Archive of SID

تأثیر رتینوییک اسید بر استخوانسازی تیبیای جنین جوجه

حسین ایمانی .MS.c☆، مجتبی رضازاده .Ph.D★♦، احمد حسینی .Ph.D★

☆ دانشگاه علوم پزشکی بقیةاله، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح و گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان

★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

چکیده

* **هدف:** بررسی تأثیر رتینوییک اسید (RA: Retinoic Acid) بر روند استخوانسازی، جذب سلولهای غضروفی و شکل‌گیری بافت مغز قرمز در تیبیای جنین جوجه

* **مواد و روشها:** رتینوییک اسید در حلال DMSO (Dimethylsulfoxide) به گونه‌ای حل شد که ۷۵ درصد میکروگرم RA در ۲ میکرولیتر وجود داشته باشد. محلول بدست آمده در دمای °۲۰- سانتی‌گراد و دور از نور نگهداری شد. دو میکرولیتر از این محلول در روز ششم انکوباسیون به‌صورت موضعی بر جوانه اندام جنین جوجه چکانده شد. جنینهای درمان شده را در روزهای ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ از انکوباسیون خارج کرده و پس از تثبیت کردن، تهیه مقاطع بافتی تیبیا به‌صورت سریال، حجمهای غضروف، شکل‌گیری استخوان، بافت همبند، مغز قرمز و حجم کل تیبیا محاسبه شد؛ همچنین چگونگی استخوانسازیِ تیبیا در گروه طبیعی و شاهد به‌صورت کمی و کیفی مقایسه گردید.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصل از این مطالعات نشان می‌دهد که RA باعث کاهش وزن جنینها و افزایش مرگ ومیر در آنها است. از طرفی می‌تواند حجم بافت همبند و عروقی، شکل‌گیری بافت غضروفی و جذب غضروف را طی استخوانسازی کاهش دهد که در نهایت حجم کلی تیبیا کاهش می‌یابد.

* **نتیجه‌گیری:** بر اساس تحقیق حاضر؛ می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از رتینوییک اسید در دوران جنینی باعث تأخیر در روند استخوانسازی شده و تکثیر سلولهای غضروفی و باز جذب آنها را دچار اختلال می‌نماید.

گل واژگان: رتینوییک اسید، تیبیا، جنین جوجه، استخوانسازی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

RA شکل فعال بیولوژیکی ویتامین A بوده و یک مادهٔ لازم در تکامل جنین است (۱، ۲، ۳) و تأثیرات مهمی بر تمایز و رشد صحیح سلولها (۴، ۵) و شکل‌گیری سر و صورت، مغز، سیستم عروق انسانی دارد (۶)؛ اما از سالها پیش رتینوئیدها به‌عنوان یک مادهٔ تراتوژن شناخته شده‌اند. مصرف بیش از حد آن در جنین حیوانات آزمایشگاهی مانند جوجه (۷، ۸، ۹) و هامستر (۱۴، ۱۵) ناهنجاریهایی را ایجاد می‌کند (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳). به‌نظر می‌رسد که هدف اولیه RA در جنین، نورال کرست و نوروایپتلیال است و با تغییرات بر روی هستهٔ سلول، سبب ناهنجاری می‌شود (۷، ۱۰، ۱۶، ۱۵، ۱۷، ۱۸). RA بر نواحی خاصی از ژنها اثر می‌گذارد و باعث تغییر در الگوی شکل‌گیری ارگانهای مختلف جنین می‌شود (۱۹).

در دو دههٔ گذشته نحوهٔ تأثیر RA در مراحل مختلف رشد جنین مورد مطالعه قرار گرفته است و براساس این یافته‌ها متوجه شده‌اند که RA بر تکثیر، مرگ سلولها و استحکام غشای سلولهای جنین تأثیر می‌گذارد (۲۰، ۲۱). همچنین این ماده می‌تواند با تأثیر اختصاصی بر روند غضروف‌زایی اندامها، ناهنجارهای خاص این نواحی را همچون مزوملیا ایجاد کند که این پدیده به‌دنبال القای نکروز سلولی و افزایش مرگ سلولها در حلقهٔ مزانشیمی پیش غضروف‌ساز جوانه اندام اتفاق می‌افتد (۲۱، ۲۲).

عده‌ای از محققین بر این باورند که RA مرگ سلولی را در مناطقی ایجاد می‌کند که دارای مرگ سلولی از قبل برنامه‌ریزی شده PCD[1] باشند (۲۴، ۲۵). به همین دلیل با درمان جنین ۹/۵ روزه موش به‌وسیلهٔ RA، افزایش نکروز سلولی همراه با PCD در اکتودرم رأسی جوانه اندام (AER: Apical Ectodermal Ridgei) و نواحی سر و صورت را مشاهده خواهیم کرد (۲۶، ۲۷، ۲۸). به‌طور کلی می‌توان چنین نتیجه گرفت که شدت و نوع ناهنجاریها در جنین به میزان RA مصرف شده، مرحله جنینی هنگام مصرف RA و مدت زمان مصرف آن بستگی دارد (۲۱، ۲۹). اگر جنین از قبل یا همزمان با شکل‌گیری ارگان خاصی در معرض RA قرار گیرد، ناهنجاری آن ارگان را بروز خواهد داد و همچنین اگر جنین در مراحل اولیه ظهور جوانهٔ اندام در معرض RA قرار گیرد، احتمالاً مدلهای غضروفی هیالن استخوانهای بلند شکل نخواهند گرفت یا به‌طور ناقص تشکیل خواهند شد و گاهی ممکن است اندامی بدون انگشت به وجود آید. این ناهنجاریها به‌دلیل تقارن شکل‌گیری تجمعات سلولهای پیش‌ساز غضروفی در هنگام درمان با RA است (۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۴، ۳۵). لذا در این مطالعه بر آن شدیم که جنین را در مراحل بعدی در معرض RA قرار دهیم و نتایج حاصل از آن را در استخوانسازی پس از شکل‌گیری مدل غضروفی در استخوانهای بلند اندام پایینی به‌خصوص استخوان تیبیا مطالعه و بررسی نماییم.

مواد و روشها

۷۵ درصد میکروگرم رتینوییک اسید تهیه شده از شرکت سیگما در ۲ میکرولیتر DMSO حل و در محل تاریکی با درجهٔ حرارت ۲۰° سانتی‌گراد نگهداری شد. جنینهای ۳ روزه از انکوباسیون خارج و به‌طور استریل پنجره‌ای به‌ابعاد ۱×۱/۵ سانتی‌متر بر روی تخم‌مرغ باز شد و مجدداً به‌داخل انکوباسیون برگردانده شد و در ابتدای روز ششم جنینی تخم‌مرغها از انکوباسیون خارج گردید و جنینهای زنده به ۳ گروه تقسیم شدند. بر روی جوانهٔ اندام گروه اول، ۰/۷۵ µg/ml RA و جوانهٔ اندام گروه دوم، ۲ میلی‌لیتر DMSO خالص چکانده شد و گروه سوم به‌عنوان گروه کنترل درنظر گرفته شدند.

پنجره‌ها به‌طور استریل بسته شده و سپس تخم‌مرغها به‌داخل انکوباسیون برگردانده شدند. جنینها در روزهای ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ (۳۶) از داخل تخم‌مرغها خارج شده و نمونه‌ها به‌مدت یک هفته داخل فرمالین قرار داده شد تا تثبیت شود و سپس پای راست جنینها جدا و عمل دکلسیفیکاسیون بر روی آنها انجام شد. پس از آن نمونه‌ها پردازش شده و بلوکهای پارافینی تهیه شد.

علاوه بر مطالعات بافتی، از نمونه مقاطع سریال تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی H & E حجمهای بافت غضروف، بافت همبندی عروقی، بافت استخوان ساخته شده، حجم کلی تیبیا در هر سه گروه RA، DMSO و طبیعی محاسبه شد. برای محاسبهٔ حجم مقاطع تهیه شدهٔ نمونه‌ها به نسبت چهار به یک از برشهای سریال انتخاب شد. با استفاده از کامرالوسیدا حجمهای تشکیل شده تیبیا به کاغذ شطرنجی منتقل شد. این عمل برای تمام مقاطع انتخابی (به نسبت ذکر شده) از یک تیبیا انجام شد و سپس مساحت هر مقطع از روی کاغذ شطرنجی محاسبه گردید و حجم آنها با استفاده از فرمول $V=s.n.p$ (V= حجم، s= مساحت هر سطح، n= تعداد برشها و p= ضخامت برش) محاسبه شد (۳۷).

از طرف دیگر برای بررسی روند استخوانسازی پایستی میزان جذب غضروف و شکل‌گیری غضروف در روزهای یاد شده محاسبه شود. برای محاسبهٔ جذب غضروف، افزایش میزان بافت همبندی عروقی در روز دوازدهم نسبت به روز یازدهم با میزان افزایش همین بافت در روز سیزدهم نسبت به روز دوازدهم مقایسه شد (۳۷).

$$V_{CVT}^{3} = \Delta V_{CR}^{3}$$

تغییرات حجم بافت همبندی عروقی = حجم غضروف جذب شده

برای محاسبهٔ شکل‌گیری غضروف افزایش حجم غضروف به‌علاوه افزایش حجم بافت همبندی عروقی (غضروف جذب شده) روز دوازدهم نسبت به روز یازدهم با مجموع همین دو عامل در روز سیزدهم نسبت به روز دوازدهم مقایسه شد (۳۷).

$$V_{CT}^{3} = \Delta V_{CAR}^{5} + V_{CR}$$

افزایش حجم شکل‌گیری غضروف = افزایش غضروف جذب شده + افزایش حجم غضروف در همان زمان

1. Programmed Cell Death
2. Connection & Vescular Tissue
3. Cartilage Resorbtion
4. Cartilage Formation
5. Cartilage

www.SID.ir

Archive of SID

یافته‌ها

یافته‌های حاصل از مطالعات کمی و کیفی در هر سه گروه طبیعی، DMSO و RA در طی روزهای ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ با یکدیگر مقایسه و نتایج زیر استخراج شد. از میان ۱۰۸ جنینی که RA دریافت داشتند، ۵۸/۳۳ درصد جنین از بین رفتند و ۴۱/۶۶ درصد زنده ماندند درحالی‌که از ۹۳ جنینی که فقط ۲ میکرولیتر DMSO ۸۰ درصد دریافت کردند، ۷۸/۴ درصد زنده مانده و ۲۱/۵ درصد مردند که این آمار نمایانگر تأثیر RA در افزایش مرگ و میر است. از طرف دیگر جنینهای هر سه گروه در روزهای ۱۱، ۱۲ و ۱۳ وزن شدند و آزمون آماری نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه طبیعی و DMSO وجود ندارد درحالی‌که اختلاف وزن معنی‌داری بین گروه RA و دو گروه دیگر مشاهده شد ($P<0.0001$) که نشان دهندهٔ کاهش وزن در گروه آزمایش است. در این قسمت به مشاهدات میکروسکوپی در روزهای نهم تا سیزدهم اشاره شده است.

* روز نهم

گروه طبیعی و DMSO

پریوست استخوان تیبیا در برش عرضی به‌صورت دو لایه قابل مشاهده است و در سمت داخل پریوست ناحیهٔ استخوانسازی شده دیده می‌شود که به شکل استوانهٔ توخالی اطراف مدل غضروفی را احاطه کرده است. از طرف دیگر تیغه‌های استخوانی عرضی نازک به‌تعداد کم و در حال رشد به‌طرف مرکز تیبیا و در قسمت میانی مدل غضروفی، سلولهای غضروفی کاملاً هایپرتروفی شده، دیده می‌شود. سلولهای خونی نیز در بخش داخلی‌تر ناحیهٔ مرکزی تیبیا پدیدار گشته‌اند.

گروه رتینوییک اسید

در برش عرضی، پریوست در اطراف تیبیای این گروه و در بخش داخلی پریوست، ناحیهٔ استخوانی شده به‌صورت استوانهٔ توخالی قابل مشاهده است ولی اثری از تیغه‌های عرضی استخوانی و سلولهای خونی نیست. در قسمت میانی مدل غضروفی تیبیا سلولهای هایپرتروفی شدهٔ غضروفی مشاهده می‌شوند ولی بافت همبند و عروقی ایجاد نشده است.

* روز دهم

گروه طبیعی و DMSO

تیغه‌های عرضی استخوانی فضای وسیعی از مقطع عرضی تیبیا را اشغال نموده است و از طرفی سلولهای خونی و بافت همبند و عروقی فراوانی بین تیغه‌ها دیده می‌شوند. در بخش میانی دیافیز تیبیا اثری از سلولهای غضروفی مشاهده نمی‌شود زیرا سلولهای غضروفی دچار مرگ سلولی شده و از بین رفته‌اند. در این روز ۲ تا ۳ ردیف تیغه‌های استخوانی شده متحدالمرکز ایجاد شده و تیغه‌های عرضی نیز بین آنها وجود دارد که نشان‌دهنده افزایش استخوانسازی در تیبیا است.

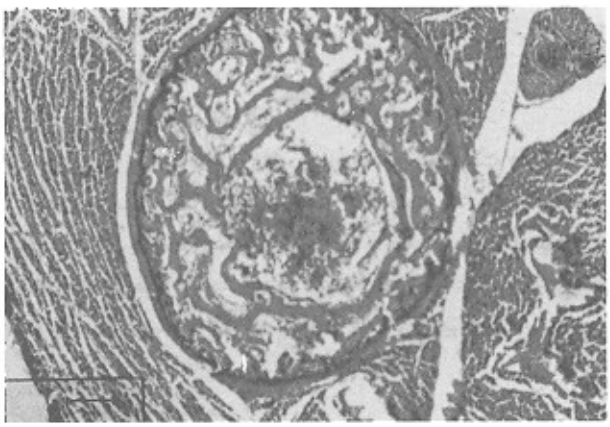
گروه رتینوییک اسید

در این گروه تیغه‌های عرضی استخوانی کمتری نسبت به دو گروه دیگر وجود دارد. مغز قرمز و بافت همبند نیز از تکامل و حجم کمتری برخوردار هستند اما هنوز در بخش میانی دیافیز سلولهای هایپرتروفی غضروفی دیده می‌شود. یک تا دو ردیف تیغه‌های استخوانی نیز ساخته شده‌اند که نمایانگر تأیید RA بر روند استخوانسازی است.

* روز یازدهم

گروه طبیعی و DMSO

تعداد تیغه‌های استخوانی عرضی افزایش یافته‌اند و در بین استخوانهای استوانه‌ای کشیده شده‌اند و بین آنها سلولهای خونی به فراوانی دیده می‌شود. میزان استخوانسازی به شکل استوانه‌های تو در تو در حدود ۳ تا ۴ ردیف است و استخوانسازی نسبت به روز قبل افزایش یافته است (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱: برش عرضی از ناحیهٔ میانی دیافیز تیبیای جنین ۱۱ روزه طبیعی
(رنگ‌آمیزی: H. & E. بزرگنمایی: ×۶۵)

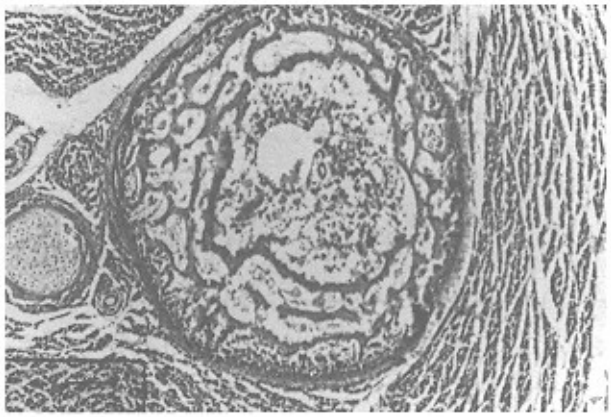
شکل ۲: دو برش عرضی از ناحیهٔ میانی دیافیز تیبیای جنین ۱۱ روزه DMSO
(رنگ‌آمیزی: H. & E. بزرگنمایی: ×۶۵)

گروه رتینوییک اسید

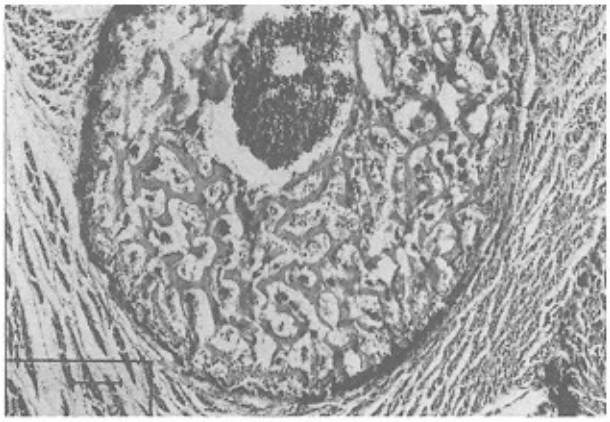
به‌نظر می‌رسد که میزان تراکم تیغه‌های استخوانی، تجمع سلولهای خونی بین تیغه‌ها و ضخامت تیغه‌ها کاهش یافته و در حدود ۲ تا ۳ ردیف استخوانسازی استوانه‌ای تو در تو انجام گرفته است اما اختلافات این گروه با دو گروه دیگر معنی‌دار نیست (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID



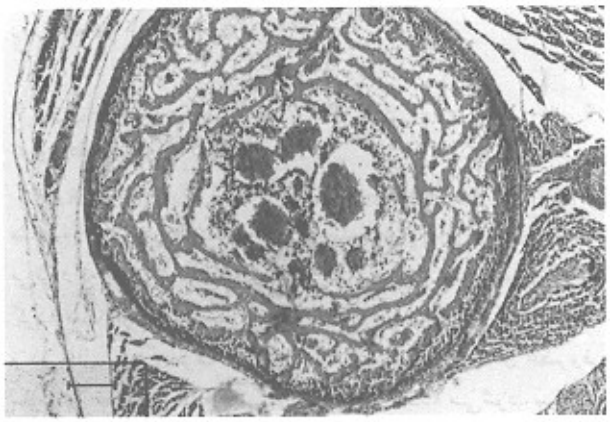
شکل ۳: برش عرضی از ناحیهٔ میانی دیافیز تیبیای جنین ۱۱ روزه رتینوییک اسیدی
(رنگ‌آمیزی: H & E، بزرگنمایی ۶۵x)



شکل ۴: برش عرضی از ناحیهٔ میانی دیافیز تیبیای جنین ۱۳ روزه طبیعی
(رنگ‌آمیزی: H & E، بزرگنمایی: ۶۵x)

* روز دوازدهم
گروه طبیعی و DMSO

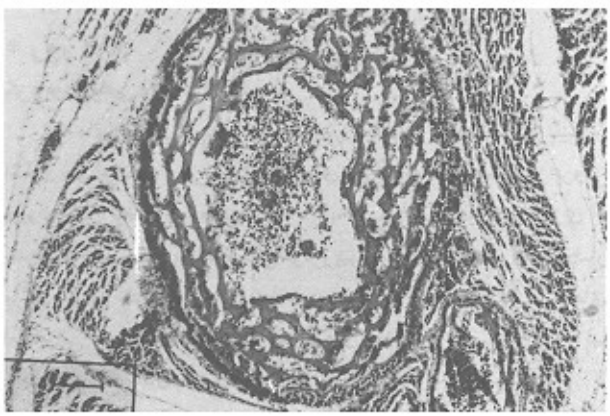
پریوست دو لایه‌ای به‌وضوح دیده شده و در قسمت داخلی آن، تیغه‌های عرضی استخوانی افزایش قابل ملاحظه‌ای پیداکرده است و در حدود ۴ تا ۵ ردیف استخوان استوانه‌ای به صورت دوایر متحدالمرکز در اطراف مغز قرمز مشاهده می‌شود. ضخامت تیغه‌های استخوانی بیشتر شده و در میانه دیافیز اثری از سلولهای غضروفی نیست.



شکل ۵: برش عرضی از ناحیهٔ میانی دیافیز تیبیای جنین ۱۳ روزه DMSO
(رنگ‌آمیزی: H & E، بزرگنمایی: ۶۵x)

گروه رتینوییک اسید

پریوست از وضوح کمتری برخوردار است؛ ضخامت و تعداد تیغه‌های عرضی استخوانی نسبت به دوگروه دیگر در همین روز کاهش دارد و استخوانسازی استوانه‌ای در حدود ۳ تا ۴ ردیف ساخته شده است. قطر عرضی دیافیز نیز کمتر از دوگروه دیگر است (شکل ۶).



شکل ۶: برش عرضی از ناحیهٔ میانی دیافیز تیبیای جنین ۱۳ روزه رتینوییک اسید
(رنگ‌آمیزی: H & E، بزرگنمایی: ۶۵x)

گروه طبیعی و DMSO

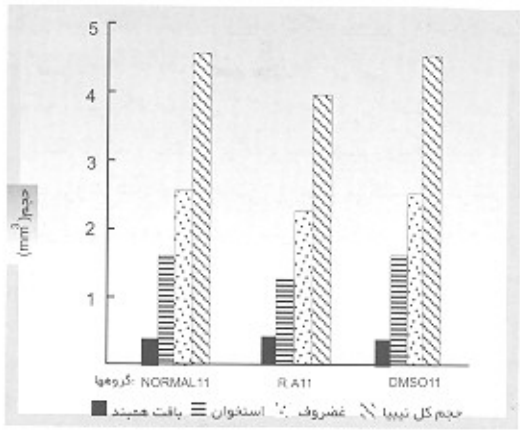
پریوست واضح‌تر شده و با کمترین بزرگنمایی دولایه به‌خوبی مشخص می‌شود. ضخامت تعداد تیغه‌های عرضی استخوانی افزایش یافته و ۵ تا ۶ ردیف استخوان استوانه‌ای درست شده است. مغز قرمز تکامل بیشتری پیداکرده و با مقایسه مقطع عرضی دیافیز تیبیای طبیعی با گروه RA می‌توان به اختلاف قطر آنها پی برد. اختلاف بین گروه طبیعی و DMSO در این روز ناچیز بوده و معنی‌دار نیست که نشان‌دهندهٔ عدم تأثیرگذاری حاد DMSO بر روند استخوانسازی جنینها است (شکل ۴ و ۵).

www.SID.ir

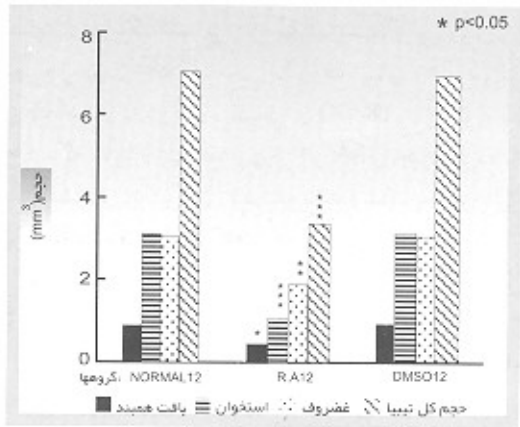
Archive of SID

* بررسی حجمهای بخشهای تشکیل شده تیبیا در استخوانسازی

برای اطمینان از تأثیر رتینوییک اسید، حجم بافتهای استخوانسازی، غضروف، بافت همبندی و حجم کلی تیبیا در ۳ گروه اندازه‌گیری شد و همان‌گونه که در نمودار ۱ مشخص است در روز یازدهم اختلاف معنی‌داری بین این عناصر وجود ندارد ولی در روز دوازدهم این اختلاف به اوج خود رسیده که نمودار ۲ نشان‌دهندهٔ تأثیر رتینوییک اسید است و آزمون One-way اختلاف معنی‌دار بین گروه رتینوییک اسید با دو گروه طبیعی و DMSO را نشان می‌دهد.

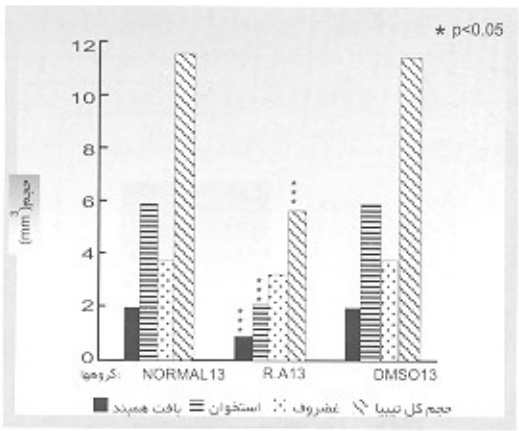


نمودار ۱: مقایسه حجمهای تیبیا در روز یازدهم جنینی بین گروههای RA، نرمال و DMSO



نمودار ۲: مقایسه حجمهای تیبیا در روز دوازدهم جنینی بین گروههای RA، نرمال و DMSO

نتایج حاصل از مورفومتری روز سیزدهم در نمودار ۳ آمده است که نشان دهندهٔ اثر مصرف رتینوییک اسید است. اما مقایسهٔ حجم غضروف تیبیای گروه رتینوییک اسیدی با دو گروه طبیعی و DMSO با آزمون آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد که احتمالاً عقب ماندگی حاصل از تأثیر رتینوییک اسید جبران کرده است و چنین توانسته است این استرس حاصل از مصرف دارو را برطرف کند، ولی هنوز کامل نیست چرا که در موارد دیگر، اختلاف هنوز معنی‌دار است.



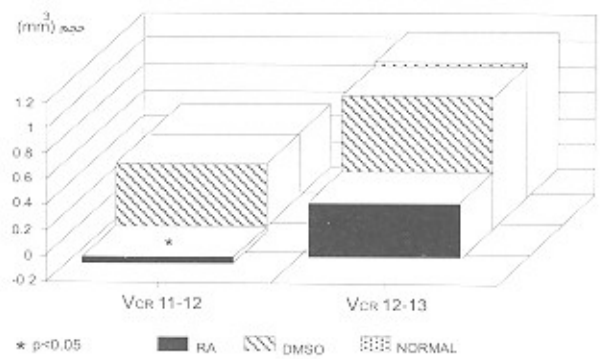
نمودار ۳: مقایسه حجمهای تیبیا در روز سیزدهم جنینی بین گروههای RA با نرمال و DMSO

برای بررسی میزان استخوانسازی دو عامل دیگر نیز در روزهای مختلف بین گروههای سه‌گانه اندازه‌گیری شد که این دو عبارت بودند از:

۱) میزان جذب غضروف، ۲) میزان شکل‌گیری غضروف

همان‌گونه که در نمودار شمارهٔ ۴ دیده می‌شود میزان جذب غضروف در روزهای ۱۱ و ۱۲ در گروه RA با گروه نرمال و DMSO اختلاف فاحشی نشان می‌دهد و از طرفی در روز ۱۲ و ۱۳ نیز این اختلاف بین RA و دو گروه دیگر دیده می‌شود و اگر اختلاف روز ۱۲-۱۱ را با اختلاف ۱۳-۱۲ مقایسه کنیم، می‌توان به وجود این اختلاف بین گروه RA، نرمال و DMSO پی برد و آزمون Kruskal-wallis و mann-whitney اختلاف را در حد معنی‌دار نشان می‌دهد.

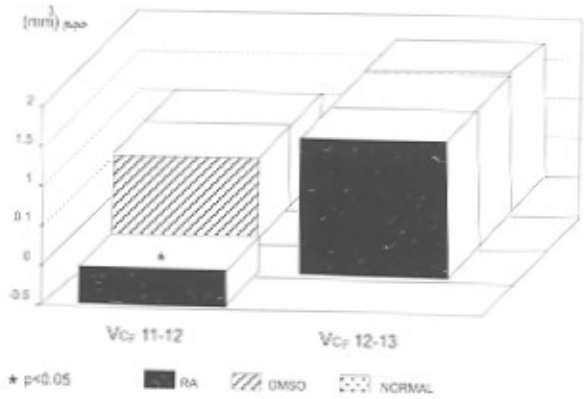
در مورد شکل‌گیری غضروف نیز چنین اختلافی بین روزهای ۱۲-۱۱ با ۱۳-۱۲ دیده می‌شود و به‌نظر می‌رسد که این عقب ماندگی قدری جبران شده باشد. در مقایسهٔ حجم غضروفهای روز سیزدهم، اختلاف گروه RA با دو گروه دیگر مشهود است (نمودار ۳) و با آزمونهای Kruskal-Wallis و Mann-Whitney سطح معنی‌داری را نشان می‌دهد (نمودار ۵).



نمودار ۴: مقایسه میزان جذب غضروف ($V_{(t)}$) در گروههای RA، نرمال و DMSO

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۵: مقایسه حجم شکل‌گیری غضروف (V_{c1}) بین گروه RA، نرمال و DMSO

بحث

استخوانسازی و پیدایش بقهٔ استخوانی[1] در تیبیای جنین جوجه در روز هفتم انکوباسیون آغاز می‌شود (۳۸، ۳۹، ۴۰، ۴۱) و تنها Gaytan و همکاران در سال ۱۹۸۷ شکل‌گیری بقهٔ استخوانی را روز نهم اعلام نمودند (۳۷). استخوانسازی تیبیا با فعالیت پریوست استخوان به‌خصوص لایهٔ داخلی آن شروع می‌شود و با نشست استئوید از لایه استئوبلاستیک پریوست در اطراف ناحیهٔ میانی دیافیز مدل غضروفی یک لایهٔ نازک استخوانی ایجاد می‌شود (۴۲، ۴۳). بنابراین ما جنین را در ابتدای روز ششم یعنی قبل از شروع استخوانسازی در استخوانهای طویل به‌خصوص تیبیا در معرض رتینویک اسید قرار دادیم چراکه تا این مرحله مدل غضروفی اولیه استخوانهای جوانه اندام و بال جنین درست شده است. از سوی دیگر، می‌دانیم که وقتی سلولهای مزانشیمی در جوانهٔ اندام یا بال جنین جوجه برای درست کردن مدل غضروفی تجمع می‌یابد، اگر جنین به‌مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در معرض رتینویک اسید قرار گیرد، ناهنجاریهایی در جوانه اندام یا بال ایجاد خواهد شد (۴۴) در حالی که نمونه‌های آزمایشی این تحقیق پس از شکل‌گیری مدل غضروفی در معرض RA قرار گرفت. روند استخوانسازی با پر عروق شدن لایهٔ استئوبلاستیکی ادامه پیدا می‌کند و سلولهای استئوبلاستی در بین تجمعات عروقی منتشر می‌شود (۴۲). قطر و طول عروق افزایش پیدا می‌کند و ترابکولاهای استخوانها در اطراف مدل غضروفی ایجاد می‌شود. در عین حال تعداد و ضخامت ترابکولاها افزایش پیدا می‌کند و هجوم جوانه استخوانساز تیبیای جنین جوجه در مرحله ۳۶-۳۴ (۱۰ و ۱۱ روزهٔ انکوباسیون) است که نشانگر شکل‌گیری فضای مغزی است (۴۳، ۴۵، ۴۱). درحالی‌که در نمونه‌های جنینی آزمایشی مطالعه شده میزان استخوانسازی تیبیا کاهش یافته است و این کاهش در روزهای دوازدهم و سیزدهم جنینی معنی‌دار است و احتمالاً رتینویک اسید بر فعالیت لایهٔ استئوبلاستیک پریوست تأثیر منفی گذاشته و فعالیت سلولهای استئوبلاست را نیز دچار رکورد کرده است. همچنین احتمالاً RA با تأثیر بر تکثیر سلولهای مزانشیمی از پر عروق شدن لایهٔ پریوست و افزایش طول و قطر عروق نیز ممانعت می‌کند و ما می‌دانیم که عروق خونی، نیروی جلو برندهٔ جوانه استخوانساز را در استخوانسازی فراهم می‌کنند (۴۲).

نتایج حاصل از مورفومتری حجم غضروفهای رتینویک اسیدی در مقایسه با دو گروه طبیعی و DMSO نشان‌دهندهٔ کاهش حجم است که در روز یازدهم با آزمون one-way معنی‌دار نبوده و فقط در روز دوازدهم جنینی معنی‌دار ولی پایین است. در روز سیزدهم مجدداً اختلاف حجم غضروف گروه RA با دو گروه دیگر معنی‌دار نیست. در روند استخوانسازی، سلولهای غضروفی دچار هایپرتروفی شده و با گسترش مویرگها این سلولها جذب می‌شوند (۴۶) و این عمل متأثر از برنامه‌های ژنتیکی از قبل برنامه‌ریزی شدهٔ سلولهای غضروفی و ترشح فاکتورهای سبب‌زا از کندروسیتهای هایپرتروفی شده است. جذب غیرمستقیم غضروف توسط سلولهای تک‌هسته‌ای (۴۷، ۴۸) و جذب مستقیم آن به‌وسیلهٔ عروق خونی صورت می‌گیرد (۴۲) و ما احتمال می‌دهیم که رتینویک اسید میزان تکثیر سلولی را تغییر می‌دهد و مرگ سلولی را القا می‌کند و با تأثیر بر متابولیسم هیالورونیک اسید در سلول غضروفی، پروتئوگلیکانهای خاصی را ایجاد می‌کند و از ترشح فاکتور سبب‌زا جلوگیری کرده و با تأثیر بر سلولهای تک‌هسته‌ای و جلوگیری از رشد عروق و افزایش طول و قطر عروق نیز از جذب غضروف ممانعت به‌عمل می‌آورد (۴۹). یکی از نتایج این تحقیق، کم شدن تمام حجمهای تشکیل شدهٔ تیبیای جنین دوازده روزهٔ رتینویک اسیدی نسبت به جنینهای یازده روزه رتینویک اسیدی است که احتمالاً اثر بر مکانیسمهای استخوانسازی، کاهش فعالیت سلولهای استئوبلاستیک، سلولهای جذب کننده غضروف و ممانعت از رشد مویرگها، به‌دلیل تأثیرگذاری رتینویک اسید بر ژنوم سلولها است.

معنی‌دار نبودن اختلاف حجم غضروف تیبیای جنین سیزده روزهٔ رتینویک اسیدی با دو گروه طبیعی و DMSO را این‌گونه می‌توان توجیه کرد که شاید جنینها مقداری از اثر RA را جبران کرده باشند و سلولهای غضروفی تکثیرشان زیاد شده باشد و شاید به‌همین دلیل است که میزان جذب غضروف نیز کاهش دارد.

از میان نتایج این تحقیق می‌توان به کم شدن اختلاف شکل‌گیری غضروف در جنین ۱۲-۱۱ روزه رتینویک اسیدی با جنین ۱۳-۱۲ روزه از همین گروه با دو گروه طبیعی و DMSO اشاره کرد که احتمالاً باز به‌دلیل تأثیر رتینویک اسید بر میزان تکثیر سلولهای کندروسیت است. البته این اختلاف را می‌توان در مورد جذب غضروف گروه رتینویک اسیدی با دو گروه دیگر نیز مشاهده کرد.

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که با ورود رتینویک اسید به‌داخل هسته سلول کندروسیت، نسخه‌برداری ژن تغییر می‌یابد و سنتز پروتئین a_1 کلاژن نوع دوم متوقف می‌شود و به‌جای آن پروتئین a_1 کلاژن نوع سوم سنتز می‌شود و فایبرونکتین بیشتری تولید می‌شود (۴۹). همچنین سنتز پروتئین پیشتاز پروتئوگلیکان غضروف متوقف می‌شود که نشانگر تغییر فنوتیپ کندروسیتها است (۲۰). بنابراین روند غضروف‌زایی و به تبع آن میزان شکل‌گیری غضروف نیز کاهش می‌یابد.

1. Collar bone

www.SID.ir

Archive of SID

تقدیر و تشکر

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر خود را از گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که امکان انجام این تحقیق را فراهم نموده، ابراز می‌دارند.

References

1. Trakashi YI, Smith JE, Winick M, Goodman DS: Vitamin a deficiency and fetal growth and development in the rat. J Nutr 1975; 105: 1299-1310

2. Thompson JN, Howell J, McC. Pitt GA: Vitamin A and reproduction in rats. Proc R Soc 1964; B159: 510-535

3. Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P: Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. Nat Genet 1999; 21(4): 444-8

4. Lotan R: Effects of vitamin A and its analogues (retinoids) on normal and neoplasti ccell. Biocheim Biophys Acta 1980; 605: 33-91

5. Dtrickland S, Mahdavi V: The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. Cell 1978; 15: 393-403

6. Scott WJ, Walter JV, Tzimas R, Nau JO, Collins H: Endogenous status of retinoids and their cytosolic binding proterins in limb buds of chick VS mouse embryos. Dev Biol 1994; 165(2): 397-409

7. Durston AJ, Timmermans JPM, Mage WJ, Hendriks HFJ, De Vnse NJ, Heineveld M, Niewwkoop PD: Retinoic acid causes an anterioposterior transformation in the developing central nervous systeme. Nature 1989; 340: 140-144

8. Maden M, Sonneveld E, Van-der-Saagop T, Gale E: The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embyro: implications for developmental mechanisms. development 1998; 125 (21): 4133-4144

9. Tamura K, Yokouchi Y, Kuroiwa A, Ide H: Retinoic acid changes the proximodistal developmental competence and affinity of distal cells in the developing chick limb bud. Dev Biol 1997; 188(2): 224-234

10. Goulding EH, Pratt RM: Isotertinoin teratogenicity in mouse whole embryo culture. J Craniofac Genet Dev Biol 1986; 6: 99-142

11. Kochhar DM: Teratogeni cactivity of retinoic acid. Acta pathol Microbiol Scand 1964; 70: 398-404

12. Webster WS, Johnston MC, Lammer EJ, Sulik KK: Isotertinoin embryophathy and the carnial neural crest: an in vivo and in vitro study. J Craniofac Genet Dev Biol 1986; 6: 211-222

13. Dowine SA, Newman SA: Morphogenetic differnces between fore and hind limb precartilage mesenchyme. Dev Biol 1994; 162(1): 195-208

14. Shenefelt RE: Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage of treatment. Teratology 1972; 5: 103-118

15. Wiley MJ, Cauwenbergs P, Taylor M: Effects of retinoic acid on the development of the facial skeleton in hamsters: early changes involving carnial neural crest cells. Arch Anat 1983; 116: 180-192

16. Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix JRAW, Lott IT, Richard JM, Sun SC: Retinoic acid embryopathy. N Engl J Med 1985; 313: 837-841

17. Thaller C, Hofmann C, Eichele G: 9-CIS-retinoic acid, a potent inducer of digit pattern duplications in the chkck wing bud. Development 1993; 118(3): 957-965

18. Yamamoto M, Gotoh Y, Tamura K, Tanaka M, Kawakami A, Ide H, Kuroiwa A: Coordinated expression of Hoxa-11 and Hoxa-13 during limb muscle patterning. Development 1998; 125 (7): 1325-1335

19. Sundelin J, Das S, Eriksson U, Rask L, Peterson PA: The primary stucture of cellular retinoic acid. binding protein from bovin adrenal glands. J Biol Chem 1985a; 260-269

20. Bernard BA, Deluca LM, Hassel GR, Yamada KM, Odlen K: Retinoic acid alters the proportion of high mannose to complex type oligosaccharides on fibronecitne secreated by cultured chondrocytes. J Biol Chem 1984; 259: 5310-5316

21. Downie SA, New man SA: Morphogenetic differences between fore and hind limb pre catilage mesenehyme: relation to mechanisms of skeletal pattern formation. Dev Biol 1994; 162(1): 195-208

22. Stratford T, Horton C, Maden M: Retinoci acid is reqiured for the initiation of out growth in the chick limb bud. Curr-Biol 1996; 6(9): 1124-1133

23. Duprez DM, Kostakopoulou K, Francis-west PJ, Tickle C, Brickell PM: Activation of Fgf-4 and HOXD gene expression by BMP-2 expressing cells in the developing chick limb bud: Development 1996; 122(6): 1821-1828

24. Sulik KK, Dehart DB: Teratogens and craniofacial

www.SID.ir

Archive of SID

malformations: Relationships to cell death. Development 1988; 103 (supple): 213-232
25. Kochhor DM: Limb development in mouse embryos. I. Anolysis of tratogenic effects of retinoic acid. Teratology 1973; 7: 289-298
26. Alles AA, Sulik KK: Retinoic acid induced limb-riduction defects: Teratology 1989; 40: 163-171
27. Lammer EJDT, Chen RM, Hoar ND, Anish PJ, Benke JT, Nroun CJ, Curry PM, Fernhoff AW, Crix LT, Lott JM, Rechard, Sun SC: Retinoic acid embaryopathy. N Eng J Med 1985; 313: 837-841
28. Gallandore F, Kistle A: Inhibition and reversion of chondrogenesis by retiuioc acid in rat limb bud cell cultrue. Wilhelm Rouxs Arch 1989; 189: 25-32
29. Sulki Kk, Alles AJ: Retinoci-acid-induced limb reduction defects: Perturbation of zones of programuned cell death as a pathogenetic mechanism. Teratology 1988; 41: 163-171
30. Loton RG, Neumann, D lotan: Reltaion ships among retinoid structure inhibition of growth, and cellular etinoic acid binding protein in cultured S.91 melamoma cells. Cancer Res 1980; 40. 1097-1102
31. Jetten AM, MER Jetten: Posible role of retinoic acid binding protein in retinoid stimulation of embryonal carcinoma cell differentation. Nature 1979; 278: 180-182
32. Ong DE, Chytil F: Changes in levels of cellular retinol-and retinoic acid binding protein of liver and hung during perinatal developmental of rat. Proc Nat Acad Sci USA 1976; 73: 3976-3978
33. Rainier S, Herrera JM, McCormick AM: Rapid characterization of cellular retinoid binding proteins by high-performance size exclusion chromatography. Arch Biochme Biophys 1983; 225: 818-825
34. Shapiro IM, Debolt K, Hatori M, Iwamotoim, Pacificin M: Retinoic acid induces a shift in the energetic state of hypertrophic chondrocytes. J Bone Miner Res 1994; 9 (8); 1229-1237
35. Iwameto M, Yagami K, Shapire IM: Retinoic acid is a major regulator of chondreeyte maturation and matrix mineralization. Micro Res Tech 1994; 28(6): 483-491
36. Hamberger V, Hamiltone: A series of normal stages in the development of chick embryo. J Morphol 1951; 88: 49-92
37. Gaytan F, Ranz FB, Aceitero J: Morphmetvic study of cartilage dynamic in the thick embryo tibia I. Methodology and tissue compartments in normal embryos. J Anat 1987; 154: 63-72
38. Rumpler Y: Apparation choronologique despoints dossification du squelette de lembyon de poul. complete Rendu Assoc. des Anatomisis 1962; 48: 1175-1191
39. Caplan DA: Bone development in cell and molecullar biology of vertebrate hard tissue ciba foun dation symposium 1981, 136: 3-22
40. Holder N: The onest of osteogesis in the developing chick limb J Embryol Exp Morphol 1979; 44: 15-29
41. Von Dermark KH, Von Dermarkd K: Immunological and studies of collagen type transition during vitro chondrogenesis of chick limb mesodermal cells. J Cell Biol 1977; 73: 736-747
42. Fell HB: The histogenesis of cartilage and bones of the embryonic fowl. G Morth 1925; 40: 417-458
43. Dillman BM,Wilbur M, Crenshaw MA: Growth of embryonic chick tibia vivo and vitro: Ascanning electron microscop study. Calcif. Tiss: Int 1979; 27. 33-40
44. Summerbell D, Harvey F: Vitamin A and the control of pattern in developing limbs. In limb development and regenration part A. JF Fallon, AI Caplan (eds). Alan R Liss, New York, 1983, pp 109-119
45. Lutfi AM: The fate of chondrocytes during carilage erosin in the grwwing tibia in domestic fowl (Gallus domesticus). Acta Anta 1971; 79: 227-235
46. Cameron DA: Erosin of the epipysis of the rat tibia by capillaries. J Bone and goins Surg 1967; 43B: 500-594
47. Sorrel JM, Weiss L: Alight and electron microscopic study of the region of cartilage resportion in the embryonic chick femur. Teratology 1980; 37(6): 527-537
48. Dodds GS: Osteoclasts and cartilage removal in endochondral ossification of certain mammals. Am J Anat 1932; 50: 97-127
49. Jelinek Riond Kistler A: Effect of retinoic acid oupon the chick embryonic morphgenetic system. I. the embryotoxicity dose range. Tevatology 1981; 23: 191-195

www.SID.ir