Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics

كفاءة إستخدام جسيمات اللايبوسوم النانوية المحملة بمركب *Jasminin* أو بالمستخلص الكلوروفورمي لنبات الرازقي *Jasminum sambac* في تثبيط نمو الخطوط الخلوية السرطانية

عامر طالب توفيق[1]، بشرى محمد علوش[2]، محمد عبد الهادي غالي[2]، هديل مكي المؤمن[2]

1 الجامعة المستنصرية/ المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية/ قسم البايولوجي الجزيئي
2 جامعة بغداد/ كلية العلوم للبنات/ قسم علوم الحياة

الخلاصة:

درست كفاءة إستخدام جسيمات اللايبوسوم النانوية في إيصال مركب Jasminin المنقى أو المستخلص الكلوروفورمي لنبات الرازقي Jasminum sambac والحاوي على مركب Jasminin إلى خطوط الخلوية السرطانية HeLa و RD مقارنة بالخلايا الطبيعية REF وقدرتها على تثبيط نمو تلك الخطوط الخلوية. حضرت جسيمات اللايبوسوم النانوية nanoliposome بطريقة التجفيف وإعادة الترطيب لمزيج دهني مكون من الكوليسترول والدهن المفسفر دايميرستيل فوسفوتديل كولين (DMPC: Cholesterole) بنسبة (50:45) ملغم/مل ومن ثم حمل جزء منها بمركب Jasminin بتركيز 50 مايكروغرام/ مل من معلق الجسيمات النانوية المصنعة وجزء أخر بالمستخلص الكلوروفورمي لنبات الرازقي Jasminum sambac والحاوي على مقدار 1,11386 mg من مركب Jasminin لكل غرام من النبات الجاف , شخص حجم وشكل جسيمات اللايبوسوم النانوية المصنعة بطريقة التشتت الضوئي الديناميكي (DLS Dynamic Light Scattering) و المجهر اللالكتروني الماسح SEM على التوالي وقيس مقدار ونوع الشحنة الكهربائية المحيطة بجسيمات اللايبوسوم النانوية باستعمال فحص zeta polential .اظهرت النتائج إمكانية تصنيع الايبوسوم النانوي بالطريقة المقترحة مع إمكانية تحميله بكل من مركب Jasminin والمستخلص الكلوفورمي لنبات الرازقي الحاوي على Jasminin وإمتلكت الجسيمات المحضرة متوسط حجم مقداره 84,7 نانومتر وبشحنة كهربائية سطحية سالبة مقدارها 44,84 عند تعبأتها بالمستخلص الكلوفورمي في حين كانت بحجم 70,3 نانومتر وبشحنة كهربائية سطحية سالبه مقدارها 57,00 عند تعبأتها بمركب Jasminin وكانت جسيمات اللايبوسوم المصنعة كروية الشكل عند فحصها بالمجهر الالكتروني الماسح وقد بلغت كفاءة تحميل اللايبوسوم بالمستخلص الكلوروفورمي نسبة مقدارها 40% في حين كانت تلك النسبة بمقدار 50.84 % عند تعبأة مركب Jasminin. كانت نتائجة تثبيط نمو الخطوط الخلوية السرطانية بإستخدام اللايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي على خلايا الخط الخلويHeLa قد بلغت 84.31% و على خلايا الخط الخلوي RDبلغت 80,57% بعد مرور 48 ساعة من التعريض. وكانت نسبة التثبيط للايبوسوم المحمل بمركب Jasminin بمقدار 80.90 % على خلايا الخط الخلوي HeLa و 87,18% على خلايا الخط RD بعد مرور 72 ساعة من التعريض بالإستنتاج فإن المستخلص الكلوفورمي ومركب jasminin داخل الجسيمات اللايبوسوم النانوية قد زاد من قدرتهما على تثبيط نمو الخلايا السرطانية.

الكلمات المفتاحية: نبات الرازقي، اللايبوسوم , نانوتكنولوجي، RD، HeLa، SEM.

المقدمة:

ازدادت أهمية النباتات الطبية والعطرية بين شعوب العالم المختلفة وتنوعت استعمالاتها كوصفات علاجية فعالة لا تحمل مضاعفات [1]. فالنبات الطبي قادر على تصنيع أنواع كثيرة من المركبات الكيميائية التي يستعملها لتعزيز وظائفه الحيوية ودفاعاته ضد الحشرات أو الفطريات أو أكلات الأعشاب. وقد استطاع الإنسان توظيف هذه المركبات لغرض علاج العديد من الأمراض [2] ويعد نبات الرازقي (Jasminum sambac (Oleacea من النباتات ذات الاهمية الطبية والجمالية بالاضافة الى اهمية استعماله في مجالات العطور ومواد التجميل فقد استعمل في الطب الشعبي لعلاج الصداع والأرق والآلام المتسببة عن كسور العظام وآلام المفاصل المخلوعة [3] واستعملت أوراقه في علاج الحمى والسعال وخفض مستوى السكر في الدم وعلاج الكسور و الإلتواءات وفي علاج حصى المرارة والتهاب الجروح والاضطرابات المعوية والإسهال . وقد اشارت العديد من البحوث الى اهمية النبات وذلك لاحتوائه على مركبات الأيض الثانوي مثل القلويدات والكلايكوسيدات و الصابونيات والفينولات و التربينات و التانينات والزيوت الطيارة [4و5] كما يحتوي النبات على المركبات dotricontanol و oleanolic acid و quercitin و6] rutin] وقد أشار العديد من الباحثين إلى ححتواء النبات على α- terpineol و -secoiridoid glycoside- sambaco و side A-G و isoguercitin و Iridoid glycoside و jasminin، والتي كانت لها أثر طبي كمركبات مضادة للسرطان في سرطان الغدد اللمفاوية المستحث في فئران دالتون المختبرية Daltons mice و ضد الخطوط السرطانية الخلوية MCF-7 و Hep-2 و 8] Vero] و ضد الخط الخلوي HeLa ، وكمضاد للاكسدة و مضاد للفايروسات herpes simplex viruses (HSV-1 and HSV-2) و 4] (ADV-11)adenoviruses و5 و 7 و 9].

Corresponding Address:
Hadeel M. H. AL-Momen
Biology Department/ College of Science for Woman / University of Baghdad
Email: hadeelalmuamen@yahoo.com

يعد السرطان من اهم الامراض التي يحاول الباحثون باستمرار إيجاد علاج مناسب له اذ إن إستخدام العلاج الكيمياوي صاحبه حصول تأثيرات جانبية كبيرة مما حفز الباحثين على دراسة إمكانية إستخدام المنتجات الطبيعية التي تتميز بعدم إمتلاكها لأثار جانبية أو وجود أثار جانبية محدوة جدا إلا ان استعمال مركبات فعالة من المنتجات الطبيعية في علاج السرطان كان له تأثيرا واضحا عندما تكون الدراسة In vitro ولكن عند تطبيق هذه الدراسات على الكائنات الحية In vivo ومنها الانسان لم تظهر نتائج علاجية واضحة كما اظهرتها تجارب خارج الجسم الحي وقد يعود سبب ذلك إلى ضعف الجاهزية الحيوية bioavailability لتلك الملركبات وعدم المعرفة الدقيقة بأليات التاثيرلتلك المركبات [10] لذا تم اللجوء الى وسائل وتقنيات اخرى لتحقيق هدف العلاج ومنها تقنية النانو [11] . تعرف تقنية النانو nanotechnology بانها الألية التي تعمل على تطويع المادة على المستوى الذري والجزيئي وبقياس إبعاد تتراوح من 1نانومتر على ان لاتزيد عن100 نانومتر ويشمل كل الأدوات أوالمواد الممزوجة أو المكونات الأخرى ضمن ذلك المدى من القياس المتري . وقد سعى العديد من الباحثين إلى استعمال الجسيمات النانوية كحامل لأنواع مختلفة من العقارات بهدف زيادة فعاليتها وتقليل التأثيرات الجانبية وقد وحققوا نتائج ظهرمن خلالها تفوق التراكيب النانوية المحملة بالمركبات الفعالة على استعمال المركبات الفعالة لوحدها في تثبيط السرطان وخصوصا إستخدام الجسيمات الدهنية النانوية [12 nanoliposome] . فقد شار[13] الى تفوق فعالية جسيمات اللايبوسوم النانوية المحملة بمركبات Iri-doid glycoside picrosides (I, II, and III والمستخلص من رايزومات Picrorhiza kurroa كمضادات للسرطان اما [14] فقد حصلوا على مستوى عالياً لتثبيط الخلايا السرطانية عند تحميل اللايبوسوم بمركب Camptothecin االذي هو عبارة عن قلويد تم استخلاصه من شجرة Camptotheca acumi-nata . من هنا جاءت هذه الدراسة لتقارن بين فعالية مركب Jasminin الحر وذلك المحمل داخل جسيمات اللايبوسوم النانوية وفعالية المستخلص الكلوروفورمي من نبات الرازقي الحاوي على مركب Jasminin وذلك المحمل داخل جسيمات اللايبوسوم النانوية وملاحظة تاثيرها على الخط السرطاني HeLa و RD والخط الطبيعي REF.

المواد وطرق العمل:

تم جمع و استخلاص المركبات الفعالة من نبات الرازقي مع فصل وحساب كمية الـ Jasminin الموجودة فيه حسب طريقة AL-Momen وجماعته , 2015 [15]

تحضير اللايبوسوم وتحميل المركب القياس والمستخلص

اعتمدت طريقة المتبعة من قبل Li 2005 وجماعته في [16] مع إجراء للتحويرات الملائمة عند الحاجة لإتمام عملية التصنيع ، إذ استعمل 1,2-di-myristoyl phosphatidylcholine (DMPC) كمصدر للفوسفولبيد مع الكولسترول (Chol) ومركب Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrch, USA) والوسط الزرعي (USBiological, USA RPMI.) ومركب Jasminin أو المستخلص الكلوروفورمي الحاوي على مركب Jasminin لتحضير اللايبوسوم . جرى خلط كل من DMPC والكولسترول بتركيزمقداره 45 و 50 ملغم / مل على التوالي في 100 مل من الكلوروفورم العالي النقاوه بعد ذوبانهم تماما جرى إضافة المستخلص الكلوروفورمي أومركب Jasminin بتركيز 50 مايكروغرام/ مل وكل على حدة (في دورقين منفصلين conical flasks) إلى ذلك المزيج. وضع المزيج في جهاز lyophilyzer ap-paratus لمدة 27 ساعة بهدف التجفيف والتخلص من الكلوروفورم ومركب DMSO ليتم الحصول على طبقة من المواد الدهنية ومركب Jasminin أو للمستخلص الكلوروفورمي [17] . بعد عملية التجفيف أعيد ترطيب rehydra-tion الطبقة الدهنية الحاوية على العقار(lipid- drug film) بوسط مزيج مؤلف من RPMIو DMSO بنسبة 9 إلى 1 وبحجم مقداره 100 مل بعدها نقل المزيج الى دورق كروي (round bottom flask) وضع المزيج في حمام مائي في جهاز المبخر الدوار (rotary evaporator) وضبطت درجة الحرارة على 60 م° وجرى تحريك المزيج بالسرعة الملائمة بشكل دائري داخل الدورق لمدة 10 دقائق ليمتزج و يتجانس جيدا ، بعد ذلك مباشرة نقل مزيج الدهن الحاوي على العقار إلى حمام مائي بارد بدرجة 4-2°م وعرض للأمواج فوق الصوتية بواسطة جهاز مولد الأمواج فوق الصوتية ذوالمجس (probe sonicatre) لمدة 15 دقيقة وبفولتية للائمة، بعدها رشح المزيج بمرشح غشائي مصنوع من عديد الكاربونات poly-carbonate filters (Avanti polar lipids, Japan) يحتوي على ثقوب بقطر 0,1 مايكرومتر مع إستمرار وضع المزيج خلال عملية الترشيح (قبل وبعد) بدرجة لاتزيد عن 4 درجة مئوية لمنع إنكسار الطور المستحلب المتكون كما وأجريت عملية الترشيح داخل air flow laminar وبأنابيب وأدوات معقمة وبظروف عالية من التعقيم لمنع تلوث الوسط الزرعي الداخل في تركيب المستحلب.

توصيف اللايبوسوم Characterization of liposome

قياس حجم اللايبوسوم المصنع

قيس متوسط أقطار اللايبوسوم في مستحلب الوسط الزرعي المحضر بواسطة تقنية تشتت الضوء الديناميكي

(The dynamic light scattering technique (DLS مع محلل حجم الجسيمات تحت المايكرون الدقيقة submicron particle size analyzer (LS230, Beckman Coulter, USA) [18].

قياس شحنة سطح جسيمات اللايبوسوم النانوية Zeta –Potential

حددت نوع وكمية الشحنة الكهربائية المتكونة على سطح جسيمات اللايبوسوم النانوية باستعمال جهاز قياس جهد الشحنات Zeta -potential analyzer, (Zeta PALS Brookhaven) لكل نوع من أنواع اللايبوسوم النانوي المصنع [19] .

تحديد شكل جسيمات اللايبوسوم النانوية

جرى تحديد شكل جسيمات اللايبوسوم النانوية المحضرة و المحملة بمركب Jasminin والمستخلص الكلوروفورمي الحاوي على Jasminin بوساطة المجهر الالكتروني الماسح (SEM) Scanning Electron Microscope (Tscan VEGA, Czech Repoblic) [19].

ففاءة التحميل جسيمات اللايبوسوم النانوي بالعقار Encapsulation ef-ficiency

حددت كفاءة تحميل اللايبوسوم للعقار(المستخلص الكلوروفورمي، او مركب Jasminin) اعتمادا على طرح التركيز الأصلي المضاف من العقار عند تحضير اللايبوسوم من التركيز المتبقي غير المحمل باللايبوسوم في الوسط ، وحددت التراكيز باستخدام تقنية HPLC ، وحسبت تركيز العقار المحمل طبقا المعادلة الآتية:

$$EE\ (\%) = ((t-f)/t) \times 100$$

EEكفاءة التحميل ، t تركيز العقار الكلي المحمل، f العقار الحر في العينة [19].

سمية مركب Jasminin والمستخلص الكلوروفورمي الحاوي على Jasminin غير المحمل والمحمل داخل جسيمات اللايبوسوم النانوية على الخطوط الخلوي Cytotoxicity of liposome encapsulated drug

اختبرت سمية اللايبوسوم المحمل بالعقار على ثلاثة خطط خلوية وهي خط خلايا HeLa المشتق من سرطان عنق الرحم البشري (cervical cell carcinoma) وخط خلايا RD المشتق من سرطان العضلات الهيكلية لجدار البطن البشري (Rhabdomyosarcoma) وخط الخلايا الطبيعية المشتقة من جنين الجرذ (REF (Rat embryo fibroblast إذ تم الحصول عليها من وحدة البنك الخلوي لقسم العلاج التجريبي في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية ، وزرعت الخلايا كل على حدة في أطباق microtiteration plates 96-well ونميت باستعمال وسط RPMI بنسبة 10% مصل العجل البقري وتركت لكي تنمو بدرجة حرارة 37 م° و 5% CO2، وبعد وصول الخلايا النامية إلى طبقة أحادية مستمرة من الخلايا confluent monolayer افرغ الوسط الزرعي من الأطباق وعوملت الخلايا المنماة بالمواد تحت الدراسة وحسب التفاصيل التالية : في مرحلة أولى جرى التعريض لمركب Jasminin والمستخلص الكلوفورمي الحاوي على مركب Jasminin غير المعبئ داخل جسيمات اللايبوسوم النانوية وبتراكيز مقدارها 7و15و20و25و30و60و120 مايروغرام/ مل من المحلول ذلك بهدف تحديد التركيز النصفي للتثبيط او مايعرف IC50 (inhibition con-centration 50) لكل من مركب Jasminin ومستخلص الكلوفورمي الحاوي على Jasminin . كذلك التعريض للمواد المكونة لجسيمات اللايبوسوم النانوية وقد شملت كل المركبات الداخلة في تصنيع اللايبوسوم وهي DMPC و Chol و

DMSO وقد إستخدمت بنفس التراكيز المستعملة لتصنيع اللايبوسوم وعرضت الخلايا إليها بنفس أوقات تعريض الخلايا للليبوسوم المحمل بالعقار. بعد التعريض للليبوسوم النانوي غير المحمل بالعقار والذي جرى تصنيعه بنفس الطريقة الموصوفة سابقا ولكن دون إضافة مركب Jasminin أوالمستخلص الكلوفورمي الحاوي على 1,11386 ملغم من مركب Jasminin . في مرحلة ثانية جرى التعريض للليبوسوم النانوي المحمل بالعقار والذي جرى تصنيعه بنفس الطريقة الموصوفة سابقا مع إضافة مركب Jasminin أوالمستخلص الكلوفورمي الحاوي على 1,11386 ملغم من مركب Jasminin بتركيز مقداره 50مايكروغرام/مل لكل منهما. كانت فترة تعريض الخطوط الخلوية السرطانية لكل تلك المواد مقدارها 24 و 48 و 72 ساعة وبعد إنتهاء فترة التعريض جرى إفرغ حفر طبق 96 من الوسط الزرعي والمادة تحت الدراسة وإضيفت إلى الحفر محلول صبغة crystal violet بتركيز 5 ملغم / مل من الميثانول و الحاوية على 10% من محلول الفورملديهايد و حضنت الاطباق لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 37 م°، و بعدها غسلت الأطباق جيدا من الصبغة المضافة بواسطة ماء الحنفية وتركت لمدة نصف ساعة لتجف ثم وقيست امتصاصية بطول موجي مقداره 490nm وكما ذكر Mbarek وجماعته , 2007[20]. حسبت نسب التثبيط بإستخدام العلاقة التالية :

$$GI\% = Abs.Cont - Abs.Treat / Abs.Cont \times 100\%$$

GI=Growth Inhibition

Abs.Cont= Absorbance of control untreated cells

Abs.Treat= Absorbance of treated cells

النتائج والمناقشة:

توصيف اللايبوسوم

حجم جسيمات اللايبوسوم والفحص بالمجهر الالكتروني الماسح (SEM)

يوضح الجدولين 1 و 2 حجوم اللايبوسومات المصنعة والمحملة بالمستخلص الكلوروفورمي او مركب Jasminin ، اذ بلغ متوسط حجم اللايبوسومات النانوية المحملة بالمستخلص الكلوروفورمي 84.7 نانومتر فيما بلغ متوسط حجمها مقدار 70.3 نانومتر للليبوسومات النانوية المحملة بمركب Jasminin. إن الطريقة المستخدمة في تحضير اللايبوسوم النانوي تبدو فعالة في جعل تلك الجسيمات ضمن المدى النانوي المحدد من قبل االنظام الدولي للمقاييس International System of Units وكذلك طبقا للمبادرة الوطنية الأمريكية للنانوتكنولوجي National Nanotechnol-) http://www.nano.gov/you/standards) ogy intuitive . إن عملية خلط المزيج الدهني من الفوسفوليبيد والكوليسترول مع وسط مائي كالوسط الزرعي المخصص لتمنية الخطوط الخلوية السرطانية كان يهدف إلى الحصول على مستحلب متجانس من كليهما وأن المزج المستمر (للوسطين الدهني والمائي بإستخدام المبخر الدوار) بدرجة حرارة 60 درجة مئوية قد كان ناجحا في تكوين طبقات متداخلة من المزيج الدهني والمحلول المائي يطلق على هذه العملية إعادة ترطيب المزيج الدهني بواسطة الوسط المائي (وهو هنا عبارة عن الوسط الزرعي) بعد عملية تجفيفه من المذيبات العضوية المستخدمة في الخطوات السابقة. وتعد عملية تكوين الطبقات المتداخلة من الوسط الدهني والوسط المائي أساس عملية الحصول على جسيمات دهنية متكونة في غلافها من فوسفوليبيد ومحتوية في داخلها على وسط مائي . بعد ضمان عملية المزج تلك سيبدو المستحلب على شكل محلول مضبب يتم منه الحصول على جسيمات دهنية من خلال تعريضه إلى الموجات فوق الصوتية التي تقوم بدورها بتكسير الطبقات المستمرة من المسحلب الدهني المائي إلى جسيمات دهنية بمختلف الحجوم وإن زيادة وقت تعرض المستحلب للأمواج فوق الصوتية سوف يزيد من تكون الجسيمات اللايبوسوم إلى الحد الذي يتحول فيه كل المستحلب إلى جسيمات دهنية يساعد في ذلك بقاء درجة الحرارة بحدود 60 درجة مئوية مما يضمن مرونة الطبقات الدهنية الموجودة في المستحلب وإستجابتها للتكسر من خلال التعرض للأمواج فوق الصوتية . وبهدف جعل كل الجسيمات الدهنية المتكونة في المستحلب ضمن المدى النانوي المتري جرى إمراره من خلال ورق ترشيح مصنوع من مادة متعدد الكاربون polycarbonate والذي يمتلك فتحات مساوية لمقدار 100 نانومتر (0,1مايكرومتر) ونظرا لإستخدام الوسط الزرعي المعروف RPMI1640 كمصدر للطور المائي في المستحلب فقد جرى التأكيد على القيام بكل عملية تحضير اللايبوسوم بعد مرحلة التعريض للموجات فوق الصوتية في ظروف معقمة تماما وأعتبرت عملية إمرار محلول اللايبوسوم المحضر من خلال مرشح 0,1 ماكرومتر هي عملية تعقيم للوسط الزرعي وجسيمات اللايبوسوم المحضرة لان الهدف النهائي هي تعريض الخطوط الخلوية السرطانية لجسيمات اللايبوسوم النانوية الحاملة لمركب Jasminin والمستخلص الكلوفورمي . لقد لوحظ عند فحص عينات من مستحلب جسيمات اللايبوسوم المحضرة بالمجهر اللالكتروني الماسح (SEM) إن اللايبوسوم المحمل بمركب Jasminin والمستخلص الكلوفورمي كان كرويا (صورة 2 و 3) و ان الشكل الكروي للجسيمات المصنعة وحجمها (PSD partical size desterpution) يعود بشكل أساسي الى انواع المواد الداخلة في تحضير اللايبوسوم ونسبها وكانت هي السبب الرئيسي في اعطاء الثباتية للليبوسوم المحضر ، اذ أشار Zhai وجماعته , 2008 [23] إلى إن ثباتية اللايبوسومات بشكل عام تعود إلى خصائص المركبات الداخلة في تكوينه والذي يعطيها أو يوفرلها ثباتا وصلابته ويقلل من سيولتها fluidity ومن ثم يزيد من نسبة التحميلها بالمركبات المختلفة. وقد ادت إضافة الكولسترول إلى اللايبوسوم المحضر في هذه التجربة لى زيادة كمية التحميل وتقليل سيولة اللايبوسوم وبالتالي زيادة ثباته. وقد أشار Zaru وجماعته , 2007[24] إلى إن وجود النسبة الملائمة من الكولسترول يزيد من سمك الغشاء ووجوده ضمن النسبة الصحيحة يؤدي إلى إحاطة اللايبوسوم بالعقار surfactant enclosed packing وتقليل حجمه.

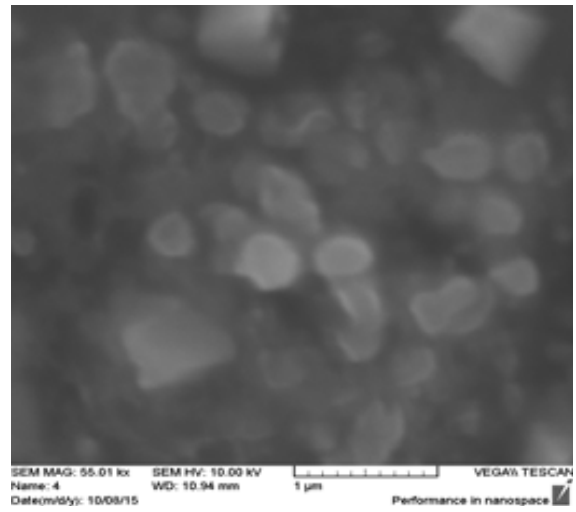
قياس الجهد الكهربائي Zeta potential

أظهرت النتائج إن اللايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي وذلك المحمل Jasminin يحملان شحنه سالبة وقدرها- 44.84 و- 57.00 على التوالي. وهذه النتائج تعني إن اللايبوسوم يكون مع الوسط الغذائي RPMI نظاما غرويا ثابتا غير قابل للإنهيار لجود شحنات كهربائية سالبة على سطح اللايبوسومات وبمقدار عالي نسبيا مما يجعلها متنافرة وغير قادرة على الإندماج مع بعضها البعض. أما السبب في وجود الشحنة الكهربائية السالبة على سطح اللايبوسوم يعود إلى الإحتكاكات الميكانيكية التي تعرض لها المستحلب أثناء عملية التحضير كالتعرض للأمواج فوق الصوتية والمرور بثقوب المرشح الكاربوني وكلما زادت كمية الشحنة الكهربائية السالبة التي تحملها سطح جسيمات اللايبوسوم في المستحلب كلما كان ثباته أكبر وعند إقترابه من مقدار- 15 سوف يبدأ بفقد الطور المستحلب تدريجيا وعندما يبلغ مقدار صفر سوف يترسب الطور الدهني في المستحلب كما قد يعود سبب تكون الشحنات السالبة إلى وجود مجاميع الدهون المفسفرة وهذا الرأي يتفق مع ما ذهب إليه Laouini وجماعته , 2012[21] إذ أشاروا إلى إن المجاميع الحامضية للدهون المفسفرة تعطي الجسيمة شحنه سطحية سالبة، ويصبح المحلول الغروي أكثر ثباتاً كلما كانت قيمة zeta potential عالية [22] ، بذلك تستعمل هذه القيمة لقياس ثباتية النظام الغروي، فكلما كانت قيمة الشحنات السالبة او الموجبة عالية فلن يكون هناك إمكانية للتجمع aggregation إذ تعمل الشحنة السالبة على تثبط تجمع اللايبوسوم .

الجدول (1) يوضح أحجام اللايبوسوم المحملة بالمستخلص الكلوروفورمي وتوزيعها

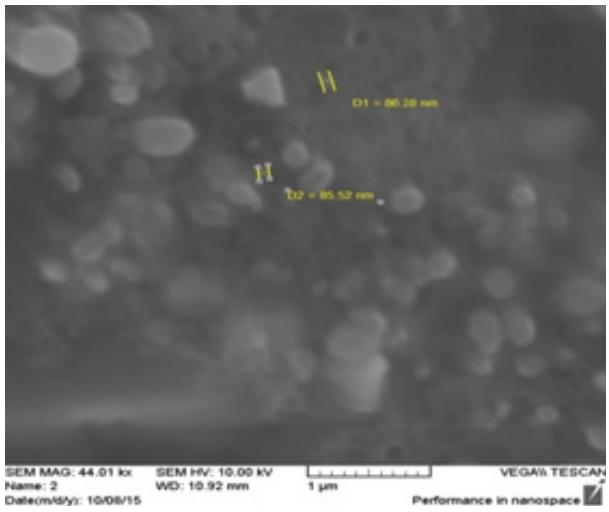
Sample ID	52-0
Date - Time	Oct 7, 2015 22:31:09
Operator ID	1
Elapsed Time	00:01:00
Median Diam.	84.5 nm
Mean Diam.	84.7 nm
Polydispersity	0.005
GSD	1.073

d(nm)	G(d)	C(d)	d(nm)	G(d)	C(d)	d(nm)	G(d)	C(d)
75.2	26	5	83.0	97	40	88.6	80	75
77.1	44	10	83.7	99	45	89.6	70	80
78.5	58	15	84.5	100	50	90.9	58	85
79.6	70	20	85.2	99	55	92.5	44	90
80.5	80	25	86.0	97	60	94.9	26	95
81.4	87	30	86.8	93	65			
82.2	93	35	87.6	87	70			



الصــورة (1) توضــح شــكل اللايبوســوم المحمــل بالمســتخلص الكلوروفورمي على مقياس 1 مايكروميتر

الصور (2) توضح شــكل اللايبوســوم المحمل بالـ Jasminin على مقياس 1 مايكروميتر



الجدول (2) يوضح أحجام اللايبوسوم المحمل Jasminin القياسي وتوزيعها

Sample ID	52- 1
Date - Time	Oct 7, 2015 22:31:09
Operator ID	1
Elapsed Time	00:01:00
Mean Diam.	70.3 nm
Rel. Var.	0.000
Skew	-0.099

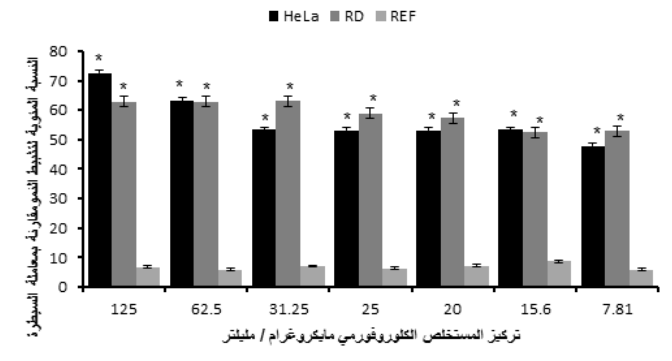
d(nm)	G(d)	C(d)	d(nm)	G(d)	C(d)	d(nm)	G(d)	C(d)
68.3	0	0	70.1	81	31	71.7	0	100
68.5	0	0	70.2	95	45	71.9	0	100
68.6	0	0	70.3	100	59	72.0	0	100
68.8	0	0	70.5	95	73	72.2	0	100
68.9	0	0	70.6	81	85	72.4	0	100
69.1	0	0	70.8	62	94	72.5	0	100
69.2	0	0	70.9	43	100	72.7	0	100
69.4	0	0	71.1	0	100	72.8	0	100
69.6	27	4	71.2	0	100	73.0	0	100
69.8	43	10	71.4	0	100	73.2	0	100
69.9	62	19	71.6	0	100	73.3	0	100

كفاءة تحميل اللايبوسوم بالمستخلص ومركب Jasminin

أظهـرت النتائـج إن اللايبوسـوم المحمـل بالمسـتخلص الكلوروفورمي احتوى علـى تركيز 20 مايكروغـرام /مل من المسـتخلص الكلوروفورمي، بينما احتوى للايبوسـوم المحمـل بالـ Jasminin على 25.42 مايكروغـرام /مل من الـ Jas-minin ممـا يعنـي أن كفـاءة تحميل اللايبوسـوم قـد بلغت 40% عند إسـتخدام المستخلص الكلوروفورمي لكنها بلغت 50.84% عند إستخدام مركبJasminin . تختلف نسـبة كفاءة التحميل باختلاف نسـب مكونات اللايبوسوم (دهون مفسفرة: كولسـترول: عقار)، ونـوع ومواصفات العقار المتمثلـة بذوبانه في الدهون، أو بالماء، وهل إن الدهون المفسـفرة phospholipids المكونة للايبوسـوم تحتوي علـى سلسـلة حامضية أو قاعديـة [25]، اذ إن وجود السلسـلة القاعدية تؤدي إلى زيـادة كفاءة التحميل ، بينما يؤدي زيادة السلاسـل الحامضية إلى انخفاض كفائته. وهذا ما يفسر النتيجة التي تظهر انخفاض كفاءة التحميل التي تم التوصل إليها ، إذ إن DMPC يعتبر من أنواع الدهون المفسفرة ذات السلاسل الحامضية.

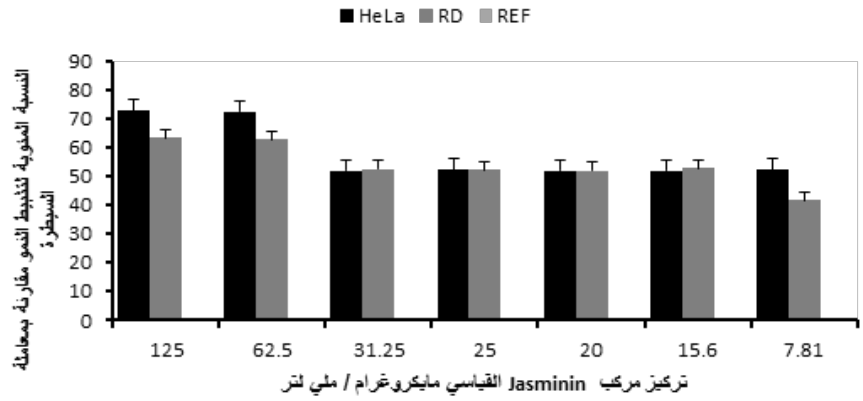
للتأثير التثبيطي للتراكيز المختلفة من المستخلص الكلوروفورمي ومركب Jas-minin على الخطوط الخلوية

يظهر الشـكل رقم (1) مستويات تأثير المسـتخلص الكلوفورمي لنبات الياسمين والحاوي على مقدار 1,11386 ملي غرام من مركب Jasminin يظهر بوضوح المقدرة العالية للمستخلص على تثبيط نمو الخطوط الخلوية السرطانية (P≤0.05) في حين كان تأثيره غير معنوي (P≤0.05) على الخط الطبيعي REF وبشكل عام كانت كل التراكيز المسـتعملة مؤثرة حتى إن أقل تركيز مسـتعمل من المستخلص الكلوفورمي كان قادر على تثبيط 47,92% و55,35% من قدرة خلايا HeLa و RD على التوالي .



الشكل رقم (1) مستويات تثبط النمو للمستخلص الكلوفورمـي لنبات الياســمين والحاوي على قمدار 1,11386 ملـي غرام من مركب Jas-minin للخطوط الخلوية السـرطانية HeLa و RD بالمقارنـة مع الخط الطبيعي REF بعد 72 ساعة من الحضن .

يظهر الشكل رقم (2) مستويات تثبيط نمو الخطوط الخلوية السرطانية والخط الطبيعي بواسطة مركب Jasminin ويظهر فيه المقدرة العالية للمركب على تثبيط نمو الخطوط الخلوية السرطانية HeLa و RD وبمعنوية ($P\leq0.05$)في حين كان تأثيره غير معنوي ($P\leq0.05$) على الخط الطبيعي REF ويظهر أن المركب Jasminin يمتلك نمط تأثير مشابه لنمط تأثير المستخلص الكلوفورمي إذ كانت كل التراكيز المستعملة مؤثرة . يستخلص من النتائج أعلاه إمكانية إستخدام المستخلص الكلوفورمي لنبات الرازقي في تطوير علاج ضد أنواع السرطانات تحت الدراسة .



الشكل رقم (2) مستويات تثبط النمو لمركب Jasminin على الخطوط الخلوية السرطانية HeLa و RD بالمقارنة مع الخط الطبيعي REF بعد 72 من الحضن .

تأثير الايبوسوم الحامل للمستخلص الكلوفورمي ومركب Jasminin على الخطوط الخلوية تحت الدراسة

يلاحظ من النتائج المذكورة في الجدول رقم (3) تأثير اللايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي، واللايبوسوم المحمل بالـ Jasminin و DMPC والكولسترول واللايبوسوم غير المحمل بعد 24 ساعة من تعريض خلايا الخطين السرطانيين HeLa و RD و الخط الطبيعي REF لها ، إن اللايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي أدى إلى أعلى نسبة تثبيط لخلايا HeLa بلغت 81.69 % ومن ثم تأثيره على خلايا RD وبنسبة تثبيط 77.36 %، لكنه لم يسجل وجود فروق معنوية بين تأثيرهما. وقد كانت هناك فروق معنوية في تأثيرها وبين خلايا الخط الخلوي الواحد وبين خلايا مجموعة السيطرة control أو خلايا الخط الخلوي REF، إذ سجلت اقل نسبة تثبيط في خلايا الخط الخلوي REF والتي بلغت4.23 % أما نتيجة اختبار اللايبوسوم المحمل بـ Jasminin على الخطوط الخلوية HeLa و RD و REF فقد اظهرت تأثيرا تثبيطيا وبفروق معنوية اذ لوحظ وجود فروقات معنوية في نسبة التثبيط بين خلايا الخط HeLa و RD، و كذلك بين خلايا الخطين السرطانين السابقين وخلايا الخط الخلوي الـ REF وخلايا مجموعة السيطرة . وقد سجلت أعلى نسبة تثبيط مقدارها 85.49 % في خلايا الخط الخلوي HeLa مقارنة مع نسبتها في خلايا الخط الخلوي RD بمقدار 70,67 % وبمقدار 4.23 % لخط خلايا REF الطبيعية ، بينما كان تأثير اللايبوسوم المحمل بـ Jasminin على خلايا الخط الخلوي الطبيعي REF محدوداً وبلغ 4.2 % . من الواضح جدا إرتفاع مستوى تثبيط كل من المستخلص الكلوفورمي ومركب Jasminin على تثبيط نمو الخطوط الخلوية تحت الدراسة عند تحميلها داخل اللايبوسوم بالمقارنه مع كلا العقارين عند إستخدامهما بشكل حر (مقارنة النتائج في الشكل رقم 1 مع الجدول رقم 3) إذ إرتفعت مستويات التثبيط بشكل ملحوظ رغم إن كمية كل من المستخلص الكلوفورمي ومركب Jasminin المعبئة داخل اللايبوسوم كانت بمقدار 20 مايكروغرام /مل من المستخلص الكلوروفورمي و 25.42 مايكروغرام /مل لمركب Jasminin والتي عند إستخدامها بشكل حر قد أنتجت نسب تثبيط تراوحت بين 52% إلى 58% في كل من الخطين الخلويين السرطانية مما يشير بشكل واضح إلى زيادة الجاهزية الحيوية لهذه المركبات عند تعبئتها داخل الجسيمات الدهنية (اللايبوسوم).

يوضح الجول رقم (3) كذلك ومن النتائج التي تم الحصول عليها إن مكونات تحضير اللايبوسوم كمركب الـ DMPC والكولسترول وكذلك اللايبوسوم غير المحمل لم يكن لها تأثيرا تثبيطيا علياً على خلايا جميع الخطوط الخلوية ، ورغم وجود فروقات معنوية فان التأثير التثبيطي للـ DMPC والكولسترول واللايبوسوم غير المحمل كان محدودا جدا إذ إمتلك اللايبوسوم غير المحمل أعلى نسبة تثبيط بلغت 7,959 % في خط خلايا HeLa وهي أعلى نسبة تثبيط نمو تم الوصول إليها مقارنة ببقية أنواع الخطوط الخلوية المستخدمة في التجربة . من ذه النتائج يتضح إن معاملة الخطوط السرطانية باللايبوسوم المحمل بالـ Jasminin أو المستخلص الكلوروفورمي أدى إلى أفضل النتائج في إحداث السمية في هذه الخلايا بعد مدة تعريض 24 ساعة. وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه Prakash وجماعته, 2014[26] والذين أشاروا إلى إن سمية للايبوسوم المحمل بمركب raloxifene HCl كانت عند اعلاها بعد 24 ساعة من التعريض مقارنة باستعمال العقار فقط ، كما تتفق النتيجة مع النتيجة التي حصل عليها Esfahani وجماعته , 2013 [27] بعد تغليف Pacliaxel باللايبوسوم واستعماله ضد خلايا سرطان الثدي MCF-7 اذ كانت نسبة التأثير السمي له أعلى من نسبته باستعمال العقار فقط.

يلاحظ من نتائج الجدول رقم (4) إن تعريض خلايا الخط الخلوي HeLa و RD و REF إلى اللايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي، واللايبوسوم المحمل بالـ Jasminin و DMPC والكولسترول، واللايبوسوم غير المحمل لمدة 48 ساعة قد أعطى نسب تثبيط متفاوتة . إذ كان التأثير التثبيطي للايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي على خلايا الخط الخلوي HeLa أعلى من تأثيره على خلايا الخطوط الأخرى، إذ بلغت نسبة تثبيطه 84,31% تبعها تأثيره في خلايا الخط الخلوي RD وبنسبة تثبيط بلغت 80,57% والنسبة الأخيرة لم تختلف معنويا عن نسبتها في خلايا الخط الخلوي HeLa ألا أنها اختلفت معنويا عن تلك التي لخلايا مجموعة السيطرة وعن خلايا REF والتي ظهرت فيها اقل نسبة تثبيط 2,73% أما استعمال اللايبوسوم المحمل بمركب Jasminin فقد أدى إلى أعلى نسبة تثبيط في خلايا الخط الخلوي RD بنسبة 72,18% تبعتها تأثيره في خلايا HeLa وبنسبة تثبيط وصلت الى 80,90% .وهذه النسب لم تختلف معنويا عن بعضها ولكنها اختلفت عن نسبتها في مجموعة خلايا السيطرة وخلايا الخط الخلوي REF والتي حدث فيها اقل تأثير تثبيطي بمقدار 4,65% .

الجدول (3) النسبة المئوية لتثبيط نمو الخلايا باستخدام اللايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي او بمركب Jasminin والمواد المكونة للايبوسوم واللايبوسوم غير المحمل بالعقاقير، على الخطوط الخلوية بعد 24 ساعة من التعريض

الخط الخلوي	المادة						قيمة LSD
	اللايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي	اللايبوسوم المحمل بالـ Jasminin	DMPC	الكولسترول	اللايبوسوم غير المحمل	السيطرة	
HeLa	81.69 ± 4.36	85.49 ± 3.81	2.50 ± 0.03	5,453 ± 0,13	7,959 ± 0,63	0,0	*9,33
RD	77.36 ± 3.09	70.67 ± 3.52	1.724 ± 0.02	5,479 ± 0,09	4,385 ± 0,12	0,0	*8,65
REF	4.23 ± 0.12	4.23 ± 0.12	4,477 ± 0,09	5,479 ± 0,11	3,075 ± 0,07	0.0	* 1,046
قيمة LSD value	* 8.912	* 9.025	*1,255	غ . م 0,894	* ١,٣٢٦	غ . م	---
* (P(≤0.05), غ . م : غير معنوي .							

الجدول (4) النسبة المئوية لتثبيط نمو الخلايا باستخدام اللايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي او بمركب Jasminin والمواد المكونة للايبوسوم واللايبوسوم غير المحمل بالعقاقير، على الخطوط الخلوية بعد 48 ساعة من التعريض .

الخط الخلوي	المادة						قيمةLSD
	اللايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي	اللايبوسوم المحمل بالـ Jasminin	DMPC	الكولسترول	اللايبوسوم غير المحمل	السيطرة	
HeLa	4,66±82,41	2,41±67,94	0,03±2,5	0,13±5,454	0,63±7,959	0,0	* 9,33
RD	3,05±76,15	3,69±75,79	0,02±1,724	0,04±5,479	0,12±4,385	0,0	* 8,65
REF	4,67 0,11±	0,06±2,48	0,09±4,477	0,11±5,405	0,07±3,075	0,0	* 1,046
قيمةLSD	* 9,714	* 7,847	* 1,155	0,894 غ. م	* 1,326	غ . م	---
* (P(≤0.05 . غ . م : غير معنوي							

يلاحظ من النتائج المذكورة في الجدول 4 إن الـ DMPC لم يكن له تأثيرا تثبيطيا يذكر لذلك لم تختلف نتائج التثبيط معنويا بين خلايا الخطوط الخلوية HeLa و RD و REF ، في حين اختلفت معنويا عن نتائج خلايا مجموعة السيطرة، إذ سجلت أعلى نسبة تثبيط في خلايا الخط الخلوي RD بلغت 4.76 تلتها خلايا الخط الخلوي HeLa وبلغت 4,41% وكانت اقل نسبة تثبيط في خلايا الـ REF التي بلغت 4.35%. كما يتضح من الجدول 4 إن مركب الـ DMPC والكولسترول واللايبوسوم غير المحمل كان لها تأثيرا تثبيطيا واطئاً جدا على جميع الخطوط الخلوية وان وجود الفروقات المعنوية و التأثير التثبيطي للـ DMPC والكولسترول واللايبوسوم غير المحمل كانت قليلة.

يبين الجدول رقم (5) نتائج تأثير اللايبوسم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي واللايبوسوموم المحمل بالـ Jasminin والـ DMPC والكولسترول، واللايبوسوم غير المحمل على الخطوط الخلوية بعد مدة 72 ساعة من التعريض. وفيه يظهر إن تأثير اللايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي كان ذو نسبة تثبيط أعلى في خلايا الخط السرطاني HeLa مقارنة مع من مثيلتها في خلايا الخط الخلوي RD، إذ بلغت 82.41% مقارنة بـ 76.15% ، وقد اختلفت معنويا عن تلك التي لخلايا مجموعة السيطرة والخط الطبيعي REF .

الجدول (5) النسبة المئوية لتثبيط الخلايا باستخدام اللايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي اوبمركب Jasminn القياسي والمواد المكونة للايبوسوم واللايبوسوم غير المحمل على خلايا الخطوط الخلوية بعد 72 ساعة من التعريض .

الخط الخلوي	المادة						قيمةLSD value
	اللايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي	اللايبوسوم المحمل بالـ Jasminin	DMPC	الكولسترول	اللايبوسوم غير المحمل	السيطرة	
HeLa	80,14 ± 4,66	67,94 ± 2,14	2,5 ± 0,06	5,454 ± 0,13	7,959 ± 0,63	0	* 9,33
RD	75,15 ± 3,05	75,69 ± 3,63	1,724 ± 0,02	5,479 ± 0,09	4,385 ± 0,12	0	* 8,56
REF	4.76 ± 0,11	2,84 ± 0,06	4,477 ± 0,09	5,405 ± 0,11	3,075 ± 0,07	0	* 1,086
قيمةLSD value	9,714*	* 7,847	* 1,255	0,894 غ . م	* 1,326	غ . م	---
* (P≤0.05)., غ .م : غير معنوي							

وقد كانت الفعالية السمية للايبوسوم المحمل بمركبJasminin في خلايا الخط السرطاني RD أعلى من مثيلتها في خلايا الخط الخلوي HeLa اذ بلغت بنسبة التثبيط 75.59% كما اختلفت نسبة التثبيط في خلايا الخط الخلوي RD و HeLa معنويا عن مثيلاتها في خلايا مجموعة السيطرة والـ REF . وتظهر النتائج المذكورة في الجدول رقم (5) إن مركب الـ DMPC والكولسترول واللايبوسوم غير المحمل كان لها تأثيرا تثبيطيا واطئاً جدا على جميع خلايا الخطوط الخلوية ورغم وجود فروقات معنوية في التأثير التثبيطي للـ DMPC والكولسترول واللايبوسوم غير المحمل كانت قليلة.

يظهر من النتائج التي تم التوصل إليها إلى إن تحميل كل من المستخلص الكلوروفورمي ومركب Jasminin في اللايبوسوم أدى إلى زيادة التأثير السمي على الخلايا بمقدار 1.6 ضعف تأثره قبل التحميل . و سبب هذه الزيادة قد يعود إلى إن اللايبوسوم يعمل على تسهيل عملية إدخال المركبات المحملة إلى داخل الخلايا ، إن ذلك قد يكون من خلال إمتلاك اللايبوسوم شحنه سالبة negative zeta potential إذ بلغت 44.84- للايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي و 57.00 - للايبوسوم المحمل بالـ Jasminin وحجم جسيمات بلغ 84.7 للايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي و 70.3 للايبوسوم المحمل بالـ Jasminin. وتلعب الشحنة السالبة وحجم الجسيمات دورا ايجابياً حاسما في الإدخال الخلوي للايبوسوم إلى داخل الخلية وبالتالي الأثر في زيادة تأثير المستخلص الكلوروفورمي والـ Jasminin المحمولين عليه . وقد أوضح Nie وجماعته , 2102 [28] إلى إن اللايبوسوم المشحون يشجع على الأخذ الخلوي ويسبب تثبيط الخلايا السرطانية، أما Deshpande وجماعته , 2013 [29] و Esfahani وجماعته 2014 [30] فقد أشارا إلى إن الأخذ الخلوي يزيد بزيادة صغر حجم الجسيمات. ومن الملاحظ أنSalem وجماعته , 2105 [25] قد أشارا إلى إن الحجم الأصغر للايبوسوم يعتبر مؤشرا مهما لتحسين الالتصاق أو الالتحام مع الخلية ومن ثم الأخذ الخلوي.

وقد تعود نسبة التثبيط التي لوحظت لمكونات اللايبوسوم والتي تشابه في تركيبها الكيميائي الغشاء الخلوي ثنائي الطبقة للخلايا وهذا ما أشار إليه Esfah-ani وجماعته , 2013 [27] عند تعريضهم خلايا الخط الخلوي لسرطان الثدي MCF-7 إلى اللايبوسوم المحمل بـ paclitaxel. ومن الأسباب الأخرى التي زادت من التأثير التثبيطي للايبوسوم المحمل بالعقار هي قابليته على حماية العقار من التحلل أو التكسر (Alavi وجماعته , 2104) [31] . كما أوضحت النتائج المذكورة في الجداول 3 و 4 و 5 حقيقة كون مكونات اللايبوسوم، واللايبوسوم غير المحمل ذات تأثير محدود على خلايا الخط الخلوي REF وخلايا الخط HeLa والخط RD السرطانية ، مما يعني احتمالية إن يكون اللايبوسوم المحمل بالمستخلص الكلوروفورمي او بمركب Jasminin واللايبوسوم غير المحمل والمواد المكونة له غير سامة للخلايا الطبيعية والسرطانية كون اللايبوسوم لا يسبب immunogenic ، ويعتبر سهل التحلل إحيائيا . وهذا ما توصل اليه Brufsky (2009) [32]، وأكده Alavi وجماعته , 2104 في دراسة لاحقة [31] إذ وجدوا ان اللايبوسوم غير المحمل لا يسبب تثبيطاً لخلايا خط سرطان الثدي MCF-7 كونه غير سام .

References:

1. Tapsell, L. C.; Hemphill, I.; Cobiac L.; Patch, C.S.; Sullivan, D. R.; Fenech, M.; Roodenrys, S.; Keogh, J. B.; Clifton, P. M.; Williams, P. G.; Fazio, V. A. and Inge, K. E. (2006). "Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future". Med. J. Aust 21(185) : 4-24.
2. Lai, P.K. and Roy, J.(2004).antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spicies.curr. Med. Chem..11(11)1451-1460.
3. Rahman, Md. A.; Hasan, Md. S.; Md. Anwar Hossain,M. A. and N. N. Biswas, N. N. (2011). Analgesic and Cytotoxic Activity of Jasminum sambac (L.) Aiton Pharmacologyonline 1: 124-13 .
4. Sabharwal, S.; Sudan, S.; and Vadi, R. (2013). Jasminum sambac Linn. (Motia): A Review. IJPRBS. 2(5):108-130 .
5. Krishnaveni, A. and Thaakur, S. R. (2014). Free Radical Scavenging Activity of Jasminum sambac . JGTPS. 5(2): 1658 – 1661
6. Jain, A.; Sharma, R.; Kumar, A. and Sharma, S. (2011). Jasminum Species: AN Overview. International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences 1(1): 251-266.
7. Dighe, V. and Mestry, D. (2012). Simulaneous Quantification OF Rutin and AND Isoquercitrin from Jasminum sambac Ait., BY High Performance Thin layer Chromatography . IJPSR. 3(7): 2086-2092.
8. Lim, T.K. (2014). Edible medicinal and non medicinal plant. Vol.8. flowers. sipringer science+ business media dordrech.

9. Chiang, L. C.; Cheng, H.Y.; Liu, M. C.; Chiang, W. and Lin, C.C.(2003). In vitro anti-herpes simplex viruses and anti- adenoviruses activity of twelve traditionally used medicinal plant in Taiwan. Boil Pharm Bull 26:1600- 1640.
10. Muqbil, I.; Masood, A.; Sarkar ,F. S.; Mohammad, R. M.; and Azmi, A. S.(2011). Progress in Nanotechnology Based Approaches to Enhance the Potential of Chemopreventive Agents Cancers, 3, 428-445.
11. Hu, C.M.; Aryal, S.and Zhang, L..(2010). Nanoparticle-assisted combination therapies for effective cancer treatment. Ther Deliv.1(2):323-34.
12. Chidambaram, M.; Manavalan, R. and Kathiresan, K. (2011). "Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations". J Pharm Pharm Sci14 (1): 67–77.
13. kumar, M. H. and Ramesh, C. (2014). Anticancer activity of nano encapsulated formulation from the extracts of Picrorhiza kurroa against human cancer cell lines. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2(5): 182-185.
14. Cuong, N.; Hsieh, M. F. and Huang, Ch.(2009). Recent Development in Nano-Sized Dosage Forms of Plant Alkaloid Camptothecin-Derived Drugs. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery. 4: 254-261.
15. AL-Momen , H.M. H.; Gali, M. A. H. and Alwash, B. M. J. (2015). Isolation of Jasmimin from Jasmine (Jasminum sambac). Iraqi Journal of Biotechnology. 14(2) : 113-121.
16. Li, L.; Braiteh, M. D. F. S. and Kurzrock, M. D. R. M. D.(2005). Liposome Encapsulated Curcumin In Vitro and In Vivo Effects on Proliferation, Apoptosis, Signaling, and Angiogenesis. Cancer. 104(6):1322-1331.
17. Jaromin, A.; Kozubeka, A.; Suchoszek-Lukaniukb, K.; Malicka-Blaszkiewiczb, M.; Peczynska-Czochc, W. and Kaczmarekd, L. (2008). Liposomal Formulation of DIMIQ, Potential Antitumor Indolo[2,3-b]Quinoline Agent and Its Cytotoxicity on Hepatoma Morris 5123 Cells. Drug Delivery . 15(1):49-56.
18. Wang, T.; Li, W.; Deng, Y. and Zou, J. (2007). Preparation of submicron unilamellar topotecan-entrapping liposomes by freeze-drying double emulsions. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2 (2): 68-76.
19. Chorachoo,J.; Amnuaikit, Th. and Voravuthikunchai, S. P. (2013). Liposomal Encapsulated Rhodomyrtone: A Novel Antiacne Drug. Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013: 1- 7 .
20. Mbarek, L. A.; Mouse, H. A.; Elabbadi, N.; Bensalah, M.; Gamouh, A.; Aboufatima, R.; Benharref, A.; Chait, A.; M. Kamal, M.; Dalal, A. and Zyad, A. (2007). Anti-tumor properties of blackseed (Nigella sativa L.) extracts. Anti-tumor effect of blackseed (Nigella sativa L) extracts. Brazilian Journal of Medical and Biological Research . 40: 839-847.
21. Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation(2012). Characterization and Application of Liposomes: State of the Art. Journal of Colloidal Science and Biotechnology. 1(2): 147-168
22. Kumar, A.; Badde, Sh.; Kamble, R. and Pokharkar, V. B..(2010). Development and characterization of liposome drug delivery system fornimesulide . Int J Pharm Pharm Sci.2(4):8789-8793.
23. Zhai, G.; Wu, J.; Z hao, X.; Yu, B.; Li, H.; Lu, Y.; Ye, W.; Lin, Y. C. and Lee, R. J. (2008). A Liposomal Delivery Vehicle for the Anticancer Agent Gossypol. Anticancer research 28: 2801-2806.
24. Zaru, M. ; Mourtas, S.; Klepetsanis, P.; Fadda, A. M. and Antimisiaris S. G. (2007). Liposomes for drug delivery to the lungs by nebulization. Eur J Pharm Biopharm 67: 655-666.
25. Salem, H. F.; Ahmed, S. M.; Hassaballah, A. E. and Omar, M. M. (2015). Targeting brain cells with glutathione-modulated nanoliposomes: in vitro and in vivo study. Drug Des Devel Ther. 9: 3705–3727.
26. Prakash, S. J. ; Santhiagu, A. and Jasemine, S. (2014). Preparation, Characterization and In Vitro Evaluation of Novel Gellan Gum-Raloxifene HCl Nanoparticles. J. Pharm. BioSci. 2: 63-7.
27. Esfahani, M. K. M.; Alavi, S. E.; Movahedi, F.; • Fatemeh Alavi, F. and Akbarzadeh, A. (2013). Cytotoxicity of Liposomal Paclitaxel in Breast Cancer Cell Line MCF-7. Ind J Clin Biochem . 28(4):358–360.
28. Nie, Y.; Ji, L.; Ding, H.; Xie, L.; Li, L.; He, B.; Wu, Y. and Gu, Z. (2012). Cholesterol Derivatives Based Charged Liposomes for Doxorubicin Delivery: Preparation, In Vitro and In Vivo Characterization. Theranostics. 2(11):1092-1103.
29. Deshpande, P. P.; Biswas, S. and Torchilin, V. P. (2013). Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. Nanomedicine (Lond).; 8(9):1-32.
30. Esfahani, M. K. M.; Alavi, S. E.; Akbarzadeh, A.; Ghassemi, S.; Saffari, Z.; Farahnak, M. and Chiani, M. (2014). Pegylation of Nanoliposomal Paclitaxel Enhances its Efficacy in Breast Cancer. Trop J Pharm Res. 13(8): 1195-1198.
31. Alavi , S. E.; Esfahani, M. K. M.; Ghassemi, S.; Akbarzadeh, A. and Hassanshahi, G. (2014). In Vitro Evaluation of the Efficacy of Liposomal and Pegylated Liposomal Hydroxyurea. Ind J Clin Biochem 29(1):84–88.
32. Brufsky, A. (2009). "Trastuzumab-Based therapy for patients with HER2-positive breast cancer". Am. J. Cline. Oncology. 33 (2): 186–95.

Efficiency of nanoliposomes loaded with chloroformic extract of *Jasminum sambac* or *Jasminin* on the growth inhibition of some cell lines, a preliminary study

Amer T. Tawfeeq[1], Bushra M. J. Alwash[2], Mohammed A. H. Gali[2], Hadeel M. H. AL-Momen[2]

1 Molecular biology/ Iraqi Center of Cancer and Medical Genetics Research/ University of Al-Mustansiriyah
2 Biology Department/ College of Science for Woman / University of Baghdad

Abstract:

The efficiency of nanoliposome to deliver Jasminum sambac chloroformic extract or the purified compound Jasminin to cervical cell carcinoma (HeLa) cell line, rhabdomyosarcoma cell line (RD) and rat embryo fibroblast normal cell line (REF) was studded. Cells growth inhibition by the compound loaded liposome in compare to same unloaded compounds was determined. Nanoliposomes were prepared by the dehydration-rehydration method using Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC):Cholesterol as (50:45) mg/ml ratio and loaded with 50 µg/ ml of chloroformic extract of Jasminum sambac (which contain 1.11386 mg/ g of dried plant) or Jasminin separately. The encapsulation efficiency of both chloroformic extract and Jasminin, liposome size, liposome surface charge and liposome shape was measured using HPLC, DSL and the scanning electron microscope (SEM) technique respectively. The results showed that nanoliposome was successful prepared by the suggested method and they were well loaded with the compounds. For nanoliposome which was loaded with the chloroformic extract the average size was 84.7 nm and zeta potential was -44.84. For nanoliposome which was loaded with Jasminin compound its average size was 70.3 nm and its surface charge was -57.00. The scanning electron microscope (SEM) shows the spherical shape of liposome. The liposome encapsulation efficiency for the chlroformic extract and jasminin were 40% and 50.84% respectively. Cancer cell line growth results indicated that both cloroformic extract and jasminin were capable of inhibit HeLa and RD cells up to 58% in concentration reange from 7.81 to 125 µg/ml after 72 hour of exposure time. However when using the nanoliposom encapsulated compound for both cloroformic extract and jasminin the cancer cells growth inhibition elevated to highest growth inhibition percentage, for HeLa cells it was 84.31% and for RD cells it was 80.57% after 48 hours of exposure time. These records didn't get higher significances after 72 hour of exposure time, inhibition percentages were 80.90% and 87.18% for HeLa and RD cells respectively. Results also indicated that there was no high inhibitory effect for DMPC, cholesterol and unloaded liposome on cell lines under investigation. In conclusion the encapsulation of the chloroformic extract and jasminin by the synthesized nanoliposome enhanced the capability of these compounds to inhibit cancer cells growth more efficiently.

Key words: *Jasminum sambac, liposome, SEM, HeLa, RD, REF.*