

The effect of para-nonylphenol on the viability and morphology of rat bone marrow mesenchymal stem cells

Abnosi MH(PhD)^{1*}, Soleimani Mehranjani M(PhD)¹, Momeni HR(PhD)¹, Mahdiyeh Najafabadi M(PhD)¹, Barati M(BSc)¹, Shojafar E(BSc)¹

1- Department of Biology, Arak University, Arak, Iran

Received 3 May 2010 Accepted 18 Aug 2010

Abstract

Background: This study investigated the effect of para-nonylphenol as an environmental pollutant on the viability and morphology of the rat bone marrow mesenchymal stem cells.

Materials and Methods: In this Experimental study, Under sterilized conditions, rat bone marrow mesenchymal stem cells were extracted in DMEM containing 15% FBS and Pen/Strep up to the third passage and then treated with 0, 10, 50, 100, 150, 200, and 250 μ M of para-nonylphenol for 12, 24, 36, and 48 hrs. Viability of the cells was measured through trypan blue and MTT staining. Eventually, 100 μ M dosage and 24 hrs of treatment were selected for carrying out the investigations. The cells morphology was studied using fluorescent dye (Hochest, propidium iodide, acridine orange, and monodensyl cadaverine) and the protein profile of the cells were studied using SDS-PAGE. Data were analyzed using one and two way ANOVA.

Results: Based on the two-way ANOVA, cumulative effect of treatment time and dosage caused a highly significant reduction ($P < 0.001$) in the viability of rat bone marrow mesenchymal stem cells. One way ANOVA indicated a significant difference in the viability of the cells from 100 μ M of para-nonylphenol onwards through all treatment times in comparison to the control group ($P < 0.05$). Condensation and deformation of the nuclei, membrane disruption, and presence of several vacuoles in the cytoplasm were also observed.

Conclusion: Para-nonylphenol toxicity resulted in morphological changes in rat bone marrow mesenchymal stem cells. This reduction in the viability of the cells was dependent on dose and time.

Keywords: Cell viability, Mesenchymal stem cells, Morphology, P-nonylphenol, Rats

*Corresponding author:

Address: Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran
Email: m-abnosi@araku.ac.ir

اثر پارا نونیل فنل بر توانایی حیات و مورفولوژی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت

دکتر محمد حسین آبنوسی^{1*}، دکتر ملک سلیمانی مهرنجانی²، دکتر حمید رضا مومنی³، دکتر مجید مهدیه نجف آبادی⁴،
 مؤژگان براتی⁵، الهام شجاع فر⁶

- 1- استادیار، دکترای بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
- 2- دانشیار، دکترای بافت و جنین، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
- 3- استادیار، دکترای فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
- 4- استادیار، دکترای فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
- 5- دانشجوی، کارشناس ارشد زیست شناسی جانوری گرایش سلولی-تکوین، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
- 6- دانشجوی، کارشناس ارشد زیست شناسی جانوری گرایش سلولی-تکوین، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت 89/2/13، تاریخ پذیرش 89/5/27

چکیده

زمینه و هدف: در این تحقیق اثر پارانونیل فنل به عنوان یک آلاینده زیست محیطی بر توانایی حیات و مورفولوژی سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان بررسی شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت تحت شرایط استریل استخراج و در محیط کشت DMEM حاوی 15 درصد FBS و پنی سیلین/استرپتومایسین تا سه پانزده کشت و سپس با غلظت های مختلف پارانونیل فنل (250 و 200، 150، 100، 50، 10، صفر میکرومولار) در زمان های مختلف 24، 36، 48 و 12 ساعت تیمار شد. توانایی حیات این سلول ها با روش تریپان بلو و متیل تیازول تترازولیوم MTT بررسی و در نهایت دوز 100 میکرومولار و زمان 24 ساعت برای ادامه مطالعه انتخاب شد. مورفولوژی سلول ها با رنگ آمیزی هوخست، پروپیدیم آبیادید، اکریدین اورانژ و منو دنسیل کاداورین بررسی شد، و پروفیل پروتئین آنها توسط SDS-PAGE مورد مطالعه قرار گرفت. داده ها با روش های آماری آنالیز واریانس دو طرفه و یک طرفه تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: بر اساس آنالیز واریانس دوطرفه، اثر متقابل و همزمان دوز مصرفی پارا نونیل فنل و زمان تیمار باعث کاهش معنی دار توانایی حیات سلول های مزانشیم مغز استخوان رت شد ($p < 0/001$). توانایی حیات سلول ها با آنالیز واریانس یک طرفه در دوز 100 میکرومولار به بعد در همه زمان های تیمار نسبت به گروه کنترل دارای تفاوت معنی دار بود ($p < 0/05$). متراکم شدن و تغییر شکل هسته، تخریب غشاء، حضور واکوئل های متعدد در سیتوپلاسم مشاهده شد.

نتیجه گیری: مسمومیت با پارانونیل فنل موجب تغییر در مورفولوژی سلول های مزانشیم مغز استخوان رت شد و کاهش معنی دار قدرت زیستی این سلول های وابسته به دوز و زمان بود.

واژگان کلیدی: پارا نونیل فنل، رت، سلول های بنیادی مزانشیم، قابلیت حیات سلول، مورفولوژی

* نویسنده مسئول: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

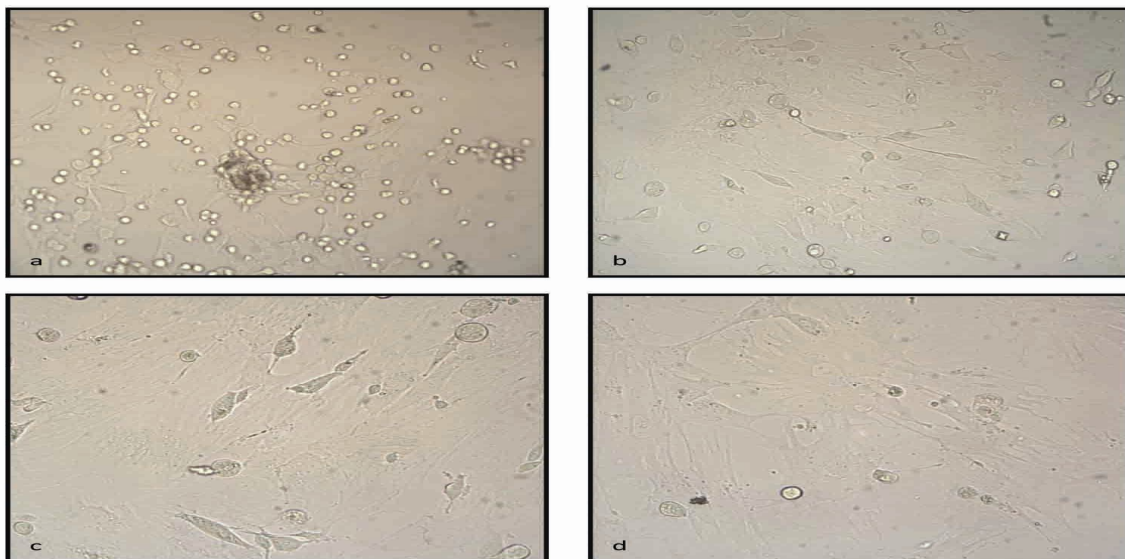
Email: m-abnosi@araku.ac.ir

مقدمه

مواد و روش‌ها

نونیل فنل اتوکسیلات یک سورفاکتانت غیر یونی است که به طور گسترده استفاده شده و در محیط به وسیله ارگانسیم‌ها به ترکیبات سمی‌تر از قبیل پارا نونیل فنل (Para-NONylphenol) تبدیل می‌شود (1). پارانونیل فنل در ساخت پلاستیک‌ها، لوازم آرایشی، صنایع چرم سازی، دترژنت‌ها و غیره به کار رفته و از طریق غذا و آب وارد زنجیره غذایی انسان نیز می‌شود (2). تحقیقات نشان داده است که پارا نونیل فنل منجر به فعال سازی آبشار کاسپازی و توقف چرخه سلولی در فاز G2/M می‌گردد (3). علاوه بر آن پارانونیل فنل با تغییر در سطح کلسیم نیز باعث مرگ در رده سلولی استئوسارکوما ی انسانی (MG63) و از طریق تولید رادیکال آزاد اکسیژن در نوتروفیل خون انسان باعث مرگ این سلول‌ها می‌شود (4، 5). سلول بنیادی مزانشیم، سلول پیش ساز با توانایی متعدد است که در مغز استخوان و دیگر بافت‌های بالغ جایگیری کرده و قادر به خودنوزایی با ظرفیت تکثیری بالا می‌باشد (6). توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیم برای تشکیل استخوان، چربی و غضروف در هر دو محیط داخل بدن و محیط آزمایشگاه تأیید شده است (7). اگر چه اثر سیتوتوکسیسیته پارانونیل فنل بر سلول‌های بنیادی جنینی انسان بررسی شده، ولی با توجه به اهمیت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان به عنوان یک ذخیره با اهمیت در جایگزینی دیگر سلول‌ها به هنگام صدمات بافتی تاکنون اثر این ماده بر این سلول‌ها گزارش نشده است (8). لذا با توجه به حضور گسترده پارانونیل فنل در محیط زیست و ورود آن به زنجیره غذایی و تهدید سلامت انسان، این مطالعه با هدف بررسی اثر سیتوتوکسیسیته پارانونیل فنل بر توانایی حیات و مورفولوژی سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت به عنوان یک مدل آزمایشگاهی طراحی گردید.

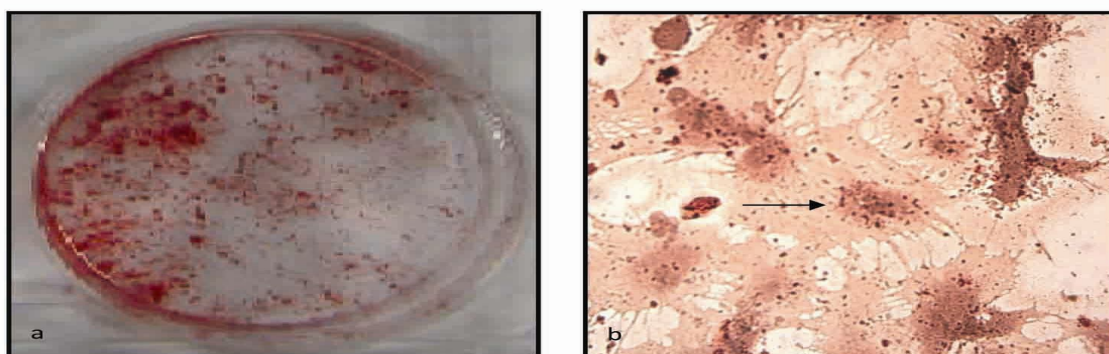
در این مطالعه تجربی از 7 موش صحرانی نر نژاد ویستار با سن 50 روز و وزن 140 ± 20 گرم استفاده شد. حیوان مورد استفاده در این پژوهش پس از خریداری از انستیتو پاستور در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط دمائی 27 ± 3 درجه سانتی‌گراد و با دسترسی مناسب به غذا و آب در قفس‌های پلی اتیلین نگهداری شد، لازم بذکر است پیش از آغاز مطالعه مجوزهای لازم جهت استفاده از این تعداد حیوان آزمایشگاهی از کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه اراک اخذ شد. برای استخراج و خالص سازی سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت از روش ارائه شده توسط اسلامی نژاد و همکاران استفاده شد (9). به صورت خلاصه استخوان ران و ساق رت پس از بی‌هوشی با دی اتیل اتر توسط جراحی جدا و تحت شرایط استریل، مغز استخوان توسط 3 میلی‌لیتر محیط کشت اصلاح شده دابلکو (DMEM) حاوی 15 درصد FBS و پنی سیلین/استرپتومایسین در لوله فالكون 15 میلی‌لیتری فلش اوت شد. لوله فالكون با 2500 دور دقیقه به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ و رسوب سلولی حاصل با یک میلی‌لیتر محیط کشت هموزن و به فلاسک 25 میلی‌لیتری منتقل گردید. بعد از 24 ساعت، سلول‌های چسبیده به فلاسک با بافر فسفات مثبت (حاوی کلسیم و منیزیم) شسته و محیط کشت تازه اضافه شد. به سلول‌های چسبیده 14-10 روز فرصت برای تکثیر داده و در طی این مدت هر سه روز محیط کشت تعویض شد. بعد از پر شدن کف فلاسک کشت سلول‌ها با تریپلسین-اتیلن دی آمین تتراستیک اسید Trypsin-EDTA جدا و نیمی از آن در یک فلاسک دیگر کشت داده شد و این کار تا پاساژ سوم تکرار گردید (شکل 1).



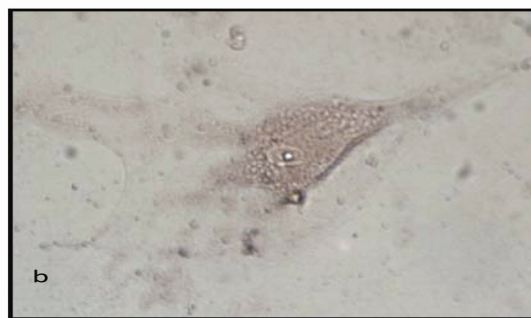
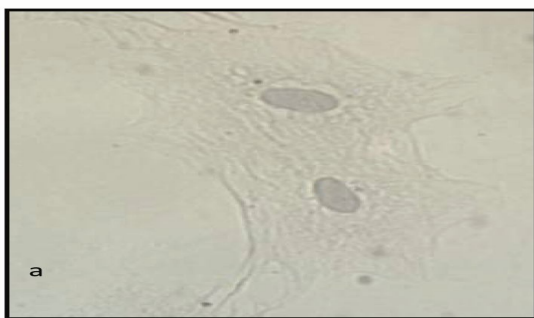
شکل 1. مراحل رشد و خالص سازی سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت (a) دو روز بعد از استخراج (b) پس از اولین پاساژ (c) بعد از دومین پاساژ (d) پس از سومین پاساژ

برای اثبات مزانشیم بودن سلول‌های خالص شده، علاوه بر قابلیت چسبندگی، سلول‌های استخراج شده به سلول‌های استخوانی و چربی نیز تمایز داده شد. سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت پس از پاساژ سوم در پلیت شش خانه کشت و بعد از چسبیدن به کف ظرف با محیط کشت اصلاح شده دابلکو حاوی FBS^+ و ترکیبات تمایزی استورژنیک (بتا-گلیسرول فسفات، دگزامتازون و آسکوربیک اسید) و آدیوژنیک (بتا-گلیسرول فسفات، دگزامتازون، ایندومتاسین و آسکوربیک اسید) به مدت 21 روز در دمای 37°C درجه سانتی گراد و 5 درصد دی اکسید کربن تیمار شد (10). بعد از این مدت سلول‌ها توسط رنگ آلیزارین رد (برای استئوبلاست) و اوایل رد (برای آدیوسیت) رنگ آمیزی شد (شکل 2 و 3).

شکل 2. تشکیل ماتریکس استخوانی در سلول‌های مغز استخوان رت بعد از تیمار با ترکیبات استورژنیک (a) نمای میکروسکوپی، رنگ صورتی نشان دهنده تشکیل ندول‌های کلسیم در ماتریکس سلول می‌باشد. (b) نمای میکروسکوپی از سلول‌ها در محیط کشت (رنگ آمیزی آلیزارین رد، میکروسکوپ اینورت، بزرگنمایی 20X).



شکل 2. تشکیل ماتریکس استخوانی در سلول‌های مغز استخوان رت بعد از تیمار با ترکیبات استورژنیک (a) نمای میکروسکوپی، رنگ صورتی نشان دهنده تشکیل ندول‌های کلسیم در ماتریکس سلول می‌باشد. (b) نمای میکروسکوپی از سلول‌ها در محیط کشت (رنگ آمیزی آلیزارین رد، میکروسکوپ اینورت، بزرگنمایی 20X).



شکل 3 تمایز سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت به سلول‌های چربی بعد از تیمار با ترکیبات آدیپوژنیک (a) نمای میکروسکوپی از سلول‌های تمایز نیافته (b) نمای میکروسکوپی از یک سلول تمایز یافته به سلول چربی در محیط کشت رنگ صورتی و وجود واکنش‌های چربی نشان دهنده تمایز سلولی می‌باشد (رنگ آمیزی اوایل رد، میکروسکوپ اینورت، بزرگنمایی 20 X)

در روش میتیل تیازول تترازولیوم MTT آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری توانایی احیای رنگ زرد دی میتیل تیازول دی فیل تترازولیوم را به بلورهای ارغوانی و نامحلول فورمازان دارد (11). سلول‌های بنیادی مزانشیم به مدت 24 ساعت در پلیت 96 خانه کشت و پس از چسبیدن این سلول‌ها به کف پلیت 96 خانه با غلظت‌های مذکور از پارانونیل فنل تیمار و پس از زمان‌های 24، 36، 48 و 120 ساعت 10 میکرولیتر میتیل تیازول تترازولیوم به ازای 100 میکرولیتر از محیط کشت به چاهک‌ها اضافه و به مدت 4 ساعت انکوبه شد. سپس بلورهای فورمازان حاصل در دی میتیل سولفو کساید حل و جذب آن توسط دستگاه خوانشگر الیزا متل اسکودیا گنوستیک، ساخت کشور آلمان) در طول موج 505 نانومتر اندازه‌گیری شد. تعداد سلول‌های زنده پس از رسم گراف استاندارد با استفاده از فرمول $Y = 0.016X + 0.037$ و $R^2 = 0.996$ در جاییکه Y جذب و X تعداد سلول‌های زنده می‌باشد، محاسبه گردید.

سلول‌های چسبیده به پلیت 24 خانه با دوز 100 میکرومولار پارانونیل فنل به مدت 24 ساعت تیمار شد (با توجه به نتایج آماری آزمون‌های تریپان بلو و میتیل تیازول تترازولیوم در مرحله دوز یابی، دوز 100 میکرومولار و مدت زمان تیمار 24 ساعت برای بررسی‌های بعدی انتخاب شد). رنگ آمیزی کروماتین با هوخست برای مطالعه مورفولوژی هسته، پروتئیدیم آیوداید همراه با هوخست برای تمایز بین سلول مرده و زنده، آکریدین اورانژ برای بررسی مورفولوژی سیتوپلاسم و منودانسیل کاداورین برای رنگ

پارانونیل فنل از شرکت آکروز (نیوجرسی، آمریکا) خریداری و محلول استوک با دی میتیل سولفو کساید (DMSO) آماده شد (غلظت نهایی دی میتیل سولفو کساید در محیط کمتر از 0/01 درصد بود) در این غلظت دی میتیل سولفو کساید، تاثیری بر رشد نرمال سلول ندارد (8) (لازم بذکر است کلیه مواد مورد استفاده در این پژوهش همگی از شرکت سیگما ساخت کشور آمریکا تهیه گردید، مگر در مواردی که به آن اشاره شده است). سلول‌ها پس از 24 ساعت کشت در پلیت پلاستیکی 12 خانه در معرض تیمار با دوزهای مختلف پارانونیل فنل (میکرومولار 250 و 200، 150، 100، 50، 10، صفر) برای مدت زمان 48 و 36، 24، 12 ساعت قرار گرفت.

برای سنجش توانایی حیات سلول‌های تیمار شده با پارانونیل فنل از دو روش تریپان بلو و میتیل تیازول تترازولیوم (Methyl Thiazol Tetra Zolium- MTT) استفاده شد. ابتدا سلول‌ها با تریپسین جدا و پس از سانتریفوژ، رسوب سلولی با محیط کشت تازه به حجم یک میلی‌لیتر رسید و سپس مقدار 300 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاصل با حجم مساوی از تریپان بلو مخلوط و به مدت 2 دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. تعداد سلول‌های زنده و مرده با لام هموسایتومتر بررسی و به صورت درصد بیان شد. در این روش، سلول‌های مرده به علت نفوذ پذیری به تریپان بلو، به رنگ آبی دیده شد. در این پژوهش درصد میانگین تعداد سلول‌های زنده و مرده با پنج بار تکرار محاسبه شد.

مقابل دوز و زمان تیمار بر قابلیت حیات سلول‌ها از روش آنالیز واریانس دوطرفه آزمون آنوای دو طرفه و برای مقایسه تفاوت میانگین قابلیت حیات سلول‌ها در دوزها و زمان‌های مختلف از آنالیز واریانس یک طرفه آزمون آنوای یک طرفه استفاده شد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آنالیز واریانس دو طرفه داده‌های به دست آمده از روش رنگ آمیزی تریپان بلو نشان داد که اثر متقابل و همزمان دوز مصرفی پارانونیل فنل و زمان تیمار باعث کاهش معنی‌دار توانایی حیات سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت شد ($p < 0/001$) (جدول 1).

آمیزی واکوئل‌های داخل سیتوپلاسمی توسط میکروسکوپ فلورسنس (اولیمپوس مدل IX70) انجام گردید (3، 12). پس از استخراج پروتئین توسط بافر حاوی 100 میلی مولار تریس، 1 درصد سدیم دو دسیل سولفات و بتا مرکاپتو اتانول و تعیین غلظت پروتئین‌ها توسط روش لاورى، پروفیل پروتئین سلول‌های تیمار شده با 100 میلی مولار پارانونیل فنل بعد از 36 ساعت با استفاده از الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دود سیل سولفات بر روی ژل 12 درصد با ولتاژ ثابت تعیین و سپس ژل الکتروفورز توسط کوماسی بلو رنگ آمیزی شد. باندهای پلی پپتیدی توسط نرم افزار ژن تولز (شرکت سینژن، انگلستان) آنالیز گردید.

با استفاده از نرم افزار SPSS برای تعیین اثر

جدول 1. مقایسه میانگین درصد توانایی حیات سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت پس از تیمار با دوزهای مختلف پارانونیل فنل و در زمان‌های متفاوت با استفاده از روش رنگ آمیزی تریپان بلو. مقادیر به صورت میانگین (انحراف معیار) می‌باشد. آزمون آنوای دو طرفه

P	48	36	24	12	زمان (ساعت)	دوز (μM)
0/001	93/67(3/78)	93/67(2/52)	95/33(1/15)	93/33(2/52)	0	0
	84/00(0/00)	93/00(2/00)	93/00(0/00)	93/00(3/00)	10	10
	48/00(2/64)	71/00(1/00)	87/33(0/58)	88/00(3/46)	50	50
	27/67(4/62)	52/33(2/08)	68/00(7/55)	76/33(1/53)	100	100
	11/67(1/15)	22/00(2/65)	23/00(3/46)	40/00(1/00)	150	150
	9/67(2/31)	14/33(2/08)	15/33(0/58)	20/33(2/08)	200	200
	3/00(1/00)	5/67(0/58)	5/67(1/53)	5/67(1/53)	250	250
0/001						* اثر متقابل دوز و زمان

اثر متقابل دوز و زمان در سطح $p < 0/001$ موجب کاهش درصد توانایی حیات سلول‌ها می‌گردد.

به بعد با گروه کنترل دارای تفاوت معنی‌دار بود (جدول 2). علاوه بر این آنالیز آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از روش متیل تiazول تترازولیم نشان داد که کاهش توانایی حیات سلول‌های مزانشیم مغز استخوان نیز وابسته به دوز و زمان تیمار بوده و نتایج حاصل از رنگ آمیزی تریپان بلورا تایید کرد (جدول 3 و 4).

مقایسه داده‌ها در روش آنالیز واریانس یک طرفه در دوزها برای زمان‌های مختلف نشان داد که میانگین قدرت حیات سلول‌ها در دوز 10 میکرومولار برای مدت زمان 48 ساعت با گروه کنترل (صفر میکرومولار) دارای تفاوت معنی‌دار شد ($p < 0/05$). دوز 60 میکرومولار در زمان 36 و 48 ساعت با گروه کنترل معنی‌دار بود ($p < 0/05$) و از دوز 100 میکرومولار و از زمان 12 ساعت

جدول 2. مقایسه میانگین درصد توانائی حیات سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت پس از تیمار با دوزهای مختلف پارانونیل فنل در هر یک از زمان‌های 12، 24، 36 و 48 ساعت با روش رنگ آمیزی تریپان بلو. مقادیر به صورت میانگین (انحراف معیار) می‌باشد. در هر ستون میانگین‌هایی که با کد حرف‌های متفاوت نامگذاری شده‌اند دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($p < 0/05$ آزمون توکی، آزمون آنوای یک طرفه)

زمان (ساعت)	12	24	36	48
دوز (میکرومولی)	0	0	0	0
	93/33 ^a (2/52)	95/33 ^a (1/15)	93/67 ^a ±(2/52)	93/67 ^a (3/79)
10	93/00 ^a (3/00)	93/00 ^a (0/00)	93/00 ^a (2/00)	84/00 ^b (0/00)
50	88/00 ^a (3/46)	87/33 ^a (0/58)	71/00 ^b (1/00)	48/00 ^c (2/64)
100	76/33 ^b (1/53)	68/00 ^b (7/55)	52/33 ^c (2/08)	27/67 ^d (4/62)
150	40/00 ^c (1/00)	23/00 ^c (3/46)	22/00 ^d (2/65)	11/67 ^e (1/15)
200	20/33 ^d (2/08)	15/33 ^c (0/58)	14/33 ^c (2/08)	9/67 ^{ef} (2/31)
250	5/67 ^e (1/53)	5/67 ^d (1/53)	5/67 ^f (0/58)	3/00 ^f (1/00)

جدول 3. مقایسه میانگین تعداد سلول‌های زنده (قابلیت حیات) مزانشیم مغز استخوان رت پس از تیمار با دوزهای مختلف پارانونیل فنل و در زمان‌های متفاوت با استفاده از روش متیل تیزول تترازولیموم. مقادیر به صورت میانگین (انحراف معیار) می‌باشند ($p < 0/05$ آزمون آنوای یک طرفه)

زمان (ساعت)	12	24	36	48
دوز (میکرو مول)	0	0	0	0
	72/16(1/86)	72/04(2/04)	72/11(1/76)	66/31(3/32)
10	70/21(2/37)	69/83(2/07)	68/94(0/51)	63/17(2/79)
50	65/79(2/29)	60/96(1/30)	51/53(2/33)	34/30(0/95)
100	58/38(1/07)	44/70(1/32)	40/50(4/38)	28/96(0/68)
150	26/94(0/48)	20/36(1/43)	12/76(0/98)	12/45(1/63)
200	16/07(0/49)	15/33(1/10)	10/96(0/46)	7/83(2/73)
250	14/15(0/68)	8/74(1/95)	6/46(1/02)	2/93(1/06)
				0/001

* اثر متقابل دز و

زمان

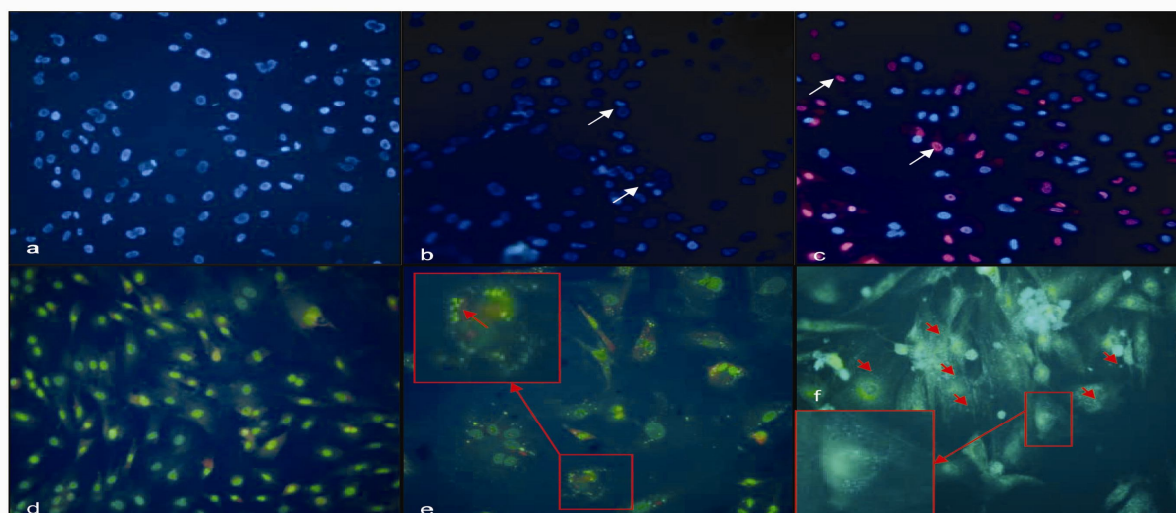
*چنانکه ملاحظه می‌شود اثر متقابل دز و زمان در سطح $p < 0/001$ موجب کاهش توانائی حیات سلول‌ها می‌گردد.

جدول 4. مقایسه میانگین تعداد سلول‌های زنده (قابلیت حیات) مزانشیم مغز استخوان رت پس از تیمار با دوزهای مختلف پارانونیل فنل در هر یک از زمان‌های 12، 24، 36 و 48 ساعت با روش متیل تیزول تترازولیموم. مقادیر به صورت میانگین (انحراف معیار) می‌باشد. در هر ستون میانگین‌هایی که با کد حرف‌های متفاوت نامگذاری شده‌اند دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($p < 0/05$ آزمون آنوای یک طرفه)

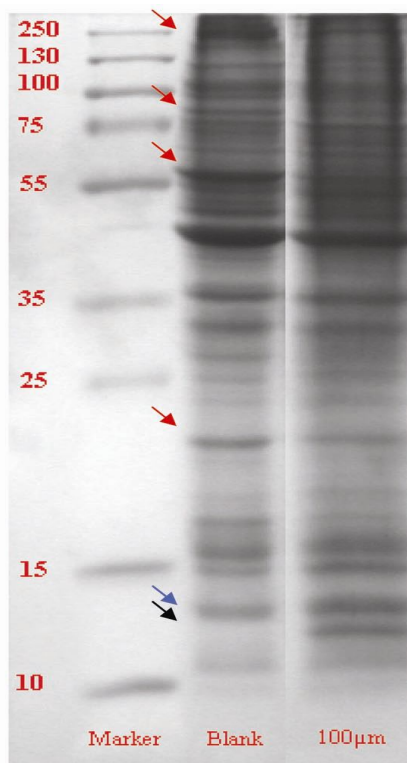
زمان (ساعت)	12	24	36	48
دوز (میکرو مول)	0	0	0	0
	72/17 ^a (1/87)	72/04 ^a (2/04)	72/11 ^a (1/76)	66/32 ^a (3/32)
10	70/21 ^a (2/37)	69/83 ^a (2/07)	68/94 ^a (0/51)	63/17 ^a (2/79)
50	65/79 ^b (2/29)	60/96 ^b (1/30)	51/53 ^b (2/33)	34/30 ^b (0/95)
100	58/38 ^c (1/07)	44/70 ^c (1/32)	40/50 ^c (4/38)	28/96 ^c (0/68)
150	26/94 ^d (0/48)	20/36 ^d (1/43)	12/76 ^d (0/98)	12/45 ^d (1/63)
200	16/07 ^e (0/9449)	15/34 ^e (1/00)	10/96 ^{de} (0/46)	7/83 ^{de} (2/73)
250	14/15 ^e (0/68)	8/74 ^f (1/95)	6/46 ^e (1/02)	2/93 ^c (1/06)

مرگ سلول‌ها در مقایسه با کنترل را نشان داد (شکل c-4). علاوه بر این رنگ آمیزی آکریدین اورانژ و منودنسیل کاداورین حضور واکوئل‌های متعدد در سیتوپلاسم (شکل 4-d) را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (شکل d-4).

تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها پس از تیمار با دوز 100 میکرومولار پارانونیل فنل در مدت زمان 24 ساعت با استفاده از رنگ فلوروسنت هوست شامل متراکم شدن و تغییر شکل هسته در مقایسه با گروه کنترل بود (شکل b-4). رنگ آمیزی پروپیدیم آیویدید افزایش تخریب غشاء و



شکل 4. رنگ آمیزی فلورسین سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز اسخوان رت تیمار شده با 100 میکرومولار پارانونیل فنل برای مدت زمان 24 ساعت. (a). سلول‌های کنترل (صفر میکرومولار) رنگ آمیزی شده با هوخست. (b) سلول‌های (تیمار شده) رنگ آمیزی شده با هوخست نشاندهنده تغییر شکل و متراکم شدن هسته (پیکان‌ها). (c) سلول‌های (تیمار شده) رنگ آمیزی همزمان هوخست و پروپیدییم آیوداید نشان دهنده سلول‌های زنده (آبی) و سلول‌های مرده (قرمز). (d) سلول‌های کنترل رنگ آمیزی شده با اکریدین اورانژ و (e و f) سلول‌های (تیمار شده) رنگ آمیزی شده با اکریدین اورانژ و مونودانسیل کاداورین برای نشان دادن واکوئل‌های داخل سیتوپلاسم (بخش‌های داخلی شکل‌های e و f بزرگ شده برای مشخص کردن واکوئل‌ها)



آنالیز ژل الکتروفورز نشان داد که تیمار سلول‌ها با

دوز 100 میکرومولار پارانونیل فنل به مدت 24 ساعت باعث

تغییر در چند باند پلی پپتیدی گردید. باندهای با وزن

ملکولی 243/71، 77/95، 55/47 و 21/06 کیلو دالتون (با

رنگ قرمز نشان داده شده است) دچار کاهش قابل توجهی

نسبت به گروه سلول‌های کنترل شد. در حالی که باند پلی

پپتیدی با وزن ملکولی 12/96 کیلو دالتون دستخوش افزایش

گردید. علاوه بر این تیمار 100 میکرومولار پارانونیل فنل

موجب ظاهر شدن یک باند پلی پپتیدی جدید با وزن

ملکولی حدود 12/07 کیلو دالتون در سلول‌های تیمار شده

گردید (شکل 5).

شکل 5. آنالیز پروفایل پروتئینی سلول‌های مزانشیمی در گروه‌های کنترل و تیمار شده با 100 میکرومولار پارانونیل فنل در مدت زمان 24 ساعت به وسیله نرم افزار Gene tools. پیکان‌ها معرف باندهای تغییر یافته می‌باشد. پیکان قرمز (باندهای کاهش یافته در گروه تیمار)، پیکان آبی (باند افزایش یافته در گروه تیمار) و پیکان سیاه (نشان دهنده باند جدید ظاهر شده در گروه تیمار). وزن ملکولی مارکرها به کیلو دالتون می‌باشد. مقدار پروتئین قرار داده شده بر روی هر چاهک 150 میکرو گرم می‌باشد.

بحث

رادیکال‌های آزاد اکسیژن نیز می‌تواند به عنوان دلیل دیگری بر افزایش مرگ و میر در سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت توسط پارانونیل فنل در نظر گرفته شود. علاوه بر این تخریب غشا تنها به غشاء سلول منتهی نمی‌شود، بلکه غشای ارگانل‌های داخل سلول مانند میتوکندری، رتیگولو آندوپلاسمیک و غیره نیز در حضور رادیکال‌های آزاد اکسیژن صدمه می‌بیند و صدمات وارده به این ارگانل‌ها می‌تواند خود عامل بروز مرگ سلولی نیز باشد (19، 20). از طرفی حضور واکوئل‌های متعدد در سیتوپلاسم سلول‌های تیمار شده با پارانونیل فنل ممکن است دلیلی بر وقوع مرگ سلولی از نوع اتوفازی باشد (21). البته بر اساس نتایج تحقیقات سایر محققین وقوع همزمان آپوپتوزیس و اتوفازی به عنوان عامل مرگ سلولی مورد تایید قرار گرفته است (21، 22). لذا می‌توان در ادامه این تحقیق، مکانیزم‌های دخیل در مرگ این سلول‌های را در اثر تیمار با پارانونیل فنل مورد بررسی بیشتر قرار داد.

مطالعات نشان داده است که تیمار با پارانونیل فنل باعث تغییر در پروفیل پروتئین‌ها در سلول‌های بنیادی عصبی شده است (3). علاوه بر این کاهش فعالیت آنزیم‌های متعددی مانند سوپر اکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز در اثر تیمار با پارانونیل فنل نیز گزارش شده است (23). در مطالعه حاضر تغییرات متعددی از قبیل کاهش، افزایش و یا حتی بروز و ظهور یک باند جدید در پروفیل پروتئینی سلول‌های مزانشیم تیمار شده با پارانونیل فنل مشاهده شد که تشخیص نوع، فعالیت و جایگاه سلولی این باندهای پروتئینی تغییر یافته نیازمند مطالعات بیشتری است. در تایید این که پارانونیل فنل می‌تواند باعث تغییراتی در باندهای پروتئینی شود می‌توان به گزارش تغییر در پروتئین‌های دخیل در حیات و چرخه سلول اشاره کرد (3). از طرفی سایر تحقیقات نشان داده که تیمار ماهی‌ها با پارانونیل فنل باعث ظهور پروتئین ویتالوجنین در گونه نر می‌گردد (24). پروتئین ویتالوجنین یک پروتئین وابسته به جنس ماده بوده و دارای وزن ملکولی 200 تا 700 کیلو دالتون در گونه‌های مختلف مهره داران می‌باشد (25). در مطالعه حاضر افزایش و کاهش

چنانکه داده‌ها نشان داد کاهش میانگین تعداد و درصد توانایی حیات سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت وابسته به دوز و زمان تیمار بود. در زمان 12 ساعت 150 میکرومولار از پارانونیل فنل باعث کاهش 50 درصد از توانایی حیات شد در حالی که این مقدار کاهش توانایی در زمان 36 ساعت توسط 100 میکرومولار و در زمان 48 ساعت توسط 50 میکرومولار از پارانونیل فنل مشاهده شد. کیم و همکاران در سال 2006 وابستگی کاهش توانایی حیات به دوز و زمان تیمار با پارانونیل فنل را نیز در سلول‌های بنیادی جنینی گزارش کردند (8). با توجه به استفاده روز افزون انسان از پارانونیل فنل، حضور این ماده شیمیایی در شیر و خون انسان گزارش شده است، از طرفی این آلاینده زیست محیطی با خاصیت آنگریزی تمایل به انباشته شدن در بافتها را نیز دارد (1، 13، 14) لذا بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق در صورت تماس دراز مدت با این آلاینده سلول‌های مزانشیم مغز استخوان به عنوان یک ذخیره حیاتی می‌تواند مورد تحدید جدی قرار بگیرند. همچنین به دنبال تیمار با 100 میکرومولار پارانونیل فنل در مدت زمان 24 ساعت تغییرات مورفولوژیک از قبیل تغییر شکل و تراکم هسته، واکوئل دار شدن سیتوپلاسم از شواهد وقوع آپوپتوزیس در این سلول‌ها و همچنین افزایش مرگ و میر نیز مشاهده شد. از آنجائی که سایر تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که پارانونیل فنل، آپوپتوزیس را در رده‌های سلولی گوناگون مثل تیموسیت، PC12 و سرتولی القا می‌کند (17-15). بنابراین تغییرات مورفولوژیک مشاهده شده در تحقیق حاضر می‌تواند به دلیل القاء آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت توسط پارانونیل فنل باشد که افزایش مرگ سلولی را در این سلول‌ها موجب شده است. تحقیقات نشان داده است که پارانونیل فنل علاوه بر القاء آپوپتوزیس، توانایی تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را نیز داشته و می‌تواند با اکسید کردن اسیدهای چرب غیر اشباع در غشای سلول، باعث بهم ریختگی در تمامیت غشا شده و منجر به مرگ سلول شود (5، 18). لذا تولید

5. Okai Y, Sato E, Higashi-Okai K, Inoue M. Enhancing effect of the endocrine disruptor para-nonylphenol on the generation of reactive oxygen species in human blood neutrophils. *Environ Health Perspect*. 2004 Apr;112(5):553-6.
6. Bosch P, Pratt S, Stice S. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biol Reprod*. 2006 Jan;74(1):46-57.
7. Minguell J, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2001 Jun;226(6):507-20.
8. Kim S, Kim B, Shim J, Gil J, Yoon Y, Kim J. Nonylphenol and octylphenol-induced apoptosis in human embryonic stem cells is related to Fas-Fas ligand pathway. *Toxicol Sci*. 2006 Dec; 94(2):310-21.
9. Eslaminejad M, Salami F, Mehranjani M, Abnoosi M, Eftekhari-Yazdi P. BIO Treatment Protects Rat Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Culture Against the TNF- Induced Apoptosis. *Yakhteh Medical Journal*. 2009; 11(1): 35-42.
10. Eslaminejad M, Nazarian H, Taghiyar L. Mesenchymal Stem Cell Isolation from the Removed Medium of Rat's Bone Marrow Primary Culture and their Differentiation into Skeletal Cell Lineages. *Yakhteh Medical Journal*. 2008;10(1):65-72.
11. Vistica D, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd M. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*. 1991 May; 51(10): 2515-20.
12. Niemann A, Takatsuki A, Elsässer H. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. *J Histochem Cytochem*. 2000 Feb;48(2):251-8.
13. Ademollo N, Ferrara F, Delise M, Fabietti F, Funari E. Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environ Int*. 2008 Oct; 34(7): 984-7.
14. Chen M, Chang C, Shen Y, Hung J, Guo B, Chuang H, et al. Quantification of prenatal exposure and maternal-fetal transfer of nonylphenol. *Chemosphere*. 2008 Aug;73(1 Suppl): S239-45.

در تراکم باندهای پلی پتیدی موجود در پروفیل پروتئینی با اوزان ملکولی مختلف مشاهده شد. علاوه بر این، بیان یک پروتئین جدید با وزن ملکولی 12/07 کیلو دالتون که شاید بتوان از آن به عنوان پروتئین وابسته به مرگ نام برد، نیز بسیار مشهود بوده است.

این تحقیق نشان داد که آلودگی با پارا نونیل فنل باعث کاهش توانایی حیات، تغییرات مورفولوژیکی از قبیل متراکم شدن هسته، حضور واکوئل‌ها در سیتوپلاسم و تغییر در پروفیل پروتئینی سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت گردید. با توجه به کاربردهای متنوع پارا نونیل فنل و اهمیت موضوع پیشنهاد می‌گردد تحقیقات بیشتری برای مطالعه اثرات مختلف توکسیسته این آلاینده زیست محیطی بر سلول‌های بنیادی صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر نتیجه طرح پژوهشی در قالب پایان نامه دانشجویی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه اراک می‌باشد. بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک جهت پشتیبانی مالی از این طرح پژوهشی تشکر می‌نماید.

منابع

1. Vazquez-Duhalt R, Marquez-Rocha F, Ponce E, Licea A, Viana M. Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Applied Ecology and Environmental Research*. 2005; 4(1): 1-25.
2. Zalko D, Costagliola R, Dorio C, Rathahao E, Cravedi J. In vivo metabolic fate of the xeno-estrogen 4-n-nonylphenol in Wistar rats. *Drug Metab Dispos*. 2003 Feb;31(2):168-78.
3. Kudo C, Wada K, Masuda T, Yonemura T, Shibuya A, Fujimoto Y, et al. Nonylphenol induces the death of neural stem cells due to activation of the caspase cascade and regulation of the cell cycle. *J Neurochem*. 2004 Mar; 88(6): 1416-23.
4. Wang J, Liu C, Lin K, Chou C, Hsieh C, Chang C, et al. Nonylphenol-induced Ca²⁺ elevation and Ca²⁺-independent cell death in human osteosarcoma cells. *Toxicol Lett*. 2005 Dec; 160(1): 76-83.

15. Aoki M, Kurasaki M, Saito T, Seki S, Hosokawa T, Takahashi Y, et al. Nonylphenol enhances apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells. *Life Sci.* 2004 Mar; 74(18): 2301-12.
16. Wang X, Han X, Hou Y, Yao G, Wang Y. Effect of nonylphenol on apoptosis of Sertoli cells in vitro. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2003 May;70(5):898-904.
17. Yao G, Hu Y, Liang J, Hou Y. Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis is related to Fas/FasL pathway. *Life Sci.* 2005 Nov;77(26):3306-20.
18. Mehranjani M, Noorafshan A, Momeni H, Abnosi M, Mahmoodi M, Anvari M, et al. Stereological study of the effects of vitamin E on testis structure in rats treated with para-nonylphenol. *Asian J Androl.* 2009 Jul; 11(4): 508-16.
19. Lehotsky J, Kaplan P, Racay P, Matejovicova M, Drgova A, Mezesova V. Effect of Oxidative Stress on the Membrane Ion Transport Systems in the Rodent Brain. *Internet World Congress on Biomedical Sciences at McMaster University; Dec 7-16th; Canada*1998.
20. Ferri K, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol.* 2001 Nov;3(11):E255-63.
21. González-Polo R, Boya P, Pauleau A, Jalil A, Larochette N, Souquère S, et al. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci.* 2005 Jul;118(Pt 14):3091-102.
22. Shao Y, Gao Z, Marks P, Jiang X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec;101(52):18030-5.
23. Chitra K, Latchoumycandane C, Mathur P. Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. *Arch Toxicol.* 2002 Sep;76(9):545-51.
24. Christensen L, Korsgaard B, Bjerregaard P. The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus*. *Aquatic Toxicology.* 1999;46(3-4):211-9.
25. Won S, Novillo A, Custodia N, Rie M, Fitzgerald K, Osada M, et al. The freshwater mussel (*Elliptio complanata*) as a sentinel species: vitellogenin and steroid receptors. *Integrative and Comparative Biology.* 2005; 45(1): 72.