فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی۸، جلد۳، شماره ۱،زمستان ۱۳۸۸، صفحه ۱۱ تا صفحه ۱۵

بررسی اثر آسکوربیک اسید (ویتامین C) بر رشد و نمو جوانه اندام حرکتی جنین موش تحت شرایط *in vitro*

کاظم پریور[۱]، هما محسنی کوچصفهانی[۲]، **سیامک یاری**[۳]

۱- استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم.
۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم.
۳- کارشناس ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم. siamak_tmu@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۳۰ **تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۲۵**

چکیده

آسکوربیک اسید (ویتامینC) ، یکی از ویتامین های محلول در آب می باشد که در بیشتر پستانداران به استثنائ پریمات ها و خوکچه هندی در کبد از گلوکز سنتز می شود.این ویتامین نقش اساسی در سنتز پروتئین های ماترکیس خارج سلولی ایفا نموده و یکی از آنتی اکسیدان های مهم می باشد.هدف از این تحقیق بررسی اثرات این ویتامین بر رشد و نمو جوانه اندام حرکتی تحت شرایط *in vitro* است. در روز ۱۱/۵ ، موش های نژاد NMRI حامله کشته شده و جوانه های اندام حرکتی جنین ها ی خارج شده و جدا و تحت عنوان گروه های کنترل، تجربی ۱ و۲ دسته بندی و نمونه های هر گروه باروش Trowell در حالت *in vitro* کشت داده شدند.دوزهای آسکوربیک اسید در این شرایط به ترتیب برای گروه های تجربی ۱ و۲ ، ۵۰ و ۱۰۰میلی گرم بر میلی لیتر می باشند. بررسی های ریخت شناسی و بافت شناسی در گروه های کنترل، تجربی ۱و ۲ به روش های معمول صورت گرفت. در طی این بررسی ها مشخص گردید که رشد طولی در محور پروکسیمال-دیستال در گروه های تجربی ۱و ۲ نسبت به کنترل افزایش وابسته به دوزی داشته وکاهش معنی داری را در تعداد سلول های مزانشیمی ، افزایش تعداد گلبول های قرمز و ازنظر سیتولوژیکی، در ناحیه پروکسیمال کندروسیت های هیپرتروفیک در گروههای تجربی مشاهده شدند.

کلید واژه: آسکوربیک اسید، جوانه اندام حرکتی، کشت اندام، گلبول قرمز، کندروسیت، آنتی اکسیدان.

مقدمه

آسکوربیک اسید (ویتامین C) لاکتون ۶ کربنه‌ای است که در کبد بیشتر گونه‌های پستانداران از گلوکز سنتز می‌شود. سنتز این ویتامین در پریمات‌ها و خوکچه هندی به واسطه عدم حضور آنزیم گونولاکتون اکسیداز صورت نمی‌گیرد. ویتامین C یک دهنده الکترون بوده و عامل احیا کننده می‌باشد. تمامی اعمال فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن به خاطر عملکرد الکترون دهندگی آن قابل توجیه است (۱،۷). ویتامین C برای سنتز کلاژن (ترکیب اصلی ساختار رگ‌های خونی، تاندون‌ها، رباط‌ها و استخوان) ضروری می‌باشد. این ویتامین نقش اساسی در سنتز نوروترانسمیتر نوروایی نفرین ایفا می‌کند. هم چنین در سنتز کارنیتین (مولکول کوچک ناقل چربی به میتوکندری) نقش دارد (۲). ویتامین C هم چنین یک آنتی اکسیدان بسیار موثر بوده و مقادیر کم آن مولکول‌هایی نظیر پروتئین، چربی،کربوهیدرات و اسیدهای نوکلئیک (DNA & RNA) را از تخریب به وسیله رادیکال‌های آزاد که طی متابولیسم نرمال ایجاد می‌شوند، حفاظت می‌کند. این ویتامین باعث سنتز مجدد دیگر آنتی اکسیدانت‌ها نظیر ویتامین E می‌گردد (۳). ویتامین C در درمان بیماری‌هایی نظیر اسکوروی، مسمومیت سرب و

www.SID.ir

دیابت نقش موثری دارد. در اسکوروی بافت‌های کلاژنی آسیب‌پذیری زیادی پیدا نموده و این ویتامین می‌تواند در درمان بیماری به علت اهمیت آن در سنتز کلاژن، سنتز نوراپی نفرین و کارنیتین در کاهش علائم خستگی حاصل از این بیماری نقش ایفا نماید. این ویتامین با کاهش جذب سرب از روده باعث کاهش مسمومیت سرب می‌شود. هم چنین با کاهش سطح LDL خون و نیز اتساع عروق باعث کاهش فشار خون و بیماری‌های کرونری قلبی ایجاد شده توسط دیابت می‌گردد (۱). با توجه به نقش ویتامین C به عنوان آنتی اکسیدان و نقش آن در تولید پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی هدف از این تحقیق بررسی اثر آسکوربیک اسید (ویتامین C) بر رشد و نمو جوانه اندام حرکتی جنین موش تحت شرایط *in vitro* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ترکیبات شیمیایی

آسکوربیک اسید مورد استفاده به صورت ال- آسکوربیک اسید با فرمول شیمیایی $C_6H_8O_6$ از شرکت مرک به صورت بلورهای ریز سفید رنگی با وزن مولکولی ۱۷۶/۱۲ و نقطه ذوب ۱۹۲-۱۹۰ درجه سانتی‌گراد تهیه گردید.

حیوانات

در این تحقیق از موش نژاد NMRI به علت نزدیک بودن ویژگی‌ها و مراحل تکوینی این پستاندار با انسان به عنوان مدل حیوانی و نیز داشتن قدرت زاد و ولد سریع‌تر این نژاد موش نسبت به سایر نژادها استفاده شد. به علت این‌که تجربیات ما بر روی جنین‌ها انجام شده است قدرت زاد و ولد، فاکتور مناسبی در انتخاب مدل حیوانی مناسب می‌باشد. مدل حیوانی مورد استفاده در شرایط طبیعی از نظر درجه حرارت، تغذیه و نور قرار گرفتند. از آن جایی که در این تحقیق بررسی بر روی جنین موش‌ها صورت می‌گیرد، موش‌های نر و ماده به نسبت ۱به ۳، جفت و هر روز ساعت ۶ الی ۸ صبح موش‌های ماده مورد بررسی قرار گرفتند. روز رویت vaginal plug روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. بعد از رویت vaginal plug و تعیین روز صفر حاملگی، در روز۱۱/۵ حاملگی، موش‌های باردار به روش cervical dislocation کشته و در شرایط استریل جنین‌ها از رحم خارج و اندام‌های حرکتی جلویی آن‌ها جدا شدند پس از جدا شدن، اندام‌های حرکتی به سه گروه تقسیم و در محیط کشت EMEM با روش Trowell کشت داده شدند.

الف) گروه کنترل: ظروف کشت حاوی محیط کشت EMEM بود.

ب) گروه تجربی۱: ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آسکوربیک اسید به محیط کشت افزوده شد.

ج) گروه تجربی۲: ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آسکوربیک اسید به محیط کشت افزوده شد.

بعد از گذشت دو روز از کشت اندام‌های حرکتی، طول و عرض آن اندازه‌گیری و برای بررسی‌های بافت‌شناسی و ریخت‌شناسی به تثبیت کننده بوئن منتقل و پس از تهیه بافت و رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین- ائوزین توسط میکروسکوپ نوری و استریو میکروسکوپ مشاهده گردید.

تحلیل آماری

نتایج آزمایش‌ها با استفاده از نرم افزار SPSSو روش آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفتند، نمودارهای مورد نیاز، توسط نرم افزار Excell رسم گردید.

نتایج

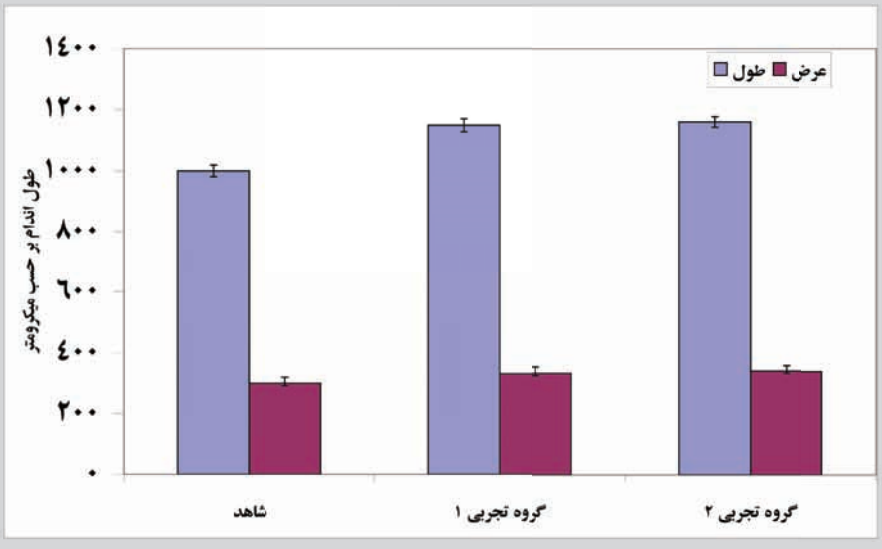
در این تحقیق شاخص‌های مختلفی از جمله: طول کل اندام حرکتی، عرض کل اندام حرکتی، تعداد سلول‌های غضروفی، تعداد سلول‌های مزانشیمی، تعداد گلبول‌های قرمز و تعداد سلول‌های دژنره از دید آماری و هم چنین تغییرات فنوتیپی سلول‌های غضروفی به لحاظ ظاهری در دو منطقه جوانه‌ی اندام حرکتی (منطقه ۱: انگشتان تا مچ، منطقه ۲: ساعد و بازو) مورد بررسی قرار گرفت. طول و عرض کل جوانه اندام حرکتی جلویی در گروه‌های تجربی ۱و ۲ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد (به ترتیب $p<0/05$ و$p<0/01$) (نمودار ۱و

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱). شمارش بعد از تهیه مقاطع هیستولوژیکی و رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین – ائوزین انجام گرفت. بررسی‌های آماری نشان داد که تعداد سلول‌های غضروفی در هر دو منطقه در گروه‌های تجربی۱و۲ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته (به ترتیب $p<۰/۰۵$ و$p<۰/۰۱$) و تعداد سلول‌های مزانشیمی در منطقه یک جوانه اندام حرکتی در گروه تجربی ۱و۲ نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشته و در منطقه دو تعداد سلول‌های مزانشیمی در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد، ولی در گروه تجربی۲ نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری مشاهده شده است ($p<۰/۰۵$). تعداد سلول‌های دژنره در منطقه ۱ و ۲ جوانه اندام حرکتی جلویی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد. بررسی آماری تعداد گلبول‌های قرمز مشخص نمود که در منطقه ۱ جوانه اندام حرکتی در گروه تجربی ۱و ۲ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد (به ترتیب $p<۰/۰۱$ و $p>۰/۰۰۱$). در منطقه ۲ تعداد گلبول‌های قرمز در گروه‌های تجربی ۱ و۲ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (به ترتیب $p<۰/۰۵$ و $p<۰/۰۱$) (جدول۱و شکل ۲).

بررسی‌های فنوتیپی نشان داده که سلول‌های غضروفی در ناحیه پروکسیمال جوانه اندام حرکتی دارای ابعاد بزرگتری بوده و هیپرتروفی شدیدی در گروه‌های تجربی نسبت به کنترل مشاهده شده است.



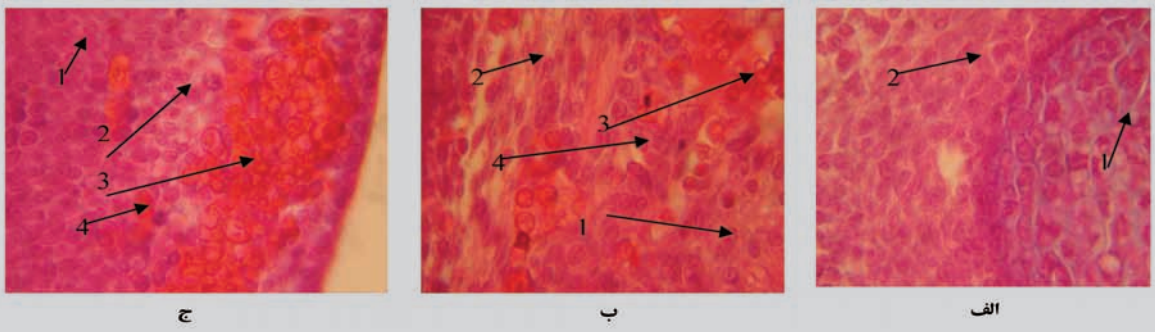
نمودار ۱- میانگین و انحراف از معیار طول اندام‌های حرکتی جلویی

جدول ۱- میانگین و اختلاف از معیار شاخص سلولی جوانه حرکتی

اندام	منطقه ۱			منطقه ۲		
	شاهد	گروه تجربی ۱	گروه تجربی ۲	شاهد	گروه تجربی ۱	گروه تجربی ۲
سلول‌های غضروفی (تعداد)	۶۰±۱۲/۴	۷۹±۶/۷	۸۴/۵±۱۳/۱	۴۴/۳±۱۲/۶	۶۰±۷/۶	۶۸/۴±۱۵/۳
سلول‌های مزانشیمی (تعداد)	۶۱/۲±۷/۳	۵۸/۶±۶/۹	۴۰±۷/۶	۸۹/۸±۱۵/۳	۸۰±۱۰/۳	۶۹/۵±۱۸/۵
سلول‌های دژنره (تعداد)	۴/۳۵±۱/۴	۶±۰/۹۹	۶/۴۳±۰/۴	۵±۰/۹۸	۶±۱/۰۲	۶/۴±۲/۰۱
سلول‌های قرمز (تعداد)	۱۲/۲۵±۰/۹۸	۱۸/۴۴±۱/۲۴	۲۰±۱/۳۱	۹±۱/۴	۱۴/۶۵±۰/۸۷	۱۵±۰/۶۹

SID
www.SID.ir

شکل ۱- فتو میکروگراف مقاطع مختلف جوانه اندام حرکتی ۱۳/۵ روزه (بزرگنمایی میکروسکوپی ٤٥ ×)
الف) کنترل، ب) تجربی ۱، ج)تجربی ۲



شکل ۲- مقاطع میکروسکوپی بافت اندام حرکتی ۱۳/۵ روز با بزرگنمایی میکروسکوپی(۱۱۲۵x)
الف) کنترل، ب)تجربی ۱، ج) تجربی ۲ (-۱ سلول غضروفی، ۲- سلول مزانشیمی، ۳- گلبول قرمز، ٤-سلول دژنره)

بحث و نتیجه‌گیری

از آن جا که شروع تشکیل جوانه اندام حرکتی جلویی جنین موش در روز ۹/۵ رشد و نمو جنینی و جوانه اندام حرکتی عقبی در روز ۱۰ رشد و نمو جنینی می‌باشد (۱) به این دلیل روز ۱۱/۵ جنینی به عنوان روز جداسازی جوانه از بدن جنین و شروع آنکو باسیون آن در محیط کشت انتخاب گردید. در این تحقیق تعداد سلول‌های غضروفی افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. آسکوربیک اسید به روش‌های مختلفی باعث افزایش تکثیر سلول‌های مختلف از جمله کندروسیت‌ها، رسپتورهای کلاژن یا اینتگرین‌ها می‌گردد. اینتگرین‌ها باعث القای سیگنال‌ها از ماتریکس خارج سلولی به اجزای داخل سلولی شده و باعث تکثیر و تمایز دودمان‌های مختلف سلولی از طریق مسیرهای signaling داخل سلولی می‌شود (۸).

افزودن ۰/۲ میلی مول سدیم آسکوربات باعث افزایش سنتز DNA به وسیله کندروسیت‌های مفصلی شده و افزایش سنتز DNA با اندازه گیری میزان شرکت 3H-thy-midinne رادیواکتیو در ساختار DNA کندروسیت‌های مفصلی خرگوش در شرایط کشت اندام و کشت سلولی قابل استناد است. این تاثیر با افزایش مدت زمان کشت به میزان ۸روز کاهش پیدا می کند. البته در شرایط کشت اندام قطعات جدا شده از مفاصل خرگوش‌های نابالغ (۳ ماهه) بهتر از خرگوش‌های ۲ الی ۳ ساله به شرایط آزمایشگاهی پاسخ می‌دهند(۶). هم چنین این ویتامین باعث افزایش سنتز 1,2,5-dihydroxy vitamin D_3 و باعث افزایش تعداد رسپتورهای ویتامین D_3 می‌گردد. این ویتامین باعث بر هم کنش بین اینتگرین‌ها و پروتئین‌های ماتریکس غضروف که حاوی RGD هستند، گشته و باعث پیشبرد تمایز کندروسیت‌ها می‌گردد (۳،۴). افزایش طول اندام حرکتی را نیز می‌توان با افزایش تعداد سلول‌های غضروفی

Archive
www.SID.ir

و افزایش ابعاد آن‌ها توجیه کرد. هم‌چنین در این تحقیق تعداد گلبول‌های قرمز موجود در اندام افزایش یافت. کارهای Johnston و همکارانش درسال۱۹۹۳ مشخص نموده که آسکوربیک اسید با افزایش میزان گلوتاتیون گلبول‌های قرمز خون باعث افزایش میزان آن‌ها می‌گردد، گلوتاتیون احیا شده به عنوان یک آنتی اکسیدانت ساختارهای سلولی را در برابر اکسیداسیون حمایت می‌کند. کاهش غلظت گلوتاتیون همراه با تخریب سلولی، موجب سرکوب ایمنی بدن و پیری می‌گردد(۵).

بررسی‌های Zan و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در تایید این مطلب نشان داد که افزودن آسکوربیک اسید به ظروف محتوی خون باعث افزایش غلظت شاخص‌هایی چون ATP و کاهش یون پتاسیم (K^+) موجود در محلول گشته و نیز غلظت رادیکال سوپر اکسید را به میزان زیادی کاهش می‌دهد (۸). همه مشاهدات فوق تاثیر آنتی اکسیدانتی آسکوربیک اسید بر گلبول‌های قرمز و در نتیجه، افزایش دوام و عمر آن‌ها را تایید می‌کند. کاهش سلول‌های مزانشیمی نیز بدین نحو توجیه می‌شود که این سلول‌ها به سلول‌های غضروفی تمایز می‌یابند در نتیجه تعداد آن‌ها در مقاطع بافتی کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند. به طور خلاصه تاثیرات آسکوربیک اسید بر روی مشخصه‌های مورد بررسی وابسته به دوز می‌باشد.

منابع

۱- پریور، کاظم.، محسنی کوچصفهانی، هما. ۱۳۷۲. اطلس جنین‌شناسی و جنین‌شناسی تجربی. انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه تربیت معلم تهران.

2.Carr, A.C., Frei, B. (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. Am J Clin Nutr, 69(6),1086-1107

3.Clark, E., Brugge, J. (1995). Integrins and signal transduction pathways : the road cekk, 69, 11-25.

4.Farquharson, C., Berry, J.L., Mawer, E.B., Seawright, E., Whitehead, C.C. (1998). Ascorbic acid- induced chondrocyte terminal differentiation : the role of the extracellular matrix and 1, 25- dihydroxy vitamin D. Eur J Cell Biol, 110-118.

5.Johnston, C.S., Claudia, G., Meyer, A., Srilakshmi, J.C. (1993). Vitamin C elevates red blood cell glutathione in healthy adults. Am J Clin Nutr, 588, 103-102.

6.Padayatty, J.S., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee J, Hyuk., and et al. (2003). Vitamin C as an antioxidant : Evaluation of its role in disease prevention. Journal of American college of nutrition, 22 (1), 18-35.

7.Simon, J.A., Hudes, E.S. (2000). Serum ascorbic acid and gallbladder disease prevalence among US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). Arch Intern Med, 160(7),931-936.

8. Zan, T., Tao, J., Tang, R.C., Liu, y., Huang, B., Zhou, J.Y., and et al. (2005). Effect of vitamin C antioxidative protection on human red blood cells, 13 (6), 1106.

Archive of SID

www.SID.ir