

Original Article

Studying the Anti-aging Effect of Human Growth Hormone on Human Fibroblast Cells via Telomerase Activity

Elaheh Sajadi, M.Sc.¹, Abdolkhalegh Deezagi, Ph.D.^{2*}, Nader Chaparzadeh, Ph.D.¹

1. Department of Biology, Faculty Science, Azerbaijan University of Teachers Education, Tabriz, Iran

2. Department of Biochemistry, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

* Corresponding Address: P.O.BOX: 14155-6343, Department of Biochemistry,
National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
Email: deezagi@nigeb.ac.ir

Received: 21/May/2009, Accepted: 25/Jan/2010

Abstract

Objective: In recent years, studies have focused on the telomerase for cancer treatment by repressing telomerase in cancerous cells or prevent cell aging by activating it in the aged cells. Thus, in these studies natural and synthetic agents have been used to repress or activate telomerase. In this research, we investigated the effects of human growth hormone (hGH) on aging via evaluation of telomerase activity.

Materials and Methods: Primary human foreskin fibroblast cells were isolated, cultured and treated with different concentrations of hGH. BrdU and MTT cell proliferation assays and cells number counting. Cell aging was assayed by the senescence sensitive galactosidase staining method. Telomerase activity was measured with a telomerase PCR ELISA kit. Data were analyzed with SPSS software (one-way ANOVA and univariate ANOVA).

Results: Our results indicated that cells treated with a lower concentration (0.1, 1 ng/ml) of hGH had more green color cells (aged cells). Furthermore, cell proliferation increased with increasing hGH concentrations (10 to 100 ng/ml) which was significant in comparison with untreated control cells. TRAP assay results indicated that telomerase activity increased with increasing hGH concentration, but there was no significant difference. Additionally, more rapid cell growth and telomerase activity was noted in the absence of H₂O₂ when compared with the presence of H₂O₂, which was significantly different.

Conclusion: Although increasing cell proliferation along with increasing hGH concentration was confirmed by all cell proliferation assays, only the cell counting test was statistically significant. Thus, it is inconclusive that hGH (up to 100 ng/ml) has an anti-aging effect. Also, because there was no significant difference in the telomerase activity results (in spite of increasing progress along with increasing hGH concentration) we can not certainly conclude that hGH (up to 100 ng/ml) impacts telomerase activity.

Keywords: Aging, Human Growth Hormone (hGH), Telomerase, Human Fibroblast Cells

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 287-294

بررسی اثر هورمون رشد بر فرایند پیری از طریق بررسی فعالیت تلومرازی در سلول‌های فیبروبلاست پوست ختنه انسانی

الهه سجادی^۱ M.Sc.، عبدالخالق دیزجی^{۲*} Ph.D.، نادر چاپارزاده^۱ Ph.D.

۱. دانشگاه تربیت معلم آذربایجان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، آذربایجان، ایران

۲. پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه بیوشیمی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۶۳۴۳-۱۴۱۵۵، پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه بیوشیمی

پست الکترونیک: Email: deezagi@nigeb.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۸/۲/۳۱، پذیرش مقاله: ۸۸/۱۱/۵

چکیده

* **هدف:** بررسی اثرات هورمون رشد بر فرایند پیری از طریق بررسی فعالیت تلومرازی
* **مواد و روش‌ها:** بدین منظور سلول‌های فیبروبلاست پوست ختنه انسان به روش کشت اولیه (Primary) از بافت پوست جداسازی و تخلیص و کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت هورمون رشد تیمار شده و میزان رشد سلول‌ها و روند پیری و فعالیت تلومراز اندازه‌گیری شد. رشد و تمایز سلول‌ها با تست‌های BrdU، MTT، و شمارش سلولی بررسی و روند پیری با تست X-GAL بررسی شد و فعالیت تلومرازی با کیت Telomerase PCR ELISA اندازه‌گیری شد.
* **یافته‌ها:** آنالیز نتایج از طریق نرم‌افزار SPSS برنامه‌های آنالیز واریانس یک طرفه و آنالیز واریانس یک متغیره انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که سلول‌های تیمار شده با غلظت پایین هورمون رشد (۱، ۰/۱، ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی بیشتر (تعداد بیشتر سلول‌های سبز) را نشان دادند که نمادی از تعداد بیشتر سلول‌های پیر می‌باشد، به علاوه تکثیر سلولی همراه با افزایش غلظت هورمون رشد افزایش می‌یابد و در این مورد، در تست شمارش سلولی اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. نتایج تست تلومرازی نشان داد که با افزایش غلظت هورمون رشد، فعالیت تلومرازی افزایش می‌یابد، اما اختلاف معنی‌دار نبود. همچنین دیده شد سلول‌های تیمار شده با آب اکسیژنه (H_2O_2)، رشد سلولی و فعالیت تلومرازی کمتر از سلول‌های تیمار نشده با H_2O_2 نشان می‌دهند و بین اثر حضور و غیاب H_2O_2 بر فعالیت تلومرازی اختلاف معنی‌دار مشاهده شد.
* **نتیجه‌گیری:** روند افزایشی تکثیر سلولی همراه با افزایش غلظت هورمون رشد در تمامی تست‌های اندازه‌گیری میزان رشد سلولی، تایید شد ولی به دلیل اینکه فقط در تست شمارش سلولی اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (و در سایر تست‌ها اختلاف معنی‌دار نبود)، به طور قطع نمی‌توان ادعا کرد که هورمون رشد تا غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر برسول‌ها اثر ضدپیری دارد. به علاوه به دلیل معنی‌دار نبودن اختلاف در نتایج تست تلومرازی (بر خلاف روند افزایشی فعالیت تلومرازی همراه با افزایش غلظت هورمون رشد)، می‌توان نتیجه گرفت که تا غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، هورمون رشد بر فعالیت تلومرازی اثری ندارد.

* **کلیدواژگان:** پیری، هورمون رشد انسانی، تلومراز، سلول‌های فیبروبلاست انسانی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۲۹۴-۲۸۷

مقدمه

است که هورمون‌ها می‌توانند فعالیت تلومرازی را در برخی بافت‌ها تنظیم کنند (۶، ۷). از آنجایی که احتمال می‌رود هورمون رشد می‌تواند، توانایی تنظیم رو به بالا در فعالیت تلومرازی سلول‌های فیبروبلاست داشته باشد، هدف از این پژوهش، تست این فرضیه در شرایط آزمایشگاهی بر سلول‌های فیبروبلاست می‌باشد. آزمایشات فونک و همکاران نشان داده است که سلول‌های فیبروبلاست، قابلیت تنظیم رو به بالا فعالیت تلومرازی، افزایش طول عمر و دوبله شدن جمعیت سلولی را دارا هستند و این سلول‌ها از خیلی وقت پیش به عنوان مدل برای مطالعات پیری به کار می‌رفته‌اند (۸).
بر اساس یک سری مطالعات دیده شده است که اغلب هورمون رشد به عنوان یک عامل ضد پیری به کار می‌رود، برای مثال شواهدی موجود است که نشان می‌دهد استفاده از هورمون رشد انسانی نوترکیب در افراد مسن تر، می‌تواند توده ماهیچه‌ای را افزایش و میزان چربی را کاهش و مواد معدنی را در چندین منطقه از اسکلت بدن افزایش دهد (۹).

تلومراز، یک آنزیم ترانسکریپتاز معکوس سلولی است که سنتز و بسط DNA تلومری را بر عهده دارد (۱، ۲). این آنزیم در بیشتر تومورهای بدخیم فعال می‌شود اما به طور معمول در سلول‌های سوماتیک نرمال غیرفعال است (۳، ۴). آنزیم تلومراز شامل زیرواحد کاتالیتیکی تلومراز (Human Telomerase Reverse Transcriptase; hTERT)، RNA تلومرازی (Human Telomerase RNA component; hTR)، و پروتئین‌های مرتبط با تلومراز می‌باشد. از میان این زیرواحد‌ها، hTERT به عنوان واحد تعیین کننده سرعت فعالیت تلومرازی می‌باشد (۵). به علاوه معرفی ژن hTERT به سلول‌های فیبروبلاست نرمال فاقد تلومراز، باعث تجدید فعالیت تلومرازی می‌شود و طول عمر سلولی را افزایش می‌دهد.

از آنجایی که مشخص شده است افزایش فعالیت تلومرازی با کاهش روند پیری سلولی مرتبط است، بنابراین فعالیت تلومرازی کاندیدای مناسبی برای اهداف این پژوهش است. شواهدی موجود

اثر هورمون رشد بر فرایند پیری

تست BrdU

از آنجا که تکثیر سلولی نیاز به همانندسازی DNA دارد، در این روش تکثیر سلولی بر اساس میزان سنتز DNA اندازه گرفته می شود (۱۴). از برودی اکسی اوریدین استفاده می شود که آنالوگ پیریمیدین است و به جای تیمین وارد DNA سلول های تکثیر شونده می شود. بعد از آنکه BrdU وارد DNA شود، با روش ایمونولوژیکی قابل شناسایی و پیگیری است (۱۳).

سلول ها در پلیت های ۹۶ خانه به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر خانه کشت شدند. بعد از ۱۲۰ ساعت گذشتن از تیمار سلول ها با غلظت های مختلف هورمون رشد (در حضور H_2O_2 و یا در غیاب آن)، به سلول های هر خانه ۱۰ ماکرولیتر (BrdU با رقت ۱/۱۰) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت آنکوبه شدند، بعد از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول ها تخلیه و پلیت در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت گذاشته شد و سپس ۲۰۰ ماکرولیتر Fix Denate به هر خانه اضافه و آنکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انجام شد. بعد از مدت زمان مذکور محلول Fix Denate نیز برداشته شد و بعد ۱۰۰ میکرولیتر Anti-BrdU-POD به هر خانه افزوده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گذاشته شد. اتصال این محلول به BrdU توسط واکنش سوبسترا قابل تشخیص است. پس از این مدت سه بار شست و شو با بافر انجام شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای تترامتیل بنزیدین (Tetra-Methyl Benzidine; TMB) اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد و بعد محلول Stop (اسید سولفوریک ۱ مولار) اضافه شد و جذب در ۴۵۰ و ۶۹۰ نانومتر با الیزاریدر (ELISA Reader) خوانده شد (۱۳).

تست MTT

میزان تکثیر سلولی توسط تست میزان اندازه گیری شد. نمک های تترارولیوم مانند MTT در سلول های زنده توسط دهیدروژنازها احیا می گردند و ایجاد بلورهای بنفش رنگ نامحلول فورمازان می کنند که بعد از حل شدن، میزان جذب که متناسب با تعداد سلول ها است توسط الیزاریدر خوانده می شود (۱۵، ۱۶). سلول ها در پلیت های ۹۶ خانه به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر ول کشت شدند. بعد از ۱۲۰ ساعت گذشتن از تیمار سلول ها با هورمون رشد (در حضور H_2O_2 و یا در غیاب آن) سلول ها در هر ول با ۱۰ ماکرولیتر محلول MTT برای ۴ ساعت آنکوبه شدند. سپس محیط جمع آوری شد و سلول ها همراه با ۱۰۰ ماکرولیتر دی متیل سولفو کسید و ۱۲/۵ ماکرولیتر بافر گلاسیسین برای ۲۴ ساعت آنکوبه شدند. سپس جذب در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد (۱۳).

رنگ آمیزی β -Gal

سلول های خاموش و پیر فیروبلات، β -Gal (که در تک سلولی ها با X-Gal آشکار می شوند) را بیان می کنند که می تواند رنگ آبی یا سبز را در pH ۶ ایجاد کند که در اثر شکست ایجاد می شود (۱۷). بنابراین رنگ گرفتن سلول (به رنگ آبی) نشان دهنده پیری سلول می باشد و این تست برای بررسی میزان پیری سلول ها مفید می باشد. سلول ها در پلیت های ۹۶ خانه به تعداد ۳۵۰۰۰ سلول در هر خانه کشت شدند. بعد از ۱۲۰ ساعت گذشتن از تیمار سلول ها با هورمون رشد (در حضور H_2O_2 و یا در غیاب آن)، سلول ها در بافر سالین شست و شو شدند و سپس به مدت ۵ دقیقه در فرمالدهید ۳ درصد فیکس

با توجه به شواهد موجود، احتمال می رود هورمون رشد بتواند کاندید مناسبی جهت مطالعات بر فرایند پیری باشد. این پژوهش به منظور مطالعه بیشتر اثر هورمون رشد بر فرایند پیری و میزان فعالیت تلومرازی سلول های فیروبلات انسانی طراحی شده است.

به علاوه، از آنجایی که شواهد موجود نشان می دهد تجمع رادیکال های آزاد و انواع اکسیژن های واکنش گر ممکن است نقش کلیدی در خاموشی تکثیری بازی کنند (۱۰)، در این مطالعه از H_2O_2 به عنوان عامل ایجاد یا تحریک کننده پیری سلول ها استفاده شده است.

مواد و روش ها

کشت سلول ها و تیمار آنها

بافت منشا سلول های فیروبلات این پژوهش، از بیمارستان ۲۲ بهمین شهر قدس و با درخواست رسمی پژوهشگاه مهندسی ژنتیک تهیه گردید. لازم به ذکر است که دریافت بافت پس از صدور مجوز از کمیته اخلاق بیمارستان صورت گرفته است.

بافت ختنه انسانی به صورت اولیه (Primary) کشت شد و سلول های فیروبلات حاصل شدند. سپس سلول ها در محیط کشت (DMEM) Dulbico's Modified Eagle Medium حاوی (FCS) Fetal Calf Serum ۱۰ درصد و در آنکوباتور در شرایط CO_2 ۵ درصد، ۹۵ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت شدند. کشت سلول در پلیت های ۹۶، ۶ و ۲۴ خانه ای صورت گرفت که در هر خانه از پلیت ها به ترتیب تعداد ۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰۰ و ۳۵۰۰۰ عدد سلول قرار گرفت. بعد از گذشت ۱۵ ساعت از زمان کشت (این مدت زمان برای اطمینان از چسبیدن سلول ها به کف ظرف، در نظر گرفته شد)، سلول های مورد نظر با غلظت های مختلف هورمون رشد (۱۰۰، ۱۰، ۵، ۱/۱۰، ۰/۱ و ۰ نانوگرم در میلی لیتر) در حضور و غیاب H_2O_2 تیمار و به مدت ۱۲۰ ساعت آنکوبه شدند. دلیل استفاده از این محدوده غلظت هورمون رشد، این است که علاوه بر بررسی اثر غلظت های فیزیولوژیک هورمون رشد، به بررسی اثر غلظت های بالاتر از حد فیزیولوژیک هم پرداخته شود، بدین منظور به بررسی هم زمان اثر غلظت های فیزیولوژیک (تا ۵ نانوگرم در میلی لیتر) و غلظت های بالاتر از حد فیزیولوژیک هورمون رشد (۱۰۰-۵ نانوگرم در میلی لیتر) پرداخته شد (۱۱).

برای پلیت های ۹۶ تایی، H_2O_2 (با رقت ۱/۱۰۰۰۰ به میزان ۱۲/۵ ماکرولیتر، به هر یک از خانه ها) و برای خانه های ۶ تایی نیز از H_2O_2 (با رقت ۱/۱۰۰۰ به میزان ۶۵ ماکرولیتر به هر خانه) و برای پلیت های ۲۴ تایی، آب اکسیژنه (با رقت ۱ به ۱/۱۰۰۰، به میزان ۶/۵ ماکرولیتر به هر یک از خانه های مورد نظر) اضافه شد (۱۲).

شمارش و تعیین میزان زنده ماندن

در پلیت های ۶ خانه، تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت شد (یک پلیت ۶ تایی با H_2O_2 تیمار شد و یک پلیت ۶ تایی دیگر با H_2O_2 تیمار نشد). سلول ها با غلظت های مختلف هورمون رشد (۱۰۰-۰) نانوگرم در میلی لیتر تیمار و ۱۲۰ ساعت آنکوبه شدند. بعد از اتمام زمان آنکوباسیون و شست و شوی سلول ها و تریسینه کردن آنها و سانتی فیوژ و حل کردن رسوب سلولی در محیط کشت، شمارش سلولی با استفاده از رنگ متیل گرین و توسط لام نتوبار صورت گرفت و بررسی میزان زنده بودن سلول ها با استفاده از رنگ آمیزی تریان بلو انجام شد (۱۳).

شدند، بعد از شست‌وشوی مجدد با بافر سالین، برای مدت ۱۶ ساعت با محلول رنگ تازه ۵- برومو-۴-کلرو-۳-اندولیل-دی-گالاکتوزیداز (β -Gal) (۱۷) (که pH آن روی ۶ تنظیم شده)، در ۳۷ درجه آنکوبه شدند. سپس رنگ آمیزی زیر میکروسکوپ فاز کنتراست بررسی شد.

تست فعالیت تلومرازی

کیت تجاری

فعالیت تلومراز با استفاده از کیت تجاری TRAP PCR-ELISA kit (Roche, Germany) انجام شد. جذب در طول موج ۶۹۰ و ۴۵۰ نانومتر، برای هر نمونه اندازه‌گیری شد. برای هر آزمایش 2×10^5 سلول از سلول‌های کشت شده در هر یک از خانه‌های پلیت‌های ۶ تایی (کشت سلول‌ها در پلیت‌های ۶ تایی و تیمار آنها با غلظت‌های مختلف هورمون رشد و در حضور و غیاب H_2O_2)، طبق دستور ذکر شده در بخش ۱-۲ می‌باشد) جداسازی شد. تست تلومرازی، مطابق روش ذکر شده برای نمونه‌های کنترل مثبت و منفی موجود در کیت و طبق پروتکل شرکت انجام شد (۱۸).

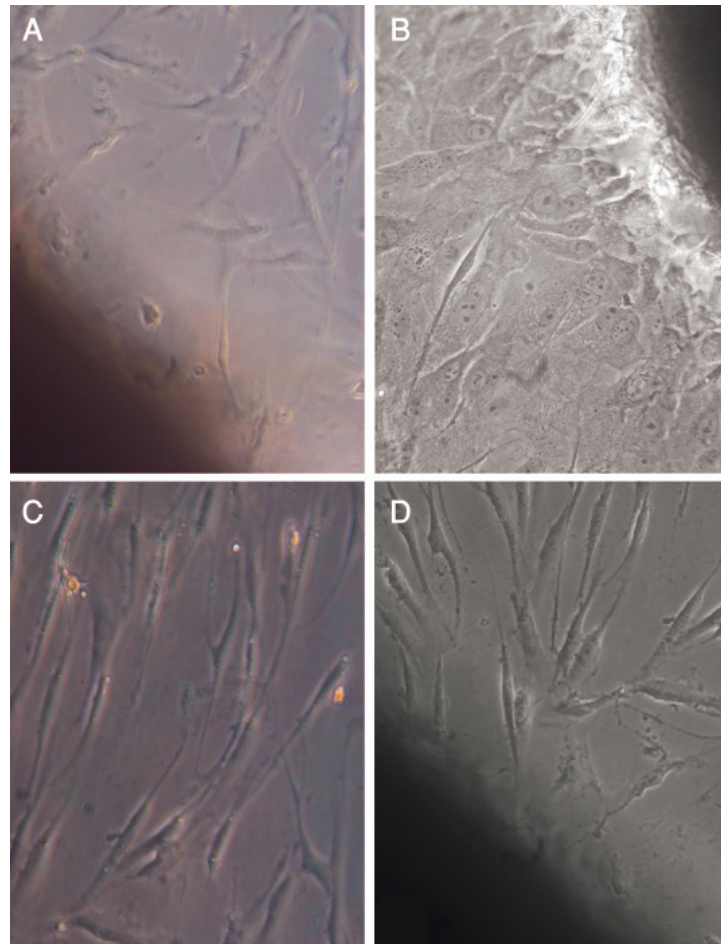
روش محاسبات آماری

یکی از روش‌های استفاده شده (نرم‌افزار Spss)، برنامه آنالیز واریانس یک طرفه بود که در این روش، میانگین اثر غلظت‌های مختلف هورمون رشد بر روی پیری، توسط تست توکی (Tukey) مقایسه شد. روش دیگر برنامه آنالیز واریانس یک متغیره بود که توسط این روش، اثر H_2O_2 بر فرایند پیری، مشخص و تایید شد. در این روش میانگین اثر وجود H_2O_2 و عدم حضور آن بر روی پیری، توسط تست Tukey مقایسه و معنی‌داری میان گروه‌ها اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

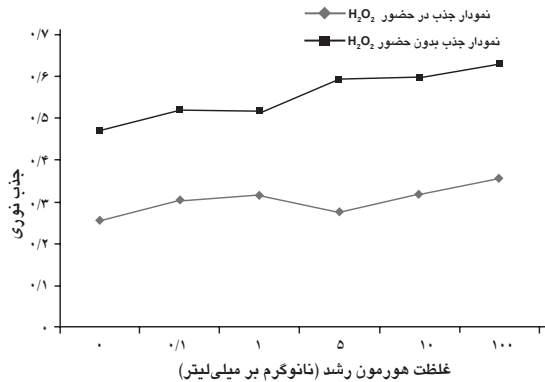
کشت اولیه سلول

تصاویر سلول‌های فیروبلاست گرفته شده از بافت ختنه انسانی در شکل ۱ نشان داده شده است. در ابتدا لازم به ذکر است که تمامی تست‌های زیر، ۳ بار تکرار شد و میانگین ۳ بار تکرار در نمودارها آورده شد.



شکل ۱: (A، B) نمای مختلف از حواشی بافت ختنه با اولین استتاله‌های سلولی در روز ۶، بافت ختنه (به عنوان منشأ اولیه سلول‌های فیروبلاست این تحقیق) به منظور کشت اولیه (Primary) از بیمارستان دریافت گردید. سپس در ظرف کشت شد، به تدریج و پس از چند روز، استتاله‌های سلولی از حواشی بافت گسترش یافتند. در این شکل حواشی بافت و استتاله‌های سلولی نمایان است (بزرگ‌نمایی $\times 250$). (C) بافت ختنه و استتاله‌های سلولی حواشی آن، در روز هفتم نمایش داده شده است، میزان استتاله‌های سلولی از کناره‌های بافت افزایش یافت. (D) در روز هفتم بافت اولیه از ظرف برداشته شد، و سلول‌ها در سطح ظرف باقی ماندند و تکثیر یافتند (بزرگ‌نمایی $\times 200$).

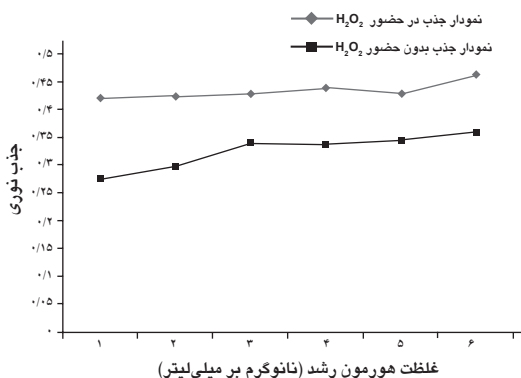
بر طبق آنالیز انجام شده، مشخص شد که بین اثر حضور و عدم حضور H_2O_2 بر رشد سلولی، اختلاف معنی دار وجود دارد. به این معنی که حضور H_2O_2 اثر پیری بر سلول‌ها دارد.



نمودار ۲: نمودار مقایسه جذب تست BrdU در حضور و غیاب H_2O_2 . این تست به منظور مقایسه جذب (و در واقع میزان تکثیر سلولی) در مقابل تیمار با غلظت‌های مختلف هورمون رشد و حضور و غیاب H_2O_2 صورت گرفت. در هر دو نمودار روند افزایشی مشاهده می‌شود. همچنین با آنالیز داده‌ها مشخص شد که بین اثر حضور H_2O_2 و غیاب آن، اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

نتایج تست BrdU (بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون)

همان‌طور که نمودار ۲ نشان می‌دهد، با افزایش غلظت هورمون رشد، جذب نیز افزایش یافته است اما با آنالیز داده‌ها دیده شد که در عدم حضور H_2O_2 ، اختلاف معنی‌دار بین اثر غلظت‌های مختلف هورمون رشد بر سلول‌ها، نسبت به نمونه کنترل در این تست مشاهده نمی‌شود، در غیاب H_2O_2 ، میانگین جذب نمونه کنترل، عدد 0.471 را نشان داد. در مورد اثر غلظت‌های مختلف هورمون رشد بر سلول‌ها در حضور H_2O_2 ، نیز با افزایش غلظت هورمون رشد، جذب نیز افزایش یافته است، اما اختلاف معنی‌دار نسبت به جذب نمونه کنترل مشاهده نشد. میانگین جذب در نمونه کنترل در حضور H_2O_2 0.255 بود. در این تست نیز تایید شد که بین اثر حضور و عدم حضور H_2O_2 بر جذب، اختلاف معنی‌دار وجود دارد. بنابراین اثر پیری بر سلول‌ها دارد.



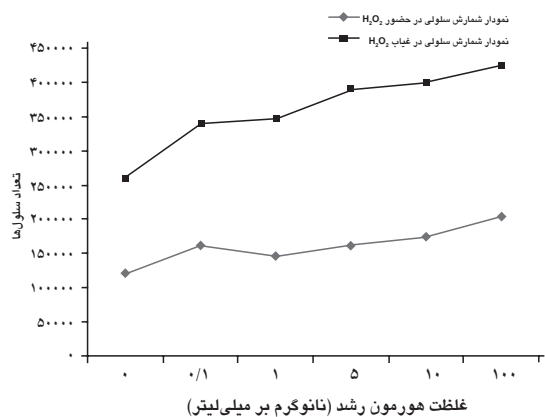
نمودار ۳: نمودار مقایسه جذب تست MTT در حضور و غیاب H_2O_2 . این تست نیز به منظور مقایسه جذب (و در واقع میزان تکثیر سلولی) در مقابل تیمار با غلظت‌های مختلف هورمون رشد و حضور و غیاب H_2O_2 صورت گرفت. در هر دو نمودار روند افزایشی مشاهده می‌شود. با آنالیز داده‌ها مشخص شد که بین اثر حضور H_2O_2 و غیاب آن، اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

بررسی تاثیر هورمون رشد و (H_2O_2) بر میزان تکثیر سلولی تست‌های MTT و BrdU و شمارش سلولی جهت بررسی ارتباط بین هورمون رشد و تکثیر سلولی انجام شده بود که نتایج به این ترتیب است:

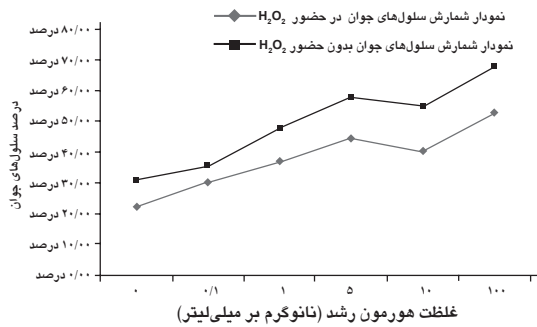
نتایج تست شمارش سلولی (بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون)

همان‌طور که در نمودار ۱ مشخص شده است، با افزایش غلظت هورمون رشد، تعداد سلول‌ها نیز افزایش یافته است. در چاهک نمونه کنترل، بعد از انکوباسیون و شمارش سلول‌ها و گرفتن میانگین از سه بار تکرار دیده شد که در غیاب H_2O_2 ، میزان میانگین عدد 260833 سلول را نشان داد، بنابراین در نمونه‌های کنترل نیز، تعداد سلول‌ها افزایش پیدا کرده است، اما تفاوت زیادی بین میزان سلول‌های کنترل و تعداد سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر هورمون رشد مشاهده شد. با آنالیز داده‌ها دیده شد که در عدم حضور H_2O_2 ، بین تعداد سلول‌های تیمار شده با هورمون رشد با غلظت کنترلی (۰) نانوگرم در میلی‌لیتر، نسبت به تعداد سلول‌های تیمار شده با تک تک غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر هورمون رشد، اختلاف معنی‌دار وجود دارد (که به ترتیب $p=0.024$ برای غلظت ۵ نانوگرم در میلی‌لیتر، $p=0.017$ برای غلظت نانوگرم در میلی‌لیتر و $p=0.004$ برای غلظت نانوگرم در میلی‌لیتر ۱۰۰ می‌باشد). نتایج این تست حاکی از آن است که با افزایش غلظت هورمون رشد تا غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، اثر ضد پیری مشاهده می‌شود ولی برای نتیجه‌گیری قطعی، نتایج این تست باید با تست‌های بعدی تایید شود.

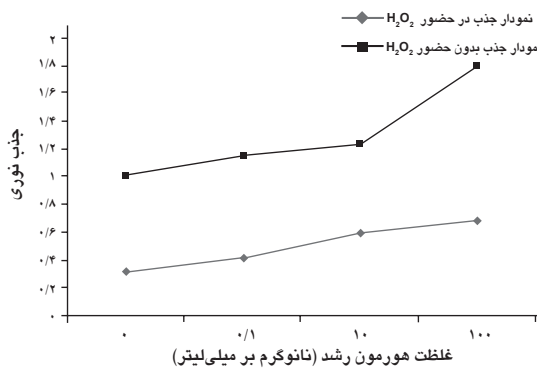
همچنین نمودار ۱ نشان می‌دهد که در حضور H_2O_2 ، نیز با افزایش غلظت هورمون رشد، تعداد سلول‌ها افزایش یافته، اما نسبت به نمونه‌هایی که بدون تاثیر H_2O_2 کشت داده شده بودند، افزایش کمتری نشان می‌دهند. این مساله حاکی از آن است که H_2O_2 اثر منفی بر رشد سلول‌ها دارد و مانع رشد سلول‌ها به میزان طبیعی می‌شود. میانگین تعداد سلول‌ها در نمونه کنترل بعد از انکوباسیون، در حضور H_2O_2 121666 سلول بود و با آنالیز داده‌ها، دیده شد که در حضور H_2O_2 ، تعداد سلول‌های تیمار شده با غلظت کنترلی (۰) هورمون رشد، نسبت به تعداد سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ هورمون رشد، اختلاف معنی‌دار ($p=0.004$) نشان می‌دهد.



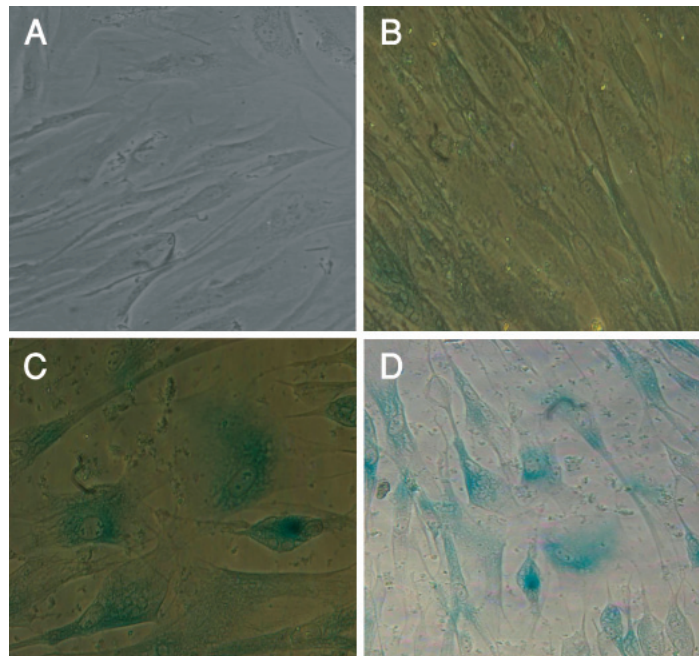
نمودار ۱: مقایسه نمودارهای شمارش سلولی سلول‌های فیبروبلاست بعد از ۱۲۰ ساعت در حضور و غیاب H_2O_2 . این تست به منظور مقایسه تعداد سلول‌ها در مقابل تیمار با غلظت‌های مختلف هورمون رشد و حضور و غیاب H_2O_2 صورت گرفت. در هر دو نمودار روند افزایشی مشاهده می‌شود و مقایسه دو نمودار، حاکی از آن است که در غیاب H_2O_2 تعداد سلول‌ها در مقایسه نقطه به نقطه بیشتر از تعداد سلول‌ها در حضور H_2O_2 است.



نمودار ۴: نمودار مقایسه درصد سلول‌های جوان تست X-Gal در حضور و غیاب H₂O₂ در هر دو نمودار روند افزایشی مشاهده می‌شود.



نمودار ۵: نمودار مقایسه فعالیت تلومرایی در حضور و غیاب H₂O₂ بر اساس جذب. این تست به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف هورمون رشد و حضور و غیاب H₂O₂ بر فعالیت تلومرایی صورت گرفت. در هر دو نمودار روند افزایشی مشاهده می‌شود.



شکل ۲: تصویر سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با β-GAL (بزرگ‌نمایی ×۴۰۰) این تست به منظور بررسی میزان پیری سلول‌ها در مقابل غلظت‌های مختلف هورمون رشد و حضور و غیاب H₂O₂ صورت گرفت. سلول‌های جوان پس از رنگ‌آمیزی بی‌رنگ می‌مانند، اما سلول‌های پیر به رنگ سبز درمی‌آیند. (A) پاساژ ۴ (سلول‌های جوان)، (B) پاساژ ۱۲ (سلول‌های پیر) سلول‌ها همانند روش ذکر شده در روش‌ها با آب اکسیژنه جهت القای پیری تیمار و سپس با غلظت‌های مختلف هورمون رشد مجدداً تیمار و به مدت ۵ روز انکوبه شدند. (C) یک نانوگرم در میلی‌لیتر هورمون رشد، (D) صد نانوگرم در میلی‌لیتر هورمون رشد.

نتایج تست MTT (بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون)

نتایج تست MTT در حضور و غیاب H₂O₂ در نمودار ۳ نشان داده شده است که با تایید نتایج حاصل از تست‌های پیشین، با افزایش غلظت هورمون رشد، افزایش جذب نمایان می‌شود. اما اختلاف معنی‌دار بین اثر غلظت‌های مختلف هورمون رشد بر جذب، نسبت به نمونه کنترل وجود ندارد. میانگین جذب در نمونه کنترل در حضور H₂O₂، ۰/۲۷۵ بود و در غیاب H₂O₂، میانگین جذب عدد ۰/۴۱۹ را نشان داد. در اینجا نیز، بین اثر حضور و عدم حضور H₂O₂ بر رشد سلولی، اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

بررسی پیری سلولی (بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون)

پیری سلولی توسط رنگ‌آمیزی β-Gal (۱۷) بررسی شد، شمارش ۳۰۰ سلول صورت گرفت که در این تعداد، تعداد سلول‌های سبز رنگ (پیر) و بی‌رنگ (جوان) (نمودار ۴) و سپس درصد سلول‌های جوان در زیر میکروسکوپ (در حضور و غیاب H₂O₂)، محاسبه شد. با افزایش غلظت هورمون رشد، درصد جوانی سلول‌ها چه در حضور و چه در غیاب H₂O₂ روبه افزایش است (و درصد پیری رو به کاهش است). اما اختلاف معنی‌دار بین اثر غلظت‌های مختلف هورمون رشد بر سلول‌ها (چه در حضور و چه در غیاب H₂O₂) نسبت به نمونه کنترل (که میانگین درصد سلول‌های جوان در نمونه کنترل در حضور H₂O₂، ۲۲ درصد و در غیاب H₂O₂، میزان میانگین عدد ۳۱/۱۱ درصد بود) مشاهده نشد (نمودار ۵).

درصد سلول‌های جوان در نمونه‌های تیمار شده با H₂O₂ پایین‌تر از درصد سلول‌های جوان نمونه‌های هم‌تایشان در غیاب H₂O₂ می‌باشند. بین اثر حضور و عدم حضور H₂O₂ بر رشد سلولی، اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

فعالیت تلومرازی

جهت بررسی این نکته که آیا هورمون رشد فعالیت تلومرازی را افزایش می‌دهد یا خیر، از روش TRAP استفاده شد. فعالیت تلومرازی سلول‌های فیروبلست در حضور و عدم حضور H_2O_2 ، نسبت به غلظت‌های (۰، ۰/۱، ۱۰، ۱۰۰) نانوگرم در میلی‌لیتر هورمون رشد، اندازه‌گیری شد. فعالیت تلومرازی در حضور و غیاب H_2O_2 هم‌زمان با افزایش غلظت هورمون رشد افزایش یافته است. اما در این روند افزایشی، اختلاف معنی‌دار نسبت به جذب نمونه کنترل، چه در حضور و چه در غیاب H_2O_2 مشاهده نشد. میانگین جذب نمونه کنترل در حضور H_2O_2 ، ۰/۳۲۱ و در غیاب H_2O_2 ، میانگین جذب عدد ۰/۰۱ بود.

همان‌طور که شکل ۷ نشان می‌دهد، جذب در نمونه‌های تیمار شده با H_2O_2 پایین‌تر از جذب نمونه‌های هم‌تایشان در غیاب H_2O_2 می‌باشد. این کاهش جذب در حضور H_2O_2 نشان می‌دهد که حضور H_2O_2 فعالیت تلومرازی را کم می‌کند. بین اثر حضور و عدم حضور H_2O_2 بر فعالیت تلومرازی، اختلاف معنی‌دار وجود دارد (میانگین جذب در نمونه کنترل مثبت کیت، عدد ۲/۵۴ را نشان داد).

بحث

در برخی از مطالعات دیده شده است که بعضی از فاکتورهای رشد نقش اساسی در تنظیم منفی یا مثبت تکثیر برخی از انواع سلول‌ها در فرایند رشد بافت و تومورژنز دارند (۶).

در آزمایشات ما، در بعضی تست‌ها (مثل تست شمارش سلولی)، بین تعداد سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های بالا (۱۰، ۱۰۰) نانوگرم در میلی‌لیتر و سلول‌های نمونه کنترل (غلظت ۰ نانوگرم در میلی‌لیتر هورمون رشد) بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون، اختلاف معنی‌دار وجود دارد. نتایج تست‌های BrdU و MTT و رنگ‌آمیزی X-Gal روند افزایشی جذب و یا رشد سلولی را نشان داد اما از آنجا که آنالیز آماری نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین اثرات غلظت‌های مختلف هورمون رشد بر رشد سلولی وجود ندارد، نمی‌توان با قطعیت به این نتیجه رسید که هورمون رشد اثر ضدپیری بر سلول‌ها دارد.

در حالی که بعضی مطالعات حاکی از آن است که شاید هورمون رشد نوترکیب بتواند برای بهبود شرایط فیزیکی و عملکرد و ظاهر افراد مسن، به کار رود (۹).

به علاوه مطالعات سونتاک و همکارانش در سال ۱۹۸۰ و مولر و همکارانش در سال ۱۹۹۳ دیده شد که در انسان‌ها نیز مانند حیوانات وجود هورمون رشد پلاسمایی در طول دوره‌ی رشد سریع، حداکثر است. بنابراین میزان هورمون رشد به تدریج کاهش می‌یابد و در افراد مسن، بسیار کم است (۱۹، ۲۰). هرچند تشخیص این نکته که آیا کاهش آزاد شدن هورمون رشد همراه با افزایش سن، به عنوان اثرات پیری محسوب می‌شود یا اینکه یکی از دلایل پیری می‌تواند باشد، مشکل است اما مهم این است که تغییرات در ترکیبات بدنی همراه با افزایش سن، نشانه‌هایی مشابه با کمبود هورمون رشد را نشان می‌دهد. این تغییرات شامل از دست رفتن توده ماهیچه‌ای بدن، قدرت بدنی، افزایش چربی، افزایش ذخیره چربی در شکم و از دست رفتن مواد معدنی استخوان می‌باشد. این مطالعات حاکی از آن است که بعضی از تغییرات در ترکیب بدنی در طول دوره پیری، توسط کاهش هورمون رشد ایجاد می‌شود و می‌تواند با درمان هورمون رشد بهبود یابد یا کامل برطرف شود. به عبارت دیگر کاهش عملکرد سیستم هورمون

رشد - فاکتور شبه انسولینی ۱، همراه با افزایش سن، می‌تواند به عنوان کمبود هورمونی محسوب شود یا بتواند با به‌کارگیری هورمون رشد یا پپتیدهایی که رها شدن هورمون رشد را تحریک می‌کند، درمان شود (۲۳-۲۱).

در بعضی آزمایشات دیده شده است که هورمون رشد یک عامل ضدپیری است. لازم به ذکر است که کاربرد هورمون رشد به عنوان یک عامل ضدپیری، توسط مطالعاتی که در سال ۱۹۷۷ درباره اثرات محدودیت مربوط به کالری در حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت، حمایت می‌شود. محدودیت مرتبط با کالری، مشکلات بزرگی در دوره زندگی گونه‌های مختلف از قبیل موش‌های آزمایشگاهی ایجاد می‌کند. در سال ۱۹۹۵ نشان داده شد که در این حیوانات، در کاهش آزاد شدن هورمون رشد همراه با افزایش سن، تاخیر ایجاد می‌کند. مطالعات مشابه در سال ۱۹۹۷ نشان داده است که از دست رفتن رگ‌های خونی در مغز همراه با افزایش سن، ممکن است ناشی از کاهش هورمون رشد باشد (۲۶-۲۴).

اگر هورمون رشد مانع پیری شود، کمبود آن باید با کاهش احتمال زندگی همراه باشد. در بیماران با کاهش قدرت هیپوفیزی به نظر می‌رسد که این مساله مشاهده می‌شود، اما این امر ممکن است ناشی از اثرات تومورهای هیپوفیزی و درمان بعضی از این بیماران باشد (۹).

مکانیسم‌های حاکم بر فعال‌سازی تلومراز، به طور کامل شناخته شده نیست. چندین فاکتور هورمونی مهم نیز به نظر می‌رسد که بر تنظیم تلومرازی اثر می‌گذارد که شامل: ویتامین D، رتینویک اسید، استروژن و آندروژن می‌باشد (۲۷). به علاوه دیده شده است که بعضی فاکتورهای رشد، فعالیت تلومرازی را به منظور تنظیم تکثیر سلولی و تمایز در سلول‌های نرمال و تومورژنز تنظیم می‌کنند. بررسی نقش‌های مختلف فاکتورهای رشد در فعالیت تلومرازی و در نتیجه طول عمر تکثیر سلولی، در فهم بیان و عمل فاکتورهای رشد تحت شرایط مختلف مهم می‌باشد (۶).

در این مطالعه اثر فاکتور دیگری به نام هورمون رشد، بر فعالیت تلومرازی بررسی شد، روند افزایشی فعالیت تلومرازی همراه با افزایش غلظت هورمون رشد وجود دارد ولی از آنجا که این اختلاف معنی‌دار نیست، می‌توان این نتیجه را گرفت که هورمون رشد تا غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر بر فعالیت تلومرازی اثری ندارد اما با توجه به روند افزایشی فعالیت تلومرازی، شاید بتوان با افزایش غلظت هورمون رشد (بالای ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) این اثر را مشاهده کرد.

نتیجه‌گیری

در مجموع در این مطالعه از طریق تست شمارش سلولی، اثر ضدپیری هورمون رشد دیده شد، اما این نتیجه توسط تست‌های BrdU و MTT و رنگ‌آمیزی β -Gal تایید نشد، بنابراین با قطعیت نمی‌توان گفت که هورمون رشد تا غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر اثر ضدپیری بر سلول‌های فیروبلست دارد. ولی از آنجا که روند افزایشی در تمامی تست‌ها دیده شده است، شاید بتوان با افزایش غلظت هورمون رشد تا بالای ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر (مثلاً ۲۰۰، ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) در مورد اثر ضد پیری این عامل با قطعیت بیشتری نظر داد. به علاوه نظر قطعی در مورد اثر هورمون رشد بر فعالیت تلومرازی (به دلیل معنی‌دار نبودن اختلاف بین اثر غلظت‌های مختلف هورمون رشد بر فعالیت تلومرازی سلول‌ها) نیاز به تحقیقات بیشتر با غلظت‌های بالاتر هورمون رشد دارد. در مجموع شاید با ادامه مسیر این پژوهش و استفاده از

تقدیر و تشکر

این پژوهش در سال ۱۳۸۶ در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری آغاز و در اواخر سال ۱۳۸۷ به پایان رسید. از حمایت کننده مالی پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (از بودجه مصوب طرح پژوهشی ۳۱۱ تامین شده است) و دانشگاه تربیت معلم آذربایجان و کارشناسان پژوهشگاه به ویژه خانم شاه‌صنم عباسی، خانم معصومه نوری و خانم ندا واصلی حق تقدیر و تشکر ویژه به عمل می‌آوریم.

References

1. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase Activity in Tetrahymena Extracts. *Cell*. 1985; 43(2 Pt 1): 405-413.
2. Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 1989; 337(6205): 331-337.
3. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994; 266(5193): 2011-2015.
4. Shay JW, Bacchetti S. A Survey of Telomerase Activity in Human Cancer. *Eur. J. Cancer*. 1997; 33(5): 787-791.
5. Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y, et al. Estrogen activates telomerase. *Cancer Res*. 1999; 59(23): 5917-5921.
6. Bayne S, Liu JP. Hormones and growth factors regulate telomerase activity in ageing and cancer, *Mol Cell Endocrinol*. 2005; 240(1-2): 11-22.
7. Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M. Telomerase Activity in Human Endometrium. *Cancer Res*. 1997; 57(4): 610-614.
8. Funk WD, Wang CK, Shelton DN, Harley CB, Pagon GD, Hoeffler WK. Telomerase expression restores dermal integrity to in vitro-aged fibroblasts in a reconstituted skin model. *Exp Cell Res*. 2000; 258(2): 270-278.
9. Bartke A, Brown-Borg HM, Bode AM, Carlson J, Hunter WS, Bronson RT. Does Growth Hormone Prevent or Accelerate Aging? *Exp Gerontol*. 1998; 33(7-8): 675-687.
10. Chandel NS, Budinger GR. The cellular basis for diverse response to oxygen. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42(2): 165-174.
11. Golde DW, Bersch N, Li CH. Growth hormone modulation of murine erythroleukemia cell growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978; 75(7): 3437-3439.
12. Fripiat CH, Chen QM, Zdanov S, Magalhaes JP, Remacle J, Toussaint O. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. 2001; 276(4): 2531-2537.
13. Deezagi A, Manteghi S, Khosravani P, Vaseli-Hagh N, Soheili ZS. Induced apoptosis by mild hyperthermia occurs via telomerase inhibition on the three human myeloid leukemia cell lines: TF-1, K562, and HL-6. *Leuk Lymphoma*. 2009; 50(9): 1519-1527.
14. Dalman A, Eftekhari Yazdi P, Rezazadeh Valojerdi M, Shahverdi A, Gourabi H, Fakheri R, et al. Effect of Serum Starvation and Full Confluence on Cell Cycle Synchronization and Apoptosis of Goat Dermal Fibroblast.

غلظت‌های بالاتر هورمون رشد (بالای ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) بتوان معنی‌داری اختلاف را در تست‌های BrdU و MTT و رنگ‌آمیزی β -Gal نیز مشاهده کرد.

در این پژوهش، اثر H₂O₂ بر پیر شدن سلول، در تمامی تست‌ها تایید شد. به عبارت دیگر مشخص شد که آب اکسیژنه، روند رشد سلولی و فعالیت تلومرازی را کم می‌کند و باعث می‌شود سلول‌ها در حضور این عامل، نسبت به غیاب آن رشد کمتر و فعالیت تلومرازی کمتر داشته باشند.

Yakhteh. 2009; 11: 212-219.

15. Kim KS, Seu YB, Baek SH, Kim MJ, Kim KJ, Kim JH, et al. Induction of cellular senescence by insulin-I growth factor binding protein-5 through a p53-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*. 2007; 18(11): 4543-4552.
16. Shokrgozar MA, Zali H, Rezaie Tavirani M. Evaluation of Proliferation Inhibition Effect of Human Calprotectin on Human Gastric Cancer Cell Line (AGS) in vitro. *Yakhteh*. 2007; 8: 258-263.
17. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92(20): 9363-9367.
18. Bosserhoff AK, Gläßl A, Stolz W, Buetner R. Detection of Telomerase Activity in Skin, Melanocytic Nevi, and Melanoma by Telomerase PCR ELISA. *Biochemica*. 1997; 3: 16-18.
19. Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J. Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology*. 1980; 107(6): 1875-1879.
20. Müller EE, Cella SG, De Gennaro Colonna V, Parenti M, Cocchi D, Locatelli V. Aspects of the neuroendocrine control of growth hormone secretion in ageing mammals. *J Reprod Fertil Suppl*. 1993; 46: 99-114.
21. Hoffman AR, Lieberman SA, Butterfield G, Thomson J, Hintz RL, Ceda GP, et al. Functional consequences of the somatopause and its treatment. *Endocrine*. 1997; 7(1): 73-76.
22. Rudman D. Growth hormone, body composition and aging. *J Am. Geriatr. Soc*. 1985; 33(11): 800-807.
23. Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, et al. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med*. 1990; 323(1): 1-6.
24. Sonntag WE, Lynch CD, Cooney PT, Hutchins PM. Decreases in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Endocrinology*. 1997; 138(8): 3515-3520.
25. Sonntag WE, Xu X, Ingram RL, C'costa A. Moderate caloric restriction alters the subcellular distribution of somatostatin mRNA and increases growth hormone pulse amplitude in aged animals. *Neuroendocrinology* 1995; 61(5): 601-608.
26. Weindruch R, Sohal RS. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N. Engl. J Med*. 1997; 337(14): 986-994.
27. Wetterau LA, Francis MJ, Ma L, Cohen P. Insulin-like growth factor I stimulates telomerase activity in prostate cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(7): 3354-3359.