



Research Article

Niosome Preparation of Atorvastatin Drug with Green Preparation Approach for *In-vitro* study of Transdermal Absorption with Lavender Essential Oil

Shidrokh Abootorabi^{1*} , Zahra Kardan²

¹ Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

² Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

***Corresponding author:** Shidrokh Abootorabi, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran. E-mail: sh.abotorabi@hums.ac.ir.

DOI: [10.32592/nkums.16.3.33](https://doi.org/10.32592/nkums.16.3.33)

How to Cite this Article:

Abootorabi Sh, Kardan Z. Niosome Preparation of Atorvastatin Drug with Green Preparation Approach for *In-vitro* study of Transdermal Absorption with Lavender Essential Oil. J North Khorasan Univ Med Sci. 2024;16(3):33-46. DOI: 10.32592/nkums.16.3.33

Received: 03 Jul 2024

Accepted: 13 Aug 2024

Keywords:

Atorvastatin
Lavender Essential Oil
Niosome
Skin Drug Delivery

Abstract

Introduction: Studies have pointed to anti-inflammatory properties of atorvastatin. In this research, niosome nanoparticles have been used to increase skin penetration and drug retention.

Method: Atorvastatin niosomes were prepared using the sonication method. The effect of cholesterol: surfactant mixture ratio was investigated on physicochemical properties of nanoparticles. Studies have been performed on the morphological features, and characterization of nanoparticles. The toxicity of optimal formulation was investigated on a normal human fibroblast cell line. Different percentages of lavender essential oil were added to the optimal formulation gel, and skin drug delivery studies were performed.

Results: The optimal formulation had the optimum particle size, PDI, zeta potential, and EE%, which leads to higher stability and dissolution of atorvastatin in the body. Morphological studies conducted on properties of nanoparticles illustrated a spherical shape and no interference with other formulation components. No cytotoxicity was detected for improved formulation of nanoparticles, including atorvastatin. *In-vitro* skin permeation results indicated that gel containing 0.5% lavender essential oil atorvastatin niosome (Atrosome) could enhance the dermal delivery of atorvastatin where a higher concentration of atorvastatin can be detected in skin layers.

Conclusion: As evidenced by the results of this study, preparing nanoparticles from atorvastatin and adding essential oil to the final formulation exerts a positive effect on local drug delivery. Moreover, drug delivery with nanocarriers significantly increased the percentage of drug retention in the target site.



تهیه نیوزوم داروی آتورواستاتین (آتروزوم) با رویکرد آماده‌سازی سبز برای مطالعه برون‌تن جذب از راه پوست با اسانس اسطوخودوس

شیدرخ ابوترابی^{۱*}، زهرا کاردان^۲

^۱ استادیار گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران
^۲ دانشجوی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران
^{*} نویسنده مسئول: شیدرخ ابوترابی، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران.
ایمیل: sh.abotorabi@hums.ac.ir

DOI: 10.32592/nkums.16.3.33

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۱۳	چکیده
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳	مقدمه: مطالعات نشان داده‌اند که آتورواستاتین دارای اثرات ضدالتهابی است. در این تحقیق، از نانوذرات نیوزومی برای افزایش نفوذ پوستی و ماندگاری این دارو در پوست استفاده شده است.
واژگان کلیدی: آتورواستاتین نیوزوم اسانس اسطوخودوس دارورسانی پوستی	روش کار: نانوذرات نیوزومی آتورواستاتین با استفاده از روش سونیکاسیون تهیه شدند. نسبت کلسترول به سورفکتانت بر خواص فیزیکیوشیمیایی نانوذرات بررسی شد. مطالعه ویژگی‌های مورفولوژیکی و ارزیابی خصوصیات نانوذرات آتورواستاتین انجام شد. سمیت فرمولاسیون بهینه بر رده سلولی نرمال فیبروبلاست انسانی بررسی شد. درصدهای مختلف اسانس اسطوخودوس به ژل فرمولاسیون بهینه اضافه شد و مطالعات دارورسانی پوستی انجام پذیرفت.
	یافته‌ها: فرمولاسیون بهینه دارای اندازه ذره‌ای، توزیع اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا و درصد داروی بارگیری شده مناسب بودند که منجر به پایداری و انحلال بیشتر آتورواستاتین در بدن می‌شود. مطالعات مورفولوژیکی و بررسی خصوصیات نانوذرات، شکل کروی و تداخل نداشتن با سایر اجزای فرمولاسیون را نشان داد. هیچ سمیت سلولی برای فرمولاسیون‌های بهینه نانوذرات آتورواستاتین تشخیص داده نشد. نتایج نفوذ پوستی در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که ژل حاوی ۰/۵٪ اسانس اسطوخودوس نانوذرات نیوزوم آتورواستاتین می‌تواند باعث افزایش انتقال پوستی آتورواستاتین شود که در آن غلظت بالاتر آتورواستاتین در لایه‌های پوست قابل تشخیص است.
	نتیجه‌گیری: این تحقیق نشان داد که تهیه نانوذرات داروی آتورواستاتین و افزودن اسانس به فرمولاسیون نهایی تاثیر مناسبی بر دارورسانی موضعی داشته و درصد ماندگاری دارو در موضع را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد.

مقدمه

با لیپوزوم‌ها مانند حساسیت به اکسیداسیون، قیمت بالا و مشکل در تهیه سطوح خلوص بالا غلبه می‌کند [۴]. نیوزوم‌ها به‌عنوان انبار دارو در بدن عمل می‌کنند که دارو را به روشی کنترل‌شده از طریق دو لایه خود آزاد می‌کنند و باعث آزادسازی پایدار داروی محصور می‌شوند [۳]. امروزه، نیوزوم‌ها به‌دلیل پایداری، سهولت آماده‌سازی، کاهش سمیت، افزایش کارایی دارو و مهم‌تر از همه عملکرد هدفمند در محل، محبوبیت بیشتری به دست آورده‌اند که برای هدف قرار دادن دارو مهم هستند، به‌ویژه در شیمی‌درمانی که در آن عامل محدودکننده به‌طور سنتی، انتخاب نکردن داروهاست [۵].

استاتین‌ها در شرایط برون‌تن و درون‌تن دارای اثرات ضدالتهابی هستند و شواهد نشان داده است که استاتین‌ها می‌توانند برای درمان اختلالات پوستی استفاده شوند و فعالیت ضدالتهابی آنها در مقایسه با دیکلوفناک قابل توجه است [۶]. آتورواستاتین یک داروی ضدهیپرلیپیدمیک است که

برای دستیابی به دارورسانی بهتر پوستی، غلبه بر موانع پوستی، به‌ویژه لایه شاخی مهم است [۱]. نشان داده شده است که فرمولاسیون‌های حاوی نانوذرات می‌توانند به‌طور موثر از لایه‌های پوست عبور کنند تا جذب پوستی داروها را بدون ایجاد هیچ‌گونه تغییری در ترکیب شیمیایی داروها بهبود بخشند [۲].

اگرچه انواع مختلفی از نانوحامل‌ها وجود دارند، از نانوذرات نیوزومی اخیراً به‌طور گسترده استفاده شده است که به‌دلیل مزایای فراوان نیوزوم‌ها از جمله زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری و انعطاف‌پذیری در خصوصیات ساختاری خود است. نیوزوم‌ها به‌طور گسترده برای رهاسازی کنترل‌شده و تحویل هدفمند برای درمان سرطان، عفونت‌های ویروسی و سایر بیماری‌های میکروبی ارزیابی شده‌اند [۳].

جزء اصلی نیوزوم‌ها سورفکتانت غیریونی است که به آن مزیت پایداری بیشتر در مقایسه با لیپوزوم‌ها می‌دهد و در نتیجه بر مشکلات مرتبط

بهینه پاسخ دارویی بررسی شد.

روش کار

مواد

آتورواستاتین کلسیم از شرکت داروسازی حکیم (تهران، ایران) خریداری شد. همچنین، کلسترول، اسپان ۸۰ و توئین ۸۰ از شرکت مرک (آلمان) تهیه شد. اسانس اسطوخودوس از شرکت دارویی زردبند (ایران) تهیه شد. سایر مواد شیمیایی و حلال‌های مد نظر از منابع معتبر و با درجه خلوص مناسب تهیه شدند.

تهیه نانوذرات نیوزومی آتورواستاتین

برای ساخت نانوذرات نیوزومی از روش سونیکاسیون استفاده شد. ۲۰۰ میلی‌گرم آتورواستاتین به‌همراه کلسترول، اسپان ۸۰ و توئین ۸۰ در یک بشر ریخته شده و روی هیت-استیرر (IKA, آلمان) با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا حل شدن کامل اجزا هم زده شد. در بشری جداگانه ۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه ریخته شد و در بن‌ماری (لوند، ایران) قرار گرفت تا به دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد برسد. سپس، آب یک‌باره به بشر اول اضافه شد و ترکیب به مدت ۲۰ دقیقه روی هیت-استیرر با چرخش ۴۰۰۰ دور در دقیقه مخلوط شد. سپس، به مدت ۳ دقیقه با دامنه ۲۰٪ با سونیکاتور پروب‌دار (Bandelin 3100, آلمان) سونیکه شد. سرانجام، در حمام آب یخ به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رسید [۵].

تعیین اندازه ذره‌ای، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا

فرمولاسیون‌های به‌دست‌آمده بعد از ۱۰۰ بار رقیق‌سازی، به گونه‌ای که هیچ حبابی داخل سل ایجاد نشود به سل دستگاه Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, بریتانیا) منتقل شدند. اندازه، پتانسیل زتا و توزیع اندازه ذره‌ای نانوذرات آتورواستاتین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با زاویه ۹۰ درجه اندازه گرفته شد [۱۰].

اندازه‌گیری میزان داروی بارگیری‌شده در نانوذرات آتورواستاتین

از روش سانتریفیوژ برای ارزیابی مقدار آتورواستاتین محصورشده در نانوذرات نیوزومی استفاده شد. بر طبق تحقیقات قبلی، سانتریفیوژ پراکندگی‌های نانوذرات در ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سانتریفیوژ یخچال‌دار (SIGMA 3-30KS, آلمان) انجام شد [۵]. داروی آزاد پس از سانتریفیوژ در لایه رویی باقی می‌ماند و مقدار کل داروی آزاد در مایع رویی را می‌توان پس از فیلترکردن با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر از طریق روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC-High Performance Liquid Chromatography) (Knauer, آلمان) ارزیابی کرد. در سیستم HPLC، فاز متحرک شامل ۷۰:۳۰ (v/v) ترکیبی از متانول و آب (با pH تنظیم‌شده با ۸۰٪ اسید فسفریک) است. آنالیزهای HPLC با استفاده از ستون XDB-C18 با سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰ میلی‌لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۳۸ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. حجم تزریق نمونه و زمان شستشوی نمونه به ترتیب ۲۰ میکرولیتر و ۳۰ دقیقه بود. از معادله ۱ برای محاسبه کارایی گیرافتادن دارو (EE%) استفاده شد. در این

به‌دلیل متابولیسم عبور اول، فراهمی زیستی خوراکی ضعیفی در حدود ۱۲ درصد نشان می‌دهد [۷]. مانع اصلی در استفاده از آتورواستاتین این است که مصرف خوراکی آن به‌دلیل حلالیت کمتر در آب، فراهمی زیستی کم و عوارض جانبی مختلف محدود شده است؛ بنابراین، کشف یک راه تجویز جایگزین برای آتورواستاتین به‌جای تجویز خوراکی بسیار مهم است. تحویل از طریق پوست آتورواستاتین یکی از مناسب‌ترین و بهترین جایگزین‌ها است؛ زیرا دارای مزایای متعددی است [۶]. با وجود این، سطح نفوذ به پوست به‌شدت به ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی ماهیت و مواد شیمیایی حامل، از جمله قطبیت حلال، نوع حامل و اندازه ذرات بستگی دارد [۱]. آتورواستاتین با ضریب تفکیک $6/36$ (logP)، نقطه ذوب ۱۷۶ درجه سانتی‌گراد و وزن مولکولی ۵۵۸/۶۴ گرم بر مول برای دارورسانی موضعی مناسب است [۸]. بسیاری از محققان کوشیده‌اند از آتورواستاتین برای تجویز از طریق پوست استفاده کنند [۳، ۶]. اثر ضدالتهابی این دارو در تجویز موضعی قابل مقایسه با فرمول موضعی بتامتازون است که می‌تواند یک داروی جایگزین در درمان درماتیت سبورئیک پوست سر باشد [۹].

با توجه به طولانی بودن فرایندهای ضدالتهابی، تهیه نانوذرات از این دارو و استفاده از جذب‌افزا میزان نفوذ و ماندگاری دارو را در پوست افزایش می‌دهد، اثرات بیشتر و سریع‌تری مشاهده می‌شود و عوارض جانبی دارو کاهش و فراهمی زیستی آن افزایش می‌یابد [۱۰، ۱۱].

در مطالعه‌ای که مرتضی سمنانی و همکاران در سال ۲۰۲۲ بر ژل نانوامولسیون دیکلوفناک حاوی اسانس کومین انجام داده‌اند، مشخص شد با افزایش درصد اسانس در نانوامول ژل میزان نفوذ پوستی دارو به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است [۱۱]. در مطالعه‌ای که فرموده و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی نانوذرات نیوزوم متیل‌بلو انجام داده‌اند، مشخص شد مصرف موضعی نیوزوم متیل‌بلو با کاهش بیشتر سطح اکسیدانت‌های بافتی، موجب افزایش سرعت ترمیم بافت می‌شود [۱۲]. در پژوهشی دیگر، شهرآیینی و همکاران دریافته‌اند که نانوذرات لیپیدی جامد آتورواستاتین قابلیت ماندگاری بالایی در پوست دارند که به اثر ضدالتهابی دارو کمک می‌کند [۶]. همچنین، آقاجانی و همکاران در سال ۲۰۲۰ مشخص کرده‌اند که کرم نانوذرات نیوزومی پنتوکسیفیلین در مقایسه با فرم معمولی نفوذ پوستی بهتری داشته و در تجویز موضعی به‌منظور بهبود زخم کارتر عمل کرده است [۱۳].

اگرچه، مطالعات متعددی وجود دارند که فرمول نیوزومی را بر تجویز موضعی ارزیابی کرده است [۱۴]. هیچ یک از آنها فرمول نیوزومال را از طریق فناوری سبز به دست نیاورده و در کنار اثر اسانس آزمایش نکرده‌اند. در تحقیق حاضر، نفوذ پوستی ژل موضعی آتوروزوم به‌دست‌آمده از فناوری سبز (هیچ حلال آلی در تهیه فرمولاسیون دخیل نیست) به‌همراه اسانس اسطوخودوس ارزیابی شد. ژل حاوی اسانس اسطوخودوس نیوزوم‌های بارگذاری‌شده با آتورواستاتین به‌عنوان یک عامل ضد برای دارورسانی موضعی به‌عنوان جایگزین حامل‌های سنتی توسعه یافتند. علاوه بر این، اثرات نسبت کلسترول به سورفکتانت برای دستیابی به نیوزوم‌هایی با سطح

معادله، W_{total} و W_{free} به ترتیب نشان دهنده غلظت اولیه دارو و داروی آزاد هستند [۱۴، ۱۵].

$$\text{Entrapment Efficiency} = \frac{W_{\text{total}} - W_{\text{free}}}{W_{\text{total}}} \times 100\% \quad (۱)$$

آنالیز حرارتی اسکن گرماسنجی افتراقی (DSC)

وضعیت تبلور نمونه‌های پودری آتورواستاتین، کلسترول و پودر لیوفیلیزه فرمولاسیون بهینه آتروزوم-۲ با دستگاه DSC-Differential Scanning Calorimetry (PerkinElmer، ایالات متحده آمریکا) بررسی شد. برای انجام این آزمایش، ۵ میلی گرم از هر نمونه برداشته و در داخل پن‌های آلومینیومی دستگاه قرار داده شد. دستگاه با سرعت ۱۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه و در محدوده دمایی ۳۰۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد برای آنالیز نمونه‌ها تنظیم شد [۱۶، ۱۷].

اسپکتروسکوپی Fourier-Transform IR

برهمکنش احتمالی دارو و اکسیپیان‌ها با طیف‌سنجی FT-IR (Fourier-Transform Infrared spectroscopy) Agilent CARY 630 ATR-) FTIR، ایالات متحده) بررسی شد. اسکن نمونه‌ها در بازه $4000 - \text{cm}^{-1}$ با رزولوشن 4 cm^{-1} انجام شد. در این آزمایش، پودر آتورواستاتین، اکسیپیان‌ها (کلسترول، توئین ۸۰ و اسپان ۸۰) و پودر لیوفیلیزه فرمولاسیون بهینه آتروزوم-۲ بررسی شدند. نمونه‌ها، درون دستگاه قرار گرفته و اشعه فروسرخ از آنها عبور کرد و طیف میزان جذب اشعه فروسرخ در برابر طول موج اشعه عبوری رسم شد [۱۸].

پراش اشعه ایکس

الگوی پراش اشعه ایکس در دمای اتاق با استفاده از دستگاه XRD: X-ray Diffraction (Bruker D8)، آلمان) برای نمونه‌های پودری آتورواستاتین، کلسترول و پودر لیوفیلیزه فرمولاسیون بهینه آتروزوم-۲ گرفته شد. ولتاژ ۴۰ kV و ۳۰ mA و دامنه زاویه بررسی نمونه‌ها ۱ تا ۴۵ درجه و سرعت اسکن دستگاه ۱ درجه بر دقیقه بود [۱۹].

تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

آنالیز SEM (Scanning Electron Microscopy) به منظور مطالعات مورفولوژیک انجام شد. بدین منظور، نانوذرات آتروزوم-۲، ۱۰ بار رقیق شده و بر روی لام شیشه‌ای قرار داده شدند تا در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شوند. سپس، با طلا روکش داده شده و با دستگاه SEM (FE-SEM، TESCAN MIRA3، جمهوری چک) با ولتاژ ۲۰ kV بررسی شدند [۲۰].

تصویربرداری با میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

برای تجزیه و تحلیل شکل و مورفولوژی نانوذرات از تصویربرداری AFM (Atomic Force Microscopy) (JPK Instruments AG، آلمان) استفاده شد. نانوذرات آتروزوم-۲ پس از ۵۰۰ بار رقیق‌سازی بر روی لام ریخته شده و در دمای اتاق خشک شدند. حالت تماسی انتخاب شد و عکس‌ها با نیروهای دافعه گرفته شدند [۶].

تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

بررسی مورفولوژی نانوذرات آتروزوم-۲ با استفاده از روش عکس‌برداری

Philips CM) TEM (Transmission Electron Microscopy) با دستگاه (120 KV، هلند) صورت گرفت. بدین منظور، چند قطره از نانوذرات روی شبکه‌های مسی پوشیده‌شده با کرین ریخته شد. نانوذرات به مدت ۳۰ ثانیه با محلول اسید فسفوتونگستیک ((v/v) ۲٪ رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت، حلال در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تبخیر شد و نانوذرات تصویربرداری شدند [۲۱].

بررسی پایداری نانوذرات لیپیدی جامد حاوی داروی آتورواستاتین
پایداری نانوذرات آتروزوم-۲ در دو دمای مختلف (۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت سه ماه ارزیابی شد. پایداری فیزیکی آتروزوم-۲ برای تعیین اندازه، شاخص پراکندگی، پتانسل زتا، درصد داروی بارگیری شده و همچنین جنبه‌های فیزیکی مانند تغییر در رنگ فرمولاسیون و ایجاد تجمع رسوب یا مواد لیپیدی بررسی شد [۲۲].

آزمون سمیت سلولی

سلول‌های فیبروبلاست انسانی (HFF-Human Foreskin Fibroblast cells) (ارائه‌شده از بانک ملی سلول، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران) برای تجزیه و تحلیل سمیت سلولی فرمولاسیون‌ها استفاده شد. سپس، سلول‌ها در ته میکروپلیت‌ها (Nunc) به مدت ۲۴ ساعت با تراکم 1×10^5 سلول در هر چاهک با آتروزوم-۲، نانوذره نیوزومی بدون دارو و آتورواستاتین (۱/۵، ۱، ۰/۵، ۲، ۵/۲ میکرومولار) کشت و با کنترل مقایسه شدند. پس از حذف ترکیب، سلول‌ها با بافر فسفات سالیین شسته شدند و رنگ‌سنجی فورمازان diphenyl [2,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 tetrazolium bromide (MTT) برای ارزیابی زنده ماندن سلول استفاده شد. انکوباسیون سلولی با MTT (Sigma، ایالات متحده) (0.5 mg/ml) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انجام شد. پس از دور ریختن مایع رویی، رسوب حاوی بلورهای فورمازان در دی‌متیل‌سولفوکسید (۱۰۰ میکرولیتر) حل شد. سپس، صفحات به مدت ۲۰ دقیقه هم‌زده شدند. در این مرحله، شدت رنگ حاصل با دستگاه خوانشگر میکروپلیت (Bio Tek 800، ایالات متحده) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت‌های مختلف (۱/۵، ۱، ۰/۵، ۲ و ۵/۲ میکرومولار) آزمایش شد و هر آزمون هشت بار تکرار شد (سلول‌ها در محیط) آزمایش شد و در نهایت، بقای سلول‌ها با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد که در آن OD_{sample} و OD_{control} به ترتیب بیانگر شدت رنگ نمونه و کنترل در طول موج ۵۶۰ نانومتر است [۵].

$$\text{viability (\%)} = \frac{(OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}})}{(OD_{\text{control}} - OD_{\text{blank}})} \times 100\% \quad (۲)$$

آنالیز GC-MS و شناسایی ترکیبات اسانس اسطوخودوس

ترکیبات اسانس اسطوخودوس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC: Gas Chromatography) و طیف‌سنجی جرمی (MS: Mass Spectrometry) (Agilent Technologies، Palo Alto، ایالات متحده)

محیط انحلال اتانول ۵۰ درصد به حجم ۹۰۰ میلی لیتر انتخاب شد. لحظه قرارگیری در سل ها در محیط انحلال زمان صفر در نظر گرفته شد. نمونه گیری در زمان های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۲۴ ساعت بعد از قرار دادن سل در محیط انحلال انجام گرفت. برای نمونه گیری، هر بار ۵ میلی لیتر از محلول موجود در محیط انحلال برداشته شده، با فیلتر ۰/۲۲ میکرون آن را صاف کرده و سطح زیر منحنی با استفاده از HPLC محاسبه شده است. جهت ثابت ماندن محیط انحلال، بعد از هر بار نمونه گیری و برداشتن ۵ سی سی از محیط، ۵ میلی لیتر اتانول ۵۰ به محیط اضافه شد [۱].

تعیین کینتیک آزادسازی دارو از غشای دیالیز

داده های حاصل از آزادسازی فرمولاسیون های آتورواستاتین از غشای دیالیز در شرایط برون تن با استفاده از روش انتخاب منحنی مناسب در مدل های مختلف کینتیکی از جمله مدل درجه صفر (معادله ۳)، مدل درجه یک (معادله ۴)، مدل هیگوچی (معادله ۵) و مدل کورس مایر-پیاس (معادله ۶) مطالعه شد که در آن، M_0 ، M_t و M_∞ به ترتیب مقادیر آتورواستاتین آزادشده در زمان صفر، t و بی نهایت هستند. C_0 و C به ترتیب مقادیر آتورواستاتین آزادشده در ابتدا و در زمان t است. K_0 ، K_1 ، K و K_p ثابت هستند. مکانیسم آزادسازی داروی آتورواستاتین از هر ماتریکس نمونه با تجزیه و تحلیل مقدار n به عنوان نماینده انتشار بررسی شد [۲۴، ۲۵].

مدل درجه صفر: $M_t = M_0 + K_0 t$ معادله (۳)

مدل درجه یک: $\log C = \log C_0 - \frac{K_1 t}{2.303}$ معادله (۴)

مدل هیگوچی: $M_t = k t^{0.5}$ معادله (۵)

مدل کورس مایر-پیاس: $\frac{M_t}{M_\infty} = k_p t^n$ معادله (۶)

بررسی مقدار جذب پوستی دارو از فرمولاسیون نانوذرات داروی

آتورواستاتین حاوی اسانس اسطوخودوس و نمونه استاندارد

در بررسی جذب پوستی، موش ها اول کار کشته می شوند بعد از پوستشان استفاده شده و تیماری با رو روی خود موش انجام نمی شود؛ قطعات پوستی مورد نیاز برای این آزمایش، از ناحیه شکمی موش صحرایی نر با وزن حدود ۲۵۰ گرم تهیه شدند. موش ها با تزریق دوز بالای کتامین و زایلازین در عرض چند دقیقه کشته شدند؛ سپس بدن حیوان با سنجاق ته گرد بر روی سطح صافی ثابت شد، به طوری که سطح شکمی آن به سمت بالا قرار گرفت. موهای ناحیه مورد استفاده با ماشین اصلاح، به نحوی که پوست آسیب نبیند چیده و تا حد امکان کوتاه شد. در انتها، پوست ناحیه بالا با تیغ جراحی و قیچی به دقت جدا و سپس به مدت ۲۴ ساعت در محلول نرمال سالین در یخچال نگهداری شد؛ سپس عضلات و چربی متصل تمیز و جدا و پوست به چند قسمت مساوی تقسیم شد. پس از آماده کردن قطعات پوستی، یک مگنت درون سل فرانس قرار داده و هر قطعه پوست روی یک سل فرانس با چسب قطره ای فیکس شد، به طوری که سطح اپیدرمی پوست به سمت خارج باشد. سلول فرانس از فاز گیرنده پر شده و پس از هواگیری و مسدود کردن مجاری آن نمونه های محلول بر روی سطح آنها قرار گرفت و ۲، ۴،

تجزیه و تحلیل شد. در این بررسی، از گاز هلیوم با سرعت ۱ میلی لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل و ستونی از مویرگ های سیلیس ذوب شده (۳۰ متر × ۰/۲۵ میلی متر × ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر) استفاده شد.

ابتدا یک میکرو لیتر اسانس به دستگاه GC-MS تزریق شد؛ دمای انژکتور و آشکارساز، ابتدا ۵۰ درجه سانتی گراد و به مرور با سرعت ۵ درجه در دقیقه به ۲۵۰ درجه سانتی گراد افزایش یافت. دما به مدت ۵ دقیقه در ۲۵۰ درجه سانتی گراد ثابت نگه داشته شد و سپس با سرعت ۱۰ درجه سانتی گراد در دقیقه افزایش داده شد تا به ۲۸۰ درجه سانتی گراد رسید [۱۱].

تهیه ژل نانوذرات نیوزومی و ژل ساده آتورواستاتین

برای تهیه ژل، کربومر ۹۴۱ (۰/۷۵٪) در سوسپانسیون نانوذرات (حاوی ۲۰ mg / ۲۰۰ آتورواستاتین) تهیه و پراکنده شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت با تری اتانول آمین تحت همزن پروانه ای با دور ۴۰۰ دور در دقیقه خنثی شد. برای تهیه نمونه استاندارد ابتدا، یک گرم آتورواستاتین به همراه ۵۰۰ میلی گرم توئین ۸۰ با ۱۰۰ میلی لیتر آب به حجم رسید. سپس، به منظور ایجاد پراکندگی یکنواخت به مدت ۲۰ دقیقه در حمام سونیکه، سونیکه شد. سپس، به منظور تهیه ژل، کربومر ۹۴۱ (۰/۷۵٪) در سوسپانسیون تهیه شده پراکنده شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت با تری اتانول آمین تحت همزن پروانه ای با دور ۴۰۰ دور در دقیقه خنثی شد. [۱۱].

تهیه ژل نانوذرات نیوزومی حاوی ۰/۵٪ و ۰/۱٪ اسانس

اسطوخودوس

به منظور تهیه ژل، کربومر ۹۴۱ (۰/۷۵٪) در سوسپانسیون نانوذرات تهیه شده (حاوی ۲۰۰ میلی گرم آتورواستاتین در ۱۰ میلی لیتر آب) پراکنده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت با تری اتانول آمین تحت همزن پروانه ای با دور ۴۰۰ دور در دقیقه خنثی شد. برای افزودن اسانس به ژل، ابتدا مقدار مشخصی اسانس به همراه ۳۰۰ میلی گرم توئین ۸۰ در ۱۰ میلی لیتر آب به مدت ۵ دقیقه با دور ۹۰۰۰ دور در دقیقه هموژن شد؛ سپس تحت همزن پروانه ای با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه، ترکیب حاوی اسانس قطره قطره به ژل نانوذرات اضافه شد [۱۱].

خصوصیات رئولوژیک ژل تهیه شده

ویسکوزیته ژل تهیه شده نانوذرات آتورواستاتین با استفاده از اسپیندل DV-II Pro Viscometer, Brookfield بر روی ویسکومتر (Middleboro, MA، ایالات متحده) بررسی شد. یک تغییر مداوم از مقیاس سرعت از ۰/۵ تا ۱۰۰ دور در دقیقه (25 ± 1 درجه سانتی گراد) برای نمونه انجام شد و ویسکوزیته اندازه گیری شد [۲۳].

آزادسازی دارو در شرایط in-vitro

برای این منظور، مشابه با تحقیقات پیشین، از غشای سلولز استات با cut off = 12000 Da و از immersion cell استفاده شد. ژل تهیه شده از فرمولاسیون بهینه نانوذرات و ژل ساده آتورواستاتین درون سل قرار داده شد و بر روی سل ها غشای سلولز استات قرار گرفت و در سل ها بسته شد و سل ها درون دستگاه انحلال شماره II فارماکوپه آمریکا قرار داده شدند.

۶، ۸ و ۲۴ ساعت بعد، ۵ میلی‌لیتر از فاز گیرنده خارج و با محیط تازه جایگزین شد و جذب نمونه‌های خارج شد و جهت تعیین مقدار با دستگاه HPLC خوانده شد [۶].

بررسی میزان داروی باقی‌مانده در پوست موش صحرایی ۲۴ ساعت بعد از تجویز فرمولاسیون نانوذرات داروی آتورواستاتین حاوی اسانس اسطوخودوس و نمونه استاندارد

به‌منظور بررسی میزان آتورواستاتین باقی‌مانده در پوست موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت پس از انجام مراحل قبل، پوست‌ها پس از آخرین نمونه‌گیری خرد شده و در ۱۰ میلی‌لیتر الکل ۵۰ درجه قرار داده شدند و پس از آن در ۳ سیکل ۲۲ دقیقه‌ای در حمام سونیکه شدند؛ سپس محلول حاصل، از کاغذ صافی عبور داده شده و محلول زیرین با فیلتر سرسنگی با اندازه منافذ ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد و با دستگاه HPLC سطح زیر منحنی مشخص شد [۶].

محاسبات آماری

داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد نمایش داده و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۶/۰۰) ارزیابی شدند. نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) یک‌طرفه بررسی شده و متعاقب آن جهت بررسی آزمون صفر درباره مقایسه میانگین داده‌های موجود در هر بخش از آزمون آماری توکی استفاده شد. تفاوت با $P < ۰/۰۵$ در هر نقطه از نظر آماری معنادار اعلام شد [۶].

یافته‌ها

خصوصیات نانوذرات نیوزومی تهیه‌شده

نتایج به‌دست‌آمده از جدول (۱) نشان می‌دهد که با افزایش نسبت‌های مختلف کلسترول به سورفکتانت غیریونی از ۱۰:۱ به ۲۰:۱ در فرمولاسیون‌ها، اندازه ذره‌ای، شاخص پراکندگی نانوذرات و درصد داروی بارگیری‌شده در نانوذرات به‌طور موثری افزایش یافتند ($P < ۰/۰۰۱$). با این حال، تغییرات نسبت کلسترول به سورفکتانت تاثیر معناداری بر پتانسیل زتای نانوذرات نداشت ($P = ۰/۰۶$).

آنالیز حرارتی DSC

ترموگرام DSC آتورواستاتین خالص، فرمولاسیون بهینه نانوذرات نیوزومی حاوی آتورواستاتین و کلسترول در شکل (۱) الف) نشان داده شده است. ترموگرام DSC آتورواستاتین خالص سه پیک گرمایی در بازه‌های ۸۰/۸۷ تا ۱۳۷/۱۷، ۱۳۷/۱۷ تا ۱۷۶/۸۵ و ۱۹۵/۱۹ تا ۲۸۹/۲۴ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد؛ که به‌ترتیب بیانگر، از دست دادن آب، ذوب و تخریب آتورواستاتین است [۶]. نقطه ذوب آتورواستاتین در ۱۶۵/۹۸ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد.

ترموگرام DSC کلسترول پیک گرمایی در ۱۴۹/۲۶ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد که مربوط به نقطه ذوب کلسترول است. ترموگرام‌های DSC نانوذرات نیوزومی آتورواستاتین بدون پیک در ۱۶۵/۹۸ درجه سانتی‌گراد هستند و در ۱۴۸/۲۵ درجه سانتی‌گراد پیک ناشی از ذوب کلسترول را نشان می‌دهد.

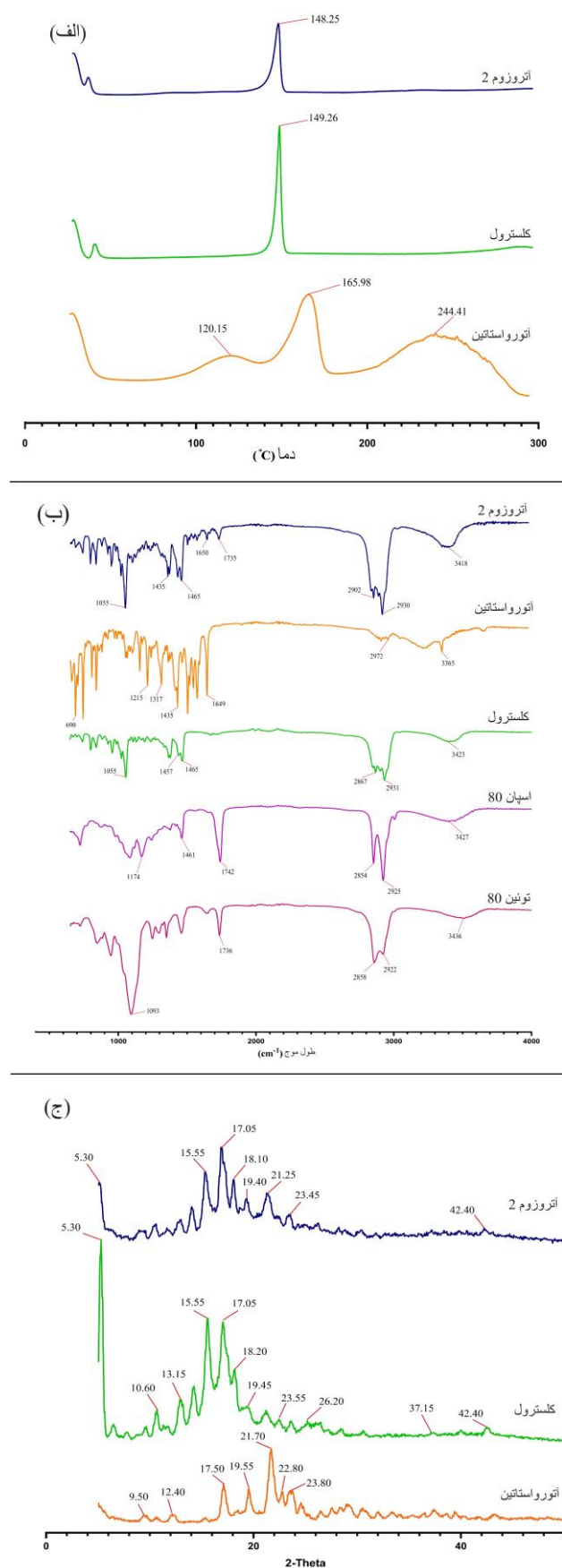
اسپکتروفتومتری FT-IR

طیف‌های FT-IR برای شناسایی تداخلات و پیوندهای احتمالی بین حامل و دارو استفاده می‌شود. در شکل (۱) ب) طیف‌های FT-IR به‌دست‌آمده از نانوذرات نیوزومی، با طیف آتورواستاتین خالص و سایر اجزای فرمولاسیون‌ها جهت بررسی تداخلات مقایسه شدند.

طیف FT-IR مربوط به آتورواستاتین 3365 cm^{-1} (OH کششی)، 2972 cm^{-1} (N-H کششی)، 1649 cm^{-1} (C=O کششی)، 1435 cm^{-1} (C-F کششی)، 1317 cm^{-1} (C-O کششی)، 1215 cm^{-1} (C-N کششی)، 690 cm^{-1} (آروماتیک خمشی خارج از صفحه)، اسپان 80 cm^{-1} (OH کششی)، 2925 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$, asymmetric stretching)، 2854 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$, symmetric stretching)، 1742 cm^{-1} (C=O کششی)، 1461 cm^{-1} (CH خمشی)، 1174 cm^{-1} (C-O کششی)، 80 cm^{-1} (OH کششی)، 2922 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$, asymmetric stretching)، 2858 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$, symmetric stretching)، 1736 cm^{-1} (C=O گروه استری، کششی)، 1093 cm^{-1} (C-O کششی) [۶] و کلسترول 3323 cm^{-1} (OH کششی)، $2850-3000 \text{ cm}^{-1}$ ؛ گروه‌های CH_2 و CH_3 کششی متقارن و نامتقارن، $1457-1465 \text{ cm}^{-1}$

جدول ۱. ترکیبات و ویژگی‌های فرمولاسیون‌های مختلف نانوذرات نیوزومی آتورواستاتین ($n=3$, mean $\pm$ SD)

فرمولاسیون	آتورواستاتین (میلی‌گرم)	کلسترول (میلی‌گرم)	اسپان ۸۰ (میلی‌گرم)	توئین ۸۰ (میلی‌گرم)	آب (میلی‌لیتر)	اندازه ذره‌ای (نانومتر)	شاخص پراکندگی	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)	درصد داروی بارگیری‌شده
آتوروزوم-۱	۲۰۰	۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۰	$137/563 \pm 144/733$	$0/447 \pm 0/055$	$-20/500 \pm 1/153$	$80/963 \pm 1/653$
آتوروزوم-۲	۲۰۰	۱۰۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۰	$6/450 \pm 196/333$	$0/457 \pm 0/050$	$-20/733 \pm 0/981$	$86/156 \pm 0/587$
آتوروزوم-۳	۲۰۰	۱۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۰	$17/470 \pm 212/033$	$0/816 \pm 0/056$	$-19/467 \pm 2/023$	$86/420 \pm 0/112$
آتوروزوم-۴	۲۰۰	۲۰۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۰	$11/907 \pm 236/933$	$0/856 \pm 0/048$	$-19/300 \pm 1/058$	$86/514 \pm 0/370$
آتوروزوم-۵	۲۰۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۰	$22/414 \pm 351/867$	$0/981 \pm 0/032$	$-19/100 \pm 0/458$	$87/182 \pm 0/135$



شکل ۱. الف) ترموگرام DSC فرمولاسیون آتروزوم-۲، آترواستاتین و کلتترول؛ ب) طیف FT-IR فرمولاسیون آتروزوم-۲، آترواستاتین، کلتترول، اسپان ۸۰، تونین ۸۰؛ ج) طیف XRD فرمولاسیون آتروزوم-۲، آترواستاتین و کلتترول

مطالعات پایداری

با توجه به نتایج به دست آمده در جدول (۲)، مشخص شد نانوذراتی که در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری می شوند، در پارامترهای ارزیابی شده تغییر معناداری نداشتند ($P > 0.05$). و تأیید شد که دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد دمای ذخیره سازی بهینه برای نانوذرات نیوزومی حاوی داروی آتورواستاتین است.

بررسی سمیت سلولی در شرایط *in vitro*

سنجش MTT آزمایشی است که بر اساس جذب به تعیین فعالیت متابولیکی سلول های زنده می پردازد. بدین منظور، غلظت های مختلف آتروزوم-۲، نانوذرات نیوزومی بدون دارو و آتورواستاتین خالص (۰/۵ تا ۲/۵ میکرومولار) طی ۲۴ ساعت بر روی سلول های نرمال فیبروبلاست انسانی (HFF) مطالعه شدند. نتایج به دست آمده در شکل (۳) نشان داد با تهیه نانوذرات نیوزومی سمیت سلولی داروی آتورواستاتین کاهش می یابد.

آنالیز GC-MS و شناسایی ترکیبات اسانس اسطوخودوس

آنالیز GC-MS برای شناسایی ترکیبات اسانس اسطوخودوس انجام شد و نتایج آنالیز در جدول (۳) نشان داد که ۳۴ ترکیب، تشکیل دهنده ۹۸/۷۴٪ از محتوای اسانس اسطوخودوس هستند و مونوترپن ها بخش اعظم ترکیبات آن را در برمی گیرند. سینئول (۳۲/۷۰٪)، لینالول (۲۳/۵۷٪)، بورنئول (۹/۵۸٪) و کامفور (۵/۲۴٪) به ترتیب ترکیبات اصلی اسانس اسطوخودوس بودند.

(CH₃ خمشی)، ۱۰۵۵ cm⁻¹ (C-O کششی) [۱] با ساختار گزارش شده در مطالعات پیشین سازگاری داشت.

پراش اشعه ایکس

ساختار بلوری نانوذرات نیوزومی داروی آتورواستاتین، با تجزیه و تحلیل الگوی پراش اشعه X آتورواستاتین، کلسترول و آتروزوم-۲ در شکل (۱). (ج) بررسی شد. الگوی XRD آتورواستاتین دارای پیک های شاخص در ۲θ مطابق با ۲۳/۸°، ۲۲/۸°، ۲۱/۷°، ۱۹/۵۵°، ۱۷/۵°، ۱۲/۴°، ۹/۵° و ۲۳/۸° است [۶]. نتایج به دست آمده از الگوی XRD کلسترول پیک های شاخص در ۲θ: ۵/۳°، ۱۰/۶°، ۱۳/۱۵°، ۱۵/۵۵°، ۱۷/۰۵°، ۱۸/۳°، ۱۹/۴۵°، ۲۳/۳۵°، ۲۶/۳° و ۳۷/۱۵° را نشان می دهد که با ساختار کلسترول در مطالعات پیشین همخوانی دارد [۱۰]. علاوه بر این، الگوهای XRD مربوط به آتروزوم-۲ پیک های شاخص کلسترول در (۲θ): ۵/۳°، ۱۵/۵۵°، ۱۷/۰۵°، ۱۸/۱°، ۱۹/۴°، ۲۱/۲۵°، ۲۳/۴۵° و ۴۲/۴° را نشان می دهد.

بررسی مورفولوژیک

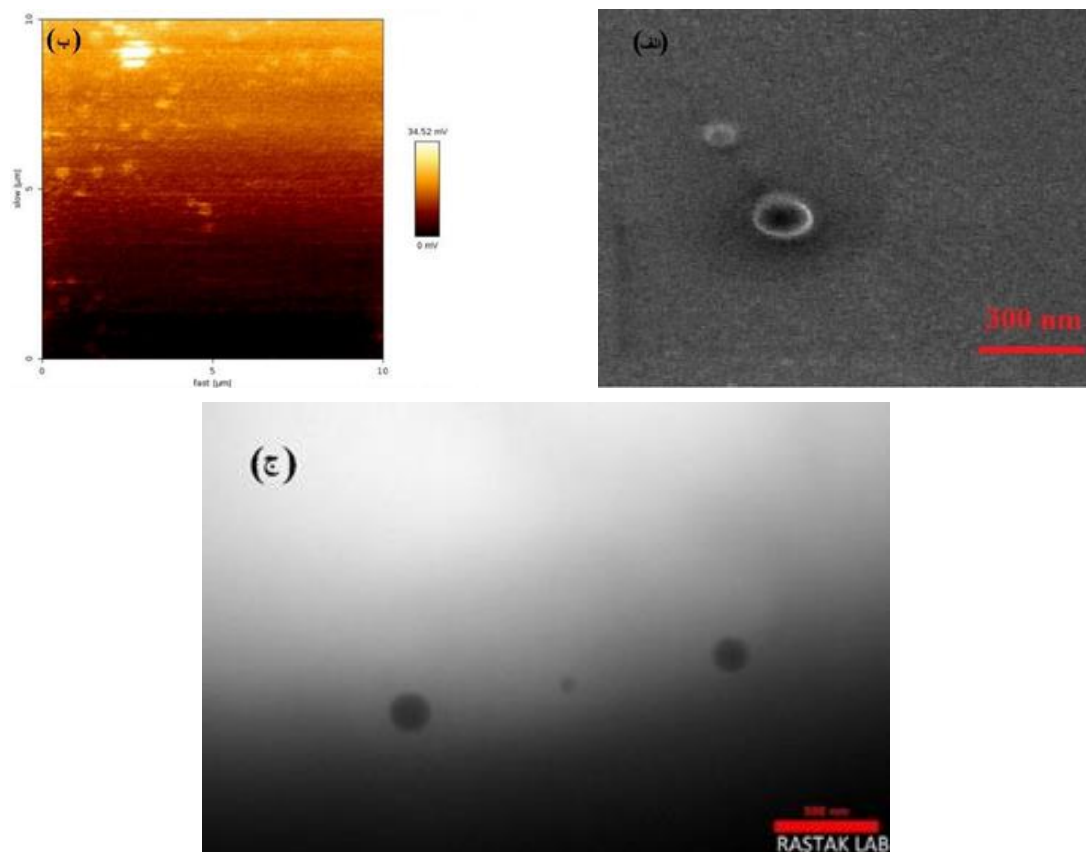
تجزیه و تحلیل تصاویر مورفولوژیکی فرمولاسیون بهینه آتروزوم، قطر وزیکول و خصوصیات سطحی آن را نشان می دهد که در شکل (۲، الف، ب و ج) نمایش داده شده است. نانوذرات آتروزوم تهیه شده در خصوص اندازه ذره ای به خوبی توزیع شده و مورفولوژی آن به شکل کروی است.

جدول ۲. مطالعات پایداری پراکندگی های نانوذرات نیوزومی نگهداری شده طی سه ماه (mean±SD, n=3)

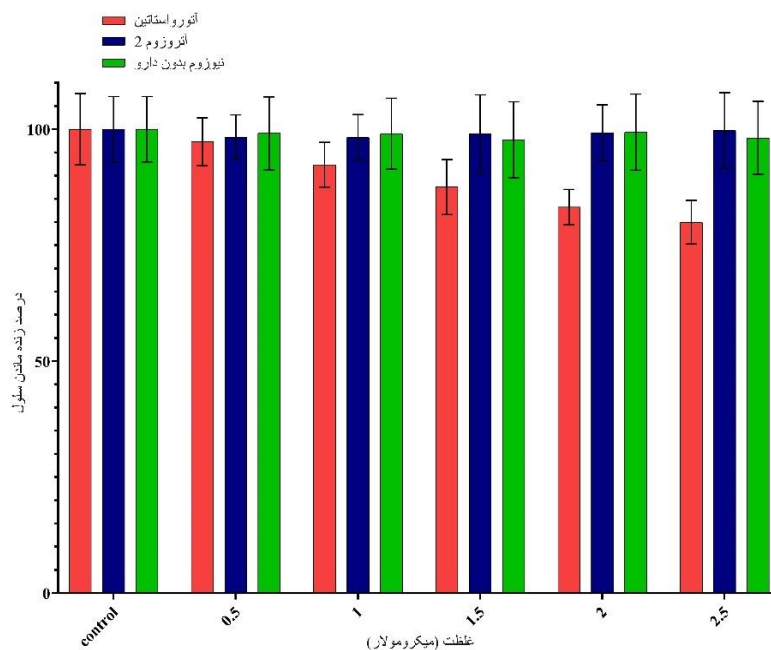
فرمولاسیون	شرایط نگهداری	زمان	اندازه ذره ای (نانومتر)	شاخص پراکندگی	پتانسیل زتا (میلی ولت)	درصد داروی بارگیری شده
آتروزوم-۲	بدو تهیه	-	۱۹۶/۳۳۳ ± ۶/۴۵	۰/۴۶ ± ۰/۰۵	-۲۰/۷۳ ± ۰/۹۸	۸۶/۱۵ ± ۰/۵۸
	۸-۲°C	۳ ماه	۲۰۷/۴۹۰ ± ۹/۴۷	۰/۵۲ ± ۰/۰۴	-۱۹/۱۲ ± ۰/۴۲	۸۴/۴۲ ± ۲/۷۲
	۲۵°C		۲۳۶/۸۶ ± ۱۵/۷	۰/۶۷ ± ۰/۰۶	-۱۸/۰۵ ± ۰/۵۸	۷۹/۰۳ ± ۲/۵۲

جدول ۳. درصد ترکیبات موجود در اسانس اسطوخودوس بر اساس آنالیز GC-MS

ردیف	نام ترکیب	مقدار (درصد)	ردیف	نام ترکیب	مقدار (درصد)
۱	سابینن هیدرات	۰/۲۵	۱۸	کریپتون	۰/۹۰
۲	ترنس-لینالول اکسید	۰/۴۱	۱۹	آلفا-ترپینئول	۲/۹
۳	کامفور	۵/۲۴	۲۰	بورنیل فورمات	۰/۴۵
۴	آلفا-توجون	۰/۲۲	۲۱	۱-اوکتن-۳-آل	۰/۳۴
۵	هگزیل-۲-متیل بوتانوات	۰/۲۴	۲۲	۳-کارن	۰/۷۴
۶	کیومن آلدهید	۰/۲۳	۲۳	(Z) بتا-اوسیمین	۱/۲۲
۷	کاروون	۰/۴۳	۲۴	آلفا-پینین	۲/۷۲
۸	لینالول استات	۱/۹۳	۲۵	بورنئول	۹/۵۸
۹	لاوندولیل استات	۱/۰۷	۲۶	سیس-لینالول اکسید	۰/۲۸
۱۰	هگزیل تیگلات	۰/۱۴	۲۷	ژرانیل استات	۰/۳۸
۱۱	۱،۸-سینئول	۳۲/۷۰	۲۸	کاریوفیلین	۰/۴۶
۱۲	(E) بتا-اوسیمین	۰/۲۶	۲۹	بتا-فارنسن	۱/۳۲
۱۳	کامفن	۰/۷۲	۳۰	لاوندولیل ایزووالرات	۰/۴۹
۱۴	لینالول	۲۳/۵۷	۳۱	کاریوفیلین اکسید	۰/۶۴
۱۵	ان-هگزانول	۰/۱۸	۳۲	بتا-پینین	۳/۰۱
۱۶	آلفا-کادینول	۰/۳۷	۳۳	میرسین	۱/۰۹
۱۷	آلفا-بیزابولول	۱/۶۳	۳۴	تریپین-۴-آل	۲/۶۳



شکل ۲. تصاویر مورفولوژیک فرمولاسیون آتروزوم-۲؛ الف) عکس میکروسکوپی SEM؛ ب) عکس میکروسکوپی AFM؛ ج) عکس میکروسکوپی TEM



شکل ۳. درصد بقای سلولی رده فیبروبلاست انسانی نرمال در غلظت‌های مختلف از آتورواستاتین، فرمولاسیون آتروزوم-۲ و نانوذرات نیوزومی بدون دارو

ثابت دارد [۲۶].

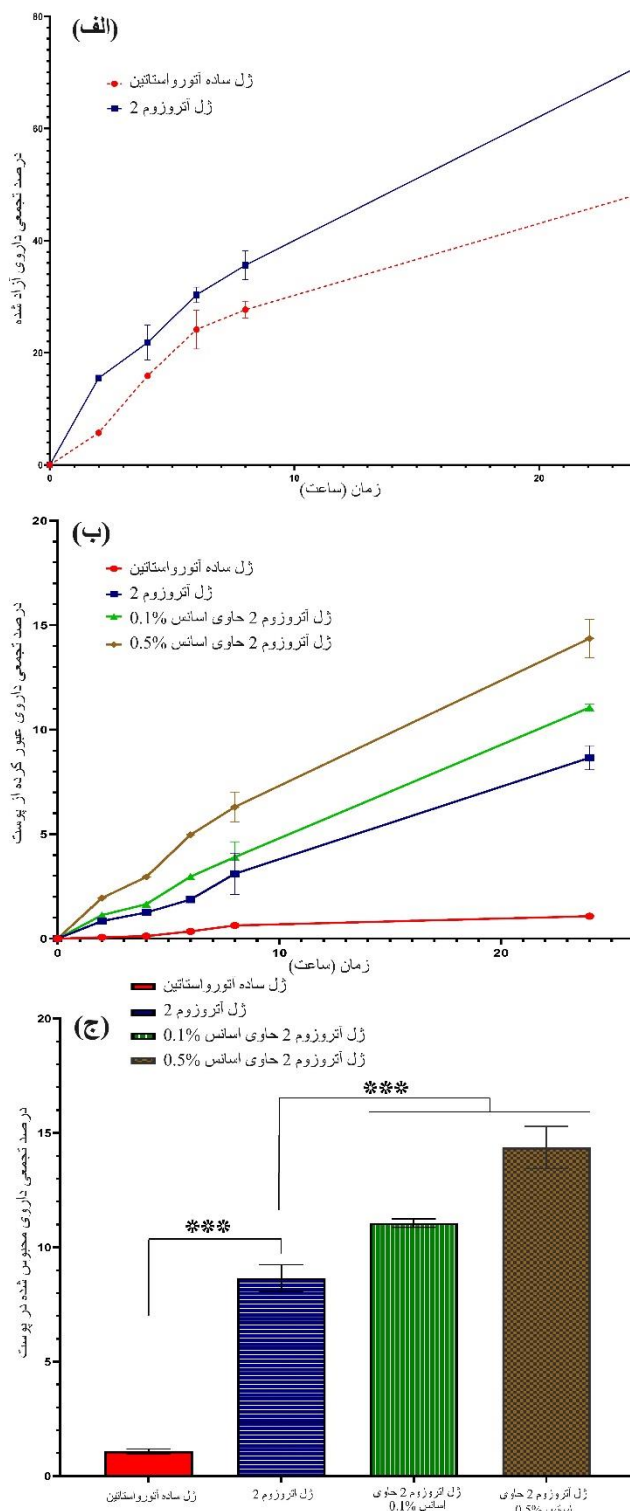
بررسی درصد و کینتیک آزادسازی دارو از ژل نانوذرات
آتورواستاتین در شرایط in-vitro
در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی برای افزایش اثربخشی فرمولاسیون‌ها

خصوصیات رئولوژیک نانوذرات آتورواستاتین

ویسکوزیته ژل نانوذرات نیوزومی داروی آتورواستاتین که برای
دارورسانی موضعی تهیه شده است، ارزیابی شد. نتایج به‌دست‌آمده
نشان داد ژل آتروزوم-۲ الگوی جریان غیرنیوتنی را بدون ویسکوزیته

و توسعه و اصلاح پروفایل آزادسازی دارو در سیستم‌های کنترل تحویل دارو انجام شده است [۲۷]. اطلاعات به‌دست‌آمده از آزادسازی دارو نشان داد که مدل کینتیکی درجه یک ($RSQ = 0.9969$) بهترین تناسب را برای فرمول نانوذرات نیوزومی آتورواستاتین در مقایسه با سایر

مدل‌های کینتیکی دارد. اطلاعات به‌دست‌آمده از شکل (۴. الف) نشان داد که ژل‌های تهیه‌شده از فرمولاسیون‌های بهینه نانوذرات نیوزومی آتروزوم-۲، قادر به افزایش معناداری در آزادسازی دارو از غشای دیالیز در مقایسه با ژل ساده آتورواستاتین هستند ($P < 0.001$).



شکل ۴. الف) درصد تجمعی داروی آزادشده طی ۲۴ ساعت از ژل فرمولاسیون آتروزوم-۲ و ژل ساده آتورواستاتین؛ (ب) درصد تجمعی داروی عبور کرده از پوست طی ۲۴ ساعت از نمونه‌های ژل ساده آتورواستاتین، ژل فرمولاسیون آتروزوم-۲، ژل حاوی ۰.۱٪ و ۰.۵٪ اسانس اسطوخودوس نانوذرات نیوزومی آتورواستاتین؛ (ج) درصد داروی محبوس در پوست طی ۲۴ ساعت از نمونه‌های ژل ساده آتورواستاتین، ژل فرمولاسیون آتروزوم-۲، ژل حاوی ۰.۱٪ و ۰.۵٪ اسانس اسطوخودوس نانوذرات نیوزومی آتورواستاتین

نتایج، با افزایش نسبت کلسترول به سورفکتانت از ۱۰:۱ به ۲:۱ اندازه نانوذرات به طور موثری افزایش یافت ($P < 0.001$)، به طوری که در فرمولاسیون آتروزوم-۱ با نسبت کلسترول به سورفکتانت ۱۰:۱ میانگین اندازه ذرات $13/564 \pm 144/733$ نانومتر بود و در فرمولاسیون آتروزوم-۵ با نسبت کلسترول به سورفکتانت از ۲:۱ به میانگین اندازه $22/414 \pm 351/867$ نانومتر رسید. مشاهدات بصری نشان داد که با افزایش کلسترول، ظاهر وزیکول‌های آتروزوم مات می‌شود. به عبارت دیگر، پس از افزودن کلسترول، کدورت پراکندگی‌ها افزایش یافته و آنها کدر و شیری‌رنگ به نظر می‌رسند. در مطالعه‌ای که تاجبخش و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی نانوذرات نیوزومی تستوسترون انانات انجام دادند، مشخص شد با افزایش نسبت کلسترول به سورفکتانت از ۵:۱ به ۱:۱ اندازه ذره‌ای نانوذرات افزایش می‌یابد [۱۰].

شاخص پراکندگی می‌تواند در محدوده ۰ تا ۱ باشد. در این باره، با افزایش نسبت کلسترول به سورفکتانت از ۱۰:۱ به ۲:۱، شاخص پراکندگی نانوذرات به طور معناداری افزایش یافت. به طوری که، این شاخص در آتروزوم-۱ و آتروزوم-۵ به ترتیب، 0.447 ± 0.32 و 0.981 ± 0.32 گزارش شد. در مطالعه‌ای که تیموری و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی نانوذرات نیوزومی کارودیلول انجام دادند، مشخص شد با افزایش نسبت کلسترول شاخص پراکندگی افزایش می‌یابد [۲۸].

نتایج حاصل نشان داد که قدر مطلق پتانسیل زتای نانوذرات با افزایش نسبت کلسترول به سورفکتانت تغییر معناداری نیافت ($P = 0.6$)، به طوری که از $1/153 \pm 20/5$ میلی‌ولت در آتروزوم-۱ به $19/1 \pm 0/458$ میلی‌ولت در آتروزوم-۵ رسید. این بار منفی در اطراف ذرات ممکن است به دلیل وجود الکترولیت باقی‌مانده در نتیجه کاتالیزور اتوکسیلاسیون سورفکتانت‌های غیر یونی یا به دلیل ماهیت دوقطبی گروه‌های اتوکسی‌توئین و اسپان باشد [۲۹]. به طور کلی، مقدار پتانسیل زتا نشان‌دهنده بار سطحی ذرات (وجود لیپیدها و سورفکتانت‌ها) و لایه استرن (وجود داروی آزاد در محیط آبی) است. مطابق با نتایج به دست آمده، در مطالعه‌ای که رادمرد و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی نانوذرات نیوزومی آربوتین انجام داده‌اند، مشخص شد با تغییر میزان کلسترول تفاوت معناداری در پتانسیل زتای نانوذرات حادث نمی‌شود [۵].

نتایج حاصل از بارگیری دارو در نانوذرات نشان داد که با افزایش نسبت کلسترول به سورفکتانت درصد بارگیری افزایش می‌یابد ($P < 0.001$)، به طوری که از $1/653 \pm 80/963$ درصد در آتروزوم-۱ به $0/135 \pm 87/182$ درصد در آتروزوم-۵ رسید. در مطالعه‌ای که مختار و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی نانوذرات نیوزومی داروی فلوربپروفن انجام داده‌اند، مشخص شد با افزایش میزان کلسترول درصد بارگیری نیوزوم‌ها افزایش می‌یابد [۳۰].

در این مطالعه، نانوذرات ایده‌آل باید دارای توزیع باریک‌تر، اندازه ذرات کمتر، درصد داروی بارگیری‌شده بالاتر و قدرمطلق پتانسیل زتای بزرگ‌تر باشند. با وجود این، تهیه نانوذره‌ای که تمام نیازهای ذکر شده را برآورده کند، بسیار

بررسی درصد داروی عبور کرده از پوست با ژل حاوی ۰/۱٪ و ۰/۵٪ اسانس اسطوخودوس نانوذرات نیوزومی و ژل نانوذرات نیوزومی داروی آترواستاتین

برای ارزیابی مقدار آترواستاتین عبوری از پوست با نانوذرات لیپیدی جامد حاوی آترواستاتین، مطالعات آزمایشگاهی به کمک سل فرانس و پوست موش صورت گرفت و شرایط سینک رعایت شد. با توجه به نتایج نشان داده شده در شکل (۴. ب)، مشخص شد درصد تجمع‌ی آترواستاتین عبور کرده از پوست از ژل فرمولاسیون آتروزوم-۲ در مقایسه با ژل ساده آترواستاتین پس از ۲۴ ساعت، به طور چشمگیری افزایش یافت ($P < 0.001$) و به ترتیب $8/65 \pm 0/1$ و $1/07 \pm 0/1$ درصد گزارش شد. افزایش جذب پوستی و میزان نفوذ دارو از خلال پوست با نانوذرات نیوزومی آترواستاتین حاوی اسانس اسطوخودوس، امکان‌پذیر است؛ بنابراین، این میزان برای ژل فرمولاسیون‌های بهینه نانوذرات نیوزومی آترواستاتین حاوی ۰/۱٪ و ۰/۵٪ اسانس اسطوخودوس طی ۲۴ ساعت، به ترتیب $11/05 \pm 0/3$ و $14/36$ درصد گزارش شد. پس از انجام آزمایش توکی، مشخص شد که درصد داروی عبور کرده از پوست از ژل نانوذرات آترواستاتین حاوی ۰/۵٪ اسانس اسطوخودوس و ژل نانوذرات آترواستاتین حاوی ۰/۱٪ اسانس اسطوخودوس در مقایسه با ژل آتروزوم-۲ افزایش معناداری داشته است ($P < 0.001$).

بررسی درصد داروی تجمع یافته در پوست با ژل حاوی ۰/۱٪ و ۰/۵٪ اسانس اسطوخودوس نانوذرات نیوزومی و ژل نانوذرات نیوزومی داروی آترواستاتین

برای ارزیابی درصد آترواستاتین تجمع یافته در پوست با نانوذرات نیوزومی دارو، مطالعات آزمایشگاهی صورت گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده از شکل (۴. ج) مشخص شد پس از گذشت ۲۴ ساعت، ژل تهیه شده از فرمولاسیون آتروزوم-۲ در مقایسه با ژل ساده آترواستاتین درصد داروی تجمع یافته پوستی بیشتری را دارد ($P < 0.001$) و این میزان به ترتیب $12/28 \pm 8/67$ و $0/09 \pm 0/88$ درصد گزارش شده است. همچنین، پس از گذشت ۲۴ ساعت، درصد داروی تجمع یافته در نمونه پوستی ژل حاوی ۰/۱٪ و ۰/۵٪ اسانس اسطوخودوس نانوذرات نیوزومی داروی آترواستاتین به ترتیب $19/72 \pm 1/54$ و $13/61$ درصد گزارش شد که نسبت به ژل آتروزوم-۲ افزایش معناداری داشته است ($P < 0.001$).

بحث

نانوذرات نیوزومی حاوی داروی آترواستاتین با موفقیت با استفاده از تکنیک سونیکاسیون تهیه شدند. نسبت‌های مختلف کلسترول به سورفکتانت غیر یونی (مخلوطی دوتایی از اسپان ۸۰ و توئین ۸۰) برای بهینه‌سازی فرمول‌های نانوذرات آترواستاتین استفاده شد. جدول (۱) ترکیبات نانوذرات نیوزومی و ویژگی‌های آنها را نشان می‌دهد. بر اساس

دشوار است؛ بنابراین، آتروزم-۲ برای مطالعات بیشتر انتخاب شد، زیرا نشان‌دهنده درصد مناسبی از به دام افتادن دارو ($0.587 \pm 0.156/86$ درصد)، پتانسیل زتای بالا ($0.911 \pm 0.733/20$ میلی‌ولت)، شاخص پراکندگی (0.457 ± 0.05) و اندازه ذرات نسبتاً کوچک ($196/333 \pm 6/45$ نانومتر) است.

در بررسی اسکن گرماسنجی افتراقی، ترموگرام‌های DSC نانوذرات نیوزومی آترواستاتین بدون پیک‌های آترواستاتین هستند و در $148/25$ درجه سانتی‌گراد پیک ناشی از ذوب کلسترول را نشان می‌دهند که نشان از بارگیری موثر دارو با حامل است. علاوه بر این، در بررسی اسپکترومتری FT-IR نانوذرات نیوزومی داروی آترواستاتین گروه‌های عاملی آترواستاتین در طیف FT-IR نانوذرات نیوزومی قابل مشاهده است. از جمله باند cm^{-1} ۱۴۳۵ (C-F کششی) که نشانگر بارگیری مناسب دارو در نانوذرات، انجام نشدن واکنش شیمیایی بین اجزای فرمولاسیون و تشکیل نشدن پیک جدید بوده است. ناپدید شدن پیک‌های آترواستاتین و پهن‌شدگی اندک الگوی XRD نانوذرات نیوزومی آترواستاتین نشان داد که دارو در حالت آمورف یا به‌صورت مولکولی در ماتریکس لیپیدی پراکنده شده است، که مطابق با نتایج حاصل از مطالعات DSC بود [۳۱].

تجزیه و تحلیل تصاویر مورفولوژیکی فرمولاسیون بهینه آتروزم، هیچ نشانی از تجمع ذرات در تصاویر میکروسکوپی ارائه نمی‌دهد. نانوذرات آتروزم تهیه‌شده دربارۀ اندازه ذره‌ای به‌خوبی توزیع شده و مورفولوژی آن به شکل کروی است. همان‌طور که مشخص است این نتایج قابل پیش‌بینی بوده است، چون در روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS)، شدت مبتنی بر قطر هیدرودینامیکی و میانگین اندازه نانوذرات است. درحالی‌که، در TEM در شرایط خلأ فوق‌العاده بالا بر روی نمونه‌های خشک عمل می‌کند [۳۲]. به عبارت دیگر، روش DLS شعاع هیدرودینامیکی نانوذرات شامل، اندازه ذرات و لایه‌های مرتبط با حلال احاطه‌کننده آن را ارزیابی می‌کند. علاوه بر این، چنین اندازه‌گیری‌های دینامیکی به‌شدت به رفتار پراکندگی یا تجمع ذرات در محلول‌ها بستگی دارد [۳۳].

امکان ذخیره‌سازی نانوذرات نیوزومی در مطالعه پایداری بررسی شد. وزیکول‌ها عامل مهمی در توسعه موفقیت‌آمیز تهیه نانوذرات دارویی است. پایداری نیوزوم‌ها تحت تاثیر مقدار داروی محبوس، غلظت آن، نوع سورفکتانت و مقدار کلسترول موجود قرار دارد؛ به همین دلیل، پایداری نانوذرات نیوزومی آترواستاتین در دو دمای یخچال و محیط بر اساس تغییرات اندازه ذره‌ای، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و درصد بارگیری دارو بعد از گذشت سه ماه بررسی شد و نتایج به این صورت بود که در دمای یخچال بعد از گذشت سه ماه، اندازه ذره‌ای افزایش یافت ولی مجدد در محدوده کمتر از 550 نانومتر قرار داشت. درباره شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و درصد داروی بارگیری‌شده نیز نانوحامل‌های نگهداری‌شده در دمای یخچال با نانوحامل‌ها در بدو تولید تفاوت معناداری نداشتند ($P > 0.05$).

در بررسی سمیت سلولی، کاهش معناداری در درصد بقای سلول برای آترواستاتین خالص ($79/9\%$) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد

($P < 0.05$). این در حالی است که، در غلظت‌های مساوی هیچ‌گونه کاهش معناداری در درصد بقای سلول‌ها برای آتروزم-۲ و نیوزوم بدون دارو در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشده ($P > 0.05$) و در غلظت $2/5$ میکرومولار پس از گذشت ۲۴ ساعت به‌ترتیب، درصد بقا $99/7$ و $98/1$ درصد گزارش شده است. یافته‌های ما نشان داد که آترواستاتین دارای اثرات سمیت سلولی بر روی رده سلولی طبیعی HFF است، درحالی‌که نانوذرات نیوزومی حاوی دارو هیچ اثر سمیت سلولی را نشان نمی‌دهند، که با نتایج Çelik و همکاران مطابقت دارد؛ آن‌ها در مطالعه خود اثرات سمیت غلظت‌های مختلف آترواستاتین را بر رده‌های سلولی نوروبلاستوما انسانی (SHSY-5Y) گزارش داده‌اند [۳۴] به گونه‌ای که، بار سطحی نانوذرات منجر به واکنش‌پذیری بیشتر با سلول‌ها و پروتئین می‌شود [۳۵]. از طرفی، با توجه به اینکه بین بار سطحی ذرات و اثرات سمیت رابطه مستقیم برقرار است، با بارگیری مناسب آترواستاتین در نانوذرات، چگالی بار نانوذرات کاهش می‌یابد و در نهایت قادر به جلوگیری از ایجاد سمیت بر روی سلول‌ها می‌شود [۳۶].

رئوگرام ژل آتروزم-۲ الگوهای جریان غیرنیوتنی را بدون ویسکوزیته ثابت نشان می‌دهد. الگوی پخش‌پذیری ژل نانوذرات با خاصیت قوام برشی با تیکسوتروپی متفاوت شناخته شد، زیرا ویسکوزیته ژل با افزایش سرعت برش کاهش یافت [۳۷]. ترکیب تیکسوتروپی و قوام برشی ویژگی‌های مفیدی برای فرمولاسیون‌های موضعی هستند، زیرا موجب راحتی مصرف‌کننده حین خروج از بسته‌بندی و استعمال در موضع می‌شوند. علاوه بر این، ویسکوزیته فیلم توزیع‌شده به‌سرعت افزایش یافته و در نتیجه از موضع پاک نمی‌شود [۳۸].

اطلاعات به‌دست‌آمده از آزادسازی دارو نشان داد که مدل کینتیکی درجه یک ($RSQ = 0.99697$) بهترین تناسب را برای فرمول نانوذرات نیوزومی آترواستاتین دارد. علاوه بر این، مدل‌های آزادسازی مربوط به پراکندگی نیوزومی همخوانی قابل قبولی با مدل‌های کورس-مایر-پاس ($RSQ = 0.996$) و $n = 0.6$ ، مدل انتشاری هیگوچی ($RSQ = 0.984$) و مدل کورس-مایر-پاس ($RSQ = 0.885$) دارد. در مدل کینتیکی کورس-مایر-پاس، n ضریب آزادسازی است که به مکانیسم رهاسازی دارو دلالت دارد. مقدار n پراکندگی نیوزومی بهینه در محدوده 0.43 تا 0.85 بود که نشان می‌دهد انتشار دارو براساس مکانیسم غیرفیکتی شامل فرسایش و انتشار است. به‌دلیل تطبیق داده‌ها با هر سه مدل، آزادسازی دارو از وزیکول‌ها بیشتر از طریق روش انتشار اتفاق می‌افتد [۳۹]. پس از ۲۴ ساعت، درصد تجمعی آزادسازی آترواستاتین در فرمولاسیون ژل آتروزم-۲ ($4/18 \pm 4/91$) درصد) به‌طور معناداری از ژل ساده آترواستاتین ($5/59 \pm 4/209$ درصد) بیشتر بود ($P < 0.01$).

افزایش جذب پوستی و میزان نفوذ دارو از خلال پوست با نانوذرات نیوزومی امکان‌پذیر است، در مطالعه‌ای که Tavano و همکاران بر دارورسانی کاپسایسین با نانوذرات نیوزومی، میکروامولسیون و محلول الکلی آن انجام داده‌اند، مشخص شد که میزان کاپسایسین بیشتری از نانوذرات نیوزومی

پوستی و بارگیری در پوست نسبت به فرم معمولی دارو می‌شود. با این حال، استفاده از پوست‌های شبیه‌سازی شده انسانی می‌توانست نتایج دقیق‌تری را نشان دهد که از نقاط ضعف این مطالعه است.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده نشان داد، نانوذرات نیوزومی یک حامل مناسب برای دارورسانی آتورواستاتین به موضع مطرح هستند. از سوی دیگر، نیوزوم‌ها می‌توانند دارو را برای مدت طولانی‌تری در محل اثر نگه دارند؛ بنابراین، یک اثر ضدالتهابی طولانی مدت با اثرات جانبی کم را می‌توان از نانوذرات نیوزومی آتورواستاتین انتظار داشت. نتایج نشان داد که آتورواستاتین می‌تواند یک فرمولاسیون کارآمد و امیدوارکننده برای محلی‌سازی آتورواستاتین در لایه‌های پوست به‌عنوان یک عامل ضدالتهابی برای درمان درماتیت سبورئیک پوست سر استفاده شوند. برای دستیابی به تحویل هدفمند بیان شده و تهیه یک فرمولاسیون پایدار با خاصیت دارورسانی پوستی مناسب (اندازه ذرات کوچکتر، PDI کوچکتر و درصد EE بالاتر)، بهینه‌سازی فرمولاسیون نیوزوم با تغییر نسبت کلسترول به مخلوط سورفکتانت‌ها ضروری است.

سپاسگزاری

این مطالعه بر پایه پایان‌نامه زهرا کاردان با شماره پژوهشی ۴۰۱۰۴۷۲ بوده و پروتکل مطالعه را کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان با کد اخلاقی (IR.HUMS.AEC.1401.007) تایید کرده است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ تضاد منافع را گزارش نمی‌کنند

نسبت به میکروامولسیون و محلول شاهد الکلی از پوست عبور کرد؛ که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت [۴۰]. همچنین، افزودن اسانس به فرمولاسیون به‌عنوان جذب‌افزا سبب افزایش جذب پوستی و میزان نفوذ دارو از خلال پوست می‌شود [۱۱]؛ بنابراین، ژل فرمولاسیون‌های بهینه نانوذرات نیوزومی آتورواستاتین حاوی اسانس اسطوخودوس درصد داروی عبور کرده از پوست بالاتری را نشان دادند. فاکتورهایی نظیر افزایش سرعت انحلال نانوذرات، اندازه کوچک نانوذرات، مساحت سطحی بیشتر، اثر پوشاندگی و وجود افزایش‌دهنده‌های جذب پوستی، همان‌طور که در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است، در این مسئله موثر هستند [۴۱]. در مطالعه‌ای که محمدپناه و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر سلول‌های سرطانی سینه انجام داده‌اند، مشخص شد که افزودن اسانس اسطوخودوس به لیپوزوم‌ها می‌تواند باعث افزایش کارایی نانوحامل‌ها در دارورسانی شود، که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد [۴۲].

بررسی درصد داروی تجمع‌یافته در پوست با ژل نانوذرات نیوزومی داروی آتورواستاتین نشان‌دهنده تجمع بیشتر دارو در پوست برای نانوذرات حاوی آتورواستاتین در مقایسه با نمونه شاهد بود. در مطالعه‌ای که شهرآیینی و همکاران در سال ۲۰۲۰ روی نانوذرات لیپیدی جامد آتورواستاتین انجام داده‌اند، مشخص شد که تهیه نانوذرات باعث افزایش احتباس دارو درون پوست می‌شود [۶]. همچنین، نانوذرات آتورواستاتین حاوی ۰/۱٪ و ۰/۵٪ اسانس اسطوخودوس در مقایسه با نمونه‌های شاهد، تجمع بیشتر دارو در پوست را به‌دنبال داشت که می‌تواند به‌عنوان منبع ذخیره دارو عمل کند تا در زمان مناسب باعث آزادسازی آتورواستاتین شود [۴۱]. در مطالعات اخیر، به استفاده از نانوذرات توجه شده است و از جمله نقاط قوت این مطالعه، استفاده از نانوذرات نیوزومی آتورواستاتین است که باعث افزایش نفوذ

References

1. Akbari J, Saeedi M, Enayatifard R, Morteza-Semnani K, Hashemi SMH, Babaei A, et al. Curcumin Niosomes (curcusesomes) as an alternative to conventional vehicles: A potential for efficient dermal delivery. *Int J Drug Deliv Technol*. 2020;60:102035. [DOI: 10.1016/j.jddst.2020.102035]
2. Goyal R, Macri LK, Kaplan HM, Kohn J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2016;240:77-92. [DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.10.049]
3. Rani N, Rana R, Thakur R, Singla S, Goyal S. Formulation and evaluation of atorvastatin calcium niosomes. *International Journal of Science and Research Archive*. 2021;2(1):116-24. [Link]
4. Sharma Y, Kumar K, Padhy SK. Formulation and evaluation of Atorvastatin calcium Niosomes. *Int J Life Sci Scienti Res*. 2016;2(4):1-4. [DOI: 10.21276/ijlssr.2016.2.4.23]
5. Radmard A, Saeedi M, Morteza-Semnani K, Hashemi SMH, Nokhodchi A. An eco-friendly and green formulation in lipid nanotechnology for delivery of a hydrophilic agent to the skin in the treatment and management of hyperpigmentation complaints: Arbutin niosome (Arbusome). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021;201:111616. [DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.111616]
6. Shahraeini SS, Akbari J, Saeedi M, Morteza-Semnani K, Abootorabi S, Dehghanpoor M, et al. Atorvastatin Solid Lipid Nanoparticles as a Promising Approach for Dermal Delivery and an Anti-inflammatory Agent. *AAPS PharmSciTech*. 2020;21(7):1-10. [DOI: 10.1208/s12249-020-01807-9] [PMID: 3297869]
7. Kumar PP, Gayatri P, Sunil R, Jaganmohan S, Rao YM. Atorvastatin loaded solid lipid nanoparticles: formulation, optimization, and in vitro characterization. *IOSR J Pharm*. 2012;2(5):23-32. [Link]
8. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 60823, Atorvastatin. . 2021. from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atorvastatin>.
9. Sobhan M, Gholampoor G, Firozian F, Mohammadi Y, Mehrpooya M. Comparison of efficacy and safety of atorvastatin 5% lotion and betamethasone 0.1% lotion in the treatment of scalp seborrheic dermatitis. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2019;267-75. [Link]
10. Tajbakhsh M, Saeedi M, Morteza-Semnani K, Akbari J, Nokhodchi A. Innovation of testosome as a green formulation for the transdermal delivery of testosterone enanthate. *Int J Drug Deliv Technol*. 2020;57:101685. [DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101685]
11. Morteza-Semnani K, Saeedi M, Akbari J, Eghbali M, Babaei A, Hashemi SMH, et al. Development of a novel nanoemulgel formulation containing cumin essential oil as skin permeation enhancer. *Drug Deliv and Transl Res*. 2022;12(6):1455-65. [DOI: 10.1007/s13346-021-01025-1]
12. Farmoudeh A, Akbari J, Saeedi M, Ghasemi M, Asemi N, Nokhodchi A. Methylene blue-loaded niosome :Preparation, physicochemical characterization, and in vivo wound healing assessment. *Drug Deliv Transl Res*. 2020;10(5):1428-41. [DOI: 10.1007/s13346-020-00715-6] [PMID: 32100265]

13. Aghajani A, Kazemi T, Enayatifard R, Amiri FT, Narenji M. Investigating the skin penetration and wound healing properties of niosomal pentoxifylline cream. *Eur J Pharm Sci.* 2020;151:105434. [DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105434] [PMID: 32590122]
14. Gomes FP, Garcia PL, Porto Alves JM, Singh AK, Kedor-Hackmann ERM, Miritello Santoro MIR. Development and validation of stability-indicating HPLC methods for quantitative determination of pravastatin, fluvastatin, atorvastatin, and rosuvastatin in pharmaceuticals. *Anal Lett.* 2009;42(12):1784-804. [DOI: 10.1080/00032710903060669]
15. Delmas T, Couffin AC, Bayle PA, De Crecy F, Neumann E, Vinet F, et al. Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tuneable viscosity. *J Colloid Interface Sci.* 2011;360(2):471-81. [DOI: 10.1016/j.jcis.2011.04.080] [PMID: 21596385]
16. Alam MS, Ahad A, Abidin L, Aqil M, Mir SR, Mujeeb M. Embelin-loaded oral niosomes ameliorate streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:1514-20. [DOI: 10.1016/j.biopha.2017.11.073] [PMID: 29793314]
17. Wang M, Yuan Y, Gao Y, Ma HM, Xu HT, Zhang XN, et al. Preparation and characterization of 5-fluorouracil pH-sensitive niosome and its tumor-targeted evaluation: *in vitro* and *in vivo*. *Drug Dev Ind Pharm.* 2012;38(9):1134-41. [DOI: 10.3109/03639045.2011.641565]
18. Kumbhar D, Wavikar P, Vavia P. Niosomal gel of lornoxicam for topical delivery: *in vitro* assessment and pharmacodynamic activity. *AAPS pharmscitech.* 2013;14(3):1072-82. [DOI: 10.1208/s12249-013-9986-5] [PMID: 23818079]
19. Yang JM, Zha LS, Yu DG, Liu J. Coaxial electrospinning with acetic acid for preparing ferulic acid/zein composite fibers with improved drug release profiles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2013;102:737-43. [DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.09.039]
20. Kassem AA, Abd El-Alim SH, Asfour MH. Enhancement of 8-methoxypsoralen topical delivery via nanosized niosomal vesicles: Formulation development, *in vitro* and *in vivo* evaluation of skin deposition. *Int J Pharm.* 2017;517(1-2):256-68. [DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.12.018] [PMID: 27956194]
21. Guo D, Dou D, Li X, Zhang Q, Bhutto ZA, Wang L. Ivermectin-loaded solid lipid nanoparticles: preparation, characterisation, stability and transdermal behaviour. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(2):255-62. [DOI: 10.1080/21691401.2017.1307207] [PMID: 28368657]
22. Kalhapure RS, Mocktar C, Sikwal DR, Sonawane SJ, Kathiravan MK, Skelton A, et al. Ion pairing with linoleic acid simultaneously enhances encapsulation efficiency and antibacterial activity of vancomycin in solid lipid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2014;117:303-11. [DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.045]
23. Boskabadi M, Saeedi M, Akbari J, Morteza-Semnani K, Hashemi SMH, Babaei A. Topical gel of vitamin A solid lipid nanoparticles: A hopeful promise as a dermal delivery system. *Adv Pharm Bull.* 2021;11(4):663-74. [DOI: 10.34172/apb.2021.075] [PMID: 34888213]
24. Varshosaz J, Tabbakhian M, Salmani Z. Designing of a thermosensitive chitosan/poloxamer *in situ* gel for ocular delivery of ciprofloxacin. *Drug Deliv.* 2008;2(1). [DOI: 10.2174/1874126600802010061]
25. Auda SH, Fathalla D, Fetih G, El-Badry M, Shakeel F. Niosomes as transdermal drug delivery system for celecoxib: *in vitro* and *in vivo* studies. *Polym Bull.* 2016;73(5):1229-45. [DOI: 10.1007/s00289-015-1544-8]
26. Li GM, Zhao J, Li B, Zhang XF, Ma JX, Ma XL, et al. The anti-inflammatory effects of statins on patients with rheumatoid arthritis: a systemic review and meta-analysis of 15 randomized controlled trials. *Autoimmun Rev.* 2018;17(3):215-25. [DOI: 10.1016/j.autrev.2017.10.013] [PMID: 29353098]
27. Campos EVR, de Oliveira JL, da Silva CMG, Pascoli M, Pasquoto T, Lima R, et al. Polymeric and solid lipid nanoparticles for sustained release of carbendazim and tebuconazole in agricultural applications. *Sci Rep.* 2015;5(1): 13809. [DOI: 10.1038/srep13809] [PMID: 26346969]
28. Taymouri S, Varshosaz J. Effect of different types of surfactants on the physical properties and stability of carvedilol nanoniosomes. *Adv Biomed Res.* 2016;5:48. [DOI: 10.4103/2277-9175.178781] [PMID: 27110545]
29. Abismail B, Canselier JP, Wilhelm AM, Delmas H, Gourdon C. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrason Sonochem.* 1999;6(1-2):75-83. [DOI: 10.1016/S1350-4177(98)00027-3]
30. Mokhtar M, Sammour OA, Hammad MA, Megrab NA. Effect of some formulation parameters on flurbiprofen encapsulation and release rates of niosomes prepared from proniosomes. *Int J Pharm.* 2008;361(1-2):104-11. [DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.05.031] [PMID: 18577437]
31. Muchow M, Maincent P, Müller R, Keck C. Production and characterization of testosterone undecanoate-loaded NLC for oral bioavailability enhancement. *Drug Dev Ind Pharm.* 2011;37(1):8-14. [DOI: 10.3109/03639045.2010.489559]
32. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *Journal of controlled release.* 2016;235:337-51. [DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017]
33. Brydson R, Brown A, Hodges C, Abellan P, Hondow N. Microscopy of nanoparticulate dispersions. *J Microsc.* 2015;260(3):238-47. [DOI: 10.1111/jmi.12290]
34. Kumar S, Randhawa JK. High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. *Mater Sci Eng C.* 2013;33(4):1842-52. [DOI: 10.1016/j.msec.2013.01.037]
35. Çelik H, Karahan H, Kelicen-Uğur P. Effect of atorvastatin on Aβ1-42-induced alteration of SESN2, SIRT1, LC3II and TPP1 protein expressions in neuronal cell cultures. *J Pharm Pharmacol.* 2020;72(3):424-36. [DOI: 10.1111/jphp.13208]
36. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2012;7:5577. [DOI: 10.2147/IJN.S36111]
37. Khalil RM, Abd-Elbary A, Kassem MA, Ghorab MM, Basha M. Nanostructured lipid carriers (NLCs) versus solid lipid nanoparticles (SLNs) for topical delivery of meloxicam. *Pharm Dev Technol.* 2014;19(3):304-14. [DOI: 10.3109/10837450.2013.778872] [PMID: 23528038]
38. El-Housiny S, Shams Eldeen MA, El-Attar YA, Salem HA, Attia D, Bendas ER, et al. Fluconazole-loaded solid lipid nanoparticles topical gel for treatment of pityriasis versicolor: formulation and clinical study. *Drug Deliv.* 2018;25(1):78-90. [DOI: 10.1080/10717544.2017.1419584] [PMID: 29239242]
39. Alemi A, Zavar Reza J, Haghirsadat F, Zarei Jalani H, Haghi Karamallah M, Hosseini SA, et al. Paclitaxel and curcumin coadministration in novel cationic PEGylated niosomal formulations exhibit enhanced synergistic antitumor efficacy. *J Nanobiotechnology.* 2018;16:1-20. [DOI: 10.1186/s12951-018-0351-4] [PMID: 29571289]
40. Tavano L, Alfano P, Muzzalupo R, de Cindio B. Niosomes vs microemulsions: new carriers for topical delivery of capsaicin. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces.* 2011;87(2):333-39. [DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.05.041] [PMID: 21684725]
41. Chen H, Chang X, Du D, Liu W, Liu J, Weng T, et al. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *Journal of Controlled Release.* 2006;110(2): 296-306. [DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.09.052]
42. Mohammadpanah M, Mojodi E, Haghirsadat F, Ehsani R. The synthesis and characterization of liposomal nano-carriers loading lavandula angustifolia essential oil to affect breast cancerous cell-lines. *Yafte* 2020; 22(1):84-95. [Link]