

اثرات مورفوژنیک و تراتوژنیک اسید رتینوئیک در جنین جوجه

(۱) مهدی شریعتی - (۲) دکتر مجتبی رضازاده - (۳) دکتر محمد خاکساری

خلاصه:

اسید رتینوئیک یکی از مشتقات ویتامین A می باشد که اثرات مورفوژنیک و تراتوژنیک متفاوتی بر روی اندامهای در حال تکامل دارد.

در این پژوهش اثرات اسید رتینوئیک بر روی جوانه اندام، چشم و محور بدن جنین جوجه در مرحله ۱۱-۱۲ Humburger & Hamilton مورد بررسی قرار گرفته است. بدین طریق که ۱۴۰ عدد تخم مرغ نطفه دار انتخاب و آنها را به ۳ گروه جهت مطالعه تقسیم نمودیم و بعددوزه‌های مختلف ۰، ۰/۳ و ۰/۵ میکروگرم از اسید رتینوئیک محلول در ۲ میکرو لیتر Dimethyl sulfoxide به آنها تزریق شد و بعد از ۴۸ ساعت مطالعه های میکروسکوپی و ماکروسکوپی در مورد آنها انجام شد. نتایج این مطالعه نشان دادند که اسید رتینوئیک با غلظت ۰/۳ و ۰/۵ میکروگرم موجب انحراف محور بدن و ناهنجاری جوانه اندام می شود. این مطالعه پیشنهاد می کند که یکی از اثرات مورفوژنیک و تراتوژنیک اسید رتینوئیک در جنین جوجه، ناهنجاری در شکل گیری جوانه اندام، چشم و انحراف در محور بدن می باشد.

مقدمه:

اسید رتینوئیک یکی از مشتقات ویتامین A می باشد که اثرات مورفوژنیک و تراتوژنیک متفاوتی بر روی اندامهای در حال تکامل دارد. مکانیزم ملکولی که اسید رتینوئیک باعث این اثرات می شود هنوز بصورت دقیق توضیح داده نشده است. با کشف پروتئینهای اختصاصی داخل سلولی برای اتصال به اسید رتینوئیک، این چنین پیشنهاد شده است که اسید رتینوئیک و پروتئین به هم متصل شده و سپس به هسته منتقل و

در آنجا رونویسی ژن را تغییر می دهند (۱۱). تاکنون گیرنده های زیادی برای اسید رتینوئیک شناخته شده است که مهمترین آنها عبارتند از آلفا، بتا و گاما. Esther و همکاران نشان دادند که گیرنده نوع گاما رونویسی ژن را تغییر داده و نقش مهمی در تمایز بافت سنگفرشی دارد. وی الگوی توزیع گیرنده های اسید رتینوئیک را در طی تکامل صورت موش مطالعه و نتیجه گرفت که: گیرنده بتا در ناحیه بینی و چشم، گیرنده گاما

۱- عضو هیأت علمی دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۲- عضو هیأت علمی دانشکده پزشکی - دانشگاه تربیت مدرس

۳- عضو هیأت علمی دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

مواد و روش کار:

جهت بررسی اثرات مرفوژنیک و تراتوژنیک اسید رتینوئیک در جنین جوجه از ۱۴۰ عدد تخم مرغ نطفه دار نژاد White Leghorn استفاده شد. تخم مرغها در انکوباتور با درجه حرارت 38.1 ± 1 و رطوبت نسبی ۵٪ قرار داده و برای جلوگیری از چسبندگی یا مرگ جنین هر روز سه بار تخم مرغها چرخانده شدند.

Dimethyl sulfoxide (DMSO) از شرکت سیگما تهیه و در تاریکی و درجه حرارت 20°C - درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. دوزهای ۰/۳ و ۰/۵ میکروگرم در ۲ میکرو لیتر ۸۰٪ DMSO تهیه و در شیشه های استریل تیره و درجه حرارت 20°C - نگهداری و برای هر مرحله آزمایش محلول تازه ساخته شد. در این پژوهش، سه گروه مورد مطالعه قرار گرفتند بدین ترتیب که بعد از سپری شدن ۴۴ تا ۴۸ ساعت از زمان انکوباسیون برای تخم مرغها پنجره باز شد (۵). به ۳۵ عدد دوز ۰/۳، ۳۵ عدد دوز ۰/۵ و ۳۵ عدد ۸۰٪ DMSO (شاهد) به میزان ۲ میکرو لیتر به وسیله سرنگ Hamilton تزریق شد و برای ۳۵ عدد فقط پنجره باز شد (گروه sham).

بعد از گذشت ۴۸ ساعت جنینها خارج، در محلول سرم فیزیولوژی شستشو و سپس با محلول بوئن ثابت (Fixed) گردیدند. با استفاده از میکروسکوپ تشریحی مطالعات مربوطه انجام و برای بررسی بافت شناسی، جنینها پاساژ و سپس بلوک گیری شده و با استفاده از میکروتوم روتاری برشهای عرضی ۵ میکرونی تهیه و با هما توکسین ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شدند.

نتایج:

میزان مرگ و میر جنینها بعد از گذشت ۴۸ ساعت پس از تزریق دوزهای مختلف ۰/۳ و ۰/۵ میکروگرم اسید رتینوئیک در مقایسه با گروه شاهد بررسی شد، که نتایج آن در جدول شماره ۱ خلاصه شده است.

در مزانشیمی که به غضروف و استخوان تمایز می یابد و گیرنده آلفا به طور یکنواخت و کم در ناحیه صورت پراکنده شده اند، به عقیده وی اثر اسید رتینوئیک بر روی ژنهای موثر بر تکامل صورت، وابسته به اعمال اختصاصی این گیرنده ها است (۲).

گزارش شده است اسید رتینوئیک تمایز سلولها را در محیط کشت تسریع می کند (۱۲) و یابه تأخیر می اندازد (۱۷) و رشد و تغییر شکل سلولها را مهار می کند (۱۰) و رشد سلولهای اولیه جنین جوجه را در محیط کشت کاهش می دهد (۱۵). همچنین رتینوئیدها می توانند تمایز سلولهای جنینی کندروسیت را مهار و یا تغییر دهند. غلظت بالای اسید رتینوئیک در دوران آبستنی موجب ناهنجاریهای اندام و سرو صورت می شود (۱۴). این اسید در طی تکامل مهره داران نقش مهمی در الگوی رشد و نمو اندام و ترمیم بازی می کند (۱، ۱۵).

Tickelle و همکاران نشان دادند که اگر این اسید در ناحیه فوقانی جوانه بال جوجه تزریق شود موجب افزایش تعداد انگشتان می شود (۱۶).

Fraser & Travill پیشنهاد کرده اند که اسید رتینوئیک از طریق مهار روند ساخت غضروف، موجب ناهنجاری اندام می شود (۳). با توجه به اینکه اثر اسید رتینوئیک بر روی هسته بوده و در مراحل اولیه تکامل، به علت تغییر در نسخه برداری، موجب تظاهرات ناهنجاری می شود، لذا در مطالعه پژوهشی که ما انجام دادیم اثرات مرفوژنیک و تراتوژنیک اسید رتینوئیک را در مرحله ۱۱-۱۲ تکامل جنین جوجه بر روی جوانه اندام، لوله عصبی و چشم که از نظر زمان تکامل در مراحل زمانی مختلفی می باشند - بررسی نمودیم. اثرات تراتوژنیک این اسید بر روی لوله عصبی قبلاً گزارش شده است و در این مقاله اثرات مرفوژنیک و تراتوژنیک اسید رتینوئیک را بر جوانه اندام و چشم بصورت توصیفی گزارش می نمائیم.

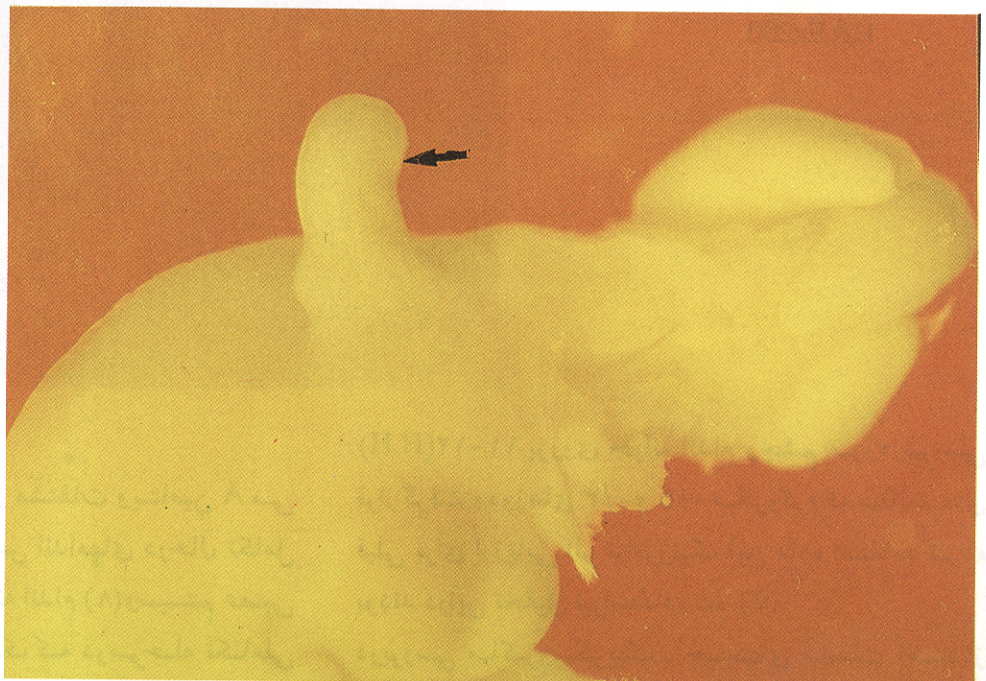
جدول ۱- اثر دوزهای مختلف ۰/۵ و ۰/۳ میکروگرم/سیدرتینوئیک و گروه شاهد بر میزان مرگ و میر جنینها ۴۸ ساعت بعد از تزریق.

وضعیت جنین	گروه	Sham	حامل DMSO	۰/۳ میکروگرم	۰/۵ میکروگرم
مرده	۰	(۰٪)	۳	۵	۶
			(۸/۵٪)	(۱۴/۲٪)	(۱۷٪)
زنده	۳۵	(۱۰۰٪)	۳۲	۳۱	۲۹
			(۹۱/۵٪)	(۸۵/۷٪)	(۸۳٪)
جمع	۳۵	۳۵	۳۵	۳۵	۳۵

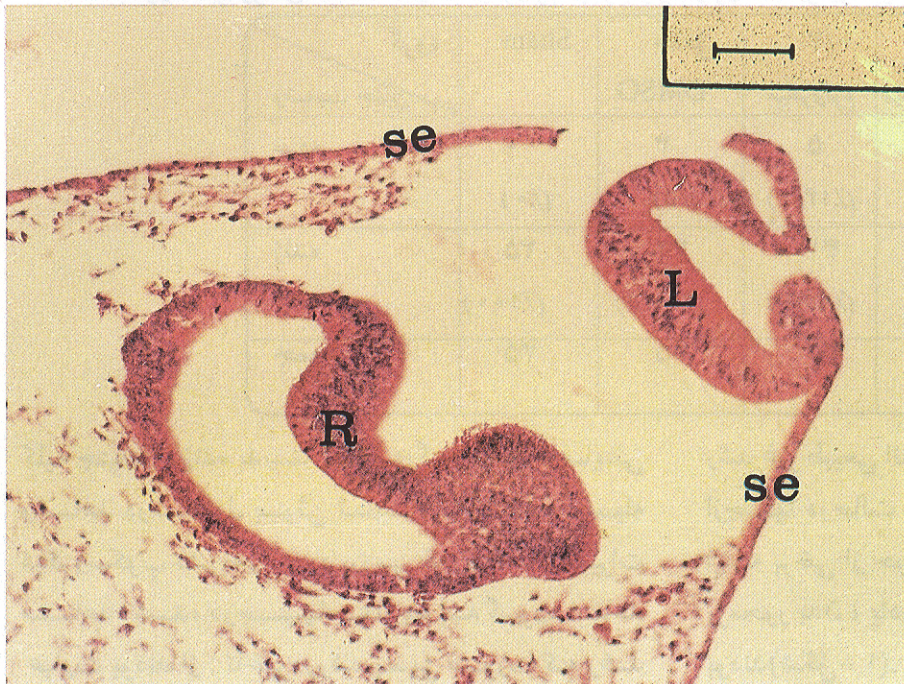
رشد غیر طبیعی اندامهای مشاهده شد، اندامهای دربرخی از جنینها در حالت طبیعی و محل اصلی خود نبودند یعنی اینکه برخی از جوانه های اندام فوقانی و تحتانی، عمود بر محور بدن، یادبرخی موارد به سمت پشت رشد کرده بودند (شکل - ۱).

در مطالعه میکروسکوپی جنینهای گروه آزمایشی، نسبت به گروه شاهد تغییرات مشاهده شده عبارتند از: ناهنجاری چشم، اتصال نوتوکورد باروده دمی، انحراف در محور جوانه اندام، (شکل های ۲ و ۳).

کلیه جنینهای زنده بدست آمده در گروههای آزمایشی و شاهد در محلول بوئن ثابت شدند و به وسیله میکروسکوپ تشریحی مورد بررسی قرار گرفتند. تغییرات مشاهده شده در جنینها با توجه به گروه شاهد عبارت بودند از: تأخیر در رشد بدین صورت که رشد برخی جنینها از یک مرحله (Stage) تا یک روز کاهش یافته بود، انحراف در محور بدن (Scoliosis) به طوریکه برخی جنینها انحنای طبیعی خود را در طی این مرحله از رشد و تکامل نداشتند.



شکل ۱- جنین چهار روزه از گروه آزمایشی رانشان می دهد که دارای ناهنجاری جوانه اندام است (فلش)



شکل ۲ - برش عرضی چشم جنین از گروه آزمایشی را نشان می دهد شبکیه (R) ناهنجار و عدسی (L) در تماس با اکتودرم سطحی (Se) دیده می شود H&Ex200



شکل ۳ - برش عرضی جنین از گروه آزمایشی جوانه اندام (LB) خلاف محور بدن رشد کرده است H&Ex200

بحث :

(H.H) ۱۱-۱۲ بر روی جوانه اندام و چشم مورد بررسی قرار گرفت و دوزهای ۰/۳ و ۰/۵ میکروگرم که مطالعه های قبلی برای ارزیابی اثر تراتوژنیک این ماده استفاده کرده بودند در این تحقیق نیز استفاده شد (۷). در بررسی ماکروسکوپی ، جنینهای بدست آمده از

اسید رتینوئیک یکی از مشتقات ویتامین A می باشد که اثرات متفاوتی بر روی اندامهای در حال تکامل مانند قلب (۷)، کام (۱) ، جوانه اندام (۸) و سیستم عصبی دارد. بنابراین اثر اسید رتینوئیک که در مرحله تکاملی

است عملی شبیه به هورمونهای استروئیدی داشته باشند (۱۸)، و کاربرد موضعی آن در جوانه اندام جوجه سبب تکامل ناهنجار اندام به وسیله اثر گذاری در ژنوم سلولهای مزانشیمی تشکیل دهنده جوانه اندام می شود. چشم در تعدادی از جنینهای گروه آزمایشی ناهنجار بود و این ناهنجاری درد و بخش عدسی و شبکیه دیده می شود. عدسی و شبکیه تکامل کافی رابا توجه به نمونه های شاهد نداشتند و در برخی موارد لنز کوچک و حتی به اکتودرم متصل بود. Langman & Weleh در مطالعه ای که انجام دادند گزارش نمودند افزایش ویتامین A در مراحل اولیه بارداری موجب ناهنجاری چشم می شود (۹)، مانیز گزارش می کنیم که تزریق ۰/۳ یا ۰/۵ میکروگرم اسید رتینوئیک در مرحله (H-H) ۱۱-۱۲ با اثر گذاری بر روی عدسی و شبکیه موجب ناهنجاری چشم می شود.

سپاسگزاری:

بدینوسیله مراتب تشکر خود را از آقای ابولهادی و سرکار خانم ملایی که در انجام تایپ اولیه ماریاری نمودند اعلام می نمایم.

دو گروه آزمایشی ۰/۳ و ۰/۵ میکروگرم تأخیر در رشد را نشان می دادند که از یک stage تا یک روز متغیر بود. این مشاهده تأییدی برگزارشهای Gelink and kistler است (۷). انحراف در محور بدن که در این مطالعه در گروههای آزمایشی مشاهده شد احتمالاً به دلیل تکثیر سلولهای در یک طرف بدن نسبت به سمت دیگر می باشد. مشاهدات مانیز تأییدی برگزارش Griffth می باشد (۴). در مرحله ۱۱-۱۲ تکامل جنین جوجه جوانه اندام در مراحل اولیه تکامل و رشد می باشد. سلولهای مزانشیمی جوانه اندام خیلی سریع می تواند تحت اثر عوامل خارجی قرار گیرد و در این مطالعه تعدادی از جنینهای هردو گروه آزمایشی ناهنجاری جوانه اندام را نشان دادند. چون تزریق اسید رتینوئیک در زمانی بوده است که مراحل اولیه شکل گیری جوانه اندام است و از آنجائیکه Slack و Tickle گزارش نموده اند که اسید رتینوئیک در طی تکامل مهره داران نقش مهمی در الگوی ساخت اندام دارد (۱۳، ۱۶) و با توجه به شناخته شدن پروتئینهای اختصاصی داخل سلولی برای اتصال به اسید رتینوئیک این حدس قوت می گیرد که این اسید ممکن

REFERENCES:

- 1- Brokes JP: Retinoid homeobox genes and limb morphogenesis - nueron 1989 ;2:1285-1294 .
- 2- Eshter R, Dascal P, et al : specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis. Development 1990; 108:213 -222.
- 3- Fraser ,D.A, and travill A.A. The effect of retinoic acid on chondrogenesis in the fetal hamster tibia in vivo. J .Em. Exp. Morphol 1978;48:23-35.
- 4- Friffth CM, wiley M.Y: Effects of retinoic acid tail bud development .Teratology 1991;43:217-224.
- 5- hamburger V, hamilton HL: A series of normal stages in the Development of the chick embryo .J. Morph 1951 ;88:49 -92.
- 6- Irie K, Morishima M, et al: 13 cis Retinoic acid induced cardiovascular malformation in ICR and NOD mice .Teratology 1988;38:504 -516 .
- 7- jelinek R, Kistler A: Effect of Retinoic acid upon the chick embryonic morphogenetic

- system 1, the embryotoxicity dose rang. Teratology 1981;23 : 191 -195.
- 8- Kochhar ,D.M: Cellular basis of congenital limb deformity induced in mice by vitamin A in morphogenesis and malformation of the limb .Vol 13 birth defects original articles series. Dbergma and Wlens G.W: Excess vitamin A and development of the cerebral cortex .J ,comp ,neurol 1967;131:15-26.
- 9- Langman ,J and Welch G.W: Excess vitamin A and development of the cerebral cortex .J.comp ,neurol 1967;131:15-26.
- 10- Lotan ,R and Nicolson G.L: Inhibitory effects of retinoic acid or retinylacetal on the growth of untransformed transformed and tumor cells in vitro .J,Natl ,Cancer inst 1977;1717 -1722.
- 11- Ong,D.E and Chytil F: Retinoic acid binding protein in rat tissue partial purification and comparison to rat tissue retinol - binding protein in rat tissue partial purification and comparison to rat tissue retinol - binding protein .J Biol Chem 1975;250:411 -417 .
- 12- Robson J,A and , Sidell N: Ultrastructural features of a human neuroblastoma cell line treated with retinoic acid .Neuroblastoma cell line treated with retinoic acid .Neuroscience ,1985;14 :1149-1162.
- 13- Slack ,J. M.W: Morphogenetic gradients -past and present .Tibs 1987;129 :200-204 .
- 14- Sulik ,K.K: Isotretinoin embryopathy and the cranial Neural crest : an In vivo and in vitro study. J craniofac .Cent ,devl.Biol 1986 ,6: 211-222.
- 15- Thaller ,C and ,Eichele ,G: Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud,nature land 1987;327:625-628.
- 16- Tickle .C,Alberts Br et al; local application of retinoic acid to limb bud mice . the action of the polarizing region .Nature 1982;290: 564 -566.
- 17- Waters ,B.K, and ,Rossant J: the effect of Retinoic acid pretreatment on the ability of murine embryonal carcinoma and inner cell mass to participate in chimera development .J Emb Exp Morphol 1986;98:99-110.
- 18- Wiley MJ,Cauwenbergs P , et al : Effect of retinoic acid on the development of the facial skeleton in hamsters early changes involving cranial neural crest cells.Acta Anat 1983;116:180-192 .

Effects of Morphogenic and Teratogenic Retinoic Acid in Chick Embryo

Shariati M.,MS

Rezazadeh M.,PhD

Khaksari M.,PhD

ABSTRACT:

Retinoic acid "one of the derivatives of vitamin A "has different morphogenic and teratogenic effects on developing organs.

For this reason, the present study is an attempt to examine the effects of retinoic acid on limb bud ,eye and body axis of chick embryo in the stages of 11-12 Hamburger and Hamilton.

The experiments carried out in this study was based on 140 white eggs which have been divided into the three groups .Each group were injected 0.0 ,0.3,0.5 microgram of retinoic acid solution in 2 microliter of dimethyl sulfoxide. After 48 hours, microscopic and macroscopic investigations were made.

The results showed that retinoic acid with dosages of 0.3 and 0.5 microgram caused scoliosis ,limb bud and eye defect in comparison with the control group.

The study suggests that one of the morphogenic and teratogenic effects of the retinoic acid in chick embryo is abnormality in limb bud,eye and body axis.