

بررسی تاثیر تجویز موضعی هورمون رشد بر استرنولوژیک سلول‌های غضروف رشد خرگوش

پدا... مشایخی^۱، C.V. Howard P. Sibbons M. Reed^۲

چکیده

سابقه و هدف: به دلیل اهمیت شناخت مکانیسم اثر هورمون رشد (GH) بر غضروف رشد (GP) در این مطالعه ساختمان سلولی GP تیبیای پروگزیمال خرگوش بر اساس روش‌های استرنولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت. مواد و روش‌ها: تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. هورمون رشد در GP تیبیای راست خرگوش به مدت ۲۱ روز به کمک میکروپمپ وارد شد. فاکتورهای استرنولوژیکی "حجم" و "ارتفاع" غضروف رشد، چگالی "حجم"، "سطح" و "تعداد" سلول‌های غضروفي بطور مستقیم و با استفاده از آنها "حجم، سطح و تعداد کل" سلولها و نیز "حجم و سطح" یک سلول غضروفي محاسبه گردید. نتایج مربوطه با انجام *t-test* و *ANOVA* تک فاکتور و در موارد مورد نیاز تست *Dunnett* با هم مقایسه گردیدند.

یافته‌ها: بین تیبیای راست و چپ گروه‌ها و نیز چپ و راست گروه سالیین و شاهد تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. "حجم" و "ارتفاع" غضروف رشد و نیز "حجم کل" سلول‌های غضروفي در گروه‌های درمان شده در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند. "سطح کل" و "تعداد کل" سلول‌های غضروفي و "حجم" و "سطح" یک سلول غضروفي گروه‌های درمان شده در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. نتیجه‌گیری و توصیه‌های: هورمون رشد باعث هیپرپلازی سلول‌های غضروفي گشته ولی باعث هیپرتروفی در آنها نمی‌شود. عمل جراحی و کاشتن میکرو پمپ‌ها تأثیری بر استرنولوژیکی سلول ندارد. دوزهای مصرف شده و نتایج حاصله مبین اثر سیستمیک GH می‌باشد.

واژگان کلیدی: هورمون رشد، غضروف رشد، روشهای استرنولوژیکی

۱- دانشکده علوم پزشکی شاهرود

۲- دانشگاه لیورپول، انگلستان

مقدمه

رشد طولی استخوان و چگونگی آن همیشه مورد توجه محققین بوده است. این امر از جهات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان نمونه می توان به بعضی مقالات که در آنها رشد طولی استخوان (۱-۵)، چگونگی اثر مواد مختلف بر سلولهای استخوانی و غضروفی (۸-۶)، ماتریکس استخوان (۹) و ژنتیک آن (۱۰ و ۱۱) مورد بحث قرار گرفته است، اشاره نمود.

مطالعات بسیاری به طور اختصاصی به اثرات هورمون رشد (*GH*) و چگونگی اثر آن بر رشد طولی استخوان و نیز غضروف رشد (*GP*) و سلولهای آن پرداخته اند، ولیکن در مورد اثر این هورمون بر سلولهای غضروفی *GP* در حیوان طبیعی هیچگونه مطالعه استرئولوژیکی انجام نشده است. هانزیکر و همکاران تنها کسانی بودند که محاسبات استرئولوژیکی را روی سلولهای غضروفی (*GP*) انجام دادند. آنها بعضی فاکتورهای استرئولوژیکی را در موشهایی که هیپوفیزشان را خارج کرده بودند و سپس آنها را تحت اثر *GH* قرار داده بودند، اندازه گیری کردند. آنها نشان دادند که این دو هورمون، سلولهای غضروفی *GP* را در تمام مراحل تمایز تحریک می کنند. آنها فاکتورها را در هر ناحیه *GP* بطور جداگانه اندازه گیری نمودند. نتایج نشان داد که *GH* باعث افزایش معنی دار ارتفاع *GP* در نواحی تکثیری و افزایش حجم نواحی تکثیری و هیپرتروفیک شده بود، هرچند که به میزان رشد فیزیولوژیک نرسیده بود.

این مطالعه حاضر با هدف بررسی استرئولوژیک اثر تجویز موضعی هورمون رشد بر سلولهای غضروفی *GP* تیبا در خرگوش نابالغ انجام شد.

مواد و روشها

تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. استخوانهای تیبای بکار رفته در این تحقیق متعلق به خرگوشهایی بود که برایت ویت در تحقیق خود برای بررسی اثر *GH* بر طول استخوانهای تیبای آنها مورد مطالعه قرار داده بود (۱۳). خرگوشها همه ماده بودند و در شروع آزمایش ۹ هفته عمر داشتند.

خرگوشها در چهار گروه دوز زیاد (*high dose*)، دوز کم (*low dose*)، سالین (*saline*) و شاهد (*control*) قرار داده شدند. در سه گروه اول، *GH* و محلول سالین توسط پمپ اسموتیک کوچک به مدت ۲۱ روز وارد اپیفیز پای راست شده بود. میزان *GH* برای گروه دوز کم و زیاد به ترتیب $10 \mu\text{g/day}$ و $100 \mu\text{g/day}$ بود. گروه شاهد مورد عمل جراحی قرار نگرفت و فقط زندگی عادی داشتند (۳۱).

پس از خارج کردن تیبای پای چپ و راست، اپیفیز آنها از زیر منطقه *GP* با برشی عمود بر محور طولی تیبا جدا گردید. برای فیکس کردن، ابتدا از محلول ۲٪ گلوستارآلدئید و بافر $0.05M$ سدیم کاکودیلات استفاده شد. هر نیم ساعت روتینیوم هگزامین تری کلراید 0.1% به محلول قبلی اضافه شد تا $PH \approx 6.73$ و اسمولاریتی 340 میلی اسمول بدست آمد. سپس اپیفیزها با بافر کاکودیلات سدیم شسته شد. برای مدت ۲ تا ۳ ساعت در محلولی محتوی کاکودیلات $0.1M$ ، $QSO4$ یک درصد و *RHT* با غلظت 0.1% قرار داده شد (اسمولاریته نهایی 330 میلی اسمول و *PH* برابر با 7.05). سپس نمونهها در اتانل 70 تا 100 درصد برای آنگیری قرار گرفت. از محلول *EDTA* (*thylen diamine tetracetic acid*) نیز برای دکلسیفیه کردن استخوانها استفاده گردید (۱۵). از آنجا که برای محاسبه بسیاری از پارامترهای استرئولوژیک احتیاج به برشهای عمودی

گرفته شد. حجم ایی فیز با فرار دادن آن در داخل آب چگالی (*Replacement Method*) اندازه گیری گردید. چگالی حجمی *GP* در داخل ایی فیز نیز با استفاده از برش های نازک و با بکارگیری یک پروژکتور (*Carl Zeiss Projector*) برای انعکاس تصویر برش ها روی یک صفحه سفید و روش نقطه شماری (*point counting*)، محاسبه و با فرار دادن مقادیر حاصل در فرمول $V_{(GP)} = V_{(GP/PT)} \times V_{(PT)}$ حجم *GP* محاسبه گردید (۱۶).

محاسبه ارتفاع *GP*: با استفاده از برش های نازک و پروژکتور فوق الذکر (بزرگنمایی ۱۳/۵) تصاویر برش ها بر روی یک صفحه سفید منعکس گردید. از هر برش سه منطقه بطور تصادفی انتخاب گردید و با خطکش ارتفاع *GP* اندازه گیری و با تبدیل اندازه های بدست آمده به مقیاس واقعی، ارتفاع *GP* محاسبه شد. محاسبه چگالی حجمی و حجم کل سلولهای غضروفی: با استفاده از عدسی شینی (۴۰×) میکروسکوپ (*Olympus BH2*) و دوربین مخصوص، تصاویر برش های نازک روی مونیتر کامپیوتر منتقل شد. با استفاده از بسته نرم افزاری فوق الذکر، یک سیستم نقاط آزمایش (*point system*) حاوی ۱۰۰ نقطه، روی تصویر برش ها منعکس گردید. چگالی حجمی سلول های غضروفی با توجه به رابطه $V_V = A_A = P_P$ (۱۶)، با روش نقطه شماری و با انتخاب تصادفی سه ستون در هر برش و با استفاده از فرمول $V_{V(chon/GP)} = \frac{\sum P_{(chon)}}{\sum P_{(GP)}}$ ، حجم کل آنها با استفاده از فرمول $V_{(tot)} = V_{V(chon/GP)} \times V_{(GP)}$ متوسط حجم یک سلول (*mean chondrocyte volume in number*) (\bar{V}_N) از رابطه $\bar{V}_N = \frac{V_V}{N_V}$ محاسبه گردید (۱۵، ۱۶، ۱۸).

(*vertical sections*) می باشد، جهت برش ها می بایست موازی جهت عمود یعنی در امتداد محور طولی ایی فیز باشد. برای این منظور هر ایی فیز به گونه ای روی میز برش فرار گرفت که محور طولی آن (محور عمود بر *GP*) در امتداد افق بود. هر ایی فیز با سه برش به موازات محور طولی آن به ۴ بخش مساوی بریده شد. سپس هر بخش از طرف راست روی میز برش خوابانیده شد و با سه برش دیگر، به چهار قسمت جدید تقسیم شد. در نهایت از هر ایی فیز ۱۶ قسمت ستونی حاصل شد که محور طولی آنها موازی محور طولی تیبا و عمود بر *GP* بود. در نتیجه همه برش های حاصل از این ستون ها، برش عمودی بودند (۱۵).

تمام قطعات با هیستورزین قالب گیری شد (با ابعاد ۲۰×۱۳ میلی متر) به گونه ای که سطح عمود آنها موازی جهت برش بود. قالب ها با تیغ شیشه ای و میکروتوم *Jung Super 2065* به ضخامت های ۱/۵ و ۳۰ میکرومتر برش داده شدند. برش های نازک با تولوئیدین آبی (*toluidine blue*) و برش های ضخیم با اتیدیوم بروماید (*ethidium bromide*) رنگ آمیزی گردیدند. از برش های ضخیم برای محاسبه چگالی تعداد و تعداد کل سلول های غضروفی و از برش های نازک برای محاسبه حجم و ارتفاع غضروف رشد و نیز چگالی حجمی و سطحی سلول های غضروفی استفاده گردید.

تمام محاسبات استرئولوژیک این تحقیق با توجه به فرمول ها و روش هایی که در دنبال می آید، با استفاده از یک بسته نرم افزاری استرئولوژیکی (*Kinetic Imaging LTD, Digital Stereology Package*) انجام گرفته است.

محاسبه حجم *GP*: برای این منظور، *GP* به عنوان یک حجم درون ایی فیز پروگزیمال تیبا (*PT*) در نظر

و با استفاده از نرم افزار استرنولوژی، کادر خطوط آزمایش روی آن قرار گرفت. با حرکت به طرف بالا و پایین (عمود بر سطح برش)، برش‌های *look-up* و *reference* مقایسه گردیدند. تمام سلول‌های غضروفی قابل مشاهده در کادر، در ارتفاع مورد نظر شمارش گردیدند. در هر برش سه ستون و در هر ستون سه دایسکتور (از بالا تا پایین *GP*) به طور تصادفی مورد مطالعه واقع شد. حجم دایسکتور از رابطه $V_{(dis.)} = A \times h$ محاسبه گردید. سطح واقعی دایسکتور (A) با بکارگیری یک گراتیکول محاسبه شد. چگالی تعداد سلول‌های غضروفی از رابطه $N_{V(chon./GP)} = \frac{\sum Q^-}{\sum A \times h}$ و تعداد کل آنها از رابطه $N_{(tot.)} = N_{V(chon./GP)} \times V_{(GP)}$ محاسبه گردید (۲۲، ۱۶).

محاسبات آماری: در استرنولوژی اندازه‌گیری چگالی‌ها به تنهایی برای نتیجه‌گیری کفایت نمی‌کند زیرا ممکن نیست تشخیص داده شود که افزایش و یا کاهش مقادیر آنها به واسطه تغییر در مقادیر کل، حجم مرجع و یا هر دو بوده است. به این دلیل مقادیر کل محاسبه شده برای سلول‌ها (حجم، سطح و تعداد کل سلول‌های غضروفی) مورد بررسی آماری قرار گرفت. برای آنالیز داده‌ها به این ترتیب عمل شد که:

- ۱- مقادیر به دست آمده برای پای چپ و راست هر حیوان با انجام *t-test* مقایسه گردید. در صورت عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین دو پا، مقادیر آنها (*pooled quantities*) برای مراحل بعدی استفاده شد.
- ۲- گروه‌های سالیین و کنترل با انجام *t-test* مقایسه و در صورت عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین آنها، مقادیر مربوط به گروه کنترل برای مراحل بعدی استفاده شد.

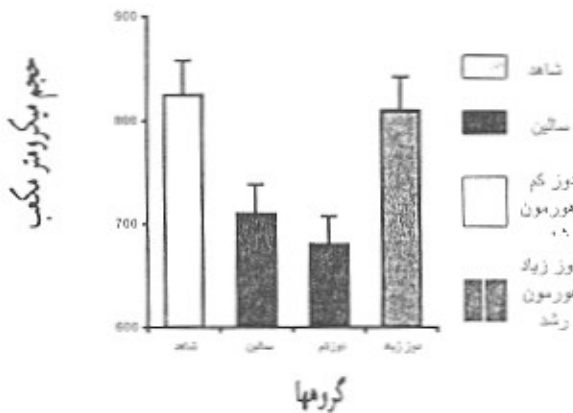
محاسبه چگالی سطحی و سطح کل سلول‌های غضروفی: برای این امر از $\times 40$ میکروسکوپ ذکر شده استفاده گردید. با استفاده از بسته نرم‌افزاری فوق‌الذکر یک سیستم خطوط آزمایش (*test system of sine-weighted lines*) که جهت عمود آن موازی جهت عمود برش بود، روی تصویر منعکس شد. از هر برش سه ستون به طور تصادفی انتخاب شد و در سه منطقه آن (پایین، وسط و بالا) نقاط برخورد خطوط سیستم با مرز سلول‌ها شمارش و با استفاده از فرمول $S_{V(chon./GP)} = 2 \times I_L$ چگالی سطحی سلول‌های غضروفی محاسبه گردید. سطح کل سلول‌ها با استفاده از فرمول $S_{(tot.)} = S_{V(chon./GP)} \times V_{(GP)}$ و متوسط سطح یک سلول (\bar{S}_N) با *(mean chondrocyte surface in number)*

استفاده از فرمول $\bar{S}_N = \frac{S_V}{N_V}$ محاسبه گردید (۲۳-۱۵).

محاسبه چگالی تعداد کل سلول‌های غضروفی: برای محاسبه این فاکتور از دایسکتور (*disector*) و برش‌های ضخیم (۳۰ میکرومتر) رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برومید استفاده گردید. در این سیستم هر سطحی از برش به عنوان برش مورد مشاهده (*looking-up section*) با سطح بعدی به عنوان برش مرجع (*reference section*) در ضخامت ۱۰ میکرومتر (h) مقایسه شد. این ارتفاع با یک *microcator* کنترل می‌گردید. تصاویر با عدسی شیئی ($\times 60$) یک میکروسکوپ کونفوکال (*Biorad* و *MRC600 Confocal Microscope*) با تابش اشعه لیزر مشاهده و مورد مطالعه قرار گرفت. زمان، محل و میزان تابش لیزر (*laser exposure*) توسط بسته نرم‌افزاری *Biorad SOM* کنترل می‌شد. تصاویر حاصل روی مونیتر کامپیوتر منعکس گردید

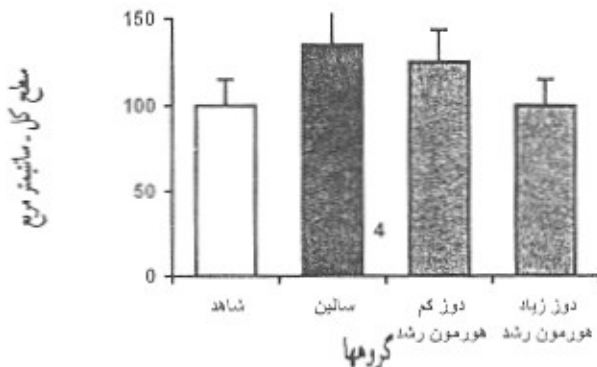
\bar{V}_N سلول‌های غضروفی در نمودار شماره ۱ ارائه گردید و نشان می‌دهد حجم یک سلول در گروه کنترل با اختلاف معنی‌داری از گروه‌های درمان شده بیشتر بود و این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار بود.

نمودار شماره ۱ حجم سلول‌های غضروفی خرگوش‌ها برحسب مقادیر مختلف تجویز موضعی هورمون رشد



سطح کل سلول‌های غضروفی گروه دوز کم، با اختلاف معنی‌داری از گروه کنترل بیشتر بود. در گروه دوز زیاد این عامل با وجود بیشتر بودن اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (نمودار ۲)

نمودار شماره ۲ سطح سلول در غضروفی خرگوش‌ها برحسب مقادیر مختلف تجویز موضعی هورمون رشد



\bar{S}_N سلول‌های غضروفی در نمودار شماره ۳ ارائه گردیده نشان می‌دهد که در هر دو گروه درمان شده با اختلاف معنی‌داری از گروه کنترل کمتر بود

۳- گروه‌های درمان شده و کنترل با انجام ANOVA تک فاکتور مقایسه گردیدند.

۴- در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین آنها، از تست دانت (Dunnett's multiple comparison test) برای مقایسه گروه‌های درمان شده با کنترل استفاده گردید.

تمام مراحل محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel انجام گردید.

محاسبه ضریب خطا

(coefficient of error): ضریب خطای CE

حجم و ارتفاع GP به ترتیب از روابط

$$CE(V_{tot}) = \sqrt{CE^2(V_{V(GP/Epi)}) + CE^2(V_{ref})}$$

$$CE(\bar{x}) = \frac{SD(\bar{x})}{\bar{x} \sqrt{n}}$$

محاسبه شده (چگالی حجم، سطح و تعداد) از رابطه

$$CE(R)_n = \left[\frac{n}{n-1} \left(\frac{\sum x^2}{\sum x \sum x} + \frac{\sum y^2}{\sum y \sum y} - \frac{2 \sum xy}{\sum x \sum y} \right) \right]^{1/2}$$

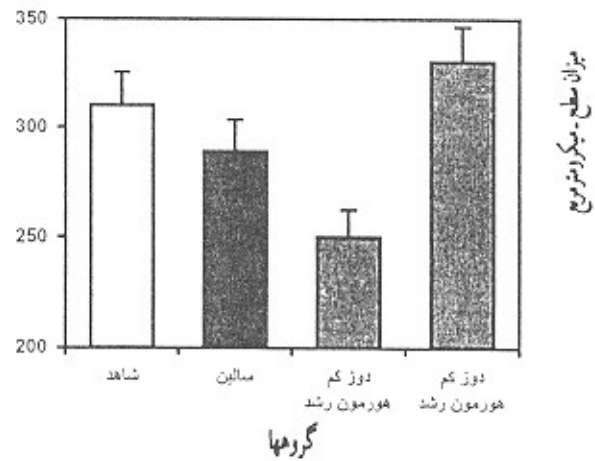
مقادیر کل (حجم، سطح و تعداد کل سلول‌های غضروفی) از رابطه

$$CE(z) = \sqrt{CE^2(x) + CE^2(y)}$$

یافته‌ها

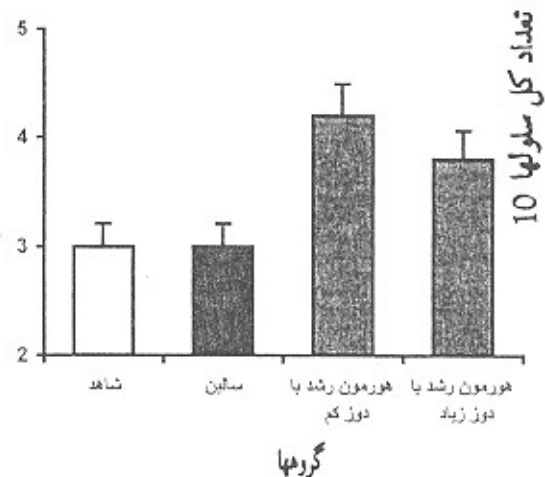
مقایسه مقادیر مربوط به پای چپ و راست در مجموع اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. مقایسه مقادیر دو پای چپ و راست در گروه‌های سالین و کنترل نیز اختلاف معنی‌داری نشان نداد. لذا مقادیر هر دو پای گروه‌های درمان شده (high dose و low dose) با گروه کنترل مقایسه گردید که نتایج حاصله نشانگر این است که: حجم و ارتفاع GP و نیز حجم کل سلول‌های غضروفی در سه گروه اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

نمودار شماره ۳ میزان سطح سلول غضروفی خرگوش برحسب سطح سلول غضروفی خرگوش به تفکیک مقادیر مختلف تجویز هورمون رشد



تعداد کل سلولهای غضروفی به تفکیک مقادیر مختلف تجویز هورمون رشد در خرگوش در نمودار شماره ۴ ارائه گردیده نشان می‌دهد که در دو گروه درمان شده با اختلاف معنی‌داری از گروه کنترل بیشتر بود.

نمودار ۴- تعداد کل سلولهای غضروفی خرگوش برحسب مقادیر مختلف تجویز هورمون رشد.



بحث:

در استروئولوژی فقط با اندازه‌گیری چگالی‌ها نمی‌توان نتیجه‌گیری نمود؛ زیرا مشخص نیست که تغییر آنها به دلیل تفاوت در حجم فضای مرجع و یا به دلیل افزایش تعداد کل می‌باشد. به این دلیل در تحقیق

حاضر مقادیر کل فاکتورها اندازه‌گیری و بین گروه‌های مختلف مقایسه گردید. با توجه به نتایج حاصله بطور کلی می‌توان بیان کرد که عدم اختلاف معنی‌دار فاکتورهای اندازه‌گیری شده در پای طرف راست و چپ و نیز بین گروه سالین و کنترل نشان‌دهنده این است که انجام عمل جراحی به تنهایی تاثیر قابل توجهی بر جای نگذاشته است و تغییرات مشاهده شده در نتایج ناشی از مصرف GH بوده است. به طور جداگانه موارد ذیل را می‌توان مورد بحث قرار داد:

مقایسه تعداد کل سلولهای غضروفی پای چپ و راست اختلاف معنی‌داری را نشان نداد؛ هر چند تعداد سلولها در پای راست کمی بیشتر از پای چپ بود. این امر می‌تواند به دلیل دریافت بیشتر GH در طرف راست باشد. در گروه‌های درمان شده، میزان تعداد کل سلولهای غضروفی دو طرف بیشتر از گروه کنترل بود ولی بین دو گروه درمان شده اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. این نتایج نشان‌دهنده این است که GH باعث تکثیر و هیپرپلازی سلولها شده است. این امر با نتایج یافته‌های لیندل (۱۴)، مانسور (۲۵) و مادسن (۱۲) در محیط *in vitro* و لوریچ (۲۹)، اولسن (۲۸) و نیلسون (۲۶) در محیط *in vivo* هماهنگی دارد. به عقیده بعضی از محققین GH باعث تحریک تمایز سلولها می‌شود (۲۷، ۲۴، ۲۱).

حجم یک سلول غضروفی در گروه‌های درمان شده با اختلاف معنی‌داری از گروه کنترل کوچکتر بود. این امر نشانگر این است که GH باعث هیپرتروفی در سلولها نگردیده است. علت این امر تاثیر GH بر تکثیر سلولها بوده و در نتیجه سلولها به علت میتوز زیاد فرصتی جهت رسیدن به حداکثر اندازه را

مقایسه سلول‌های طبیعی کاهش یابد. در نهایت بطور کلی می‌توان بیان کرد که:

- اثر GH بر GP پروگزیمال تیبیای خرگوش باعث افزایش هیپرپلازی سلول‌های غضروفی می‌شود.
- اثر GH بر GP پروگزیمال تیبیای خرگوش باعث هیپرتروفی سلول‌های غضروفی نمی‌شود.
- در دوزهای مصرف شده GH دارای اثرات *predominant* سیستماتیک می‌باشد.
- عمل کاشت پمپ اثر قابل ملاحظه‌ای بر فاکتورهای اندازه‌گیری شده نداشته است.
- با توجه به اختلاف چگالی‌های اندازه‌گیری شده طرف راست و چپ در گروه‌های درمان شده (هر چند در مقادیر کل اختلافی وجود نداشت)، می‌توان حدس زد که GH یک اثر موضعی بر *cyto architecture* طرف درمان شده داشته است.

پیدا نکرده‌اند. این نتایج با یافته‌های هانزبکر (۳۰) مطابقت دارد.

بیشتر بودن مقادیر بسیاری از فاکتورهای اندازه‌گیری شده در مقایسه پای چپ و راست، علیرغم عدم وجود اختلاف معنی‌دار (به غیر از چگالی حجم و تعداد در دو گروه درمان شده و چگالی سطح در گروه با دوز زیاد) نشان دهنده اثر GH بر سلول‌ها در طرف تزریق شده می‌باشد که با یافته‌های نلسون (۲۶) (مطابقت دارد. در عین حال عدم اختلاف معنی‌دار دو طرف نشان‌دهنده اثر سیستمیک GH می‌باشد که با نتایج ————— رایت و ————— (۱۳)، اشلکتور (۱۷) و راسل (۲۱) تطابق دارد.

متوسط سطح یک سلول غضروفی در گروه‌های درمان شده نشان‌دهنده کوچک شدن سلول‌ها می‌باشد. با توجه به دیگر یافته‌ها که تعداد سلول‌ها زیاد شده ولی حجم کل سلول‌ها افزایش معنی‌دار نیافته است این امر طبیعی است که حجم یک سلول کم شده و به تبع آن متوسط سطح یک سلول نیز در

REFERENCES

1. Williams GR, Robson H, Shalet SM. Thyroid hormone actions on cartilage and bone: interactions with other hormones at the epiphyseal plate and effects on linear growth. *J Endocrinol* 1998; 157(3): 391-403.
2. Zapf J. Growth promotion by insulin-like growth factor I in hypophysectomized and diabetic rats. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 140(1-2): 143-9.
3. Mancilla EE, De Luca F, Uyeda JA, Czerwiec FS, Baron J. Effects of fibroblast growth factor-2 on longitudinal bone growth. *Endocrinology* 1998; 139(6): 2900-4.
4. Kidder LS, Schmidt IU, Evans GL, Turner RT. Effects of growth hormone and low dose estrogen on bone growth and turnover in long bones of hypophysectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1997; 61(4): 327-35.
5. Chen MM, Yeh JK, Aloia JF. Histologic evidence: growth hormone completely prevents reduction in cortical bone gain and partially prevents cancellous osteopenia in the tibia of hypophysectomized rats. *Anat Rec* 1997; 249(2): 163-72.
6. Wakita R, Izumi T, Itoman M. Thyroid hormone-induced chondrocyte terminal differentiation in rat femur organ culture [published erratum appears in *Cell Tissue Res.*, 1998; 294(2): 391].

7. Monson E, Baumbach WR, Lavelin I, Gertler A, Hurwitz S, Pines M. Generation of growth hormone binding protein by avian growth plate chondrocytes is dependent on cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 135(1): 1-10.
 8. Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Reynolds PR, Rosier RN, et al. BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation. *J Bone Miner Res* 1999; 14(4): 475-82.
 9. Shukunami C, Hiraki Y. Expression of cartilage-specific functional matrix chondromodulin-I mRNA in rabbit growth plate chondrocytes and its responsiveness to growth stimuli in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249(3): 885-890.
 10. Chan SJ, Plisetskaya EM, Urbinati E, Jin Y, Steiner DF. Expression of multiple insulin and insulin-like growth factor receptor genes in salmon gill cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94(23): 12446-12451.
 11. Nilsson A, Carlsson B, Isgaard J, Isaksson OGP, Rymo L. Regulation by GH of insulin-like factor-I mRNA expression in rat epiphyseal growth plate as studied with in-situ hybridization. *J Endocrinology* 1990; 125: 67-74.
 12. Madsen K, Friberg U, Roos P, Edén S, Isaksson OGP. Growth hormone stimulates the proliferation of cultured chondrocytes from rabbit ear and rib growth plate cartilage. *Nature* 1983; 304: 545-547.
 13. Braithwaite IJ. Leg lengthening using growth hormone. The effect of continuous growth hormone administration and periosteal division on the longitudinal growth of the immature rabbit tibia. MD. Thesis, 1993; University of Liverpool.
 14. Lindahl A, Isgaard J, Carlsson L, Isaksson OGP. Differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on colony formation of epiphyseal chondrocytes in suspension culture in rats of different ages. *Endocrinology* 1987; 121: 55-62.
 15. Cruz-Orive LM, Hunziker EB. Stereology for anisotropic cells: Application to growth cartilage. *J Microscopy* 1986; 143: 47-80.
 16. Howard CV. Stereological techniques in biological electron microscopy, In: *Biophysical Electron Microscopy. Basic concepts and modern techniques*. Ed. Hawkes PW and Valdré U, by Academic Press, 1990.
 17. Schlechter NL, Russel SM, Greenberg S, Spencer EM, Nicoll CS. A direct growth effect of growth hormone in rat hindlimb shown by arterial infusion. *Am J Physiology* 1986; 250: E231-E235.
۱۸. مشایخی ی، برزجان م. محاسبه چگالی حجمی و سطحی. مجله دانش و تندرستی، فصلنامه علمی و پژوهشی دانشکده علوم پزشکی شاهرود ۱۳۷۸؛ سال ۲، صفحات ۳۵-۲۷.
19. Miles Results:, Davy P. Precise and general condition for the validity of a comprehensive set of stereological fundamental formulae. *J Microscopy* 1976; 107: 211-226.
 20. Isaksson OGP, Jansson JO, Gause IAM. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 1982; 216: 1237-9.
 21. Russell SM, Spencer EM. Local injections of human or rat growth hormone or purified human somatomedin-C stimulate unilateral tibial epiphyseal growth in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 1985; 116: 2563-67.

22. De Hoff RT, Rhines FN. *Quantitative Microscopy*. Mc Graw-Hill, New York, 1968.
23. Baddeley AJ, Gundersen HJG, Cruz-Orive LM. *Estimation of surface area from vertical sections*. *J Microscopy* 1986; 142: 259-76.
24. Isgaard J, Moller C, Isaksson OGP, Nilsson A, Mathews LS, et al. *Regulation of insulin-like growth factor messenger ribonucleic acid in rat growth plate by growth hormone*. *Endocrinology* 1988; 122: 1515-20.
25. Maor G, Hochberg Z, Vonder Mark K, Heinegard D, Silbermann M. *Human growth hormone enhances chondrogenesis and osteogenesis in a tissue culture system of chondroprogenitor cells*. *Endocrinology* 1989; 125: 1239-45.
26. Nilsson A, Isgaard J, Lindahl A, Dahlström, A, Skottner A, Isaksson OGP. *Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate*. *Science* 1986; 233: 571-4.
27. Isaksson OGP, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J. *Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth*. *Endocrin Rev* 1987; 9: 426-38.
28. Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson OGP, Linahl A. *Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate*. *Pro Natl Aca Sci, USA*, 1992; 89: 9826-30.
29. Loveridge N, Farquharson C, Palmer R, Loblely GE, Flint DJ. *Growth hormone and longitudinal bone growth in vivo-short term effect of a growth hormone antiserum*. *J Endocrinol* 1995; 146: 55-62.
30. Hunziker EB, Wagner J, Zapf J. *Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes in vivo*. *J Clin Invest* 1994; 93: 1078-86.