

## مطالعه اثر همزمان اپی گالوکاتچین گالات و بیسفنول A بر مورفولوژی و قدرت زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرایی در شرایط آزمایشگاهی

بیان لطفی<sup>۱</sup>، ملک سلیمانی مهرنجانی<sup>۲</sup>، مجید مهدیه<sup>۳</sup>

۱. کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی- تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران (مؤلف مسؤل)، تلفن ثابت: ۰۸۷-۳۵۵۳۷۰۰۸،

Bayanlotfi@yahoo.com

۲. دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

۳. استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** آلاینده های زیست محیطی مانند بیسفنول A، علاوه بر مشکلات زیست محیطی، سلامت انسان را نیز تحت تاثیر قرار می دهد. اپی گالوکاتچین گالات به عنوان یک آنتی اکسیدان، موجب محافظت سلول‌ها در محیط کشت سلولی می شود. اما هنوز اثر آن بر سمیت القاء شده توسط بیسفنول A بر سلول‌های بنیادی مزانشیم مشخص نشده است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی نقش حفاظتی اپی گالوکاتچین گالات بر این سلول‌ها به دنبال تیمار با بیسفنول A (القاء کننده استرس - اکسیداتیو) بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در شرایط استریل با روش فلشینگ استخراج و در محیط کشت کامل (DMEM حاوی ۱۵٪ FBS و 100 U/ml پنی سیلین / استرپتومایسین) کشت داده شد. پس از پایان پاساژ سوم سلول‌ها به ۴ گروه کنترل، تیمار با بیسفنول A، اپی گالوکاتچین گالات + بیسفنول A و اپی گالوکاتچین گالات تقسیم و برای مدت ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت تیمار شد. در پایان قدرت حیات، مورفولوژی سلولی، کلسیم داخل سلولی، و میزان تخریب DNA سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه تحلیل و تفاوت میانگین‌ها در سطح  $P < 0/05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

**نتایج:** بیسفنول A موجب کاهش معنی دار توانایی زیستی و کلسیم داخل سلولی شد. همچنین تغییرات مورفولوژیک مانند تخریب DNA و تغییر سیتوپلاسم در گروه تیمار شده با بیسفنول A مشاهده گردید. اپی گالوکاتچین گالات موجب تغییر این پارامترها در گروه بیسفنول A + اپی گالوکاتچین گالات در حد گروه کنترل شد.

**نتیجه گیری:** اپی گالوکاتچین گالات می تواند نقش حفاظتی در مقابل آثار سمی کاربرد بیسفنول A در سلول‌های بنیادی مزانشیم داشته باشد.

**کلمات کلیدی:** بیسفنول A، اپی گالوکاتچین گالات، سلول‌های بنیادی مزانشیم.

وصول مقاله: ۹۲/۷/۲۹ اصلاحیه نهایی: ۹۳/۴/۲۲ پذیرش: ۹۳/۶/۳

## مقدمه

سلول‌های بنیادی از لحاظ منشا به دو دسته عمده سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغین تقسیم می‌شوند. محدودیت موجود در کاربرد سلول‌های تمایز یافته بالغ و سلول‌های بنیادی جنینی در پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت، بررسی امکان استفاده از سلول‌های بنیادی بالغ و القای پرتوانی در آن و یا سلول‌های تمایز یافته بالغ را به عنوان جایگزین‌های مناسب در مباحث سلول درمانی مطرح ساخت (۱). از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغین که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیم اشاره کرد (۲). بیسفنول A ترکیبی آلی بوده و حاوی دو گروه فنول می‌باشد. این ماده جزئی از ساختار چندین پلیمر مهم است (۳). بیسفنول A که با تولید سالیانه ۲-۳ میلیون تن، مونومری مهم در تولید پلی‌کربنات است، برای اولین بار در سال ۱۸۹۱ شناخته شد. این ماده از تغلیظ استون بدست می‌آید و این واکنش توسط اسید کاتالیز می‌شود (۴). بیسفنول A در صنایع پلاستیک سازی، چرم سازی، کاغذسازی و غیره استفاده می‌گردد، که بدنبال آن پساب این صنایع موجب آلودگی آب‌های سطحی و زیرزمینی به بیسفنول A می‌گردد (۵). پس بیسفنول A با خاصیت استروژنیک به عنوان آلاینده زیست محیطی مطرح بوده است (۶). هدف اصلی بیسفنول A در درون سلول میتوکنندری می‌باشد که مرکز تشکیل رادیکال‌های آزاد گونه اکسیژن فعال است، بیسفنول A باعث آسیب به میتوکنندری شده که در نتیجه آن انرژی کمتر و ROS بیشتری تولید می‌شود و به علت عدم توازن بین رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدانت‌ها، استرس اکسیداتیو بروز می‌کند (۷). گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که بیسفنول A می‌تواند موجب مرگ برنامه‌ریزی شده در بسیاری از سلول‌ها، هم در موجود زنده و هم در آزمایشگاه شود (۸). آنتی‌اکسیدانت‌ها ترکیباتی هستند که در جلوگیری از بسیاری واکنش‌های اکسایشی که بوسیله رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود، از

طریق جلوگیری کردن یا به تأخیر انداختن زیان سلول‌ها و بافت‌ها کمک می‌کنند (۹) و از آنجایی که برگ سبز چای، همه آنزیم‌ها، واسطه‌های متابولیکی و عناصر ساختاری که معمولاً از طریق رشد و فتوسنتز در گیاه تجمع می‌یابند را در بردارد به عنوان آنتی‌اکسیدانی مهم مطرح می‌باشد (۱۰). چای سبز حاوی کافئین، کاتچین، پلی‌فنول، ویتامین‌های E، B، C، فلاونوئیدها، گلیکوپروتئین، فیبر، لیپید و کارتنوئیدهاست (۱۱). کاتچین‌ها در دسته پلی‌فنول‌ها هستند و تا کنون ۴ نوع کاتچین اصلی در برگ چای سبز شامل اپی‌گالوکاتچین‌گالات (EGCG)، اپی‌کاتچین‌گالات (ECG)، اپی‌گالوکاتچین (EGC) و اپی‌کاتچین (EC) شناسایی شده است (۱۲). اپی‌گالوکاتچین گالات یک ترکیب اصلی پلی‌فنولی چای سبز است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطان و ضدموثاژن دارد (۱۳). اپی‌گالوکاتچین‌گالات به وسیله نقش آنتی‌اکسیدانی خود می‌تواند با رادیکال‌های آزاد برای مثال رادیکال‌های آزاد پروکسیدیل واکنش داده و یک هیدروژن به آنها داده و رادیکال‌ها را به فرم پایدار تبدیل می‌کند، در محیط کشت حاوی اپی‌گالوکاتچین‌گالات در مقایسه با محیط کشت فاقد آن افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیم انسان گزارش شده است (۱۳). از میان رده‌های سلولی مختلف سلول‌های بنیادی مزانشیم انتخاب شد، زیرا سلول‌های بنیادی مزانشیم سلول‌هایی با قدرت تکثیر بالا بوده که به راحتی تخلیص می‌شوند، از آنجا که این سلول‌ها در مجاورت خون محیطی می‌باشند (۱۴)، احتمال تماس با آلاینده‌ها از جمله بیسفنول A در مورد آنها زیاد است و می‌توان همزمان از یک آنتی‌اکسیدانت برای خنثی کردن اثر سمی بیسفنول A استفاده کرد. با توجه به اینکه تا کنون اثر همزمان بیسفنول A و اپی‌گالوکاتچین‌گالات بر قدرت زیستی، مورفولوژی سلول‌های مزانشیم مغز استخوان مطالعه نشده است، در مطالعه حاضر اثرات همزمان بیسفنول A و اپی‌گالوکاتچین‌گالات بر پارامترهای ذکر شده در

چسبندگی، سلول‌های استخراج شده به سلول‌های استخوانی و چربی نیز تمایز داده شد (۱۵). سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت پس از پاساژ سوم در پلیت ۶ خانه کشت و بعد از چسبیدن به کف ظرف با محیط کشت DMEM حاوی  $FBS^+$  (FBS) به همراه منیزیوم و کلسیم کلرید) و ترکیبات تمایزی استئوژنیک (بتا- گلیسرول فسفات، دگزامتازون و آسکوربیک اسید) و آدیپوژنیک (بتا گلیسرول فسفات، ایندومتاسین و آسکوربیک اسید) به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن تیمار شد. بعد از این مدت سلول‌ها توسط رنگ آلیزارین رد (برای استئوبلاست) و اوایل رد (برای آدیپوسیت) رنگ آمیزی شد.

#### غلظت یابی :

سلول‌های پاساژ سوم مورد شمارش قرار گرفت و تعداد ۵۰۰۰ سلول (در تمام مراحل مطالعه همین تعداد سلول مورد استفاده قرار گرفت) به ازای هر خانه یک پلیت ۱۲ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت در معرض تیمار با غلظت‌های مختلف بیسفنول A (۰، ۱، ۴، ۶، ۱۰، ۱۵ میکرومولار) (۱۸-۱۶)، برای مدت زمان ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت تیمار شد و برای سنجش توانایی حیات سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A از روش متیل تiazول تترازولوم (Methyl Thiazol Tetra) (Zolium-MTT) استفاده شد. در روش متیل تiazول تترازولوم، سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری توانایی احیای رنگ زرد دی متیل تiazول دی فنیل تترازولوم را به بلورهای ارغوانی و نامحلول فورمازان دارد. پس از زمان‌های مذکور، ۱۰ میکرولیتر متیل تiazول تترازولوم به ازای ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. سپس بلورهای فورمازان حاصل در دی‌متیل سولفوکساید حل و جذب آن توسط دستگاه ELISA reader (diagnostic, Germany SCo) در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید. تعداد سلول‌های زنده پس از رسم گراف استاندارد با استفاده از فرمول جذب  $R_2 = 0.996$  و  $Y = 0.016X + 0.037$  در جاییکه Y جذب

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

#### روش بررسی

**استخراج و تیمار سلول‌ها:** در این مطالعه تجربی از ۱۰ سر رت نر نژاد ویستار با سن ۵۰ روز و وزن  $20 \pm 140$  گرم استفاده شد. حیوانات مورد استفاده در این پژوهش پس از خریداری از انستیتو پاستور در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط دمایی  $27 \pm 3$  درجه سانتیگراد و با دسترسی به غذا و آب در قفس‌های پلی اتیلن نگهداری شد، لازم بذکر است پیش از آغاز مطالعه مجوزهای لازم جهت استفاده از این حیوان آزمایشگاهی از کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه اراک اخذ شد. برای استخراج و خالص سازی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان ران و ساق رت پس از بیهوشی با دی اتیل اتر توسط جراحی جدا و تحت شرایط استریل، مغز استخوان توسط ۳ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, Germany)، حاوی ۱۵ درصد FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, Germany) و پنی سیلین / استرپتومایسین (Gibco, Germany) در لوله فالکون ۱۵ میلی لیتری فلش اوت شد، لوله فالکون با ۲۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و رسوب سلولی حاصل با یک میلی لیتر محیط کشت هموژن و به فلاسک ۲۵ میلی لیتری منتقل گردید. بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌های چسبیده به فلاسک با بفر فسفات مثبت (حاوی کلسیم و منیزیوم) شسته و محیط کشت تازه اضافه شد. به سلول‌ها ۱۰ تا ۱۴ روز فرصت برای تکثیر داده شد، در طی این مدت هر سه روز یکبار محیط کشت تعویض شد، بعد از پر شدن کف فلاسک کشت سلول‌ها با تریپسین - اتیلن دی آمین تتر استیک اسید (Trypsin - EDTA solution ; Sigma) جدا و نیمی از آن در یک فلاسک دیگر کشت داده شد و این کار تا پاساژ سوم تکرار گردید. برای اثبات مزانشیم بودن سلول‌های خالص شده، علاوه بر قابلیت

الکتروفورز، به طور افقی قرار داده شده، الکتروفورز تحت ولتاژ ۲۰ ولت و به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. پس از آن لام‌ها در اتانول قرار گرفته و در معرض هوا خشک شد. رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر انجام گرفت و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت عکس برداری لازم انجام شد.

**بررسی میزان کلسیم داخل سلولی:** کلسیم با کرزول فتالین ایجاد کمپلکسی می‌نماید که در محیط قلیایی، ارغوانی رنگ است و شدت رنگ حاصله متناسب با غلظت کلسیم می‌باشد (۱۹). در این سنجش از کیت کلسیم شرکت درمان کاو استفاده گردید. سلول‌های بنیادی مزانشیم پس از پاساژ سوم در پلیت‌های ۲۴ خانه قرار گرفت و تیمار سلول‌ها در ۴ گروه مذکور انجام گردید. سلول‌ها در گروه‌های جداگانه پس از شست و شو با  $PBS^-$  به کمک اسکرابر و ۵۰ میکرولیتر بافر استخراج کلسیم (HCL ۰/۶ نرمال) از کف پلیت جدا شدند و به اپندورف منتقل شدند. پس از طی مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، به تعداد نمونه‌ها و همچنین نمونه شاهد، ویال محلول بافر انتخاب گردید و به همه ویال‌های مورد نظر ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا اضافه شد. سپس به هر ویال ۳۰ میکرولیتر از نمونه سلولی اضافه گردید و جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (England, T80 + PG instrument ltd) در طول موج ۵۷۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

**آنالیز داده‌ها:** با استفاده از نرم افزار SPSS، از روش آماری آنالیز واریانس دو طرفه و یک طرفه، تست Tukey استفاده شد و تفاوت میانگین‌ها در سطح  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

**توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم بر پایه روش MTT (رنگ سنجی):** داده‌های به دست آمده از روش رنگ آمیزی MTT نشان داد که اثر متقابل و همزمان غلظت مصرفی بیسفنول A و

نمونه و X تعداد سلول‌های زنده می‌باشد، محاسبه گردید. در اینجا غلظت ۶ میکرومولار بیسفنول A انتخاب شد. با توجه به مطالعه نتایج حاصل از غلظت یابی، تیمار با غلظت ۲۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین گالات (Sigma Aldrich) (انتخاب غلظت اپی‌گالوکاتچین گالات بر اساس مطالعات گذشته انتخاب گردید) و ۶ میکرومولار بیسفنول A و زمان ۲۴ ساعت، برای ادامه مطالعه انتخاب شد.

**بررسی مورفولوژی سلول‌ها:** سلول‌های چسبیده به پلیت ۲۴ خانه با غلظت ۲۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین گالات و ۶ میکرومولار بیسفنول A به مدت ۲۴ ساعت در ۴ گروه کنترل، بیسفنول A، اپی‌گالوکاتچین گالات + بیسفنول A و اپی‌گالوکاتچین گالات تیمار شد. سپس رنگ آمیزی کروماتین با هوخست برای مطالعه مورفولوژی هسته، پروپیدیوم آیدواید همراه با هوخست برای تمایز بین سلول مرده و زنده، اکریدین اورانژ برای بررسی مورفولوژی سیتوپلاسم انجام گردید و عکس برداری توسط میکروسکوپ فلورسنس (Olympus IX70) صورت گرفت.

**بررسی میزان تخریب DNA:** به منظور بررسی آسیب دیدگی DNA آزمون کامت یا میکروژل الکتروفورز، در شرایط قلیایی، به شرح زیر انجام شد: سلول‌های چسبیده به پلیت ۲۴ خانه تیمار شده با غلظت ۲۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین گالات و ۶ میکرومولار بیسفنول A به مدت ۲۴ ساعت، در ۴ گروه ذکر شده، تریپسین زنی و با محلول آگارز نقطه ذوب پائین به سوسپانسیون سلولی اضافه شد. سپس سلول‌ها روی لام ریخته و سطح لام‌ها توسط لامل‌های بلند، روکش گردید. لام‌ها به مدت ۲۰ دقیقه به منظور بسته شدن ژل در دمای ۴ درجه قرار داده شد. به منظور لیز کردن سلول‌ها، بعد از جامد شدن ژل لامل‌ها برداشته شده و لام‌ها به مدت ۲ ساعت در جار حاوی محلول لیز کننده (محلول حاوی NaCl, Tris base, EDTA و NaSLS) قرار داده شدند. پس از شست و شو با بافر الکتروفورز، لام‌ها در تانک

زمان تیمار باعث کاهش معنی دار توانایی حیات سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت شد. ( $P < 0/001$ ) (جدول ۲و۱).

جدول ۱) مقایسه میانگین تعداد سلول‌های زنده مزانشیم مغز استخوان رت پس از تیمار با غلظت‌های مختلف بیسفنول A در زمان‌های متفاوت با استفاده از روش متیل تiazول ترازولیوم. مقادیر به صورت میانگین ( انحراف معیار ) می‌باشد (آزمون آنوای دو طرفه).

p	زمان (ساعت)				دوز ( $\mu\text{M}$ )
	۴۸	۳۶	۲۴	۱۲	
۰/۰۰۱	۶۶/۳۱(۳/۳۲)	۷۲/۱۱(۱/۷۶)	۷۲/۰۴(۲/۰۴)	۷۲/۱۷(۱/۸۶)	۰
	۶۳/۱۷(۲/۷۹)	۶۸/۹۴(۰/۵۱)	۶۹/۸۳(۲/۰۷)	۷۰/۲۱(۲/۳۷)	۱
	۳۴/۳۰(۰/۹۵)	۵۱/۵۳(۲/۳۳)	۶۰/۹۶(۱/۳۰)	۶۵/۷۹(۲/۲۹)	۴
	۲۸/۹۶(۰/۶۸)	۴۰/۵۰(۴/۳۸)	۴۴/۷۰(۱/۳۲)	۵۸/۳۸(۱/۰۷)	۶
	۱۲/۴۵(۱/۶۳)	۱۲/۷۶(۰/۹۸)	۲۰/۳۶(۱/۴۳)	۲۶/۹۴(۰/۴۸)	۱۰
	۷/۸۳(۲/۷۳)	۱۰/۹۶(۰/۴۶)	۱۵/۳۳(۱/۱۰)	۱۶/۰۷(۰/۹۴)	۱۵
۰/۰۰۱					*اثر متقابل دوز و زمان

\*چنانکه ملاحظه میشود اثر متقابل دوز زمان در سطح  $P < 0/001$  موجب کاهش توانایی حیات سلول‌های می‌گردد.

مقایسه داده‌ها در روش آنالیز واریانس یک طرفه در غلظت سلول‌ها در غلظت ۶ میکرومولار به بعد در تمامی زمان‌ها با و زمان‌های مختلف نشان داد که میانگین قدرت حیات گروه کنترل تفاوت معنی دار مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲) مقایسه میانگین تعداد سلول‌های زنده مزانشیم مغز استخوان رت پس از تیمار با غلظت‌های مختلف بیسفنول A در هر یک از زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت با روش متیل ترازولیوم. در هر ستون میانگین‌هایی که با کد حرف‌های متفاوت (a, b, c, ...) نامگذاری شده‌اند دارای تفاوت معنی دار می‌باشند. ( $P < 0/05$  one way ANOVA Tukeys Test).

۴۸	زمان (ساعت)				دوز ( $\mu\text{M}$ )
	۳۶	۲۴	۱۲		
۶۶/۳۱ <sup>a</sup> (۳/۳۲)	۷۲/۱۱ <sup>a</sup> (۱/۷۶)	۷۲/۰۴ <sup>a</sup> (۲/۰۴)	۷۲/۱۷ <sup>a</sup> (۱/۸۷)	۰	
۶۳/۱۷ <sup>a</sup> (۲/۷۹)	۶۸/۹۴ <sup>a</sup> (۰/۵۱)	۶۹/۸۳ <sup>a</sup> (۲/۰۷)	۷۰/۲۱ <sup>a</sup> (۲/۳۷)	۱	
۳۴/۳۰ <sup>b</sup> (۰/۹۵)	۵۱/۵۳ <sup>b</sup> (۲/۳۳)	۶۰/۹۶ <sup>b</sup> (۱/۳۰)	۶۵/۷۹ <sup>b</sup> (۲/۲۹)	۴	
۲۸/۹۶ <sup>c</sup> (۰/۶۸)	۴۰/۵۰ <sup>c</sup> (۴/۳۸)	۴۴/۷۰ <sup>c</sup> (۱/۳۲)	۵۸/۳۸ <sup>c</sup> (۱/۰۷)	۶	
۱۲/۴۵ <sup>d</sup> (۱/۶۳)	۱۲/۷۶ <sup>d</sup> (۰/۹۸)	۲۰/۳۶ <sup>d</sup> (۱/۴۳)	۲۶/۹۴ <sup>d</sup> (۰/۴۸)	۱۰	
۷/۸۳ <sup>de</sup> (۲/۷۳)	۱۰/۹۶ <sup>de</sup> (۰/۴۶)	۱۵/۳۳ <sup>e</sup> (۱/۱۰)	۱۶/۰۷ <sup>e</sup> (۰/۹۴)	۱۵	

اپی‌گالوکاتچین گالات (۲۰ میکرومولار) + بیسفنول A (۶ میکرومولار) با گروه کنترل دارای تفاوت معنی دار نبود ( $P < 0/05$ ). بنابراین اپی‌گالوکاتچین گالات باعث جبران اثر

بررسی توانایی زیستی مقایسه نتایج نشان داد طی روند ۲۴ ساعت، تیمار با غلظت ۶ میکرومولار بیسفنول A سبب کاهش معنی دار توانایی زیستی نسبت به گروه کنترل شد ( $P < 0/05$ ). در حالی که تیمار با

تخریبی بیسفنول A بر قدرت حیات سلول‌ها شده است (جدول ۳).

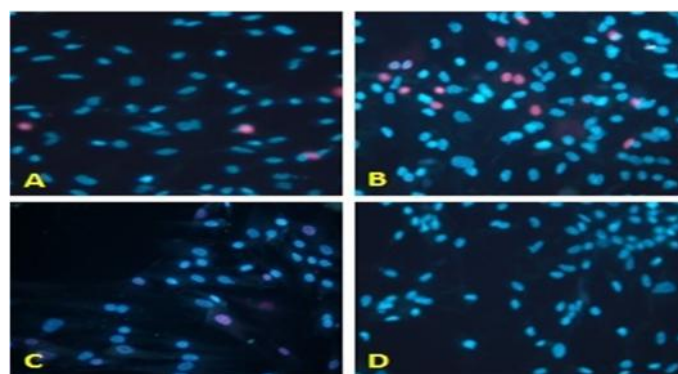
جدول ۳) مقایسه میانگین تعداد سلول‌های زنده در نمونه‌های سلولی تیمار شده با بیسفنول A و اپی گالوکاتچین گالات طی زمان ۲۴ ساعت. مقادیر به صورت  $sem \pm mean$  می‌باشد. (one way ANOVA Tukey's Test P = 0.05) (a,b,c) میزان معنی دار بودن داده‌ها را نشان می‌دهند..

تعداد سلول	گروه‌ها
$72/04^a \pm 2/04$	کنترل
$44/70^b \pm 1/32$	بیسفنول A ( $6\mu m$ ) بیسفنول A ( $6\mu m$ ) + اپی گالوکاتچین-
$71/96^a \pm 1/39$	گالات ( $20\mu m$ )
$93/67^c \pm 1/52$	اپی گالوکاتچین گالات ( $20\mu m$ )

اکثریت سلول‌ها هسته آبی رنگ داشتند و در گروه‌های تیمار شده با بیسفنول A + اپی گالوکاتچین گالات، تعداد سلول‌های با هسته آبی رنگ بیشتر از سلول‌های با هسته قرمز رنگ بود و این نشان دهنده تأثیر مثبت اپی گالوکاتچین گالات بر افزایش تعداد سلول‌های زنده است (شکل ۱).

#### بررسی مورفولوژی سلول‌ها

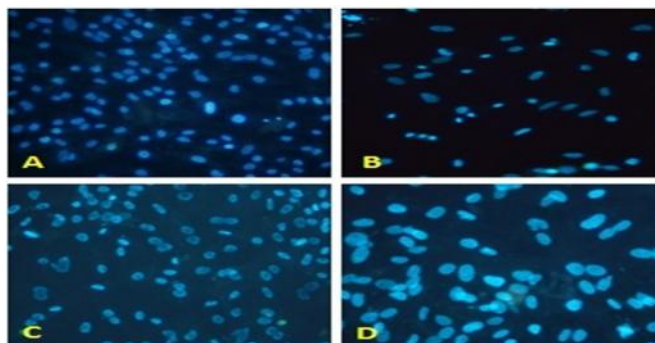
نتایج حاصل از رنگ آمیزی پروپودیوم آیوداید نشان داد که در مقابل سلول‌های زنده با هسته‌های آبی رنگ، هسته سلول‌های مرده قرمز رنگ شدند. بر طبق این رنگ آمیزی در گروه کنترل اکثریت قریب به اتفاق سلول‌ها هسته‌های آبی رنگ داشتند، اما در گروه تیمار با بیسفنول A سلول‌های با هسته‌های آبی رنگ (سلول‌های زنده) بسیار کمتر بود. همچنین در گروه‌های تیمار شده با اپی گالوکاتچین گالات



شکل ۱) رنگ آمیزی فلورسنس پروپودیوم آیوداید در سلول‌های بنیادی مزانشیم ۲۴ ساعت پس از تیمار با بیسفنول A و اپی گالوکاتچین گالات. (A) سلول‌های کنترل. (B) سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A ( $6\mu m$ ) (C) سلول‌های تیمار شده با اپی گالوکاتچین گالات ( $20\mu m$ ) + بیسفنول A ( $6\mu m$ ) (D) سلول‌های تیمار شده با اپی گالوکاتچین گالات ( $20\mu m$ ). (بزرگنمایی  $20\times$ ).

اپی گالوکاتچین گالات (۲۰ میکرومولار) و بیسفنول A + اپی گالوکاتچین گالات در طی ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل دارای تغییرات مورفولوژیک بود. در گروه تیمار با بیسفنول A تغییرات مورفولوژیکی شامل تراکم و شکستگی در هسته‌ها بود. (شکل ۲).

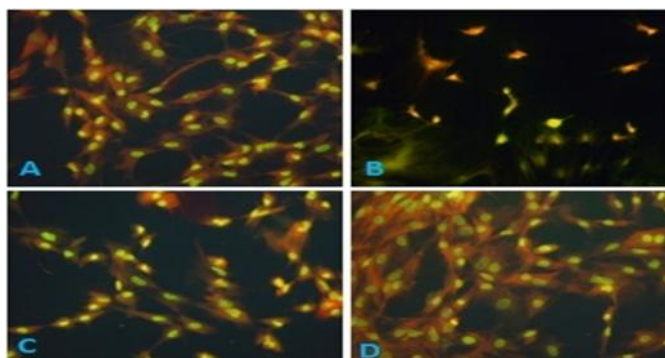
پس از رنگ آمیزی با رنگ فلورسنس هوخست، هسته‌ها به رنگ آبی درآمدند. تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیم با غلظت‌های ۲۰ میکرومولار اپی گالوکاتچین گالات و ۶ میکرومولار بیسفنول A در ۴ گروه کنترل، گروه تیمار با بیسفنول A (۶ میکرومولار)، گروه تیمار با



شکل ۲) رنگ آمیزی فلورسنس هوخست در سلول‌های بنیادی مزانشیم ۲۴ ساعت پس از تیمار با اپی گالوکاتچین گالات و بیسفنول A. A) سلول‌های کنترل. B) سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A (۶ μm). C) سلول‌های تیمار شده با اپی گالوکاتچین گالات (۲۰ μm) + بیسفنول A (۶ μm). D) سلول‌های تیمار شده با اپی گالوکاتچین گالات (۲۰ μm). (بزرگنمایی ۲۰x).

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 بود و همچنین هسته‌ها در موقعیت مرکزی نسبت به سیتوپلاسم قرار داشتند (شکل ۳).

رنگ آمیزی آکریدین اورانژ تغییرات رخ داده در سیتوپلاسم و موقعیت هسته و سیتوپلاسم را نسبت به هم نشان داد. که طبق نتایج حاصل در گروه‌های کنترل، شکل سیتوپلاسم چندوجهی و زوائد سلولی قابل تشخیص بود و هسته‌ها در موقعیت مرکزی نسبت به سیتوپلاسم قرار داشتند. در گروه تیمار با بیسفنول A چروکیدگی و کوچک شدن



شکل ۳) رنگ آمیزی فلورسنس آکریدین اورانژ در سلول‌های بنیادی مزانشیم ۲۴ ساعت پس از تیمار با بیسفنول A و اپی گالوکاتچین گالات. A) سلول‌های کنترل. B) سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A (۶ μm). C) سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A (۶ μm) + اپی گالوکاتچین گالات (۲۰ μm). D) سلول‌های تیمار شده با اپی گالوکاتچین گالات (۲۰ μm). (بزرگنمایی ۲۰x).

## میزان کلسیم داخل سلولی

مقایسه نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان بر طبق گروه‌های ذکر شده در طی روند ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل دارد. تیمار با غلظت‌های ۶ میکرومولار بیسفنول A سبب کاهش معنی‌دار میزان کلسیم داخل سلولی نسبت به گروه کنترل شد

( $P < 0.05$ ). در گروه تیمار با بیسفنول A + اپی‌گالوکاتچین گالات میزان رسوب کلسیم داخل سلولی با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت ( $P > 0.05$ ) (جدول ۴).

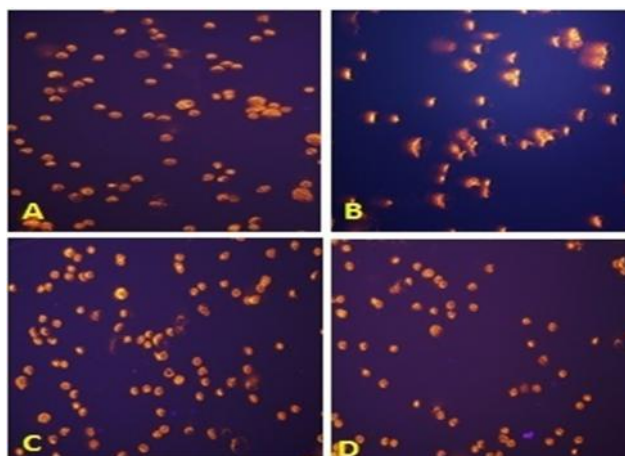
جدول ۴) مقایسه میانگین کلسیم در سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A و اپی‌گالوکاتچین گالات. مقادیر به صورت  $\text{mean} \pm \text{sem}$  می‌باشد. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$  one way ANOVA Tukeys Test) (a,b,c) میزان معنی‌دار بودن داده‌ها را نشان می‌دهند.

زمان (ساعت)	گروه‌ها
۲۴	کنترل
	بیسفنول A ( $6 \mu\text{m}$ ) $0.52^b \pm 0.34$
۲۴	بیسفنول A ( $6 \mu\text{m}$ ) + اپی‌گالوکاتچین گالات ( $20 \mu\text{m}$ )
	اپی‌گالوکاتچین گالات ( $20 \mu\text{m}$ ) $0.86^c \pm 0.65$

## آزمون کامت

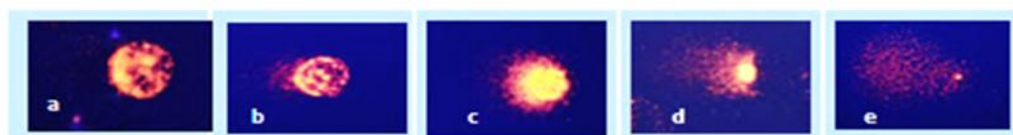
نتایج بدست آمده از آزمون کامت نشان داد که در گروه تیمار با بیسفنول A دنباله یا کامت بیشتری نسبت به گروه کنترل وجود دارد و در سلول‌های تیمار شده با اپی‌گالوکاتچین گالات و بیسفنول A + اپی‌گالوکاتچین گالات دنباله یا کامت کمتری نسبت به گروه کنترل دیده شد (شکل ۴). به منظور ارزیابی میزان

آسیب وارده به DNA سلول‌ها بر اساس طول و اندازه کامت سلول‌ها در ۵ گروه درجه‌بندی شد. داده‌ها حاکی از افزایش میزان حرکت DNA در میدان الکتریکی در اثر تیمار با بیسفنول A بود (شکل ۵). ضمناً مقایسه میانگین درصد آسیب وارده به DNA در سلول‌های مزانشیم مغز استخوان در گروه‌های مختلف در جدول ۵ ارائه شده است.



شکل ۴) تست کامت در سلول‌های بنیادی مزانشیم ۲۴ ساعت پس از تیمار با اپی‌گالوکاتچین گالات و بیسفنول A (A) سلول‌های کنترل. (B) سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A ( $6 \mu\text{m}$ ) (C). سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A ( $6 \mu\text{m}$ ) + اپی‌گالوکاتچین گالات ( $20 \mu\text{m}$ ). (D) سلول‌های تیمار شده با اپی‌گالوکاتچین-گالات ( $20 \mu\text{m}$ ). (بزرگنمایی  $20 \times$ ).





شکل ۵) درجه بندی سلول‌ها بر اساس طول و اندازه‌ی کامت. (a) درجه صفر ( بدون کامت ). (b) درجه یک. (c) درجه دو. (d) درجه سه. (e) درجه چهار.

جدول ۵) مقایسه میانگین درصد درجه آسیب وارد به DNA در سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت در گروه‌های تیمار با بیسفنول A و اپی گالوکاتچین- گالات با گروه کنترل. مقادیر به صورت  $mean \pm sem$  می‌باشد. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد ( one way ANOVA,  $P < 0.05$ , Tukeys Test, a,b,c) میزان معنی‌دار بودن داده‌ها را نشان می‌دهند).

درصد سلول‌های دنباله دار

دوز	درجه ۰	درجه ۱	درجه ۲	درجه ۳	درجه ۴
کنترل	۶۲/۶۳ <sup>c</sup> ± ۰/۲۷۷	۲۱/۰۰ <sup>b</sup> ± ۱/۷	۵/۳۳ <sup>a</sup> ± ۰/۵۷	۱/۳۳ <sup>a</sup> ± ۰/۵۷	۴/۱۷۶ <sup>a</sup> ± ۰/۰۱۳
بیسفنول A (6µm)	۲۶/۶۶ <sup>b</sup> ± ۱/۵۲	۲۶/۳۳ <sup>b</sup> ± ۴/۷	۸/۰۰ <sup>b</sup> ± ۲/۶۴	۱۹/۱۰ <sup>b</sup> ± ۳/۶.	۱۱/۳ <sup>b</sup> ± ۲۶/۲۰
بیسفنول A+ اپی- گالوکاتچین- گالات (20µm)	۷/۷۶۶ <sup>d</sup> ± ۳/۲۱	۱۷/۰۰ <sup>a</sup> ± ۲/۶۴	۳/۰۰ <sup>a</sup> ± ۱/۱۵	۱/۳۳ <sup>a</sup> ± ۱/۱۵	۱۶/۱ <sup>a</sup> ± ۰۰/۱
اپی گالوکاتچین- گالات (20µm)	۷۸/۶۶ <sup>d</sup> ± ۳/۰۵	۱۵/۳۳ <sup>a</sup> ± ۰/۵۷	۴/۶۶ <sup>a</sup> ± ۰/۵۷	۳/۰۰ <sup>a</sup> ± ۰/۶۸	۵۷/۰ <sup>a</sup> ± ۶۶/۱

### بحث

تا به امروز، بسیاری از اطلاعات در مورد مکانیسم عمل مواد سمی مختلف از آزمون بر روی حیوانات یا مطالعات در شرایط *in vitro* با استفاده از سلول‌های بسیار تمایز یافته، نامیرا و یا سلول‌های سرطانی و دچار تومور شده بدست آمده است. اخیرا با توجه به مقاومت سلول‌های مزانشیم مغز استخوان و استخراج آسان آنها پیشنهاد شده است که می‌توان از آنها برای بررسی مواد سمی و آنتی‌اکسیدانت‌ها استفاده کرد (۲۰). از طرفی در بررسی اثرات مواد سمی با استفاده از انواع سلولی تمایز یافته یا دودمان‌های سلولی نامیرا نمی‌توان اثرات این مواد بر مراحل تمایز و تکوین را

نیز مطالعه نمود، لذا با توجه به اینکه سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان دارای قابلیت زیادی در تمایز به بافت‌هایی مانند استخوان، عصب و غیره می‌باشند، مدل آزمایشگاهی مناسبی در بررسی تأثیر و سمیت مواد شیمیایی بر روی سلول‌ها و عملکرد داروها در طی روند تمایز هستند (۲۱). نتایج این مطالعه کاهش معنی‌داری وابسته به غلظت را در توانایی زیستی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان رت در اثر تیمار با بیسفنول A در طی ۲۴ ساعت نشان داد که با نتایج مطالعات سایر محققان مبنی بر کاهش توانایی زیستی دیگر سلول‌ها در طی تیمار با بیسفنول A هم راستا است (۲۲ و ۱۶). مطالعه ما نشان داد که اپی گالوکاتچین گالات تأثیر مثبتی بر

پیشگیری از آثار سمی حاصل از بیسفنول A بر توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان دارد. از آنجایی که اپی‌گالوکاتچین‌گالات از پلی‌فنول‌های آنتی‌اکسیدانی قوی موجود در چای سبز می‌باشد سبب جلوگیری از تشکیل اکسیژن‌های واکنش‌پذیر (ROS) در داخل سلول میتوکندری می‌گردد. در ساختار اپی‌گالوکاتچین‌گالات سه حلقه فنول دیده می‌شود که گروه‌های هیدروکسیل این حلقه‌ها، باعث احیا رادیکال‌های آزاد و غیر فعالسازی آنها می‌گردد (۲۳). Costa و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که اپی‌گالوکاتچین‌گالات باعث افزایش توانایی زیستی و تکثیر سلولی در سلول‌های کلیه می‌شود (۲۴). Yea و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که غلظت ۱۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین‌گالات در مدت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بر روی سلول‌های فیروبلست بیماری گوشه نوع I باعث کاهش مرگ سلولی و همچنین افزایش تکثیر سلولی می‌شود و با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود مانع از استرس شبکه آندوپلاسمی می‌شود (۲۵). آسیب DNA بوسیله تست کامت نشان داد که در گروه بیسفنول A آسیب به DNA به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. تشکیل دنباله در سلول‌های مذکور، حاکی از وقوع شکستگی در DNA است. طبق مطالعات گذشته سمیت با بیسفنول A سبب کاهش توانایی زیستی، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، کاهش توانایی آنتی‌اکسیدان‌ها و آسیب DNA می‌گردد، همچنین بیسفنول A باعث افزایش تعداد کروموزوم‌های غیرنرمال می‌شود که نشان دهنده ارتباط بین پراکسیداسیون لیپیدی و genotoxicity می‌باشد (۲۶). Fen We و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که اپی‌گالوکاتچین‌گالات مانع از آپوپتوز و شکسته شدن DNA در سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرائی وابسته به غلظت و زمان می‌شوند (۲۷). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که اپی‌گالوکاتچین‌گالات، تأثیر بیسفنول A بر

وقوع شکستگی DNA در سلول‌های بنیادی مزانشیم را کاهش داد. پیشنهاد می‌شود که اپی‌گالوکاتچین‌گالات با کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش توانایی زیستی آنتی‌اکسیدان‌ها میزان آسیب DNA را کاهش می‌دهند. نتایج تحقیقات بر روی سلول‌های بنیادی عصبی که توسط Ishido و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام گرفته بود نشان داد که بیسفنول A با فیلامنت‌های اکتین تداخل ایجاد می‌کند. به این صورت که تیمار با بیسفنول A موجب تغییرات مورفولوژیکی مانند تکه تکه شدن سیتواسکلتون در سلول‌های عصبی شده بود (۲۸). بیسفنول A با تحریک تولید رادیکال‌های آزاد باعث غیر فعالسازی گروه تیول در پروتئین اکتین و در نتیجه تخریب آن و نهایتاً تغییر شکل سلول می‌گردد (۲۸). پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون پروتئین اکتین، مکانیسم احتمالی در کنترل شکل می‌باشد. Hinshow و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که گروه تیول بر روی اسید آمینه‌ی سیستئین در پروتئین اکتین، به میزان تشکیل حالت فیبری و یا گلوبولار اکتین تأثیر می‌گذارد. در واقع گروه تیول در میکروفیلانته‌های اکتین، یکی از اهداف استرس-اکسیداتیو است و حفظ آن در حالت احیا شدن برای عملکرد سلول‌های طبیعی ضروری می‌باشد. گلوپتایون مهم‌ترین دارنده‌ی گروه تیول غیر پروتئینی است که برای احیا گروه‌های تیول غیر پروتئینی ضروری است (۲۹). نتایج رنگ‌آمیزی هوخست نشان داد که اپی‌گالوکاتچین‌گالات با تأثیری که بر روی هسته‌های سلول‌های بنیادی مزانشیم می‌گذارد باعث افزایش قطر هسته‌ها در این سلول‌ها می‌شود. پیشنهاد می‌شود که اپی‌گالوکاتچین‌گالات به عنوان محافظ گروه‌های تیول پروتئین‌های سلولی، به خصوص پروتئین‌های غشا سلولی است، و پروتئین‌های غشا را در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. علاوه بر این اپی‌گالوکاتچین‌گالات با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی که دارد باعث تقویت عملکرد

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

می‌گردد.

## References

1. Carlos A, Rodrigues V, Tiago G, Fernandes H. Stem cell cultivation in bioreactors: *Biotechnology Advances* 2011; 29: 815 – 829.
2. Bieback A, Brinkmann L. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells* 2010; 2: 81-92.
3. Von G, Wormuth M, Scheringer M, Hungerbuhler K. Bisphenol A: how the most relevant exposure sources contribute to total consumer exposure. *Risk analysis: An Official Publication of the Society for Risk Analysis* 2010; 30: 473-480.
4. Joskow R, Barr B, Barr J, Calafat A, Needham L, Rubin C. Exposure to bisphenol-A from bis-glycidyl dimethacrylate based dental sealants. *J Amer Den Assoc* 2006; 137: 62-353.
5. Biswanger C, Davis L, Roberts R. Estrogenic impurities in tissue culture plastic ware are not bisphenol A. *In Vitro Cell. Dev. Biol Animal* 2006; 42: 294-297.
6. Welshons W, Nagel S, Vom-Saal S. Large effects from small exposures: Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol-A at levels of human exposure. *Endocrinology* 2006; 147: 56-69.
7. Hiromasa O, Takahiro T, Sanae M, Iguchi A, Hiroyoshi A. Induction of reactive oxygen species by bisphenol-A and abrogation of bisphenol-A induced cell injury by DJ-1. *Toxicol Sci* 2005; 88: 26-114.
8. Hiroshi I, Kazue M, Masamichi D, Takayuki M, Fumio Y. Bisphenol-A induced apoptosis of cultured rat sertoli cells: *Reproductive Toxicology* 2003; 17: 457-464.
9. Virgili F, Marino M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Rad Biol Med* 2008; 45: 16-123.
10. Turk G, Sonmez M, Aydin M, Yuce A, Gur S, Yuksel M, and et al. Effects of green tea juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clin Nutr* 2008; 27: 96-289.
11. Yang HY, Yang SC, Chao JC, Chen JR. Beneficial effects of catechin rich green tea and inulin on the body composition of overweight adults: *Br J Nutr* 2012; 107: 54-749.
12. Katiyar SK, Mukhtar H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen-presenting cells, and oxidative stress: *J Leukoc Biol* 2001; 69: 26-719.
13. Wei YJ, Tsai SK, Lin LC, Lee TY. Catechin stimulates osteogenesis by enhancing PP2A activity in human mesenchymal stem cells. *Osteoporos Int* 2011; 22: 1469-1479.
14. Eslaminejad MB. Mesenchymal stem cell: Isolation and biology. *Journal of Iranian Anatomical Science* 2005; 5: 61-73.
15. Soleimani M, Nadri S, Izadpanah R. Isolation of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow: frequent medium change method. *Tehran University Medical Journal* 2008; 66: 229-236.

16. Sakuma S, Nakanishi M, Morinaga K. Bisphenol-A 3,4-quinone induces the conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 2010;48: 2217–2222.
17. Robert J, Letchera B, Thomas S, Abraham S. Effects of bisphenol A-related diphenylalkanes on vitellogenin production in male carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes and aromatase (CYP19) activity in human H295R adrenocortical carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005;209: 95 – 104.
18. Hideaki Y, Jun Z, Tao Y, Kazuo S, Hironori U, Yumi K, and et al. Serum-free mouse embryo cells generate a self-sustaining feedback loop for an astrocyte marker protein and respond to cytokines and bisphenol A in accordance with the subtle difference in their differentiation state. *Cell Biology International* 2007;31:638-644.
19. Nowyky MC, Thoms AP. Intracellular calcium signaling. *J Cell Sci* 2002; 6:371-398.
20. Kermani S, Karbalaie K, Madani H, Jahangirnejad AA, Eslaminejad MB, Nasr-Esfahani MH, and et al. Bone marrow-mesenchymal stem cells as a suitable model for assessment of environmental pollution. *J Arak Univ Med Sci* 2008;11: 117-125.
21. Kim SK, Kim BK, Shim JH, Gil JE, Yoon YD, Kim JH. Nonylphenol and octylphenol-induced apoptosis in human embryonic stem cells is related to fas-fas ligand pathway. *Toxicol Sci* 2006;94: 32-310.
22. Tabuchi Y, Takasaki I, Kondo T. Identification of genetic networks involved in the cell injury accompanying endoplasmic reticulum stress induced by bisphenol-A in testicular sertolicells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006;345: 1044–1050.
23. Khan N, H Mukhtar. Tea polyphenols for health promotion: *Life Sci* 2007;81:519–533.
24. Costa S, Utan A, Cervellati R, Speroni E. Catechins: natural free-radical scavengers against ochre toxin A-induced cell damage in a pig kidney cell line(LLC-PK1): *Food and Chemical Toxicology* 2007;45:1910–1917.
25. Yea L, Kim S, Heo T. Protective effect of catechin in type I Gaucher disease cells by reducing endoplasmic reticulum stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011;413: 254–258.
26. George H, Johnson F, Elizabeth M. Mechanistic investigations of low dose exposures to the genotoxic compounds bisphenol-A and rotenone: *Mutation Research* 2008;651: 56–63.
27. FenWu, Hong Sun, Thomas Kluz, Hailey AClancy, Kathrin Kiok, Max Costa. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2012;258:166–175.
28. Ishido M, Suzuki J. Quantitation analyses of inhibitory effect of bisphenol-A neural stem-cell migration using a neurosphere assay in vitro. *Journal of Health Science* 2010;56: 175-181.
29. Hinshow Y, Inshishara M, Okada N, Fujisawa S. Free radical interaction between green tea, ascorbate and flavonoids, in vivo. *Clin Chim Acta* 2006; 20:823-828.