

بررسی مقایسه‌ای اثر رتینوئیک اسید اگزوزن بر اندام حرکتی جلویی و عقبی جنین موش نژاد Balb/C در شرایط *in vitro* و مقایسه میزان جذب آن کاظم پریور^۱، هما محسنی کوچصفهانی^۲، مسعود مشهدی اکبربوجار^۳، فرشته میرمحمدرضائی^۴

^۱ استادیار، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

^۲ استادیار، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم تهران

^۳ استادیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه تربیت معلم تهران

^۴ 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 مورفوژن موثر در رشد و نمو می‌باشد را بصورت اگزوزن 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 ۲۰٪ سرم بند ناف جنین انسان به مدت دو روز کشت دادیم. کشت‌ها در 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 حلال رتینوئیک اسید می‌باشد). در گروه تجربی رتینوئیک اسید در سه غلظت 10^{-6} ، 10^{-5} و 10^{-4} مولار به محیط کشت اضافه شد. پس از دو روز انکوباسیون، نمونه‌ها در فیکساتیو بوئن فیکس شده و از نظر مورفولوژی 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 H.P.L.C/اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** اثر توکسیک رتینوئیک اسید اگزوزن در رشد و نمو اندام حرکتی قابل مشاهده است و این تاثیر بر اندام عقبی بیشتر از اندام جلویی است.

نتیجه‌گیری: رتینوئیک اسید اگزوزن باعث کاهش طول محور پروکسیمال-دیسیتال اندامهای حرکتی و کاهش رشد انگشتان می‌شود. همچنین رتینوئیک اسید از کندروژنز ممانعت می‌کند و غلظتهای بالا کاهش چشمگیری را در تعداد سلولهای غضروفی اندامهای حرکتی سبب می‌شود.

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

مقدمه

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

می‌کند. رتینوئیدها همانند هورمون‌های استروئیدی و مولکولهای چربی دوست از بخشهای هیدروفیلیک غشاء عبور می‌کنند و جابجایی 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 CRABP-I (Cellular Retinoic Acid Binding Protein) و

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

(email: f_mmr53@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۳/۱۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱۰/۲۵

CRABP-II می‌باشند 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 α, β, γ 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 قطبی‌کننده (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 Balb/c را با هم آمیزش داده و روز مشاهده واژینال 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 محیط کشت Eagle's MEM (Minimum Essential Medium) به 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 بندناف جنین انسان (Human Embryonic Cord Serum)، محلول نمکی بالانس شده هنسکس (Hanks balanced salt solution=HBSS)، رتینوئیک اسید (شرکت سیگما)، فیکساتیو بوئن آبی، آلسیان بلو و موش نر و ماده نژاد 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 الکل تیمار شدند (الکل حلال رتینوئیک

اسید است). در گروه تجربی رتینوئیک اسید در سه غلظت 10^{-6} ، 10^{-5} و 10^{-4} مولار به محیط کشت اضافه شد. پس از دو روز انکوباسیون، نمونه‌ها در فیکساتیو بوئن فیکس شده سپس مقاطع بافتی با ضخامت $5\mu m$ به صورت طولی (فرون‌تال) تهیه و توسط آلسیان 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 استفاده از نرم افزار SPSS (version 11.0, SPSS Inc., USA) و با استفاده از آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

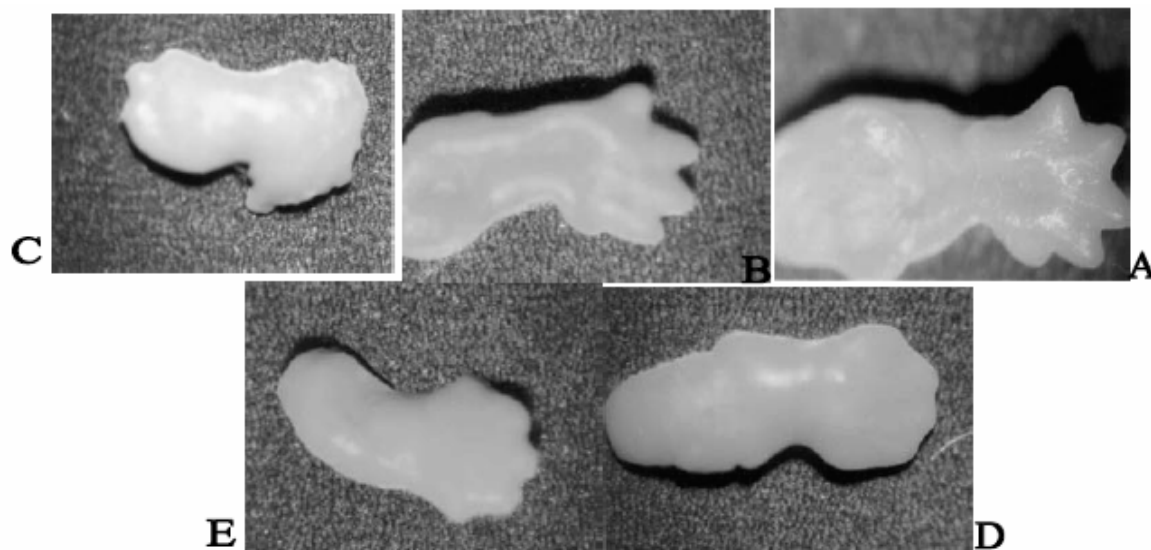
یافته‌ها

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^{-5} بیشتر از 10^{-6} . 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^{-6} رتینوئیک اسید کاهش معنی‌داری را از 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).

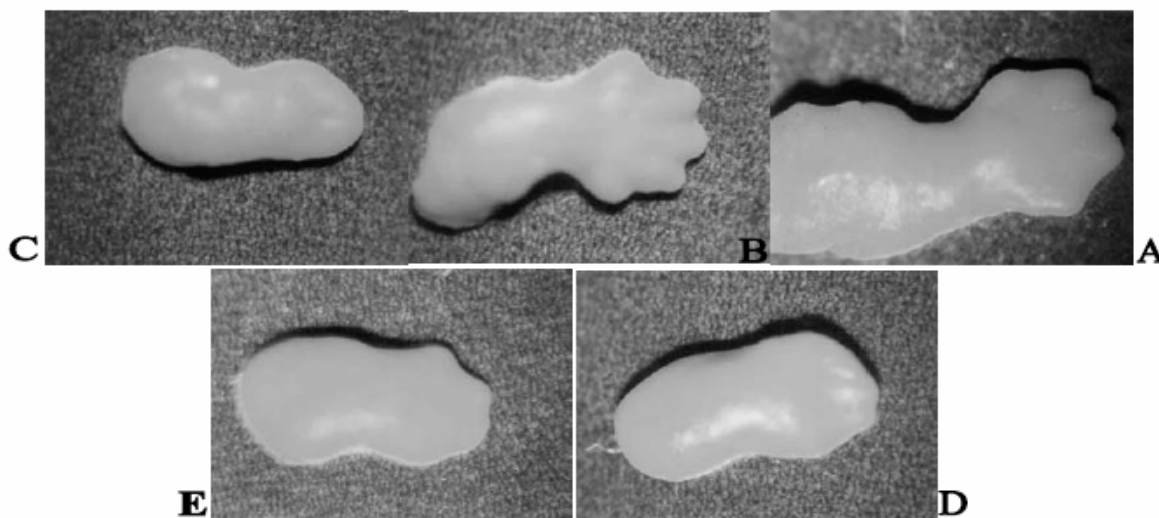
وضعیت سلول‌های غضروفی در اندام حرکتی جلویی و عقبی در گروه کنترل، شم و گروه تجربی با ۳ غلظت 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} رتینوئیک اسید در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است. بررسی نتایج آماری نشان داد که تعداد سلول‌های غضروفی در

تیمار شده با رتینوئیک اسید نشان می‌دهد که تشکیل ماتریکس خارج سلولی کاهش یافته است. بنابراین رتینوئیک اسید تمایز 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).

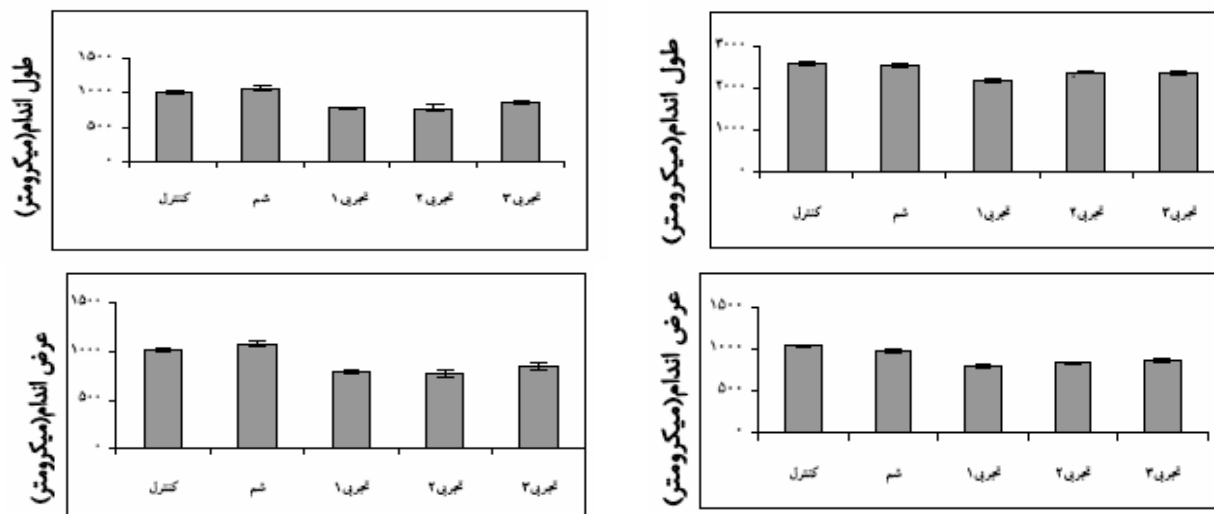
اندام حرکتی جلویی در سه غلظت تیمار شده کاهش معنی‌داری را ($p < 0.001$) نسبت به گروه کنترل و شم دارد. همچنین تعداد اندازه کانون‌های غضروفی در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل و شم کاهش یافته است. این کاهش در غلظت‌های بالا 10^{-4} و 10^{-5} بیشتر از 10^{-6} می‌باشد. میزان جذب رنگ آلسین بلو در گروه‌های تجربی کاهش بیشتری دارد. کاهش رنگ‌پذیری سلول‌های غضروفی اندامهای حرکتی



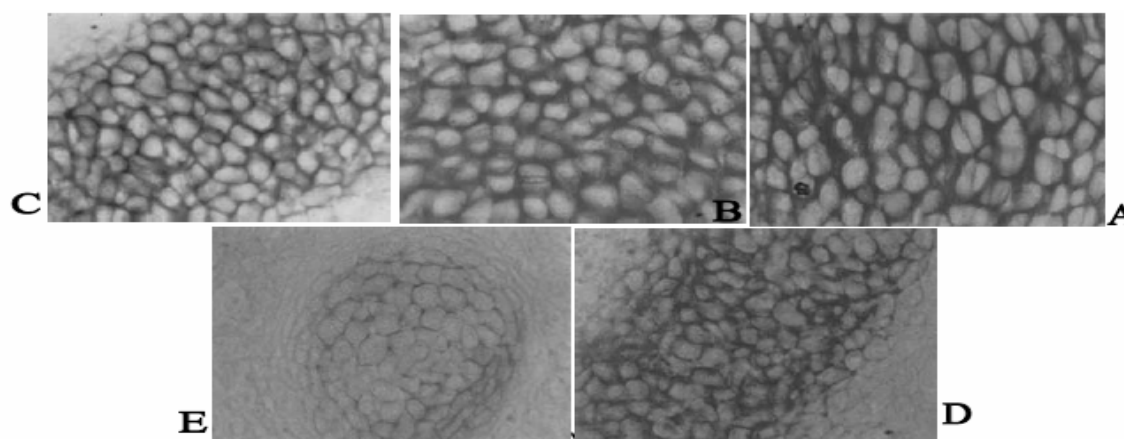
شکل ۱- استریوفتومیکروگراف جوانه اندام حرکتی جلویی روز ۱۴ جنینی، A: نمونه کنترل، B: نمونه شم، C، D و E: نمونه‌های تجربی به ترتیب با غلظت‌های 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} رتینوئیک اسید (بزرگمایی $\times 40$)



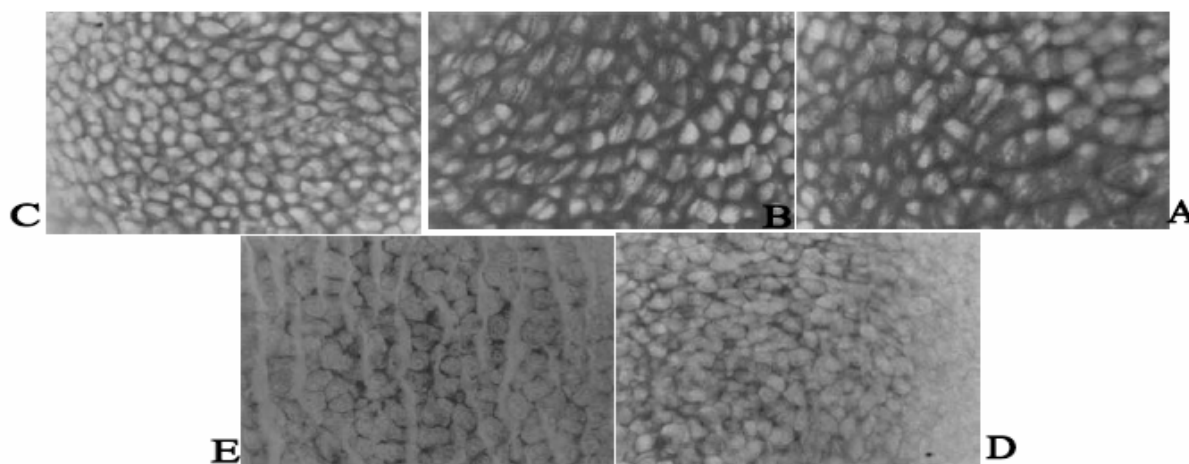
شکل ۲- استریوفتومیکروگراف جوانه اندام حرکتی عقبی روز ۱۴ جنینی، A: نمونه کنترل، B: نمونه شم، C، D و E: نمونه‌های تجربی به ترتیب با غلظت‌های 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} رتینوئیک اسید (بزرگمایی $\times 40$)



نمودار ۱- مقایسه طول و عرض جوانه اندام حرکتی جلویی در گروههای کنترل، شم و تجربی
نمودار ۲- مقایسه طول و عرض جوانه اندام حرکتی عقبی در گروههای کنترل، شم و تجربی



شکل ۳- فتومیکروگراف سلولهای غضروفی جوانه اندام حرکتی جلویی روز ۱۴ جنینی رنگ آمیزی آلسین بلو، 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 $\times 1125$)



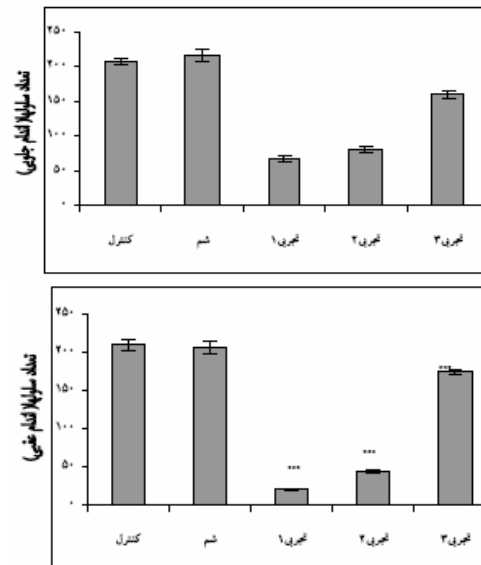
شکل ۴- فتومیکروگراف سلولهای غضروفی جوانه اندام حرکتی عقبی روز ۱۴ جنینی رنگ آمیزی آلسین بلو، A: نمونه کنترل، B: نمونه شم، C، D و E: نمونه‌های تجربی به ترتیب با غلظتهای 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} رتینوئیک اسید (بزرگنمایی $\times 1125$)

پیشرفت کننده که در زیر AER قرار دارد صورت می گیرد. احتمالاً رتینوئیک اسید از تزاید سلولی در مزانشیم پستی جلوگیری می کند (۹).

رتینوئیک اسید اندوژن ساختمان AER را بوسیله مزانشیم خود حفظ می کند در صورتیکه افزودن رتینوئیک اسید به صورت اگزوزن 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 می شود (۹). در مطالعه دیگری دوز تراژون رتینوئیک اسید (دوز بالا) سبب بیان غیرطبیعی TGF- β 2 در حاشیه پستی جوانه اندام حرکتی می شود. این بیان نابجای TGF β -2 سبب کاهش رشد پروکسیمال - دیستال اندام حرکتی جلویی می شود (۸).

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

نتایج بررسی های میکروسکوپی حاصل از رنگ آمیزی اختصاصی ماتریکس خارج سلولی سلول های غضروفی با آلسین بلو نشان داد که رتینوئیک اسید کندروژن را کاهش داده و میزان کاهش یا ممانعت از کندروژن وابسته به دوز می باشد. به طوریکه دیده شد در دوز بالا (10^{-4}) غضروف زایی کاهش یافته و شدت رنگ پذیری سلول های غضروفی کاهش چشمگیری را نشان می دهد زیرا شدت رنگ پذیری سلول های غضروفی با میزان غضروف زایی ارتباط دارد. کاهش رنگ پذیری سلول ها خود نشان دهنده کاهش سنتز و کاهش تعداد لایه های ماتریکس خارج سلولی می باشد. در غلظت 10^{-5} رتینوئیک اسید شدت رنگ پذیری سلول ها بیشتر از دوز 10^{-4} و کمتر از 10^{-6} بود. در دوز 10^{-6} میزان رنگ پذیری سلول ها افزایش یافته و غضروف زایی و سنتز ماتریکس خارج سلولی نیز افزایش یافته است. همچنین در مطالعات ما دیده شد که رتینوئیک اسید سبب کاهش تعداد ندول های غضروفی و اندازه بخش های غضروفی می شود و این کاهش نیز وابسته به غلظت به کار رفته می باشد. در مطالعاتی که در همین راستا توسط Renault و همکارانش در سال ۱۹۹۵ بر روی سلول های



نمودار ۳- مقایسه تعداد سلول های غضروفی جوانه اندام حرکتی جلویی و عقبی در گروه های کنترل، شم و تجربی ($p < 0.05$), ($p < 0.01$), ($p < 0.001$)

میزان رتینوئیک اسید در محیط کشت اندام حرکتی جلویی به شرح زیر است: در غلظت 10^{-5} در پایان ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۰/۲۸ و ۰/۱۲ از کل پیک باقیماند. این ارقام در غلظت 10^{-6} 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 10^{-5} در پایان ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۰/۵۲ و ۰/۳۲ از کل پیک باقیماند. این ارقام در غلظت 10^{-6} به ترتیب ۰/۴۳ و ۰/۲۲ از کل پیک بود.

بحث

نتایج بررسی های ماکروسکوپی نشان داد که در نمونه های تیمار شده با رتینوئیک اسید (RA) طول محور پروکسیمال - دیستال اندام های حرکتی جلویی و عقبی و رشد انگشتان کاهش می یابد و این کاهش رشد وابسته به دوز استفاده شده است. کاهش رشد در دوزهای بالا 10^{-4} و 10^{-5} نسبت به دوز پایین 10^{-6} بیشتر بود. مطالعاتی که توسط Tsuiji و همکارانش در سال ۱۹۹۹ بر روی رت در شرایط *in vivo* انجام شد نشان داد دوز تراژون رتینوئیک اسید (غلظت های بالا ۱۰۰ mg/kg) رشد پروکسیمال - دیستال جوانه اندام حرکتی جلویی را کاهش می دهد (۹). به نظر می رسد که این کاهش رشد به علت کاهش تزاید سلول های مزانشیمی باشد زیرا رشد پروکسیمال - دیستال جوانه اندام حرکتی بواسطه تزاید سلول های مزانشیمی جوانه اندام حرکتی در منطقه

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

در تحقیق حاضر مشاهده شد که رتینوئیک اسید در غلظتهای پایین اثر ممانعت‌کننده کمتری بر روی رشد و نمو و کندروژنز دارد در صورتیکه در دوزهای بالا این اثرات شدیدتر است. به نظر می‌رسد که در غلظتهای حتی پایین‌تر از غلظت 10^{-6} ، رتینوئیک اسید بر روی رشد و نمو و کندروژنز اثر تحریک‌کننده داشته باشد. Desbiens و همکارانش نشان دادند که دوزهای بالای رتینوئیک اسید ممانعت‌کننده رشد و مورفوژنز اسکلتی اندام حرکتی موش می‌باشد در صورتیکه دوزهای پایین تحریک‌کننده رشد و کندروژنز 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.

کاهش طول محور پروکسیمال- دیستال و کاهش رشد انگشتان (که در غلظت 10^{-4} رتینوئیک اسید در اندام عقبی هیچ انگشتی تشکیل نشد) و همچنین کاهش کندروژنز 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 نسبت به اندام جلویی می‌باشد.

در مجموع بررسیهای انجام شده نشان داد رتینوئیک اسید اندوزن که یک مورفوژن موثر در طی تکوین بسیاری از اندامهاست وقتی به صورت آگزوزن به کار می‌رود بخصوص در دوزهای بالا، نقش سمی و تراتوژن دارد ولی در دوزهای پایین محرک رشد بوده و اثرات تراتوژن آن در اندام عقبی بیشتر از اندام جلویی است. بنابراین باید مصرف هر ماده یا مورفوژن موثر در رشد و نمو جنین بصورت آگزوزن با دقت بیشتری صورت گیرد. لذا در مصرف ویتامین A در دوران بارداری باید توجه شود چون رتینوئیک اسید از مشتقات 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 هاتف سلمانیان معاونت پژوهشی مرکز تحقیقات ژنتیک که از کمکها و راهنماییهایشان در طول طرح بهره برده شد، تشکر می‌شود.

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 Carcing 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. Tsuiji 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. Tsuiji H, Kishi K. Retinoid-induced limb defects 2: Involvement of TGF- β 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.