

## Design, synthesis and formulation of niosomes containing acetaminophen: structural properties, anticancer effects and apoptotic gene expression analysis

Amir Mirzaie<sup>1</sup>

Maryam Abbasi<sup>2\*</sup>

### Abstract

**Background:** Niosomes are innovative targeted drug delivery systems that enhance the biological properties of drugs. This study aimed to synthesize acetaminophen-containing niosomes, investigate their structural characteristics, assess cytotoxicity, and analyze the expression of apoptotic genes.

**Method:** In this experimental study, various formulations of acetaminophen-loaded niosomes were synthesized. Their structural characteristics were examined using scanning electron microscopy (SEM), dynamic light scattering (DLS), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The cytotoxic effects on the colon cancer cell line (HT29) were assessed via the MTT colorimetric method. Additionally, the expression levels of apoptotic genes Bax and Bcl2 were evaluated.

**Results:** The synthesis results indicated that the Nio1 formulation was the optimal variant, exhibiting a size of 289.6 nm. FTIR analysis confirmed successful niosome synthesis. Drug release tests revealed that the release rate of acetaminophen in niosome form was significantly slower than that of the free drug, with only 28% released over 8 hours. Furthermore, niosomes containing acetaminophen demonstrated significant cytotoxic effects against the HT29 cell line. The expression of the apoptotic gene Bax increased significantly by  $2.14 \pm 0.34$  ( $P < 0.01$ ), while the expression of Bcl2 decreased by  $0.46 \pm 0.11$  ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** The findings of this study indicate that acetaminophen-loaded niosomes exhibit significant cytotoxic effects against the HT29 cell line and enhance the expression of apoptotic genes. These results suggest that niosomes could be a promising drug delivery system, warranting further research to optimize their application in cancer treatment.

**Keywords:** Niosome, acetaminophen, Colon Cancer, Cytotoxicity, Apoptosis

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

2-Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

\* Corresponding Author: Email:  
[Bio\\_mar.abbasi@yahoo.com](mailto:Bio_mar.abbasi@yahoo.com)

**How to cite this article:** Mirzaie A, Abbasi M. Design, synthesis and formulation of niosomes containing acetaminophen: structural properties, anticancer effects and apoptotic gene expression analysis. Alborz University Medical Journal 2024; 14 (1): 59-81

## طراحی، سنتز و فرمولاسیون نیوزوم‌های حاوی استامینوفن: بررسی خصوصیات ساختاری، اثرات ضدسرطانی و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی

### چکیده

امیر میرزاچی<sup>۱</sup>  
مریم عباسی<sup>۲</sup>

**زمینه و هدف:** نیوزوم‌ها یکی از سیستم‌های دارورسانی هدفمند جدید هستند که خواص بیولوژیکی داروها را افزایش می‌دهند. هدف این مطالعه، سنتز نیوزوم‌های حاوی استامینوفن، بررسی خصوصیات ساختاری، بررسی خصوصیات سمیت سلولی و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی بود.

**روش کار:** در این مطالعه، فرمولاسیون‌های مختلف از نیوزوم‌های حاوی استامینوفن سنتز شده و خصوصیات ساختاری آن توسط روش‌های میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM)، پراکنده‌گی نور دینامیکی (DLS) و روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه فرودسرخ (FTIR) بررسی شد و به دنبال آن اثرات سمیت سلولی آن بر روی رده سلولی سرطان کولون (HT29) با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT بررسی شد. در انتهای، میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax و Bcl2 بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج سنتز نیوزوم‌ها نشان داد که فرمولاسیون NiO1 فرمولاسیون بهینه بوده و دارای سایز ۶/۲۸۹ نانومتر بود. هم چنین نتایج FTIR سنتز نیوزوم‌ها را تایید نمود. به دنبال آن، تست رهایش دارو نشان داد که میزان رهایش دارو در حالت نیوزومه به مراتب آهسته‌تر از داروی آزاد است بطوریکه میزان رهایش دارو در مدت زمان ۸ ساعت، ۲۸٪ بود. نیوزوم‌های حاوی استامینوفن دارای اثرات سمیت سلولی معناداری علیه رده سلولی HT29 بود و بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax و Bcl2 به ترتیب به میزان (۰/۰۱ > ۰/۳۴ ± ۰/۰۴) افزایش، (۱/۱ > ۰/۰۶ ± ۰/۰۰) کاهش یافت.

**نتیجه‌گیری:** به طورکلی نتایج این مطالعه نشان داد که نیوزوم‌های حاوی استامینوفن دارای اثرات سمیت سلولی معناداری علیه رده سلولی HT29 بوده و می‌تواند بیان ژن‌های آپوپتوزی را افزایش دهد؛ بنابراین می‌توان با مطالعات بیشتر از نیوزوم‌ها به عنوان یک سیستم تحويل دارو استفاده نمود.

**واژه‌های کلیدی:** نیوزوم، استامینوفن، اثرات سمیت سلولی، آپوپتوز

۱ گروه زیست‌شناسی، واحد پرنده، دانشگاه آزاد

اسلامی، پرند، ایران

۲ گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی،

دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول:

Email: Bio\_mar.abbasi@yahoo.com

## مقدمه

نفوذپذیری و اثر ماندگاری شوند.<sup>۱۰</sup> این فرآیند تجمع دارو در محل سلول‌های تومور، در گردش دارو جهت دارو رسانی مؤثر، تاثیرگذار است.<sup>۱۱</sup> نانوحامل‌های متعددی از جمله ایمونوگلوبولین، پروتئین‌های سرم، پلیمرهای مصنوعی، لیپوزوم‌ها، میکروسferها، گلوبول‌های قرمز و نیوزوم‌ها برای افزایش هدف‌گیری دارو استفاده شده‌اند.<sup>۱۲</sup> نیوزوم‌ها ساختارهای غیریونی سورفتانت، چندلایه‌ای یا تک لایه‌ای هستند که اندازه آنها بین ۱۰ تا ۱۰۰۰۰ نانومتر است. نیوزوم‌ها حامل‌های دارویی بینظیری هستند که توسط ترکیبی از کلستروول و سورفتانت‌های غیر یونی سنتز می‌شوند.<sup>۱۳</sup> نیوزوم‌ها می‌توانند پایداری یکسانی را برای داروهای آبرگز و آبدوست فراهم می‌کنند و در عین حال زیستسازگار، زیست تخریب‌پذیر، ارزان قیمت هستند.<sup>۱۴</sup> فرمولاسیون نیوزومال برای دارو رسانی و هدف‌گیری تومور برای ایجاد یک فرمول پایدار، غیر سمی، زیست تخریب‌پذیر، غیر ایمنی را با دارو با فراهمی زیستی خوب ضروری است.<sup>۱۵</sup> نیوزوم‌ها همچنین مدت زمانی را که دارو در جریان خون می‌گذراند افزایش می‌دهند، بنابراین، آنها به عنوان حاملی برای تحويل مدام و/با کنترل شده داروها به مکان‌های مورد نظر وعده می‌دهند.<sup>۱۶</sup> نیوزوم‌ها دارای مزایای بیشتری نسبت به سایر نانوذرات لیپیدی مانند لیپوزوم‌ها دارند، زیرا پایداری شیمیایی بیشتر، ماندگاری طولانی، خلوص بالا، یکنواختی محتوا، هزینه کم و ذخیره سازی راحت دارند. نیوزوم‌ها توانایی طولانی کردن گردش داروهای به دام افتاده، به حداقل رساندن تخریب و غیرفعال شدن دارو پس از تجویز را دارند که به جلوگیری از عوارض جانبی نامطلوب و سمیت، افزایش فراهمی زیستی دارو و هدف قرار دادن داروی محبوس شده در ناحیه پاتولوژیک کمک می‌کند.<sup>۱۷</sup> هدف از این مطالعه، سنتز نیوزوم‌های حاوی استامینوفن، تایید خصوصیات ساختاری آن، بررسی اثرات ضدسرطانی و تاثیر آن بر بیان زنگنهای آپوپتوزی در رده سلولی سرطان کولون (HT29) بود.

## مواد و روش‌ها

### سنتز نیوزوم‌های حاوی استامینوفن

روش هیدراتاسیون لایه نازک برای تهیه نیوزوم لود شده با استامینوفن استفاده شد. به طور خلاصه، برای تهیه نیوزوم‌های بارگذاری شده با استامینوفن، مقادیر مختلف کلستروول، اسپن ۶۰ (Span60) و توئین (Tween 60) در مخلوطی از حلال‌های کلروفرم و متانول (نسبت ۲:۱) حل شدند (جدول ۱). سپس محلول به دست آمده کاملاً هم زده شد تا اجزاء کاملاً حل شوند. محلول به دست آمده را در یک فلاسک دور مخصوص ریخته و

سرطان وضعیتی است که در آن سلول‌ها به طور غیرقابل کنترلی تکثیر می‌شوند و بدخیمی‌های تهاجمی تولید می‌کنند که منجر به مرگ میلیون‌ها نفر در سال می‌شود.<sup>۱</sup> همچنین، سرطان یک موضوع مهم بهداشت عمومی جهانی است و دارای دومین نرخ مرگ و میر در ایالات متحده است و حدود ۶۱۰۰۰ مورد مرگ و میر در سال ۲۰۲۲ را به خود اختصاص داده است.<sup>۲</sup> سرطان کولون یک نوع سرطان است که یکی از جدیدترین بیماری‌های بدخیم تشخیص داده شده در نظر گرفته می‌شود.<sup>۳</sup> میزان بروز مرگ و میر در مردان به ویژه در کشورهای توسعه یافته بیشتر از زنان است، بطوريکه میزان شیوع آن، رتبه سوم را در ایالات متحده دارد.<sup>۴</sup> شیمی درمانی یک نوع روش درمانی رایج سرطان است که به طور گسترده در سرتاسر دنیا از آن استفاده می‌شود. دوز بالای شیمی درمانی منجر به ایجاد انواع عوارض جانبی و آسیب به سایر سلول‌های سالم می‌شود.<sup>۵</sup> علاوه بر این، مطالعات نشان داده است که سلول‌های سرطانی پس از قرار گرفتن در معرض طولانی مدت دارو، مقاومت دارویی ایجاد می‌کنند. در نتیجه، احتساب از سلول‌های سالم و به طور خاص هدف قرار دادن سلول‌های بدخیم، هدف اصلی تحقیقات سرطان می‌باشد.<sup>۶</sup> برای این منظور، داروهای جدید توسط شرکت‌های دارویی در حال توسعه هستند.<sup>۷</sup> استامینوفن دارویی است که در چند دهه گذشته به طور کامل مورد مطالعه قرار گرفته است و به عنوان یک داروی بی‌خطر در نظر گرفته می‌شود. استامینوفن به طور معمول به عنوان یک داروی مسكن/اضد تب استفاده می‌شود که به شکل یک محصول بدون نسخه در سراسر جهان قابل دسترسی می‌باشد.<sup>۸</sup> استامینوفن به عنوان یک داروی دارای حلایت بالا و نفوذپذیری کم طبقه بندی می‌شود و در صورت مصرف بیش از حد استامینوفن، گلوتاتیون درون سلولی کاهش می‌یابد و N-acetyl-p-benzoquinone imine در پروتئین‌های سلولی، عمدتاً در داخل کبد، متصل می‌شود که منجر به سمیت سلولی می‌شود. برخی از کارآزمایی‌های بالینی نشان میدهد دوز بالا استامینوفن میتواند اثرات ضدسرطانی داشته باشد. مطالعات حیوانی نشان میدهد که استامینوفن با دوز بالا دارای خواص ضدتوموری از طریق اختلال در مسیر سیگنالینگ JAK-STAT، در سلول‌های توموری می‌شود.<sup>۹</sup>

علم نانوتکنولوژی برای فرمولاسیون داروهای شیمی درمانی برای افزایش اثربخشی درمانی آنها به کار گرفته شده است. نانوحامل‌ها میتوانند به طور اختصاصی باعث تجمع دارو در بافت سرطانی به دلیل افزایش

برداری در ساعت مختلط انجام می‌شود، به این صورت که ۱ میلی لیتر PBS حاوی کیسه دیالیز حذف و ۱ میلی لیتر PBS با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد جایگزین می‌شود. نمونه برداری تا ۲۲ ساعت در بازه‌های زمانی مشخص (۱۱، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) انجام می‌شود. جذب نوری نمونه‌ها توسط اسپکتروفوتومتر UV در طول موج ۲۶۵ نانومتر خوانده شد و نمودار درصد آزادسازی تجمعی دارو از نیوزوم به مدت ۷۲ ساعت ترسیم شد.<sup>۲۰</sup>

#### بررسی اثرات سمیت سلولی

سمیت سلولی نیوزوم‌های بارگذاری شده با دارو با استفاده از یک روش رنگ‌سنگی (MTT) علیه رده سلولی سرطان کولون (HT29) مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور رده سلولی از بانک سلولی انسنتیتو پاستور ایران تهیه شد. سپس سلول‌ها به طور جداگانه با تراکم ۱۰<sup>۴</sup> سلول در هر چاهک در یک پلیت ۹۶ چاهکی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نیوزوم‌های بارگذاری شده با دارو (۳/۱۲۵) تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و نیوزوم آزاد تیمار شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، محلول رنگی MTT میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS به خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO) به چاهک‌ها اضافه شد و جذب تمام چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد میزان بقای سلولی محاسبه شد. لازم به ذکر است در این تست، کنترل منفی سلول‌های تیمار نشده و کنترل مثبت سلول‌های تیمار شده با DMSO (۰/۲۲ درصد) است.

#### بررسی بیان ژن‌های آپوپتوزی

جهت اندازه‌گیری بیان ژن‌های آپوپتوزی شامل *Bax* و *Bcl2* با روش Real-Time PCR اندازه‌گیری شد. ابتدا RNA کل سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده با نیوزوم‌های بارگذاری شده با نیوزوم و داروی آزاد با استفاده از کیت استخراج RNA (Qiagen، ایالات متحده آمریکا) طبق دستورالعمل آن استخراج شد. سنتز DNA مکمل با کیت سنتز cDNA (فرمنتاز، لیتوانی) انجام شد. برای انجام PCR از Beta-*actin* (پرایمرهای اختصاصی ژن‌های هدف *Bax*, *Bcl2* و ژن خانه‌دار (actin) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی پرایمر معکوس ژن هدف-۳'-TTGCTTCAGGGTTCATCCAG-۵' و معکوس ۵'-*Bax*-۳' بود. توالی پرایمر معکوس ژن هدف-۳'-AGCTTCTTGGTGGACGCATC-۵' بود. توالی پرایمر معکوس ژن هدف-۳'-TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC-۵' و *Bcl2*-۵'،

در شرایط موردنظر (۰ درجه سانتی گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه) در خلاء قرار میدهیم تا حلال کامل‌آتبخیر شود. سپس در مرحله هیدراتاسیون، ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات حاوی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استامینوفن به فیلم لیپیدی تهیه شده در دمای انتقال فاز بالا (۶۰ درجه سانتی‌گراد) اضافه شد و با استفاده از دستگاه چرخشی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه چرخش به مدت نیم ساعت. برای هیدراتاسیون مناسب پس از اتمام فرایند هیدراتاسیون، برای کاهش اندازه ذرات، فracasot به مدت ۶ دقیقه انجام شد.<sup>۱۸</sup>

#### راندمان انکپسولاسیون

راندمان کپسولاسیون (Encapsulation efficiency, EE) به داروی محصور شده در ساختار نیوزوم در مقایسه با داروی اولیه مورداستفاده اشاره دارد. برای این منظور، نیوزوم‌های سنتز شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۴۰۰ گرم به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. نیوزوم‌های لود شده با استامینوفن رسوب می‌کنند و استامینوفن‌های آزاد در مایع رویی باقی می‌مانند. جذب نمونه رویی توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۶۵ نانومتر خوانده شد و مقدار داروی آزاد محاسبه و از مقدار اولیه دارو کم شده و از آن % محاسبه می‌شود.<sup>۱۹</sup>

$$\text{راندمان انکپسولاسیون} = \frac{(\text{میزان داروی آزاد} - \text{میزان داروی اولیه})}{\text{میزان داروی اولیه}} \times 100$$

#### تست‌های تأییدی ساختار نیوزوم‌های سنتز شده

Mیکروسکوپ الکترونی رویشی (Scanning Electron Microscope, SEM) برای بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی نیوزوم‌های لود شده با استامینوفن استفاده شد. همچنین برای تعیین اندازه، از پراکنده‌گر نور دینامیکی (Dynamic Light Scattering (DLS)) و از روش تحلیل Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) برای بررسی گروه‌های عملکردی سطح نیوزوم‌های تولید شده استفاده شد.

#### بررسی میزان آزادسازی دارو

در این مطالعه، انتشار دارو به صورت پویا ارزیابی می‌شود، بهاین ترتیب، ۲ میلی‌لیتر از نیوزوم‌های بارگذاری شده با دارو و همچنین داروی آزاد به طور جداگانه در کیسه دیالیز (وزن مولکولی ۱۲ کیلو دالتون) قرار می‌گیرند. هر یک از کیسه‌ها در یک فلاسک حاوی ۵۰ میلی‌لیتر سالین بافر فسفات (PBS) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد معلق می‌شوند. فلاسک‌ها با کیسه‌های حاوی نیوزوم حاوی دارو و دارو آزاد روی همزن قرار می‌گیرند. نمونه

سنتز نیوزومهای بارگذاری شده با استامینوفن و بررسی ویژگی‌های ساختاری

در این مطالعه، فرمولاسیون‌های مختلف نیوزومهای حاوی استامینوفن

سنتز شد (جدول ۱) و بر این اساس فرمولاسیون F1 به عنوان فرمولاسیون

برتر جهت ادامه مطالعه انتخاب گردید به طوری که دارای درصد EE

بالاتر و اندازه کوچکتر در مقایسه با فرمولاسیون‌های دیگر بود (جدول ۲).

نتایج SEM نشان می‌دهد که نیوزومهای سنتز شده دارای ساختار کروی

معکوس CAGCCAGGAGAGAAATCAAACAGAG<sup>۵'-</sup> و برای زن

مرجع<sup>۳'-</sup> CGTCTGCCCTATCAACTTCG Beta-actin به عنوان

و معکوس<sup>۵'-</sup> CATTTCAGCTG<sup>۳'</sup> بود.

#### تحلیل آماری

تمامی آزمون‌های این مطالعه ۳ بار تکرار شد و نتایج با نرمافزار

One-Way ANNOVA نسخه ۸ با استفاده از روش GraphPad Prism

آنالیز شد و  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

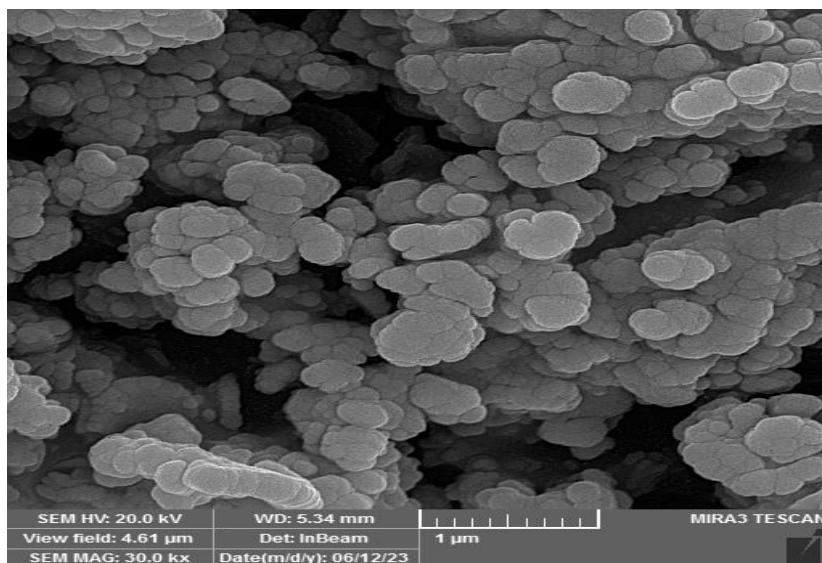
هستند (شکل ۱) و همچنین نتایج DLS نشان داد که اندازه بهینه نیوزومهای سنتز شده ۲۸۹/۶ نانومتر است (شکل ۲).

جدول ۱. سنتز چند فرمولاسیون نیوزومی از استامینوفن

فرمولاسیون	غلظت استامینوفن (mg/ml)	نوع سورفتانت	مقدار لپید (μmol)	نسبت مولی سورفتانت به کلسترول	نسبت مولی اسپن ۶۰/توئین ۶۰	زمان سونیکاسیون (min)
Nio1	۱	۶۰ اسپن	۲۰۰	۱:۱	۱۰۰:۰	۶
Nio2	۱	۶۰ اسپن	۲۰۰	۱:۱	۵۰:۵۰	۶
Nio3	۱	۶۰ اسپن	۲۰۰	۱:۱	۰:۱۰۰	۶
Nio4	۱	۶۰ اسپن	۲۰۰	۲:۱	۱۰۰:۰	۶
Nio5	۱	۶۰ اسپن	۲۰۰	۲:۱	۰:۱۰۰	۶
Nio6	۱	۶۰ اسپن	۲۰۰	۲:۱	۵۰:۵۰	۶
Nio2-B	-	۶۰ اسپن	۲۰۰	۱:۱	۵۰:۵۰	۶

جدول ۲. خصوصیات ساختاری فرمولاسیون‌های مختلف سنتز شده نیوزوم که در آن استامینوفن لود شده است

Formulation	Size (nm)	PDI	EE (%)
Nio1	۲۸۹.۶	۰.۱۱۹	۹۱.۴۴
Nio2	۳۱۲.۵	۰.۲۶۶	۶۰.۸۵
Nio3	۲۹۵.۳	۰.۲۸۷	۵۱.۷۴
Nio4	۲۲۲.۷	۰.۲۴۴	۷۰.۲۶
Nio5	۳۵۰.۶	۰.۱۹۷	۶۱.۵۷
Nio6	۴۱۵.۱	۰.۳۲۵	۵۲.۷۳



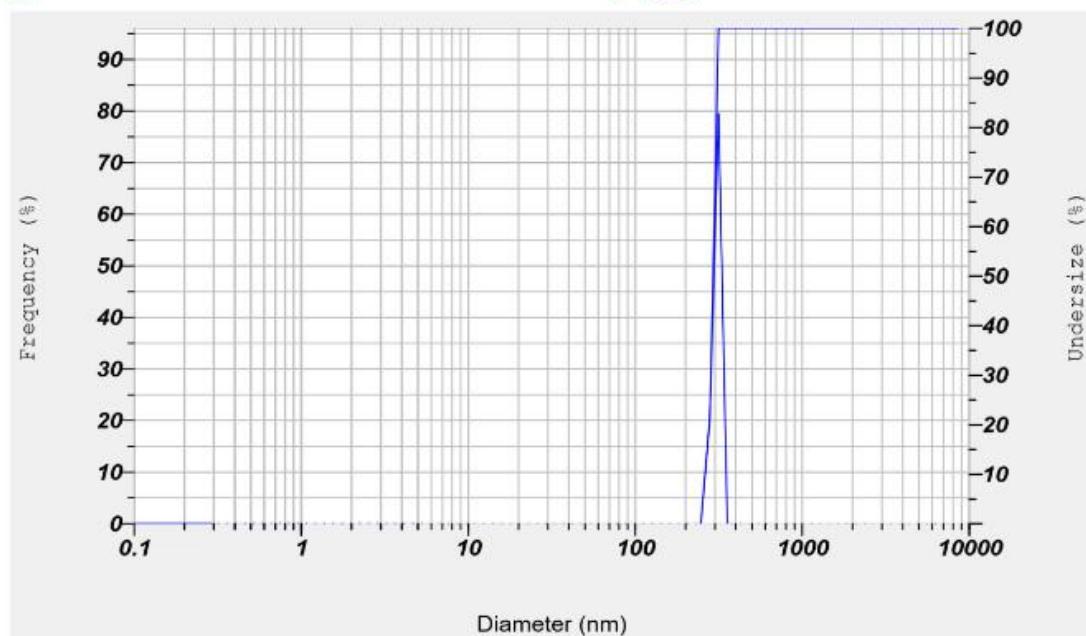
شکل ۱. میکروگراف میکروسکوپ الکترونی رویشی از نیوزوم‌های سنتز شده (نتایج نشان میدهد که نیوزوم‌های سنتز شده کروی هستند)

### Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	289.6 nm	13.8 nm	292.0 nm
2	---	--- nm	--- nm	--- nm
3	---	--- nm	--- nm	--- nm
Total	1.00	289.6 nm	13.8 nm	292.0 nm

### Cumulant Operations

Z-Average : 2437.1 nm  
PI : 1.657

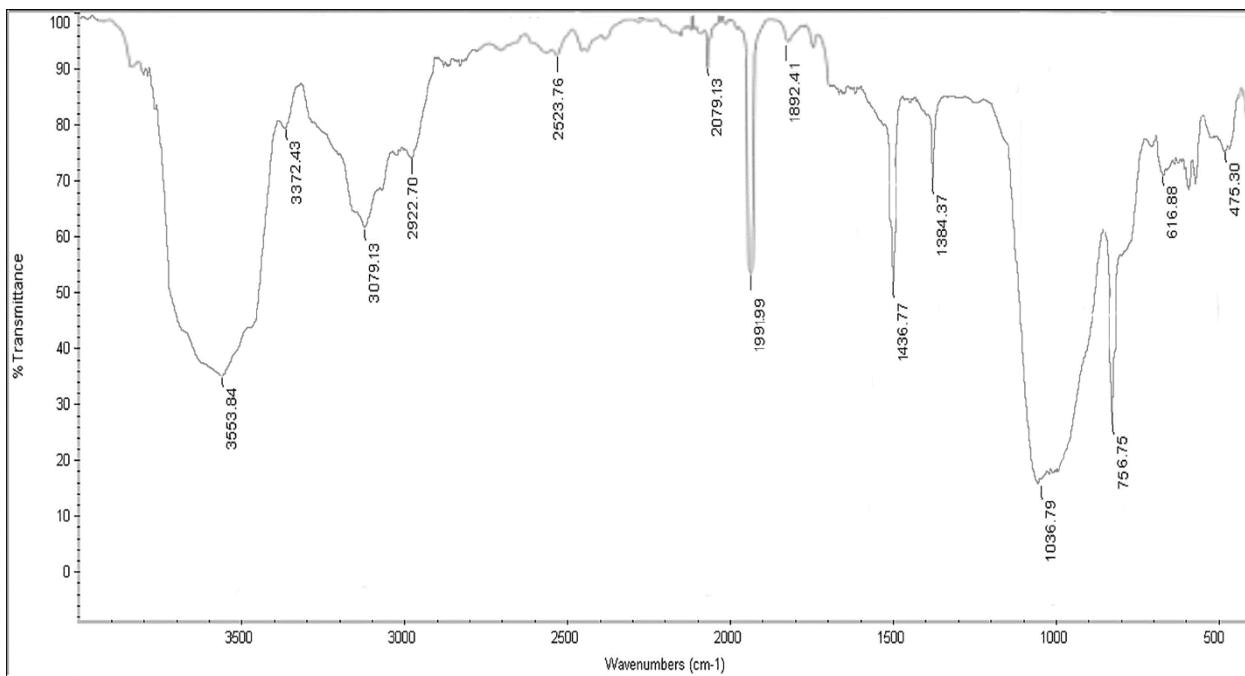


شکل ۳. نتایج DLS جهت اندازه گیری سایز نیوزوم‌های سنتز شده

### FTIR نیوزوم حاوی استامینوفن

عدد موج حدود  $1892\text{ cm}^{-1}$  و پیک مربوط به ارتعاش کششی پیوندهای C=C در حلقه‌های آروماتیکی در عدد موج حدود  $1436\text{ cm}^{-1}$  واقع شده است. همچنین پیک‌های مربوط به ارتعاش خمشی پیوندهای C-H در ساختارهای متیلی و متیلنی در این ماده به ترتیب در عدد موج‌های حدود  $1036\text{ cm}^{-1}$  واقع شده است (شکل ۳).

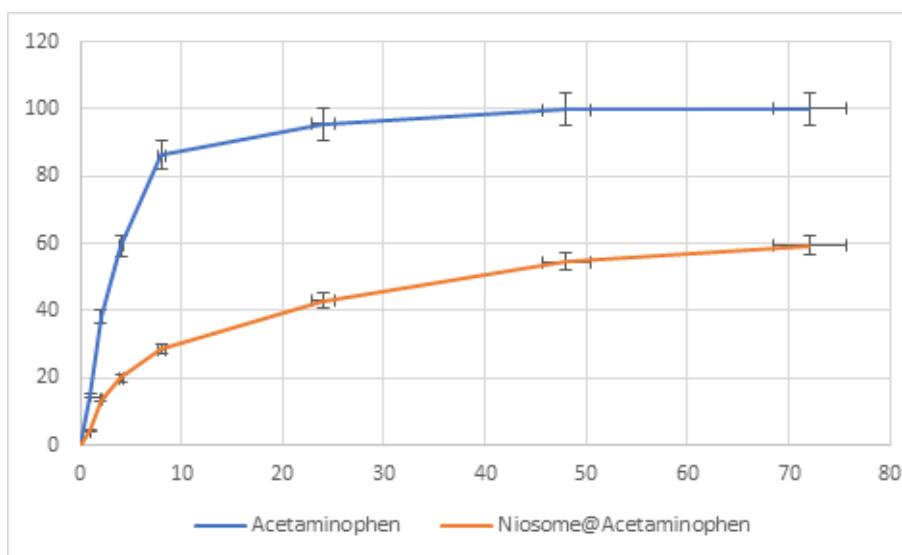
در این طیف پیک مشاهده شده در عدد موج حدود  $3372\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی پیوندهای O-H موجود در ساختارهای هیدروکسیلی استامینوفن است. همچنین ارتعاش کششی نامتناهن و متقارن پیوندهای C-H در ساختار این ماده پیک‌های جذبی در عدد موج‌های حدود  $2079\text{ cm}^{-1}$ ،  $2523\text{ cm}^{-1}$  و  $2922\text{ cm}^{-1}$  نشان داده است. به علاوه پیک مربوط به ارتعاش خمشی مولکول‌های آب یا پیوندهای هیدروکسیلی در



شکل ۳. نیوزومهای حاوی استامینوفن سنتز شده

۸ ساعت اول در محیط آزاد شدند، اما برای نیوزومهای حاوی استامینوفن، ۲۸ درصد از دارو از شکل نیوزومی در ۸ ساعت پس از انتشار آزاد شدند. بر اساس نتایج، رهاسازی دارو از حالت نیوزومه در ۲ مرحله انجام می‌شود. مرحله اولیه ۰ تا ۸ ساعت، زمانی که انتشار دارو بسیار سریع و انفجراری است، دارو را به محیط انتشار منتشر می‌کند. مرحله دوم مرحله آهسته رهش است که در آن دارو به مدت ۷۲ ساعت به آرامی در محیط آزاد پخش می‌شوند (شکل ۴).

تست میزان آزادسازی دارو شکل ۴ فرآیند آزادسازی تجمعی شکل آزاد دارو و نیوزومهای بارگذاری شده با دارو را در محیط آزادسازی فسفات بافر سالین (PBS) به مدت ۷۲ ساعت نشان می‌دهد. برای شبیه‌سازی و نزدیکتر کردن محیط انتشار به شرایط واقعی و *in vivo*، از محیط انتشار PBS برای فاز گیرنده استفاده شد، آزادسازی دارو از شکل نیوزومی (۵۹٪) کمتر از دارو آزاد (۱۰۰٪) است (۷۲ ساعت). در انتشار داروی آزاد، ۸۶ درصد از دارو در

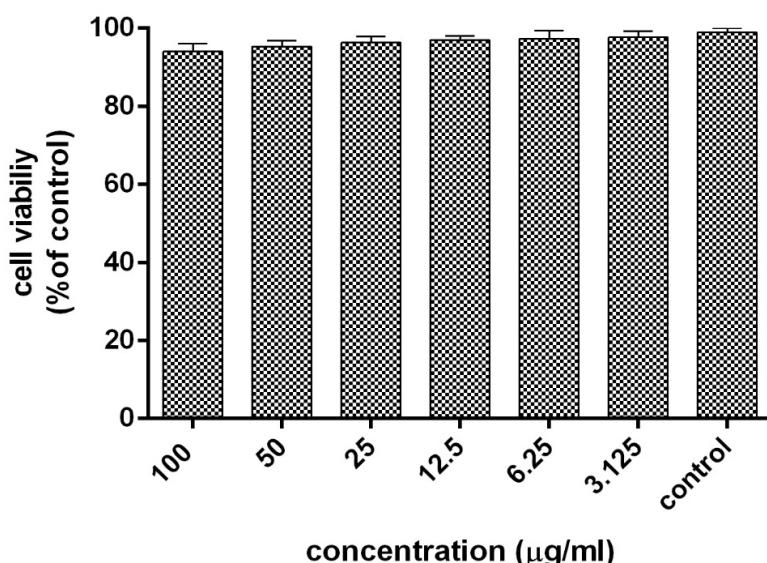


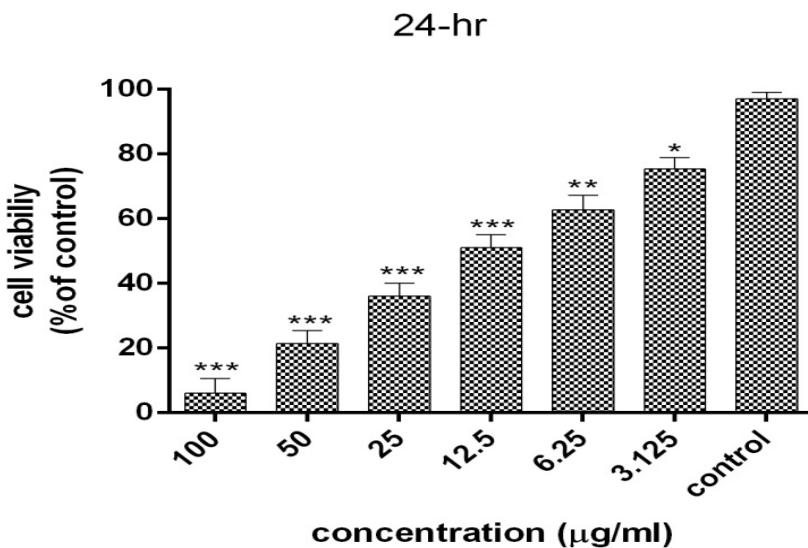
شکل ۴. تست آزادسازی دارو از نیوزوم در مدت زمان ۷۲ ساعت (داروی آزاد با نیوزوم حاوی دارو مقایسه شده است)

#### نتایج تیمار سلول‌ها با نیوزوم‌ها

سلولی نشان داد که در غلظت‌های ذکر شده به ترتیب میزان بقای سلولی  $72/23 \pm 0/22$  (۰/۰۵)،  $45/12 \pm 0/23$ ،  $55/32 \pm 0/23$ ،  $10/25 \pm 0/16$ ،  $18/69 \pm 0/51$ ،  $31/36 \pm 0/41$  (شکل ۵a). هم چنین اثرات سمیت سلولی نیوزوم‌های آزاد نشان داد که دارای سمیت سلولی معناداری نسبت به گروه کنترل (تیمار نشده) ندارند ( $p < 0/05$ ).

جهت بررسی اثرات سمیت نیوزوم‌های حاوی استامینوفن و نیوزوم آزاد علیه رده سلولی HT29 از روش رنگ‌سننجی MTT استفاده شد که میزان بقای سلولی بررسی شد. در این تست، غلظت‌های مختلفی از نیوزوم‌ها شامل  $100/3/125$ - $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  استفاده شد که پس از تیمار سلول‌ها در مدت زمان ۲۴ ساعت میزان بقای سلولی محاسبه شد. نتایج میزان بقای



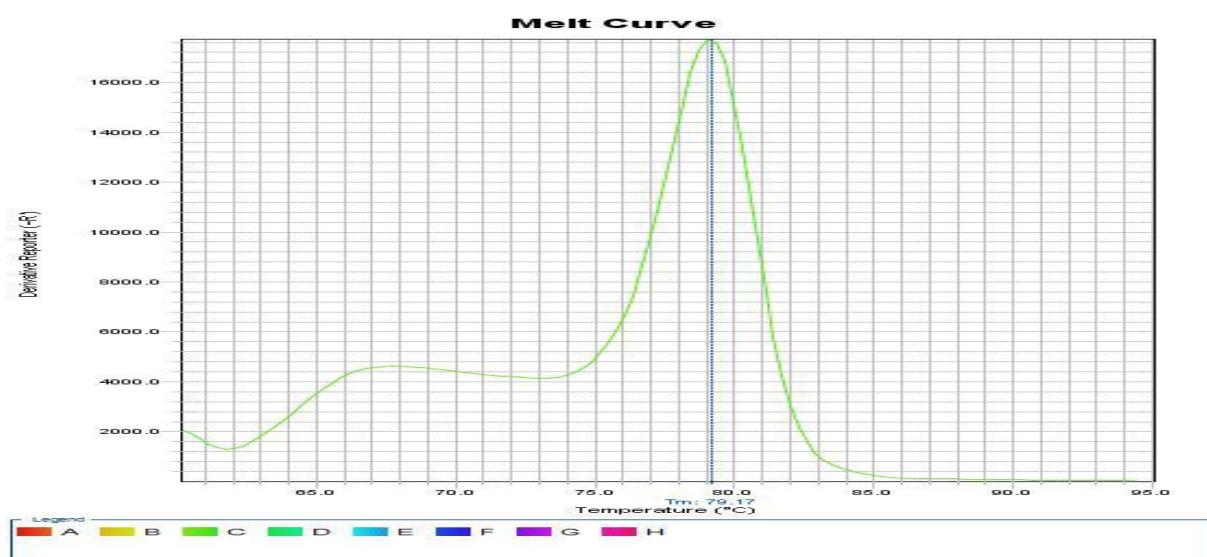


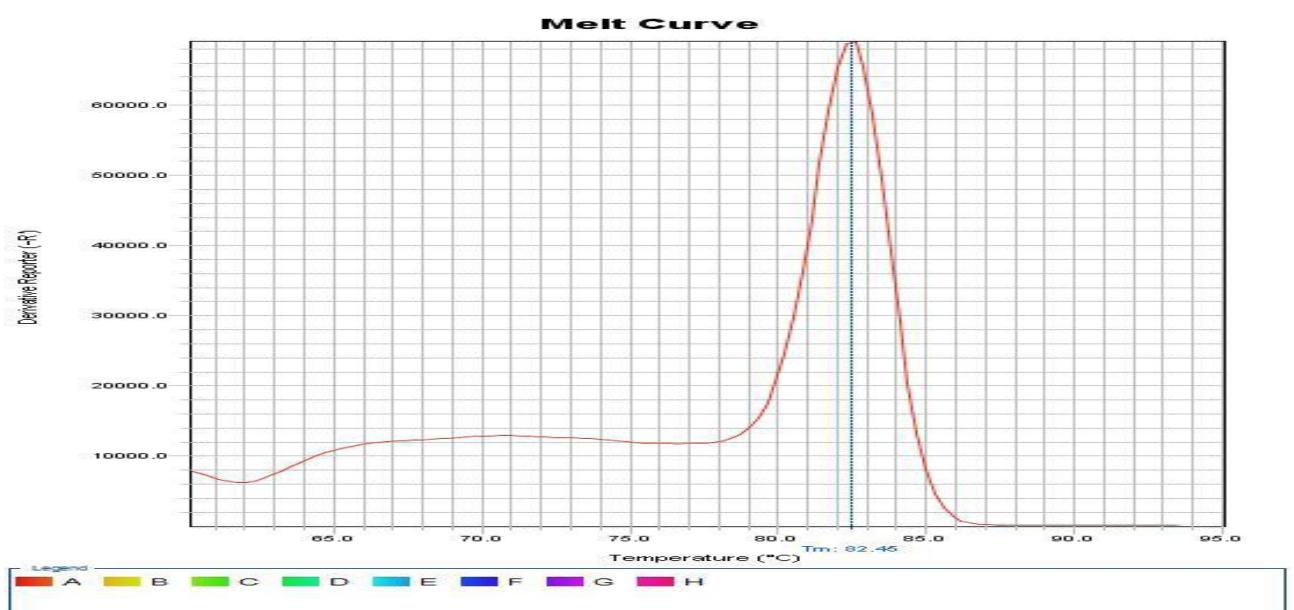
شکل ۵. درصد بقای سلول‌های رده HT29 در برابر غلظت‌های مختلف نیوزومهای حاوی استامینوفن (a) و نیوزوم آزاد (b); میزان بقای سلولی با در نظر گرفتن گروه کنترل محاسبه شده است ( $P < 0.05$ : \*\*\*,  $P > 0.05$ : \*). (\*\*\* =  $P < 0.001$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \* =  $P < 0.05$ ).

#### بررسی بیان ژنهای مرتبط با آپوپتوز

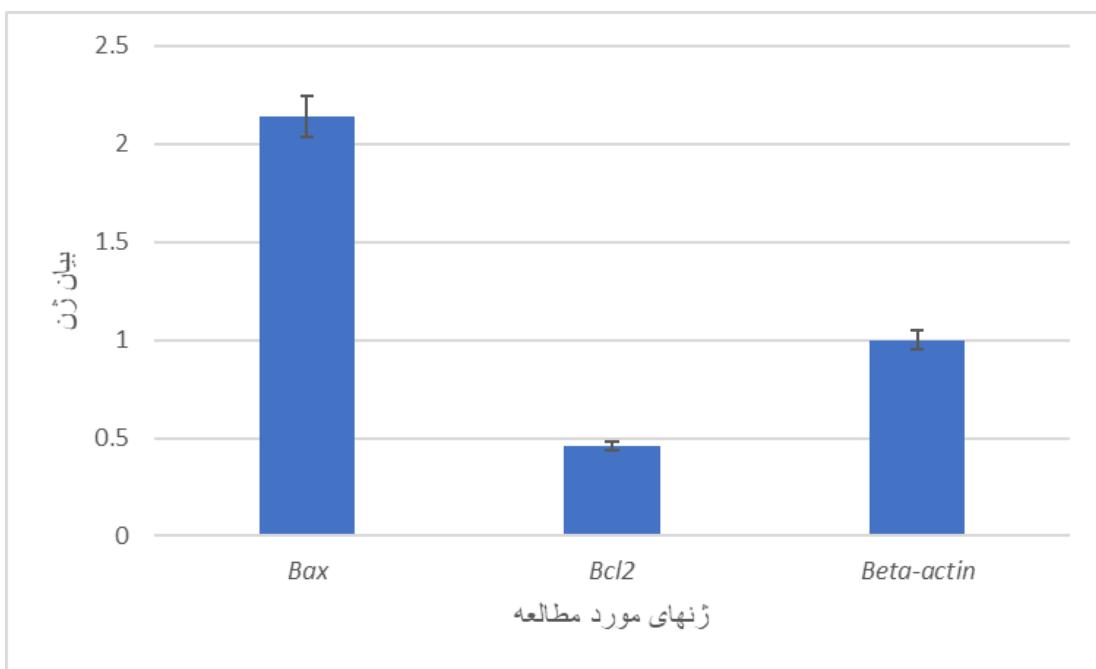
۲۴ ساعت ارزیابی شد. نسبت بیان ژن *Bax* به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی HT29 تیمار شده با نیوزومها نسبت به ژن مرجع *Beta-actin* در رده سلولی HT29 تیمار شده با نیوزومها طی ۲۴ ساعت به ترتیب به میزان  $0.10 \pm 0.03$  افزایش یافت در صورتیکه میزان بیان ژن *Bcl/2* در سلول‌های HT29 تیمار شده با استامینوفن نسبت به ژن مرجع *Bcl/2* کاهش یافت (شکل ۷).

در این تست، جهت تأیید از تکثیر ژن موردنظر، عدم ایجاد پرایمر دایمر و عدم تکثیر یافتن سایر ژن‌های غیرمرتبط، از آنالیز منحنی ذوب استفاده شده (شکل ۶). در شکل ۶ منحنی ذوب ژن‌های *Bax* و *Bcl/2* در رده سلولی HT29 نشان داده شده است. ۱- الگوی منحنی ذوب ژن ۲ *Bcl/2* در دمای  $82^{\circ}\text{C}$ ، ۳- الگوی منحنی ذوب ژن *Bax* در دمای  $82^{\circ}\text{C}$  می‌باشد. تغییر در بیان ژن‌ها در سلول‌های HT29 تیمار شده با نیوزومها طی





شکل ۶. منحنی ذوب ژن *Bax* (۸۲ درجه سانتی گراد) و *Bcl2* (۸۰ درجه سانتی گراد).



شکل ۷. میزان بیان ژن های *Bax* و *Bcl2* نسبت به ژن مرجع بتاکتین. نتایج به صورت مقایسه با ژن کنترل گزارش شده است ( $P < 0.001$ , \*\*\*).

این معایب، می‌توان به اثرات جانبی این روش‌ها بر سایر سلول‌های سالم می‌باشد. محققان در پی یافتن راهکارهای جدید درمانی می‌باشند که یکی از این روش‌ها، روش‌های مبتنی بر نانوتکنولوژی می‌باشد که مطالعات و پیشرفت‌های زیادی در این حوزه مشاهده شده است<sup>۳۴</sup>. بسیاری از این

بحث  
مطالعات نشان می‌دهد که بیماری سرطان به عنوان یک عامل مرگ و میر شایع در کل دنیا محسوب می‌شود که تاکنون از روش‌های اشعه‌درمانی و شیمی‌درمانی استفاده می‌شود که این روشها دارای معایب هستند<sup>۳۵</sup>. از

باعث سیالیت آنها و افزایش سرعت رهاسازی غشای وزیکول می‌شود.<sup>۳۰</sup> یکی دیگر از اهداف این مطالعه، بررسی اثرات سمیت سلولی و آپوپتوزی نیوزومهای حاوی استامینوفن بود. نتایج نشان داد که نیوزومهای حاوی استامینوفن دارای سمیت سلولی معناداری علیه رده سلولی HT2۹ بود طوری که در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر در میلی لیتر میزان کاهش بقای سلولی  $18/69 \pm 0/51$  ( $P < 0/001$ )  $2/14 \pm 0/34$  ( $P > 0/01$ ) بود. هم چنین نتایج نشان داد که نیوزومهای حاوی استامینوفن طی ساعت میزان بیان زن *Bax* را به میزان ( $0/01$ )  $18/69 \pm 0/51$  ( $P < 0/001$ ) داد در صورتیکه میزان بیان زن *Bcl2* در سلول‌های HT2۹ تیمار شده با استامینوفن نسبت به زن مرجع  $0/46 \pm 0/11$  کاهش یافت. مطالعات مختلفی در زمینه بررسی اثرات سمیت سلولی نیوزومها انجام شده است. رضایی و همکارانش نانوذرات طلا را در نیوزومها بارگذاری کرد و اثرات سیتو توکسیک آنها را بر روی رده سلولی سلطان تخدمان انسان ارزیابی کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات طلای بارگذاری شده با نیوزوم دارای اثرات سمیت سلولی واپسیه به دوز بوده و اثرات سیتو توکسیک معنی‌داری نسبت به نانوذرات طلای آزاد دارند. مطالعات نشان داده است که اثر کشنده‌گی سلول‌ها، بستگی به زمان و غلظت نانوذرات دارد.<sup>۳۱</sup> الق آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات، یکی از مکانیسم‌های مورد توجه محققان می‌باشد بطوریکه اثرات سمیت سلول‌های نانوذرات به دلیل تاثیر آنها بر روی متابولیسم تنفسی سلولی نیز می‌باشد. هم چنین افزایش بیان زن‌های آپوپتوزی در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات و راه افتادن آبشار آپوپتوزی توسط بسیاری از محققان به اثبات رسیده است.<sup>۳۲</sup>

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه، سنتز نیوزومهای حاوی استامینوفن، خصوصیات ساختاری، اثرات سمیت سلولی و آپوپتوزی آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نیوزومهای سنتز شده دارای ساختار کروی و دارای اندازه میانگین  $289/6$  نانومتر می‌باشد. هم چنین نتایج نشان داد که نیوزومهای HT2۹ سنتز شده دارای اثرات سمیت سلولی معنادار علیه رده سلولی  $HT29$  بوده و می‌تواند آپوپتوز را القا کند. با توجه به نتایج میتوان پیشنهاد داد که نیوزومها میتوانند اثرات سمیت سلولی را افزایش دهند و به عنوان یک سیستم رهایش دارو جهت اهداف درمانی در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

پیشرفت‌ها در حوزه استفاده از سیستمهای نانو حمل دارو میباشد. داروهای ضدسرطان راچ مورد استفاده در درمان سرطان، میتوانند علاوه بر سلول‌های سلطانی، سلول‌های نرمال را نیز تاثیر قرار دهند. با توجه به اینکه داروهای ضدسرطان در دوزهای بالا استفاده از سیستمهای نانو حمل دارو، زیادی می‌شوند.<sup>۳۳</sup> یکی از ویژگیهای استفاده از سیستمهای نانو حمل دارو، افزایش میزان پایداری داروها در سیستم گردش خون می‌باشد. نکته دیگر، نانوذرات که دارای سایز نانومتر هستند می‌توانند از سیستم اینمنی میزان و فاگوسیته شده در امان باشند.<sup>۳۴</sup>

در این مطالعه از سیستم نیوزوم جهت انکپسولاسیون داروی استامینوفن استفاده شد، طوری که فرمولاسیون‌های مختلفی از نیوزومها سنتز شد و خصوصیات سایز و درصد EE آن محاسبه شد. نتایج نشان داد که فرمولاسیون  $1\text{NiO}$ ، فرمولاسیون برتر بود و دارای درصد EE بالاتر و اندازه کوچک‌تر در مقایسه با فرمولاسیون‌های دیگر بود. هم چنین جهت بررسی شکل ظاهری و اندازه نیوزومهای سنتز شده از روش میکروسکوپ الکترونی روبشی و DLS استفاده شد. نتایج نشان داد که نیوزومهای سنتز شده دارای شکل ظاهری کروی با اندازه  $289/6$  نانومتر بودند. مطالعات مختلفی در زمینه سنتز نیوزومهای حاوی دارو و بررسی خصوصیات آن انجام شده است. Sharjeel Abid و همکارانش نانوفیبرهای حاوی استامینوفن سنتز کردن و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانوفیبرها را بررسی نمودند. نتایج نشان داد که قطر نانوذرات بین  $185$  تا  $375$  نانومتر است.<sup>۳۵</sup> Swati De و همکارانش، نیوزومهای لود شده با نانوذرات طلا را سنتز کردن و خواص آنها را با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و DLS بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که نیوزومهای سنتز شده کروی هستند و اندازه نیوزومهای سنتز شده بین  $100$  تا  $2000$  نانومتر است.<sup>۳۶</sup> Nusaiba K Al-Nemrawi، فرمولاسیون‌هایی از نانوپلیتیکل PLGA حاوی استامینوفن سنتز نمودند و سایز و میزان EE٪ محاسبه گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوپلیکل‌های سنتز شده دارای اندازه متوسط  $10$  تا  $1000$  نانومتر و میزان EE٪ برابر با  $90$ ٪ است.<sup>۳۷</sup> در ادامه مطالعه، میزان رهایش دارو توسط کیسه دیالیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان رهایش دارو از نیوزوم آهسته روش بوده و در ساعات اولیه آزادسازی اتفاق جاری است. سرعت رهاسازی دارو از نیوزوم به ترتیب آن بستگی دارد، نیوزومهایی که دارای سیالیت غشای سفت‌تری هستند، رهایش آهسته‌تری دارند. همچنین چندین مطالعه نشان داده است که استفاده از توئین  $80$  در تهیه نیوزومها

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی همکاران که در انجام این پروژه و در دسترس قراردادن تجهیزات آزمایشگاهی همیاری نمودند، تشکر و قدردانی میگردد  
تعارض منافع  
نویسندها تعارضی اظهار نکرده اند.

### ملاحظات اخلاقی

ملاحظات اخلاقی مطابق کدهای مصوب دانشگاه رعایت شده است.  
مشارکت نویسندها  
نویسندها به طور مساوی در این مطالعه نقش داشتند.

### References

- WHO Cancer. [(accessed on 14 July 2021)]. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Ferlay J., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M., Znaor A., Soerjomataram I., Bray F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. [(accessed on 14 July 2021)]. Available online:
- Papamichael D., Audisio R.A., Glimelius B., de Gramont A., Glynne-Jones R., Haller D., Kohne C.H., Rostoft S., Lemmens V., Mitry E., et al. Treatment of colorectal cancer in older patients: International Society of Geriatric Oncology (SIOG) consensus recommendations 2013. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 2015;26:463–476.
- Triantafyllidis J.K., Nasioulas G., Kosmidis P.A. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: Epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res.* 2009;29:2727–2737.
- Edwards B.K., Ward E., Kohler B.A., Eheman C., Zauber A.G., Anderson R.N., Jemal A., Schymura M.J., Lansdorp-Vogelaar I., Seeff L.C., et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer.* 2010;116:544–573.
- Navarro M., Nicolas A., Ferrandez A., Lanas A. Colorectal cancer population screening programs worldwide in 2016: An update. *World J. Gastroenterol.* 2017;23:3632–3642.
- Wilson J.M., Jungner Y.G. Principles and practice of mass screening for disease. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* 1968;65:281–393.
- Neuwelt AJ, Wu YJ, Knap N, Losin M, Neuwelt EA, Pagel MA, Warmann S, Fuchs J, Czauderna P, Wozniak M. Using acetaminophen's toxicity mechanism to enhance cisplatin efficacy in hepatocarcinoma and hepatoblastoma cell lines. *Neoplasia.* 2009;11:1003–1011.
- Kobrinsky NL, Hartfield D, Horner H, Maksymiuk A, Minuk GY, White DF, Feldstein TJ. Treatment of advanced malignancies with high-dose acetaminophen and N-acetylcysteine rescue. *Cancer Invest.* 1996;14:202–210.
- Wu YJ, Neuwelt AJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. Acetaminophen enhances cisplatin- and paclitaxel-mediated cytotoxicity to SKOV3 human ovarian carcinoma. *Anticancer Res.* 2013;33:2391–2400.
- Allen TM. Liposomal drug formulations: Rationale for development and what we can expect for the future. *Drugs.* 1998;56:747–56.
- Malhotra M, Jain NK. Niosomes as drug carriers. *Indian Drugs.* 1994;31:81–6.
- Udupa N. Niosomes as drug carriers. In: Jain NK, editor. Controlled and novel drug delivery. 1st edition. New Delhi: CBS Publishers and Distributors; 2002.
- Baillie AJ, Florence AT, Hume LR, Muirhead GT, Rogerson A. The Preparation and properties of Niosomes-Non ionic surfactant vesicles. *J Pharm Pharmacol.* 1985;37:863–8.
- Kaur IP, Garg A, Singla AK, Aggarwal D. Vesicular systems in ocular drug delivery: An overview. *Int J Pharm.* 2004;269:1–14.

16. Hu C, Rhodes DG. Proniosomes: A Novel Drug Carrier Preparation. *Int J Pharm.* 1999;185:23–35.
17. Azmin MN, Florence AT, Handjani-Vila RM, Stuart JF, Vanlerberghe G, Whittaker JS. The effect of non-ionic surfactant vesicle (noisome) entrapment on the absorption and distribution of methotrexate in mice. *J Pharm Pharmacol.* 1985;37:237–42.
18. Szoka F, Jr, Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes) *Annu Rev Biophys Bioeng.* 1980;9:467–508. [PubMed] [Google Scholar]
19. Jadon PS, Gajbhiye V, Jadon RS, Gajbhiye KR, Ganesh N. Enhanced oral bioavailability of griseofulvin via niosomes. *AAPS PharmSciTech.* 2009;10:1186–92.
20. Sheena IP, Singh UV, Kamath R, Uma Devi P, Udupa N. Niosomal mitoxantrone A, with better tumor efficiency. *Indian J Pharm Sci.* 1998;60:45–8.
21. Baillie AJ, Coombs GH, Dolan TF, Laurie J. Non-ionic surfactant vesicles, niosomes, as delivery system for the anti-leishmanial drug, sodium stibogluconate. *J Pharm Pharmacol.* 1986;38:502–5.
22. Gregoriadis G. Targeting of drugs: Implications in medicine. *Lancet.* 1981;2:241–6.
23. Morson B.C. The evolution of colorectal carcinoma. *Clin. Radiol.* 1984;35:425–431.
24. Zoetemelk M., Ramzy G.M., Rausch M., Nowak-Sliwinska P. Drug-drug interactions of irinotecan, 5-fluorouracil, folinic acid and oxaliplatin and its activity in colorectal carcinoma treatment. *Molecules.* 2020;25:2614. doi: 10.3390/molecules25112614.
25. Petrelli F., Coinu A., Ghilardi M., Cabiddu M., Zaniboni A., Barni S. Efficacy of oxaliplatin-based chemotherapy+ bevacizumab as first-line treatment for advanced colorectal cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* 2015;38:227–233.
26. Ibrahim A., Hirschfeld S., Cohen M.H., Griebel D.J., Williams G.A., Pazdur R. FDA drug approval summaries: Oxaliplatin. *Oncologist.* 2004;9:8–12. doi: 10.1634/theoncologist.9-1-8.
27. Zhu L., Chen L. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2019;24:40. doi: 10.1186/s11658-019-0164-y.
28. Semrad T.J., Fahrni A.R., Gong I.Y., Khatri V.P. Integrating chemotherapy into the management of oligometastatic colorectal cancer: Evidence-based approach using clinical trial findings. *Ann. Surg. Oncol.* 2015;22:855–862. doi: 10.1245/s10434-015-4610-4.
29. Ahmed F., Kumari S., Kondapi A.K. Evaluation of antiproliferative activity, safety and biodistribution of oxaliplatin and 5-fluorouracil loaded lactoferrin nanoparticles for the management of colon adenocarcinoma: An in vitro and an in vivo study. *Pharm. Res.* 2018;35:178.
30. Zhou J., Chang L., Guan Y., Yang L., Xia X., Cui L., Yi X., Lin G. Application of circulating tumor DNA as a non-invasive tool for monitoring the progression of colorectal cancer. *PLoS ONE.* 2016;11:e0159708. doi: 10.1371/journal.pone.0159708.
31. Lv C., Qu H., Zhu W., Xu K., Xu A., Jia B., Qing Y., Li H., Wei H.-J., Zhao H.-Y. Low-dose paclitaxel inhibits tumor cell growth by regulating glutaminolysis in colorectal carcinoma cells. *Front. Pharmacol.* 2017;8:244. doi: 10.3389/fphar.2017.00244.
32. Einzig A.I., Neuberg D., Wiernik P.H., Grochow L.B., Ramirez G., O'Dwyer P.J., Petrelli N.J. Phase II trial of paclitaxel in patients with advanced colon cancer previously untreated with cytotoxic chemotherapy: An eastern cooperative oncology group trial (PA286). *Am. J. Ther.* 1996;3:750–754.
33. Laraib U., Sargazi S., Rahdar A., Khatami M., Pandey S. Nanotechnology-based approaches for effective detection of tumor markers: A comprehensive state-of-the-art review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021;195:356–383