



## Curcumin partially prevented oxidative stress induced by DEHP in bone marrow mesenchymal stem cells through activation of Nrf2/NFkB pathway

Abnosi MH<sup>a\*</sup>, Lak M<sup>b</sup>

<sup>a</sup>PhD, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

<sup>b</sup>M.Sc, Department of Biology, 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 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.

<https://10.61186/JCT.15.4.281>

### KEYWORDS

bone marrow mesenchymal stem cells, Di-2-ethylhexyl phthalate, curcumin, oxidative stress, catalase, superoxide dismutase

### ABSTRACT

**Aim:** Turmeric contains a high amount of curcumin (Cur), which exhibits strong antioxidant activity. Cur binds to antioxidant response elements for gene, thus suppressing reactive oxygen species (ROS). Reactive oxygen species are short-lived, highly electrophilic molecules. When intracellular antioxidants are reduced or ROS accumulate excessively, it brings about the imbalance in the redox state which leading to oxidative stress. DEHP consists of a pair of eight-carbon esters linked to a benzenedicarboxylic acid ring with chemical formula of C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>. DEHP is used as a plasticizer in many polyvinyl chloride products, especially in medical devices such as intravenous bags and tubing, umbilical artery catheters, blood bags, infusion tubing, enteral nutrition feeding bags, nasogastric tubes and dialysis bags. Due to non-covalent binding to the plastic products, DEHP leaches into biological fluids during medical treatment causing contamination. There is ample evidence that DEHP induces oxidative stress and causes apoptosis in cells. Therefore, the study aimed to investigate the effects of Cur on DEHP-induced oxidative stress in bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), as DEHP has been found to induce oxidative stress in BMSCs.

**Materialand Methods:** Rat BMSCs was extracted and after the 3rd passage, their cell viability and proliferation were examined in the presence of various concentrations (0.05,0.1, 0.25, 1, 2.5 and 5 μM) of Cur for a period of 4 days. Subsequently, a concentration of 0.1 μM Cur was chosen for further assessment of viability and proliferation abilities (measured by population doubling number (PDN)), total protein, malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (TAC), catalase and superoxide dismutase (SOD) activity as well as the expression of NFkB and Nrf2 both individually and in conjunction with 100 or 500 μM of DEHP (chosen based on previous study) for

\* Corresponding author. Tel.:08632627234, Fax: 0834173406

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

DOI: : <https://10.61186/JCT.15.4.281>

Received: 15 Sep. 2024; Received in revised form: 19 Dec. 2024; Accepted: 21 Dec. 2024

Original Article

© Author



durations of 4 and 8 days. The data underwent statistical analysis with  $P < .05$  considered as the minimum level of significance.

**Results:** Concentrations of 0.05, 0.1, and 0.25  $\mu\text{M}$  of Cur were found to have no effect on the viability ( $P < 0.05$ ) of the BMSCs but significantly increased proliferation ability ( $P < 0.0001$ ). Conversely, concentrations of 1, 2.5, and 5  $\mu\text{M}$  of Cur significantly reduced viability ( $P < 0.0001$ ). The concentration of 0.1  $\mu\text{M}$  was chosen for further analysis based on viability tests and PDN analysis. This selected concentration notably increased BMSCs proliferation after 4 days, while higher concentrations (1, 2.5, and 5  $\mu\text{M}$ ) reduced both viability and proliferation. Furthermore, this concentration counteracted the effects of DEHP at both day 4 and day 8 by reducing MDA levels and increasing TAC levels as well as catalase and SOD activity - particularly at day 8 compared to the DEHP-treated groups. Additionally, Cur was found to reduce NF $\kappa$ B expression while increasing Nrf2 expression in BMSCs.

**Conclusion:** Curcumin mitigated oxidative stress induced by DEHP through the Nrf/NF $\kappa$ B pathway. Moreover, it enhanced the cell viability and proliferation capacity of BMSCs in the presence of DEHP. Therefore, patients undergoing hemodialysis and blood transfusion, who may be exposed to DEHP from medical devices like tubes and other plastic products, should consider consuming turmeric to counteract the oxidative impact of this chemical.



## کورکومین با فعال سازی مسیر Nrf2/NFkB به صورت محدود باعث مهار استرس اکسیداتیو القا شده توسط دی-۲-اتیل هگزیل فتالات در سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان شد

محمد حسین آبنوسی\*<sup>۱</sup>، محجوبه لک<sup>۲</sup>

\*<sup>۱</sup> استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

<sup>۲</sup> کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p><b>هدف:</b> زردچوبه حاوی مقدار زیادی کوکومین (Cur) است که اثر آنتی اکسیدانتی قوی دارد. از دی-۲-اتیل هگزیل فتالات (DEHP) در محصولات پلی ونیل کلرید (PVC) استفاده می شود که امکان رها شدن و ورود آن به مایعات زیستی در طی درمان های پزشکی وجود دارد. DEHP باعث القای استرس اکسیداتیو در سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان (BMSCs) می شود، لذا هدف این مطالعه بررسی اثر Cur بر استرس اکسیداتیو ناشی از DEHP در BMSCs می باشد. <b>مواد و روش ها:</b> درصد زنده مانی BMSCs بعد از پاساژ سوم در حضور غلظت های ۰/۰۵ تا ۵ میکرومولار Cur برای مدت ۴ روز بررسی شد. سپس از غلظت ۰/۱ میکرومولار Cur برای بررسی در صد زنده مانی و تکثیری سلول ها، غلظت مالون دی آلدئید (MDA)، ظرفیت تام آنتی اکسیدانت (TAC)، فعالیت آنزیم های کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و همچنین بیان ژن های Nrf2 و NFkB به صورت مجزا و در حضور غلظت های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرو مولار DEHP در مدت ۴ و ۸ روز استفاده شد. <b>نتایج:</b> غلظت منتخب Cur در مدت ۴ روز باعث افزایش توانایی تکثیر سلول ها شد. این غلظت توانست در مدت ۴ و ۸ روز اثر سمی DEHP را مرتفع ساخته و همچنین باعث کاهش غلظت MDA و افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز و SOD، به خصوص در ۸ روز شود. با توجه به افزایش TAC، این ترکیب گیاهی توانست بیان NFkB را کاهش و بیان Nrf2 را افزایش دهد. <b>نتیجه گیری:</b> Cur از طریق مسیر Nrf/NFkB اثر اکسیداتیو القا شده توسط DEHP را کاهش داد. لذا برای کم کردن اثر DEHP در بیماران، می توان از زردچوبه استفاده نمود.</p>	<p>سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان، دی-۲-اتیل هگزیل فتالات، کورکومین، استرس اکسیداتیو، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۵ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۱</p>

### ۱- مقدمه

از نرم کننده های صنعتی در تهیه محصولات پلاستیکی تولید شده از پلی ونیل کلراید (PVC) استفاده میشود، در صورت عدم استفاده از این نرم کننده ها، محصولات تهیه شده از PVC بسیار شکننده شده و فرم پذیری لازم را ندارند (۱). فتالات ها به عنوان یک خانواده بزرگ از نرم کننده ها عموماً در محصولات پلاستیکی استفاده میشوند که از میان این

خانواده دی-۲-اتیل هگزیل فتالات (DEHP) پرمصرف ترین نرم کننده در تهیه محصولات تولید شده از PVC میباشد (۲). با توجه به این که این نرم کننده با PVC پیوند شیمیائی محکمی برقرار نمیکند (۳)، در اثر تغییر دما، یا در تماس با مایعات از پلاستیک جدا شده و وارد محیط زیست میشود. انسان از طریق هوا، آب آشامیدنی و غذا در تماس با این آلاینده زیست محیطی می باشد (۴) و البته باید خاطر نشان شد که در صنعت پزشکی، با توجه به استفاده گسترده از محصولات PVC آلودگی بیماران با این آلاینده اجتناب ناپذیر است. از DEHP برای تولید سرنگهای تزریقی، کیسه های خون، لوله های تزریقی خون و غیره استفاده میشود (۵)، که این محصولات در تماس با مایعات این آلاینده زیست محیطی را آزاد نموده و باعث ورود آن به جریان خون محیطی شده که در نتیجه بافتهای دیگر مانند مغز استخوان آلوده میشوند. در سال ۱۹۶۷ با توجه به ارائه گزارش در خصوص آزاد شدن DEHP از PVC، برای اولین بار مشخص شد که میزان ۵۰ تا ۷۰ میلی گرم در لیتر از این آلاینده زیست محیطی در محصولات خونی موجود در کیسه های حاوی خون وجود دارد (۶). از آن زمان تا کنون تولید و مصرف DEHP به میزان قابل توجه ادامه دارد و در وسایل و تجهیزات پزشکی نیز قابل مشاهده است (۷). در تحقیق انجام شده توسط آبنوسی و علیاری (۸) سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت (BMSCs) با غلظتهای ۰/۵ تا ۲۵۰۰ میکرومولار DEHP در مدت زمان ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. در این پژوهش مشخص گردید که غلظت ۱۰۰ میکرومولار هیچ تغییر معنی داری در در صد زنده مانی این سلولها ایجاد نمی کند ولی از غلظت ۵۰۰ میکرومولار در صد زنده مانی این سلولها کاهش معنی داری را نشان داد. البته با افزایش زمان تیمار به مدت ۴ تا ۷ روز مشخص شد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار نه تنها توانائی زیستی بلکه توانائی تکثیری این سلولها بر اساس آزمون دو برابرشدگی جمعیت و توانائی تشکیل کلونی را دچار کاهش معنی دار نموده است. در مطالعه دیگری، آبنوسی و همکاران (۹) نشان دادند که DEHP باعث القاء مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوزیس) وابسته به کاسپاز و توقف چرخه سلولی در فاز G1 میشود. علاوه بر این تحقیقات آزمایشگاهی نشان داده است که این آلاینده زیست محیطی باعث کاهش توانائی تمایز سلولهای BMSCs به استئوبلاست از طریق اختلال در مسیر BMP/RUNX2 میشود (۱۰ و ۱۱).

سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان به عنوان پشتوانه سلولی برای تولید استئوبلاستها یا سلولهای تولید کننده ماتریکس استخوان عمل کرده (۱۲) و اختلال در عملکرد این سلولهای باعث بروز مشکلات پاتولوژیک مانند استئوپنی و استئوپورزیس در بافت استخوان میشود (۱۳). سلامت بافت استخوان در گرو عملکرد دو نوع سلول به نامهای استئوکلاست و استئوبلاست میباشد (۱۴)، این دو سلول در جهت مخالف یکدیگر به ترتیب باعث باز جذب استخوان و آزاد سازی کلسیم از طرفی و بارگذاری ماتریکس تولید شده و تقویت استحکام این بافت از طرف دیگر میشوند. لذا در صورتی که میزان بارگذاری و تولید ماتریکس توسط استئوبلاستها دچار اختلال شود به دلیل کاهش تولید ماتریکس، تراکم استخوان کاهش یافته و احتمال شکستگی و عوارض ناشی از استئوپورزیس اجتناب ناپذیر خواهد بود.

DEHP باعث القاء استرس اکسیداتیو شده (۸ و ۱۰ و ۱۵ و ۱۶) و با تاثیر بر پروتئینها، اسیدهای نوکلئیک و چربیهای غشائی باعث بروز مرگ سلولی میشود. لذا مقابله با رادیکال آزاد می تواند اثر این آلاینده زیست محیطی را کاهش دهد. در سلولها، سیستمهای آنتی اکسیدانت شامل آنزیمها (کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پروکسیداز) و ملکولهای آنتی اکسیدانت (گلوکاتایون، ویتامین C، ویتامین E) مسئول خنثی سازی رادیکالهای آزاد هستند (۱۷). از آنجا که توانائی سیستم آنتی اکسیدانی سلول محدود به میزان تولید رادیکال آزاد است، لذا در صورتی که تعادل بین این سیستم و رادیکالها با افزایش میزان تولید رادیکال آزاد بهم بخورد امکان مقابله با رادیکالها برای سلول وجود نخواهد داشت و

اکسیداسیون ملکولها و ترکیبات عالی در سلول منجر به بروز اختلال سلولی خواهد شد. برای جلوگیری از بروز استرس اکسیداتیو در سلولها از آنتی اکسیدانت‌های طبیعی تولید شده توسط گیاهان استفاده میشود، این ترکیبات راه خود را در محصولات متعددی آرایشی و بهداشتی، درمانی و حتی مواد غذایی باز کرده اند (۱۸) و به وفور مورد استفاده قرار میگیرند. زردچوبه یکی از ادویه جات پر مصرف در تهیه غذاها میباشد که به صورت گسترده توسط بسیاری از مردم مورد استفاده قرار میگیرد. این ادویه در ایران به صورت معمول در همه غذاها استفاده شده و مورد علاقه اکثر افراد ساکن در این کشور است. کورکومین (**Cur**) یکی از ترکیبات موجود در زردچوبه میباشد (۱۹) و از آنجا که یک پلی فنل گیاهی است دارای خاصیت آنتی اکسیدانتی نیز میباشد. مطالعات متعددی (۲۰ و ۲۱) و از جمله مطالعه متا آنالیز (۲۲) نشان داده است که **Cur** از توان آنتی اکسیدانتی بالائی برخوردار است و میتواند باعث افزایش توان آنتی اکسیدانتی کل **TAC** ( ) سلول شود .

با توجه به این که **DEHP** به صورت روز افزون در لوازم پزشکی درمانی مورد استفاده قرار میگیرد، لذا سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان از طریق خون محیطی در معرض این آلاینده زیست محیطی قرار میگیرند. از آنجا که **Cur** در زردچوبه به آسانی در اختیار عموم جامعه قرار دارد، هدف از مطالعه حاضر بررسی توان آنتی اکسیدانتی **Cur** در مقابله با **DEHP** در حضور سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت میباشد. این مطالعه به بررسی اثر این آنتی اکسیدانت بر در صد زنده مانی، مرفولوژی و مقابله با القاء استرس اکسیداتیو و بیان ژنهای دخیل در آن می پردازد.

## ۲- مواد و روشها

**استخراج سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت:** 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. پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک و اخذ کد اخلاق (IR.ARAKMU.REC.1401.078) و رعایت اصول اخلاقی، موشهای صحرایی نژاد ویستار به کمک دی اتیلن اتر بی هوش و استخوانهای ران و ساق پای آنها جدا و پس از جدا کردن بافتهای پیوندی، استخوانها در محیط کشت کامل شامل محیط **DMEM** ( Dulbecco's Modified Eagle Medium) حاوی ۱۵ **FBS** (Fetal Bovine Serum) و پنسیلین-استرپتومایسین (**PEN-STRP-100X**) قرار داده و به زیر هود لامینار منتقل شد. سپس دو سر استخوان با قیچی استریل قطع و مغز استخوان با تزریق محیط کشت به داخل استخوان (عمل فلاشینگ) خارج و در لوله فالكون 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 ۳ میلی لیتر محیط تازه معلق و به فلاسک کشت **T25** انتقال و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سطح اشباع ۵ درصد دی اکسید کربن نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی خارج و سلولها با بافر فسفات نمکی (**PBS**) شستشو و مجدداً محیط کشت کامل به فلاسک **T25** اضافه 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 مجدداً در یک فلاسک **T25** دیگر کشت داده شد. عمل کشت مجدداً سه بار تکرار و خلوص سلولها با استفاده از روش فلوسایتومتری بررسی و برای آنالیزهای بعدی استفاده شد.

**بررسی درصد زنده مانی و تکثیری سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان:** سلولهای پاساژ سوم با تعداد ۳۰۰۰۰ سلول در پلیت ۱۲ خانه کشت و پس از آن که به تراکم ۷۰ درصد رسیدند با غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار **DEHP**.

انتخاب شده بر اساس مطالعه آبتوسی و علیاری (۸) و غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۵ میکرومولار Cur برای مدت چهار روز تیمار شدند. سپس محیط کشت هر چاهک تخلیه و پس از شستشو با PBS، سلول‌ها توسط تریپسین-EDTA از کف فلاسک کنده شد. برای بررسی درصد زنده مانی، پس از تهیه سوسپانسیون سلولی ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون با ۵۰ میکرولیتر از محلول تریپان بلو (۰/۴ درصد) مخلوط و بعد از دو دقیقه توسط لام نئوبار شمارش سلولی انجام و درصد زنده مانی سلول‌ها گزارش شد.

برای بررسی توان تکثیر سلول‌ها از فرمول  $PDN = (\log N/N_0 \times 3.32)$  استفاده شد، در این فرمول PDN (دوبرابر شدگی جمعیت) با استفاده از تعداد سلول‌های اولیه کشت داده شده (N0) و تعداد سلول‌های برداشت شده بعد از زمان مشخص (N) محاسبه شد. با توجه به نتایج درصد زنده مانی و توان تکثیر از آنجا که غلظت ۰/۱ میکرومولار Cur بیشترین تاثیر در سلامت سلول‌ها را داشت برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شد.

**استخراج محتوی سلولی:** بعد از ۴ و ۸ روز تیمار، سلول‌ها توسط محلول تریپسین-EDTA از کف ظرف کنده و توسط بافر فسفات سالین (pH 7.2) شستشو شدند. سپس غشای سلولی با استفاده از روش انجماد و ذوب تخریب و به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ و محلول روئی برای آنالیز پروتئین جدا شد. غلظت پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش لوری ارزیابی و با استفاده از آلبومین سرم گاوی نمودار استاندارد رسم و غلظت نمونه‌ها توسط فرمول خطی  $Y = 0.0056X + 0.0382$  با  $R^2 = 0.9854$  محاسبه شد. در فرمول، Y معرف میزان جذب در ۶۶۰ نانومتر و X معرف غلظت پروتئین (میکروگرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد و در آنالیزهای بعدی نمونه‌ها بر اساس میزان پروتئین ثابت اندازه گیری شد.

**سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT):** برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم CAT مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات پتاسیم ۲۵ میلی مولار (pH 7) و ۳۰۰ میکرولیتر  $H_2O_2$  مخلوط کرده و در طول موج ۲۴۰ nm سرعت حذف  $2O_2H$  به مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد (لازم بذکر است که قبلا میزان جذب  $H_2O_2$  در بافر فسفات در ۰/۴ تنظیم شد که نقطه شروع برای اندازه‌گیری سرعت واکنش بود). میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی  $39/4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}$  براساس سرعت مصرف پراکسید هیدروژن در دقیقه بر میزان میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

**سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD):** اندازه‌گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز براساس اثر بازدارندگی آنزیم با احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم است. مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه سلولی و ۱ میلی لیتر از محلول واکنش حاوی نیتروبلوتترازولیوم (۶/۱ میلی‌گرم)، ریبوفلاوین (۷/۹ میلی‌گرم) و متیونین (۱/۹ میلی‌گرم) در حجم نهائی ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم، در لوله‌های آزمایش ریخته شد. از محلول فاقد عصاره به‌عنوان کنترل و شاهد استفاده و لوله‌های آزمایش حاوی نمونه کنترل و نمونه‌های تیماری را به مدت ۱۰ دقیقه در روشنایی (نور مصنوعی در یک اتاقک) و نمونه بلانک در شرایط کاملا تاریکی قرار داده شد. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر از محلول بلانک که فاقد رنگ بود استفاده و سپس در طول موج ۵۶۰ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل T۸۰+ ساخت شرکت PG instrument کشور انگلستان) جذب نمونه خوانده شد و در صد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برای هر نمونه محاسبه شد. میزان فعالیت آنزیم برحسب یک واحد در دقیقه به‌ازای میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

**تعیین میزان پراکسید/اسیون لیپید:** برای سنجش مالون دی آلدئید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون، یک میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد به ۱۰۰ میکرولیتر نمونه اضافه شد. مخلوط به‌دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شد و بلافاصله لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در

یخ خرد شده قرار گرفت و سپس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. غلظت کمپلکس تیوباربتولیک اسید-مالون دی آلدئید با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل T۸۰+ ساخت شرکت PG instrument کشور انگلستان) در طول موج ۵۲۳nm خوانده شد. چون در طول موج ۵۲۳nm بعضی از ترکیبات به عنوان ترکیبات مزاحم جذب دارند پس جذب محلول را در طول موج ۶۰۰ nm نیز خوانده و از جذب خوانده شده در طول موج ۵۲۳ nm کم شد. غلظت کمپلکس تیوباربتولیک اسید-مالون دی آلدئید تشکیل شده با استفاده از ضریب خاموشی  $\epsilon = \text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1} \times 155$  و فرمول  $A = \epsilon bc$  (A: جذب خوانده شده،  $\epsilon$ : ضریب خاموشی، b: عرض کووت (۱ سانتی متر)، c: غلظت کمپلکس مالون دی آلدئید) محاسبه و بر حسب میکرومول گزارش شد.

**اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانت تام (روش FRAP):** برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانتی کل، به هر لوله حاوی ۱۵۰ میکرولیتر نمونه، ۱۷۰۰ میکرولیتر محلول FRAP (بافر سدیم استات ۳۰۰ میلی مولار pH ۶/۳، محلول ۱۰ میلی مولار TPTZ و محلول ۲۰ میلی مولار کلرید آهن با حجم‌های مساوی) و ۸۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل T۸۰+ ساخت شرکت PG instrument کشور انگلستان) در طول موج ۵۹۳nm خوانده شد. برای تهیه منحنی استاندارد از محلول سولفات آهن (FeSo<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (شرکت Merk آلمان) استفاده شد. کلیه مراحل تهیه نمونه‌های استاندارد مانند مراحل فوق‌الذکر انجام شد و به جای نمونه‌های تیمار شده از غلظت‌های مختلف سولفات آهن استفاده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانتی نمونه‌های تیمار شده پس از رسم منحنی استاندارد با استفاده از فرمول خطی  $Y = 0.0072X + 0.0277$  با  $R^2 = 0.997$  محاسبه و غلظت آنتی‌اکسیدانت تام بر حسب میکرومول آهن در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد. در فرمول فوق‌الذکر Y میزان جذب (nm) و X میزان آنتی‌اکسیدانت کل می‌باشد.

**بررسی بیان ژن‌های دخیل در استرس اکسیداتیو:** به منظور انجام PCR-معکوس (RT-PCR)، RNA کل از سلول‌ها بعد از ۴ و ۸ 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 شد. واکنش PCR به منظور بررسی بیان ژن‌های Nrf2، NFkB و GAPDH با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) انجام شد. بدین منظور از دستگاه ترموسایکلر مدل (Eppendorf master cycler gradient, Eppendorf Co. Hamburg, Germany) و برنامه‌های دمایی: ۱- ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای فعال‌سازی آنزیم پلیمراز، ۲- ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای واسرشتگی DNA دو رشته، ۳- ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای اتصال پرایمر اختصاصی متناسب با نوع پرایمرها به مدت ۱ دقیقه، ۴- ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای انجام پلیمریزاسیون و ۵- ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه برای یکسان‌سازی طول رشته‌های تولید شده با تعداد ۳۵ سیکل تکرار (مرحله ۲ تا ۳) استفاده شد. نمونه‌ها پس از انجام PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و پس از عکس برداری توسط (Gel flash, Syngene bio imaging, England) با استفاده از نرم افزار (Gel Quant: 1.8.2) آنالیز شدند.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای اختصاصی

طول محصول	دمای اتصالی (°C)	توالی پرایمر (bp)	ژن
۱۳۶bp	۵۶/۴ ۵۹/۴	F: TCGTCTCATAGACAAGATGG R: GTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	<i>GAPDH</i>
۱۷۷bp	۵۸/۱ ۵۷/۷	F:GGACCTAAAGCACAGCCAACACAT R:TCGGCTTGAATGTTTGTCTTTTGTG	<i>Nrf2</i>
۲۰۱bp	۶۱/۸ ۶۰/۵	F: ACCTTTGCTGGAAACACACC R: ATGGCCTCGGAAGTTTCTTT	<i>NF-κβ</i>

### ۳- آنالیز آماری

آنالیز آماری داده ها با کمک نرم افزار SPSS (ساخت شرکت میکروسیستم آمریکا مدل ۱۶) توسط روش آنالیز واریانس یک طرفه، تست Tukey انجام و سطح معنی داری معادل  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد. نمودارها توسط نرم افزار Graph Pad Prism رسم شد.

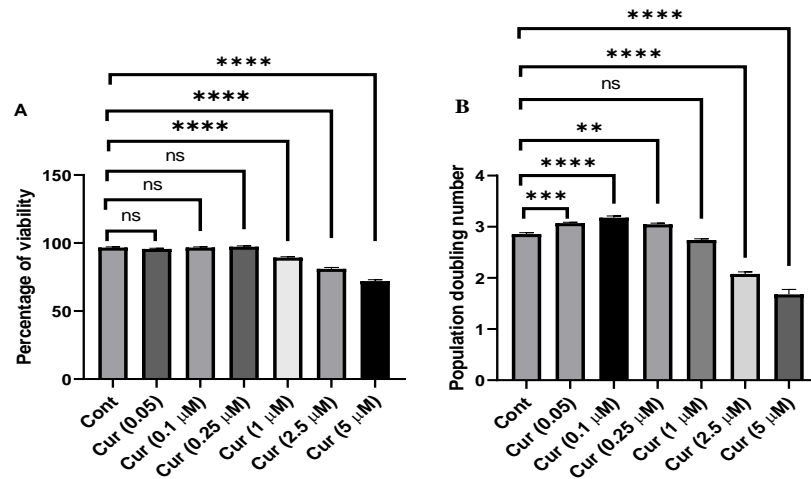
### ۴- نتایج

#### اثر DEHP و کوکومین بر درصد زنده مانی BMSCs

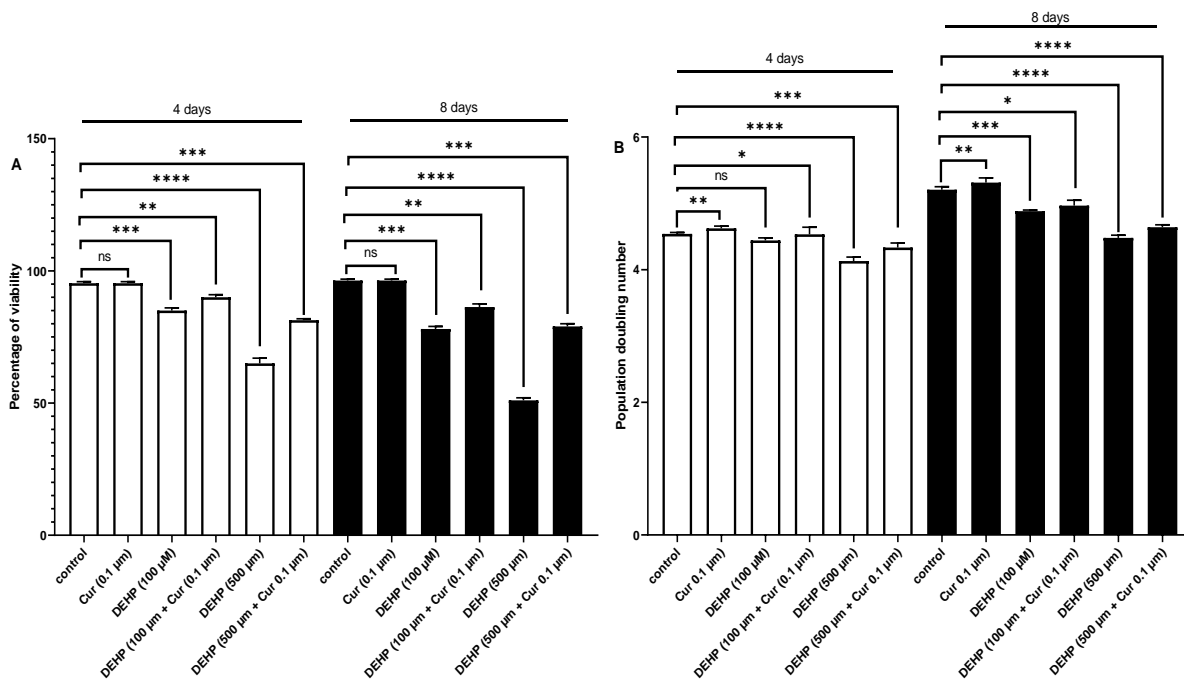
برای ارزیابی درصد زنده مانی سلول ها، سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با غلظت های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۱، ۲/۵ و ۵ میکرومولار کوکومین تیمار شدند. درصد زنده مانی گروه های تیماری در ابتدا به مدت ۴ روز توسط رنگ آمیزی تریپان بلو محاسبه شد. همان گونه که در نمودار A-۱ ملاحظه مینمایید، تیمار سلول ها با غلظت های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲۵ میکرومولار کوکومین اثری بر درصد زنده مانی سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان نداشتند، ولی غلظت های ۱، ۲/۵ و ۵ میکرومولار به ترتیب باعث کاهش بسیار معنی دار ( $p < 0.0001$ ) درصد زنده مانی این سلول ها شد. در نمودار B-۱ دیده می شود که PDN سلول های تیمار شده با غلظت ۰/۱ میکرومولار کوکومین بیشترین افزایش ( $p < 0.001$ ) را در مقایسه با غلظت ۰/۰۵ ( $p < 0.01$ ) و غلظت ۰/۲۵ ( $p < 0.01$ ) میکرومولار نشان داد. با توجه به داده های موجود در تست چهار روزه، غلظت ۰/۱ میکرومولار کوکومین برای مقابله با اثر سمیت DEHP برای آنالیز بیشتر در ۴ و ۸ روز انتخاب و از این غلظت کوکومین در کلیه آزمون ها استفاده شد.

از طرفی در نمودار A-۲ دیده می شود، درصد زنده مانی سلول ها در گروه تیمار شده با ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP (انتخاب این غلظت ها بر اساس مطالعه آنوسی و علیاری (۸) انجام شده است) طی ۴ روز به ترتیب حدوداً ۸۵ درصد و ۶۵ درصد و در ۸ روز به ترتیب ۷۸ درصد و ۵۰ درصد محاسبه شدند. این نتایج نشان داد درصد زنده مانی سلول ها در گروه تیمار شده با DEHP به صورت وابسته به غلظت و زمان کاهش یافته است. از طرفی توانایی زیستی سلول ها در تیمار با غلظت ۰/۱

میکرومولار کورکومین برای ۴ روز ۹۷ درصد و ۸ روز ۹۸/۵ درصد محاسبه شد که این مقادیر در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود ( $p>0.05$ ). در گروه‌های تیمار شده با کورکومین و DEHP، اگرچه اثر سمی غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP توسط این آنتی‌اکسیدانت در ۴ و ۸ روز در مقایسه با گروه‌های تیماری با DEHP کاهش معنی‌دار داشته است، ولی در مقایسه با گروه کنترل نتوانست تاثیر این آلاینده زیست محیطی را به‌طور کامل از بین ببرد. نتایج حاصل از آزمون PDN در ۴ و ۸ روز نیز موید نتایج آزمون درصد زنده‌مانی می‌باشد (نمودار ۲-B).



نمودار ۱: مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی (A) و دو برابر شدگی جمعیت (B) سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تیمار شده با غلظت‌های مختلف Cur به مدت ۴ روز. مقادیر میانگین درصد زنده‌مانی هر گروه با کنترل مقایسه شده است. داده‌ها به صورت  $\text{mean} \pm \text{sd}$  و سطح معنی‌دار سطح معنی‌دار ns غیر معنی‌دار ( $p>0.05$ ), \*  $p<0.01$ , \*\*  $p<0.001$ , \*\*\*  $p<0.0001$  در نظر گرفته شده است.

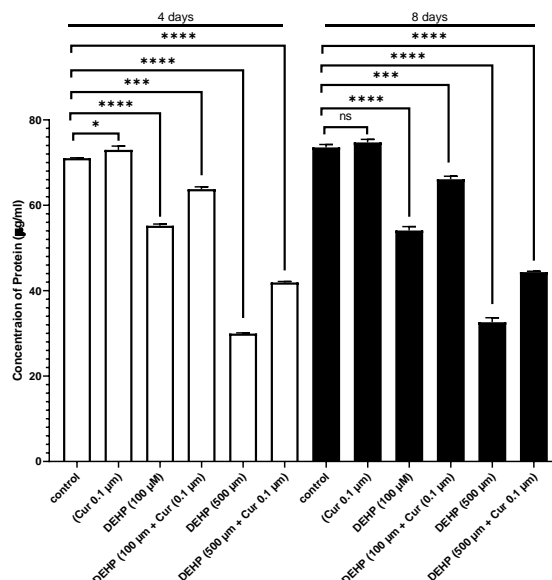


نمودار ۲: مقایسه میانگین در صد زنده‌مانی سلول‌ها (A) و دو برابر شدگی جمعیت (B) سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تیمار شده با کوکومین (Cur) و غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP به صورت مستقل و هم‌زمان به مدت ۴ و ۸ روز. مقادیر میانگین‌ها در هر گروه با کنترل همان گروه مقایسه شده است. داده‌ها به صورت  $\text{mean} \pm \text{sd}$  و سطح معنی‌دار سطح معنی‌دار ns غیر معنی‌دار ( $p > 0.05$ ), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  و \*\*\*\*  $p < 0.0001$  در نظر گرفته شده است.

## بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی

### غلظت پروتئین کل

در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومول DEHP، کاهش بسیار معنی‌دار ( $p < 0.0001$ ) میزان پروتئین کل سلول‌ها به صورت وابسته به دوز در ۴ و ۸ روز در مقایسه با کنترل مشاهده شد. از طرفی تیمار سلول‌ها با کوکومین باعث افزایش میزان پروتئین کل سلول‌ها شد، البته لازم به ذکر است افزایش میزان پروتئین کل سلول‌ها در ۴ روز نسبت به کنترل معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) بوده است. در تیمار هم‌زمان، در ۴ و ۸ روز کوکومین اثر سمی غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP را نسبت به گروه‌های تیماری با این غلظت‌ها از DEHP را بهبود بخشید ولی نسبت به کنترل نتوانست اثر این آلاینده را مرتفع سازد (نمودار ۳).

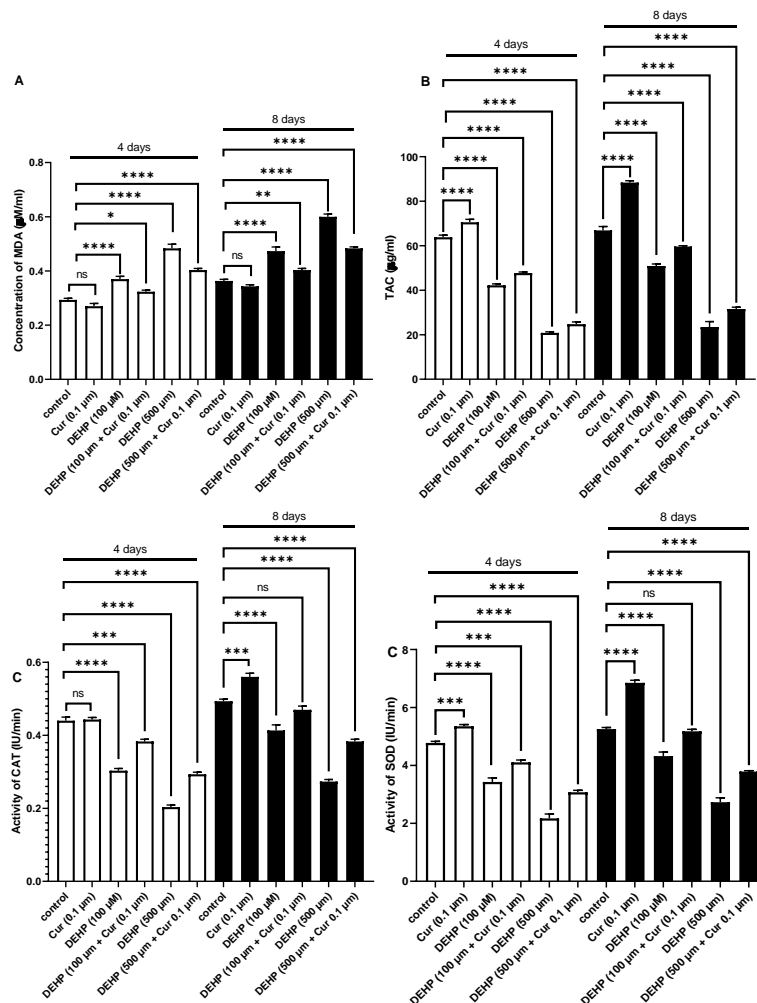


نمودار ۳: مقایسه میانگین غلظت پروتئین کل سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تیمار شده با غلظت‌های مختلف DEHP و غلظت ۰/۲۵ میکرومولار کوکومین (Cur) به مدت ۴ و ۸ روز. مقادیر میانگین غلظت پروتئین در هر روز از تیمار با کنترل مربوطه در همان روز مقایسه شده است. داده‌ها به صورت  $\text{mean} \pm \text{sd}$  و سطح معنی‌داری ns غیر معنی‌دار ( $p > 0.05$ ), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  و \*\*\*\*  $p < 0.0001$  در نظر گرفته شده است.

## بررسی القاء استرس اکسیداتیو و مقابله سیستم آنتی‌اکسیدانسی

در این آزمون، افزایش بسیار معنی‌دار ( $p < 0.0001$ ) غلظت MDA در سلول‌های تیماری با غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP نسبت به کنترل بعد از ۴ و ۸ روز مشاهده شد. در گروه تیمار شده با کوکومین در ۴ و ۸ روز در مقایسه با گروه‌های تیمار شده با DEHP کاهش بسیار معنی‌دار در غلظت MDA مشاهده شد ولی نسبت به گروه کنترل در ۴ و ۸، کوکومین نتوانست اثر این آلاینده زیست محیطی نسبت به گروه کنترل را خنثی نماید (نمودار ۴-A). نتایج به دست آمده

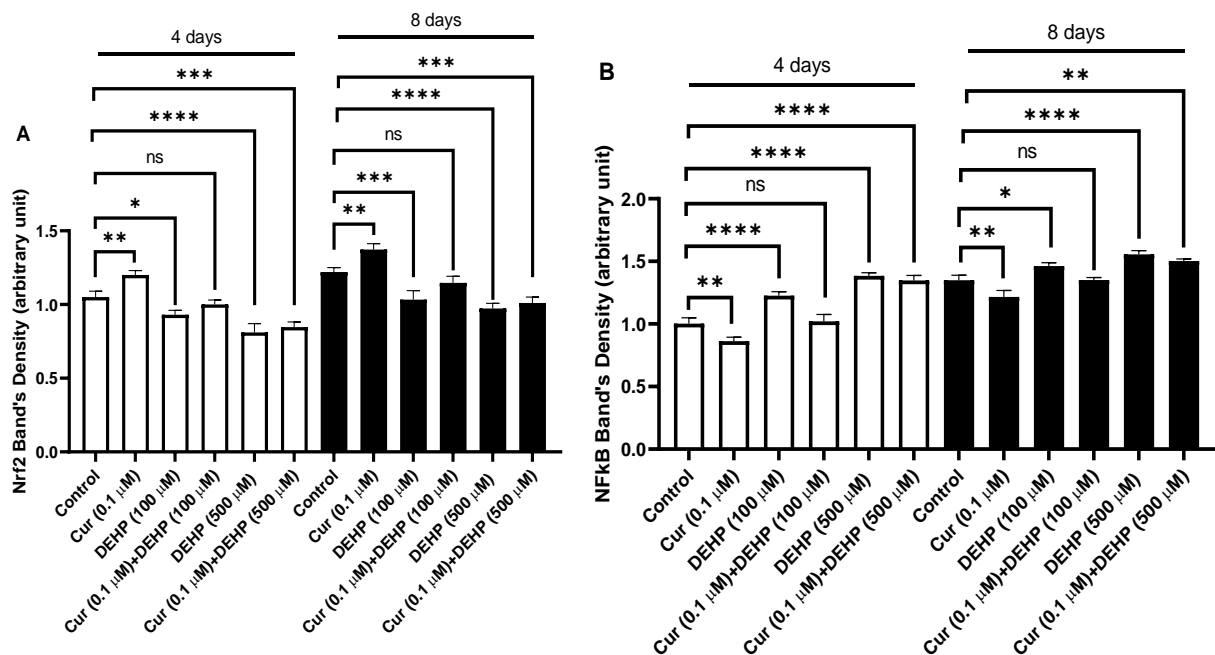
نشان دهنده کاهش بسیار معنی‌دار ( $p < 0.0001$ ) توان آنتی‌اکسیدانتی سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP در ۴ و ۸ روز بود. از طرفی همان‌طور که در نمودار ۴-B ملاحظه می‌شود، کورکومین نسبت به گروه کنترل باعث افزایش بسیار معنی‌دار ( $p < 0.0001$ ) TAC سلول‌ها بعد از ۴ و ۸ روز شد. اما اگر چه در تیمار هم‌زمان کورکومین نسبت به گروه‌های تیماری با DEHP توانست تا حدودی اثر این آلاینده زیست‌محیطی را برطرف نماید ولی در مقایسه با گروه کنترل این تاثیر معنی‌دار ( $p < 0.0001$ ) بود و نتوانست مسمومیت ناشی از این آلاینده زیست‌محیطی را کاملاً مرتفع سازد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی شامل CAT و SOD در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP در ۴ و ۸ روز کاهش بسیار معنی‌دار ( $p < 0.0001$ ) داشته است (نمودار ۴-C و ۴-D). از طرفی در سلول‌های تیمار شده با کورکومین افزایش بسیار معنی‌دار ( $p < 0.0001$ ) فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز بعد از گذشت ۴ و ۸ روز نسبت به گروه کنترل مشاهده شد در صورتی‌که فعالیت آنزیم کاتالاز تنها در ۸ روز نسبت به گروه کنترل بسیار معنی‌دار ( $p < 0.0001$ ) بود، ولی در ۴ روز تغییر نداشت. در تیمار هم‌زمان، کورکومین در ۴ روزه اثر سمی غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز را نسبت به گروه‌های تیماری این آلاینده را به‌صورت معنی‌دار جبران نمود ولی در مقایسه با گروه کنترل نتوانست اثر این آلاینده را خنثی نماید. این در حالی است که در تیمار ۸ روزه نسبت به گروه کنترل تاثیر غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار را کاملاً مرتفع نمود. البته بایستی متذکر شد که در تیمار هم‌زمان کورکومین و ۵۰۰ میکرومولار DEHP برای مدت ۸ روز نیز، کورکومین نتوانست اثر سمی این آلاینده بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی را نسبت به گروه کنترل نتوانست جبران نماید (نمودار ۴-C و ۴-D).



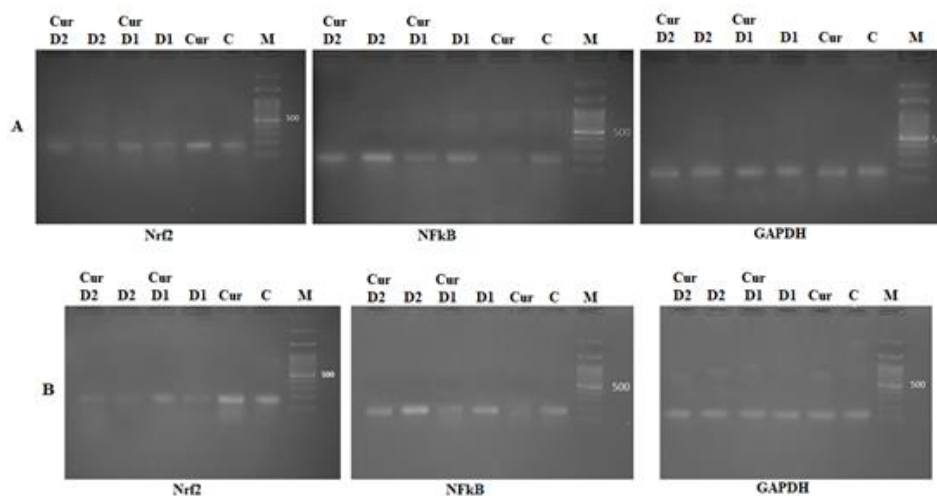
نمودار ۴: مقايسه ميانگين (A) ميزان مالون دى آلدئيد (MDA)، (B) ميزان آنتى اكسيدانت كل (TAC، C) فعاليت آنزيم كاتالاز (CAT) و (D) فعاليت آنزيم سوپر اكسيد ديسموتاز (SOD) در سلول‌هاى بنيادى مزانشيم مغز استخوان رت تيمار شده با كوركومين (Cur) و غلظت‌هاى مختلف DEHP به مدت ۴ و ۸ روز. مقادير ميانگين فعاليت آنزيم در هرروز از تيمار با كنترل مربوطه در همان روز مقايسه شده است. داده‌ها به صورت mean±sd و سطح معنى دار ns غير معنى دار  $p>0.05$ ،  $p<0.001$ \*\*\* و  $p<0.0001$ \*\*\*\* در نظر گرفته شده است.

### بررسى بيان ژن‌هاى دخيل در استرس اكسيداتيوا

NFkB و Nrf2 ژن‌هاى هستند كه در القاي استرس اكسيداتيوا نقش مهمى ايفا مى‌كنند. در گروه‌هاى تيمارى با غلظت‌هاى متفاوت DEHP به مدت ۴ و ۸ روز، ميانگين بيان ژن NFkB به صورت بسيار معنى دار ( $p<0.001$ ) نسبت به گروه كنترل افزايش و ميانگين بيان ژن Nrf2 به صورت بسيار معنى دار ( $p<0.0001$ ) كاهش كاهش يافت. اين در حالى است كه در گروه تيمارى با كوركومين به مدت ۴ و ۸ روز نسبت به گروه‌هاى كنترل كاهش ميانگين بيان ژن NFkB به طور معنى دار ( $p<0.001$ ) و افزايش ميانگين بيان ژن Nrf2 به طور معنى دار ( $p<0.0001$ ) مشاهده شد. در تيمار هم‌زمان كوركومين باعث افزايش ميانگين بيان ژن Nrf2 و كاهش بيان ژن NFkB در تيمار ۴ و ۸ روز نسبت به گروه‌هاى تيمار شده با غلظت ۱۰۰ ميكرومولار DEHP شد و اثر اين غلظت از اين آلاينده را در مقايسه با گروه كنترل كاملا مرتفع نمود، اگرچه كوركومين نتوانست تاثير غلظت ۵۰۰ ميكرومولار بر بيان اين ژن‌ها را برطرف نمايد (نمودار A-۵ و B-۵). در راستاى آناليز آمارى، با توجه به شكل A-۱ و B-۱ نيز مى‌توان بيان كرد، اثرسمى غلظت ۱۰۰ ميكرومولار DEHP بر بيان ژن‌هاى Nrf2 و NFkB توسط كوركومين جبران شده است ولى اين آنتى اكسيدانت گياهى نتوانسته است اثر ۵۰۰ ميكرومولار را در مقايسه با گروه كنترل بر طرف كند. در اين آناليز از ژن GPDH به عنوان ژن خانه دار استفاده شد و تغييرى در بيان اين ژن مشاهده نشد.



نمودار ۵: مقایسه میانگین بیان ژن Nrf2 (A) و B) ژن NFkB در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تیمار شده با کورکومین (Cur) و غلظت‌های مختلف DEHP به مدت ۴ و ۸ روز. مقادیر میانگین بیان ژن در هر روز از تیمار با کنترل مربوطه در همان روز مقایسه شده است. داده‌ها به صورت  $\text{mean} \pm \text{sd}$  و سطح معنی‌دار ns غیر معنی‌دار  $p > 0.05$ ، \*  $p < 0.05$ ، \*\*  $p < 0.01$ ، \*\*\*  $p < 0.001$  و \*\*\*\*  $p < 0.0001$  در نظر گرفته شده است



شکل ۱: بیان ژن‌های Nrf2، NFkB و GAPDH در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تیمار شده با کورکومین (Cur) و غلظت‌های مختلف DEHP (به مدت A) ۴ و B) ۸ روز. M مارکر، C کنترل، Cur تیمار شده با ۰/۱ میکرومولار کورکومین، D1 تیمار شده با ۱۰۰ میکرومولار DEHP، D2 تیمار شده با ۵۰۰ میکرومولار DEHP، CuR-D1 تیمار شده با کورکومین و غلظت ۱۰۰ میکرومولار DEHP، Cur-D2 تیمار شده با کورکومین و غلظت ۵۰۰ میکرومولار DEHP.

## ۵- بحث

در مطالعه حاضر از کورکومین به عنوان آنتی اکسیدانت گیاهی در کنترل اثر نامطلوب DEHP استفاده شد. درصد زنده‌مانی سلول‌ها در گروه تیمار شده با ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP طی ۴ و ۸ روز همراه با کاهش معنی‌دار وابسته به غلظت و زمان بوده است. با توجه به این که رنگ تریپان بلو به عنوان یک رنگ حیاتی از غشای سالم عبور نمی‌کند، لذا عبور آن از غشا بیانگر اختلال در یکپارچگی و سلامت غشای سلول است (۲۳) و می‌توان گفت DEHP به عنوان یک آلاینده زیست‌محیطی که به صورت گسترده در صنایع مختلف از جمله صنعت درمانی و پزشکی استفاده می‌شود، باعث اختلال در غشای سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان شده است. آبنوسی و علیاری (۸) نشان دادند که غلظت‌های ۰/۵ تا ۱۰۰ میکرومولار DEHP بر درصد زنده‌مانی سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بی‌تاثیر می‌باشند، در صورتی که از غلظت ۵۰۰ تا ۲۵۰۰ میکرومولار کاهش در صد زنده‌مانی وابسته به غلظت و زمان را مشاهده نمودند، از طرفی این تاثیر در مطالعه آبنوسی و همکاران (۹) نیز مشاهده شده است. در مقایسه با مطالعات پیشین می‌توان گفت افزایش زمان تیمار باعث اثر گذاری

غلظت کم این آلاینده شده است و علاوه بر توان زیستی، توان تکثیری سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان براساس آزمون PDN نیز تحت تأثیر DEHP قرار گرفته است.

درصد زنده مانی سلول‌ها در زمان ۴ و ۸ روز تحت تاثیر غلظت ۰/۱ میکرومولار کورکومین در مقایسه با کنترل بدون تغییر بوده است، ولی با توجه به آزمون PDN بیشترین تکثیر سلولی در حضور این غلظت از کورکومین مشاهده شد. مطالعات متعدد نشان داده است که غلظت‌های زیاد کورکومین باعث کاهش در صد زنده مانی و تکثیری سلول‌های سرطانی میشود. Li و همکاران (۲۴) نشان دادند که غلظت‌های ۱۰ میکرومولار تا ۵۰ میکرومولار کورکومین باعث کاهش معنی دار در صد زنده مانی سلول‌های مختلف سرطانی به واسطه القاء آپوپتوزیس می‌شود. همچنین Cao و همکاران (۲۵) نیز نشان دادند که غلظت‌های ۵ تا ۸۰ میکرومولار کورکومین باعث کاهش معنی دار در صد زنده مانی سلول‌های استئوسارکوما به صورت وابسته به غلظت و زمان می‌شوند. نتایج تحقیقات فوق الذکر در راستای مطالعه حاضر است و باید گفت که غلظت‌های زیاد این آنتی اکسیدانت گیاهی باعث کاهش در صد زنده مانی می‌شود ولی غلظت‌های کم آن تاثیری بر در صد زنده مانی سلول‌ها ندارد.

اگر چه تیمار ۴ و ۸ روز سلول‌ها با این آنتی‌اکسیدانت گیاهی (۰/۱ میکرومولار) نتوانست اثر سمی غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP را در مقایسه با گروه کنترل کاملاً مرتفع نماید، ولی در گروه تیمار مشترک، کورکومین در مقایسه با گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار باعث بهبود درصد زنده مانی سلول‌ها شده است. از نظر شیمیائی کورکومین یکی از آنتی اکسیدانت‌های قوی محسوب می‌شود (۲۱ و ۲۲)، ولی با توجه به جذب کم آن از طریق دستگاه گوارش (۲۶) اثر بخشی این آنتی اکسیدانت در سرکوب رادیکال‌های آزاد کم می‌شود. در این پژوهش استفاده از غلظت‌های زیاد ۱ تا ۵ میکرومولار اثر کاملاً سمی داشت و بهترین غلظت برای مقابله با اثر سمی DEHP بر سلول‌ها بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت، غلظت ۰/۱ میکرومولار بود که این غلظت توانائی خنثی سازی اثر اکسیداتیو این آلاینده را در محیط کشت نداشت. از آن‌جا که DEHP با عبور از غشای سلول باعث اختلال در عملکرد آن می‌شود لذا کورکومین باید بتواند علاوه بر این‌که اثر سو بر سلول نداشته باشد، باید اثر اکسیداتیو این آلاینده را خنثی نماید که به طور کامل موفق به این امر نشده است.

نتایج این پژوهش نشان داد تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار DEHP باعث کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز در مقایسه با گروه کنترل شد. از طرفی تیمار با DEHP در مقایسه با گروه کنترل باعث افزایش غلظت MDA و همچنین کاهش توان آنتی‌اکسیدانتی کل (TAC) سلول‌ها به صورت وابسته به غلظت طی ۴ و ۸ روز شد. در راستای این نتایج مطالعات Lee and Lim (۲۷) و Ghosh و همکاران (۲۸) نشان داد تیمار DEHP از یک سو موجب افزایش پر اکسیداسیون لیپید، از سوی دیگر سبب کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام (TAC) به ترتیب در سلول‌های BNLCL2 و هپاتوسیت می‌شود. DEHP با تولید رادیکال آزاد می‌تواند آنتی اکسیدانت‌های موجود در سلول را اکسید نموده و باعث کاهش توان آنتی اکسیدانتی کل سلول شود. از طرفی با توجه به اثر مهارکنندگی بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاتالاز و سوپر اکسیددیسموتاز راه مقابله با رادیکال‌های آزاد را مسدود می‌نماید، لذا رادیکال‌های آزاد با اکسید نمودن اسیدهای چرب غیراشباع باعث تخریب غشای سلول شده است (۲۹) که باعث افزایش میزان مالون دی آلدئید در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان شد. در مطالعه آنبوسی و علیاری (۸) مشاهده شد که DEHP در غلظت ۵۰۰ و ۱۵۰۰ میکرومولار باعث القاء استرس اکسیداتیو در ۴۸ ساعت شده و میزان تولید میزان مالون دی آلدئید بعد از کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانتی کل و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی افزایش معنی داری داشته است. البته با توجه به این‌که مدت زمان تیمار سلول‌های در مطالعه فوق ۴۸ ساعت بوده است، غلظت ۱۰۰ میکرومولار این آلاینده تأثیری در غلظت MDA تولید شده نداشته است. در صورتی‌که در مطالعه حاضر با افزایش زمان تیمار به ۴ و ۸ روز غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیز باعث القاء

استرس اکسیداتیو شده است. با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر، باید خاطر نشان کرد که اثر سمی این آلاینده زیست محیطی با افزایش زمان تماس افزایش قابل ملاحظه‌ای خواهد داشت که حتی غلظت‌های کم نیز تاثیر سمی خود را بر سیستم بیولوژیک می‌گذارند.

تیمار سلول‌ها با کورکومین موجب کاهش مالون دی آلدئید و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز و همچنین توان آنتی اکسیدانتی کل پس از ۴ و ۸ روز شد، ولی فعالیت آنزیم کاتالاز تنها در ۸ روز با افزایش در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. کورکومین یک متابولیت ثانویه گیاهی با توان آنتی اکسیدانتی است که این نتیجه توسط دیگران نیز تایید شده است. Lin و همکاران (۳۰) به اثر آنتی اکسیدانتی این متابولیت ثانویه گیاهی اشاره کرده و بیان نمودند که اگر چه تمام غلظت‌های کورکومین باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز شدند ولی در غلظت‌های بالا، کورکومین باعث افزایش میزان MDA می‌شود. از طرفی Asouri و همکاران (۳۱) نشان دادند که اثر آنتی اکسیدانتی کورکومین در غلظت‌های ۲۵ تا ۲۰۰ میکرومولار در مقایسه با آسکوربیک اسید بیشتر است.

در تیمار هم‌زمان سلول‌ها، کورکومین در مقایسه با گروه کنترل نتوانست اثر اکسیداتیو غلظت‌های مختلف DEHP را کاملا برطرف نماید ولی در مقایسه با گروه‌های تیماری با DEHP، این آنتی اکسیدانت گیاهی توانست اثر این آلاینده زیست محیطی را بهبود بخشد. با توجه به فعالیت آنتی اکسیدانتی کورکومین، در این مطالعه انتظار می‌رفت که این متابولیت ثانویه گیاهی بتواند اثر اکسیداتیو DEHP را خنثی نماید، ولی از آن‌جا که DEHP مهار کننده قوی برای آنزیم‌ها متابولیک است (۳۲ و ۳۳) احتمالا شدت تاثیر این آلاینده بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت به‌صورتی است که کورکومین نتوانسته است به‌صورت کامل تاثیر منفی آن را برطرف نماید. در مطالعه Xue و همکاران (۳۴) نشان داده شد که جذب روده‌ای کورکومین از طریق انتشار ساده و انتقال فعال توسط P-گلیکو پروتئین (از دسته انتقال دهنده‌های ABC) انجام می‌پذیرد. با توجه به وابستگی این انتقال دهنده‌ها به ATP می‌توان گفت که احتمالا حضور DEHP در محیط و اثر مهاری این آلاینده در تولید ATP باعث کاهش انتقال کورکومین به سلول بوده است و تنها از طریق انتشار ساده این آنتی اکسیدانت گیاهی توانسته است به‌صورت محدود در سلول حضور یابد.

ژن فاکتور هسته ای مربوط به اریترئوئید ۲ (Nrf2) در بیان فاکتورهای آنتی‌اکسیدانتی برای جلوگیری از استرس‌اکسیداتیو نقش عمده‌ای بازی می‌کند تا سلول بتواند با مهار رادیکال‌های آزاد، محافظت سلولی را به‌واسطه شبکه آنتی‌اکسیدانی انجام دهد (۳۵). از طرفی NFkB با فعالیت دوگانه علاوه بر فعال کردن اثر اکسیداتیو دارای اثر آنتی‌اکسیدانتی نیز است، لذا رادیکال‌های آزاد می‌توانند آن را فعال یا غیرفعال نمایند (۳۶). نسبت بیان این دو ژن (Nrf2/NFkB) در مقابله با استرس‌اکسیداتیو بسیار با اهمیت بوده و مشخص کننده روند کاهش یا افزایش پراکسیداسیون چربی‌های غشای سلول می‌باشد (۳۷ و ۳۸).

مطالعات مختلف استرس‌اکسیداتیو را به‌عنوان یک مسیر اصلی در مسمومیت ناشی از DEHP در سلول‌های زایا و اسپرم توصیف کرده‌اند (۳۹ و ۴۰). کاهش قابل توجهی در محتوای گلوکوتانیون سلول به‌دنبال تیمار با DEHP مشاهده شده است که در نتیجه آن و به‌واسطه استرس اکسیداتیو و فعال کردن p38MAPK/NF-kB، آسیب کلیه ناشی از دیابت تشدید شده است (۴۱). در پژوهش حاضر تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان با DEHP در غلظت‌های متفاوت نسبت به گروه کنترل، نشان داد که میانگین بیان ژن NFkB افزایش و میانگین بیان ژن Nrf2 کاهش یافته است که این خود می‌تواند باعث القاء استرس اکسیداتیو در این سلول‌ها شود. از طرفی کورکومین باعث کاهش بیان ژن NFkB و افزایش بیان ژن Nrf2 در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت شد است و در تیمار هم‌زمان نیز نتوانست اثر غلظت ۱۰۰ میکرومولار این

آلاینده زیست محیطی را در مقایسه با گروه کنترل کاملاً خنثی نماید. اگرچه این تاثیر در تیمار هم‌زمان با غلظت ۵۰۰ میکرومولار مشاهده نشد ولی بهبود بیان این ژن‌ها در مقایسه با گروه تیماری ۵۰۰ میکرو مولار کاملاً قابل مشاهده است. Li و همکاران (۴۲) نشان دادند که کورکومین باعث افزایش بیان ژن Nrf2 و کاهش بیان ژن NFkB در رت ویستار با ضایعه انسداد شریان در بخش میانی مغز شده است.

## ۶- نتیجه‌گیری

به‌عنوان نتیجه‌گیری، برای کاهش تشکیل ROS یا از بین بردن اثر آن، سیستم‌های فیزیولوژیک از چندین مکانیسم متفاوت استفاده می‌کنند، از میان آن‌ها آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانسی را می‌توان به‌عنوان مهم‌ترین نام برد. با توجه به این‌که DEHP به‌عنوان یک آلاینده زیست محیطی باعث القاء استرس اکسیداتیو شده و از آن‌جا که آلودگی به این آلاینده اجتناب ناپذیر است، استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانسی مانند کوکومین در زرد چوبه پیشنهاد می‌شود. اگر چه کوکومین اثر آنتی‌اکسیدانسی قوی دارد ولی به‌دلیل جذب کم توان برطرف کردن تاثیر سو DEHP را به‌طور کامل ندارد. ولی از آن‌جا که به آسانی برای عموم جامعه قابل تهیه است مصرف آن می‌تواند در برطرف کردن استرس اکسیداتیو مفید باشد. این آنتی‌اکسیدانسی با تاثیر بر بیان ژن‌های دخیل در استرس اکسیداتیو فعالیت آنزیم‌ها آنتی‌اکسیدانسی را افزایش داده لذا بدین ترتیب باعث جلوگیری از اثر DEHP می‌شود. با توجه به نتایج این پژوهش، مصرف روزانه زردچوبه که حاوی مقدار زیادی کورکومین است برای بیماران که تحت درمان دیالیز یا انتقال خون هستند پیشنهاد می‌شود.

## ۷- منابع

1. Sun Z, Mi X, Yu Y, Shi W, Feng A, Moad G, Thang SH. All-PVC Flexible Poly (vinyl Chloride): Nonmigratory Star-Poly (vinyl Chloride) as Plasticizers for PVC by RAFT Polymerization. *Macromolecules* 2021 54 (11), 5022-5032. DOI: 10.1021/acs.macromol.1c00616.
2. Zeng F, Zhang L, Deng F, Lou S. Early-life exposure to di (2-ethyl-hexyl) phthalate: Role in children with endocrine disorders. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Feb 10;11:1115229. doi: 10.3389/fcell.2023.1115229.
3. Latini G, Ferri M, Chiellini F. Materials degradation in PVC medical devices, DEHP leaching and neonatal outcomes. *Curr Med Chem.* 2010;17(26):2979-89. doi: 10.2174/092986710792064992.
4. Arrigo F, Impellitteri F, Piccione G, Faggio C. Phthalates and their effects on human health: Focus on erythrocytes and the reproductive system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 2023; 270:109645. doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109645.
5. 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.
6. Lozano M, Cid J. DEHP plasticizer and blood bags: challenges ahead. *ISBT Science Series* (2013) 8, 127–130.
7. Inoue K., Kawaguchi M., Yamanaka R., et al. Evaluation and analysis of exposure levels of di(2-ethylhexyl) phthalate from blood bags. *Clinica Chimica Acta.* 2005;358(1-2):159–166. doi: 10.1016/j.cccn.2005.02.019.
8. 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>
9. Abnosi HM, 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.

10. Abnosi, M. H., & 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>.
11. Shayeganfar Z, Abnosi MH, Sargolzaei. Effect of Di-2-ethylhexyl phthalate on alkalinephospatase activity was due to down regulation of osteogenic related genes. *Journal of Cell and Tissue*. 2023;14(1): 80-95. (Abstract in English)
12. Hu L, Yin C, Zhao F, Ali A, Ma J, Qian A. Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):360. doi: 10.3390/ijms19020360.
13. Marie PJ. Osteoblast dysfunctions in bone diseases: from cellular and molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci*. 2015; 72(7): 1347-61. doi: 10.1007/s00018-014-1801-2.
14. Xu J, Yu L, Liu F, Wan L and Deng Z. The effect of cytokines on osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling in osteoporosis: a review. *Front. Immunol*. 2023; 14: 1222129. doi: 10.3389/fimmu.2023.1222129
15. 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.
16. Pan X, Zheng L, Ding Y, Dai Z, Qi X, Zhang X, et al. Effects of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate on Oxidative Stress and Lipid Metabolism in Livers of Male *Xenopus tropicalis*. *J Clin Toxicol*. 2023; 13: 528. DOI: 10.35248/2161-0495-23.13.528.
17. Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL, Savvateeva MV, Melnikova NV, Krasnov GS, Dmitriev AA. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019: 6175804. doi: 10.1155/2019/6175804.
18. Michalak M. Plant-Derived Antioxidants: Significance in Skin Health and the Ageing Process. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 6;23(2):585. doi: 10.3390/ijms23020585.
19. Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods*. 2017 Oct 22;6(10):92. doi: 10.3390/foods6100092.
20. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 595:105-25. doi: 10.1007/978-0-387-46401-5\_3.
21. Tuong DTC, Moniruzzaman M, Smirnova E, Chin S, Sureshbabu A, Karthikeyan A, Min T. Curcumin as a Potential Antioxidant in Stress Regulation of Terrestrial, Avian, and Aquatic Animals: A Review. *Antioxidants*. 2023; 12(9): 1700. <https://doi.org/10.3390/antiox12091700>
22. Jakubczyk K, Drużga A, Katarzyna J, Skonieczna-Żydecka K. Antioxidant Potential of Curcumin-A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9(11):1092. doi: 10.3390/antiox9111092.
23. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015; 111: A3.B.1-A3.B.3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111.
24. Li Y, Sun W, Han N, Zou Y, Yin D. Curcumin inhibits proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis of retinoblastoma cell lines through modulation of miR-99a and JAK/STAT pathway. *BMC cancer*. 2018;18(1):1-9.
25. Cao F, Liu T, Xu Y, Xu D, Feng S. Curcumin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in human osteoclastoma cell through MMP-9, NF-κB and JNK signaling pathways. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015; 8(6): 6037-45.
26. Dei Cas M, Ghidoni R. Dietary Curcumin: Correlation between Bioavailability and Health Potential. *Nutrients*. 2019 Sep 8;11(9):2147. doi: 10.3390/nu11092147.

27. 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.
28. 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.
29. Feng J, Wang J, Wang Y, Huang X, Shao T, Deng X, Cao Y, Zhou M and Zhao C. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation: Prospective Associations Between Ferroptosis and Delayed Wound Healing in Diabetic Ulcers. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022; 10: 898657. doi: 10.3389/fcell.2022.898657.
30. Lin X, Bai D, Wei Z, Zhang Y, Huang Y, Deng H, et al. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264. 7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. *PloS one.* 2019; 14(5): e0216711.
31. Asouri M, Ataee R, Ahmadi AA, Amini A, Moshaei MR. Antioxidant and free radical scavenging activities of curcumin. *Asian J Chem.* 2013; 25(13):7593-5.
32. Dirven H, van den Broek P, Jongeneelen F. Effect of di (2-ethylhexyl) phthalate on enzyme activity levels in liver and serum of rats. *Toxicology.* 1990;65(1-2):199-207.
33. Shahcheraghi SH, Salemi F, Peirovi N, Ayatollahi J, Alam W, Khan H, et al. Nrf2 regulation by curcumin: Molecular aspects for therapeutic prospects. *Molecules.* 2021;27(1):16.
34. Xue M, Cheng Y, Xu L, Zhang L. Study of the intestinal absorption characteristics of curcumin in vivo and in vitro. *J Appl Pharm.* 2017; 9: 1000246.
35. Lingappan K. NF-κB in oxidative stress. *Current opinion in toxicology.* 2018;7:81-6.
36. Abnosi MH, Tabandeh MR, Mosavi-Aroo F. Corrigendum to: Betaine ameliorates high glucose-induced oxidative stress in granulosa cells. *Reprod Fertil Dev.* 2023; 35(8): 492. doi: 10.1071/RD22247\_CO.
37. Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF-κB response pathways. *Biochemical society transactions.* 2015;43(4):621-6.
38. Kasahara E, Sato EF, Miyoshi M, Konaka R, Hiramoto K, Sasaki J, et al. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di (2-ethylhexyl) phthalate. *Biochemical Journal.* 2002;365(3):849-56
39. Erkekoglu P, Rachidi W, Yuzugullu OG, Giray B, Favier A, Ozturk M, et al. Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di (2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono (2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicology and applied pharmacology.* 2010;248(1):52-62.
40. She Y, Jiang L, Zheng L, Zuo H, Chen M, Sun X, et al. The role of oxidative stress in DNA damage in pancreatic β cells induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Chemico-Biological Interactions.* 2017;265:8-15
41. Ding W-J, Huang S-L, Huang S, Xu W-P, 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. *Toxicology Research.* 2023;12(2):332-43
42. Li W, Suwanwela NC, Patumraj S. Curcumin by down-regulating NF-kB and elevating Nrf2, reduces brain edema and neurological dysfunction after cerebral I/R. *Microvasc Res.* 2016 Jul;106:117-27. doi: 10.1016/j.mvr.2015.12.008. Epub 2015 Dec 12. PMID: 26686249.

