● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ سوم، شمارهٔ ۲، ص ۶۶-۵۹، ۱۳۷۵

مقالهٔ پژوهشی

اثر اسید رتینوئیک بر تکامل لوله عصبی در جنین جوجه

مهدی شریعتی[۱]، دکتر مجتبی رضازاده[۲]، دکتر محمد خاکساری[۳] و حمیدرضا جعفری‌نوه[۱]

خلاصه

اسید رتینوئیک یکی از مشتقات ویتامین A می‌باشد که در درمان برخی بیماری‌های پوستی مصرف می‌شود، ولی اثرات تراتوژنیک متفاوتی بر روی اندام‌های در حال تکامل مهره‌داران، بر حسب مرحله تکاملی برجا می‌گذارد. لوله عصبی از دو ناحیه متفاوت ساخته می‌شود، بخشی را که از لایه‌های زاینده جنینی شکل می‌گیرد لوله عصبی اولیه و بخشی را که از جوانه دم منشأ می‌گیرد لوله عصبی ثانویه گویند. لذا مطالعه‌ای طراحی شد تا اثر اسید رتینوئیک بر روی تکامل لوله عصبی اولیه و ثانویه جنین جوجه در مرحله ۱۲-۱۱ همبرگر و هامیلتون (Humburger & Hamilton - H.H) بررسی شود. به این منظور ۲۵۴ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار انتخاب و به ۶ گروه جهت مطالعه تقسیم گردیدند. به چهار گروه از تخم‌مرغ‌ها در مرحله ۱۲-۱۱ (H.H) دوزهای ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میکروگرم از اسید رتینوئیک محلول در ۲ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (dimethyl sulfoxide) و به گروه پنجم فقط دی متیل سولفوکسید تزریق گردید و به گروه ششم هیچ‌گونه تزریقی انجام نگرفت. ۴۸ ساعت بعد از تزریق، جنین‌ها خارج و مطالعه‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی بر روی آنها انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که اسیدرتینوئیک با غلظت ۰/۵ میکروگرم موجب بازماندن لوله عصبی اولیه و ایجاد لوله عصبی فرعی در مقایسه با گروه شاهد می‌شود ($P<0/05$). براساس این مطالعه یکی از اثرات تراتوژنیک اسید رتینوئیک در جنین جوجه ناهنجاری در سیستم عصبی می‌باشد که به صورت بازماندن لوله عصبی یا پدید آمدن لوله عصبی فرعی آشکار می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسید رتینوئیک، لوله عصبی، جنین جوجه، تراتوژن

۱ـ عضو هیأت علمی گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی رفسنجان

۲ـ استادیار علوم تشریحی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

۳ـ استادیار فیزیولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی رفسنجان

مقدمه

لوله عصبی از دو ناحیه متفاوت ساخته می‌شود. بخشی از لوله عصبی را که از لایه‌های زاینده جنینی شکل می‌گیرد، نورولاسیون اولیه می‌نامند، که ابتدا به صورت یک ضخیم‌شدگی اکتودرمی در بالای نوتوکورد و مزودرم با نام صفحه عصبی ظاهر می‌شود. لبه‌های جانبی صفحه عصبی شروع به برجسته شدن کرده و چین‌های عصبی شکل می‌گیرد. در همین حال ناحیه میانی صفحه عصبی فرو رفته و فضایی به نام ناودان عصبی بین چین‌های عصبی شکل می‌گیرد. سپس چین‌ها به هم نزدیک شده، در نهایت به یکدیگر می‌چسبند و لوله عصبی را می‌سازند (۹). بخش دیگر لوله عصبی که از جوانه دم منشأ می‌گیرد نورولاسیون ثانویه نامیده می‌شود. جوانه دم خود شامل یک توده مزانشیمی است که از بقایای شیار اولیه بوجود می‌آید که تشکیل آن در جنین‌های جوجه در ناحیه کمری ـ خاجی (lombosacral) در مرحله ۱۴-۱۳ (H.H) در زمانی که نوروپورپشتی (posterior nuropore) بسته می‌شود، با چهار اتفاق مهم شروع می‌شود: ۱ـ تشکیل طناب مرکزی به وسیله تجمع سلول‌های پشتی جوانه دمی ۲ـ تمایز این طناب به سلول‌های مرکزی و محیطی ۳ـ حفره حفره شدن این طناب به چندین حفره ابتدایی ۴ـ پیوستگی همه حفرات به یکدیگر و ایجاد یک حفره واحد مرکزی (۱۶،۱۷).

با توجه به اثرات سودمندی که ویتامین A در درمان اختلالات پوستی و امراض نئوپلاستیک دارد نزدیک به ۳۰ سال است که در مورد این ویتامین و مشتقات آن ـ رتینوئیدها ـ تحقیق می‌شود. اخیراً روشن شده است که این ترکیبات در روند طبیعی تکامل و ترمیم نیز دخالت دارند (۲). تحقیقات انجام شده بر روی حیوان‌های آزمایشگاهی نشان داده که این ماده تراتوژن بوده (۱۹) و در انسان هم به عنوان تراتوژن مطرح می‌باشد (۱۴). مکانیسم مولکولی اثرات تراتوژنیک متفاوت اسید رتینوئیک هنوز به صورت دقیق روشن نشده است، ولی با کشف پروتئین‌های اتصالی داخل سلولی این حدس قوت گرفت که اسید رتینوئیک و پروتئین گیرنده به هم متصل و سپس وارد هسته شده و رونویسی ژن را تغییر می‌دهند (۱۲). اسید رتینوئیک اثرات متفاوتی بر جوانه اندام‌ها (۱۸)، تکامل کام (۳)، تکامل قلب (۷)، سیستم عصبی (۱۹) و لوله عصبی ثانویه دارد (۴).

از آنجاکه مطالعات قبلی به طور جداگانه روی سیستم عصبی و لوله عصبی ثانویه انجام شده و از طرف دیگر اندام‌های مختلف در حال تکامل، از رده‌های حیوانی متفاوت مورد بررسی قرار گرفته، این طرح بنیادی کاربردی به منظور بررسی اثرات اسید رتینوئیک در یک مرحله خاص که هنوز نورولاسیون اولیه در حال انجام است (مرحله ۱۲-۱۱) و نورولاسیون ثانویه شروع نشده، به طور هم‌زمان روی این دو قسمت که از نظر روند تکامل متفاوت هستند، انجام گرفته است.

مواد و روش کار

جهت بررسی اثر اسید رتینوئیک بر روی تکامل لوله عصبی از ۲۵۴ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار نژاد White leghorn استفاده شد. تخم‌مرغ‌ها در انکوباتور با درجه حرارت ۱°C ± ۳۸ و رطوبت نسبی ۵٪ قرار داده شدند و برای جلوگیری از چسبندگی یا مرگ جنین هر روز ۳ بار چرخانده شدند.

All-trans retinoic acid (R.A) و دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) از شرکت سیگما تهیه و در تاریکی و درجه حرارت ۲۰°C- نگهداری شدند.

دوزهای ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میکروگرم اسید رتینوئیک در ۲ میکرولیتر DMSO ۸۰٪ تهیه و در شیشه‌های استریل و در تاریکی و درجه حرارت ۲۰°C- نگهداری شدند. برای هر مرحله آزمایش محلول تازه ساخته شد. روش کار به این صورت بود که ۶ گروه مورد مطالعه قرار گرفتند و بعد از گذشت ۴۴ تا ۴۸ ساعت از زمان انکوباسیون، برای تخم‌مرغ‌ها پنجره باز شد و به ۳۵ عدد دوز ۰/۳، ۶۶ عدد دوز ۰/۵، ۳۹ عدد دوز ۰/۷، ۳۲ عدد دوز ۱ میکروگرم و به ۴۹ جنین به عنوان گروه شاهد DMSO ۸۰٪ به میزان ۲ میکرولیتر به وسیله سرنگ Hamilton تزریق شد و برای ۳۳ عدد از آنها فقط پنجره باز شد (گروه sham). ۴۸ ساعت بعد از تزریق جنین‌ها خارج شده و در محلول سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند. سپس با محلول بوئن، ثابت شده و با استفاده از استرئومیکروسکوپ ناهنجاری‌های ماکروسکوپی از جمله درصد مرگ و میر در آنها بررسی شد. برای مطالعه میکروسکوپی، ۹ جنین از هر گروه انتخاب شده و بعد از پاساژ و بلوک‌گیری از سر تا انتهای دم آنها برش‌های پشت سر هم ۵ میکرونی تهیه و با هماتوکسیلن و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند و موارد باز بودن لوله عصبی و ایجاد لوله عصبی فرعی در آنها ارزیابی و نتایج حاصله با استفاده از آزمون آماری فیشر تجزیه و تحلیل گردید. جهت مقایسه درصد مرگ و میر بین گروه‌ها از آزمون مجذورکای استفاده گردید. مقادیر $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

میزان مرگ و میر جنین‌ها بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تزریق دوزهای مختلف اسید رتینوئیک با توجه به نمونه شاهد که فقط DMSO دریافت کرده بودند در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱ : *اثر دوزهای مختلف ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میکروگرم اسید رتینوئیک بر میزان مرگ و میر جنین‌ها ۴۸ ساعت بعد از تزریق*

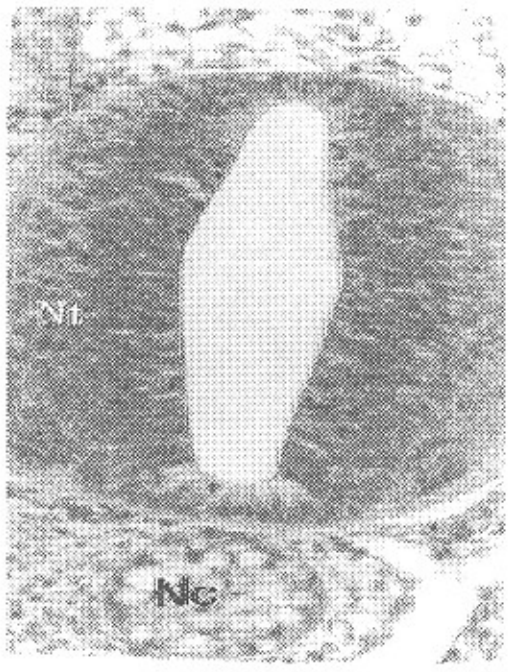
گروه / مرگ و میر	Sham	حامل DMSO	۰/۳	۰/۵	۰/۷	۱
مرده	۰ ٪۰	۹ ٪۱۸/۴	۸ ٪۲۲/۹	۱۹ ٪۲۸/۸	۲۸ ٪۷۱/۸	۲۳ ٪۷۱/۹
زنده	۳۳ ٪۱۰۰	۴۰ ٪۸۱/۶	۲۷ ٪۷۷/۱	۴۷ ٪۷۱/۲	۱۱ ٪۲۸/۲	۹ ٪۲۸/۱
جمع	۳۳	۴۹	۳۵	۶۶	۳۹	۳۲

با بررسی جدول فوق، افزایش ناگهانی درصد مرگ جنین‌ها با افزایش دوز از ۰/۵ به ۰/۷ میکروگرم آشکار می‌شود. به عبارت دیگر ۰/۲ میکروگرم اضافه تزریق از سطح ۰/۵، نزدیک ۴۳ درصد افزایش نواخت مرگ جنین‌ها را به دنبال داشته است ($P<0/0001$). همچنین اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه شاهد و گروه sham وجود داشت، بدین معنی که باز کردن پنجره اثری بر مرگ و میر جنین‌ها نداشت، در حالی که DMSO تا حدودی مرگ و میر جنین‌ها را به دنبال داشته است.

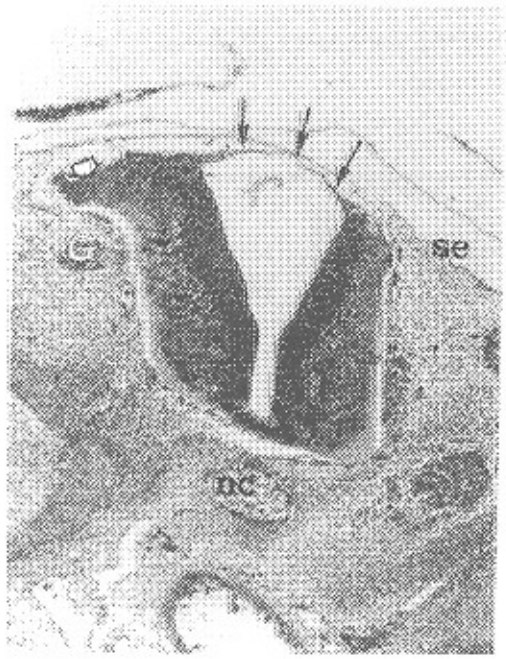
همه جنین‌های بدست آمده از گروه‌های ۰/۳، ۰/۵ و گروه شاهد جهت بررسی‌های ماکروسکوپی و تعداد ۹ جنین از هر گروه جهت بررسی‌های میکروسکوپی انتخاب شدند. از آنجا که در دوز ۰/۷ و ۱ میکروگرم میزان مرگ و میر جنین‌ها زیاد بود و به نظر می‌رسید که این دوزها دارای اثرات سمی می‌باشند مشاهده اثرات تراتوژنیک در آنها غیرممکن بود، لذا مطالعات میکروسکوپی روی آنها انجام نشد.

در بررسی‌های ماکروسکوپی، جنین‌های هر دو گروه، تأخیر در رشد را نشان می‌دادند که از یک مرحله (stage) تا یک روز متغیر بود. علاوه بر این عروق خارج جنینی هر دو گروه نسبت به نمونه شاهد، رشد و گسترش چندانی پیدا نکرده بودند و برخی از جنین‌ها انحناهای طبیعی خود را در طی این مرحله از رشد و تکامل نداشتند.

در مطالعات میکروسکوپی، مواردی از باز بودن لوله عصبی اولیه مشاهده شد. در برخی از جنین‌ها ناحیه پشتی لوله عصبی باز بوده و تعدادی سلول مرده دیده می‌شد و در مواردی نیز مجرای لوله عصبی وسیع بوده و گاهی ناحیه پشتی لوله عصبی رشد بیشتری به اطراف داشت (شکل‌های ۱ـالف و ب).



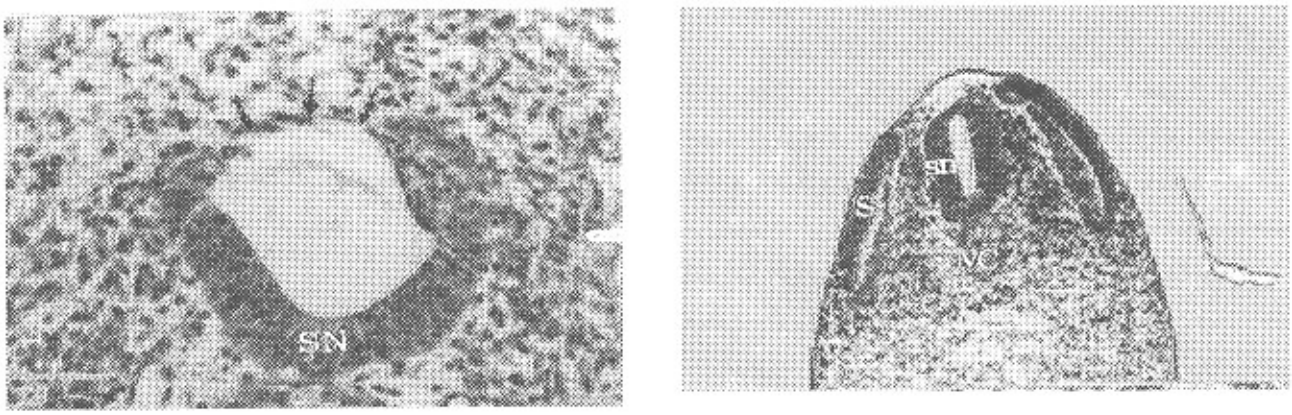
الف



ب

شکل ۱ : الف ـ برش عرضی لوله عصبی جنین چهار روزه از گروه شاهد. Nt ـ لوله عصبی، Nc ـ نوتوکورد H&E × ۴۰۰

ب ـ برش عرضی لوله عصبی جنین چهارروزه ۴۸ ساعت پس از تزریق از گروه آزمایشی دوز ۰/۳. ناحیه پشتی لوله عصبی باز است (سر پیکان‌های بزرگ) و زیاد بودن فضاهای بین سلولی (سر پیکان کوچک) و رشد اضافی لوله عصبی (پیکان کوچک) مشاهده می‌شود. Se ـ اکتودرم سطحی، Nc ـ نوتوکورد، G ـ گانگلیون پشتی (H&E × ۱۰۰).

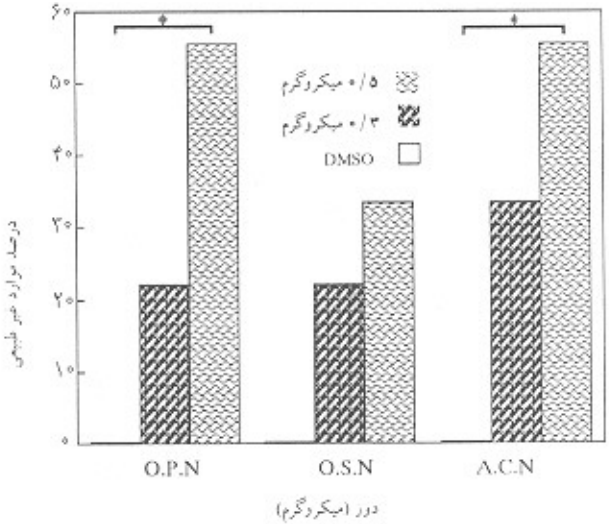


الف ب

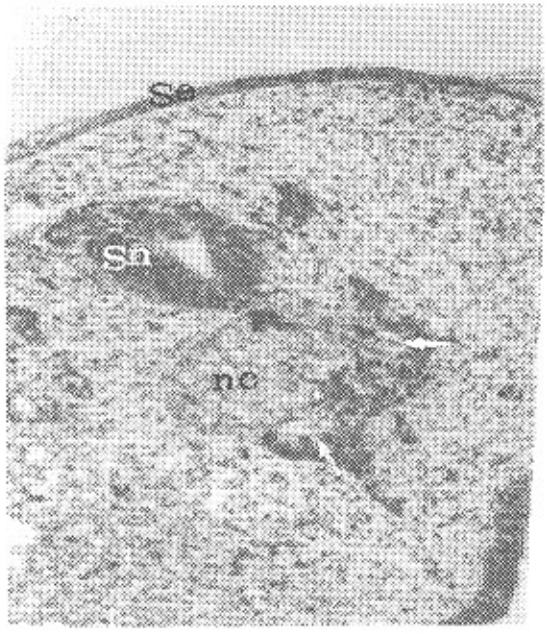
شکل ۲ : الف ـ برش عرضی لوله عصبی ثانویه جنین چهارروزه از گروه شاهد. Sn ـ لوله عصبی ثانویه، Nc ـ نوتوکورد، S ـ سومیت (H&E ×۲۰۰).
ب ـ برش عرضی لوله عصبی ثانویه یک جنین چهارروزه از گروه آزمایشی دوز ۰/۵ که بخش پشتی آن باز می‌باشد. Sn ـ لوله عصبی ثانویه، (H&E× ۲۰۰).

ناهنجاری دیگر باز بودن لوله عصبی ثانویه بود، به طوری که ناحیه پشتی لوله عصبی ثانویه در برخی از جنین‌ها باز بود. سلول‌ها کروماتین متراکم و لوله‌های عصبی ظاهری نامنظم داشتند (شکل‌های ۲ـالف و ب).

در مورد باز بودن لوله عصبی اولیه فقط در گروه ۰/۵ میکروگرم اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت ($P<0/05$ ـ نمودار ۱).



نمودار ۱ : اثر دوزهای مختلف اسید رتینوئیک در میزان بازماندن لوله عصبی اولیه open primary neural tube (O.P.N) بازماندن لوله عصبی ثانویه open secondary neural tube (O.S.N) و ایجاد لوله عصبی فرعی accessory neural tube (A.C.N) ۴۸ ساعت بعد از تزریق ($P<0/05$ *).



شکل ۳ : برش عرضی لوله عصبی ثانویه از یک جنین گروه آزمایشی دوز ۰/۳ که تعدادی لوله عصبی فرعی در اطراف نوتوکورد و چسبیده به آن مشاهده می‌شود. (پیکان‌ها) Sn ـ لوله عصبی ثانویه، Se ـ اکتودرم سطحی، Nc ـ نوتوکورد، H&E ×۲۰۰

ارتباط معنی‌داری در مورد درصد باز بودن لوله عصبی ثانویه در هیچ یک از دو گروه مطالعه شده مشاهده نشد (۳۳/۳ درصد و ۲۲/۲ درصد $P>0/05$، نمودار ۱). ناهنجاری دیگر پیدایش لوله عصبی فرعی بود به طوری که در تعدادی از جنین‌ها در ناحیه دمی

تعدادی لوله عصبی فرعی مشاهده شد که اطراف نوتوکورد آرایش یافته بودند (شکل ۳). در این مورد فقط در گروه ۰/۵ میکروگرم اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد (۵۵/۵٪، P<۰/۰۵، نمودار ۱).

بحث

اسید رتینوئیک یکی از مشتقات سنتزی ویتامین A می‌باشد که در درمان برخی بیماری‌های پوستی مصرف می‌شود ولی اثرات تراتوژنیک متفاوتی بر روی عضوهای در حال تکامل مانند قلب (۷)، کام (۳)، جوانه اندام (۱۳,۱۸)، سیستم عصبی (۱۰,۱٤) و لوله عصبی ثانویه (٤) دارد. روند تکاملی لوله عصبی اولیه و ثانویه با هم تفاوت دارد (۱٦)، بنابراین اثر اسید رتینوئیک بر روی تکامل لوله عصبی اولیه و ثانویه در مرحله تکاملی ۱۲-۱۱ (H.H) مورد بررسی قرار گرفت (٦). در این تحقیق نیز مانند مطالعه‌هایی که قبلاً برای ارزیابی اثرات تراتوژنیک این ماده انجام شده است از دوزهای ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میکروگرم استفاده شد (٤,۸).

دوزهای مختلف اسید رتینوئیک در مرحله ۱۲-۱۱ اثرات متفاوتی بر میزان مرگ و میر جنین‌ها داشت. هنگامی که دوز از ۰/۵ میکروگرم افزایش پیدا می‌کند مرگ و میر ٤۳ درصد افزایش می‌یابد و تزریق ۱ میکروگرم، یا به عبارت دیگر افزایش ۰/۳ میکروگرم، تغییر محسوسی در میزان مرگ و میر حاصل نمی‌کند. به عبارت دیگر، افزایش ۰/۲ میکروگرم، یعنی از سطح ۰/۵ به ۰/۷، یک سطح بحرانی برای مرگ و میر جنین‌ها محسوب می‌شود که این یافته‌ها با گزارش قبلی که توسط گریفت و ویلی (griffth & Wiley) بیان شده است متفاوت می‌باشد. زیرا در مطالعه آنها دوز مناسب که کمترین مرگ و میر و بیشترین ناهنجاری را در ناحیه دمی ایجاد می‌کند، ۱ میکروگرم و مرحله تکاملی را ۱٤-۱۳ معرفی نموده است (٤)، در حالی که در مطالعه ما دوز مناسب که کمترین مرگ و میر را داشت ۰/۳ میکروگرم و دوزی که بیشترین ناهنجاری را ایجاد کرد ۰/۵ میکروگرم و مرحله تکاملی ۱۲-۱۱ بوده است. احتمالاً نحوه تزریق دارو و زمان به کار بردن آن موجب این گوناگونی پاسخ شده است، زیرا در این مطالعه جنین‌ها در هنگام تزریق جوان‌تر بوده‌اند. در بررسی ماکروسکوپی، جنین‌های بدست آمده از دوگروه تزریقی ۰/۳ و ۰/۵ میکروگرم، تأخیر در رشد را نشان می‌دادند که این تأخیر در جنین‌هایی که دوز ۰/۵ میکروگرم را دریافت کرده بودند بیشتر بود. علاوه بر این در مقایسه با نمونه‌های شاهد، عروق خونی خارج جنینی رشد قابل ملاحظه‌ای نداشتند. این مشاهده تأییدی بر گزارش‌های محققین دیگر است (۸,۱۱,۱۹). تأخیر در رشد، احتمالاً به علت مهار یا کند شدن تقسیم سلولی در دوران جنینی یا مرگ سلول‌ها است (۱۰). علت احتمالی دیگر، عدم رشد کافی عروق خونی و نقص در تغذیهٔ جنین در حال رشد می‌باشد. انحراف در محور بدن که در این مطالعه در گروه‌های آزمایشی مشاهده شد، احتمالاً به دلیل تکثیر بیشتر سلول‌ها در یک طرف بدن نسبت به طرف دیگر یا به علت طولانی شدن مدت زمان تقسیم میتوز در یک سمت محور بدن نسبت به سمت دیگر می‌باشد. در مرحله ۱۲-۱۱ تکامل جنین جوجه که لوله عصبی و نوروپورپشتی هنوز بسته نشده، استفاده از اسید رتینوئیک موجب نقص لوله عصبی از جمله بازماندن آن می‌شود. معمولاً در جنین‌هایی که دارای نقص لوله عصبی بودند، نوتوکورد نیز ناهنجار بود و به خوبی تکامل نیافته بود. شاید ارتباطی بین این دو از نظر ایجاد ضایعه وجود داشته باشد. در این مورد نیز مشاهدات ما موافق گزارش دیگر محققین می‌باشد (۱,۱۰,۲۰). احتمالاً اسید رتینوئیک موجب مرگ سلولی در ناحیهٔ پشتی لوله عصبی و سلول‌های مزانشیمی اطراف لوله عصبی شده و این عامل موجب بازماندن لوله عصبی می‌شود. این فرضیه تأییدی بر گزارش یاسودا (Yasuda) و همکاران می‌باشد (۲۱). شاید اثر اسید رتینوئیک بر روی نوتوکورد، موجب اختلال در روند القاء سلولی بین نوتوکورد و لوله عصبی شده، در نتیجه لوله عصبی بدشکل یا باز می‌ماند.

در ناحیه دمی جنین سلول‌های مزانشیمی از شیار اولیه مهاجرت می‌نمایند تا جوانه دمی شکل گیرد، که شروع شکل‌گیری لوله عصبی ثانویه است. با وجود اینکه مکانیسم‌های درگیر در شکل‌گیری لوله عصبی اولیه در لوله عصبی ثانویه نقشی ندارند ولی لوله عصبی این ناحیه باز مانده و ناهنجار بود و گاهی لوله عصبی فرعی نیز در این قسمت‌ها دیده می‌شد. احتمالاً مرگ سلولی یکی از عوامل بازماندن لوله عصبی است. روبرت (Rubert) و همکاران گزارش نمودند که پروتئین‌های هسته‌ای که میل اتصالی به اسید رتینوئیک دارند در جوانه دم جنین جوجه فراوان می‌باشند (۱۵). احتمالاً اسید رتینوئیک بر روی سلول‌های مزانشیمی در حال تمایز این ناحیه اثر گذاشته و تمایز آنها را به لوله عصبی مختل می‌نماید. به این ترتیب لوله عصبی باز مانده یا بدشکل می‌شود.

گریفت و ویلی نشان دادند که اسید رتینوئیک می‌تواند میزان اسید سیالیک را در محیط کشت افزایش دهد. اسید سیالیک بخشی از ترکیبات گلیکولیپیدی و گلیکوپروتئینی غشاء سلولی می‌باشد. همچنین در ترکیبات گلیکوزآمینوگلیکان و

پروتئوگلیکان بستر خارج سلولی نیز دیده می‌شود. بنابراین اسید سیالیک می‌تواند در تأثیر متقابل بین دو سلول یا سلول با مواد سنتزی خودش در طی تکامل نقش داشته باشد (٤،٥). بر این اساس ممکن است اسید رتینوئیک از طریق تأثیر روی شکل و وضعیت اسید سیالیک روی جوانه دمی اثر گذاشته و موجب ایجاد لوله عصبی فرعی شود. در خاتمه پیشنهاد می‌شود محدوده دوز ۰/۵ تا ۰/۷ میکروگرم را که یک مرحله بحرانی برای جنین‌ها محسوب می‌شود دقیق‌تر بررسی نموده و با استفاده از روش‌های ایمنوهیستوشیمی محل‌های اتصال اسیدرتینوئیک در ناحیه دمی مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به اثرات تراتوژنیک اسید رتینوئیک، در استفاده کلینیکی از آن به خصوص در دوره بارداری باید دقت لازم را به عمل آورد.

سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب تشکر خود را از آقای ابوالهادی و سرکار خانم احمدی و سرکار خانم ملایی که در تایپ این مقاله ما را یاری نمودند اعلام می‌نمایم.

Summary

Effect of Retinoic Acid on Neural Tube Development in Chick Embryo

M. Shariati, MS[1]; M. Rezazadeh, PhD[2]; M. Khaksari, PhD[3]; and H.R. Jaafarineveh, MS[1]

1. Faculty Member, Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services
2. Assistant Professor of Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor of Physiology, Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services, Rafsanjan, Iran

Retinoic acid is one of the derivatives of vitamin A. It is used for treatment of dermatitis, but it has different teratogenic effects on developing organs depending on the different stages of embryonic life. Neural tube is made of two different parts: primary neural tube originated from embryo germinal layer and secondary neural tube originated form tail bud. The present study was designed to compare the effects of different doses of retinoic acid on primary and secondary neural tube development in the stages of 11-12 Humburger & Hamilton. In order to do this, 254 White Leghorn eggs were divided to six groups for further direct studies. Four of the groups were injected with either of; 0.3, 0.5, 0.7, and 1 microgram solution of retinoic acid in 2 microliter of dimethyl sulfoxide, the fifth group was injected with only dimethylsulfoxide, and no injection was made to the last group (sham). Forty eight hours later embryos were removed and studied both microscopically and macroscopically. The results showed that, retinoic acid with the dose of 0.5 microgram caused the primary neural tube to be left open and produced accessory neural tube with comparison to the control group ($P<0.05$). This study suggests that one of the teratogenic effects of retinoic acid in chick embryo is abnormality in the nervous system presented as open primary neural tube or production of accessory neural tube.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 1996; 3(2): 59-66
Key Words: *Retinoic acid, Neural tube, Chick embryo, Teratogen*

References

1. Alles AJ and Sulik KK. Retinoic acid induced spina bifida: evidence for a pathogenetic mechanism. *Development* 1990; 108(1): 73-81.
2. Birnbaum LS, Harris MW, Stocking LM, Clark AM and Morrissey RE. Retinoic acid and 2, 3, 7, 8 tetrachlorodibenzo - P - dioxin selectively enhance teratogenesis

in C 57BL/6N mice. *Toxicol Appl pharmacol* 1989; 98(3): 487-500.

3. Brodes JP. Retinoid, homeoboy genes and limb morphogenesis. *Neuron* 1989; 2(3): 1285-1294.
4. Griffth CM and Wiley MY. Effects of retinoic acid on chick tail bud development. *Teratology* 1991; 43(3): 217-224.
5. Hascall V and Hascall G: Proteoglycans. In: Hall E.D (Ed). Cell biology of extra cellular matrix. 3rd ed., New York, Plenum Press, 1981; pp39-63.
6. Humburger V and Hamilton HI. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph* 1951; 88(2): 49-92.
7. Irie K, Morishima M, Ando M and Takao A. 13 cisretinoic acid induced cardiovascular malformation in ICR and NOD mice. *Teratology* 1988; 38(5): 504-516.
8. Jelinek R and Kistler A. Effect of retinoic acid upon the chick embryonic morphogenetic systems. I. The embryotoxicity dose range. *Teratology* 1981; 23(2): 191-195.
9. Karfunkel P. The mechanisms of neural tube formation. *Int Rev Cytol* 1974; 38(0): 245-271.
10. Modad SP, Ghatpande SK, Rane RK and Mulherkar J. Ciu dalization by retinoic acid is corrilated with inhibition of cell population growth and expansion of chick blastoderm cultured in vitro. *Int J Dev Biol* 1993; 37(4): 601-607.
11. Moro - Bolias JA, Gato A, Alonso-Revuelta MT, Pastor JF, Repressa JJ and Barboso F. Retinoic acid induces chages in the rhombencephalic neural crest cells migration and extra cellular matrix composition in chick embryos. *Tratology* 1993; 48(3): 197-206.
12. Ong DE and Chytil F. Retinoic acid - binding protein in rat tissue: partial purification and comparison to rat tissue retinol binding protein. *J Biol chem* 1975; 250(1): 114-117.
13. Paulsen - DF. Retinoic acid in limb bud outgrowth: review and hypothesis. *Anat Embryol - Berl* 1994; 190(5): 299-415.
14. Rosa FA, Wilk L, and kelsey Fo. Teratogen update: Vitamin A congeners. Teratology 1986; 33(3): 335-364.
    Spicific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis *Development* 1990; 108(3): 213-222.
15. Rubert E, Dolle P, Krust A, Zelent A, Morris Kay G and Chambon P. Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis. *Development* 1990; 108(2): 213-222.
16. Schoenwolf GC. Histological and ultrastructural observations of tail bud formation in the chick embryo. *Anat Rec* 1979; 163(1): 131-148.
17. Schoenwolf GC. Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos. *Am J Anat* 1984; 169(4): 361-376.
18 Sulik KK and Dehrat DB. Retinoic acid induced limb malformations resulting from apical ectodermal ridge cell death. *Teratology* 1988; 37(6): 527-537.
19. Tibbles L and Wiley MJ. A comparative study of the effects of retinoic acid given during the critical period for inducing spina bifida in mice and hamsters. *Teratology* 1988; 37(2): 113-125.
20. Wiley MJ, Cauwenbergs P and Taylor IM. Effects of retinoic acid on the development of the facial skeleton in

hamsters: Early changes involving cranial neural crest cells. *Acta Anat* 1983; 116(2): 180-192.

21. Yasuda Y, Konishi H, Matsuo T, Kihara T and Tanimura T. Aberrant differentiation of neuroepithelial cells in developing mouse brains subsequent to retinoic acid exposure in utero. *Am J anat* 1989; 186(3): 271-284.