Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol.13, No.1, Spring 2013, Pages 16-23

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

Asadi A*[1], Abdolmaleki A[2], Najafi F[3]

[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 LD_{50} was 10.87 mg/egg. Morphological study of the treated embryos showed no abnormalities in embryos, and skeletal staining showed the deletion of caudal vertebrate in high concentration.

Conclusion: The BDP18 copolymer had low toxic and teratogenic effects against the embryos, but it caused the deletion of caudal vertebrate 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

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-12]

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

اسدالله 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 وفناوری 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 زمینه‌ای جدید بنام درمان‌های پلیمری شده است. در این مطالعه سمیت و اثرات تراتوژنیک 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 غلظت‌های مختلف، در سه مرحله مجزا و در روز سوم انکوباسیون جنین مرغ، درون کیسه هوا تزریق شد و درصد بقاء جنین‌ها و تغییرات مورفولوژیک و اسکلتی آن‌ها ثبت گردید.

یافته‌ها: میزان درصد بقاء جنین‌ها بستگی به غلظت تیمار دارد بطوریکه در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر/ تخم مرغ تنها ۳۳/۳٪ از جنینها زنده ماند و میزان LD_{50} برابر با ۱۰/۸۷ میلی‌گرم/ تخم مرغ برآورد شد. از نظر شکل ظاهری هیچگونه ناهنجاری در جنین ها مشاهده نگردید و از نظر ناهنجاریهای اسکلتی، حذف مهره های دمی در غلظت های بالا مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: کوپلیمر BDP18 در غلظت‌های پایین اثرات سمیت و تراتوژنیک کمی بر روی جنین دارد، در غلظت های بالاتر از آستانه تاثیر (۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) سبب حذف مهره های دمی می‌شود. این پلیمر می‌تواند در غلظت‌های پایین به عنوان یک سیستم رهش دارویی موثر مورد استفاده قرار گیرد.

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

دریافت: ۹۱/۳/۳ **پذیرش:** ۹۱/۶/۷

مقدمه

گروه بزرگی از سیستم‌های رهش داروی موجود، سیستم‌های پلیمری می‌باشند که مورد توجه زیادی واقع شده‌اند و سیستم‌های مناسبی بنظر می‌رسند و منجر به ظهور زمینه‌ای جدید بنام درمان‌های پلیمری شده است. بطور عمومی درمان‌های پلیمری به هر پلیمری که به عنوان جزئی از یک محصول دارویی با هدف ایجاد یا تغییر عمل دارو باشد گفته می‌شود. درمان‌های پلیمری شامل پلیمرهایی می‌شود که بطور ذاتی از لحاظ بیولوژیکی فعال هستند و کونژوگه‌های دارو- پلیمر، میسل‌های پلیمری، نانو ذرات و لیپوزوم‌های پوشیده شده با پلیمرها می‌باشند. شمار در حال رشدی از درمان‌های پلیمری در آمریکای شمالی، اروپا و آسیا برای کاربردهای کلینیکی در درمان سرطان، عفونت‌ها و بیماری‌های ژنتیکی دارای مجوز می‌باشند. استفاده از پلیمرها نه تنها ورود پروتئین به سلول را افزایش داده بلکه افزایش پایداری پروتئین نیز حاصل می‌شود [۱]. پلیمرها به عنوان حامل‌های دارویی از پیشرفت‌های اخیر در دارو رسانی هستند که در سال

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-12]

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 بلاک‌های پلی اتیلن گلیکول (PEG) در زنجیره‌های کوپلیمری، ناقلهای دارویی امیدوار کننده ای هستند که توسط سیستم های فاگوسیتوز کننده تک هسته‌ای کمتر تجزیه می‌شوند [۵،٤]. مطالعات قبلی اهمیت طول زنجیرهای PEG را در جلوگیری از جذب پروتئین پلاسما بر روی نانوذرات پلی لاکتیک اسید-پلی اتیلن گلیکول (PLA-PEG) و واکنش آنها با سلول‌های فاگوسیتوز کننده نشان داده‌اند [٤،۶]. در طول چند دهه گذشته توجه زیادی به توسعه و ساخت نانوذرات پلیمری زیست تخریب پذیر برای تحویل داروهای موثر، پپتیدها، پروتئین‌ها و DNA شده است [۷،۸]. 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 رتیکولواندوتلیال به سرعت از جریان خون حذف می‌شوند. سنتز نانوذراتی که می‌تواند از جذب سریع توسط سلول‌های فاگوسیتوز کننده بگریزد نشان دهنده نسل دوم نانوذرات حامل‌های دارویی است [۱۲-۹]. جنین جوجه یکی از مدلهای 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 هرتعداد 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 بدشکلی‌های اسکلتی حاصل از موتانت‌ها نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد [۱۳]. جنین 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 میکروجراحی دارند و همچنین بررسی تأثیر مواد شیمیایی و دارویی بر روی جنین هموار کرده است [١٤]. 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 مناسب۱۰-۱۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. کوپلیمر BDP18 در PBS حل شده و سپس در روز سوم گرماگذاری، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول های BDP18 در غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر/تخم مرغ و با استفاده از سرنگ هامیلتون به داخل کیسه هوا تزریق شد. تزریق در شرایط استریل و از قسمت پهن 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 به‌طور تصادفی انتخاب شده و آلودگی آن مورد بررسی قرار می‌گرفت. جهت کنترل رشد جنینی در طول انکوباسیون، بطور متوسط ٤ بار کندلینگ انجام گرفت تیمار در سه تکرار انجام شد و در هر تکرار

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-12]

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

۲- بررسی سمیت و تراتوژنیک

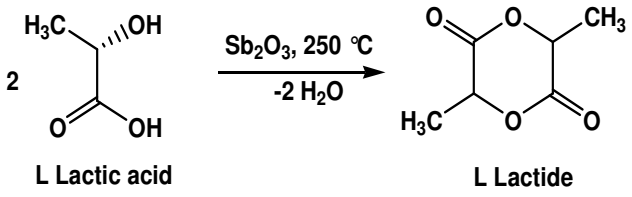
تخم مرغ های تیمار شده و شاهد، در روز ۱۹ انکوباسیون باز و جنین‌ها توزین شدند. میزان مرگ و میر آن ها ثبت شده با فرمول زیر محاسبه گردید [۱۶].

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

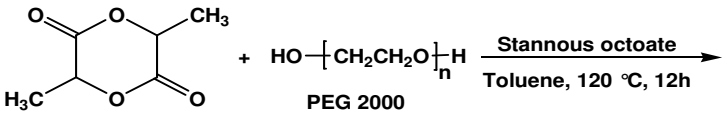
سپس جنین ها از نظر هر گونه ناهنجاری ظاهری قابل تشخیص بررسی و ثبت گردید. برای بررسی ناهنجاری اسکلتی، پوست جنین جدا و محتویات شکمی تخلیه گردید و به مدت ۳ روز در محلول ۲ درصد هیدروکسید پتاسیم (KOH) قرار گرفتند. سپس، جنین ها در محلول ۱ درصد هیدروکسید پتاسیم حاوی رنگ آلیزارین قرمز (نوعی رنگ است که برای رنگ آمیزی اسکلت جهت بررسی ناهنجاریهای موجود در آن مورد استفاده قرار می گیرد) (۰/۱ درصد) به مدت۳ روز رنگ آمیزی گردید. شفاف‌سازی نهایی با قراردادن جنین در گلیسرول (۱۰۰٪) انجام شد [۱۷].

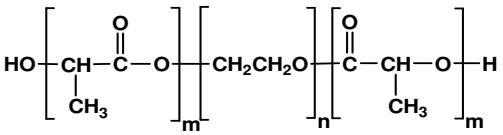
۳- سنتز کوپلیمر تری بلاک BDP18

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 (شکل۱). در مرحله بعد، L-لاکتید خالص به درون یک بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی تولوئن خشک، پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ و کاتالیست اکتات قلع دوظرفیتی ریخته شد، مخلوط تهیه شده در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس برای ۱۲ ساعت تحت رفلاکس قرار گرفت (شکل۲). حلال تولوئن تحت خلاء بوسیله دستگاه روتاری خارج شد سپس کوپلیمر حاصل در کلروفرم حل وسپس 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 ٤٠ درجه برای ٤ساعت کاملا خشک شد.



شکل۱. سنتز L-lactide





شکل۲. سنتز کوپلیمر تری بلاک BDP18

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-12]

٤- مطالعات آماری

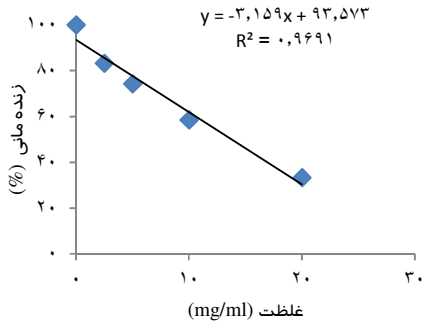
برای تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS و تحلیل واریانس یک طرفه[1]، برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن[2] و برای محاسبه LD50 از ارزیابی پروبیت[3] استفاده شد.

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 غلظت‌های۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر/ تخم مرغ به ترتیب ۸۳/۳٪، ۷٤/۶٪، ۵۸/۵٪ و ۳۳/۳٤٪ 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 (نمودار۱).



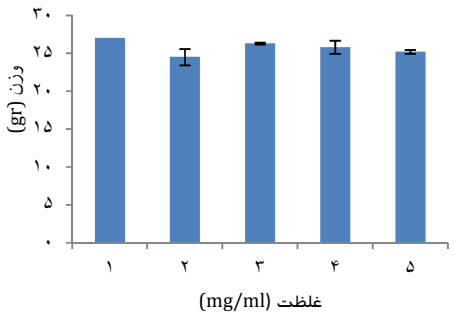
نمودار۱. تاثیر غلظت‌های مختلف از پلیمرBDP18 بر جنین جوجه

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

منابع تغییرات	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	معنی داری
تیمار	۹۰/۷۰۷	٤	۲۲/۶۷۷	۱/۸۶۲	/۱۵۷
خطا	۲٤۳/۵٤۶	۲۰	۱۲/۱۷۷		۰



نمودار۲. تاثیر غلظت‌های مختلف از کوپلیمرBDP18 بر میانگین وزنی جنین جوجه

بررسی ناهنجاری جنین تیمار شده

بررسی مورفولوژی ظاهری جنین‌ها هیچگونه ناهنجاری را در نمونه‌های تیمار نشان نداد (شکل۳).

بررسی ساختار اسکلت جنین‌های تحت تیمار نشان داد که میزان شیوع اختلالات اسکلتی با افزایش غلظت تیمار افزایش می‌یابد، به‌طوری‌که در غلظت های پایین هیچگونه ناهنجاری مشاهده نشد و در بیشترین غلظت تیمار در ۳۳/۳ درصد از جنین‌ها ناهنجاری‌های از نوع حذف مهره‌های دمی مشاهده شد (جدول۱و شکل٤).

[1] ANOVA
[2] Duncan
[3] Probit

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-12]

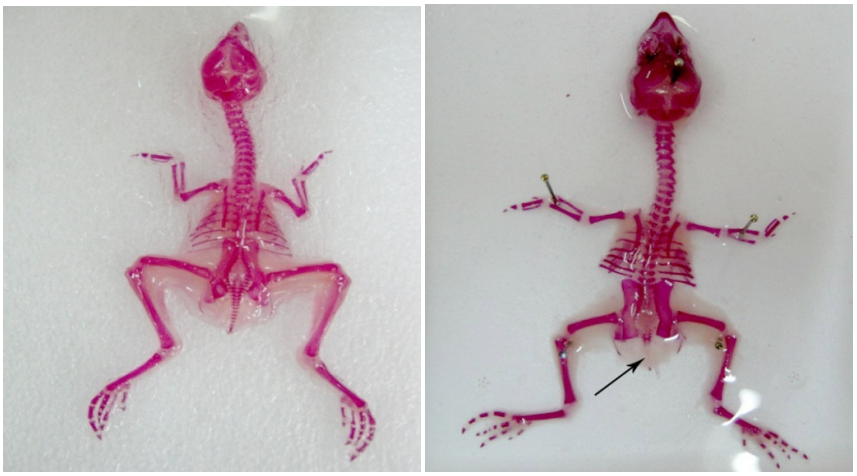
الف ب

شکل۳. 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 نمی‌شود.

جدول۱. ناهنجاری های مربوط به غلظت‌های مختلف BDP18 بر جنین جوجه

غلظت میلی‌گرم در میلی‌لیتر/تخم‌مرغ	درصد ناهنجاری مورفولوژیکی	درصد ناهنجاری اسکلتی	نوع ناهنجاری
۰	NO*	NO	-
۲/۵	NO	NO	-
۵	NO	NO	-
۱۰	NO	۶/۲۵	حذف مهره‌های دمی
۲۰	NO	۳۳/۳	حذف مهره‌های دمی

*NO: مشاهده نشد



الف ب

شکل ٤. تصاویر بدست آمده از ناهنجاری‌های اسکلتی غلظت‌های مختلف BDP18

در شکل الف حذف مهره‌های دمی مشاهده می‌شود (فلش)، شکل ب یک نمونه از جنین‌های کنترل می‌باشد.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-12]

بحث

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد کوپلیمر تری بلاک BDP18 با ساختار PLA-PEG2000-PLA اثرات سمیت و تراتوژنیک کمی بر روی جنین دارد. تاثیر غلظت های بالاتر از آستانه ترکیب BDP18 بر جنین جوجه منجر به ایجاد ناهنجاری اسکلتی از نوع حذف مهره‌های دمی شد که می‌تواند ناشی از تاثیر مستقیم ترکیب بر سلول‌های جنینی باشد. بررسی اثر متوترکسات در رت‌ها نشان داد که بیشتر ناهنجاری‌های ایجاد شده محدود به مهره‌های دمی می‌باشد [۱٤]. بررسی یافته‌های قبلی نشان می‌دهد که استخوان‌های اندام‌های انتهایی تحت تاثیر مواد تراتوژن 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 تراتوژنیک 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 به۲۰ در جنین تخم‌مرغ را بررسی کرد و مشاهده کرد، که ناهنجاری های 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 [۲٤]. پائول و همکاران تاثیرات آرکولین هیدروبروماید را بر روی جنین جوجه بررسی کردند. نتایج بدست آمده نشان داد که این ماده تاثیرات تراتوژنی بر جنین جوجه داشته است.

همچنین این ترکیب باعث افزایش مرگ و میر جنین جوجه نسبت به گروه شاهد شده اند. علاوه بر آن ناهنجاری هم در بین گروه های تیماری مشاهده شده است که این ناهنجاری‌ها عبارتند از: کاهش حجم بدن، کاهش رویش پر، وارونگی احشا، کوتاهی منقار و پاهای چنبری. همچنین تاخیر 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 استخوان های بلند و انگشت‌های کلسیفیه نشده مشاهده شده است [۲۵].

پترئوا و همکاران گزارش دادند که بندیوکاربامات هیچ گونه تأثیر سمیت و تراتوژنی بر جنین جوجه ندارد. بندیوکاربامات تاثیر 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 بندیوکاربامات 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 تاثیر BDP18 در این مطالعه ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر بود.

مطالعات نشان داده که موادی که اثرات سیتوتوکسیسیتی دارند باعث مهار رشد و مهاجرت سلول‌ها می شوند و این عوامل در رشد جنین تاثیر 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 [۱٤].

مرگ سلولی ناشی از تاثیر ترکیبات سمی باعث اختلال در الگوی میتوز سلولی در بافت ها شده و منجر به اختلال در تماس سلولی در طی تمایز

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-12]

می‌شود. این فرایند منجر به اختلال در عمل القاءِ تمایز و اندام زایی صحیح می‌گردد [۳۱].
بررسی‌ها نشان داده‌اند که ناهنجاری‌زا ها 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

کوپلیمر تری بلاک BDP18 با ساختار PLA-PEG2000-PLA اثرات سمیت و تراتوژنیک 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 می نماییم.

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 liofilization 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.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-12]

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: effectes 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 toxicity542 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 Reprouduction 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.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-12]