

مطالعه آزمایشگاهی اثر تیمار هم زمان بیسفنول A و ویتامین C بر توانایی زیستی و تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت بالغ

ملک سلیمانی مهربانجانی^{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 می‌کند. ویتامین C یک آنتی‌اکسیدانت قوی است و از سلول‌ها در مقابل استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر تیمار هم زمان بیسفنول A و ویتامین C به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت بر توانایی زیستی و تمایز استئوژنیک rMSCs بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی rMSCs به چهار گروه کنترل، بیسفنول A (۲۰۰ نانومولار)، بیسفنول A (۲۰۰ نانومولار) + ویتامین C (۳۰۰ میکرومولار) و ویتامین C (۳۰۰ میکرومولار) 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 آلکالین فسفاتاز و غلظت کلسیم داخل سلولی ($P < 0/001$) و هم‌چنین افزایش قابل‌توجهی در شکستگی DNA، در سلول‌های گروه بیسفنول A نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. پارامترهای فوق، در گروه بیسفنول A + ویتامین C نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$). نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ویتامین C قادر است اثرات نامطلوب بیسفنول A را بر توانایی زیستی و تمایز استئوژنیک rMSCs جبران کند.

واژه‌های کلیدی: بیسفنول A، ویتامین C، سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت، تمایز استئوژنیک

ارجاع: سلیمانی مهربانجانی ملک، دربندی فاطمه، عظیمی آتناسادات. مطالعه آزمایشگاهی اثر تیمار هم زمان بیسفنول A و ویتامین C 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): ۴۵-۶۲

۱- استاد، دکترای بافت و جنین‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۲- کارشناس ارشد زیست‌شناسی جانوری، سلولی-تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۳- دانشجو دکتری زیست‌شناسی جانوری، سلولی-تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۸۱۶۱۷۰۹۸، پست الکترونیکی: m-soleimani@araku.ac.ir، کد پستی: ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

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 عملکردهای 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 سیتوتوکسیسیته بیسفنول A و هم‌چنین اثر آنتی اکسیدانتی ویتامین C 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 هم‌زمان بیسفنول A و ویتامین C بر تمایز استئوژنیک این سلول‌ها گزارش نشده است.

بنابراین با توجه به صنعتی شدن جوامع و کاربرد گسترده بیسفنول A در صنعت و زنجیره غذایی و تهدید سلامت انسان و هم‌چنین پتانسیل بالای سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان در تمایز به رده‌های مختلف سلولی و کاربرد آن‌ها در پزشکی، برآن شدیم تا اثر ویتامین C را به عنوان یک آنتی اکسیدانت در جلوگیری از اثرات نامطلوب بیسفنول A بر توانایی زیستی و تمایز استئوژنیک سلول‌های 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 (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)، دما 27 ± 3 درجه سانتی‌گراد) و تغذیه (پلت و آب)، نگهداری شد.

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 خودنوزایی، 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 درون‌ریز می‌شوند (۲). بیسفنول A (BPA) یکی از فراوان‌ترین مخرب‌های اندوکرینی است که در ساخت محصولات رزین اپوکسی و پلاستیک‌های پلی‌کربنات از جمله بطری‌های آب، شیشه بچه، ظرف نگهداری غذا، کاغذ حرارتی، دستگاه‌های پزشکی، بطری‌های پلاستیکی قابل بازیافت، پوشش داخلی قوطی‌های مواد غذایی و آشامیدنی (۳)، مواد دندان‌سازی (۴)، ساخت Digital Video Disc (DVD) و اسباب‌بازی‌های کودکان (۵) کاربرد دارد. بیسفنول A در دما و PH خاص، از این محصولات آزاد و وارد آب، غذا، هوا و پوست، بزاق و خون جانداران می‌شود. انسان نیز روزانه از طریق مصرف غذا و آشامیدنی‌های آلوده به بیسفنول A و هم‌چنین آلودگی‌های صنعتی در معرض این آلاینده زیست‌محیطی قرار می‌گیرد (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 می‌شود (۶)

از سوی دیگر آنتی اکسیدانت‌ها ترکیباتی هستند که با شرکت در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلول، رادیکال‌های آزاد را غیرفعال و از واکنش‌های شیمیایی آن‌ها جلوگیری می‌کنند (۷). ویتامین C (اسید آسکوربیک)، یک

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. سلول های پاساژ سوم به تعداد 1×10^4 در هر خانه پلیت ۲۴ خانه ایی کشت و تیمار سلول ها در گرو های مذکور، انجام شد. پس از ۲۱ روز کشت سلول ها 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 سلول های تمایز یافته: ۲۱ روز پس از تیمار سلول ها در محیط استئوژنیک، تغییرات مورفولوژیکی سلول ها با استفاده از رنگ های فلورسنت هوخست، پروپیدیوم آیوداید و آکریدین اورنژ بررسی شد. سلول ها بعد از رنگ آمیزی، دو بار با PBS^- شسته شد و عکس برداری توسط میکروسکوپ فلورسنس صورت گرفت. قطر هسته سلول های 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 $\text{pH}=10$ قرار داده شد. سپس لام ها به مدت ۴ دقیقه در بافر الکتروفورز حاوی NaOH 300 mM، EDTA 1mM با $\text{PH}=13$ 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

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 16000g 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 بیسفنول A، انتخاب و از طرفی با توجه به این که در دوز ۲۰۰ نانومولار بیسفنول A + ۳۰۰ میکرومولار ویتامین C، ویتامین توانست توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی را تا حد گروه کنترل بهبود دهد، دوز ۳۰۰ میکرومولار ویتامین C نیز به عنوان دوز مؤثر ویتامین، انتخاب گردید و مطالعه با ۴ گروه شامل کنترل، ۲۰۰ نانومولار بیسفنول A، ۲۰۰ نانومولار بیسفنول A + ۳۰۰ میکرومولار ویتامین C و ۳۰۰ میکرومولار ویتامین C 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: سلول های پاساژ سوم به تعداد 1×10^4 در هر خانه پلیت ۲۴ خانه ایی کشت و تیمار سلول ها در محیط استئوژنیک انجام شد.

پس از ۲۱ روز سلول ها به واسطه ی 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

اثبات ماهیت مزانشیمی بودن سلول های استخراج شده نتایج حاصل از آزمایشات رنگ آمیزی آلزارین رد و اوایل رد نشان داد که سلول های استخراج شده از مغز استخوان رت بالغ، پس از قرارگیری در معرض محیط استنوزنیک و آدیپوژنیک به مدت ۲۱ روز، به استنوبلاست و آدیپوسیت تمایز یافته بودند (شکل ۱). همچنین نتایج حاصل از بررسی میزان بیان مارکرهای سطحی در سلول های استخراج شده نشان داد که سلول های استخراج شده از مغز استخوان رت بالغ، مارکرهای سلول های CD90, CD105, CD73 را بیان کرده و مارکرهای CD34 و CD45 را بیان نکرده اند. (شکل ۲). این نتایج مبین مزانشیمی بودن سلول های استخراج شده از مغز استخوان در این پژوهش می باشد.

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).

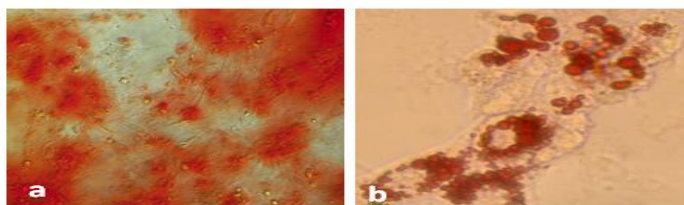
تجزیه و تحلیل آماری

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 میانگین ها در سطح $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

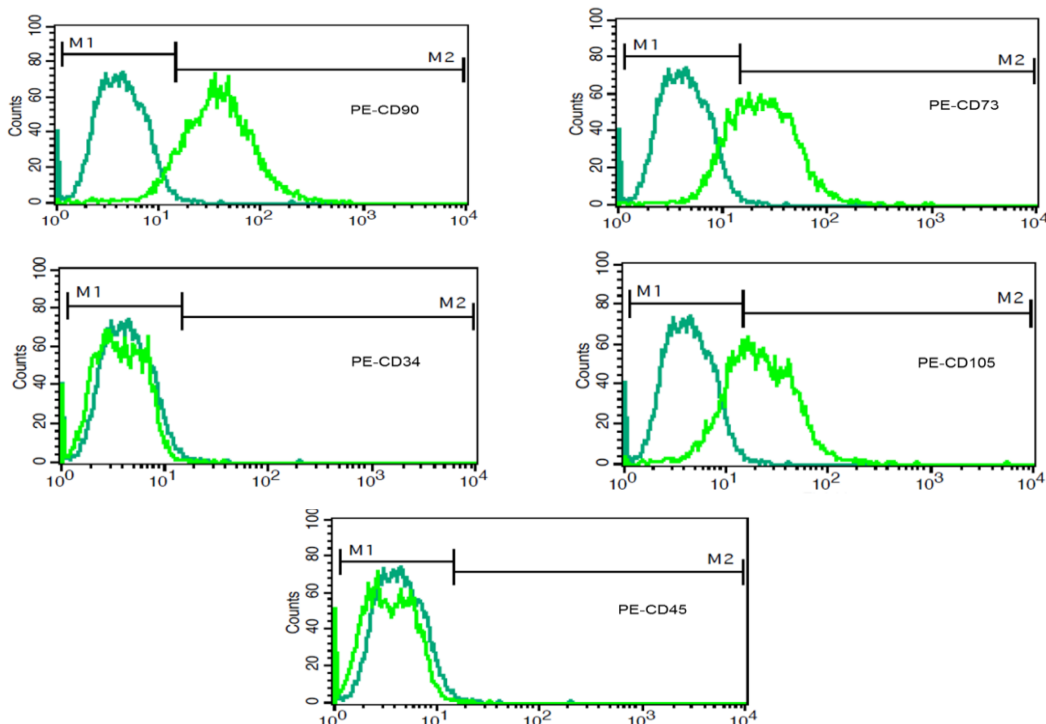
ملاحظات اخلاقی

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

نتایج



شکل ۱: a: رنگ آمیزی آلزارین رد سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت بالغ از دوره ی ۲۱ روزه ی تمایز استنوزنیک (بزرگنمایی $\times 400$).
b: رنگ آمیزی اوایل رد سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت بالغ پس از تمایز به چربی.



شکل ۲: بررسی نتایج فلوسیتومتری سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت با مارکرهای CD90, CD105, CD73, CD34 و CD45. سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت بالغ مارکرهای CD90, CD105, CD73 را بیان کرده و مارکرهای CD34 و CD45 را بیان نکرده اند

بررسی توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس

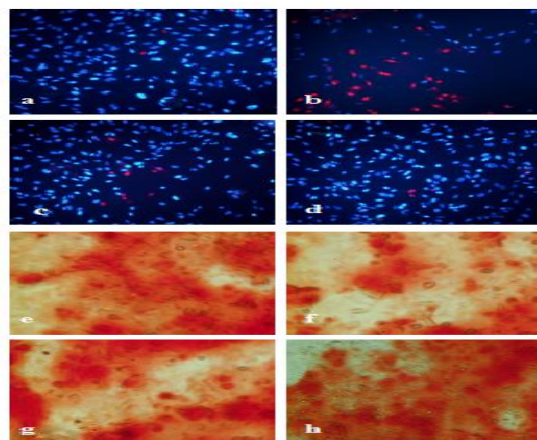
استخوانی و انتخاب دوز مؤثر

نانومولار بیسفنول A توانست این کاهش‌ها را جبران کرده و به سطح گروه کنترل برساند ($P < 0/001$). (جدول ۱ و شکل ۳). بنابراین با توجه به نتایج حاصل از بررسی توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی، دوز ۲۰۰ نانومولار بیسفنول A و ۳۰۰ میکرومولار ویتامین C، در مدت ۲۱ روز، به عنوان دوزهای مؤثر انتخاب گردید و مطالعه با چهار گروه: کنترل، تیمار با ۲۰۰ نانومولار بیسفنول A، ۲۰۰ نانومولار بیسفنول A + ۳۰۰ میکرومولار ویتامین C و ۳۰۰ میکرومولار ویتامین C ادامه یافت.

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 بیسفنول A و ویتامین C، مشخص شد که دوز ۲۰۰ نانومولار بیسفنول A موجب کاهش معنی‌دار توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی نسبت به گروه کنترل گردید ($P < 0/001$). دوز ۳۰۰ میکرومولار ویتامین C در تیمار هم‌زمان با ۲۰۰

جدول ۱: 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 تعداد سلول‌های زنده ($\times 1000$)	میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی بر حسب غلظت آلیزارین رد (میلی مولار)
کنترل	$16989 \text{ fg} \pm 181/643$	$451/67 \text{ g} \pm 13/503$
بیسفنول A (۲۰۰ nM)	$8942/3 \text{ b} \pm 228/500$	$208/33 \text{ b} \pm 10/408$
بیسفنول A (۲۵۰ nM)	$7493 \text{ a} \pm 323/950$	$152/33 \text{ a} \pm 17/502$
بیسفنول A (۲۰۰ nM) + ویتامین C (۲۰۰ μM)	$13624 \text{ d} \pm 109/207$	$319/67 \text{ d} \pm 11/503$
بیسفنول A (۲۰۰ nM) + ویتامین C (۲۵۰ μM)	$15598 \text{ e} \pm 521/087$	$381/67 \text{ f} \pm 12/583$
بیسفنول A (۲۰۰ nM) + ویتامین C (۳۰۰ μM)	$16852 \text{ fg} \pm 49/166$	$460/33 \text{ g} \pm 6/027$
بیسفنول A (۲۰۰ nM) + ویتامین C (۳۵۰ μM)	$17341 \text{ g} \pm 63/976$	$507/33 \text{ h} \pm 7/505$
بیسفنول A (۲۰۰ nM) + ویتامین C (۴۰۰ μM)	$18502 \text{ h} \pm 45/368$	$604/00 \text{ i} \pm 15/099$
بیسفنول A (۲۵۰ nM) + ویتامین C (۲۰۰ μM)	$12258 \text{ c} \pm 342/702$	$274/33 \text{ c} \pm 13/576$
بیسفنول A (۲۵۰ nM) + ویتامین C (۲۵۰ μM)	$14105 \text{ e} \pm 192/922$	$344/50 \text{ de} \pm 12/010$
بیسفنول A (۲۵۰ nM) + ویتامین C (۳۰۰ μM)	$16352 \text{ f} \pm 230/352$	$371/33 \text{ ef} \pm 10/016$
بیسفنول A (۲۵۰ nM) + ویتامین C (۳۵۰ μM)	$16858 \text{ fg} \pm 127/052$	$458/00 \text{ g} \pm 2/645$
بیسفنول A (۲۵۰ nM) + ویتامین C (۴۰۰ μM)	$18151 \text{ h} \pm 67/144$	$600/00 \text{ i} \pm 15/00$



شکل ۳: رنگ آمیزی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با رنگ‌های فلورسنت پروپیدیوم آیواید و هوست (a-d) (بزرگنمایی $\times 200$)، هسته‌های صورتی رنگ سلول‌های مرده را نشان می‌دهد.

نانومولار)، نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0/001$). افزایش معنی داری 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 ویتامین C (۳۰۰ میکرومولار)، نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0/001$). (جدول ۲).

بررسی تغییرات مورفولوژیک سلولها

میانگین قطر هسته سلولهای گروه بیسفنول A نسبت به گروه کنترل کاهش معنی دار ($P < 0/001$) و در گروه ویتامین C، افزایش معنی داری ($P < 0/001$) را نشان داد. اما تغییر معنی داری در میانگین قطر هسته سلولهای گروه بیسفنول A + ویتامین C نسبت به گروه کنترل، مشاهده نشد ($p > 0/05$) (جدول ۲).

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

رنگ آمیزی آلیزارین رد (e-h) (بزرگنمایی $400 \times$)، 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 بیسفنول A. (c و g) گروه بیسفنول A + ویتامین C. (d و h) گروه ویتامین C.

بررسی میزان کلسیم داخل سلولی و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز

کاهش معنی داری در میانگین سطح کلسیم داخل سلولی و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروه بیسفنول A (۲۰۰

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

گروهها	میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز U/L	میزان کلسیم (mg/dl)	میانگین قطر هسته سلولهای تمایز یافته به استئوبلاست (میکرومتر)
کنترل	$65/66^b \pm 2/081$	$41/33^b \pm 1/527$	$16/64^b \pm 1/891$
بیسفنول A (۲۰۰ nM)	$33^a \pm 1/732$	$22/66^a \pm 2/081$	$12/39^a \pm 1/347$
بیسفنول A (۲۰۰ nM) + ویتامین C (۳۰۰ μ M)	$68/66^b \pm 2/516$	$44/33^b \pm 1/527$	$17/17^b \pm 2/203$
ویتامین C (۳۰۰ μ M)	$93/33^c \pm 3/511$	$58^c \pm 2/000$	$21/30^c \pm 1/499$

نسبت به کنترل مشاهده نشد. علاوه بر این در گروه ویتامین C هسته سلولها بسیار منظم و در مرکز سیتوپلاسم قرار داشت و سیتوپلاسم سلولها نیز گسترده تر و زوائد سلولی آنها بزرگتر شد (شکل ۴).

آزمون کامت

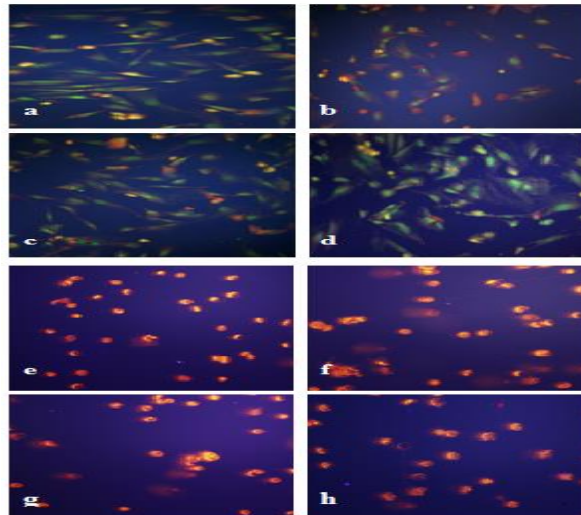
نتایج حاصل از آزمون کامت نشان داد که در گروه کنترل، هسته سلولها فاقد دنباله بود و این نشان دهنده عدم شکستگی DNA است. تعداد سلولهای دنباله دار در گروه بیسفنول A نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که نشانه شکستگی DNA در تعداد بیشتری از سلولهای این گروه بود. در حالی که در گروه بیسفنول A + ویتامین C تعداد سلولهای

مقادیر به صورت $means \pm SD$ است و میانگینهای با کد حرفهای متفاوت دارای تفاوت معنی دار می باشد. (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 بیسفنول A مقدار سیتوپلاسم تغییر یافته و چروکیده شد، شکل سلولها به صورت گرد تغییر شکل داد، به ندرت زوائد سیتوپلاسمی کمی در آنها مشاهده شد و موقعیت هسته نسبت به سیتوپلاسم نامنظم شد، در حالی که در گروه بیسفنول A + ویتامین C تغییرات مورفولوژیکی قابل توجهی

کاهش یافت که نشان دهنده اثر مهارى ویتامین C بر آسیب و شکستگی DNA در این گروه سلولى بود (شکل ۴).

دنباله دار نسبت به گروه بیسفنول A کاهش یافت و در گروه ویتامین C نیز تعداد سلول‌های دنباله دار نسبت به گروه کنترل



شکل ۴: رنگ آمیزی فلورسنت آکریدین اورانژ (a-d) و تست کامت (e-h) در سلول‌های بنیادی مزانشیم پس از دوره 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 بیسفنول A. (c و g) گروه بیسفنول A + ویتامین C. (d و h) گروه ویتامین C.

افزایش پروتئین C-myc (۱۹) به عنوان یک عامل ایجاد استرس سلولى 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 بیسفنول A می‌شود.

چنانچه دیده شد در گروه بیسفنول A میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی، میزان کلسیم داخل سلولى و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (شاخص‌های تمایز استئوژنیک) به طور معنی‌داری کاهش یافت. بیسفنول A 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 (مهم‌ترین فاکتورهای 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 بیسفنول A به عنوان یک ترکیب شبه استروژنی با اشغال کردن جایگاه‌های مربوط به استروژن بر

بحث

در مطالعه حاضر بیسفنول A 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). بیسفنول A با اثر بر توبولین، سازماندهی رشته‌های دوک را در سلول تخریب می‌کند و با اعمال اثر مهارى بر تشکیل دوک متافازى، مانع تقسیم سلولى 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)، افزایش بیان پروتئین‌های مرتبط با آسیب DNA یعنی P53، P-chk2، ATM و H2AX، افزایش تولید ROS (۶)، مهار آنزیم‌های زنجیره تنفسی، مهار آنتی‌اکسیدازها در سیستم آنتی‌اکسیدانتی (۱۷)، کاهش پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 و PRDX4 (۱۸)، افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax (۱۱)، کاهش پروتئوزوم 26S و

استئوژنیک سلولهای ماهیچه صاف عروقی بود (۲۷). بر اساس مطالعات صورت گرفته توسط محققین، ویتامین C با افزایش ترجمه mRNA پروکلژن نوع I و سنتز کلژن 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 بیسفنول A 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. بیسفنول A 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- κ B (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 بیسفنول A، حلقه‌های اکتینی دپلمیریزه شده، به خوبی گسترش نیافته و در نتیجه به صورت یک توده نامنظم در می‌آید. بنابراین با توجه به اینکه پلیمریزاسیون و دپلمیریزاسیون پروتئین اکتین، مکانیسم اصلی در کنترل مورفولوژی سلول است این تغییرات مورفولوژیکی در سلولهای تیمار شده با بیسفنول A صورت می‌گیرد، که به آپوپتوزیس سلول می‌انجامد (۱۳). مطالعه حاضر نشان داد که ویتامین C از این گونه تغییرات مورفولوژیکی سلولها جلوگیری

روی گیرنده‌هایش، مانع از ایفای نقش این هورمون در تولید کلسیم و ترشح کلسی‌تونین می‌شود و هم‌چنین 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 می‌دهد، بیسفنول A با اثر مهاری بر ترشح کلسی‌تونین و کاهش کلسیم داخل سلولی، باعث مهار تمایز استئوژنیک سلولها می‌شود (۲۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ویتامین C اثر مخرب بیسفنول A بر تکثیر و توانایی زیستی و هم‌چنین 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 هم‌چنین Urbun و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی سلولهای استئوبلاست می‌باشد (۲۳). ویتامین C 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 هم‌چنین با افزایش فعالیت تلومراز، افزایش بیان ژنهای hTR و TRF2 (ژن‌های مهارکننده پیری سلول)، افزایش پتانسیل غشا و افزایش بیان klf4 و Jhd1a/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 آن‌ها می‌شود.

هم‌چنین در مطالعه حاضر نشان داده شد که ویتامین C در گروه بیسفنول A + ویتامین C، موجب افزایش معنی‌دار شاخص‌های 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

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 ویتامین C را در موارد مواجهه با بیسفنول A پیشنهاد می‌نماید.

سیاسگزاری

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.

می‌کند. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات دیگر محققین نیز مشخص شده است که ویتامین C از طریق مهار تولید ROS، کاهش بیان ژن‌های پروآپتوتیک Bax و P53، افزایش بیان ژن آنتی‌آپتوتیک Bcl-2 و کاهش آزاد شدن سیتوکروم C 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 ویتامین C توانست اثرات نامطلوب بیسفنول A را که موجب کاهش توانایی زیستی و اختلال در تمایز استئوژنیک آن‌ها و هم چنین ایجاد

References:

- 1-Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Sliaper-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, Zhong 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.

- 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. *Paranonylphenol 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.

- 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

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 Darbandi², Atena Sadat Azimi³

Original Article

Introduction: 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, alkaline 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

¹Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

²Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

³Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

*Corresponding author: Tel: 09181617098, email: m-soleimani@araku.ac.ir