Veterinary Clinical Pathology, Vol.13, No. 49, Spring 2019

"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2019.664904**

The role of vitamin A in preventing fetal injuries caused by injection of *Escherichia coli* lipopolysaccharide in the rat

Delkhosh, A.[1], Delashoub, M.[2*], Khakpour, M.[3]

1- D.V.M. Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
*Corresponding author's email: masoud-delashoub@iaut.ac.ir
(Received: 2018/6/10 Accepted: 2019/2/5)

Abstract

Lipopolysaccharides (LPS) induce adverse fetal development including intrauterine growth retardation (IUGR), intrauterine fetal death (IUFD), embryonic resorption and preterm delivery which are all related to LPS-induced oxidative stress. This study aimed to investigate the protective role of vitamin A against LPS induced fetal defects in the rat. In this study, 48 pregnant female rats were divided into 4 groups. On days 15 to 17 of pregnancy, 75 mg/kg of *E. coli* LPS was injected intraperitoneally in groups 1 and 2 the second and third groups received 100 mg/kg of vitamin A intramuscularly a week before injection of LPS. The fourth group was the control group and placebo was injected to simulate injection stress. On the 18th day, all rats were euthanized. The number of live and dead fetuses and resorption sites was counted. Live fetuses in each litter were weighed, crown-rump and tail lengths measured and skeletal development was evaluated. In addition, maternal liver, placenta, and fetal liver samples were excised for measurement of MDA and GSH contents. The results showed that administration of LPS significantly increased fetal mortality, decreased fetal weight and crown-rump and tail lengths of live fetuses and retarded skeletal ossification in caudal vertebrae, anterior and posterior phalanges and supraoccipital bone. Our study showed that co-treatment of vitamin A and LPS could decrease LPS induced defects and improve injuries indicating the preventive effects of vitamin A against LPS induced injuries during fetal development.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Vitamin A, Lipopolysaccharide, *Escherichia coli*, Fetal injury, Antioxidant.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2019.664904

نقش ویتامین A در پیشگیری از صدمات جنینی ناشی از تزریق لیپوپلی‌ساکارید باکتری *اشریشیا کولای* در موش صحرایی

عارف دلخوش[۱]، مسعود دل‌آشوب[۲*]، منصور خاکپور[۳]

۱- دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: masoud-delashoub@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۷/۳/۲۰ پذیرش نهایی: ۹۷/۱۱/۱۶)

چکیده

لیپوپلی‌ساکاریدها از عوامل آسیب‌رسان به جنین در طی مراحل رشد می‌باشند. تاخیر در رشد جنین، مرگ داخل رحمی جنین، جذب جنینی و زایمان زودرس، با استرس اکسیداتیو ناشی از لیپوپلی‌ساکاریدها مرتبط می‌باشد. در تحقیق حاضر اثر محافظتی ویتامین A در برابر صدمات جنینی ناشی از لیپوپلی‌ساکاریدها در موش صحرایی بررسی شد. در این مطالعه تجربی تعداد ٤٨ سر موش صحرایی آبستن به ٤ گروه تقسیم و در روزهای ۱۵ تا ۱۷ آبستنی، به موش‌های گروه‌های اول و دوم، مقدار ۷۵ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از لیپوپلی‌ساکارید باکتری *اشریشیاکولای* به صورت داخل صفاقی تزریق شد. همچنین موش‌های گروه‌های دوم و سوم یک هفته قبل از تزریق لیپوپلی‌ساکارید، روزانه مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، ویتامین A به صورت داخل عضلانی دریافت کردند. به موش‌های گروه چهارم به عنوان شاهد، برای مشابه‌سازی استرس تزریق، دارونما تزریق شد. در روز ۱۸ تمامی موش‌ها آسان‌کشی شدند. تعداد جنین‌های زنده و مرده شمارش شده، سپس جنین‌های زنده وزن گردیده و طول تاج-کفل، متاکارپ، متاتارس، بندهای انگشتان دست و پا و جناغ اندازه‌گیری شد. همچنین در کبد مادر، کبد جنین و جفت، میزان مالونیل‌دی‌آلدئید و گلوتاتیون اندازه‌گیری شد. تجویز لیپوپلی‌ساکارید به‌طور معنی‌داری موجب افزایش تلفات جنینی، کاهش وزن جنین و طول تاج-کفل در جنین‌های زنده و کاهش استخوانی شدن اسکلت در متاکارپ، متاتارس، بندهای انگشتان دست و پا و جناغ شد ($p<۰/۰۵$). تجویز همزمان ویتامین A و لیپوپلی‌ساکارید موجب کاهش آسیب‌های ناشی از لیپوپلی‌ساکارید و بهبود صدمات مربوطه شد که نشان‌دهنده قدرت حفاظتی ویتامین A در برابر عوارض ناشی از لیپوپلی‌ساکاریدها در جنین می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ویتامین A، لیپوپلی‌ساکارید، *اشریشیاکولای*، آسیب جنینی، آنتی‌اکسیدان.

مقدمه

در طی تشکیل جنین، سیگنال‌های محیطی در شکل‌گیری سیستم نوروآندوکرین و رفتار نتاج تاثیرگذار می‌باشند. تحقیقات گسترده در گونه‌های مختلف نشان داده که استرس پیش از تولد، التهاب یا عفونت مادرزادی و تغذیه نامناسب جنین، موجب تغییر در فیزیولوژی و رفتار در زندگی پس از تولد خواهد شد (Welberg and Seckl, 2001; Coe *et al*., 2002; Cottrell and Seckl, 2009). استرس مادری در طی بارداری با محدودیت رشد داخل رحمی در ارتباط بوده و موجب افزایش احتمال تولد پیش از موعد می‌گردد (Rondo *et al*., 2003)، که معمولاً با اختلالات ادراکی و هیجانی اوایل زندگی نیز همراه می‌باشد (Talge *et al*., 2007). از این‌رو وزن پائین در زمان تولد به‌عنوان یکی از شاخص‌های غیرطبیعی بودن محیط رحم می‌باشد که موجب افزایش احتمال ابتلا به بیماری‌های مختلف در آینده خواهد شد (Barker *et al*., 1993).

لیپوپلی‌ساکارید باکتریایی (LPS) ترکیب ویژه‌ای در غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که در باکتری‌های گرم مثبت وجود ندارد و یک ماده توکسیک (اندوتوکسین) با فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف در شرایط *in vivo* و *in vitro* می‌باشد (Rietschel *et al*., 1994). در صورتی‌که مقادیر زیادی از LPS در شرایط *in vivo* از میکروارگانیسمی آزاد شود، می‌تواند منجر به سندرم‌های شدیدی نظیر اختلال در چندین اندام، انعقاد داخل عروقی منتشر، شوک توکسیک هیپوولمیک (Biswas and Lopez-Collazo, 2009) و سقط شود (Parant and Chedid, 1964; Chaouat *et al*., 1990; Haddad *et al*., 1995). این سندرم‌ها عمدتاً توسط میانجی‌های فعال بیولوژیک نظیر فاکتور نکروزدهنده تومور (TNF) و نیتریک اکساید (NO) که از سلول‌های مختلف به‌ویژه ماکروفاژها آزاد می‌شوند، ایجاد می‌گردد (Raetz *et al*., 1991; Rietschel *et al*., 1994; Biswas and Lopez-Collazo, 2009). انسان و دام و پرندگان، معمولاً به‌صورت مداوم، در اثر برخورد با باکتری‌های گرم منفی که به‌صورت عمده در دستگاه گوارش آن‌ها وجود دارند، در معرض مقادیر پائینی از لیپوپلی‌ساکاریدها می‌باشند (Jacob *et al*., 1997). به دنبال هرگونه استرس در دستگاه گوارشی و مصرف الکل احتمال ورود این ماده به جریان گردش خون و بیماری‌زایی در نقاط مختلف بدن وجود دارد (Fukui *et al*., 1991; Delashoub and Khojasteh, 2012). با توجه به اینکه در دوران آبستنی به‌دنبال استرس‌های فراوان سیستم دفاعی بدن مادر دچار ضعف می‌شود، احتمال ورود این باکتری‌ها به جریان گردش خون وجود دارد. در بررسی‌های انجام شده، گزارش گردیده که انتقال LPS از مادر به جنین موجب عوارض متعددی در جنین شده است که اختلال در رشد جنین یا مرگ جنین در دوران آبستنی از آن دسته می‌باشد (Romero *et al*., 1988). اختلالات مذکور در انسان بیشتر همراه با سقط جنین بوده (Romero *et al*., 1988) و در جوندگان می‌تواند همراه با مرگ جنین در داخل رحم و یا جلوگیری از رشد جنین و ایجاد جنین نارس باشد (Ogando *et al*., 2003). تحقیقات پژوهشگران نشان داده است که اندوتوکسین‌های روده‌ای توانایی ایجاد نکروز در جنین، سقط جنین‌های فوری، آسیب به اندام‌های جنین، مرگ جنین و ناهنجاری‌های گوناگون در انواع گونه‌ها را دارا می‌باشند

(Coid *et al*., 1976). به‌طوری‌که چنین عفونتی در زنان با عارضه سقط جنین، زایمان زودرس و پاره شدن پیش از موعد غشاء جنینی همراه بوده است (Hillier *et al*., 1989; Gibbs and Duff, 1991). همچنین تجویز لیپوپلی‌ساکارید *اشریشیاکولای* به صورت یک دوز وریدی در روز ۸ آبستنی، موجب کاهش وزن جنین و افزایش ناهنجاری‌های جنینی با افزایش غلظت LPS شده است (Lanning *et al*., 1983). به‌نظر می‌رسد که سایتوکاین‌های پیش‌التهابی آزادشده تحت تاثیر LPS، نظیر اینترلوکین-۱ (Silver *et al*., 1997) و TNF (Gendron *et al*., 1990; Li *et al*., 2013) از فاکتورهای مهم در تحریک مرگ جنین داخل رحم توسط LPS می‌باشند. پژوهشگران گزارش نموده‌اند که TNF-α در افزایش میزان هم‌اکسیژناز-۱ ناشی از LPS در کبد موش نقش دارد (Rizzardini *et al*., 1994). از طرف دیگر LPS موجب اختلال در عملکرد آنزیم هم‌اکسیژناز-۱ در کبد جنین می‌شود که با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد همراه می‌باشد (Bautista *et al*., 1990). همچنین پروستاگلاندین‌ها نقش مهمی در سمیت جنینی ناشی از لیپوپلی‌ساکارید دارند. در برخی مطالعات نشان داده‌اند که گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که از ماکروفاژها به دنبال تحریک ناشی از حضور LPS آزاد می‌شوند، در مرگ داخل رحمی جنین و نیز تاخیر در رشد جنین در داخل رحم، موثر بوده و یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده آسیب‌های جنینی می‌باشند (Silver *et al*., 1995; Xu *et al*., 2006).

با توجه به مطالب فوق و تحقیقات انجام‌شده، این نکته به اثبات رسیده است که عوارض حاصل‌شده توسط LPS به دنبال بروز یک سمیت اکسیداتیو در بدن ایجاد می‌شود (Silver *et al*., 1995; Bautista *et al*., 1990). با توجه به نوع عارضه ایجادشده، استفاده از روش‌هایی برای کاهش سمیت اکسیداتیو LPS بسیار مهم بوده و یکی از این روش‌ها استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد (Buhimschi *et al*., 2003; Yuan-Hua *et al*., 2006). آنتی‌اکسیدان‌ها در بسیاری از سرطان‌ها به عنوان یک ماده محافظت‌کننده و همچنین پیشگیری‌کننده مطرح بوده‌اند و استفاده از آن‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو همواره توصیه شده است (Chen *et al*., 2005). در مطالعات انجام‌شده این نکته مشخص شده است که استفاده از داروهای آنتی‌اکسیدانی می‌تواند آسیب جنینی ایجادشده توسط LPS در موش را کاهش دهد (Buhimschi *et al*., 2003; Chen *et al*., 2005; Yuan-Hua *et al*., 2006). این نظریه وجود دارد که ممکن است اکثر بیماری‌های مهلک با برخی فعالیت‌های رادیکال‌های آزاد در ارتباط باشند. لذا آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند خطر پیشرفت اکثر بیماری مهلک را کاهش دهند و باعث عمری طولانی‌تر و با کیفیت بالاتر شوند (Parra *et al*., 1998).

گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز از جمله آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و ویتامین‌های A، C و E از جمله آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی می‌باشند (Cadenas and Packer, 1996; Block *et al*., 2008). مطالعات دانشمندان در سال ۲۰۰۳ نشان داده که ان-استیل سیستئین (N-acetylcysteine) که پیش‌ساز گلوتاتیون بوده و دارای نقش آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، قادر است نقش محافظتی در برابر سقط جنین ناشی از LPS داشته باشد. همچنین این ماده به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مستقیم از مرگ جنینی و زایمان

زودرس ناشی از التهاب جلوگیری می‌کند (Buhimschi *et al.*, 2003). گزارش‌ها نشان داده است که ویتامین C (اسید آسکوربیک) نیز در پیشگیری از نقص عضو جنینی در بارداری‌های تجربی دیابتی موثر می‌باشد (O'sullivan *et al.*, 1988). بررسی تاثیر اسید آسکوربیک بر مرگ داخل رحمی جنین و تاخیر رشد داخل رحمی موش‌ها نشان داده که درمان پیشگیرانه با اسید آسکوربیک به عنوان آنتی‌اکسیدان، از آسیب‌ها و نقص عضوهای جنینی ناشی از LPS ممانعت می‌کند، اما درمان بعدی با این ماده تاثیر محافظتی کمتری بر مرگ داخل رحمی جنین دارد (Chen *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2006). ویتامین A آنتی‌اکسیدانی محلول در چربی می‌باشد که از مولکول‌های زیستی محافظت می‌کند و فعالیت آندوژنی آنزیم‌های تخلیه‌شده در استرس اکسیداتیو و نیز ناشی از استعمال سیگار را تنظیم می‌کند (Xu *et al.*, 2006). خواص آنتی‌اکسیدانی ویتامین A در موارد تجویز پیش از زایمان به مادر نیز گزارش شده است (Alfonso *et al.*, 1996; Thébaud *et al.*, 1999). همچنین پژوهشگران اثرات محافظتی ویتامین A در برابر اثرات اکسیداتیو ناشی از مسمومیت با تتراکلریدکربن را در کبد گزارش نموده‌اند (Nordberg and Arner, 2001). از طرف دیگر بر اساس نتایج پژوهشگران، آنتی‌اکسیدان‌های مختلف از مرگ داخل رحمی جنین و تاخیر رشد داخل رحمی ناشی از لیپوپلی‌ساکاریدها در موش‌ها محافظت می‌کنند. همچنین استفاده همزمان از آنتی‌اکسیدان‌ها و لیپوپلی‌ساکارید، موجب کاهش آسیب‌های ناشی از لیپوپلی‌ساکاریدها در اندام‌ها می‌شود (Chen *et al.*, 2005).

هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی ویتامین A در محافظت از آسیب‌های جنین در برابر لیپوپلی‌ساکارید باکتری *اشریشیا کولای* بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر به‌صورت تجربی و در آزمایشگاه‌های دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز در طی سال‌های ۹۵ و ۹۶ در مدت ٦ ماه با رعایت حقوق حیوانات آزمایشگاهی و با دریافت کد کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی به شماره شناسایی IR.IAU.TABRIZ.REC.1396.44 انجام پذیرفت.

- **مواد شیمیایی مورد استفاده:** LPS (لیپوپلی‌ساکارید باکتری *اشریشیا کولای* سروتیپ $O_{127}:H_8$)، اسید اسکوربیک، Glutathione assay kit ، (Thiobarbituric acid reactive substances) TBARS و ویتامین A مورد استفاده در این مطالعه، از شرکت سیگما ساخت کشور آمریکا خریداری شدند.

- **حیوانات مورد آزمایش:** حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده در این مطالعه، موش‌های صحرایی نژاد ویستار بودند. موش‌های جنس ماده با وزن تقریبی ۱۵۰ الی ۲۰۰ گرم و به تعداد ۱۲۸ سر و موش‌های جنس نر با وزن تقریبی ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم و به تعداد ٦٤ سر، جهت جفت‌گیری ابتدایی انتخاب شدند. تمامی موش‌ها از مرکز نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز خریداری گردید. در ابتدا برای بررسی وضعیت سلامت، موش‌ها به مدت یک هفته در شرایط آزمایشگاه نگه‌داری شدند و هر روز از لحاظ بالینی مورد ارزیابی قرار گرفتند. یکی از معیارهای مهم

ارزیابی سلامت حیوانات، وزن‌گیری در روز صفر و تکرار وزن‌گیری در روز هفتم بود. حیوانات در قفس‌های فلزی با دمای محیط ۲۰ الی ۲۶ درجه سلسیوس، رطوبت ٤٠ الی ٧٤ درصد، تهویه ۱۰ الی ۱۵ بار در ساعت و روشنایی ۱۲ ساعت در روز (ساعت ۷ الی ۱۹) نگه‌داری شدند. از غذای آماده قابل دسترس به صورت پلت برای موش‌های صحرایی استفاده گردید. جهت انجام جفت‌گیری، حیوانات نر و ماده در طول مدت شب به نسبت ۲ به ٤ در داخل قفس قرار گرفتند. صبح روز بعد برای بررسی لقاح، حیوانات ماده از لحاظ تشکیل پلاک واژینال و همچنین وجود و یا عدم وجود اسپرم در اسمیر واژن مورد ارزیابی قرار گرفتند. موش های ماده‌ای که از نظر آزمایشات مذکور مثبت بودند به عنوان آبستن روز صفر تلقی شدند. سن موش‌های ماده در زمان آبستنی بین ۱۱ الی ۱۳ هفتگی و سن حیوانات نر در این مرحله ۱۲ الی ۱۳ هفته بود. در ادامه موش‌های ماده مثبت از نظر آزمایشات ذکرشده، در گروه‌هایی با محدوده وزنی ۲۰۰ الی ۲۵۰ گرم و به تعداد ۹٦ سر طبقه‌بندی شدند و حیواناتی که نتیجه آزمایش در آن‌ها منفی بود، حذف شدند.

- **نحوه انجام آزمایش در گروه‌های مختلف**: ٤ گروه ۱۲تایی از موش‌ها به‌صورت تصادفی انتخاب شده و در روزهای ۱۵ تا ۱۷ آبستنی، به حیوانات گروه‌های اول و دوم، مقدار ۷۵ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از LPS باکتری *اشریشیاکولای* (سروتیپ O_{127}:H_8) به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. البته موش‌های گروه‌های دوم و سوم از یک هفته قبل از تزریق LPS، روزانه مقدار ۱۰۰ mg/kg ویتامین A (رتینول، شرکت سیگما، آمریکا) را به صورت داخل عضلانی دریافت کردند. موش‌های گروه چهارم به عنوان شاهد بوده و برای مشابه‌سازی استرس تزریق به آن‌ها سالین نرمال تزریق شد. در روز ۱۸ آبستنی، تمامی حیوانات بعد از بیهوشی توسط اتر آسان‌کشی شده و رحم آن‌ها به صورت جداگانه وزن شد. سپس تعداد جنین‌های مرده و زنده ارزیابی شده و بعد از وزن‌کشی(ترازوی دیجیتال آزمایشگاهی AND ساخت کشور ژاپن) جنین‌های زنده و جفت آن‌ها، با استفاده از کولیس (دیجیتال، گوانگلو، ساخت کشور چین) اندازه جمجمه تا دم، متاکارپ، متاتارس، بندهای انگشتان دست و پا و جناغ در اسکلت جنین‌های زنده مشخص شد. جنین‌ها به مدت حداقل ۲ هفته در اتانول ۹۵ درجه (الکل اتیلیک، سیگما، آمریکا) نگه‌داری شده و بعد از انجام مراحل آماده‌سازی، اندازه بخش‌های مختلف بدن که می‌توانند شاخصی برای نشان دادن رشد جنین باشند، دقیقاً سنجیده شدند (Delashoub *et al*., 2012). در مسیر دیگر آزمایش، ٤ گروه ۱۲تایی دیگر از موش‌ها به‌صورت تصادفی انتخاب و مراحل تزریق دارو در آن‌ها مشابه با گروه‌های قبلی انجام شد، با این تفاوت که تزریق LPS به صورت تک‌دوز و تنها در روز ۱۵ آبستنی انجام شد و پس از سپری شدن ٦ ساعت از تزریق، حیوانات با استنشاق اتر، آسان‌کشی شده و پس از کالبدگشایی کبد مادرها و جنین‌های آن‌ها جداسازی شده و پس از هموژن گردیدن، از لحاظ مقادیر گلوتاتیون بافتی (GSH) و میزان پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) به ترتیب توسط کیت‌های Glutathione assay kit و TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

- **روش اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی**: سنجش پراکسیداسیون لیپیدی با اندازه‌گیری میزان

مالون‌دی‌آلدئید (malondialdehyde; MDA) با استفاده از تیوباربیتوریک اسید (TBA) انجام شد. بدین منظور ۵۰ میکرولیتر از نمونه بافتی مورد آزمایش در لوله آزمایش ریخته شده و سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. در ادامه بعد از اضافه کردن محلول حاوی ۲۹ میلی‌مول TBA در اسید استیک (خریداری شده از شرکت سیگما-آمریکا)، مجموعه کاملاً مخلوط شده و سپس به مدت یک ساعت در بن‌ماری ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از خنک شدن نمونه‌ها، ۲۵ میکرولیتر از اسید کلریدریک (hydro chloric acid; HCl) ۵ مول در لیتر به آن اضافه شد. نمونه حاصله با ۳/۵ میلی‌لیتر ان-بوتانول (N-butanol) به مدت ۵ دقیقه ترکیب شده و بعد از انجام سانتریفیوژ (مدل Rotofix46H، هتیش آلمان) با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس، فاز بوتانول جداسازی شده و ماده باقی‌مانده (برحسب نانومول بر میلی‌گرم) توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-VIS (**مدل UV2100 یونیکو، ساخت آمریکا**) در طول موج ۵۳۲ نانومتر مشخص شد (Savitha *et al*., 2005).

- **روش اندازه‌گیری مقادیر GSH**: سنجش مقادیر GSH با استفاده از متد Griffith انجام شد. بدین منظور ابتدا ۰/٤ میلی‌لیتر از بافت کبد هموژنیزه شده با ۰/٤ میلی‌لیتر از محلول اسید متافسفریک مخلوط گردید تا پروتئین‌های آن رسوب کند. بعد از ٤۰ دقیقه با استفاده از عمل سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه، پروتئین رسوبی جداسازی شد. در ادامه ٤۰۰ میکرولیتر از مایع رویی با ۰/٤ میلی‌لیتر از محلول فسفات هیدروژن‌سدیم مخلوط شده و جذب نوری آن توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ٤۱۲ نانومتر قرائت گردیده و مقادیر GSH با واحد نانومول بر میلی‌گرم پروتئین، تعیین شد (Nordberg and Arner, 2001).

- **نحوه ارزیابی رشد جنین‌ها**: در ابتدا برای اینکه نفوذ رنگ به درون جنین‌ها بهتر شود، پوست جنین‌ها جدا شد. سپس جنین‌ها به مدت ۳ روز در اتانول ۹۵ درصد قرار گرفتند. برای رنگ‌آمیزی غضروف‌ها، به مدت ۲ روز در محلولی از آلسین بلو، اتانول و اسید استیک گلاسیال قرار گرفته و سپس شستشو داده شدند. همچنین برای رنگ‌آمیزی استخوان‌ها، به مدت ۲روز رنگ‌آمیزی با آلیزارین‌رد (alizarin red) صورت گرفت. عمل شفاف‌سازی هم با استفاده از پتاس ۰/۵ درصد صورت گرفت. نحوه بررسی بر اساس روش Aliverti صورت گرفت که درجه رشد جنین ارزیابی شده و در جستجوی یک شاخص اضافی، تعدادی از مراکز استخوانی‌نشده در ۵ ناحیه اسکلتی جناغ، متاکارپ، متاتارس و بندهای انگشتان اندام‌های حرکتی پیشین و پسین جنین‌ها بررسی گردید (Aliverti *et al*., 1979; Buhimschi *et al*., 2003).

- **تحلیل آماری داده‌ها**: برای بررسی تفاوت‌های آماری بین گروه‌های مختلف، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون‌های HSD و نیومن کیول (Student–Newmann–Keuls post hoc test) با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱٦ استفاده شد. همچنین مقادیر $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر اساس جدول ۱، لیپوپلی‌ساکارید موجب کاهش معنی‌داری وزن‌جفت، وزن جنین، تعداد جنین زنده و طول تاج-کفل در موش‌های دریافت‌کننده این ماده در مقایسه با سایر گروه‌ها شد ($p<۰/۰۵$). همچنین تعداد جنین‌های مرده در موش‌های دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ($p<۰/۰۵$)، درحالی‌که میزان جذب جنین در موش‌های دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید در مقایسه با موش‌های سایر گروه‌ها اختلاف آماری معنی‌داری نداشت.

جدول ۱- مقایسه وزن جفت، تعداد جنین‌های زنده و مرده، وزن جنین، جذب جنینی و طول تاج-کفل بین گروه‌های مختلف (میانگین± انحراف معیار)

گروه‌ها	فراسنجه‌های مورد آزمایش					
	وزن جفت (گرم)	وزن جنین (گرم)	تعداد جنین زنده	جذب جنینی (میلی‌متر)	تعداد جنین مرده	طول تاج-کفل (میلی‌متر)
شاهد	۰/۰±۵۸/۰۵^{b}	٤/۰±۰۱/۰۰٦^{b}	۱۲/۰±۱/۱۲^{c}	۰/۰±۵۸/۰۲	۰/۰±۱۱/۰۲^{a}	۳/۰±۹۲/٤٤^{b}
دریافت‌کننده ویتامین A	۰/۰±۵٦/۰۲^{b}	٤/۰±۲٤/۰۱۷^{b}	۱۱/۰±۹۳/۱٤^{c}	۰/۰±۵۷/٦	۰/۰±۱۲/۱۱^{a}	۳/۰±۹۱/۲۵^{b}
دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید	۰/۰±۳۸/۰٤^{a}	۳/۰±۱۵/۰۱^{a}	٦/۰±۲/۳^{a}	۰/۰±٦۵/۳۳	۰/۰±۲۸/۰۲٤^{c}	۳/۰±٤۵/۱۸^{a}
دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید+ویتامین A	۰/۰±٤۹/۰۱^{b}	۳/۰±٦۵/۲۷^{b}	۱۰/۰±۳۱/۱^{b}	۰/۰±٦۱/۱٦	۰/۰±۱۷/۱۹^{b}	۳/۰±۷۳/۵۱^{b}
سطح معنی‌داری	۰/۰۲۱	۰/۰۳۵	۰/۰۰۳	۰/۰٦۲	۰/۰۰۹	۰/۰۲۹

abc: حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

از سوی بررسی وضعیت تشکیل استخوان در نواحی مختلف جنین حاکی از کاهش معنی‌دار استخوانی شدن در انگشتان دست و پا و متاتارس ($p<۰/۰۵$) و کاهش غیرمعنی‌دار در متاکارپ و جناغ بود (جدول ۲). تشکیل استخوان در ناحیه متاتارس موش‌های دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید و موش‌های تیمارشده با لیپوپلی‌ساکارید به‌همراه ویتامین A، به‌طور معنی‌داری کمتر از میزان آن در ناحیه متارس موش‌های دو گروه دیگر بود ($p<۰/۰۵$). علاوه بر این پارامترهای مربوط به بندهای انگشتان دست و پا در موش‌های دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید به‌طور معنی‌داری نسبت به پارامترهای مذکور در موش‌های گروهای دیگر، کاهش نشان داد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲- مقایسه وضعیت تشکیل استخوان در نواحی مختلف جنین در گروه‌های مورد آزمایش (میانگین ± انحراف معیار)

گروه‌ها	فراسنجه‌های مورد آزمایش				
	متاکارپ	جناغ	انگشتان دست	انگشتان پا	متاتارس
شاهد	٤/٠±٨٦/٠٢^{b}	٣/٠±٩٥/٠١	٥/٠±٩٧/٥٤	٣/٠±٨٩/١^{c}	٣/٠±٥٥/٢٤^{c}
دریافت‌کننده ویتامین A	٣/٠±٩٦/٠١	٥/٠±٩٧/١	٣/٠±٩١/١^{c}	٣/٠±٥٣/٠٦^{c}	٤/٠±٨٦/٠٠^{b}
دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید	٣/٠±٧٨/١	٥/٠±٨٨/ ٢	٢/٠±٩/٤^{a}	٢/٠±٤٥/٠١^{a}	٤/٠±٥١/٠٥^{a}
دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید +ویتامین A	٣/٠±٨٢/٤١	٥/٠±٨٧/٠٢	٣/٠±٦٩/١٩^{b}	٣/٠±٣٣/١٥^{b}	٤/٠±٧/١٧^{b}
سطح معنی‌داری	٠/٠٧٥	٠/١٨٤	٠/٠٠٨	٠/٠٠٩	٠/٠٣٦

abc: حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد (p<٠/٠٥).

میزان مقادیر گلوتاتیون (GSH) در بافت‌های مختلف موش‌های گروه‌های مورد آزمایش نیز به‌طور مقایسه‌ای در جدول ۳ نشان داده شده است. میزان GSH در جفت، کبد مادر و کبد جنین در موش‌های دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های دیگر کاهش نشان داد (p<٠/٠٥). در موش‌های دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید به همراه ویتامینA، مقادیر GSH در کبد جنین و جفت نسبت به موش‌های دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید افزایش معنی‌داری داشت (p<٠/٠٥).

جدول ۳- مقایسه مقادیرگلوتاتیون برحسب نانومول بر میلی‌گرم در بافت‌های مختلف موش‌های مورد مطالعه (میانگین± انحراف معیار)

گروه‌ها	فراسنجه‌های مورد آزمایش		
	جفت	کبد مادر	کبد جنین
شاهد	٥٤٦/١±٦٥/٩٨^{c}	١٠٢٥/٢٣±٢٤/٦^{b}	٦٨٤/٤٣±٢٥/٨^{c}
دریافت‌کننده ویتامین A	٢٤٧/٢٨±٥١/٢^{a}	٧٢٤/٢٨±٧٦/٩^{a}	٣٠٥/٢٣±٧٦/٥^{a}
دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید	٥٤١/١٤±٢١/٤^{c}	١٠٣٠/٢±٥٤/١^{b}	٦٨٢/١١±٩/٢^{c}
دریافت‌کننده لیپوپلی-ساکارید+ویتامین A	٣٩٥/٢±٦١/٢^{b}	٩٤٥/١±٦٦/١^{b}	٥٣١/٨±١٠٠/٣^{b}
سطح معنی‌داری	٠/٠٠٦	٠/٠٣١	٠/٠١٧

abc: حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد (p<٠/٠٥).

بر اساس جدول ٤ سطح مالونیل‌دی‌آلدئید (MDA) در بافت کبد جنین، کبد مادر و جفت موش‌های دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید در مقایسه با موش‌های گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<٠/٠٥). همچنین مشخص گردید، اگر چه سطح MDA در موش‌های دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید به همراه ویتامین A، نسبت به موش‌های دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید در بافت کبد مادر و کبد جنین به‌طور معنی‌داری کاهش داشت (p<٠/٠٥)، اما از این نظر بین به موش‌های دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید به‌همراه ویتامین A و موش‌های گروه شاهد اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت.

جدول ٤- مقایسه مقادیر مالونیل‌دی‌آلدئید برحسب نانومول بر میلی‌گرم در بافت‌های مختلف موش‌های مورد مطالعه (میانگین± انحراف معیار)

گروه‌ها	فراسنجه‌های مورد آزمایش		
	جفت	کبد مادر	کبد جنین
شاهد	۲۵۵/۱±۱۲/۳[a]	٤۳۲/٤٥±۳۱/۹[a]	۲۷۱/٤±۳۱/۱[a]
دریافت‌کننده ویتامین A	۳٦۸/۸±۲٤/۸[b]	۷۱۰/۱۱±٥٤/۳[c]	٥۳۱/۸٦±۸۸/۹[c]
دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید	۲٥۲/۷±۱/٦[a]	٤٤۲/۲٤±٤/٥[a]	۲۷۲/٥±۱٥/۹۰[a]
دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید +ویتامین A	۲۷٥/٤±٦/۲[a]	٥۲۱/٦۱±٥۱/۰۰[b]	۳٦۷/۱۳±۱۳/۰۱[b]
سطح معنی‌داری	۰/۰۲٤	۰/۰۰۱	۰/۰۰٥

abc: حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰٥).

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر لیپوپلی‌ساکارید باکتری *اشریشیا کولای* بر رشد جنین داخل رحمی و تشکیل اسکلت جنینی و اثر آنتی‌اکسیدانی ویتامین A در پیشگیری از عوارض ناشی از این ماده بود.

لیپوپلی‌ساکارید عوارض مختلفی در روند تشکیل جنین ایجاد می‌کند، که شامل جذب جنینی، مرگ جنین داخل رحم و زایمان پیش از موعد می‌باشد (Collins *et al.*, 1994). نتایج تحقیقات پژوهشگران در مورد تاثیر تجویز لیپوپلی‌ساکارید با دوزهای روزانه ۲٥، ٥۰ و ۷٥ میکروگرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن در روزهای ۱٥-۱۷ آبستنی نشان داد که میزان تلفات جنینی با افزایش دوز به‌صورت قابل توجهی افزایش می‌یابد، به‌طوری‌که در گروه دریافت‌کننده دوز بالا، تلفات جنین تا ٦۳/۲ درصد نیز گزارش شد. با این‌حال تجویز لیپوپلی‌ساکارید در مراحل پایانی آبستنی جذب جنینی را افزایش نداد (Xu *et al.*, 2006). ریورا و همکاران در سال ۱۹۹۸، گزارش نمودند که تجویز لیپوپلی‌ساکارید به میزان ۱۰۰ میکروگرم/کیلوگرم به موش‌های صحرائی در روزهای ۲۰-۱٤ آبستنی موجب تلفات جنینی تا ٤۳ درصد و همچنین موجب کاهش رشد جنین‌های زنده می‌شود (Rivera *et al.*, 1998). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که تعداد جنین‌های زنده در گروه دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید باکتری *اشریشیاکولای* کاهش معنی‌داری در مقایسه با آن در گروه‌های دیگر دارد. همچنین میزان کاهش جنین‌های زنده در گروه دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید به‌علاوه ویتامین A نیز نسبت به گروه دریافت‌کننده فقط لیپوپلی‌ساکارید دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد که نشان‌دهنده کاهش عوارض پاتولوژیکی ناشی از لیپوپلی‌ساکارید در اثر استفاده از این ویتامین می‌باشد. همچنین در پژوهش حاضر تجویز لیپوپلی‌ساکارید مذکور در موش‌های آبستن بطور معنی‌داری میزان وزن جنین و نیز طول تاج- کفل و دم را در جنین‌های زنده کاهش داد. از طرف دیگر تجویز این لیپوپلی‌ساکارید قبل از زایمان منجر به کاهش اندازه نتاج در زمان تولد و کاهش تعداد جنین‌های زنده در رحم در روز ۱۸ آبستنی شد (Coyle *et al.*, 2009). در این ارتباط افزایش تعداد جذب جنین و کاهش تعداد جنین‌های زنده متعاقب تجویز

لیپوپلی‌ساکارید در روز هشتم آبستنی گزارش شده‌است (Carey *et al.*, 2003).

نتایج برخی پژوهشگران نشان داده است که تجویز لیپوپلی‌ساکارید در اواخر دوره آبستنی به موش‌ها باعث کاهش معنی‌دار استخوانی شدن اسکلت در ستون مهره‌های خلفی، انگشتان دست و پا و استخوان پس‌سری می‌شود (Xu *et al.*, 2006). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که لیپوپلی‌ساکارید موجب کاهش معنی‌دار اندازه انگشتان دست و پا و همچنین متاتارس می‌شود و نیز استفاده از ویتامین A در کاهش اثرات ناشی از این ماده موثر بوده است.

همچنین یافته‌های بعضی از مطالعات نشان داده است که تجویز یک دوز لیپوپلی‌ساکارید موجب کاهش قابل توجه میزان گلوتاتیون در کبد جنین می‌شود که این موضوع نشان‌دهنده آن است که تزریق لیپوپلی‌ساکارید به مادر موجب ایجاد استرس اکسیداتیو در کبد جنین می‌شود (Xu *et al.*, 2006). در مطالعه حاضر نیز مشخص گردید که میزان گلوتاتیون به شکل معنی‌داری در بافت‌های موش‌های گروه دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید کاهش پیدا کرده و میزان این آنزیم در بافت‌های موش‌های گروه دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید به‌علاوه ویتامین A علی‌رغم داشتن تفاوت آماری معنی‌دار با بقیه گروه‌های مورد مطالعه، نسبت به میزان آن در بافت‌های موش‌های گروه دریافت‌کننده لیپوپلی‌ساکارید نیز افزایش معنی‌داری داشته است که نشان‌دهنده تاثیر آنتی‌اکسیدانی ویتامین A در جهت کاهش اثرات استرس اکسیداتیو و سمیت ناشی از لیپوپلی‌ساکارید استفاده‌شده می‌باشد. نشان داده شده است که گلوتاتیون برای حفاظت تیول و سایر گروه‌های نوکلئوفیلیک در پروتئین‌ها در مقابل متابولیت‌های سمی ضروری می‌باشد و کاهش میزان این ترکیب در شرایط استرس داخل سلولی منجر به اکسیداسیون و آسیب به لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA توسط گونه‌های آزاد اکسیژن می‌شود (Rauscher *et al.*, 2001). محققین دیگری نیز کاهش میزان گلوتاتیون در اندام‌ها را در فاز اولیه شوک سپتیک گزارش نموده اند (Rizzardini *et al.*, 1998). لذا به نظر می‌رسد که نتایج مطالعه حاضر نشان داد که لیپوپلی‌ساکارید موجب تغییر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و وضعیت اکسایش و احیاء تیول می‌شود. گزارش‌ها نشان می‌دهد که در اثر افزایش میزان گونه‌های آزاد اکسیژن، میزان MDA افزایش می‌یابد و صدمات اکسیداتیو ناشی از لیپوپلی‌ساکارید در اندام‌های مختلف را می‌توان با افزایش میزان MDA در سرم و بافت‌های قلب، کبد و کلیه نشان داد. در این ارتباط نتایج پژوهشی در سال ۲۰۰۲ نشان داده که متعاقب تجویز لیپوپلی‌ساکارید باکتری *سالمونلا اینتریتیدیس* میزان فشار خون شریانی، TNF-α و MDA افزایش می‌یابد (Altavilla *et al.*, 2002). همچنین گزارش شده است که متعاقب تجویز لیپوپلی‌ساکارید، میزان MDA در قلب و پلاسما افزایش می‌یابد و همچنین استفاده از آپوسینین و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، ۷ روز قبل از چالش با لیپوپلی‌ساکارید، به‌طور معنی‌داری میزان زنده‌مانی موش‌های صحرائی را افزایش و میزان MDA را کاهش می‌دهد (Ben-Shaul *et al.*, 2001). در مطالعه حاضر هم میزان MDA در کبد جنین، کبد مادر و همچنین جفت به دنبال تجویز لیپوپلی‌ساکارید باکتری *اشریشیا کولای* به طور معنی‌داری افزایش یافت، درحالی‌که در موش‌های گروه دریافت‌کننده

لیپوپلی‌ساکارید به‌علاوه ویتامین A میزان MDA در مقایسه با مقدار آن در بافت‌های مربوط به موش‌های گروه دریافت‌کننده فقط لیپوپلی‌ساکارید کاهش داشت که این امر نشان‌دهنده تاثیر آنتی‌اکسیدانی ویتامین A می‌باشد. در این ارتباط نشان داده‌اند که این ویتامین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و از استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (Nordberg and Arner, 2001; Gonzalez-Reyes *et al*., 2006). در واقع ویتامین A فعالیت آنزیم‌های حذف‌کننده در استرس اکسیداتیو را تنظیم می‌کند (Zobali *et al*., 2002; Xu *et al*., 2006).

نتایج مطالعه حاضر نشان از قدرت حفاظتی ویتامین A در برابر عوارض ناشی از لیپوپلی‌ساکارید در جنین موش‌های صحرایی دارد. با توجه به این‌که استفاده از داروهای مختلف در طول دوران بارداری محدودیت‌های زیادی دارند، لذا استفاده از ویتامین A به عنوان یک آنتی‌اکسیدان ایمن در برابر عوارض جنینی ناشی از لیپوپلی‌ساکاریدها توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Alfonso, L., Arnaiz, A., Alvarez, F., Qi, B., Diez-Pardo, J., Vallis-I-Soler, A., *et al*. (1996). Lung hypoplasia and surfactant system immaturity induced in the fetal rat by prenatal exposure to nitrofen. Neonatology, 69(2): 94-100.
- Aliverti, V., Bonanomi, L., Giavini, E., Leone, V. and Mariani, L. (1979). The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. Teratology, 20(2): 237-242.
- Altavilla, D., Squadrito, G., Minutoli, L., Deodato, B., Bova, A., Sardella, A., *et al*. (2002). Inhibition of nuclear factor-κb Activation by Irfi 042, protects against endotoxin-induced shock. Cardiovascular Research, 54(3): 684-693.
- Barker, D.J., Godfrey, K.M., Gluckman, P.D., Harding, J.E., Owens, J.A. and Robinson, J.S. (1993). Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. The Lancet, 341(8850): 938-941.
- Bautista, A.P., Meszaros, K., Bojta, J. and Spitzer, J.J. (1990). Superoxide anion generation in the liver during the early stage of endotoxemia in rats. Journal of Leukocyte Biology, 48(2): 123-128.

- Ben-Shaul, V., Lomnitski, L., Nyska, A., Zurovsky, Y., Bergman, M. and Grossman, S. (2001). The effect of natural antioxidants, nao and apocynin, on oxidative stress in the rat heart following LPS challenge. Toxicology Letters, 123(1): 1-10.
- Biswas, S.K. and Lopez-Collazo, E. (2009). Endotoxin tolerance: New mechanisms, molecules and clinical Significance. Trends in Immunology, 30(10): 475-487.
- Block, G., Jensen, C.D., Morrow, J.D., Holland, N., Norkus, E.P., Milne, G.L., *et al*. (2008). The effect of vitamins C and E on biomarkers of oxidative stress depends on baseline level. Free Radical Biology and Medicine, 45(4): 377-384.
- Buhimschi, I.A., Buhimschi, C.S. and Weiner, C.P. (2003). Protective effect of N-acetylcysteine against fetal death and preterm labor induced by maternal inflammation. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 188(1): 203-208.
- Cadenas, E. and Packer, L. (1996): Handbook of Antioxidants. Marcel Dekker Inc., 3(6): 205-284.
- Carey, L.C., Berbée, P.L., Coyle, P., Philcox, J.C. and Rofe, A.M. (2003). Zinc treatment prevents lipopolysaccharide-induced teratogenicity in mice. Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology, 67(4): 240-245.
- Chaouat, G., Menu, E., Clark, D., Dy, M., Minkowski, M. and Wegmann, T. (1990). Control of fetal survival in Cba× Dba/2 mice by lymphokine therapy. Journal of Reproduction and Fertility, 89(2): 447-458.
- Chen, Y.H., Wang, J.P., Wang, H., Sun, M.F., Wei, L.Z., Wei, W., *et al*. (2005). Lipopolysaccharide treatment downregulates the expression of the pregnane X receptor, Cyp3a11 and Mdr1a genes in mouse placenta. Toxicology, 211(3): 242-252.
- Coe, C.L., Kramer, M., Kirschbaum, C., Netter, P. and Fuchs, E. (2002). Prenatal stress diminishes the cytokine response of leukocytes to endotoxin stimulation in juvenile rhesus monkeys. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 87(2): 675-681.
- Coid, C. (1976). Bacterial endotoxin and impaired fetal development. Experientia, 32(6): 735-736.
- Collins, J., Smith, M., Arnold, R.R. and Offenbacher, S. (1994). Effects of Escherichia coli and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide on pregnancy outcome in the golden hamster. Infection and Immunity, 62(10): 4652-4655.
- Cottrell, E.C. and Seckl, J. (2009). Prenatal Stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 3: 19.
- Coyle, P., Tran, N., Fung, J.N., Summers, B.L. and Rofe, A.M. (2009). Maternal dietary zinc supplementation prevents aberrant behaviour in an object recognition task in mice offspring exposed to LPS in early pregnancy. Behavioural Brain Research, 197(1): 210-218.
- Delashoub, M. and Khojasteh, S.M.B. (2012). An Investigation on protective effects of vitamin E against Lipopolysaccharide-induced fetal injuries in rat. Advances in Environmental Biology, 6(8): 2274-2279.
- Fukui, H., Brauner, B., Bode, J.C. and Bode, C. (1991). Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. Journal of Hepatology, 12(2): 162-169.
- Gendron, R., Nestel, F., Lapp, W. and Baines, M. (1990). Lipopolysaccharide-Induced fetal resorption in mice is associated with the intrauterine production of tumour necrosis factor-alpha. Journal of Reproduction and Fertility, 90(2): 395-402.
- Gibbs, R.S. and Duff, P. (1991). Progress in Pathogenesis and management of clinical intraamniotic infection. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 164(5): 1317-1326.
- Gonzalez-Reyes, S., Martinez, L., Martinez-Calonge, W., Fernandez-Dumont, V. and Tovar, J.A. (2006). Effects of antioxidant vitamins on molecular regulators involved in lung hypoplasia induced by nitrofen. Journal of Pediatric Surgery, 41(8): 1446-1452.
- Griffith, O.W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Analytical Biochemistry, 106(1): 207-212.

- Haddad, E., Duclos, A. and Baines, M. (1995). Early embryo loss is associated with local production of nitric oxide by decidual mononuclear cells. The Journal of Experimental Medicine, 182(4): 1143-1151.
- Hillier, S., Martius, J., Krohn, M., Kiviat, N., Holmes, K. and Eschenbach, D. (1989). A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. International Journal of Gynecology and Obstetrics, 29(1): 96-97.
- Jacob, A.L., Goldberg, P.K., Bloom, N., Degenshein, G.A. and Kozinn, P.J. (1997). Endotoxin and bacteria in portal blood. Gastroenterology, 42(2): 359-365.
- Kaya, H., Sezik, M., Ozkaya, O., Dittrich, R., Siebzehnrubl, E. and Wildt, L. (2004). Lipid peroxidation at various estradiol concentrations in human circulation during ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. Hormone and Metabolic Research, 36(10): 693-695.
- Lanning, J., Hilbelink, D. and Chen, L. (1983). Teratogeneic effects of endotoxin on the golden hamster. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, 3(2): 145-149.
- Li, X.J., Zhang, G.X., Sun, N., Sun, Y., Yang, L.Z. and Du, Y.J. (2013). Protective effects of erythropoietin on endotoxin-related organ injury in rats. Journal of Huazhong University of Science and Technology, 33(5): 680-686.
- Nordberg, J. and Arner, E.S. (2001). Reactive oxygen species, ntioxidants and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biology and Medicine, 31(11): 1287-1312.
- Ogando, D.G., Paz, M. and Franchi, A.M. (2003). The functional role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide induced embryonic resorption in mice. Reproduction, 125(1): 95-110.
- O'sullivan, A., Dore, C., Boyle, S., Coid, C. and Johnson, A. (1988). The effect of campylobacter lipopolysaccharide on fetal development in the mouse. Journal of Medical Microbiology, 26(2): 101-105.
- Parra, T., de Arriba, G., Conejo, J.R., Cantero, M., Arribas, I., Rodríguez-Puyol, D., *et al*. (1998). Effect of vitamin E on cyclosporine nephrotoxicity. Transplantation, 66(10): 1325-1329.
- Parant, M. and Chedid, L. (1964). Protective Effect of Chlorpromazine against endotoxin-induced abortion. Experimental Biology and Medicine, 116(4): 906-909.
- Raetz, C.R., Ulevitch, R.J., Wright, S., Sibley, C., Ding, A. and Nathan, C. (1991). Gram-negative endotoxin: An extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. The FASEB Journal, 5(12): 2652-2660.
- Rauscher, F.M., Sanders, R.A. and Watkins, J.B. (2001). Effects of coenzyme Q10 treatment on antioxidant pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 15(1): 41-46.
- Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., *et al*. (1994). Bacterial endotoxin: Molecular relationships of structure to activity and function. The FASEB Journal, 8(2): 217-225.
- Rivera, D., Olister, S., Liu, X., Thompson, J., Zhang, X., Pennline, K., *et al*. (1998). Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise. The FASEB Journal, 12(2): 189-197.
- Rizzardini, M., Carelli, M., Porras, M.C. and Cantoni, L. (1994). Mechanisms of endotoxin-induced haem oxygenase M-RNA accumulation in mouse liver: Synergism by glutathione depletion and protection by N-acetylcysteine. Biochemical Journal, 304(2): 477-483.
- Rizzardini, M., Zappone, M., Villa, P., Gnocchi, P., Sironi, M., Diomede, L., *et al*. (1998). Kupffer cell depletion partially prevents hepatic heme oxygenase 1 messenger RNA accumulation in systemic inflammation in mice: Role of interleukin 1β. Hepatology, 27(3): 703-710.
- Romero, R., Roslansky, P., Oyarzun, E., Wan, M., Emamian, M., Novitsky, T.J., *et al*. (1988). Labor and infection. II. Bacterial endotoxin in amniotic fluid and its relationship to the onset of preterm labor. Labor and Infection, 158(5): 1044-1049.

- Rondo, P., Ferreira, R., Nogueira, F., Ribeiro, M., Lobert, H. and Artes, R. (2003). Maternal psychological stress and distress as predictors of low birth weight, prematurity and intrauterine growth retardation. European Journal of Clinical Nutrition, 57(2): 266-272.
- Savitha, S., Tamilselvan, J., Anusuyadevi, M. and Panneerselvam, C. (2005). Oxidative stress on mitochondrial antioxidant defense system in the aging process: role of DL-alpha-lipoic acid and L-carnitine. Internationla Journal of Clinical Chemistry, 355(1-2): 173-180.
- Silver, R.M., Edwin, S.S., Trautman, M.S., Simmons, D.L., Branch, D.W., Dudley, D.J., *et al*. (1995). Production of a newly recognized form of inducible cyclooxygenase (COX-2) in murine decidua in response to lipopolysaccharide. Journal of Clinical Investigation, 95(2): 725-731.
- Silver, R.M., Edwin, S.S., Umar, F., Dudley, D.J., Branch, D.W. and Mitchell, M.D. (1997). Bacterial lipopolysaccharide-mediated murine fetal death: The role of interleukin-1. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 176(3): 544-549.
- Talge, N.M., Neal, C. and Glover, V. (2007). Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: How and why? Journal of Child Psychology and Psychiatry, 48(3-4): 245-261.
- Thébaud, B., Tibboel, D., Rambaud, C., Mercier, J.C., Bourbon, J.R., Dinh-Xuan, A.T., *et al*. (1999). Vitamin A decreases the incidence and severity of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 277(2): L423-L429.
- Welberg, L.A. and Seckl, J.R. (2001). Prenatal Stress, Glucocorticoids and the programming of the brain. Journal of Neuroendocrinology, 13(2): 113-128.
- Xu, D.X., Chen, Y.H., Wang, H., Zhao, L., Wang, J.P. and Wei, W. (2006). Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal growth restriction and skeletal development retardation in mice. Toxicology Letters, 163(1): 20-29.
- Xu, D.X., Chen, Y.H., Zhao, L., Wang, H. and Wei, W. (2006). Reactive oxygen species are involved in lipopolysaccharide-induced intrauterine growth restriction and skeletal development retardation in mice. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 196(6): 1714-1707.
- Yuan-Hua, C.H., De-Xiang, X., Lei, Z.H., Hua, W., Jian-Ping, W., Wei, W., *et al*. (2006). Ascorbic acid protects against lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and intra-uterine growth retardation in mice. Toxicology, 217(1): 39-45.
- Zobali, F., Avci, A., Canbolat, O. and Karasu, Ç. (2002). Effects of vitamin A and insulin on the antioxidative state of diabetic rat heart: A comparison study with combination treatment. Cell Biochemistry and Function, 20(2): 75-80.