Archive of SID

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر ویتامین E بر تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ به استئوبلاست طی تیمار همزمان با سدیم آرسنیت

دکتر ملک سلیمانی مهرنجانی*، دکتر مجید مهدیه**، صدیقه حسینی*** ، آتناسادات عظیمی***

دریافت: ۹۴/۳/۲۵ پذیرش: ۹۴/۹/۱۴

چکیده:

مقدمه و هدف: سدیم آرسنیت از طریق القای استرس‌اکسیداتیو باعث اختلال در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت (rMSCs) به استئوبلاست می‌گردد. در مطالعه حاضر، هدف بررسی اثر تیمار همزمان سدیم آرسنیت و ویتامینE بر تمایز آزمایشگاهی rMSCs به استئوبلاست بود.

روش کار: در محیط کشت حاوی ۱۵٪ سرم جنین گاوی، rMSCs کشت داده شد. تیمار با سدیم آرسنیت (۲۰ نانومولار)، تیمار با ویتامینE (۵۰ میکرومولار) انجام شد. بدین ترتیب که در پایان پاساژ سوم سلول‌ها به ٤ گروه: کنترل، تیمار با سدیم آرسنیت، تیمار با ویتامینE و سدیم آرسنیت + ویتامینE تقسیم و برای مدت ۲۱ روز، در محیط استئوژنیک حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده شدند. توانایی زیستی ، معدنی شدن ماتریکس استخوانی، کلسیم داخل و خارج سلولی، فعالیت آلکالین‌فسفاتاز، آسیب DNA و تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها بررسی شد. داده‌ها با روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (Anova) تجزیه و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P<0.05$ معنی‌دار درنظر گرفته شد.

نتایج: توانایی زیستی، معدنی شدن ماتریکس استخوانی، رسوب کلسیم، فعالیت آلکالین‌فسفاتاز و قطر هسته در گروه سدیم آرسنیت کاهش معنی‌داری یافت ($P<0.05$). پارامترهای فوق، در گروه سدیم آرسنیت + ویتامینE ، در حد گروه کنترل بهبود یافت ($P<0.05$).

نتیجه‌نهایی: ویتامین E با کاهش سمیت سدیم آرسنیت ، تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان را افزایش می دهد.

کلید واژه ها: تمایز استئوژنیک / توانایی زیستی / سدیم آرسنیت / سلول‌های بنیادی مزانشیم / ویتامینE

مقدمه:

آرسنیک یک آلاینده زیست محیطی است که در صنایع مختلف به‌ویژه در صنایع شیمیایی کاربرد دارد و به همین دلیل میزان آن در شهرهای صنعتی بیشتر می‌باشد (۱). آزادسازی آرسنیک در طبیعت از طریق سنگ‌های معدنی صورت گرفته و موجب انتشار در محیط و ورود آن به بدن از طریق مواد غذایی، هوا، خاک و آب آشامیدنی می‌گردد (۴-۲). این ترکیب در کشاورزی نیز به شکل آفت‌کش و علف‌کش مورد استفاده قرار می‌گیرد و با نفوذ به محیط آبی و خاکی، در درون گیاهان و جانوران انباشته می‌شود. علاوه بر این، مصرف داروهای حاوی آرسنیک مثل Trisenox، نیز راه دیگری است که ممکن است انسان را در معرض این ماده سمی قرار دهد (۵). این آلاینده زیست محیطی اثرات نامطلوبی بر ارگان‌های مختلف بدن دارد و طبق تحقیقات مشخص شده است که آرسنیک در انسان به‌عنوان یکی از مهم‌ترین فاکتورهای القاکننده استرس اکسیداتیو عمل می‌کند (۶).

آرسنیک یک عنصر شبه‌فلز است که در فرم اکسیداتیوهای متعددی وجود دارد ولی از بین آن‌ها اکسید ۳ ظرفیتی این عنصر اثرات سمی بیشتری دارد (۷)

* دانشیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک (m-soleimani@araku.ac.ir)

** استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک

*** کارشناسی ارشد زیست شناسی جانوری دانشگاه اراک

www.SID.ir

Archive of SID

و طبق تحقیقات صورت گرفته، مشاهده شده است که سدیم آرسنیت باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های فیبروبلاست (۸) و نورواپی‌تلیال مغز میانی موش می‌شود (۹). سدیم آرسنیت باعث برهم زدن هموستاز یونی، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد گروه اکسیژن (ROS) و فعال‌سازی مسیرهای وابسته به کاسپاز در سلول‌ها می‌گردد (۷).

از سوی دیگر آنتی‌اکسیدانت‌ها ترکیباتی هستند که از تشکیل رادیکال‌های آزاد در سلول جلوگیری می‌کنند و نقش مهمی در حفاظت از سلول در مقابل آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو ایفا می‌کنند (۱۰). ویتامینE هم یک آنتی‌اکسیدانت قوی فنولیک است (۱۱) که در غشاء سلول قرار می‌گیرد و از تخریب دیواره و غشاهای زیستی جلوگیری می‌کند و از آنجاییکه محلول در چربی است، در بدن انسان و دیگر جانوران نیز در بافت چربی، کبد و عضلات ذخیره می‌گردد (۱۲). این ویتامین، در ساختمان خود دارای گروه هیدروکسیلی می‌باشد که روی یک حلقه‌ی کرومانولی قرار گرفته است و همین گروه هیدروکسیل باعث خاصیت آنتی‌اکسیدانتی این ترکیب و احیاء رادیکال‌های آزاد و غیرفعال‌سازی آن‌ها می‌گردد. رادیکال آزاد با ایجاد استرس اکسیداتیو باعث تغییر در ارگانل‌های داخل سلولی، تخریب DNA و پراکسیداسیون لیپیدی در سلول می‌شود و در مقابل ویتامینE با اهدای هیدروژن فنولیک حلقه‌ی کرومانولی خود، باعث شکستن زنجیره واکنش‌های رادیکال‌های آزاد شده و پراکسیداسیون لیپیدهای سلول و فسفولیپیدهای غشا را به حداقل می‌رساند و بدین طریق توانایی حیات و بقای سلولی را افزایش می‌دهد (۱۰).

سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان (MSCs) سلول‌های پرتوانی هستند که توانایی تمایز به انواعی از رده‌های سلولی نظیر سلول‌های استخوانی، غضروف و چربی را دارا می باشند. این سلول‌ها را می توان از مزانشیم مغز استخوان استخراج، تخلیص و همچنین تکثیر کرد و از آن‌ها در پیوندهای اتولوگ استفاده نمود (۷،۱۳).

از آنجاییکه مطالعات نشان داده است که آلاینده‌های زیست محیطی از جمله سدیم آرسنیت، به‌دلیل ایجاد استرس اکسیداتیو، فرآیند تمایز MSCs به استئوبلاست را مهار می‌کنند (۷)، لذا در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر حفاظتی ویتامینE بر آثار مخرب سدیم آرسنیت در تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ rMSCs به استئوبلاست، را مورد مطالعه و بررسی قرار دهیم.

روش کار:

جداسازی و کشت سلول‌های مغز استخوان : در این مطالعه تجربی پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه اراک، با رعایت اصول اخلاقی، رت‌های نژاد ویستار با سن تقریبی ۳۵ روز، به کمک دی‌اتیلن‌اتر بیهوش شده، استخوان‌های ران و ساق پا (درشت نی) آن‌ها جدا و سپس بافت‌های پیوندی اطراف استخوانها به طور کامل پاک گردید. استخوان‌ها در محیط کشت MEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium ، Gibco، Germany) در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفته و به زیر هود لامینار منتقل شدند. دوسر هراستخوان با قیچی استریل قطع و مغز استخوان با عمل فلاشینگ خارج و به داخل لوله فالکون حاوی محیط کشت DMEM حاوی ۱۵٪ سرمFBS (Fetal Bovine Serum، Gibco، Germany) هدایت شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در (round per minutes) ۱۲۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. محیط رویی خارج و رسوب سلولی درون یک میلی‌لیتر محیط تازه معلق گردید، سپس در فلاسک T25 کشت و در انکوباتور CO_2 دار(دمای۷ درجه سانتیگراد، ۵٪ CO_2) انکوبه گردید. بعد از ۲۴ ساعت محیط رویی که دارای سلول‌های غیر چسبنده بود، خارج شده و شستشوی سلول‌ها با PBS^- انجام گردید. سپس به مدت ۱۴ روز هر سه روز یکبار محیط سلول‌ها تعویض شد. زمانی که کف فلاسک به تراکم بالایی از سلول رسید، سلول‌ها با کمک Trypsin/EDTA 1x ۰/۲۵٪ (Sigma-Aldrich) از کف فلاسک جدا و به فلاسک‌های جدید منتقل شدند. سه مرحله پاساژ سلولی، برای به‌دست آوردن خلوص بالایی از این سلول‌ها صورت گرفت. سلول‌های پاساژ سوم به تعداد ۱۲ چاهک (5×10^3 سلول در هر خانه) از پلیت ۱۲ چاهکی در چهار گروه: (کنترل، محیط استئوژنیک: محیط DMEM حاوی ۱۰٪ سرم گاوی، ۱۰ میلی مولار بتاگلیسرول فسفات،۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک-۳-فسفات) (۱۳) و گروه‌تیماری۱(محیط استئوژنیک‌حاوی ۲۰ نانومولار سدیم آرسنیت) (Sigma-Aldrich) و گروه تیماری ۲ (محیط استئوژنیک حاوی ۵۰ میکرومولار ویتامین E) و نیز گروه تیماری۳ (محیط استئوژنیک با دوزهای ۲۰ نانومولار

www.SID.ir

Archive of SID

سدیم آرسنیت و ۵۰ میکرومولار ویتامین E (Sigma-Aldrich) به طور همزمان، ، به مدت ۲۱ روز بررسی شد.

بررسی توانایی زیستی سلول‌ها: تست متیل‌تیازول‌تترازولیوم (MTT) شاخصی از میزان توانایی زیستی سلول‌ها است و در آن میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندری سلول مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. سلول‌های گروه کنترل و همچنین سلول‌های گروه تیماری ۱و۲ دو بار با PBS^- شستشو داده شد. سپس ۳۰ میکرولیتر محلول متیل‌تیازول تترازولیوم (MTT) ۰/۰۱ مولار، به هر چاهک اضافه و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. پس از تشکیل بلورهای فورمازون، این بلورها در حلال دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) (Sigma-Aldrich) حل شده و سپس میزان جذب محلول حاصل در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه ELAISA-reader (SCO diagnostic, Germany) اندازه گیری شد و با استفاده از منحنی استاندارد MTT تعداد سلول‌های زنده در گروه‌های مختلف تعیین گردید (۱۳). لازم به ذکر است برای اطمینان از نتایج، آزمایش سه بار برای هر گروه، تکرار شد.

اندازه گیری میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی: برای انجام این روش، سلول‌های پاساژ سوم به تعداد ۵×۱۰^۳ در هر چاهک پلیت ۱۲ خانه‌ای در حضور محیط های استئوژنیک مخصوص گروههای کنترل و تیماری ۱و۲ کشت داده شد. پس از ۲۱ روز، میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌ها با روش رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد ارزیابی گردید. بدین منظور ابتدا سلول‌ها دو بار با PBS شستشو شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با فرمالین ۱۰٪ فیکس گردید و سپس با محلول رنگ آلیزارین رد (Sigma, St. Louis, MO, USA) رنگ‌آمیزی شد. سلولها با آب مقطر شستشو و سپس اسید استیک ۱۰٪ به سلولها افزوده گردید. محلولهای رنگ قرمز آلیزارین‌رد از ماتریکس استخوانی بدین ترتیب استخراج شدو سپس جذب نوری آنها در طول موج ۴۰۵ نانومتر ثبت شد (۱۴) و در سه گروه مطالعه مقایسه گردید.

بررسی میزان رسوب کلسیم خارج سلولی (وان کوزا): جهت بررسی میزان رسوب کلسیم در ماتریکس خارج سلولی، از رنگ‌آمیزی وان کوزا استفاده شد. در این نوع رنگ‌آمیزی، به طور خاص میزان رسوبات فسفات کلسیم ماتریکس خارج سلولی، با استفاده از نیترات نقره نشان داده می‌شود.

بدین منظور سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ، پس از پاساژ سوم، به تعداد ۱۰×۱۰^۳ در هر ویال پلیت ۱۲ خانه ریخته شد و به مدت ۲۱ روز با دوزهای انتخابی سدیم آرسنیت و ویتامین E گروه های مطالعه کشت داده شد. سپس سلول‌ها با کمک فرمالدئید ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه فیکس گردیده و پس از دو بار شستشو با PBS^-، ۵۰۰ میکرولیتر نیترات نقره (Sigma Chemical) ۰/۱٪ (۱۳) به سلول‌ها اضافه شد و در انتها، بررسی سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus, IX70) انجام گردید.

بررسی میزان رسوب کلسیم داخل سلولی: جهت اندازه‌گیری میزان رسوب کلسیم داخل سلولی، ابتدا محیط کشت رویی سلولها برداشته شد و سلولها ۲ تا ۳ مرتبه با PBS^- شستشو داده شدند. سپس کلسیم داخل سلول با ۵۰ میکرولیتر اسیدکلریدریک ۰/۰۵ نرمال استخراج گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴° C نگهداری شد. پس از این مدت زمان، مقدار کلسیم با کمک کیت تجاری (Darman Kave, Iran) تعیین شد و رنگ حاصل با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵۷۵ نانومتر اندازه گیری گردید.

بررسی میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: برای انجام این روش سلول‌ها ابتدا دو بار با PBS^- شستشو داده شدند و سپس در بافر لیز کننده (Tris- Triton X-100, pH =۷/۵ ,HCl ۰/۲۵ مولار) هموژنیزه گردیدند. سپس هر نمونه در ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. میزان پروتئین موجود در محلول رویی با کمک روش برادفورد (۱۵) و با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در نمونه سلولی لیز شده بر حسب غلظت مساوی از پروتئین در حضور نیتروفنیل فسفات به عنوان سوبسترا با استفاده از کیت اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز (Darman Kave, Iran) بررسی شد. سپس با افزودن سود ۰/۰۲ نرمال واکنش آنزیم متوقف و میزان جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آزمون کامت (Commet assay): این تست بر اساس حرکت DNA در میدان الکتریکی ارزیابی می‌گردد. اگر DNA هسته در اثر عوامل محیطی مختلف دچار شکست شده باشد، به‌دلیل اختلاف سرعت حرکت قطعات DNA با طول مختلف در میدان الکتریکی، اطراف هسته سلول‌ها هاله یا دنباله‌ای دیده می‌شود و هرچه این تخریب شدیدتر باشد، هاله بزرگ‌تر و کشیده‌تری به‌دنبال هسته تشکیل

www.SID.ir

Archive of SID

خواهد شد. برای انجام این تست، ابتدا مخلوط سوسپانسیون سلولی گروه کنترل وگروه‌های تیماری با تراکم ۱۰ ×۲ در هر میلی لیتر محلول ۱٪ آگارز با دمای ذوب پایین تهیه شد. این سوسپانسیون بر روی اسلایدهای میکروسکوپی مفروش شده با ۱٪ آگارز گذاشته شد و پس از لامل‌گذاری، اسلایدها با آگارز ۵ نرمال به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس لامل از روی اسلایدها به آرامی برداشته شد و اسلاید میکروسکوپی در بافر لیز حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، Nacl ۲/۵ مولار، NaSL ۱٪، Tris-base ۱۰ میلی‌مولار، با pH=۱۰ به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد. پس از آن اسلایدها در بافر الکتروفورز حاوی EDTA ۱ میلی‌مولار، NaOH ۳۰۰ میلی‌مولار، با pH=۱۳ با جریان ۳۰۰ آمپر به مدت ۲۰ دقیقه الکتروفروز گردید. در نهایت نمونه در بافر خنثی کننده حاوی Tris base ۰/۴ مولار که با Hcl به pH=۷/۵ رسیده بود، شستشو داده شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید به کمک میکروسکوپ Olympus مشاهده و عکس‌برداری گردید (۷).

بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها: به دنبال تیمار سلول‌ها در محیط استئوزنیک برای مدت ۲۱ روز، مورفولوژی هسته با استفاده از رنگ هوخست (Hoechst-33342) و پس از ۵ دقیقه انکوبه کردن در دمای اتاق مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور ابتدا محیط رویی سلول‌ها کشیده شد و شستشو با PBS^- انجام گرفت. سپس ۱۰ میکرولیتر محلول µg/ml ۱، Hoechst-33342 ، در تاریکی به هر خانه پلیت اضافه شد و پس از ۵ دقیقه سلول‌ها مجددا با PBS^- شسته شدند و عکس‌برداری با میکروسکوپ فلورسنس (Olympus IX۷۰) صورت گرفت. در ادامه قطر سلول‌ها با کمک نرم افزار تصویری موتیک (Micro optical group company version 1.2) اندازه گیری شد و مورد ارزیابی قرار گرفت. Hoechst-33342، یک رنگ فلورسنت است که از طریق غشا، در سلول نفوذ کرده و DNA را رنگ می کند و تغییرات هسته از قبیل تراکم کروماتین و قطعه قطعه شدن آن را نشان می‌دهد. مورفولوژی سیتوپلاسم سلول‌ها نیز با رنگ فلورسنت آکریدین اورنژ بررسی شد. آکریدین اورنژ، هسته سلول را سبز و سیتوپلاسم را نارنجی می کند. بدین منظور نیز پس از رنگ‌آمیزی سلول‌ها در تاریکی و با محلول g/ml ۰/۰۱ آکریدین اورنژ، سلول‌ها ۲ بار با PBS^- شسته شدند و بلافاصله توسط میکروسکوپ فلورسنس(Olympus IX70) عکس برداری از آنها صورت گرفت (۱۴).

آنالیز آماری داده ها : در پایان داده‌های حاصل با استفاده از آزمون آماری یک‌طرفه One-Way ANOVA ، تست Tukey ، تجزیه و تحلیل گردید و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج:

بررسی توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌ها : کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد سلولهای‌زنده (توانایی‌زیستی)، میزان‌معدنی شدن ماتریکس استخوانی (آلیزارین‌رد) و میزان رسوب فسفات کلسیم (وان کوزا) در گروه rMSCs تیمار شده با سدیم آرسنیت (گروه تیماری۱)، در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($P<0.05$). افزایش‌معنی‌داری نیز در سه پارامتر فوق در گروه rMSCs تیمار شده با سدیم آرسنیت+ویتامینE، نسبت به گروه تیماری ۱ و در حد گروه کنترل دیده شد ($P<0.05$). از مقایسه میانگین پارامترهای یادشده در گروه سلولهای rMSCs تیمار شده با ویتامینE (گروه تیماری۳)، نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری مشاهده گردید ($P<0.05$) (جدول ۱).

جدول۱: مقایسه توانایی زیستی (میانگین تعداد سلول‌های زنده) و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ rMSCs پس از ۲۱ روز کشت در محیط استئوژنیک و تیمار با ویتامین E (۵۰ میکرومولار) ، سدیم آرسنیت (۲۰ نانومولار) و همچنین تیمار همزمان ویتامین E و سدیم آرسنیت

	تعداد سلول‌های زنده	غلظت آلیزارین رد (میکرومولار)
کنترل	۱۹/۰۳ ^{b}±۰/۶۲	۳۸۱/۲۵ ^{b}±۱/۲۰
سدیم آرسنیت	۹/۸۱ ^{a}±۰/۳۳	۱۹۲/۵۰ ^{a}±۲/۴۹
سدیم آرسنیت + ویتامین E	۲۱/۷۱ ^{b}±۰/ ۷۰	۳۹۳/۵۰ ^{b}±۰/۳۵
ویتامین E	۳۸/۰۹ ^{c}±۱/۴۱	۴۸۷/۵۰ ^{c}±۰/۷۷

مقادیر به صورت means±SD می‌باشد و میانگین‌های با کدهای a، b و c، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر هستند (one way ANOVA tukey's test,P<0.05).

اندازه‌گیری سطح کلسیم داخل سلولی و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: کاهش معنی‌داری در سطح کلسیم داخل سلولی و میانگین فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز در گروه سلول‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت (۲۰ نانومولار)، نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید ($P<0.05$). همچنین افزایش معنی‌داری نیز در سطح فاکتورهای مذکور درگروه

www.SID.ir

Archive of SID

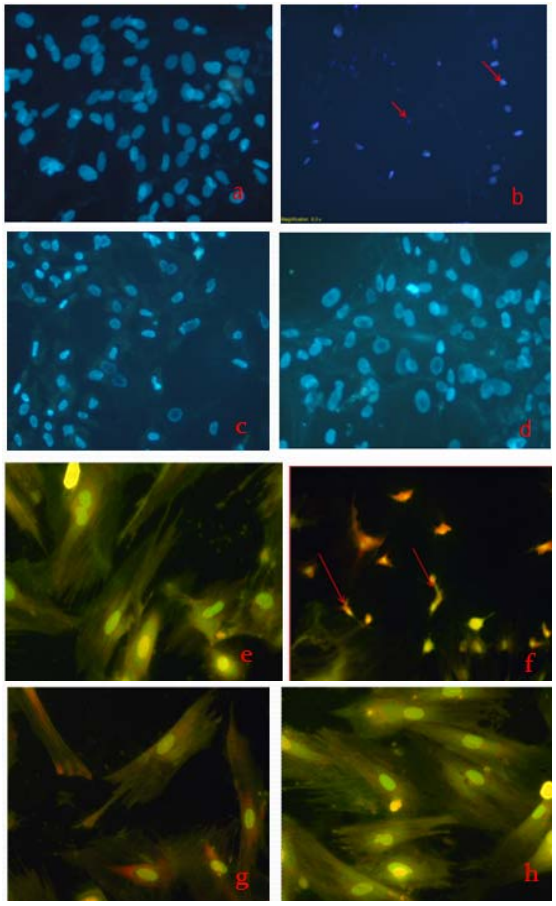
سلول‌های تیمار شده با ویتامین E (۵۰ میکرومولار) ، نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P<0.05). درحالیکه در سلول‌های گروه تیمار همزمان سدیم آرسنیت و ویتامینE ، تغییر معنی‌داری در سطح کلسیم داخل سلولی و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (جدول۲).

جدول ۲: مقایسه اثر همزمان سدیم آرسنیت (۲۰ نانومولار) و ویتامین E (۵۰ میکرومولار) بر میزان کلسیم داخل سلولی و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ rMSCs با گروه کنترل، پس از ۲۱ روز.

	میزان فعالیت آنزیم آلکالین سفاتاز(U/L)	میزان کلسیم (mg/dl)
کنترل	۷۱/۹۹ ^{b}±۰/۰۰	۳۰/۸۸ ^{b}±۰/۰۰
سدیم آرسنیت	۲۷/۳۳ ^{a}±۰/۴۶	۱۰/۳۴ ^{a}±۰/۳۱
سدیم آرسنیت + ویتامین E	۷۴/۳۸ ^{b}±۰/۰۰	۳۱/۴۴ ^{b}±۰/۶۲
ویتامین E	۸۷/۵۰ ^{c}±۰/۷۹	۴۹/۱۷ ^{c}±۰/۰۰

مقادیر به صورت means±SD می‌باشد و میانگین‌های با کدهای a، b و c، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر هستند (one way ANOVA tukey's test,P<0.05).

بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها: میانگین قطر هسته سلول‌های بنیادی مزانشیم تیمار شده با ۲۰ نانومولار سدیم آرسنیت نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌دار و در گروه تیمار شده با ۵۰ میکرومولار ویتامین E، نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<0.05). اما تغییر معنی‌داری در میانگین قطر هسته سلول‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت و ویتامین E به صورت همزمان، نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (شکل۱ و جدول۳). رنگ‌آمیزی سیتوپلاسم سلول‌ها با رنگ آکریدین اورنژ نیز، سیتوپلاسم چندوجهی با زوائد قابل تشخیص را در سلول‌های گروه کنترل نشان داد ولی سیتوپلاسم سلول‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت، منقبض و از حالت چندوجهی خارج شده بود. در مقابل سیتوپلاسم سلول‌ها در گروه تیمار شده با ویتامینE، گسترش زیادی یافته بود و هسته نیز در برخی سلول‌ها از موقعیت مرکزی خود خارج و به حاشیه سیتوپلاسمی سلول کشیده شده بود. اما در میزان گستردگی سیتوپلاسم سلول‌های گروه تیمار همزمان سدیم آرسنیت و ویتامین E، تغییر قابل توجهی نسبت به گروه کنترل، مشاهده نشد (شکل ۱).



شکل۱: رنگ‌آمیزی هوخست و آکریدین اورنژ (بزرگنمایی 400x) در سلول‌های بنیادی مزانشیم تمایز یافته رت بالغ rMSCs به استئوبلاست، ۲۱ روز پس از تیمار با سدیم آرسنیت و ویتامین E در محیط استئوژنیک.

a،e) گروه کنترل. b،f) سلول‌های تیمار شده با ۲۰ نانومولار سدیم آرسنیت. c، g) سلول‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت (۲۰ نانومولار) و ویتامین E (۵۰ میکرومولار) به صورت همزمان. d،h) سلول‌های تیمار شده با ۵۰ میکرومولار ویتامین E. (پیکان‌ها در شکل b، فشردگی کروماتین را در هسته سلول‌ها و در شکل f، انقباض و فشردگی سیتوپلاسم را نشان می‌دهد).

جدول ۳: مقایسه اثر همزمان سدیم آرسنیت و ویتامین E بر میزان آسیب DNA (درصد) و میانگین قطر هسته در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ با گروه کنترل، ۲۱ روز پس از تیمار با دوزهای ۲۰ نانومولار سدیم آرسنیت و ۵۰ میکرومولار ویتامینE.

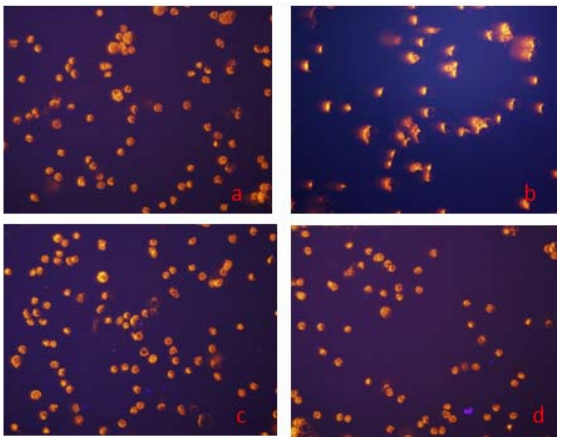
	درصد سلول‌های دارای دنباله کامتی					میانگین قطرهسته
	درجه ۰	درجه۱	درجه۲	درجه۳	درجه ۴	سلول‌ها(µm)
کنترل	۶۲/۶۶ ±۰/۰۸^{b}	۰/۷۰^{bc}±۲۴/۰	۰/۰۰^{b}±۶/۰۰	۰/۰۰^{a}±۳/۶۶	۰/۰۰^{a}±۳/۳۳	۱۲/۴۸^{b}±۰/۰۰
سدیم آرسنیت	۲۴/۶۶^{a}±۰/۰۰	۰/۰۰۳^{c}±۲۵/۳	۰/۷۰^{c}±۱۲/۰۰	۳/۶۰^{b}±۱۸/۰۰	۰/۷۰^{b}±۲۰/۰۰	۱۰/۰۶^{a}±۰/۰۸
سدیم آرسنیت+ ویتامین E	۶۵/۵۰^{c}±۰/۰۰	۰/۰۰^{b}±۲۳/۸۰	۰/۰۰^{ab}±۴/۷۲	۰/۷۰^{a}±۳/۱۶	۰/۰۰^{a}±۳/۰۰	۱۲/۵۴^{b}±۰/۰۴
ویتامین E	۷۲/۶ ^{d}±۰/۰۰۶	۰/۰۴۳ ^{a}±۱۶/۳۳	۰/۰۰^{a}±۴/۳۳	۰/۰۰^{a}±۲/۶۶	۰/۰۰^{a}±۲/۰۰	۰/۰۰^{c}±۱۳/۹۴

مقادیر به صورت means±SD می‌باشد و میانگین‌های با کدهای a، b و c، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر هستند (one way ANOVA tukey's test,P<0.05).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج آزمون کامت: در بررسی اثر سدیم آرسنیت و ویتامینE بر سلامت هسته سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ rMSCs توسط آزمون کامت، مشخص شد که در گروه کنترل و همچنین گروه تیمار همزمان سدیم آرسنیت و ویتامین E، تقریبا هسته اغلب سلول‌ها به صورت یکنواخت با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شده و بدون دنباله بودند که بیانگر سلامت DNA می‌باشد. اما در گروه سلول‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت، DNA شکسته شده تحت تاثیر میدان الکتریکی به صورت دنباله یا کامت به همراه باقی‌مانده هسته ها دیده شد و این نشانه تخریب DNA و مرگ سلولی، بدنبال تیمار سلول‌ها با ۲۰ نانومولار سدیم آرسنیت بود. در حالیکه در گروه سلول‌های تیمار شده با ویتامین E، تقریبا هسته تمام سلول‌ها به صورت یکنواخت با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شده و دنباله کامتی در سلول‌های این گروه مشاهده نشد (شکل۲).



شکل ۲: تست کامت در سلول‌های بنیادی مزانشیم تمایز یافته رت بالغ rMSCs به استئوبلاست، ۲۱ روز پس از تیمار با سدیم آرسنیت و ویتامین E (بزرگنمایی 200X).

a) گروه کنترل. b) گروه سلول‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت (۲۰ نانومولار). c) گروه سلول‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت و ویتامین E به‌طور همزمان. d) سلول‌های تیمار شده با ویتامین E (۵۰ میکرومولار).

همچنین طبق مطالعات کمی نتایج حاصل از آزمون کامت، درجات مختلفی از طول دنباله‌ی کامت در تصاویر مشاهده گردید که جهت بررسی و مقایسه دقیق‌تر، داده‌های حاصل براساس طول دنباله کامت (میکرومتر)، به پنج درجه متفاوت تقسیم شد و براین اساس افزایش معنی‌داری در میزان آسیب DNA و حرکت قطعات شکسته شده DNA در میدان الکتریکی در سلول‌های بنیادی مزانشیم تیمار شده با سدیم آرسنیت و همچنین کاهش معنی‌داری در میزان آسیب DNA در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان تیمار شده با ویتامین E در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل مشاهده گردید ($P<0.05$). اما در گروه تیمار همزمان سدیم آرسنیت و ویتامین E تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل، در درصد سلول‌های دارای دنباله کامتی دیده نشد (جدول۳).

بحث:

در مطالعه حاضر سدیم آرسنیت، باعث کاهش توانایی زیستی در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ rMSCs گردید، این یافته در راستای نتایج حاصل از مطالعه گرونگ و همکاران بر روی سلول‌های فیبروبلاست موش در سال ۲۰۱۰ می‌باشد (۱۶).

ویلاسنور و همکاران، کنده و همکاران و همچنین چای و همکاران به‌ترتیب در سال‌های ۲۰۰۶، ۲۰۰۷ و ۲۰۰۷، اثر سدیم آرسنیت را بر سلول‌های β پانکراس (۱۷)، لنفوسیت‌های T موش (۱۸) و سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه ادراری (uroepithelial) انسان (۱۹) مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که سدیم آرسنیت در رفتاری وابسته به دوز و زمان، باعث کاهش توانایی زیستی، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، تولید رادیکال‌های آزاد گروه اکسیژن (ROS) و افزایش سطح استرس اکسیداتیو در این سلول‌ها می‌گردد.

هرچند که مکانیسم سمیت سدیم آرسنیت به خوبی مشخص نشده است، اما برخی مطالعات نشان داده‌اند که سدیم آرسنیت با دپلاریزه کردن غشای میتوکندری، باعث ایجاد اختلال در زنجیره تنفسی (۲۰)، افزایش سطح رادیکال‌های آزاد (۷)، مهار تشکیل ATP طی گلیکولیز و درنتیجه کاهش سطح انرژی در سلول‌ها می‌گردد (۲۱).

از سوی دیگر سدیم آرسنیت با واکنش با گروه‌های تیول و سولفیدریل آنزیم‌های میتوکندریایی ترمیم‌کننده DNA و مهار فعالیت این آنزیم‌ها، موجب آسیب و قطعه قطعه شدن DNA و در نتیجه مرگ سلولی می‌شود (۲۰). طبق مطالعات صورت گرفته در سال ۲۰۱۰ نیز مشاهده شد که دوز ۰/۱ میکرومولار سدیم آرسنیت طی مدت زمان ۳۶ ساعت، باعث القای آپوپتوزیس، تغییرات مورفولوژیک و تغییر در پروفایل پروتئینی سلول‌های بنیادی مزانشیم می‌گردد (۷).

با توجه به اینکه سدیم آرسنیت موجب تشکیل ROS (۷)، افزایش سطح استرس اکسیداتیو و القای آپوپتوزیس

www.SID.ir

Archive of SID

(۷) در سلول‌ها می‌شود، بنابراین به نظر می رسد ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی بتواند اثرات مخرب سدیم آرسنیت را تعدیل کند. همانگونه که در این بررسی نیز نشان داده شد، تیمار همزمان سلول‌ها با سدیم آرسنیت و ویتامین E، کاهش توانایی زیستی، افزایش شکستگی و آسیب DNA و همچنین مهار تمایز استئوژنیک، تحت تاثیر تیمار سلول‌ها با سدیم آرسنیت را به طور معنی‌داری و تا حد گروه کنترل جبران نمود و در حقیقت ویتامین E توانست آثار سمی این آلاینده زیست محیطی را در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ کاهش دهد.

علاوه بر این ویتامینE می‌تواند باعث تغییر در الگوی بیان ژن‌ها در سلول‌ها نیز شود. طبق مطالعات صورت گرفته توسط آن و همکاران در سال ۲۰۱۱ که اثر ویتامینE را بر قدرت تکثیر و سطح بیان ژن آلکالین‌فسفاتاز در سلول‌های مزانشیم انسانی مورد بررسی قرار داده بودند; نشان داده شد که دوز ۱۰۰ میکرومولار ویتامینE پس از ۳ روز تیمار، باعث افزایش معنی‌دار سطح بیان ژن آلکالین فسفاتاز و Runx-2 می‌گردد (۲۲).

میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی و همچنین سطح فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز که به میزان بیان ژن Runx-2 وابسته هستند، از مهم‌ترین شاخص‌های تمایز استئوژنیک محسوب می‌شوند (۲۲) و سطح بیان ژن Runx-2، به مسیر سیگنالی wnt وابسته است. ویتامینE با افزایش میزان فعالیت β–Catenin در سلول باعث جلوگیری از مهار مسیر سیگنالی wnt، افزایش بیان ژن Runx-2 و درنتیجه افزایش میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و رسوب کلسیم در ماتریکس خارج سلولی می‌شود (۲۲،۲۳).

اما سدیم آرسنیت با القای استرس اکسیداتیو، مسیر سیگنالی wnt و درنتیجه تمایز استئوژنیک را در سلول‌های بنیادی مزانشیم مهار می‌کند، به‌علاوه این آلاینده زیست محیطی با تولید هیدروژن‌پراکسید (H_2O_2) و مهار کانال‌های کلسیمی باعث برهم زدن هموستاز کلسیم شده و و از ورود کلسیم به داخل سلول جلوگیری می کند. ورود کلسیم به داخل سلول برای سنتز هیدروکسی آپاتیت که بخش معدنی سلول استخوانی را تشکیل می‌دهد، لازم و ضروری می‌باشد (۲۱،۲۴).

ویتامینE با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی خود و با برقراری تعادل در قابلیت نفوذپذیری انتخابی غشای سلول‌ها، باعث ورود کلسیم و فعال شدن کانال‌های کلسیمی در سلول می‌شود و به برقراری و حفظ هموستاز کلسیم و در نتیجه تعادل سلولی کمک می‌کند; چرا که کاهش یا فقدان کلسیم در سلول باعث مهار پمپ‌های سدیم-پتاسیمی وابسته به کلسیم می‌گردد و سلول را در مسیر مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده قرار می‌دهد. بنابراین ویتامینE با افزایش ورود کلسیم به سلول، به معدنی شدن ماتریکس و القای تمایز استئوژنیک نیز کمک می‌کند (۱۰،۲۴) در مطالعه حاضر هم ویتامینE باعث افزایش سطح کلسیم داخل سلولی، رسوبات فسفات کلسیمی ماتریکس خارج سلولی و القای تمایز استئوژنیک، در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان گردید.

طبق نتایج مطالعه حاضر بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان انقباض شدید سیتوپلاسم وکاهش معنی‌دار قطر هسته در سلولهای تیمار شده با سدیم آرسنیت و درمقابل گستردگی سیتوپلاسم به‌همراه افزایش معنی‌دار قطر هسته در سلول‌های تیمار شده با ویتامینE مشاهده شد. از آنجاییکه سدیم آرسنیت، یک آنتی‌سولفیدریل است، تمایل به ترکیب شدن با گروه‌های سولفیدریل و تیول در سیستئین پروتئین‌های سلولی را دارد. بنابراین به پروتئین‌های اسکلت سلولی مثل اکتین و توبولین متصل می‌شود و با تولید رادیکال‌های آزاد، پلیمریزاسیون این پروتئین‌ها را مهار می‌کند و بدین طریق سبب تخریب پروتئین‌های سیتواسکلتون و انقباض سیتوپلاسم می‌گردد (۲۵،۲۶).

از سوی دیگر ویتامینE باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و جلوگیری از تخریب پروتئین‌های سایتواسکلتون مثل اکتین می‌گردد (۱۳)، بنابراین می‌تواند باعث سنتز شبکه گسترده‌ای از رشته‌های اکتین در اسکلت سلولی شود و همین امر هم گستردگی سیتوپلاسم و خارج کردن هسته سلول از موقعیت مرکزی، که هر دو به‌عنوان تغییرات مورفولوژیکی در راستای تمایز استئوژنیک هستند، را موجب می‌شود (۱۴).

نتیجه نهایی:

سدیم آرسنیت، به عنوان یک آلاینده زیست محیطی، باعث مهار تمایز استئوژنیک و در نتیجه مهار تشکیل استخوان و همچنین کاهش بقای سلولی در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان می‌گردد. ویتامینE هم به

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی و موثر، قادر است توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ را افزایش دهد. بنابراین براساس نتایج این مطالعه، پیشنهاد می‌شود که در زمینه ارتباط بین بیماری‌های استخوانی مثل استئوپروزیس و سطوح سرمی سدیم آرسنیت و ویتامینE تحقیقات بیشتری در جوامع انسانی صورت گیرد. شاید ویتامینE بتواند ماده‌ای موثر در خنثی کردن اثرات سمی آلاینده‌های زیست محیطی در انسان نیز محسوب گردد.

سپاسگزاری :

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک که با پشتیبانی مالی انجام این پروژه تحقیقاتی را امکان‌پذیر نمودند. ضمناً منافع شخصی نویسندگان با نتایج این مطالعه ارتباطی نداشته است.

References

1. Soleimani Mehranjani M, Shariatzadeh SMA, Maleki P, Mahmoodi M. Quantitative study of the histopathological effects of sodium arsenite on kidney structure in rats. Arak Med Univ J 2008; 10 (4): 57-63. (Persian)
2. Peraza MA, Carter DE, Gandolfi AJ. Toxicity and metabolism of subcytotoxic inorganic arsenic in human renal proximal tubule epithelial cell (HK-2). Cell Biol Toxicol 2003; 19 (4): 253-64.
3. Liu SX, Athar M, Lippai I, Waldren C, Hei TK. Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98 (4): 1643-8.
4. Jana K, Jana S, Samanta PK. Effect of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary- testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. Reprod Biol and Endocrin 2006; 4 (9): 1-13.
5. Momeni HR, Soleimani Mehranjani M, Eskandari N, Hemayatkhah Jahromi V. Protective effect of curcumin on testis histopathology in sodium arsenite-treated adult mice. Arak Med Univ J 2014; 17 (84): 73-81. (Persian)
6. Chatterjee A, Das D, Mandal BK, Chowdhury TR, Samanta G, Chakraborti D. Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. Part I. Arsenic species in drinking water and urine of the affected people. Analyst 1995; 120 (3): 917-24.
7. Abnosi MH, Soleimani Mehranjani M, Momeni HR, Mahdiyeh M, Shojafar E, Barati M. Effect of sodium arsenite on cell viability, morphology and protein profile in rat bone marrow mesenchymal stem cells. Sci J Hamadan Univ Med Sci 2010; 2 (56): 24-31. (Persian)
8. Kann S, Stes C, Reichard JF, Huang MY, Sartor MA, Schwemberger S. Butilhydroquinone protects cells genetically deficient in glutathione biosynthesis from arsenite-induced apoptosis without significantly changing their prooxidant status. Toxicol Sci 2005; 87 (2): 365-84.
9. Sidhu JS, Ponce A, Vredevoogd MA, Yu X , Gribble E, Woo Hong S. Cell cycle inhibition by sodium arsenite in primary embryonic rat midbrain neuroepitelial cells. Toxicol Sci 2005; 89 (2): 475-84.
10. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. Nutrition 2002; 18 (10): 872-9.
11. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. Free Radic Biol Med 2007; 43 (1): 4-15.
12. Traber MG, Burton GW, Hughes L, Keith UI, Hideki H, Malloy M. Discrimination between forms of vitamin E by humans with and without genetic abnormalities of Lipoprotein metabolism. J Lipid Res 1992; 33 (1): 1171-82.
13. Soleimani Mehranjani M, Azimi AS. In Vitro study of the effect of Vitamin E on viability, morphological changes and induction of osteogenic differentiation in adult rat bone marrow mesenchymal stem cells. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 22 (4): 1406-18. (Persian)
14. Abnosi MH, Dehdehi L. Study of morphology and biochemistry of rat bone marrow mesenchymal stem cells before and after osteogenic differentiation: a comparative study. J Cell Tissue 2012; 3 (2): 103-11. (Persian)
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
16. Gurung RL, Balakrishnan L, Bhattacharjee RN, Manikandan J, Swaminathan S, Hande MP. Inhibition of poly (ADP-Ribose) polymerase-1 in telomerase deficient mouse embryonic fibroblasts increases arsenite-induced genome instability. Genome Integrity 2010; 1:5.
17. Villasenor AD, Soto MCS, Cebrian ME, Wegman PO, Hiriat M. Sodium arsenite impairs insulin secretion and transcription in pancreatic β-cells. Toxicol Appl Pharmacol 2006; 214 (1): 30-4.
18. Conde P, Saavedra LCA, Acevedo RCG, Aranda ESC. Sodium arsenite induced inhibition of cell proliferation is related to inhibition of IL-2 mRNA expression in mouse activated T cells. Arch Toxicol 2007; 81 (4): 251-9.

www.SID.ir

Archive of SID

19. Chai CY, Huang YC, Hung WC, Kang WY, Chen WT. Arsenic salt-induced DNA damage and expression of mutant p53 and COX-2 proteins in SV-40 immortalized human uroepithelial cells. Mutagenesis 2007; 22 (6): 403-8.
20. Tchounwou BP, Centeno JA, Patlolla AK. Arcenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis a health risk assessment and management approach. Mol Cellular Biochem 2004; 255 (1-2): 47-55.
21. Giorgi C, Agnolectto C, Bononi A, Bonora M, Marchi ED. Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. Mitochondrion 2012; 12 (1): 77-85.
22. Ahn KH, Jung HK, Jung SE, Yi KW, Park HT, Shin JH. Microarray analysis of gene expression during differentiation of human mesenchymal stem cells treated with Vitamin E in vitro into osteoblasts. Korean J Bone Metab 2011; 18 (1): 23-32.
23. Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, Barry FP, McNamara LM. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. Eur Cell Mater 2012; 23: 13-27.
24. Almeida M, Han L, Millan MM, OBrien CA, Manolgas SC. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting catenin from t cell factor to forkhead box o-mediated transcription. J Biol Chem 2007; 282 (37): 27298-305.
25. Li W, Chou LN. Effects of sodium arsenite on the cytoskeleton and cellular glutathione levels in cultured cells. Toxicol Appl Pharmacol 1992; 114 (1): 132-9.
26. Che XF, Zheng CL, Owatari S, Mutoh M, Gotanda T, Jeung HC. Overexpression of survivin in primary ATL cells and sodium arsenite induces apoptosis by down-regulating survivin expression in ATL cell lines. Blood 2006; 107 (12): 4880-7.

www.SID.ir

Archive of SID

Original Article

The Effect of Vitamin E on the In Vitro Differentiation of Adult Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Osteoblast During Sodium Arsenite Exposure

M. Soleimani Mehranjani, Ph.D.*; M. Mahdiyeh, Ph.D.**; S. Hoseini, M.Sc.***
A.S. Azimi, M.Sc.***

Received: 15.6.2015 Accepted: 5.12.2015

Abstract

Introduction & Objective: Sodium arsenite disturbs the differentiation of adult rat bone marrow mesenchymal stem cells (rMSCs) to Osteoblast through oxidative stress. We aimed to investigate the preventive effect of vitamin E, a strong antioxidant, in sodium arsenite toxicity on rMSCs differentiation to osteoblast.

Materials & Methods: rMSCs were cultured in Dulbecco's Modified Eagles Medium containing 15% Fetal Bovine Serum and divided into: control, sodium arsenite (20 nM), vitamin E (50 μM) and sodium arsenite + vitamin E for 21 days in the osteogenic media containing 10% of fetal bovine serum. Cell viability, bone matrix mineralization, intercellular and extracellular calcium, alkaline phosphatase activity, DNA damage and cell morphological changes were evaluated. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's test and means were considered significantly different at $P<0.05$.

Results: Cell viability, bone matrix mineralization, calcium deposition, alkaline phosphatase activity and nuclei diameter decreased significantly in the sodium arsenite group. The mentioned parameters increased significantly in cells treated with sodium arsenite + vitamin E to the control level ($P<0.05$). Cytoplasmic extensions were also observed in the vitamin E group.

Conclusions: Vitamin E reduces sodium arsenite toxicity, increasing osteogenic differentiation in rMSCs.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2015; 22 (4):276-285)

Keywords: Cell Viability / Mesenchymal Stem Cells / Osteogenic Differentiation
Sodium arsenite / Vitamin E

---

* Associate Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences Arak University, Arak, Iran. (m-soleimani@araku.ac.ir)
** Assistant Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences Arak University, Arak, Iran.
*** M.Sc. in Developmental Biology, Arak University, Arak, Iran.

www.SID.ir