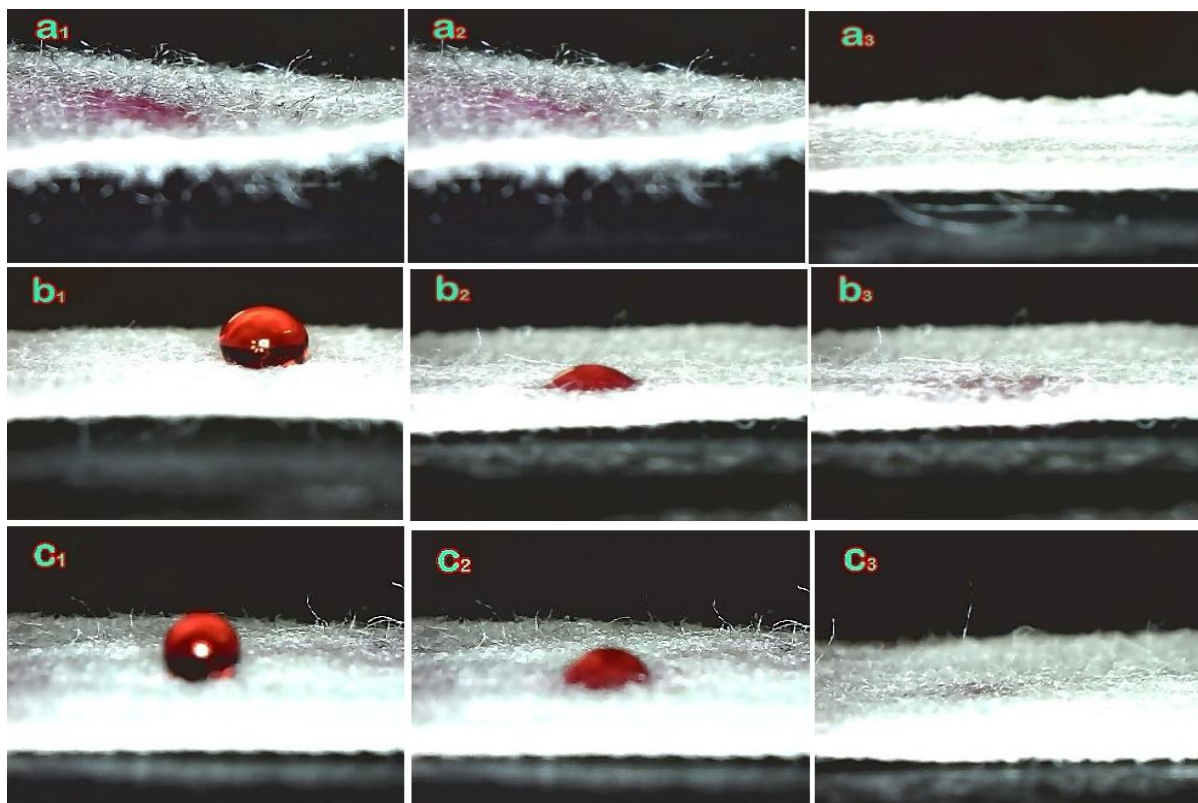
شد. در نمونه رmq کشی شده زمان جذب کامل قطره به طور میانگین ۱۰ ثانیه و زمان خیس شدن کامل ۷ ثانیه اندازه گیری شد و در نمونه اسپری شده، پس از سه بار اندازه گیری، زمان جذب کامل قطره، ۶ ثانیه بود و زمان خیس شدن کامل در اثر غوطه‌وری به طور متوسط ۵ ثانیه اندازه گیری شد. با مقایسه تصاویر بالا می‌توان نتیجه گرفت که خاصیت آب‌دوستی زخم‌پوش با توجه به زمان جذب کامل قطره و همچنین زمان خیس شدن کامل و غوطه‌وری با توجه به استاندارد زخم‌پوش‌ها که معمولاً ۱۰ ثانیه است و در اینجا برای نمونه‌های اسپری و رmq کشی ۵ و ۷ ثانیه است، باعث جذب بیشتر خونابه‌ی زخم شده و در ترمیم زخم تأثیر بیشتری دارد.

با توجه به تصاویر میکروسکوپی، در نمونه رmq کشی، پوشش نانو کپسول به مراتب بهتر بوده و بیشتر از نمونه اسپری شده، جذب پارچه شده است.

همچنین در نمونه اسپری شده (میانگین ۹۴/۴ نانومتر) ذرات نسبت به نمونه رmq کشی (میانگین ۱۲۱ نانومتر) ریزتر بوده اما در رmq کشی، ذرات نانو لیپوزوم تجمع شده است.

آزمون قطره آب از نمونه‌های زخم‌پوش

از بررسی شکل ۴ این گونه می‌توان نتیجه گرفت که در نمونه خام، به محض قرار گرفتن قطره، فوراً و در کمتر از ۳ ثانیه جذب کامل صورت گرفت، به نحوی که امکان گرفتن عکس از تشکیل قطره میسر نشد. همچنین در ارزیابی زمان خیس شدن کامل در روش شناوری، نمونه خام در کمتر از ۳ ثانیه، کاملاً خیس

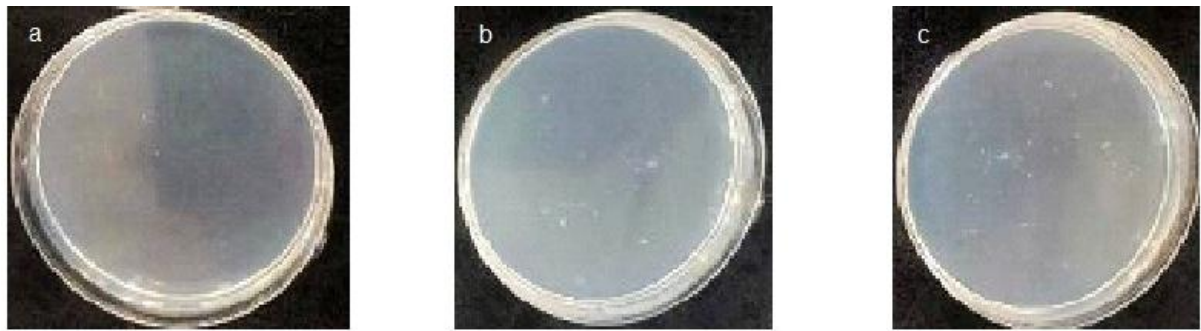


شکل ۴. آزمون قطره آب (a) نمونه خام، (b) نمونه رmq کشی، (c) نمونه اسپری شده

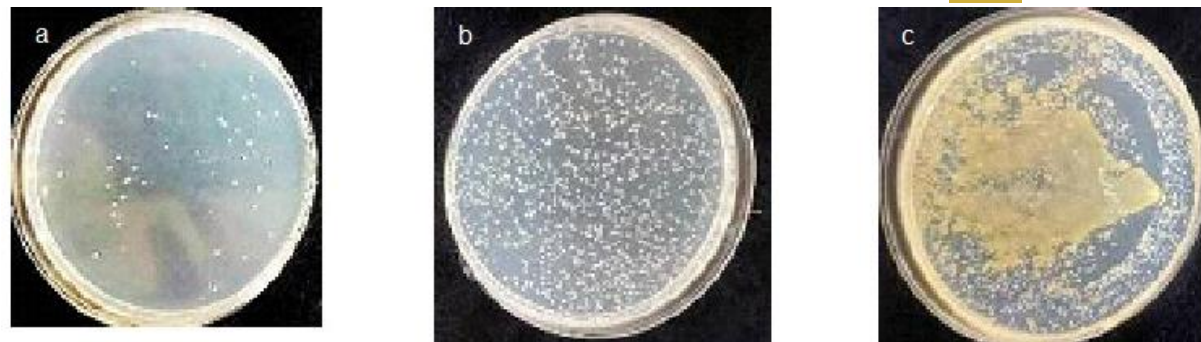
حساسیت نشان داده به طوری که کلنی‌های رشد یافته کمتر از ۱۰ عدد است. طبق شکل ۶، باکتری استافیلوکوک در مقابل نمونه رmq کشی مقاومت بالایی ندارد و رشد باکتری حدود ۵۰ کلنی است، ولی مقاومت باکتری برای نمونه اسپری شده بسیار زیادتر از نمونه رmq کشی است، زیرا بیش از ۵۰۰ کلنی رشد کرده‌اند.

بررسی خواص ضد میکروبی زخم‌پوش

خواص ضد میکروبی زخم‌پوش پوشش داده شده به دو روش اسپری و رmq کشی با استاندارد AATCC روی دو باکتری ایکلای و استاف بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۵ مشخص است، باکتری اشیریشیا کلی در مقابل زخم‌پوش از خود



شکل ۵. آزمون میکروبی زخم پوش روی باکتری اشیریشیا کلی (a): نمونه رmq کشی، (b): نمونه اسپری شده، (c): نمونه خام



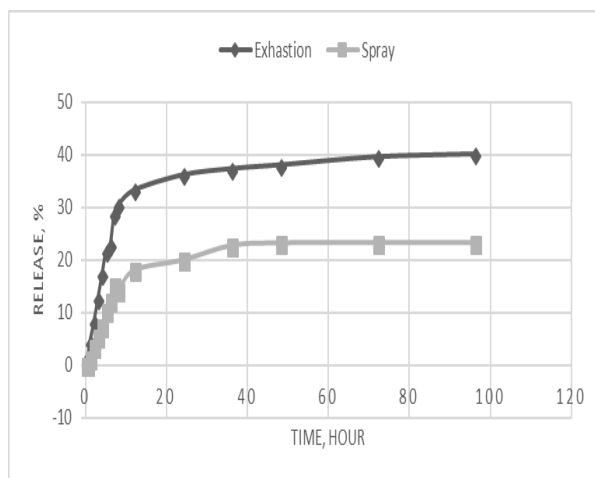
شکل ۶. آزمون میکروبی زخم پوش روی باکتری استافیلوکوک (a): نمونه رmq کشی، (b): نمونه اسپری شده، (c): نمونه خام

بررسی رهائش زخم پوش

جدول ۴ رهائش زخم پوش پوشش داده شده با دو روش اسپری و رmq کشی را با هم مقایسه می کند.

جدول ۴. مقایسه رهائش زخم پوش پوشش داده شده با دو روش اسپری و رmq کشی

روش پوشش دهی	درصد رهائش (۱ ساعت)	درصد رهائش (۶ ساعت)	درصد رهائش (۲۴ ساعت)	درصد رهائش (۴۸ ساعت)	درصد رهائش (۷۲ ساعت)	درصد رهائش (۹۶ ساعت)
رmq کشی	۴/۳۲	۲۲/۷۳	۳۶/۱۴	۳۸/۰۳	۳۹/۵۷	۴۰/۱
اسپری	۱/۵	۱۲/۴۴	۲۰/۰۹	۲۳/۳۵	۲۳/۳۸	۲۳/۴۰



شکل ۷. نمودار مقایسه رهائش زخم پوش پوشش داده شده با دو روش اسپری و رmq کشی

مطابق شکل ۷، درصد رهائش در دو نمونه اسپری و رmq کشی اندازه گیری شد و نتایج آن با نتایج رهائش لیپوزوم مقایسه گردید. آنچه که در این نتایج مشهود است، رهائش آهسته تر اسانس در پوشش پارچه نسبت به لیپوزوم است، به نحوی که قبلاً در ۹۶ ساعت رهائش اسانس در پارچه حدود ۴۰ درصد است، در حالی که رهائش لیپوزوم نزدیک به ۶۰ درصد است. همچنین در مقایسه رهائش اسانس زنیان در دو نمونه اسپری و رmq کشی، نمونه اسپری شده دارای رهائشی به مراتب آهسته تر از نمونه رmq کشی است تا آنجا که نمونه اسپری در ۹۶ ساعت تنها ۲۳ درصد رهائش داشته، در حالی که نمونه رmq کشی نزدیک به ۴۰ درصد رهائش داشته است.

۵. بحث

در سال‌های اخیر، توجه محققین به سمت یافتن ترکیبات طبیعی و گیاهی با خواص مهارکنندگی رشد باکتری‌ها معطوف شده است و انواع مختلفی از گیاهان و عصاره‌ها و اسانس‌های آن‌ها با موفقیت در مهار رشد باکتری در شرایط آزمایشگاهی به کار گرفته شده است (۲۲). شاید بی‌خطر بودن نسبی آن‌ها، در دسترس بودن و فراوانی داروهای گیاهی، در کنار کنترل مسیر درمان از دلایل توجه به داروهای گیاهی است (۲۳). زنیان یکی از این داروهای گیاهی است که دارای اثر ضد میکروبی است. اسانس میوه این گیاه آجوان نام دارد که قدرت کشندگی و ضد میکروبی آن به خاطر ترکیباتی چون تیمول است. نزدیک به ۱۶ ترکیب در اسانس زنیان وجود دارد، اما تیمول، مهم‌ترین و اصلی‌ترین ترکیب فنولی در زنیان گزارش شده و حداقل ۴۰ تا ۵۰ درصد اسانس را تشکیل می‌دهد (۲۴). مطالعه ما، اثر ضد میکروبی عصاره زنیان را در برابر باکتری‌های انتخاب شده ثابت نمود. این مطالعه نشان داد که رشد باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم منفی (اشریشیاکلی) توسط عصاره گیاه زنیان مهار شد. مود و همکاران در سال ۲۰۱۴، اثر ضد باکتری اسانس زنیان را بررسی کردند. آن‌ها فعالیت ضد باکتری اسانس زنیان را در برابر دو باکتری گرم منفی کلبسیلا و اشریشیاکلی و دو باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و پنوموکوکوس بررسی کردند و سپس حداقل غلظت مهاری این ماده در برابر هر ۴ باکتری تعیین شد که نتیجه آن قدرت مهاری بیشتر بر باکتری استاف نسبت به سایر باکتری‌ها بود (۲۵). نتایج حداقل غلظت مهاری باکتری آن مقاله با نتایج مقاله حاضر مطابقت دارد. به نظر می‌رسد به علت دیواره سلولی خاص باکتری‌های گرم منفی، اثرات ضد باکتریایی اسانس گیاه در آن‌ها کمتر است (۲۶). هم‌چنین محبوبی و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر ضد باکتری و ضد قارچی اسانس زنیان و آویشن را روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به روش میکرودیالوژن برات بررسی کردند که طبق گزارش این مطالعه اسانس زنیان اثر ضد میکروبی بالاتری نسبت به اسانس آویشن داشت (۲۷). در سال ۲۰۱۶، حقیرالسادات و همکاران به تولید

و بررسی خصوصیات وزیکول‌های فسفولیپیدی حاوی اسانس زنیان پرداختند. آن‌ها نانولیپوزوم حاوی اسانس زنیان را با روش آب پوشانی لایه نازک چربی تهیه کردند. در آن پژوهش که فاز لیپیدی شامل فسفاتیدیل کولین سویا و کلسترول بود، نانو ذرات ساخته شده از نظر میزان راندمان بارگذاری، اندازه، پتانسیل و رهایش اسانس مورد ارزیابی قرار گرفت که میزان بارگذاری اسانس زنیان در حامل لیپوزومی در حدود ۳۵ درصد و اندازه نانوذره در حدود ۱۸۶ نانومتر و رهایش در ۴۸ ساعت برابر ۴۴ درصد گزارش شد (۲۸). این در حالی است که در پژوهش حاضر با فرمولاسیون طراحی شده، میزان راندمان بارگذاری اسانس زنیان به ۸۷ درصد افزایش داشته و اندازه ذرات ۱۷۷ نانومتر گزارش شد. هم‌چنین میزان رهایش در ۷۲ ساعت تا ۶۳ درصد اندازه‌گیری شد.

۶. نتیجه‌گیری

اسانس زنیان یکی از داروهای ضد میکروبی است و کارآمدی ضد میکروبی آن در درجه اول به تعامل مستقیم با ترکیبات تیمولی آن بستگی دارد. برای جلوگیری از سمیت‌های احتمالی اسانس، دوز کلی داروی مورداستفاده محدود می‌شود. مطالعات اولیه نشان داد که محصور کردن اسانس در کپسول، سمیت دارو را در مقایسه با فرم آزاد دارو کاهش می‌دهد، درحالی‌که قدرت ضد باکتری دارو حفظ می‌شود. مطالعات بعدی نشان داد هنگامی که از فرم لیپوزومی استفاده شود، سمیت داروی آزاد کاهش یافته (احتمالاً به دلیل کاهش غلظت دارو در بافت‌های سالم و رهایش آهسته دارو) و علاوه بر کاهش سمیت، فرم کپسولی دارای اثرات برابر با داروی آزاد در درمان عفونت‌هاست (دست کم بخشی به دلیل وجود ساختمان تا حدودی مشابه غشای سلولی انسان در میکروپها). به دلیل این که فرم کپسولی سمیت کمتری دارد، دوز کمتری از دارو می‌تواند به کار برده شود و در نتیجه منجر به افزایش کارایی شاخص درمانی شود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان از پوشش‌دهی بهتر نانو کپسول به روش رمل کشی نسبت به روش اسپری داشت. آزمون‌های مختلف نساجی از جمله آزمون نفوذپذیری هوا، ثبات

۷. تقدیر و تشکر

این مطالعه هیچ‌گونه حامی مالی نداشته است. بدین وسیله از همکاری‌های دانشگاه آزاد اسلامی یزد در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

سایشی و آزمون قطره آب نشان از خواص قابل‌قبول زخم‌پوش تولیدی داشته و آزمون میکروبی زخم‌پوش با استاندارد (AATCC 100-1993) تأثیر عدم رشد باکتری در حضور زخم‌پوش مخصوصاً روی باکتری ایکلای را نشان می‌دهد. تصاویر طیف‌سنجی فرسرخ از سطح زخم‌پوش نیز نشان از حضور ترکیب نانو کپسول به‌ویژه اسانس زنیان دارد و نتایج رهایش زخم‌پوش، آهسته رهش بودن آن را در مقایسه با کپسول سنتز شده نشان می‌دهد. در مجموع، این کالای تولیدی توانست نتایج قابل‌قبولی داشته باشد و تأثیر مثبتی در بهبود زخم‌های عفونی نشان دهد. برای ادامه کار پیشنهادهای زیر توصیه می‌شود: مقایسه نتایج زخم‌پوش حاصل از روش جذب یا اسپری روی پارچه برای نانو سامانه لیپوزومی و زخم‌پوش حاصل از نانو الیاف؛ مقایسه نتایج حاصل از اسانس‌های مختلف در نانو سامانه‌ها در قالب زخم‌پوش؛ پیشبرد پژوهش در قالب آزمایش‌های درون‌تنی.

References

- Geerligs M, Oomens C, Ackermans P, Baaijens F, Peters G. Linear shear response of the upper skin layers. *Biorheology*. 2011; 48(3-4):229-45.
- Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97(8):2892-923.
- Amoabediny G, Haghirsadat F, Naderinezhad S, Helder MN, Akhoundi Kharanaghi E, Mohammadnejad Arough J, et al. Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (noisome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 2017; 1-18.
- Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 2007; 18(3):241-68.
- Zhang H-Y, Liang F, Zhang J-W, Wang F, Wang L, Kang X-G. Effects of long noncoding RNA-ROR on tamoxifen resistance of breast cancer cells by regulating microRNA-205. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2017; 79(2):327-37.
- Larson ML, Rubenstein SE, Schiller GJ, Solomon SR, Louie AC, Paulsen KH, et al. Study design of an expanded access protocol of cpx-351 (cytarabine: daunorubicin) liposome injection in patients 60-75 years of age with secondary acute myeloid leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2017; 23(3):S249-50.
- Xu H, Zhang L, Li L, Liu Y, Chao Y, Liu X, et al. Membrane-loaded doxorubicin liposomes based on ion-pairing technology with high drug loading and ph-responsive property. *AAPS PharmSciTech.* 2017; 18(6):2120-30.
- Seibel NL, Shad AT, Bekersky I, Groll AH, Gonzalez C, Wood L V, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of liposomal amphotericin B in immunocompromised pediatric patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61(2):e01477-16.
- Edwards JV, Vigo TL. Bioactive fibers and polymers. ACS Publications; 2001.
- Dastjerdi R, Montazer M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. *Colloids Surf., B.* 2010; 79(1):5-18.
- Becker MA, Willman P, Tuross NC. The US first ladies gowns: a biochemical study of silk preservation. *J. Am. Inst. Conserv.* 1995; 34(2):141-52.
- Forlani G, Seves AM, Ciferri O. A bacterial extracellular proteinase degrading silk fibroin. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2000; 46(4):271-5.
- Kumar VS, Nagaraja BM, Shashikala V, Padmasri AH, Madhavendra SS, Raju BD, et al. Highly efficient Ag/C catalyst prepared by electro-chemical deposition method in controlling microorganisms in water. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 2004; 223(1):313-9.
- Tang Z, Liu S, Dong S, Wang E. Electrochemical synthesis of Ag nanoparticles on functional carbon surfaces. *J. Electroanal. Chem.* 2001; 502(1):146-51.
- Pradhan N, Pal A, Pal T. Silver nanoparticle catalyzed reduction of aromatic nitro compounds. *Colloids Surf., A.* 2002; 196(2):247-57.
- Sweeney IR, Mirafteb M, Collyer G. A critical review of modern and emerging absorbent dressings used to treat exuding wounds. *Int. Wound. J.* 2012; 9(6):601-12.
- Stashak TS, Farstvedt E, Othic A. Update on wound dressings: indications and best use. *Clin. Tech. Equine Pract.* 2004; 3(2):148-63.
- Fan Z, Liu B, Wang J, Zhang S, Lin Q, Gong P, et al. A novel wound dressing based on Ag/graphene polymer hydrogel: effectively kill bacteria and accelerate wound healing. *Adv. Funct. Mater.* 2014; 24(25):3933-43.
- Celia C, Trapasso E, Locatelli M, Navarra M, Ventura CA, Wolfram J, et al. Anticancer activity of liposomal bergamot essential oil (BEO) on human neuroblastoma cells. *Colloids Surf., B.* 2013; 112:548-53.
- Benita S. Microencapsulation: methods and industrial applications. CRC Press; 2005.
- Nelson G. Microencapsulation in textile finishing. *Color. Technol.* 2001; 31(1):57-64.
- Pandooneh A, Zuhair MH, Taghi A. The effect of molecule isolated from garlic on the survival of the transplanted allogenic intestine in Balb/c mice. *Kowsar.* 1996; 2:119-27.
- Roberto CH. medicinal plants photo dictionary. Traditional Medicine & Material Medical Research Center Tehran University of Medical Sciences. 2005; (Persian).
- Balbba SI, Hilal SH, Hoggag MR. Active constituents of Ammi majus fruit at different stages. *Acta Med.* 1973; 23(4):372-80.

25. Mood BS, Shafeghat M, Metanat M, Saeidi S, Sepehri N. The inhibitory effect of ajowan essential oil on bacterial growth. *International Journal of Infection*. 2014; 1(2).
26. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol*. 2004; 94(3):223–53.
27. Mahboubi M, Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oil. *Int. J. Mic*. 2011; 3(4):194.
28. 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 origin: Synthesis and characterization of phospholipid lipid-based vesicles incorporated *Trachyspermum copticum*. *SSU_Journals*. 2016; 24(6):468–78.