



Curcumin Reinstates Osteogenic Differentiation Disrupted by DEHP in Rat Mesenchymal Stem Cells

Abnosi MH^{a*}, Lak M^b

^a PhD, Biology Dept., Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

^b MSc, Biology Dept., Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Abnosi MH, Lak M. Curcumin Reinstates Osteogenic Differentiation Disrupted by DEHP in Rat Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cell and Tissue*. 2025; 16(4): 369-388.

Journal of Cell and Tissue. 2025; 16(4): 369.

KEYWORDS

osteogenic differentiation, Di-2-ethylhexyl phthalate, curcumin, oxidative stress, gene expression

ABSTRACT

Introduction: Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is a commonly used plasticizer in polyvinyl chloride (PVC) products, including medical devices such as syringes, IV tubing, blood bags, respiratory circuits, and dialysis equipment. Due to its weak physical bonding to the PVC matrix and lack of covalent interactions, DEHP can leach into biological fluids upon contact. This becomes particularly concerning during prolonged clinical exposure, as it allows the compound to enter the bloodstream and potentially affect sensitive tissues, including bone marrow. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) are multipotent progenitors with the ability to differentiate into osteoblasts, playing a vital role in bone remodeling and regeneration. Given their sensitivity to environmental toxins, DEHP exposure represents a significant risk to BMSC viability and osteogenic function. Evidence suggests that DEHP disrupts osteogenesis by inducing oxidative stress and downregulating essential genes involved in matrix formation and mineralization. Curcumin (Cur), a bioactive polyphenol extracted from the rhizome of *Curcuma longa*, possesses strong antioxidant, anti-inflammatory, and cytoprotective properties. It is nontoxic, affordable, and widely available, making it a promising candidate for counteracting xenobiotic-induced oxidative damage. This study explores whether Curcumin can mitigate DEHP's deleterious effects on BMSCs during osteogenic differentiation.

* Corresponding author. Tel: 08632211454

E-mail address: m-abnosi@araku.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.61882/JCT.16.4.369>

Received: 21 Jul. 2025; Received in revised form: 3 Oct. 2025; Accepted: 19 Oct. 2025

Original Article

© Author



Aim: We hypothesize that co-treatment with Cur will ameliorate DEHP-mediated disruption in cell viability, antioxidant capacity, and osteogenic marker expression.

Materials and Methods: BMSCs were isolated from adult male Wistar rats under sterile conditions and cultured to passage three. Cells were divided into four experimental groups and exposed for 21 days to the following treatments: (1) control, (2) DEHP (100 μ M), (3) Curcumin (0.1 μ M), and (4) DEHP + Curcumin. The cells were cultured in osteogenic differentiation medium throughout the treatment period. Cell viability was assessed using the tetrazolium-based MTT assay. Osteogenic differentiation was evaluated via Alizarin Red staining for mineral deposition, calcium quantification, and alkaline phosphatase (ALP) activity measurement. Oxidative stress was assessed by quantifying intracellular malondialdehyde (MDA) levels, a lipid peroxidation marker. Antioxidant enzyme activity for catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) was measured spectrophotometrically. Total antioxidant capacity (TAC) was evaluated using commercial kits. For molecular analysis, total RNA was extracted from cells and reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA). Semi-quantitative PCR was performed to measure expression levels of osteogenic differentiation-related genes: *Smad1*, *Bmp2*, *Bmp7*, *Runx2*, *Alp*, *Col-1A1*, and *Osteocalcin (Oc)*. *Gapdh* served as the internal control. Data were statistically analyzed using ANOVA with Tukey's post-hoc test. A threshold of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results DEHP treatment caused a marked reduction in BMSC viability ($p < 0.0001$), confirming its cytotoxicity. Cells co-treated with Curcumin showed a significant restoration in viability ($p < 0.01$), indicating Cur's protective effects. Alizarin Red staining revealed diminished extracellular matrix mineralization in DEHP-treated cells, with corresponding reductions in calcium content and ALP activity. Notably, Curcumin co-treatment restored all markers to levels comparable to those seen in control cells. ALP, an early osteogenic marker, showed complete recovery, underlining Cur's efficacy in preserving bone-forming potential. Gene expression analysis demonstrated that DEHP downregulated osteogenic genes (*Smad1*, *Bmp2*, *Bmp7*, *Runx2*, *Col-1A1*, *Oc*). Co-treatment with Curcumin significantly reversed this suppression, elevating transcript levels to near control values. These results suggest a transcriptional rescue linked to improved redox homeostasis. Oxidative stress measurements indicated that DEHP increased MDA levels while suppressing CAT and SOD activity, as well as total antioxidant capacity ($p < 0.0001$). Curcumin treatment effectively reduced MDA concentrations ($p < 0.05$), and boosted CAT and SOD activity ($p < 0.01$). TAC was significantly elevated in Curcumin-treated groups ($p < 0.0001$), indicating improved redox balance and defense against oxidative damage.

Conclusion: This study provides strong evidence that DEHP impairs BMSC viability and osteogenic differentiation primarily through oxidative stress mechanisms. Curcumin co-treatment mitigates DEHP-induced cellular damage, restores osteogenic function, and enhances antioxidant defenses. These findings highlight Curcumin's potential as a therapeutic agent to counteract phthalate toxicity in clinical contexts involving prolonged exposure to DEHP-containing materials.



کورکومین تمایز استئوژنیک مختل شده توسط DEHP را در سلول‌های بنیادی مزانسیم رت بازسازی می‌کند

محمد حسین آبنوسی^{۱*}، محجوبه لک^۲

^۱ استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران
^۲ کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: دی-۲-اتیل‌هگزیل فتالات (DEHP) به‌عنوان نرم‌کننده در محصولات PVC پزشکی استفاده می‌شود و به دلیل عدم اتصال کووالانسی، در فرایند درمان جدا شده و موجب آلودگی مغز استخوان می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که DEHP با القای استرس اکسیداتیو، تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانسیم (BMSCs) را مهار می‌کند. در این پژوهش، نقش آنتی‌اکسیدانسی کورکومین (Cur) در کاهش آسیب‌های DEHP بررسی شده است. مواد و روش‌ها: سلول‌ها BMSC از رت ویستار استخراج و پس از پاساژ سوم، به مدت ۲۱ روز در محیط استئوژنیک با (DEHP 100 μM)، کورکومین (0.1 μM) و ترکیب هم‌زمان آن‌ها تیمار شدند. توانایی زیستی و تمایز استئوژنیک با آزمون‌های آلیزارین رد، کلسیم ماتریکس و آلکالین فسفاتاز ارزیابی شد. استرس اکسیداتیو با اندازه‌گیری MDA، فعالیت CAT و SOD و سطح TAC بررسی گردید. همچنین بیان ژن‌های استئوژنیک از طریق RT-PCR برای ژن‌های <i>SMAD1</i>، <i>BMP2</i>، <i>BMP7</i>، <i>RUNX2</i>، <i>COL-1</i>، <i>ALP</i>، <i>OC</i> و <i>GAPDH</i> انجام شد. نتایج: DEHP موجب کاهش شدید توانایی زیستی و تمایز استئوژنیک BMSCs شد ($p < 0.0001$)، در حالی که کورکومین در تیمار هم‌زمان این اثرات را به‌طور معنی‌دار جبران نمود، به‌طوری‌که ماتریکس استخوانی، غلظت کلسیم و فعالیت آلکالین فسفاتاز به سطح کنترل رسید. همچنین بیان همه ژن‌های دخیل در تمایز استئوژنیک افزایش یافت و Cur موجب کاهش ($p < 0.05$) MDA و افزایش فعالیت SOD، CAT و TAC شد، و توانست اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از DEHP را خنثی کند. نتیجه‌گیری: کورکومین با مهار استرس اکسیداتیو توانست اثرات مهاری DEHP بر تمایز استئوژنیک BMSCs را جبران نماید. لذا پیشنهاد می‌شود در صورت مواجهه با DEHP در طی درمان دراز مدت از کورکومین استفاده شود.</p>	<p>تمایز استئوژنیک، دی-۲-اتیل‌هگزیل فتالات، کورکومین، استرس اکسیداتیو بیان ژن</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۳۰ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۷/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۲۷</p>

۱- مقدمه

با توجه به استفاده روز افزون از دی-۲-اتیل‌هگزیل فتالات (DEHP) در صنایع مختلف به‌خصوص مصنوعات تولید شده از پلی ونیل کلرید (PVC) و استفاده از این محصولات در درمان‌های پزشکی، آلودگی با DEHP تهدید بزرگی برای بیماران به‌شمار می‌رود (۱). این ترکیب شیمیایی به‌عنوان نرم‌کننده در PVC استفاده می‌شود (۲)، به‌صورتی‌که در غیاب DEHP

محصولات پلاستیکی تولید شده بسیار خشک و شکننده می‌شوند (۳). در طی فرایند تولید پلاستیک، DEHP با PVC پیوند شیمیایی کووالانس برقرار نمی‌کند (۴) و با تغییر در شرایط فیزیکی از قبیل گرما، سرما و تماس با مایعات این ترکیب شیمیایی آزاد شده (۵) و باعث بروز آلودگی می‌شود.

تحقیقات نشان داده است که مسمومیت با DEHP باعث اختلال در فرایند تولید اسپرم (۶)، تخمک‌گذاری (۷)، بروز سندرم پلی‌سیستیک (۸)، نارسائی کلیوی (۹)، نارسائی کبدی (۱۰) می‌شود. همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد از این ترکیب شیمیایی به‌عنوان نرم‌کننده در تولید محصولات پلاستیکی که در صنعت پزشکی کاربرد دارد استفاده می‌شود PVC در تولید سرنگ تزریق، لوله‌های تزریق، کیسه‌های جمع‌آوری خون و محصولات آن، لوله‌های به‌کار رفته در دستگاه دیالیز و دستگاه تنفس استفاده می‌شود (۱۱). از آن‌جا که DEHP به‌راحتی از PVC جدا و در مایعات بیولوژیک مانند خون آزاد می‌شود، به‌واسطه گردش خون به اندام‌ها و بافت‌های مختلف از جمله بافت مغز استخوان رفته و باعث آلودگی این بافت‌ها می‌شود (۱۱).

مطالعات قبلی نشان داده است که تیمار خوراکی رت‌های اسپراگو-دولی نر (Male Sprague-Dawley rats) با DEHP به‌مدت ۲ هفته باعث تجمع این ترکیب شیمیایی در پلاسما، بیضه‌ها، کلیه و کبد این حیوان آزمایشگاهی شده است (۱۲). در مطالعه آبنوسی و علیاری (۱۳) نشان داد که تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت (BMSCs) با غلظت‌های مختلف DEHP (۰/۵ تا ۲۵۰۰ میکرومولار) در مدت زمان ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت باعث کاهش توانائی زیستی این سلول‌ها شده و از غلظت ۵۰۰ میکرومولار توانائی زیستی به‌صورت وابسته به غلظت و زمان تیمار کاهش داشته است. البته آن‌ها نشان دادند که با افزایش زمان تیمار توانائی تکثیر این سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیز تحت تاثیر قرار گرفته و کاهش می‌یابد. لذا با افزایش زمان تیمار غلظت‌های کم نیز به‌صورت موثر باعث مسمومیت می‌شود. این در حالی است که در کوتاه مدت غلظت‌های زیاد مانند ۵۰۰ میکرومولار باعث القای استرس اکسیداتیو و اختلال در آنزیم‌های متابولیک سلول‌های BMSCs شدند. در مطالعات بعدی مشخص شد که غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP در تیمار ۲۱ روزه باعث کاهش تمایز BMSCs به استئوبلاست شده است و این به‌دلیل آسیب‌های متابولیک و اختلال در بیان ژن‌های *Runx2*، *Bmp2/3*، *Smad1*، *Oc*، *On* و *Alp* بوده است (۱۴ و ۱۵). همچنین آبنوسی و همکاران (۱۶) نشان دادند که DEHP باعث توقف چرخه سلولی در مرحله G1 در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت می‌شود. آن‌ها مشخص نمودند که این ترکیب شیمیایی با افزایش بیان ژن P53، القای آپوپتوزیس در این سلول‌ها را نیز فعال می‌کند (۱۶).

علاوه بر مطالعات سلولی فوق‌الذکر، Zhang و همکاران (۱۷) نشان دادند که تیمار موش‌های C57BL/6 به‌مدت ۲۹ هفته با DEHP باعث کاهش توده استخوانی، تخریب میکروسکوپی و کاهش توان استخوان‌سازی در استخوان ران و افزایش توان آدیپوژنز با افزایش بیان ژن $\text{PPAR}\gamma$ و فعال‌سازی تولید CDK3 شده است.

با توجه به مطالعات فوق‌الذکر، آلودگی با DEHP می‌تواند تاثیر مخربی بر بافت استخوان گذاشته و در نتیجه باعث بروز بیماری‌های مرتبط با این بافت مانند استئومالاسی و استئوپورزیس گردد. از آن‌جاکه این ترکیب شیمیایی باعث بروز استرس اکسیداتیو در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت می‌شود (۱۲ و ۱۳ و ۱۸) لذا تمایز این سلول‌ها به استئوبلاست نیز به خطر خواهد افتاد. سلول‌های استئوبلاست به عنوان سلول‌هائی که مسئول تولید ماتریکس مغز استخوان هستند باعث افزایش توده استخوانی شده و از پوکی استخوان جلوگیری می‌کنند (۱۳ و ۱۸). لذا در صورت کاهش تعداد این سلول‌ها امکان تولید

ماتریکس استخوان کاهش یافته و این بافت با کاهش توده استخوانی روبه‌رو خواهد شد که این خود موجبات بروز بیماری‌های مرتبط با بافت استخوان را به همراه خواهد داشت. در مطالعه آبنوسی و لک (۱۸) مشخص شد که تیمار هم‌زمان BMSCs با میزان ۰/۱ میکرومولار کورکومین (Cur) و ۱۰۰ میکرومولار DEHP به‌مدت ۴ و ۸ روز باعث مهار اثر سمی DEHP بر توانایی زیستی و تکثیر این سلول‌ها می‌شود. در این مطالعه مشخص شد که میزان ۰/۱ میکرومولار Cur به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت گیاهی که در زردچوبه یافت شده و در دسترس عموم مردم قرار دارد می‌تواند تا حدود زیادی از اثر استرس اکسیداتیو این ترکیب شیمیایی به‌واسطه تاثیر بر مسیر سیگنالینگ Nrf2/NFkB جلوگیری نماید.

از آن‌جا که گزارش‌های متعددی نشان داده است که DEHP باعث کاهش توان تمایز BMSCs به استئوبلاست به‌واسطه القای استرس اکسیداتیو شده است، در مطالعه حاضر با توجه به مطالعه آبنوسی و لک (۱۸)، تاثیر غلظت ۰/۱ میکرومولار Cur برای مهار اثر اکسیداتیو غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP در محیط استئوژنیک بررسی شود. همچنین در مطالعه حاضر توان تمایز استئوژنیک BMSCs در حضور غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP و غلظت ۰/۱ میکرومولار Cur به‌صورت جداگانه و هم‌زمان مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. نتایج این تحقیق می‌تواند دریچه‌ای بر روی محققین باز نموده تا بتوان امکان مهار اثر DEHP بر توان تمایز سلول‌های BMSCs توسط متابولیت‌های ثانویه گیاهی را بررسی نموده و شاید در آینده از این ترکیبات به‌عنوان مکمل دارویی در جلوگیری از آسیب‌های استخوانی ناشی از آلودگی شیمیایی استفاده شود.

۲- مواد و روش‌ها

استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت: رت‌های ویستار از انستیتو پاستور (تهران-ایران) تهیه و در حیوان‌خانه دانشگاه اراک در دما و نور طبیعی نگه‌داری و با غذای استاندارد تغذیه شدند. یک هفته بعد، حیوانات با توجه به مجوز کمیته اخلاق دانشگاه اراک (IR.ARAKMU.REC.1401.078) با استفاده از روش قطع گردن قربانی و سپس استخوان‌های ران و ساق آن‌ها خارج و بافت‌های اطراف استخوان‌ها پاکسازی شدند. دو سر هر استخوان برش داده شد و مغز استخوان با تزریق ۲ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین خارج شد. محتویات مغز استخوان در لوله فالتون با سرعت ۲۵۰g به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و سلول‌ها در فلاسک T25 حاوی محیط کشت تازه کشت و در انکوباتور حاوی CO₂ قرار گرفتند. هر سه روز یک بار، محیط کشت تعویض شد تا زمانی که یک لایه یکنواخت از سلول‌ها کف فلاسک را پوشاند. سپس سلول‌ها با استفاده از تریپسین-EDTA جدا و با بافر فسفات نمکی (PBS) ۲۰ میلی‌مولار pH برابر با ۷/۲ شسته و مجدداً در فلاسک کشت T25 جدید حاوی محیط کشت تازه کشت داده شدند. این مرحله دو بار دیگر نیز انجام شد و خلوص سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر (شرکت (PAS) PARTEC، آلمان) بررسی و مورد استفاده قرار گرفتند. تمام مواد کشت نام‌برده از شرکت Gibco آلمان تهیه و تمامی مراحل تحت شرایط استریل انجام شد.

روش تیمار سلول‌ها: بر اساس مطالعات پیشین (۱۳-۱۶ و ۱۸)، سلول‌ها پس از پاساژ سوم در معرض تیمار با ۱۰۰ میکرومولار از DEHP و با توجه به مطالعه آبنوسی و لک (۱۸) غلظت ۰/۱ میکرومولار از Cur به‌صورت مجزا و همچنین در ترکیب ۱۰۰ میکرومولار DEHP + ۰/۱ میکرومولار Cur قرار گرفتند. تیمار سلول‌ها در حضور گروه کنترل انجام پذیرفت و کلیه آزمون‌ها به‌صورت تکرار سه‌گانه انجام شده‌اند تا از صحت و قابلیت تکرارپذیری نتایج اطمینان حاصل شود.

ارزیابی توانایی زیستی سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT: جهت تعیین توانایی زیستی سلول‌ها، از آزمون MTT ۴،۵-
(dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد. برای انجام آزمایش، تعداد 1×10^4 سلول در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت شد. پس از رسیدن سلول‌ها به هم‌گرایی ۷۰ درصد، تیمار سلول‌ها توسط غلظت‌های ۰/۱ میکرومولار از Cur و ۱۰۰ میکرومولار از DEHP به صورت مجزا و همزمان در حضور کنترل انجام شد. پس از گذشت ۲۱ روز از شروع تیمار، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر) و PBS (۹۰۰ میکرولیتر) محیط کشت DMEM بدون سرم اضافه و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از حذف محیط کشت، کریستال‌های فورمازان تشکیل شده با استفاده از DMSO به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد استخراج شدند. سپس از هر نمونه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج شده به صورت مجزا به پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل و میزان جذب نوری آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌خوان (Medical SCO GmbH، آلمان) اندازه‌گیری شد.

تمایز استئوژنیک سلول‌های BMSCs و ارزیابی معدنی شدن آن‌ها: برای تمایز BMSCs به استئوبلاست از محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و گلیسرول فسفات سدیم (۱ میلی‌مولار)، اسید آسکوربیک (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و دگزامتازون (۱۰ نانومولار) استفاده شد (تمام مواد از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شدند). ابتدا تعداد 1×10^4 سلول در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت و پس از رسیدن به هم‌گرایی ۷۰ درصد، تیمار سلول‌ها توسط غلظت‌های ۰/۱ میکرومولار از Cur و ۱۰۰ میکرومولار از DEHP به صورت مجزا و هم‌زمان در حضور کنترل انجام شد. پلیت‌ها در شرایط مرطوب، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 نگهداری شدند. تعویض محیط کشت هر ۳ روز انجام شد و این فرآیند تا ۲۱ روز ادامه یافت. برای بررسی معدنی شدن، ابتدا پلیت‌ها با PBS شسته شده و با فرمالدهید ۱۰ درصد تثبیت شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از معرف آلیزارین قرمز (ARR) با غلظت ۴۰ میلی‌مولار و pH برابر با ۴/۲ افزوده شده و به مدت ۴۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از شست‌وشوی رنگ اضافی با PBS، تصویربرداری با میکروسکوپ Olympus مجهز به دوربین DP-70، انجام شد.

برای سنجش کمی میزان معدنی شدن، ابتدا ۸۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۱۰ درصد به هر چاهک اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس سلول‌ها با استفاده از اسکرابر از کف پلیت جدا و به میکروتیوپ با وزن معلوم منتقل گردیدند. در حالی که یک لایه روغن معدنی (Sigma-Aldrich) روی محلول قرار داشت، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد جوشانده شدند. سپس لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت 10000 g سانتریفیوژ شدند. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از محلول (بدون روغن معدنی) با ۲۰۰ میکرولیتر هیدروکسید آمونیوم ۱۰ درصد خنثی و جذب نوری محلول‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر با میکروپلیت‌خوان (SCO diagnostic، آلمان) اندازه‌گیری شد.

برای محاسبه غلظت رنگ آلیزارین، نمودار استاندارد با استفاده از غلظت‌های معلوم ARR تهیه شد. محلول استاندارد با رقیق‌سازی ARR در مخلوطی از اسید استیک و هیدروکسید آمونیوم به نسبت ۵:۲ تهیه و محلول نهایی با غلظت ۲ میلی‌مولار آماده شد که سپس به ۵ غلظت مختلف رقیق‌سازی انجام شد. غلظت نمونه‌ها (μM) با استفاده از شیب خط اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری غلظت کلسیم استخراج شده از ماتریکس: پلیت‌های شش خانه حاوی 1×10^4 سلول تا رسیدن به مرحله‌ی هم‌گرایی در شرایط انکوباسیون قرار گرفتند. پس از آن، تیمار گروه‌های مختلف آزمایشی تحت شرایط استئوژنیک به مدت ۲۱ روز انجام شد. سپس سلول‌ها ابتدا با PBS و آب دی‌یونیزه شسته و با استفاده از اسکالپل از کف ظرف جدا و در لوله‌هایی با وزن

از پیش اندازه‌گیری شده جمع‌آوری گردیدند. برای استخراج محتوای کلسیم ماتریکس، وزن یکسانی از نمونه‌ها با استفاده از ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک (۰/۵ نرمال) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار شدند. پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰g، غلظت کلسیم با استفاده از کیت تجاری (شرکت پارس‌آزمون، ایران) و اسپکتروفتومتر (مدل T80+)، محصول شرکت PG Instruments (انگلستان) در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با تهیه رقت‌های مختلف از CaCl_2 ، نمودار استاندارد ترسیم و غلظت نمونه‌ها (mg/dL) با استفاده از شیب خط اندازه‌گیری شد.

استخراج محتوای سلولی: تعداد 5×10^5 سلول در فلاسک T25 کشت شد و پس از رسیدن به هم‌پوشانی، طبق طرح آزمایش، فلاسک‌ها با محیط استئوژنیک آلوده به DEHP و GA تیمار شدند. پس از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی (BMSCs) به استئوبلاست‌ها، فلاسک با بافر Tris-HCl ۲۰ میلی‌مولار، (pH=7.2) شستشو و سلول‌ها با کمک اسکالپل جمع‌آوری شدند. غشاء سلول‌ها برداشته شده در ۵۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl با روش انجماد و ذوب شکسته و محتویات سلولی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. میزان پروتئین موجود در سوپرناتانت با استفاده از روش Lowry تعیین شد. نمودار استاندارد با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) رسم شد و با استفاده از شیب خط غلظت پروتئین (μg) محاسبه شد. در ادامه آنالیز فاکتورهای بیوشیمیایی با استفاده از عصاره سلولی براساس میزان پروتئین یکسان در هر نمونه انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در استخراج سلولی با استفاده از کیت تجاری (شرکت پارس‌آزمون، ایران) و براساس غلظت یکسان پروتئین اندازه‌گیری شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۱۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل (T80+ شرکت PG Instruments، انگلستان) اندازه‌گیری شد. پس از رسم نمودار استاندارد، فعالیت آنزیم بر حسب واحد بین‌المللی بر لیتر (IU/l) با استفاده از شیب خط محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در استخراج سلولی با استفاده از نیترو-بلو تترازولیوم (Sigma-aldrich) (NBT)، کد N6876 اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، حجم مشخصی از نمونه‌های استخراج‌شده که حاوی مقدار یکسانی از پروتئین بودند، با ۱ میلی‌لیتر از محلول واکنش حاوی ۶/۱ میلی‌گرم NBT، ۱/۹ میلی‌گرم متیونین، ۷/۹ میلی‌گرم ریبوفلاوین و ۳/۳ میلی‌گرم EDTA حل‌شده در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم مخلوط شدند. پس از انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در جعبه نور، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. همچنین به‌صورت جداگانه، نمونه‌های کنترل و بلانک تهیه شد، با این تفاوت که عصاره نمونه به آن‌ها اضافه نگردید و لوله‌ی بلانک به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس محلول آن جهت صفر کردن اسپکتروفتومتر (T80+ شرکت PG Instruments، انگلستان) استفاده شد. سپس فعالیت آنزیم به‌صورت درصد مهار ایجاد رنگ (۵۰ درصد) در هر دقیقه محاسبه و بر حسب میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در استخراج سلولی، ابتدا محلول واکنش شامل ۳۰۰ میکرولیتر H_2O_2 و ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۲۵ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۰ تهیه شد. جذب نوری این محلول پیش از شروع اندازه‌گیری روی عدد ۰/۴ تنظیم شد. سپس حجم مشخصی از نمونه‌ها، که همگی حاوی مقدار یکسانی پروتئین بودند، به محلول واکنش اضافه و کاهش جذب نوری پس از دو دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از

اسپکتروفتومتر مدل (+T80 شرکت PG Instruments، انگلستان) خوانده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس کاهش جذب در مدت یک دقیقه و با استفاده از ضریب خاموشی $39/4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ محاسبه شد.

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدها: به منظور بررسی پراکسیداسیون لیپیدها، سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به عنوان نشانگر این فرآیند در استخراج سلولی اندازه‌گیری شد. جهت انجام واکنش، ۱ میلی‌لیتر از محلول واکنش حاوی تیوباریوتیک اسید (۰/۵ درصد) و تری‌کلرو استیک اسید (۲۰ درصد) در HCl آماده شد، و حجم مشخصی (μL) از نمونه‌های دارای مقدار یکسان پروتئین به آن افزوده و سپس لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند. پس از آن، لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در حمام یخ نگه‌داری و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت 10000 g سانتریفیوژ شدند. جذب نوری نمونه‌ها ابتدا در طول موج ۵۲۳ نانومتر و سپس در ۶۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل (+T80 شرکت PG Instruments، انگلستان) اندازه‌گیری شد. اختلاف بین دو مقدار جذب نوری محاسبه شد و با استفاده از ضریب خاموشی $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ سطح MDA محاسبه و بر حسب میکرومول بر میلی‌لیتر ($\mu\text{M}/\text{mL}$) گزارش شد.

برآورد محتوای آنتی‌اکسیدنتی کل: بر اساس غلظت یکسان پروتئین در استخراج سلولی، محتوای آنتی‌اکسیدنتی کل (TAC) با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر از نمونه به ۱۷۰۰ میکرولیتر از محلول واکنش اندازه‌گیری شد. محلول واکنش شامل بافر استات سدیم با غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار و pH برابر ۶/۳، و ۱۰ میلی‌مولار ترکیب ۲،۴،۶-تری (۲-پیریدیل)-S-تری‌آزین (محصول Sigma-Aldrich، امریکا) بود که در محلولی ۴۰ میلی‌مولار اسید کلریدریک (HCl) و ۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن حل شد. سپس ۸۵۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر به محلول واکنش اضافه و پس از انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل (+T80 شرکت PG Instruments، انگلستان) اندازه‌گیری شد. پس از رسم نمودار استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف سولفات آهن ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (شرکت Merck، آلمان)، سطح TAC نمونه‌ها با استفاده از شیب خط محاسبه شد.

بررسی بیان ژن: RNA کل 1×10^6 سلول با استفاده از کیت استخراج (RNA Super RNA Extraction Kit)، LOT# (YT908) استخراج و cDNA توسط کیت BioFACT (LOT# BR631-096) سنتز شد. تکثیر ژن‌های آلکالین فسفاتاز (Alp)، استئوکلسین (Oc)، فاکتور رونویسی مرتبط با (Runx2)، Smad1، پروتئین مورفوزنتیک استخوان ۲ (Bmp2)، کلاژن-۱ (Col-1a1) و گلیسرآلدئید دهیدروژناز (Gapdh) با استفاده از دستگاه PCR (مدل Master Cycler Gradient شرکت Eppendorf، هامبورگ، آلمان) در سه تکرار و با پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) انجام شد. فرآیند PCR شامل مرحله‌ی آغازین در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، و سپس طی ۳۵ سیکل شامل ۹۵ درجه به مدت ۱ دقیقه، دمای Annealing مختص پرایمرها به مدت ۱ دقیقه، و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه صورت پذیرفت. مرحله‌ی نهایی شامل کشش (Elongation) به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی و نتایج توسط دستگاه مستندسازی ژل Gel Flash (شرکت Syngene Bio Imaging، انگلستان) تصویربرداری و با نرم‌افزار Gel Quant (نسخه ۱.۸.۲) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جدول ۱: توالی جفت پرایمرهای اختصاصی استفاده شده برای بررسی بیان ژن‌ها

Gene	Size (bp)	Annealing temp. (°C)	Sequence
<i>Alp</i>	144 bp	58.4	F: CATGTTTCCTGGGAGATGGTA
		59.4	R: GTGTTGTACGTCTGGAGAGA
<i>Oc</i>	294 bp	60.5	F: AACGGTGGTGCCATAGATGC
		62.5	R: AGGAGGCTCTCTCTGCTCAC
<i>Runx2</i>	289 bp	64.6	F: CCGCACGACAACCGCACCAT
		64.6	R: CGCTCCGGCCACAAATCTC
<i>Smad1</i>	246 bp	70.4	F: CCGCTGCTTACCTGCCTCCTGAA
		68.2	R: GAACGCTTCGCCCACACGGTTGT
<i>Bmp2</i>	106 bp	62.1	F: CGTCAAGCCAAACACAAACAGC
		64.7	R: GAGCCACAATCCAGTCATTCCAC
<i>Bmp7</i>	443 bp	54.8	F: AAGCCCAGATGGTACGG
		54.8	R: GCACCTCCAGGGAAAAAC
<i>Gapdh</i>	136 bp	56.4	F: TCGTCTCATAGACAAGATGG
		59.4	R: GTAGTTGAGGTCAATGAAGGG
<i>Col-1A1</i>	177 bp	58.7	F: TGGATGGCTGCACGAGT
		59.4	R: TTGGGATGGAGGGAGTTA

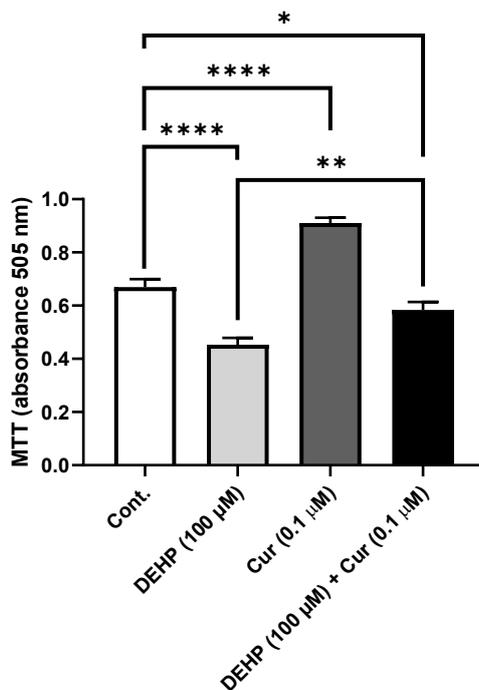
۳- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام گرفت. برای مقایسه میان گروه‌ها، از تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون Tukey به‌عنوان آزمون پس‌آزمون (post hoc) به‌کار گرفته شد. جهت بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk و برای ارزیابی همگنی واریانس‌ها از آزمون Levene استفاده گردید. ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism انجام و نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SD) گزارش و سطح معنی‌داری در تمام آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ ($p < 0.05$) در نظر گرفته شد.

۴- نتایج

توانائی زیستی

تیمار سلول‌ها BMSC با DEHP باعث کاهش بسیار معنی‌دار زیست‌پذیری سلولی شد ($p < 0.0001$)، در حالی که Cur به‌طور معنی‌دار توانائی زیستی سلول‌ها را افزایش داد ($p < 0.0001$). تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تیمار همزمان سلول‌ها با DEHP و Cur منجر به جبران کامل توانائی زیستی سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل نشد، ولی در مقایسه با گروه سلول‌ها تیمار شده با DEHP جبران معنی‌دار مشاهده گردید ($p < 0.001$) (نمودار ۱).

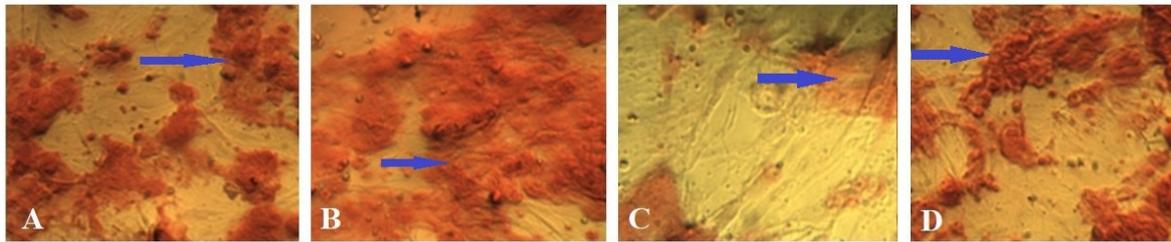


نمودار ۱: مقایسه میانگین توانائی زیستی سلول‌ها بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تمایز یافته به استوبلاست تیمار شده با DEHP و Cur به مدت ۲۱ روز در محیط استئوژنیک. مقادیر میانگین زیستی با کنترل مقایسه شده است. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ و سطح معنی‌داری $p < 0.05$ *، $p < 0.01$ ** و $p < 0.0001$ **** در نظر گرفته شده است.

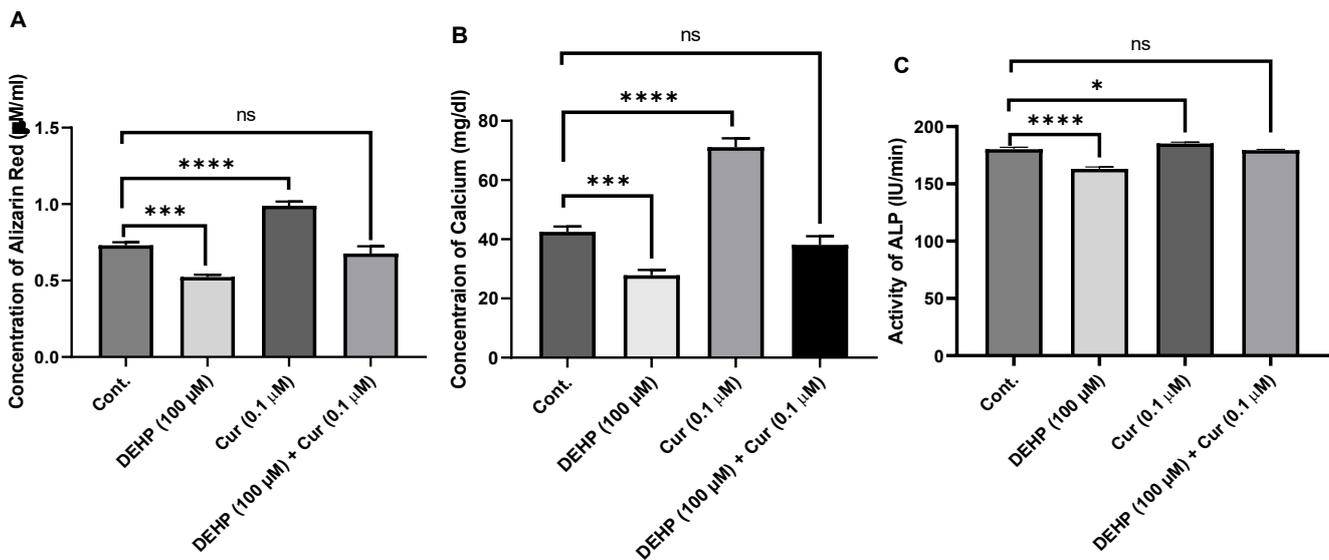
تولید ماتریکس خارج سلولی

بر اساس رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، مشاهده شد که DEHP در مقایسه با گروه کنترل، تمایز استخوانی سلول‌ها بنیادی مزانشیمی (BMSCs) را کاهش می‌دهد، این در حالی است که Cur توانائی تمایز BMSCs به سلول‌ها استخوان‌ساز را افزایش داد و درمان ترکیبی با Cur و DEHP اثر مهارکنندگی DEHP را خنثی نمود (شکل ۱). علاوه بر این، آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که تیمار با Cur به‌طور معنی‌داری ($p < 0.0001$) تولید ماتریکس را افزایش داده است، در حالی که DEHP در مقایسه با گروه کنترل روند تمایز ($p < 0.0001$) را مهار نموده است (نمودار A۲). از طرفی آنالیز نتایج میزان کلسیم (نمودار B۲) و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) سلول‌ها (نمودار C۲) نتایج تغییرات میزان معدنی شدن را تأیید نمود و نشان داد که درمان با DEHP به‌طور بسیار معنی‌دار ($p < 0.0001$) میزان کلسیم ماتریکس و فعالیت آنزیم ALP را کاهش داده است.

این حال، در گروه تیمار همزمان، Cur توانست اثرات سمی DEHP را بهبود بخشد و تفاوتی میان نتایج این گروه و گروه کنترل مشاهده نشد ($p > 0.05$).



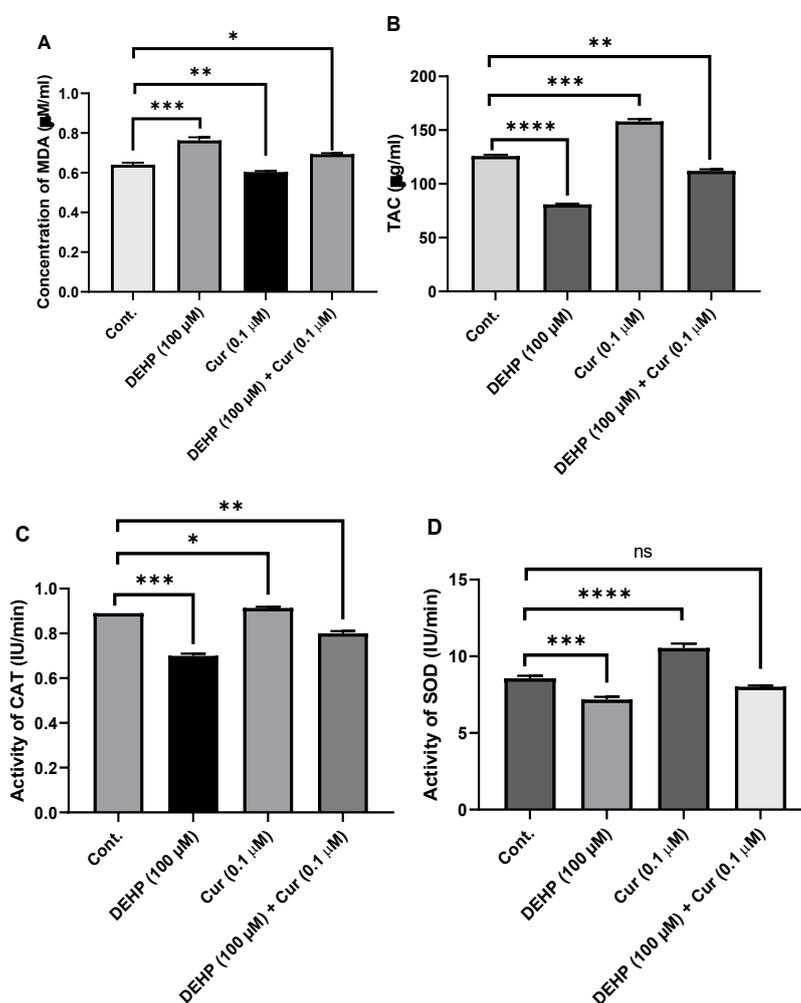
شکل ۱: تصاویر میکروسکوپی معدنی شدن ماتریکس سلول‌ها تمایز یافته بر اساس رنگ آمیزی آلیزارین رد. (A) گروه کنترل. (B) گروه تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار کورکومین. (C) گروه تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP (D) گروه تیمار هم‌زمان با غلظت ۱/۱ میکرومولار کورکومین + غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP. (بزرگنمایی $\times 400$). فلش‌های آبی رنگ بخش‌هایی از ماتریکس تولید شده توسط سلول‌های استئوبلاست است که به رنگ قرمز آلیزارین رد مشخص شده است.



نمودار ۲: مقایسه میانگین (A) غلظت آلیزارین رد (B) غلظت کلسیم ماتریکس (C) فعالیت آنزیم کالین فسفاتاز سلول‌ها بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تمایز یافته به استئوبلاست تیمار شده با غلظت‌های مختلف DEHP و کورکومین (Cur) به مدت ۲۱ روز در محیط استئوژنیک. مقادیر میانگین‌ها در هر گروه با کنترل مقایسه شده است. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{sD}$ و سطح معنی داری ns = بی معنی، * $P < 0.05$ ، *** $p < 0.001$ و **** $p < 0.0001$ در نظر گرفته شده است.

استرس اکسیداتیو

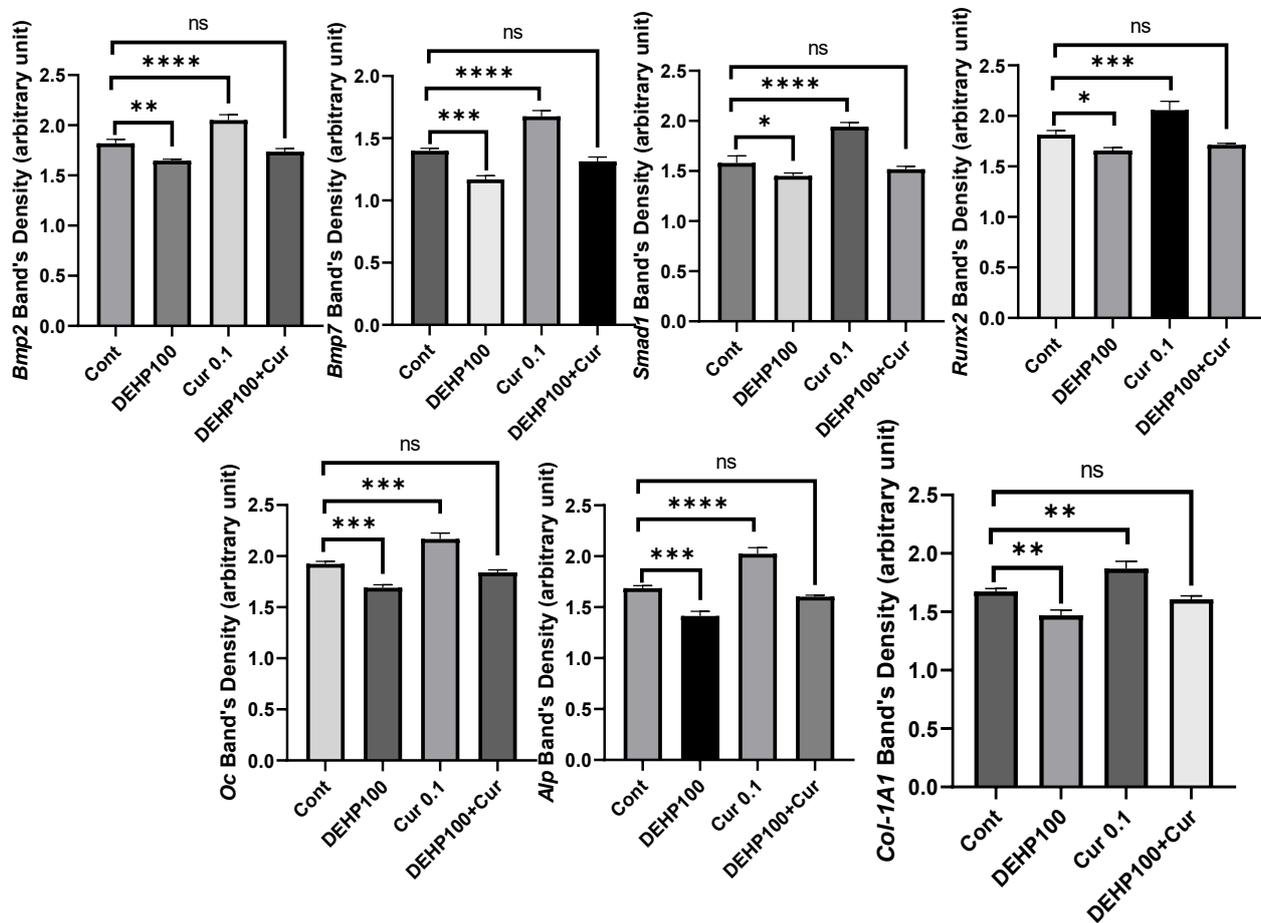
تیمار سلول‌ها BMSC با DEHP منجر به افزایش بسیار معنی‌دار سطح MDA شد ($p < 0.001$) (نمودار ۳A)، در حالی که کاهش بسیار معنی‌داری در غلظت ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل (TAC) ($p < 0.0001$) و فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT ($p < 0.001$) مشاهده گردید (نمودار ۳B، C۳، B۳، D۳). این در حالی است که تیمار سلول‌ها با Cur باعث کاهش معنی‌دار سطح MDA ($p < 0.01$) و افزایش غلظت TAC ($p < 0.001$) و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT ($p < 0.05$) شد. در گروهی که به صورت هم‌زمان با DEHP و Cur تیمار شده است، سطوح MDA، TAC و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نسبت به گروه تیماری با DEHP متعادل شده بود ولی با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری داشته است ($p < 0.05$) لذا Cur نتوانست اثر اکسیداتیو DEHP را به طور کامل از بین ببرد.



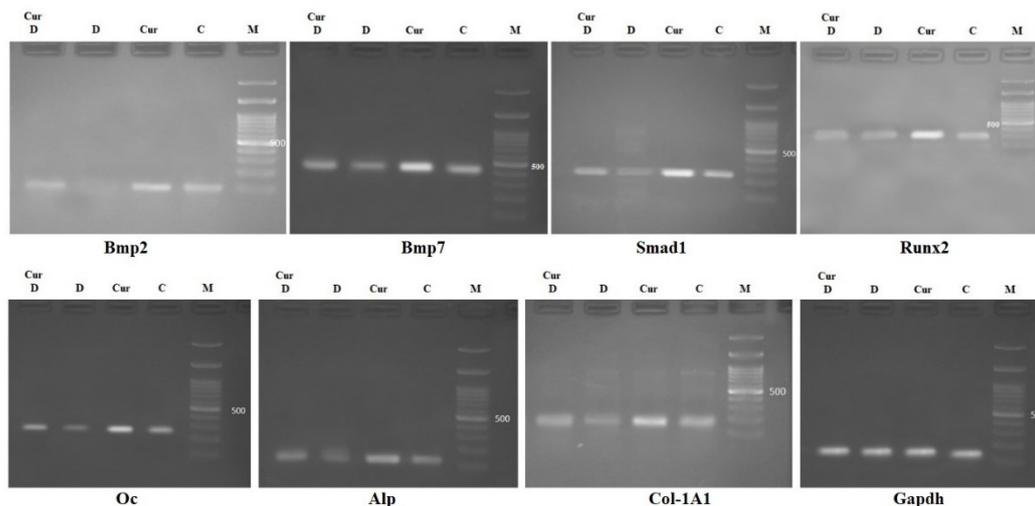
نمودار ۳: مقایسه میانگین (A) غلظت مالون دی آلدئید (B) غلظت آنتی‌اکسیدانت کل (C) فعالیت کاتالاز و (D) فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سلول‌ها بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تمایز یافته به استئوبلاست تیمار شده با DEHP و Cur به مدت ۲۱ روز در محیط استئوژنیک. مقادیر میانگین زیستی در هر گروه با کنترل مقایسه شده است. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ و سطح معنی‌داری = ns بی معنی، * $p < 0.05$ ، ** $p < 0.01$ ، *** $p < 0.001$ و **** $p < 0.0001$ در نظر گرفته شده است.

بیان ژن‌های مرتبط با استئوژنز

بیان ژن‌های مرتبط با تمایز استئوژنیک سلول‌های BMSC، تحت تیمار با DEHP نشان دهنده کاهش بسیار معنی‌داری در بیان کلیه ژن‌های بررسی شده بوده است (نمودار ۴). در گروه تیمار شده به صورت هم‌زمان با Cur، DEHP و Cur توانست اثرات کاهشی DEHP را خنثی نموده و بیان تمامی ژن‌های مورد بررسی را جبران نماید، به طوری که اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد ($p > 0.05$). تیمار سلول‌ها به تنهایی با Cur منجر به افزایش بسیار معنی‌دار بیان تمامی ژن‌های بررسی شده شد ($p < 0.001$). از طرفی عکس ژل‌های آگارز مربوط به باندهای این ژن‌ها (شکل ۲) نیز نتایج آماری به دست آمده را تایید می‌نماید. با توجه به این که ژن Gapdh به عنوان ژن خانه‌دار محسوب می‌شود تغییری در بیان ژن Gapdh مشاهده نشد.



نمودار ۴: مقایسه میانگین بیان ژن‌های دخیل در تمایز استئوژنیک سلول‌ها بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تیمار شده با کورکومین (Cur) و DEHP به مدت ۲۱ روز. مقادیر میانگین بیان ژن با کنترل مربوطه مقایسه شده است. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{sD}$ و سطح معنی‌دار ns غیرمعنی‌دار $p > 0.05$ ، $p < 0.01$ **، $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ **** در نظر گرفته شده است.



شکل ۲: بیان ژن‌های دخیل در تمایز استئوژنیک سلول‌ها بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تیمار شده با Cur و DEHP به مدت ۲۱ روز. M مارکر، Cur کنترل، تیمار شده با کور کومین، D تیمار شده با DEHP، CurD تیمار شده با کور کومین و DEHP.

۵- بحث

در مطالعه حاضر، آثار سمی DEHP بر BMSCs به صورت کاهش معنی‌دار در توانائی زیستی، توانائی تمایز استئوژنیک، غلظت پروتئین کل و بیان ژن‌های مرتبط با فرایند استئوژنز تأیید شد. یافته‌های ما با مطالعات پیشین هم‌راستا هستند که DEHP را به‌عنوان یک ترکیب مهار کننده در فرآیندهای تمایز و عملکرد سلولی معرفی نموده‌اند (۱۹ و ۲۰). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که DEHP موجب کاهش چگالی مواد معدنی استخوان می‌شود. پژوهش‌های حیوانی با استفاده از اسکن میکروسکوپی نشان داده‌اند که DEHP اثرات زیان‌آوری بر سلامت استخوان در موش‌های اوارکتومی شده داشته و پیشرفت استئوپروز را تأیید نموده است (۲۱). مطالعه‌ای دیگر توسط Lai و همکاران (۲۲) نشان داد که تیمار موش‌های اوارکتومی شده با DEHP به مدت ۸ هفته منجر به افزایش معنی‌دار سطوح $IL-1\beta$ ، $IL-10$ ، $IL-17A$ ، اینترفرون- γ (IFN- γ)، فاکتور نکروز تومورآلفا ($TNF-\alpha$) و $Dickkopf-1$ گردید و ساختار تراپیکولار استخوان فمور نیز تحت تاثیر قرار گرفت. گزارش شده است که این آلاینده محیطی می‌تواند با اختلال در عملکرد سلول‌ها استخوان‌ساز یا ایجاد التهاب، فرآیند تشکیل استخوان را مختل سازد (۱۶ و ۲۱).

تاثیر DEHP بر سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های مختلف از جمله بیضه‌ها، تخمدان‌ها، اندومتر، کلیه‌ها، نورون‌ها، مغز، کبد و قلب مورد بررسی قرار گرفته است (۲۳-۲۹) که تمرکز اصلی این مطالعات بر استرس اکسیداتیو القا شده توسط DEHP به‌عنوان عامل اصلی آسیب‌ها بوده است (۳۰). با وجود تعداد محدود مطالعات درباره اثرات DEHP و سایر فتالات‌ها بر بافت استخوانی (۳۱)، مکانیزم‌های مولکولی زمینه‌ساز آسیب استخوانی ناشی از سمیت DEHP همچنان به‌طور کامل شناخته نشده‌اند. در پژوهش‌های پیشین خود، نشان داده‌ایم که متابولیسم سلول‌ها BMSC با اختلال مواجه شده و غشای آن‌ها در اثر آپوپتوزیس ناشی از سمیت DEHP آسیب دیده است (۱۳ و ۱۶). در مطالعه کنونی، مشخص شد که DEHP موجب پراکسیداسیون لیپیدی در غشای سلولی می‌گردد؛ به طوری که غلظت MDA به‌طور قابل توجهی افزایش یافته، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی

کاهش یافته و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل (TAC) نیز در سلول‌های BMSC در حال تمایز به سلول‌های استخوانی کاهش یافته است. همچنین، سمیت DEHP منجر به کاهش غلظت پروتئین کل در طی تمایز سلول‌ها BMSC به سلول‌ها استخوانی شد.

افزایش چشم‌گیر سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) (و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی شامل کاتالاز) CAT (و سوپراکسید دیسموتاز) SOD (در گروه تیمار شده با DEHP بیانگر استرس اکسیداتیو و سمیت سلولی هستند (۳۲). همچنین کاهش بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با استئوژنز نظیر Col-1, Bmp2, Smad1, Runx2 و Oc نشان می‌دهد که DEHP مسیرهای رونویسی حیاتی در تمایز استخوانی را مختل می‌سازد (۱۵). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که DEHP از طریق القای استرس اکسیداتیو موجب آسیب‌های بافتی در اندام‌های مختلف می‌شود. گزارش شده است که DEHP با فعال‌سازی مسیرهای ERK/MAPK و p38/MAPK در سلول‌ها کبدی باعث آپوپتوزیس می‌شود (۳۳)، همچنین از طریق تحریک مسیرهای سیگنال‌دهی PI3K/Akt و NF-κB در بیضه‌ها، منجر به استرس اکسیداتیو و مرگ سلول‌ها زاینده می‌شود (۳۴). در اغلب مطالعات، سمیت DEHP با استرس اکسیداتیو مرتبط دانسته شده است (۳۵-۳۷) که در ادامه به تولید یون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل به‌عنوان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) منجر می‌شود (۳۸). مولکول‌های زیستی نظیر اسیدهای چرب غیراشباع و چندغیراشباع، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به شدت نسبت به اکسیداسیون توسط ROS حساس هستند که تخریب عملکردی آن‌ها را در پی دارد (۳۹) که این خود باعث اختلال در روند متابولیک و همئوستاز سلولی می‌شود.

استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌های گیاهی جهت پیشگیری از پراکسیداسیون لیپید ناشی از تولید بیش از حد ROS توصیه شده است (۱۴ و ۱۶ و ۴۰). Cur یک آنتی‌اکسیدانت گیاهی قدرتمند است که در گیاه زردچوبه یافت می‌شود (۱۸) که در دسترس عمومی می‌باشد. با توجه به اثر مهاری DEHP بر توانایی استئوژنیک BMSCs، در این مطالعه از Cur به‌دلیل توانایی‌اش در مقابله با اثرات استرس اکسیداتیو و اثر سمی DEHP استفاده شد. در مطالعه حاضر Cur اثرات حفاظتی قابل توجهی را ارائه داد. تیمار با Cur موجب احیای ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، و بهبود ویژگی‌های تمایزی سلول‌ها BMSC فراهم نمود. این امر با افزایش معنی‌دار بیان ژن‌ها، افزایش تولید ماتریکس معدنی همراه بود (۴۱ و ۴۲). در گروه تیمار هم‌زمان، مشاهده شد که Cur به‌طور کامل اثرات مخرب DEHP را خنثی کرده و تفاوتی با گروه کنترل از نظر شاخص‌های بیوشیمیایی و بیان ژن مشاهده نشد.

این نتایج نشان‌دهنده‌ی توان بالقوه Cur به‌عنوان یک عامل درمانی با خواص آنتی‌اکسیدانتی و تقویت‌کننده تمایز استخوانی در شرایط استرس سلولی هستند. اثرات مشاهده‌شده بر بیان ژن، فعالیت آنزیمی و پروتئین‌سازی بیانگر نقش تنظیمی Cur در حفظ تعادل ردوکس و حمایت از مسیرهای بیولوژیکی ضروری برای استئوژنز می‌باشد. ژن Runx2 به‌عنوان یکی از عوامل کلیدی در تمایز BMSCs به استئوبلاست شناخته می‌شود (۴۳) و تحت کنترل خانواده ژن‌های Bmp2 و Smad قرار دارد (۴۴). Runx2 بیان ژن‌های Oc و Alp را تنظیم می‌کند که در تشکیل ماتریکس استخوانی توسط استئوبلاست‌های تازه تمایز یافته نقش دارند (۴۵).

مطالعه حاضر نشان داد که پس از القای تمایز استخوانی، بیان ژن‌های Bmp2, Smad1, Runx2, Alp, Oc و Col-1a1 توسط Cur افزایش یافت و در نتیجه تمایز استخوانی BMSCs ارتقا یافت. گرچه Cur به‌عنوان آنتی‌اکسیدانتی قوی در کاهش اثرات سمی DEHP عمل می‌کند، اما شواهد نشان می‌دهند که مسیر سیگنال‌دهی خاصی باید در افزایش بیان ژن‌های مرتبط

با تمایز استخوانی توسط Cur فعال شده باشد. در مطالعه‌ای توسط Xiong و همکاران (۴۲)، مشخص شد که تیمار BMSCs با Cur، باعث افزایش تمایز استئوژنیک لگامنت‌های پریدنتال انسان از طریق فعال سازی مسیر PI3K/AKT/Nrf2 می‌شود در بازسازی استخوان، علاوه بر فعالیت استئوکلاست‌ها به‌عنوان سلول‌ها تجزیه‌کننده ماتریکس، استئوبلاست‌ها به‌عنوان سلول‌ها سازنده ماتریکس نقش حیاتی ایفا می‌کنند. پس از تمایز سلول‌ها BMSC به استئوبلاست‌ها، این سلول‌ها شروع به تولید ماتریکس استخوانی می‌کنند که نشان‌دهنده شکل‌گیری استخوانی قوی و سالم است. بنابراین، هرگونه اختلال در فرآیند تمایز استخوانی سلول‌ها BMSC می‌تواند منجر به کاهش چگالی استخوان و در نتیجه، زمینه‌ساز بروز استئوپروز باشد (۴۶). فعال‌سازی ژن‌های مرتبط با استئوژنز، منجر به تولید اجزای آلی و معدنی ماتریکس استخوان می‌شود (۴۷). DEHP با کاهش بیان ژن‌های مربوطه، باعث مهار تولید اجزای آلی (مانند COL-1A1) و معدنی (مانند غلظت کلسیم) ماتریکس استخوان شد. در مقابل، Cur به‌عنوان یک محصول گیاهی طبیعی، قادر به بهبود بیان ژن‌ها و بازیابی سطح COL-1A1 و فعالیت آنزیم ALP بوده که دو عامل مهم در بیوسنتز ماتریکس استخوانی هستند.

۶- نتیجه گیری

استرس اکسیداتیو القا شده توسط DEHP منجر به کاهش بیان ژن‌های مرتبط با استئوژنز گردید که به‌دنبال آن، تولید کلاژن و فعالیت ALP کاهش یافت. در مقابل، Cur به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت قوی، توانست استرس اکسیداتیو ناشی از DEHP را خنثی کند و موجب احیای بیان ژن‌های مرتبط با استئوژنز و افزایش تولید ماتریکس استخوانی شود. اگرچه تحقیقات بیشتر جهت درک دقیق‌تر از میزان اثرات حفاظتی Cur در برابر سمیت DEHP لازم است، اما آگاهی متخصصان سلامت از اثرات احتمالی مواجهه با DEHP بر سلامت استخوان اهمیت بالایی دارد. بنابراین، گنجاندن مواد غذایی یا مکمل‌های غنی از آنتی‌اکسیدانت در برنامه‌های درمانی بیماران در معرض خطر، می‌تواند در کاهش آثار منفی استرس اکسیداتیو بر متابولیسم استخوان مؤثر بوده و به ارتقای سلامت عمومی کمک کند. برای درک دقیق‌تر از مکانیزم‌های دخیل در این تعاملات، پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده بر بررسی مسیرهای سیگنالینگ دخیل در بیان ژن‌های مرتبط با تمایز استئوژنیک، سلامت میتوکندری، و تغییرات اپی‌ژنتیک تمرکز یابد. همچنین، انجام مطالعات در مدل‌های حیوانی یا بالینی جهت ارزیابی قابلیت درمانی Cur در مقابله با اختلالات استخوانی ناشی از مواجهه با DEHP ضروری است.

۷- منابع

1. Yang L, Liu X, Peng Z, Liu Z, Song P, Zhou J, Ma K, Yu Y, Dong Q. Exposure to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) increases the risk of cancer. *BMC Public Health*. 2024 Feb 10;24(1):430. doi: 0.1186/s12889-024-17801-w.
2. ATSDR. Toxicological profile for di(2-ethylhexyl) phthalate. Atlanta: United States Public Health Service; 2022.
3. Ito R, Seshimo F, Haishima Y, Hasegawa C, Isama K, Yagami T, Nakahashi K, Yamazaki H, Inoue K, Yoshimura Y, Saito K, Tsuchiya T, Nakazawa H. Reducing the migration of di-2-ethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride medical devices. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005; 303 (1–2): 104-112. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.07.009.

4. Van Vliet ED, Reitano EM, Chhabra JS, Bergen GP, Whyatt RM. A review of alternatives to di (2-ethylhexyl) phthalate-containing medical devices in the neonatal intensive care unit. *J Perinatol*. 2011 Aug;31(8):551-60. doi: 10.1038/jp.2010.208. Epub 2011 Feb 10. Erratum in: *J Perinatol*. 2012 Aug;32(8):648.
5. Turner VS, Mitchell SG, Kang SK, Hawker RJ. A comparative study of platelets stored in polyvinyl chloride containers plasticised with butyryl trihexyl citrate or triethylhexyl trimellitate. *Vox Sang*. 1995;69(3):195-200. doi: 10.1111/j.1423-0410.1995.tb02593.x.
6. XueXia L, YaNan L, Zi T, YuSheng Z, ZeLin W, Peng Z, MeiNa X, FuJun L. Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) exposure induces sperm quality and functional defects in mice. *Chemosphere*. 2023 Jan;312(Pt 1):137216. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.137216.
7. Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1994 Oct;128(2):216-23. doi: 10.1006/taap.1994.1200.
8. Wang S, Xu K, Du W, Gao X, Ma P, Yang X, Chen M. Exposure to environmental doses of DEHP causes phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Toxicology*. 2024 Dec;509:153952. doi: 10.1016/j.tox.2024.153952.
9. Liu Y, Zhang X, Yi R, Tian Q, Xu J, Yan X, Ma J, Wang S, Yang G. Exploring the nephrotoxicity and molecular mechanisms of Di-2-ethylhexyl phthalate: A comprehensive review. *Chemico-Biological Interactions*. 2025; 405: 111310. Doi: 10.1016/j.cbi.2024.111310.
10. Rusyn I, Peters JM, Cunningham ML. Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver. *Crit Rev Toxicol*. 2006 May;36(5):459-79. doi: 10.1080/10408440600779065.
11. Wang W, Kannan K. Leaching of Phthalates from Medical Supplies and Their Implications for Exposure. *Environ Sci Technol*. 2023 May 23;57(20):7675-7683. doi: 10.1021/acs.est.2c09182.
12. Suna S, Jitsunari F. Blood and organ distribution of mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) in rats exposed to di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) via diet. *World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences*. 2023; 13(03): 019-025. DOI: 10.30574/wjbphs.2023.13.3.0116
13. Abnosi MH, Aliyari Babolghani Z. Diethylhexyl phthalate induced oxidative stress and caused metabolic imbalance in bone marrow mesenchymal stem cells. *Physiology and Pharmacology* 2022; 26: 88-100. <http://dx.doi.org/10.52547/phypha.26.1.5>
14. Abnosi MH, Aliyari Babolghani Z. The inhibitory role of di-2-ethylhexyl phthalate on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via down-regulation of runx2 and membrane function impairment. *International Journal of Medical Toxicology and Forensic Medicine*. 2020; 10(2): 26673. DOI:10.32598/ijmtfm.v10i2.26673
15. Shayeganfar Z, Abnosi MH, Sargolzaee J. Effect of Di-2-ethylhexylphthalate on alkalinephosphatase activity was due to down regulation of osteogenic related genes. *Journal of Cell and Tissue*. 2023; 14(1): 80-95. Doi: 10.52547/JCT/14.1.80
16. Abnosi MH, Sargolzaee J, Shayeganfar Z. Induction of Caspase-dependent Apoptosis in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Due to Di-2-Ethylhexyl Phthalate Toxicity was Found to

Arrest the Cell Cycle at the G1 Stage. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2023;18(8):1106-1112. doi: 10.2174/1574888X18666230106114727.

17. Zhang Y, Zheng L, Cheng D, Lei C, Li H, Zhou J, Zhang C, Song F, Zeng T, Zhao X. Chronic di(2-ethylhexyl) phthalate exposure at environmental-relevant doses induces osteoporosis by disturbing the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Sci Total Environ.* 2024 Mar 1;914:169918. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.169918.

18. Abnosi MH, Lak M. Curcumin partially prevented oxidative stress induced by DEHP in bone marrow mesenchymal stem cells through activation of Nrf2/NFkB pathway. *Journal of Cell and Tissue.* 2025; 15(4): 281-298. DOI: 10.61186/JCT.15.4.281.

19. Ahmad Bhat F, Ramajayam G, Parameswari S, Vignesh RC, Karthikeyan S, Senthilkumar K, Karthikeyan GD, Balasubramanian K, Arunakaran J, Srinivasan N. Di 2-ethyl hexyl phthalate affects differentiation and matrix mineralization of rat calvarial osteoblasts – in vitro. *Toxicology in Vitro.* 2013; 27(1): 250-256. Doi: 10.1016/j.tiv.2012.09.003.

20. Martins K, Applegate B, Hagedorn B, Kennish J, Zwollo P .Di(2-ethylhexyl) phthalate inhibits B cell proliferation and reduces the abundance of IgM-secreting cells in cultured immune tissues of the rainbow trout .*Fish & Shellfish Immunology.* 2015; 44(1): 332-341. Doi: 10.1016/j.fsi.2015.02.037.

21. Choi JI, Cho HH. Effects of Di(2-ethylhexyl)phthalate on Bone Metabolism in Ovariectomized Mice. *J Bone Metab.* 2019; 26(3):169-177. doi: 10.11005/jbm.2019.26.3.169.

22. Lai CC, Liu FL, Tsai CY, Wang SL, Chang DM. Di-(2-ethylhexyl phthalate exposure links to inflammation and low bone mass in premenopausal and postmenopausal females: Evidence from ovariectomized mice and humans. *Int J Rheum Dis.* 2022; 25(8):926-936. doi: 10.1111/1756-185X.14386.

23. Posnack N. G., Swift L. M., Kay M. W., Lee N. H., Sarvazyan N. Phthalate exposure changes the metabolic profile of cardiac muscle cells. *Environmental Health Perspectives.* 2012;120(9):1243–1251. doi: 10.1289/ehp.1205056.

24. Lin H., Yuan K., Li L., et al. In utero exposure to diethylhexyl phthalate affects rat brain development: A behavioral and genomic approach. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2015;12(11):13696–13710. doi: 10.3390/ijerph121113696.

25. Xu Y., Agrawal S., Cook T. J., Knipp G. T. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate affects lipid profiling in fetal rat brain upon maternal exposure. *Archives of Toxicology.* 2007;81(1):57–62. doi: 10.1007/s00204-006-0143-8.

26. David R. M., Moore M. R., Finney D. C., Guest D. Chronic toxicity of Di(2-ethylhexyl)phthalate in mice. *Toxicological Sciences.* 2000;58(2):377–385. doi: 10.1093/toxsci/58.2.377.

27. Moradi M., Parker M., Sneddon A., Lopez V., Ellwood D. Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. *BMC Women's Health.* 2014;14, article 123 doi: 10.1186/1472-6874-14-123.

28. Li L., Liu J.-C., Lai F.-N., et al. Di (2-ethylhexyl) Phthalate Exposure Impairs Growth of Antral Follicle in Mice. *PLoS ONE*. 2016;11(2) doi: 10.1371/journal.pone.0148350.e0148350.
29. David R. M. Proposed Mode of Action for In Utero Effects of Some Phthalate Esters on the Developing Male Reproductive Tract. *Toxicologic Pathology*. 2006;34(3):209–219. doi: 10.1080/01926230600642625.
30. Rowdhwal SSS, Chen J. Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 22;2018:1750368. doi: 10.1155/2018/1750368.
31. Choi JI, Cho HH. Effects of Di(2-ethylhexyl)phthalate on Bone Metabolism in Ovariectomized Mice. *J Bone Metab*. 2019 Aug;26(3):169-177. doi: 10.11005/jbm.2019.26.3.169.
32. Ding WJ, Huang SL, Huang S, Xu WP, Wei W. Di(2-ethylhexyl) phthalate mediates oxidative stress and activates p38MAPK/NF-kB to exacerbate diabetes-induced kidney injury in vitro and in vivo models. *Toxicol Res (Camb)*. 2023 Apr 1;12(2):332-343. doi: 10.1093/toxres/tfad022.
33. Lee J, Lim KT. Plant-originated glycoprotein (24 kDa) has an inhibitory effect on proliferation of BNL CL.2 cells in response to di(2-ethylhexyl)phthalate. *Cell Biochem Funct* 2011; 29: 496 505.
34. Rogers R, Ouellet G, Brown C, Moyer B, Rasoulpour T, Hixon M. Cross-talk between the Akt and NF-kappaB signaling pathways inhibits MEHP-induced germ cell apoptosis. *Toxicol Sci* 2008; 106: 497 508.
35. Lee J, Lim KT. Plant-originated glycoprotein (24 kDa) has an inhibitory effect on proliferation of BNL CL.2 cells in response to di(2-ethylhexyl)phthalate. *Cell Biochem Funct* 2011; 29: 496 505.
36. Ghosh J, Das J, Manna P, Sil PC. Hepatotoxicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate is attributed to calcium aggravation, ROS-mediated mitochondrial depolarization, and ERK/NF-kappaB pathway activation. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 1779 1791.
37. Tetz LM, Cheng AA, Korte CS, Giese RW, Wang P, Harris C, Meeker JD, Loch-Carusio R. Mono-2-ethylhexyl phthalate induces oxidative stress responses in human placental cells in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013; 268(1):47-54. doi: 10.1016/j.taap.2013.01.020.
38. Wang W, Craig ZR, Basavarajappa MS, Hafner KS, Flaws JA. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces oxidative stress and inhibits growth of mouse ovarian antral follicles. *Biol Reprod*. 2012; 87(6):152. doi: 10.1095/biolreprod.112.102467.
39. Juan CA, Pérez de la Lastra JM, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 28;22(9):4642. doi: 10.3390/ijms22094642.
40. Abnosi MH, Sargolzaei J, Nazari F. Gallic Acid Ameliorates Cadmium Effect on Osteogenesis by Activation of Alkaline Phosphatase and Collagen Synthesis. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2023; 25(9): 603-612.
41. Khezri K, Maleki Dizaj S, Rahbar Saadat Y, Sharifi S, Shahi S, Ahmadian E, Eftekhari A, Dalir Abdolahinia E, Lotfipour F. Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells via Curcumin-Containing Nanoscaffolds. *Stem Cells Int*. 2021 Jul 17;2021:1520052. doi: 10.1155/2021/1520052.

42. Xiong Y, Zhao B, Zhang W, Jia L, Zhang Y, Xu X. Curcumin promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through the PI3K/AKT/Nrf2 signaling pathway. *Iran J Basic Med Sci.* 2020 Jul;23(7):954-960. doi: 10.22038/IJBMS.2020.44070.10351.
43. Bruderer MRichards, RG, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of runx2 in osteogenesis. *European Cells and Materials.* 2014; 28: 269-286.
44. Hassan MQ, Tare RS, Lee SH, Mandeville M, Morasso MI, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. BMP2 Commitment to the Osteogenic Lineage Involves Activation of Runx2 by DLX3 and a Homeodomain Transcriptional Network. *Journal of Biological Chemistry.* 2006; 281(52): 40515-40526.
45. Liu TM, Lee EH. Transcriptional Regulatory Cascades in Runx2-Dependent Bone Development *Tissue Eng Part B Rev.* 2013 Jun; 19(3): 254–263.
46. Valenti MT, Carbonare LD, Mottes M. Osteogenic Differentiation in Healthy and Pathological Conditions. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(1): 41. doi: 10.3390/ijms18010041.
47. Blair HC, Larrouture QC, Li Y, Lin H, Beer-Stoltz D, Liu L, Tuan RS, Robinson LJ, Schlesinger PH, Nelson DJ. Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Eng Part B Rev.* 2017; 23(3): 268–280.