

## بررسی اثر کاتچین هیدرات بر توان زیستی، توان تکثیری و بیوشیمی سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت در حضور عنصر بور به‌عنوان یک ریز مغذی

محمد حسین آبنوسی \*Ph.D.، سمیرا منصوری M.Sc.

-دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، کد پستی ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-abnosi@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۲۴

### چکیده

**هدف:** از این مطالعه بررسی تاثیر کاتچین هیدرات (CH) و اسید بوریک (BA) بر سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت (MSCs) می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** MSCs با CH تیمار و با تست تریپان بلو توانایی حیات آن‌ها در ۱۲، ۲۴، ۳۶ ساعت بررسی شد. دوزهای ۴۰۰ و ۳۲۰ میکرومولار CH به همراه ۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر BA و زمان ۳۶ ساعت انتخاب شد. توانایی تکثیر توسط آزمون تشکیل کلونی (CFA) و دو برابر شدگی جمعیت (PDN)، مورفولوژی سلول‌ها، سطح الکترولیت‌های سدیم، پتاسیم و کلسیم و فعالیت آنزیم‌های ALT، AST، ALP، LDH، اندازه‌گیری شد. میزان مالون دی‌آلدئید (MDA)، آنتی‌اکسیدان کل و فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT نیز سنجش شد.

**نتایج:** در ۱۲ ساعت تنها غلظت ۳۲۰ میکرومولار و در ۲۴ و ۳۶ ساعت از ۴۰۰ تا ۳۲۰ میکرومولار، CH باعث کاهش توانایی زیستی شد. از طرفی دوزهای انتخابی باعث کاهش معنی‌دار توانایی تکثیری، قطر هسته و مساحت سیتوپلاسم شد. تیمار با CH باعث افزایش فعالیت ALT، AST، ALP، LDH و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل و کاهش میزان MDA و سدیم و پتاسیم شد. BA تاثیری بر توانایی زیستی، مورفولوژی و PDN نداشت ولی باعث کاهش CFA و فعالیت ALT، AST، LDH و فعالیت BA شد. فعالیت ALP و میزان کلسیم، سدیم و پتاسیم، میزان MDA و فعالیت SOD و CAT را افزایش داد. اثر متقابل CH و BA تا حدودی باعث جبران کاهش توانایی تکثیر، توانایی زیستی، تغییرات مورفولوژیک، تغییر فعالیت آنزیم‌های متابولیک و میزان الکترولیت‌ها ناشی از تیمار با CH شد. از طرفی تیمار همزمان باعث شد که CH بتواند استرس اکسیداتیو حاصل از تیمار با BA را جبران نماید.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به جبران اثرات سمی CH توسط بور میتوان هنگام مصرف چای از کشمش و خرما استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان، کاتچین هیدرات، اسید بوریک، توانایی زیستی، فاکتورهای بیوشیمیایی

## مقدمه

سلول‌های سرطانی MCF-7 و SiHa مشخص شد که کاتچین هیدرات باعث القای آپوپتوزیس وابسته به کاسپاز در این سلول‌ها می‌شود (۵ و ۷). از طرفی تحقیقات پیشین نشان داده است که پلی فنل‌های موجود در چای سبز در تامین سلامت بافت استخوان نقش داشته و با کاهش بازجذب استخوان و افزایش تشکیل ماتریکس استخوان و در نتیجه باعث افزایش تراکم استخوان در حیوانات آزمایشگاهی شده است (۸). در مطالعه Choi و Hwang (۹) نشان داده شد که کاتچین با کاهش سیتوکینهای دخیل در فعال سازی بازجذب استخوان و کاهش آپوپتوزیس در سلول‌های استئوبلاست می‌تواند از استئوپوروز و ایجاد التهاب در استخوان جلوگیری نماید. با توجه به نتایج دوگانه در تحقیقات پیشین شامل القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی از طرفی و تامین سلامت بافت استخوان از طرف دیگر، ضرورت انجام تحقیقات بیشتر بر روی تاثیر کاتچین اجتناب ناپذیر است. به‌خوبی واضح است که در جامعه ایرانی چای به‌خصوص نوع سیاه آن به‌صورت روز افزون مصرف می‌شود که این مصرف می‌تواند به‌عنوان یک شمشردولبه در سلامت ما نقش بازی کند.

از طرفی عنصر بور (B) با عدد اتمی ۵، تنها نافلز در میان عناصر گروه IIIA جدول تناوبی و دارای خواص بین فلز و نافلز می‌باشد. بوریک اسید یک ریز مغذی ضروری برای گیاهان محسوب می‌شود (۱۰). عنصر بور به‌صورت آزاد در طبیعت وجود ندارد و ساده ترین فرم آن در حالت محلول ساختار تری هیدروکسی آن یا اسید بوریک است که یک اسید ضعیف لوئیس می‌باشد (۱۱). مطالعات انجام شده توسط موحدی و آبنوسی نشان داده است که غلظت  $6\text{ng/ml}$  اسید بوریک اثر منفی بر سلامت سلول‌های مزانشیم نداشته و باعث افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و میزان کلسیم تام و در نهایت تمایز سلول‌ها به استئوبلاست شده است (۱۲ و ۱۳). غذاها با منشا گیاهی نظیر خشکبار، میوه‌های خشک و تازه، بقولات، سبزی‌ها

کاتچین هیدرات ترکیبی فلاونوییدی با خاصیت آنتی اکسیدانت قوی موجود در چای سبز (۱) می‌باشد که فرمول مولکولی و وزن مولکولی آن به‌ترتیب C15H16O7 و  $270/290$  گرم بر مول است. این ترکیب در دمای  $25/6$  درجه سانتی‌گراد به‌میزان  $2/2$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در آب و  $50$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در اتانول حل می‌شود. انواع کاتچین‌های موجود در برگ چای شامل ۱- اپی کاتچین EC ۲- اپی گالوکاتچین EGC ۳- اپی کاتچین گالات ECG ۴- اپی گالوکاتچین گالات EGCG است (۲). اپی گالوکاتچین گالات از جمله مهمترین پلی فنول‌های آنتی‌اکسیدانتی موجود در چای سبز است که به‌طور معمول دارای بیشترین میزان فعالیت در مقایسه با سایر آنتی اکسیدان‌ها بوده و خاصیت آنتی اکسیدانتی این ماده ۲۵ برابر ویتامین E و ۱۰۰ برابر ویتامین D گزارش شده است (۳). از طرفی کاتچین نیز که از منابع طبیعی بسیاری مانند برگ چای، دانه انگور و پوست و ساقه درخت آکاسیا استخراج و دارای خاصیت آنتی اکسیدانتی قوی و ضد سرطانی بواسطه القا آپوپتوزیس می‌باشد (۴ و ۵). یکی از مشتقات کاتچین، کاتچین هیدرات است که به‌صورت تجاری از طرف شرکت‌ها متعددی در بازار عرضه می‌شود. در مطالعه انجام توسط Ejaz Ahmad و همکاران (۶) غلظت ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت روزانه به‌مدت ۲۱ روز به رت نژاد ویستار داده شد و مشخص شد که کاتچین هیدرات به‌واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی خود در درمان بیماری آلزایمر نقش دارد. در مطالعه Ejaz Ahmad تیمار کاتچین هیدرات موجب افزایش بیان آنزیم‌های استیل کولین ترانسفراز و نیتریک اکسید سنتتاز القائی و کاهش سطح واسطه‌های التهابی نظیر TNF-a ، IL1B شد. این مطالعه مشخص کرد که کاتچین هیدرات در جلوگیری از تخریب حافظه و بهبود استرس اکسیداتیو موثر است. در مطالعه‌ی دیگری بر روی

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 با دور ۲۵۰۰ سانتریفیوژ شد. محیط رویی خارج و رسوب سلولی در پنج میلی لیتر محیط تازه معلق شد 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 حاوی سلول‌های غیرچسبیده خارج و سپس به مدت ۱۴ روز هر سه روز یکبار محیط سلول‌ها تعویض شد. زمانی که کف فلاسک به تراکم بالایی از سلول رسید، سلول‌ها با کمک (Gibco Trypsin/EDTA Company) از کف فلاسک جدا و به فلاسک‌های جدید منتقل شدند. برای به دست آوردن خلوص بالا از این سلول‌ها سه مرحله پاساژ تکرار شد.

**سنجش توانایی زیستی:** برای بررسی تاثیر کاتچین هیدرات بر توان زیستی سلول‌ها و یافتن دوز موثر، سلول‌های پاساژ سوم با تراکم ۵۰۰۰۰ سلول در پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند. محیط رویی سلول‌ها خارج و محیط کامل حاوی سرم و غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰، ۳۲۰۰ و ۶۴۰۰ میکرومولار کاتچین هیدرات به چاهک‌های مختلف اضافه شد. سپس پلیت به انکوباتور انتقال یافت. بعد از سپری شدن ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت سلول‌های چسبیده تریپسین زنی و محیط کشت حاوی سلول به نسبت ۱:۱ با تریپان بلو ۰/۴ درصد مخلوط شد. پلیت به مدت ۲ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. با استفاده از لام نئوبار سلول‌های آبی رنگ (سلول‌های مرده) و سلول‌های بی‌رنگ (سلول‌های زنده) شمارش و درصد حیات سلول‌ها محاسبه گردید.

با توجه به نتایج حاصل از آزمون تریپان بلو دو غلظت ۴۰۰ و ۳۲۰۰ میکرو مولار از کاتچین هیدرات و با در نظر گرفتن مطالعه آبنوسی و موحدی (۱۲) غلظت ۶ نانوگرم بر میلی لیتر اسید بوریک انتخاب شد. در ادامه گروه‌های

منبع اصلی این عنصر هستند (۱۴). در فرهنگ ایرانی به صورت سنتی و برای جلوگیری از مصرف شکر، مصرف محصولات گیاهی مانند توت و خرما به هنگام نوشیدن چای سفارش شده است که البته با توجه به بررسی‌های انجام شده دلیل علمی نیز برای آن یافت نشد. از آنجا که محصولات گیاهی حاوی مقادیر قابل توجهی از عنصر بور بوده و چای نیز دارای مقادیر زیادی از کاتچین است. لذا با توجه به اهمیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (MSCs) که سلول‌های پرتوان بوده و از طریق تمایز به استئوبلاست نقش مهمی در سلامت استخوان دارند، در این پژوهش تاثیر کاتچین هیدرات بر این سلول‌ها بررسی و همچنین تاثیر متقابل کاتچین هیدرات و بوریک اسید نیز به عنوان مکمل مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

#### مواد و روش‌ها

کلیه 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 سانتی گراد 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 - استرپتومایسین (Gibco Company) در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفته، به زیرهود لامینار منتقل شد. دو

رنگ کریستال ویولت به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شد. کلونی‌های تشکیل شده در گروه های فوق الذکر در زیر میکروسکوپ مشاهده و شمارش شد، همچنین قطر کلونی‌ها نیز با کمک نرم افزار موتیک (شرکت موتیک مدل ۱/۲) اندازه‌گیری شد. برای بررسی PDN، تعداد ۲۰ هزار سلول در پلیت تک‌خانه کشت و سپس سلول‌های بر اساس گروه‌های آزمایشی در زمان‌های ۱، ۳ و ۶ روز تیمار شد. سلول‌ها تریپسینه و مورد شمارش قرار گرفتند و PDN با استفاده از فرمول،  $\log(N/N_0) \times 3.31$  (تعداد سلول در آغاز کشت و N تعداد سلول در پایان کشت) محاسبه شد.

**اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی:** سلول‌های کنترل و تیمار شده پس از ۳۶ ساعت، تریپسینه و شستشو شدند، سپس به کمک نیتروژن مایع سائیده و پس از لیز شدن با بافر  $\text{Tris-HCl}$  PH = ۷/۴ استخراج و در ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان پروتئین موجود در محلول رویی به کمک روش لوری و با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. کلیه اندازه‌گیری‌ها در نمونه‌های تیمار شده و کنترل بر اساس میزان پروتئین ثابت انجام شد.

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز (LDH) کد محصول (۲۲ ۱۴۰۰۰)، آلانین ترانس آمیناز (ALT) کد محصول (۱۹ ۱۴۰۰۰) و آسپارات ترانس آمیناز (AST) کد محصول (۱۸ ۱۴۰۰۰) از کیت‌های شرکت پارس آزمون (تهران - ایران) استفاده شد. طبق پروتکل 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.

در بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز تام (ALPs) از کیت پارس آزمون (کد محصول ۲ ۱۴۰۰۰) استفاده شد و براساس روش ارائه شده توسط شرکت تولید کننده میزان

آزمایشی زیر برای آزمون‌های بعدی و زمان‌های مورد نظر طراحی شدند.

(۱) C (گروه کنترل)، این گروه در تمام مدت زمان تیمار تنها با محیط کشت تازه تیمار شدند.

(۲) BA- این گروه تنها با غلظت ۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر بوریک اسید تیمار شد.

(۳) CH400- این گروه با غلظت ۴۰۰ میکرومولار کاتچین هیدرات تیمار شد.

(۴) CH3200- این گروه با غلظت ۳۲۰۰ میکرومولار کاتچین هیدرات تیمار شد.

(۵) CH400+BA- این گروه با غلظت ۴۰۰ میکرومولار کاتچین هیدرات و ۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر اسید بوریک تیمار شد.

(۶) CH3200+BA- این گروه با غلظت ۳۲۰۰ میکرومولار کاتچین هیدرات و ۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر اسید بوریک تیمار شد.

**بررسی مورفولوژی:** پس از تیمار سلول‌ها، مورفولوژی هسته با استفاده از رنگ فلورسنت هوخست (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PBS) و مورفولوژی سیتوپلاسم با استفاده از رنگ فلورسنت آکریدین اورنژ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر PBS) بررسی و توسط میکروسکوپ فلورسانس (Olympus IX70-Japan) مجهز به دوربین (مدل DP71) عکس‌برداری شدند. قطر هسته‌ها و مساحت سیتوپلاسم به کمک نرم افزار موتیک (شرکت موتیک مدل ۱/۲) اندازه‌گیری و گزارش شد.

**بررسی توان تکثیر:** در راستای بررسی توان تکثیر، توان کلونی زائی (CFA) و میزان دو برابر شدگی جمعیت (PDN) بررسی شد. برای بررسی CFA، سلول‌های پاساژ سوم با تراکم ۵۰۰۰۰ در پلیت‌های تک‌خانه، به مدت ۷ روز کشت شد. در پایان سلول‌ها دو بار با PBS شسته و با

مخلوط و در طول موج ۲۴۰ نانومتر سرعت حذف  $H_2O_2$  به مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد (لازم به ذکر است که قبلاً 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  $cm^{-1}$   $39/4mM$  براساس سرعت مصرف میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه بر میزان میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

#### سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید

**دیسموتاز (SOD):** فعالیت آنزیم SOD براساس روش Giannopolitis و همکاران (۱۵) اندازه‌گیری شد. در این روش اندازه‌گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز براساس اثر بازدارندگی آنزیم با احیای نوری نیتروبلوتترازولیموم است. مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه سلولی و ۱ میلی‌لیتر از محلول واکنش (۲۵ میلی‌مولار بافر فسفات با  $pH=8/6$ ، ۱۲ میلی‌مولار متیونین، ۷۵ میکرو مولار نیتروبلو تترازولیموم، ۱ میلی‌مولار ریبوفلاوین، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و ۵۰ میلی‌مولار سدیم کربنات) در لوله‌های آزمایش ریخته شد. از محلول فاقد عصاره به‌عنوان کنترل و شاهد استفاده شد. 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 کاملاً تاریکی قرار داده شد. برای صفر کردن دستگاه اسپکتوفتومتر از محلول بلانک که فاقد رنگ بود استفاده و سپس در طول ۵۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل T80+ 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 در دقیقه به‌ازای میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید.

**تعیین میزان پراکسید/سیون لیپید:** میزان پراکسیداسیون لیپید از روش اصلاح شده Heath and Packer سنجیده شد. در این پژوهش سنجش مالون دی

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 ویژه آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

میزان کلسیم تام 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 و بر حسب میلی‌گرم بر دسی لیتر گزارش شد.

اندازه‌گیری غلظت سدیم و پتاسیم توسط دستگاه جذب شعله‌ای (Flame photometer) ساخت انگلستان مدل PFP7 انجام شد. در این روش سدیم و پتاسیم نور با طول موجهای متفاوت را ساطع می‌کنند که انتشار نور توسط فیلتر مناسب اندازه‌گیری و میزان انتشار نور متناسب با غلظت این عناصر است. با استفاده از این روش و تهیه غلظت‌های متفاوت از کلرید سدیم و کلرید پتاسیم نمودار استاندارد تهیه و با استفاده از فرمول‌های  $y=0.0127x+0.0053$  و  $R^2=0.996$  و  $y=0.3169x+0.0001$  و  $R^2=0.999$  به ترتیب غلظت‌های سدیم و پتاسیم موجود در نمونه‌ها محاسبه شد. در فرمول‌های فوق الذکر  $y$  میزان جذب و  $x$  غلظت الکترولیت‌ها بوده و میزان الکترولیت‌ها در نمونه‌های به‌صورت میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

**سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT):** فعالیت آنزیم CAT با استفاده از روش Cakmak و Marschner اندازه‌گیری شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی را با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات پتاسیم ۲۵ میلی‌مولار ( $pH=7$ ) و ۳۰۰ میکرولیتر  $H_2O_2$  (۱۰ mM)

در طول موج ۵۹۳ نانومتر 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 فوق الذکر 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  $y=0.0011x+0.0245$  با  $R^2=0.981$  محاسبه و غلظت آنتی‌اکسیدانت تام بر حسب میکرو مول در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

#### آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها با کمک نرم افزار SPSS (ساخت شرکت میکروسیستم آمریکا مدل ۱۶) توسط روش آنالیز واریانس یک‌طرفه تست توکی انجام و سطح معنی‌داری معادل  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

#### نتایج

مقایسه میانگین توانایی زیستی سلول‌ها نشان داد که در طی ۱۲ ساعت کاهش توانایی زیستی از دوز  $3200 \mu\text{M}$  به بعد نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بوده ( $p < 0.05$ ). این در حالی است که در طی زمان ۲۴ و ۳۶ ساعت این کاهش از دوز  $400 \mu\text{M}$  مشاهده شده است (جدول ۱). برای ادامه مطالعات در جهت بررسی اثرات هم‌زمان کاتچین هیدرات و  $6 \text{ ng/ml}$  نانوگرم بر میلی‌لیتر بوریک اسید، غلظت‌های ۴۰۰ میکرومول و ۳۲۰۰ کاتچین هیدرات در طی زمان ۳۶ ساعت انتخاب شدند. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تیمار سلول‌ها با اسید بوریک تاثیر معنی‌داری بر توانایی زیستی سلول‌ها در مقایسه با گروه C نداشت. از طرفی نیز تیمار هم‌زمان کاتچین هیدرات و اسید بوریک نیز نتوانست مسمومیت ناشی از کاتچین هیدرات را مرتفع سازد، لذا کاتچین

آلدهید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون در نظر گرفته شده است. یک میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی تیوباربتوریک 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 بعد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس غلظت کمپلکس تیوباربتولیک اسید-مالون دی آلدهید با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل T80+ ساخت شرکت PG instrument کشور انگلستان) در طول موج ۵۲۳ نانومتر خوانده شد. چون در طول موج ۵۲۳ نانومتر بعضی از ترکیبات به‌عنوان ترکیبات مزاحم جذب دارند پس جذب محلول را در طول موج ۶۰۰ نانومتر نیز خوانده و از جذب خوانده شده در طول موج ۵۲۳ نانومتر کم شد. غلظت کمپلکس تیوباربتوریک اسید-مالون دی آلدهید تشکیل شده با استفاده از ضریب خاموشی  $1 \text{ cm}^{-1} - 155 \text{ mmol}$  و فرمول  $A = \epsilon bc$  (A: جذب خوانده شده،  $\epsilon$ : ضریب خاموشی، b: عرض کووت (۱cm)، c: غلظت کمپلکس مالون دی آلدهید) اندازه‌گیری و برحسب میکرومول گزارش شد.

**اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانت تام (روش FRAP):** فعالیت آنتی‌اکسیدانتی کل با استفاده از روش Benzie and Strain طبق مراحل زیر تعیین شد. بهر لوله حاوی ۱۵۰ میکرولیتر نمونه، ۱۷۰۰ میکرولیتر محلول FRAP (بافر سدیم استات ۳۰۰ میلی‌مولار pH ۶/۳، محلول ۱۰ میلی‌مولار TPTZ و محلول ۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن با حجم‌های مساوی) و ۸۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. سپس لوله‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل T80+ ساخت شرکت PG instrument کشور انگلستان)

هیدرات در تیمارها باعث کاهش معنی دار ( $P < 0.05$ ) BA شد (جدول ۲).  
توانایی زیستی سلول‌های MSCs نسبت به گروه C و

جدول ۱: مقایسه میانگین توانایی درصد زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت پس از تیمار ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعته با دوزهای مختلف کاتچین هیدرات توسط رنگ آمیزی تریپان بلو

زمان (ساعت)	دوز ( $\mu\text{M}$ )		
	۳۶	۲۴	۱۲
۰	۹۵/۱۴ <sup>a</sup> ±۰/۲۳	۹۵/۴۲ <sup>a</sup> ±۰/۴۳	۹۵/۷۸ <sup>a</sup> ±۰/۲۵
۱۰۰	۹۴/۱۳ <sup>ab</sup> ±۰/۷۶	۹۴/۶۷ <sup>a</sup> ±۰/۵۱	۹۵/۳۰ <sup>a</sup> ±۰/۲۲
۲۰۰	۹۲/۵۷ <sup>ab</sup> ±۰/۳۱	۹۳/۰۷ <sup>ab</sup> ±۰/۴۹	۹۴/۶۲ <sup>ab</sup> ±۰/۲۶
۴۰۰	۹۱/۷۵ <sup>b</sup> ±۰/۳۴	۹۲/۵۵ <sup>b</sup> ±۰/۴۵	۹۳/۶۴ <sup>ab</sup> ±۰/۱۵
۵۰۰	۸۸/۸۸ <sup>c</sup> ±۱/۸۹	۹۰/۶۵ <sup>c</sup> ±۰/۲۴	۹۲/۵۹ <sup>ab</sup> ±۰/۱۳
۱۶۰۰	۸۸/۱۹ <sup>c</sup> ±۰/۶۹	۸۹/۴۴ <sup>cd</sup> ±۰/۲۸	۹۲/۳۴ <sup>ab</sup> ±۰/۳۱
۳۲۰۰	۸۳/۶۴ <sup>d</sup> ±۰/۱۵	۸۸/۵۱ <sup>d</sup> ±۰/۰۲	۹۱/۰۰ <sup>b</sup> ±۰/۰۳
۶۴۰۰	۳۰/۷۴ <sup>e</sup> ±۰/۳۵	۳۲/۴۱ <sup>e</sup> ±۱/۹۰	۶۷/۴۷ <sup>c</sup> ±۰/۲۶

مقادیر به صورت mean±SD می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0.05$ )

به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد، one way ANOVA, Tukey test.

جدول ۲: مقایسه میانگین توانایی زیستی سلول‌ها پس از تیمار ۳۶ ساعته بر طبق گروه‌های فوق‌الذکر توسط رنگ آمیزی تریپان بلو

گروه‌ها	مقدار
C	۹۵/۲۰ <sup>a</sup> ±۰/۲۴
BA	۹۴/۳۴ <sup>a</sup> ±۰/۲۲
CH400	۹۱/۸۷ <sup>b</sup> ±۰/۲۶
CH400+BA	۹۲/۱۴ <sup>b</sup> ±۰/۵۰
CH3200	۸۳/۱۴ <sup>c</sup> ±۰/۹۱
CH3200+BA	۸۶/۶۸ <sup>d</sup> ±۰/۶۳

مقادیر به صورت mean±SD می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف-های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0.05$ ) به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

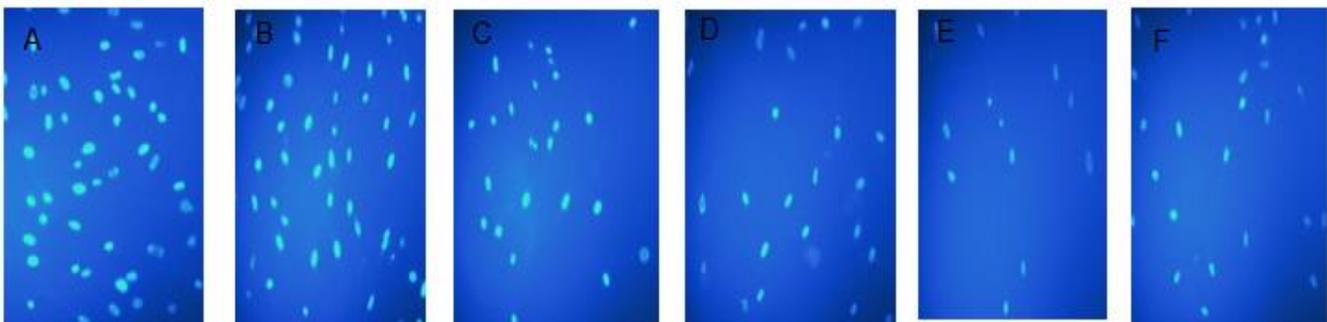
one way ANOVA, Tukey test

تیمار شده با غلظت‌های ۴۰۰ و ۳۲۰۰ میکرومولار کاتچین هیدرات نسبت به کنترل تغییرات مورفولوژیک شامل متراکم شدن، شکستگی و تغییر شکل هسته مشاهده شد

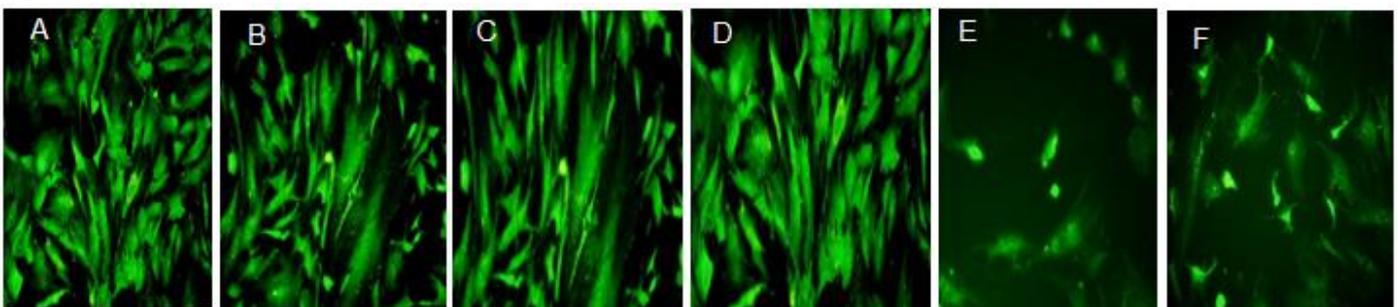
در مدت زمان ۳۶ ساعت تغییرات مورفولوژیک هسته سلول‌ها در مقایسه با کنترل در گروه تیمار شده با ۶ نانومولار اسید بوریک مشاهده نشد. ولی در گروه‌های

درحالی که چروکیدگی و کوچک شدن سیتوپلاسم و گرد شدگی نسبی سلول‌ها در گروه‌های تیمار شده با کاتچین هیدرات در مقایسه با کنترل قابل مشاهده بود (شکل ۲). پیرو مشاهدات میکروسکوپی، آنالیز آماری داده‌ها نیز کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) مساحت سیتوپلاسم را در گروه‌های تیمار شده با کاتچین هیدرات نسبت به گروه C و BA تایید کرد. تیمار همزمان کاتچین هیدرات و اسید بوریک توانست تغییرات مورفولوژیک سیتوپلاسم را در مقایسه با تیمار کاتچین هیدرات به تنهایی جبران کند، به‌صورتی که داده‌ها نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود (جدول ۳).

(شکل ۱). علاوه بر نتایج میکروسکوپی، آنالیز آماری داده‌ها نیز کاهش معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) به‌صورت وابسته به دوز در گروه‌های ۴۰۰ و ۳۲۰۰ میکرومول کاتچین هیدرات نسبت به گروه‌های کنترل را نشان داد. تیمار همزمان کاتچین هیدرات و اسید بوریک در گروه C400+BA باعث بهبود معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) تغییرات ناشی از تیمار با کاتچین هیدرات شد ولی این تاثیر در رابطه با دوز ۳۲۰۰ میکرومول مشاهده نشد (جدول ۳). رنگ آمیزی آکریدین اورنژ نیز نشان داد که شکل سیتوپلاسم در سلول‌های گروه C و BA چندوجهی و زوائد سلولی قابل تشخیص بوده و هسته‌های آن‌ها در موقعیت مرکزی نسبت به سیتوپلاسم قرار داشتند،



شکل ۱: رنگ آمیزی فلورسنت هسته سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با رنگ فلورسنتس هوست پس از ۳۶ ساعت تیمار (A) کنترل تیمار (B) ۶ ng/ml اسید بوریک و دوزهای (C) ۴۰۰ μM کاتچین هیدرات (D) ۴۰۰ μM کاتچین هیدرات و ۶ ng/ml اسید بوریک (E) ۳۲۰۰ μM کاتچین هیدرات (F) ۳۲۰۰ μM کاتچین هیدرات و ۶ ng/ml اسید بوریک (بزرگ‌نمایی X ۲۰۰).



شکل ۲: رنگ آمیزی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با رنگ فلورسنس آکریدین اورنژ پس از ۳۶ ساعت تیمار (A) کنترل (B) ۶ ng/ml اسید بوریک و دوزهای (C) ۴۰۰ μM کاتچین هیدرات (D) ۴۰۰ μM کاتچین هیدرات و ۶ ng/ml اسید بوریک (E) ۳۲۰۰ μM کاتچین هیدرات (F) ۳۲۰۰ μM کاتچین هیدرات و ۶ ng/ml اسید بوریک (بزرگ‌نمایی × ۲۰۰).

جدول ۳: مقایسه میانگین قطر هسته (μm) و مساحت سیتوپلاسم (μm<sup>2</sup>) سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در گروه‌های فوق‌الذکر پس از ۳۶ ساعت تیمار

گروه‌ها	میانگین قطر هسته	میانگین مساحت سیتوپلاسم
C	۲۰/۵۹ <sup>a</sup> ± ۲/۹۵	۱۸۲۹/۶۱ <sup>a</sup> ± ۲۸۹/۱۲
BA	۱۹/۷۷ <sup>a</sup> ± ۲/۰۸	۱۷۸۰/۳۴ <sup>a</sup> ± ۳۵۴/۳۴
CH400	۱۸/۵۳ <sup>bc</sup> ± ۲/۰۴	۱۵۱۰/۶۱ <sup>b</sup> ± ۲۰۷/۴۸
CH400+BA	۱۹/۴۶ <sup>ab</sup> ± ۲/۳۵	۱۷۵۹/۴۳ <sup>a</sup> ± ۱۹۶/۸۸
CH3200	۱۷/۱۸ <sup>c</sup> ± ۱/۶۲	۱۳۸۵/۲۶ <sup>b</sup> ± ۲۰۶/۶۹
CH3200+BA	۱۸/۳۱ <sup>bc</sup> ± ۲/۱۰	۱۶۶۶/۹۷ <sup>ab</sup> ± ۳۲۱/۶۳

مقادیر به صورت mean±SD می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵) به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. one way ANOVA, Tukey test.

زمان‌های تیمار اثر غلظت ۴۰۰ میکرومولار کاتچین هیدرات را به صورت معنی‌دار (p<۰/۰۵) در مقایسه با تیمار فقط با کاتچین هیدرات جبران نماید. این در حالی است که اثر جبرانی بوریک اسید بر غلظت ۳۲۰۰ کاتچین هیدرات فقط در زمان کوتاه یک روز قابل جبران بود و در ۳ و ۶ روز میزان PDN در سلول‌های تیمار شده به صورت هم‌زمان با کاتچین هیدرات و بوریک اسید نسبت به گروه‌های C و BA کاهش معنی‌دار نشان داد (جدول ۴).

تعداد دو برابرشدگی (PDN) در روزهای ۳، ۱ و ۶ روز بررسی شد. در روزهای ۳، ۱ و ۶ گروه اسید بوریک نسبت به گروه C تغییر معنی‌دار نشان نداد (p>۰/۰۵). این در حالی است که در گروه‌های تیمار شده با کاتچین هیدرات کاهش معنی‌داری (p<۰/۰۵) نسبت به گروه‌های C و BA دیده شد به طوری که این کاهش در گروه ۳۲۰۰ میکرومول در ۳، ۱ و ۶ روز بسیار معنی‌دار (p>۰/۰۰۱) بود. در گروه‌های تیمار هم‌زمان کاتچین هیدرات و اسید بوریک، اسید بوریک توانست در همه

جدول ۴: مقایسه میانگین تعداد دو برابر شدگی جمعیت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در گروه‌های فوق الذکر پس از ۳، ۶ و ۳۰ روز تیمار

زمان (روز)	۱	۳	۶	گروه‌ها
	۱/۰۵۱ <sup>a</sup> ±۰,۱۲	۱/۲۴۸ <sup>a</sup> ±۰,۱۰	۱/۸۵۶ <sup>a</sup> ±۰,۰۷	C
	۰/۹۷۷ <sup>a</sup> ±۰/۱۲	۱/۱۸۶ <sup>ab</sup> ±۰,۱۰	۱/۵۹۱ <sup>ab</sup> ±۰,۴۴	BA
	۰/۷۸۸ <sup>ab</sup> ±۰/۱۵	۰/۹۰۳ <sup>b</sup> ±۰/۰۰	۱/۰۵۱ <sup>b</sup> ±۰/۱۲	C400
	۰/۹۰۳ <sup>ab</sup> ±۰,۰۰	۱/۱۲۵ <sup>ab</sup> ±۰,۰۰	۱/۳۱۷ <sup>ab</sup> ±۰,۰۰	C400+BA
	۰/۵۳۴ <sup>b</sup> ±۰/۳۶	۰/۴۲۷ <sup>c</sup> ±۰/۱۸	۰/۳۲۰ <sup>c</sup> ±۰/۰۰	C3200
	۰/۷۹۸ <sup>ab</sup> ±۰/۱۸	۰/۵۳۴ <sup>c</sup> ±۰/۱۸	۰/۴۲۷ <sup>c</sup> ±۰/۱۵	C3200+BA

مقادیر به صورت  $SD \pm mean$  می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ) به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد، one way ANOVA, Tukey test.

داده‌های مربوط به قطر و تعداد کلونی نشان داد که تیمار با اسید بوریک باعث کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) تعداد و قطر کلونی‌های تشکیل شده توسط MSCs در مقایسه با گروه C شد. از طرفی نیز تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۴۰۰ و ۳۲۰۰ میکرومول همراه با کاهش بسیار معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) بود. تیمار هم‌زمان با اسیدبوریک و کاتچین هیدرات نیز نسبت به گروه‌های C و BA کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) نشان داد و نتوانست جبران کاهش ناشی از تیمار با کاتچین به‌تنهایی را به‌همراه داشته باشد (جدول ۵).

جدول ۵: مقایسه میانگین تعداد و قطر کلونی‌های (mm) تشکیل شده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در گروه‌های فوق الذکر پس از ۷ روز تیمار

میانگین قطر کلون	میانگین تعداد کلونی	گروه‌ها
۱/۵۸ <sup>a</sup> ±۰/۲۳	۱۲۲/۵۰ <sup>a</sup> ±۰/۱۰	C
۱/۲۷ <sup>b</sup> ±۰/۰۹	۱۱۳/۵۱ <sup>b</sup> ±۳/۵۳	BA
۱/۰۴ <sup>c</sup> ±۰/۱۱	۷۷/۰۰ <sup>c</sup> ±۲/۸۳	C400
۱/۲۴ <sup>b</sup> ±۰/۱۸	۹۵/۰۰ <sup>d</sup> ±۴/۲۴	C400+BA
۰/۰۰ <sup>d</sup> ±۰/۰۰	۰/۰۰ <sup>e</sup> ±۰/۰۰	C3200
۰/۰۰ <sup>d</sup> ±۰/۰۰	۰/۰۰ <sup>e</sup> ±۰/۰۰	C3200+BA

مقادیر به صورت  $SD \pm mean$  می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0.05$ ) به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد، one way ANOVA, Tukey test.

کاهش معنی دار ( $p < 0.05$ ) میزان فعالیت آنزیم‌های LDH، AST و ALT در مقایسه با گروه‌های تیمار شده با کاتچین هیدرات به تنهایی شد البته فعالیت این آنزیم‌ها در مقایسه با گروه C نیز کاهش معنی‌دار داشت مگر در رابطه با تاثیر غلظت ۳۲۰۰ میکرومولار کاتچین هیدرات بر فعالیت آنزیم LDH که نسبت به گروه C افزایش نشان داد (جدول ۶).

بوریک اسید باعث افزایش معنی دار ( $p < 0.05$ ) فعالیت آنزیم‌های LDH و ALP نسبت به گروه C شد در حالی که این ترکیب شیمیائی باعث کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) فعالیت آنزیم‌های ALT و AST در سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت شد. از طرفی تیمار سلول‌ها با غلظت ۴۰۰ میکرومولار کاتچین هیدرات تغییری در فعالیت این آنزیمها در مقایسه با گروه C به وجود نیاورد ولی غلظت ۲۳۰۰ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار فعالیت کلیه آنزیم‌های فوق الذکر شد. تیمار هم‌زمان کاتچین هیدرات و بوریک اسید باعث

جدول ۶: مقایسه میانگین فعالیت (IU/L) آنزیم‌های آلانین ترانس آمیناز (ALT) و آسپاراتات ترانس آمیناز (AST)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آلکالین فسفاتاز (ALP) سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در گروه‌های مختلف پس از ۳۶ ساعت تیمار

گروه‌ها	LDH	ALP	AST	ALT
C	۱۰۸۰/۰ <sup>a</sup> ± ۷۲/۱	۳۵/۴۷ <sup>a</sup> ± ۷/۹	۲۲/۶۷ <sup>a</sup> ± ۰,۳۲	۶/۵۵ <sup>ac</sup> ± ۰/۵۹
BA	۷۴۰/۰ <sup>b</sup> ± ۶۰,۰	۴۴/۶۲ <sup>b</sup> ± ۳/۴	۱۷/۷۳ <sup>b</sup> ± ۰,۲۰	۴/۱۶ <sup>b</sup> ± ۰/۳۴
CH400	۱۱۸۰/۰ <sup>ac</sup> ± ۳۴/۶	۳۶/۶۱ <sup>a</sup> ± ۱/۹	۲۳/۲۴ <sup>a</sup> ± ۰/۵۰	۷/۰۱ <sup>ac</sup> ± ۰/۹۹
CH400+BA	۸۴۶/۶ <sup>b</sup> ± ۸۰/۸	۴۴/۶۲ <sup>b</sup> ± ۹/۰۸	۱۹/۸۰ <sup>c</sup> ± ۰,۲۴	۴/۱۶ <sup>b</sup> ± ۰/۳۴
CH3200	۶۶۲۱/۰ <sup>c</sup> ± ۲۰۰/۳	۴۸/۰۶ <sup>b</sup> ± ۰/۰	۲۵/۱۱ <sup>d</sup> ± ۰/۱۰	۷/۴۱ <sup>c</sup> ± ۱/۶
CH3200+BA	۶۶۱۳/۰ <sup>d</sup> ± ۱۳۰/۱	۶۲/۲۳ <sup>c</sup> ± ۱/۹	۲۰/۷۸ <sup>c</sup> ± ۰,۳۸	۴/۹۶ <sup>ab</sup> ± ۰/۳۴

مقادیر به صورت mean±SD می باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می باشد ( $p < 0.05$ ) به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد، (one way ANOVA, Tukey test).

حالی‌است که غلظت ۳۲۰۰ میکرو مولار باعث کاهش معنی دار ( $p < 0.05$ ) میزان سدیم و پتاسیم گردید ولی غلظت ۴۰۰ میکرومولار تنها غلظت پتاسیم را کاهش داد. غلظت هم‌زمان کاتچین هیدرات و بوریک اسید باعث افزایش معنی‌دار سدیم و کاهش معنی دار پتاسیم در مقایسه با گروه C شد (جدول ۷).

بوریک اسید به تنهایی باعث افزایش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) غلظت کلسیم و سدیم و کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) غلظت پتاسیم در مقایسه با گروه C شد. در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۴۰۰ و ۳۲۰۰ میکرومولار کاتچین هیدرات میزان کلسیم داخل سلولی در مقایسه با گروه C هیچ‌گونه تغییری نشان ندادند. این در

جدول ۷- مقایسه میانگین غلظت کلسیم، سدیم و پتاسیم داخل سلولی در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در گروه‌های مختلف پس از ۳۶ ساعت تیمار

گروه‌ها	کلسیم (mg/dl)	سدیم (µg/dl)	پتاسیم (µg/dl)
C	۱/۳۵۴ <sup>a</sup> ±۰,۱۵۴	۴/۸۰ <sup>a</sup> ±۰,۳۴	۰/۸۷ <sup>a</sup> ±۰,۰۳
BA	۱/۸۰ <sup>b</sup> ±۰/۲۴	۶/۹۵ <sup>b</sup> ±۰,۳۵	۰/۷۳ <sup>b</sup> ±۰,۰۱
CH400	۱/۳۵۳ <sup>a</sup> ±۰/۰۹	۴/۲۱ <sup>a</sup> ±۰/۳۲	۰/۵۵ <sup>c</sup> ±۰/۰۱
CH400+BA	۱/۶۷۶ <sup>ab</sup> ±۰,۰۳	۶,۱۷ <sup>b</sup> ±۰,۵۹	۰/۵۱ <sup>c</sup> ±۰,۰۱
CH3200	۱/۲۰۵ <sup>a</sup> ±۰/۱۳	۳/۶۲ <sup>c</sup> ±۰/۳۴	۰/۴۷ <sup>c</sup> ±۰/۰۵
CH3200+BA	۱/۳۶۰ <sup>a</sup> ±۰/۱۲	۵/۱۹ <sup>d</sup> ±۰/۳۳	۰/۳۷ <sup>d</sup> ±۰/۰۳

مقادیر به صورت  $SD \pm mean$  می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ) به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد، one way ANOVA.Tukey test.

آلدئید در مقایسه با گروه C به‌وجود نیامد. تیمار هم‌زمان کاتچین هیدرات و بوریک اسید باعث کاهش میزان آنتی اکسیدانت کل در مقایسه با گروه‌های تیمار شده با کاتچین هیدرات به‌تنهایی شد ولی تغییر در غلظت MDA و فعالیت آنزیم‌ها آنتی اکسیدانت در مقایسه با گروه C و گروه‌های تیمار شده با کاتچین هیدرات به‌تنهایی به‌وجود نیامد (جدول ۸).

آنالیز آماری داده‌ها نشان داد بوریک اسید باعث افزایش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) غلظت MDA و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی SOD و CAT در سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت شد، در حالی که هیچ‌گونه تغییری در میزان آنتی اکسیدانت کل به‌وجود نیامد. تیمار سلول‌های با غلظت‌های مختلف کاتچین هیدرات به‌تنهایی باعث افزایش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) میزان آنتی اکسیدانت کل گردید ولی تغییر در فعالیت آنزیم‌ها و میزان مالون دی

جدول ۸: مقایسه میانگین میزان آنتی‌اکسیدانت کل (FRAP)، محتوی مالون دی آلدئید (MDA)، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و سوپراکسیددیسموتاز (SOD) سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت در گروه‌های مختلف پس از ۳۶ ساعت تیمار

گروه‌ها	FRAP (µM mg <sup>-1</sup> of protein)	MDA (µM)	CAT Unit min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> of (protein)	SOD (Unit min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> of protein)
C	۱۴/۳۳ <sup>a</sup> ±۰/۵۷	۰/۱۷ <sup>a</sup> ±۰/۰۱	۰/۵۶ <sup>a</sup> ±۰/۰۲	۴/۹۳ <sup>a</sup> ±۰/۰۸
BA	۱۵/۳۳ <sup>a</sup> ±۱/۵۲	۰/۲۱ <sup>b</sup> ±۰/۰۱	۰/۷۲ <sup>b</sup> ±۰/۰۳	۶/۱۹ <sup>b</sup> ±۰/۰۵
CH400	۲۰/۰۰ <sup>b</sup> ±۱/۰۰	۰/۱۵ <sup>a</sup> ±۰/۰۳	۰/۵۶ <sup>a</sup> ±۰/۰۲	۴/۶۵ <sup>a</sup> ±۰/۰۷
CH400+BA	۱۶/۶۷ <sup>ab</sup> ±۰/۵۷	۰/۲۰ <sup>ab</sup> ±۰/۰۱	۰/۵۸ <sup>a</sup> ±۰/۰۰	۴/۸۳ <sup>a</sup> ±۰/۰۱
CH3200	۲۶/۰۰ <sup>c</sup> ±۲/۰۰	۰/۱۱ <sup>c</sup> ±۰/۰۲	۰/۵۹ <sup>a</sup> ±۰/۰۲	۴/۱۷ <sup>a</sup> ±۰/۰۴
CH3200+BA	۲۱/۳۳ <sup>b</sup> ±۲/۰۵	۰/۱۸ <sup>a</sup> ±۰/۰۱	۰/۶۲ <sup>a</sup> ±۰/۰۱	۴/۳۵ <sup>a</sup> ±۰/۰۳

مقادیر به صورت  $mean \pm SD$  می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ) به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد، one way ANOVA.Tukey test.

## بحث

در مدت زمان کم با دوز زیاد و در مدت زمان زیاد با دوز کم، کاتچین هیدرات باعث کاهش این فاکتور زیستی در سلول‌های مزانشیم مغز اسخوان رت شده است. رنگ تریپان بلو قابلیت عبور از غشای سیتوپلاسم را ندارد مگر اینکه تمامیت غشای از بین رفته باشد (۲۰)، یکی از فاکتورهایی که باعث از بین رفتن تمامیت غشا می‌شود، عدم تعادل در غلظت الکترولیت‌ها می‌باشد. در بررسی میزان الکترولیت‌ها مشخص شد که کاتچین هیدرات باعث اختلال در سطح الکترولیت‌های کلسیم، سدیم و پتاسیم می‌شود، البته باید در نظر گرفت که بوریک اسید خود نیز این اختلال را به وجود آورد. تیمار همزمان کاتچین هیدرات و اسید بوریک نیز کاهش توانایی زیستی را نشان داد اگرچه این کاهش در تیمار هم‌زمان تا حدودی نسبت به تیمار کاتچین هیدرات به تنهایی مرتفع شده بود ولی دلیل بر جبران نیست و همچنان نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود. لذا عدم جبران کاهش توانایی زیستی ممکن است به این دلیل باشد که بوریک اسید نتوانسته است اختلال در سطح الکترولیت‌ها را جبران نماید. در نتیجه می‌توان گفت که استفاده هم‌زمان این دو ترکیب فاقد هرگونه اثر هم‌افزایی یا جبران‌کنندگی در رابطه با توانایی زیستی است.

نتایج دوبرابر شدگی جمعیت کاهش تعداد جمعیت سلولی در ۱، ۳ و ۶ روز، در هر دو غلظت کاتچین هیدرات نسبت به کنترل را نشان داد، البته در گروه تیمار شده با دوز ۳۲۰۰ میکرو مول کاهش بیشتری مشاهده شد. همچنین بررسی توانایی تشکیل کلونی نیز با نتیجه به دست آمده در آزمون دو برابر شدگی جمعیت سلولی هم‌راستا بود. این نتایج نشان داد که افزایش غلظت و طولانی‌تر شدن زمان تیمار اثر مسمومیت بیشتری را اعمال می‌کند و توانایی حیات و توانایی تکثیری سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز اسخوان تحت تاثیر کاتچین هیدرات را به شدت کاهش می‌دهد. کاتچین هیدرات بر توانایی تکثیر

مطالعات زیادی در رابطه با اثر کاتچین و مشتقات آن بر روی انواع سلول‌های مختلف انجام گرفته اما در رابطه با اثر این ماده در اسخوان سازی و فرآیند استئوژنز اطلاعات کافی در دسترس نیست. با توجه به اهمیت سلول‌های مزانشیم مغز اسخوان در فرآیند ترمیم و بازسازی اسخوان و با استناد بر مقاله Choi و Hwang (۹) مطالعه اثر کاتچین هیدرات بروی سلامت MSCs قابل بحث و بررسی است. همچنین مطالعات آبنوسی و موحدی (۱۲ و ۱۳) در رابطه با اسید بوریک و تاثیر آن بر روی MSCs از طرفی و حضور قابل ملاحظه عنصر بور در گیاهان از طرف دیگر، مطالعه نقش کاتچین هیدرات به همراه اسید بوریک بر شاخصه‌های بیوشیمیایی، مورفولوژی و توانایی حیات سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز اسخوان را ضروری می‌سازد.

جدای از اثر بازداندگی رشد سلول‌های سرطانی که گزارشهای متعددی در رابطه با آن وجود دارد (۵، ۷، ۱۶)، اثر آنتی‌اکسیدانی کاتچین هیدرات (۶، ۱۷، ۱۸) بخوبی بررسی شده است. البته بررسی‌های انجام شده بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز اسخوان در این پژوهش نشان دادند که کاتچین هیدرات با غلظت‌های تعیین شده باعث کاهش توانایی زیستی، قطر هسته و مساحت سیتوپلاسم می‌شود که این می‌تواند به علت اختلال در غشای سلول و القا آپوپتوزیس و فعال شدن نوکلئازها و پروتئازهای متعدد باشد که باعث متراکم شدن کروماتین و چروکیدگی سلول می‌شود (۱۹). مطالعه صورت گرفته توسط الشتاوی نشان دادند که کاتچین هیدرات باعث القاء آپوپتوز وابسته به P53 و کاسپاز در سلول‌های سرطان پستان انسانی می‌شود (۱۶). لذا همان‌طور که قبلاً متذکر شدیم احتمالاً تغییر در مورفولوژی MSCs شامل تراکم کروماتین و چروکیدگی سیتوپلاسم در این پژوهش به دلیل بروز مرگ سلولی برنامه ریزی شده می‌باشد. از طرفی کاهش توانایی زیستی نیز مشاهده شد که

سیکل سلولی نیاز مبرم به انرژی برای سنتز بیوملکول‌های مورد نیاز در مراحل مختلف این فرآیند وجود دارد. اختلال در فرآیند تولید انرژی سلول می‌تواند باعث فقر انرژی در سلول و در نتیجه دلیل ایجاد اختلال در روند تکثیر سلولی باشد. در محیط کشت سلولی، کربوهیدرات‌ها در مرکز متابولیسم قرار دارند که در نتیجه سلول با مصرف گلوکز از طریق مسیر هوازی بخش مهمی از نیاز انرژی خود را تامین می‌کند. در فرایند هوازی، گلوکز در مسیر گلیکولیز به ۲ مول پیروات تبدیل شده که این مولکول‌ها پس از تبدیل به استیل کوآ وارد چرخه کربس می‌شوند. در این چرخه، که در میتوکندری اتفاق می‌افتد، انرژی موجود در گلوکز در حمال‌های انرژی از جمله  $NAD^+$  و FAD ذخیره و از طریق زنجیره انتقال الکترون در فرآیند اکسیداسیون فسفوریلاسیون در حضور اکسیژن باعث تولید ATP مورد نیاز سلول می‌شود (۲۲). علاوه بر تبدیل به استیل کوآ، پیروات می‌تواند به لاکتیک اسید تبدیل شود، این واکنش در حضور آنزیم لاکتات دهیدروژناز انجام می‌پذیرد که در این صورت تنها تعداد کمی ATP نسبت به مسیر هوازی تولید می‌شود (۲۳). این تغییر در فرآیند تولید انرژی را اثر واربرگ (۲۴) می‌نامند که در این صورت میزان مصرف گلوکز از طریق مسیر غیر هوازی افزایش یافته ولی میزان تولید ATP در سلول کمتر از متابولیسم هوازی است و در نهایت سلول دچار فقر انرژی می‌شود.

در مطالعه حاضر تیمار سلول‌ها با اسید بوریک به تنهایی، با تایید نتایج آبنوسی و موحدی، باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز، آلانین ترانس آمیناز و آسپارات ترانس آمیناز شد، که این نشان‌دهنده تامین انرژی سلول از طریق مصرف گلوکز به واسطه متابولیسم هوازی است. نتایج تیمار سلول با غلظت ۳۲۰۰ میکرومولار کاتچین هیدرات نشان داد که فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم سلولی مانند فعالیت

MSCs تاثیر نامطلوب دارد و این تاثیر نیز در مورفولوژی این سلول‌ها دیده شد. در بررسی تاثیر هم‌زمان کاتچین هیدرات و بوریک اسید، خسارت وارد شده توسط غلظت کم کاتچین هیدرات (۴۰۰ میکرومولار) توسط بوریک اسید در آزمون PDN، قطر هسته و مساحت سیتوپلاسم جبران شده بود ولی در رابطه با غلظت زیاد (۳۲۰۰ میکرومولار) اگرچه تاحدودی صدمات وارده جبران شد ولی کاملا به حد کنترل نرسیده بود. جبران کاهش قطر هسته و مساحت سیتوپلاسم می‌تواند به این دلیل باشد که بوریک اسید باعث ممانعت از ورود کاتچین هیدرات به داخل سلول شده است. همان‌طور که تحقیقات پیشین اشاره می‌کند کاتچین هیدرات اثر آنتی اکسیدانتهی دارد (۶، ۱۷، ۱۸)، لذا در این تحقیق با روش FRAP مشخص شد که در گروه‌های  $CH_{400}$  و  $CH_{3200}$  میزان آنتی اکسیدانت کل به صورت معنی‌دار و وابسته به غلظت افزایش داشته است. در صوتی که تیمار هم‌زمان اسید بوریک و کاتچین هیدرات نشان داد که میزان آنتی اکسیدانتهی کل سلول کاهش معنی‌دار داشته است، که این می‌تواند به دلیل اختلال در ورود کاتچین هیدرات به درون سلول به واسطه حضور اسید بوریک باشد. همان‌طور که قبلا نیز اشاره شده است اسید بوریک یک اسید ضعیف (۱۱) است که می‌تواند با گروه هیدروکسی در ترکیبات واکنش دهد و با تولید کمپلکس از ورود کاتچین هیدرات به داخل سلول جلوگیری کند.

اختلال ایجاد شده توسط کاتچین هیدرات که در توانایی تکثیر سلول‌های مزانشیم مغز استخوان (بر اساس آزمونهای PDN و CFA) به وجود آمد ممکن است به دلیل اختلال در سیکل سلولی اتفاق افتاده باشد (۲۱). تا حدودی توانایی تکثیر سلولی توسط بوریک اسید جبران شده است به خصوص در رابطه با توانایی دوبرابر شدگی جمعیت سلولی که تحت تاثیر غلظت کم (۴۰۰ میکرومولار) کاتچین هیدرات بود است. در مرحله S

اسید بوریک با تولید رادیکال آزاد باعث پروکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع در سلول شده است. افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نیز در جهت کاهش فعالیت رادیکال‌های آزاد بوده است. احتمالاً برخی از اختلالات ایجاد شده توسط اسید بوریک مانند کاهش معنی‌دار توان کلونی زائی یا کاهش ۵ الی ۱۵ درصدی قطر هسته، مساحت سیتوپلاسم و توانائی زیستی سلول‌ها می‌تواند به دلیل تولید رادیکال آزاد باشد. از طرفی تیمار سلول‌ها با کاتچین هیدرات باعث کاهش میزان تولید MDA نسبت به گروه کنترل شده است که این خود نشان دهنده‌ی خاصیت آنتی‌اکسیدانتی کاتچین هیدرات (۲۵) است. تیمار هم‌زمان کاتچین هیدرات و اسید بوریک باعث کاهش میزان MDA داخل سلولی نسبت به تیمار بوریک اسید به تنهایی شده است، به طوری که مقدار MDA به حد کنترل رسید. می‌توان اینطور تفسیر کرد که اثر آنتی‌اکسیدانتی کاتچین هیدرات موجب کاهش استرس اکسیداتیو تولید شده به وسیله‌ی بوریک اسید شده و مصرف هم‌زمان این ترکیبات می‌تواند اثرات منفی ناشی از عنصر بور که در محصولات گیاهی وجود دارد را مرتفع سازد. مطالعات انجام شده توسط Yetuk\_ و همکاران (۲۶) و مهرا و همکاران (۲۷) نشان داد که مصرف کاتچین باعث کاهش میزان MDA و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی می‌شود. این مطالعات در راستای مطالعه حاضر می‌باشند.

#### نتیجه‌گیری

کاتچین هیدرات یک ترکیب فلاونوئیدی موجود در چای سبز است و طبق مطالعه حاضر این ترکیب سبب کاهش توانایی حیات و توانائی تکثیر سلول‌های مزانشیم به دلیل تخریب غشا، تغییر در تعادل یون‌ها و انتقال متابولیزم از هوازی به بی‌هوازی می‌شود. از طرفی مصرف عنصر بور به صورت اسید بوریک توانست در مواردی باعث جبران صدمات سلولی ناشی از کاتچین هیدرات به خصوص در

آسپارات ترانس آمیناز، آلانین ترانس آمیناز و لاکتات دهیدروژناز افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل داشته است، این بدان معنی است که فرآیند تولید انرژی اولاً از طریق بی‌هوازی انجام و اثر واربرگ به وجود آمده است که در نتیجه آن فقر انرژی در سلول ایجاد شده است. ثانیاً با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر افزایش فعالیت آنزیم‌های ترانس آمیناز سبب شده است که سلول‌ها برای تامین واسطه‌های چرخه کربس و جبران کمبود انرژی، مصرف آمینواسیدها و پروتئین‌ها به عنوان منبع انرژی را در دستور کار خود قرار داده اند. از طرفی تاثیر متقابل کاتچین هیدرات و اسید بوریک باعث تخفیف در فرآیند بی‌هوازی و بهبود تولید انرژی با کاهش این فرآیند شده است. نتیجه‌گیری کلی از این مطالعه نشان داد که تیمار کاتچین هیدرات کاتابولیزم سلول را هرچه بیشتر به سمت متابولیزم بی‌هوازی هدایت می‌کند که علاوه بر فقر انرژی باعث مصرف اسید آمینه و پروتئین‌ها برای تولید انرژی می‌شود. این تغییرات بیوشیمیائی علاوه بر اختلال در تعادل الکترولیتی می‌تواند دلیل دیگری بر تغییر در توانائی زیستی، توانائی تکثیر و تغییرات مورفولوژیک باشد.

در این پژوهش نکته قابل تامل دیگری وجود دارد که تاثیر کاتچین هیدرات و اسید بوریک بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز است. کاتچین هیدرات و بوریک اسید، هر یک به تنهایی باعث افزایش فعالیت آنزیم ALP شدند و اثر متقابل آنها نیز حاکی از اثر هم افزائی در فعالیت این آنزیم است. با توجه به مطالعات آبنوسی و موحدی (۱۲) و (۱۳) و تحقیق منتشر شده از Choi و Hwang (۹) بررسی بیشتر در این زمینه را پیشنهاد می‌نمائیم واز ارائه تفسیر در این زمینه خودداری می‌شود.

از نکات قابل اهمیت دیگر در این پژوهش این است که اسید بوریک باعث افزایش میزان MDA و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در سلول‌های تیمار شده است. این امر نشان‌دهنده این واقعیت است که

1. Yang HY, Yang SC, Chao JC, Chen JR. Beneficial effects of catechin-rich green tea and inulin on the body composition of overweight adults. *Br J Nutr.* 2012; 107(5): 749-54.
2. Lee LS, Kim SH, Kim YB, Kim YC. Quantitative Analysis of Major Constituents in Green Tea with Different Plucking Periods and Their Antioxidant Activity. *Molecules.* 2014; 19(7): 9173-9186.
3. Kawase M, Wang R, Shiomi T, Saijo R, Yagi K. Antioxidative Activity of (-)-Epigallocatechin-3-(3"-O-methyl)gallate Isolated from Fresh Tea Leaf and Preliminary Results on Its Biological Activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2000; 64(10): 2218-2220.
4. Zhao J, Wang J, Chen Y, et al: Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5- 3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis.* 1999; 20(9): 1737-1745.
5. Alshatwi AA. Catechin hydrate suppresses MCF-7 proliferation through TP53/Caspase-mediated apoptosis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2010; 29: 167-175.
6. Ejaz Ahmed M, Khan MM, Javed H, Vaibhav K, Khan A, Tabassum R, et al. Amelioration of cognitive impairment and neurodegeneration by catechin hydrate in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Neurochemistry Int.* 2013; 62(4): 492-501.
7. Al-Hazzani, AA., Alshatwi, AA. Catechin hydrate inhibits proliferation and mediates apoptosis of SiHa human cervical cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2011; 49(12): 3281-6.
8. Shen CL, Yeh JK, Cao JJ, Chyu MC, Wang JS. Green Tea and Bone Health: Evidence from Laboratory Studies. *Pharmacol Res.* 2011 August ; 64(2): 155-161.
9. Choi EM, Hwang JK. Effects of (+)-Catechin on the Function of Osteoblastic Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2003; 26(4): 523-526.
10. Nielsen FH. The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition.* 2000; 16(7): 512-4.
11. Mokhov AV, Kartashov PM, Gornostaeva TA, Asadulin AA, Bogatikov OA. Complex nanospherulites of zinc oxide and native amorphous boron in the Lunar regolith from Mare Crisium. *Doklady Earth Sciences.* 2013; 448(1): 61-63.
12. Abnosi MH, Movahedi B. Investigation of the Effect of Boron on the Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cell & Tissue.* 2015; 5(4): 351-360. (abstract in English).
13. Movahedi Najafabadi, BH., Abnosi, MH. Boron Induces Early Matrix Mineralization via Calcium Deposition and Elevation of Alkaline Phosphatase Activity in Differentiated Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Cell Journal (Yakhteh).* 2016; 18(1): 62-73.
14. Nielsen FH. The justification for providing dietary guidance for the nutritional intake of boron. *Biol Trace Elem Res.* 1998; 66(1-3): 319-30.

## منابع

15. Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 1977; 59: 309–314.
16. Xiang LP, Wang A, Ye JH, Zheng XQ, Polito CA, Lu JL, et al. Suppressive Effects of Tea Catechins on Breast Cancer. *Nutrients.* 2016; 8: 458-872.
17. Iñiguez-Franco F, Soto-Valdez H, Peralta E, Ayala-Zavala JF, Auras R, Gámez-Meza N. Antioxidant Activity and Diffusion of Catechin and Epicatechin from Antioxidant Active Films Made of Poly(l-lactic acid). *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60 (26): 6515–6523.
18. Mehra P1, Garg M, Koul A, Bansal DD. Effect of (+)-catechin hydrate on oxidative stress induced by high sucrose and high fat diet in male Wistar rats. *Indian J Exp Biol.* 2013; 51(10): 823-7.
19. Saraste, A., Pulkki, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardio Res.* 2000; 45(3): 528–537.
20. Tran SL, Puhar A, Ngo-Camus M, Ramarao N. Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *PLoS One.* 2011; 6(9): e22876.
21. Xiang LP, Wang A, Ye JH, Zheng XQ, Polito CA, Lu JL, et al. Suppressive Effects of Tea Catechins on Breast Cancer. *Nutrients.* 2016 Aug; 8(8): 458-572.
22. Brand MD. The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1187(2): 132-139.
23. Scott CB, Kemp RB. Direct and indirect calorimetry of lactate oxidation: implications for whole-body energy expenditure. *J Sports Sci.* 2005; 23(1): 15-19.
24. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science.* 2009 May 22; 324(5930): 1029–1033.
25. Lee KJ, Oh YC, Cho WK, Ma JY. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity Determination of One Hundred Kinds of Pure Chemical Compounds Using Offline and Online Screening HPLC Assay. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; (2015): ID165457. 13 pages.
26. Yetuk G, Pandir D, Bas H. Protective Role of Catechin and Quercetin in Sodium Benzoate-Induced Lipid Peroxidation and the Antioxidant System in Human Erythrocytes In Vitro. *The Sci World J.* 2014; (2014): ID 874824. 6 pages.
27. Mehra P, Koul A, Bansal DD. Studies on Antioxidant Role of (+)-Catechin Hydrate in High Sucrose High Fat Diet Induced Oxidative Stress. *Am. J. Biomed. Sci.* 2013; 5(2): 161-17.



## Investigating the effect of catechin hydrate on viability, proliferation, and biochemistry of rat bone marrow mesenchymal stem cells in presence of boron as a micronutrient

Abnosi MH, Ph.D<sup>\*</sup>, Mansoori S, M.Sc

- Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

\* Email corresponding author: [m-abnosi@araku.ac.ir](mailto:m-abnosi@araku.ac.ir)

Received: 15 Jul. 2017

Accepted: 14 Nov. 2017

### Abstract

**Aim:** Investigating the effect of catechin hydrate (CH) and boric acid (BA) on rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs).

**material and Methods:** MSCs were treated with culture media containing CH, then with the help of trypan blue the viability was investigated at 12, 24 and 36hours. 400 and 3200 $\mu$ M of CH along with 6ng/ml of BA and 36hours were selected for further study. Proliferation based on colony forming assay (CFA) and population doubling number (PDN), morphology, level of sodium, potassium and calcium and activity of LDH,ALP,AST,ALT were analyzed. Malondialdehyde (MDA), total antioxidant and activity of SOD and CAT were measured too.

**Results:** only 3200 $\mu$ M at 12hours and from 400 to 6400 $\mu$ M at 24 and 36 hours, the CH caused significant reduction in viability, proliferation, nuclei diameter and cytoplasm area. Treatment with CH caused increase in activity of LDH,ALP,AST,ALT and increased in FRAP as well as reduction of MDA and sodium, potassium level. BA did not show any effect on viability, morphology and PDN but caused reduction of CFA and activity of LDH,AST and ALT. BA also caused elevation of ALP activity and level of calcium, sodium, potassium as well as MDA level and activity of CAT and SOD. Co-treatment compensated the viability, proliferation, morphological changes, metabolic enzyme activity variation and level of electrolyte to some extent. On the other hand, co-treatment showed, CH ameliorated the oxidative stress induced by BA.

**Conclusion:** since boron ameliorated the CH toxicity, along with tea we may consume dry grapes and dates.

**Key words:** bone marrow mesenchymal stem cells, catechin hydrate, boric acid, viability, biochemical factors