

اثر سدیم آرسنیت بر قدرت زیستی، مورفولوژی و نمایه پروتئینی سلول های بنیادی مزانسیم مغز استخوان رت

دکتر محمدحسین آبنوسی*، دکتر ملک سلیمانی مهرنجانی**، دکتر حمیدرضا مؤمنی*
دکتر مجید مهدیه نجف آبادی*، الهام شجاع فر***، مژگان براتی***

دریافت: ۸۸/۱۲/۴، پذیرش: ۸۹/۴/۱۵

چکیده:

مقدمه و هدف: سدیم آرسنیت به عنوان یک آلاینده زیست محیطی در هوا، آب و پوسته زمین وجود دارد و سلامتی انسان را تهدید می کند. هدف از این مطالعه تعیین اثر سدیم آرسنیت بر قدرت زیستی و مورفولوژی سلول های بنیادی مزانسیمی مغز استخوان رت می باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی سلول های بنیادی مزانسیم مغز استخوان رت در محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۵ و پنی سیلین-استرپتومایسین تا مرحله پاساژ سوم رشد داده شد. سپس سلول ها با سدیم آرسنیت (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۲/۵، ۱۲/۵ و ۲۰ میکرومولار) در ۴۸، ۳۶، ۲۴، ۱۲ ساعت تیمار شد. قدرت زیستی سلول ها با رنگ آمیزی تریپان بلو و تست MTT بررسی و سپس دز ۰/۱ میکرومولار و مدت زمان تیمار ۳۶ ساعت برای ادامه مطالعه انتخاب شد. مورفولوژی سلول ها با رنگ آمیزیهای هوخست، پروپیدیوم آیواید و آکریدین اورنژ و همچنین تغییرات پروفیل پروتئین سلولها توسط الکتروفورز مورد مطالعه قرار گرفت. اطلاعات بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و توسط آزمونهای آماری ANOVA یکطرفه و دوطرفه آنالیز گردید.

نتایج: بر اساس آنالیز واریانس دوطرفه داده ها، اثر متقابل و همزمان دز مصرفی سدیم آرسنیت و زمان تیمار باعث کاهش معنی دار قدرت زیستی سلول های مزانسیم مغز استخوان رت شد ($P < 0.001$). آنالیز واریانس یک طرفه داده ها نشان داد که قدرت زیستی سلولها از دز ۰/۱ میکرومولار در زمان ۳۶ ساعت به بعد در همه زمانهای تیمار نسبت به کنترل دارای تفاوت معنی دار بود ($p < 0.05$). تغییرات مورفولوژیک شامل متراکم شدن و تغییر شکل هسته، تخریب غشاء و چروکیدگی سیتوپلاسم مشاهده شد. علاوه بر آن نمایه پروتئینی سلول های تحت تیمار نیز نسبت به کنترل تغییرات آشکاری را نشان داد.

نتیجه نهایی: مسمومیت با سدیم آرسنیت باعث تغییر در مورفولوژی و نمایه پروتئینی سلولهای مزانسیم مغز استخوان رت می شود و کاهش معنی دار قدرت زیستی این سلولها وابسته به دز و زمان می باشد.

کلید واژه ها: سلولهای بنیادی مزانسیم / سدیم آرسنیت / شکل شناسی / قابلیت حیات / موش

مقدمه:

تنفس، یا گوارش مواد غذایی و آب آشامیدنی آلوده وارد بدن موجودات زنده می شود (۱،۲). آرسنیک در حالت اکسیداتیوهای متعدد وجود دارد که از بین آنها اکسید ۳ ظرفیتی اثرات سمی بیشتری دارد (۳). از طرفی سازمان

آلودگی محیط زیست با آرسنیک از طریق صنایع ذوب فلزات، سوختن ذغال سنگ و استفاده از حشره کشها و آفت کش ها به وجود می آید و از طریق پوست،

* استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک (abnosi2002@yahoo.com)

** دانشیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک

*** کارشناسی ارشد زیست شناسی دانشگاه اراک

چسبیده به فلاسک با بافر فسفات مثبت (حاوی Ca^{+2} و Mg^{+2}) شسته و به محیط کشت تازه اضافه شد. به سلول های چسبیده ۱۴-۱۰ روز فرصت برای تکثیر داده و در طی این مدت هر سه روز محیط کشت تعویض شد. بعد از پر شدن کف فلاسک کشت سلول ها با Trypsin-EDTA جدا و نیمی از آن در یک فلاسک دیگر کشت داده شد و این کار تا پاساژ سوم تکرار گردید.

برای اثبات مزانشیم بودن سلول های خالص شده، علاوه بر قابلیت چسبندگی، سلول های استخراج شده به سلول های استخوانی و چربی نیز تمایز داده شد. سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت پس از پاساژ سوم در پلیت شش خانه کشت و بعد از چسبیدن به کف ظرف با محیط کشت DMEM حاوی FBS^{+} (FBS) به همراه منیزیم و کلسیم کلرید) و ترکیبات تمایزی استئورژنیک (بتا- گلیسرول فسفات، دگزامتازون و آسکوربیک اسید) و آدیپوژنیک (بتا- گلیسرول فسفات، دگزامتازون، ایندومتاسین و آسکوربیک اسید) (۱۳) به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد دی اکسید کربن تیمار شد. بعد از این مدت سلول ها توسط رنگ آلیزارین رد (برای استئوبلاست) و اوایل رد (برای آدیپوسیت) رنگ آمیزی شد.

سدیم آرسنیت از شرکت مرک (Merck) آلمان خریداری شد (لازم بذکر است کلیه مواد مورد استفاده در این پژوهش همگی از شرکت سیگما ساخت کشور آمریکا تهیه گردید مگر در مواردی که به آن اشاره شده است). سلول ها پس از ۲۴ ساعت کشت در پلیت پلاستیکی ۱۲ خانه در معرض تیمار با دزهای مختلف سدیم آرسنیت (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۲/۵، ۱۲/۵ و ۲۰ میکرومولار) برای مدت زمان ۴۸ و ۳۶، ۲۴، ۱۲ ساعت قرار گرفت.

برای سنجش قدرت زیستی سلول های تیمار شده با سدیم آرسنیت ابتدا سلول ها با تریپسین جدا و پس از سانتریفوژ، رسوب سلولی با محیط کشت تازه به حجم یک میلی لیتر رسید و سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاصل با حجم مساوی از تریپان بلو مخلوط و به مدت ۲ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. تعداد سلول های زنده و مرده با لام هموسایتومتر بررسی و بصورت درصد بیان شد. در این روش، سلول های مرده به علت نفوذ پذیری به تریپان بلو، به رنگ آبی دیده شد.

غذا و داروی آمریکا برای درمان و جلوگیری از بروز مجدد بیماری لوسمی حاد پرومیلوسیتی تجویز فرم سه ظرفیتی آرسنیت را پیشنهاد داده است (۴)، طبق مطالعات انجام شده میزان این ماده سمی در خون محیطی بیماران تحت درمان تا ۵ میکرو مولار یا بیشتر اندازه گیری شده است (۵). گزارش شده است که سدیم آرسنیت باعث القای آپوپتوزیس در سلول های فیبروبلاست جنین موش (۲) نوروایپتیلیال در مغز میانی رت (۳)، لنفوسیت $CD4^{+}T$ (۶) و میوبلاستهای H9C2 (۷) می شود. مکانیسم سمیت آرسنیک به طور دقیق شناخته نشده است اما برخی مطالعات نشان داده است که آرسنیک باعث تخریب هموستاز یونی در سلول (۸) و افزایش تولید رادیکال آزاد اکسیژن شده و مسیرهای وابسته به کاسپاز را در سلول ها راه اندازی می کند (۹).

سلول های مزانشیم مغز استخوان در سطح داخلی حفره مغز استخوان قرار داشته و توان تمایز به سلول های استخوان، غضروف، چربی، تاندون و غیره را دارا میباشند (۱۰) از طرفی تحقیقات نشان داده اند که این سلول ها میتوانند به سلول های پیش ساز سلول های خونی تبدیل شوند (۱۱) همچنین این سلول ها با ورود به خون محیطی در ترمیم بافتهای مختلف از جمله بافت قلب بهنگام سکتة نقش بسزائی را ایفا می کنند (۱۲).

با توجه به اینکه تاکنون اثر سمی سدیم آرسنیت بر قدرت زیستی، مورفولوژی و پروفیل پروتئینی سلول های مزانشیم مغز استخوان مطالعه نشده و از طرفی اهمیتی که این سلول ها در ترمیم بافتهای صدمه دیده مانند استخوان دارند، در مطالعه حاضر اثرات سمی سدیم آرسنیت بر پارامترهای ذکر شده در سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار:

این مطالعه از نوع تجربی میباشد که در آن استخوان ران و ساق رت پس از بی هوشی با دی اتیل اتر توسط جراحی جدا و تحت شرایط استریل، مغز استخوان توسط ۳ میلی لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۵٪ FBS و پنی سیلین/ استرپتومایسین در لوله فالکون ۱۵ میلی لیتری فلش اوت شد. لوله فالکون در دور ۲۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و رسوب سلولی حاصل با یک میلی لیتر محیط کشت هموزن و به فلاسک ۲۵ میلی لیتری منتقل گردید. بعد از ۲۴ ساعت، سلول های

پروپیدیم آیوداید همراه با هوخست برای تمایز بین سلول مرده و زنده (۱۵) و رنگ آمیزی آکریدین اورانژ برای بررسی مورفولوژی سیتوپلاسم توسط میکروسکوپ فلورسنس (Olympus IX70) انجام گردید.

پس از استخراج پروتئین توسط بافر حاوی ۱۰۰ میلی مولار تریس، ۱ درصد سدیم دو دسیل سولفات و بتا مرکاپتو اتانول و تعیین غلظت پروتئین‌ها توسط روش لاوری، پروفیل پروتئین سلول‌های تیمار شده با ۰/۱ میکرومولار مولار سدیم آرسنیت بعد از ۳۶ ساعت با استفاده از الکتروفورز دنا توره (SDS-PAGE) بر روی ژل ۱۲ درصد با ولتاژ ثابت تعیین و سپس ژل الکتروفورز توسط کماسی بلو رنگ آمیزی شد. باند های پلی پپتیدی توسط نرم افزار Genetools شرکت Syngene انگلستان آنالیز گردید.

با استفاده از نرم افزار SPSS برای تعیین اثر متقابل دز و واریانس دوطرفه (two-way ANOVA) و برای مقایسه تفاوت میانگین قابلیت حیات سلول‌ها در دزها و زمان‌های مختلف از آنالیز واریانس یک طرفه (one way-ANOVA) استفاده شد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج:

آنالیز واریانس دو طرفه داده های بدست آمده از روش رنگ آمیزی تریپان بلو نشان داد که اثر متقابل و همزمان دز مصرفی سدیم آرسنیت و زمان تیمار باعث کاهش معنی دار قدرت زیستی سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت می شود ($p < 0.001$) (جدول ۱).

علاوه بر روش تریپان بلو برای بررسی قدرت زیستی سلول‌ها تیمار شده از روش MTT نیز استفاده شد. در این روش آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری توانایی احیای رنگ زرد دی متیل تیا زول دی فنیل تترازولیموم را به بلورهای ارغوانی و نامحلول فورمازان دارد (۱۴). سلول‌های بنیادی مزانشیم به مدت ۲۴ ساعت در پلیت ۹۶ خانه کشت و پس از چسبیدن این سلول‌ها به کف پلیت ۹۶ خانه با غلظت های مذکور از سدیم آرسنیت تیمار و پس از زمان‌های ۴۸، ۳۶، ۲۴، ۱۲ ساعت ۱۰ میکرولیتر MTT به ازای ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. سپس بلور های فورمازان حاصل در DMSO حل و جذب آن توسط ELISA reader (SCO diagnostic, Germany) در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. سپس، بعد از رسم منحنی استاندارد بر اساس میزان جذب برای تعداد 10^5 ، 10^4 ، $7/5 \times 10^4$ ، 5×10^4 و $2/5 \times 10^4$ و صفر سلول زنده، تعداد سلول های زنده پس از تیمار با سدیم آرسنیت با استفاده از فرمول $Y = 0.016X + 0.037$ و $R^2 = 0.996$ در جاییکه Y جذب و X تعداد سلول‌های زنده می باشد، محاسبه گردید.

سلول های چسبیده به پلیت ۲۴ خانه با دز ۰/۱ میکرومولار سدیم آرسنیت به مدت ۳۶ ساعت تیمار شد (با توجه به نتایج آماری آزمونهای تریپان بلو و MTT در مرحله دز یابی، دز ۰/۱ میکرومولار و مدت زمان تیمار ۳۶ ساعت برای بررسیهای بعدی انتخاب شد). رنگ آمیزی کروماتین با هوخست برای مطالعه مورفولوژی هسته،

جدول ۱: مقایسه میانگین درصد توانائی زیستی سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت پس از تیمار با دزهای مختلف سدیم آرسنیت و در زمانهای متفاوت با استفاده از روش رنگ آمیزی تریپان بلو

| ارزش P | زمان (ساعت) | | | | دز (μM) |
|--------|------------------------|--------------|--------------|--------------|---------|
| | ۴۸ | ۳۶ | ۲۴ | ۱۲ | |
| | ۸۹/۶۷ ± ۷/۳۷ | ۹۱/۰۰ ± ۸/۷۲ | ۹۲/۳۳ ± ۴/۶۲ | ۹۵/۶۷ ± ۲/۵۲ | ۰ |
| | ۱۷/۵۷ ± ۵/۵۱ | ۲۴/۳۳ ± ۲/۰۸ | ۷۲/۶۷ ± ۳/۰۵ | ۸۹/۶۷ ± ۲/۵۲ | ۰/۱ |
| | ۴/۷۸ ± ۱/۵۶ | ۱۵/۲۳ ± ۱/۸۰ | ۴۰/۵۳ ± ۳/۵۶ | ۶۷/۶۷ ± ۲/۵۲ | ۰/۵ |
| ۰/۰۰۱ | ۱/۵۵ ± ۰/۴۸ | ۵/۱۳ ± ۰/۶۰ | ۲۹/۶۷ ± ۳/۵۱ | ۵۴/۶۷ ± ۲/۵۲ | ۲/۵ |
| | ۰/۹۹ ± ۰/۳۷ | ۰/۵۹ ± ۰/۱۰ | ۱۲/۷۰ ± ۱/۱۳ | ۳۷/۶۷ ± ۲/۰۸ | ۱۲/۵ |
| | ۰/۱۱ ± ۰/۰۴ | ۰/۱۴ ± ۰/۰۲ | ۳/۸۰ ± ۰/۷۲ | ۱۵/۶۷ ± ۰/۵۸ | ۲۰ |
| ۰/۰۰۱ | * اثر متقابل دز و زمان | | | | |

* اثر متقابل دز و زمان در سطح $P < 0.001$ موجب کاهش درصد توانایی حیات سلول ها می گردد.

کاهش قدرت زیستی سلولهای مزانشیم مغز استخوان رت نیز وابسته به دز و زمان تیمار بوده و نتایج حاصل از نفوذ رنگ تریپان بلو به داخل سلول را تایید کرد.

تغییرات مورفولوژیک سلول ها پس از تیمار با دز ۰/۱ میکرومولار سدیم آرسنیت در مدت زمان ۳۶ ساعت با استفاده از رنگ فلوروسنت هوخست شامل متراکم شدن و تغییر شکل هسته در مقایسه با گروه کنترل بود. رنگ آمیزی پروپیدیم آیویدید افزایش تخریب غشاء و مرگ سلول ها در مقایسه با کنترل را نشان داد. علاوه بر این رنگ آمیزی آکریدین اورانژ چروکیدگی سیتوپلاسم سلولها را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد(شکل ۱).

مقایسه داده ها در روش آنالیز واریانس یک طرفه در دزها برای زمانهای مختلف نشان داد که میانگین قدرت حیات سلولها در دز ۰/۱ میکرومولار برای مدت زمان ۲۴ ساعت تا ۴۸ ساعت با گروه کنترل (صفر میکرومولار) دارای تفاوت معنی دار بود ($P < 0.05$). کاهش توانائی حیات سلولها در ۱۲ ساعت نسبت به کنترل از دز ۰/۵ میکرومولار به بعد دارای تفاوت معنی دار و چنانکه داده ها نشان می دهد دز ۰/۵ میکرومولار از زمان ۲۴ ساعت به بعد باعث کاهش شدید توانائی حیات سلولها شد ($P < 0.05$) (جدول ۲). علاوه بر این آنالیز آماری داده های بدست آمده با روش تترازولیم (MTT) بر اساس توانائی آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری در تبدیل رنگ زرد تترازولیم به کریستال بنفش فرمازون نشان داد که

جدول ۲: مقایسه میانگین توانائی زیستی سلولهای مزانشیم مغز استخوان رت پس از تیمار با دزهای مختلف سدیم آرسنیت در هر یک از زمانهای ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت با روش رنگ آمیزی تریپان بلو و MTT

| دوز (μM) | زمان (ساعت) | | | | | | | |
|----------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | ۴۸ | | ۳۶ | | ۲۴ | | ۱۲ | |
| | تریپان بلو درصد | MTT تعداد | تریپان بلو درصد | MTT تعداد | تریپان بلو درصد | MTT تعداد | تریپان بلو درصد | MTT تعداد |
| ۰ | سلول زنده $10^3 \times$ | سلول زنده $10^3 \times$ | سلول زنده $10^3 \times$ | سلول زنده $10^3 \times$ | سلول زنده $10^3 \times$ | سلول زنده $10^3 \times$ | سلول زنده $10^3 \times$ | سلول زنده $10^3 \times$ |
| ۰/۱ | ۸۹/۶۷ ^a ± ۷/۳۷ | ۵۶/۵۷ ^a ± ۲/۰۲ | ۹۱/۰۰ ^a ± ۸/۷۲ | ۵۷/۳۰ ^a ± ۴/۴۷ | ۹۲/۳۳ ^a ± ۴/۶۲ | ۵۹/۸۱ ^a ± ۱/۴۱ | ۹۵/۶۷ ^a ± ۲/۵۲ | ۶۱/۳۸ ^a ± ۱/۲۳ |
| ۰/۵ | ۱۷/۵۷ ^b ± ۵/۵۱ | ۲۰/۱۱ ^b ± ۰/۴۴ | ۲۴/۳۳ ^b ± ۲/۰۸ | ۲۷/۸۷ ^b ± ۱/۱۰ | ۷۲/۶۷ ^b ± ۳/۰۵ | ۳۶/۱۹ ^b ± ۲/۱۱ | ۸۹/۶۷ ^a ± ۲/۵۲ | ۶۰/۸۶ ^a ± ۱/۳۲ |
| ۲/۵ | ۴/۷۸ ^c ± ۱/۵۶ | ۱۸/۸۳ ^b ± ۰/۲۱ | ۱۵/۲۳ ^{bc} ± ۱/۸۰ | ۲۳/۸۷ ^c ± ۰/۷۵ | ۴۰/۵۳ ^c ± ۳/۵۶ | ۳۱/۲۷ ^{bc} ± ۰/۸۱ | ۶۷/۶۷ ^b ± ۲/۵۲ | ۵۰/۳۸ ^b ± ۴/۰۴ |
| ۱۲/۵ | ۱/۵۵ ^c ± ۰/۴۸ | ۱۷/۹۷ ^b ± ۰/۱۵ | ۵/۱۳ ^{cd} ± ۰/۶۰ | ۱۹/۱۰ ^d ± ۰/۸۲ | ۲۹/۶۷ ^d ± ۳/۵۱ | ۲۸/۳۵ ^c ± ۴/۰۷ | ۵۴/۶۷ ^c ± ۲/۵۲ | ۴۳/۸۲ ^b ± ۳/۵۴ |
| ۲۰ | ۰/۹۹ ^c ± ۰/۲۷ | ۱۳/۵۷ ^c ± ۱/۰۰ | ۰/۵۹ ^d ± ۰/۱۰ | ۱۵/۳۳ ^c ± ۲/۰۴ | ۱۲/۷۰ ^c ± ۱/۱۳ | ۱۶/۱۳ ^d ± ۱/۴۲ | ۳۷/۶۷ ^d ± ۲/۰۸ | ۲۶/۳۰ ^c ± ۱/۸۷ |
| | ۰/۱۱ ^c ± ۰/۰۴ | ۸/۴۰ ^d ± ۰/۷۸ | ۰/۱۴ ^d ± ۰/۰۲ | ۱۱/۲۳ ^f ± ۱/۰۷ | ۳/۸۰ ^f ± ۰/۷۲ | ۱۰/۸۳ ^d ± ۰/۹۵ | ۱۵/۶۷ ^c ± ۰/۵۸ | ۲۲/۴۰ ^c ± ۱/۴۰ |

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار می باشد.

در هر ستون میانگین هائی که با کد حرفهای متفاوت نامگذاری شده اند دارای تفاوت معنی دار می باشند

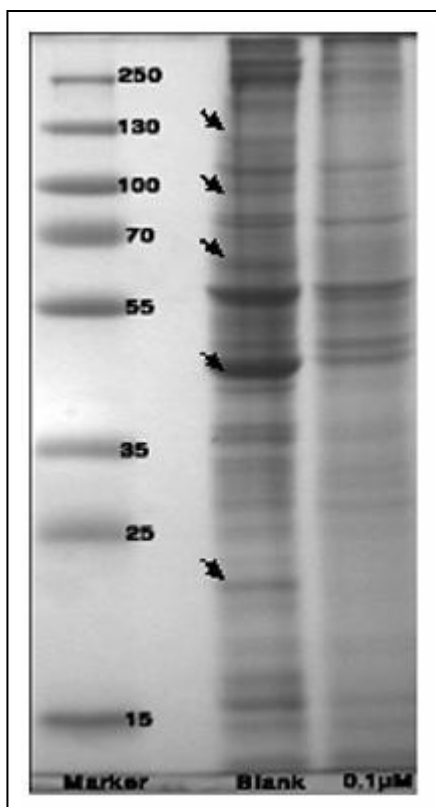
a داده های مربوط به دوز صفر (گروه کنترل) است. داده های گروه های تیمار که با حرف a مشخص شده اند از نظر آماری با گروه کنترل تفاوت معنی دار ندارند

b, c, d, e و f همگی در یک ستون با داده های گروه کنترل و گروههای دیگر که کد حرفهای آنها با هم مختلف است تفاوت معنی دار دارند

bc, این داده ها بجز با داده هائی که حروف b یا c دارند با کلیه داده های دیگر که کد حرفهای دیگر دارند از نظر آماری معنی دار هستند

cd, این داده ها بجز با داده هائی که حروف d یا c دارند با کلیه داده های دیگر که کد حرفهای دیگر دارند از نظر آماری معنی دار هستند

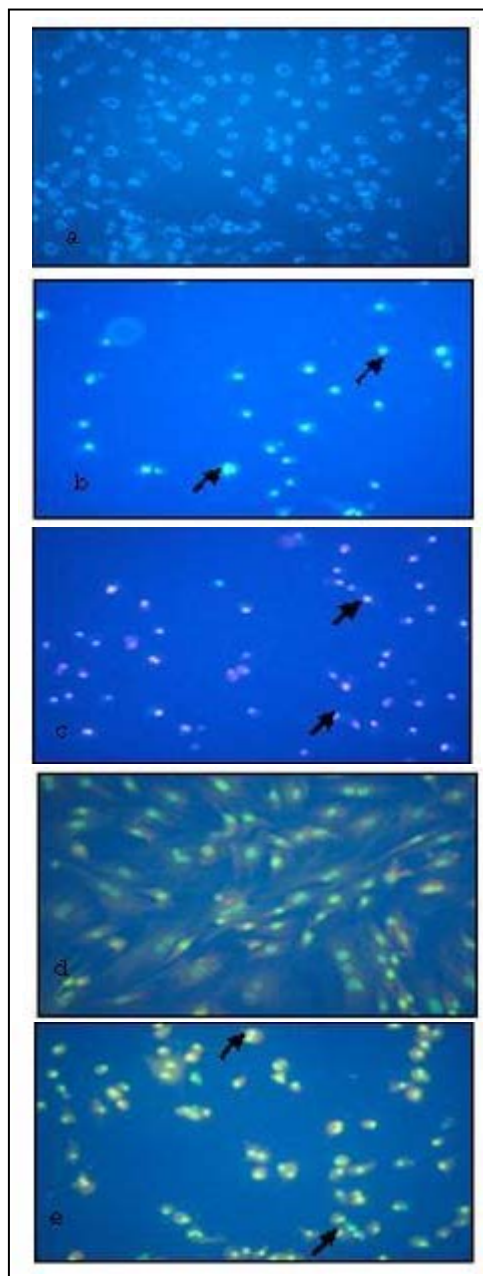
کاهش در باندها گردید. بیشترین کاهش در باندهای با وزن ملکولی ۱۲۳/۵۱، ۱۰۱/۱۸، ۶۴/۹۱، ۴۹/۶۷ و ۲۵/۳۹ کیلو دالتون در سلول های تیمار شده با ۰/۱ میکرومولار سدیم آرسنیت نسبت سلول های کنترل دیده شد. (شکل ۲).



شکل ۲. آنالیز پروفایل پروتئینی سلول های مزانشیمی در گروه های کنترل و تیمار شده با ۰/۱ میکرومولار سدیم آرسنیت در مدت زمان ۳۶ ساعت به وسیله نرم افزار Gene tools پیکان ها معرف باندهای تغییر یافته هستند. وزن ملکولی مارکرها به کیلو دالتون می باشد. مقدار پروتئین قرار داده شده بر روی هر چاهک ۱۵۰ میکرو گرم میباشد.

بحث:

با استفاده از خاصیت چسبندگی به ظروف کشت پلاستیکی (۱۶) تمایز به سلول های استخوانی و سلولهای چربی (۱۷) مشخص شد که سلول های خالص سازی شده در مطالعه حاضر دارای خاصیت مزانشیمی هستند. براساس نتایج حاصل از رنگ آمیزی تریپان بلو و MTT کاهش توانایی حیات سلول های مزانشیم مغز استخوان رت وابسته به دز و زمان بود. تحقیقات انجام گرفته توسط سیدهو در سال ۲۰۰۵ نشان داد که سدیم آرسنیت قدرت زیستی سلول های نورواپیتلیال مغز میانی رت را با



شکل ۱. رنگ آمیزی فلورسین سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تیمار شده با ۰/۱ میکرومولار سدیم آرسنیت برای مدت زمان ۳۶ ساعت

(a). سلول های کنترل (صفر میکرو مولار) رنگ آمیزی شده با هوخست. (b) سلول های (تیمار شده) رنگ آمیزی شده با هوخست نشان دهنده تغییر شکل و متراکم شدن هسته (پیکانها). (c) سلول های (تیمار شده) رنگ آمیزی همزمان هوخست و پروپیدیم آیواید نشاندهنده سلولهای زنده (آبی) و سلولهای مرده (قرمز). (d) سلول های کنترل رنگ آمیزی شده با اکریدین اورانژ و (e) سلول های (تیمار شده) رنگ آمیزی شده با اکریدین اورانژ برای نشان دادن چروکیدگی سیتوپلاسم.

آنالیز ژل الکتروفورز نشان داد که تیمار سلول ها با ۰/۱ میکرومولار سدیم آرسنیت به مدت ۳۶ ساعت باعث

این امر بدلیل نفوذ پذیری بیشتر غشاء سلولها بدنبال تیمار با این آلاینده زیست محیطی می باشد (۲۲). علاوه بر این تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن و القای استرس اکسیداتیو در سلول (۱۹) توسط سدیم آرسنیت می تواند دلیل دیگری بر افزایش مرگ و میر در سلول های مزانشیم مغز استخوان تیمار شده با این آلاینده باشد. رنگ آمیزی با آکریدین اورانژ کاهش زوائد سلولی و چروکیدگی سیتوپلاسم را در سلول های تحت تیمار نشان داد. از آنجائیکه سیتواسکلتون به عنوان یکی از اهداف درون سلولی آرسنیت پیشنهاد شده است و نشان داده شده است که سدیم آرسنیت از طریق برهم کنش با گروه های سولفیدریل موجود در منومر های توبولین سازنده میکروتوبول ها باعث ممانعت از پلیمریزاسیون آنها می شود (۱۹) لذا تخریب سیتواسکلتون توسط سدیم آرسنیت ممکن است دلیل چروکیدگی و کاهش شدید در تعداد زوائد سیتوپلاسمی سلولی باشد که در سلول های تیمار شده مشاهده شد. نتایج به دست آمده از بررسی مورفولوژیک سلول ها در مطالعه حاضر شامل متراکم شدن هسته، بی نظمی و چروکیدگی در سیتوپلاسم سلول ها بود که در راستای نتایجی است که از مطالعه اثر سدیم آرسنیت بر سلول های نوروآپتیلیال مغز میانی جنین رت، به دست آمده است (۳).

در مطالعه حاضر پروفیل پروتئینی سلولهای مزانشیم تیمار شده با سدیم آرسنیت غالباً دستخوش کاهش در میزان حجم زیر نمودار شده بود. از آنجائیکه افزایش میزان پروتئین های P53 و P21 که در پاسخ به آسیب DNA ناشی از تیمار با سدیم آرسنیت رخ می دهد، و نیز این دو پروتئین بر بیان ژن های متعددی اثر گذارند (۲۳) و همچنین نشان داده شده که تیمار با سدیم آرسنیت بیان ژنهایی نظیر HSP-70 (۲۴) TRAIL-R1 (۲۵) و MRP-1 (۲۶) را تحت تاثیر قرار می دهد و از طرفی این اعتقاد نیز وجود دارد که تیمار با سدیم آرسنیت باعث کاهش فعالیت و همچنین تغییر در ساختار برخی پروتئین ها میگردد (۲۷،۲۸) وقوع چنین تغییراتی مورد انتظار است. تشخیص اینکه نوع و فعالیت پروتئینهای تغییر یافته در پروفیل پروتئینی چیست و در کدام بخش از سلول فعالیت دارند نیازمند مطالعات بیشتر است.

نتیجه نهایی:

مطالعه حاضر نشان داد که آلودگی با سدیم آرسنیت

الگوی وابسته به دوز و زمان کاهش می دهد (۳) که در تایید نتایج مطالعه حاضر می باشد. از طرفی بررسی انجام شده با استفاده از روش MTT و تریپان بلو بر روی سلولهای نامیرای H9C2 حاصل از قلب جنین رت نشان داد که در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تنها غلظت ۱۰ میکرو مولار در مقایسه با غلظتهای ۱، ۲/۵ و ۵ میکرومولار از سدیم آرسنیت باعث کاهش معنی دار قدرت زیست این سلولها گردید (۷). اختلاف در نتایج مطالعه حاضر و تحقیق انجام شده بر روی سلولهای H9C2 ممکن است به دلیل اختلاف در نوع سلول و حساسیت بیشتر سلولهای مزانشیم نسبت به مسمومیت با سدیم آرسنیت باشد. با توجه به اینکه سلولهای مزانشیم مغز استخوان بعنوان منبع ذخیره برای تولید سلولهای دیگر میباشند (۱۲-۱۰) لذا صدمه به این سلولها می تواند تبعات زیادی را بهمراه داشته باشد. هرچند که مکانیسم سمیت سدیم آرسنیت به خوبی روشن نیست، اما نتایج برخی مطالعات نشان داده است که سدیم آرسنیت موجب آسیب به میتوکندری (۱۸) افزایش سطح رادیکال های آزاد در سلول (۱۹) کاهش فعالیت آنزیم های ترمیم DNA (۲۰) اختلال در تعادل یون های K^+ و Na^+ در سلول (۸) و به دنبال متوقف کردن سیکل سلولی آپوتوزیس را در سلول ها القاء می کند (۳). علاوه بر این نشان داده شده است که این آلاینده زیست محیطی موجب آپوتوزیس در سلولهای نوروآپتیلیال در مغز میانی رت (۳) لئوسیت T CD4+ (۶) میوبلاستهای H9C2 (۷) نیز شده است. بهر حال نیاز به مطالعات بیشتر برای شناسایی اثر سدیم آرسنیت بر روی سلولهای مزانشیم مغز استخوان ضروری بنظر می رسد. از طرفی بدنبال تیمار سلولهای مزانشیم مغز استخوان با غلظت ۰/۱ میکرومولار سدیم آرسنیت در مدت زمان ۳۶ ساعت تغییرات مورفولوژیک از قبیل تغییر شکل و تراکم هسته، چروکیدگی سیتوپلاسم و همچنین افزایش تعداد سلولهای مرده نیز مشاهده شد. با در نظر گرفتن فرایند فعال سازی آنزیم های کاسپاز در سلولهایی که تحت تیمار سدیم آرسنیت قرار می گیرند و نقش این آنزیم در شکستگی ژنوم سلول، این فعالیت آنزیمی ممکن است عامل تغییر شکل و متراکم شدن هسته سلول های تیمار شده باشد (۲۱). از طرفی چنانکه داده ها نشان داد به دنبال تیمار سلولها با سدیم آرسنیت شاهد مرگ بسیاری از سلولهای مزانشیم مغز استخوان رت بودیم که

10. Yourek G, Hussain MA, Mao JJ. Cytoskeletal changes of mesenchymal stem cells during differentiation. *ASAIOJ* 2007; 53: 1-9.
11. Lund TC, Tolar J, Orchard PJ. Granulocyte colony-stimulating factor mobilized CFU-F can be found in the peripheral blood but have limited expansion potential. *Haematologica* 2008; 93(6): 908-912.
12. Ripa RS, Sørensen MH, Wang Y, Jørgensen E, Mortensen S, Lene Bindslev T, et al. Bone marrow-derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte stimulating factor after acute myocardial infarction. *Circulation* 2007; 116: 24-30.
13. Baghban Eslaminejad M, Nazarian H, Taghiyar L. [Mesenchymal stem cell isolation from the removed medium of rat's bone marrow primary culture and their differentiation into skeletal cell lineages]. *Yakhte Medical Journal* 2008; 10: 65-67. (Persian)
14. 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: 2551- 2560.
15. Kudo C, Wada K, Masuda T, Yonemura T, Shibuya A, Fujimoto Y, et al. Nonylphenol induces the death of neural stem cells due to activation of caspase cascade and regulation of cell cycle. *J Neurochem* 2004; 88: 1416-1423.
16. Bosch P, Pratt SL, Stice SL. Isolation characterization gene modification and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biol Reprod* 2006; 74: 46-57.
17. Bongso A, Lee EH. Stem cells from bench to bedside, World scientific, PartI, Singapore, 2005.
18. Tchounwou BP, Centeno JA, Patlolla AK. Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis a health risk assessment and management approach. *Mol Cellular Biochem* 2004; 255:47-55.
19. Liu L, Trimarchi RJ, Navarro P, Blasco MA, Keefe DL. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome stability, and apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 31998-32004.
20. Danaee H, Nelson H, Liber H, Little JB, Kelsey T. Low dose exposure to sodium arsenite synergistically interacts with UV radiation to induce mutations and alter DNA repair in human cells. *Mutagenesis* 2004; 19(2): 143-148.
21. Wilson H, Miller J, Hyman M, Schipper M, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res* 2002;62:3893-3903.
22. William R, Watson G, Redmond HP, Wang JH, Hayes DB. Mechanisms involved in sodium arsenite-induced apoptosis of human neutrophils. *Leukocyte Biol* 1996; 60: 625-632.

باعث کاهش توانائی حیات، تغییرات مورفولوژیکی و پروفیل پروتئینی سلولهای مزانشیم مغز استخوان رت گردید. با توجه به اهمیت موضوع پیشنهاد می گردد مطالعات بیشتری برای بررسی اثرات مختلف سمیت این آلاینده زیست محیطی بر سلول های بنیادی صورت پذیرد.

سپاسگزاری :

مطالعه حاضر نتیجه طرح پژوهشی در قالب پایان نامه دانشجویی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه اراک می باشد. لذا بدینوسیله از مسئولین محترم دانشگاه خصوصاً معاونت محترم پژوهشی جهت پشتیبانی مالی طرح تشکر و قدردانی می گردد.

منابع :

1. Ho Yu M, Environmental toxicology. CRC/Lewis Publishers, Boca Raton, FL, Lewis publishers, 2000,177-178.
2. Kann S, Stes C, Reichard JF, Huang MY, Sartor MA, Schwemberger S, et al. Butylhydroquinone protects cells genetically deficient in glutathione biosynthesis from arsenite-induced apoptosis with out significantly changing their prooxidant status. *Toxicol Sci* 2005; 87(2): 365-384.
3. Sidhu JS, R, Ponce A, Vredevoogd MA, Yu X, Gribble E, Woo Hong S, et al. Cell cycle inhibition by sodium arsenite in primary embryonic rat midbrain neuroepithelial cells. *Toxicol Sci* 2005; 89(2): 475-484.
4. Zhang TD, Chen GQ, Wang GY, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z. Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL. *Oncogene* 2001; 20: 7146-7153.
5. Lehmann GM, McCabe MJ. Arsenite slows S phase progression via inhibition of cdc25A dual specificity phosphatase gene transcription. *Toxicol Sci* 2007; 99(1): 70-78.
6. Fung CX, C-Lei Z, Owatari S, M, Gotanda MT, Cheul JH, Furukawa T, et al. Over expression of survivin in primary ATL cells and sodium arsenite induces apoptosis by down-regulating survivin expression in ALT cell lines. *Blood* 2006; 107(12): 4880-87.
7. Yancy SL, Shelden EA, Gilmont RR, Welsh MJ. Sodium arsenite exposure alters cell migration, focal adhesion localization and decreases tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in H9C2 Myoblasts. *Toxicol Sci* 2005; 84: 278-286.
8. Rael LT, Ayala-Fierro F, Carter DE. The effects of sulfur, thiol and thiol inhibitor compounds on arsinite-induced toxicity in the human erythrocyte membrane. *Toxicol Sci* 2000;55(2):468-477.
9. Kitareewan S, Roebuck BD, Demidenko E, Sloboda RD, Mitrovsky ED. Lysozymes and trivalent arsenic treatment in acute promyelocytic leukemia. *J Natl Canaer Inst* 2007; 99: 41-52.

23. Yih LH, Lee TC. Arsenite induces P53 accumulation through an ATM-dependent pathway in human fibroblasts, *Cancer Res* 2000; 60: 6346-6352.
24. Wong HR, Finder JD, Wassrloos K, Pitt BR. Expression of Inos in cultured muscle cells is inhibited by the heat shock response. *AJP* 1995; 269: 843-848.
25. Ivanov NV, Hei TK. Sodium arsenite accelerates TRAIL-mediated apoptosis of human melanoma cells through upregulation of TRAIL-R1/R2 surface levels and down regulation of cFLIP expression, *Cell Res* 2006; 312(20): 4120-38.
26. Kimura A, Ishida Y, Hayashi T, Wada T, Yokoyama H, Sugaya T, et al. Interferon- γ plays protective roles in sodium arsenite-induced renal injury by up-regulating intrarenal multidrug resistance-associated protein 1 expression. *AJP* 2006; 169(4): 1118-1128.
27. Thompson DJ. A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chem Biol Interact* 1993; 88(2-3): 89-94.
28. Bredfeldt TG, Kopplin MJ, Gandolfi AJ. Effects of arsenite on UROtsa cells: low-level arsenite causes accumulation of ubiquitinated proteins that is enhanced by reduction in cellular glutathione levels. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 198(3): 412-18.