

Study of Teratogenic and Cytotoxic Effects of BDP18 Tri-Block Copolymer (PLA-PEG2000-PLA) on Chicken Embryos

Asadi A^{*1}, Abdolmaleki A², Najafi F³

¹ Department of Biology, School of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

² Young Researchers & Elites Club, Islamic Azad University, Hamedan Branch, Hamedan, Iran

³ Department of Resin and Additives, Institute for Color Science and Technology, Tehran, Iran

* Corresponding Author. Tel/Fax: +98 451-5514701 E-mail: asady@uma.ac.ir

Received: 23 May 2012 Accepted: 28 August 2012

ABSTRACT

Background & Objectives: Polymers as drug carriers are recent advances in drug delivery and led to the new advent field that called polymer treatment. In the present study, the toxic and teratogenic effects of BDP18 were evaluated against chicken embryos as a model.

Methods: The BDP18 tri-block copolymer (PLA-PEG2000-PLA) was synthesized. The compound solution was injected in triplicate examination, in the air sac of the eggs, at third day of incubation, and survived fraction of the embryos and Morphological and skeletal changes were recorded.

Results: The survived fraction of the embryos depends on the compound concentration. In concentration of 20 mg/ml, 33.3% of the embryos were survived and the LD₅₀ was 10.87 mg/egg. Morphological study of the treated embryos showed no abnormalities in embryos, and skeletal staining showed the deletion of caudal vertebrae in high concentration.

Conclusion: The BDP18 copolymer had low toxic and teratogenic effects against the embryos, but it caused the deletion of caudal vertebrae at concentrations above the threshold (10 mg/ml). This polymer can be used as an effective drug-release system in low concentrations.

Key words: Tri-Block Copolymer BDP18; Cell Toxicity; Teratogenic; Chick Embryo

مطالعه اثرات ترانوژنیک و سمیت سلولی کوپلیمر تری بلاک BDP18 (PLA-PEG2000-PLA) بر اسکلت جنین جوجه

اسداله اسدی^{۱*}، آرش عبدالملکی^۲، فرهود نجفی^۳

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران ^۲ باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران ^۳ گروه پژوهشی رزین و مواد افزودنی، موسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ، تهران، ایران

نویسنده مسئول، تلفاکس: ۰۴۵۱ ۵۵۱۴۷۰۱ E-mail: asady@uma.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: پلیمرها به عنوان حامل های دارویی از پیشرفت های اخیر در دارو رسانی هستند و منجر به ظهور زمینه های جدید بنام درمان های پلیمری شده است. در این مطالعه سمیت و اثرات ترانوژنیک کوپلیمر BDP18 نسبت به جنین جوجه بعنوان جانور مدل مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: کوپلیمر تری بلاک BDP18 (PLA-PEG2000-PLA) سنتز گردید. ترکیب حاصل در غلظت های مختلف، در سه مرحله مجزا و در روز سوم انکوباسیون جنین مرغ، درون کیسه هوا تزریق شد و درصد بقاء جنین ها و تغییرات مورفولوژیک و اسکلتی آن ها ثبت گردید.

یافته ها: میزان درصد بقاء جنین ها بستگی به غلظت تیمار دارد بطوریکه در غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر / تخم مرغ تنها ۳/۳٪ از جنین ها زنده ماند و میزان LD₅₀ برابر با ۱۰/۸۷ میلی گرم / تخم مرغ برآورد شد. از نظر شکل ظاهری هیچگونه ناهنجاری در جنین ها مشاهده نگردید و از نظر ناهنجاری های اسکلتی، حذف مهره های دمی در غلظت های بالا مشاهده شد. **نتیجه گیری:** کوپلیمر BDP18 در غلظت های پایین اثرات سمیت و ترانوژنیک کمی بر روی جنین دارد، در غلظت های بالاتر از آستانه تاثیر (۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) سبب حذف مهره های دمی می شود. این پلیمر می تواند در غلظت های پایین به عنوان یک سیستم رهش دارویی موثر مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: کوپلیمر BDP18 Tri-Block، سمیت سلولی، ترانوژنیک، جنین جوجه

دریافت: ۹۱/۳/۳

پذیرش: ۹۱/۶/۷

مقدمه

گروه بزرگی از سیستم های رهش داروی موجود، سیستم های پلیمری می باشند که مورد توجه زیادی واقع شده اند و سیستم های مناسبی بنظر می رسند و منجر به ظهور زمینه های جدید بنام درمان های پلیمری شده است. بطور عمومی درمان های پلیمری به هر پلیمری که به عنوان جزئی از یک محصول دارویی با هدف ایجاد یا تغییر عمل دارو باشد گفته می شود. درمان های پلیمری شامل پلیمرهایی می شود که بطور ذاتی از لحاظ بیولوژیکی فعال

هستند و کونژوگ های دارو- پلیمر، میسل های پلیمری، نانو ذرات و لیپوزوم های پوشیده شده با پلیمرها می باشند. شمار در حال رشدی از درمان های پلیمری در آمریکای شمالی، اروپا و آسیا برای کاربردهای کلینیکی در درمان سرطان، عفونت ها و بیماری های ژنتیکی دارای مجوز می باشند. استفاده از پلیمرها نه تنها ورود پروتئین به سلول را افزایش داده بلکه افزایش پایداری پروتئین نیز حاصل می شود [۱]. پلیمرها به عنوان حامل های دارویی از پیشرفت های اخیر در دارو رسانی هستند که در سال

پرنده از نظر پیچیدگی و مورفولوژیکی و مراحل عمومی تکوین، شباهت زیادی به جنین پستانداران دارد، لذا به عنوان مکمل برای مطالعه تکوین پستانداران به کار می‌رود. همچنین جنین جوجه را می‌توان به راحتی کشت داد. این عمل راه را برای بسیاری از تحقیقات که نیاز به میکروجرای دارند و همچنین بررسی تأثیر مواد شیمیایی و دارویی بر روی جنین هموار کرده است [۱۴]. در تحقیق حاضر اثرات تراتوژنیک و سمیت سلولی کوپلیمر تری بلاک BDP18 با ساختار عمومی PLA-PEG2000-PLA به عنوان حامل دارویی استفاده شده و بر روی جنین جوجه مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش کار

۱- تیمار جنین جوجه

تخم مرغ های بارور نژاد راس از شرکت محلی خریداری شدند. تخم مرغ ها در شرایط دمایی مناسب ۱۰-۱۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. کوپلیمر BDP18 در PBS حل شده و سپس در روز سوم گرماگذاری، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول های BDP18 در غلظت های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر/تخم مرغ و با استفاده از سرنگ هامیلتون به داخل کیسه هوا تزریق شد. تزریق در شرایط استریل و از قسمت پن تخم مرغ به درون کیسه هوا صورت گرفت و بلافاصله محل تزریق توسط پارافین مذاب بسته شد و تخم مرغ ها در دمای ۳۸ - ۳۷/۷ درجه سانتی گراد و در رطوبت ۶۵٪ گرماگذاری شدند. به عنوان شاهد از تعداد تکرار یکسان تخم مرغ از تزریق ۱۰۰ میکرولیتر PBS استفاده گردید، تعدادی تکرارهای اضافی جهت کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی گرماگذاری گردید که به طور تصادفی انتخاب شده و آلودگی آن مورد بررسی قرار می گرفت. جهت کنترل رشد جنینی در طول انکوباسیون، بطور متوسط ۴ بار کندلینگ انجام گرفت تیمار در سه تکرار انجام شد و در هر تکرار

۱۹۹۹ پیشنهاد شده اند [۲]. امروزه انواعی از پلیمرها بطور گسترده برای داروهای مختلف مانند داروهای ضد سرطان کشف شده است [۳]. درسالهای اخیر علاقه فراوانی به طراحی و سنتز حامل های دارویی با دوره زمانی طولانی گردش خون وجود داشته است، در این میان، نانو ذرات زیست تخریب پذیر با بلاک های پلی اتیلن گلیکول (PEG) در زنجیره های کوپلیمری، ناقل های دارویی امیدوار کننده ای هستند که توسط سیستم های فاگوسیتوز کننده تک هسته ای کمتر تجزیه می شوند [۴، ۵]. مطالعات قبلی اهمیت طول زنجیره های PEG را در جلوگیری از جذب پروتئین پلاسما بر روی نانو ذرات پلی لاکتیک اسید- پلی اتیلن گلیکول (PLA-PEG) و واکنش آنها با سلول های فاگوسیتوز کننده نشان داده اند [۶، ۷]. در طول چند دهه گذشته توجه زیادی به توسعه و ساخت نانو ذرات پلیمری زیست تخریب پذیر برای تحویل داروهای موثر، پپتیدها، پروتئین ها و DNA شده است [۸، ۷]. یکی از مشکلات عمده استفاده از نانو ذرات به عنوان حامل های دارویی پلیمری این است که پس از تزریق به سرعت توسط سیستم های فاگوسیتوز کننده رتیکولاندوتلیال به سرعت از جریان خون حذف می شوند. سنتز نانو ذراتی که می تواند از جذب سریع توسط سلول های فاگوسیتوز کننده بگریزد نشان دهنده نسل دوم نانو ذرات حامل های دارویی است [۹-۱۲]. جنین جوجه یکی از مدل های آزمایشگاهی جانوری مناسب است که توسط محققین رشته های مختلف از جمله جنین شناسی، فارماکولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمی به دفعات مورد استفاده قرار می گیرد، دلیل این امر راحتی تهیه آن به هر تعداد و کوتاهی طول دوران جنین آن است. همچنین مراحل نرمال تکوین اسکلت جنین جوجه نه تنها در مطالعات جنین شناسی تجربی و تراتولوژیک به عنوان کنترل استفاده دارد، بلکه جهت مقایسه در بدشکلی های اسکلتی حاصل از موتانت ها نیز می تواند مورد استفاده قرار گیرد [۱۳]. جنین

برای هر غلظت ۶ تخم مرغ در نظر گرفته شده است [۱۵].

۲- بررسی سمیت و تراژونیک

تخم مرغ های تیمار شده و شاهد، در روز ۱۹ انکوباسیون باز و جنین‌ها توزین شدند. میزان مرگ و میر آن‌ها ثبت شده با فرمول زیر محاسبه گردید [۱۶].

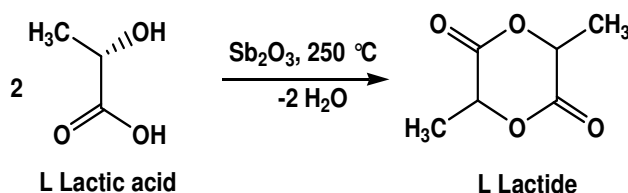
$$\text{درصد مرگ و میر شاهد} - \text{درصد مرگ و میر تیمار} = \frac{\text{درصد مرگ و میر تیمار}}{100 - \text{درصد مرگ و میر شاهد}}$$

سپس جنین‌ها از نظر هر گونه ناهنجاری ظاهری قابل تشخیص بررسی و ثبت گردید. برای بررسی ناهنجاری اسکلتی، پوست جنین جدا و محتویات شکمی تخلیه گردید و به مدت ۳ روز در محلول ۲ درصد هیدروکسید پتاسیم (KOH) قرار گرفتند. سپس، جنین‌ها در محلول ۱ درصد هیدروکسید پتاسیم حاوی رنگ آلیزارین قرمز (نوعی رنگ است که برای رنگ آمیزی اسکلت جهت بررسی ناهنجاریهای موجود در آن مورد استفاده قرار می‌گیرد) (۱/۰ درصد) به مدت ۳ روز رنگ آمیزی

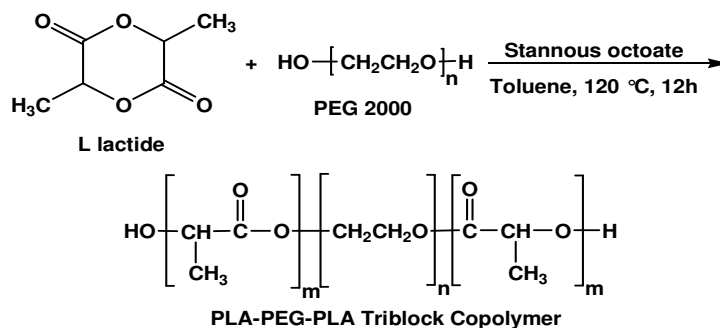
گردید. شفاف‌سازی نهایی با قراردادن جنین در کلیسروال (۱۰۰٪) انجام شد [۱۷].

۳- سنتز کوپلیمر تری بلاک BDP18

BDP18، کوپلیمری تری بلاک با ساختار عمومی PLA-PEG2000-PLA می‌باشد. برای سنتز کوپلیمر تری بلاک BDP18 ابتدا L-لاکتید در حضور تری اکسید آنتیموان (Sb_2O_3) به عنوان کاتالیزور از L-لاکتیک اسید تولید شد (شکل ۱). در مرحله بعد، L-لاکتید خالص به درون یک بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی تولوئن خشک، پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ و کاتالیست اکتات قلع دو ظرفیتی ریخته شد، مخلوط تهیه شده در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس برای ۱۲ ساعت تحت رفلکس قرار گرفت (شکل ۲). خلال تولوئن تحت خلاء بوسیله دستگاه روتاری خارج شد سپس کوپلیمر حاصل در کلروفرم حل و سپس صاف شد. محلول کوپلیمر بوسیله دی اتیل اتر رسوب گیری شد. رسوبات حاصل بوسیله اتانول گرم برای خروج پلی اتیلن گلیکول واکنش نداده شسته شد. در انتها رسوبات خالص تحت خلاء و دمای ۴۰ درجه برای ۸ ساعت کاملاً خشک شد.



شکل ۱. سنتز L-lactide



شکل ۲. سنتز کوپلیمر تری بلاک BDP18

۴- مطالعات آماری

برای تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS و تحلیل واریانس یک طرفه^۱، برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن^۲ و برای محاسبه LD50 از ارزیابی پروبیت^۳ استفاده شد.

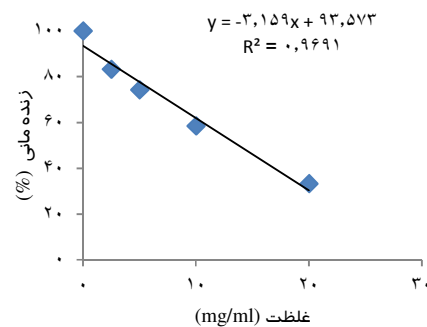
یافته‌ها

بررسی تاثیر کوپلیمر BDP18 بر درصد تلفات جنین

جوجه

سه گروه آزمایشی و یک گروه شاهد به ازای هر غلظت تزریقی BDP18 به تخم مرغ‌ها از نظر کسر بقاء جنین مورد مطالعه قرار گرفت، این یافته‌ها نشان داد که در تیمار تخم مرغ‌ها با غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر/ تخم مرغ به ترتیب ۳/۸۳٪، ۶/۷۴٪، ۵/۵۸٪ و ۳۳/۳۴٪ در روز ۱۹ زنده مانده‌اند. بررسی رابطه خطی بین غلظت تیمار و درصد جنین‌های زنده مانده نشانگر LD50 برابر ۱۰/۸۷ میلی‌گرم/تخم مرغ بود.

بررسی آماری داده‌ها نشان داد که اختلاف بین گروه شاهد و هر یک از غلظت‌های مورد بررسی و همچنین مقایسه اختلاف بین غلظت‌های تیمار در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. به عبارتی دیگر، افزایش مرگ و میر نسبت به افزایش غلظت کوپلیمر BDP18 صحیح می‌باشد (نمودار ۱).



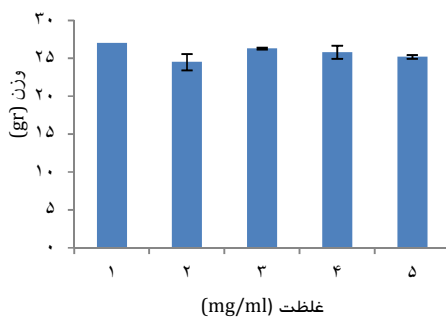
نمودار ۱. تاثیر غلظت‌های مختلف از پلیمر BDP18 بر جنین جوجه

بررسی تغییرات وزنی پلیمر BDP18 بر جنین جوجه

در این تحقیق هیچ گونه تغییرات وزنی معنی‌داری در جنین‌های تیمار شده با پلیمر BDP18 در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد.

جدول ۱. تجزیه واریانس مربوط به اثرات پلیمر BDP18 بر میانگین

وزنی جنین جوجه		میانگین	درجه	جمع	منابع
معنی	F	مربعات	آزادی	مربعات	تغییرات
داری					
تیمار		۲۲/۶۷۷	۴	۹۰/۷۰۷	تیمار
خطا	۱/۸۶۲	۱۲/۱۷۷	۲۰	۲۴۳/۵۴۶	خطا



نمودار ۲. تاثیر غلظت‌های مختلف از کوپلیمر BDP18 بر میانگین وزنی جنین جوجه

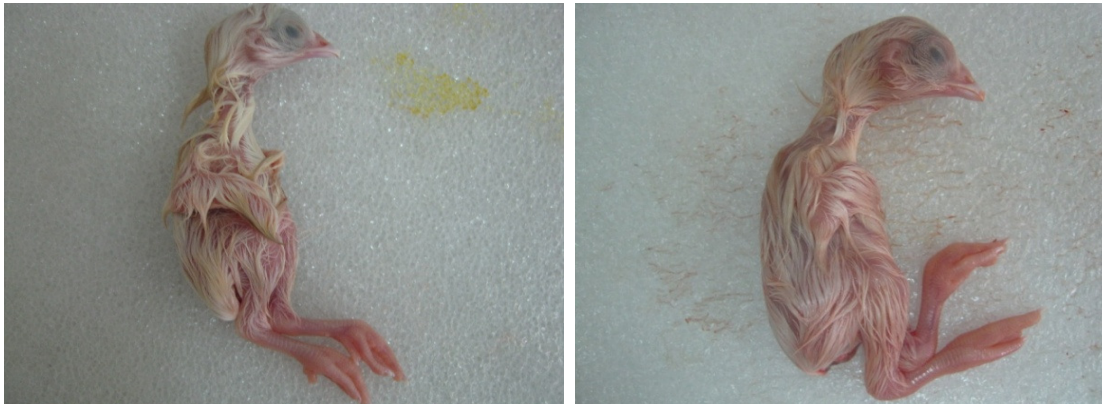
بررسی ناهنجاری جنین تیمار شده

بررسی مورفولوژی ظاهری جنین‌ها هیچگونه ناهنجاری را در نمونه‌های تیمار نشان نداد (شکل ۳). بررسی ساختار اسکلت جنین‌های تحت تیمار نشان داد که میزان شیوع اختلالات اسکلتی با افزایش غلظت تیمار افزایش می‌یابد، به طوری که در غلظت‌های پایین هیچگونه ناهنجاری مشاهده نشد و در بیشترین غلظت تیمار در ۳۳/۳ درصد از جنین‌ها ناهنجاری‌های از نوع حذف مهره‌های دمی مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۴).

¹ ANOVA

² Duncan

³ Probit



ب

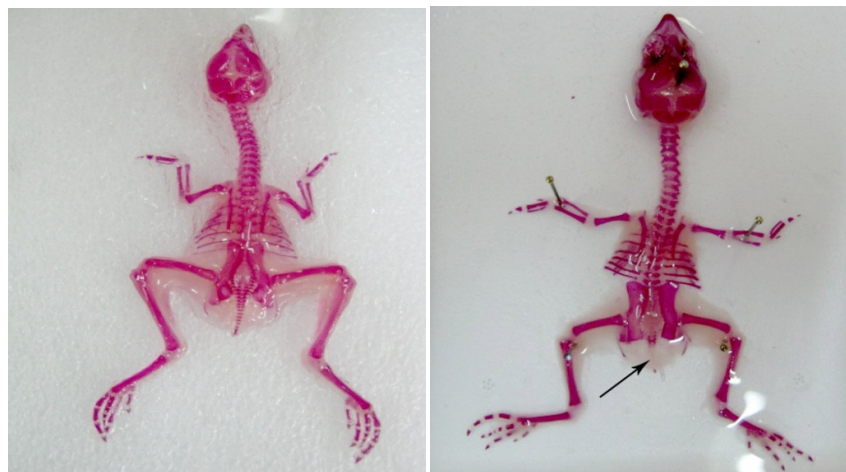
الف

شکل ۳. تصاویر بدست آمده از نظر بررسی مورفولوژیکی. همان طور که ملاحظه می شود در گروه های تیمار (الف) و کنترل (ب) هیچ گونه ناهنجاری دیده نمی شود.

جدول ۱. ناهنجاری های مربوط به غلظت های مختلف BDP18 بر جنین جوجه

نوع ناهنجاری	درصد ناهنجاری اسکلتی	درصد ناهنجاری مورفولوژیکی	غلظت میلی گرم در میلی لیتر / تخم مرغ
-	NO	NO*	۰
-	NO	NO	۲/۵
-	NO	NO	۵
حذف مهره های دمی	۶/۲۵	NO	۱۰
حذف مهره های دمی	۳۳/۳	NO	۲۰

NO*: مشاهده نشد



ب

الف

شکل ۴. تصاویر بدست آمده از ناهنجاری های اسکلتی غلظت های مختلف BDP18 در شکل الف حذف مهره های دمی مشاهده می شود (فلش). شکل ب یک نمونه از جنین های کنترل می باشد.

بحث

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد کوپلیمر تری بلاک BDP18 با ساختار PLA-PEG2000-PLA اثرات سمیت و ترانوژنیک کمی بر روی جنین دارد. تأثیر غلظت‌های بالاتر از آستانه ترکیب BDP18 بر جنین جوجه منجر به ایجاد ناهنجاری اسکلتی از نوع حذف مهره‌های دمی شد که می‌تواند ناشی از تأثیر مستقیم ترکیب بر سلول‌های جنینی باشد. بررسی اثر متوترکسات در رت‌ها نشان داد که بیشتر ناهنجاری‌های ایجاد شده محدود به مهره‌های دمی می‌باشد [۱۴]. بررسی یافته‌های قبلی نشان می‌دهد که استخوان‌های اندام‌های انتهایی تحت تأثیر مواد ترانوژن بیشتر دچار نقص می‌شوند [۳۰]. دستیابی به تخصص در انتقال دارو، برای جلوگیری از عوارض جانبی ناخواسته مرتبط با تحویل سیستمیک عوامل درمانی و به حداکثر رساندن اثر درمانی مهم است [۱۸]. مطالعات نشان داده‌اند که مرگ و میر جنین‌ها پس از تزریق درون تخم می‌تواند به علت تخریب و از بین رفتن هوموستازی جنینی به علت تزریق مواد باشد و حساسیت جنین‌ها به مرحله‌ی رشد و نمو آنها وابسته است [۱۹]. همچنین بسیاری از محققین اثر ترانوژنیک آنتی بیوتیک‌ها و فاکتورهای رشد را وقتی که در طول هفته اول جنینی درون تخم تزریق می‌شوند اثبات کرده‌اند [۲۳-۲۰]. پورمیرزا در سال ۱۳۸۰ اثر مخلوط اسکوپولامین و هیوسیامین به نسبت ۸۰ به ۲۰ در جنین تخم‌مرغ را بررسی کرد و مشاهده کرد، که ناهنجاری‌های مورفولوژیکی مثل کامل بسته نشدن حفره شکمی و بدشکلی منقار در نتیجه تزریق مخلوط اسکوپولامین و هیوسیامین بوجود آمد. و همچنین سبب تلفات جنین گردید [۲۴]. پائول و همکاران تأثیرات آرکولین هیدروبروماید را بر روی جنین جوجه بررسی کردند. نتایج بدست آمده نشان داد که این ماده تأثیرات ترانوژنی بر جنین جوجه داشته است.

همچنین این ترکیب باعث افزایش مرگ و میر جنین جوجه نسبت به گروه شاهد شده‌اند. علاوه بر آن ناهنجاری هم در بین گروه‌های تیماری مشاهده شده است که این ناهنجاری‌ها عبارتند از: کاهش حجم بدن، کاهش رویش پر، وارونگی احشا، کوتاهی منقار و پاهای چنبری. همچنین تأخیر در تکوین در گروه تیمار نسبت به شاهد قابل توجه بود. در بررسی دقیق تر با استفاده از رنگ آمیزی از الیزرین، پاهای چنبری، مهره‌های کلسیفیه نشده، کوتاهی استخوان‌های بلند و انگشت‌های کلسیفیه نشده مشاهده شده است [۲۵].

پترئوا و همکاران گزارش دادند که بندیکاربامات هیچ گونه تأثیر سمیت و ترانوژنی بر جنین جوجه ندارد. بندیکاربامات تأثیر ملایمی بر روی وزن جنین داشت. به طوری که باعث کاهش وزن جنین حداکثر ۱۵٪ گردیده است. با توجه به مطالعات قبلی نتیجه‌گیری شد که بندیکاربامات اثرات سمیت قابل توجهی ندارد [۲۶].

تمام غلظت‌های عامل ناهنجاری‌زا نمی‌تواند منشا تولید ناهنجاری جنینی باشد، زمانی که غلظت عامل ناهنجاری‌زا بیشتر از غلظت آستانه شود علائم سمیت ظاهر می‌شود [۲۹-۲۷]. آستانه‌ی تأثیر BDP18 در این مطالعه ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر بود.

مطالعات نشان داده که موادی که اثرات سیتوتوکسیسیته دارند باعث مهار رشد و مهاجرت سلول‌ها می‌شوند و این عوامل در رشد جنین تأثیر قابل توجهی بجا می‌گذارند، بررسی‌های انجام گرفته با میتومایسین این یافته را اثبات کرده است. لذا مهار تکثیر سلولی در بافت‌های جنینی که به سرعت در حال تکثیر هستند ممکن است منجر به ناهنجاری شود [۱۴].

مرگ سلولی ناشی از تأثیر ترکیبات سمی باعث اختلال در الگوی میتوز سلولی در بافت‌ها شده و منجر به اختلال در تماس سلولی در طی تمایز

کوپلیمر تری بلاک BDP18 با ساختار PLA-PEG2000-PLA اثرات سمیت و تراژونیک کمی بر روی جنین دارد، در غلظت های بالاتر از آستانه‌ی تاثیر سبب حذف مهره های دمی می‌شود. این پلیمر می‌تواند در غلظت‌های پایین به عنوان یک سیستم رهش دارویی موثر مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی و همچنین زحمات جناب آقای دکتر سنگین آبادی که ما را صمیمانه در انجام این تحقیق یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

می‌شود. این فرایند منجر به اختلال در عمل القاء تمایز و اندام زایی صحیح می‌گردد [۳۱].
بررسی‌ها نشان داده‌اند که ناهنجاری‌ها سبب ایجاد مکانیسم‌هایی می‌شوند که در اعمال متعدد و مختلف سلول‌های طبیعی جنین دخالت می‌کنند و به تاثیر این مکانیسم‌ها واکنش‌های به هم پیوسته‌ای بوجود می‌آیند که می‌توانند منجر به تاخیر رشد جنین، ناقص الخلقه شدن آن و حتی مرگ جنین گردند [۳۲].

نتیجه گیری

References

- 1- Kabanov A, Batrakova E, Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J of Controlled release*. 2002 May; 82: 189-212.
- 2- Wubeante YA, Neeraj K. A systematic study on lyophilization process of polymersomes for long-term storage using doxorubicin-loaded (PEG) 3-PLA nanopolymersomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012 Jun; 46: 405-414.
- 3- Ahmed F, Pakunlu RI, Brannan A, Bates FS, Minko T, Discher DE. Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. *J Controlled Release*. 2006 Jul; 116: 150-158.
- 4- Bazile D, PrudHomme C, Bassoullet MT, Marlard M, Spenlehauer G, Veillard M. Stealth PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J Pharm Sciences*. 1995 May; 84: 493-498.
- 5- Vila A, Gill H, McCallion O, Alonso MJ. Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. *J of Controlled release*. 2004 Oct; 98: 231-244.
- 6- Jaeghere F, Allemann E, Leroux JC, Stevels W, Feijen J, Doelker E, Gurny R. Formulation and lyophilization of poly (lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and in vitro cell uptake. *J Pharm Res*. 1999 May; 16: 859- 866.
- 7- Vassiliou AA, Papadimitriou SA, Bikiaris DN, Mattheolabakis G, Avgoustakis K. Facile synthesis of polyester-PEG triblock copolymers and preparation of amphiphilic nanoparticles as drug carriers. *J of Controlled release*. 2010 Nov; 148: 388-395.
- 8- Ma LL, Jie P, Venkatraman SS. Block copolymer stealth nanoparticles for chemotherapy: interactions with blood cells in vitro. *J Adv. Funct. Mater*. 2008 Jul; 18 : 716-725.
- 9- Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *J Adv. Drug Deliv. Rev*. 2001 Aug; 47 :113-131.
- 10- Torchilin VP. PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *J Adv. Drug Deliv. Rev*. 2002 May; 54: 235-252.
- 11- Van Butsele K, Jerome R, Jerome C. Functional amphiphilic and biodegradable copolymers for intravenous vectorisation. *J Polymer*. 2007 Apr; 48: 7431-7443.
- 12- Yang A, Yang L, Liu W, Li Z, Yang X. Tumor necrosis factor alpha blocking peptide loaded PEG-PLGA nanoparticles: preparation and in vitro evaluation. *Int J. Pharm*. 2007 Jun; 331: 123-132.

- 13- Petrovova E, Sedmera D, Misek I, Lesnik F, Luptakova L. Bendiocarbamate toxicity in the chick embryo. *J Folia Biologica*. 2009 Aug; 55: 61-65.
- 14- Manner J, Seidl W, Heinicke F, Hesse H. Teratogenic effects of suramin on the chick embryo. *J Anatomy Embryology*. 2003 Nov; 206: 229-237.
- 15- Alhifi MA, Khan MZ, Hlgoshai HA, Ghole VS. Teratogenic effect of dimethoat on chicken embryo. *J Int Med*. 2004 Aug; 3: 1-9.
- 16- Talebi-Jahromi K. *Pesticides toxicology*, 2nd ed. Tehran: Tehran Academic press, 2008: 492.
- 17- Green AC. A rapid method for clearing and staining specimens for the demonstration of bone. *The Ohio Journal of Science*. 1952 Nov; 529(1): 31-34.
- 18- Suzanne M, Steven M, John J, Douglas H, Adam R. Effects of block copolymer properties on nanocarrier protection from in vivo clearance. *J of Controlled release*. 2012 May; 162: 208–217.
- 19- Bruggeman V, Swennen Q, Deketelaere B, Onagbesan O, Tona K, Decuypere E. Embryonic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in chickens: effects of dose and embryonic stage on hatchability and growth. *J Comp Biochem physiol*. 2003 Jul; 136: 17-28.
- 20- Roelens SA, Beck V, Maervoet J, Aerts G, Reyns GE, Schepens P, et al. The dioxin-like PCB 77 but not the ortho-substituted PCB 153 interferes with chicken embryo thyroid hormone homeostasis and delays hatching. *J Gen Comp Endocrinol*. 2005 Oct; 143: 1-9.
- 21- Borzemska W, Karpińska E, Szeleszczuk P, Binek M, Malicka E, Kosowska G, et al. Evaluation of toxicity of stimulators in a biological test on chick embryos. *J Med Wet*. 1995 Aug; 51: 745-747.
- 22- Borzemska W, Kosowska G, Malec H, Piusiński W, Niezgoda J, Malec L. Attempts to establish the toxicity of Galium aparine seeds using a biological test, in chick embryos and chickens. *J Med Wet*. 1991 Dec; 47: 366-368.
- 23- Van Der Geyten S, Van Der Rynde I, Segers IB, Kuhn ER, Darras VM. Differential expression of iodothyronine deiodinases in chicken tissues during the last week of embryonic development. *J Gen Comp Endocrinol*. 2002 Jul; 128: 65-73.
- 24- PourMirza A. Lethal and morphological teratogenic effects of a mixture of scopolamine and hyoscyamine on chick embryos. *Journal of Veterinary Research*. 2001 Jun; 56(3): 13-16.
- 25- Paol K, Moitra PK, Mukherjee I, Maity C, Ghsal SK. Teratogenicity of arecolinehydrobromide on developing chicken embryos: A preliminary report. *J Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1999 Jul; 62: 356-362.
- 26- Petrovova E, Sedmera D, Misek I, Lesnik F, Luptakava L. Bendiocarbamate toxicity in the chick embryo. *J Folia Biologica*. 2009 Jun; 55: 61-65.
- 27- Elkington J. *The poisoned womb: Human Reproduction in a polluted world*. Penguin Book, New York. 1985; 89-118.
- 28- Magras IN, Kotski-Kovatsi VP, Kovatsis A, Adamidou L. Teratogenic effects of a mixture of scopolamine and hyoscyamine in chick embryos. *J Human Toxicol*. 1993 Aug; 35: 434-435.
- 29- Sunil Kumar KB, Devi KS. Teratogenic effects of methyl parathion in developing chick embryos. *J Human Toxicol*. 1992 Jun; 34: 408-410.
- 30- Singh JD, Singh S. Skeletal malformations induced by mitomycin C in chicken embryo. *J Acta orthopaedica*. 1976 May; 47: 509-514.
- 31- Ranjbar R, Vatanchian M, Mohammadian B, Mayahi M. Chronological study of chicken embryo wing and leg skeleton development by alizarin red- alcian blue double staining technique. *Iranian Journal of Biology*. 2006 May; 19(2): 167-179.
- 32- Muhammed A, Von Borstel R. *Basic and Applied Mutagenesis*. Plenum Press, New York. 1984; 285-298.