

# مطالعه اثر اسید رتینوئیک بر تکامل غیر طبیعی اندامهای حرکتی موش

دکتر مهدی جلالی<sup>۱</sup>، دکتر محمد رضا نیکروش<sup>۲</sup>

**Title:** Retinoic acid-induced abnormal development of motor limbs in the mouse

**Authors:** Jalali M.<sup>1</sup>, Nikravesh M.R.<sup>2</sup>

**Abstract:** In this study, teratogenic effect of retinoic acid, following single dose injection of 200mg/kg of retinoic acid to pregnant balb/c mice of 2 months old on 11th-12th days of gestation is investigated. Control group received physiological serum in the same manner and all of fetuses (experimental and control) were collected on day 18. Retinoic acid administration in 11th postconceptional day resulted in significant malformations in skeletal system and some of limb defects such as asymmetry in axial limbs, phochomelia, micromelia, amelia, synductylian and lobster claw among experimental fetuses. These data indicate that a effective dose of retinoic acid in critical periods of development can interfere differentiation and produce motor limbs malformation.

**Key words:** Retinoic acid, limb defects, Pregnancy, Mouse.

۱- دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد. 1- Associated Professor, School of Medicine, Mashad University of Medical Sciences.

۲- دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد. 2- Associated Professor, School of Medicine, Mashad University of Medical Sciences.

## خلاصه

برای انجام این مطالعه که به منظور بررسی اثرات احتمالی اسید رتینوئیک بر پیدایش نقایص جنینی در روزهای ۱۱ و ۱۲ حاملگی صورت گرفت به یک گروه از موشهای دو ماهه نژاد balb/c به عنوان گروههای تجربی در روزهای فوق یک دوز خوراکی 200 mg/kg اسید رتینوئیک (ویتامین A) تجویز گردید و گروه کنترل نیز به طریق مشابه سرم فیزیولوژی دریافت نمود سپس در روز ۱۸ حاملگی موشهای هر دو گروه تحت بیهوشی عمیق قرار گرفته و به منظور مطالعات بعدی اقدام به جمع آوری جنینهای آنان گردید این مطالعه نشان داد که تجویز اسید رتینوئیک در این محدوده از حاملگی موش می تواند به ناهنجاریهای متفاوتی در اندامهای حرکتی منجر شود که از آن جمله می توان به عدم تقارن در محور اندامها و فوکولیا، میکرومیلیا، سین داکتیلیو پای پنجه خرچنگی در جنینهای تجربی اشاره نمود یافته های حاصل بیانگر این واقعیت است که تجویز دوز موثری از اسید رتینوئیک در دوران حساس اندام زایی می تواند باعث رشد اسکلتی اندامها شده و در پدیده تمایز مداخله نماید تا آنجا که به نقایص گوناگون اندامهای حرکتی منجر شود.

کل واژه گان: اسید رتینوئیک، نقایص اندام، حاملگی، موش

## مقدمه

اگر چه هیپرویتامینوز مادری موضوعی است که از سالها پیش با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسیده است با این وجود در ارتباط با هیپرویتامینوز اسید رتینوئیک (ویتامین A) و خصوصا موارد انسانی مربوط به آن گزارشات کمتری در دست است بنابراین با توجه به یافته های Yasudo و دیگران (۱ و ۲) که در فاصله سالهای ۱۹۸۶ و ۱۹۸۷ صورت گرفته است خاطر نشان شده است که اسید رتینوئیک قادر است به راحتی از سد جفتی گذشته و با تاثیر گذاری بر ارگانوژنز جنینی به اختلالات تکاملی گوناگونی منجر شود. در این رابطه یک نکته را نباید از نظر دور داشت و آن اینکه در شرایط بحرانی اندام زایی جنینی چنانچه هر عامل مداخله گر و منجمله ویتامین A در پدیده تمایز ایجاد مزاحمت نماید ممکن است به نقایص تکاملی اندام منجر شود (۳) بر این اساس و با توجه به اینکه دوره حساس اندام زایی در موش در حدود

روز ۱۱ تا ۱۲ حاملگی است (۴) در این پژوهش که در آزمایشگاه هیستوتکنیک دانشکده پزشکی مشهد انجام گرفت سعی گردید تا با استفاده از یک دوز خوراکی 200 mg / kg اسید رتینوئیک خوراکی (۵) و تاثیر احتمالی آن در حوالی روزهای یاد شده بر اندام زایی جنینی مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرد.

## مواد و روشها

به منظور این مطالعه ۱۸ موش ۲ ماهه از نژاد balb/c انتخاب گردید و هریک به طور جداگانه بایک موش نر در قفسهای مخصوص جفتگیری آمیزش داده شدند پس از مشاهده واژینال پلاگ و تعیین روز صفر حاملگی در هر یک از آنان این نمونه ها مطابق جدول یک به گروههای تجربی و کنترل تقسیم شدند سپس همه گروهها تحت شرایط استاندارد حیوانخانه تحت مراقبت قرار گرفتند در صبح روز یازدهم و دوازدهم به ترتیب به نمونه های هر یک از گروههای تجربی ۱

فراوانی ناهنجاریهای اندامهای حرکتی: در این رابطه همانگونه که تعداد جنینهای نابهنجار در گروههای تجربی ۱ و ۲ (جدول ۱) نشان می دهد درصد این ناهنجاریها چشمگیر است به گونه ای که در گروه تجربی ۱ این نقایص ۴۵/۵٪ و در گروه تجربی ۲ مقدار آن ۴۳/۶٪ محاسبه شده است در حالیکه این رقم در گروه کنترل ۱ معادل ۱/۵٪ و در گروه کنترل ۲ معادل ۳٪ محاسبه شده است

نقایص جنینی: در مشاهدات ماکروسکوپی جنینهای تجربی اشکال گوناگونی از ناهنجاریهای اندامی مشاهده گردید که مهمترین آنها عبارتند از: عدم تقارن در محور اندامها و میکرو ملیا، درجات متفاوتی از فوکوملیا، پنجه خرچنگی، آملیا و سین داکتیلی. تشریح اندامهای ناقص در این گونه جنینها با بهره گیری از میکروسکوپ استرئو نشان داد که نقایص ساختمانی گوناگونی از قبیل کوتاهی استخوانهای اندام قدامی یا فقدان آنها، فقدان استخوانهای کارپ، متاکارپ و انگشتان وجود دارد همچنین در رابطه با اندام خلفی کوتاهی استخوان فمور، کوتاهی یا فقدان استخوانهای تیبیا و فیولا، فقدان استخوانهای تارس متاتارس و انگشتان نیز دیده می شود. نقایص ساختاری مفاصل نیز در اکثر اینگونه اندامها مشاهده شد بطوریکه در مواردی سر استخوان فمور وجود نداشت و یا اینکه مفصل هیپ تشکیل نگردیده بود همچنین کندیلهای استخوان فمور تیبیا نیز در موارد مربوط به نقص مفصل زانو دیده نشد و حفره مفصلی تکامل نیافته بود.

و مقدار ۲۰۰ mg / kg ویتامین A (ساخت کارخانه داروسازی ابوریحان) از طریق خوراکی تجویز گردید (۵) و معادل این عمل در نمونه های گروه کنترل با سرم فیزیولوژی صورت پذیرفت در روز ۱۸ حاملگی با استفاده از بیهوشی عمیق همه نمونه ها قطع نخاع گردیده و سزارین شدند جنینهای بدست آمده از هر یک از مادران گروههای تجربی و کنترل پس از شمارش و معاینات اولیه در شیشه های کدگذاری شده جداگانه محتوی فرمالین ۱۰٪ فیکس گردیدند در مرحله بعد نقایص ظاهری جنینی با استفاده از میکروسکوپ استرئو مورد بررسی قرار گرفته و نقایص مربوط به اندامهای حرکتی در آنها به ثبت رسید.

### نتایج

اثرات مادری: در طول دوره مراقبت پس از تجویز ویتامین A هیچگونه علامتی که ناشی از تجویز دارو باشد در مادران تجربی مشاهده نشد.

کاهش جنینی: شمارش جنینی در گروههای تجربی و کنترل نشان داد که تعداد جنینهای تجربی نسبت به کنترل کاهش یافته است این کاهش جنینی در مقایسه بین جنینهای تجربی ۱ نسبت به کنترل به مقدار ۱۹٪ و در مقایسه بین تجربی تجربی ۲ و کنترل ۲ به مقدار ۱۶٪ مقایسه گردیده است.

وزن جنینی: مقایسه میانگین وزن جنین های تجربی (۰/۰۷ ± ۱/۴۶) نسبت به میانگین وزن گروه کنترل (۰/۱۲ ± ۲/۳۴) اختلاف معنی دار نشان می دهد (P < ۰/۰۵).

جدول ۱ - فراوانی نقایص اندامهای حرکتی در جنینهای گروههای مختلف.

در مقایسه اندامهای حرکتی در گروههای تجربی ۱ و ۲ نسبت به کنترل P < 0/001 محاسبه گردیده است

| شماره هر گروه | تعداد مادران هر گروه | روز دریافت هورمون | تعداد جنینهای هر گروه | جنین های دارای نقص اندام قدامی | جنین های دارای نقص اندام خلفی |
|---------------|----------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| تجربی ۱       | ۶                    | ۱۱                | ۵۴                    | ۱۸                             | ۷                             |
| تجربی ۲       | ۶                    | ۱۲                | ۵۵                    | ۱۰                             | ۱۴                            |
| کنترل ۱       | ۶                    | ۱۱                | ۶۶                    | ۱                              | -                             |
| کنترل ۲       | ۶                    | ۱۲                | ۶۵                    | ۱                              | ۱                             |

## بحث

بر اساس این مطالعه و با عطف به اینکه از نظر علم جنین شناسی جوانه های اندام در موش در محدوده زمانی روزهای ۱۱ تا ۱۲ جنینی شروع به پیدایش مینمایند. بررسی نتایج حاصل بازگو کننده این واقعیت است که مکانیسم عمل تاثیر گذاری اسید رتینوئیک تجویزی اگرچه دقیقاً مشخص نیست ولی علت هر چه که باشد این واقعیت را نمی توان نادیده گرفت که چنانچه در اوایل نیمه دوم حاملگی که دوره بحرانی تکامل و تمایز اندام زایی در جنین موش به حساب می آید (۴). اسید رتینوئیک تجویز شده می تواند از سد جفتی عبور نموده و بر روند تکامل طبیعی اندامهای حرکتی جنین تاثیر بگذارد (۶). در این رابطه ochhar مقدم بر پژوهشهای یاد شده (۱۹۷۳) ناهنجاریهای ناشی از تجویز اسید رتینوئیک را در روزهای دوازدهم تا چهاردهم حاملگی موش مورد مطالعه قرار داده بود اما به اعتبار اینکه روز یازدهم را در محدوده زمانی آزمایش منظور نکرده بود شواهدی مبنی بر بروز ناهنجاریهای اندام در این برهه خاص گزارش نگردید. نامبرده ۳۸٪ کل ناهنجاریهای پدید آمده در روز دوازدهم را به اندامهای حرکتی نسبت داد و در عوض اعلام نمود که ناهنجاریهای پدید آمده در اندام در روز سیزدهم نسبت به روز قبل به ۵۰٪ (۱۹٪ کل ناهنجاریهای جنینی) کاهش می یابد در این رابطه Murakami و Kameyama نیز قبل از آن (۱۹۶۵) گزارش کرده بودند که میان کنش های سلولی مربوط به شکل گیری و تمایز جوانه اندام تحتانی چند ساعت عقب تر از شروع این پروسه در اندام فوقانی آغاز می شود (۸). بر اساس برخی از مطالعات انجام شده اثرات باز دارنده اسید رتینوئیک بر تمایز سلولهای مزانشیمی جوانه اندام و کندروژنز آن به صورت مرگ سلولی در جنین موش گزارش شده است (۹). مطالعه حاضر نیز نشانگر این موضوع است که احتمالاً با شدت

یافتن روند تغییرات دژنراتیو بخشی از مدل‌های اولیه غضروفی در استخوانها و ساختمان مفاصل از بین رفته و یا اینکه شرایطی فراهم شده است که این ساختمانها نتوانسته اند از شکل گیری و تکامل طبیعی برخوردار باشند. با مطالعه مکانیسم حفره دار شدن و شکل گیری مفاصل سینوویال که به وسیله O'Rahilly و Gardner (۱۹۷۸) صورت گرفت طرز پیدایش این مفاصل در جنین مورد تجزیه و تحلیل واقع شد. بر اساس بعضی از این فرضیات پیدایش شکاف بین مفصلی و شکل گیری حفره مفصلی با تاثیر پذیری از عوامل و فاکتورهای متعددی بروز می نماید که از آن جمله می توان به فعالیت‌های عضلانی و حرکات جنین اشاره نمود (۱۱). در این رابطه بیان شده است که تحت تاثیر این گونه عوامل حفرات مفصلی میتوانند کاملاً رشد کنند و زمانیکه حرکات جنین به هر علت محدود شود بافت مزانشیم تمایز نیافته ای جانشین حفره مفصلی می گردد (۱۲). بنابراین عدم رشد و تکامل اندامهای حرکتی که در این پژوهش نیز به صورت نقص یا کوتاهی اندام دیده شد خود ممکن است یکی از عوامل محدود کننده حرکات اندام در حال رشد و در نتیجه پیدایش اختلالات ساختاری مفاصل مربوط به آن باشد. از جمله دیگر عوامل شاید بتوان به فاکتورهای درونی از جمله مرگ برنامه ریزی شده سلولی (Programmed cell death) اشاره کرد که در پستانداران مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است گزارشات موجود نشان می دهند که چنانچه این برنامه با اختلاف مواجه گردد میتواند شکل گیری حفرات مفصلی و پیدایش شکاف انگشتان را دچار اختلال می نماید (۱۴). نتایج حاصل از این مشاهدات ثابت می کند که مرگ برنامه ریزی شده سلولی در گونه های مختلف جانوری از مکانیسم مشترکی پیروی می کند که در مورد تکامل اندامهای حرکتی به تمایز ساختمان مفاصل و انگشتان می انجامد بنابراین بعید

موش محسوس می شود ممکن است عواملی از جمله بلوک شدن گیرنده های سلولی که از این طریق تاثیر یک عامل خارجی مثل ( اسید رتینوئیک) صورت میگیرد بر پدیده تکامل اثر بگذارد (۱۵) در این حالت احتمالا دریافت پیامهای القایی از جانب سایر سلولها و بافتها به وسیله اندام هدف ( اندامهای حرکتی در حال تمایز ) غیر ممکن می شده و پدیدیده تمایز مختل می شود (۲۰-۱۶) بنابراین بعید به نظر نمی رسد که اسید رتینوئیک تجویز شده در برهه های زمانی حساس تمایز اندامهای حرکتی قدامی و خلفی بتواند با تحت تاثیر قرار دادن روند تکامل آنها به پیدایش نقایص منجر شود که به صورت فقدان حفره مفصلی یا فقدان همه استخوانهای اندام یا بخشی از آنها بروز نموده و به ناهنجاریهایی از قبیل سینداکتیلی، فوکوملیا یا آملیا که در این پژوهش دیده شد منتهی می گردد.

بسه نظر نمی رسد که اسید رتینوئیک تجویز شده به عنوان یک فاکتور مزاحم خارجی احتمالا می توانند به تاثیر گذاری بر این برنامه منجر شود و تمایز اندامها را دچار اختلال نماید از سوی دیگر آنچه که در این پژوهش می تواند مورد توجه قرار گیرد این است که از میان ناهنجاریهای پدید آمده مربوط به تزریق روز یازدهم قریب به آن ۷۲٪ آن متعلق به اندامهای حرکتی قدامی و ۲۸٪ آن مربوط به اندامهای حرکتی خلفی است در حالیکه از میان ناهنجاریهای مربوط به تزریق روز ۱۲ حدود ۴۱٪ مربوط به اندامهای حرکتی قدامی و ۵۹٪ آن مربوط به اندامهای حرکتی خلفی است این موضوع با این واقعیت شناخته شده که اولاً تمایز اندامهای حرکتی قدامی و خلفی از نظر زمانی کاملاً بر همدیگر منطبق نیست ثانیاً این واقعیت را نمیتوان نادیده گرفت که در این برهه زمانی حساس که مهمترین مرحله تکاملی اندامهای حرکتی در جنین

#### References:

- 1- Yasudo Y., Konishi H., Kihara T., Tanimura T., Developmental anomalies induced by all-trans-retinoic acid in fetal mice: II. Induction of abnormal neuroepithelium. *Teratology*. 1987, 35: 355-366.
- 2- Yasuda Y., Okamoto M., Konishi H., Developmental anomalies induced by all-transretinoic acid in fetal mice: I. Macroscopic findings. *Teratology*. 1986, 34: 37- 49.
- 3- Zhu C. C., Yamada G., Blum M., Retinoic acid teratogenicity: the role of gooseoid and BMP-4. *Cell-Mol-Biol*. 1999, 45(5): 617-629.

- 4- Bernard F. S., Stata N., Equivalent ages in rat, mouse and chick embryos. *Teratology*. 1979, 19: 273-287.
- 5- Abu-Hijleh G., Padmanabhan R., Retinoic acid-induced abnormal development of hindlimb joints in the mouse. *Euro-J-Morph*. 1997, 35(5): 327-336.
- 6- Bila V., Kren V., Retinoic acid teratogenicity in rat congenic and recombinant inbred strains with malformation syndrome. *Transplant-Proc*. 1997, 29(3): 1707-1708.

- 7- Kochhar D. M., Limb development in mouse embryos. I. Analysis of teratogenic effects of retinoic acid. *Teratology*, 1973, 7: 289-298.
- 8- Murakami U., Kameyama Y., Malformations of the mouse fetus caused by hypervitaminosis A of the mother during pregnancy. *Arch. Env. Health*. 1965, 10: 732-741.
- 9- Kistler A., Retinoic acid-induced cartilage resorption. Induction of specific changes in protein synthesis and inhibition by tunicamycin. *Differentiation*. 1982, 21:168-174.
- 10- O'Rahilly R., Gardner E., The embryology of movable joints. The joints and synovial fluid. vol.1. Academic Press, New York. 1978, pp. 49-103.
- 11- Andersen H., Bro-Rasmussen F., Histochemical studies on the histogenesis of the joints in human fetuses with special reference to the development of the joint cavities in the hand and foot. *Am-J-Anat*. 1961, 108: 111-112.
- 12- Ruano-Gil G., Nardi-Valardaga J., Telexidor J., Embryonal hypermobility and articular development. *Acta.Anat*. 1985, 123: 90-92.
- 13- Alles A. J., Sulik K. K., Retinoic-acid-induced limb-reduction defects: perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenetic mechanism. *Teratology*. 1989, 40(2): 163-171.
- 14- Milaire J., Rooze M., Hereditary and induced modifications of normal necrotic patterns in the developing limb buds of the rat and mouse. facts and hypothesis. *Arch. Biol*. 1983, 94:459- 490.
- 15- Greenspan F. S., Baxter J. D., Basic and clinical endocrinology, 4th Ed. U S A. Prentice-Hall International Inc. 1994, pp: 424-426.
- 16- Kwart R. F., Kimmel C. A., Kimmel G. L., Slikker W., Identification of the cellular retinoic acid binding protein (cRABP) within the embryonic mouse (CD-1) limb bud. *Teratology*. 1985, 32(1): 103-111.
- 17- De-Luca L. M., Scita G., Ha-ras oncogene transformation abolishes retinoic acid-induced reduction of intracellular fibronectin. *Braz-J-Med-Biol-Res*. 1996, 29(9):1127-1131.
- 18- Hayes C., Morriss Kay G M., Retinoic acid specifically downregulates *Fgf4* and inhibits posterior cell proliferation in the developing mouse autopod. *J-Anat*. 2001, 198(5): 561-568.
- 19- Nolen G. A., The effects of various levels of dietary protein on retinoic acid-induced teratogenicity in rats. *Teratology*. 1972, 5(2): 143-151.
- 20- Soprano D. R., Gyda M., Jiang H., Harnish D. C., Ugen K., Satre M., Chen L., Soprano K. J., Kochhar D. M., A sustained elevation in retinoic acid receptor-beta 2 mRNA and protein occurs during retinoic acid-induced fetal dysmorphogenesis. *Mech-Dev*. 1994, 45(3): 243-253.