

اثر همزمان بیسفنول A و اپی گالوکاتچین گالات بر تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرایی نر به استئوبلاست در محیط کشت

بیان لطفی^{1*}؛ ملک سلیمانی مهرنجانی¹؛ مجید مهدیه¹

چکیده

زمینه: چای سبز غنی از اپی گالوکاتچین گالات است و خاصیت آنتی‌اکسیدانتی فراوانی دارد که می‌تواند باعث افزایش ماده معدنی استخوان شود. از سوی دیگر در جوامع صنعتی امروزی انسان‌ها در تماس مستقیم با آلاینده‌های مختلفی مثل بیسفنول A قرار دارند، که علاوه بر مشکلات زیست محیطی، برای سلامتی انسان نیز مضر می‌باشند.

روش‌ها: در این مطالعه پس از استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت، سلول‌های پاساژ سوم به 13 گروه کنترل، دوزهای مختلف بیسفنول A (250 و 1000 نانومولار) و دوزهای مختلف اپی گالوکاتچین گالات (5، 10، 15، 20 و 30 میکرومولار) + بیسفنول A تقسیم شدند و در محیط استئوژنیک برای مدت 21 روز تیمار شدند. سپس توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی ارزیابی شد. برای ادامه مطالعه دوز 250 نانومولار بیسفنول A و 30 میکرومولار اپی گالوکاتچین گالات انتخاب شد. تأثیر همزمان بیسفنول A و اپی گالوکاتچین گالات بر میزان تمایز استئوژنیک سلول‌ها از طریق تست‌های MTT، آلیزارین‌رد، سنجش میزان رسوب کلسیم داخل سلولی و خارج سلولی، میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و مورفولوژی سلول‌های تمایز یافته توسط رنگ‌های فلورسنت بررسی گردید.

یافته‌ها: براساس آنالیز واریانس نشان داده شد که تیمار با دوزهای 250 و 1000 نانومولار بیسفنول A باعث کاهش توانایی زیستی و تمایز به استئوبلاست سلول‌های مغز استخوان می‌شود ($P < 0/05$). همچنین تیمار با 30 میکرومولار اپی گالوکاتچین گالات باعث خستگی شدن اثرات مخرب بیسفنول A بر روی سلول‌های مغز استخوان شد.

نتیجه‌گیری: مطالعه ما نشان داد که اپی گالوکاتچین گالات می‌تواند اثرات مخرب بیسفنول A را بر سلول‌های مزانشیم جبران کند. کلیدواژه‌ها: سلول بنیادی مزانشیم، بیسفنول A، اپی گالوکاتچین گالات، استئوبلاست، رت

«دریافت: 1393/6/25 پذیرش: 1393/9/11»

1. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک

*عهده‌دار مکاتبات: کردستان، کامیاران، خیابان بهشتی، کوچه عزیزی، پلاک 37، کدپستی: 6631757365، تلفن: 09188703967

Email: Bayanlotfi@yahoo.com

مقدمه

غذایی کاربرد دارند، وجود دارد. علاوه بر این، بیسفنول A به‌عنوان سورفکتانت صنایعی مانند پلاستیک‌سازی و مواد دندان‌پزشکی استفاده می‌گردد (2). از آنجایی که بیسفنول A می‌تواند به رسپتورهای استروژن متصل شود، توانایی تغییر و تخریب سیستم اندوکراین را نیز دارد (3). هدف اصلی بیسفنول A در درون سلول، میتوکندری می‌باشد که مرکز تشکیل رادیکال‌های آزاد گونه فعال اکسیژن است. بیسفنول A با تولید رادیکال‌های آزاد، باعث آسیب به میتوکندری می‌شود و در نتیجه آن انرژی کم‌تری

امروزه در جوامع صنعتی، انسان و دیگر موجودات زنده به‌طور مستقیم و غیرمستقیم در معرض آلاینده‌های زیست محیطی مثل بیسفنول A قرار دارند که ورود آن به چرخه‌های غذایی در 30 سال اخیر به‌طور فزاینده‌ای بالا رفته است. بیسفنول A با خاصیت استروژنیک به‌عنوان زئواستروژن محیطی مطرح بوده (1) و مهم‌ترین متابولیت دترژنت‌های آلکیل فنول پلی‌اتوکسیلات می‌باشد که در پلی‌وینیل کلراید و پلی‌استرین‌هایی که در صنایع بسته‌بندی

اپی گالوکاتچین گالات می تواند رشد تومور را در برخی اعضای بدن کاهش دهد (12). اپی گالوکاتچین گالات مهارکننده کموتریپسین، گلوکز 6 فسفاتاز کبدی و لیپیدپراکسیداز است و احتمال نپذیرفتن عضو پیوندی در بدن انسان را نیز کاهش می دهد (13). مطالعات اپیدمیولوژیکال نشان می دهد که غلظت ماده معدنی استخوان (BMD) در زنان یائسه ای که عادت به نوشیدن چای سبز دارند بیشتر از زنانی است که چای سبز نمی - خورند (14). نشان داده شده که اپی گالوکاتچین گالات باعث تحریک مرگ سلولی در سلول های استئوکلاست و مهار تمایز استئوکلاستونژنیز در کشت آزمایشگاهی سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان می شود. این یافته ها پیشنهاد می کند که اپی گالوکاتچین گالات می تواند شرایط مناسبی را در جهت ترمیم استخوان و بهبود بیماری های استخوانی مثل پوکی استخوان فراهم کند (14). بنابراین با توجه به اثرات مخرب بیسفنول A در مطالعه حاضر، اثرات آنتی اکسیدانتی قوی اپی - گالوکاتچین گالات بر روی سلول های تیمار شده با بیسفنول A بررسی شده است. به این منظور از میان رده - های سلولی مختلف، سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت انتخاب گردید و اثر آنتی اکسیدانتی اپی گالوکاتچین گالات چای سبز در القای تمایز استئوژنیک و همچنین در مهار اثرات توکسیک ناشی از تیمار طولانی مدت بیسفنول A در این سلول ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

استخراج و تیمار سلول ها: در این مطالعه پس از محاسبه تقریبی تعداد سلول های مورد نیاز برای پژوهش، تعداد 15 راس موش نر نژاد ویستار با سن تقریبی 50 روز و وزن 20 ± 140 گرم انتخاب شد. حیوان های مورد استفاده پس از خریداری از انستیتو رازی در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط دمایی 3 ± 27 درجه سانتی گراد و با دسترسی مناسب به غذا و آب در قفس های

تولید می گردد و استرس اکسیداتیو به وجود می آید (4). مطالعه Suzuki و همکارانش نشان داد که بیسفنول A باعث کاهش سطح کلسیم پلاسما شده و مانع از ترشح هورمون های ترشح کننده کلسیم مانند کلسی تونین می شود (5). سلول بنیادی مزانشیم، سلول هایی هستند که می توانند برای مدت نسبتاً طولانی تقسیمات خود تجدیدی را ادامه داده و با فراهم شدن شرایط لازم به رده های اسکلتی متمایز شوند (6). این سلول ها پس از چندین بار پاساژ به صورت یکدست و با مورفولوژی دوکی شکل در محیط کشت ظاهر می شوند (7). براساس مطالعات پیشین، سلول های بنیادی مزانشیمی در نمونه های مغز استخوان به تعداد بسیار معدودی وجود دارند. تعداد این سلول ها در حدود 15-10 سلول به ازای 10^6 سلول هسته دار در مغز استخوان تخمین زده می شود. لذا تکثیر آزمایشگاهی این سلول ها قبل از هرگونه کار تجربی یا بالینی اجتناب ناپذیر است (6). از طرفی پتانسیل تمایز به استخوان از توانایی های مشخصه سلول های بنیادی مزانشیمی بوده و با معرفی آن امیدهای زیادی برای درمان ضایعات بافت استخوان به وجود آمده است. آنتی اکسیدانت چای سبز، برگ های گیاه *Camellia Sinesis* است و به عنوان یکی از متداول ترین آشامیدنی ها محسوب می شود که خواص سودمندی مثل اثرات ضدسرطانی و آنتی اکسیدانتی دارد (8). چای سبز حاوی کافئین، انواع کاتچین ها، پلی فنول، ویتامین های B، C، E، فلاونوئید، گلیکوپروتئین، فیبر، لیپید و کارتنوئیدهاست (9). آنتی اکسیدانت کاتچین ها که یکی از ترکیبات موجود در چای سبز هستند، در گروه پلی فنول ها قرار دارند. تاکنون 4 نوع کاتچین اصلی شامل اپی گالوکاتچین گالات (EGCG)، اپی کاتچین گالات (ECG)، اپی گالوکاتچین (EGC) و اپی کاتچین (EC) در برگ چای سبز شناسایی شده است (10). اپی گالوکاتچین گالات که مهم ترین ترکیب پلی فنولی چای سبز است خاصیت آنتی اکسیدانتی، ضدسرطانی و ضدموتاژنی دارد (11). بررسی های بیولوژی و اپیدمیولوژی در ده سال اخیر نشان داده که

سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری توانایی احیای رنگ زرد دی‌متیل تiazولدی فیل ترازولیوم را به بلورهای ارغوانی و نامحلول فورمازان دارد (3). پس از زمان‌های انجام مراحل فوق، 10 میکرولیتر میتل تiazول ترازولیوم به ازای 100 میکرولیتر از محیط کشت به چاهک‌ها اضافه و به مدت 4 ساعت انکوبه شد. سپس بلورهای فورمازان حاصل در دی‌متیل سولفوکساید حل و جذب آن توسط دستگاه ELISA reader (SCO diagnostic, Germany) در طول موج 505 نانومتر اندازه‌گیری شد. تعداد سلول‌های زنده پس از رسم گراف استاندارد با استفاده از فرمول جذب $R2=0/996$ و $Y = /016X+0/037$ (Y جذب نمونه و X تعداد سلول‌های زنده) محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی: برای انجام این روش، محیط کشت رویی برداشته و سلول‌ها با فرمالین 10 درصد فیکس شد و سپس با محلول رنگی آلیزارین‌رد رنگ‌آمیزی گردید. سلول‌ها با آب مقطر شستشو شد. سپس اسیداستیک 10 درصد به سلول‌ها افزوده و بدین ترتیب رنگ قرمز آلیزارین‌رد از ماتریکس استخوانی استخراج شد. در پایان جذب محلول‌های قرمز رنگ حاصل در طول موج 405 نانومتر ثبت و با جذب نوری غلظت‌های مشخص آلیزارین‌رد مقایسه گردید. در نهایت، با توجه به مطالعه نتایج حاصل از دوزیابی، تیمار با دوز 30 میکرومولار اپی گالوکاتچین - گالات و 250 نانومولار بیسفنول A طی 21 روز، برای ادامه مطالعه انتخاب شد.

انتخاب دوز مؤثر: با توجه به نتایج به دست آمده حاصل از تست میتل تiazول ترازولیوم و رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد دوزهای 250 نانومولار بیسفنول A و 30 میکرومولار اپی گالوکاتچین گالات جهت ادامه تست‌ها و بررسی‌های بیشتر انتخاب گردید. در این مطالعه برای انتخاب دوز مؤثر بیسفنول A و اپی گالوکاتچین گالات مرحله غلظت‌یابی را انجام شد. ابتدا دو دوز 250 و 1000 نانومولار بیسفنول A انتخاب و سپس این 2 دوز بیسفنول A با دوزهای انتخابی اپی گالوکاتچین گالات (5،

پلی اتیلین نگه‌داری شدند. پس از بی‌هوشی با دی‌اتیل اتر استخوان‌های ران و ساق پای رت، جدا و تحت شرایط استریل، مغز استخوان توسط 3 میلی‌لیتر محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, Germany) DMEM حاوی 15 درصد FBS (Fetal Bovin Serum, Gibco, Germany) و پنی‌سیلین / استرپتومایسین (Gibco ; Germany) در لوله فالكون 15 میلی‌لیتری فلش اوت شد. لوله فالكون با 2500rpm به مدت 5 دقیقه سانتیفریژ و رسوب سلولی حاصل با یک میلی‌لیتر محیط کشت هموزن و به فلاسک 25 میلی‌لیتری منتقل گردید. بعد از 24 ساعت، سلول‌های چسبیده به فلاسک با بافر فسفات شسته شده و محیط کشت تازه اضافه شد. 10-14 روز فرصت برای تکثیر سلول‌ها داده شد، در طی این مدت هر سه روز یک‌بار محیط کشت تعویض گردید. بعد از پر شدن کف فلاسک سلول‌ها با تریپسین - اتیلن دی آمین تتراسیتیک اسید (Trypsin-EDTA solution; sigma) از کف جدا و نیمی از آن در یک فلاسک دیگر کشت داده شد و این کار تا پاساژ سوم تکرار گردید. سلول‌های پاساژ سوم در پلیت شش‌خانه کشت و بعد از چسبیدن به کف ظرف به 13 گروه کنترل، دوزهای مختلف بیسفنول A (250 و 1000 نانومولار) و دوزهای مختلف اپی گالوکاتچین گالات (5، 10، 15، 20 و 30 میکرومولار) + بیسفنول A تقسیم و در محیط استئوژنیک (بتا-گلیسرول فسفات، دگزامتازون و آسکوربیک اسید) و آدیپوژنیک (بتا -گلیسرول فسفات، دگزامتازون، ایندومتاسین و آسکوربیک اسید) حاوی 15 درصد سرم جنین گاوی برای مدت 21 روز تیمار شدند.

بررسی توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان: برای سنجش توانایی حیات سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A و اپی گالوکاتچین گالات از روش میتل تiazول ترازولیوم (Methyl Thiazol Tetra Zolium- MTT) استفاده شد. لازم به ذکر است که بیشتر مواد مورد استفاده در این پژوهش از شرکت سیگما ساخت کشور آمریکا تهیه گردید. در روش میتل تiazول ترازولیوم،

10، 15، 20 و 30 میکرومولار) ترکیب شد. بعد از مرحله دوزیابی ترکیبی، در آخر دوز 250 نانومولار بیسفنول A و 30 میکرومولار اپی گالوکاتچین گالات برای ادامه بررسی ها انتخاب گردید (جدول 1). بر این اساس فقط در مرحله دوزفایندینگ 13 گروه وجود داشت ولی در بقیه مراحل و برای دیگر تست ها فقط 4 گروه (کنترل، 250 نانومولار بیسفنول A، 30 میکرومولار اپی گالوکاتچین گالات+250 نانومولار بیسفنول A، 30 میکرومولار اپی گالوکاتچین-گالات) بررسی شد.

بررسی مورفولوژی سلول ها: سلول های چسبیده به پلیت 24 خانه با دوزهای انتخابی بیسفنول A و اپی گالوکاتچین گالات در 21 روز و در 4 گروه کنترل، بیسفنول A، تیمار همزمان بیسفنول A و اپی گالوکاتچین گالات و اپی گالوکاتچین گالات تیمار شد. سپس رنگ آمیزی با هوخست برای مطالعه مورفولوژی هسته و آکریدین اورانژ برای بررسی مورفولوژی سیتوپلاسم انجام گردید و عکس برداری توسط میکروسکوپ فلورسنس (olympus IX 70) صورت گرفت.

بررسی میزان کلسیم داخل سلولی: کلسیم با کرزول فتالین ایجاد کمپلکسی می نماید که در محیط قلیایی، ارغوانی رنگ است و شدت رنگ حاصله متناسب با غلظت کلسیم می باشد (16). در این سنجش از کیت کلسیم شرکت درمان کاو ایران استفاده گردید. سلول های بنیادی مزانشیم پس از پاساژ سوم در پلیت های 24 خانه قرار گرفت و تیمار سلول ها در 4 گروه مذکور به مدت 21 روز انجام گردید. سلول ها در گروه های جداگانه پس از شستشو با PBS⁻ به کمک اسکرابر و بافر استخراج آلکالین فسفاتاز از کف پلیت جدا و به اپندورف منتقل شدند. در زمان انجام تست روش لوری به منظور تعیین مقادیر پروتئین انجام گرفت. پس از اضافه کردن 500 میکرولیتر از محلول بافر استخراج به هر لوله، 5 میلی لیتر از سود 0/02 نرمال اضافه شد و جذب لوله نمونه ها در مقابل لوله بلانک در طول موج 410 نانومتر خوانده شد.

با استفاده از نرم افزار SPSS، از روش آماری آنالیز واریانس دو طرفه و یک طرفه و تست Tukey جهت تحلیل داده ها استفاده شد.

یافته ها

اثر اپی گالوکاتچین گالات (EGCG) بر توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی

بررسی مورفولوژی سلول ها: سلول های چسبیده به پلیت 24 خانه با دوزهای انتخابی بیسفنول A و اپی گالوکاتچین گالات در 21 روز و در 4 گروه کنترل، بیسفنول A، تیمار همزمان بیسفنول A و اپی گالوکاتچین گالات و اپی گالوکاتچین گالات تیمار شد. سپس رنگ آمیزی با هوخست برای مطالعه مورفولوژی هسته و آکریدین اورانژ برای بررسی مورفولوژی سیتوپلاسم انجام گردید و عکس برداری توسط میکروسکوپ فلورسنس (olympus IX 70) صورت گرفت.

بررسی میزان کلسیم داخل سلولی: کلسیم با کرزول فتالین ایجاد کمپلکسی می نماید که در محیط قلیایی، ارغوانی رنگ است و شدت رنگ حاصله متناسب با غلظت کلسیم می باشد (16). در این سنجش از کیت کلسیم شرکت درمان کاو ایران استفاده گردید. سلول های بنیادی مزانشیم پس از پاساژ سوم در پلیت های 24 خانه قرار گرفت و تیمار سلول ها در 4 گروه مذکور انجام گردید. سلول ها در گروه های جداگانه پس از شستشو با PBS⁻ به کمک اسکرابر و 50 میکرولیتر بافر استخراج کلسیم (0/6 Hcl نرمال) از کف پلیت جدا و به اپندورف منتقل شدند. پس از طی مدت زمان 24 ساعت در دمای 4 درجه سانتی گراد، به تعداد نمونه ها و همچنین نمونه شاهد، ویال محلول بافر انتخاب گردید و به همه ویال های مورد نظر 100 میکرولیتر محلول رنگزا اضافه شد. سپس به هر ویال 30 میکرولیتر از نمونه سلولی اضافه گردید و جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر

بررسی میزان کلسیم داخل سلولی: کلسیم با کرزول فتالین ایجاد کمپلکسی می نماید که در محیط قلیایی، ارغوانی رنگ است و شدت رنگ حاصله متناسب با غلظت کلسیم می باشد (16). در این سنجش از کیت کلسیم شرکت درمان کاو ایران استفاده گردید. سلول های بنیادی مزانشیم پس از پاساژ سوم در پلیت های 24 خانه قرار گرفت و تیمار سلول ها در 4 گروه مذکور انجام گردید. سلول ها در گروه های جداگانه پس از شستشو با PBS⁻ به کمک اسکرابر و 50 میکرولیتر بافر استخراج کلسیم (0/6 Hcl نرمال) از کف پلیت جدا و به اپندورف منتقل شدند. پس از طی مدت زمان 24 ساعت در دمای 4 درجه سانتی گراد، به تعداد نمونه ها و همچنین نمونه شاهد، ویال محلول بافر انتخاب گردید و به همه ویال های مورد نظر 100 میکرولیتر محلول رنگزا اضافه شد. سپس به هر ویال 30 میکرولیتر از نمونه سلولی اضافه گردید و جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر

نشد ($P > 0/05$). بنابراین برای ادامه مطالعه، دوزهای 30 میکرومولار اپی گالوکاتچین گالات و 250 نانومولار بیسفنول A انتخاب گردید (جدول 1).

نتایج حاصل از آزمون MTT و آلیزارین رد: بیسفنول A در طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم به استئوبلاست باعث کاهش توانایی حیات و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی در این سلول‌ها شد ($P < 0/001$) و اپی گالوکاتچین گالات باعث جبران اثرات تخریبی بیسفنول A گردید، به گونه‌ای که تفاوت معناداری در گروه تیمار همزمان نسبت به گروه کنترل مشاهده نگردید (جدول 2) (تصویر 1).

بررسی مورفولوژی سلول‌ها: در گروه کنترل و تیمار پس از رنگ آمیزی با رنگ فلورسنس هوست، هسته‌ها به رنگ آبی درآمدند. تیمار سلول‌های مزانشیم با دوزهای 30 میکرومولار اپی گالوکاتچین گالات و 250 نانومولار

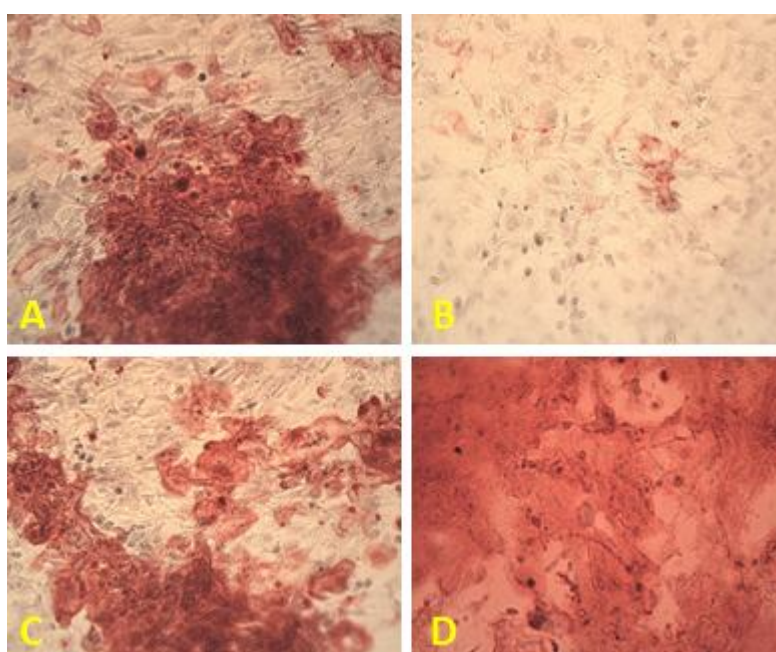
سلول‌ها: آنالیز داده‌ها افزایش توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی را در سلول‌های بنیادی مزانشیم، طی روند تمایز به استئوبلاست، در حضور دوزهای مختلف اپی گالوکاتچین گالات نشان داد ($P < 0/05$). با توجه به نتایج به دست آمده از تست MTT و رنگ آمیزی آلیزارین رد مشخص گردید که دوز 250 و 1000 نانومولار بیسفنول A به صورت وابسته به دوز، باعث کاهش توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان می‌شود ($P < 0/001$). در مقابل توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌ها در گروه‌های تیمار همزمان اپی گالوکاتچین گالات و بیسفنول A افزایش یافته ($P < 0/05$) و به حد گروه کنترل نزدیک شده بود به طوری که در گروه مربوط به دوز 30 میکرومولار اپی گالوکاتچین گالات و 250 نانومولار بیسفنول A تفاوت معناداری نسبت به گروه کنترل مشاهده

جدول 1- مقایسه میانگین ($\pm SD$) توانایی زیستی و میزان معدنی ماتریکس استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیم پس از تیمار 21 روزه در گروه‌های مختلف (در هر ستون میانگین‌هایی که با کد حرف‌های متفاوت (a,b,c,...) نامگذاری شده‌اند دارای تفاوت معنادار می‌باشند. در واقع این حروف میزان معنادار بودن داده‌ها را نشان می‌دهند).

| تست | | دوز |
|----------------------------------|----------------------------------|---|
| میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی | تعداد سلول زنده | |
| 406/6 \pm 16/3 | 18291 ^{ab} \pm 485/6 | کنترل |
| 233/3 ^{hi} \pm 12/9 | 10345 ^g \pm 416/2 | بیسفنول A (250nm) |
| 195/8 ⁱ \pm 18/4 | 7812/5 ^h \pm 572/8 | بیسفنول A (1 μ m) |
| 256/6 ^{gh} \pm 16/1 | 11875 ^{efg} \pm 390/3 | بیسفنول A (250nm) + اپی گالوکاتچین گالات (5 μ m) |
| 300 ^{efg} \pm 22/5 | 13333 ^{cde} \pm 344/2 | بیسفنول A (250nm) + اپی گالوکاتچین گالات (10 μ m) |
| 350/8 ^{cde} \pm 21/3 | 14750 ^c \pm 687/5 | بیسفنول A (250nm) + اپی گالوکاتچین گالات (15 μ m) |
| 392/5 ^{abc} \pm 15/6 | 17354 ^b \pm 893/4 | بیسفنول A (250nm) + اپی گالوکاتچین گالات (20 μ m) |
| 441/6 ^a \pm 22/5 | 196657 ^a \pm 477/3 | بیسفنول A (250nm) + اپی گالوکاتچین گالات (30 μ m) |
| 218/3 ^{hi} \pm 18/4 | 8687 ^h \pm 615/5 | بیسفنول A (1 μ m) + اپی گالوکاتچین گالات (5 μ m) |
| 252/5 ^{gh} \pm 18/1 | 1187/5 \pm 615/5 | بیسفنول A (1 μ m) + اپی گالوکاتچین گالات (10 μ m) |
| 298/3 ^{fg} \pm 11/3 | 12562 ^{def} \pm 471/8 | بیسفنول A (1 μ m) + اپی گالوکاتچین گالات (15 μ m) |
| 335/8 ^{def} \pm 12/8 | 13729 ^{cd} \pm 366/2 | بیسفنول A (1 μ m) + اپی گالوکاتچین گالات (20 μ m) |
| 373/3 ^{bcd} \pm 17/5 | 14500 ^c \pm 125 | بیسفنول A (1 μ m) + اپی گالوکاتچین گالات (30 μ m) |

جدول 2- مقایسه میانگین (\pm SD) توانایی زیستی و میزان معدنی ماتریکس استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرایی پس از تیمار 21 روزه

| تست | | دوز |
|----------------------------------|-----------------------------|---|
| میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی | تعداد سلول‌های زنده | |
| 404/6 ^b ±16/2 | 17145/8 ^b ±753/5 | کنترل |
| 233/3 ^c ±12/8 | 10354 ^c ±416/1 | بیسفنول A (250nm) |
| 435 ^b ±13/2 | 18166/7 ^b ±443/4 | بیسفنول A (250nm) + اپی گالوکاتچین گالات (30µm) |
| 926/2 ^a ±8/8 | 41770 ^a ±344/2 | اپی گالوکاتچین گالات (30µm) |



تصویر 1- ماتریکس سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت رنگ‌آمیزی شده با آلیزارین رد در نمونه‌های سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت در محیط استوژنیک پس از 21 روز. (A) گروه کنترل. (B) سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A (250 نانومولار). (C) سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A (250 نانومولار) + اپی گالوکاتچین گالات (30 میکرومولار). (D) سلول‌های تیمار شده با اپی گالوکاتچین گالات (30 میکرومولار) (20X).

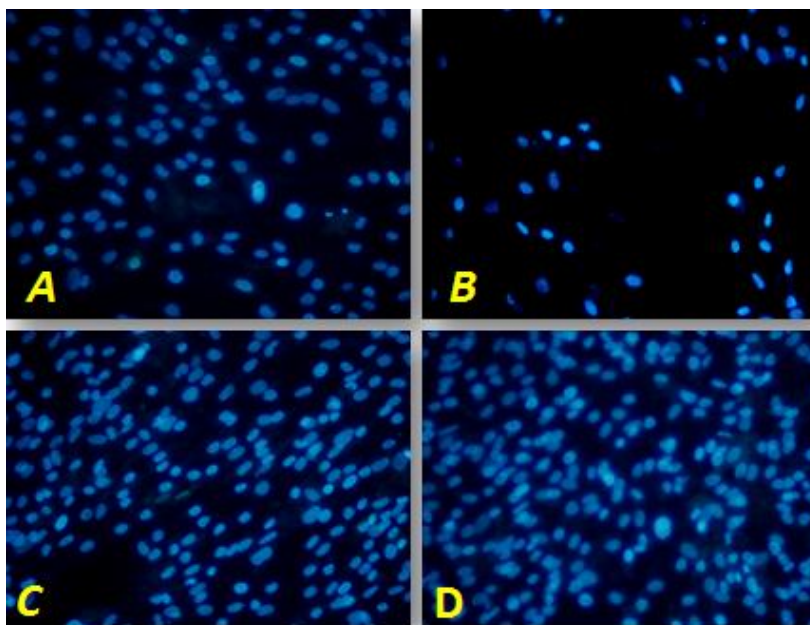
سیتوپلاسم چندوجهی و زوائد سلولی قابل تشخیص بود و هسته‌های آن‌ها در موقعیت مرکزی نسبت به سیتوپلاسم قرار داشتند. در گروه تیمار با بیسفنول A چروکیدگی و کوچک شدن سیتوپلاسم و گرد شدن سلول‌ها مشهود بود. در گروه‌های تیمار با اپی گالوکاتچین گالات و بیسفنول A + اپی گالوکاتچین گالات شکل سیتوپلاسم دارای زوائد بزرگ‌تر و سیتوپلاسم پهن‌تری بودند و هم‌چنین هسته‌ها در موقعیت مرکزی نسبت به سیتوپلاسم قرار داشتند (تصویر 3).

بیسفنول A در 4 گروه کنترل، گروه تیمار با بیسفنول A (250 نانومولار)، گروه تیمار با اپی گالوکاتچین گالات (30 میکرومولار) و اپی گالوکاتچین گالات + بیسفنول A در طی 21 روز در مقایسه با گروه کنترل دارای تغییرات مورفولوژیک بود (تصویر 2).

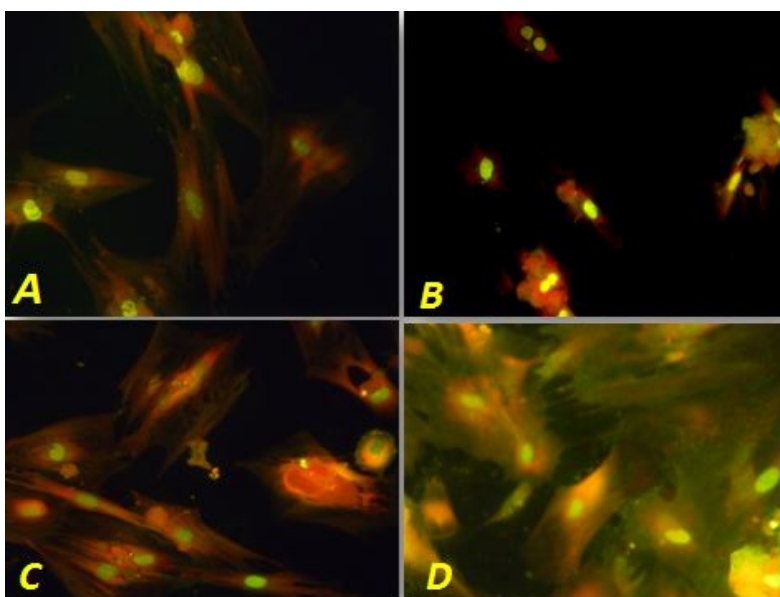
رنگ‌آمیزی آکریدین اورنژ تغییرات رخ داده در سیتوپلاسم و موقعیت هسته و سیتوپلاسم را نسبت به هم نشان داد که طبق نتایج حاصل در گروه‌های کنترل، شکل

گروه کنترل دارد. تیمار با دوزهای 250 نانومولار بیسفنول A سبب کاهش معنادار میزان کلسیم داخل سلولی نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0/05$). تیمار با دوز 30 میکرومولار

میزان کلسیم داخل سلولی: مقایسه نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های مزانشیم مغز استخوان بر طبق گروه‌های ذکر شده در طی روند تمایز 21 روزه اختلاف معناداری با



تصویر 2- رنگ آمیزی فلورسنس هوخست در سلول‌های بنیادی مزانشیم تمایز یافته به استئوبلاست 21 روز پس از تیمار با بیسفنول A و اپی گالوکاتچین گالات. (A) سلول‌های کنترل. (B) سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A (250 نانومولار). (C) سلول‌های تیمار شده با اپی گالوکاتچین - گالات (30 میکرومولار) + بیسفنول A (250 نانومولار). (D) سلول‌های تیمار شده با اپی گالوکاتچین گالات (30 میکرومولار) (20X).



تصویر 3- رنگ آمیزی فلورسنس آکریدین اورانژ در سلول‌های بنیادی مزانشیم تمایز یافته به استئوبلاست 21 روز پس از تیمار با بیسفنول A و اپی - گالوکاتچین گالات. (A) سلول‌های کنترل (B) سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A (250 نانومولار). (C) سلول‌های تیمار شده با اپی گالوکاتچین گالات (30 میکرومولار) + بیسفنول A (250 نانومولار). (D) سلول‌های تیمار شده با اپی گالوکاتچین گالات (30 میکرومولار) (20X).

جدول 3- مقایسه میانگین (\pm SD) میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (U/L) و میزان کلسیم (میلی گرم بر دسی‌لیتر) در نمونه‌های استئوژنیک تیمار شده با بیسفنول A (250 نانومولار)، اپی‌گالوکاتچین گالات (30 میکرومولار) و اپی‌گالوکاتچین گالات (30 میکرومولار) + بیسفنول A (250 نانومولار) با گروه کنترل در 21 روز

| تست | | دوز |
|-------------------------|------------------------|---|
| میزان فعالیت آنزیم U/L | میزان کلسیم (Mg/dl) | |
| 66/37 ^b ±0/8 | 39/1 ^b ±2/2 | کنترل |
| 34/1 ^c ±3 | 23/4 ^c ±0/7 | بیسفنول A (250nm) |
| 68/7 ^b ±2/1 | 42/5 ^b ±1/5 | بیسفنول A (250nm) + اپی‌گالوکاتچین گالات (30µm) |
| 99/5 ^a ±0/7 | 51/6 ^a ±4/5 | اپی‌گالوکاتچین گالات (30µm) |

در جمعیت‌های عادی حدود 0/2-20ng/ml گزارش شده است (19). در goldfish، بیسفنول A به‌طور معناداری مانع فعالیت آلکالین فسفاتاز می‌شود (20). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعداد سلول‌های زنده و توانایی تمایز به استخوان در سلول‌های بنیادی مزانشیم پس از تیمار با بیسفنول A، نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری یافت. همچنین مطالعات دیگر محققین نشان می‌دهد که بیسفنول A به‌طور مستقیم به روی استئوبلاستوزنزیس و استئوکلستوزنزیس در طول پروسه تمایز اثر می‌گذارد (21). بیسفنول A مانع از بیان RANK و متعاقباً مانع از تمایز و بیان فاکتورهای وابسته به حیات می‌شود. بیسفنول A مانع بیان Runx2 و osterix شده و در طی تمایز استئوبلاست با دخالت در مسیر wnt/ β -catenin مانع از تمایز استئوبلاست‌ها و شکل‌گیری استخوان می‌شود. بتاکانتین پروتئینی ضروری برای تمایز استخوان و تنظیم توده استخوانی می‌باشد. در این راستا نتایج دیگر مطالعات نیز تأثیر بیسفنول A را بر کاهش توانایی معدنی شدن سلول‌های استئوبلاست تأیید می‌کند (22). همان‌طور که گفته شد، سطوح استرس اکسیداتیو با میزان تراکم ماتریکس استخوانی رابطه عکس دارد و میزان آنتی‌اکسیدانت‌ها در بیماران استئوپورزیس پائین است (23).

از سوی دیگر نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اپی‌گالوکاتچین گالات در کاهش آثار سمی بیسفنول A بر

اپی‌گالوکاتچین گالات موجب افزایش معنادار میزان رسوب کلسیم داخل سلولی نسبت به گروه کنترل گردید (P<0/05). همچنین در گروه تیمار شده با اپی‌گالوکاتچین- گالات (30 میکرومولار) + بیسفنول A (250 نانومولار) میزان رسوب کلسیم داخل سلولی با گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت (P<0/05). (جدول 3).

میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: مقایسه نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های مزانشیم مغز استخوان برطبق گروه‌های ذکرشده در طی روند تمایز 21 روزه اختلاف معناداری با گروه کنترل دارد. تیمار با دوزهای 250 نانومولار بیسفنول A سبب کاهش معنادار میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نسبت به گروه کنترل شد (P<0/05). تیمار با دوز 30 میکرومولار اپی‌گالوکاتچین- گالات موجب افزایش معنادار بر میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نسبت به گروه کنترل گردید (P<0/05). درحالی‌که گروه تیمار شده با اپی‌گالوکاتچین گالات (30 میکرومولار) + بیسفنول A (250 نانومولار)، از نظر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با گروه کنترل تفاوت معنادار نداشت (جدول 3).

بحث

جمعیت‌های انسانی به‌طور دایم در معرض همیشگی بیسفنول A قرار دارند. بیسفنول A در مواد غذایی، نوشیدنی‌ها و دیگر منابع یافت می‌شود و غلظت سرمی آن

اپی گالوکاتچین گالات با قدرت آنتی اکسیدانی که دارد با احیاء رادیکال‌های آزادگونه اکسیژن، باعث فعال شدن مسیر wnt و متعاقباً افزایش بیان ژن آلکالین فسفاتاز و در نتیجه افزایش میزان فعالیت این آنزیم می‌گردد. علاوه بر این، نتایج ما که شبیه نتایج قبلی بر روی سلول‌های جنینی مغز میانی موش صحرایی بود نشان می‌دهد که بیسفنول A باعث تحریک آپوپتوز در استئوبلاست‌ها به صورت وابسته به دوز می‌شود (33). بر اساس نتایج آزمون MTT نشانه اولیه در سمیت با بیسفنول A بر پایه اختلال در زنجیره تنفسی میتوکندری می‌باشد که باعث آزاد شدن فاکتورهای القاءکننده آپپتوز می‌گردد. این فاکتورها ممکن است باعث قطعه قطعه شدن DNA در هسته سلول شود. افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن منجر به تغییرات مختلفی در سلول به خصوص در متابولیسم سلول می‌گردد (34). مطالعات نشان داده است که حتی در دوزهای پایین و در حد نانومولار بیسفنول A هم اثرات آپپتوتیک خود را به صورت قطعه قطعه شدن DNA از طریق تولید H_2O_2 القاء می‌کند و از طرفی آسیب DNA و تولید ROS وقایعی به موازات هم هستند که به وسیله سمیت بیسفنول A ایجاد می‌شوند و در نهایت می‌توانند باعث کاهش توانایی زیستی سلول‌ها گردند (35).

اما در ساختار اپی گالوکاتچین گالات سه حلقه فنول دیده می‌شود که گروه‌های هیدروکسیل این حلقه‌ها، باعث احیاء رادیکال‌های آزاد و غیرفعالسازی آنها می‌گردد و بدین طریق می‌تواند از کاهش توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم که تحت تأثیر حضور بیسفنول A ایجاد شده است جلوگیری کند و آثار توکسیک این آلاینده را کاهش دهد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک که با پشتیبانی مالی انجام این پروژه تحقیقاتی را امکان‌پذیر نمود.

فاکتورهای تمایزی استئوژنیک نقش مؤثری را ایفا می‌کند. مطالعات ما بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیم نشان داده است که اپی گالوکاتچین گالات باعث افزایش بیان مارکرهای تمایز استئوژنیک، مثل میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز می‌شود (24). آنزیم آلکالین فسفاتاز نقش مهمی در معدنی شدن سیستم اسکلتی و تشکیل استخوان دارد (25). علاوه بر این آنزیم، ژن‌های MMP2، BMP1 و MSX2 نیز در تشکیل و حفظ شبکه استخوانی، افزایش معدنی شدن ماتریکس استخوانی و تمایز استئوبلاست‌ها دخالت دارند (26). همچنین BGN و TGF- β 1 فاکتورهای ضروری در استخوان‌سازی انسان می‌باشند و نقش مهمی در تشکیل استئوبلاست‌ها دارند (27). کلاژن 1 و RunX-2 هم از جمله ژن‌هایی هستند که در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست ضروری می‌باشند و لازم به ذکر است که طبق مطالعات صورت گرفته تأثیر اپی گالوکاتچین گالات در افزایش بیان فاکتورهای مذکور که جزو مهم‌ترین فاکتورهای تمایز به استخوان بودند، به اثبات رسیده است (28 و 29). استوکلسین پروتئینی است که برای معدنی شدن استخوان ضروری است و به واسطه پروتئین Runx-2 (cbfa-1) بیان می‌گردد (30). مطالعات بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیم نشان داد که پروتئین‌های کلاژن 1، استوکلسین و استئوپونین در تشکیل و حفظ ماتریکس خارج سلولی بافت استخوانی ضروری می‌باشند (31). اپی گالوکاتچین-گالات با قدرت آنتی اکسیدانی بالایی که دارد با احیاء رادیکال‌های آزاد گروه اکسیژن باعث برقراری تعادل کلسیم در سلول‌های بنیادی مزانشیم می‌گردد. فرآیند تمایز استئوژنیک وابسته به مسیر سیگنالی wnt می‌باشد که این مسیر سیگنالی در حضور بتاکاتین و فاکتور TCF-LEF باعث فعالسازی ژن آلکالین فسفاتاز می‌گردد. تحقیقات نشان داده است که رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌تواند باعث مهار بیان ژن آلکالین فسفاتاز توسط مسیر wnt شوند (32). نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌کند که

References

1. von Goetz N, Wormuth M, Scheringer M, Hungerbühler K. Bisphenol a: how the most relevant exposure sources contribute to total consumer exposure. *Risk Anal.* 2010;30(3):473-87.
2. Joskow R, Barr DB, Barr JR, Calafat AM, Needham LL, Rubin C. Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants. *J Am Dent Assoc.* 2006;137(3):353-62.
3. Satoh K, Ohyama K, Aoki N, Iida M, Nagai F. Study on anti-androgenic effects of bisphenol a diglycidyl ether (BADGE), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives using cells stably transfected with human androgen receptor, AR-EcoScreen. *Food Chem Toxicol.* 2004;42(6):983-93.
4. Ooe H, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A-induced cell injury by DJ-1. *Toxicol Sci.* 2005;88(1):114-26.
5. Suzuki N, Kambegawa A, Hattori A. Bisphenol A influences the plasma calcium level and inhibits calcitonin secretion in goldfish. *Zoolog Sci.* 2003;20(7):745-8.
6. Baksh D, Davis JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion independent survival and expansion. *Exp Hematol.* 2003; 31(8):۷۲۳-32.
7. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(4): 393-403.
8. Liao S, Kao YH, Hiipakka RA. Green tea: biochemical and biological basis for health benefits. *Vitam Horm.* 2001;62:1-94.
9. Aktas O, Prozorovski T, Smorodchenko A, Savaskan NE, Lauster R, Kloetzel PM, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF-kappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2004;173(9):5794-800.
10. Xie B, Shi H, Chen Q, Ho CT. Antioxidant properties of fractions and polyphenol constituents from green, oolong and black teas. *Proc Natl Sci Counc Repub China B.* 1993;17(2):77-84.
11. Lu H, Meng X, Yang CS. Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(5):572-9.
12. Zheng Y, Lim EJ, Wang L, Smart EJ, Toborek M, Hennig B. Role of caveolin-1 in EGCG-mediated protection against linoleic acid induced endothelial cell activation. *J Nutr Biochem.* 2009;20(3):202-9.
13. Sayama K, Lin S, Zheng G, Oguni I. Effects of green tea on growth, food utilization and lipid metabolism in mice. *In Vivo.* 2000;14(4):481-4.
14. Hegarty VM, May HM, Khaw KT. Tea drinking and bone mineral density in older women. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(4):1003-7.
15. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 1991 ;51(10): 2515-20.
16. Nowyky MC, Thomas AP, Intracellular calcium signaling. *J Cell Sci.* 2012;115(8): 3715-6.
17. Sabokbar A, Millet PJ, Myer B, Rushton N. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone Miner.* 1994;27(1):57-67.
18. Rungby J, Kasse M, Eriksen EF, Danscher G. The von kossa reaction for calcium deposits: silver lactate staining increases sensitivity and reduces background. *Histochem J.* 1993;25(6):446-51.
19. Schonfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal fetal placental unit. *Environ Health Perspect* 2002;110(11):703-7.
20. Suzuki N, Hattori A. Bisphenol A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the cultured scales of goldfish. *Life Sci.* 2003;73(17):237-47.
21. Kyung H, Kwan Hee M, Kyoung Hee Ch, You Cheol H. Bisphenol A reduces differentiation and stimulates apoptosis of osteoclasts and osteoblasts. *Life Sciences.* 2013;93(9):367-72.
22. Naik P, Vijayalaxmi KK. Cytogenetic evaluation for genotoxicity of Bisphenol A in bone marrow cells of Swiss albino mice. *Mut Res.* 2009; 676(2): 106-12.
23. Murphy JM, Frink DG, Hunziker EB, Barry FP. Stem Cell Therapy in a Caprine Model of Osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(12):3467-74.
24. Vali B, Rao LG, EL-Sohemy A. Epigallocatechin 3 gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast like cells. *J Nutr Biochem.* 2007;18(5):341-7.
25. Manduca P, Sanguineti C, Pistone M, Boccignone E, Sanguineti F, Santolini F, et al. Differential expression of alkaline phosphatase in clones of human osteoblast like cells. *J Bone Miner Res.* 1993;8(3):291-300.
26. Yang D, Tsay HJ, Lin SY, Chiou SH, Li MJ. cAMP/PKA regulates osteogenesis, adipogenesis and ratio of RANKL/OPG mRNA expression in mesenchymal stem cells by suppressing leptin. *PLoSone.* 2008;3(2):1540.
27. Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells.* 2002;20(3):249-58.

28. Yun JH, Pang EK, Kim CS, Yoo YJ, Cho KS, Chai JK, et al. Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase 9 and on the formation of osteoclasts. *J Periodontal Res.* 2004;39(52):300-7.
29. Chen CH, Ho ML, Chang JK. Green tea catechins enhance the expression of osteoprotegerin(OPG) in pluripotent stem cells. *J Orthop Surg Taiwan.* 2003;20(3):178-83.
30. Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, et al. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol.* 2001;155(4):157-66.
31. Ducy P, Karsenty G. Two distinct osteoblast specific cisacting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol.* 1995;15(4):1858-69.
32. Chen CH, Ho ML, Chung JK, Hang SH, Wang GJ. Green tea catechin enhances osteogenesis in a bone marrow mesenchymal stem cell line. *Osteoporos Int.* 2005;16(12):2039-45.
33. Liu R, Xing L, Kong D, Jiang J, Shang L, Hao W. Bisphenol A inhibits proliferation and induces apoptosis in micromass cultures of rat embryonic midbrain cells through the JNK, CREB and p53 signaling pathways. *Food Chem Toxicol.* 2013;52(9):76-82.
34. Floros KV, Thomadaki H, Florou D, Talieri M, Scorilas A. Alterations in mRNA expression of apoptosis related genes BCL2, BAX, FAS, caspase 3, and the novel member BCL2L12 after treatment of human leukemic cell line HL60 with the antineoplastic agent etoposide. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1090:89-97.
35. Szymczyk KH, Freeman TA, Adams CS, Srinivas V, Steineck MJ. Active caspase 3 is required for osteoclast differentiation. *J Cell Physiol.* 2006; 209(3):836-44.