Physiology and Pharmacology, 15 (3), 308-317
Autumn 2011 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

The effect of long term treatment of lowest effective dose of para-nonylphenol on viability, morphology and proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells

Mohammad Hossein Abnosi*, Malek Soleimani Mehranjani, Seyed Mohammad Ali Shariatzadeh, Majid Mahdiyeh Najafabadi, Leila Dehdehi

Dept. Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

Received: 7 Aug 2011 **Accepted: 9 March 2011**

Abstract

Introduction: In this study, the effect of para-nonylphenol as an environmental pollutant on viability, morphology and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells was investigated.

Methods: Bone marrow mesenchymal stem cells of rat were treated with the 0.5, 1, 2.5, 3.5 and 5 μM of para-nonylphenol for a period of 21 days, then the viability of the cells were estimated using trypan blue and MTT methods. After choosing the effective dose, the integration of the DNA was investigated using comet assay and agarose gel electrophoresis. Mechanisms of cell death were also investigated by TUNEL assay and presence of caspase activity.

Results: The results showed that para-nonylphenol caused significant dose dependent reduction of viability and proliferation of the cells. Comet assay, agarose gel electrophoresis and TUNEL test showed that the DNA of the cells were damaged and broken after treatment with 0.5 and 2.5 μM of para-nonylphenol. In addition, activated caspase-3 was observed in the cytoplasm of treated cells.

Conclusion: This study showed that a very low concentration of para-nonylphenol has drastic effects on bone marrow mesenchymal stem cells. This chemical is used in formulation of cosmetics and detergents and therfore may have detrimental effects on the viability and proliferation of stem cells.

Key words: apoptosis, caspase, mesenchymal stem cells, para-nonylphenol, TUNEL

* Corresponding author e-mail: Abnosi2002@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۵ (۳)، ۳۰۸ – ۳۱۷
پاییز ۱۳۹۰

فیزیولوژی و فارماکولوژی

اثر طولانی مدت کمترین دوز موثر پارا–نونایل فنل بر توانایی زیستی، مورفولوژی و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت

محمد حسین آبنوسی*، ملک سلیمانی مهرنجانی، سید محمد علی شریعت زاده، مجید مهدیه نجف آبادی، لیلا دهدهی
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک

دریافت: ۱۱ اردیبهشت ۹۰ پذیرش: ۱۶ مرداد ۹۰

چکیده

مقدمه: در این پژوهش اثر پارانونایل فنل به عنوان یکی از آلاینده های زیست محیطی بر توانایی زیستی، مرفولوژی و میزان تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان مورد بررسی قرار گرفت.

روش ها: سلول ها با غلظت های ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۳/۵ و ۵ میکرومولار از پارانونایل فنل به مدت ۲۱ روز کشت داده و میزان بقا و توانایی زیستی سلول ها با تست رنگ آمیزی تریپان بلو و MTT بررسی شد. پس از یافتن دوز موثر، مرفولوژی سلولها توسط رنگ آمیزی فلورسنت، سلامت DNA با تست کامت و الکتروفورز ارزیابی و مرگ سلولی با تست TUNEL و کاسپاز بررسی گردید.

یافته ها: نتایج نشان داد که پارانونایل فنل باعث کاهش معنی دار توان زیستی سلول ها و تکثیر آنها بصورت وابسته به دوز شد. بررسیهای مورفولوژیک، انجام تست کامت و ژل الکتروفورز DNA و مثبت شدن تست TUNEL، تخریب و قطعه قطعه شدن DNA را نشان داد. همچنین مثبت شدن تست کاسپاز-۳ فعال، بیان گر نوع مرگ سلولی برنامه ریزی شده وابستگی به کاسپاز بود.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که پارانونایل فنل به عنوان یک آلاینده زیست محیطی و گزنواستروژن، حتی در مقادیر بسیار کم در مدت زمان طولانی، اثرات سمی بر روی سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان دارد. بنابراین با توجه به مصرف مقادیر کم این آلاینده زیست محیطی بعنوان سورفاکتانت در فرمولاسیون مواد آرایشی و مواد شوینده ممکن است در صورت استفاده مداوم و طولانی مدت توانائی زیستی سلولهای بنیادی را در معرض خطر قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز سلول های بنیادی مزانشیم، کاسپاز، تانل، پارانونایل فنل

مقدمه

سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرائی سلول های پرتوانی بوده که به راحتی تخلیص و تکثیر شده و توانایی تمایز به انواعی از سلول ها را نظیر سلول های استخوانی، غضروفی و چربی دارا می باشند و می توان از آنها در پیوندهای اتولوگ استفاده کرد. این سلول ها علاوه بر مغز استخوان در بافت هایی نظیر بافت چربی، پرده سینویال و عضله اسکلتی نیز یافت می شوند [۱۱،۶،۵]. از آنجا که سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در تماس مستقیم با خون محیطی بوده و همچنین پتانسیل تمایز و توان تکثیر برای مدت طولانی آنها سبب شده است که این سلول بنیادی یک انتخاب مناسب برای بررسی اثر مواد سمی بر روی خواص بنیادین، تکثیر و تمایز آنها باشند [۱۱].

پارانونایل فنل با خاصیت استروژنیک بعنوان آلاینده زیست

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: abnosi2002@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

محیطی مطرح بوده [۱۶] و مهمترین متابولیت دترژنت های آلکیل فنل پلی اتوکسیلات ها می باشد که در پلی وینیل کلراید و پلی استیرن هایی که در صنایع بسته بندی غذایی کاربرد دارند، موجود می باشند. علاوه بر این پارا نونایل فنل به عنوان سورفکتانت غیریونی کاربرد وسیعی را در صنایعی مانند شوینده ها و مواد آرایشی دارد [۱۴]. همچنین از پارا–نونایل فنل در صنایع رنگ سازی، ذوب فلزات، چرم سازی، کاغذ سازی و غیره استفاده می گردد که بدنبال آن پساب این صنایع موجب آلودگی آبهای سطحی و زیر زمینی به پارا نونایل فنل می گردد [۳]، که این خود باعث آلوده شدن جانوران دریائی که غذای بخش عظیمی از انسانها را تشکیل می دهند می گردد [۹].

این ترکیب شیمیائی به دلیل خاصیت آبگریزی می تواند در بافت های چربی ماهی ها جذب شده و سپس از طریق زنجیره غذایی به عنوان تهدیدی بزرگ در سلامت انسان و حیوانات به شمار آید [۱۲,۹]. آبنوسی و همکاران در مطالعه پیشین نشان دادند که پارا– نونایل فنل باعث کاهش توانائی حیات بصورت وابسته به دوز شده و دوز ۱۰۰ میکرومولار آن در مدت زمان ۲۴ ساعت باعث تغییرات موفولوژیک در هسته و سیتوپلاسم و همچنین تغییر در نمایه پروتئینی سلولهای مزانشیم مغز استخوان شد [۱]. اخیراً حضور پارا–نونایل فنل در نمونه پلاسمای انسانی و شیر مادران به ترتیب ۲۶ و۱۲۰۰ نانو مولار گزارش شده است [۱۵]، لذا در این مطالعه به اثر دوزهای بسیار پایین (در حد نانو مولار) این آلاینده برای مدت زمان طولانی بر توانایی زیستی سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان و مکانیزم مرگ سلولی پرداخته شده است.

مواد و روش ها

پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه اراک و رعایت اصول اخلاقی، موش های صحرائی نژاد ویستار به کمک دی اتیلن اتر بیهوش شده، استخوان های ران و ساق پای آن ها جدا و سپس بافت های پیوندی اطراف استخوان ها به طور کامل پاک گردید. استخوان ها در محیط کشت کامل (DMEM حاوی ۱۵٪ سرم FBS) در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفته، به زیر هود لامینار منتقل شد. دو سر استخوان با قیچی استریل قطع و مغز استخوان با عمل فلاشینگ خارج و به داخل لوله فالکون حاوی محیط کشت کامل هدایت و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰rpm سانتریفیوژ شد. محیط رویی خارج و رسوب سلولی در یک میلی لیتر محیط تازه معلق گردید و در فلاسک T25 کشت و در انکوباتور CO_2 دار (دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ، ۵٪ CO_2) آنکوبه گردید. بعد از ۲۴ ساعت محیط رویی که دارای سلول های غیرچسبنده بود، خارج شده و شستشوی سلول ها با PBS^+ انجام گردید. سپس به مدت ۱۴ روز هر سه روز یکبار محیط سلول ها تعویض گردید. زمانی که کف فلاسک به تراکم بالایی از سلول رسید، سلول ها با کمک Trypsin/EDTA (کلیه مواد مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شده است مگر در موارد ذکر شده) از کف فلاسک جدا و به فلاسک های جدید منتقل شدند. برای بدست آوردن خلوص بالایی از این سلول ها سه مرحله پاساژ تکرار شد.

برای بررسی تاثیر پارانونایل فنل بر بقا و توانایی زیستی سلول ها و یافتن دوز موثر، سلول های پاساژ سوم با تراکم ۵۰۰۰ سلول در هرخانه پلیت ۶ خانه و با تراکم ۱۰۰۰ سلول در پلیت ۱۲ خانه کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت تحت تیمار با غلظتهای ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۳/۵ و ۵ میکرومولار از پارانونایل فنل به مدت ۲۱ روز قرار گرفته و تعویض محیط کشت هر سه روز یک بار انجام گرفته و در پایان این مدت درصد بقای سلولی با دو روش تریپان بلو و MTT مورد بررسی قرار گرفت. در روش تریپان بلو، سلول ها پس از دو بار شستشو با PBS^-، تریپسین زنی شده و با افزودن محیط کشت کامل، به نسبت ۱:۱ تریپان بلو ۰/۴ درصد به هر خانه اضافه گردید و با استفاده از لام نئوبار تعداد سلول های آبی رنگ (سلول های مرده) و سلول های بی رنگ (سلول های زنده) شمارش شد و با استفاده از رابطه زیر [۱۱] درصد توانایی

$$\text{درصد توانایی زیستی} = \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{تعداد سلول های کل}} \times ۱۰۰$$

زیستی سلول های هر دوز معلوم گردید.

در تست متیل تیازول تترازولیوم (MTT) فعالیت آنزیم

دهیدروژناز میتوکندری سلولی و نهایتا میزان احیای نمک تترازولیوم که شاخصی از رشد و بقای سلولی است مورد بررسی قرار می گیرد. برای انجام این تست سلول های تیمار شده پس از ۲۱ روز دوبار با PBS^{-} شستشو داده شده و به آنها محیط کشت حاوی MTT در تاریکی اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در آنکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد، انکوبه شد. پس از آن محیط رویی به آرامی حذف گردیده و به کریستال های فورمازان حاصل، محلول DMSO اضافه شد و جذب نوری محلول حاصله با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد. لازم به ذکر است که هر آزمایش سه بار تکرار گردید [۲]. پس از بررسی میزان بقا و توانایی زیستی با غلظت های متفاوت پارانونایل فنل (مرحله دوزیابی) دوز ۰/۵ و ۲/۵ میکرومولار انتخاب و مابقی تست ها با آن ها انجام گردید.

برای بررسی توان کلنی زایی، سلول های پاساژ سوم با تراکم۴۰ $cell/cm^2$ در پلیت های تک خانه، به مدت ۱۴،۷ و ۲۱ روز کشت شد. در پایان این مدت، کشت سلول ها دو بار با PBS شسته شد و با رنگ کریستال ویولت به مدت به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی گردید. کلنی های تشکیل شده در گروه کنترل و تیمار در زیر میکروسکوپ مشاهده و شمارش گردید و قطر کلنی ها نیز اندازه گیری شد.

برای بررسی میزان دوبرابرشدگی جمعیت (population doubling number)، تعداد سلول ها در آغاز و پایان دوره هر مرحله از کشت (روز ۵ ،۱۰، ۱۵و ۲۱) محاسبه شد و با استفاده از فرمول : $3.31\times\log N_1/N_2$ (N_1 تعداد سلول در آغاز کشت و N_2 تعداد سلول در پایان کشت)، محاسبه گردید [۷].

پس از کشت و تیمار ۲۱ روزه با دوزهای ۰/۵ و ۲/۵ میکرومولار رنگ آمیزی کروماتین با هوخست (۱µg/ml) جهت بررسی مورفولوژی هسته و همچنین برای بررسی تغییرات رخ داده در مورفولوژی سیتوپلاسم از رنگ فلورسنس اکریدین اورانژ (۰/۰۱gr/ml) استفاده شد. سپس جهت بررسی مورفولوژی سلول ها از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus IX70) استفاده گردید.

برای بررسی سلامت DNA هسته سلول های تیمار شده با پارانونایل فنل، از تست کامت استفاده شد. این تست بر اساس حرکت DNA در میدان الکتریکی انجام می شود. اگر DNA در اثر عوامل محیطی مختلف دچار شکست و قطعه قطعه شدن شده باشد به دلیل اختلاف سرعت حرکت قطعات DNA با طول مختلف در میدان الکتریکی، اطراف هسته سلول ها هاله یا دنباله ای دیده می شود و هرچه این تخریب شدیدتر باشد، هاله بزرگ تر و کشیده تری حول هسته تشکیل خواهد شد. برای انجام این تست ابتدا مخلوط سوسپانسیون سلولی گروه کنترل و تیمار با تراکم ۲۰۰ هزار سلول در هر میلی لیتر محلول ۱ درصد آگارز با دمای ذوب پایین تهیه شد. این سوسپانسیون بر روی اسلایدهای میکروسکوپی مفروش شده با آگارز نرمال ۱/۵ درصد گذاشته شد و پس از لامل گذاری اسلایدها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد آنکوبه شدند. سپس لامل از روی اسلایدها به آرامی برداشته شد و اسلاید میکروسکوپی در بافر لیز حاوی Nacl 2.5 M, EDTA 0.1 mM, Tris-base 10 Mm, NaSLS 1% با PH=۱۰ به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد. پس از آن اسلایدها در بافر الکتروفورز حاوی NaOH 300 mM, EDTA 1Mm با PH =۱۳ با جریان ۳۰۰ آمپر به مدت ۲۰ دقیقه الکتروفورز گردید. در نهایت نمونه در بافر خنثی کننده حاویTris base0.4M که با Hcl به PH =۷/۵ رسیده بود، شستشو داده شده و پس از رنگ امیزی با اتیدیوم بروماید به کمک میکروسکوپ Olympus مشاهده و عکسبرداری گردید.

برای بررسی سلامت DNA پس از استخراج ژنوم از سلول های مزانشیم مغز استخوان تیمار شده بر طبق دستورالعمل کیت سیناژن، از ژل آگارز ۱/۵ درصد برای الکتروفورز استفاده شد و پس از بارگذاری نمونه ها، الکتروفورز با شدت جریان ۴۰۰ میلی آمپر و اختلاف پتانسیل ۷۰ ولت در مدت ۶۰ دقیقه در حضور مارکر (Fermentas, #SM1153) انجام شد. بعد از گذشت زمان مورد نظر، برای مشاهده باندها بر روی ژل از دستگاه ژل داک استفاده و باندهای مربوط به DNA شکسته شده با نردبان DNA مشاهده گردید. با استفاده از کیت TUNEL و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Roche, Germany, Lot # 13965100) مرگ سلولی در سلولهای تمیار شده مورد بررسی قرار گرفت. به طور خلاصه، سلول های تیمار شده با فرمالدئید ۴ درصد در PBS^{-} در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت فیکس شدند و پس از شستشو با PBS^{-} در آب اکسیژنه ۳ درصد در متانول

به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و پس از شستشو با PBS^- به مدت ۵ دقیقه در محلول تریتون-X 100 در دمای ۴ درجه سانتیگراد و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه در محلول تانل آنکوبه شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در محلول DAB در تاریکی قرار گرفتند. پس از آن سلول ها با میکروسکوپ نوری مشاهده گردیدند. در این رنگ آمیزی سلول های آپوپتوزی با هسته های قهوه ای رنگ مشخص گردیدند. همچنین جهت یافتن وابستگی مسیر آپوپتوزیس به کاسپازها از کیت کاسپاز ۳- فعال (Chemicon, Germany, Lot # 0605029945) بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید و در پایان سلول ها با رنگ هماتوکسیلین رنگ آمیزی شدند. با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و تست Tukey داده های بدست آمده تجزیه و تحلیل شد و تفاوت میانگینها در سطح $p<0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این مطالعه نشان داده شد که تیمار با پارانونایل موجب کاهش معنی دار ($p<0.05$) در توانایی زیستی سلول ها مزانشیم مغز استخوان موش صحرائی بصورت وابسته به دوز می گردد (جدول ۱). همان گونه که در جدول ۱ آمده است، تیمار ۲۱ روزه با غلظت های ۰/۵ تا ۵ میکرومولار پارانونایل فنل موجب کاهش معنی دار ($p<0.05$) در توانایی زیستی سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان در هر دو روش رنگ آمیزی تریپان بلو و MTT گردید.

نتایج تعداد کلونی (جدول ۲) و قطر آنها (جدول ۳) نشان داد که تا روز ۷ تفاوت معنی داری بین گروهای تیمار و کنترل وجود ندارد. این درحالی است که میانگین تعداد کلونیها در نمونه های تیمار شده در روز ۱۴ در مقایسه با گروه کنترل بصورت وابسته به دوز کاهش معنی داری ($p<۰/۰۵$) را نشان داد که این کاهش نیز در روز ۲۱ بخوبی مشخص است.

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول ها و تعداد سلول‌های مزانشیم زنده پس از تیمار ۲۱ روزه با دوزهای مختلف پارانونایل فنل با روش رنگ آمیزی تریپان بلو و آزمون MTT. مقادیر به صورت means ±sd می باشد. تفاوت میانگین‌ها در سطح $p<0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. میانگین های با کد حرفهای متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی دار می باشد (one way ANOVA, Tukey test, $p<0.05$).

Doses (µM)	Trypan blue staining (percent of the viable cells)	MTT assay (Number of the viable cells)
0	$94.25^{a} \pm 1.25$	$22137.50^{a} \pm 1307.74$
0.5	$83.00^{b} \pm 1.41$	$12031.25^{b} \pm 1107.62$
1	$82.00^{b} \pm 0.81$	$11306.25^{c} \pm 634.22$
2.5	$71.75^{c} \pm 3.59$	$10118.75^{c} \pm 94.37$
3.5	$58.25^{d} \pm 2.21$	$7012.50^{d} \pm 225.35$
5	$45.75^{e} \pm 6.39$	$6268.75^{e} \pm 1123.49$

جدول ۲- مقایسه میانگین تعداد کلونی های تشکیل شده توسط سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در روزهای ۷، ۱۴و ۲۱ پس از تیمار با پارانونایل فنل (۰/۵ و ۲/۵ میکرومولار). مقادیر به صورت means ±sd می باشد. میانگین های با کد حرفهای متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی دار می باشد (one way ANOVA, Tukey test, $p<0.05$).

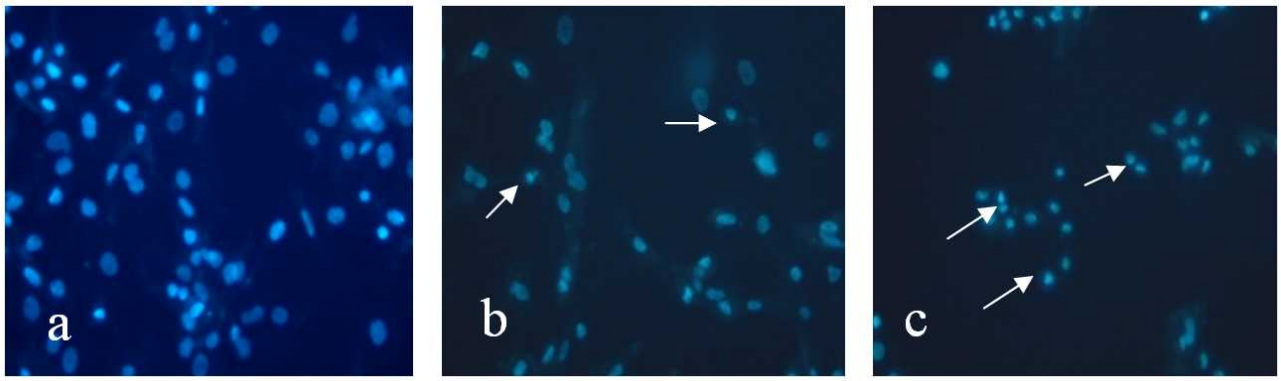
Doses (µM)	Number of the colonies (day 7)	Number of the colonies (day 14)	Number of the colonies (day 21)
0	$6.67^{a} \pm 0.57$	$50.33^{a} \pm 2.51$	$63.33^{a} \pm 5.68$
0.5	$6.67^{a} \pm 0.57$	$43.67^{b} \pm 2.30$	$50.00^{b} \pm 4.35$
2.5	$6.00^{a} \pm 0.00$	$35.00^{c} \pm 1.00$	$32.00^{c} \pm 2.00$

جدول ۳- مقایسه میانگین قطر کلونی های (میلی متر) تشکیل شده توسط سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در روزهای ۷، ۱۴و ۲۱ پس از تیمار با پارانونایل فنل (۰/۵ و ۲/۵ میکرومولار). مقادیر به صورت means ±sd می باشد. میانگین های با کد حرفهای متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی دار می باشد (one way ANOVA, Tukey test, $p<0.05$).

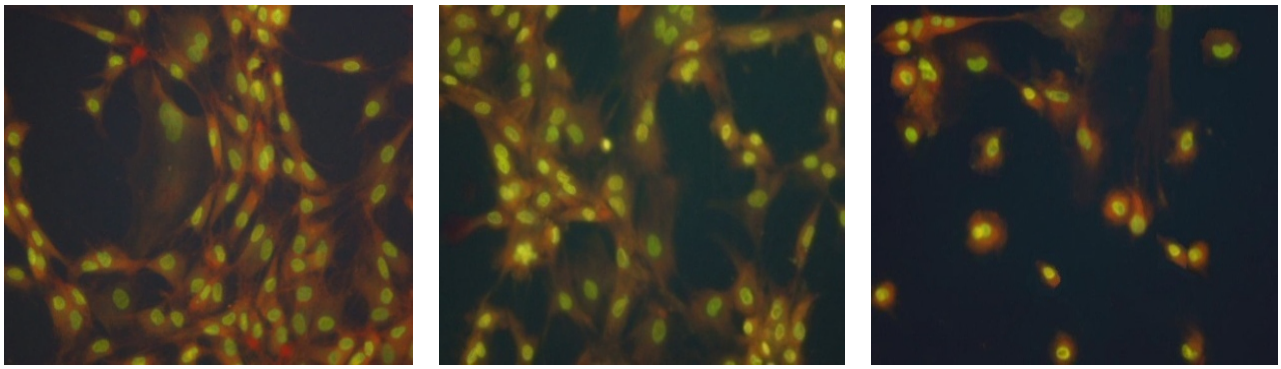
Doses (µM)	Diameter (mm) of the colonies (day 7)	Diameter (mm) of the colonies (day 14)	Diameter (mm) of the colonies (day 21)
0	$1.120^{a} \pm 0.127$	$2.170^{a} \pm 0.063$	$2.224^{a} \pm 0.066$
0.5	$1.018^{a} \pm 0.127$	$2.157^{a} \pm 0.089$	$2.084^{b} \pm 0.052$
2.5	$1.120^{a} \pm 0.071$	$2.221^{a} \pm 0.093$	$1.843^{c} \pm 0.043$

جدول ٤- مقایسه میانگین تعداد دوبرابرشدگی جمعیت سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۱ پس از تیمار با پارانونایل فنل (۰/۵ و ۲/۵ میکرومولار). مقادیر به صورت means ±sd می باشد. میانگین های با کد حرفهای متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی دار می باشد (one way ANOVA, Tukey test, $p<0.05$).

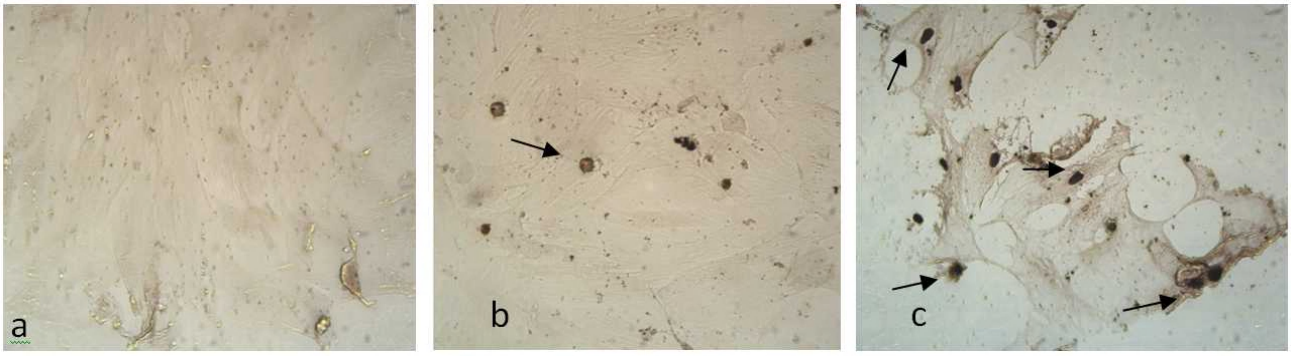
Doses (µM)	Population doubling number (day 5)	Population doubling number (day 10)	Population doubling number (day 15)	Population doubling number (day 21)
0	$1.08^{a} \pm 0.06$	$1.55^{a} \pm 0.12$	$1.91^{a} \pm 0.05$	$2.11^{a} \pm 0.10$
0.5	$0.93^{a} \pm 0.08$	$1.49^{a} \pm 0.08$	$1.63^{a} \pm 0.09$	$1.44^{b} \pm 0.04$
2.5	$1.07^{a} \pm 0.13$	$0.99^{b} \pm 0.07$	$0.90^{b} \pm 0.07$	$0.79^{c} \pm 0.15$



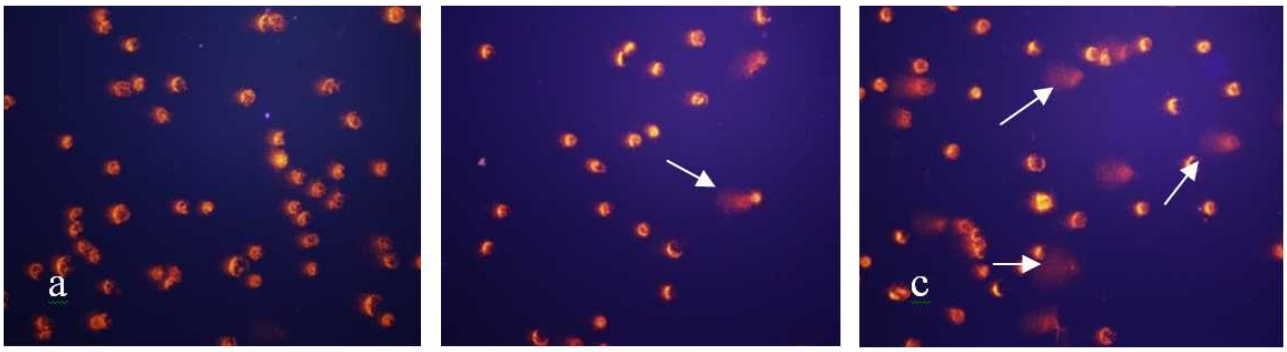
شکل ۱- رنگ آمیزی فلورسنس سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با رنگ هوخست پس از ۲۱ روز تیمار با پارانونایل فنل. a) سلول‌های کنترل b) دوز ۰/۵ میکرومولار c) دوز ۲/۵ میکرومولار از پارانونایل فنل (بزرگ نمایی ۲۰x) (پیکان ها، فشردگی کروماتین را در هسته سلولهای تیمار شده نشان می دهد).



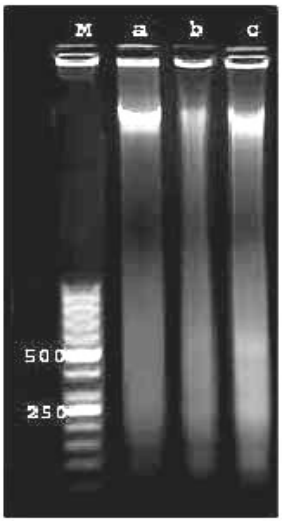
شکل ۲- رنگ آمیزی آکریدین اورنژ سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت پس از ۲۱ روز تیمار با پارانونایل فنل a) سلول‌های کنترل b) دوز ۰/۵ میکرومولار c) دوز ۲/۵ میکرومولار از پارانونایل فنل (بزرگ نمایی ۲۰x) (پیکان ها چروکیدگی سیتوپلاسم و کوچک شدن یا گرد شدن سلول ها را نشان می دهد).



شکل ۳- تست تانل در سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت پس از ۲۱ روز تیمار با پارانونایل فنل a) سلول های کنترل b) دوز ۰/۵ میکرومولار c) دوز ۲/۵ میکرومولار از پارانونایل فنل (پیکان ها هسته سلول های تانل مثبت را نشان می دهد) (بزرگ نمایی ۲۰x).



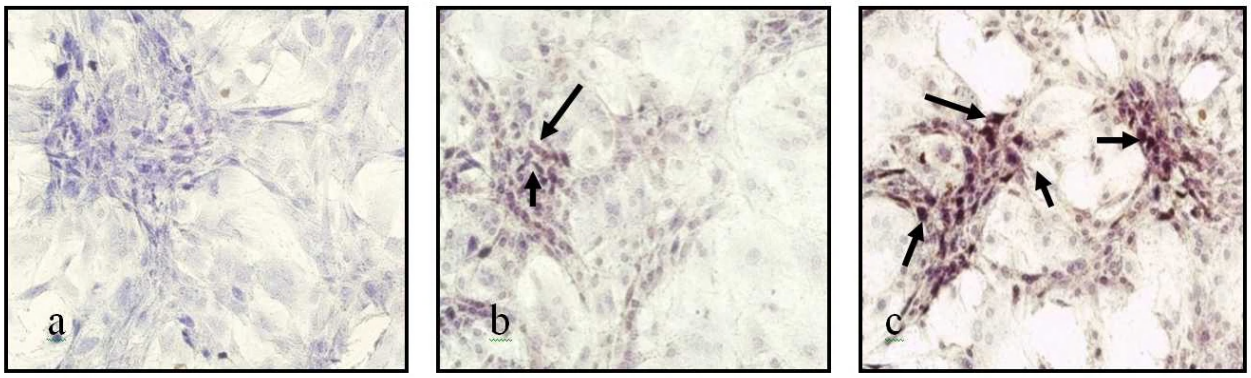
شکل ٤- تست کامت در سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت ۲۱ روز پس از تیمار با پارانونایل فنل a) گروه کنترل b) دوز ۰/۵ میکرومولار c) دوز ۲/۵ میکرومولار (پیکان ها کامت را نشان می دهد).



شکل ۵- طرح نردبانی در ژل الکتروفورز سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت پس از ۲۱ روز تیمار با پارانونایل فنل M) مارکر a) نمونه کنترل b) ۰/۵ میکرومولار c) ۲/۵ میکرومولار.

این در حالی است که در نتایج قطر کلونی ها در گرو های تیمار شده تنها در روز ۲۱ کاهش معنی دار ($p<۰/۰۵$) مشاهده شد. نتایج دو برابرشدگی جمعیت (جدول شماره ۴) نشان دارد که دوز ۲/۵ میکرو مولار از پارا نونایل فنل در روزهای ۱۰، ۱۴ ۲۱ نسبت به گروه کنترل باعث کاهش تکثیر سلولها شده است ولی دوز ۰/۵ میکرومولار تنها در روز ۲۱ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری در توانائی تکثیر سلولها ایجاد کرد (جدول ۴).

رنگ آمیزی های فلوروسنت سلولهای تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که هسته سلولها دچار تغییرات



شکل ٦– تست کاسپاز– ۳ فعال. a) سلول های کنترل b) دوز ۰/۵ میکرومولارc) دوز ۲/۵ میکرومولار . (بزرگ نمایی ۲۰x) (پیکان ها کاسپاز–۳ فعال را در سیتوپلاسم سلول ها نشان می دهد)

مورفولوژیک از قبیل فشردگی کرماتین و شکستگی شده است که این تغییرات در دوز ۲/۵ میکرومولار بصورت چشمگیری قابل مشاهده بود (شکل ۱). سلولهای تیمار شده با دوز ۲/۵ میکرومولار از نظر سیتوپلاسمی نیز دچار تغییرات مورفولوژیک بارزی از قبیل چروکیدگی و گرد شدن نسبت به سلولهای تیمار شده با دوز ۰/۵ میکرومولار و کنترل شده بودند (شکل ۲).

برای روشن شدن مکانیزم مرگ در سلولهای مزانشیم مغز استخوان تیمار شده با پارا نونایل فنل ابتدا رنگ آمیزی به روش TUNEL انجام شد، که سلول های آپوپتوتیک قهوه ای رنگ را در گروه تیمار با پارانونایل فنل در مقایسه با گروه شاهد به معرض نمایش گذاشت (شکل ۳). برای مطالعه بیشتر شکستگی DNA در سلولهای تیمار شده و تایید تست تانل از آزمونهای کامت و الکتروفورز بر روی ژل آگارز نیز استفاده شد.

در بررسی اثر پارانونایل فنل بر سلامت هسته سلول های بنیادی مزانشیمی توسط تکنیک کامت مشخص شد که در گروه شاهد، هسته سلول ها بصورت یکنواخت با اتیدم برماید رنگ آمیزی شده و بدون هاله بود که بیانگر سلامت DNA می باشد. این در حالیست که در گروه تیمار با پارانونایل فنل DNA شکسته شده تحت تاثیر میدان الکتریکی بصورت دنباله یا کامت به همراه باقی مانده هسته ها دیده شد که این خود نشانه تخریب DNA بدنبال تیمار سلولها با پارا نونایل فنل بود (شکل ۴). همچنین الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز نیز طرح نردبانی DNA را در گروه تیمار نشان داد که این امر حاکی از شکسته شدن DNA بدنبال فعالیت آنزیمهای نوکلئاز بود (شکل ۵).

جهت روشن شدن ماهیت مرگ سلولی القا شده توسط پارانونایل فنل، و بررسی وابستگی یا عدم وابستگی به کاسپازها، بیان کاسپاز – ۳ فعال مورد ارزیابی قرار گرفت. این کاسپاز یک عامل اجرایی مهم در فرایند آپوپتوز می باشد و در کلیه مسیرهای آپوپتوزی حضور دارد. مطالعه حاضر نشان داد که فعالیت کاسپاز–۳ در گروه تیمار با پارانوایل فنل به طور چشمگیری افزایش می یابد که حاکی از وابستگی مرگ سلولی القا شده توسط پارانونایل فنل به کاسپازها بود (شکل ۶).

بحث

تا به امروز، بسیاری از اطلاعات در مورد مکانیسم عمل مواد سمی مختلف از آزمون بر روی حیوانات یا مطالعات در شرایط in vitro با استفاده از سلول های بسیار تمایز یافته، نامیرا و یا سلول های سرطانی و دچار تومور شده بدست آمده است. اخیراً با توجه به مقاومت سلولهای مزانشیم مغز استخوان و استخراج آسان آنها پیشنهاد شده است که می توان از آنها برای بررسی اثرات مواد سمی استفاده کرد [۱۱]. از طرفی در بررسی اثرات مواد سمی با استفاده از انواع سلولی تمایز یافته یا دودمان های سلولی نامیرا نمی توان اثرات این مواد بر مراحل تمایز و تکوین را نیز مطالعه نمود، لذا با توجه به اینکه سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان دارای قابلیت زیادی در تمایز به بافتهائی مانند استخوان، عصب و غیره می باشد مدل آزمایشگاهی مناسبی در بررسی تاثیر و سمیت مواد شیمیایی بر روی سلول ها و عملکرد داروها در طی روند تمایز می باشند [۱۲]. نتایج این مطالعه کاهش معنی داری وابسته به دوز را در توانایی زیستی سلول های مزانشیمی بنیادی مغز استخوان رت در اثر تیمار با پارانونایل فنل در طی

۲۱ روز نشان داد که با نتایج مطالعات سایر محققان مبنی بر کاهش توانایی زیستی دیگر سلولها در طی تیمار با نونایل فنل [۱۷،۱۳،۸،۱] هم راستا است. اهمیت این مطالعه از این جهت می باشد که اولا نشان داده شد که کاهش توانائی زیستی وابسته به دوز تیمار بوده و ثانیا تاکنون تاثیر دوز کم پارا نونایل فنل (در حد نانو مولار) طی یک دوره تیمار بلند مدتی بر سلول های بنیادی مغز استخوان گزارش نشده بود.

در این مطالعه علاوه بر توانایی زیستی سلول ها، کاهش معنی داری نیز در تعداد و قطر کلنی های تشکیل شده و همچنین میزان دوبرابر شدگی سلول ها مشاهده شد که نشان داد این آلاینده میزان تکثیر سلول ها را نیز کاهش می دهد. نکته قابل اهمیت در این مطالعه این است که دوزهای ۰/۵ و ۲/۵ میکرومولار در مدت زمان کوتاه ۵ تا ۷ روز هیچ یک از فاکتورهای رشد و تکثیر نامبرده در فوق را کاهش نمی دهد ولی با ادامه زمان تیمار اثر مسمومیت آشکار شده تا اینکه این اثر در ۲۱ روز کاملا مشهود است. با توجه به استفاده پارا–نونایل فنل به عنوان یک سورفاکتنت در فرمولاسیون لوازم آرایشی می توان گفت که استفاده مکرر و طولانی مدت از این ترکیب شیمیائی میتواند تاثیر مخربی بر توانائی زیستی و قابلیتهای تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی پوست بر جای بگذارد. Kudo و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که پارا نونایل فنل با عث کاهش سطح پروتئین های سیکلین و توقف سلول در فاز G2/M چرخه سلولی در سلول های بنیادی عصبی می گردد [۱۳]. این مطالعه در تایید پژوهش حاضر بوده و می تواند کاهش تکثیر و رشد سلولهای مزانشیم مغز استخوان را توضیح دهد. البته در ادامه مکانیزم مرگ سلولی در سلولهای مزانشیم مغز استخوان موش صحرائی نیز مورد بررسی قرار گرفت که نکته مهم در سلولهای تیمار شده با پارانونایل فنل وقوع آپوپتوزیس بود که توسط تست تانل، کامت و الکتروفورز DNA مورد تایید قرار گرفت. همچنین نشان داده شد که در سلولهای تیمار شده با دوز های ۰/۵ و ۲/۵ افزایش تعداد سلول های آپوپتوتیک در کشت سلول ها با دوز تیمار وابستگی مستقیمی را نشان داد. تایید تاثیر پارانونایل فنل بر DNA سلول با تست کامت، ژل الکتروفورز DNA و همچنین تست TUNEL مشخص کرد که این ترکیب شیمیائی می تواند باعث فعال شدن نوکلئازهای داخل سلول شود، لذا برای روشن شدن اینکه آیا آپوپتوزیس حاصل وابسته به کاسپاز است یا نه در ادامه حضور کاسپاز ۳ فعال در سیتوپلاسم سلولهای تیمار شد مورد بررسی قرار گرفت. کاسپاز ۳ فعال یک کاسپاز عمل کننده است که می تواند تحت تاثیر مسیر داخلی یا خارجی فعال شده و در نهایت منجر به فعال شدن نوکلئازها شده که باعث صدمه به DNA سلول می گردد [۱۸]. لذا تخریب DNA و قطعه قطعه شدن آن در نتیجه فعال شدن آبشار کاسپازها می باشد که می توان گفت کاهش توانائی زیستی در نتیجه مرگ برنامه ریزی شده وابسته به کاسپار است. مطالعات دیگر نشان داده است که پارانونایل فنل اثرات مختلفی بر اجزا سلولی از جمله ماده ژنتیکی سلول می گذارد [۱۳،۱۲]. این ترکیب شیمیائی علاوه بر مکانیزم توضیح داده شده در بالا همچنین باعث افزایش کلسیم داخل سلولی شده که منجر به فعال شدن آندونوکلئازهای وابسته به کلسیم و منیزیم می گردد و در نهایت می تواند ایجاد شکستگی در DNA سلول را باعث شود [۴]. بعلاوه Hughes و همکاران (۲۰۰۰) و Mishelangeli و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که پارانونایل فنل با مهار پمپ های کلسیمی شبکه اندوپلاسمی موجب اختلال در هومئوستازی کلسیم گردیده که این نیز میتواند دلیل دیگری در وقوع مرگ سلولی باشد [۱۵،۱۰]. البته ممکن است مکانیزمهای دیگری نیز در کاهش توانائی زیستی و تکثیر سلولها بنیادی در حضور پارا–نونایل فنل دخیل باشند که یافتن آنها نیازمند بررسی و پژوهش بیشتر می باشد.

پارانونایل فنل به عنوان یک آلاینده زیست محیطی و یک سورفاکتانت غیر یونی در غلظت های میکرومولار قادر است توانایی زیستی و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان را کاهش دهد. لذا با توجه به استفاده از این ترکیب شیمیائی در فرمولاسیون مواد آرایشی باید جانب احتیاط را اولا در فرمولاسیون آنها با استفاده از این ماده شیمیائی و ثانیا مصرف طولانی مدت مواد آرایشی رعایت نمود، البته با توجه به تفاوت سلولهای بنیادی پوست و مزانشیم مغز استخوان نیاز مبرم به بررسی میزان صدمات وارده به سلولهای بنیادی پوست در تحقیات جداگانه ضروری می باشد.

سپاسگزاری

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک که با پشتیبانی مالی انجام این پروژه تحقیقاتی را امکان پذیر نمود.

References

[1] Abnosi MH, Soleimani Mehranjani M, Momeni HR, Mahdiyeh Najafabadi M, Barati M, Shojafar E. The effect of para-nonylphenol on the viability and morphology of rat bone marrow mesenchymal stem cells. ***J Arak Univ Med Sci*** 14 (2011) 1-11.

[2] Abnosi MH, Soleimani Mehranjani M, Momeni HR, Mahdiyeh Najafabadi M, Shojafar E, Barati M, Effect of sodium arsenite on viability, morphology and protein profile of the rat bone marrow mesenchymal stem cells. ***Jouranl of Hamedan Medial University*** 17 (2010) 24-32.

[3] Bechi N, Letta F, Romagnoli R, Jantra S, Environmental levels of para-nonylphenol are able to affect cytokine secretion in human placenta. ***Environ Health Perspect*** 118 (2010) 427-431.

[4] Chien LY, Hairnet H, Lowering extracellular calcium content protects cells from arsenite-induced killing and micronuclei formation. ***Mutagenesis*** 11 (1996) 75-78.

[5] Eslaminejad MB, Mesenchymal Stem Cell: Isolation and biology. ***journal of Iranian Anatomical Science*** 5 (2007) 61-73.

[6] Eslaminejad MB, Rouhi L, Arabnajafi M, Baharvand H, Culture and expansion of rat mesenchymal stem cells using the serum prepared from rat's peripheral blood. ***journal of Iranian Anatomical Science*** 49 (2007) 331-344.

[7] Eslaminejad MB, Salami F, Mehranjani MS, Mohamad Hossein Abnoosi MH, Eftekhari-Yazdi P, BIO Treatment Protects Rat Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Culture Against the TNF-α Induced Apoptosis. ***Yakhteh Medical Journal*** 11 (2009) 35-42.

[8] Gong Y, Han XD, Nonylphenol- induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells, ***Reprod Toxicol*** 22 (2006) 623-30.

[9] Gong Y, Wu J, Huang Y. Shen S, Han X, Nonylphenol induced apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. ***Toxicol Lett*** 186 (2009) 84-95.

[10] Hughes PJ, McLellan H, Lowes DA, Zafar Khan S,. Bilmen JG, Tovey SC, Godfrey RE, R. H. Michell, Kirk CJ, Michelangeli F, Estrogenic Alkylphenols Induce Cell Death by InhibitingTestis Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Pumps. ***Biochem Biophys Res Commun*** 277(2000) 568–74.

[11] Kermani S, Karbalaie K, Madani H, Jahangirnejad AA, Eslaminejad MB, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H, Bone marrow-mesenchymal stem cells as a suitable model for assessment of environmental pollution. ***J Arak Univ Med Sci*** 11(2008) 117-125.

[12] Kim SK, Kim BK, Shim JH, Gil JE, Yoon YD, Kim JH, Nonylphenol and Octylphenol-induced apoptosis in human embryonic stem cells is related to fas-fas ligand pathway. ***Toxicol Sci*** 94 (2006) 310-32.

[13] Kudo C, Wada K, Masuda T, Yonemura T, Shibuya A, Fujimoto Y, Nakajima A, Niwa H, Kamisaki Y, Nonylphenol induces the death of neural stem cells due to activation of caspase cascade and regulation of cell cycle. ***J Neurochem*** 88 (2004) 1416-23.

[14] Liu P, Liu G, Chao W, Effect of nonylphenol on the calcium signal and catecholamine secretion coupled with nicotinic acetylcholine receptors in bovine adrenal chromaffin cells. ***Toxicology*** 244 (2008) 77-85.

[15] Michelangeli F, Ogunbayo OA, Wootton LL, Lai PF, Al-Mousa F, Harris RM, Waring RH,. Kirk CJ, Endocrine disrupting alkylphenols: Structural requirements for their adverse effects on Ca2+ pumps, Ca2+ homeostasis & Sertoli TM4 cell viability, ***Chem Biol Interact*** 176 (2008) 220–6.

[16] Vivacqua A, Recchia AG, Fasanella G, Gabriele S, Carpino A, Rago V, Di Gioia ML, Leggio A, Bonofiglio D, Liguori A, Maggiolini M, The Food Contaminants Bisphenol A and 4-Nonylphenol Act as Agonists for Estrogen Receptor α in MCF7 Breast Cancer Cells. ***Endocrine*** 22 (2003) 275–84.

[17] Wang JL, Lia CC, Lin KL, Chou CT, Hsieh CH, Chang CH, Chen WC, Liu SI, Hsu SS, Chang HT, Jan CH, Nonylpenol-induced ca2+ elevation and ca2+ -independent cell death in human osteosarcoma cells. ***Toxicol Lett*** 160 (2005) 76-83.

[18] Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR, Caspase-3 Is the Primary Activator of Apoptotic DNA Fragmentation via DNA Fragmentation Factor-45/Inhibitor of Caspase-activated DNase Inactivation. ***J Biol Chem*** 274 (1999) 30651-6.