

## بررسی اثر عنصر بور بر سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت

محمد حسین آبنوسی \*Ph.D.، بنت الهدی موحدی M.Sc.

- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کدپستی: ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: abnosi2002@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۲۳

## چکیده

**هدف:** در این پژوهش تاثیر دوزهای مختلف اسید بوریک بر توانایی زیستی، مورفولوژی و خصوصیات بیوشیمیایی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت (MSCs) بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** MSCs تا سه پاساژ کشت و سپس با غلظت‌های ۰/۶، ۳ و ۶ نانوگرم، میکروگرم و میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسید بوریک در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت تیمار شد. توانایی زیستی با تست متیل تیازول تیترازولیوم بررسی و دوزهای ۶ نانوگرم، میکروگرم و میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و زمان ۳۶ ساعت برای ادامه مطالعه انتخاب گردید. تکثیر سلولی بر اساس توانایی تشکیل کلونی و دو برابر شدگی جمعیتی (PDN) ارزیابی و مورفولوژی سلول‌ها توسط رنگ آمیزی فلوروسنت بررسی شد. همچنین میزان کلسیم تام و فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، لاکتات دهیدروژناز، آسپارات ترانس آمیناز و آلانین ترانس آمیناز مورد مطالعه قرار گرفت. داده‌ها با روش ANOVA آنالیز شد.

**نتایج:** توانایی زیستی در زمان ۳۶ ساعت توسط همه غلظت‌ها کاهش معنی‌دار داشت. دوزهای تیماری باعث تغییر در مورفولوژی هسته و سیتوپلاسم و همچنین کاهش معنی‌دار تعداد و قطر کلونی به صورت وابسته به دوز شد. تیمار با دوز ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث کاهش معنی‌دار PDN در روزهای ۱، ۳ و ۶ روز و کاهش فعالیت آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز، آسپارات ترانس آمیناز و آلانین ترانس آمیناز نیز توسط همه دوزها مشاهده شد. افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و میزان کلسیم تام در اثر تیمار با دوزهای ۶ نانوگرم و میکروگرم مشاهده شد. در حالی که دوز ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیچ‌گونه اثری بر میزان کلسیم تام و آلکالین فسفاتاز نداشت.

**نتیجه گیری:** غلظت‌های میلی‌گرم اسید بوریک اثر سمی بر MSCs دارد ولی در مورد غلظت‌های نانو و میکروگرم با توجه به تاثیر مثبت بر برخی فاکتورها تحقیقات بیشتر پیشنهاد می‌شود.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان، اسید بوریک، قابلیت حیات، آلکالین فسفاتاز، ترانس آمیناز

## مقدمه

نشان داد ولی دوز ۲۰۰ تا ۷۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر سمی بر سلول‌ها داشت.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سلول‌های پرتوانی بوده که به راحتی تخلیص و تکثیر شده و توانایی تمایز به انواع سلول‌های استخوانی، غضروفی و چربی را دارا می‌باشند و می‌توان از آن‌ها در پیوندهای اتولوگ استفاده کرد (۹). این سلول‌ها علاوه بر مغز استخوان در بافت‌هایی نظیر بافت چربی، پرده سینویال و عضله اسکلتی یافت می‌شوند (۱۰). به دلیل اهمیت سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان در فرآیند تشکیل و ترمیم بافت استخوان و با توجه وجود گزارشاتی مبنی بر اثر مثبت بور بر سلامت استخوان از یک طرف و وجود برخی از تناقضات موجود در مطالعات پیشین در رابطه با میزان دوز و زمان تاثیر عنصر بور بر سلول‌های مزانشیم از طرف دیگر، هدف از این مطالعه بررسی تاثیر دوزهای متفاوت در زمان‌های متفاوت از عنصر بور بر توانایی زیستی، تکثیر، مورفولوژی و برخی خواص بیوشیمیایی سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان بود تا بتوان درک بهتری از اثرات مثبت یا منفی دوزهای متفاوت از این عنصر به دست آورد.

## مواد و روش‌ها

کلید مواد مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شد مگر در مواردی که ذکر شده است. در این مطالعه تجربی از موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۵۰ روز و وزن  $20 \pm 140$  گرم استفاده شد. حیوان مورد استفاده در این پژوهش پس از خریداری از انستیتو پاستور در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط دمایی  $3 \pm 27$  درجه سانتی‌گراد و با دسترسی مناسب به غذا و آب در قفس‌های پلی اتیلن نگه‌داری شد. با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی، موش‌ها به کمک دی اتیلن اتر بی‌هوش شده، استخوان‌های ران و ساق پای آن‌ها جدا و سپس بافت‌های پیوندی اطراف استخوان‌ها به طور کامل پاک گردید. استخوان‌ها در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco Company) حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (Gibco Company) و پنی‌سیلین-استریتومايسين (Gibco Company) 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 فاکون حاوی محیط کشت کامل هدایت و سپس به مدت ۵ دقیقه در

بور (B) با عدد اتمی ۵، تنها نافلز در میان عناصر گروه IIIA جدول تناوبی و دارای خواص بین فلز و نافلز می‌باشد. بور ریز مغذی ضروری برای گیاهان است و نتایج مطالعات نشان داده که این عنصر می‌تواند به عنوان یک ریزمغذی اساسی برای حیوانات و انسان نیز محسوب شود (۱). غذاها با منشا گیاهی نظیر خشکبار، میوه‌های خشک و تازه، بقولات، سبزی‌ها منبع اصلی این عنصر هستند (۲). بور در حالت طبیعی از مواد غذایی مختلف در روده و معده جذب و به شکل اسید بوریک در خون به گردش در می‌آید (۳). با وجود این‌که از کلسیم، فسفر و ویتامین D (کله کلسیفرول) به عنوان ریزمغذی‌های اصلی در فرآیند معدنی شدن استخوان نام برده می‌شود، اما علاوه بر این عناصر، بور دارای خواص مهمی است که از نظر بالینی توجه زیادی را به خود معطوف داشته است و به عنوان عنصر مکمل، از عمل کرد کلسیم، منیزیم و ویتامین D حمایت می‌کند (۴). بور از طریق تاثیرگذاری بر عمل کرد کلیه، دفع ادراری کلسیم و منیزیم را کاهش داده و میزان کلسیم یونیزه در خون را افزایش می‌دهد (۵). در سال‌های اخیر مطالعاتی بر روی تاثیر بور و مشتقات آن بر توانایی زیستی سلول‌های مختلف انجام گرفته است. از جمله این تحقیقات مطالعه هاآکی و همکاران (۶) بر روی اثرگذاری اسید بوریک بر سلول‌های پیش استئوبلاست MC3T3-E1 می‌باشد. توانایی زیستی این سلول‌ها در دوز ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۲۴ ساعت کاهش داشت ولی در طولانی مدت (۲، ۵ و ۱۴ روز) تفاوتی با گروه کنترل نشان نداد. علاوه بر توانایی زیستی، میزان تکثیر سلول‌ها در طولانی مدت کاهش کمی داشت اما این کاهش نسبت به کنترل دارای تفاوت معنی‌دار نبود. در حالی‌که در مطالعه‌ای که توسط بینگ و همکاران (۷) بر روی تمایز سلول‌های مزانشیم مغز استخوان (BMSCs) انجام شد، غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر اسید بوریک در تیمار ۴، ۷ و ۱۴ روز، میزان تکثیر سلول‌ها را در مقایسه با کنترل کاهش داد. دیمرسی و همکاران (۸) بر روی تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیم دندان انسان (hTGSCs) با سدیم پنتابورات پنتاهیدرات (NaB) پرداختند. در این تحقیق که در جهت بررسی اثر NaB بر شاخص‌های زیستی و تمایزی سلول‌های مزانشیم دندان پس از انجماد و ذوب نمودن در حضور SO<sub>2</sub>Me انجام گرفت، دوز ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر NaB با غلظت ۵ درصد SO<sub>2</sub>Me نقش محافظتی بر حیات سلول‌ها را

۲۵۰۰rpm سانتریفیوژ شد. محیط رویی خارج و رسوب سلولی در پنج میلی لیتر محیط تازه معلق گردید و در فلاسک T25 کشت و در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد CO<sub>2</sub>) انکوبه گردید. بعد از ۲۴ ساعت محیط رویی که دارای سلول های غیرچسبنده بود، خارج شده و 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 (Gibco Company) از کف فلاسک جدا و به فلاسک های جدید منتقل شدند. برای به دست آوردن خلوص بالا از این سلول ها سه مرحله پاساژ تکرار شد.

**سنجش توانایی زیستی:** برای بررسی تاثیر اسید بوریک (شرکت مرک آلمان) بر توان زیستی سلول ها و یافتن دوز موثر، سلول های پاساژ سوم با تراکم ۱۵۰۰۰ سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند، پس از ۲۴ ساعت تحت تیمار با غلظت های ۰/۶، ۳، ۶ نانو، میکرو و میلی گرم بر میلی لیتر اسید بوریک در زمان های ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت قرار گرفته و تعویض محیط کشت هر سه روز یکبار انجام و در پایان این زمان ها درصد بقای سلولی با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت.

در تست متیل تiazول ترازولیم (MTT) سلول های تیمار شده پس از زمان های تیمار دو بار با PBS شستشو داده شد و به آن ها ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت فاقد سرم و ۱۰ میکرو لیتر MTT (۵ میلی لیتر بر میلی لیتر) اضافه و در انکوباتور به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، انکوبه شد. پس از آن محیط رویی به آرامی حذف گردیده و به کریستال های فورمازان حاصل، محلول دی متیل سولفوکسید (DMSO) اضافه و جذب نوری محلول حاصله با دستگاه ELISA-reader (مدل Elisa Reader Medical ساخت شرکت SCO GmbH کشور آلمان) در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. تعداد سلول های زنده پس از رسم گراف استاندارد با استفاده از فرمول  $Y=0.016X+0.037$  و  $R^2=0.996$  محاسبه گردید، لازم به ذکر است در این فرمول  $Y$  جذب و  $X$  تعداد سلول های زنده می باشد (۱۱).

از آنجائی که در مدت زمان ۳۶ ساعت همگی دوزها باعث کاهش توانائی حیات بود، لذا دوزهای ۶ نانو، میکرو و میلی گرم بر میلی لیتر اسید بوریک و مدت زمان تیمار ۳۶ ساعت برای ادامه مطالعه انتخاب و مابقی تست ها با این دوزها و زمان انجام گردید.

**بررسی مورفولوژی:** پس از تیمار سلول ها، مورفولوژی هسته با استفاده از رنگ فلورسنت هوخست (۱ میکرو گرم) و مورفولوژی سیتوپلاسم با استفاده از رنگ فلورسنت آکریدین اورنژ (0.01gr/ml) بررسی و توسط میکروسکوپ فلورسانس (Olympus IX70-Japan) مجهز به دوربین (مدل DP71) عکس برداری شدند. سپس قطر هسته ها و مساحت سیتوپلاسم به کمک نرم افزار موتیک (Motic) اندازه گیری و مقایسه گردید (۱۲).

**بررسی میزان توان تکثیر:** برای بررسی توان کلونی زایی، سلول های پاساژ سوم با تراکم ۵۰۰۰۰ در پلیت های تک خانه، به مدت ۷ روز کشت شد. در پایان سلول ها دو بار با PBS شسته و با رنگ کریستال ویولت به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی گردید. کلونی های تشکیل شده در گروه کنترل و تیمار در زیر میکروسکوپ مشاهده و شمارش گردید، همچنین قطر کلونی ها نیز با کمک نرم افزار موتیک اندازه گیری شد (۱۳).

برای بررسی میزان دوبرابری جمعیت (PDN)، تعداد ۲۰ هزار سلول در پلیت تک خانه کشت داده شد و سپس محیط سلول ها با غلظت های ۶ نانو، میکرو و میلی گرم بر میلی لیتر اسید بوریک در زمان های ۱، ۳ و ۶ روز جایگزین گردید. سلول ها تریپسینه و مورد شمارش قرار گرفتند و PDN با استفاده از فرمول  $\log N/N_0 \times 3.31$ ، (N0 تعداد سلول در آغاز کشت و N تعداد سلول در پایان کشت) محاسبه گردید (۱۳).

**اندازه گیری فاکتورهای بیوشیمیایی:** سلول های تیمار داده شده با غلظت های ۶ نانو، میکرو و میلی گرم بر میلی لیتر به مدت ۳۶ ساعت، پس از تریپسینه شدن و شستشو با بافر (pH=۷/۴)، (Tris-Hcl)، به کمک نیتروژن مایع سائیده و پس از لیز شدن در ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان پروتئین موجود در محلول رویی به کمک روش لوری و با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. به منظور به دست آوردن فعالیت آنزیمی بر حسب واحد بین المللی در لیتر بر گرم پروتئین (U/L) میزان فعالیت آنزیم هر نمونه به مقدار پروتئین تام آن نمونه تقسیم شد.

جهت بررسی فعالیت آنزیم های لاکتات دهیدروژناز (LDH) (کد محصول ۱۴۰۰۲۲)، آلانین ترانس آمیناز (ALT) (کد محصول ۱۴۰۰۱۹) و آسپارات ترانس آمیناز (AST) (کد محصول ۱۴۰۰۱۸) از کیت های شرکت پارس آزمون (تهران- ایران)

استفاده شد. طبق پروتکل کیت‌ها ۱۰ میکرولیتر از نمونه را با یک میلی‌لیتر از محلول واکنش موجود در کیت مخلوط و اختلاف جذب بین صفر و ۳ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (PG Instrument Company, England) قرائت شد.

همچنین در بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز تام (ALPs) از کیت پارس آزمون (کد محصول ۱۴۰۰۰۲) استفاده شد و بر اساس روش ارائه شده توسط شرکت میزان ۲۰ میکرولیتر از نمونه با یک میلی‌لیتر از محلول واکنش موجود در کیت مخلوط و اختلاف جذب بین صفر و ۳ دقیقه در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (PG Instrument Company, England) قرائت شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

میزان کلسیم تام داخل سلولی با کمک کیت کلسیم شرکت پارس آزمون (کد محصول ۱۴۰۰۰۷) اندازه‌گیری شد. در این روش ۲۰ میکرولیتر نمونه سلولی با یک میلی‌لیتر محلول واکنش موجود در کیت مخلوط و اختلاف جذب بین صفر و ۳ دقیقه در طول موج ۵۷۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (PG Instrument Company, England) اندازه‌گیری شد.

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

### نتایج

در این مطالعه نتایج تست *MTT* نشان داد که کاهش توانایی زیستی سلول‌ها وابسته به‌زمان است (جدول ۱). کاهش معنی‌دار توانایی زیستی سلول‌ها در تیمار ۱۲ ساعته از دوز ۶ میکروگرم شروع شد، در صورتی‌که این کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) در تیمار ۲۴ ساعته از دوز ۶ نانوگرم و در ۳۶ ساعته از دوز ۰/۶ نانوگرم مشاهده شد. در ۳۶ ساعت دوزهای میلی‌گرم نیز نسبت به هم دارای تفاوت معنی‌دار بودند ( $p < 0.01$ ). از طرفی با توجه به اینکه دوزهای ۶ نانو، میکرو و میلی‌گرم در زمان ۳۶ ساعت نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند برای ادامه بررسی‌ها تیمار سلول‌ها با این دوزها در زمان ۳۶ ساعت انجام شد.

جدول ۱: مقایسه میانگین توانایی زیستی سلول‌ها پس از تیمار ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعته با دوزهای مختلف اسید بوریک توسط تست *MTT* مقادیر به صورت  $mean \pm SD$  می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ). *Tukey's test* one way (ANOVA).

دوز	زمان (ساعت)		
	۱۲	۲۴	۳۶
۰	۳۲/۶۸ <sup>a</sup> ± ۰/۵۹	۳۴/۵۶ <sup>a</sup> ± ۰/۱۰	۳۴/۹۳ <sup>a</sup> ± ۰/۳۱
۰/۱۶ ng/ml	۳۲/۰۶ <sup>a</sup> ± ۰/۶۸	۳۴/۰۶ <sup>a</sup> ± ۰/۲۲	۲۸/۰۶ <sup>b</sup> ± ۰/۳۴
۳ ng/ml	۳۱/۴۳ <sup>a</sup> ± ۰/۴۳	۳۴/۰۳ <sup>a</sup> ± ۰/۰۶	۲۷/۸۱ <sup>b</sup> ± ۰/۲۲
۶ ng/ml	۳۱/۳۱ <sup>a</sup> ± ۰/۵۶	۳۳/۱۲ <sup>b</sup> ± ۰/۲۵	۲۷/۷۵ <sup>b</sup> ± ۰/۲۵
۰/۱۶ μg/ml	۳۱/۲۰ <sup>a</sup> ± ۰/۷۸	۳۳/۱۲ <sup>b</sup> ± ۰/۴۳	۲۷/۷۰ <sup>b</sup> ± ۰/۳۴
۳ μg/ml	۳۱/۱۲ <sup>a</sup> ± ۰/۸۱	۳۳/۱۲ <sup>b</sup> ± ۰/۴۳	۲۷/۶۸ <sup>b</sup> ± ۰/۲۵
۶ μg/ml	۳۰/۶۲ <sup>b</sup> ± ۰/۴۳	۲۹/۷۷ <sup>c</sup> ± ۰/۱۵	۲۶/۵۰ <sup>c</sup> ± ۰/۱۶
۰/۱۶ mg/ml	۳۰/۳۷ <sup>b</sup> ± ۰/۵۹	۲۹/۷۵ <sup>c</sup> ± ۰/۱۶	۲۶/۳۷ <sup>c</sup> ± ۰/۴۰
۳ mg/ml	۳۰/۷۵ <sup>b</sup> ± ۰/۳۷	۲۹/۶۸ <sup>c</sup> ± ۰/۱۲	۲۳/۹۳ <sup>d</sup> ± ۰/۲۲
۶ mg/ml	۳۰/۰۶ <sup>b</sup> ± ۰/۶۶	۲۹/۵۶ <sup>c</sup> ± ۰/۰۶	۲۲/۷۵ <sup>e</sup> ± ۰/۲۲

دوز ۶ میلی گرم بر میلی لیتر باعث کاهش معنی دار ( $p < 0.05$ ) PDN (جدول ۲) در روزهای ۱ و ۳ در مقایسه با کنترل شد ولی این تغییر در دوزهای ۶ نانو و میکرو گرم مشاهده نشد. در صورتی که در تیمار ۶ روزه، تمام دوزها کاهش معنی داری ( $p < 0.05$ ) را نسبت به کنترل نشان دادند. از طرفی مشاهدات نشان داد که تیمار سلولها در مدت زمان ۷ روز باعث کاهش

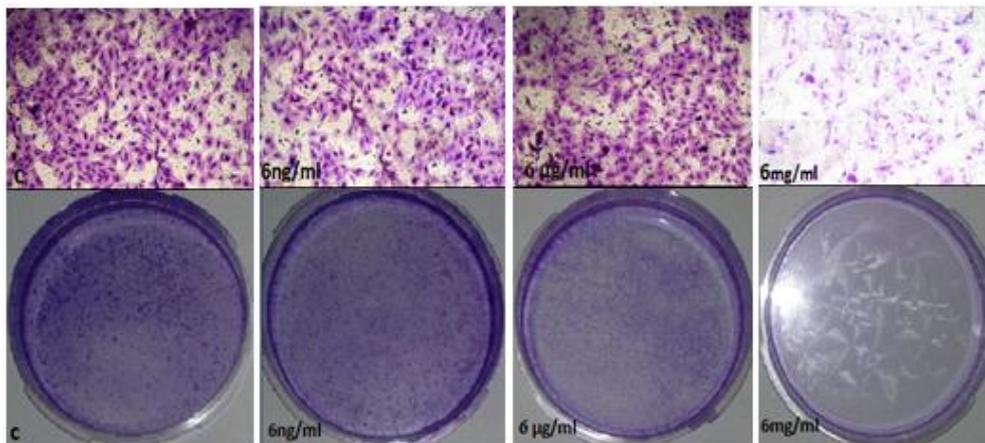
معنی دار ( $p < 0.05$ ) در تعداد و قطر کلونیها نسبت به کنترل شد. این در حالی است که دوز ۶ میلی گرم بر میلی لیتر مانع تشکیل کلونی توسط سلولها در مدت زمان ۷ روز شد لذا در نتایج هیچگونه کلونی گزارش نشده است (جدول ۳). مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی در شکل ۱ نیز تایید کننده نتایج کمی موجود در رابطه با تعداد و قطر کلونی می باشد.

جدول ۲: مقایسه میانگین تعداد و قطر کلونیهای تشکیل شده توسط سلولهای مزانشیم مغز استخوان رت پس از ۷ روز تیمار با دوزهای ۶ نانو، میکرو و میلی گرم بر میلی لیتر اسید بوریک. مقادیر به صورت  $mean \pm SD$  می باشد. میانگینها با کد حرفهای متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی دار می باشد ( $p < 0.05$ , Tukey's test, one way ANOVA).

میانگین قطر (میلی متر)	میانگین تعداد	زمان (روز)
		دوز
$2/95^a \pm 0/11$	$86/33^a \pm 3/51$	۰
$1/83^b \pm 0/05$	$80/67^b \pm 2/30$	۶ ng/ml
$1/00^c \pm 0/04$	$75/66^c \pm 6/50$	۶ μg/ml
$0/00^d \pm 0/00$	$0/00^d \pm 0/00$	۶ mg/ml

جدول ۳: مقایسه میانگین تعداد دوبرابرشدگی جمعیت سلولهای بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در روزهای ۱، ۳، ۶ و ۹ روز پس از تیمار با اسید بوریک (۶ نانو، میکرو و میلی گرم). مقادیر به صورت  $mean \pm SD$  می باشد. میانگینها با کد حرفهای متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی دار می باشد ( $p < 0.05$ , Tukey's test, one way ANOVA).

میانگین $\log N/N0 \times 3.31$ روز ۶	میانگین $\log N/N0 \times 3.31$ روز ۳	میانگین $\log N/N0 \times 3.31$ روز ۱	زمان
			دوز
$3/95^a \pm 0/02$	$3/31^a \pm 0/04$	$2/10^a \pm 0/38$	۰
$2/75^b \pm 0/04$	$3/27^a \pm 0/02$	$2/08^a \pm 0/10$	۶ ng/ml
$1/43^c \pm 0/03$	$3/25^a \pm 0/07$	$2/05^a \pm 0/07$	۶ μg/ml
$1/00^d \pm 0/03$	$2/11^b \pm 0/17$	$1/25^b \pm 0/30$	۶ mg/ml



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپی (بزرگ‌نمایی  $200\times$ ) و ماکروسکوپی کلونی‌های تشکیل شده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان تیمار شده با دوزهای ۶ نانو، میکرو و میلی گرم بر میلی‌لیتر اسید بوریک پس از مدت زمان ۷ روز.

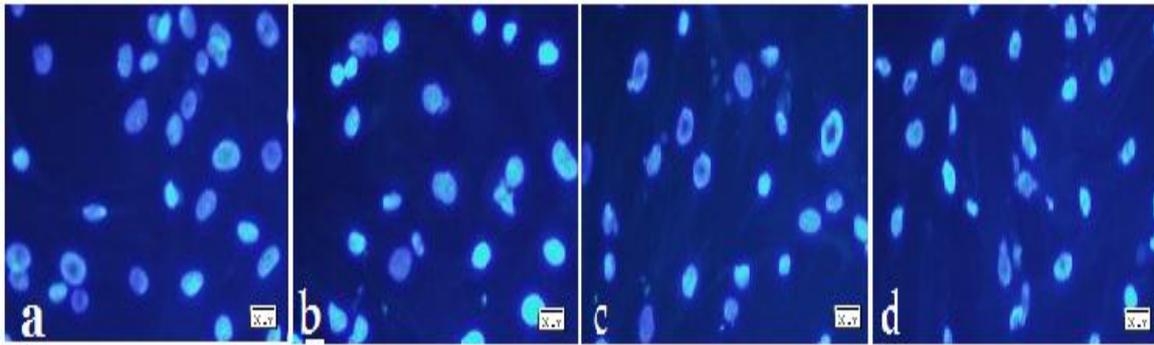
نسبت به کنترل کاهش معنی‌دار داشتند ( $p < 0/05$ ). علاوه بر این میزان کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در تیمار ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به دوزهای ۶ نانو و میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز معنی‌دار ( $p < 0/001$ ) بود (جدول ۵). میزان فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز در دوزهای ۶ نانو و میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به کنترل و تیمار ۶ میلی‌گرم افزایش معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) نشان داد. در حالی‌که مشاهده شد تیمار سلول‌ها با دوز ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری نسبت به کنترل نداشت است (جدول ۵). از طرفی نیز غلظت کلسیم تام در دوزهای ۶ نانو و میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به کنترل و دوز ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) داشت، لازم به‌ذکر است میزان کلسیم تام در دوزهای ۶ نانو و میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به یکدیگر نیز دارای تفاوت معنی‌دار بودند ( $p < 0/05$ ) (جدول ۶).

در مدت زمان ۳۶ ساعت تغییرات مورفولوژیک هسته سلول‌ها شامل متراکم شدن و تغییر شکل هسته در مقایسه با کنترل مشاهده شد (شکل ۲). در آنالیز آماری داده‌ها نیز کاهش معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) قطر هسته‌ها (جدول ۴) به‌صورت وابسته به دوز نسبت به گروه کنترل دیده شد. رنگ آمیزی آکریدین اورنژ نیز چروکیدگی و کوچک شدن سیتوپلاسم را در دوزهای ۶ میکرو و میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل نشان داد، در صورتی‌که این تغییرات در دوز ۶ نانو گرم نسبت به کنترل مشاهده نمی‌شود (شکل ۳). آنالیز آماری داده‌ها نیز موید نتایج میکوسکوپی بوده و کاهش معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) مساحت سیتوپلاسم (جدول ۴) را در دوزهای ۶ میکرو و میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد.

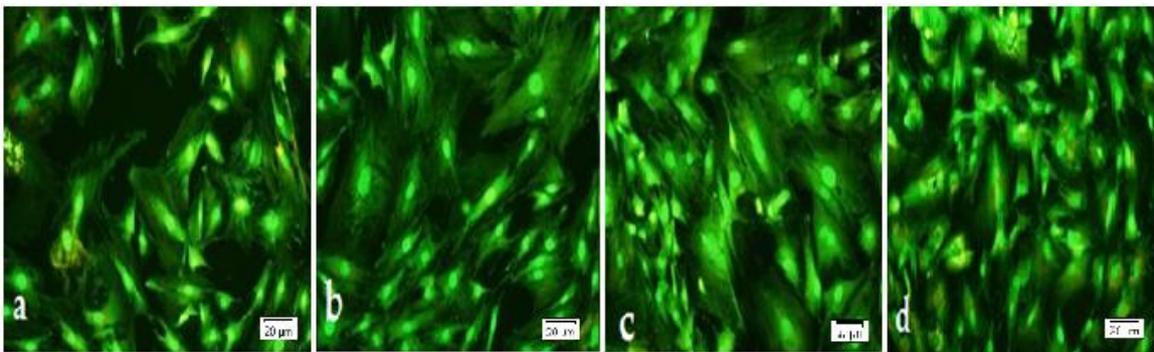
فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات ترانس آمیناز، آلانین ترانس آمیناز و لاکتات دهیدروژناز در دوز ۶ نانو، میکرو و میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

جدول ۴: مقایسه میانگین قطر هسته و مساحت سیتوپلاسم سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت پس از ۳۶ ساعت تیمار با دوزهای ۶ نانو، میکرو و میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسید بوریک. مقادیر به‌صورت  $mean \pm SD$  می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0/05$ , Tukey's test, one way ANOVA).

میانگین مساحت سیتوپلاسم ( $\mu\text{m}^2$ )	میانگین قطر هسته ( $\mu\text{m}$ )	زمان (۷ روز) دوز
$4001/83^a \pm 35/52$	$11/93^a \pm 0/15$	۰
$3998/56^a \pm 28/40$	$11/23^a \pm 0/11$	۶ ng/ml
$2752/96^b \pm 20/05$	$9/63^b \pm 0/15$	۶ $\mu\text{g}/\text{ml}$
$1550/33^c \pm 12/52$	$6/83^c \pm 0/11$	۶ mg/ml



شکل ۲: رنگ آمیزی فلورسنت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با رنگ هوخست پس از ۳۶ ساعت. (a) کنترل، (b) ۶ نانو، (c) ۶ میکرو و (d) ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسید بوریک (بزرگ‌نمایی ۲۰۰×).



شکل ۳: رنگ آمیزی سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با رنگ فلوروسنت آکریدین اورنژ پس از ۳۶ ساعت تیمار با دوزهای (b) ۶ نانو، (c) ۶ میکرو و (d) ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسید بوریک در مقایسه با گروه کنترل (a) (بزرگ‌نمایی ۲۰۰×).

جدول ۵: مقایسه میانگین فعالیت (U/L) آنزیم‌های آسپارات ترانس آمیناز (AST)، آلانین ترانس آمیناز (ALT)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و آلکالین فسفاتاز تام (ALPs) سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت پس از ۳۶ ساعت تیمار با دوزهای ۶ نانو، میکرو و میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسید بوریک. مقادیر به صورت  $mean \pm SD$  می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ) Tukey's one way ANOVA.

ALP	LDH	ALT	AST	آنزیم دوز
$0.104^a \pm 0.00$	$0.151^a \pm 0.10$	$0.39^a \pm 0.00$	$0.34^a \pm 0.10$	۰
$0.108^b \pm 0.00$	$0.443^b \pm 0.10$	$0.33^b \pm 0.10$	$0.29^b \pm 0.10$	۶ng/ml
$0.115^b \pm 0.10$	$0.39^b \pm 0.10$	$0.34^b \pm 0.10$	$0.28^b \pm 0.10$	۶μg/ml
$0.103^a \pm 0.10$	$0.117^c \pm 0.10$	$0.112^c \pm 0.10$	$0.11^c \pm 0.10$	۶mg/ml

جدول ۶: مقایسه میانگین میزان کلسیم تام داخل سلولی (میلی گرم بر دسی لیتر) سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت پس از ۳۶ ساعت تیمار با دوزهای ۶ نانو، میکرو و میلی گرم بر میلی لیتر اسید بوریک. مقادیر به صورت  $mean \pm SD$  می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ، *Tukey's*، *one way ANOVA*).

غلظت کلسیم (میلی گرم بر دسی لیتر)	زمان (۳۶ ساعت) دوز
$1/0.1^a \pm 0/1.0$	▪
$2/0.3^b \pm 0/0.5$	۶ng/ml
$3/6.0^c \pm 0/1.1$	۶μg/ml
$1/0.3^a \pm 0/0.1$	۶mg/ml

## بحث

نتایج دوبار شدگی جمعیت سلولی (PDN)، کاهش تعداد جمعیت سلولی را پس از ۶ روز در تیمار با همه دوزها نشان داد. در صورتی که تنها دوز ۶ میلی گرم بر میلی لیتر باعث کاهش تعداد جمعیت سلولی در ۱ و ۳ روز شد. از طرفی تست توانایی تشکیل کلونی (CFA) پس از ۷ روز نیز نشان داد که با افزایش دوز، تعداد کلونی و قطر آن‌ها کاهش یافت. به گونه‌ای که در دوز ۶ میلی گرم بر میلی لیتر هیچگونه کلونی تشکیل نشد. در مطالعه هاآکی و همکاران (۶) در تیمار طولانی مدت (۵ و ۱۴ روز) سلول‌ها با دوز ۱ میکروگرم هیچگونه کاهشی در توانایی تکثیر و حیات سلولی مشاهده نشد. در صورتی که بینگ و همکاران (۷) در مطالعه ای که بر روی تمایز سلول‌های مزانشیم مغز استخوان انسان به استئوبلاست انجام دادند اعلام نمودند که تیمار با دوز ۱ میکروگرم بر میلی لیتر (معادل ۱۰۰۰ نانوگرم گرم) اسید بوریک در طولانی مدت (۴، ۷ و ۱۴ روز) کاهش توانایی تکثیر و توانایی زیستی را به دنبال دارد.

در مطالعات فوق الذکر که اثر طولانی مدت بور را بررسی کرده‌اند علاوه بر اینکه نوع مطالعه و رده سلولی متفاوت است نتایج نیز کاملاً با یکدیگر مغایرت دارند. مطالعه حاضر نیز بر روی سلول‌های مزانشیم مغز استخوان به عنوان پیش ساز سلول‌های استئوبلاست انجام شده است ولی بهر حال مشخص می‌کند که غلظت‌های کم (نانو و میکروگرم بر میلی لیتر) اگرچه در ۱ و ۳ روز تأثیری ندارند ولی در طولانی مدت دارای اثر مسمومیت می‌باشد و حتی اثرات مسمومیت در غلظت‌های زیاد (میلی گرم بر میلی لیتر) به صورت بارزتر دیده می‌شود. این مطالعه تأیید کننده مطالعه بینگ و همکاران می‌باشد. به صورتی که با گذشت زمان احتمالاً تحمل مسمومیت در سلول‌های مزانشیم نسبت به دوزهای کم از بین رفته و لذا این تحمل در رابطه با دوزهای نانو

علی‌رغم بدیهی بودن ضرورت بور برای گیاهان، تاکنون اهمیت آن برای انسان و جانوران به‌طور کامل مشخص نشده است. گزارش شده است که بور به دلیل وجود کنترل هموستاتیکی مانند سیستم دفعی بدن (ادرار و عرق)، برای انسان و جانوران فاقد مسمومیت می‌باشد (۱۴). از طرفی نیز تحقیقات در زمینه‌های گوناگون تأثیرات مثبت بور را بر تشکیل، ترکیب و شاخصه‌های فیزیکی استخوان نشان می‌دهد (۱۵ و ۱۶). لذا این مطالعه سلولی در جهت مشخص نمودن نقش بور بر روی برخی از شاخصه‌های بیوشیمیایی، مورفولوژی و توانایی حیات سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان به‌عنوان پشتوانه‌ای در ترمیم و بازسازی استخوان، در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) انجام گرفت.

این تحقیق بر روی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان نشان داد که عنصر بور در هر غلظتی می‌تواند باعث کاهش توانایی حیات و تغییرات مورفولوژیک شامل کاهش در قطر هسته و مساحت سیتوپلاسمی، احتمالاً به دلیل اختلال در تشکیل نوکلئوپروتئین‌ها و پروتئین‌های سیتواسکلتون سلولی، پس از چندین ساعت شود، این کاهش اگرچه وابسته به زمان است ولی وابسته به دوز نمی‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط هاآکی و همکاران (۶) انجام شده است، مشخص گردید که اسید بوریک در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر در کوتاه مدت (۲۴ ساعت) موجب کاهش توانایی زیستی سلول‌های پیش استئوبلاست MC3T3-E1 می‌گردد. در مطالعه فوق الذکر اگرچه سلول‌های از نظر رده با سلول‌های مزانشیم مشابه نیستند ولی تیمار کوتاه مدت هاکی و همکاران موید نتایج حاضر است.

و میکروگرم از بور دیده نمی‌شود. در تحقیقی که توسط دیمرسی و همکاران (۸) بر روی تاثیر سدیم پنتابورات پنتاهیدرات (NaB) بر توانایی زیستی سلول‌های مزانشیم دندان انسان در فرآیند انجماد در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ روز صورت گرفت، مشخص شد که غلظت ۲۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیچ‌گونه اثر منفی بر روی سلول‌ها نداشته است و حتی در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث افزایش مقاومت غشایی در سلول شده است، اما در غلظت‌های بالاتر (۲۰۰ تا ۷۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) القا سمیت را در سلول‌ها به‌همراه داشت است، که می‌تواند تاییدی باشد بر اینکه عنصر بور بر سیستم‌های بیولوژیک و حیات سلولی در صورت استفاده مداوم دارای اثر سوء است.

برای بررسی بیشتر اثر عنصر بور، در مطالعه حاضر میزان سطح آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و غلظت کلسیم تام سنجیده شد. آنزیم آلکالین فسفاتاز، آنزیم غشایی بوده (۱۷ و ۱۸) و باعث تجزیه پیروفسفات در سلول می‌شود که متعاقباً ورود کلسیم را نیز امکان‌پذیر می‌سازد (۱۹). میزان فعالیت این آنزیم و غلظت کلسیم تام در غلظت‌های کم (نانو و میکروگرم بر میلی‌لیتر) اسید بوریک نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار را نشان داد در صورتی که سطح آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و کلسیم تام، در تیمار ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسید بوریک تفاوتی با کنترل نداشت. در مطالعه پینگ غلظت ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم اسید بوریک در ۷ روز منجر به افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و افزایش بیان ژن‌های این آنزیم نسبت به گروه کنترل شد، همچنین از طرفی رسوب کلسیم تام در دوز ۱ و ۱۰ نانوگرم اسید بوریک در تیمار ۲۱ روز افزایش و در دوز ۱۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم اسید بوریک کاهش داشت (۷). با توجه به هم راستا بودن نتایج ما با مطالعات قبلی در زمینه تاثیرگذار بودن مقادیر کم بور بر میزان فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و همچنین میزان کلسیم تام به عنوان فاکتورهای کلیدی در استخوان‌سازی، می‌توان گفت که این عنصر نقش مثبتی را بازی می‌کند، ولی از طرف دیگر ممکن است افزایش میزان کلسیم به‌دلیل اختلال به‌وجود آمده از تاثیر بور بر روی کانال‌های کلسیم در غشا سلولی یا رسپتورهای کلسیم وابسته به *ATPase* شبکه آندوپلاسمی باشد که در غلظت‌های کم این عنصر به‌وجود آمده است. در مطالعه حاضر غلظت کلسیم تام در دوز بالا اسید بوریک در سطح کنترل قرار گرفت، این ممکن است به‌دلیل آن باشد که در این دوز عنصر بور با تاثیر بر پتانسیل غشا باعث ایجاد مسمومیت شده که می‌تواند (۱) جایگزین کلسیم در سلول شده و از ورود کلسیم به‌داخل

سلول ممانعت کند و حتی باعث خروج کلسیم از سلول شود (۲) در غلظت‌های بالا، بور باعث غیر فعال شدن کانال‌های کلسیم شده و نقش مهارکنندگی بر آن‌ها دارد. نتایج مطالعه هیندرسون و همکاران (۲۰) نشان می‌دهد که اسید بوریک با مهار رسپتورهای ریانودین (*ryanodine*) مانع آزادسازی کلسیم از شبکه آندوپلاسمی به سیتوزول می‌شود. لذا این امکان وجود دارد که دوزهای پایین تر بور بتواند اثر مثبت را بر رسپتورهای کلسیم بگذارد و افزایشی که در میزان آن رخ می‌دهد را ناشی شود ولی در غلظت‌های بالا تر این اثر مثبت از بین می‌رود.

در ادامه مطالعه حاضر تاثیر عنصر بور بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم سلولی مانند فعالیت آسپارات ترانس آمیناز، آلانین ترانس آمیناز و لاکتات دهیدروژناز مورد بررسی قرار گرفت که با افزایش دوز تیماری، کاهش فعالیت این آنزیم‌ها را شاهد بودیم. در مطالعه انجام شده بر روی سلول‌های سرتولی که توسط کیبو و همکاران (۲۱) انجام گرفت، دوز ۳ تا ۱۰ میلی‌مولار (معادل ۰/۱۸ تا ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اسید بوریک باعث کاهش معنی‌دار سطح لاکتات، پیرووات و *ATP* (به‌ترتیب به‌میزان ۳۰، ۶۰ و ۱۷ درصد) در مدت زمان ۲۴ ساعت شد (۲۱). از آنجایی که بور مهارکننده رقابتی دو دسته از آنزیم‌ها شامل دسته اول: آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز و دسته دوم: آنزیم‌هایی که وابسته به کوآنزیم‌های نوکلئوتیددار چون *NAD* و *FAD* می‌باشد (۲۲)، لذا کاهش فعالیت مشاهده شده در آنزیم‌های کلیدی متابولیسم دور از انتظار نیست. مطالعه کیبو و مطالعه حاضر نشان داد که عنصر بور باعث تغییر در متابولیسم عمومی سلول می‌شود به‌صورتی که متابولیسم اسیدهای آمینه و تولید لاکتات را کاهش داده ولی باعث افزایش مصرف گلوکز و پیرووات از طریق واکنش‌های هوازی می‌گردد تا بتواند فقر *ATP* به‌وجود آمده در سلول را جبران نماید.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده، اسید بوریک در دوزهای بالا باعث تخریب غشا سلولی و اختلال در فعالیت‌های متابولیکی سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت می‌شود. همچنین اگرچه دوز پایین این عنصر در برخی از جهات اثرات مثبت به‌همراه دارد ولی با افزایش زمان باعث کاهش توانایی حیات، تغییر در سیتواسکلتون سلولی (سیتوپلاسم و هسته) و کاهش فعالیت برخی از آنزیم‌های متابولیکی شد لذا از طرف این تیم تحقیقاتی

arsenite on rat bone marrow mesenchymal stem cells: cells viability and morphological study. Scientific journal of hamadan university of medical sciences and health services. 2010; 17(2): 24-31.[abstract in english]

12. Abnosi MH, Soleimani Mehranjani M, Shariatzadeh MA, Mahdih Najafabadi M, et al. 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. *Physiol and Pharmacol*. 2011; 15(3): 308-317. [abstract in english]

13. Abnosi MH, Jafari Yazdi Z. Low Dose and Long Term Toxicity of Sodium Arsenite Caused Caspase Dependent Apoptosis Based on Morphology and Biochemical Character. *Cell Journal(Yakhteh)*. 2012; 14(3): 161-170.

14. Hunt CD. Dietary boron: an overview of the evidence for its role in immune function. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. 2003; 16(4): 291-306.

15. Nielsen FH. Evolutionary events culminating in specific minerals becoming essential for life. *Eur J Nutr*. 2000; 39(2): 62-6.

16. Sutherland B, Strong P, King JC. Determining human dietary requirements for boron. *Biol Trace Elem Res*. 1998; 66(1-3): 193-204.

17. Zou L, Zou X, Chen L, Li H, et al. Multilineage differentiation of porcine bone marrow stromal cells associated with specific gene expression pattern. *J Orthop Res*. 2008; 26(1): 56-64.

18. Stucki U, Schmid J, Hämmerle C, Lang N. Temporal and local appearance of alkaline phosphatase activity in early stages of guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12(2): 121-7.

19. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99(14): 9445-9.

20. Henderson K, Stella Jr SL, Kobylewski S, Eckhert CD. Receptor activated Ca<sup>2+</sup> release is inhibited by boric acid in prostate cancer cells. *PLoS One*. 2009; 4(6): e6009.

21. Ku WW, Mason Shih L, Chapin RE. The effects of boric acid (BA) on testicular cells in culture. *Reprod Toxicol*. 1993; 7(4): 321-31.

22. Hunt CD. Regulation of enzymatic activity. *Biol Trace Elem Res*. 1998; 66(1-3): 205-25.

ادامه پژوهش به خصوص در رابطه با تمایز سلول های مزانشیم مغز استخوان به استئوبلاست و ضرورت حضور این عنصر به مقدار کم در رژیم غذایی روزانه پیشنهاد می گردد.

## تشکر و قدردانی

پروژه تحقیقاتی حاضر در غالب پایان نامه دانشجویی مصوب ۹۲/۱۲/۱۷ به شماره ۹۲/۱۳۴۹۹ با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک انجام شده است، لذا بدین وسیله از دانشگاه اراک تشکر و قدردانی می شود.

## منابع

1. Nielsen FH. The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition*. 2000;16(7): 512-4.
2. Nielsen FH. The justification for providing dietary guidance for the nutritional intake of boron. *Biol Trace Elem Res*. 1998; 66(1-3): 319-30.
3. Barranco W, Eckhert C. Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *Br J Cancer*. 2006; 94(6): 884-90.
4. King N, Odom TW, Sampson HW, Yersin AG. The effect of in ovo boron supplementation on bone mineralization of the vitamin D-deficient chicken embryo. *Biol Trace Elem Res*. 1991; 31(3): 223-33.
5. Hegsted M, Keenan M, Siver F, Wozniak P. Effect of boron on vitamin D deficient rats. *Biol Trace Elem Res*. 1991; 28(3): 243-55.
6. Hakki SS, Bozkurt BS, Hakki EE. Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *J Trace Elem Med Biol*. 2010; 24(4): 243-50.
7. Ying X, Cheng S, Wang W, Lin Z, et al. Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biol Trace Elem Res*. 2011; 144(1-3): 306-15.
8. Demirci S, Do an A, i li B, Sahin F. Boron increases the cell viability of mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation. *Cryobiology*. 2014; 68(1): 139-46.
9. Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011; 20(1): 5-14.
10. Oreffo RO, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reviews*. 2005; 1(2): 169-78.
11. Abnosi MH, Soleimani Mehranjani M, Momeni H, Mahdih Najafabadi M, et al. Effect of sodium

## Investigation of the Effect of Boron on the Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Abnosi MH, Ph.D.\*, Movahedi B, M.Sc.

- Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak 38156-8-7349, Iran

\* Email corresponding author: abnosi2002@yahoo.com

Received: 15 Oct. 2014

Accepted: 25 Nov. 2014

---

### Abstract

**Aim:** In the present study, the effect of different dose of boric acid (B) on viability, morphology and some biochemical characteristic of rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) were investigated.

**Material and Methods:** MSCs after 3rd passage was treated with 0.6,3 and 6 nano,micro and milligram/ml of B for 12,24 and 36hrs. The viability was estimated using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and the dose of 6 Nano, micro and milligram/ml and 36hrs was chosen to continue the investigation. The cell proliferation base on colony forming assay and population doubling number (PDN) was studied; also the morphology of the cells was investigated using florescent dye. The concentration of total calcium and the activity of the enzymes Alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase was estimated. Data was analyzed using ANOVA.

**Results:** Treatment of the cells with all the doses caused the viability to decrease significantly after 36hrs. Morphology of the nuclei and cytoplasm as well as number and diameter of the colonies showed significant reduction due to the treatments. Whereas treatment with 6mg/ml caused significant decrease of the PDN after 1, 3 and 6days. In addition significant decrease of the activity of Alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and lactate dehydrogenase were observed in response to treatment with all the doses. Treatment with 6ng and µg/ml caused significant increase in the alkaline phosphatase activity and total calcium concentration, whereas 6mg/ml left no effect on total calcium level and alkaline phosphatase activity.

**Conclusion:** Treatment of MSCs with mg dosage of B showed toxicity, but regarding some factors we observed positive results with respect to nano and microgram dosage, therefore more research is recommended.

**Keywords:** Alkaline phosphatase, Bone marrow mesenchymal stem cells, Boric acid, Viability, Transaminase