

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

شماره پیاپی ۸، جلد ۳، 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 (ویتامین C)، یکی از ویتامین های محلول در آب می باشد که در بیشتر پستانداران به استثنای پریمات ها و خوکیه 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 های خارج شده و جدا و تحت عنوان گروه های کنترل، تجربی ۱ و ۲ 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 و ۲، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر می باشند. بررسی های ریخت شناسی و بافت شناسی در گروه های کنترل، تجربی ۱ و 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 ۱ و ۲ نسبت به کنترل افزایش وابسته به دوزی داشته و کاهش معنی داری را در تعداد سلول های مزانشیمی، افزایش تعداد گلبول های قرمز و از نظر سیتولوژیکی، در ناحیه پروکسیمال کندروسیت های هیپرتروفیک در گروه های تجربی مشاهده شدند.

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

مقدمه

در سنتز نوروترانسمیتر نوروپی نفرین ایفا می کند. 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 مولکول هایی نظیر پروتئین، چربی، کربوهیدرات و اسیدهای نوکلئیک (DNA & RNA) را از تخریب به وسیله رادیکال های آزاد که طی متابولیسم نرمال ایجاد می شوند، حفاظت می کند. این ویتامین باعث سنتز مجدد دیگر آنتی اکسیدانت ها نظیر ویتامین E می گردد (۳). ویتامین C در درمان بیماری هایی نظیر اسکوروی، مسمومیت سرب و

آسکوربیک اسید (ویتامین C) لاکتون ۶ کربنه ای است که در کبد بیشتر گونه های پستانداران از گلوکز سنتز می شود. سنتز این ویتامین در پریمات ها و خوکیه هندی به واسطه عدم حضور آنزیم گونولاکتون اکسیداز صورت نمی گیرد. ویتامین C یک دهنده الکترون بوده و عامل احیا کننده می باشد. تمامی اعمال فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن به خاطر عملکرد الکترون دهنده گی آن قابل توجیه است (۱،۷). ویتامین C برای سنتز کلاژن (ترکیب اصلی ساختار رگ های خونی، تاندون ها، رباط ها و استخوان) ضروری می باشد. این ویتامین نقش اساسی

صفر حاملگی، در روز ۵/۱۱ 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 تجربی ۱: ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آسکوربیک اسید به محیط کشت افزوده شد.

ج) گروه تجربی ۲: 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 SPSS و روش آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند، 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 ۱ و ۲ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد (به ترتیب $p < 0/05$ و $p < 0/01$) (نمودار ۱ و

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 آنتی‌اکسیدان 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.

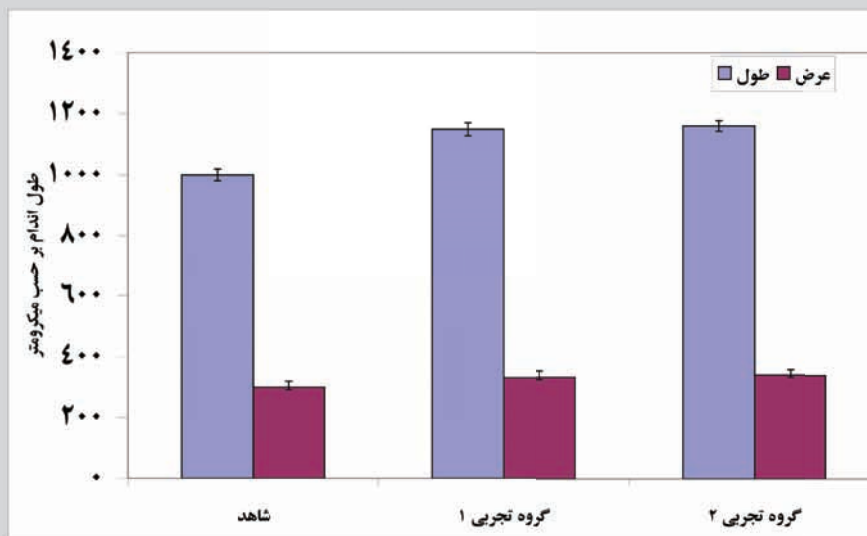
حیوانات

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 این که 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 ۱ به 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

شکل ۱). شمارش بعد از تهیه مقاطع هیستولوژیکی و رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین-ائوزین انجام گرفت. بررسی های آماری نشان داد که تعداد سلول های غضروفی در هر دو منطقه در گروه های تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشته (به ترتیب $p < 0/05$ و $p < 0/01$) و تعداد سلول های مزانشیمی در منطقه یک جوانه اندام حرکتی در گروه تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری نداشته و در منطقه دو تعداد سلول های مزانشیمی در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری نشان نمی دهد، ولی در گروه تجربی ۲ نسبت به کنترل کاهش معنی داری مشاهده شده است ($p < 0/05$). تعداد سلول های دژنره در منطقه ۱ و ۲

جوانه اندام حرکتی جلویی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری نشان نداد. بررسی آماری تعداد گلبول های قرمز مشخص نمود که در منطقه ۱ جوانه اندام حرکتی در گروه تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری نشان می دهد (به ترتیب $p < 0/01$ و $p > 0/001$). در منطقه ۲ تعداد گلبول های قرمز در گروه های تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان می دهد (به ترتیب $p < 0/01$ و $p < 0/05$) (جدول ۱ و شکل ۲).

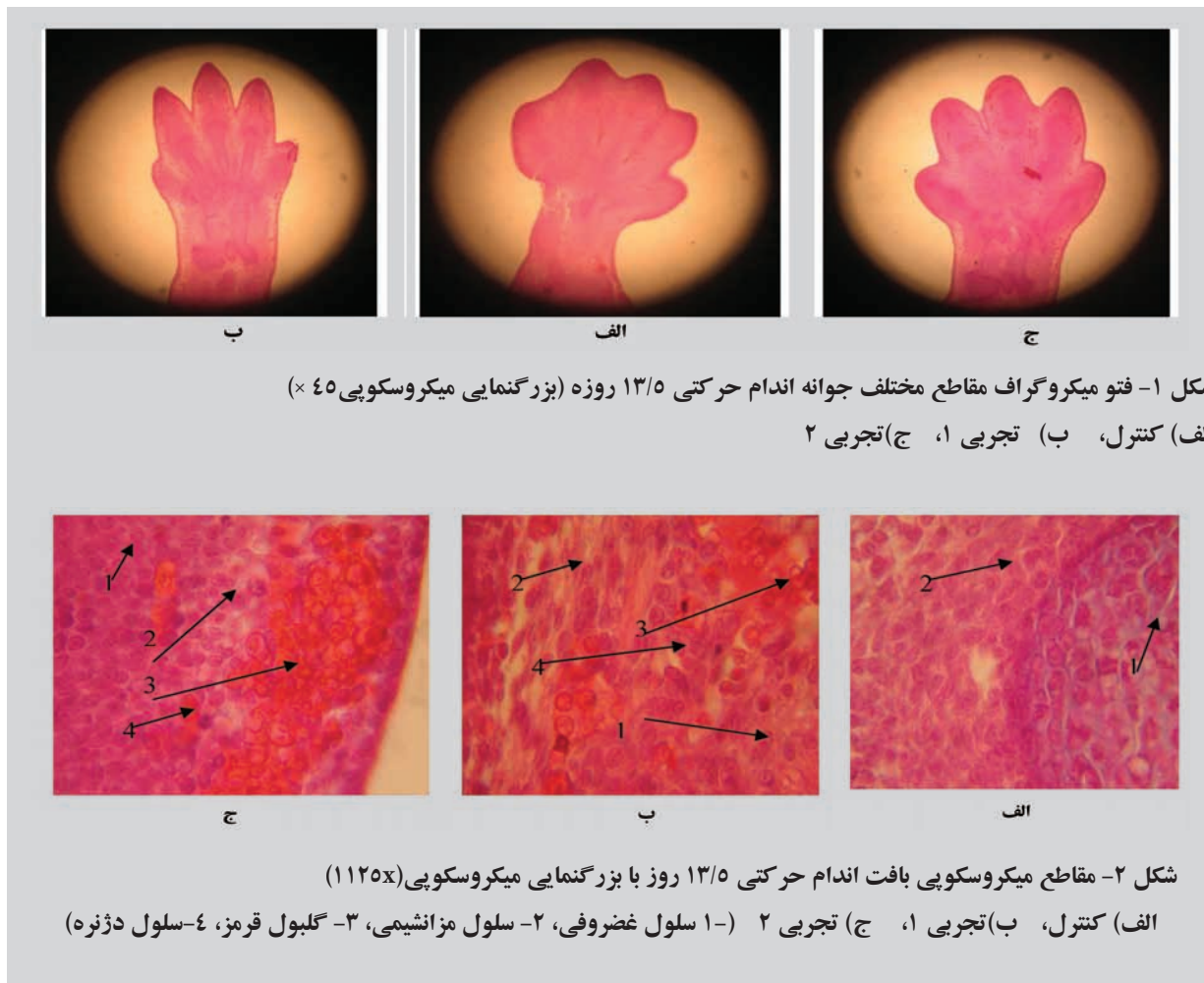
بررسی های فوتویی نشان داده که سلول های غضروفی در ناحیه پروکسیمال جوانه اندام حرکتی دارای ابعاد بزرگتری بوده و هیپرتروفی شدیدی در گروه های تجربی نسبت به کنترل مشاهده شده است.



نمودار ۱- میانگین و انحراف از معیار طول اندام های 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
سلول های غضروفی (تعداد)	۶۰±۱۲/۴	۷۹±۶/۷	۸۴/۵±۱۳/۱	۴۴/۳±۱۲/۶	۶۰±۷/۶	۶۸/۴±۱۵/۳
سلول های مزانشیمی (تعداد)	۶۱/۲±۷/۳	۵۸/۶±۶/۹	۴۰±۷/۶	۸۹/۸±۱۵/۳	۸۰±۱۰/۳	۶۹/۵±۱۸/۵
سلول های دژنره (تعداد)	۴/۳۵±۱/۴	۶±۰/۹۹	۶/۴۳±۰/۴	۵±۰/۹۸	۶±۱/۰۲	۶/۴±۲/۰۱
سلول های قرمز (تعداد)	۱۲/۲۵±۰/۹۸	۱۸/۴۴±۱/۲۴	۲۰±۱/۳۱	۹±۱/۴	۱۴/۶۵±۰/۸۷	۱۵±۰/۶۹



بحث و نتیجه گیری

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 می باشد (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 سلول های غضروفی افزایش معنی داری را نشان می دهد. آسکوربیک اسید به روش های مختلفی باعث افزایش تکثیر سلول های مختلف از جمله کندروسیت ها، رسپتورهای کلاژن یا اینتگرین ها می گردد. اینتگرین ها باعث القای سیگنال ها از ماتریکس خارج سلولی به اجزای داخل سلولی شده و باعث تکثیر و تمایز دودمان های مختلف سلولی از طریق مسیرهای signaling داخل سلولی می شود (۸).

افزودن ۰/۲ میلی مول سدیم آسکوربات باعث افزایش

سنتر DNA به وسیله کندروسیت های مفصلی شده و افزایش سنتر DNA با اندازه گیری میزان شرکت 3H-thy- midinne رادیواکتیو در ساختار DNA کندروسیت های مفصلی خرگوش در شرایط کشت اندام و کشت سلولی قابل استناد است. این تاثیر با افزایش مدت زمان کشت به میزان ۸ روز کاهش پیدا می کند. البته در شرایط کشت اندام قطعات جدا شده از مفاصل خرگوش های نابالغ (۳ ماهه) بهتر از خرگوش های ۲ الی ۳ ساله به شرایط آزمایشگاهی پاسخ می دهند (۶). هم چنین این ویتامین باعث افزایش سنتر 1,2,5-dihydroxy vitamin D₃ و باعث افزایش تعداد رسپتورهای ویتامین D₃ می گردد. این ویتامین باعث برهم کنش بین اینتگرین ها و پروتئین های ماتریکس غضروف که حاوی RGD هستند، گشته و باعث پیشبرد تمایز کندروسیت ها می گردد (۴،۳). افزایش طول اندام حرکتی را نیز می توان با افزایش تعداد سلول های غضروفی

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 اکسیدانتهی 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.

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.

و افزایش ابعاد آنها توجیه کرد. هم‌چنین در این تحقیق تعداد گلبول‌های قرمز موجود در اندام افزایش یافت. کارهای Johnston و همکارانش در سال ۱۹۹۳ مشخص نموده که آسکوربیک اسید با افزایش میزان گلوبوتاتیون گلبول‌های قرمز خون باعث افزایش میزان آنها می‌گردد، گلوبوتاتیون احیا شده به عنوان یک آنتی اکسیدانت ساختارهای سلولی را در برابر اکسیداسیون حمایت می‌کند. کاهش غلظت گلوبوتاتیون 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

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.,

