Research Paper

The effect of α-tocopherol on telomerase activity and induction of lymphocyte proliferative responses between young and elderly individuals

Hamideh Mohammadtaheri[1], Setareh Haghighat[1], Mehdi Mahdavi[2*]

1. Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University,Tehran, Iran
2. Recombinant Vaccine Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*** Corresponding author e-mail: Mahdavivac@gmail.com**

Citation: Mohammadtaheri H, Haghighat S, Mahdavi M. The effect of α-tocopherol on telomerase activity and induction of lymphocyte proliferative responses between young and elderly individuals. Daneshvar Medicine 2020; 28(4):35-45.

Abstract

Background and Objective: Aging or biological senescence is the process of deterioration and loss of living potent over time. Different genes are involved in initiating and continuing the aging process, the most important of which are telomerase activity genes. The present study was aimed to evaluate the effects of α-tocopherol and PPD on telomerase activity and the induction of proliferative lymphocyte responses in people with aging for the first time.

Materials and Methods: 10 cc heparinized blood was drawn from ten elderly individuals aged 80-100 years and ten young 20-40. Then, PBMCs were separated by using a ficoll solution and it was cultured. Lymphocyte proliferation was evaluated by BRDU assay. Gene expression of telomerase activity in treated cells with α-tocopherol and PPD were performed by Real-time PCR method. Data were analyzed by one-way ANOVA method.

Results: The results of proliferative lymphocyte responses of the elderly showed a significant increase compared to the young. The results of TERT gene expression showed that treatment with dialphatocopherol increased the expression of telomerase activity which showed a significant difference compared to β-actin gene. Also, BrdU assay indicated a relative increase in lymphocyte proliferation of the elderly compared with young people.

Conclusion: α-tocopherol showed an anti-aging effect by which lymphocyte activity increased in the elderly compared to the young.

Keywords: α-tocopherol, PPD, Aging, Telomerase, Lymphocyte

Received: 24 July 2020
Last revised: 3 Oct 2020
Accepted: 19 Oct 2020

مقاله پژوهشی

تأثیر آلفاتوکوفرول بر فعالیت تلومراز و القای پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌ها در افراد پیر و جوان

نویسندگان: حمیده محمدطاهری[۱]، ستاره حقیقت[۱]، مهدی مهدوی[۲]*

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد تهران پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات واکسن های نوترکیب دانشگاه تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: مهدی مهدوی **Email: Mahdavivac@gmail.com**

چکیده

مقدمه و هدف: پیری، یا سالخوردگی بیولوژیکی، فرآیند زوال و کاهش نیروی موجود زنده درگذر زمان است. ژن‌های مختلفی در شروع و ادامه فرآیند پیری نقش دارند که از مهم‌ترین آن‌ها ژن‌های مربوط به فعالیت تلومراز است. در این مطالعه برای اولین بار اثر دی آلفاتوکوفرول و PPD بر فعالیت تلومراز و القای پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌های افرادی که دچار پیری شده‌اند در مقایسه با افراد جوان بررسی‌شده است.

مواد و روش ها: از ده فرد مسن در رنج سنی ۸۰ تا ۱۰۰ سال و ده فرد جوان در رنج سنی ۲۰ تا ٤۰ سال، ده سی‌سی خون گرفته شد و به کمک فایکول PBMC ها جدا و کشت داده شدند. بررسی تکثیر لنفوسیتی با استفاده از تست BRDU صورت گرفت. بیان ژن‌های مربوط به تلومراز اکتیویتی به کمک Real-time PCR سنجش شد. نتایج با استفاده از آزمون one-way ANOVA آنالیز شدند.

نتایج: نتایج پاسخ های تکثیری در لنفوسیت های افراد پیر نسبت به افراد جوان افزایش معناداری را نشان داد. نتایج بررسی بیان ژن **TERT** نشان داد که تیمار با دی آلفاتوکوفرول منجر به افزایش بیان فعالیت تلومراز شده که نسبت به ژن **β-actin** اختلاف معناداری را نشان می دهد. همچنین در سلول های افراد جوان نسبت به سلول های افراد پیر فعالیت تلومراز افزایش بیشتری داشته است.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که دی آلفاتوکوفرول با افزایش عملکرد تلومراز منجر به جوان شدن سلول های لنفوسیت های افراد پیر می شود اما به نظر می رسد اثر دی آلفاتوکوفرول در سلول های جوان بیشتر از سلول های پیر می باشد به عبارتی استفاده از دی آلفاتوکوفرول در جوانی اثر بیولوژیکی بیشتری بر روی لنفوسیت ها دارد.

واژه های کلیدی: آلفاتوکوفرول، PPD، پیری، تلومراز، لنفوسیت

دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۲۴
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۹/۰۷/۱۲
پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۸

مقدمه

پیری، یک فرایند جهانی، ذاتی، پیشرونده و آسیب رسان است که با تجمع تدریجی آسیب های مختلف و کاهش کارایی عملکردی و هموستاز در سلول ها و بافت ها، در طی زمان همراه است (۱). پیری در سطوح مختلف بافت و اندام، سلول و مولکول بروز می کند. عوامل متعددی در بروز پیری نقش دارند که شامل زمینه ژنتیکی، میزان تولید رادیکال های آزاد، میزان فعالیت آنزیم تلومراز، محدودیت غذایی، تولید محصولات زائد، متیلاسیون **DNA**، گلیکاسیون، استرس، جهش های میتوکندری، تخریب و ترمیم **DNA**، میان کنش **DNA**، پروتئین و غیره است. سالمندی پدیده‌ای است که به‌وسیله تغییرات بیولوژی، فیزیولوژی، بیوشیمی و آناتومی در سلول‌های بدن ایجاد می‌شود. این تغییرات به‌مرورزمان بر عملکرد سلول‌ها اثر می‌گذارد (۲).

ویتامین **E** یکی از ویتامین‌های محلول در چربی است که برای نخستین بار در سال ۱۹۲۲ میلادی کشف شد و سپس در سال ۱۹۳٦ میلادی از جوانه گندم جدا گردید و آلفاتوکوفرول نام گرفت. بعدها دو گونه دیگر به نام بتا توکوفرول و گاما توکوفرول کشف شدند که اثرشان نسبت به آلفاتوکوفرول کمتر بود. این ویتامین در لایه چربی دیواره سلول و داخل سلول قرار می‌گیرد و از تخریب دیواره سلول جلوگیری می‌کند. همچنین ویتامین **E** یک نام برای گروهی از مولکول‌ها است که اثراتی شبیه آلفاتوکوفرول را دارند (۳). هرچند ویتامین **E** مهم‌ترین عامل برای داشتن سیستم ایمنی قوی، پوست سالم و چشم‌های سالم است، اما همه فواید و خطرات ویتامین **E** هنوز خیلی مشخص نیست (٤).

طی پیری، تعداد سلول‌های دندریتیک و سیتوتوکسیک **T** در تیموس کاهش می‌یابد که نقش مهمی در کارکرد نامناسب سیستم ایمنی در پیری دارد. تغییرات تدریجی و خود به خودی پیری (**Ageing**) با افزایش بی‌نظمی و آنتروپی و نهایتاً مرگ همراه است، اما علم بیوتکنولوژی از رشته‌های متعددی تشکیل‌شده است که توانسته علاوه بر مقابله با بیماری‌های گوناگون کاهنده طول عمر، باعث بهبود و به تأخیر انداختن فرآیند پیری در افراد شود (۵).

داشتن یک سیستم ایمنی توانمند و سالم، به‌ویژه در سالمندان می‌تواند آن‌ها را در برابر عفونت‌ها، کانسرها و بیماری‌های اتو ایمن و غیره حفظ کند و عوارض سالمندی را کاهش بدهد (٦).

ایمنی همراه با افزایش سن تغییر می‌کند که درنهایت به پیری ایمنی منجر می‌شود. این پدیده در لنفوسیت‌های **T** با تغییرات فنوتیپی و عملکردی همراه است. هم‌زمان با سالخوردگی بدن، سیستم ایمنی نیز دچار پیری می‌گردد. کاهش تدریجی پاسخ‌دهی به آنتی‌ژن‌ها و پیری لنفوسیت‌های **T** در پیری سیستم ایمنی مشاهده می‌شود. این پدیده به‌عنوان یک مشکل در بازسازی لنفوسیت‌ها و عملکرد آن‌ها در نظر گرفته می‌شود. ازاین‌رو تغییرات فنوتیپی لنفوسیت‌ها و تغییرات سایتوکاین‌ها با پیری ایمنی همراه می‌گردد و از اهمیت پیش‌آگهی برخوردار است (۷). در تحقیق حاضر عملکرد تلومرازی و تکثیری لنفوسیت های افراد ۸۰ تا ۱۰۰ ساله در مواجهه با دی آلفا توکوفرول مورد ارزیابی قرار گرفته است و پاسخ این جمعیت با افراد جوان مقایسه گردید.

مواد و روش ها

تهیه دی آلفاتوکوفرول و PPD

ماده دی آلفاتوکوفرول با خلوص بالای ۹۹ درصد از شرکت **Sigma** آمریکا تهیه گردید و همچنین یک ویال **PPD** با درجه تزریق به انسان از طرف دکتر مهدوی و همکاران به این پروژه اهدا گردید.

تهیه نمونه خون هپارینه از افراد جوان و مسن

از ده فرد مسن در رنج سنی ۸۰ تا ۱۰۰ سال و ده فرد جوان در رنج سنی ۲۰ تا ٤۰ سال با کسب رضایت نامه از همه طرفین با استفاده از سرنگ، خون هپارینه گرفته شد. نمونه‌ها جهت استخراج **PBMC** به زیر هود کشت سلول منتقل شد (۸).

معیار ورود و خروج افراد در این مطالعه: در این مطالعه رنج سنی افراد حائز اهمیت بود که فاقد بیماری های عفونی باشند و جنس افراد هم مد نظر قرار نگرفت.

جدول ۱. شاخص های آماری متغیرها

	درصد مذکر	درصد مؤنث	میانگین سنی	انحراف معیار
جمعیت افراد پیر	٪۷۰	٪۳۰	۸۶	۵/۱۱ + -
جمعیت افراد جوان	٪۳۰	٪۷۰	۲۷	۵/۹۸+ -

جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای از خون محیطی

برای جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی از فایکول استفاده شد. نمونه‌های خون با **ml** ۱۰ محلول سرم فیزیولوژی استریل رقیق شد. خون رقیق‌شده به‌آرامی بر روی فایکول که حجم آن برابر خون رقیق نشده است، اضافه شد. لوله حاوی خون و فایکول با سرعت **rpm** ۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی که در حدفاصل فایکول و سرم خون قرارگرفته است به‌آرامی به‌وسیله سمپلر جمع‌آوری شد. سپس به‌منظور حذف فایکول همراه و همچنین پلاکت آن با محیط کشت **RPMI-1640** مخلوط و سرعت **rpm** ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه مجدد سانترفیوژ شد. پس از اطمینان از حذف پلاکت ها، سلول‌های حاصل مجدداً با محیط کشت **RPMI-1640** مخلوط و دو بار به مدت ۱۰ دقیقه دیگر سانترفیوژ گردید. تعداد و میزان بقاء سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به‌دست‌آمده با استفاده از رنگ تریپان بلو تعیین شد.

بررسی پاسخ‌های تکثیری به روش BRDU

سلول‌های جداسازی شده به کمک فایکول به تعداد ۲×۱۰۵ در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. سپس سلول‌ها با دی آلفاتوکوفرول و **PPD** در غلظت بهینه شده در آزمایشات مقدماتی تیمار شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت از کشت سلول‌های **PBMC** در پلیت ۹۶ خانه، به هر چاهک از پلیت مقدار ۲۰ میکرولیتر از ماده **BRDU** اضافه شد. پلیت درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت پلیت سانتریفیوژ شده و محتویات داخل هر چاهک به‌آرامی به‌وسیله سمپلر تخلیه شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه پلیت بدون درب، در دستگاه فور در ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کف پلیت کاملاً خشک گردیده و سلول‌ها در کف پلیت فیکس گردید. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر نفوذپذیر کننده غشاء به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شد. پلیت‌ها تخلیه شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر ماده آنتی **BRDU** که در بافر مخصوص کیت رقیق‌شده بود، به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس پلیت تخلیه شد و ٦ بار با **PBS 1X** (به میزان ۳۰۰ میکرولیتر در هر چاهک) شستشو گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا (**TMB**) به هر چاهک اضافه گردید و در محیط تاریک قرار داده شد. پس از گذشت ۵ دقیقه واکنش با اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک ۲ مولار متوقف شد. بلافاصله میزان **OD** در طول موج **nm 450** قرائت شد.

کشت سلول‌ها و تیمار با دی آلفاتوکوفرول و PPD

ابتدا سلول‌های تک‌هسته‌ای مستخرج از خون محیطی را در پلیت ۲٤ خانه به تعداد ۱ میلیون سلول در هر چاهک کشت داده و با رقت **۲μg/ml** از دی آلفاتوکوفرول و **PPD** تیمار شده است. پس از گذشت ۱۲ و ۲٤ ساعت از هرکدام به‌صورت مجزا **RNA** استخراج و به **cDNA** تبدیل‌شده است.

استخراج RNA

با کمک میکروپیپت، محتویات ویال کاملاً مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردیده است.

به ازای هر ۱ میلی‌لیتر از محلول ترایزول ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط اضافه‌شده و مخلوط همگن گردید.

نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ انکوبه شده، نمونه‌ها در دور **rpm** ۱٤۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده است. پس از سانتریفیوژ فاز رویی جدا شده و هم‌حجم آن ایزوپروپانول سرد به آن اضافه گردید و بعد از مخلوط شدن، به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه شد. نمونه‌ها در دور **rpm** ۱٤۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. فاز رویی دور ریخته شده و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به آن اضافه شد و مخلوط جهت جدا شدن رسوب از ته ویال، به مدت چند ثانیه ورتکس شد. نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه در دور **rpm** ۱٤۰۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید.

محلول رویی دور ریخته شد و با وارونه کردن ویال اجازه داده شد تا رسوب در دمای اتاق به مدت چند دقیقه خشک شود. رسوب در آب تیمار شده با **DEPC** (۰/۱ درصد) حل گردید و ویال حاوی **RNA** در **C**˚۸۰- نگهداری شد.

ساخت DNA **مکمل** (cDNA)

در این تحقیق بر اساس پروتکل کیت **Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)** انجام شده است. ابتدا **µg**۲-۱ از نمونه **RNA** به همراه **µL**۱ بافر **10x**، **µL**۱ آنزیم **DNAse** و آب تا حجم **µL**۱۰ به یک میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتر استریل و عاری از **RNase** اضافه شد و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه فرایند ساخت انجام شد.

واکنش PCR Real time

جهت واکنش **PCR** در ابتدا غلظت های **cDNA** با استفاده از نانودراپ اندازه‌گیری و یکسان‌سازی شدند. در این تحقیق از **Master mix** و **cDNA** سنتز شده با پرایمرهای ژن‌های **β -actin** و **TERT** حاصل از **RNA** استخراج‌شده از سلول‌ها، در دو واکنش مجزا و به‌صورت **duplicate** استفاده شد. اجزا واکنش شامل بافر **5x**، **RNasin (٤۰Unit/µl)**، مخلوط **dNTP (10mM)**، **oligo dT**، **$MgCl_2$** و آنزیم **RT** به لوله واکنش اضافه شده و واکنش **PCR** با دستگاه **Rotor Gene** طبق پروتکل روتین انجام شد. مخلوط واکنش به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر، جهت غیرفعال سازی آنزیم **RT** قرار گرفت. آنالیز داده های **Real time PCR** بر اساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. بدین منظور اختلاف چرخه های آستانه به‌دست‌آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با دارو) و نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با دارو) محاسبه و با استفاده از فرمول **Δ Δ Ct**، نسبت ژن هدف به ژن مرجع (**β -actin**) از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه‌گردید.

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

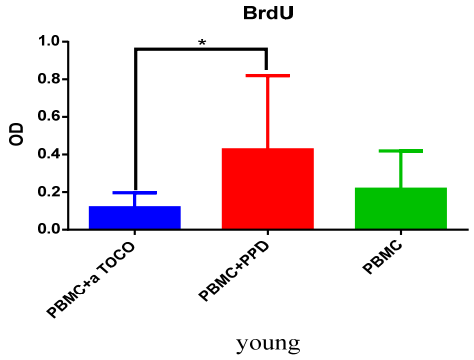
محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار graphpad prism 6 انجام گردید و نتایج با آنالیز واریانس یک‌طرفه (**One way ANOVA**) مورد بررسی قرار گرفت و تفاوت بیان ژن‌های هدف، بین نمونه‌های کنترل و تیمار شده با روش آماری **Tukey's HSD post-hoc test** محاسبه گردیده است.

اطلاعات به صورت **mean±standard deviation (SD)** نمایش داده‌شده است و P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

پاسخ تکثیر لنفوسیتی سلول‌های افراد جوان

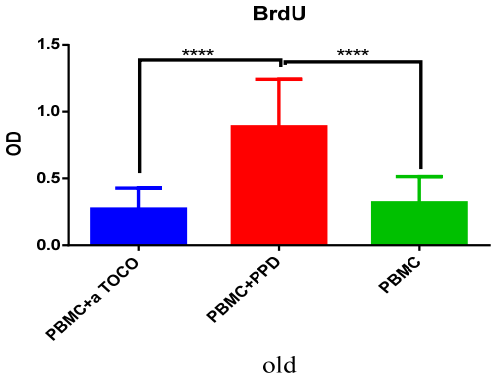
تکثیر لنفوسیتی در گروه لنفوسیت‌های افراد جوان تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول نسبت به تیمار با **PPD** کاهش معناداری نشان داد (**p=0.0342**). تکثیر لنفوسیتی در گروه لنفوسیت‌های افراد جوان تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول نسبت به سلول‌های بدون تیمار اختلاف معناداری نشان نداد (**p=0.6784**). تکثیر لنفوسیتی در گروه لنفوسیت‌های افراد جوان تیمار شده با **PPD** نسبت به سلول بدون تیمار اختلاف معناداری نشان نداد (**p=0.1865**).



نمودار ۱. آنالیز تست **BRDU** در افراد جوان. تکثیر لنفوسیتی در گروه لنفوسیت‌های افراد جوان تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول نسبت به تیمار با **PPD** کاهش معناداری نشان داد (**p=0.0342**)

پاسخ تکثیر لنفوسیتی سلول‌های افراد پیر

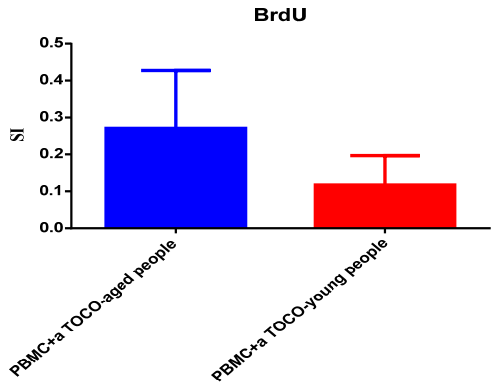
تکثیر لنفوسیتی در گروه لنفوسیت‌های افراد پیر تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول نسبت به تیمار با **PPD** کاهش معناداری نشان داد (**p<0.0001**). تکثیر لنفوسیتی لنفوسیت‌های افراد پیر تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول نسبت به سلول‌های بدون تیمار اختلاف معناداری نشان نداد (**p=0.9087**). تکثیر لنفوسیتی در گروه لنفوسیت‌های افراد پیر تیمار شده با **PPD** نسبت به سلول بدون تیمار افزایش معناداری نشان داد (**p<0.0001**).



نمودار ۲. آنالیز تست **BRDU** در افراد پیر. تکثیر لنفوسیتی در گروه لنفوسیت‌های افراد پیر تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول نسبت به تیمار با **PPD** کاهش معناداری نشان داد (**p<0.0001**)

نتایج مقایسه تکثیر لنفوسیتی بر حسب اندیکس تحریک بین افراد پیر و جوان در مواجهه با آلفاتوکوفرول

بدین منظور تکثیر نسبی لنفوسیتی افراد پیر و جوان با تقسیم میزان تکثیر لنفوسیت‌ها در مواجهه با آلفاتوکوفرول بر سلول‌های عدم تحریک نشان داده شد که میزان تکثیر لنفوسیتی در افراد پیر بیشتر از جوان است به‌عبارت‌دیگر دی آلفاتوکوفرول بر سلول‌های افراد پیر اثر تحریکی تکثیری بیشتری نسبت به افراد جوان داشته است (**P=0.0245**).

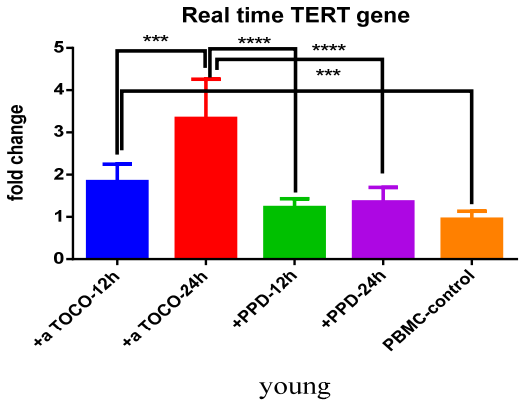


نمودار ۳. مقایسه تکثیر لنفوسیتی بین افراد پیر و جوان بر حسب اندیکس تحریک. تکثیر لنفوسیتی در سلول های افراد پیر تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول نسبت به سلول های افراد جوان افزایش معناداری نشان داده است (**P=0.0245**)

نتایج آنالیز بیان ژن TERT در افراد جوان

نتایج در افراد جوان نشان می‌دهد که بیان ژن سلول تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول در ساعت ۱۲ نسبت به بیان ژن سلول تیمار شده با **PPD** در ساعت ۱۲ افزایش معناداری نشان داد (**P = 0.0423**). در افراد جوان، بیان ژن سلول تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول در ساعت ۱۲ نسبت به بیان ژن سلول بدون تیمار افزایش معناداری نشان داد (**P <0.0010**). در افراد جوان، بیان ژن سلول تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول در ساعت ۲٤ نسبت به بیان ژن سلول تیمار شده با **PPD** در ساعت ۲٤ افزایش معناداری نشان داد (**P <0.0001**). در افراد جوان، بیان ژن سلول تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول در ساعت ۲٤ نسبت به بیان ژن سلول بدون تیمار افزایش معناداری نشان داد (**P <0.0001**).

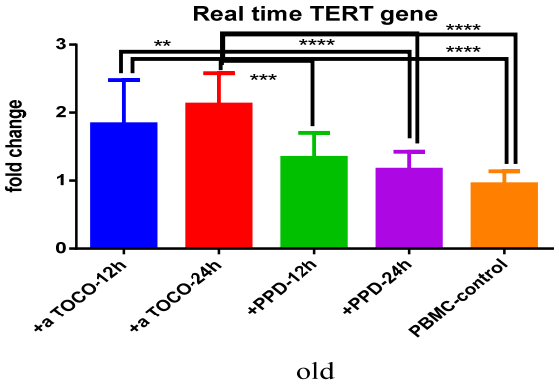
در افراد جوان، بیان ژن سلول تیمار شده با **PPD** در ساعت ۱۲ نسبت به بیان ژن سلول بدون تیمار اختلاف معناداری نشان نداد (**P <0.6839**). در افراد جوان، بیان ژن سلول تیمار شده با **PPD** در ساعت ۲٤ نسبت به بیان ژن سلول بدون تیمار اختلاف معناداری نشان نداد (**P = 0.3074**).



نمودار ٤. آنالیز بیان ژن **TERT** و **β-actin** در افراد جوان. بیان ژن **TERT** در سلول های افراد جوان تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول در ساعت ۱۲ و ۲٤ نسبت به سلول های تیمار شده با **PPD** در ساعتهای متناظر و همچنین نسبت به سلول های بدون تیمار افزایش معناداری نشان داد (**P < 0.0423**).

نتایج آنالیز بیان ژن TERT در افراد پیر

نتایج نشان می‌دهد که در افراد پیر، بیان ژن سلول های تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول در ساعت ۱۲ نسبت به بیان ژن سلول های تیمار شده با **PPD** در ساعت ۱۲ اختلاف معناداری نشان نداد (**P = 0.0588**).. در افراد پیر، بیان ژن سلول تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول در ساعت ۱۲ نسبت به بیان ژن سلول های بدون تیمار افزایش معناداری نشان داد (**P <0.0001**). در افراد پیر، بیان ژن سلول های تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول در ساعت ۲٤ نسبت به بیان ژن سلول های تیمار شده با **PPD** در ساعت ۲٤ افزایش معناداری نشان داد (**P <0.0001**). در افراد پیر، بیان ژن سلول های تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول در ساعت ۲٤ نسبت به بیان ژن سلول های بدون تیمار افزایش معناداری نشان داد (**P <0.0001**). در افراد پیر، بیان ژن سلول های تیمار شده با **PPD** در ساعت ۱۲ نسبت به بیان ژن سلول های بدون تیمار اختلاف معناداری نشان نداد (**P <0.2041**). در افراد پیر، بیان ژن سلول های تیمار شده با **PPD** در ساعت ۲٤ نسبت به بیان ژن سلول های بدون تیمار اختلاف معناداری نشان نداد (**P = 0.7503**).



نمودار ٥. آنالیز بیان ژن **TERT** و **β-actin** در افراد پیر. بیان ژن **TERT** در سلول های افراد پیر تیمار شده با دی آلفاتوکوفرول در ساعت ۲٤ نسبت به سلول های تیمار شده با **PPD** در ساعت ۲٤ و همچنین نسبت به سلول های بدون تیمار افزایش معناداری نشان داد (**P < 0.0001**).

بحث و نتیجه گیری

پیری یک فرآیند چندبعدی است که شامل بسیاری از مکانیسم‌های مولکولی و سلولی است. داشتن یک سیستم ایمنی توانمند و سالم، به‌ویژه در سالمندان می‌تواند آن‌ها را در برابر عفونت‌ها، سرطان‌ها و بیماری‌های اتو ایمن و غیره حفظ کند و عوارض سالمندی را کاهش بدهد (٦). هم‌زمان با سالخوردگی بدن، سیستم ایمنی نیز دچار پیری می‌گردد. ایمنی همراه با افزایش سن تغییر می‌کند که درنهایت به پیری ایمنی منجر می‌شود (٩). این پدیده در عملکرد **T cell** ها، **B cell** ها، ایمنی سلولی، تولید آنتی‌بادی، کمپلمان، سلول های دندریتیک و ماکروفاژها با کاهش قابل تأمل همراه است (١٠)؛ بنابراین به‌طور طبیعی این افراد در معرض عفونت هستند (٦). ویتامین **E**، یک ویتامین محلول در چربی است و افزایش مصرف ویتامین **E** سبب تقویت سیستم ایمنی از طریق افزایش بیگانه‌خواری ماکروفاژها و افزایش تولید آنتی‌بادی می‌شود. در حقیقت ویتامین **E** برای عملکرد طبیعی سیستم ایمنی بدن ضروری است (٧). اسیدهای چرب می‌توانند به‌عنوان مولکول تعدیل‌کننده سیستم ایمنی در ارتباطات بین سلولی، سیال بودن غشاء و شکل‌گیری مولکول پیامبر ثانویه دخالت نمایند و ویتامین **E** می‌تواند از این طریق تنظیم‌کننده سیستم ایمنی باشد (٤). در مطالعه حاضر اثر دی آلفاتوکوفرول بر رفتار سلول های سیستم ایمنی از نظر القا پاسخ تکثیری و بیان تلومراز ارزیابی شد و لنفوسیت‌های افراد پیر و افراد جوان با هم مقایسه شدند تا اثر سن بر رفتار ایمونولوژیک در مواجهه با دی آلفا توکوفرول مورد بررسی دقیق قرار گیرد.

بررسی نتایج پاسخ تکثیری لنفوسیت‌ها نشان می‌دهد که لنفوسیت‌های افراد جوان و همچنین لنفوسیت‌های افراد پیر در مواجهه با **PPD** به‌صورت معناداری پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌ها را نسبت به سلول‌های شاهد افزایش می‌دهند و این یک فرآیند طبیعی است به دلیل این‌که این افراد قبلاً واکسن مایکوباکتریوم را دریافت کردند و لنفوسیت‌های خاطره ای اختصاصی آنتی‌ژن مایکوباکتریوم را در خود دارند و درواقع این لنفوسیت‌ها پس از مواجهه با آنتی‌ژن‌های مذکور، تکثیر پیدا می‌کند. نتایج برخورد لنفوسیت افراد جوان و پیر با دی آلفاتوکوفرول نشان می‌دهد که ظاهراً دی آلفاتوکوفرول هیچ اثر تقویتی در پاسخ لنفوسیت‌ها ندارد، بلکه باعث سرکوب لنفوسیت‌ها می‌شود و این سرکوب برای سلول‌های جوان مشهودتر از سلول‌های پیر است. مطالعات متعددی درگذشته نشان داده که دی آلفاتوکوفرول منجر به مهار تکثیر سلول‌ها می‌شود. **S Devaraj** و همکارانش بعد از ٨ هفته استفاده از مکمل آلفاتوکوفرول، عملکرد مونوسیت‌ها را بررسی کردند. آن‌ها در این مطالعه کاهش معنادار تولید گونه‌های واکنش‌دهنده اکسیژن، تولید **IL-1** β و چسبندگی این سلول‌ها به دیواره اندوتلیال را گزارش کردند (١١). یافته‌های مطالعات گذشته، یافته‌های این پژوهش را تأیید می نماید اگرچه افزایش تکثیری لنفوسیت‌ها به‌عنوان یک شاخص تقویت سیستم ایمنی تلقی می‌شود اما در این مطالعه سلول‌ها در حضور آنتی‌ژن اختصاصی تحریک نشدند بلکه در حضور دی آلفاتوکوفرول توان القاء تکثیر مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به نظر می‌رسد دی آلفاتوکوفرول در سلول‌های افراد جوان اثر سرکوب گری بیشتری نسبت به سلول‌های افراد پیر دارد، یعنی سرکوب گری آن در سلول‌های افراد پیر ازنظر شاخص‌های تکثیری لنفوسیتی کمتر می‌باشد و مقایسه سلول افراد جوان و پیر ازنظر شاخص تکثیر لنفوسیتی در این مطالعه برای اولین بار صورت گرفت که به نظر می‌رسد که رفتار سلول افراد پیر نسبت به سلول افراد جوان در برخورد با دی آلفاتوکوفرول متفاوت است و اثر مهاری دی آلفاتوکوفرول در تکثیر لنفوسیت‌ها بر روی سلول‌های افراد جوان بیشتر از سلول‌های افراد پیر می‌باشد و به عبارت دیگر در سلول‌های افراد پیر اثر مهاری آن کمتر است. بر اساس مطالعات گذشته میزان بیان ژن **TERT** با عملکرد آنزیم تلومراز مرتبط است و این ثابت شده است درواقع به نظر

می‌رسد که بیان ژن **TERT** در افراد جوان بالاست و با افزایش سن کاهش پیدا می‌کند؛ بنابراین بیان ژن به‌عنوان شاخص عملکرد آنزیم تلومراز در نظر گرفته می‌شود به‌گونه‌ای که افزایش بیان آن نشان‌دهنده جوانی و کاهش بیان آن نشان‌دهنده پیری می‌باشد (۱۲). بررسی میزان بیان ژن **TERT** نشان می‌دهد که **PPD** هم در ساعت ۱۲ و هم در ساعت ۲٤ نسبت به ژن **β-actin** تفاوت معناداری نشان نداد یعنی تأثیری در جوان‌سازی سلول نداشت؛ اما استفاده از دی آلفاتوکوفرول هم در ساعت ۱۲ و هم در ساعت ۲٤ نسبت به **PPD** افزایش بیان **TERT** را نشان داد. هم در ساعت ۱۲ و هم در ساعت ۲٤ نسبت به ژن **β- actin** افزایش بیان ژن تلومراز به‌صورت معناداری مشاهده شد. همچنین در ساعت ۱۲ نسبت به ساعت ۲٤ یک افزایش مجدد مشاهده شد که این افزایش معنادار نیست. نتیجه کلی این است که استفاده از دی آلفاتوکوفرول در سلول خون محیطی افراد پیر منجر به افزایش بیان آنزیم تلومراز شده و این افزایش بیان در ساعت ۲٤ بیشتر بوده که نسبت به ژن**β-actin** اختلاف معناداری را نشان می‌دهد. دی آلفاتوکوفرول در شرایط **in vitro** با افزایش بیان تلومراز می‌تواند منجر به جوان شدن سلول‌ها گردد. این مطالعه با مطالعات افراد دیگری که نشان دادند ویتامین **E** می‌تواند باعث تقویت سلول‌های سیستم ایمنی شوند و عملکرد آن را بهبود ببخشد، هم‌خوانی دارد. **Yabuta** و همکاران، گزارش کردند که میزان بالای آلفاتوکوفرول توانسته است از کوتاه شدن تلومر محافظت کند (۱۳). در همین راستا، **Balcerczyk** و همکاران در مطالعه‌ای به افراد بین ۳۵-۵۵ سال، ترکیبی از تمام آنتی‌اکسیدانت ها شامل امگا-۳، کاروتنوئیدها، کوآنزیم **Q10**، سلنیوم، ویتامین **D** و آلفاتوکوفرول به مدت ۱۲ هفته تجویز کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که فعالیت تلومراز لنفوسیت‌ها افزایش‌یافته است بدون آنکه طول تلومر کوتاه شود. این تأثیر چشمگیر به‌واسطه مصرف آنتی‌اکسیدانت ها رخ داده است (١٤). هم‌چنین مطالعه بر روی سلول‌های افراد جوان نشان داده که **PPD** منجر به افزایش بیان ژن **TERT** به‌عنوان شاخص تلومراز اکتیویتی نشده و نسبت به سلول شاهد افزایش بیان نداشته است؛ اما دی آلفاتوکوفرول در ساعت ۱۲ منجر به افزایش بیان ژن شده و در ساعت ۲٤ افزایش بسیار شاخص بوده که این نشان می‌دهد که دی آلفاتوکوفرول در سلول‌های جوان اثر تقویتی بر روی آنزیم تلومراز و درواقع جوان نگه‌داشتن سلول دارد. شاید نتایج به این مفهوم دلالت دارد که دی آلفاتوکوفرول روند پیری در سلول جوان را به تأخیر می‌اندازد؛ اما میزان اثر جوان‌سازی بر روی لنفوسیت‌های پیر به‌اندازه سلول‌های جوان نبوده است. به‌عبارت‌دیگر، اثر دی آلفاتوکوفرول در جوانی نسبت به سلول پیر شده بیشتر است. در همین راستا، مطالعات متعددی بر روی میزان ویتامین **E** و تأثیر آن بر روی سیستم ایمنی در افراد پیر نشان داد که آلفاتوکوفرول به‌صورت اختصاصی پاسخ‌های ایمنی سلولی را افزایش می‌دهد که این امر با افزایش سن کاهش می‌یابد (١٥،١٦). به دلیل تأثیرات آنتی‌اکسیدانتی که ویتامین **E** دارد می‌تواند از روند پیری لنفوسیت‌ها از طریق ثابت نگه‌داشتن طول تلومر، حفظ تمامیت تلومر از آسیب‌های اکسیداتیو و افزایش فعالیت تلومراز ممانعت به عمل آورد. ضمن اینکه موجب افزایش پاسخ ایمنی هومورال و سلولار نیز می‌شود (۱۷). همچنین مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدانت ها سرعت کوتاه شدن طول تلومر را کاهش می‌دهند. به‌عنوان‌مثال کاروتنوئید ها، یا مکمل‌های حاوی امگا-۳ و امگا-٦ همگی منجر به افزایش طول تلومر به‌خصوص در لکوسیت ها می‌شوند (۱۸،۱۹). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که دی آلفاتوکوفرول با فرآیند افزایش عملکرد تلومراز به جوان‌سازی سلول‌ها کمک می‌کند؛ اما اثر دی آلفاتوکوفرول بر سلول‌های جوان بیشتر از سلول‌های پیر می‌باشد. به نظر می‌رسد که اگر دی آلفاتوکوفرول در دوران جوانی به سبد غذایی این افراد اضافه شود فرآیند پیری را دچار تغییر می‌کند چه‌بسا که در دوران پیری بر اساس نتایج به‌دست‌آمده امکان دارد که دی

آلفاتوکوفرول به جوان شدن سلول‌ها کمک کند اما اثر دی آلفاتوکوفرول در دوران پیری کمتر از دوران جوانی است یعنی بهتر است که در دوران جوانی از دی آلفاتوکوفرول استفاده گردد تا سلول ها دیرتر پیر شود ولی اگر سلول پیر شود و از دی آلفاتوکوفرول استفاده گردد بر اساس نتایج حاصل از فعالیت تلومراز به نظر می‌رسد که سلول را جوان می‌کند اما اثر آن کمتر می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران پزشکی تصویب گردید و دارای کد اخلاقی **IR.IAU.PS.REC.1398.102** می باشد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارضی بین افراد نویسنده وجود ندارد.

منابع

1. Flatt T. A new definition of aging? Frontiers in genetics. 2012;3:148.
2. Akbari BH, Ravasi AA, Akbari MR. The effect of a endurance training period with cellular anti-aging purpose on telomerase enzyme content in cardiac tissue and peripheral blood lymphocytes in rats. Journal of Medical Council of Islamic Republic of Iran 2014;31(4): 389-396
3. Bruno RS, Song Y, Leonard SW, Mustacich DJ, Taylor AW, Traber MG, et al. Dietary zinc restriction in rats alters antioxidant status and increases plasma F2 isoprostanes. The Journal of Nutritional Biochemistry 2007;18(8):509-18.
4. Vakili R, Daliri R. The effect of different levels of vitamin E on humoral immunity, and performance in broiler chicks. Journal of Veterinary Research 2010; 65(3):239-68.
5. Wherry EJ. T cell exhaustion. Nature Immunology 2011;12(6):492-9.
6. Moosavi N. The summery of studies achievements on aging cell-mdiated immunity system by cell proliferation tests. journal of rehabilitation 2002;3(1)8-9.
7. Pourgheysari B, Kmiari L. Evaluation of T cell phenotype and function in 10-30 years old individuals and the correlation of its alteration with age. Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences 2016;18(2):1-9.
8. Charpentier B, Fournier C, Fries D, Mathieu D, Noury J, Bach J. Immunological studies in human ageing. I. In vitro functions of T cells and polymorphs. Journal of Clinical & Laboratory Immunology 1981;5(2):87-93.
9. Kmiari L. Evaluation of T cell phenotype and function in 10-30 years old individuals and the correlation of its alteration with age. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences 2016;18(2):1-9.
10. Nikolich-Žugich J. T cell aging: naive but not young. The Journal of Experimental Medicine 2005;201(6):837-40.
11. Devaraj S, Li D, Jialal I. The effects of alpha tocopherol supplementation on monocyte function. Decreased lipid oxidation, interleukin 1 beta secretion, and monocyte adhesion to endothelium. The

Journal of Clinical Investigation 1996;98(3):756-63.

12. Rodríguez-Rodero S, Fernández-Morera JL, Menéndez-Torre E, Calvanese V, Fernández AF, Fraga MF. Aging genetics and aging. Aging and Disease 2011; 2(3):186–195.

13. Yabuta S, Masaki M, Shidoji Y. Associations of buccal cell telomere length with daily intake of β-carotene or α-tocopherol are dependent on carotenoid metabolism-related gene polymorphisms in healthy Japanese adults. The Journal of Nutrition, Health & Aging 2016;20(3):267-74.

14. Balcerczyk A, Gajewska A, Macierzyńska-Piotrowska E, Pawelczyk T, Bartosz G, Szemraj J. Enhanced antioxidant capacity and anti-ageing biomarkers after diet micronutrient supplementation. Molecules 2014;19(9):14794-808.

15. De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Manuel Victor V, Arnalich F. Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women. Free Radical Research 2008;42(3):272-80.

16. Wu D, Nikbin Meydani S. Age-associated changes in immune function: impact of vitamin E intervention and the underlying mechanisms. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets 2014; 14(4):283-9.

17. Kowdley K, Meydani S, Cornwall S, Grand R, Mason J. Reversal of depressed T-lymphocyte function with repletion of vitamin E deficiency. Gastroenterology 1992;102:1-4.

18. Kiecolt-Glaser JK, Epel ES, Belury MA, Andridge R, Lin J, Glaser R, et al. Omega-3 fatty acids, oxidative stress, and leukocyte telomere length: A randomized controlled trial. Brain Behavior and Immunity 2013;28:16-24.

19. Min K-B, Min J-Y. Association between leukocyte telomere length and serum carotenoid in US adults. European Journal of Nutrition 2017;56(3):1045-52.