مطالعه اثرات محافظتی ویتامین E در برابر صدمات جنینی ایجادشده توسط لیپوپلی‌ساکاریدها در موش صحرایی

حسین محمدزاده[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: ۹۶/۵/۲۸ پذیرش نهایی: ۹۶/۱۱/۱۶)

چکیده

لیپوپلی‌ساکاریدها از عوامل مهم آسیب‌های جنین در طی مراحل رشد می‌باشند. این آسیب‌ها شامل تاخیر در رشد جنین، مرگ داخل رحمی جنین، جذب جنینی و زایمان زودرس بوده و با استرس اکسیداتیو ناشی از لیپوپلی‌ساکاریدها مرتبط می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظتی ویتامین E در برابر صدمات جنینی ناشی لیپوپلی‌ساکاریدها در موش صحرایی بود. در این مطالعه تعداد ٤٨ سر موش صحرایی آبستن به ٤ گروه تقسیم و به موش‌های گروه‌های ۱ و ۲ در روزهای ۱۵ تا ۱۷ آبستنی لیپوپلی‌ساکارید به‌میزان ۷۵ میکروگرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی، به گروه‌های ۲ و ۳ یک هفته قبل از تجویز لیپوپلی‌ساکارید، ویتامین E روزانه به‌میزان ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل عضلانی و به گروه ٤ به عنوان شاهد، سالین نرمال به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. در روز ۱۸ تمامی موش‌ها آسان‌کشی شدند. تعداد جنین‌های زنده و مرده شمارش شده، سپس تعداد جنین‌های زنده وزن گردیده و طول تاج-کفل در جنین‌های زنده و اسکلت در متاکارپ، متاتارس، بندهای انگشتان دست و پا و جناغ نیز اندازه‌گیری شد. میزان مالونیل‌دی‌آلدئید و گلوتاتیون بافتی کبد مادر، کبد جنین و جفت اندازه‌گیری شد. تجویز لیپوپلی‌ساکارید به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) موجب افزایش تلفات جنینی، کاهش وزن جنین و طول تاج-کفل در جنین‌های زنده و کاهش استخوانی‌شدن اسکلت در متاکارپ، متاتارس، بندهای انگشتان دست و پا و جناغ آن‌ها گردید. نتایج نشان داد که تجویز هم‌زمان ویتامین E و لیپوپلی‌ساکارید موجب کاهش آسیب‌های ناشی از لیپوپلی‌ساکارید و بهبود صدمات مربوطه در جنین موش صحرایی می‌شود.

کلیدواژه‌ها: ویتامین E، لیپوپلی‌ساکارید، آسیب جنین، آنتی‌اکسیدان، موش صحرایی.

مقدمه

لیپوپلی‌ساکارید (LPS) یک ترکیب سمی در دیواره باکتری‌های گرم منفی بوده و معمولاً به مقدار زیادی در لوله گوارش انسان و حیوانات حضور دارد و به دنبال هرگونه استرس در دستگاه گوارش احتمال ورود این ماده به گردش خون و بیماری‌زایی این ماده در نقاط مختلف بدن وجود دارد (Jacob *et al*., 1997). در بررسی های انجام شده، انتقال LPS از مادر به جنین موجب عوارض متعددی در جنین شده است که اختلال در رشد جنین یا مرگ جنین در دوران آبستنی می‌تواند از آن دسته عوارض باشد. این عوارض در انسان بیشتر با سقط جنین همراه بوده و در جوندگان می‌تواند با مرگ جنین در داخل رحم و یا جلوگیری از رشد آن و ایجاد جنین نارس همراه باشد (Buhimschi *et al*., 2003; Ogando *et al*., 2003; Silver *et al*., 1995). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که فاکتور توموری نکروز آلفا (TNF-α) یکی از واسطه‌های عمده است که باعث تحلیل در رشد جنینی، مرگ جنین در داخل رحم و زایمان زودرس شده و در اثر تزریق LPS به‌وجود می آید (Buhimschi *et al*., 2003; Cederberg *et al*., 2001). همچنین زمانی که مادر در معرض LPS قرار می‌گیرد، به‌طور معنی‌داری بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (iNOS) در سلول‌های جفت و میومتر و همچنین تولید نیتریک اکساید در جفت و رحم افزایش می یابد (Bautista *et al*., 1990). پروستاگلندین‌ها نقش مهمی در مسمومیت جنینی ناشی از القاء LPS دارند. همچنین، یکی از مهم‌ترین دلایل عوارض ناشی از این ماده تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) است که موجب مرگ داخل رحمی جنین و تحلیل رشد جنین می‌شود (Chen *et al*., 2005; Ejima *et al*., 2000). القاء LPS باعث تحریک ماکروفاژها برای تولید انواع رادیکال‌های آزاد آکسیژن (reactive oxygen species; ROS) و افزایش نیتروتیروزین و نیتریک اکساید (NO) در ارگان‌های غنی از ماکروفاژ می شود (Gayle *et al*., 2004). مطالعات اخیر نشان داد که N-استیل سیستئین که یک پیش‌ساز گلوتاتیون و یک آنتی‌اکسیدان مستقیم است، باعث محافظت از مرگ جنین و زایمان زودرس ناشی از سمیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اثر القاء LPS در مادر می شود (Altavilla *et al*., 1990). انواعی از آنتی‌اکسیدان‌ها از موش‌ها در برابر زایمان زودرس و مرگ داخل رحمی جنین ناشی از القاء LPS محافظت کرده‌اند. ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان محلول در چربی، یکی از اعضاء خانواده آلفا، بتا، گاما و دلتاتوکوفرول و مربوط به دلتاتوکوترینول است (Herrera and Barbas, 2001). فرم فعال ویتامین E، هومولوگ آلفاتوکوفرول است که غشاء سلول را از اکسیداسیون ناشی از واکنش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و رادیکال‌های چربی تولیدشده در طی واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون چربی‌های غیر اشباع محافظت می‌کند (Griffith, 1980). اسید اسکوربیک یک آنتی‌اکسیدان است و نشان داده شده است که از نقص عضو جنین ناشی از دیابت ملیتوس تجربی ایجاد شده در دوره بارداری، جلوگیری می‌کند (Herrera and Barbas, 2001). در مطالعه‌ای دیگر تاثیر اسید اسکوربیک بر تحلیل رشد جنین و مرگ داخل رحمی جنین مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان داده است که مصرف آن قبل از القاء LPS باعث جلوگیری از نقص رشد در جنین می‌شود، اما مصرف آن بعد از القاء

LPS اثر محافظتی کمتری بر مرگ داخل رحمی جنین خواهد داشت (Buhimschi *et al*., 2003). نشان داده است که در استرس اکسیداتیو ناشی از القاء LPS درمان با یکی از عوامل محافظت‌کننده مانند ویتامین E بسیار مهم است. لذا، در این مطالعه اثر حفاظتی ویتامین E در برابر صدمات جنینی ایجادشده توسط LPS در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به‌صورت تجربی آزمایشگاهی و در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز در سال ۹۶-۹۵ با رعایت حقوق حیوانات آزمایشگاهی با دریافت کد کمیته اخلاق پژوهش علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به شماره شناسایی IR.IAUT.TABRIZ.REC.1396.64 انجام پذیرفت.

- **مواد شیمیایی**: لیپوپلی‌ساکارید (LPS) باکتری *اشریشیاکلی* سروتیپ 0127:H8، اسید اسکوربیک، TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances)، کیت سنجش گلوتاتیون و سایر مواد و اقلام مورد استفاده در این مطالعه، از شرکت سیگما ساخت کشور آمریکا خریداری شدند.

- **حیوانات**: حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده در این مطالعه، موش‌های صحرایی نژاد ویستار بودند. موش‌های جنس ماده با وزن تقریبی ۱۸۰ الی ۲۰۰ گرم و به تعداد ٦٤ سر و جنس نر با وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۲۲۰ گرم و به تعداد ۳۲ سر جهت جفت‌گیری ابتدایی انتخاب شدند. تمامی موش‌ها از محل نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز خریداری گردید. در ابتدا برای بررسی وضعیت سلامت، به مدت یک هفته در شرایط آزمایشگاه نگه‌داری شده 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 ۲٦ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ٤٠ الی ٧٤ درصد، تهویه ۱۰ الی ۱۵ بار در ساعت و روشنایی ۱۲ ساعت در روز (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. ماده‌هایی که مثبت بودند به عنوان روز صفر آبستنی تلقی شدند. سن حیوانات ماده در زمان آبستنی ۱۲ هفته بود. حیواناتی که نتیجه آزمایش در آنها منفی بود، از آزمایش حذف شدند. ماده‌های مثبت به تعداد ٤٨ سر و با محدوده وزنی ۲۰۰ الی ۲۵۰ گرم انتخاب و به‌صورت تصادفی در ٤ گروه ۱۲تایی تقسیم شدند. در روزهای ۱۵ تا ۱۷ آبستنی، به ترتیب به گروه های اول و دوم، مقدار ۷۵ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از LPS باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* سروتیپ 0127:H8 به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه‌های دوم و سوم از یک هفته قبل از تزریق LPS، روزانه مقدار mg/kg ۲۰ ویتامین E به صورت داخل عضلانی دریافت کردند. گروه چهارم به عنوان گروه شاهد بوده و برای مشابه‌سازی استرس تزریق به آنها سالین نرمال تزریق شد. در روز ۱۸ تمامی حیوانات بعد از بیهوشی

توسط اتر آسان‌کشی شده و رحم آنها به صورت جداگانه وزن شد و سپس تعداد جنین‌های مرده و زنده شمارش شده و بعد از وزن‌کشی جنین‌های زنده و جفت آنها، با استفاده از کولیس اندازه جمجمه تا دم در جنین‌های زنده و اسکلت در متاکارپ، متاتارس، بندهای انگشتان دست و پا و جناغ مشخص شد. موش‌های صحرایی بعد از بیهوشی با اتر آسان‌کشی و سپس کالبدگشایی گردیده و نمونه‌هایی از کبد مادر و جنین‌های مربوطه جداسازی شد و از نمونه‌های مذکور هموژنات تهیه گردید و مقادیر گلوتاتیون بافتی (GSH) و میزان پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) آن‌ها توسط کیت‌های اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس جنین‌ها به مدت حداقل ۲ هفته در اتانول نگه‌داری شده و بعد از انجام مراحل آماده‌سازی، از لحاظ اندازه بخش‌های مختلف بدن که می‌توانند شاخصی برای نشان دادن رشد جنین باشند، بررسی شدند (Delashoub *et al*., 2014).

– **اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی:** سنجش پراکسیداسیون لیپیدی با اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde; MDA) صورت پذیرفت. اندازه‌گیری سطوح MDA با استفاده از تیوباربیتوریک اسید (TBA) انجام شد. به‌طور خلاصه ۵۰ میکرولیتر نمونه در لوله ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. بعد از اضافه کردن محلول حاوی ۲۹ میلی‌مول TBA (خریداری شده از شرکت سیگما) در اسید استیک ، کاملاً مخلوط شد، سپس به مدت یک ساعت در بن‌ماری ۱۰۰ درجه قرار گرفت. آنگاه نمونه‌ها خنک شده و ۲۵ میکرولیتر از اسید هیدروکلریک (HCL) (۵ مول در لیتر) به آن اضافه شد. نمونه حاصل با ۳/۵ میلی‌لیتر ان-بوتانول (n-butanol) به مدت ۵ دقیقه ترکیب شد. بعد از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، فاز بوتانول جداسازی شده و کدورت ماده باقی‌مانده توسط اسپکتروفوتومتر (نانومول بر میلی‌گرم) مشخص شد (Savitha *et al*., 2005).

– **اندازه‌گیری مقادیر GSH:** سنجش مقادیر GSH با استفاده از روش Griffith انجام شد (Nordberg and Arner, 2001). ابتدا بافت کبد هموژنیزه شده، سپس ۰/٤ میلی‌لیتر از آن با ۰/٤ میلی‌لیتر محلول اسید متافسفریک مخلوط گردید تا پروتئین‌های آن رسوب کند. بعد از ٤۰ دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه، پروتئین رسوبی جداسازی شد. ٤۰۰ میکرولیتر از مایع رویی با ۰/٤ میلی‌لیتر محلول فسفات هیدروژن سدیم مخلوط شد و جذب نوری آن در ٤۱۲ نانومتر قرائت گردید. مقادیر GSH با واحد نانومول بر میلی‌گرم پروتئین، تعیین شد.

– **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 گرفتند، سپس شستشو داده شدند. برای رنگ‌آمیزی استخوان‌ها، به مدت ۲ روز رنگ‌آمیزی با آلیزارین رد (alizarin red) صورت گرفت. عمل شفاف‌سازی با پتاس نیم درصد صورت گرفت. درجه رشد جنین بر اساس روش آلیورتی و همکاران در سال ۱۹۷۹ صورت گرفت (Aliverti *et al*., 1979). در جستجوی یک شاخص اضافی، تعدادی از مراکز

استخوانی‌نشده در ۵ ناحیه اسکلتی شامل جناغ، متاکارپ، متاتارس، بندهای اندام حرکتی پیشین و پسین در جنین موش‌ها بررسی شد (Buhimschi *et al.*, 2003).

– **تحلیل آماری داده‌ها:** برای بررسی تفاوت‌های آماری معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه، آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و پس‌آزمون HSD توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج مربوط به وزن جنین‌ها، تعداد جنین‌های زنده و مرده، وزن جفت‌ها، جذب جنینی و طول ستون فقرات در جدول ۱ آورده شده است. اختلاف معنی‌دار و مشخصی در وزن جفت و جنین میان گروه مواجهه با لیپوپلی‌ساکارید و سایر گروه‌ها مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). همین‌طور تفاوت آماری معنی‌داری میان تعداد جنین‌های مرده و زنده در گروه مواجهه با لیپوپلی‌ساکارید با سایر گروه‌ها وجود داشت ($p<۰/۰۵$). تفاوت آماری معنی‌داری میان گروه مواجهه با لیپوپلی‌ساکارید و سایر گروه‌ها در جذب جنین وجود نداشت ($p<۰/۰۵$). میزان طول تاج کفل در گروه لیپوپلی‌ساکارید به‌طور معنی‌داری از بقیه گروه‌ها کمتر بود ($p<۰/۰۵$). مقایسه مقادیر مربوط به رشد بخش‌های مختلف استخوانی جنین‌ها بین گروه‌ها در جدول ۲ آورده شده است. تفاوت آماری معنی‌داری در درجه استخوانی‌شدن متاکارپ و جناغ بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. در مقابل، تفاوت آماری معنی‌داری میان درجه استخوانی‌شدن بندهای اندام‌های حرکتی پیشین و پسین در گروه مواجهه با لیپوپلی‌ساکارید نسبت به سایر گروه‌ها وجود داشت ($p<۰/۰۱$). درجه استخوانی‌شدن متاتارس در گروه مواجهه با لیپوپلی-ساکارید با سایر گروه‌ها دارای اختلاف آماری معنی-داری بود ($p<۰/۰۵$).

مقادیر مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به طور معنی‌داری در کبد مادر و کبد جنین ($p<۰/۰۱$) و همچنین جفت ($p<۰/۰۵$) در گروه مواجهه با لیپوپلی‌ساکارید نسبت به سایر گروه‌ها افزایش یافته بود (جدول ۳). در حالی‌که میزان مالونیل دی‌آلدئید جفت در میان گروه تیمار با ویتامین E به‌علاوه لیپوپلی‌ساکارید، با گروه شاهد اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. این در حالی است که اختلاف آماری معنی‌داری در میزان مالونیل دی‌آلدئید کبد مادر بین گروه مواجهه با لیپوپلی‌ساکارید و تیمار با ویتامین E به‌علاوه لیپوپلی‌ساکارید وجود داشت ($p<۰/۰۱$). مقایسه مقادیر به‌دست‌آمده برای GSH بین گروه‌ها در جدول ٤ مشخص شده است. مواجهه با لیپوپلی‌ساکارید به مقدار قابل توجهی میزان GSH را در کبد مادر کاهش داد که با دو گروه شاهد و تیمار با ویتامین E اختلاف آماری معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). تیمار با ویتامین E نتوانست به‌طور معنی-داری از کاهش میزان GSH کبد مادر در اثر لیپوپلی-ساکارید، جلوگیری کند. در کبد جنین و جفت نیز میزان GSH در گروه مواجهه با لیپوپلی‌ساکارید در مقایسه با بقیه گروه‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۱$). در ضمن میزان این ماده در کبد جنین و جفت در گروه مواجهه با لیپوپلی‌ساکارید، در مقایسه با گروه تیمار با لیپوپلی‌ساکارید و ویتامین E نیز اختلاف آماری معنی-داری داشت ($p<۰/۰۵$).

جدول ۱- مقایسه گروه‌ها از لحاظ وزن جفت، تعداد جنین‌های زنده و مرده، وزن جنین‌ها، میزان جذب جنین و طول بدن (میانگین± انحراف معیار).

گروه‌ها / فراسنجه‌ها	شاهد	ویتامین E	لیپوپلی‌ساکارید	لیپوپلی‌ساکارید+ویتامین E	معنی‌داری
وزن جفت (گرم)	۰/۵۸±۰/۰۵[a]	۰/۵۷±۰/۰۷[a]	۰/۳۸±۰/۰۴[b]	۰/۵۲±۰/۰۲[a]	۰/۰۲۱
وزن جنین زنده (گرم)	۴/۰۱±۰/۰۰۶[a]	۳/۹۵±۰/۰۳۳[a]	۳/۱۵±۰/۰۱[b]	۳/۷۸±۰/۳۱[a]	۰/۰۳۶
تعداد جنین زنده	۱۲/۱±۰/۱۲[a]	۱۱/۸۵±۰/۱[a]	۶/۲±۰/۳[b]	۱۱/۶۷±۰/۱[a]	۰/۰۰۷
تعداد جنین مرده	۰/۱۱±۰/۰۲[a]	۰/۱۳±۰/۰۲[a]	۰/۲۸±۰/۰۲۴[b]	۰/۱۴±۰/۱۱[a]	۰/۰۰۲
میزان جذب جنینی	۰/۵۸±۰/۰۲	۰/۵۹±۰/۲	۰/۶۵±۰/۳۳	۰/۵۹±۰/۱۷	۰/۰۸۱
طول تاج-کفل (میلی‌متر)	۳/۹۲±۰/۴۴[a]	۳/۹۰±۰/۰۱[a]	۳/۴۵±۰/۱۸[b]	۳/۸۷±۰/۱۴[a]	۰/۰۲۹

a,b: حروف مختلف در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد ($p<0/05$).

جدول ۲- مقایسه رشد بخش‌های مختلف استخوانی جنین بین گروه‌های مورد مطالعه (میانگین± انحراف معیار).

گروه‌ها / فراسنجه‌ها (میلی‌متر)	شاهد	ویتامین E	لیپوپلی‌ساکارید	لیپوپلی‌ساکارید+ویتامین E	معنی‌داری
متاکارپ	۳/۹۵±۰/۰۱	۳/۸۹±۰/۰۷	۳/۷۸±۰/۱	۳/۸۵±۰/۲۳	۰/۷۹
متاتارس	۴/۸۶±۰/۰۲[a]	۴/۸۱±۰/۱[a]	۴/۵۱±۰/۰۵[b]	۴/۷۷±۰/۰۴[a]	۰/۰۲۵
بند اندام‌های حرکتی پیشین	۳/۸۹±۰/۱[a]	۳/۸۲±۰/۰۶[a]	۲/۹±۰/۴[b]	۳/۷۶±۰/۳۱[a]	۰/۰۰۹
بند اندام‌های حرکتی پسین	۳/۵۵±۰/۲۴[a]	۳/۵۱±۰/۰۳[a]	۲/۴۵±۰/۰۱[b]	۳/۵±۰/۰۰[a]	۰/۰۰۶
جناغ	۵/۹۷±۰/۵۴	۵/۹۴±۰/۳	۵/۸۸±۰/۲	۵/۹۲±۰/۱	۰/۸۲

a,b: حروف مختلف در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد ($p<0/05$).

جدول ۳- مقایسه مقادیر مالون‌دی‌آلدئید (نانومول بر میلی‌گرم) بافت‌های مختلف بین گروه‌های مورد مطالعه (میانگین± انحراف معیار).

فراسنجه‌ها / گروه‌ها	مالونیل‌دی‌آلدئید جفت	مالونیل‌دی‌آلدئید کبد مادر	مالونیل‌دی‌آلدئید کبد جنین
شاهد	۲۵۵/۱±۱۲/۳[a]	۴۳۲/۴۵±۳۱/۹[a]	۲۷۱/۴±۳۱/۱[a]
ویتامین E	۲۶۴/۴±۵/۷[a]	۴۴۷/۳۹±۱۰/۰[a]	۲۷۹/۶±۲۱/۸۷[a]
لیپوپلی‌ساکارید	۳۶۸ /۸±۲۴/۸[b]	۷۱۰/۱۱±۵۴/۳[c]	۵۳۱/۸۶±۸۸/۹[c]
ویتامین E + لیپوپلی‌ساکارید	۲۶۹/۱۲±۱۵/۲[a]	۴۷۹/۵۸±۲۳/۲[b]	۳۲۱/۰۱±۱۰/۹۷[b]
معنی‌داری	۰/۰۱۹	۰/۰۰۵	۰/۰۰۹

a,b: حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد ($p<0/05$).

جدول ٤- مقایسه مقادیر گلوتاتیون (نانومول بر میلی‌گرم) بافت‌های مختلف بین گروه‌های مورد مطالعه (میانگین± انحراف معیار).

فراسنجه‌ها / گروه‌ها	جفت	کبد مادر	کبد جنین
شاهد	٥٤٦/١±٦٥/٩٨[a]	١٠٢٥/٢٣±٢٤/٦[a]	٦٨٤/٤٣±٢٥/٨[a]
ویتامین **E**	٥٣٧/٣٤±٣١/٧[a]	١٠٠٠/٤٣±١٥/٧[a]	٦٧٨/٢١±١٤/٦[a]
لیپوپلی‌ساکارید	٢٤٧/٢٨±٥١/٢[c]	٧٢٤/٢٨±٧٦/٩[b]	٣٠٥/٢٣±٧٦/٥[c]
ویتامین **E** + لیپوپلی‌ساکارید	٤١٠ /٢٦±٤٧/٨[b]	٧٥٤/٤±١٢٧/٢[b]	٥٧٠/٢٣±٤١/٦[b]
معنی‌داری	٠/٠٠٩	٠/٠١٧	٠/٠٠٦

a,b: حروف مختلف در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (p<٠/٠٥).

بحث و نتیجه‌گیری

لیپوپلی‌ساکارید (LPS) یک ترکیب سمی در دیواره باکتری‌های گرم منفی بوده و معمولاً به مقدار زیادی در لوله گوارش انسان و حیوانات حضور دارد (Jacob *et al*.,1997) و به‌دنبال هرگونه استرس در دستگاه گوارشی احتمال ورود این ماده به جریان گردش خون و بیماری‌زایی آن در نقاط مختلف بدن وجود دارد (Fukui *et al*., 1991). با انتقال LPS از مادر به جنین عوارض متعددی ازجمله اختلال در رشد یا مرگ جنین ایجاد شده است که در انسان بیشتر با سقط جنین همراه بوده (Romero *et al*., 1988) و در جوندگان می‌تواند با مرگ جنین در داخل رحم و یا جلوگیری از رشد آن و ایجاد جنین نارس همراه باشد (Ogando *et al*., 2003). یکی از مهم‌ترین دلایل عوارض ناشی LPS تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن از ماکروفاژها به دنبال تحریک آن‌ها توسط LPS می‌باشد (Silver *et al*.,1995). از طرف دیگر LPS موجب اختلال در عملکرد آنزیم هم‌اکسیژناز ۱ در کبد جنین می‌شود که با افزایش تولید رادیکال آزاد همراه است (Bautista *et al*., 1990).

با توجه به مطالب فوق و تحقیقات انجام شده، این نکته به اثبات رسیده است که عوارض ایجادشده توسط LPS به‌دنبال ایجاد یک سمیت اکسیداتیو در بدن می‌باشد (Silver *et al*.,1995; Bautista *et al*., 1990). با توجه به نوع عارضه ایجادشده از LPS، استفاده از روش‌های مختلف برای کاهش سمیت اکسیداتیو این ماده 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 همواره به‌عنوان یک ماده محافظت‌کننده و همچنین پیشگیری‌کننده مطرح بوده‌اند و استفاده از آن‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو توصیه شده است (Shen X *et al*., 2005). مشخص شده است که استفاده از داروهای آنتی‌اکسیدان می‌تواند آسیب جنینی ایجادشده توسط LPS در موش را کاهش دهد (Buhimschi *et al*., 2003; Chen *et al*., 2005; Yuan-Hua *et al*., 2006). مطالعات محققین در سال ۲۰۰۳ نشان داد که N-acetylcysteine که پیش‌ساز گلوتاتیون بوده و از طرف دیگر دارای نقش آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، قادر است نقش محافظتی در برابر سقط جنین ناشی از LPS داشته باشد (Buhimschi *et al*., 2003). محققان چینی

نیز در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که استفاده از اسید آسکوربیک به عنوان آنتی‌اکسیدان، می‌تواند نقش پیشگیرانه‌ای در برابر عوارض و آسیب‌های جنینی ناشی از LPS داشته باشد (Yuan-Hua *et al*., 2006).

آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند خطر پیشرفت ده‌ها بیماری مهلک را کاهش دهند و باعث عمری طولانی‌تر و با کیفیت بالاتر شوند (Para *et al*., 1998). ویتامین E یکی از ویتامین‌های محلول در چربی است. این ویتامین همچون ویتامین C خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد و اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد در بافت‌های بدن را از بین می‌برد. سابیک و همکاران در سال ۲۰۰۹ اثرات حمایتی ویتامین E و گیاه زنجبیل بر سمیت القاءشده توسط سیکلوفسفامید در دستگاه تولید مثل موش‌های نر، پیش از شروع دوره شیمی‌درمانی را گزارش کردند (Sabik *et al*., 2009). الشمسی و همکاران در سال ۲۰۰٤ نیز نشان داده‌اند که ویتامین E با کاهش گلوکز خون در موش‌های آزمایشگاهی دیابتی موجب کاهش عوارض بیماری می‌گردد. در مطالعه ایشان کاهش مالونیل‌دی-آلدئید (MDA) و افزایش گلوتاتیون (GSH) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در موش‌های دیابتی تیمارشده با ویتامین E گزارش شده است (Alshamsi *et al*., 2004). ویتامین E با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها و محافظت در برابر رادیکال‌های آزاد، مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان غشاهای بیولوژیک است (Traber and Atkinson, 2007). شن و همکارانش در سال ۲۰۰۵ ثابت کردند که استفاده از ویتامین E و سلنیوم می‌تواند میزان آپوپتوز سلولی را کاهش دهد (Shen *et al*., 2005). در سال ۲۰۰۵ جمعی از محققان ترکیه‌ای ثابت کردند که استفاده از ویتامین E می‌تواند سمیت کبدی ایجادشده توسط دوگزوروبیسین (doxorubicin) را که در واقع عارضه‌ای ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌باشد، کاهش دهد (Kalender *et al*., 2005). مشخص شده است که ویتامین A نیز قادر است عوارض LPS را تا حد زیادی کاهش دهد ولی قدرت آنتی‌اکسیدانی آن در مقایسه با ویتامین E کمتر می‌باشد (Delashoub *et al*., 2014).

در مطالعه حاضر نشان داده شد که LPS می‌تواند منجر به استرس اکسیداتیو و آسیب ناشی از آن در بدن مادر و جنین گردد. این اثر با بررسی افزایش مقادیر MDA و کاهش مقادیر GSH و همین‌طور تاثیر روی رشد جنین قابل توجیه است. مواجهه با LPS به طور معنی‌داری منجر به کاهش وزن جنین، طول بدن جنین و همین طور کاهش رشد استخوانی در بندهای اندام‌های حرکتی پیشین و پسین و همین‌طور متاتارس می‌شود که یافته اخیر با نتایج ریورا و همکاران در سال ۱۹۹۸ هم‌خوانی دارد (Rivera *et al*., 1998). افزایش مقادیر MDA در بررسی حاضر به دلیل افزایش در ساخت و تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. LPS منجر به آسیب اکسیداتیو در ارگان‌های مختلف می‌گردد که با افزایش مقادیر MDA در سرم و بافت‌ها مشخص می‌شود. یافته‌های بررسی اخیر با نتایج محققان پیشین در این زمینه هم‌خوانی دارد (Altavilla *et al*., 1990; Ben-Shaul *et al*., 2001; Nordberg and Arner, 2001). تحقیق انجام‌گرفته توسط باتیستا و همکارانش در سال ۱۹۹۰ نشان داد که LPS منجر به تحریک ماکروفاژها شده و باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بافت‌ها می‌شود که با افزایش نیتروزین در ارگان‌های غنی از ماکروفاژ همراه است (Bautista *et al*., 1990). اجیما و همکارانش در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که LPS

منجر به افزایش میزان ٤-هیدروکسی۲-نوننال (4-hydroxy-2-nonenal) در جفت می‌شود که این پروتئین هم دلیل دیگری بر ایجاد استرس اکسیداتیو در جنین می‌باشد (Ejima *et al.*, 2000). رادی و همکارانش ثابت کردند که کاهش گروه‌های سولفیدریل بعد از اندوتوکسمی ممکن است به دلیل افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و نیتریک اکسید (NO) باشد که دلیل دیگری بر آسیب اکسیداتیو است (Radi *et al.*, 1991). این کاهش در گروه‌های سولفیدریل ممکن است به دلیل کاهش در تولید پروتئین‌های دارای گروه‌های SH و کاهش در تولید GSH و کاهش فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز در بافت‌ها باشد (Savitha *et al.*, 2005). گلوتاتیون به‌عنوان یکی از مشهورترین مولکول‌های نابودکننده رادیکال‌های آزاد در سیتوپلاسم می‌باشد. در مطالعه حاضر، کاهش در مقادیر این ماده در کبد مادر و جنین بعد از استفاده از LPS نشان می‌دهد که LPS منجر به افزایش آسیب اکسیداتیو و به طبع آن کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گشته است. این کاهش در میزان GSH می‌تواند منجر به افزایش آسیب در چربی‌ها، پروتئین‌ها و همین‌طور DNA شود (Riedel and Maulik, 1999). ویتامین E به عنوان عاملی آنتی‌اکسیدانی، قادر است به‌طور مستقیم با کاهش پراکسیدازهای غشا باعث کاهش عملکرد رادیکال‌های آزاد و کاهش آسیب اکسیداتیو گردد. این کار با تسهیل عملکرد GSH پراکسیداز هموارتر می‌شود. مطالعه اخیر نشان داد که مصرف هم‌زمان ویتامین E با LPS منجر به کاهش عوارض این ماده در روند رشد جنین و همین‌طور روند استخوان‌سازی در قسمت‌های مختلف از قبیل بندهای اندام‌های حرکتی پیشین و پسین و متاتارس می‌گردد. همین‌طور این ویتامین قادر بوده مقادیر MDA در کبد جنین و مادر را که به‌دنبال استفاده از LPS افزایش چشمگیری داشت، تا حد طبیعی خود کاهش دهد. همچنین کاهش معنی‌دار GSH به‌دنبال مواجهه با LPS، با درمان هم‌زمان با ویتامین E به‌صورت معنی‌داری جبران شد. تمامی نتایج فوق نشان از قدرت حفاظتی ویتامین E در برابر عوارض ناشی از LPS در جنین دارد. با توجه به اینکه استفاده از داروهای مختلف در طول دوران بارداری محدودیت های زیادی دارند، لذا استفاده از ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان ایمن، در برابر عوارض جنینی LPS 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

- Aliverti, V., Bonanomi, L. and Giavini, E. (1979). The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. Teratology, 20(2): 237-242.
- AlShamsi, M., Amin, A. and Adeghate, E. (2004). Beneficial effect of vitamin E on the metabolic parameters of diabetic rats. Cell Biochemistry, 261(1-2): 35-42.
- Altavilla, D., Squadrito, G., Minutloi, L., Deodato, B., Bova, A., Sardella, A., *et al*. (1990). Inhibition of nuclear factor-kB activation by IRFI 042 protects against endotoxin-induced shock. Cardiovascular Research, 54(3): 684-693.
- 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, A., Nyska, A., Zurovsky, Y., Bergman, M. and Grossman, S. (2001). The effect of natural antioxidants, NOA and apocynin, on oxidative stress in the rat heart following LPS challenge. Toxicology Letters, 123(1): 1-10.
- 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.
- Cederberg, J., Siman, C.M. and Eriksson, U.J. (2001). Combined treatment with Vitamin E and Vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. Pediatrics Research, 49(6): 755-762.
- Chen, Y.H., Wang, G.P., Wang, H., Sun, M.F., Wei, L.Z., Wei, W., *et al*. (2005). Lipopolysaccharide treatment down regulates the expression of the pregnant X receptor, cyp3a11 and mdr1a genes in mouse placenta. Toxicology, 211(3): 242-252.
- Delashoub, M., Banan Khojasteh, S.M. and Khodadadi, A. (2014). Protective Role of Vitamin A against Fetal Injuries Induced by Lipopolysaccharides. Annual Research and Review in Biology, 4(12): 1948-1957. [In Persian]
- Ejima, K., Koji, W., Tsuruta, D., Nanri, H., Kashimura, M. and Ikeda, M. (2000). Induction of apoptosis in placentas of pregnant mice exposed to lipopolysaccharides possible involvement of Fas/Fas ligand system. Biology of Reproduction, 62(1): 178-185.
- 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.
- Gayle, D.A., Beloosesky, R., Desai, M., Amidi, F., Nunez, S.E., Ross, M.G., *et al*. (2004). Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. American Journal of Physiology and Regulative Integrated Comparative Physiology, 286(6): 1024-1029.
- Griffith, O.W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Analytical Biochemistry, 106(1): 207-212.
- Herrera, E. and Barbas, C. (2001). Vitamin E action, metabolism and perspectives. Journal of Physiology and Biochemistry, 57(2): 43-56.
- Jacob, A.L., Goldberg, P.K., Bloom, N., Degenshein, G.A. and Kozinn, P.G. (1997). Endotoxin and bacteria in portal blood. Gastroenterology, 72(6): 1268-1270.
- Kalender, S., Kalender, Y. and Yel, M. (2005). Doxorubin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats.The effect of vitamin E and catechin. Toxicology, 1209(1):39-45.
- Kaya, H., Sezik, M., Ozkaya, O., Dittrich, R., Siebzehnrubl, E., Wildt, L., *et al*. (2004). Lipid peroxidation at various estradiol concentrations in human circulation during ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. Hormones and Metabolic Research, 36(10): 693-695.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.G. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biology and Chemistry, 193(1): 265-275.

- Malmezat, T., Breuille, D., Capitan, P., Mirand, P. and Obled, C. (2000). Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. Journal of Nutrition, 130(5): 1239-1246.
- Nordberg, J. and Arner, E.S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. Free Radicals Biology, 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.
- 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.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. and Freeman, B.A. (1991). The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Journal of Biology and Chemistry, 266(7): 4244-4250.
- Riedel, W. and Maulik, G. (1999).an integrated response of the central nervous system to oxidative stress. Molecular Cell Biochemistry, 196(1-2): 125-132.
- Rivera, D.L., Olister, S.M., Liu, X., Thompson, J.H., Zhang, X.J., Pennline, K., *et al*. (1998). Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise. FASEB Journal, 12(2): 189-197.
- 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.
- Sabik, L.M.E. and Abdel-Rahman, S.S. (2009). Alpha-tocopherol and ginger are protective on Cyclophosphamide induced gonadal toxicity in adult male albino rats. Basic Applied Pathology, 2(1):9-21.
- Savitha, S., Tamilselvan, J., Anusuyadevi, M. and Panneerselvam, C. (2005). Oxidative stress on mitochondrial antioxidant defense system in the aging process. Role of DL-a-lipoic acid and L-carnitine. Clinica Chimica Acta, 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.
- Shen, X., Sun, J. and Xie, LM. (2005). Effects of dietary supplementation with vitamin E and selenium on rat hepatic stellate cell apoptosis. World Journal of Gastroentrology, 28(32): 49-61.
- Traber, M.G. and Atkinson, G. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. Free Radicals Biology and Medicine, 43(1): 4-15.
- Tsiotou, A.G., Sakorafas, G.H., Anagnostopoulos, G. and Bramis, J. (2005). Septic shock current pathogenetic concept from a clinical perspective. Medical Science Monitoring, 11(3): 76-85.
- Wasowicz, W., Neve, J. and Peretz, A. (1993). Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. Clinical Chemistry, 39(12): 2522-2526.
- Xu, D.X., Chen, Y.H., Wang, H., Zhao, L., Wang, G.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. Gynecology, 195(6): 1707-1714.
- 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.

Effect of vitamin E in prevention of lipopolysaccharide induced fetal injuries in the rat

Mohammadzadeh, H.[1], Delashoub, M.[2*], Khakpour, M.[3]

1- Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
*Corresponding author's email: masoud-delashoub@iaut.ac.ir
(Received: 2017/8/19 Accepted: 2018/2/5)

Abstract

Lipopolysaccharides (LPS) are one of the most important factors in the formation of embryonic damages. These damages include intra-uterine growth retardation, intra-uterine fetal death, embryonic absorption and preterm birth and are associated with oxidative stress caused by lipopolysaccharides. This study aimed to investigate the protective effect of vitamin E on lipopolysaccharide induced fetal damages in the rat. In this study, 48 pregnant rats were selected and allocated to 4 groups. In groups 1 and 2, 75 µgr/kg of lipopolysaccharides were injected intraperitoneally on day 15 to 17 of pregnancy. A week before administration of lipopolysaccharides to rats of groups 2 and 3, they received 20 mg/kg of intramuscular vitamin E daily. Group 4 received normal saline intraperitoneally as a control group. In day 18 of pregnancy all mice were euthanized. In each animal, the number of live and dead embryos were counted. Then the live fetuses were weighed and the length of crown–rump, metacarpus, metatarsus, anterior phalanges, posterior phalanges and sternum were determined. In addition, the amounts of malondialdehyde and glutathione were measured in maternal and embryonic liver and placenta. Administration of lipopolysaccharides significantly increased fetal mortality and reduced fetal weight, length of the tail and crown–rump, live embryos and skeletal ossification of the metacarpus, metatarsus, anterior and posterior phalanges and sternum. Results showed that simultaneous administration of vitamin E and lipopolysaccharides reduced damages and improved respective injuries in mice embryos.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Vitamin E, Lipopolysaccharide, Fetal damage, Antioxidant, Rat.