

تأثیر احتمالی سمیت سلولی عنصر روی بر سلول‌های رده لنفوئیدی مولت - ۴ (Molt-4)

حسن تکمه داشی^۱، فرزانه اوسطی آشتیانی^۲، علی اکبر پورفتح‌الله^۳

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: عنصر روی در ساختار و عملکرد بسیاری از آنزیم‌ها شرکت نموده و در سیستم ایمنی نقش بارزی دارد. این مطالعه به منظور بررسی تأثیر احتمالی سمیت سلولی عنصر روی بر سلول‌های T- (مولت - ۴) در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است.

مواد و روش: با استفاده از روش کشت سلولی سلول رده لنفوئیدی مولت - ۴ در شرایط آزمایشگاهی در مجاورت غلظت‌های مختلف روی در زمان‌های متفاوت (۱۲ تا ۷۲ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه گردید. آنگاه میزان زنده ماندن و رشد سلول‌ها با رنگ‌آمیزی فلورسانس (رنگ‌آمیزی اتیدایوم بروماید-آکریدین اورنج) بررسی شد. نتایج به دست آمده با برنامه نرم‌افزار Spss (آزمون آنالیز واریانس و دانت) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که بین میزان زنده ماندن و رشد سلول‌ها در گروه‌های آزمون و شاهد تا غلظت ۱۰۰ میکرومولار در ساعات ۱۲ تا ۷۲ اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. اما در غلظت‌های ۲۰۰ میکرومولار تا ۵۰۰ میکرومولار بعد از ۱۲ و ۲۴ و... ساعت انکوباسیون، میزان زنده ماندن سلول‌ها و رشد آنها در گروه آزمون نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار یافت. ($p < 0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری: ترکیبات روی بر رده سلولی مولت - ۴ دارای اثر سمیت سلولی وابسته به دوز بوده و احتمالاً بتوان از آن در آینده در تنظیم سیستم ایمنی استفاده نمود.

کل واژگان: روی، سلول مولت - ۴، سمیت سلولی، کشت سلولی

مجله پزشکی ارومیه، سال چهاردهم، شماره سوم، ص ۱۷۹-۱۷۴، پائیز ۱۳۸۲

آدرس مکاتبه: همدان - دانشگاه علوم پزشکی همدان - حسن تکمه داشی

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

۲- استادیار گروه ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۳- دانشیار گروه ایمنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

حسن تکمه داهی ، فرزانه اوسطی آشتیانی ، علی اکبر پورفتح الله

مقدمه

مطالعات انجام شده در داخل بدن^۱ توسط محققان مختلف نشان می دهد که روی در فعالیت بیش از ۳۰۰ نوع آنزیم و در متابولیسم اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدرات ها، چربی ها، پروتئین ها و غیره دخالت دارد (۳، ۱). نقش روی به علت تولید و تخریب سریع سلول ها در سیستم ایمنی از بقیه سیستم های مختلف بدن بارزتر است (۶، ۴).

مطالعات مارتین^۲ و همکاران در آزمایشگاه بر رشد و میزان سلول های زنده راجی و مولت^۳ -۴ نشان داد که هر گاه 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 ۵۰ میکرومولار)، تعداد کل سلول ها و میزان زنده ماندن آنها در هر دو گروه آزمون و شاهد یکی بودند (۷). در یک مطالعه دیگر صرفاً بر روی رده سلولی مولت^۳ -۴ میچیکو^۴ و همکاران پی بردند که بعد از ۴۸ ساعت انکوبه سلول های مولت^۳ -۴ در حضور غلظت های ۱۰۰ میکرومولار و ۲۰۰ میکرومولار از عنصر روی، تعداد سلول های زنده به ترتیب ۸۵ درصد و ۱۰ درصد است (۸).

مطالعات محدودی در ارتباط با اثر غلظت های مختلف روی بر رده سلولی در محیط آزمایشگاهی انجام شده است ، با توجه به این که تاکنون در ایران مطالعه ای در رابطه با این موضوع انجام نگرفته است، گروه تحقیق بر آن شد تا با توجه به امکانات موجود، اثرات احتمالی سمیت سلولی روی را بر سلول های مذکور در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دهد. سپس بین مشاهدات آزمایشگاهی به دست آمده در این مطالعه با آنچه که در داخل بدن توسط محققان مختلف گزارش شده است تطبیق به عمل 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.

مواد و روش

این مطالعه نوعی تحقیق تحلیلی - توصیفی و بنیادی است. ابتدا محلول کلرید روی ۱ مولار با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شد و از آن غلظت های ۱ میکرومولار تا ۵۰۰ میکرومولار تهیه گردید. سپس در شرایط استریل و در زیر هود بیولوژیک از سلول های مولت^۳ -۴ (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، سوسپانسیون که تعداد سلول های زنده آن بیش از ۹۷ درصد بود تهیه گردید. بدین منظور در زیر هود و شرایط استریل ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را برداشته با ۳۰ میکرولیتر از محلول ۰/۴ درصد تریپان بلو با هم مخلوط نمودیم. سپس یک قطره از این مخلوط مابین لام و لامل ریخته و در زیر میکروسکوپ نوری مطالعه گردیدند. سلول های که در زیر میکروسکوپ غشاء آنها سالم بود زنده و سلول های که رنگ آبی گرفته و غشاء آنها چروکیده بود مرده در نظر گرفته شدند. سپس با استفاده از فرمول زیر درصد زنده ماندن سلول ها محاسبه گردید.

درصد سلول های زنده = $100 \times$ تعداد کل سلول های زنده و مرده /
تعداد سلول های زنده

در مرحله بعد حدود ۷۵ میکرولیتر از این سوسپانسیون که معادل ۱۵۰۰۰ سلول بود برداشته و به چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای انتقال داده شد. در مرحله بعد به تمام چاهک ها به استثنای چاهک های شاهد، ۱۰ میکرولیتر هم از غلظت های مختلف روی (۱۰ میکرولیتر تا ۵۰۰ میکرو لیتر) اضافه گردید. حجم نهایی همه چاهک ها با استفاده از محیط کشت

1. In Vivo
2. Martin
3. Raji and Molt-4 = T Lymphoid Cell Lin in Vivo
4. Michiko

تأثیر احتمالی سمیت سلولی عنصر روی بر سلول‌های رده لنفوئیدی مولت - ۴ (Molt-4)

اتیديوم برومايد وارد DNA سلول مرده شده و در زیر میکروسکوپ فلورسانس رنگ نارنجی به کروماتین سلول مرده می‌دهد (۹).

در نهایت با استفاده از محلول اتیديوم برومايد - آکریدین اورنج سلول‌های زنده سبزرنگ و غیر زنده نارنجی تا قهوای رنگ دیده می‌شود.

برای این منظور ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آکریدین اورنج را به همراه ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اتیديوم برومايد را به نسبت مساوی در ۱ میلی لیتر محلول (فسفات - بافر - سالین) حل نموده و سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول فوق را با ۲۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی مخلوط نموده و از این مخلوط ۱۰ میکرولیتر روی یک لام تمیز ریخته و روی آن را با لامل می‌پوشانیم سپس با عدسی ۴۰X یا ۶۰X میکروسکوپ فلورسانس حداقل ۲۰۰ سلول را از نظر زنده بودن و یا غیر زنده بودن مورد مطالعه و شمارش قرار می‌دهیم. تعداد سلول‌های سبز رنگ (زنده) تقسیم بر مجموع کل سلول‌های سبز رنگ (زنده) و سلول‌های مرده (نارنجی رنگ) معادل درصد سلول‌های زنده است. در نهایت نتایج این مطالعه با استفاده از برنامه SPSS آنالیز گردید.

نتایج

یافته‌های شمارش کلی سلولی و بررسی میزان سلول‌های زنده^۱ و یا سمیت سلولی بعمل آمد که نتایج آنها در نمودار - ۱ آمده است. با توجه به نمودار - ۱ سلول‌های مولت - ۴ در غلظت‌های پایین روی یعنی تا ۱۰۰ میکرومول و در فواصل زمانی مختلف، از میزان زنده بودن بسیار بالایی برخوردار می‌باشند. به طوری که درصد سلول‌های زنده در گروه آزمون در اثر غلظت‌های متفاوت

RPMI-1640 به ۱۰۰ میکرو لیتر رسانده شد. سپس در زیر هود با حرکت ملایم و دورانی دست چاهک‌های پلیت مخلوط گردیدند، تمامی چاهک‌ها از نظر اینکه به آنها سوسپانسیون سلولی اضافه شده باشد و مطمئن باشیم که سلول‌ها قبل از انکوباسیون زنده و سر حال هستند، با میکروسکوپ معکوس^۱ کنترل گردیدند. بعد از تمامی مراحل فوق بلافاصله پلیت‌های کشت سلولی در انکوباتور حاوی ۵ درصد گاز دی اکسید کربن با دمای ۳۷ درجه انکوبه گردیدند. در انتهای زمان معین از انکوباسیون سلول‌ها (فواصل زمانی ۱۲ تا ۷۲ ساعته) از هر غلظت مورد مطالعه ۳ تا چاهک برای بررسی تعداد سلول‌ها و زنده بودن آنها با استفاده از روش رنگ‌آمیزی فلورسنت استفاده شد. در ضمن با شمارش تعداد سلول‌های زنده در انتهای انکوباسیون در گروه‌های آزمون و مقایسه با تعداد سلول‌های زنده گروه‌های شاهد همان ساعات مورد مطالعه، تکثیر یا رشد سلول‌ها نیز بررسی گردیدند. جهت کاهش خطا، از غلظت‌های مختلف روی به دفعات زیاد کشت سلولی انجام گردید.

روش فلورسانس (رنگ‌آمیزی اتیديوم برومايد و آکریدین اورنج): برگرفته از مجله

Current Protocol of Immunology 1998

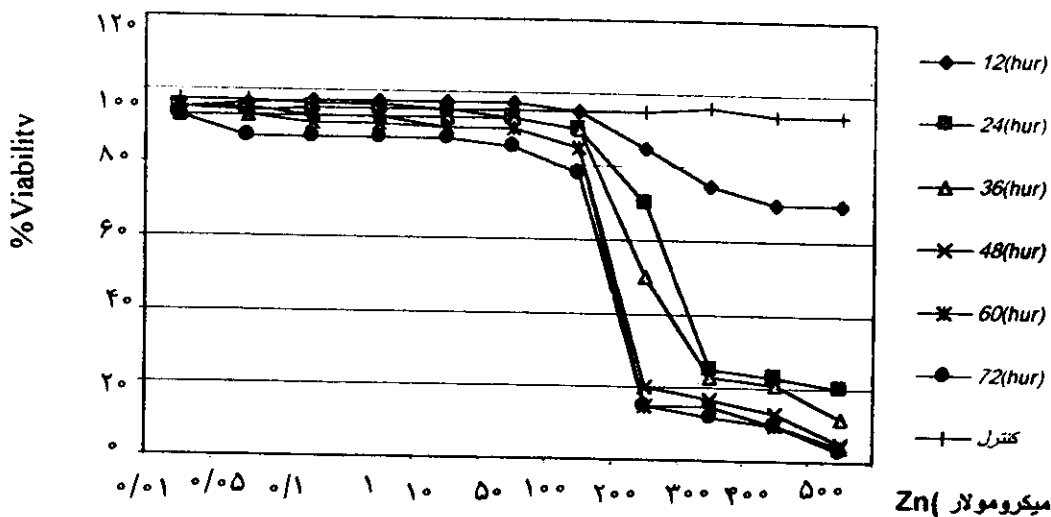
اساس کار: شاید بتوان گفت که رنگ‌آمیزی فلورسانس و شمارش سلول‌ها در زیر میکروسکوپ اگر با دقت انجام شود ساده‌ترین و سریعترین وسیله برای تشخیص سلول‌های زنده و غیر زنده می‌باشد.

در این روش از رنگ‌های فلورسانس آکریدین اورنج و اتیديوم برومايد استفاده شد. آکریدین اورنج یک رنگ حیاتی است و توسط سلول‌های زنده جذب می‌شود. آکریدین اورنج وارد DNA سلول زنده می‌شود و در زیر میکروسکوپ یک نمای سبز رنگ به کروماتین سلول زنده می‌دهد.

اما اتیديوم برومايد فقط سلول‌های مرده را رنگ می‌کند.

1- Invert

2- Viability



نمودار ۱ - نتایج تاثیر غلظت های مختلف Zn بر میزان زنده ماندن سلول Molt-4 در فواصل زمانی مختلف با استفاده از آزمایش فلورسانس .

تفاوت معنی داری دارد. به طوری که در غلظت ۵۰۰ میکرولیتر پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، درصد سلول های زنده به ۵ درصد رسید ($p < 0.05$).

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 ۵۰ میکرولیتر روی پس از ۴۸ ساعت انکوبه میزان زنده ماندن سلول ها بالای ۹۴ درصد بود (۷). در

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 مولت ۴- در فواصل زمانی مختلف (۱۲ تا ۷۲ ساعت) و در اثر غلظت های پایین روی یعنی ۰/۰۱ میکرولیتر تا ۱۰۰ میکرولیتر با میزان درصد زنده بودن سلول های شاهد همان ساعت و ساعت های دیگر انکوباسیون تفاوت معنی داری ندارد.

اما درصد سلول های زنده مذکور در غلظت های ۲۰۰ میکرولیتر تا ۵۰۰ میکرولیتر با درصد زنده سلول های شاهد همان ساعت

References

1. Maret W, Jacob C, Vallee B, Fisher E: Inhibitory sites in enzymes: Zinc removal and reactivation by thionein. *Nat Acad Sci* 1999, 96: 1936-1940.
2. Vallee B, Galdes A: The Metallobiochemistry of Zinc enzymes. *Adv Enzymol*, 1984, 56: 282- 430.
3. Spencer H, Osis D, Karmner 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.
4. Lothar R, Philip G: Zinc and Immune System. *Nut. Soc*, 2000, 59: 541-552.
5. Wellinghausen N, Fisher A, Kirchner H: Interaction of Zinc ion with Human peripheral blood mononuclear cells. *Cell Immunol*, 1996, 171: 255-261.
6. Driessen C, Hirv K, Rink L, Kirchner H: Induction of cytokines by Zinc ions in human peripheral blood Mononuclear cells and Separated monocytes. *Lymph Cyt Res*, 1994, 13:15-20.
7. Martin SJ, Mazdai G, Strain J, Cotter T:

مطالعه دیگر که توسط میچیکو و همکارانش با روش فلوسایتومتری به عمل آمده نشان داد که روی تا ۱۰۰ میکرولیتر تأثیر سمیت سلولی بر مولت - ۴ ندارد اما پس از ۱۲ ساعت در حضور غلظت‌های بالاتر تأثیر سمی روی معلوم شد (۸).

یافته‌های مطالعه ما با استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسانس با نتایج میچیکو و همکارانش تفاوت معنی‌داری نداشت. محقق مذکور اشاره می‌کند که روی باعث القاء آپوپتوز و نکروز در مولت - ۴ می‌شود. اما در این مطالعه با روش فلورسانس نتوانستیم دقیقاً نوع مرگ سلولی را ارزیابی نماییم. لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌ای دیگری با استفاده از تست‌های مولکولی به آن پرداخته شود.

مطالعه موجود برای اولین بار در ایران و در دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. مطالعات اندکی بر سلول‌های مولت - ۴ به عمل آمده است. یافته‌های تروزی^۱ همکارانش از مطالعه تأثیر روی بر لنفوسیت‌های طبیعی انسان در آزمایشگاه نشان داد که روی یک تنظیم‌کننده آپوپتوز است (۱۰). همچنین مطالعات ایگوچی^۲ و همکارانش نشان داد که روی در غلظت ۱۰۰ میکرو لیتر تا ۳۰۰ میکرو لیتر بطور نسبی باعث مرگ در سلول‌های کارسینوما ی پروستات انسانی می‌شود (۱۱).

تطبیق یافته‌های به دست در این مطالعه یا یافته‌های سایر محققان (در آزمایشگاه و در داخل بدن انسان) نشان می‌دهد که روی در غلظتی معادل ۱۰ برابر سطح فیزیولوژیک پلاسمایی بر سلول‌های مختلف به‌ویژه در این مطالعه بر مولت - ۴ تأثیر سمیت سلولی دارد. ترکیبات روی بر رده سلولی مولت - ۴ دارای اثر سمیت سلولی وابسته به دوز بوده و احتمالاً بتوان از آن در آینده در تنظیم سیستم ایمنی استفاده نمود.

سپاسگزاری :

در پایان از آقای مسعود سلیمانی و کارکنان آزمایشگاه گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس تقدیر و تشکر می‌نمایم.

1. Treves

2. Iguchi

- Programmed Cell death (apoptosis) in Lymphoid and Myeloid Cell Lines during Zinc deficiency. *Clin Exp Immunol*, 1991, 83: 338-43.
8. 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.
 9. Wyllie A, Kerr j, Currie, A: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev cytol*, 1980, 68: 251.
 10. Treves S, Trentini P, Acaneli M, Bucci G, Divingilo F: Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes. *Exp Cell Res*, 1994, 211: 339-43.
 11. Iguchi K Hamatake M, Ishida R, Usami Y, Adachi T, Yamamoto H: Induction of necrosis by Zinc in prostate carcinoma cells 2nd identification of proteins increased in association with this induction. *Eur j Biochem*, 1998, 253: 766-770.