تأثیر احتمالی سمیت سلولی عنصرروی بر سلولهای رده لنفوئیدی راجی (*Raji*) باتکنیک فلورسانس

صفر شمس[1]، حسن تکمه داشی[1]

1- مربی عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان

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

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 4:51 +0330 on Friday December 6th 2019

چکیده

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

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

Ø مواد و روش ها: این مطالعه تحلیلی-توصیفی وبنیادی با استفاده از تکنیک کشت سلولی رده لنفوئیدی راجی در شرایط آزمایشگاهی در مجاورت غلظت های مختلف روی در زمانهای متفاوت (12تا72 ساعت) در دمای 37درجه سانتیگراد و5 درصد CO_2 انکوبه گردید. آنگاه میزان زنده ماندن ورشد 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 100میکرومولار در ساعات 12 تا 72 اختلاف معنی داری وجود ندارد؛ اما در 200میکرومولار تا 500 میکرومولار بعد از 12، 24 و .... ساعت انکوباسیون ,این پارامترها درگروه آزمون نسبت به گروه شاهدکاهش معنی دار یافت ($p<0/05$).

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

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

آدرس مکاتبه: بلوار شهید فهمیده، روبروی پارک مردم، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی

پست الکترونیک: Safarshams@yahoo.com

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 4:51 +0330 on Friday December 6th 2019

مقدمه

مطالعات انجام شده توسط محققین مختلف نشان داده است که عنصر روی جهت حفظ سلامتی انسان مورد نیاز است (1-6). این عنصر در ساختار وعملکرد آنزیمها، متالوآنزیم ها، هورمونها، به ویژه اسید های نوکلئیک مشارکت دارد (7). مسمومیت باآن باعث اختلال درعملکرد نوتروفیلها می شود (8). نقش روی بعلت تکثیر سریع سلول هادر سیستم ایمنی از بقیه سیستم های مختلف بدن مهمتر است (9-11).

مطالعات مارتین[1] و همکاران در آزمایشگاه بر رشد و میزان سلولهای زنده راجی[2] ومولت -4 نشان داد که هرگاه سلول های مذکور در محیط کشت فاقد روی کشت داده شوند، ظرفیت رشد و تکثیر خودرا از دست می دهند. اما درحضورآن (تا 50 میکرومولار)، تعداد کل سلول ها و میزان زنده ماندن[3] سلول های مذکور در هر دو گروه آزمون و شاهد یکی بودند (12). دریک مطالعه دیگر صرفاً برروی رده سلولی مولت-4 میچیکو[4] وهمکاران پی بردند که بعداز 48 ساعت انکوبه سلولهای مولت-4 در حضور غلظت‌های 100میکرومولار 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 وباتوجه 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 درداخل 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 ـ ایمنی استفاده نمود.

مواد و روش ها

در این مطالعه که نوعی تحقیق تحلیلی-توصیفی وبنیادی 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 ودر 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 درزیر هود و شرایط استریل، 30 میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی را بر داشته و با 30 میکرولیتر 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 غشاءآنها 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.

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

در مرحله بعد حدود 75 میکرو لیتر از این سوسپانسیون که معادل 15000 سلول بود برداشته و به چاهک های پلیت 96 خانه‌ای 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 ازمحیط 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
2. Raji=B-lymphoid cell line
3. Viability
4. Michiko and et al

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 4:51 +0330 on Friday December 6th 2019

انکوباسیون زنده و سرحال هستند، با میکروسکوپ معکوس[1] کنترل گردیدند. بعد از تمامی مراحل فوق، بلافاصله پلیت های کشت سلولی در انکوباتور حاوی 5درصد گاز CO_2 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 یارشد سلول ها نیز بررسی گردیدند.

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

تکنیک فلورسانس (رنگ‌آمیزی 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 اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید استفاده شد. اکریدین اورنج یک رنگ حیاتی است و توسط سلول های زنده جذب می شود. اکریدین 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 ها ی زنده سبز رنگ وغیر زنده نارنجی تا قهوه‌ای رنگ دیده می شود.

روش کار: برای این منظور 100 میکرو گرم در میلی لیتر اکریدین اورنج را به همراه 100 میکرو گرم در میلی لیتر اتیدیوم برو ماید را به نسبت مساوی در 1 میلی لیتر محلول (فسفات، بافر، سالین) حل نموده و سپس10 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 غلظت‌های پایین روی یعنی تا 100 میکرو مولارو در فواصل زمانی مختلف، از میزان زنده بودن بسیار بالائی برخوردار می‌باشند. بطوریکه درصد سلول های زنده در گروه آزمون در اثر غلظت‌های متفاوت روی با درصد زنده بودن سلول‌های شاهد در همان ساعت تفاوت معنی داری نداشت. آزمون آماری نشان داد که میزان درصد زنده بودن سلول‌های راجی درفواصل زمانی مختلف (12 تا 72 ساعت) و در اثر غلظت‌های پایین روی یعنی 1میکرو مولار تا 100 میکرو مولار با میزان درصد زنده بودن سلول‌های شاهد همان ساعت و ساعتهای دیگر انکوباسیون تفاوت معنی داری ندارد.

اما درصد سلولهای زنده مذکور در غلظت‌های 200 میکرو مولار تا 500 میکرو مولار با درصد زنده سلول‌های شاهد همان ساعت تفاوت معنی داری دارد ($p<0/05$) بطوریکه درغلظت 500 میکرو مولار پس از72 ساعت انکوباسیون، درصد سلول های زنده به 5 درصد رسید.

1. Invert

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 4:51 +0330 on Friday December 6th 2019

جدول شماره 1- نتایج اثر غلظت‌های مختلف روی بر زنده بودن سلول های راجی پس از 12تا72 ساعت انکوباسیون (با رنگ آمیزی فلورسانس)

غلظت عنصر روی (میکرومولار)	درصد زنده ماندن سلولها پس از 12 ساعت	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	%95	0/883	%95	0/883	%94/1	0/850	%92/9	0/788
10	%94	0/850	%95	0/883	%94	0/841	%92/9	0/788
50	%94	0/841	%94	0/850	%93/7	0/850	%92/9	0/750
100	%93	0/742	%93	0/742	%93/5	0/810	%92/9	0/7200
200	%82	<0/05	%78	<0/05	%27	<0/001	%15	0/001
300	%75	<0/05	%53	<0/05	%20	<0/001	%10	<0/001
400	%69	<0/05	%20	<0/05	%15	<0/001	%12	<0/001
500	%68	<0/05	%18	<0/05	%10	<0/001	%5	<0/001
شاهد	%97	-	%96	-	%95	-	%94	-

* p<0/05 از لحاظ آماری معنی دار است

بحث

یافته های ما در مقایسه با نتایج مارتین وهمکارانش تفاوت معنی داری را نشان نداد، بطوریکه در هر دومطالعه در شرایط آزمایشگاهی ودر 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 وهمکارانش 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 تروز[1] 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 ایگوچی[2] 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

تطبیق 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 پلاسمایی 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 واحتمالاً بتوان از آن در آینده در تنظیم سیستم ایمنی استفاده نمود.

1. Treves 2. Iguchi

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 4:51 +0330 on Friday December 6th 2019

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-MeGregor 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 Biochen. 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 remoral and reactivation by thionein. Procedings of the National Academy of Sciences USA 1999; 96: 1936-1940
7. Vallee B, Galdes A: The Metallobiochmistry 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. Indoction 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 in dependent 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