

بررسی ضایعات پاتولوژیک و تغییرات آنزیمی ناشی از تزریق نانوامولسیون

تازه طراحی شده در بافت کبد موش سوری

• عادلہ دیوسالار* دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران صندوق پستی ۳۱۹۷۹-۳۷۵۵۱

• زهره زارع: دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران صندوق پستی ۳۱۹۷۹-۳۷۵۵۱

تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۰

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۰

چکیده

این تحقیق به بررسی سمیت نانوامولسیون طراحی شده با فرمولاسیون جدید روی بافت کبد موش سوری پرداخته شده است. به همین منظور تعداد ۶۰ موش سوری نر با وزن ۳۰ تا ۴۰ گرم انتخاب شد. به نمونه‌های مورد آزمایش، ۵۰۰ ماکرولیتزر از نانوامولسیون به صورت تزریق درون صفاقی افزوده و بعد از فاصله زمانی ۱، ۵ و ۱۰ روز، مطالعات بررسی سمیت از طریق تکنیک‌های هیستوتکنیک و سنجش آنزیم‌های کبدی ALT و AST و آلکالین فسفاتاز انجام گرفت. نتایج مطالعات هیستوتکنیک روی بافت کبد هیچ تغییر معنی‌داری در تعداد سلول‌های کوپفر و هپاتوسیت و همچنین قطر پورت‌ها نشان نداد اما تغییراتی در نظم و انسجام سلول‌های کبدی نمونه‌های تیمار نسبت به کنترل مشاهده شد که می‌توان آن را یکی از اثرات جانبی نانوامولسیون به حساب آورد. همچنین نتایج سنجش‌های آنزیم‌های کبدی، هیچگونه اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های کنترل و مورد آزمایش نشان نداد به این مفهوم که در تمام مقایسه‌ها P value به نحو قابل توجهی بالاتر از ۰/۰۵ بود. با توجه به داده‌های بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که نانوامولسیون طراحی شده در دوز ۵۰۰ ماکرولیتزر در موش‌های سوری نر اثرات جانبی کمی دارد و می‌تواند بعنوان حامل داروهای مختلف از جمله داروهای شیمی درمانی بکار برده شود.

کلمات کلیدی: نانوامولسیون، آنزیم‌های کبدی، ضایعات پاتولوژیک، هیستوتکنیک



مقدمه

نانوامولسیون‌ها، بسیار ریز شده یا زیر میکرون می‌باشند که اندازه قطره‌های آنها بین ۲۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر می‌باشد. نانوامولسیون‌ها بعلت اندازه ویژه‌ای که دارند با چشم غیرمسلح به صورت شفاف یا نیمه شفاف دیده می‌شوند و همچنین در مقابل رسوب شدن و خامه‌ای شدن پایداری و مقاومت لازم را دارند. این خصوصیات، نانوامولسیون‌ها را برای مطالعات بنیادی و کاربردی (شیمیایی، دارویی، بهداشتی و غیره) بسیار مناسب نموده است (۳ و ۱۰).

تحویل دارو به تومورهای جامد یکی از مهمترین چالش‌ها در درمان سرطان است. استفاده از داروهای شیمی درمانی در آزمایشات بالینی نشان داده که این داروها به علت سینتیک‌های دارویی، تحویل کم و تجمع محدود در سلول هدف تخریب می‌شوند. نانوامولسیون‌ها نه تنها از ترکیبات دارویی محافظت می‌کنند بلکه تحویل داخل سلولی دارو را بوسیله پیش بردن و تسهیل کردن انتقال دارو در عرض غشای پلاسمایی بهبود می‌بخشند. استفاده از یک سیستم امولسیون باعث می‌شود که مقادیر تزریقی کمتری در مقایسه با یک محلول مایع استفاده گردد. بعلاوه، به دلیل اینکه داروهای لیپوفیلی درون فاز روغنی داخلی تجمع می‌یابند و از تماس مستقیم با مایعات بدن و بافت‌ها دور می‌مانند (۱۲ و ۱۳).

کبد یک اندام پیچیده و بزرگ می‌باشد که نقش اصلی آن طراحی و مدیریت متابولیسم کربوهیدرات، پروتئین و چربی است. این اندام، نقش محوری در تغذیه و متابولیسم ویتامین‌ها دارد. کبد مسئول سنتز پروتئین‌های حیاتی مثل آلبومین، فاکتورهای انعقادی، آپوپروتئین‌ها و غیره است و نقش مهمی در عملکرد سیستم ایمنی به واسطه داشتن سلول‌های ماکروفاژی و کوپفر ایفا می‌کند (۹). یکی از مهمترین اعمال کبد علاوه بر سوخت و ساز مواد مختلف، سم‌زدایی گزنوبیوتیک‌ها، مواد آلوده کننده محیطی و داروهای شیمیایی است (۱۴).

حساس‌ترین و پر مصرف‌ترین آنزیم‌های تشخیصی کبد، آمینوترانسفرازها هستند که آسپارات آمینوترانسفراز (SGOT یا AST) و آلانین آمینوترانسفراز (SGPT یا ALT) را شامل می‌شوند. آنزیم‌های کبدی ALT و AST، درون سلولی هستند و در مواردی که آسیب سلولی رخ دهد، وارد خون می‌شوند. قابل ذکر است که به صورت طبیعی آنزیم ALT در سیتوزول و آنزیم AST در میتوکندری سلول‌های کبدی قرار دارند. نکرور کبدی منجر به افزایش سطح سرمی آنزیم‌های شاخص می‌شود که از

کبد به داخل خون، آزاد می‌شوند. افزایش سطح آنزیم‌های ALT و AST نشان دهنده آسیب‌های کبدی می‌باشد (۴).

در این تحقیق، پس از سنتز و شناسایی خصوصیات شیمیایی و فیزیکی نانوامولسیون طراحی شده با فرمولاسیون جدید، به بررسی سمیت نانوامولسیون فوق یا عبارتی نانوتوکسیسیته این سیستم نانوامولسیونی بعنوان یک سیستم حامل دارو روی بافت کبد موش سوری پرداخته شده است.

هدف از این تحقیق، بررسی سمیت از طریق تکنیک‌های هیستوتکنیک و بررسی اندیکاتورهای مهم کبدی (آنزیم‌های کبدی ALT و AST و آلکالین فسفاتاز) روی موش‌های تیمار شده با نانوامولسیون در مقایسه با موش‌های کنترل می‌باشد.

مواد و روشها

این تحقیق تجربی روی ۶۰ موش سوری با وزن ۳۰ تا ۴۰ گرم انجام شد و موش‌ها به سه گروه کنترل، شم (گروهی که بجای نانوامولسیون، ۵۰۰ میکرولیتر آب دریافت کرده‌اند) و تیمار تقسیم شده‌اند. به نمونه‌های مورد آزمایش یا تیمار، ۵۰۰ ماکرولیتر از نانوامولسیون طراحی شده بصورت تزریق درون صفاقی افزوده شد و بعد از فاصله زمانی ۱، ۵ و ۱۰ روز موش‌ها با کلروفورم بیهوش و آزمایشات هیستوتکنیک و بیوشیمیایی مربوطه انجام گردید. موش‌ها در شرایط استاندارد از نظر درجه حرارت، میزان رطوبت و دسترسی آزاد به آب و مواد غذایی نگهداری شدند.

امروزه با استفاده از میکروسکوپ فاز متضاد و تداخلی و رنگ‌آمیزی حیاتی اطلاعات بسیاری درباره وضعیت طبیعی سلول‌های زنده در زمان حیات آنها کسب شده است با این حال بسیاری از انواع سلول‌ها را نمی‌توان به صورت زنده مجزا نموده و مطالعه کرد. بعلاوه رابطه سلول‌ها با یکدیگر و با ماده بین سلولی را از طریق تهیه برش‌های بافتی و سلولی بهتر می‌توان درک نمود. برای آماده‌سازی نمونه جهت بررسی میکروسکوپی اعمال متعددی صورت می‌گیرد که شامل: تثبیت، آب‌گیری، الکل‌زدایی یا شفاف کردن، نفوذ پارافین، قالب‌گیری، برش‌برداری و چسباندن لامل است. برش‌های پارافینی چسبانده شده بر لام‌ها باید از هفت مرحله متوالی عبور داده شوند تا در نهایت یک لام آماده میکروسکوپی تهیه گردد. این مراحل بترتیب شامل: پارافین‌زدایی، خارج نمودن حلال پارافین، آبدهی، رنگ‌آمیزی و چسباندن لامل می‌باشد.



در شکل‌های ۱ تا ۳ فتومیکروگراف بافت کبد تیمار شده با غلظت ثابتی از نانوامولسیون پس از گذشت زمان‌های مختلف انکوباسیون ۱، ۵ و ۱۰ روز در مقایسه با نمونه کنترل نشان داده شده است.

نتایج نشان می‌دهد که قطر ناحیه پورت و تعداد سلول‌های کوپفر (نمودار ۱) و هپاتوسیت کبد (نمودار ۲) موش‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه کنترل هیچ تفاوت معنی‌داری نداشتند. اما در نمونه‌های تیمار نظم و یکپارچگی سلول‌های هپاتوسیت تا حدودی از بین رفته است.

یکی دیگر از روش‌های بررسی آسیب‌های احتمالی ناشی از نانوامولسیون‌ها، بررسی‌های سرولوژیک می‌باشد که در زیر هر کدام بطور جداگانه شرح داده می‌شود. در این بخش، مقادیر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی کبد مانند آلانین آمینوترانسفراز، آسپارات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز موجود در سرم موش‌های تیمار شده با نانوامولسیون پس از زمان‌های انکوباسیون متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفتند.

همانگونه که نتایج موجود در نمودارهای ۳ تا ۵ نشان می‌دهد گروه تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل که هیچ ماده‌ای دریافت نکرده و همچنین گروه شم که به همین مقدار آب دریافت کرده است تغییر معنی‌داری در میزان آلانین آمینوترانسفراز، آسپارات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز نشان ندادند. کاهش یا افزایش مقدار این نشانگرها در خون نشانه آسیب به بافت مورد نظر یا تغییر شرایط بدن می‌باشد.

نتایج آزمون‌های عملکردی کبد، هیچگونه اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های شاهد، شم و مورد آزمایش نشان نداد به این مفهوم که در تمام مقایسه‌ها P value به نحو قابل توجهی بالاتر از ۰/۰۵ بود. نمودارهای فوق، هر کدام سطح سرمی پارامتر مورد نظر و نمونه کنترل و شم را مقایسه کرده است. با اینکه برخی تغییرات در سطح پارامترهای سرم مشاهده می‌شود اما این تغییرات معنی‌دار نیست.

به منظور بررسی دقیق تغییرات مورفولوژیک در بافت کبد موش‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل، با استفاده از نرم‌افزار image J بررسی‌های مورفولوژیک روی قطر ناحیه پورت، تعداد سلول‌های کوپفر و هپاتوسیت و در نهایت نظم سلول‌ها در بافت کبدی انجام گرفت. سپس آنالیزها داده‌ها برای مشخص کردن معنی‌دار بودن این تغییرات با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

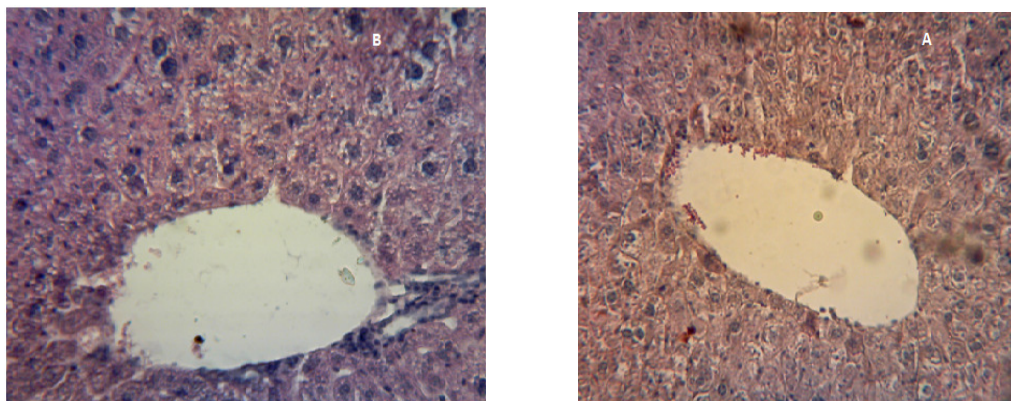
کلیه موش‌ها بعد از فاصله زمانی ۱، ۵ و ۱۰ روز تیمار با کلروفرم بیهوش و نمونه‌های خونی از طریق قلب جمع‌آوری شدند و سپس در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در ۳۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید تا مقادیر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی کبد مانند آلانین آمینوترانسفراز، آسپارات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز موجود در سرم حاصل، برای بررسی مورد استفاده قرار گیرد. برای اندازه‌گیری این نشانگرها از دستگاه اتوآنالیزر استفاده شد. داده‌ها از نظر آماری، با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و تست توکی (Tukey) ارائه گردیدند. معیار استنتاج $Mean \pm S.E.M$ بود و محاسبه آماری برای تعیین وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) بین گروه‌های کنترل، شم و تیمار بکار برده شد.

نتایج

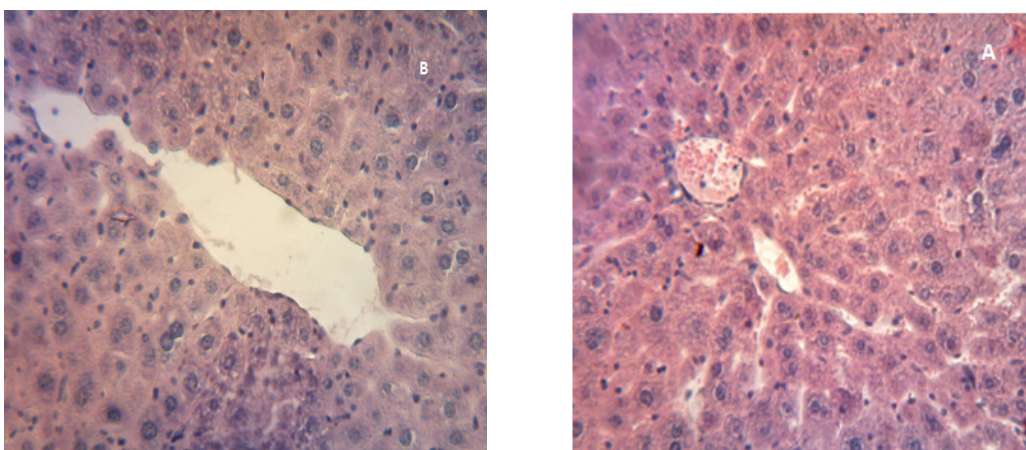
به منظور بررسی تاثیر نانوامولسیون بر کبد موش سوری، بعد از رنگ‌آمیزی با همتوکسیلین-ائوزین تغییرات آسیب‌شناسی مورد ارزیابی قرار گرفت و با موش‌های کنترل که هیچ تزریقی دریافت نکرده بودند، مقایسه گردیدند.

به منظور بررسی دقیق تغییرات مورفولوژیک در بافت سه فاکتور (۱) قطر ناحیه پورت، (۲) تعداد سلول‌های کوپفر و هپاتوسیت و (۳) نظم سلول‌ها در بافت کبد مورد بررسی قرار گرفت.

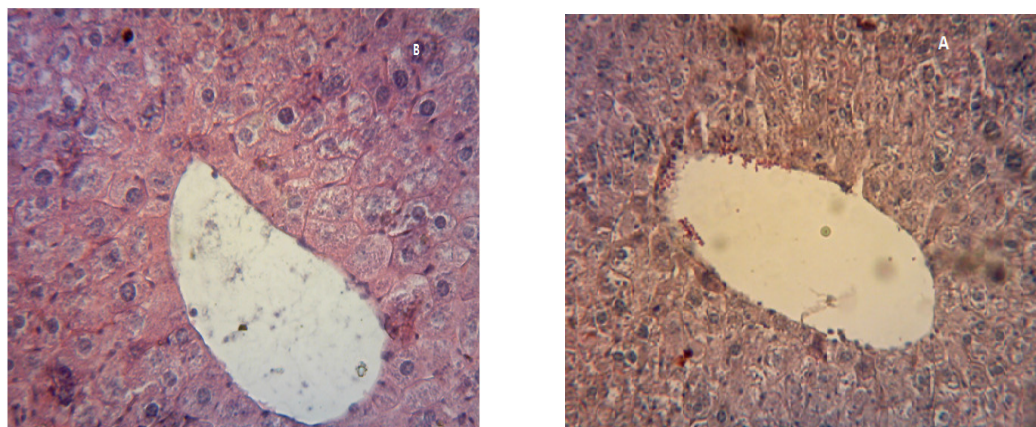




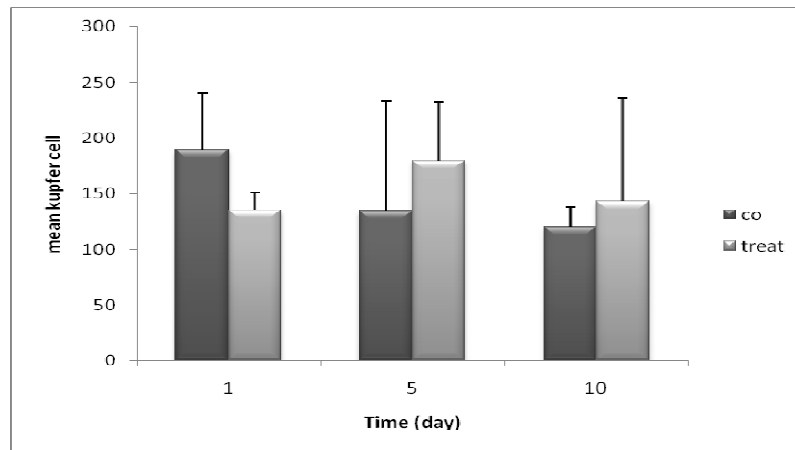
شکل ۱: نمای ریزبینی از بافت کبد گروه کنترل (A) و تیمار شده (B) با دوز ۵۰۰ میکرولیتر از نانومولسیون، یک روز بعد از تزریق دارو به کمک رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین (بزرگنمایی ۲۰x)



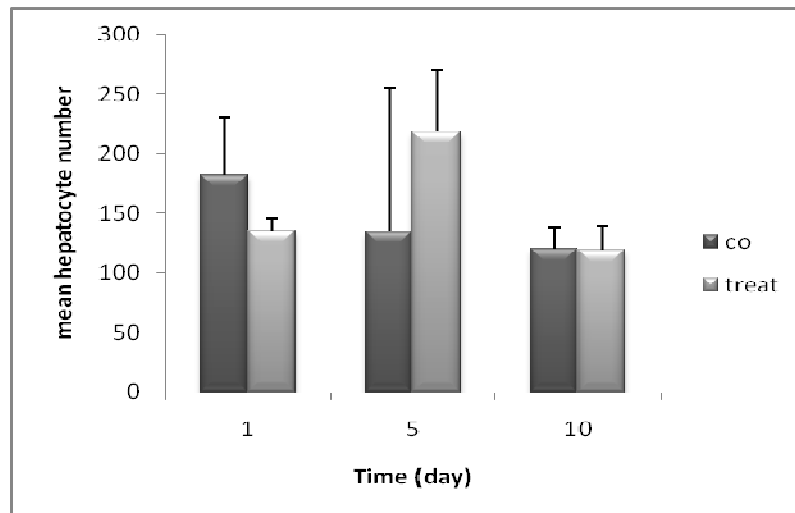
شکل ۲: نمای ریزبینی از بافت کبد گروه کنترل (A) و تیمار شده (B) با دوز ۵۰۰ میکرولیتر از نانومولسیون، ۵ روز بعد از تزریق دارو به کمک رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین (بزرگنمایی ۲۰x)



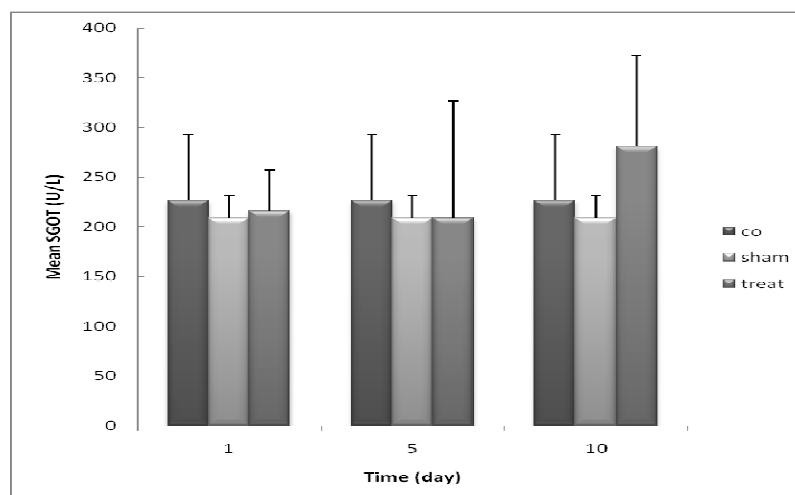
شکل ۳: نمای ریزبینی از بافت کبد گروه کنترل (A) و تیمار شده (B) با دوز ۵۰۰ میکرولیتر از نانومولسیون بدون ماده مؤثره، ۱۰ روز بعد از تزریق دارو به کمک رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین (بزرگنمایی ۲۰x)



نمودار ۱: تغییرات تعداد سلول‌های کوپفر در نمونه تیمار و کنترل در فاصله زمانی ۱، ۵ و ۱۰ روز بعد از تزریق نانومولسیون

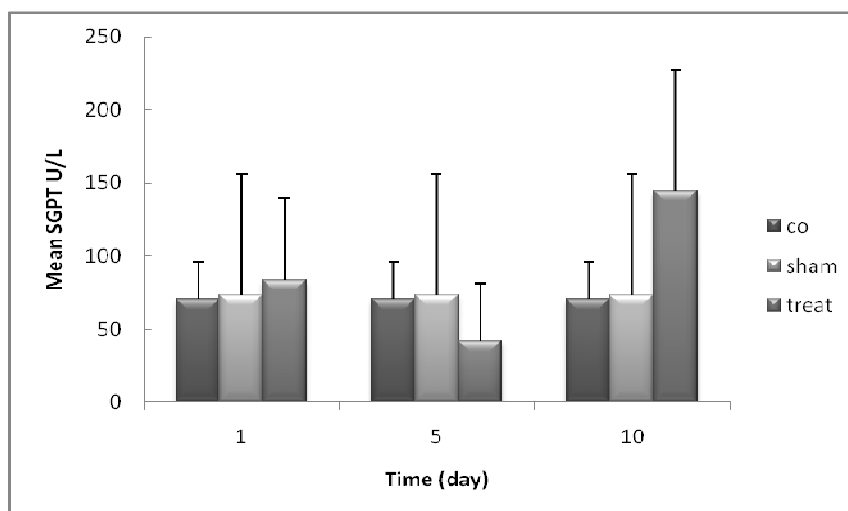


نمودار ۲: تغییرات تعداد سلول‌های هپاتوسیت در نمونه تیمار و کنترل در فاصله زمانی ۱، ۵ و ۱۰ روز بعد از تزریق نانومولسیون

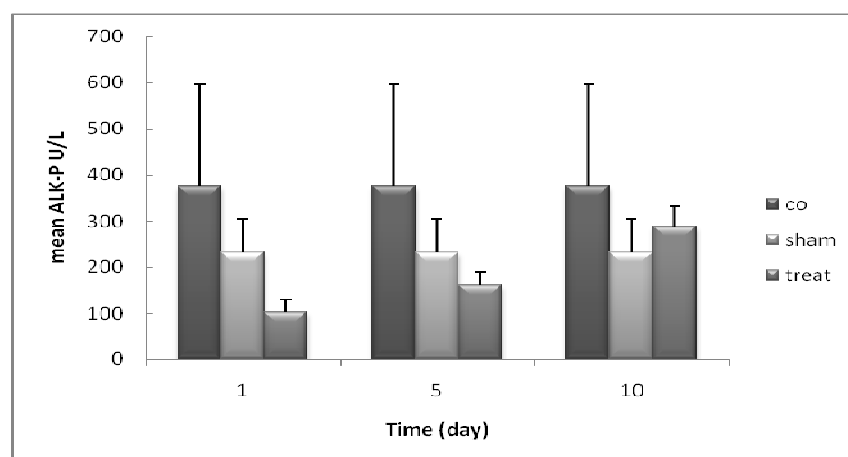


نمودار ۳: مقایسه گروه دریافت کننده ۵۰۰ ماکرولیتر نانومولسیون بدون ماده مؤثره و گروه‌های کنترل و شم در میزان آسپاراتات آمینو ترانسفراز سرم. تفاوت معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).





نمودار ۴: مقایسه گروه دریافت کننده ۵۰۰ ماکرولیتزر نانومولسیون بدون ماده مؤثره و گروه‌های کنترل و شم در میزان آلانین آمینو ترانسفراز سرم. تفاوت معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).



نمودار ۵: مقایسه گروه دریافت کننده ۵۰۰ ماکرولیتزر نانومولسیون بدون ماده مؤثره و گروه‌های کنترل و شم در میزان آلکالین فسفاتاز سرم. تفاوت معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

بحث

آسپاراتات آمینو ترانسفراز، آلکالین فسفاتاز (بعنوان شاخص‌های کبد)، میزان نیتروژن سرم و کراتینین (بعنوان شاخص‌های کلیه) مورد سنجش قرار گرفتند. علاوه بر آن بررسی‌های هیستوپاتولوژی روی بافت کبد انجام شد. نتایج نشان داد که هیچ تفاوت چشمگیری در سطح شاخص‌های سرم مشاهده نشد بعلاوه کم یا هیچ سمیت سیستماتیکی در بافت‌ها مشاهده نگردید (۱).

مطالعات بافت‌شناسی روی بافت‌هایی انجام می‌شود که بعد از کشتن حیوان فیکس شده باشند و تغییرات در مورفولوژی بافت یا سلول با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام می‌شود (۷).

یکی از روشهای مطالعه و بررسی نانو سمیت و اثرات جانبی نانو مواد، مطالعه تاثیر آنها در درون ارگانسیم‌های زنده سالم می‌باشد. مطالعات *in vivo* به طور معمول در موش‌ها یا رت‌ها انجام می‌شود (۸). برای مطالعه سمیت نانو مواد در *in vivo* می‌توان از یکی از سه روش تغییرات در شیمی سرم خون، تغییر در ریخت‌شناسی بافت از طریق هیستوتکنیک هیستولوژی و پراکنش زیستی سراسری نانو مواد در بدن استفاده کرد (۵).

Shyam و همکاران (۲۰۱۰) داروی کورکامین را با استفاده از پلی کاپرولاکتون بصورت نانومولسیون فرموله کردند. برای بررسی سمیت حاد آن آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز،

برخی از بافت‌ها که به طور معمول مورد مطالعه قرار می‌گیرد شامل: بافت مغز، چشم، ریه، کبد، کلیه، طحال و قلب می‌باشند (۲).

نتایج حاصل از بررسی روی بافت کبد هیچ تغییر معنی‌داری در تعداد سلول‌های کوپفر و هپاتوسیت و همچنین قطر پورت‌ها نشان نداد اما تغییراتی در نظم و انسجام سلول‌های کبد در نمونه تیمار نسبت به نمونه کنترل مشاهده شد. در نتیجه نانوامولسیون در دوز ۵۰۰ ماکرولیتراثرات جانبی چشمگیری ندارد و در بافت کبد نیز باعث تغییرات اندکی در بافت شده که می‌توان آن را یکی از اثرات جانبی به حساب آورد. البته با توجه به داده‌های مربوط به سرم خون با اینکه نانوامولسیون تغییراتی در بافت کبد داده اما تغییرات آنقدر نبوده که بتواند سلول‌ها را تخریب و باعث آزادسازی آنزیم‌های مورد نظر شود.

یکی از معمولترین سنجش‌های سمیت در محیط *in vivo* بررسی ترکیب خون و شیمی سرم برای بررسی تغییرات بعد از در معرض قرار گرفتن با نانومواد می‌باشد. در اینجا هموستاز خون بعنوان فاکتوری برای سمیت استفاده می‌شود جاییکه هر انحراف، افزایش یا کاهش در اجزای خون، از حالت طبیعی (قبل از در معرض قرارگیری) به عنوان سمیت شناخته می‌شود (۵). در این تحقیق، برای بررسی سمیت و اثرات جانبی نانوامولسیون‌های مورد نظر پارامترهای سرم شامل: آسپارات آمینو ترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز به عنوان شاخص‌های کبد مورد مطالعه قرار گرفت.

ایجاد آسیب‌های کبدی را می‌توان با بررسی آزمون‌های عملکرد و در عین حال مطالعات هیستوپاتولوژیک بافت کبد نیز بررسی نمود (۱۱). آنزیم‌های کبدی ALT و AST، درون سلولی هستند و در مواردی که آسیب سلولی رخ دهد، وارد خون می‌شوند. قابل ذکر است که به صورت طبیعی آنزیم ALT در سیتوزول و آنزیم AST در میتوکندری سلول‌های کبدی قرار دارد. AST بطور طبیعی در انواع مختلف بافت‌ها از قبیل کبد، قلب، ماهیچه، کلیه و مغز قرار دارد. این آنزیم در زمان آسیب به هر کدام از این بافت‌ها وارد خون می‌شود. برای مثال میزان غلظت سرمی آن در هنگام حمله‌های قلبی و مشکلات ماهیچه‌ای افزایش می‌یابد. قسمت عمده‌ی ALT برعکس AST بطور طبیعی در کبد یافت می‌شود. اگر چه نمی‌توان گفت که این آنزیم در نتیجه آسیب کبدی وارد خون می‌گردد، این آنزیم منحصراً در کبد قرار دارد اما کبد جایی است که در برگیرنده

بیشترین غلظت این آنزیم است.

بنابراین نسبتاً از این آنزیم بعنوان شناساگر ویژه موقعیت کبدی استفاده می‌شود (۶). آلکالین فسفاتاز (ALP) آنزیمی است که عمدتاً در کبد و مغز استخوان تولید می‌شود، همچنین این آنزیم از روده، کلیه و جفت استخراج می‌گردد.

نتایج آزمون‌های عملکردی کبد، هیچگونه اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های شاهد، شم و مورد آزمایش نشان نداد به این مفهوم که در تمام مقایسه‌ها P value به نحو قابل توجهی بالاتر از ۰/۰۵ بود. با توجه به نتایج بدست آمده برای آزمون ALT، عدم بروز آسیب کبدی، AST، عدم آسیب در کبد، عضله قلب، عضله اسکلتی، کلیه‌ها، مغز، پانکراس، ریه‌ها، لکوسیت‌ها و اریتروسیت‌ها، آلکالین فسفاتاز (با توجه به این که در انسان افزایش کمتر از سه برابر آن تقریباً در هر نوع بیماری کبدی و بیشتر از چهار برابر مقدار طبیعی آن عمدتاً در اختلال کلسیاتیک کبدی، بیماری‌های ارتشاحی کبد مثل سرطان و برخی بیماری‌های استخوانی دیده می‌شود) و اینکه هیچ یک از فاکتورهای مذکور در این تحقیق افزایش معنی‌داری نداشتند، عدم بروز مشکلات مذکور ثابت می‌شود.

با توجه به داده‌های بدست آمده در محیط *in vivo* می‌توان نتیجه گرفت که نانوامولسیون طراحی شده در دوز ۵۰۰ ماکرولیترا مورد استفاده در موش‌های سوری نر با وزن ۳۰ تا ۴۰ گرم اثرات جانبی کمی داشته است و می‌توان در مطالعات بعدی دوز مؤثر و بدون عوارض جانبی را بدست آورد تا به عنوان حامل داروهای مختلف از جمله داروهای شیمی درمانی، داروهای کم محلول در آب و فرمولاسیون داروایی که از طریق پوست جذب می‌شوند بکار برده شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه خوارزمی انجام یافته است که بدینوسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1-Baker, G.L.; Gupta, A.; Clark, M.L.; Valenzuela, B.R.; Staska, L.M.; Harbo, S.J.; Pierce, J.T. and Dill, J.A. 2008. Inhalation toxicity and lung



- toxicokinetics of C40 fullerene nanoparticles and microparticles. *Toxicol. Sci.*, 101:122–131.
- 2-Janbaz, K.H.; Saeed, S. and Gilani, A.H., 2002.** Protective effect of rutin on paracetamol and CCl₄induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*, 64:557-573.
- 3-Kratz, F., 2008.** Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J. Control. Rel.*, 132:171–183.
- 4-Lachman, L.; Lieberman, H.A. and Kanig, H.A., 2008.** The theory and practice of industrial pharmacy; 3rd ed. pp.510-1.
- 5-Lewinski, N.; Colvin, V. and Drezek, R., 2008.** Cytotoxicity of nanoparticles, *Small.*, 4:26-49.
- 6-Lieberman, H.A.; Rieger, M.M. and Banker, G.S., 2006.** Pharmaceutical dosage forms: Disperse systems; Vol. 3, 2 ed. Marcel Dekker Inc. pp.339-344.
- 7-Mitra, S.K.; Venkataranganna, M.V.; Sundaram, R. and Gopumadhavan, S., 1998.** Protective effect of HD-03, an herbal formulation, against various hepatotoxic agents in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 63:181-186.
- 8-Mortensen, L.J.; Oberdorster, G.; Pentland, A.P. and DeLouise, L.A., 2008.** *In vivo* skin penetration of quantum dot nanopartiles in the murine model: The effect of UVR, *Nano Lett.*, 8:2779–2787.
- 9-Shiota, G.; Tsuchiya, H. and Hoshikawa, Y., 2006.** The liver as a target organ of retinoids. *Hepatol. Res.*, 36:248-254.
- 10-Shyam, S.; Bansal, M. and Aqil, F., 2011.** Advanced drug-delivery systems of curcumin for cancer Chemoprevention, *Cancer Prev. Res.* 5P.
- 11-Solans, C.; Izquierdo, P.; Nolla, J. and Azemar, N., 2005.** Nano-emulsions, *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* 10:102-110.
- 12-Tiwari, S.B. and Shenoy, D.B., 2006.** Nanoemulsion formulations for improved oral delivery of poorly soluble drugs. 9th Annual NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show. Northeastern University. USA.
- 13-Vivian, J.T. and Callis, P.R., 2001.** Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys. J.*, 80:2093-2109.
- 14-Zhu, M.T.; Feng, W.Y.; Wang, B.; Wang, T.C.; Gu, Y.Q.; Wang, M.; Wang, Y.; Ouyang, H.; Zhao, Y.L. and Chai, Z.F., 2008.** Comparative study of pulmonary responses to nano-and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology*, 247:102–111.

