



Effect of Di-2-ethylhexylphthalate on alkalinephospatase activity was due to down regulation of osteogenic related genes

Shayeganfar Z^a, Abnosi MH^{b*}, Sargolzaei J^c

^a Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

^b Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran


^c Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Shayeganfar Z, Abnosi MH, Sargolzaei. Effect of Di-2-ethylhexylphthalate on alkalinephospatase activity was due to down regulation of osteogenic related genes. Journal of Cell and Tissue. 2023;14(1): 80.

 <https://10.52547/JCT/14.1.80>

KEYWORDS

Bone marrow mesenchymal stem cells; Di-2-ethylhexylphthalate; Osteogenic differentiation; Collagen; Gene expression

ABSTRACT

Aim: Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) is used as plasticizer to produce flexible polyvinyl chloride (PVC) which is used in food and medical industries. Due to temperature change and contact with biological fluids and other liquids, DEHP leaches out from PVC. Humans get exposed to DEHP in different way including food consumption and medical utilities such as blood bags, blood transfusion tubes, syringes. At 2002, 120000 tons of DEHP has been produced in United States of America and this production was raised up to 230000 tons at 2006. In Iran, only in one of the industries called as Farabi petrochemical industries, 55000 tons of phthalate per year is produced. It has been reported that the DEHP concentration in human blood might reach to 52 to 55 µg/ml when blood is stored in polyvinyl chloride bags for two weeks. Previously, the effect of different concentration of DEHP on viability, proliferation and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells was investigated. In the present study, effect of 100 µM (39 µg/ml) of DEHP on the expression of genes related to osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells was investigated.

Material and methods: In this experimental study, rat bone marrow mesenchymal stem cells were extracted from Wistar rats and after 3rd

* Corresponding author. Tel.:08632627220; Fax: 08632627220

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

DOI: <https://10.52547/JCT/14.1.80>

Received: Jan. 16, 2023; Received in revised form: Mar. 23, 2023; Accepted: Fen. 19, 2023

Original Article

© Author



passage the cells cultured was performed in osteogenic media in presence of 100 μ M of DEHP for 21 days. The viability of the cells was studied using 3-[4, 5-dimethylthiazol-2yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. In addition, the osteogenic differentiation of the rat bone marrow mesenchymal stem cells was investigated using quantitative alizarin red test and calcium concentration determination. In addition, alkaline phosphatase enzyme activity as a marker of osteogenic differentiation was measured. Expression of the osteogenic related genes (osteonectin, SMAD1, BMP2, BMP7 and RUNX2) were studied using reverse transcriptase-PCR. Data was analyzed and the minimum level of significant was considered as $p < 0.05$.

Results: Data analysis revealed, rat bone marrow mesenchymal stem cells viability reduced significantly ($p < 0.05$) following treatment with 100 μ M of DEHP when compared to control one. Also, we observed a significant ($p < 0.05$) reduction in matrix production based on significant reduction in alizarin red concentration as well as calcium content and alkaline phosphatase enzyme activity. In addition, a significant ($p < 0.05$) reduction in total protein also was observed in the samples extracted from BMSCs differentiated to osteoblasts in presence of DEHP. Meanwhile, a significant ($p < 0.05$) down regulation of osteogenic related genes was confirmed while no change ($p > 0.05$) was observed in the expression of GAPDH.

Conclusion: based on this study, long term exposure to DEHP caused reduction in matrix production which strongly showed the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells is affected by low concentration of this environmental pollutant. As it was observed, the concentration used in this study was lower than the concentration of this pollutant in blood bags. Therefore, if a patient gets exposed to the biological or non-biological fluids in a treatment procedure, large amount of DEHP would enter the blood circulation system. As DEHP is used in production of food containers and medical utilities such as blood tubing, blood bags, dialysis tubes in dialysis machines, we strongly suggest a legal restriction to be forced on the industrial which using this chemical as plasticizer.



اثر دی-۲-اتیل هگزیل فتالات بر کاهش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به دلیل کاهش بیان ژن‌های دخیل در تمایز استئوژنیک بود

زهرا شایگان فر^۱، محمد حسین آبنوسی^{۲*}، جواد سرگلزائی^۳

^۱گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران، zahrashayeganfar@yahoo.com

^۱گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران، m-abnosi@araku.ac.ir

^۲گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران، j-sargolzaei@araku.ac.ir

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: دی-۲-اتیل هگزیل فتالات (DEHP) به‌عنوان نرم کننده پلاستیک در صنایع غذایی و پزشکی استفاده شده و انسان‌ها با روش‌های متفاوت مانند تزریقات پزشکی در معرض این آلاینده قرار می‌گیرند. قبلاً اثر غلظت‌های مختلف این آلاینده بر توانایی حیات، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم مغزاستخوان رت ویستار (BMSCs) بررسی شده است. در این پژوهش مکانیسم اثر DEHP بر ژن‌های دخیل در تمایز BMSCs به استئوبلاست بررسی شد. مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی BMSCs در محیط استئوژنیک با غلظت‌های ۰ و ۱۰۰ میکرومولار از DEHP برای مدت ۲۱ روز تیمار و از آزمون MTT جهت بررسی توانایی حیات و از آزمون آلیزارین رد، اندازه‌گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز و تعیین غلظت کلسیم ماتریکس برای بررسی معدنی شدن استفاده شد. بیان ژن‌های دخیل در تمایز با تکنیک RT-PCR ارزیابی شد. نتایج: آنالیز آماری نشان داد که توانایی زیستی نیز با کاهش معنی‌دار (۴۲٪) مواجه شد. همچنین کاهش تولید ماتریکس بر اساس کاهش میزان آلیزارین رد، غلظت کلسیم و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نشان داد که تمایز BMSCs به استئوبلاست در حضور DEHP کاهش معنی‌دار داشته است. ضمناً کاهش بیان ژن‌های ضروری مشاهده شد. نتیجه‌گیری: DEHP در مدت طولانی باعث کاهش معدنی ماتریکس تولید شده توسط سلول‌ها شده است و در نتیجه کاهش تمایز BMSCs به استئوبلاست می‌شود. از آن‌جا که DEHP در تهیه وسایل پزشکی و ظروف غذایی استفاده می‌شود، پیشنهاد می‌شود در مصرف این ترکیب محدودیت‌های قانونی اعمال شود.</p>	<p>تمایز به استئوبلاست بیان ژن سلول‌های بنیادی مزانشیم مغزاستخوان، دی-۲-اتیل هگزیل فتالات، تمایز به استئوبلاست، کلاژن، بیان ژن</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۶ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۱/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۳۰</p>

۱- مقدمه

از محصولات پلی ونیل کلرید (PVC) به صورت گسترده در صنایع مختلف استفاده می‌شود (۱)، و استفاده از این پلیمر شیمیائی در صنایع پزشکی به خصوص تهیه سرنگ، لوله‌های مخصوص تزریق مایعات، کیسه‌های جمع آوری خون، کیسه‌های مخصوص نگهداری محصولات پلاستیک خون و غیره استفاده می‌شود (۲ و ۳). از آنجا که محصولات تولید شده توسط PVC سخت و شکننده هستند، برای رفع این مشکل از نرم کننده‌های شیمیائی استفاده می‌شود (۳). در بین نرم کننده‌های شیمیائی، استرفتالاتها مهم‌ترین خانواده از نرم کننده‌ها شیمیائی هستند که برای تهیه محصولات PVC به آن اضافه می‌شوند (۴). سالانه مقادیر زیادی از استرفتالاتها در دنیا تولید و مورد مصرف قرار می‌گیرند، با توجه به مطالعه انجام گرفته در ایران مشخص شده است که فتالاتها و متابولیت‌های آن در ادرار خانم‌های باردار که از لوازم آرایش استفاده کرده و همچنین برای حمل و نگهداری غذا از ظروف پلاستیکی استفاده می‌کنند بیشتر دیده شده است (۵). از طرفی در ایالات متحده آمریکا، در سال ۲۰۰۲ میزان ۱۲۰۰۰۰ تن دی اتیل هگزیل فتالات تولید شد و این مقدار در سال ۲۰۰۶ به میزان ۲۳۰۰۰۰ تن رسید (۶). در سال ۲۰۱۱ در کشور چین میزان ۵۰ میلیون تن محصولات پلاستیک از PVC تولید شده است که استرهای فتالات، ۹۰ درصد نرم کننده‌ها استفاده شده در این محصولات را تشکیل می‌دهد (۷). در میان ۲۵ نوع مختلف از استرهای فتالات، دی اتیل هگزیل فتالات (DEHP) بیشترین استفاده در تولید محصولات صنعتی تولید شده از PVC را دارد (۴). اگرچه قوانین متعددی در توقف استفاده از DEHP در آمریکا و اروپا وضع شده است، ولی در حال حاضر استفاده از این نرم کننده در صنعت پلاستیک به صورت روز افزونی در حال افزایش است (۶).

جدای از آلودگی گسترده محیط زیست که توسط صنایع مختلف بوجود می‌آید (۸) عمده‌ترین مشکل درخصوص استفاده از این ماده شیمیائی به آزاد سازی آن از محصولات صنعتی تولید شده از PVC بر می‌گردد. با توجه به عدم برقراری پیوند کووالانس این ترکیب با PVC، در صورت تغییر دما یا نگهداری مایعات و مواد غذایی در ظروف پلاستیک، این ترکیب شیمیائی به راحتی از PVC جدا و وارد مایعات و مواد غذایی می‌شود. در مطالعه انجام شده توسط رحیمی و همکاران (۹) مشخص شد که با تغییر دما DEHP به آب لیموهای داخل بطری پلاستیکی انتقال پیدا می‌کند. همچنین موذن و همکاران (۱۰) نشان دادند که DEHP بیشترین میزان مهاجرت به نوشابه‌های داخل بطری‌های تولید شده از پلی اتیلن تری فتالات (PET) را در مقایسه با دیگر استرهای فتالات داشته است. از طرفی از آنجا که مصنوعات متعددی در خصوص درمان، سلامت و بهداشت (سرنگ‌های تزریق، لوله‌های تزریق، کیسه‌های نگهداری خون و فراورده‌های خونی، ظروف کشت سلولی، ظروف نگهداری لوسیون‌ها و لوازم آرایشی و بهداشتی) از PVC تولید می‌شوند، حضور DEHP در خون، ادرار، شیر مادر و دیگر مایعات بیولوژیک گزارش شده است (۱۱). مطالعات متعددی وجود دارد که اثر سمی DEHP بر روی سلول‌های مختلف را گذارش نموده‌اند، در ادامه به برخی از این مطالعات اشاره می‌شود. در مطالعه Sumner و همکاران (۱۲) مشاهده شد که DEHP باعث کاهش تحرک و شکستگی DNA در اسپرم انسان و سگ می‌شود. همچنین مشخص شده است که تیمار با DEHP باعث کاهش بیان گیرنده‌های مینرالوکورتیکوئیدها در سلول‌های لیدیک می‌شود (۱۳)، ضمناً نشان داده شده است که تیمار ۴۸ ساعته سلول‌های HepG2 با DEHP باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و کاهش بیان پروتئین Nrf-2 در این سلول‌ها می‌شود (۱۴). حضور این ترکیب شیمیائی در خون و خاصیت هیدروفوب آن موجب حضور DEHP در مغز استخوان را فراهم نموده به صورتی که می‌تواند باعث مسمومیت سلول‌های بنیادی مغز استخوان شود.

در مغز استخوان دو نوع سلول بنیادی خون‌ساز و مزانشیم وجود دارد، که به ترتیب مسئولیت تولید سلولهای خونی (رده میلوئیدی و لنفوئیدی) و سلول استئوبلاست به‌عده این سلول‌های بنیادی می‌باشد (۱۵). از آن‌جا که سلول‌های استئوبلاست مسئول تولید ماتریکس استخوان می‌باشند، مسمومیت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان به معنی کاهش تمایز این سلول‌ها به استئوبلاست بوده و در نتیجه می‌تواند در تولید ماتریکس استخوان اختلال ایجاد نماید. تحقیقات نشان داده است که DEHP در محیط آزمایشگاهی می‌تواند توانائی زیستی این سلول‌ها را کاهش داده و باعث توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت (BMSCs) شوند. آبنوسی و علیاری (۱۶) در مطالعه خود نشان دادند که تیمار BMSCs با غلظت‌های ۰/۵ تا ۲۵۰۰ میکرومولار DEHP در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت باعث کاهش معنی‌دار توانائی زیستی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت از ۵۰۰ میکرومولار به‌صورت وابسته به غلظت شد. از طرفی غلظت ۵۰۰ میکرومولار در ۴۸ ساعت باعث کاهش قطر هسته و تراکم کروماتین و کوچک شدن سیتوپلاسم این سلول‌ها شد. البته آن‌ها متذکر شدند که تیمار طولانی مدت باعث شده است که غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیز باعث ایجاد مسمومیت شود به‌صورتی که در تیمار ۷ و ۱۴ روز این غلظت باعث کاهش تعداد و قطر کلونی‌ها شد. ضمناً تیمار ۴ و ۸ روز نیز باعث شد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار موجب کاهش دوبرابر شدگی جمعیت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان شود. از طرفی در مطالعه دیگری آبنوسی و همکاران (۱۷) نشان دادند که تیمار BMSCs در مدت زمان ۴۸ ساعت، غلظت ۱۰۰ میکرومولار باعث توقف چرخه سیکل سلولی در مرحله G1 شده و آپوپتوزیس وابسته با کاسپاز را نیز در این سلول‌ها القا می‌کند.

اخیراً آبنوسی و علیاری (۱۸) نشان دادند که DEHP با القای استرس اکسیداتیو و اختلال در متابولیسم سلولی باعث کاهش تمایز BMSCs به سلول‌های استئوبلاست می‌شود. در ادامه مطالعه آن‌ها، برای اولین بار به بررسی بیشتر بیان ژن‌های دخیل در تمایز سلول‌های BMSCs به استئوبلاست پرداخته شده است تا بتوان مکانیزم این اختلال را مورد بررسی قرار دهیم.

۲- مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی رت نر نژاد ویستار از انستیتو پاستور- تهران خریداری و در اتاق حیوانات دانشگاه اراک تحت شرایط استاندارد نور و دما نگهداری شد. ملاحظات اخلاقی: پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک و اخذ کد اخلاق (IR.ARAKMU.REC.1399.099) و رعایت اصول اخلاقی، موش‌های صحرایی نژاد ویستار به کمک دی اتیلن اتر بی‌هوش و بعد از قربانی شدن، استخوان‌های ران و ساق پای آن‌ها جدا و پس از جدا کردن بافت‌های پیوندی، استخوان‌ها در محیط کشت کامل شامل محیط دولباسکو ایگل مودی‌فاید می‌دیم (DEME) حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و پنی‌سیلین-استرپتومایسین (PEN-STRP) قرار داده شد و به زیر هود لامینار منتقل شد. سپس دو سر استخوان با قیچی استریل قطع و مغز استخوان با تزریق محیط کشت به‌داخل استخوان (عمل فلاشینگ) خارج و به در لوله فالکون حاوی محیط کشت تخلیه شد. سپس سلول‌های استخراج شده در دور ۲۵۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و پس از تخلیه محیط رویی و رسوب سلولی مجدداً در یک میلی لیتر محیط تازه معلق و به فلاسک کشت T25 انتقال و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سطح اشباع ۵ درصد دی اکسید کربن نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی خارج و سلول‌ها با بافر فسفات نمکی (PBS) شستشوی و در فلاسک T25 قرار داده شد. محیط کشت سلول‌ها به مدت ۱۴ روز هر سه روز یک‌بار تعویض و زمانی که کف فلاسک با سلول‌های تک لایه پوشیده شد به کمک ترپسین-دی اتیل تتر استیک اسید (Trp-EDTA)، سلول‌ها

جدا و مجددا در یک فلاسک T25 دیگر کشت داده شد. عمل کشت مجدد سه بار تکرار و خلوص سلول‌ها با استفاده از روش فلوسایتومتری بررسی و برای آنالیزهای بعدی استفاده شد.

بررسی توانایی زیستی: برای بررسی توانایی زیستی، سلول‌های پاساژ سوم با تعداد ۵۰۰۰ سلول در پلیت ۱۲ خانه کشت و پس از آن که به تراکم ۷۰ درصد رسیدند با غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP به مدت ۲۱ روز با تعویض هر سه روز یک بار محیط کشت تیمار شدند. سپس با استفاده از روش MTT فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندریایی به عنوان شاخص متابولیک سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه: محیط کشت هر چاهک تخلیه و پس از شستشو با PBS، ۱ میلی لیتر محیط کشت فاقد سرم به هر چاهک اضافه و به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول تترازولیوم (۵ میلی گرم بر میلی لیتر PBS) اضافه و پلیت برای مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. بعد از تخلیه محیط کشت مجددا هر چاهک با PBS شستشو و سپس برای استخراج کریستال‌های فورمازان به هر چاهک ۱ میلی لیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه و پلیت برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج شده به چاهک یک پلیت ۹۶ خانه منتقل و جذب نمونه‌ها توسط میکروپلیت ریدر مدل (Medical SCO GmbH; Germany) در طول موج ۵۰۵ نانومتر قرائت شد (۱).

بررسی تمایز استئوژنیک و اندازه گیری میزان رنگ آلیزارین رد: تمایز استئوژنیک در پلیت ۶ خانه و با محیط کشت کامل DMEM حاوی سدیم گلیسروفسفات (۱ میلی مولار)، ال-آسکوربیک اسید (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و دکزامتازون (۱۰ نانومولار) انجام شد. چاهک‌ها با غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP در حضور کنترل تیمار و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محیط حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۲۱ روز با تعویض محیط برای هر سه روز یک بار نگهداری شد. بعد از این مدت، محیط کشت حذف و سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با فرمالدئید ۱۰ درصد فیکس شدند. به هر چاهک ۲ میلی لیتر محلول آلیزارین رد (۴۰ میلی مولار، pH ۴/۲) اضافه و پلیت به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از شستشوی رنگ اضافی، تصویر برداری توسط میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین انجام و سپس برای اندازه گیری کمی رنگ آلیزارین رد جذب شده توسط ماتریکس، ۱ میلی لیتر اسید استیک ۱۰ درصد به هر چاهک اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه سلول‌ها توسط اسکرپر جمع آوری و در یک میکروتیوپ قرار گرفت و به مدت ۳۰ ثانیه به شدت بهم زده شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر روغن معدنی به هر میکروتیوپ اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بلافاصله میکروتیوپ‌ها خارج و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شده و در دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ شد. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از محلول روئی با ۲۰۰ میکرولیتر محلول آمونیوم سولفات ۱۰ درصد خنثی سازی و جذب ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط میکروپلیت ریدر قرائت شد.

نمودار استاندارد با تهیه ۵ غلظت مشخص از محلول آلیزارین رد (محلول ۲ میلی مولار با اضافه کردن محلول ۴۰ میلی مولار آلیزارین رد به مخلوط اسید استیک (۱۰ درصد) و آمونیوم سولفات (۱۰ درصد) به نسبت ۵ به ۲ به عنوان محلول استاندارد تهیه شد) رسم و سپس با استفاده از فرمول خطی $Y=0.7572-0.0079$ با $R^2=0.9994$ غلظت (µM/ml) رنگ آلیزارین رد استخراج شده از نمونه محاسبه و گزارش شد.

اندازه گیری غلظت کلسیم استخراج شده از ماتریکس: پلیت بعد از ۲۱ روز تیمار با PBS شستشو و سلول‌های توسط اسکرپر جمع آوری و در یک میکروتیوپ با وزن مشخص (برای تعیین وزن سلول‌های پس از تفاضل اوزان) قرار گرفت. کلسیم موجود در وزن مساوی از سلول‌های با استفاده از ۵۰ میکرو لیتر اسید کلریدریک (۵/۰ نرمال) در ۴ درجه سانتی گراد به مدت

۲۴ ساعت استخراج و سپس میزان کلسیم موجود در ماتریکس سلولی با کمک کیت کلسیم شرکت پارس آزمون (کد محصول ۱۴۰۰۰۷) اندازه‌گیری شد. در این روش ۲۰ میکرولیتر نمونه سلولی با یک میلی‌لیتر محلول واکنش موجود در کیت مخلوط و اختلاف جذب بین صفر و ۳ دقیقه در طول موج ۵۷۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر (PG Instrument Company, England) اندازه‌گیری و غلظت کلسیم با استفاده از نمودار استاندارد (تهیه شده از غلظت‌های مختلف کلرید کلسیم) با استفاده از فرمول خطی $Y=0.0076X+0.0088$ و $R^2=0.9981$ تعیین بر اساس mg/dl گزارش شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: سلول‌های تیمار داده شده با غلظت‌های ۱۰۰ میکرومولار DEHP به مدت ۲۱ روز ابتدا با استفاده از PBS شستشو و سپس بعد از جمع‌آوری برونش انجماد و ذوب لیز و به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. میزان پروتئین موجود در محلول رویی به کمک روش لوری و با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم براساس میزان نمونه با مقدار پروتئین مساوی اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALPs) از کیت پارس آزمون (کد محصول ۱۴۰۰۰۲) استفاده شد و بر اساس روش ارائه شده توسط شرکت میزان ۲۰ میکرولیتر از نمونه با یک میلی‌لیتر از محلول واکنش موجود در کیت مخلوط و اختلاف جذب بین صفر و ۳ دقیقه در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (PG Instrument Company, England) قرائت شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید. میزان فعالیت آنزیم براساس فرمول خطی $Y=0.0015X+0.0004$ و $R^2=0.9993$ به‌دست آمده از نمودار استاندارد تعیین و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد بین‌المللی در لیتر بر گرم پروتئین (U/L) (میزان فعالیت آنزیم هر نمونه به مقدار پروتئین تام آن نمونه تقسیم شد) گزارش شد.

بررسی بیان ژن‌های دخیل در تمایز استئوژنیک: به‌منظور انجام PCR-معکوس (RT-PCR)، RNA کل سلول‌های تمایز یافته بعد از ۲۱ روز تیمار با استفاده از کیت Super RNA extraction kit for tissue and cells (YT9080) استخراج و DNA مکمل (c-DNA) کل توسط کیت BioFACT(BR631-096) سنتز گردید. واکنش PCR به‌منظور بررسی بیان ژن‌های مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) انجام شد. بدین منظور از دستگاه ترموسایکلر مدل (gradient Eppendorf mastercycler) و برنامه‌های دمایی: ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه با تعداد ۳۵ سیکل تکرار انجام شد.

جدول ۱: پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده برای PCR

ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	طول محصول
ALP	F: CATGTTTCCTGGGAGATGGTA	۵۸/۴	۱۴۴bp
	R: GTGTTGTACGTCTTGAGAGA	۵۹/۴	
OC	F: AACGGTGGTGCCATAGATGC	۶۰/۵	۲۹۴bp
	R: AGGAGGCTCTCTGCTCAC	۶۲/۵	
ON	F: AAACATGGCAAGGTGTGTGA	۵۶/۴	۳۰۱bp
	R: AGGTGACCAGGACGTTTTTG	۵۸/۴	
RUNX2	F: CCGCACGACAACCGCACCAT	۶۴/۶	۲۸۹ bp
	R: CGCTCCGGCCACAAATCTC	۶۴/۶	
SMAD1	F: CCGCCTGCTTACCTGCCTCCTGAA	۷۰/۴	۲۴۶bp
	R: GAACGCTTCGCCACACGGTTGT	۶۸/۲	
BMP2	F: CGTCAAGCCAAACACAAACAGC	۶۲/۱	۱۰۶ bp
	R: GAGCCACAATCCAGTCATTCCAC	۶۴/۷	
BMP7	F: AAGCCCAGATGGTACGG	۵۴/۸	۱۳۶bp
	R: GCACCTCCAGGGAAAAC	۵۴/۸	
GAPDH	F: TCGTCTCATAGACAAGATGG	۵۶/۴	۱۳۶bp
	R: GTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	۵۹/۴	

۳- آنالیز آماری داده‌ها

با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) و تست Tukey داده‌های به‌دست آمده آنالیز و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۴- نتایج:

توانایی زیستی

جهت بررسی توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تمایز یافته به استئوبلاست از روش MTT استفاده شد. در این مطالعه نتایج تست MTT نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار دی-۲-اتیل هگزیل فتالات بعد از ۲۱ روز باعث کاهش توانایی زیستی سلول‌های تمایز یافته به صورت معنی‌دار ($p < 0.05$) در مقایسه با کنترل شد (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه میانگین توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت طی روند تمایز به استئوبلاست پس از تیمار به مدت ۲۱ روز با

دی-۲-اتیل هگزیل فتالات براساس میزان جذب رنگ بنفش فورمازان

غلظت (μM)	زمان (۲۱ روز)
۰	$0.507^a \pm 0.005$
۱۰۰	$0.335^b \pm 0.01$

مقادیر به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد (one way ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$)

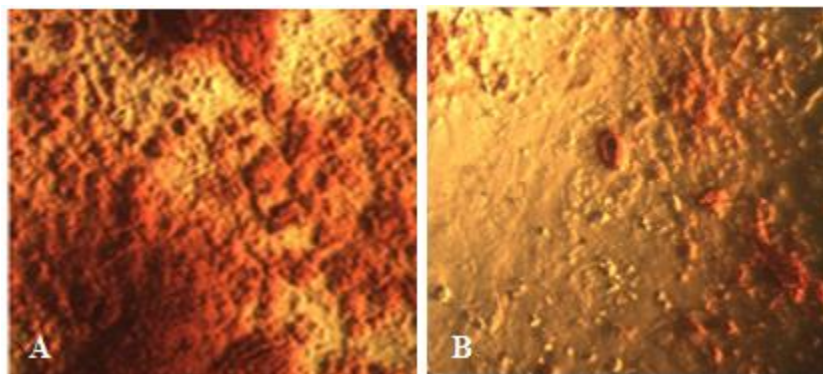
میزان معدنی شدن ماتریکس براساس آزمون آلیزارین رد

آنالیز آماری نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار دی ۲-اتیل هگزیل فتالات بعد از ۲۱ روز باعث کاهش معنی دار ($p < 0.05$) معدنی شدن ماتریکس در مقایسه با کنترل شد (جدول ۳). مشاهدات میکروسکوپی نیز تایید کننده ی نتایج آنالیزهای کمی در رابطه با میزان معدنی شدن ماتریکس سلولها بود (شکل ۱).

جدول ۳: مقایسه ی میانگین میزان رنگ آلیزارین رد (mM) استخراج شده از نمونه های استئوژنیک تیمار شده با دی ۲-اتیل هگزیل فتالات با گروه کنترل در ۲۱ روز.

غلظت (μM)	زمان (۲۱ روز)
۰	۰/۳۶۱a ± ۰/۰۲
۱۰۰	۰/۱۲۶b ± ۰/۰۲

مقادیر به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ می باشد. میانگینها با کد حرفهای متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی دار می باشد (one way ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$).



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپی (بزرگنمایی ۲۰۰X). (A) گروه کنترل (B) گروه تیماری با ۱۰۰ میکرومولار از دی ۲-اتیل هگزیل فتالات

تعیین غلظت فاکتورهای بیوشیمیایی دخیل در تمایز

آنالیز آماری داده ها نشان داد غلظت پروتئین کل استخراج شده از سلولهای بنیادی مزانشیم مغزاستخوان رت تمایز یافته به استئوبلاست بعد از تیمار با غلظت های ۰ و ۱۰۰ میکرومولار از DEHP در مدت ۲۱ با کاهش معنی دار ($p < 0.05$) در گروه تیماری نسبت به کنترل روبرو شده بود (جدول ۴). همچنین آنالیز آماری نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار دی ۲-اتیل هگزیل فتالات در ۲۱ روز در مقایسه با کنترل، باعث کاهش معنی دار ($p < 0.05$) فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز شد (جدول ۴). از طرفی غلظت ۱۰۰ میکرومولار از DEHP باعث کاهش معنی دار ($p < 0.05$) میزان کلسیم در سلولهای مزانشیم مغز استخوان رت تمایز یافته به استئوبلاست نسبت به کنترل بعد از ۲۱ روز شد (جدول ۴).

جدول ۴: مقایسه میانگین میزان پروتئین کل ($\mu\text{g/ml}$)، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (IU/L) و میزان کلسیم استخراج شده از ماتریکس (mg/dl)

داخل سلولی سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت طی روند تمایز به استئوبلاست پس از ۲۱ روز تیمار با DEHP

غلظت (μM)	پروتئین کل	آنزیم آلکالین فسفاتاز	غلظت کلسیم ماتریکس
۰	$157/50^a \pm 16/25$	$294/08^a \pm 36/05$	$25/59^a \pm 1/00$
۱۰۰	$121/25^b \pm 6/61$	$147/61^b \pm 24/03$	$16/36^b \pm 0/64$

مقادیر به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ می باشد. میانگین ها با کد حرف های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی دار می باشد (one way ANOVA, Tukey test, $p < 0/05$).

بررسی میزان بیان ژن های دخیل در تمایز سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت به استئوبلاست به کمک تکنیک RT-PCR:

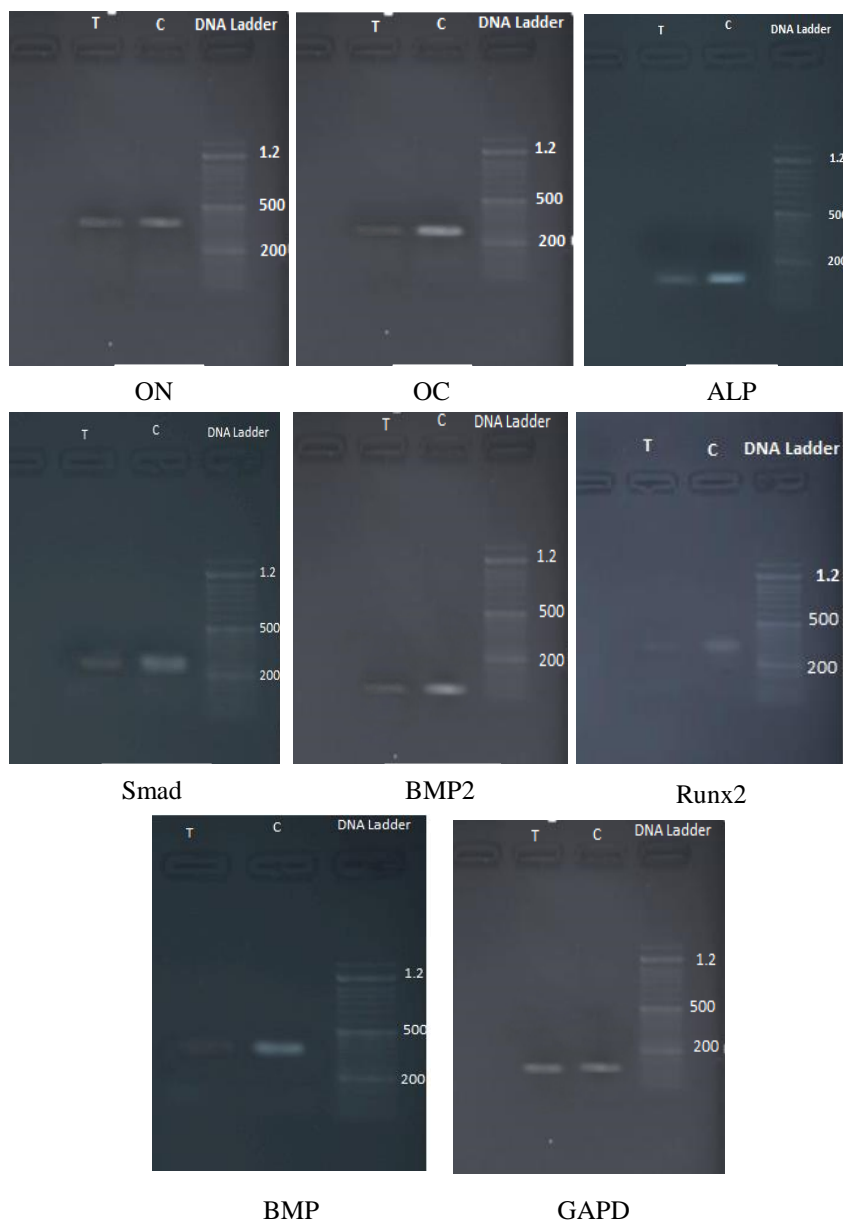
در روند تمایز سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان به استئوبلاست، ژن های مختلفی شامل ژن های ALP، OC، RUNX2، ON، SMAD1، BMP2، BMP7 و GAPD دخیل هستند. تکنیک RT-PCR (شکل ۲) نشان داد که ۲۱ روز تیمار سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در طی روند تمایز با DEHP باعث کاهش بیان این ژن ها شد. ژن GAPDH به عنوان کنترل در این مطالعه استفاده شد و در هیچ یک از گروه ها تغییر معنی دار نشان نداد. در جدول ۵ شدت رنگ حاصل از باندها بر روی ژل آگارز توسط نرم افزار ImageJ اندازه گیری و نشان داده شده است.

جدول ۵: مقایسه میانگین بیان ژن های دخیل در روند تمایز سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت به استئوبلاست پس از ۲۰ روز تیمار با

۱۰۰ میکرومولار دی-۲-اتیل هگزیل فتالات

غلظت (μM)		ژن
۱۰۰	۰	
$0/55^a \pm 0/01$	$0/55^a \pm 0/03$	GAPDH
$0/23^b \pm 0/08$	$0/49^a \pm 0/04$	BMP7
$0/45^b \pm 0/03$	$0/62^a \pm 0/03$	BMP2
$0/41^b \pm 0/06$	$0/61^a \pm 0/08$	SMAD1
$0/43^b \pm 0/02$	$0/59^a \pm 0/07$	ON
$0/46^b \pm 0/05$	$0/60^a \pm 0/05$	RUNX2
$0/40^b \pm 0/04$	$0/61^a \pm 0/01$	OC
$0/36^a \pm 0/04$	$0/51^a \pm 0/07$	ALP

مقادیر به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ می باشد. میانگین ها با کد حرف های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی دار می باشد (one way ANOVA, Tukey test, $p < 0/05$).



شکل ۲: میزان بیان ژن‌های دخیل در تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تیمار شده با DEHP در مدت زمان ۲۱ روز.

۵- بحث

توانایی زیستی سلول‌های تمایز یافته تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌دار داشت. بررسی انجام شده توسط آبنوسی و علیاری (۱۸) نیز نشان داد که DEHP باعث القای استرس اکسیداتیو و اختلال در غشا می‌شود. با توجه به نتایج آزمون MTT، از آن‌جا که استرس اکسیداتیو می‌تواند فعالیت میتوکندری را مختل کند، احتمالاً

دلیل کاهش توانایی زیستی سلول‌ها، اختلال در عملکرد میتوکندری و ساختار غشایی آن بوده است که باعث کاهش میزان تولید کریستال فورمازان شده است.

در مطالعه Bhat و همکاران (۱۹)، غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP در تیمار ۲۴ ساعت باعث کاهش توانایی زیستی سلول‌های استئوبلاست جمجمه موش شد این در حالی‌ست که در تیمار ۴۸ ساعت تاثیر این غلظت از نظر آماری بی معنی گزارش شده است. علاوه بر آن در مطالعات Chiu و همکاران (۲۰) توانایی زیستی سلول‌های استرومال مغز استخوان در حضور غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP بعد از ۷ روز بدون تغییر گزارش شد. این در حالیست که Sabbieti و همکاران (۲۱) نشان دادند بنزیل بوتیل فتالات و دی بوتیل فتالات حتی در غلظت ۱ میکرومولار در طی ۲۴ ساعت توانایی زیستی سلول‌های MC3T3-E1 را به صورت معنی‌دار کاهش می‌دهد. از طرفی مطالعات آبنوسی و علیاری (۱۸) مویید کاهش توانایی زیستی سلول‌های استئوبلاست تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان می‌باشد. عدم تطابق نتایج مطالعات پیشین در خصوص مسمومیت ناشی از DEHP با مطالعه حاضر را نمی‌توان تفسیر کرد و تنها نکته قابل توجه تفاوت در مدت زمان تیمار در این مطالعات می‌باشد. ضمناً با توجه به مسمومیت این آلاینده و تاثیر آن بر سلول‌های دیگر از طرفی و کاهش فعالیت متابولیک و القاء استرس اکسیداتیو از طرفی دیگر نیاز بیشتری به مطالعه تاثیر این ترکیب شیمیایی بر توانایی حیات سلول‌های استئوبلاست ضروری به نظر می‌رسد.

در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و غلظت کلسیم ماتریکس به عنوان دو فاکتور مهم برای بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم به استئوبلاست بررسی شد. در واقع برای حضور یون کلسیم، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ضروری می‌باشد و این آنزیم باعث تجزیه پیروفسفات در سلول و تسهیل ورود یون کلسیم برای تشکیل ماتریکس زمینه ای (هیدروکسی آپاتیت) می‌باشد (۲۲). از طرفی برای این‌که هیدروکسی آپاتیت بتواند تشکیل و رسوب نماید حضور پروتئین کلاژن ضروری است، در این راستا ابتدا سلول استئوبلاست با ترشح پروتئین کلاژن و دیگر پروتئین‌ها امکان تشکیل ماده معدنی ماتریکس و رسوب آن را فراهم می‌کند (۲۳). کاهش میزان پروتئین کل در سلول‌های تمایز یافته تایید بر تاثیر DEHP بر کاهش میزان ماده آلی ماتریکس تولید شده توسط سلول‌های استئوبلاست می‌باشد، زیرا ۹۰ درصد پروتئین‌های ماتریکس را کلاژن ۱ تشکیل می‌دهد (۲۳) که بیشترین نوع پروتئین در ماتریکس است که این خود مویید عدم حضور ماده آلی ماتریکس برای تشکیل رسوب یا نودول کلسیمی است. در مطالعه حاضر فعالیت آلکالین فسفاتاز و غلظت کلسیم در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP بعد از ۲۱ روز نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار نشان داد. همچنین نتایج کمی و کیفی آزمون آلیزارین رد و کاهش بیان پروتئین کلاژن ۱ نیز تایید کننده این نتایج بود. نتایج نشان داد که تشکیل نودول‌های کلسیمی در گروه تیماری نسبت به کنترل کاهش معنی‌دار داشت است.

مطالعات دیگر نیز در راستای نتایج این مطالعه می‌باشد به صورتی که Bhat و همکاران (۱۹) نشان دادند، تیمار سلول‌های استئوبلاست جمجمه موش با غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP در ۲۴ ساعت باعث کاهش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، کاهش میزان کلاژن و کاهش نودول‌های استخوانی شد. علاوه بر آن در مطالعات Chiu و همکاران (۲۰) نشان داده شد که تیمار موش‌های اورکتومی شده با DEHP باعث کاهش میزان پروتئین

استئوکلسین و کلاژن نوع ۱ شده است که این خود نشان دهنده تاثیر منفی این آلاینده بر سلامت بافت استخوان می‌باشد. همچنین آن‌ها نشان دادند که موش‌ها بعد از تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم DEHP به مدت ۸ هفته دستخوش کاهش معنی‌دار تراکم استخوان شدند و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و میزان نودل‌های استخوانی در محیط کشت استئوبلاست استخراج شده نیز کاهش معنی‌دار نشان داده است.

تشکیل ماتریکس خارج سلولی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیم مغزاستخوان در محیط آزمایشگاهی از روز هفتم شروع و تا روز بیستم به بالاترین میزان خود می‌رسد (۲۴). ژن‌های متعددی در فرایند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم مغزاستخوان به استئوبلاست نقش دارند که برخی از این ژن‌ها آغازین (Early Genes) می‌باشند که در مرحله‌ی شروع فرایند استئوژنز بیان و تا انتهای مرحله تمایز نیز بیان آن‌ها ادامه دارد، از این ژن‌ها می‌توان آلکالین فسفاتاز را نام برد (۲۵). از طرفی ژن استئوکلسین به‌عنوان خاتمه (Late Gene) در طی فرایند شروع به بیان شدن کرده و در انتهای فرایند تمایز به بیشترین مقدار خود می‌رسد (۲۶). ضمناً بیان ژن استئونکتین به‌دنبال بیان ژن آلکالین فسفاتاز به‌عنوان ژن میانی (med gene) بعد از بیان کلاژن باعث اتصال آن به این پروتئین شده و نقش مهمی در تشکیل ماتریکس خارج سلولی دارد (۲۷). بیان این ژن‌ها به‌دنبال بیان ژن‌های دیگر از قبیل BMP7، SMAD1 و RUNX2 امکان‌پذیر است. با توجه به اختلال در فرایند استئوژنیک بررسی بیان ژن‌های دخیل در این فرایند نیز مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد بیان ژن‌های BMP7، BMP2، ALP، SMAD1، RUNX2، OC و ON در اثر تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به‌مدت ۲۱ روز کاهش معنی‌دار داشته است.

پروتئین‌های مورفولوژیک استخوان (BMPs) یکی از تنظیم‌کننده‌های تمایز سلول به استئوبلاست و مسئول حفظ هموستاز استخوان‌ها می‌باشد (۲۸)، این پروتئین‌ها از خانواده‌ی بزرگ TGF- β super (TGF- β family) می‌باشند که در تمایز به استئوبلاست نقش حیاتی دارند (۲۹). پروتئین‌های TGF- β مانند BMP2 و BMP7 در بخش سیتوپلاسمی به گیرنده‌های اختصاصی سرین/ترونین کیناز متصل شده و با فسفوریلاسیون BMPRII باعث فسفوریلاسیون BMPRI و در نهایت فسفوریلاسیون SMAD1 می‌شود (۳۰). پروتئین SMAD1 از اصلی‌ترین گیرنده‌ها است که توسط گیرنده‌های TGF- β فعال شده و به‌صورت مستقیم در تنظیم رونویسی (۳۱) فاکتورهای رونویسی RUNX2، Dlx5 و Osterix (Osx) در بیان ماتریکس سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیم در حال تمایز نقش دارد. از طرفی باید متذکر شویم که RUNX2 در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان به پری استئوبلاست‌ها و استئوبلاست‌های نابالغ و Osterix در تبدیل استئوبلاست‌های نابالغ به بالغ و استئوسیت‌ها نقش دارند (۳۲). ژن RUNX2 به‌واسطه کمپلکس SMAD1,5,8,4 در هسته بیان می‌شود و به دنبال بیان RUNX2 سایر مارکرهای استخوانی مانند ALP، coII، ON، OC و OP و سیالوپروتئین استخوان (BSP) نیز که برای تمایز استئوبلاست ضروری هستند به‌صورت متوالی بیان می‌شوند (۳۳). علاوه بر کلاژن نوع ۱، پروتئین استئوکلسین (OC) در تشکیل هسته‌ی کریستال هیدروکسی آپاتیت نقش مهمی را ایفا می‌کند (۲۶).

غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP با اثر بر فنوتیپ معدنی شدن (پروتئین ماتریکس از قبیل کلاژن ۱ و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز) باعث کاهش معنی‌دار تمایز سلول‌ها گردید. این تاثیر به دلیل کاهش بیان ژن‌های دخیل در تمایز سلول‌های BMSCs به استئوبلاست مانند BMP7، BMP2، SMAD1، Runx2، OC، ALP

موجب کاهش رسوب کلسیم در ماتریکس معدنی شده است (۲۲). همچنین علاوه بر کاهش فعالیت آنزیم ALP کاهش بیان ژن‌های Runx2، SMAD1، BMP2، BMP7 بر بیان پروتئین COL-1A1 تاثیر داشته است که این خود باعث کاهش میزان تشکیل نودولهای معدنی ماتریکس شده است.

۶- نتیجه گیری

به‌عنوان نتیجه گیری بررسی حاضر نشان داد که DEHP میتواند با تاثیر بر مسیر BMP/SMAD باعث کاهش بیان ژن‌های دخیل در روند تمایز استئوبلاست شود و در نتیجه با کاهش بیان پروتئین و کاهش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز تمایز BMSCs را به استئوبلاست کاهش دهد. این کاهش می‌تواند در دراز مدت امکان ابتلا به بیماری‌های مربوط به استخوان مانند استئوپوروزیس را در حیوانات افزایش دهد.

۷- تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر در دانشگاه اراک، گروه زیست‌شناسی انجام شد، لذا نویسندگان مقاله لازم می‌دانند از همه دست‌اندرکاران و مسئولین دانشکده و گروه زیست‌شناسی تقدیر و تشکر نمایند.

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ نوع تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: محمد حسین آبنوسی در طرح ایده تحقیقاتی، متدولوژی و تایید نتایج آزمایش و همچنین نگارش مقاله نقش داشته است، جواد سرگلزانی در انجام امور تحقیقاتی و آنالیز داده‌های تحقیق نقش داشته است. زهرا شایگان در انجام کلیه آزمون‌ها و تست‌های انجام شده و آنالیز داده‌ها نقش داشته است.

۸- منابع

1. Martínez-Razo LD, Martínez-Ibarra A, Vázquez-Martínez ER. The impact of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and Mono(2-ethylhexyl) Phthalate in placental development, function, and pathophysiology. *Environment International*. 2021; 146: 106228. DOI: 10.1016/j.envint.2020.106228.
2. Sasakawa S, Mifumi Y. Di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) Content of Blood or Blood Components Stored in Plastic Bags. *Vox Sang*. 1978; 34: 81-86.
3. Green R, Hauser R, Calafat AM, et al. Use of Di(2-ethylhexyl) Phthalate-Containing Medical Products and Urinary Levels of Mono(2-ethylhexyl) Phthalate in Neonatal Intensive Care Unit Infants. *Environ Health Perspect*. 2005; 113(9): 1222-1225.
4. Tickner JA, Schettler T, Guidotti T, McCally M, et al. Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: A critical review. *American journal of industrial medicine*. 2001; 39(1):100-11.
5. Darvishmotevalli M, Bina B, Feizi A, Ebrahimpour K, et al. Monitoring of urinary phthalate metabolites among pregnant women in Isfahan, Iran: the PERSIAN birth cohort. *J Environ Health Sci Eng*. 2019 Dec; 17(2): 969-978.

6. Zolfaghari M, Drogui P, Seyhi B , Brar SK , et al. Occurrence, fate and effects of Di (2-ethylhexyl) phthalate in wastewater treatment plants: A review, *Environmental Pollution* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2014.07.014>.
7. Wang W, WahLeung AO, HangChu L, HungWong M. Phthalates contamination in China: Status, trends and human exposure-with an emphasis on oral intake. *Environmental Pollution*. 2018; 283: 771-782.
8. Hassanzadeh N, Esmaili Sari A, Khodabandeh S, Bahramifar N. The Concentrations of Di (2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) and Di-n-Butyl Phthalate (DnBP) in the Surface Waters of Anzali Wetland in May 2013. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014; 24(117): 204-213 (Text in Persian).
9. Rahimi L, Ghanbarzadeh B, Dehghannya J. Migration of Phthalate Esters from Polyethylene Terephthalate into a Lemon Juice Simulant. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 2016; 12(1): 79- 87 (Text in Persian).
10. Moazzen M, Rastkari N, Alimohammadi M, Shariatifar N, et al. Assessment of Phthalate Esters in A Variety of Carbonated Beverages Bottled in PET. *Journal of Environmental Health Engineering*. 2014; 2(1): 7-18. (Text in Persian).
11. Chang YJ, Lin KL, Chang YZ. Determination of Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human hair using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2013; 420: 155–159.
12. Sumner, R.N., Tomlinson, M., Craigon, J. England GCW., et al. Independent and combined effects of diethylhexyl phthalate and polychlorinated biphenyl 153 on sperm quality in the human and dog. *Science Report* 2019; 9: 3409. DOI: 10.1038/s41598-019-39913-9.
13. Martinez-Arguelles DB, Culty M, Zirkin BR, Papadopoulos V. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate decreases mineralocorticoid receptor expression in the adult testis. *Endocrinology*. 2009;150(12):5575–5585.
134. Liu H, Han W, Zhu S, Li Z, et al. Effect of DEHP and DnOP on mitochondrial damage and related pathways of Nrf2 and SIRT1/PGC-1 α in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2021; 158: 112696. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112696.
15. Toğel F, Westenfelder C. Adult Bone Marrow–Derived Stem Cells for Organ Regeneration and Repair. *Developmental Dynamics*. 2007; 236: 3321–3331.
16. 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.
17. Abnsi MH, Sargolzaei 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 G1 stage. 2023; in press.
18. 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. <https://doi.org/10.32598/ijmtfm.v10i2.26673>.
19. Bhat FA, Ramajayam G, Parameswari S, Vignesh R, et al. Di 2-ethyl hexyl phthalate affects differentiation and matrix mineralization of rat calvarial osteoblasts–in vitro. *Toxicology in Vitro*. 2013;27(1):250-56.
20. Chiu CY, Sun SC, Chiang CK, Wang CC, et al. Plasticizer di (Di-2-ethylhexyl) phthalate interferes with osteoblastogenesis and adipogenesis in a mouse model. *Journal of Orthopaedic Research*. 2018;36(4):1124-34.
21. Sabbieti M, Agas D, Santoni G, Materazzi S, et al. Involvement of p53 in phthalate effects on mouse and rat osteoblasts. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;107(2):316-27.
22. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current opinion in Orthopaedics*. 2007;18(5):444-8.
23. Sroga GE, Vashishth D. Effects of Bone Matrix Proteins on Fracture and Fragility in Osteoporosis. *Curr Osteoporosis Rep*. 2012; 10(2): 141–150.

24. Glueck M, Gardner O, Czekanska E, Alini M, et al. Induction of osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells by crosstalk with osteoblasts. *BioResearch open access*. 2015;4(1):121-30.
25. Choi M-H, Noh W-C, Park J-W, Lee J-M, et al. Gene expression pattern during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. *Journal of periodontal & implant science*. 2011;41(4):167-75.
26. Sila-Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, Kitaguchi H, et al. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. *Kobe J Med Sci*. 2007;53(1-2):25-35.
27. Zhu YS, Gu Y, Jiang C, Chen L. Osteonectin regulates the extracellular matrix mineralization of osteoblasts through P38 signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*. 2020;235(3):2220-31.
28. Reddi AH, Reddi A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2009;5(20):341-2.
29. Bruderer M, Richards R, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater*. 2014;28(28):269-86.
30. Wu C-J, Lu H-K. Smad signal pathway in BMP-2-induced osteogenesis a mini review. *J Dent Sci*. 2008;3(1):13-21.
31. Qi H, Aguiar DJ, Williams SM, La Pean A, et al. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(6):3305-10.
32. Sinha KM, Zhou X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(5):975-84.
33. Schindeler A, Little DG. Ras-MAPK signaling in osteogenic differentiation: Friend or foe? *Journal of Bone and Mineral Research*. 2006;21(9):1331-38.