

بررسی تاثیر فرمولاسیون نانوارکئوزوم پگیله ۶- جینجرول بر رشد سلول های سرطان سینه رده MCF-7

لیلی احمدی^{۱*}، عظیم اکبرزاده^۲، محسن چيانی^۳، جعفر مسعود سینیکی^۴

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

۲- استاد، بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی، انیستیتوپاستور، تهران، ایران

۳- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی دارویی، بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی، انیستیتوپاستور، تهران، ایران

۴- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

چکیده

مقدمه: از فناوری نانو در طراحی فرمولاسیون جدید دارو ها استفاده می گردد. نانوحامل ها برای دارو ها یا مواد فعال بیولوژیک به منظور بهبود شاخص درمانی استفاده می شوند. کارایی شیمی درمانی با افزایش زمان در معرض دارو قرار گرفتن سلول ها نسبت مستقیم دارد لذا نانو حامل ها به دلیل اندازه کوچکشان به بافت مورد نظر نفوذ کرده و در نتیجه باعث تجمع کارآمد دارو در جایگاه هدف می گردند. ۶-جینجرول که اثر م هارکنندگی بر رشد سلول های سرطان دارد در این تحقیق به صورت فرمولاسیون نانو آرکئوزوم پگیله ۶-جینجرول تهیه و تاثیر آن بر روی سلول های سرطانی رده سلولی MCF-7 بررسی گردید.

مواد و روش ها: در ابتدا لیپید های هالوباکتر سالیناروم استخراج و ۶-جینجرول محلول در اتانول، پلی اتیلن گلیکول 2000 و توئین ۸۰ به آن افزوده و به کمک اوپوریتور ماده آلی استخراج و سپس رسوب حاصل را در محیط بافر فسفات حل نموده و سپس سونیکه گردید. قطر ذرات با دستگاه زتاسایزر اندازه گیری و در نهایت اثر سایتوتوکسیسیته فرمولاسیون به روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. **یافته ها:** قطر نانو آرکئوزوم پگیله ۶-جینجرول برابر ۲۹۰ نانومتر بود. هم چنین بازده انکپسولاسیون ۶-جینجرول در نانو آرکئوزوم پگیله معادل ۹۶/۳۳ درصد بدست آمد. سلول های سرطانی، تحت اثر این فرمولاسیون در دوز های مختلف تفاوت نشان دادند.

نتیجه گیری: ابعاد نانوذرات و مقدار انکپسولاسیون به منظور دارورسانی هدفمند مناسب بود، هم چنین نانو آرکئوزوم پگیله ۶-جینجرول اثر سایتوتوکسیسیته بر روی سلول های سرطان سینه رده سلولی MCF-7 داشت.

واژه های کلیدی: نانوحامل ها، آرکئوزوم، ۶-جینجرول، رده سلولی MCF-7

مقدمه

امروزه به صورت بالینی استفاده میشوند کارایی ایده آلی ندارند، علاوه بر این بیشتر دارو های شیمی درمانی دارای اثرات جانبی و خیمی هستند. این عوارض جانبی و مقاومت دارویی باعث شده است که شیمی درمانی اغلب با شکست مواجه شود (۴). امروزه برای کاهش عوارض و افزایش کارایی عوامل شیمی درمانی از تکنولوژی های جدید استقبال شده است. از جمله این روش های نوین استفاده از نانوتکنولوژی در حوزه پزشکی می باشد (۳).

طیف وسیعی از ذرات نانوساختار امروزه با هدف افزایش میزان سالم بودن، غیرسمی بودن و سازگار بودن با محیط زیست ساخته می شوند (۱۵). مزیت بزرگ استفاده از نانوحامل ها

شیمی درمانی یکی از روش های درمان سرطان است. مشکل بزرگ در درمان سرطان، عوارض جانبی دارو های شیمی درمانی، مقاومت سلول های سرطانی، مصرف دوز بالای دارو و هزینه های سنگین می باشد. کم کردن این اثرات جانبی و افزایش کارایی دارو ها، هدف مهمی در توسعه درمان سرطان می باشد (۴). دیگر مشکل اساسی در درمان تومور، کاهش حساسیت سلول های توموری نسبت به دارو ها یا به عبارت دیگر مقاومت دارویی است. در ضمن بسیاری از دارو های شیمی درمانی که

نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران
Email: leili.ahmadi5@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۱/۲۵

استخراج گردید بدین ترتیب که در مرحله اول ابتدا متانول و کلروفرم (نسبت ۲ به ۱) رابه رسوب افزوده و خوب ورتکس نموده در مرحله بعد کلروفرم به همان مقدار قبل اضافه کرده و مجددا ورتکس و سپس آب مقطر به آن افزوده، ورتکس کرده و به مدت ۶ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید و فازقرمز رنگ پایین را که حاوی لیپید می باشد استخراج نموده. برای داشتن لیپید خالص نسبت به شستشوی آن اقدام کرده که برای تهیه محلول شستشو می بایست مراحل بالا را تکرار کرده با این تفاوت که به جای رسوب از آب مقطر استفاده شد. پس از سانتریفیوژ، فاز رویی را به کمک سرنگ به لیپید استخراج شده از مرحله قبل اضافه کرده و پس از ورتکس و سانتریفیوژ، فاز پایین را استخراج و در آخر به کمک دستگاه روتاری اوپوریتور (با سرعت ۶۰ دور بر دقیقه و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد)، حلال های آلی جداگردید.

تهیه نانو آرکتوزوم

مقدار ۴/۳۷ میلی گرم/ میلی لیتر از لیپید را با ۴۰ میکروگرم/ میلی لیتر از ۶-جینجروم محلول در اتانول (سیگما) و ۲۰۰ میلی گرم پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ مخلوط نموده، یکی از کاربرد های پلی اتیلن گلیکول پوشاندن آرکتوزوم بوده و منجر به مخفی شدن آن ها از سیستم ایمنی و پایداری آن ها در سیستم گردش خون و رهایش آرام و پیوسته دارو می گردد که از این طریق امکان رسیدن داروی انکپسوله شده در آرکتوزوم به سلول های هدف افزایش می یابد، سپس ۲۴ میلی گرم توئین ۸۰ افزوده و به کمک اوپوریتور ماده آلی استخراج و سپس رسوب حاصل را در ۲۰ میلی لیتر بافر فسفات حل کرده و بر روی همزن مغناطیسی به مدت ۱ ساعت قرار داده، سپس به منظور تغییر در اندازه ذرات و تبدیل به مقیاس نانو، ویال حاوی محلول را در حمام دستگاه سونیکاتور با توان ۶۰ وات و ۳۰ کیلوهرتز به مدت ۱۰ دقیقه قرارداد، در این مرحله به نانو آرکتوزوم پگیله ۶-جینجروم دست یافته ایم. تمام مراحل فوق را بدون ۶-جینجروم تکرار نموده و بدین ترتیب نمونه شاهد نیز آماده گردید.

بررسی اندازه نانو آرکتوزوم حاوی ۶-جینجروم و نمونه شاهد

مقدار جذب نانو آرکتوزوم پگیله حاوی ۶-جینجروم را با دستگاه اسپکتروفتومتر^۵ اندازه گیری نموده و با دستگاه زتا سایزر اندازه

بر دارو های ساده، تحویل اختصاصی میزان زیادی از عوامل درمانی با استفاده از اهداف زیست تشخیصی(۵)، حفاظت از دارو ها از تجزیه زودرس و واکنش با محیط های بیولوژیکی، افزایش جذب دارو ها در بافت های انتخابی از طریق افزایش نفوذپذیری و اثر نگهداری، کنترل بر روی فارماکوکینتیک و پروفایل توزیع بافتی دارو و بهبود نفوذ داخل سلولی که شاخص درمانی محسوب می شود(۱۳). نتایج مطالعات نشان می دهد که مواد زیست فعال مثل عوامل ضد سرطان که در سیستم های حامل کپسوله شده اند کارایی بیشتر و سمیت کمتری از خود بروز میدهند. بیش از یک دهه است که نشان داده شده آرکتوزوم ها^۱ می توانند به عنوان یک نانو سیستم بی خطر برای آزادسازی دارو ها و واکنش ها به کار گرفته شوند. آرکتوزوم ها از لیپید های قطبی استخراج شده از میکروارگانیزم های آرکیا ساخته می شوند(۱۱). لذا از آرکتوزوم ها به عنوان وزیکول های تحویل دارو در این پژوهش استفاده گردید.

با توجه به خاصیت فارماکولوژیک و بیوشیمیایی گیا هان و ادویه جات، انگیزه ای را جهت تحقیق در خصوص دارو هایی برای درمان سرطان با منشاء گیاهی ایجاد کرده است. طی تحقیقات انجام شده جینجروم استخراج شده از گیاه زنجبیل اثرم هارکنندگی بر رشد تومور های بافت سینه(۹) تخمدان (۱،۱۴) پانکراس (۱۲) روده (۶،۲) و سایر بافت ها داشته است، این ماده از طریق آپوپتوزیس مانع از تکثیر سلول های سرطانی می گردد(۷،۸) به دلیل خاصیت ضد سرطانی جینجروم برای کاهش دوز مصرفی، عوارض جانبی، افزایش مدت زمان ماندگاری در جریان خون و نهایتاً بهبود شاخص درمانی، نانوآرکتوزوم پگیله ۶-جینجروم تهیه و تاثیر آن بر روی سلول های سرطان سینه رده سلولی-VMCF بررسی گردید.

مواد و روش ها

استخراج لیپید از هالو باکترسالییناروم

هالو باکترسالییناروم^۲ یک آرکیای فوق العاده هالوفیل و میله ای شکل است که از مرکز ذخایر ژنتیک ایران تهیه گردید. بر اساس پروتکل مربوطه، محیط کشت مایع با PH = ۷/۲ را آماده و اتوکلاو نموده سپس هالو باکترسالییناروم در آن کشت داده شد و در دستگاه شیکرانکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور rpm ۱۷۰ قرار گرفت. طی ۱۰ روز روند رشد بررسی گردید. پس از رشد هالو باکتر سالییناروم، محتویات درون ارلن ها را سانتریفیوژ نموده (سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه) فاز رویی خارج و با استفاده از متانول و کلروفرم، لیپید

Polyethylene glycol	۳
Tween	۴
Spectrophotometr	۵

Archaeosomes	۱
Halobacterium salinarum	۲

اثر سائیتوتوکسیسیته نانو آرکتوزوم پگیله ۶- جینجرول
 برای بررسی اثر سائیتوتوکسیسیته^۹ فرمولاسیون نانو آرکتوزوم پگیله ۶-جینجرول از آزمون^{۱۰} MTT استفاده شد.

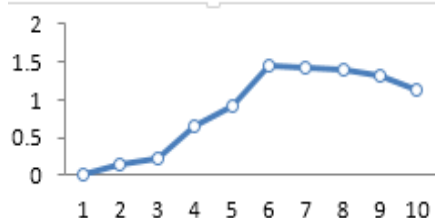
روز اول در اولین مرحله ، سلول ها را با کمک تریپسین از فلاسک جدا شد (مراحل مشابه پاساژ سلولی است) از این سوسپانسیون سلولی ۱۰ میکرولیتر برداشته و به آن ۱۰ میکرولیتر تریپان بلو اضافه گردید، سپس بر روی لام نتوبار قرار می دهیم و سلول ها را شمارش شد. شمارش سلولی که در روز اول انجام می گیرد بسیار مهم و حساس است چون باید به نحوی صورت گیرد که تعداد مساوی از سلول ها در همه خانه ها وارد شود. سپس سلول ها در پلیت ۹۶ خانه ای قرار داده شدند.

در روز دوم از ۶-جینجرول آزاد و نانوارکتوزوم پگیله ۶-جینجرول ، غلظت های مختلف (۰/۶۲۵، ۱/۱۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار) تهیه شد. سپس محیط کشت پلیت را تخلیه نموده و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های ساخته شده اضافه گردید.

۴۸ ساعت بعد ابتدا جهت تهیه محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم/ میلی لیتر، ۵۰mg از پودر MTT در ۱۰ میلی لیتر از بافر فسفات حل شد و هنگام استفاده در رنگ آمیزی ۱۰ برابر با بافر فسفات رقیق گردید تا محلول ۰/۵ میلی گرم/ میلی لیتر MTT به دست آید. در مرحله بعد به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده اضافه شد. پلیت را به مدت سه ساعت در انکوباتور قرار داده سپس محیط سلول ها را تخلیه می نماییم و برای حل نمودن فرمازان^{۱۱} تولید شده، به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول^{۱۲} اضافه نموده و پلیت را ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه می داریم تا فرمازان به خوبی حل گردد. در مرحله ی بعد جذب را به کمک دستگاه الیزاریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد.

نتایج

بیشترین مقدار رشد هالوباکتر سالیواروم طی ۱۰ روز بر اساس منحنی رشد لگاریتمی در روز ششم مشاهده گردید (نمودار ۱).



نمودار ۱- رشد هالوباکتر سالیواروم طی ۱۰ روز

Cytotoxicity	۹
۲-(YI-۲-Dimethylthiazol-۴,۵)	۱۰
Formazan	۱۱
Isopropanol	۱۲

ذره و پتانسیل آن مورد ارزیابی قرار گرفت. اندازه و پتانسیل نمونه شاهد نیز به همین ترتیب مشخص گردید.

محاسبه بازده انکپسولاسیون

برای محاسبه درصد بازده انکپسولاسیون^۶ در مرحله اول از ۶-جینجرول استاندارد غلظت های ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵ میکرو گرم تهیه شد و جذب آن در طول موج ۲۸۲ نانومتر اندازه گیری گردید سپس منحنی استاندارد رسم و معادله آن جهت آنالیز های بعدی مشخص شد.

در مرحله دوم از دو فرمولاسیون نانو آرکتوزوم پگیله ۶-جینجرول و نمونه شاهد به مقدار مساوی به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید سپس سوپرناتانت را جدا نموده و جذب آن در مقابل سوپرناتانت^۷ نمونه شاهد در طول موج ۲۸۲ خوانده شد سپس به کمک معادله منحنی استاندارد ، مقدار داروی آزاد را محاسبه نموده و در نهایت با استفاده از مقدار داروی اولیه و با کمک معادله زیر بازده انکپسولاسیون بدست آمد:

کشت و پاساژ سلولی

سلول های Y-MCF- از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت ویال تهیه شد و در محیط RPMI که حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گاوی بود کشت داده شد و داخل انکوباتوری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد که حاوی پنج درصد گاز CO₂ بود، قرار گرفت. پس از رشد سلول های سرطانی به منظور افزایش مقدار سلول های سرطانی نسبت به پاساژ سلولی اقدام گردید بدین ترتیب که در ابتدا محیط کشت روی فلاسک ها را تخلیه نموده، سپس دو تا سه میلی لیتر تریپسین^۸ ۰/۲۵ درصد به آن ها اضافه کرده و به مدت سه تا پنج دقیقه در این وضعیت نگهداری نموده تا سلول ها بطور کامل از کف فلاسک جدا شوند. بعد از گذشت مدت زمان مناسب و برای خنثی کردن اثر تریپسین محیط کشت سرم دار را به فلاسک اضافه نموده و به آرامی پیتاژ می کنیم. سوسپانسیون بدست آمده را به لوله فالکون منتقل کرده وبا سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ نموده و بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی را خارج کرده و پلیت سلولی را به همراه محیط کشت تازه به فلاسک جدید انتقال داده ، بر حسب تعداد سلول ها می توان حداقل دو و حداکثر چ هار فلاسک سلولی جدید بدست آورد.

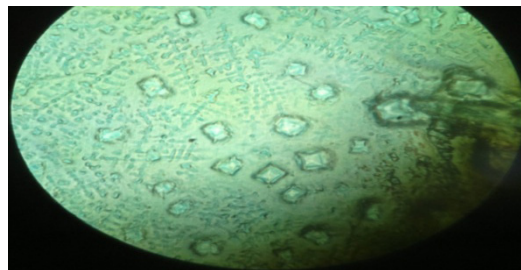
Encapsulation efficiency	۶
Supernatant	۷
Trypsin	۸

های منحصر به فرد لیپید های قطبی آرکیا، دارای مزایای قابل توجهی هستند که موجب خواص پایداری فیزیکی و شیمیایی بیشتری از قبیل پایداری حرارتی، پایداری در سرم، پایداری در pH های خیلی بالا و خیلی پائین، مقاومت به استرس های اکسیداتیو و مقاومت در مقابل عمل فسفولیپاز ها و نمک های صفراوی را به آرکتوزوم ها می دهد لذا این خصوصیات برای آزادسازی دارو و واکسن ها در زیست فناوری بسیار مفید می باشد، هم چنین مطالعات نشان می دهد که مصرف خوراکی آرکتوزوم ها مضر نبوده و بی ضرر بودن آن ها در طراحی واکسن با جزئیات در موش مورد بررسی قرار گرفته است و مشخص شده لیپید های آرکتوزومی از بدن دفع می شوند (۱۱). با توجه به اینکه در این مطالعه ابعاد نانو آرکتوزوم پگیله ۶-جینجرول معادل ۲۹۰ نانومتر و درصد انکپسولاسیون ۹۶/۳۳ درصد بود، این فرمولاسیون قابل استفاده در دارو رسانی هدفمند می باشد. به دلیل اینکه شیمی درمانی مؤثر نیازمند سطح مؤثر و بالایی از مولکول های دارو در داخل سلول های سرطانی است علاوه بر این کارایی شیمی درمانی با افزایش زمان در معرض دارو قرار گرفتن سلول ها نسبت مستقیم دارد (۱۰) استفاده از نانو دارو ها این امکان را جهت ر هایش آرام دارو و تجمع آن ها در کنار سلول های سرطانی فراهم نموده و به دلیل اینکه نانو آرکتوزوم پگیله ۶-جینجرول در این پژوهش اثر کشندگی بر سلول های سرطان سینه رده سلولی MCF-۷ داشته است می توان به منظور جلوگیری از انتشار دارو در کل بدن و ایجاد عوارض جانبی، از این فرمولاسیون در تحقیقات برای تهیه نانو دارو ها استفاده کرد. با توجه به خاصیت دارویی زنجبیل و ترکیبات خالص شده آن مانند ۶- جینجرول وهم چنین بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش در خصوص تاثیر سایتوتوکسیستی نانو آرکتوزوم پگیله ۶-جینجرول بر سلول های سرطانی، نیاز به تحقیقات تکمیلی بیشتری در محیط درون تنی به نظر می رسد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت انستیتو پاستور ایران و در بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی انستیتو پاستور انجام شده است که بدین وسیله از خانم ها دکتر دلارام احمدی، زهرا صفاری، مریم فرحناک و آقایان مهندس ابراهیم علوی ودکترحسن ابراهیمی که در این تحقیق همکاری صمیمانه مبذول داشته اند تشکر و قدردانی می گردد.

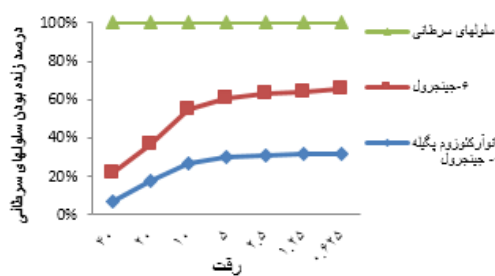
در بررسی اندازه نانو ذرات ، بیشترین درصد توزیع اندازه نانو آرکتوزوم پگیله ۶-جینجرول ۲۹۰ نانومتر و اندازه نانو آرکتوزوم پگیله بدون ۶-جینجرول (نمونه شاهد) ۲۳۸ نانومتر بود که نشان دهنده انکپسولاسیون ۶-جینجرول درون آرکتوزوم بود و به تبع آن موجب افزایش اندازه ذره گردید (شکل ۱).



شکل ۱-وزیکول های نانو آرکتوزوم حاوی ۶-جینجرول

پس از ابعاد بدست آمده به کمک سوپرناتانت جداشده از محلول و محاسبات انجام شده درصد انکپسولاسیون مشخص گردید که معادل ۹۶/۳۳ درصد بود.

سمیت و توان کشندگی نانو آرکتوزوم پگیله حاوی ۶- جینجرول نیز از تست MTT، بر رده سلول های سرطانی MCF-۷ پس از ۴۸ ساعت به اثبات رسید. نتایج سنجش MTT با اندازه گیری جذب نوری سلول های سرطانی تیمار شده با غلظت های مختلف ۶-جینجرول و نانو آرکتوزوم پگیله ۶-جینجرول نشان داد که فرمولاسیون نانو آرکتوزوم پگیله ۶-جینجرول در غلظت ۴۰ میکرو گرم / میلی لیتر بیش از ۹۰٪ سلول های سرطانی را از بین برده (نمودار ۲).



نمودار ۲- تاثیر رقت های مختلف ۶-جینجرول و نانو آرکتوزوم پگیله ۶-جینجرول بر سلول های MCF-۷ پس از ۴۸ ساعت به روش MTT

بحث

به دلیل اینکه رگ زایی در تومور های سرطانی به صورت معیوب می باشد و فاصله سلول های اندوتلیال ۶۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر است غلظت دارو در بافت تومور در هنگامی که درون یک نانوذره کپسوله شده باشد نسبت به داروی آزاد، چندین برابر افزایش می یابد و به صورت یکدست در جایگاه تومور تجمع می نماید (۱۶). با توجه به اینکه نانو آرکتوزوم ها به عنوان وزیکول های تحویل دارو و واکسن محسوب میشوند و به دلیل ساختار

منابع

1. Al-Achi A. A current look at ginger use. Retrieved 2007-08-02. Available From: URL: http://www.uspharmacist.com/oldformat.asp?url=newlook/files/Comp/ginger2.htm&pub_id=8&article_id=772.
2. Bode A. Ginger is an effective inhibitor of HCT116 human colorectal carcinoma in .Paper presented at the frontiers in cancer prevention Research Conference ,Phoenix ,AZ. 2003;October 26-30.
3. Brigger I. Dubernet C. and Couvreur p. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanc Drug Delivery Revi* (2002); 54: 631–651.
4. Chen B, Cheng J, Shen M, Gao F, Xu W, Shen H, Ding J, Gao C, Sun Q, Sun X, Cheng H, Li G, Chen W, Chen N, Liu L, Li X, Wang X. Magnetic nanoparticle of Fe₃O₄ and 5-bromotetrandrin interact synergistically to induce apoptosis by daunorubicin in leukemia cells. *Int J Nanomedicine*. 2009; 4:65-71.
5. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. (2005); 5:161–171. 131-132.
6. Jeong, C.-H.; Bode, A. M.; Pugliese, A.; Cho, Y.-Y.; Kim, H.-G.; Shim, J.-H.; Jeon, Y.-J.; Li, H. et al. (2009). “[6]-Gingerol Suppresses Colon Cancer Growth by Targeting Leukotriene A4 Hydrolase”. *Cancer Research* 69 (13): 5584–91. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0491. PMID 19531649. [displayauthors=suggested (help)].
7. Keum YS, Kim J, Lee KH, Park KK, Surh YJ, Lee JM, et al. Induction of apoptosis and caspase-3 activation by chemopreventive [6]- paradol and structurally related compounds in KB cells. *Cancer Lett* 2002; 177 (1):41-47.
8. Lee E, Surh YJ. Induction of apoptosis in HL 60 cells by pungent vanilloids[6]-gingerol and [6] paradol. *Cancer Lett* 1998; 134(2):163-168.
9. Lee, H; Seo, E; Kang, N; Kim, W (2008). “[6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells”. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19 (5): 313–9. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.05.008. PMID 17683926.
10. Millenbaugh NJ, Wientjes MG, Au JL. A Pharmacodynamic analysis method to determine the relative importance of drug concentration and treatment time on effect. *Cancer Chemother Pharmacol.* (2000);45:265–272.
11. Mozafari MR. *Nanocarrier Technologies, Frontiers of Nanotherapy*, Massey University, New Zealand, Springer Publication, 2007,17-41.
12. Park, Yon Jung; Wen, Jing; Bang, Seungmin; Park, Seung Woo; Song, Si Young (2006). “[6]-Gingerol Induces Cell Cycle Arrest and Cell Death of Mutant p53-expressing Pancreatic Cancer Cells”. *Yonsei Medical Journal* 47 (5): 688–97. doi:10.3349/ymj.2006.47.5.688. PMC 2687755. PMID 17066513.
13. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol.* (2007); 2:751–760.
14. Rhode, Jennifer; Fogoros, Sarah; Zick, Suzanna; Wahl, Heather; Griffith, Kent A; Huang, Jennifer; Liu, J Rebecca (2007). “Ginger inhibits cell growth and modulates angiogenic factors in ovarian cancer cells”. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 7: 44. doi :10.1186/1472-6882-7-44. PMC 2241638. PMID 18096028.
15. Sinha S.H., Pan L., Chanda P and Sen S.K. (2009). Nanoparticles fabrication using ambient biological resources. *Journal of Applied Biosciences*, 19: 1113 – 1130.
16. Wang X, Yang L, Chen ZG, Shin DM. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *CA: a cancer j. clinicians*. 2008; 58 (2): 97-110.

