

تأثیر احتمالی سمیت سلولی عنصر روی بر سلولهای رده لنفوییدی راجی (Raji) باتکنیک فلورسانس

صفر شمس^۱، حسن تکمه داشی^۱
۱- مربی عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان

یافته / دوره هشتم / شماره 2 / تابستان 85 / مسلسل 28

چکیده

دریافت مقاله: 84/12/19، پذیرش مقاله: 85/2/6

Ø مقدمه: عنصر روی (Zn) در حفظ سلامتی انسان و در ساختار و عملکرد سیستم ایمنی نقش بارزی دارد. این مطالعه به منظور بررسی تأثیر احتمالی سمیت سلولی عنصر روی بر سلولهای B (راجی) در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

Ø مواد و روش ها: این مطالعه تحلیلی-توصیفی و بنیادی با استفاده از تکنیک کشت سلولی رده لنفوییدی راجی در شرایط آزمایشگاهی در مجاورت غلظت های مختلف روی در زمانهای متفاوت (12 تا 72 ساعت) در دمای 37 درجه سانتیگراد و 5 درصد CO₂ انکوبه گردید. آنگاه میزان زنده ماندن و رشد سلول ها با رنگ آمیزی فلورسانس (10 میکرو لیتر از مخلوط اکریدین اورنج و اتید یوم برو ماید) بررسی شد.

Ø یافته ها: آنالیز داده ها نشان داد که بین میزان زنده ماندن و رشد سلول ها در گروههای آزمون و شاهد تا غلظت 100 میکرومولار در ساعات 12 تا 72 اختلاف معنی داری وجود ندارد؛ اما در 200 میکرومولار تا 500 میکرومولار بعد از 12، 24 و ... ساعت انکوباسیون، این پارامترها در گروه آزمون نسبت به گروه شاهد کاهش معنی دار یافت (p<0/05).

Ø نتیجه گیری: ترکیبات روی بر رده سلولی راجی دارای اثر سمیت سلولی وابسته به دوز بوده و احتمالاً بتوان از آن در آینده در تنظیم سیستم ایمنی استفاده نمود.

واژه های کلیدی: روی، درصد زنده ماندن سلولها، سلول راجی، سمیت سلولی

مقدمه

مواد و روش ها

مطالعات انجام شده توسط محققین مختلف نشان داده است که عنصر روی جهت حفظ سلامتی انسان مورد نیاز است (6-1). این عنصر در ساختار و عملکرد آنزیمها، متالوآنزیمها، هورمونها، به ویژه اسیدهای نوکلئیک مشارکت دارد (7). مسمومیت با آن باعث اختلال در عملکرد نوتروفیلها می شود (8). نقش روی بعلا تکتثیر سریع سلول هادر سیستم ایمنی از بقیه سیستم های مختلف بدن مهمتر است (9-11).

مطالعات مارتین¹ و همکاران در آزمایشگاه بر رشد و میزان سلولهای زنده راجی² ومولت⁴- نشان داد که هرگاه سلول های مذکور در محیط کشت فاقد روی کشت داده شوند، ظرفیت رشد و تکثیر خود را از دست می دهند. اما در حضور آن (تا 50 میکرومولار)، تعداد کل سلول ها و میزان زنده ماندن³ سلول های مذکور در هر دو گروه آزمون و شاهد یکی بودند (12). دریک مطالعه دیگر صرفاً بر روی رده سلولی مولت-4- میچیکو⁴ وهمکاران پی بردند که بعد از 48 ساعت انکوبه سلولهای مولت-4- در حضور غلظت های 100 میکرومولار و 200 میکرومولار از عنصر روی، تعداد سلول های زنده به ترتیب 85 درصد و 10 درصد است (13).

مطالعات محدودی در ارتباط با اثر غلظت های مختلف روی بر رده سلولی در محیط آزمایشگاهی انجام شده است و باتوجه به اینکه تا کنون در ایران مطالعه ای در رابطه با این موضوع انجام نگرفته است، بر آن شدیم با توجه به امکانات موجود، اثرات احتمالی سمیت سلولی روی را بر سلول های مذکور در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دهیم. سپس بین مشاهدات آزمایشگاهی به دست آمده در این مطالعه با آنچه که در داخل بدن توسط محققین مختلف گزارش شده است تطبیق بعمل خواهد آمد. در نهایت اینکه در صورت امکان با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه بتوان از ترکیبات حاوی روی در تنظیم سیستم - ایمنی استفاده نمود.

در این مطالعه که نوعی تحقیق تحلیلی-توصیفی و بنیادی است ابتدا محلول کلرید روی 1 مولار با استفاده از فیلتر 0/2 میکرون استریل شد و از آن غلظتهای 1 میکرومولار تا 500 میکرومولار تهیه گردید. سپس در شرایط استریل و در زیر هود بیولوژیک از سلولهای راجی (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، سوسپانسیونی که تعداد سلول های زنده آن بیش از 97 در صد بود تهیه گردید، بدین منظور در زیر هود و شرایط استریل، 30 میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی را بر داشته و با 30 میکرو لیتر از محلول 0/4 درصد تریپان بلو با هم مخلوط شد. سپس یک قطره از این مخلوط مابین لام و لامل ریخته و در زیر میکرو سکوپ نوری مطالعه گردید. سلول هایی که در زیر میکروسکوپ غشاء آنها سالم بود زنده، سلول های که رنگ آبی گرفته و غشاء آنها چروکیده بود مرده در نظر گرفته شدند. سپس با استفاده از فرمول زیر در صد زنده ماندن سلول ها محاسبه گردید.

$$100 \times \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{تعداد سلول های مرده}} = \text{درصد سلول های زنده}$$

در مرحله بعد حدود 75 میکرو لیتر از این سوسپانسیون که معادل 15000 سلول بود برداشته و به چاهک های پلیت 96 خانه ای انتقال داده شد. در مرحله بعد به تمام چاهک ها به استثناء چاهک های شاهد، 10 میکرو لیتر از غلظت های مختلف روی (1 میکرو مولار تا 500 میکرو مولار) اضافه گردید. حجم نهایی همه چاهک ها با استفاده از محیط کشت RPMI-1640 به 100 میکرو لیتر رسانده شد. سپس در زیر هود با حرکت ملایم و دورانی دست، چاهک های پلیت مخلوط گردیدند. تمامی چاهک ها از نظر اینکه به آنها سوسپانسیون سلولی اضافه شده باشد و مطمئن باشیم که سلول ها قبل از

1. Martin and et al

3. Viability

2. Raji=B-lymphoid cell line

4. Michiko and et al

اتیدیوم برو ماید را به نسبت مساوی در 1 میلی لیتر محلول (فسفات، بافر، سالین) حل نموده و سپس 10 میکرو لیتر از محلول فوق را با 250 میکرو لیتر از سو سپانسیون سلولی مخلوط نموده و از این مخلوط 10 میکرو لیتر روی یک لام تمیز ریخته و روی آن را با لامل می پوشانیم. سپس با عدسی 40X یا 60 X میکرو سکوپ فلورسانس حداقل 200 سلول را از نظر زنده بودن و یا غیر زنده بودن مورد مطالعه و شمارش قرار می دهیم. تعداد سلول های سبز رنگ (زنده) تقسیم بر مجموع کل سلول های سبز رنگ (زنده) و سلول های مرده (نارنجی رنگ) معادل درصد سلول های زنده است. در نهایت داده های این مطالعه با استفاده از بر نامه SPSS (آزمون آنالیز واریانس و دانت) آنالیز گردید.

یافته ها

چنانچه جدول شماره 1 نشان می دهد سلولهای راجی در غلظت های پایین روی یعنی تا 100 میکرو مولار در فواصل زمانی مختلف، از میزان زنده بودن بسیار بالایی برخوردار می باشند. بطوریکه درصد سلول های زنده در گروه آزمون در اثر غلظت های متفاوت روی با درصد زنده بودن سلول های شاهد در همان ساعت تفاوت معنی داری نداشت. آزمون آماری نشان داد که میزان درصد زنده بودن سلول های راجی در فواصل زمانی مختلف (12 تا 72 ساعت) و در اثر غلظت های پایین روی یعنی 1 میکرو مولار تا 100 میکرو مولار با میزان درصد زنده بودن سلول های شاهد همان ساعت و ساعتهای دیگر انکوباسیون تفاوت معنی داری ندارد.

اما درصد سلولهای زنده مذکور در غلظت های 200 میکرو مولار تا 500 میکرو مولار با درصد زنده سلول های شاهد همان ساعت تفاوت معنی داری دارد ($p < 0/05$) بطوریکه در غلظت 500 میکرو مولار پس از 72 ساعت انکوباسیون، درصد سلول های زنده به 5 درصد رسید.

انکوباسیون زنده و سرحال هستند، با میکروسکوپ معکوس¹ کنترل گردیدند. بعد از تمامی مراحل فوق، بلافاصله پلیت های کشت سلولی در انکوباتور حاوی 5 درصد گاز CO₂ با دمای 37 درجه انکوبه گردیدند. در انتهای زمان معین از انکوباسیون سلول ها (فواصل زمانی 12 تا 72 ساعته) از هر غلظت مورد مطالعه، سه تا چاهک برای بررسی تعداد سلول ها و زنده بودن آنها با استفاده از تکنیک رنگ آمیزی فلورسنت مورد قرار گرفت. در ضمن با شمارش تعداد سلول های زنده (در انتهای انکوباسیون) در گروههای آزمون و مقایسه با تعداد سلول های زنده گروههای شاهد همان ساعات مورد مطالعه، تکثیر یا رشد سلول ها نیز بررسی گردیدند.

جهت کاهش خطا، از غلظت های مختلف روی به دفعات زیاد کشت سلولی انجام گردید.

تکنیک فلورسانس (رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج):

شاید بتوان گفت که رنگ آمیزی فلور سانس و شمارش سلول ها در زیر میکروسکوپ اگر با دقت انجام شود ساده ترین و سریعترین وسیله برای تشخیص سلول های زنده و غیر زنده می باشد. در این روش از رنگهای فلور سانس آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید استفاده شد. آکریدین اورنج یک رنگ حیاتی است و توسط سلول های زنده جذب می شود. آکریدین اورنج وارد DNA سلول زنده می شود و در زیر میکرو سکوپ یک نمای سبز رنگ به کروماتین سلول زنده می دهد.

اما اتیدیوم بروماید فقط سلول های مرده را رنگ می کند. اتیدیوم بروماید وارد DNA سلول مرده شده و در زیر میکرو سکوپ فلورسانس، رنگ نارنجی به کروماتین سلول مرده می دهد (9).

در نهایت با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید - آکریدین اورنج سلول های زنده سبز رنگ و غیر زنده نارنجی تا قهوه ای رنگ دیده می شود.

روش کار: برای این منظور 100 میکرو گرم در میلی لیتر آکریدین اورنج را به همراه 100 میکرو گرم در میلی لیتر

1. Invert

جدول شماره 1- نتایج اثر غلظت‌های مختلف روی بر زنده بودن سلول های راجی پس از 12 تا 72 ساعت انکوباسیون (با رنگ آمیزی فلورسانس)

غلظت عنصر روی درصد زنده ماندن (میکرومولار)	ارزش p *	درصد زنده ماندن سلولها پس از 24 ساعت	ارزش p	درصد زنده ماندن سلولها پس از 48 ساعت	ارزش p	درصد زنده ماندن سلولها پس از 72 ساعت	ارزش p
1	0/883	95%	0/883	94/1%	0/850	92/9%	0/788
10	0/850	95%	0/883	94%	0/841	92/9%	0/788
50	0/841	94%	0/850	93/7%	0/850	92/9%	0/750
100	0/742	93%	0/742	93/5%	0/810	92/9%	0/7200
200	<0/05	82%	<0/05	27%	<0/001	15%	0/001
300	<0/05	75%	<0/05	20%	<0/001	10%	<0/001
400	<0/05	69%	<0/05	15%	<0/001	12%	<0/001
500	<0/05	68%	<0/05	10%	<0/001	5%	<0/001
شاهد	-	97%	-	95%	-	94%	-

* p<0/05 از لحاظ آماری معنی دار است

بحث

یافته های ما در مقایسه با نتایج مارتین و همکارانش تفاوت معنی داری را نشان نداد، بطوریکه در هر دو مطالعه در شرایط آزمایشگاهی و در حضور 50 میکرو مولار روی پس از 48 ساعت انکوبه میزان زنده ماندن سلول ها بالای 94 درصد بود (12). در مطالعه دیگر که توسط میچیکو و همکارانش با تکنیک فلوسایتومتری بعمل آمده نشان داد که روی تا 100 میکرومولار تأثیر سمیت سلولی بر مولت-4 ندارد؛ اما پس از 12 ساعت در حضور غلظت های بالاتر تأثیر سمی روی معلوم شد (13).

یافته های مطالعه ما با استفاده از رنگ آمیزی فلورسانس با نتایج میچیکو و همکارانش تفاوت معنی داری نداشت. محقق مذکور اشاره می کند که روی باعث القاء آپوپتوزیس و نکروزیس در مولت-4 می شود. اما ما در این مطالعه باتکنیک فلورسانس نتوانستیم دقیقاً نوع مرگ سلولی را ارزیابی نماییم، لذا پیشنهاد می شود در مطالعه ای دیگری با استفاده از تست های مولکولی به آن پرداخته شود.

مطالعات اندکی بر سلولهای راجی بعمل آمده است. یافته های تروز¹ و همکارانش از مطالعه تأثیر روی بر لنفوسیت های طبیعی انسانی در آزمایشگاه نشان داد که روی یک تنظیم کننده آپوپتوزیس است (14). همچنین مطالعات ایگوچی² و همکارانش نشان داد که روی در غلظت 100 میکرو مولار تا 300 میکرو مولار بطور نسبی باعث القاء نکروزیس در سلول های کارسینومای پروستات انسانی می شود (15).

نتیجه گیری

تطبيق یافته های به دست در این مطالعه با یافته های سایر محققین (در آزمایشگاه و در داخل بدن انسان) نشان می دهد که روی در غلظتی معادل 10 برابر سطح فیزیولوژیک پلاسمايي بر سلول های مختلف بویژه در این مطالعه بر راجی تأثیر سمیت سلولی دارد. ترکیبات روی بر رده سلولی راجی دارای اثر سمیت سلولی وابسته به دوز بوده و احتمالاً بتوان از آن در آینده در تنظیم سیستم ایمنی استفاده نمود.

References

1. Berger A. What does zinc do? *BMJ*. 2002 Nov 9; 325: 1059
2. Calder PC, Kew S. The immune system: a target for functional foods? *Br J Nutr*, 2002 Nov; 88 suppl 2: 165-177
3. Fuchs GJ, Osendarp SJ, Huda SN, Grantham-McGregor SM. Zinc supplementation during pregnancy and effects on mental development and behavior of infants a follow-up study. *Lancet*. 2002 Jul 27; 360: 290-4
4. Hause H, Hebel S, Engelhardi G, Rink L. Flow cytometric measurement of labile zinc in peripheral blood mononuclear cells. *Anal Biochem*. 2006 Feb 28: 145-160
5. Santon A, Formigari A, Albergoni V, Irato P. Effect of Zn treatment on wild type and MT-null cell lines in relation to apoptotic and/or necrotic processes and on MT isoform gene expression. *Biochim Biophys Acta* 2006 Feb 20: 211-221
6. Maret W, Jacob C, Vallee B, Fisher E. Inhibitory sites in enzymes: Zinc removal and reactivation by thionein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1999; 96: 1936-1940
7. Vallee B, Galdes A: The Metallobiochemistry of Zinc enzymes: *Adv Enzymol*. 1984; 56: 282-430
8. Spencer H, Osis D, Karmer L. Intake excretion and retention of Zinc in man . In: *Trace elements in human health and disease*. New York: Academic press, 1976; 23: 346-361
9. Lathar R, Philip G. Zinc and Immune System *Proceedings of the Nutrition Society*, 2000; 59: 541-552
10. Wellinghausen N, Fisher A, Kirchner H. Interaction of Zinc ion with human peripheral blood mononuclear cells. *Cellular Immunology*. 1996; 171: 255-261
11. Driessen C, Hirv K, Rink L, Kirchner H. Induction of cytokines by Zinc ions in human peripheral blood mononuclear cells separated monocytes. *Lymphokine and Cytokine Research*, 1994; 13: 15-20
12. Martin SJ, Mazdai G, Strain J, Cotter T. Programmed cell death in Lymphoid and Myeloid Cell Lines during Zinc deficiency. *Clin Exp Immunol*. 1991; 83: 338-343
13. Michiko H, Kazuhiro I, Kazuhiro H, Ryoji I. Zinc Induces Mixed Types of cell Death, Necrosis and Apoptosis in Molt-4 Cells. *J Biochem* 2000; 128: 933-939
14. Treves S, Trentini P, Acaneli M, Bucci G, Divingilo F. Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes. *Wxp Cell Res*, 1994; 211: 339-343
15. Iguchi K, Hamatake M, Ishida R, Usami Y, Adachi T, Yamamoto H. Induction of necrosis by Zinc in prostate carcinoma cells identification of proteins increased in association with this induction. *Eur j Biochem*, 1998; 253: 766-770