**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 Theachers 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 $H_2O_2$ when compared with the presence of $H_2O_2$, 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

Archive of SID



www.SID.ir

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

الهه سجادی .M.Sc[1]، عبدالخالق دیزجی .Ph.D[2*]، نادر چاپارزاده .Ph.D[1]

۱. دانشگاه تربیت معلم آذربایجان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، آذربایجان، ایران
۲. پژ وهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه بیوشیمی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۶۳۴۳-۱۴۱۵۵، پژ وهشگاه 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 باغلظت‌های متفاوت هورمون رشد تیمارشده ومیزان رشد سلول‌ها و روند پیری و فعالیت تلومراز اندازه‌گیری شد. رشد وتمایز 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 (۰/۱، ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی بیشتر (تعداد بیشتر سلول‌های سبز) را نشان دادند که نمادی ازتعداد بیشتر سلول‌های پیر می‌باشد، به علاوه تکثیر سلولی همراه با افزایش غلظت هورمون رشد افزایش می‌یابد و دراین 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 باآب اکسیژنه ($H_2O_2$)، رشد سلولی وفعالیت تلومرازی کمتر از سلول‌های تیمار نشده با $H_2O_2$ نشان می‌دهند و بین اثر حضورو 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 برسلول‌ها 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 ۱۰۰نانوگرم 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

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 است که هورمون‌ها می‌توانند فعالیت تلومرازی را در برخی بافت‌ها تنظیم کنند (۶، ۷). ازآنجایی 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 فونگ 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 یک‌سری 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 درافراد مسن‌تر ، می‌تواند توده ماهیچه‌ای را افزایش و میزان چربی را کاهش و مواد معدنی را در چندین منطقه از اسکلت بدن افزایش دهد (۹).



Archive of SID

www.SID.ir

با توجه به شواهد موجود، احتمال می‌رود هورمون رشد بتواند کاندید مناسبی جهت مطالعات بر فرایند پیری باشد. این پژوهش به منظور مطالعه بیشتر اثر هورمون رشد برفرایند پیری و میزان فعالیت تلومرازی سلول‌های فیبروبلاست انسانی طراحی شده است.

به علاوه، از آنجایی که شواهد موجود نشان می‌دهد تجمع رادیکال‌های آزاد و انواع اکسیژن‌های واکنش‌گر 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 سلول‌ها استفاده شده است.

## مواد و روش‌ها

### کشت سلول‌ها وتیمار آنها

بافت منشا سلول‌های فیبروبلاست این پژوهش، از بیمارستان ۲۲ بهمن شهرقدس 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 سلول‌های فیبروبلاست حاصل شدند. سپس سلول‌ها در محیط کشت Dulbico's Modified Eagle Medium (DMEM) حاوی (FCS) Fetal Calf Serum ۱۰ درصد و در آنکوباتور در شرایط $CO_2$ ۵ درصد، ۹۵ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. کشت سلول در پلیت های ۹۶، ۶ و ۲۴ خانه‌ای صورت گرفت که در هر خانه از پلیت‌ها به ترتیب تعداد ۵۰۰۰ ، ۱۰۰۰۰۰ و ۳۵۰۰۰ عدد سلول قرار گرفت. بعداز گذشت ۱۵ ساعت از زمان کشت (این مدت زمان برای اطمینان از چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف، درنظر گرفته شد)، سلول‌های مورد نظر با غلظت‌های مختلف هورمون رشد (۱۰۰، ۱۰، ۵ ، ۱/۰، ۰/۱ و ۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) 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 غلظت‌های فیزیولوژیک هورمون رشد، به بررسی اثر غلظت‌های بالاتر از حد فیزیولوژیک هم پرداخته شود، بدین منظور به بررسی هم‌زمان اثر غلظت‌های فیزیولوژیک (تا ۵ نانوگرم در میلی‌لیتر) و غلظت‌های بالاتراز حد فیزیولولوزیک هورمون رشد (۱۰۰-۵ نانوگرم در میلی‌لیتر) پرداخته شد (۱۱).

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

### شمارش و تعیین میزان زنده ماندن

در پلیت‌های ۶ خانه، تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت شد (یک پلیت ۶تایی با $H_2O_2$ تیمار شد و یک پلیت ۶تایی دیگر با $H_2O_2$ تیمار نشد). سلول‌ها با غلظت‌های مختلف هورمون رشد (۱۰۰-۰) نانوگرم در میلی‌لیتر تیمار و ۱۲۰ ساعت آنکوبه شدند. بعد از اتمام زمان آنکوباسیون و شست‌وشوی سلول‌ها و تریپسینه کردن آنها و سانتریفیوژ و حل کردن رسوب سلولی در محیط کشت، شمارش سلولی با استفاده از رنگ متیل گرین و توسط لام نئوبار صورت گرفت و بررسی میزان زنده بودن سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو انجام شد (۱۳).

### تست BrdU

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

سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر خانه کشت شدند. بعد از ۱۲۰ ساعت گذشتن از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف هورمون رشد (در حضور $H_2O_2$ و یا در غیاب آن)، به سلول‌های هر خانه ۱۰ ماکرولیتر (BrdU با رقت ۱/۱۰) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت آنکوبه شدند، بعد از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول‌ها تخلیه و پلیت در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت گذاشته شد و سپس ۲۰۰ ماکرولیتر Fix Denate به هرخانه اضافه و آنکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بعد از مدت زمان مذکور محلول Fix Denate نیز برداشته شد و بعد ۱۰۰ میکرولیتر Anti-Brdu-POD به هرخانه افزوده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. اتصال این محلول به Brdu توسط واکنش سوبسترا قابل تشخیص است. پس از این مدت سه بار شست‌وشو با بافر انجام شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای ترامتیل بنزیدین (Tetra-Methyl Benzidin; TMB) اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد محلول Stop (اسید سولفوریک ۱ مولار) اضافه شد و جذب در ۴۵۰و ۶۹۰ نانومتر با الایزاریدر (ELISA Reader) خوانده شد (۱۳).

### تست MTT

میزان تکثیر سلولی توسط تست
(3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
نیز اندازه‌گیری شد. نمک‌های تترازولیوم مانند MTT در سلول‌های زنده توسط دهیدروژنازها احیا می‌گردند و ایجاد بلورهای بنفش رنگ نامحلول فورمازان می‌کنند که بعد از حل شدن، میزان جذب که متناسب با تعداد سلول‌ها است توسط الایزا ریدر خوانده می‌شود (۱۵، ۱۶).

سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر ول کشت شدند. بعداز ۱۲۰ ساعت گذشتن از تیمار سلول‌ها با هورمون رشد (در حضور $H_2O_2$ و یا در غیاب آن) سلول‌ها در هر ول با ۱۰ ماکرولیتر محلول MTT برای ۴ ساعت آنکوبه شدند. سپس محیط جمع آوری شد و سلول‌ها همراه با ۱۰۰ ماکرولیتر دی متیل سولفوکسید و ۱۲/۵ ماکرولیتر بافر گلایسین برای ۲۴ ساعت آنکوبه شدند. سپس جذب در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد (۱۳).

### رنگ‌آمیزی β-Gal

سلول‌های خاموش و پیر فیبروبلاست، β-Gal (که در تک سلولی‌ها با X-Gal آشکار می‌شوند) را بیان می‌کنند که می‌تواند رنگ آبی یا سبز را در pH6 ایجاد کند که در اثر شکست ایجاد می‌شود (۱۷). بنابراین رنگ گرفتن سلول (به رنگ آبی) نشان دهنده پیری سلول می‌باشد و این تست برای بررسی میزان پیری سلول‌ها مفید می‌باشد.

سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه به تعداد ۳۵۰۰۰ سلول در هر خانه کشت شدند. بعد از ۱۲۰ ساعت گذشتن از تیمار سلول‌ها با هورمون رشد (در حضور $H_2O_2$ و یا در غیاب آن)، سلول‌ها در بافر سالین شست‌وشو شدند و سپس به مدت ۵ دقیقه در فرمالدهید ۳درصد فیکس



Archive of SID

www.SID.ir

شدند، بعد از شست‌وشوی مجدد با بافر سالین، برای مدت ۱۶ ساعت با محلول رنگ تازه ۵- برومو -۴ کلرو -۳اندولیل- دی -گالاکتوزیداز (β-Gal) (۱۷) (که pH آن روی ۶ تنظیم شده)، در ۳۷ درجه آنکوبه شدند. سپس رنگ‌آمیزی 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 و۴۵۰ نانومتر، برای هر نمونه اندازه‌گیری شد. برای هر آزمایش $۲\times۱۰^{۵}$ سلول از سلول‌های کشت شده در هر یک از خانه های پلیت‌های ۶تایی (کشت سلول‌ها در پلیت‌های ۶تایی و تیمار آنها با غلظت‌های مختلف هورمون رشد و در حضور و غیاب $H_2O_2$، طبق دستور ذکر شده در بخش ۲-۱ 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

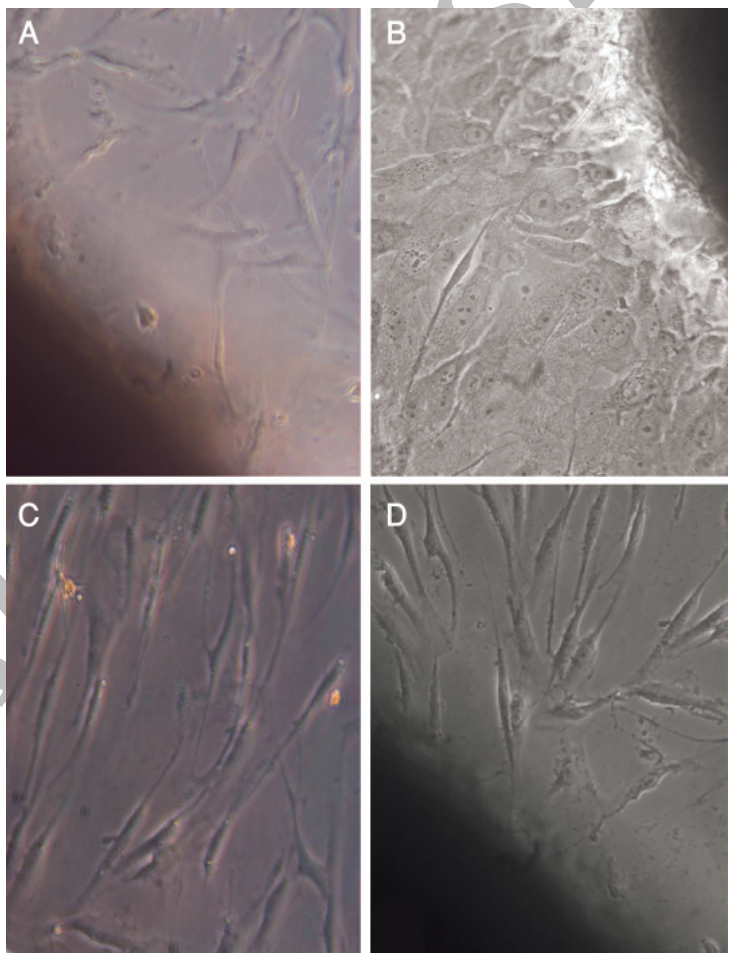
یکی از روش‌های استفاده شده (نرم‌افزار Spss)، برنامه آنالیز واریانس یک طرفه بود که در این روش، میانگین اثر غلظت‌های مختلف هورمون رشد بر روی پیری، توسط تست توکی (Tukey) مقایسه شد. روش دیگر برنامه آنالیز واریانس یک متغیره بود که توسط این روش، اثر $H_2O_2$ بر فرایند پیری، مشخص و تایید شد. در این روش میانگین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

## یافته ها

### کشت اولیه سلول

تصاویر سلول‌های فیبروبلاست گرفته شده از بافت خنثه 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) نماهای مختلف از حواشی بافت خنثه با اولین استطاله‌های سلولی در روز ۶، بافت خنثه (به عنوان منشا اولیه سلول‌های فیبروبلاست این تحقیق) به منظور کشت اولیه (Primary) از بیمارستان دریافت گردید. سپس در ظرف کشت شد، به تدریج و پس از چند روز، استطاله‌های سلولی از حواشی بافت گسترش یافتند. در این شکل حواشی بافت و استطاله‌های سلولی نمایان است (بزرگ‌نمایی ۲۵۰X). C) بافت خنثه و استطاله‌های سلولی حواشی آن، در روز هفتم نمایش داده شده است، میزان استطاله‌های 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 ۴۰۰X) .**



www.SID.ir

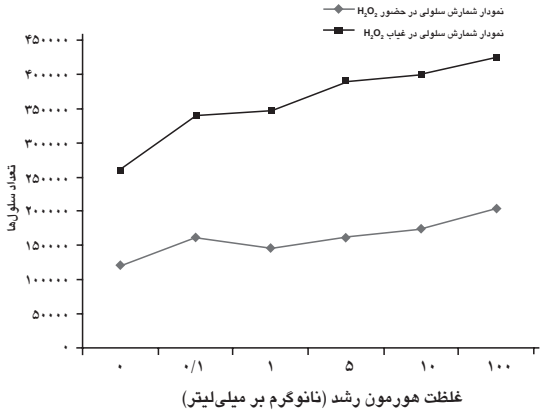
**بررسی تاثیر هورمون رشد و ($H_2O_2$) بر میزان تکثیر سلولی**

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)**

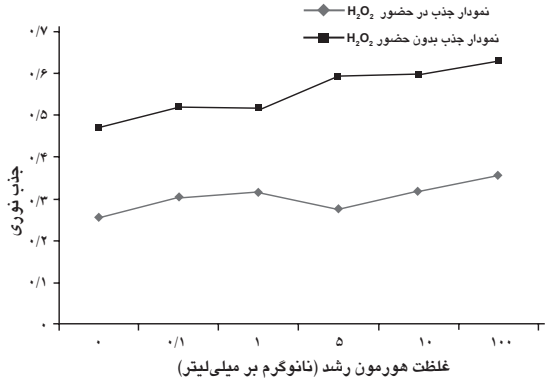
همان طور که در نمودار ۱ مشخص شده است، با افزایش غلظت هورمون رشد، تعداد سلول‌ها نیز افزایش یافته است. در چاهک نمونه کنترل، بعد از انکوباسیون و شمارش سلول‌ها و گرفتن میانگین از سه بار تکرار دیده شد که در غیاب $H_2O_2$، میزان میانگین عدد ۲۶۰۸۳۳ سلول را نشان داد، بنابراین در نمونه‌های کنترل نیز، تعداد سلول‌ها افزایش پیدا کرده است، اما تفاوت زیادی بین میزان سلول‌های کنترل و تعدادسلول‌های 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 $p=۰/۰۲۴$ برای غلظت ۵ نانوگرم در میلی‌لیتر، $p=۰/۰۱۷$ برای غلظت نانوگرم در میلی‌لیتر ۱۰ و $p=۰/۰۰۴$ 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 $H_2O_2$ ۱۲۱۶۶۶سلول 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 (با $p=۰/۰۰۴$) 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 هردو نمودار روند افزایشی مشاهده می‌شود و مقایسه دو نمودار، حاکی از ان است که در غیاب $H_2O_2$ تعداد سلول‌ها در مقایسه نقطه به نقطه بیشتر از تعداد سلول‌ها در حضور $H_2O_2$ است.**

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



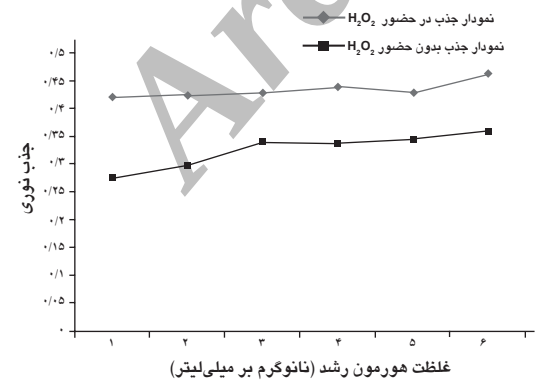

**نمودار ۲: نمودار مقایسه جذب تست BrdU در حضور و غیاب $H_2O_2$. این تست به منظور مقایسه جذب (و در واقع میزان تکثیر سلولی) در مقابل تیمار با غلظت‌های مختلف هورمون رشد و حضور و غیاب $H_2O_2$ صورت گرفت، در هر دو نمودار روند افزایشی مشاهده می‌شود. همچنین با آنالیز داده‌ها مشخص شد که بین اثر حضور $H_2O_2$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

**نتایج تست BrdU (بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون)**

همان طور 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 ۰/۴۷۱ را نشان داد.

در مورد اثر غلظت‌های مختلف هورمون رشد بر سلول‌ها در حضور $H_2O_2$، نیزبا 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 $H_2O_2$ ۰/۲۵۵ بود.

در این تست نیز تایید شد که بین اثرحضور و عدم حضور $H_2O_2$ بر جذب، اختلاف معنی‌داروجود دارد. بنابراین $H_2O_2$ 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 هردو نمودار روند افزایشی مشاهده می‌شود. با آنالیز داده‌ها مشخص شد که بین اثر حضور $H_2O_2$ و غیاب آن، اختلاف معنی‌دار وجود دارد.**



Archive of SID

www.SID.ir

### نتایج تست MTT (بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون)

نتایج تست MTT در حضور و غیاب $H_2O_2$ 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 $H_2O_2$، ۰/۲۷۵ بود و در غیاب $H_2O_2$، میانگین جذب عدد ۰/۴۱۹ را نشان داد.

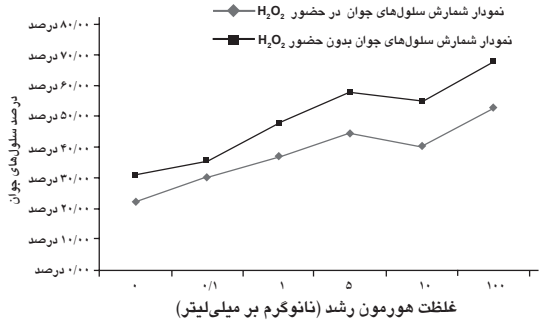
دراینجا نیز، بین اثرحضور و عدم حضور $H_2O_2$ بر رشد سلولی، اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

### بررسی پیری سلولی (بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون)

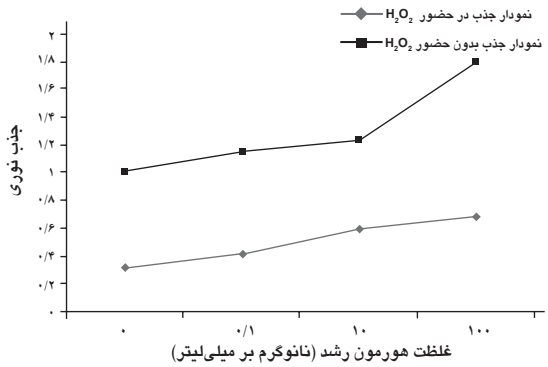
پیری سلولی توسط رنگ‌آمیزی β-Gal (۱۷) بررسی شد، شمارش ۳۰۰ سلول صورت گرفت که در این تعداد، تعداد سلول‌های سبز رنگ (پیر) و بی‌رنگ (جوان) (نمودار ۴) و سپس درصد سلول‌های جوان در زیر میکروسکوپ (درحضور و غیاب $H_2O_2$)، محاسبه شد.

با افزایش غلظت هورمون رشد، درصد جوانی سلول‌ها چه در حضور و چه در غیاب $H_2O_2$ 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 $H_2O_2$) نسبت به نمونه کنترل (که میانگین درصد سلول‌های جوان در نمونه کنترل در حضور $H_2O_2$، ۲۲ درصد و در غیاب $H_2O_2$، میزان میانگین عدد ۳۱/۱۱ درصد بود) مشاهده نشد (نمودار ۵).

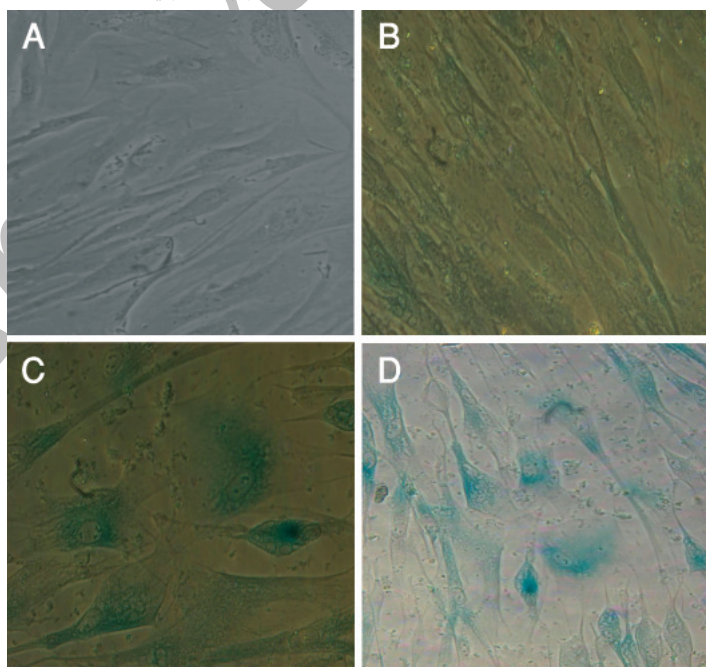
درصد سلول‌های جوان در نمونه‌های تیمار شده با $H_2O_2$ پایین‌تر از درصد سلول‌های جوان نمونه‌های همتایشان در غیاب $H_2O_2$ می‌باشند. بین اثرحضور و عدم حضور $H_2O_2$ بر رشد سلولی، اختلاف معنی‌دار وجود دارد.




**نمودار ۴: نمودار مقایسه درصد سلول‌های جوان تست X-Gal در حضور و غیاب $H_2O_2$. در هردو نمودار روند افزایشی مشاهده می‌شود.**




**نمودار ۵: نمودار مقایسه فعالیت تلومرازی در حضور و غیاب ($H_2O_2$ بر اساس جذب). این تست به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف هورمون رشد و حضور و غیاب $H_2O_2$ بر فعالیت تلومرازی 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 $H_2O_2$ صورت گرفت. سلول‌های جوان پس از رنگ‌آمیزی بی رنگ می‌مانند، اما سلول‌های پیر به رنگ سبز درمی‌آیند. A) پاساژ ۴ (سلول های 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 مجددا تیمار و به مدت ۵ روز انکوبه شدند. C) یک نانوگرم در میلی‌لیتر هورمون رشد، D) صد نانوگرم در میلی‌لیتر هورمون رشد.**



Archive of SID
www.SID.ir

**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 فیبروبلاست درحضور 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 H2O2، 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.

همان طور 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 اثرحضور 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 تیمارشده 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 وظاهر افراد مسن، به کار رود (۹).

به علاوه مطالعات سونتاگ 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، رتینوییک 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 تومورزنز 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 معنی دار 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 فیبروبلاست 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 (مثلا۲۰۰،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



Archive of SID

www.SID.ir

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 $H_2O_2$ 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.

## تقدیر و تشکر

این پژوهش در سال ۱۳۸۶ در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری آغاز و در اواخر سال ۱۳۸۷به 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 می آوریم.

## 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. Frippiat 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. 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-l 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, Gläβl 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.

Archive of SID



www.SID.ir