

اثر اسید رتینوئیک بر ساختار سلول‌های پانکراس جنین موش صحرائی

دکتر بهپور یوسفی^۱، نوشین برومند^۲، سعید حقیقی^۱

۱) گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، ۲) دانشگاه آزاد، واحد دامغان، نشانی مکاتبه‌ی نویسندگی مسئول:
سمنان، کیلومتر ۵ جاده دامغان، دانشکده‌ی پزشکی، گروه علوم تشریح، دکتر بهپور یوسفی، e-mail: behpour.y9@gmail.com

چکیده

مقدمه: مطالعه‌های اخیر نشان داده‌اند که برای تکامل اولیه‌ی پانکراس در حیوانات اسید رتینوئیک مورد نیاز است. از آن‌جا اثر اسید رتینوئیک (ATRA) با منشای بیرونی در روز دهم دوره‌ی جنینی در مراحل بعدی تکامل بر ساختار پانکراس به خوبی مشخص نشده است، این مطالعه انجام شد. مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی مداخله‌ای، موش‌های صحرائی ماده (Rat) به طور تصادفی در دو گروه شاهد و آزمایش (۵ سر در هر گروه) قرار گرفتند. به گروه آزمایش، اسید رتینوئیک ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به صورت خوراکی و از طریق لوله داده شد. در روز هجدهم بارداری جنین‌ها (از هر گروه ۲۴ جنین) جمع‌آوری شدند. سپس نمونه‌ها برای رنگ‌آمیزی آسینی‌ها، مجاری و جزایر لانگرهانس آماده شدند. تراکم متغیرهای فوق در هر میدان دید میکروسکوپی به همراه اقطار آسینی، و هسته‌ی سلول آن اندازه‌گیری و محاسبه شدند. یافته‌ها با استفاده از آزمون آماری تی زوجی مقایسه شدند. یافته‌ها: میانگین تراکم آسینی‌ها و سیستم مجاری همراه با جزایر لانگرهانس در هر میدان دید میکروسکوپی در گروه مورد (آزمایش) نسبت به گروه شاهد به ترتیب ۲۳/۵٪ و ۷۶٪ افزایش داشت که هر دو از نظر آماری معنی‌دار ($P < 0/001$) بود. میانگین اقطار آسینی و هسته‌ی سلول‌های آن در گروه مورد (آزمایش) نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار نشان داد. نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌شود که ATRA ممکن است تکثیر و تمایز آسینی‌ها و مجاری همراه با جزایر لانگرهانس را افزایش دهد.

واژگان کلیدی: پانکراس، اسید رتینوئیک اسید (ATRA)، جزایر لانگرهانس، جنین

دریافت مقاله: ۸۸/۲/۱۳ - دریافت اصلاحیه: ۸۸/۳/۳۰ - پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۲۲

مقدمه

پانکراس یک عضو پیچیده است که از دو اجتماع سلولی متفاوت با عنوان سلول‌های درون‌ریز^۱ و برون‌ریز^۲ تشکیل شده است. سلول‌های برون‌ریز پانکراس شامل سلول‌های آسینی و سلول‌های مجاری هستند. سلول‌های آسینی با تولید آنزیم‌های گوارشی و ترشح آنها به روده، به هضم و جذب غذا در روده کمک می‌کنند. سلول‌های درون‌ریز، جزایر

لانگرهانس نامیده می‌شوند که از پنج نوع سلول تشکیل شده‌اند. سلول‌های بتا که هورمون انسولین تولید می‌کنند، سلول‌های آلفا که از بقیه درشت‌ترند و در تولید هورمون گلوکاگون شرکت می‌کنند، سلول‌های دلتا که در تولید هورمون سوماتوستاتین نقش دارند.^۱ سلول‌های PP که تولید پلی‌پپتیدهای پانکراس را به عهده دارند و سلول‌هایی که هورمون گرلین ترشح می‌کنند.^۲ عملکرد این هورمون‌ها باعث تنظیم متابولیسم می‌شود. برای تکامل مناسب پانکراس، برهم‌کنش بخش‌های اپی‌تلیال - مزانشیمال لازم است.^۳ برای این برهم‌کنش، عوامل متعددی مانند فولیستاتین، رتینوئیدها و

i- Endocrine

ii- Exocrine

رطوبت نسبی کافی در حیوانخانه مهیا شد و آب تصفیه شده و غذای آماده Pellet به اندازه‌ی کافی، آزادانه در اختیار آنها قرار گرفت. موش‌ها بعد از مشخص شدن شروع بارداری از طریق مشاهده پلاک واژینال به طور تصادفی در دو گروه شاهد و آزمایش (مورد) (۵ سر در هر گروه) قرار گرفتند. در روز دهم بارداری به گروه آزمایش، ۱۰۰ میلی‌گرم اسید ارتینوئیک به ازای هر کیلوگرم بر وزن بدن (Sigma-Aldrich, USA) حل شده در روغن ذرت و الکل (نسبت ۱:۹) به صورت خوراکی و از طریق لوله ۱۷ و به گروه شاهد فقط آب و غذا داده شد. در روز هیجدهم بارداری از هر گروه ۲۴ جنین جمع‌آوری و در فرمالین ۱۰٪ فیکس شد. سپس نمونه‌ها مطابق روش روتین پارافینی پاساژ و قالبگیری شدند. از نمونه‌ها برش‌های سریال به صورت طولی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. از هر پنج برش، یک برش برای مطالعه‌ی بعدی انتخاب شد. به منظور مطالعه، نمونه‌های پانکراس با میکروسکوپ نوری و دست‌یابی بهتر به اهداف مورد نظر از رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین - ائوزین (H&E)، کروم آلوم هماتوکسیلین فلوکسین و گرمیلیوس استفاده شد. در این مطالعه، از میکروسکوپ Diastar با بزرگنمایی ۴۰۰ و ۱۰۰۰ چشمی مجهز به سیستم TV.Camera نوع Javelin مدل JE3352X برای تصاویر استفاده شد.

برای اندازه‌گیری متغیرهای تراکم آسینی، تراکم مجاری به همراه جزایر لانگرهانس در هر یک از ۲۴ نمونه‌ی پانکراس گروه آزمایش و ۲۴ نمونه‌ی گروه شاهد، از هر نمونه‌ی پانکراس ۵ لام به طور تصادفی انتخاب و در هر لام ۵ میدان دید با عدسی چشمی شطرنجی بررسی شد. برای این منظور تصاویر میکروسکوپی (میکروسکوپ Diastar) را با کمک سیستم TV.Camera نوع Javelin مدل JE3352X به تلویزیون انتقال داده شد و با کمک لام نئوبار اصلاح شده صفحه تلویزیون به مربع‌های بزرگ A و کوچک B تقسیم شد و طول هر یک از مربع‌ها از روی لام نئوبار در هر یک از درشت‌نمایی‌های مختلف به شرح زیر به دست آمد.

سپس میزان تراکم در سطح برای هر یک از نمونه‌ها، از تقسیم مساحت اشغال شده‌ی خانه‌های شطرنجی دارای ساختارهای مورد نظر به کل مساحت خانه‌های شطرنجی مورد مشاهده در میدان دید برای هر دو گروه به دست آمد و میانگین متغیرهای فوق برای گروه‌های فوق محاسبه و مقایسه شدند.

فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF)ⁱ، از جمله عوامل مشخصی هستند که با تحریک ناحیه‌ای از مزانشیم، باعث تکامل بخش برون‌ریز پانکراس می‌شوند.^{۴،۵}

رتینوئیدها گروهی از آنالوگ‌های طبیعی و سنتتیک ویتامین A هستند که برای تکامل مهره‌داران لازمند^۶ و اثر مهمی بر رشد و تمایز انواع مختلف سلول‌ها دارند.^۷ همچنین، وجود آنها در دوران جنینی برای تشکیل اندام‌هایی مانند سیستم عصبی مرکزی، شش‌ها، کلیه، روده و پانکراس ضروری است.^{۸-۱۲} به طوری‌که ثابت شده است تولید اسید رتینوئیک در سلول‌های مزودرم جانبی جنینی برای تشکیل و تکامل پانکراس از سلول‌های آندودرم پشتی مورد نیاز است.^{۱۴} و نقش پیام‌رسانی در تکامل آن دارد.^{۱۵} علاوه بر این‌ها، نشان داده شده است که اسید رتینوئیک (ATRA)^{۱۳} در محیط کشت دارای بافت پانکراس جنینی، باعث توقف مورفوژنز جوانه‌ای، توقف تمایز بخش برون‌ریز و القای تشکیل گروه‌های سلولی بخش درون‌ریز به ویژه سلول‌ها بتا، زودتر از موعد می‌شود.^۲ در حالی که بر اساس برخی از مطالعه‌های دیگر، این دارو سبب کاهش تمایز بخش برون‌ریز می‌شود.^{۱۶} با توجه به این‌که مطالعه‌های قبلی در این خصوص اغلب در محیط کشت انجام شده و یافته‌های حاصل از آنها نیز ضد و نقیض می‌باشد و نیز تاکنون، اثر استفاده از این اسید در روز دهم دوره‌ی جنینی در مراحل بعدی تکامل پانکراس مشخص نشده است هدف از این مطالعه بررسی اثر خوراکی این دارو بر ساختار سلول‌های برون‌ریز و درون‌ریز پانکراس جنین‌هایی بود که مادران آنها در روز دهم حاملگی در معرض آن قرار گرفتند. همچنین، در این مطالعه برای اولین بار اثر افزایشی این دارو بر تراکم آسینی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از موش صحرایی نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم، از جنس ماده و بالغ استفاده شد. حیوانات به مدت ده روز برای سازگاری با شرایط محیط جدید در مرکز حیوان‌خانه نگهداری شدند. در طول این مدت، شرایط مطلوب فیزیکی شامل، درجه‌ی حرارت ۲۰ تا ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و

i - Fibroblastic Growth Factor

ii - All- Trans Retinoic Acid

به منظور بررسی کمی مانند متغیرهای قطر آسینی، ارتفاع سلول آسینی و هسته‌ی سلول* آن در هر یک از نمونه‌ها از عدسی چشمی مجهز به میکرومتر چشمی با درشت‌نمایی $\times 10$ ، کالیبره شده به وسیله یک Stage micrometer و عدسی شیئی با درشت‌نمایی $\times 40$ و $\times 100$ استفاده شد. طول خطکش قطعه‌ی چشمی ۱۰۰ واحد بود که هر واحد آن با عدسی شیئی $\times 40$ و $\times 100$ به ترتیب برابر $3/5$ و $1/4$ میکرون محاسبه شد. روش مطالعه به این ترتیب بود که در هر نمونه‌ی پانکراس، ۵ لام و در هر لام ۵ میدان دید قطر، ارتفاع و هسته‌ی سلول آسینی در موقعیت ۳، ۶، ۹ و ۱۲، مرکز اندازه‌گیری شد. در نهایت، به منظور به دست آوردن اندازه‌ی متغیرهای فوق بر حسب میکرون، حاصل‌ضرب اعداد خام به دست آمده در ضریب $1/4$ (هر واحد خطکش قطعه‌ی چشمی با عدسی شیئی $\times 100$ برابر با $1/4$ میکرون است) محاسبه شد. سپس میانگین متغیرهای فوق برای هر یک از نمونه‌ها پانکراس محاسبه شد.^{۱۸} سپس میانگین متغیرها برای هر یک از نمونه‌ها در دو گروه آزمایش (مورد) و شاهد محاسبه و نسبت به هم مقایسه شدند.^{۱۸}

یافته‌ها

یافته‌های به دست آمده از تأثیر ATRA بر پانکراس جنین در گروه آزمایش و مقایسه‌ی آن با گروه شاهد در جدول ۱ نشان داده شده است.

در هر میدان دید میکروسکوپی، در گروه مورد، $0/4593 \pm 0/020140$ و در گروه شاهد، $0/56736 \pm 0/011420$ بود. مقایسه‌ی میانگین تراکم آسینی در دو گروه آزمایش و شاهد نشان داد که ATRA باعث افزایش ($23/5\%$) معنی‌دار ($P < 0/0001$) تراکم آسینی‌ها در گروه آزمایش می‌شود [نمودار ۱ و تصویر ۱ (الف و ب)].

جدول ۱- میانگین و انحراف استاندارد متغیرها در دو گروه مورد (آزمایش) و شاهد

متغیر	گروه مورد (تعداد = ۲۴)	گروه شاهد (تعداد = ۲۴)	مقدار P
تراکم آسینی‌ها در میدان دید میکروسکوپی	$0/56736 \pm 0/011420$	$0/45930 \pm 0/020140$	$0/0001$
تراکم مجاری و جزایر لانگرهانس در میدان دید میکروسکوپی	$0/27990 \pm 0/080498$	$0/15890 \pm 0/038431$	$0/0001$
قطر آسینی‌ها (میکرومتر)	$34/5650 \pm 5/36307$	$38/3865 \pm 7/37061$	$0/0001$
ارتفاع سلول‌ها آسینی‌ها (میکرومتر)	$12/44 \pm 1/919$	$12/57 \pm 0/2/000$	معنی‌دار نبود
قطر هسته‌ی سلول‌های آسینی (میکرومتر)	$5/014 \pm 0/3390$	$0/3774 \pm 5/241$	$0/0001$

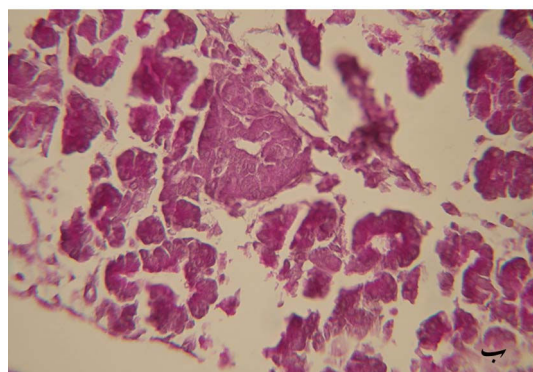
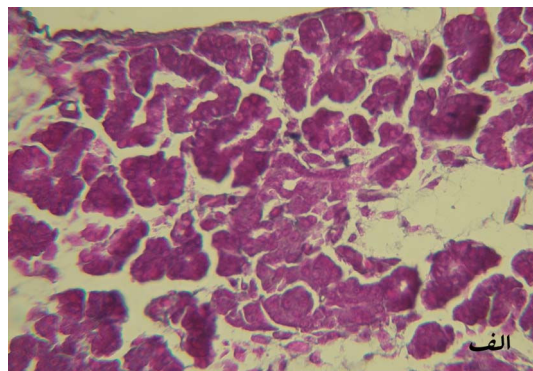
* اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف از استاندارد بیان شده‌اند.

که این اسید باعث کاهش قطر آن در گروه دریافت‌کننده‌ی به میزان 10% شده است. به طوری‌که میانگین قطر آسینی‌ها در گروه مورد (آزمایش)، $34/5650 \pm 5/30964$ میکرومتر و در گروه کنترل، $38/3865 \pm 7/38901$ میکرومتر بود. این کاهش از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < 0/0001$) [نمودار ۲، تصویر ۳ (الف و ب)].

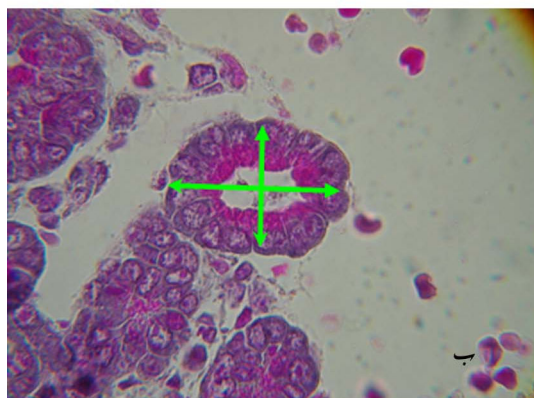
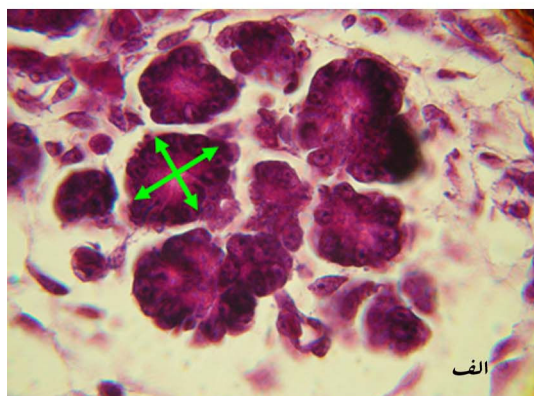
میانگین تراکم مجاری و جزایر پانکراس در هر میدان دید میکروسکوپی، در گروه مورد (آزمایش) $0/27990 \pm 0/080432$ و در گروه شاهد $0/15890 \pm 0/07845$ بود. مقایسه‌ی میانگین متغیرهای فوق در دو گروه آزمایش و شاهد، حاکی از افزایش (76%) معنی‌دار ($P < 0/0001$) آنها در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد. [نمودار ۱، تصویر ۲ (الف و ب)]. مقایسه‌ی میانگین قطر متوسط آسینی‌ها در دو گروه آزمایش و شاهد نشان داد

همانطور که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود میانگین ارتفاع این سلول‌ها در گروه آزمایش ($12/44 \pm 0/64$ میکرومتر) نسبت به گروه شاهد ($12/57 \pm 0/61$ میکرومتر) کاهش معنی‌دار نداشت [تصویر ۴ (الف و ب)].

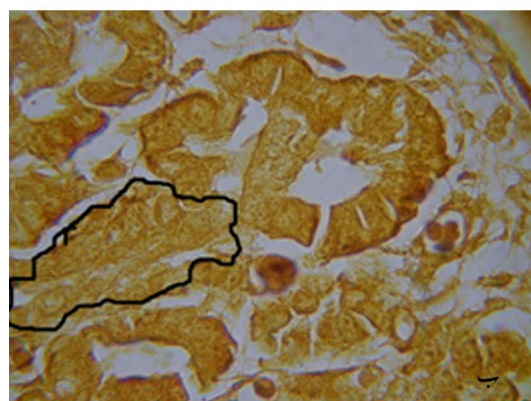
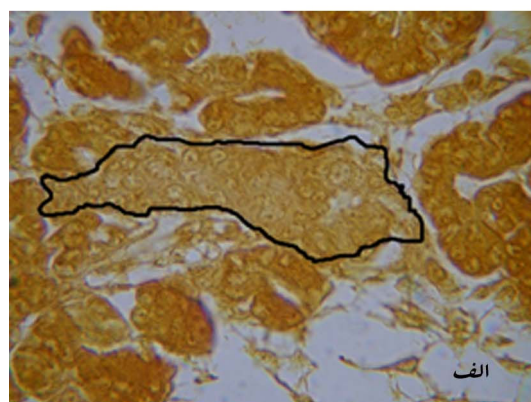
میانگین قطر هسته‌ی این سلول‌ها در گروه دریافت‌کننده‌ی اسید $5/014 \pm 0/013$ میکرومتر و در گروه شاهد، $5/241 \pm 0/015$ میکرومتر بود. مقایسه‌ی میانگین فوق در دو گروه نشان داد که ATRA باعث کاهش قطر هسته‌ی این سلول‌ها در گروه دریافت‌کننده‌ی اسید شده است و این کاهش از نظر آماری معنی‌دار ($P < 0/001$) بود. [نمودار ۲، تصویر ۴ (الف و ب)].



تصویر ۱- افزایش تراکم آسینی‌ها در یک میدان دید میکروسکوپی (بزرگ‌نمایی ۴۰۰، رنگ‌آمیزی کروم آلوم هماتوکسیلین فلوکسین) در جنین‌های ۱۸ روزه، الف (گروه آزمایش و ب) گروه شاهد.



تصویر ۳- کاهش میانگین قطر متوسط آسینی‌های پانکراس (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰) در جنین‌های ۱۸ روزه نسبت به گروه شاهد، الف (گروه آزمایش (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین) و ب) گروه شاهد (رنگ‌آمیزی کروم آلوم هماتوکسیلین فلوکسین).

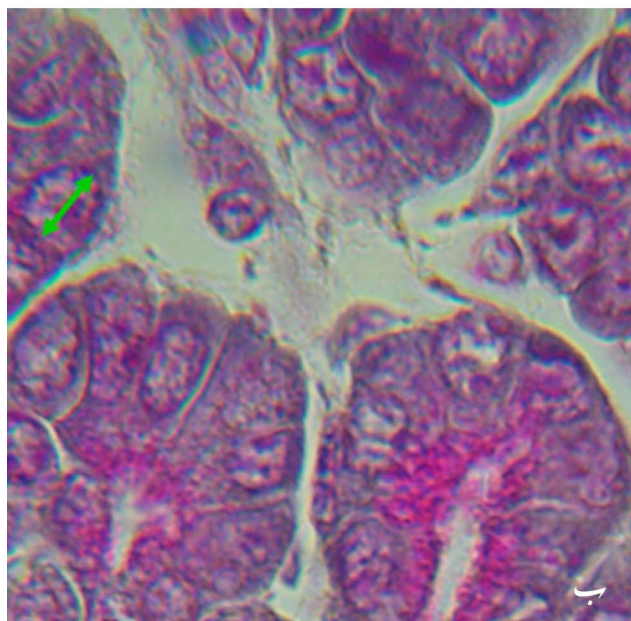
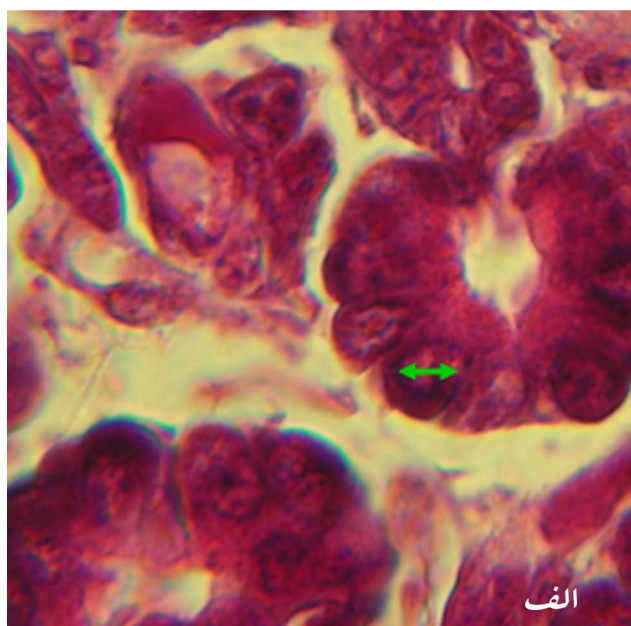


تصویر ۲- افزایش تراکم جزایر و مجاری پانکراس در یک میدان دید میکروسکوپی (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰، رنگ‌آمیزی گریملیوس) در جنین‌های ۱۸ روزه، الف (گروه آزمایش و ب) گروه شاهد.

مجاری در مراحل بعدی تکامل پانکراس یعنی روز هیجدهم می‌شود. ولی در این گروه قطر آسینی و هسته‌ی سلول‌های تشکیل‌دهنده‌ی آن باوجود افزایش تراکم آسینی‌ها در واحد سطح کاهش معنی‌دار داشت.

افزایش تراکم آسینی‌ها تحت تأثیر ATRA در این مطالعه نسبت به گروه شاهد با یافته‌های سایر پژوهشگران^{۱۶،۲} همخوانی ندارد و اولین بار است که گزارش می‌شود. در یک مطالعه‌ی حیوانی، مادر جنین‌هایی که با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در معرض این دارو قرار داده شدند^{۱۶} آسینی‌های پانکراس کاهش معنی‌دار یافته بود. مطالعه‌ی دیگری^۲ نشان داد که افزودن اسیدرتینوئیک به محیط کشت حاوی پانکراس همین اثر را دارد. باید توجه داشت که با وجود چنین افزایشی، کاهش قطر آنها در گروه مورد آزمایش قابل توجه و از نظر آماری معنی‌دار بود. با کنار هم گذاشتن این دو یافته می‌توان گفت که تعداد آسینی‌ها با قطرهای کوچک‌تر در گروه فوق بیشتر از گروه شاهد بود و این مطلب کاملاً در تصاویر گرفته شده قابل تشخیص بود. از اینرو دارو موجب افزایش تقسیم‌های سلولی و به دنبال آن افزایش تراکم آسینی ولی با اندازه‌های کوچک‌تر در این گروه شده است و سازوکار دقیق آن نیز برای ما نامشخص است. به نظر می‌رسد که احتمالاً عواملی مانند دوز دارو و روز دریافت آن بر پاسخ سلول‌های در حال تمایز پانکراس نسبت به RA در روزها مختلف، در شرایطی خاص اثر دارد و شاید این عوامل در تفاوت یافته‌های ما با دیگران بی‌تأثیر نباشد، به طوری‌که، دیده شده است که استفاده از یک دوز RA و در شرایط یکسان در محیط طبیعی در روزهای هشتم و دوازدهم جنینی، موجب مهار تمایز آسینی‌ها در روز هشتم می‌شود، در حالی‌که در روز دوازدهم چنین اثری ندارد.^{۱۶} در تمایز آسینی‌های پانکراس عوامل مختلفی از جمله ماتریکس خارج سلولی مانند لامینین I نقش دارد. به طوری که هم کاهش و هم افزایش آن، تمایز آسینی‌ها را مهار می‌کند.^۲ و این‌که در مطالعه‌ی ما دوز به کار رفته بر سطح بیان لامینین اثر داشته یا نداشته نیاز به بررسی بیشتر دارد.

ارزیابی اثر ATRA بر تراکم جزایر لانگرهانس به همراه مجاری پانکراس جنین نشان داد که این دو متغیر در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافته است. البته در این مطالعه به دلیل ارتباط تنگاتنگ تکاملی بین این دو، آنها به طور منفک بررسی قرار نشدند. در تأیید یافته‌ی ما بررسی‌های دیگری توسط سایر پژوهشگران در محیط زنده^{۱۹} و در محیط



تصویر ۴- کاهش میانگین قطر هسته و ارتفاع سلول آسینی پانکراس (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰) در جنین‌های ۱۸ روزه، الف) گروه آزمایش (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین) و ب) گروه شاهد (رنگ‌آمیزی کروم آلوم هماتوکسیلین فلوکسین).

بحث

یافته‌های به دست آمده در این مطالعه نشان داد که در گروه آزمایش دوز واحد ATRA در روز دهم دوره‌ی جنینی سبب افزایش تراکم آسینی‌ها و جزایر لانگرهانس همراه

رونویسی درون‌ریزی و افزایش mRNA سلول‌های انسولین‌ساز، از طریق باند شدن به رسپتورهای E: RA^{۲۳} و یا از طریق گسترش و آزادسازی ژن‌های تسهیل‌کننده‌ی انسولین باشد.^{۲۱،۲۴}

پس از آنالیز داده‌ها، مشاهده شد که ATRA بدون اثر مؤثر بر ارتفاع سلول آسینی، قطر هسته را به طور قابل ملاحظه کاهش داده است. این یافته با گزارش کسنوشیتا و همکاران مبنی بر کاهش قطر ماست سل‌ها توسط این ماده در تضاد است.^{۲۵} اندازه‌ی سلول در موجودات چندسلولی تحت تأثیر عوامل درونی و بیرونی است و توسط بیوژنز ریپوزوم تنظیم می‌شود.^{۲۶} این امر نتیجه‌ی هماهنگی زنجیره‌ای بین پیشرفت چرخه‌های تقسیم سلولی و رشد آن نیز هست، اما چهار پروسه‌ی عمومی متفاوت این‌دو را تعدیل می‌نماید^{۲۷} و شاید اندازه‌ی سلول، وابسته به مرحله‌ای از مراحل تمایز سلولی باشد^{۲۸} و روشن شدن دقیق این موضوع نیاز به بررسی بیشتر دارد.

در مجموع، پژوهش حاضر نشان داد که مصرف اسید رتینوئیک ممکن است در دوره‌ی بارداری توانایی تکثیر و تمایز آسینی‌ها و جزایر لانگرهانس همراه با مجاری پانکراس را در جنین افزایش دهد.

آزمایشگاهی^{۱۳،۹،۲۰} ارایه شده است هر چند شرایط مطالعه‌های ذکر شده با مطالعه‌ی ما در آن موش‌ها در روز دهم دارو دریافت کردند تفاوت دارد. به عنوان نمونه اراسموس و همکاران^۹ با اضافه کردن، RA به محیط کشت دارای جوانه‌های پشته‌ی پانکراس در روز ۱۲/۵ جنینی، و ما از طریق خوراندن آن در روز دهم به موش‌های باردار، در جنین آنها مشاهده کردیم که این دارو موجب افزایش متغیرهای فوق در روز هیجدهم می‌شود. در واقع، این مطالعه‌ها تا حدودی همسو با مطالعه‌ی ما بودند. با توجه به این‌که تمایز جوانه‌های پشته‌ی و شکمی پانکراس در فاصله‌ی روزهای ۹-۸/۷۵، منشعب شدن اپیتلیوم و تمایز مجاری در روز ۱۲/۵ و تمایز بخش آندوکرین (سلول‌های جزایر) در روز ۱۳/۵ جنینی ۹ آغاز می‌شود، به نظر می‌رسد که این دارو از طریق پیش‌ساز سلول‌های اپیتلیوم مجاری تأثیر می‌گذارد و سبب تحریک تمایز آن می‌شود. گزارش شده است که در افزایش سلول‌های درون‌ریز (سلول‌های انسولینی) و مجاری ۱۳ ژن، Pdx1^{۲۲} و ۲۱ نقش اصلی و مهمی دارد و در محیط آزمایشگاهی، RA بیان آن را تنظیم و کنترل می‌نماید.^{۱۳} سازوکار القا و افزایش سلول‌های درون‌ریز، توسط ژن Pdx1 می‌تواند هم به دلیل القای عوامل

References

- Murtaugh LC, Melton DA. Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 71-89
- Shen CN, Marguerie A, Chien CY, Dickson C, Slack JM, Tosh D. All-trans retinoic acid suppresses exocrine differentiation and branching morphogenesis in the embryonic pancreas. *Differentiation* 2007; 75: 62-74
- Gittes GK, Galante PE, Hanahan D, Rutter WJ, Debase HT. Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development* 1996; 122: 439-47.
- Edlund H. Pancreatic organogenesis-developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 524-32.
- Bhushan A, Itoh N, Kato S, Thierry JP, Czernichow P, Bellusci S, et al. Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development* 2001; 128: 5109-17.
- Chen Y, Pan FC, Brandes N, Afelik S, Solter M, Pieler T. Retinoic acid signaling is essential for pancreas development and promotes endocrine at the expense of exocrine cell differentiation in *Xenopus*. *Dev Biol* 2004; 271: 144-60.
- Maden M. Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 843-53.
- Broglia F, Gottero C, Benso A, Prodam F, Volante M, Destefanis S, et al. Ghrelin and the endocrine pancreas. *Endocrine* 2003; 22: 19-24.
- Erasmus C, Penny C, Kramer B. Retinoic acid increases the length and volume density of ducts in the rat embryonic pancreas. *Dev Growth Differ* 2003; 45: 199-207.
- Kramer B, Clem P. Regulation of the proportion of insulin cells in embryonic chick pancreas: effect of a growth factor-reduced extracellular matrix in combination with retinoic acid. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003; 39: 196-8.
- McCaffery PJ, Adams J, Maden M, Rosa - Molinar E. Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 457-72.
- Nagatomo K, Ishibashi T, Satou Y, Satoh N, Fujiwara S. Retinoic acid affects gene expression and morphogenesis without upregulating the retinoic acid receptor in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mech Dev* 2003; 120: 363-72.
- Tulachan SS, Doi R, Kawaguchi Y, Tsuji S, Nakajima S, Masui T, et al. All-trans retinoic acid induces differentiation of ducts and endocrine cells by mesenchymal/epithelial interactions in embryonic pancreas. *Diabetes* 2003; 52: 76-84.
- Molotkov A, Molotkova N, Duester G. Retinoic acid generated by Raldh2 in mesoderm is required for mouse dorsal endodermal pancreas development. *Dev Dyn* 2005; 232: 950-7.

15. Stafford D, Hornbruch A, Mueller PR, Prince VE. A conserved role for retinoid signaling in vertebrate pancreas development. *Dev Genes Evol* 2004; 214: 432-41.
16. Colakoglu N, Kukner A, Oner J, Sonmez MF, Oner H, Ozan E. Effects of high dose retinoic acid on TGF-beta2 expression during pancreatic organogenesis. *J Mol Histol* 2005; 36: 413-18.
17. Padmanabhan R. Retinoic acid-induced caudal regression syndrome in the mouse fetus. *Reprod Toxicol* 1998; 12: 139-51.
18. Wing TY, Christensen AK. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat* 1982 ;165: 13-25.
19. Yamaguchi Y, Igarashi R. Nanotechnology for therapy of type 2 diabetes. *Nippon Rinsho* 2006; 64: 295-300.
20. Kang MK, Yoon YE, Yang JY, Kwon KB, Park JW, Jhee EC. Protective effect of retinoic acid on interleukin-1 beta-induced cytotoxicity of pancreatic beta-cells. *Mech Ageing Dev* 2004; 125:483-90.
21. Packer AI, Crotty DA, Elwell VA, Wolgemuth DJ: Expression of the murine Hoxa4 gene requires both autoregulation and a conserved retinoic acid response element. *Development* 1998; 125: 1991-8.
22. Li Z, Manna P, Kobayashi H, Spilde T, Bhatia A, Preuett B, et al. Multifaceted pancreatic mesenchymal control of epithelial lineage selection. *Dev Biol* 2004; 269: 252-63.
23. Clark AR, Wilson ME, London NJ, James RF, Docherty K: Identification and characterization of a functional retinoic acid / thyroid hormone-response element upstream of the human insulin gene enhancer. *Biochem J* 1995; 309 (Pt 3): 863-70.
24. Huang D, Chen SW, Langston AW, Gudas LJ. A Conserved retinoic aid responsive element in the murine Hoxb – 1 gene is required for expression in the developing gut. *Development* 1998; 125: 3235-46.
25. Kinoshita T, Koike K, Mwamtemi HH, Ito S, Ishida S, Nakazawa Y, et al. Retinoic acid is a negative regulator for the differentiation of cord blood - derived human mast cell progenitors. *Blood* 2000; 95: 2821-8.
26. Hafen E, Stocker H. How are the sizes of cells, organs, and bodies controlled? *PLoS Biology* 2003; 1: E86.
27. Rupes I. Checking cell size in yeast. *Trends Genet* 2002; 18: 479-85.
28. Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, Palis J. Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood* 2004; 104:19- 25.

Original Article

Effects of All-trans Retinoic Acid on The Pancreas Development in Rat Embryo

Yousefi B¹, Bromand N², Haghighi S¹

¹Department of Anatomy, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, ²Islamic Azad University, Dameghan Branch, Damghan, I.R.Iran

E-mail: behpour.y9@gmail.com

Received: 03/05/2009, Accepted: 13/06/2009

Abstract

Introduction: Recent data shows that retinoic acid (RA) signaling is required for early pancreatic development in animals, whereas the effects of exogenous All-trans Retinoic Acid (ATRA) on gestation day (GD) 10 in later development have not been well documented. **Materials and Methods:** In this experimental interventional study, female rats, were randomly divided into two groups (experimental and control, n=5 each). Animals in the experimental group received single dose (100 mg /kg) of ATRA orally on GD 10 and fetuses were observed on GD 18. The fetus pancreas (from both the experimental and control groups; each n=24) were processed for staining and followed by measuring the accumulation of pancreatic acinus and pancreatic ductile associated with the islets of langerhans. In addition, the mean diameter of pancreatic acinus, acinar cells and related nucleus were measured. Statistical analysis was done by student t-test, P value<0.05 being considered significant. **Results:** In the experimental embryos on GD 18, the mean accumulation of pancreatic acinus (23.5%), and pancreatic ductile, associated with the islets of langerhans (76%) per field were increased. There was a significant difference in accumulation of pancreatic acinus (P< 0.0001) and pancreatic ductile, associated with the islets of langerhans (P< 0.0001), between the groups in this regard. The mean diameter of pancreatic acinus and the related nucleus were compared in the two groups, and results showed significant (P< 0.0001) decrease of this parameter in the experimental group. **Conclusion:** Results suggest that ATRA may have positive effects on proliferation, differentiation and maturation of pancreatic acinus and pancreatic ductile associated with the islets of langerhans.

Keywords: Pancreas, All-trans retinoic acid, Islets of langerhans, Embryo