مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و ششم، شماره پنج، مرداد ۱۳۹۷
تاریخ دریافت:۱۳۹۷/۲/۱
تاریخ پذیرش:۱۳۹۷/۴/۲

# مطالعه آزمایشگاهی اثر تیمار هم زمان بیسفنولA و ویتامینC بر توانایی زیستی و تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت بالغ

ملک سلیمانی مهرنجانی*[۱]، فاطمه دربندی[۲]، آتناسادات عظیمی[۳]

**مقاله پژوهشی**

**مقدمه:** بیسفنول A از طریق تولید رادیکال‌های آزاد، مورفولوژی، توانایی زیستی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت (rMSCs) به استئوبلاست را مختل می کند. ویتامین C یک آنتی اکسیدانت قوی است و از سلول ها در مقابل استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر تیمار هم زمان بیسفنولA و ویتامینC به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت بر توانایی زیستی و تمایز استئوژنیک rMSCs بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی rMSCs به چهار گروه کنترل، بیسفنولA (۲۰۰نانومولار)، بیسفنولA (۲۰۰نانومولار)+ ویتامینC (۳۰۰میکرومولار) و ویتامینC (۳۰۰میکرومولار) تقسیم شد و برای مدت ۲۱ روز، در محیط کشت استئوژنیک، تیمار شد. سپس توانایی زیستی، تمایز استئوژنیک، تغییرات مورفولوژیک و شکستگی DNA در سلول‌های گروه‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها با روش آنالیز آماری واریانس یک‌طرفه و تست Tukey تجزیه و تحلیل و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**نتایج:** کاهش معنی‌داری در توانایی زیستی سلولها، میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی، فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز و غلظت کلسیم داخل سلولی ($P< 0/001$) و هم چنین افزایش قابل‌توجهی در شکستگی DNA، در سلول‌های گروه بیسفنولA نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. پارامترهای فوق، در گروه بیسفنولA + ویتامینC نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری نداشت ($p> 0/05$).

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ویتامین C قادر است اثرات نامطلوب بیسفنولA را بر توانایی زیستی و تمایز استئوژنیک rMSCs جبران کند.

**واژه‌های کلیدی:** بیسفنولA، ویتامینC، سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت، تمایز استئوژنیک

**ارجاع:** سلیمانی مهرنجانی ملک، دربندی فاطمه، عظیمی آتناسادات. **مطالعه آزمایشگاهی اثر تیمار هم زمان بیسفنولA و ویتامینC بر توانایی زیستی و تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت بالغ**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۵): ۶۲-۴۵۰

۱- استاد، دکترای بافت و جنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
۲- کارشناس ارشد زیست شناسی جانوری، سلولی-تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، ایران
۳- دانشجو دکتری زیست شناسی جانوری، سلولی-تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، ایران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۸۱۶۱۷۰۹۸، پست الکترونیکی: m-soleimani@araku.ac.ir، کد پستی : ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-24 ]

## مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نوعی سلول غیرخونساز ساکن در مغز استخوان و برخی از دیگر بافت‌های بدن، مانند بافت چربی هستند که مورفولوژی شبه فیبروبلاستی دارند. این سلول‌ها با داشتن توانایی خود نوزایی، می‌توانند به رده‌های سلولی استئوبلاستیک، آدیپوژنیک و کندروژنیک تمایز یابند. تمایز جهت‌دار سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان به استئوبلاست، برای استفاده از آن‌ها در توسعه درمان‌های جدید بسیار حیاتی می‌باشد و نقش مهمی را در بازسازی بافت استخوان صدمه دیده ایفا می‌کند (۱).

در جوامع صنعتی کنونی، انسان همواره در معرض گروه بزرگی از ترکیبات شیمیایی قرار دارد که مخرب اندوکرینی بوده و باعث اختلال در عملکرد غدد درون ریز می‌شوند (۲). بیسفنول A (BPA) یکی از فراوان‌ترین مخرب‌های اندوکرینی است که در ساخت محصولات رزین اپوکسی و پلاستیک های پلی کربنات از جمله بطری های آب، شیشه بچه، ظرف نگهداری غذا، کاغذ حرارتی، دستگاه های پزشکی، بطری های پلاستیکی قابل بازیافت، پوشش داخلی قوطی های مواد غذایی و آشامیدنی (۳)، مواد دندان سازی (۴)، ساخت Digital Video Disc (DVD) و اسباب‌بازی‌های کودکان (۵) کاربرد دارد. بیسفنولA در دما و PH خاص، از این محصولات آزاد و وارد آب، غذا، هوا و پوست، بزاق و خون جانداران می شود. انسان نیز روزانه از طریق مصرف غذا و آشامیدنی‌های آلوده به بیسفنول A و هم چنین آلودگی های صنعتی در معرض این آلاینده زیست محیطی قرار می گیرد (۳). طبق مطالعات صورت گرفته توسط محققین دیگر بیسفنول A از طریق افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش ترکیبات سیستم آنتی‌اکسیدانتی بدن باعث القای استرس اکسیداتیو و کاهش توانایی زیستی و تمایز و افزایش مرگ سلولی آپوپتوزی می شود (۶)

از سوی دیگر آنتی اکسیدانت‌ها ترکیباتی هستند که با شرکت در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلول، رادیکال‌های آزاد را غیرفعال و از واکنش های شیمیایی آن ها جلوگیری می‌کنند (۷). ویتامینC (اسید آسکوربیک)، یک آنتی اکسیدانت قوی محلول در آب می‌باشد که در غلظت‌های فیزیولوژیکی، از سلول‌ها در مقابل آسیب‌های سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (۸). این ویتامین با از دست دادن یک الکترون به طور قابل برگشت اکسیده شده و این مکانیسم در تعدادی از عملکرد های محافظتی سلول تحت شرایط فیزیولوژیکی از جمله ممانعت از آسیب DNA ناشی از اکسیداسیون و محافظت از لیپیدها در مقابل آسیب ناشی از اکسیداتیو ظاهر می‌شود (۸،۹).

اگرچه اثر سیتوتوکسیسیتی بیسفنولA و هم چنین اثر آنتی اکسیدانتی ویتامینC بر توانایی زیستی، تمایز استئوژنیک و آپوپتوزیس سلول‌های مختلفی از جمله سلول‌های بنیادی عصبی مورد بررسی قرار گرفته است (۱۰،۱۱)، ولی با وجود اهمیت بسیار زیاد سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان و توانایی آن‌ها در تمایز به سلول‌های استخوانی و ترمیم ضایعات استخوانی، تاکنون اثر هم زمان بیسفنولA و ویتامینC بر تمایز استئوژنیک این سلول‌ها گزارش نشده است.

بنابراین با توجه به صنعتی شدن جوامع و کاربرد گسترده بیسفنولA در صنعت و زنجیره غذایی و تهدید سلامت انسان و هم چنین پتانسیل بالای سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان در تمایز به رده‌های مختلف سلولی و کاربرد آن ها در پزشکی، برآن شدیم تا اثر ویتامین C را به عنوان یک آنتی اکسیدانت در جلوگیری از اثرات نامطلوب بیسفنولA بر توانایی زیستی و تمایز استئوژنیک سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ مورد بررسی و مطالعه قرار دهیم.

## روش بررسی

### جداسازی و کشت سلول‌های مغز استخوان

در این مطالعه تجربی از رت‌های نر نژاد Wistar با سن تقریبی ۵۰ روز استفاده شد. حیوان مورد نظر از موسسه رازی تهیه و در خانه حیوانات دانشگاه اراک تحت شرایط استاندارد نور (۱۲ساعت روشنائی، ۱۲ ساعت تاریکی)، دما (۳±۲۷درجه سانتی گراد) و تغذیه (پلت و آب)، نگهداری شد.

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-24 ]

رت ها با دی اتیل اتر بیهوش شده و استخوان های ران و ساق پای آن ها جدا و پس از پاکسازی بافت‌های پیوندی متصل به استخوان، به لوله فالکون حاوی پنج میلی لیتر محیط کشت (Germany, Gibco, Dulbecco`s Modified Eagles DMEM (Medium منتقل و سپس مغز استخوان طی عمل Flashout خارج و به داخل لوله فالکون حاوی محیط کشت کامل (۱۵٪ DMEM+ FBS) انتقال داده شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی خارج و بعد از اضافه کردن یک میلی لیتر محیط کشت تازه به رسوب سلولی، عمل پیپتاژ انجام شد. محیط کشت حاوی سلول، به فلاسک های کشت T25 منتقل و فلاسک ها در انکوباتور با شرایط $CO_2$ ۵٪، رطوبت ۸۸٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. محیط کشت سلول‌ها هر ۳ روز یک بار تعویض شد و هنگامی که تراکم سلول‌ها در کف فلاسک بیش از ۸۰ درصد شد، سلول‌ها طی عمل پاساژ و با کمک Trypsin/EDTA ۲۵ درصد از کف فلاسک جدا و به فلاسک های جدید منتقل شد. برای به دست آمدن خلوص ۹۵-۹۰ درصد، حداقل تا ۳ مرحله پاساژ تکرار گردید.

اثبات مزانشیم بودن سلول های استخراج شده از مغز استخوان: از بررسی تمایز استئوژنیک و آدیپوژنیک سلول‌ها و چگونگی بیان مارکرهای سطحی در سلول های استخراج شده از مغز استخوان رت بالغ، پس از طی سه پاساژ متوالی، جهت اثبات مزانشیم بودن سلول ها استفاده شد. سلول های پاساژ سوم به منظور بررسی تمایز، در دو پلیت کشت داده شد و پس از پر شدن کف پلیت، محیط کشت خارج گردید. به یک پلیت محیط تمایزی استئوژنیک (محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم گاوی، ۱۰ میلی مولار بتاگلیسرول فسفات، ۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آسکوربیک ۳-فسفات) و به پلیت دیگر محیط تمایزی آدیپوژنیک (محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم گاوی، ۱ میکرومولار دگزامتازون، ۰/۲ میلی مولار ایندومتاسین و ۰/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر انسولین) اضافه شد و محیط کشت سلول ها هر ۳ روز یک بار تعویض شد. بعد از ۲۱ روز تمایز استئوژنیک توسط رنگ آمیزی آلیزارین رد و تمایز آدیپوژنیک توسط رنگ آمیزی اویل رد ارزیابی شد. هم چنین به منظور بررسی سطح بیان مارکرهای سطحی سلول های استخراج شده پس از پاساژ سوم، بعد از تریپسینه شدن و سانتریفیوژ کردن، سلول ها به اپندورف منتقل و پس از شستشو با PBS به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. در ادامه رنگ آمیزی سلول ها با آنتی بادی های کونژوگه با PE,CD90,CD105,CD34,CD45(abcam,USA), CD73(Biolegend,USA) به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال صورت گرفت. سپس میزان بیان مارکرهای مورد نظر با استفاده از فلوسایتومتری (FACSCalibur) و نرم افزار FlowJo (ver 7.6.1) آنالیز شد.

کشت سلول‌ها در دوز های مختلف بیسفنول**A** و ویتامین**C** و بررسی توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی: تعداد $۱\times۱۰^{۴}$ سلول پاساژ سوم در هر خانه‌ی پلیت ۲۴ خانه‌ایی کشت و پس از گذشت یک روز، سلول‌ها در گروه های کنترل، ۲۰۰ و ۲۵۰ نانومولار بیسفنولA (Sigma-Aldrich) ، ۲۰۰ نانومولار بیسفنولA + ویتامینC ( ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ و ۴۰۰ میکرومولار) و ۲۵۰ نانومولار بیسفنولA + ویتامینC ( ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ و ۴۰۰ میکرومولار) در حضور محیط تمایزی استئوژنیک به مدت ۲۱ روز تیمار داده شد. در پایان دوره تیمار توانایی زیستی سلول‌ها توسط تست رنگ سنجی MTT ارزیابی شد، به این صورت که DMEM فاقد سرم و محلول MTT و دی متیل سولفوکسید (DMSO) (Sigma-Aldrich) به هر ویال اضافه و میزان جذب محلول توسط دستگاه SCO diagnostic, ELAISA-reader (Germany) در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری و تعداد سلول‌های زنده در هر گروه توسط منحنی استاندارد MTT مشخص شد.

میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی نیز توسط رنگ آمیزی آلیزارین رد بررسی گردید، به این صورت که سلول‌ها پس از فیکس شدن با فرمالدئید (به مدت ۱۵ دقیقه)، در معرض رنگ آلیزارین رد قرار گرفته و پس از شستشو با آب مقطر و اضافه کردن اسیداستیک به هر ویال، محلول رویی به

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-24 ]

اپندورف منتقل و Mineral oil به آن اضافه شد و اپندورف ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد و پس از آن به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت، سانتریفیوژ با دور ۱۶۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت و پس از استخراج Mineral oil، به محلول درون اپندورف ها، هیدروکسید آمونیوم اضافه و جذب محلول به دست آمده توسط دستگاه ELAISA-reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر ثبت شد.

**انتخاب دوز مؤثر**

با توجه به نتایج به دست آمده از تست MTT و آلیزارین رد، دوز ۲۰۰ نانومولار به عنوان دوز مؤثر بیسفنولA، انتخاب و از طرفی با توجه به این که در دوز ۲۰۰ نانومولار بیسفنولA + ۳۰۰ میکرومولار ویتامینC، ویتامین توانست توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی را تا حد گروه کنترل بهبود دهد، دوز ۳۰۰ میکرومولار ویتامینC نیز به عنوان دوز مؤثر ویتامین، انتخاب گردید و مطالعه با ۴ گروه شامل کنترل، ۲۰۰ نانومولار بیسفنولA، ۲۰۰ نانومولار بیسفنولA + ۳۰۰ میکرومولار ویتامینC و ۳۰۰ میکرومولار ویتامینC ادامه یافت.

بررسی میزان کلسیم داخل سلولی و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: در این پژوهش برای اندازه گیری میزان کلسیم از کیت کلسیم (ایران-شرکت درمان کاو) استفاده و مراحل زیر انجام شد: سلول‌های پاساژ سوم به تعداد $۱\times۱۰^{۴}$ در هر خانه‌پلیت ۲۴ خانه ایی کشت و تیمار سلول‌ها در محیط استئوژنیک انجام شد.

پس از ۲۱ روز سلول‌ها به واسطه‌ی شستشو با $PBS^{-}$ از کف پلیت جدا شده و به اپندورف منتقل گردید و در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت به تعداد نمونه ها و هم چنین نمونه شاهد، ویال محلول بافر انتخاب و به همه ویال ها ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا و به ویال استاندارد علاوه بر محلول رنگزا، ۱۰ میکرولیتر محلول استاندارد کلسیم و به همه ویال ها به جز ویال شاهد، ۳۰ میکرولیتر نمونه سلولی اضافه شد. سپس جذب ویال ها در مقابل ویال شاهد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۵ نانومتر قرائت و غلظت کلسیم گروه های مذکور محاسبه گردید.

جهت بررسی میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز از کیت (ایران-شرکت پارس آزمون) استفاده شد. سلول‌های پاساژ سوم به تعداد $۱\times۱۰^{۴}$ در هر خانه پلیت ۲۴ خانه ایی کشت و تیمار سلول‌ها در گرو های مذکور، انجام شد. پس از ۲۱ روز کشت سلول‌ها در محیط استئوژنیک، ابتدا شستشوی سلولها با $PBS^{-}$ انجام شد و سپس سلول ها از کف فلاسک جدا و به اپندورف منتقل و فریز شدند. به هر لوله آزمایش، ۵۰۰ میکرولیتر محلول بافر- سوبسترا و حجم مشخصی از نمونه و سود ۰/۰۲ نرمال، اضافه شد و سپس جذب گروه های مذکور، در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت و با استفاده از منحنی استاندارد، فعالیت آنزیم محاسبه شد. بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول‌های تمایز یافته: ۲۱ روز پس از تیمار سلول‌ها در محیط استئوژنیک، تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها با استفاده از رنگ های فلورسنت هوخست، پروپیدیوم آیوداید و آکریدین اورنژ بررسی شد. سلول‌ها بعد از رنگ آمیزی، دو بار با $PBS^{-}$ شسته شد و عکس برداری توسط میکروسکوپ فلورسنس صورت گرفت. قطر هسته سلول‌های تمایز یافته نیز توسط نرم افزار تصویری موتیک اندازه گیری شد (۱۲).

**آزمون کامت**

برای انجام این تست مخلوط سوسپانسیون سلولی ۴ گروه مذکور بر روی لام های پوشیده شده توسط آگارز گذاشته شد و پس از لامل گذاری، لام ها به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از برداشتن لامل ها، لام ها به مدت ۲ ساعت در بافر لیز کننده حاوی Tris base (۱۰ میلی مولار)، NaSLS (۱ درصد)، EDTA (۰.۱۵ مولار) و NaCl (۲.۵ مولار) با pH=10 قرار داده شد. سپس لام ها به مدت ۴ دقیقه در بافر الکتروفورز حاوی NaOH 300 mM, EDTA 1mM با PH=13 انکوبه شده و الکتروفورز ۲ ولت به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. سپس لام ها با استفاده از محلول خنثی ساز حاوی Tris base 0.4 mM که PH آن با HCL به ۷/۵ رسیده بود، شستشو داده شد و

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-24 ]

در نهایت به مدت ۵ دقیقه در اتانل قرار گرفته و پس از خشک شدن در معرض هوا و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، عکس برداری با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس صورت گرفت (۱۳).

**تجزیه و تحلیل آماری**

داده های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0 و روش آماری ANOVA One-Way و تست tukey تجزیه و تحلیل و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

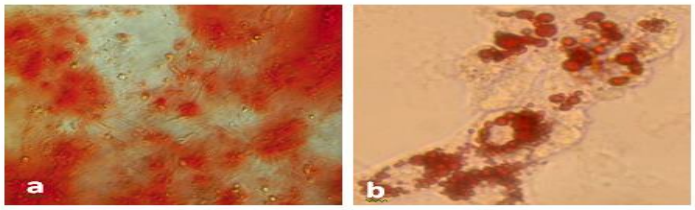
**ملاحظات اخلاقی**

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه اراک تایید شده است و کلیه نکات اخلاقی و اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است.

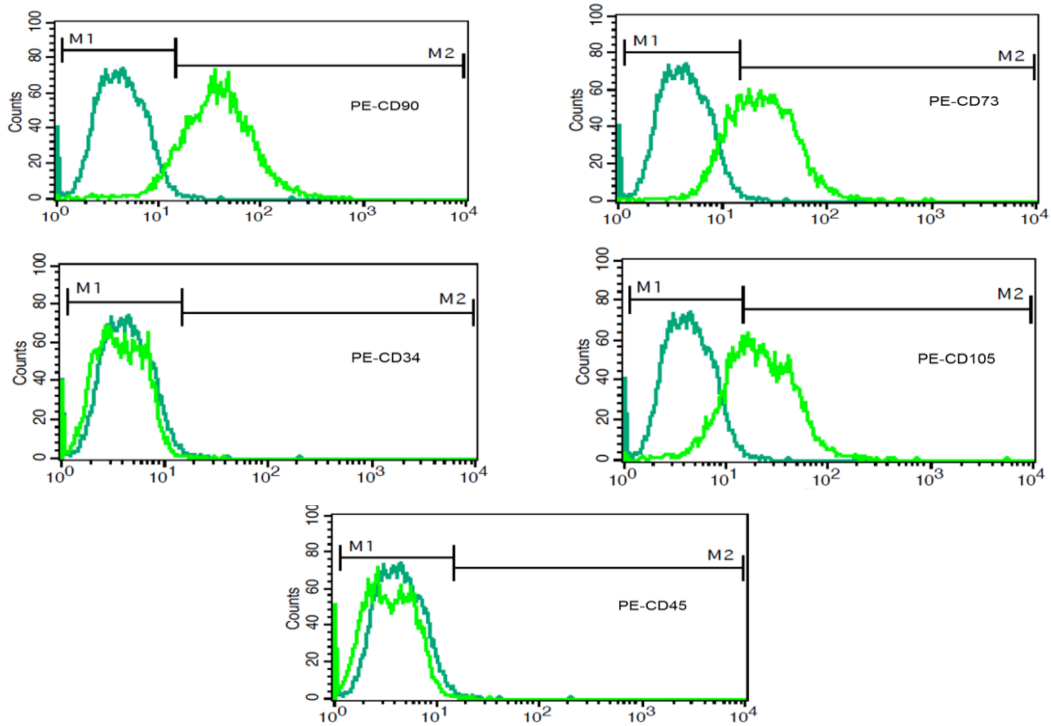
## نتایج

**اثبات ماهیت مزانشیمی بودن سلول های استخراج شده**

نتایج حاصل از آزمایشات رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد و اویل‌رد نشان داد که سلول‌های استخراج شده از مغز استخوان رت بالغ، پس از قرارگیری در معرض محیط استئوژنیک و آدیپوژنیک به مدت ۲۱ روز، به استئوبلاست و آدیپوسیت تمایز یافته بودند (شکل ۱). همچنین نتایج حاصل از بررسی میزان بیان مارکرهای سطحی در سلول‌های استخراج شده نشان داد که سلولهای استخراج شده از مغز استخوان رت بالغ، مارکرهای CD90, CD105,CD73 را بیان کرده و مارکرهای CD45 و CD34 را بیان نکرده‌اند. (شکل۲). این نتایج مبین مزانشیمی بودن سلول‌های استخراج شده از مغز استخوان در این پژوهش می باشد.




شکل۱: a: رنگ آمیزی آلیزارین رد سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ پس از دوره ی ۲۱ روزه ی تمایز استئوژنیک (بزرگنمایی **X۴۰۰**).
b: رنگ آمیزی اویل رد سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ پس از تمایز به چربی.




شکل۲: بررسی نتایج فلوسیتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت با مارکرهای CD90, CD105,CD73، CD45 **و** CD34. سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت بالغ مارکرهای CD90, CD105,CD73 را بیان کرده و مارکرهای CD45 **و** CD34 را بیان نکرده اند

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-24 ]

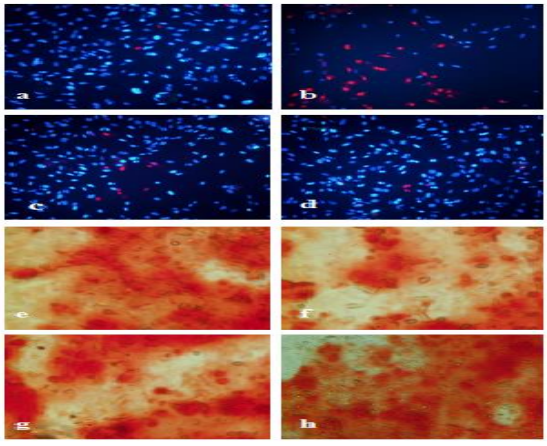
**بررسی توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی و انتخاب دوز مؤثر**

از مقایسه نتایج حاصل از بررسی توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان تیمار شده با دوزهای مختلف بیسفنولA و ویتامینC، مشخص شد که دوز ۲۰۰ نانومولار بیسفنولA موجب کاهش معنی‌دار توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی نسبت به گروه کنترل گردید (P< 0/001). دوز ۳۰۰ میکرومولار ویتامینC در تیمار هم زمان با ۲۰۰ نانومولار بیسفنولA توانست این کاهش‌ها را جبران کرده و به سطح گروه کنترل برساند (P< 0/001). (جدول ۱و شکل ۳).

بنابراین با توجه به نتایج حاصل از بررسی توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی، دوز ۲۰۰ نانومولار بیسفنولA و ۳۰۰ میکرومولار ویتامینC، در مدت ۲۱ روز، به عنوان دوزهای موثر انتخاب گردید و مطالعه با چهار گروه; کنترل، تیمار با ۲۰۰ نانومولار بیسفنولA، ۲۰۰ نانومولار بیسفنولA + ۳۰۰ میکرومولار ویتامینC و ۳۰۰ میکرومولار ویتامینC ادامه یافت.

جدول۱: مقایسه میانگین توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت ، ۲۱ روز پس از تیمار با دوزهای مختلف بیسفنول A و ویتامین C.

| گروه‌ها | MTT<br>تعداد سلول‌های زنده (۱۰۰۰×) | میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی بر<br>حسب غلظت آلیزارین رد (میلی مولار) |
|---|---|---|
| کنترل | ۱۶۹۸۹ $^{fg}$ ± ۱۸۱/۶۴۳ | ۴۵۱/۶۷ $^{g}$ ± ۱۳/۵۰۳ |
| بیسفنول A (۲۰۰ nM) | ۸۹۴۲/۳ $^{b}$ ± ۲۲۸/۵۰۰ | ۲۰۸/۳۳ $^{b}$ ± ۱۰/۴۰۸ |
| بیسفنول A (۲۵۰ nM) | ۷۴۹۳ $^{a}$ ± ۳۲۳/۹۵۰ | ۱۵۲/۳۳ $^{a}$ ± ۱۷/۵۰۲ |
| بیسفنول A (۲۰۰ nM) + ویتامین C (۲۰۰ µM) | ۱۳۶۲۴ $^{d}$ ± ۱۰۹/۲۰۷ | ۳۱۹/۶۷ $^{d}$ ± ۱۱/۵۰۳ |
| بیسفنول A (۲۰۰ nM) + ویتامین C (۲۵۰ µM) | ۱۵۵۹۸ $^{e}$ ± ۵۲۱/۰۸۷ | ۳۸۱/۶۷ $^{f}$ ± ۱۲/۵۸۳ |
| بیسفنول A (۲۰۰ nM) + ویتامین C (۳۰۰ µM) | ۱۶۸۵۲ $^{fg}$ ± ۴۹/۱۶۶ | ۴۶۰/۳۳ $^{g}$ ± ۶/۰۲۷ |
| بیسفنول A (۲۰۰ nM) + ویتامین C (۳۵۰ µM) | ۱۷۳۴۱ $^{g}$ ± ۶۳/۹۷۶ | ۵۰۷/۳۳ $^{h}$ ± ۷/۵۰۵ |
| بیسفنول A (۲۰۰ nM) + ویتامین C (۴۰۰ µM) | ۱۸۵۰۲ $^{h}$ ± ۴۵/۳۶۸ | ۶۰۴/۰۰ $^{i}$ ± ۱۵/۰۹۹ |
| بیسفنول A (۲۵۰ nM)+ ویتامین C (۲۰۰ µM) | ۱۲۲۵۸ $^{c}$ ± ۳۴۲/۷۰۲ | ۲۷۴/۳۳ $^{c}$ ± ۱۳/۵۷۶ |
| بیسفنول A (۲۵۰ nM)+ ویتامین C (۲۵۰ µM) | ۱۴۱۰۵ $^{e}$ ± ۱۹۲/۹۲۲ | ۳۴۴/۵۰ $^{de}$ ± ۱۲/۰۱۰ |
| بیسفنول A (۲۵۰ nM)+ ویتامین C (۳۰۰ µM) | ۱۶۳۵۲ $^{f}$ ± ۲۳۰/۳۵۲ | ۳۷۱/۳۳ $^{ef}$ ± ۱۰/۰۱۶ |
| بیسفنول A (۲۵۰ nM)+ ویتامین C (۳۵۰ µM) | ۱۶۸۵۸ $^{fg}$ ± ۱۲۷/۰۵۲ | ۴۵۸/۰۰ $^{g}$ ± ۲/۶۴۵ |
| بیسفنول A (۲۵۰ nM)+ ویتامین C (۴۰۰ µM) | ۱۸۱۵۱ $^{h}$ ± ۶۷/۱۴۴ | ۶۰۰/۰۰ $^{i}$ ± ۱۵/۰۰ |




شکل۳: رنگ آمیزی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با رنگ‌های فلورسنت پروپیدیوم آیوداید و هوخست (a-d) (بزرگنمایی ۲۰۰X)، هسته های صورتی رنگ سلول های مرده را نشان می دهد.



[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-24 ]

مقادیر به صورت Means±SD است و میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت در دو ستون دارای تفاوت معنی دار نسبت به یکدیگر می‌باشد (One-way ANOVA, tukey's test P<0/001)

رنگ آمیزی آلیزارین رد (e-h) (بزرگنمایی ۴۰۰X)، ۲۱ روز پس از تیمار با بیسفنول A (۲۰۰ نانومولار) و ویتامین C (۳۰۰ میکرومولار) در محیط استئوژنیک. (a و e) گروه کنترل. (b و f) گروه بیسفنولA . (c و g) گروه بیسفنول A + ویتامینC. (d و h) گروه ویتامین**C** .

**بررسی میزان کلسیم داخل سلولی و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز**

کاهش معنی‌داری در میانگین سطح کلسیم داخل سلولی و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروه بیسفنولA (۲۰۰ نانومولار)، نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P<0/001). افزایش معنی‌داری در میانگین سطح پارامترهای یاد شده در گروه بیسفنول A (۲۰۰ نانومولار) + ویتامین C (۳۰۰ میکرومولار) در حد گروه کنترل مشاهده شد. افزایش معنی داری نیز در سطح پارامترهای مذکور در گروه ویتامینC (۳۰۰ میکرومولار)، نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P<0/001). (جدول ۲).

**بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها**

میانگین قطر هسته سلول‌های گروه بیسفنولA نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار (P<0/001) و در گروه ویتامینC، افزایش معنی‌داری ( P<0/001) را نشان داد. اما تغییر معنی‌داری در میانگین قطر هسته سلول‌های گروه بیسفنولA + ویتامینC نسبت به گروه کنترل، مشاهده نشد ( p>0/05) (جدول ۲).

جدول ۲ : مقایسه اثر تیمار هم زمان بیسفنولA و ویتامینC بر میانگین مقدار کلسیم داخل سلولی، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و قطر هسته در گروه های مختلف سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ تیمار شده با بیسفنولA و ویتامینC به مدت ۲۱ روز در محیط استئوژنیک.

| گروه‌ها | میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتازU/L | میزان کلسیم ( mg/dl ) | میانگین قطر هسته سلول‌های تمایز یافته به استئوبلاست(میکرومتر) |
|---|---|---|---|
| کنترل | ۶۵/۶۶ $^{b}$ ± ۲/۰۸۱ | ۴۱/۳۳ $^{b}$ ± ۱/۵۲۷ | ۱۶/۶۴ $^{b}$ ± ۱/۸۹۱ |
| بیسفنولA (۲۰۰nM) | ۳۳ $^{a}$ ± ۱/۷۳۲ | ۲۲/۶۶ $^{a}$ ± ۲/۰۸۱ | ۱۲/۳۹ $^{a}$ ± ۱/۳۴۷ |
| بیسفنولA (۲۰۰nM) + ویتامینC (۳۰۰ µM) | ۶۸/۶۶ $^{b}$ ± ۲/۵۱۶ | ۴۴/۳۳ $^{b}$ ± ۱/۵۲۷ | ۱۷/۱۷ $^{b}$ ± ۲/۲۰۳ |
| ویتامینC (۳۰۰ µM) | ۹۳/۳۳ $^{c}$ ± ۳/۵۱۱ | ۵۸ $^{c}$ ± ۲/۰۰۰ | ۲۱/۳۰ $^{c}$ ± ۱/۴۹۹ |

مقادیر به صورت means±SD است و میانگین های با کد حرف های متفاوت دارای تفاوت معنی دار می‌باشد. (One-way ANOVA,, tukey's test, P<0/05)

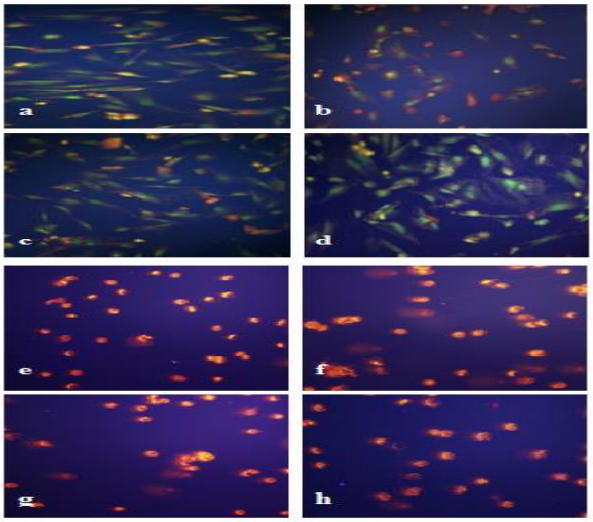
در رنگ آمیزی آکریدین اورانژ در گروه کنترل هسته نسبت به سیتوپلاسم در مرکز قرار داشته و سیتوپلاسم دارای زوائد سلولی قابل تشخیص و چند وجهی بود. در گروه بیسفنولA مقدار سیتوپلاسم تغییر یافته و چروکیده شد، شکل سلول ها به صورت گرد تغییر شکل داد، به ندرت زوائد سیتوپلاسمی کمی در آن ها مشاهده شد و موقعیت هسته نسبت به سیتوپلاسم نامنظم شد، در حالی که در گروه بیسفنولA + ویتامینC تغییرات مورفولوژیکی قابل توجهی نسبت به کنترل مشاهده نشد. علاوه بر این در گروه ویتامینC هسته سلول ها بسیار منظم و در مرکز سیتوپلاسم قرار داشت و سیتوپلاسم سلول ها نیز گسترده‌تر و زوائد سلولی آن ها بزرگتر شد (شکل ۴).

**آزمون کامت**

نتایج حاصل از آزمون کامت نشان داد که در گروه کنترل، هسته سلول‌ها فاقد دنباله بود و این نشان دهنده عدم شکستگی DNA است. تعداد سلول‌های دنباله دار در گروه بیسفنول A نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که نشانه شکستگی DNA در تعداد بیشتری از سلول های این گروه بود. در حالی که در گروه بیسفنولA + ویتامینC تعداد سلول‌های

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-24 ]

دنباله دار نسبت به گروه بیسفنولA کاهش یافت و در گروه ویتامینC نیز تعداد سلول‌های دنباله دار نسبت به گروه کنترل کاهش یافت که نشان دهنده اثر مهاری ویتامینC بر آسیب و شکستگی DNA در این گروه سلولی بود (شکل ۴).




شکل۴: رنگ آمیزی فلورسنت آکریدین اورانژ (a-d) و تست کامت (e-h) در سلول‌های بنیادی مزانشیم پس از دوره ی ۲۱ روزه تیمار با بیسفنول A (۲۰۰ نانومولار) و ویتامین C (۳۰۰ میکرومولار) در محیط استئوژنیک.(a و e) گروه کنترل. (b و f) گروه بیسفنولA . (c و g) گروه بیسفنول A + ویتامینC . (d و h) گروه ویتامینC .

## بحث

در مطالعه حاضر بیسفنولA موجب کاهش توانایی زیستی و افزایش میزان آسیب و شکستگی DNA در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ شد که این یافته‌ها در راستای نتایج حاصل از مطالعه Suzuki و Ishido در سال ۲۰۱۰ بر روی سلول‌های بنیادی عصبی می‌باشد (۱۴). بیسفنولA با اثر بر توبولین، سازماندهی رشته های دوک را در سلول تخریب می‌کند و با اعمال اثر مهاری بر تشکیل دوک متافازی، مانع تقسیم سلولی در سلول‌ها می‌شود (۱۵). این آلاینده زیست محیطی با اثر بر مسیر سیگنالی MAPK ( Mitogen-activated Protein Kinase)، افزایش فسفوریلاسیون JNK( c-Jun N- terminal Kinase) (۱۶)، افزایش بیان پروتئین های مرتبط با آسیب DNA یعنی P53 ، P-chk2، ATM و H2AX، افزایش تولید ROS (۶)، مهار آنزیم‌های زنجیره تنفسی، مهار آنتی‌اکسیدازها در سیستم آنتی اکسیدانتی (۱۷)، کاهش پروتئین‌های آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 و PRDX4 (۱۸)، افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax (۱۱)، کاهش پروتئوزوم 26S و افزایش پروتئین C-myc (۱۹) به عنوان یک عامل ایجاد استرس سلولی عمل می‌کند و از طریق پراکسیداسیون لیپیدها و القای استرس اکسیداتیو، باعث افزایش آپوپتوزیس (۱۱) و در نتیجه کاهش توانایی زیستی و ایجاد آسیب و شکستگی DNA در سلول‌های تیمار شده با بیسفنولA می‌شود.

چنان چه دیده شد در گروه بیسفنول A میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی، میزان کلسیم داخل سلولی و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (شاخص های تمایز استئوژنیک) به طور معنی داری کاهش یافت. بیسفنولA از طریق افزایش بیان ژن‌های مهارکننده مسیر سیگنالی Wnt-β-catenin، باعث مهار این مسیر سیگنالی، کاهش انتقال β-catenin به درون هسته (۱۱)، کاهش بیان Runx2 و Osterix (مهم ترین فاکتور های رونویسی استئوژنیک) و کاهش فعالیت مسیر سیگنالی MAPK می‌شود و به این صورت باعث مهار تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان می‌شود (۲۰). علاوه بر این بیسفنولA به عنوان یک ترکیب شبه استروژنی با اشغال کردن جایگاه های مربوط به استروژن بر

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-24 ]

روی گیرنده‌هایش، مانع از ایفای نقش این هورمون در تولید کلسیم و ترشح کلسی‌تونین می‌شود و هم چنین با اثر مهاری بر جریان کلسیم از طریق کانال‌های کلسیمی، باعث کاهش میزان کلسیم داخل سلولی می‌شود. بنابراین از آن جایی که کلسیم نیز برای تشکیل هیدروکسی آپاتیت ضروری است و هیدروکسی آپاتیت بخش معدنی سلول استخوانی را تشکیل می دهد، بیسفنولA با اثر مهاری بر ترشح کلسی‌تونین و کاهش کلسیم داخل سلولی، باعث مهار تمایز استئوژنیک سلول‌ها می‌شود (۲۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ویتامینC اثر مخرب بیسفنولA بر تکثیر و توانایی زیستی و هم چنین میزان آسیب و شکستگی DNA را در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت خنثی می‌کند که این یافته‌ها نیز در راستای نتایج حاصل از مطالعه Guo و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان سگ (۲۲) و هم چنین Urbun و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی سلول‌های استئوبلاست می‌باشد (۲۳). ویتامینC از طریق مهار رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط فرآیندهای بیولوژیکی مختلف استرس اکسیداتیو را کاهش داده و با کاهش بیان C-myc موجب کاهش شکستگی و آسیب DNA می‌شود (۲۴). ویتامین C هم چنین با افزایش فعالیت تلومراز، افزایش بیان ژن‌های hTR و TRF2 (ژن های مهارکننده پیری سلول)، افزایش پتانسیل غشا و افزایش بیان klf4 و Jhdm1a/b (ژن‌های مؤثر در تکثیر سلولی) (۲۵) و تحریک مسیر ERK1/2 (Extracellular signal–regulated kinases) (۲۶) باعث کاهش سرعت پیر شدن سلول‌ها و افزایش قدرت تکثیر و میزان توانایی زیستی آن ها می‌شود.

هم چنین در مطالعه حاضر نشان داده شد که ویتامینC در گروه بیسفنول A + ویتامین C، موجب افزایش معنی دار شاخص های تمایزی استئوژنیک نسبت به گروه بیسفنول A شد. این یافته نیز در راستای نتایج حاصل از مطالعه Ciceri و همکارانش در سال ۲۰۱۱ پیرامون اثر ویتامین C بر تمایز استئوژنیک سلول‌های ماهیچه صاف عروقی بود (۲۷). بر اساس مطالعات صورت گرفته توسط محققین، ویتامینC با افزایش ترجمه mRNA پروکلاژن نوع I و سنتز کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان (۲۸)، باعث فعال کردن مسیر MAPK و به دنبال آن فعال شدن فاکتور رونویسی Cbfa1/Runx2 (۲۹) و افزایش میزان بیان Osterix از طریق تحریک فعالیت آنزیم پرولین هیدروکسیلاز (۳۰) شده و در نتیجه باعث افزایش تمایز استئوژنیک سلول‌ها می‌گردد.

در مطالعه حاضر بیسفنولA موجب تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان گردید که این تغییرات عبارتند از: از دست دادن زوائد سیتوپلاسمی، فشرده و متراکم شدن هسته، کوچک شدن قطر هسته، چروکیدگی و برجسته شدن غشای سلول و خارج شدن هسته از موقعیت مرکزی که با توجه به مطالعات صورت گرفته توسط سایر محققین این تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌ها منطبق با تغییراتی است که در زمان مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس صورت می‌گیرد. بیسفنولA از طریق بیان کاسپاز-۳ فعال، افزایش Bax و کاهش Bcl-2 (۲۵)، افزایش فعالیت TNF-α و P38 MAPK (۳۱)، مهار فاکتور هسته ایی آنتی آپوپتوتیک (NF- kappaB KB) (۳۲) و افزایش مقدار ROS (۳۳) باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌ها می‌شود.

اکتین نیز یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های اسکلت سلولی است که در حفظ مورفولوژی طبیعی سلول نقش مهمی دارد و در حالت طبیعی به شکل یک حلقه اکتینی زیر غشای سیتوپلاسمی قرار دارد. اما بر اثر تیمار با بیسفنولA، حلقه های اکتینی دپلیمریزه شده، به خوبی گسترش نیافته و در نتیجه به صورت یک توده نامنظم در می‌آید. بنابراین با توجه به اینکه پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون پروتئین اکتین، مکانیسم اصلی در کنترل مورفولوژی سلول است این تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های تیمار شده با بیسفنولA صورت می‌گیرد، که به آپوپتوزیس سلول می‌انجامد (۱۳). مطالعه حاضر نشان داد که ویتامینC از این گونه تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها جلوگیری

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-24 ]

می‌کند. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات دیگر محققین نیز مشخص شده است که ویتامینC از طریق مهار تولید ROS، کاهش بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک Bax و P53، افزایش بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 و کاهش آزاد شدن سیتوکرومC از میتوکندری، باعث مهار آپوپتوزیس و در نتیجه کاهش تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها می‌شود (۳۴،۳۵).

## نتیجه گیری

چنان که داده‌های حاصل از این تحقیق نشان داد ویتامینC توانست اثرات نامطلوب بیسفنولA را که موجب کاهش توانایی زیستی و اختلال در تمایز استئوژنیک آن‌ها و هم چنین ایجاد تغییرات نامطلوب در مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ در مسیر تمایز به استئوبلاست شد را جبران نماید. لذا بررسی این نتایج، استفاده از ویتامینC را در موارد مواجه با بیسفنولA پیشنهاد می نماید.

## سپاسگزاری

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک که با پشتیبانی مالی، انجام این پروژه تحقیقاتی در قالب پایان نامه را امکان‌پذیر ساخت

**تعارض در منافع:** تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

## References:

***1***-Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortendach I, Marini FC, et al. ***Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement***. Cytotherapy 2005; 7(5): 393-5.

***2***-Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, et al. ***Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society***. Endocrinology 2012; 153(9): 4097-10.

***3***-Acconcia F, Pallottini V, Marino M***. Molecular Mechanisms of Action of BPA***. Dose-Response 2015; 13(4): 1-9.

***4***-Stahlut RW, Welshon WV, and Swan SH. ***Bisphenol A Data in NHANES Suggest Longer than Expected Half-Life, Substantial Nonfood Exposure, or Both***. Environ Health Perspect 2009; 117(5): 784-89.

***5***-Maffini MV, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. ***Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A.*** Mol Cell Endocrinology 2006; 25: 254-55.

***6***-Xina F, Jiangb L, Liua X, Gengb C, Wangc W, Zhonga L. ***induces oxidative stress-associated DNA damage in INS-1 cells***. Mutation Res 2014; 769: 29-33.

***7***-Punchard NA, Kelly FJ. ***Introduction, In Free radicals, a practical Approach. Illustrated, reprint***. Oxford, United Kingdom: Oxford Uni Press 1996; 1-5.

***8***-Carr A, Frei B. ***Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions***? FASEB J 1999; 13(9): 1007-24.

***9***-Tolbert JB. ***Dehydroascorbic acid in: Ascorbic acid, Chemistry, Metabolism, and Uses***. American Chemical Society, Washington, DC 1983; 101-23.

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-24 ]

10- Ishido M, Suzuki J. ***Quantitative Analyses of Inhibitory Effects of Bisphenol A on Neural Stem Cell Migration Using a Neurosphere Assay in vitro***. J Health Sci 2010; 56(2): 175-81.

11- Tiwari SK, Agarwal S, Seth B, Yadav A, Ray RS, Mishra VN, Chaturvedi RK. ***Inhibitory Effects of Bisphenol-A on Neural Stem Cells Proliferation and Differentiation in the Rat Brain Are Dependent on Wnt/β-Catenin Pathway***. Mol Neurobiol 2015; 52(3): 1735-57.

12- Abnosi MH, Soleimani Mehranjani M, Shariatzadeh MA, Dehdehi L. ***Para-Nonylphenol Impairs Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Influencing the Osteoblast Mineralization***. Iran J Basic Med Sci 2012; 15(6): 1131-39.

13- Soleimani Mehranjani M, Mosavi M. ***Cadmium chloride toxicity suppresses osteogenic potential of rat bone marrow mesenchymal stem cells through reducing cell viability and matrix mineralization***. Indian J Med Res 2011; 65(4): 157-67.

14- Iida H, Maehara K, Doiguchi M, Mori T, Yamada F. ***Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat Sertoli cells***. Reprod Toxicol 2003; 17(4): 457-64.

15- Aidan J. ***The Effects of Bisphenol A on in-vitro Cell Viability of Mammalian Cell Line by Neutral Red Assay***. The Plymouth Student Scientist 2009; 2(1): 25-31.

16- Kim K, Son TG, Kim SJ, Kim HS, Kim TS, Han SY, Lee J. ***Suppressive Effects of Bisphenol A on the Proliferation of Neural Progenitor Cells.*** J Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues 2007; 70(15-16): 1288-95.

17- Dikalov S. ***Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases***. Free Radic Biol Med 2011; 51(7): 1289-1301.

18- Ge LC, Chen ZJ, Liu H, Zhang KS, Su Q, Ma XY, et al. ***Signaling related with biphasic effects of bisphenol A (BPA) on Sertoli cell proliferation: A comparative proteomic analysis***. Biochim et Biophys Acta 2014; 1840(9): 2663–73.

19- Chitra S, Nalini G, Rajasekhar G. ***The ubiquitin proteasome system and efficacy of proteasome inhibitors in diseases.*** Int J Rheum Dis 2012; 15(3): 249–60.

20- Hwang JK, Min KH, Choi KH, Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, et al. ***Bisphenol A reduces differentiation and stimulates apoptosis of osteoclasts and osteoblasts.*** Life Sci 2013; 93(9-11): 367-72.

21- Suzuki N, Kambegawa A, Hattori A. ***Bisphenol A Influences the Plasma Calcium Level and Inhibits Calcitonin Secretion in Goldfish***. Zoolog Soci Japan 2003; 20(6): 745-48.

22- Guo P, Zeng JJ, Zhou N. ***A Novel Experimental Study on the Fabrication and Biological Characteristics of Canine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Sheet Using Vitamin C***. Scanning 2015; 37(1): 42-8.


[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-24 ]

23- Urban K, Höhling HJ, Lüttenberg B, Szuwart T, Plate U. ***An in vitro study of osteoblast vitality influenced by the vitamins C and E. Urban et al***. Head Face Med 2012; 8(25); 1-10.

24- Wei C, Liu X, Tao J, Wu R, Zhang P, Bian Y, et al. ***Effects of vitamin C on characteristics retaining of in vitro-cultured mouse adipose-derived stem cells***. In Vitro Cell Dev Biol Animal 2014; 50(1): 75–86.

25- Kim YY, Ku SY, Huh Y, Liu HC, Kim SH, Choi YM, Moon SY. ***Anti-aging effects of vitamin C on human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes***. AGE (Dordr) 2013; 35(5): 1545–57.

26- Young IS, Woodside JV. ***Antioxidants in health and disease***. J Clin Pathol 2001; 54(3): 176–86.

27- Ciceri P, Volpi E, Brenna I, Arnaboldi L, Neri L, Brancaccio D, et al**. *Combined effects of ascorbic acid and phosphate on rat VSMC osteoblastic differentiation***. Nephrol Dial Transplant 2012; 27: 122–27.

28- Choi KM, Seo YK, Yoon HH, Song KY, Kwon SY, Lee HS, et al. ***Effect of Ascorbic Acid on Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation***. J Biosci Bioeng 2008; 105(6): 586–94.

29- Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E. ***Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation***. Connect Tissue Res 2003; 44(1):109-16.

30- Xing W, Pourteymoor S, Mohan S. ***Ascorbic acid regulates osterix expression in osteoblasts by activation of prolyl hydroxylase and ubiquitination-mediated proteosomal degradation pathway***. Physiol Genomics 2011; 43(12): 749–57.

31- Urriola-Muñoz P, Lagos-Cabré R, Moreno RD. ***A Mechanism of Male Germ Cell Apoptosis Induced by Bisphenol-A and Nonylphenol Involving ADAM17 and p38 MAPK Activation***. PLOS One 2014; 9(12): e113793.

32- Lee YM, Seong MJ, Lee JW, Lee YK, Kim TM, Nam SY, et al. ***Estrogen receptor independent neurotoxic mechanism of bisphenol A, an environmental estrogen***. J Vet Sci 2007; 8(1): 27-38.

33- Terasaka H, Kadoma Y, Sakagami H, Fujisuwa S. ***Cytotoxicity and Apoptosis-inducing Activity of Bisphenol A and Hydroquinone in HL-60 Cells***. Anticancer Res 2005; 25(3B): 2241-47.

34- Li CJ, Sun LY, Pang CY. ***Synergistic Protection of N-Acetylcysteine and Ascorbic Acid 2-Phosphate on Human Mesenchymal Stem cells Against Mitoptosis, Necroptosis and Apoptosis***. Sci Rep-Uk. 2015; 5: 9819.

35-Bakkenist CJ, Kastan MB**. *Initiating cellular stress responses***. Cell 2004; 118(1): 9-17


[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-24 ]

**Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences**
**Vol 26| NO 5 | Aug 2018**
**Received: 21 Apr 2018**
**Accepted: 23 Jun 2018**

# In vitro study on the effect of Bisphenol A and vitamin C co-treatment on the viability and osteogenic differentiation of adult rat bone marrow mesenchymal stem cells

**Malek Soleimani Mehranjani[*1], Fatemeh Darbandi[2], Atena Sadat Azimi[3]**

**Original Article**

**Introdution:** Bisphenol A (BPA) disturbs the morphology, viability and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (rMSCs) to osteoblast via the production of free radicals. Vitamin C (vit-C) is a potent antioxidant and protects cells against oxidative stress. The aim of this study was to investigate the effect of co-treatment of BPA and vitamin C as an antioxidant on the viability and osteogenic differentiation of rMSCs.

**Methods:** In this experimental study, rMSCs were divided into 4 groups; control, BPA (200nM), BPA (200nM) + vit-C (300µM) as well as vit- C (300µM) and treated for 21 days in the osteogenic media. Then, cell viability, osteogenic differentiation, morphological changes and *DNA breakage in different groups of cells were evaluated. Data were* analyzed using one-way ANOVA and Tukey's test and the means were considered significantly different at $P<0.05$.

**Results:** A significant reduction in the cell viability, bone matrix mineralization, alkalin phosphatase activity and intracellular calcium concentration ($P<0.001$) as well as a considerable increase in *DNA breakage* was seen in the BPA group compared to the control. The above parameters were compensated in the BPA + Vit-C group to the control level.

**Conclusion:** The results of this investigation showed that Vit-C can compensate the adverse effects of BPA on the viability and osteogenic differentiation of rMSCs.

**Keywords:** Bisphenol A ,Vitamin C,Rat Bone Marrow,Mesenchymal Stem Cells,Osteogenic Differentiation.

**Citation:** Soleimani Mehranjani M, Darbandi F, Azimi AS. **In vitro study on the effect of Bisphenol A and vitamin C co-treatment on the viability and osteogenic differentiation of adult rat bone marrow mesenchymal stem cells.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2018; 26(5): 450-62

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran
[2]Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran
[3]Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran
***Corresponding author: Tel:** 09181617098, **email:** m-soleimani@araku.ac.ir

[ Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-24 ]