

## بررسی ایمنوهِستوشیمیایی اثر هیپوتیروئیدی مادری در دوران بارداری و شیردهی بر تغییرات بیان لامینین در آلوئول‌های ریه نوزادان رت نژاد ویستار

زهرا هوشمند M.Sc.\*، مریم عامریون M.Sc.<sup>۱</sup>، ناصر مهدوی شهری Ph.D.<sup>۱</sup>، مهدی جلالی Ph.D.<sup>۲</sup>،  
محمد رضا نیکروش Ph.D.<sup>۲</sup>

۱- دانشگاه فردوسی، دانشکده علوم پایه، مشهد، ایران

۲- دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، مشهد، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Zhoshmand@ymail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۲۸

### چکیده

**هدف:** در این مطالعه سعی شده است با استفاده از مطالعات ایمنوهِستوشیمی، بررسی اثر هیپوتیروئیدی مادری بر تغییرات بیان لامینین در آلوئول‌های ریه نوزادان رت نژاد ویستار مورد بررسی قرار گیرد.

**مواد و روش‌ها:** در این بررسی از رت‌های ماده باکره نژاد ویستار استفاده شد. رت‌های مادر در دو گروه تجربی (هیپوتیروئید و هیپوتیروئید تیمار شده با تیروکسین) و یک گروه کنترل (هر گروه شامل ۱۲ رت) قرار گرفتند. در گروه‌های تجربی، رت‌ها ۱۴ روز قبل از جفت‌گیری به ترتیب در معرض داروهای ضد تیروئیدی پروپیل تیواوراسیل، با دوز ۵۰ میلی‌گرم و به‌طور هم‌زمان داروهای پروپیل تیواوراسیل و لووتیروکسین، به ترتیب با دوزهای ۵۰ و ۱ میلی‌گرم در هر لیتر آب آشامیدنی قرار گرفتند. پس از ۱۴ روز جهت اطمینان از تغییرات سطح هورمون‌ها، از رت‌های مادر تست خون گرفته و به آن‌ها اجازه جفت‌گیری داده شد. سپس از ریه نوزادان ۱۰ روزه جهت انجام مطالعات ایمنوهِستوشیمیایی نمونه‌برداری به عمل آمد.

**نتایج:** در آلوئول‌های ریه، در گروه هیپوتیروئید کاهش معنی‌داری در بیان لامینین ( $p=0/001$ ) مشاهده شد، در حالی‌که گروه هیپوتیروئید تیمار شده با تیروکسین تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان نداد.

**نتیجه‌گیری:** هورمون‌های تیروئیدی اثرات بسیار مهمی بر بیان لامینین و تکوین ریه دارند، به طوری‌که هیپوتیروئیدی مادری باعث کاهش قابل توجهی در بیان لامینین در آلوئول‌ها می‌شود. بنابراین تغییر در میزان طبیعی هورمون‌های تیروئیدی مادری می‌تواند باعث تغییرات گسترده‌ای در تکوین آلوئول‌های ریه جنین و نوزاد شود.

**واژگان کلیدی:** هیپوتیروئیدی، مطالعات ایمنوهِستوشیمیایی، لامینین، آلوئول

## مقدمه

مواجه کند خواهد توانست تکوین طبیعی ریه را دچار مشکل نماید. بنابراین با توجه به اهمیت فوق العاده آلوئول‌های ریه در فرآیندهای مرتبط با تنفس و از آن‌جا که در ارتباط با اثر هیپوتیروئیدی مادری بر تکوین آلوئول‌ها تحقیقات چندانی صورت نگرفته، در این تحقیق سعی شد تا با استفاده از ردیابی لامینین در ماده خارج سلولی و در ساختار غشای پایه آلوئول-های ریه به شدت بیان آن به‌عنوان یک ابزار مطالعه تلقی گردد.

## مواد و روش‌ها

تعداد ۳۶ عدد رت باکره نژاد ویستار دارای سن ۲/۵ ماه و وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم تهیه شد. کلیه مراحل انجام کار با رعایت کدهای اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوبه وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی انجام گرفت. (حیوانات در شرایط استاندارد خانه حیوانات دانشکده علوم، گروه فیزیولوژی دانشگاه فردوسی مشهد با دمای مناسب و آب آشامیدنی و غذای کافی تحت مراقبت بوده و پرفیوژن بطنی و نمونه‌برداری تحت بی‌هوشی عمیق انجام گرفت. رت‌ها در ۳ گروه ۱۲ تایی قرار گرفتند: الف) گروه تجربی ۱ داروی پروپیل تیواوراسیل (PTU) (ساخت شرکت ایران دارو) را به‌صورت محلول در آب آشامیدنی با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۵) دریافت کردند. گروه تجربی ۲ نیز به‌طور هم‌زمان داروهای پروپیل تیواوراسیل و لووتیروکسین (ساخت شرکت ایران دارو) را به‌ترتیب با دوزهای ۵۰ میلی‌گرم و ۱ میلی‌گرم (۶) در هر لیتر آب آشامیدنی دریافت کردند. گروه کنترل فقط آب آشامیدنی دریافت کردند. لازم به ذکر است تمام گروه‌های تجربی به‌مدت ۱۴ روز قبل از جفت‌گیری و در تمام طول دوره بارداری و شیردهی در معرض این داروها قرار گرفتند. به گروه کنترل در تمام طول آزمایش آب لوله کشی شهری داده شد. برای حصول اطمینان از ایجاد کاهش سطح هورمون‌های تیروئیدی در گروه هیپوتیروئید و عدم کاهش آن در گروه هیپوتیروئید تیمار شده با تیروکسین سطوح هورمون‌های تیروئیدی در پلاسمای خون رت‌ها به‌روش رادیوایمونواسی اندازه‌گیری شد. به این منظور با استفاده از لوله‌های شیشه‌ای موئینه استریل و ضد انعقاد خون از ورید چشمی حیوانات به‌میزان ۰/۵ تا ۱ میلی‌لیتر خون‌گیری به‌عمل آمد و پس از سانتریفوژ کردن آن‌ها، سرم خون جدا شد و در لوله‌های هپارینیزه پندرف به آزمایشگاه مرکزی جهاد دانشگاهی مشهد منتقل شد. سپس با استفاده از کیت کاوشیار و به‌روش رادیو

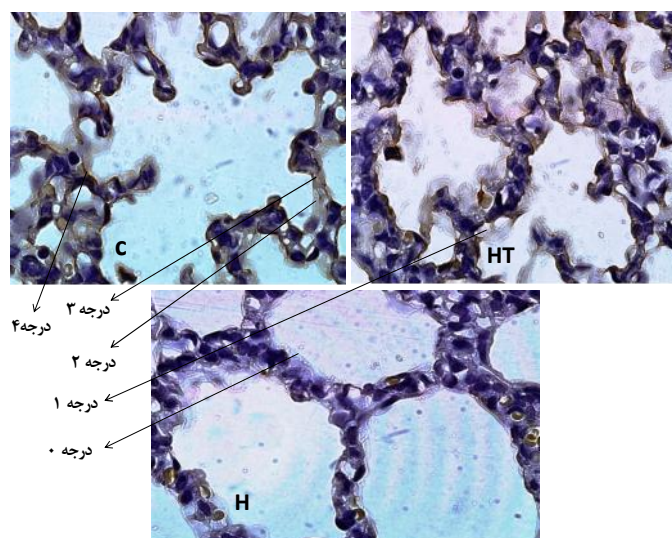
بررسی‌های به‌عمل آمده نشان داده است که هورمون‌های تیروئیدی لازمه تکوین طبیعی بافت‌های بدن محسوب می‌شوند تا آنجا که در زمان ارگانوژنز و در شرایطی که هنوز تیروئید جنین تکوین نیافته و قادر به ترشح نیست، جنین به هورمون‌های تیروئیدی مادری وابسته است که از طریق جریان خون از سد جفتی گذشته و در روند تکوین بافت‌های جنینی بخصوص سیستم عصبی نقشی حیاتی ایفا می‌نماید (۱). در این زمینه مطالعات نشان می‌دهد که در مچخه رت، مهاجرت نورون‌ها از لایه گرانولار خارجی به لایه گرانولار داخلی در دوران پس از تولد رخ می‌دهد و وابسته به حضور هورمون‌های تیروئیدی است. به‌طوری‌که در افراد هیپوتیروئید، بسیاری از نورون‌ها مهاجرتشان را کامل نمی‌کنند و می‌میرند (۲). بنابراین چنین استنباط می‌شود که سیستم هورمونی مادری و من‌جمله هورمون‌های تیروئیدی دارای این قابلیت است که به سهم خود در پدیده‌های تکوین و ارگانوژنز جنینی مشارکت نماید. با این توصیف بعید به‌نظر نمی‌رسد که در غیاب هورمون‌های تیروئیدی مادری، تکامل سیستم تنفسی نیز بمانند بعضی دیگر ارگان‌ها با مشکل مواجه شود. در رابطه با تاثیر هورمون‌های تیروئیدی بر روی ریه، این هورمون‌ها به‌طور مستقل یا همراه با گلوکوکورتیکوئیدها، برای رشد و تکوین نرمال ریه‌ها ضروری اند (۳). افزایش در میل ترکیبی رسپتورهای تیروئیدی و اشغال آن‌ها به‌وسیله T3 در طی تکوین ریه در پستانداران (خرگوش)، نیز بیانگر همین موضوع می‌باشد (۳). بررسی‌ها نشان می‌دهد که هورمون‌های تیروئیدی بر روی آلوئول نوع II، سنتز و ترشح سورفاکتانت موثر است، به‌طوری‌که که تیروئیدکتومی در رت بالغ قطر سلول‌های آلوئولی نوع II را به ۱/۳ میزان طبیعی آن‌ها کاهش می‌دهد. عکس این‌حالت در سلول‌های آلوئولی نوع II ریه‌های بالغ، که به‌مدت شش روز در معرض T4 اضافی قرار گرفتند صادق است، این سلول‌ها دستخوش هیپرتروفی می‌شوند (۴). در این مطالعه نقش هورمون‌های تیروئیدی بر تکوین آلوئول‌های ریه مورد مطالعه قرار گرفت. از سوی دیگر در ساختار خارج سلولی آلوئول‌ها، پروتئین‌های متعددی ایفای نقش می‌کنند که لامینین یکی از مهم‌ترین آن‌هاست. اهمیت این پروتئین در ساختار ریه آنقدر مهم است که چنانچه تغییرات تکوینی حاصل از نقایص ژنتیکی یا ترشحات هورمونی یا هر عامل دیگری که بیان ژن‌های کدکننده مربوط به آن را با اشکال

با این تکنیک رنگ آمیزی، laminin مورد نظر بر اساس میزان پیدایش، به anti laminin واکنش مثبت نشان داده و به رنگ قهوه‌ای (برحسب میزان laminin از قهوه‌ای روشن تا تیره) ظاهر شدند. بنابراین پس از عکس برداری از لام‌ها توسط میکروسکوپ دوربین‌دار، با استفاده از روش گانگ (۷، ۸، ۹) درجه رنگ-ناپذیری صفر و رنگ‌پذیری از ۱ تا ۴ در نظر گرفته شد تا بتوان در ارزیابی تغییرات آن را از حالت کیفی به کمی تغییر داد. در این بررسی با استفاده از نرم افزار آماري spss و تست‌های کروسکال والیس و من‌ویتنی اقدام به تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم جداول و نمودارهای مورد نظر شد.

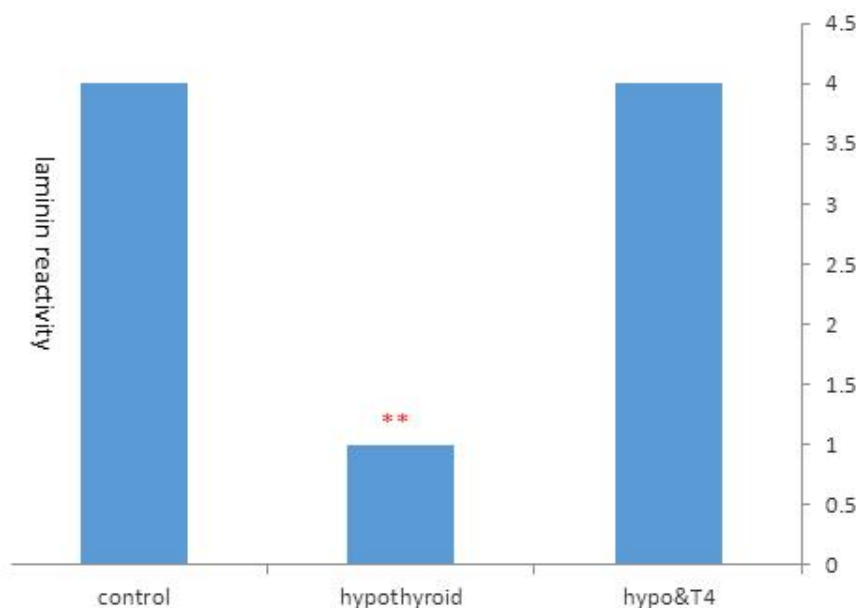
### نتایج

مقایسه تغییرات بیان لامینین بین ۳ گروه کنترل، هیپوتیروئید و هیپوتیروئید تیمار شده با تیروکسین، تغییرات معنی‌داری را در بیان لامینین در آلوئول‌های نوزادان ۱۰ روزه نشان داد (شکل ۱ و نمودار ۱). در این نوزادان، واکنش‌پذیری لامینین در نوزادان مربوط به مادران هیپوتیروئید نسبت به نوزادان مربوط به گروه کنترل به میزان قابل توجهی کاهش پیدا کرد ( $p=0/001$ ) (شکل ۱ و نمودار ۱). در حالی که واکنش‌پذیری لامینین در گروه هیپوتیروئید تیمار شده با تیروکسین مشابه گروه کنترل بود (شکل ۱ و نمودار ۱).

ایمونواسی (RIA) سطح سرمی هورمون‌های T3 و T4 هر یک از نمونه‌ها معین شد و در صورت تغییرات لازم در هر کدام از گروه‌ها به آن‌ها اجازه جفت‌گیری داده شد. نحوه آمیزش رت‌ها به این صورت بود که در ابتدای هر شب یک رت ماده به همراه یک رت نر در داخل قفس قرار داده شدند و در صبح روز بعد، با استفاده از سوآپ از ناحیه واژن رت ماده گسترش تهیه شد و در زیر میکروسکوپ جهت اطلاع از وجود یا عدم وجود اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. نوزادان مربوط به گروه کنترل و گروه‌های تجربی در روز دهم پس از تولد، پس از بی‌هوشی با کلروفرم و پرفیوژن بطنی (با استفاده از فرمالدئید ۴ درصد) مورد فیکس اولیه قرار گرفتند و سپس ریه آن‌ها جدا سازی و جهت مطالعات ایمونوهیستوشیمی به الکل ۷۰ منتقل گردید. پس از انجام مراحل آماده سازی بافتی، و قالب‌گیری، از نمونه‌ها برش‌های سریال ۵ میکرونی تهیه شد. به فاصله هر ۱۰ برش یک برش انتخاب شد. نمونه‌ها پس از پارافین زدایی و آبدهی، به مدت ۱۰ دقیقه با PBS شستشو داده شدند، و به مدت ۱۰ دقیقه‌ی دیگر، در تریتون  $100\times$  قرار گرفتند، مجدداً با محلول PBS شستشو داده شدند و به مدت ۲ ساعت در معرض آنتی‌بادی آنتی لامینین قرار گرفتند، سپس مجدداً با محلول PBS شستشو داده شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در معرض دی آمینو بنزیدین (DAB) قرار گرفتند. سپس لام‌ها، ۳ بار با محلول PBS شستشو داده شدند و به مدت ۲۰ ثانیه در معرض هماتوکسیلین قرار گرفتند و سرانجام با چسب انتلان با لامل پوشانده شدند.



شکل ۱: واکنش اختصاصی لامینین آلوئول‌های ریوی در نوزادان ۱۰ روزه ( $100\times$ ). بیان لامینین کاهش قابل ملاحظه‌ای را در گروه هیپوتیروئید (H) نسبت به گروه کنترل (C) نشان داد در حالی که میزان بیان لامینین در گروه هیپوتیروئید تیمار شده با تیروکسین (HT) مشابه گروه کنترل بود. گرید بندی بر اساس روش گانگ بر اساس درجه رنگ‌پذیری از ۰ تا ۴.



نمودار ۱: بررسی تغییرات بیان لامینین در آلوئول‌های ریه. بیان لامینین در آلوئول‌های ریه در گروه هیپوتیروئید (H) نسبت به گروه کنترل (C) به‌طور قابل توجهی کاهش یافت در حالی که در گروه هیپوتیروئید تیمار شده با تیروکسین (hypo+T4) نسبت به گروه کنترل تفاوتی مشاهده نشد. علامت \*\*:  $p < 0.01$

### بحث

برای تکوین نرمال ریه‌ها ضروری می‌باشد، مثلاً پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی در بافت ریه در حال تکوین، دارای نقش‌های حمایتی و ساختاری هستند. در این میان گلیکوپروتئین‌هایی مانند فیبرونکتین و لامینین، واکنش‌های بین سلول‌ها را میانجی‌گری می‌کنند. لامینین در واکنش‌های سلول-ماتریکس ایفای نقش می‌کند و در هموستاز و بازسازی بافت در طی جنین‌زایی مهم است (۱۹ و ۲۰). سلول‌های آلوئولار روی غشای پایه‌ای قرار گرفته‌اند که از کمپلکسی از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی ساخته شده است. در ریه‌های سالم ترکیب این ماتریکس باعث اتصال سلول‌های اپی‌تلیالی آلوئولی به یکدیگر می‌شوند. همچنین در ریه موش، لامینین به‌وسیله پیوند با اینتگرین‌های سطح سلولی واکنش‌های بین سلول‌های اپی‌تلیال و مزانشیم را میانجی‌گری می‌کند (۲۱).

در واقع سلول‌های آلوئولی احتمال دارد که حداقل ۵ ایزوفرم لامینین را بیان کنند، به‌عنوان مثال، در زمان تشکیل آلوئول، بیان زیر واحد ۱ اینتگرین در اپی‌تلیوم آلوئول افزایش پیدا می‌کند (۲۲). در ریه رت زنجیره ۳ لامینین در غشای پایه آلوئول بیان می‌شود و در این مکان با زیرواحدهای ۱، ۲ و ۳ متمرکز می‌شود زنجیره ۳ برای آلوئول‌ها بسیار می‌باشد به‌طوری‌که جهش در این زنجیره، باعث اختلال در تجمع غشای پایه سلول‌های اپی‌تلیالی آن می‌شود. همچنین، ایزوفرم زنجیره

رِسپتورهای هورمون‌های تیروئیدی در بخش‌های مختلف ریه و مخصوصاً آلوئول‌ها وجود دارند. در واقع بیان mRNA یکی از زیرواحدهای این رسپتورها (*TR I*)، در مرحله آلوئولار تقریباً به حد ماکزیمم می‌رسد که این موضوع بیانگر نقش به‌سزای این هورمون‌ها بر تکوین آلوئول‌ها می‌باشد (۳). بیان لامینین نیز از نظر تکوینی تنظیم شده است، برای مثال زیر واحدهای ۱ و ۲ در شش‌های جنین بیان می‌شوند در حالی‌که زیرواحدهای ۳، ۴ و ۵ لامینین در شش‌های جنین و بالغ شناسایی شده است (۱۰) و هورمون‌های تیروئیدی بر بیان لامینین تاثیرگذار می‌باشند (۱۷-۱۱). از این‌رو با توجه به اثرات گسترده هورمون‌های تیروئیدی در تکوین اندام‌های مختلف (۲، ۶، ۱۷ و ۱۸) و با توجه به اینکه ریه یکی از مهم‌ترین ارگان‌های بدن و آلوئول‌ها مهم‌ترین بخش آن محسوب می‌شوند، در این مطالعه سعی شده است به بررسی اثر هیپوتیروئیدی مادری در دوران بارداری و شیردهی، بر تکوین آلوئول‌های جنین و نوزاد پرداخته شود. در حقیقت در این مطالعه سعی بر این است تا با تکیه بر مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی به بررسی تغییرات لامینین در غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی آلوئول‌ها، در نوزادانی که مادران آن‌ها در معرض داروهای ضد تیروئیدی قرار گرفته‌اند، پرداخته شود. همان‌گونه که می‌دانیم ماتریکس خارج سلولی

مهم‌ترین عناصر تشکیل دهنده ماده خارج سلولی و غشای پایه آلونول‌ها محسوب می‌شود کاهش بیان آن نوعی نقص بشمار می‌رود که به نوبه‌ی خود تکوین آلونول‌ها را نیز با مشکل مواجه می‌کند. از طرف دیگر با توجه به مطالعه حاضر می‌توان مشکل کاهش بیان لامینین در اثر کاهش هورمون‌های تیروئیدی را با تجویز مقدار مناسبی از هورمون تیروئیدی (T4) بهبود بخشید. تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر اثر کم‌کاری هورمون‌های تیروئیدی بر روی بیان لامینین در ریه انجام نشده است. با توجه به مطالعه حاضر می‌توان چنین استنباط کرد که کاهش تیروئید در مادر و در طی بارداری و شیردهی می‌تواند باعث کاهش قابل توجهی در بیان لامینین در نوزاد شده و بنابراین تکوین ریه را نیز تحت تاثیر قرار دهد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با همت و همکاری اساتید راهنما و مشاور و با بهره‌گیری از کمک‌های آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه فردوسی و آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد صورت گرفته. لذا بدین وسیله از همه دست‌اندرکاران و همچنین مسئول خانه حیوانات گروه فیزیولوژی دانشگاه فردوسی مشهد به‌خاطر همکاری صمیمانه‌شان کمال تشکر و قدردانی را داریم.

### منابع

1. Jalali M, Nikravesht MR. Maternal hypothyroidism and cell development in brain cortex during embryonic period and after birth in rat. *J Medical sciences*. 2006; 44: 27-36.
2. P Farwell F, A Dubord S. thyroid hormones regulates the extracellular organization of laminin on astrocytes. *J Endocrinology*. 1999; 140(11): 5014-5021.
3. Rajatapiti P, Kester M, Krijger R, Rottier R, et al. Expression of glucocorticoid, retinoid, and thyroid hormone receptors during human lung development. *J Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005; 90(7): 4309-4314.
4. Holt JP, Canavan J, Goldspink F. The influence of thyroid hormones on the growth of the lungs in perinatal rats. *J Developmental Biology*. 1993; 37(3): 467-72.

۲ لامینین در غشای پایه مجاری پری‌آلونولاری یافت می‌شود و بیشتر در طی تکوین ریه (خرگوش) و در زمان تمایز سلول‌های آلونولی نوع II، بیان و در زیر این سلول‌ها متمرکز می‌شود (۲۲). این مطالب، همه بیانگر نقش مهم لامینین در تکوین آلونول‌ها می‌باشد، علاوه بر این هورمون‌های تیروئیدی نقش مهمی را در تکوین و بلوغ آلونول‌ها ایفا می‌کنند، به‌عنوان مثال این هورمون‌ها سنتز سورفاکتانت را تسهیل می‌کنند. تکوین مناسب سیستم سورفاکتانت ریوی برای تنفس نرمال در زمان تولد لازم است (۲۳)، به‌طوری‌که کمبود سورفاکتانت در جنین‌های نارس، علت اصلی سندرم دیسترس تنفسی نوزاد می‌باشد. در جنین نارس انسانی که مبتلا به سندرم دیسترس تنفسی است، غلظت سرمی T3 و T4 در دوره بعد از تولد پایین‌تر از جنین نارس بدون سندرم دیسترس تنفسی است (۲۴). همچنین سندرم دیسترس تنفسی به نسبت بالا در کودکانی که در دوران جنینی مبتلا به هیپوتیروئیدی بوده‌اند، دیده می‌شود (۲۵ و ۲۶). نمودار ۱ و نتایج حاصل از آنالیزهای آماری در پژوهش حاضر، در رابطه با بیان لامینین در آلونول‌های ریوی نشان داد که هیپوتیروئیدی مادری باعث کاهش معنی‌داری در میزان بیان لامینین نسبت به گروه کنترل می‌شود در حالی‌که هیچ تفاوت معنی‌داری در بیان لامینین در آلونول‌های نوزادان گروه هیپوتیروئید تیمار شده با تیروکسین نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. با توجه به مطالعات انجام شده توسط سایر محققان و تایید حضور لامینین در غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی و تاثیر هورمون‌های تیروئیدی بر آن و نتایج به‌دست آمده در این پژوهش می‌توان چنین استنباط کرد که هیپوتیروئیدی در آلونول‌ها میزان بیان لامینین را همانند آن در مخچه کاهش می‌دهد و با توجه به اینکه این کاهش در مرحله بحرانی تکوین آلونول‌ها اتفاق می‌افتد ممکن است تکوین آلونول‌ها را دچار مشکل کند. همچنین بیان لامینین در آلونول‌های نوزادان ۱۰ روزه در دو گروه کنترل و هیپوتیروئید تیمار شده با تیروکسین مشابه بود که این بیانگر این موضوع است که هورمون تیروکسین می‌تواند جایگزین خوبی برای درمان افراد هیپوتیروئید و بازگرداندن آن‌ها به حالت طبیعی باشد.

### نتیجه‌گیری

کم‌کاری تیروئید بر روی بیان لامینین اثر مستقیمی دارد و باعث کاهش بیان آن می‌شود از آنجایی‌که لامینین یکی از

5. Knipper M, Zinn C, Maier H, Praetorius M, et al. Thyroid hormone deficiency before the onset of hearing causes irreversible damage to peripheral and central auditory systems. *J Neurophysiology*. 2000;83: 3101-112
6. Amerion M, Hushmand Z, Tahajjodi SS, Mahdavi Shahri N, et al. The immunohistochemical effect of maternal hypothyroidism and hyperthyroidism during pregnancy and lactation on skin development in wistar rat newborns. *J Cell & Tissue*. 2012; 3(1): 1-8
7. Jalali M, Nikravesh MR, Moeen AA, Mohammadi Sh, et al. Maternal Nexposure on Collagen Type IV Pulmonary Changes in Mouse Offspring's. *J Iranian Anatomical Sciences*. 2010; 8: 139-147.
8. Nikravesh MR, Moeen AA, Jalali M, Mohammadi S, et al. Maternal nicotine induces collagen type IV changes and its role on pulmonary bronchogenesis and alveolarization in mouse newborns. *J Pharmaceutical Sciences*. 2010; 16(3): 181-186.
9. Gong H, Ye W, Freddo TF, Hernandez MR. Hyaluronic acid in the normal and glaucomatous optic nerve, *J Exp Eye Res*. 1997; 64: 587-595.
10. R. Jones JC, Lane K, Hopkinson SB, Lecuona E, et al. Laminin-6 assembles into multimolecular fibrillar complexes with perlecan and participates in mechanical-signal transduction via a dystroglycandependent, integrin-independent mechanism, *J Cell Science*. 2005; 118: 2557-2566.
11. Friesema EC. Thyroid hormone transporters. *J Vitamins and hormones*. 2005; 70: 137-167
12. Quatresooz P, Thirion L, Piérard-Franchimont C, Piérard GE. Cutaneous manifestations of endocrine disorders. *J Revue Medicale Liège*. 2006; 61: 104-108.
13. Slominski A. Neuroendocrine sytem of the skin. *J Dermatology*. 2005; 211: 199-208.
14. Bassett J, Swinhoe R, Chassande O, Samarut J, et al. Thyroid Hormone Regulates Heparan Sulfate Proteoglycan Expression in the Growth Plate. *J Endocrinology*. 2005; 147: 295-305.
15. Kimura-Kuroda J, Nagata IN, Negishi-Kato M, Kuroda Y. Thyroid hormone-dependent development of mouse cerebellar Purkinje cells in vitro. *J Brain Resarch and Developmaenatal Brain Research*. 2007; 137: 55-65.
16. Zoeller RT, Crofton KM. Thyroid hormone action in fetal brain development and potential for disruption by environmental chemicals. *J Neurotoxicology*. 2000; 21(6): 935-945.
17. Koibuchi N, Chin W. Thyroid hormone action and brain development. *J Trends of Endocrinology and Metabolism*. 2005; 11: 123-128.
18. Amerion M, Tahajjodi S, Hushmand Z, Mahdavi Shahri N. The Effect of Maternal Thyroid Disorders (Hypothyroidism and Hyperthyroidism) During Pregnancy and Lactation on Skin Development in Wistar Rat Newborns. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2012; 16: 665-674.
19. Shariati M, Nikravesh MR, Jalali M, Fazel AR, et al. Maternal nicotine exposure altered expression of laminin 5 in lung tissue newborn mice. *Journal of cell and animal biology*. 2012 ; 6(15): 226-232.
20. Shariati M, Nikravesh MR, Jalali M, Fazel AR, et al. Effect of maternal nicotine exposure on expression of laminin alpha in lung tissue of newborn. *Pakistan Journal of Biological Science*. 2012; 15(24):1168-1175.
21. Rafighdoust H, Nikravesh MR, Jalali M. Pattern of laminin expression during kidney morphogenesis in Balb/c mice. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2010; 13(19): 961-965.
22. Warburton D, Schwarzb M, Tefftc D, Flores-Delgado G, et al. The molecular basis of lung morphogenesis. *J Mechanisms of Development*. 2002; 92: 55-81.
23. Philip L, Ballard M, Hovey L, Gonzales L. Thyroid hormone stimulation of phosphatidylcholine synthesis in cultured fetal rabbit lung. *J Clinical Investigation*. 1984 ; 74(3): 898-905.
24. Erenberg A, Frank L, J.Rberts RL, Rhodes M. Pulmonary superoxide dismutase activity in the euthyroid and hypothyroid ovine fetus. *J Pediatric Research*. 1982; 16: 570-572.
25. Mahoney AD, Jain L. Respiratory disorders in moderately preterm, late preterm, and early term infants. *Clin Perinatol*. 2013; 40(4): 665-678.
- 26- Polin RA, Carlo WA. Surfactant replacement therapy for preterm and term neonates with respiratory distress. *Pediatrics*. 2014 ; 133(1): 156-163.