

## بررسی مقایسه‌ای اثر رتینوئیک اسید اگزوژن بر اندام حرکتی جلویی و عقبی جنین موش نژاد Balb/C در شرایط *in vitro* و مقایسه میزان جذب آن

کاظم پریور<sup>۱</sup>، هما محسنی کوچصفهانی<sup>۲</sup>، مسعود مشهدی اکبر بوجار<sup>۳</sup>، فرشته میرمحمد رضائی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> استاد، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

<sup>۲</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم تهران

<sup>۳</sup> استادیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه تربیت معلم تهران

<sup>۴</sup> دانشجوی دکترا، دانشگاه تربیت معلم تهران

### چکیده

سابقه و هدف: رتینوئیک اسید یکی از مشتقات ویتامین A می‌باشد که در درمان آکنه، پسوریازیس و همچنین برخی سرطانها استفاده می‌شود. رتینوئیک اسید در رشد و نمو و تمایز در طی مراحل تکوینی مهره‌داران نقش مهمی را بازی می‌کند. در این تحقیق اثر رتینوئیک اسید که یک موفره‌زن موثر در رشد و نمو می‌باشد را بصورت اگزوژن در کشت اندام حرکتی مورد بررسی قرار دادیم.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی موشهای نر و ماده نژاد *Balb/c* را با هم آمیزش داده و روز مشاهده واژینال پلاک، روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. در روز ۱۲ حاملگی، جنین‌ها را از لوله‌های رحمی خارج کرده و جوانه اندام‌های حرکتی جلویی و عقبی را از جنین جدا کرده و در محیط کشت *Eagle's MEM* به همراه *l-glutamine* شلند. در گروه کنترل جوانه اندام‌های حرکتی جنین در محیط کشت قرار داده شد و در گروه سه گروه کنترل، شم و تجربی تقسیم شدند. در گروه کنترل جوانه اندام‌های حرکتی جنین در محیط کشت قرار داده شد و در گروه شم جوانه اندام حرکتی در محیط کشت حاوی الکل تیمار شد (الکل حلal رتینوئیک اسید می‌باشد). در گروه تجربی رتینوئیک اسید در سه غلظت ۱۰<sup>-۵</sup>، ۱۰<sup>-۴</sup> و ۱۰<sup>-۳</sup> مولار به محیط کشت اضافه شد. پس از دو روز اکتوپلایسون، نمونه‌ها در فیکساتیو بوئن فیکس شده و از نظر موروفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند، سپس مقاطع بافتی از نمونه‌ها تهیه شد و توسط *Alcian blue* رنگ‌آمیزی شده و اثر رتینوئیک اسید بر تعداد سلول غضروفی و طول و عرض اندام‌های حرکتی بررسی شد. میزان رتینوئیک اسید جذب شده از محیط کشت با استفاده از تکنیک C.H.P.L.C. اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: اثر توکسیک رتینوئیک اسید اگزوژن در رشد و نمو اندام حرکتی قابل مشاهده است و این تاثیر بر اندام عقبی بیشتر از اندام جلویی است.

نتیجه‌گیری: رتینوئیک اسید اگزوژن باعث کاهش طول محور پروکسیمال-دیستال اندام‌های حرکتی و کاهش رشد انگشتان می‌شود. همچنین رتینوئیک اسید از کندرولوژنر ممانعت می‌کند و غلظتهاي بالا کاهش چشمگیری را در تعداد سلولهای غضروفی اندام‌های حرکتی سبب می‌شود.

واژگان کلیدی: رتینوئیک اسید، اندام حرکتی جلویی، کندرولوژنر.

### مقدمه

می‌کند. رتینوئیدها همانند هورمون‌های استروئیدی و مولکولهای چربی دوست از بخش‌های هیدروفیلیک غشاء عبور می‌کنند و جابجا‌یابی آنها در داخل سیتوپلاسم توسط پروتئین‌های اتصالی اختصاصی تسهیل می‌شود. پس از ورود رتینوئیک اسید به سلول این مولکول به پروتئین‌های داخل سلولی اتصال می‌یابد. این پروتئین‌ها دو گروه بوده که تحت عنوان I (Cellular Retinoic Acid Binding Protein) CRABP-I و

رتینوئیک اسید از مشتقات ویتامین A است و در رشد و نمو و تمایز در طی مراحل تکوینی مهره‌داران نقش مهمی را بازی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت معلم، گروه زیست‌شناسی، فرشته میرمحمد رضائی

(email: f\_mmr53@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۳/۱۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱۰/۲۵

اسید است). در گروه تجربی رتینوئیک اسید در سه غلظت  $10^{-5}$ ،  $10^{-4}$  و  $10^{-3}$  مولار به محیط کشت اضافه شد. پس از دو روز انکوباسیون، نمونه‌ها در فیکساتیو بوئن فیکس شده سپس مقاطع بافتی با ضخامت  $5\mu\text{m}$  به صورت طولی (فرونتال) تهیه و توسط آلسین بلو (Alcian blue) رنگ‌آمیزی شد و مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. همچنین در این تحقیق پس از کشت نمونه‌ها میزان رتینوئیک اسید باقی مانده در محیط کشت با استفاده از تکنیک H.P.L.C پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

در این مطالعه تجربی متغیرهایی از قبیل طول کل اندام، عرض کل اندام و تعداد سلول‌های غضروفی مورد بررسی قرار گرفت. کلیه اندازه‌گیری‌ها توسط خطکش اکولری (گراتیکول) از بخش‌های میانی سریال انجام گرفت. نتایج به دست آمده با SPSS (version 11.0, SPSS Inc., USA) استفاده از نرم افزار (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

### یافته‌ها

بررسی‌های ماکروسکوپی اندامهای جلویی و عقبی گروههای کنترل، شم و تجربی (شکل ۱ و ۲) نشان داد در گروه تجربی بر حسب غلظت رتینوئیک اسید بکار رفته تغییراتی در طول محور پروکسیمال-دیستال اندام حرکتی دیده می‌شود. همچنین کاهش رشد در انگشتان وجود دارد به‌طوری‌که در غلظتهای بالا این کاهش رشد بیشتر دیده می‌شود. کاهش رشد در غلظت  $10^{-4}$  رتینوئیک اسید بیشتر از غلظت  $10^{-5}$  است و در غلظت  $10^{-3}$  بیشتر از  $10^{-4}$ . در مقایسه نمونه‌های تجربی با نمونه کنترل و شم کاهش رشد دیده می‌شود. همچنین کاهش رشد در اندام عقبی بیشتر از اندام جلویی بود. نتایج حاصل از بررسی طول و عرض کل جوانه اندام حرکتی جلویی و عقبی نشان داد که طول جوانه اندام حرکتی جلویی و عقبی در نمونه‌های تجربی در ۳ غلظت متفاوت ( $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$  و  $10^{-3}$ ) ارتباطی اسید کاهش معنی‌داری را لحاظ آماری (به ترتیب  $p < 0.001$ ،  $p < 0.05$  و  $p < 0.01$ ) در مقایسه با کنترل و شم نشان می‌دهد. از طرف دیگر عرض جوانه اندام نمونه‌های تجربی در هر سه غلظت کاهش معنی‌داری داشت ( $p < 0.001$ ) (نمودارهای ۱ و ۲).

وضعیت سلول‌های غضروفی در اندام حرکتی جلویی و عقبی در گروه کنترل، شم و گروه تجربی با ۳ غلظت ( $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$  و  $10^{-3}$ ) رتینوئیک اسید در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است. بررسی نتایج آماری نشان داد که تعداد سلول‌های غضروفی در

CRABP-II می‌باشد که انتقال رتینوئیدها را به داخل هسته تسهیل می‌کند (۱-۳). رسپتورهای رتینوئیک اسید متعلق به خانواده گیرنده‌های هورمون‌های تیروئیدی-استروئیدی هستند. سیگنال‌های رتینوئیک اسید توسط رسپتورهای رتینوئیک اسید RARs و RXRs انتقال می‌یابد. این رسپتورها شامل انواع  $\alpha$ ،  $\beta$ ،  $\gamma$  هستند (۳). پس از اتصال هر یک از این لیگاندها به رسپتورهایشان و اتصال آنها با منطقه پیوند شونده DNA موجب القا فعالیت ژن‌های خاصی شده و باعث نسخه‌برداری و سنتز mRNA و پروتئین‌هایی می‌شود که در القاء، تکثیر و تمایز سلول نقش دارند (۴-۷).

رتینوئیک اسید فاکتور مهم در تکوین اندام حرکتی می‌باشد. رتینوئیک اسید اندوژن در بخش خلفی اندام حرکتی جنین در غلظت بالائی تولید می‌شود. بررسی‌ها نشان داد ممانعت از سیگنال رتینوئیک اسید از طریق ممانعت از سنتز یا موتاسیون رسپتورهای رتینوئیک اسید مانع تشکیل منطقه فعالیت قطبی کننده (ZPA) در جوانه اندام حرکتی می‌شود. رتینوئیک اسید در سازماندهی محور قدامی-خلفی و پشتی-شکمی نقش دارد (۸). در این تحقیق به مطالعه مقایسه‌ای اثر رتینوئیک اسید اگزوژن بر روی اندام حرکتی عقبی و جلویی و مقایسه میزان جذب آن در شرایط یکسان پرداختیم.

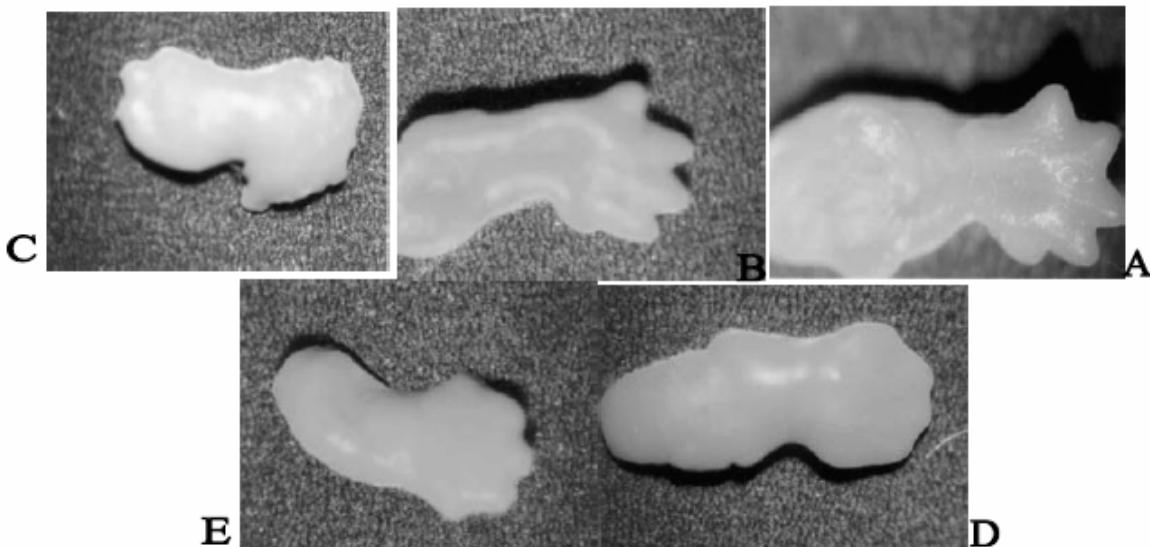
### مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، موشهای نر و ماده نژاد c Balb/c را با هم آمیزش داده و روز مشاهده و اژئیال پلاک، روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. در روز ۱۲ حاملگی جنین‌ها از لوله‌های رحمی خارج شد و جوانه اندامهای حرکتی جلویی و عقبی (forelimb bud and hindlimb bud) از جنین جدا شده و در Eagle's MEM (Minimum Essential Medium) محیط کشت داده شد و در همراه ۲۰٪ سرم بند ناف جنین انسان به مدت دو روز کشت داده شدند. این محیط کشت دارای گلوتامین و سدیم بی‌کربنات (شرکت سیگما) بود. سایر مواد به کار رفته عبارت بودند از: سرم بند ناف جنین انسان (Human Embryonic Cord Serum)، محلول نمکی بالانس (Hanks balanced salt solution=HBSS)، رتینوئیک اسید (شرکت سیگما)، فیکساتیو بوئن آبی، ال‌سیان بلو و موش نر و ماده نژاد C Balb/c بود.

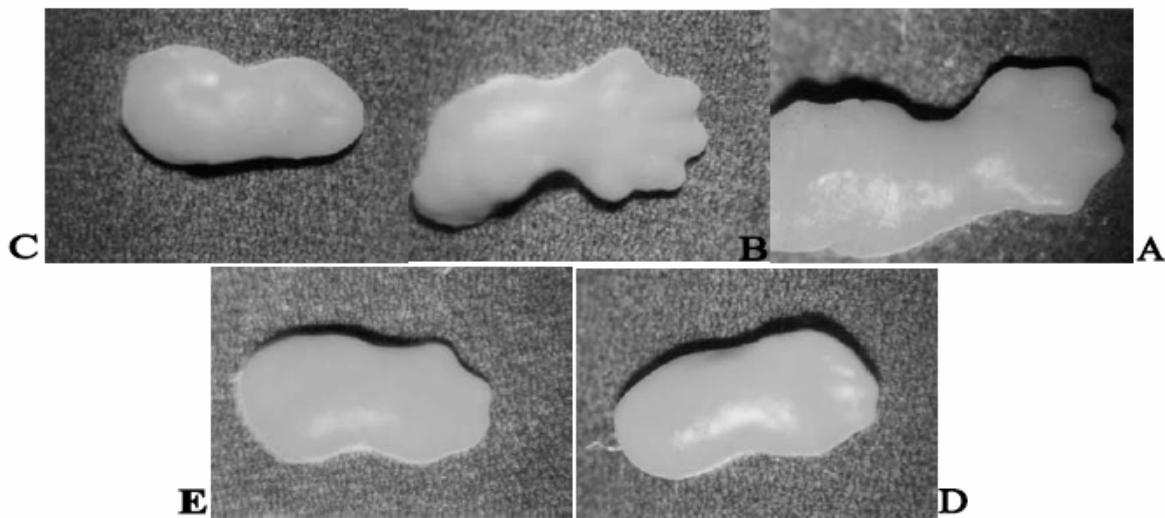
کشت‌ها در سه گروه کنترل، شم و تجربی تقسیم شدند. در گروه کنترل اندامهای حرکتی جلویی جنین در محیط کشت قرار داده شدند و در گروه شم جوانه‌های اندام حرکتی در محیط کشت حاوی الكل تیمار شدند (الکل حلal رتینوئیک

تیمار شده با رتینوئیک اسید نشان می‌دهد که تشکیل ماتریکس خارج سلولی کاهش یافته است. بنابراین رتینوئیک اسید تمايز سلول‌های غضروفی را به تأخیر می‌اندازد و کاهش می‌دهد. کاهش کانونهای غضروفی و کاهش تشکیل ماتریکس غضروفی در اندام عقبی بیشتر از اندام جلویی است (نمودار ۳).

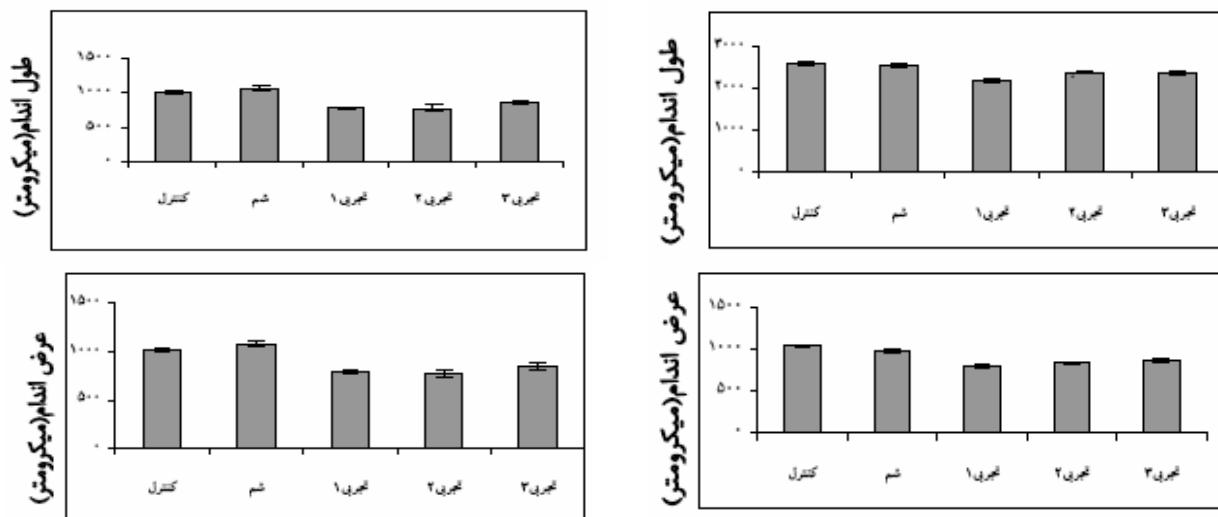
اندام حرکتی جلویی در سه غلظت تیمار شده کاهش معنی‌داری را ( $p < 0.001$ ) نسبت به گروه کنترل و شم دارد. همچنین تعداد اندازه کانون‌های غضروفی در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل و شم کاهش یافته است. این کاهش در غلظت‌های بالا<sup>-۴</sup> و <sup>-۵</sup> $10$  و <sup>-۶</sup> $10$  بیشتر از  $10^{-6}$  می‌باشد. میزان جذب رنگ آلسین بلو در گروه‌های تجربی کاهش بیشتری دارد. کاهش رنگ پذیری سلول‌های غضروفی اندامهای حرکتی



شکل ۱- استریوفوتومیکروگراف جوانه اندام حرکتی جلویی روز ۱۴ جنینی، A: نمونه کنترل، B: نمونه شم، C، D و E: نمونه‌های تجربی به ترتیب با غلظت‌های  $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$  و  $10^{-6}$  رتینوئیک اسید (بزرگنمایی  $\times 40$ )

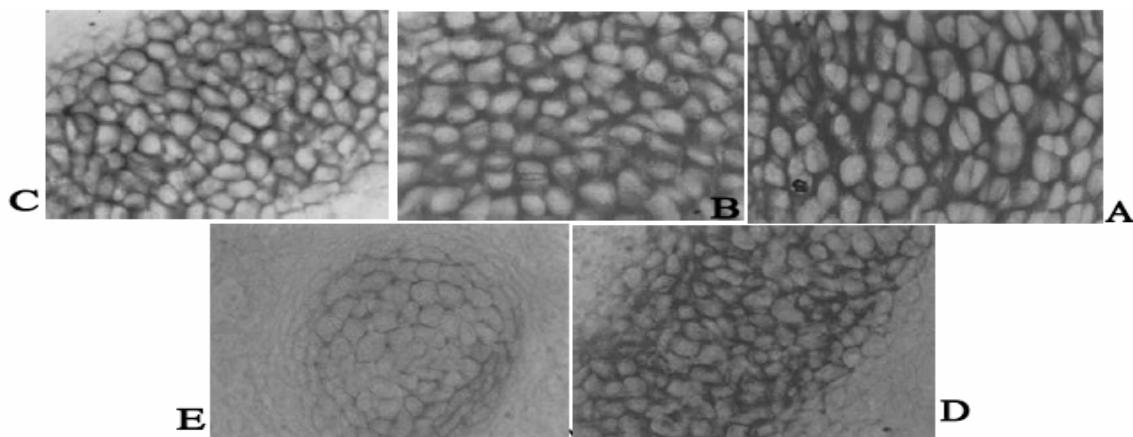


شکل ۲- استریوفوتومیکروگراف جوانه اندام حرکتی عقبی روز ۱۴ جنینی، A: نمونه کنترل، B: نمونه شم، C، D و E: نمونه‌های تجربی به ترتیب با غلظت‌های  $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$  و  $10^{-6}$  رتینوئیک اسید (بزرگنمایی  $\times 40$ )

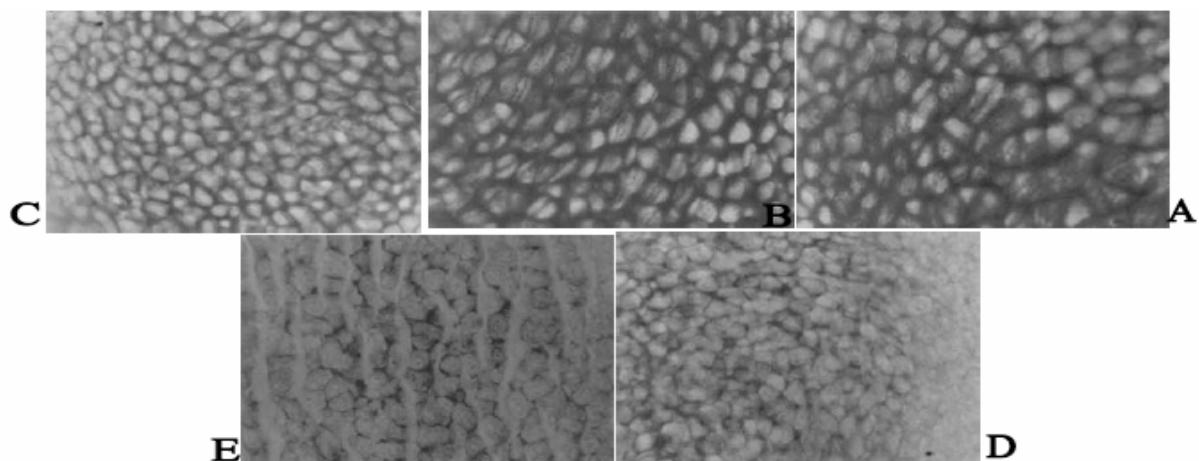


نمودار ۲- مقایسه طول و عرض جوانه اندام حرکتی عقبی در گروههای کنترل، شم و تجربی

نمودار ۱- مقایسه طول و عرض جوانه اندام حرکتی جلویی در گروههای کنترل، شم و تجربی



شکل ۳- فتومیکروگراف سلولهای غضروفی جوانه اندام حرکتی جلویی روز ۱۴ جنینی رنگ‌آمیزی آلسین بلو، A: نمونه کنترل، B: نمونه شم، C و D: نمونه‌های تجربی به ترتیب با غلظتهای  $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$  و  $10^{-6}$  رتینوئیک اسید (بزرگنمایی  $\times 1125$ )



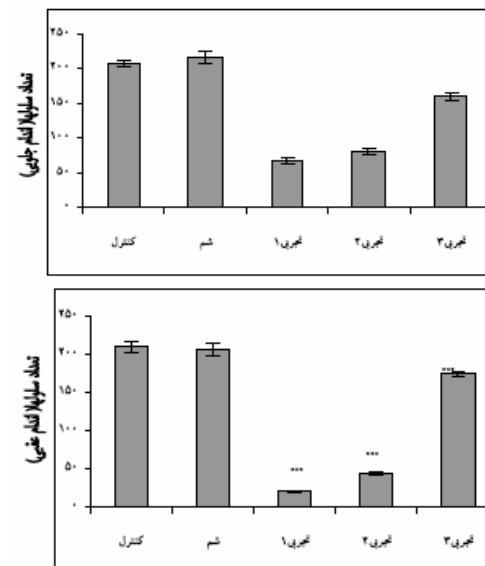
شکل ۴- فتومیکروگراف سلولهای غضروفی جوانه اندام حرکتی عقبی روز ۱۴ جنینی رنگ‌آمیزی آلسین بلو، A: نمونه کنترل، B: نمونه شم، C و D: نمونه‌های تجربی به ترتیب با غلظتهای  $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$  و  $10^{-6}$  رتینوئیک اسید (بزرگنمایی  $\times 1125$ )

پیشرفت‌کننده که در زیر AER قرار دارد صورت می‌گیرد. احتمالاً رتینوئیک اسید از تزايد سلولی در مزانشیم پشتی جلوگیری می‌کند (۹).

رتینوئیک اسید اندوژن ساختمان AER را بوسیله مزانشیم خود حفظ می‌کند در صورتیکه افزودن رتینوئیک اسید به صورت اگزوژن ساختمان AER را حفظ نکرده و عدم نگهداری ساختمان AER سبب بیان نابجا و یا عدم ترشح و بیان فاکتورهای مؤثر در رشد و نمو اندام حرکتی می‌شود (۹). در مطالعه دیگری دوز ترااتوژن رتینوئیک اسید (دوز بالا) سبب بیان غیرطبیعی TGF- $\beta$ 2 در حاشیه پشتی جوانه اندام حرکتی می‌شود. این بیان نابجای TGF $\beta$ -2 سبب کاهش رشد پروکسیمال- دیستال اندام حرکتی جلویی می‌شود (۸).

از نتایج بدست آمده در این مطالعه به نظر می‌رسد که رتینوئیک اسید اندوژن اثر رتینوئیک اسید اگزوژن را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد زیرا در این مرحله جنبی رتینوئیک اسید اندوژن در اندام حرکتی فعال است. Tanaka و همکارانش گزارش کردند سیترال 3,7 dimethyl-2,6-octadienal که ممانعت کننده سنتز رتینوئیک اسید می‌باشد در صورت اضافه کردن به محیط کشت اندام حرکتی جلویی از رشد آن جلوگیری خواهد کرد در حالی که افزودن رتینوئیک اسید اگزوژن به محیط کشت (citral+RA) سبب رشد اندام حرکتی خواهد شد (۱۰).

نتایج بررسی‌های میکروسکوپی حاصل از رنگ‌آمیزی اختصاصی ماتریکس خارج سلولی سلول‌های غضروفی با آلسین‌بلو نشان داد که رتینوئیک اسید کندروژن را کاهش داده و میزان کاهش یا ممانعت از کندروژن وابسته به دوز می‌باشد. به طوریکه دیده شد در دوز بالا ( $^{+/-} ۱۰$ ) غضروف‌زایی کاهش یافته و شدت رنگ‌پذیری سلول‌های غضروفی کاهش چشمگیری را نشان می‌دهد زیرا شدت رنگ‌پذیری سلول‌های غضروفی با میزان غضروف‌زایی ارتباط دارد. کاهش رنگ‌پذیری سلول‌ها خود نشان دهنده کاهش سنتز و کاهش تعداد لایه‌های ماتریکس خارج سلولی می‌باشد. در غلظت  $^{+/-} ۱۰$  رتینوئیک اسید شدت رنگ‌پذیری سلول‌ها بیشتر از دوز  $^{+/-} ۱۰$  و کمتر از  $^{+/-} ۱۰$  بود. در دوز  $^{+/-} ۱۰$  میزان رنگ‌پذیری سلول‌ها افزایش یافته و غضروف‌زایی و سنتز ماتریکس خارج سلولی نیز افزایش یافته است. همچنین در مطالعات ما دیده شد که رتینوئیک اسید سبب کاهش تعداد ندول‌های غضروفی و اندامه بخش‌های غضروفی می‌شود و این کاهش نیز وابسته به غلظت به کار رفته می‌باشد. در مطالعاتی که در همین راستا توسط Renault و همکارانش در سال ۱۹۹۵ بر روی سلول‌های



نمودار ۳- مقایسه تعداد سلولهای غضروفی جوانه اندام حرکتی جلویی و عقبی در گروههای کنترل، شام و تجربی ( $^{+/-} ۵$ ،  $p<0.01$ ،  $^{***}$ ،  $p<0.001$ ،  $^{***}$ ،  $p<0.001$ ،  $^{***}$ )

میزان رتینوئیک اسید در محیط کشت اندام حرکتی جلویی به شرح زیر است: در غلظت  $^{+/-} ۱۰$  در پایان ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب  $^{+/-} ۰.۲۸$  و  $^{+/-} ۰.۱۲$  از کل پیک باقیماند. این ارقام در غلظت  $^{+/-} ۱۰$  به ترتیب  $^{+/-} ۰.۱۶$  و صفر از کل پیک بود.

میزان رتینوئیک اسید در محیط کشت اندام حرکتی عقبی به شرح زیر است: در غلظت  $^{+/-} ۱۰$  در پایان ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب  $^{+/-} ۰.۵۲$  و  $^{+/-} ۰.۳۲$  از کل پیک باقیماند. این ارقام در غلظت  $^{+/-} ۱۰$  به ترتیب  $^{+/-} ۰.۴۳$  و  $^{+/-} ۰.۲۲$  از کل پیک بود.

## بحث

نتایج بررسی‌های ماکروسکوپی نشان داد که در نمونه‌های تیمار شده با رتینوئیک اسید (RA) طول محور پروکسیمال- دیستال اندامهای حرکتی جلویی و عقبی و رشد انگشتان کاهش می‌یابد و این کاهش رشد وابسته به دوز استفاده شده است. کاهش رشد در دوزهای بالا  $^{+/-} ۱۰$  و  $^{+/-} ۱۰$  نسبت به دوز پایین  $^{+/-} ۱۰$  بیشتر بود. مطالعاتی که توسط Tsuiki و همکارانش در سال ۱۹۹۹ بر روی رت در شرایط *in vivo* انجام شد نشان داد دوز ترااتوژن رتینوئیک اسید (غلظتهاي بالا  $100\text{ mg/kg}$ ) رشد پروکسیمال- دیستال جوانه اندام حرکتی جلویی را کاهش می‌دهد (۹). به نظر می‌رسد که این کاهش رشد به علت کاهش تزايد سلول‌های مزانشیم پشتی باشد زیرا رشد پروکسیمال- دیستال جوانه اندام حرکتی بواسطه تزايد سلول‌های مزانشیمی جوانه اندام حرکتی در منطقه

کاهش طول محور پروکسیمال- دیستال و کاهش رشد انگشتان (که در غلظت  $^{+4}$  ۱۰ رتینوئیک اسید در اندام عقبی هیچ انگشتی تشکیل نشد) و همچنین کاهش کندروروژن در اندام عقبی بیشتر بود که به نظر می‌رسد علت آن عقب بودن تکوین اندام عقبی نسبت به اندام جلویی باشد. تشکیل اندام جلویی در جنین جوجه در روز ۹ جنینی و اندام عقبی در روز ۱۰ می‌باشد که خود حاکی از عقب بودن رشد اندام عقبی می‌باشد. در مطالعه Kwasigroch و همکارانش گزارش شد تزریق دوزهای بالای رتینوئیک اسید به موش نژاد ICR در روز ۱۱ حاملگی نقص‌هایی را در رشد انگشتان و همچنین در طول استخوان‌های دراز سبب می‌شود و این اثرات بر روی اندام حرکتی عقبی بیشتر از اندام حرکتی جلویی بود (۶).

نتایج حاصل از HPLC کاهش میزان رتینوئیک اسید در محیط کشت اندامهای حرکتی را با گذشت زمان نشان می‌دهد که نشان‌دهنده جذب آن می‌باشد. کاهش میزان رتینوئیک اسید در محیط کشت اندام جلویی بیشتر از عقبی است که احتمالاً ناشی از عقب بودن رشد اندام عقبی و کاهش جذب می‌باشد.

در مجموع بررسیهای انجام شده نشان داد رتینوئیک اسید اندوژن که یک مورفوژن موثر در طی تکوین بسیاری از اندامهاست وقتی به صورت اگزوژن به کار می‌رود بخصوص در دوزهای بالا، نقش سمی و تراویژن دارد ولی در دوزهای پایین محرك رشد بوده و اثرات تراویژن آن در اندام عقبی بیشتر از اندام جلویی است. بنابراین باید مصرف هر ماده یا مورفوژن موثر در رشد و نمو جنین بصورت اگزوژن با دقت بیشتری صورت گیرد. لذا در مصرف ویتامین A در دوران بارداری باید توجه شود چون رتینوئیک اسید از مشتقان ویتامین A است و احتمالاً میزان مصرف ماده و زمان مصرف با توجه به سن جنین مهم است.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری مسئولان محترم گروه زیست‌شناسی و دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم تهران در تامین امکانات اجرایی این طرح تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از جناب آقای دکتر علی هائف سلمانیان معاونت پژوهشی مرکز تحقیقات ژنتیک که از کمکها و راهنمایی‌هایشان در طول طرح بهره برده شد، تشکر می‌شود.

مزانشیمی اندام حرکتی رت انجام شد ملاحظه شد که رتینوئیک اسید در دوزهای بالا کندروروژن را کاهش داده و همچنین تعداد لایه‌های ماتریکس خارج سلولی کاهش می‌باید (۱۱). در طی کندروروژن سنتز مولکول‌های چسباننده سلولی که از اجزای ماتریکس خارج سلولی هستند مانند فیبرونکتین، تناسین، NCAM و N-Cadherin در بخش‌های متراکم پیش‌غضروفی افزایش می‌باید ولی در طی تیمار نمونه‌ها با رتینوئیک اسید و رنگ‌آمیزی با آلسین بلو مشاهده شد میزان سنتز ماتریکس خارج سلولی کاهش یافته است. در پژوهشی که از Yajima و همکارانش در سال ۱۹۹۹ انجام دادند مشاهده کردند که در تیمار سلول‌های مزانشیمی جوانه بال جنین N-cadherin جوجه با رتینوئیک اسید از تجمع پروتئین‌های ممانعت می‌شود و تعداد و شکل عناصر غضروفی در طول محور پروکسیمال- دیستال کاهش می‌باید (۱۲). مطالعات Tanaka و همکارانش در سال ۱۹۹۶ نشان داد وقتی از ممانعت‌کننده‌های سنتز RA اندوژن استفاده می‌شود افزودن RA اگزوژن عمل RA اندوژن را انجام می‌دهد (۱۰). به دنبال این بحث مطالعه‌ای توسط Motoyama انجام شد که با استفاده از ماده‌ای به نام antisense oligodeoxy nucleotid بیان پروتئین-1 RAR gamma (یکی از رسپتورهای رتینوئیک اسید) و در نتیجه از رشد و نمو سلول‌های مزانشیمی اندام حرکتی جنین جوجه جلوگیری شد، این در حالیست که کندروروژن افزایش یافت. بنابراین در طول کندروروژن میزان RA اندوژن و رسپتورهای آن کاهش می‌باید و هر عاملی که افزاینده RA و رسپتورهای آن باشد از کندروروژن ممانعت می‌کند (۵).

در تحقیق حاضر مشاهده شد که رتینوئیک اسید در غلظتها پایین اثر ممانعت‌کننده کمتری بر روی رشد و نمو و کندروروژن دارد در صورتیکه در دوزهای بالا این اثرات شدیدتر است. به نظر می‌رسد که در غلظتها حتی پایین‌تر از غلظت  $^{+4}$  رتینوئیک اسید بر روی رشد و نمو و کندروروژن اثر تحریک‌کننده داشته باشد. Desbiens و همکارانش نشان دادند که دوزهای بالای رتینوئیک اسید ممانعت‌کننده رشد و مورفوژن اسکلتی اندام حرکتی موش می‌باشد در صورتیکه دوزهای پایین تحریک‌کننده رشد و کندروروژن هستند (۷). در مطالعه حاضر مشاهده شد اثر رتینوئیک اسید بر روی اندام حرکتی عقبی بیشتر از اندام حرکتی جلویی بوده که این در بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی کاملاً مشهود بود.

**REFERENCES**

1. Gudas LJ. Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem* 1994;269(22): 15399-402.
2. Chelbi MK, Pelicanol A. Retinoic acid and interferon signaling cross talk in normal and RA-resistant APL cells. *Leukemia* 1999; 13: 1167-74.
3. Stratford T, Logan C, Zile M, Maden M. Abnormal anteroposterior and dorsoventral patterning of the limb bud in the absence of retinoids. *Mechanisms of Development* 1999; 81: 115-25.
4. Bollag W, Holdener EF. Retinoids in cancer prevention. *Ann Oncol* 1994; 3: 513-26.
5. Etok MJ. Antisense retinoic acid receptor gamma-1 oligonucleotide enhances chondrogenesis of mouse limb mesenchymal cells in vitro. *FEBS Letters* 1994; 338(3): 319-22.
6. Kwasigroch TE, Skalko RG, Church JK. Mouse limb bud development in submerged culture: quantitative assessment of the effects of in vivo exposure to retinoic acid. *Teratog Carcino Mutagen* 1984; 4(3): 311-26.
7. Desbiens X, Meunier L, Lassalle B. Specific effects of retinoic acid on the skeletal morphogenesis of the 11-day mouse embryo forelimb bud in vitro. *Biocell* 1990; 68(3): 213-20.
8. Tsuiki H, Kishi K. Retinoid-induced limb defects 1: Inhibition of cell proliferation in distal mesenchyme of limb bud in rats. *Reprod Toxicol* 1999; 113: 103-11.
9. Tsuiki H, Kishi K. Retinoid- induced limb defects 2: Involvement of TGF- $\beta$ 2 in retinoid-induced inhibition of limb bud development. *Reprod Toxicol* 1999; 113: 113-22.
10. Tanaka M, Tamura K, Ide H. Citral: an inhibitor of retinoic acid synthesis; Modifies chick limb development. *Developmental Biology* 1996; 175: 239-47.
11. Renault JY, Caillaud JM, Chevalier J. Ultrastructural characterization of normal and abnormal chondrogenesis in micromass rat embryo limb bud cell culture. *Toxicol Applied Pharmacol* 1995; 130(2): 177-87.
12. Yajima H, Yoneitamura S, Watanabe N, Tamura K, Ide H. Role of N-cadherin in the sorting-out of mesenchymal cells and in the positional identity along the proximodistal axis of the chick limb bud. *Developmental Biology* 1999; 216(3): 274-84.