

تأثیر عنصر روی بر زنده بودن و شکل ظاهری سلولهای رده لنفوئیدی Molt-4

حسن تکمه دashi*، دکتر فرزانه اوسطی آشتیانی**، دکتر علی اکبر پورفتح الله***

چکیده:

با توجه به نقش مهم عنصر روی (Zn) در ساختار و عملکرد بسیاری از آنزیمها و پروتئینهای شرکت کننده در اعمال بیولوژیکی بخصوص در حفظ و تعادل سیستم ایمنی و نیز اثرات شناخته شده کمبود Zn در بروز بسیاری از بیماریها، مطالعه موجود به منظور بررسی اثرات احتمالی سیتوتوکسیک عنصر مذکور بر رده لنفوئیدی بدخیم T (Molt-4) در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

بدین منظور با استفاده از تکنیک کشت سلولی (Cell-culture) رده سلولی مذکور در شرایط آزمایشگاهی در مجاورت غلظت های مختلفی از Zn در زمانهای مختلف انکوباسیون گردید. سپس زنده ماندن سلولها با استفاده از آزمایش تریپان بلو و شکل ظاهری سلولها با رنگ آمیزی راییت - گیمسا مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج آنالیز آماری با استفاده از برنامه نرم افزار Spss (آزمون آنالیز واریانس و آزمون دانست) نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی اختلاف معنی داری بین درصد زنده ماندن سلولها و رشد سلولها (تکثیر سلولها) در گروه آزمون و گروه شاهد (از غلظت های $0.1 \mu\text{M}$ تا $100 \mu\text{M}$ در تمام ساعات مورد مطالعه ۱۲ تا ۷۲ ساعت) وجود ندارد، بطوریکه در هر دو گروه آزمون و شاهد، میزان زنده ماندن سلولها بالای ۹۰٪ بود و رشد سلولها نیز در هر دو گروه به موازات هم بود و تفاوت معنی داری با هم نداشتند. در صورتیکه در غلظتهای $200 \mu\text{M}$ تا $500 \mu\text{M}$ بعد از ۱۲ ساعت انکوباسیون سلولهای Molt-4، میزان زنده ماندن سلولها بین ۸۵-۷۰ درصد بود. و بعد از ۲۴ ساعت به کمتر از ۵۰٪ کاهش یافت ($p < 0.05$).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که Zn در غلظت های $0.1 \mu\text{M}$ تا $100 \mu\text{M}$ و در زمانهای انکوباسیون ۱۲ تا ۷۲ ساعت بر روی رده سلولی Molt-4 اثر توکسیک ندارد. از طرف دیگر Zn در غلظتهای بالای $200 \mu\text{M}$ تا $500 \mu\text{M}$ (که بیش از ۱۰ برابر سطح فیزیولوژیک پلاسمائی Zn است) در آزمایشگاه اثر سیتوتوکسیک داشته (باعث مهار رشد و زنده بودن سلولها شده) و با افزایش غلظت و زمان انکوباسیون بر شدت آن روی رده سلولی مذکور افزوده شد.

کلید واژه ها: درصد زنده ماندن سلولها/ سلول Molt-4 / عنصر روی / مرگ سلولی

مقدمه:

نوکلئیک، کربوهیدراتها، چربیها، پروتئینها دخالت دارد (۳) و نقش آن در سیستم ایمنی از بقیه سیستمهای مختلف بدن مهمتر و بارزتر است (۴-۶). نتایج مطالعات S.J. Martin و همکارانش در آزمایشگاه

مطالعات انجام شده در Invivo توسط محققین مختلف نشان داده است که روی (Zn) برای فعالیت و ساختار بیش از ۳۰۰ نوع آنزیم اساسی است (۱،۲). در متابولیسم اسیدهای

* عضو هیأت علمی گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

** استادیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران

*** دانشیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

۱۰ میکرولیتر هم از غلظتهای مختلف Zn اضافه گردید. حجم نهایی همه چاهک ها با استفاده از RPMI-1640 به ۱۰۰ 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 همین اینکه مطمئن باشیم سلولها قبل از انکوباسیون زنده و سرحال هستند، با میکروسکوپ معکوس (Invert) کنترل گردیدند. بعد از تمامی مراحل فوق بلافاصله پلیتهای کشت سلولی در انکوباتور حاوی ۵٪ گاز Co2 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 لام نئوبار و رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده شد. ۳ تا چاهک نیز برای بررسی تغییرات احتمالی شکل ظاهری سلولهای مذکور با استفاده رنگ آمیزی رایت - گیمسا مورد بررسی قرار گرفت.

جهت کاهش خطا ، از غلظتهای مختلف Zn به دفعات زیاد کشت سلولی انجام گردید.

الف- آزمایش تریپان بلو : پس از اتمام زمان انکوباسیون ، پلیتهای کشت سلولی را از انکوباتور ۳۷ درجه بیرون آورده و در زیر هود و شرایط استریل بدین روش مطالعه گردیدند : از هر چاهک ۳۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی را بر داشته 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. سلولهای که در زیر میکروسکوپ بیرنگ بودند و غشاء آنها سالم بود زنده و سلولهای که رنگ آبی گرفته و غشاء آنها چروکیده بود مرده در نظر گرفته شدند. سپس با استفاده از فرمول زیر درصد زنده ماندن سلولها محاسبه گردید.

درصد سلولهای زنده

$100 \times \frac{\text{تعداد کل سلولهای زنده و مرده}}{\text{تعداد سلولهای زنده}}$ در ضمن با شمارش تعداد سلولهای زنده در انتهای انکوباسیون در گروههای آزمون و مقایسه با تعداد سلولهای زنده در گروههای شاهد همان ساعات مورد مطالعه، تکثیر و رشد سلولها نیز بررسی گردیدند.

ب- بررسی اثر Zn بر شکل ظاهری سلولها با رنگ آمیزی رایت - گیمسا: پس از اینکه پلیتها در انتهای فواصل

بر تکثیر ، مرگ و یا درصد سلولهای زنده Molt-3 نشان داد که تحت شرایط کمبود Zn سلولهای مورد مطالعه فاقد رشد و تکثیر بودند و در حضور Zn (تا $50 \mu\text{M}$) ، بموازات سلولهای کنترل رشد نموده بودند (۷). در یک مطالعه دیگر Michiko H و همکارانش پی بردند که بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون سلولهای Molt-4 در حضور غلظت های $100 \mu\text{M}$ و $200 \mu\text{M}$ از عنصر Zn ، تعداد سلولهای زنده به ترتیب ۸۵ درصد و ۱۰ درصد است و در مجاورت با غلظت $300 \mu\text{M}$ ، بعد از ۱۲ و ۲۴ ساعت تعداد سلولهای زنده به ترتیب به ۸۰ درصد و ۲۰ درصد خواهد رسید (۸).

مطالعات محدودی در ارتباط با اثر غلظتهای مختلف Zn بر رده سلولی Molt-4 (T-Lymphoid Cell Line) در محیط آزمایشگاهی انجام شده است. با توجه به اینکه تا کنون در ایران مطالعه ای در رابطه با این موضوع انجام نگرفته است، برآن شدیم با توجه به امکانات موجود ، اثرات احتمالی سیتوتوکسیک Zn را بر زنده ماندن و شکل ظاهری سلولهای مذکور در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دهیم. سپس بین مشاهدات آزمایشگاهی به دست آمده در این مطالعه با آنچه که در Invivo توسط محققین مختلف گزارش شده است تطبیق بعمل آوریم تا در صورت امکان با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه بتوان از ترکیبات حاوی Zn در تنظیم سیستم ایمنی (Immune Modulation) استفاده نمود.

روش کار:

این مطالعه از نوع تحلیلی مقایسه ای است. ابتدا محلولهای مورد نیاز از جمله محلول کلرید روی (ZnCl_2) و محلول محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FCS (سرم گوساله جنینی Fetal Calf Serum) تهیه گردیدند. محلول کلرید روی با استفاده از فیلتر $0/2$ میکرون استریل شد و از آن غلظتهای $0/1 \mu\text{M}$ تا $500 \mu\text{M}$ تهیه گردید. سپس در شرایط استریل و در زیر هود بیولوژیک از سلولهای Molt-4 (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، سوسپانسیون که تعداد سلولهای زنده آن بیش از ۹۷ درصد بود تهیه گردید، 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 چاهکها به استثناء چاهک های شاهد ،

نرم افزار Spss (آزمون آنالیز واریانس و آزمون دانت) تجزیه و تحلیل شده است.

نتایج:

درانتهای زمانهای معین انکوباسیون سلولها از هر غلظت بصورت سه تایی با روش تریپان بلو شمارش کل سلولی و بررسی درصد سلولهای زنده و یاسیتوتوکسیسیتی سلولی بعمل آمد و بارها تکرار گردید که نتایج آنها در ذیل آمده است. جداول ۱ تا ۶ نتایج اثر غلظت‌های مختلف Zn بر زنده بودن سلول Molt-4 پس از ۱۲ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون با آزمایش تریپان بلو را نشان می دهد.

زمانی (۷۲-۱۲ ساعت) از انکوباتور بیرون آورده شد، جهت بررسی اثر Zn بر شکل ظاهری سلولها با دستگاه سیتواسپین از هر غلظت مورد مطالعه گسترش سلولی (لام) تهیه گردید. در مرحله بعد به میزان ۱ میلی لیتر و به مدت ۵ دقیقه رنگ رایت-گیمسا بر روی لام ریخته ، سپس به میزان ۰/۵ میلی لیتر و به مدت ۱۰ دقیقه بافر رایت روی لام حاوی رنگ اضافه نموده ، سپس به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه لام را با آب معمولی شستشو داده و پس از خشک نمودن شکل ظاهری سلولها ، وضعیت هسته و سیتوپلاسم آنها مورد بررسی قرار گرفتند. قابل ذکر است نتایج این مطالعه با استفاده از

جدول ۱: نتایج اثر غلظت‌های مختلف Zn بر زنده بودن سلول Molt-4 پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون

Zn(μM)	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۱	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	شاهد
درصد زنده ماندن سلولها	۹۷	۹۶	۹۵	۹۵	۹۴	۹۴	۹۳	۸۲	۷۵	۷۰	۷۰	۹۷
P-value	۰/۹۹۵	۰/۹۹۰	۰/۸۹۱	۰/۸۸۳	۰/۸۵۰	۰/۸۴۱	۰/۸۳۰	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	—

جدول ۲: نتایج اثر غلظت‌های مختلف Zn بر زنده بودن سلول Molt-4 پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون

Zn(μM)	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۱	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	شاهد
درصد زنده ماندن سلولها	۹۶	۹۶	۹۵	۹۵	۹۵	۹۴	۹۳	۷۸	۵۲	۲۰	۲۰	۹۶
P-value	۰/۹۸۴	۰/۹۷۷	۰/۸۵۹	۰/۸۵۰	۰/۸۴۱	۰/۷۵۳	۰/۷۴۲	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	—

جدول ۳: نتایج اثر غلظت‌های مختلف Zn بر زنده بودن سلول Molt-4 پس از ۳۶ ساعت انکوباسیون

Zn(μM)	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۱	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	شاهد
درصد زنده ماندن سلولها	۹۵	۹۴/۵	۹۴	۹۳/۲	۹۳	۹۲/۶	۹۲/۵	۹۷	۲۵	۲۰	۱۸	۹۵
P-value	۱/۰۰۰	۰/۹۹۲	۰/۹۸۰	۰/۸۵۰	۰/۸۲۰	۰/۸۱۰	۰/۷۸۹	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	—

جدول ۴: نتایج اثر غلظت‌های مختلف Zn بر زنده بودن سلول Molt-4 پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون

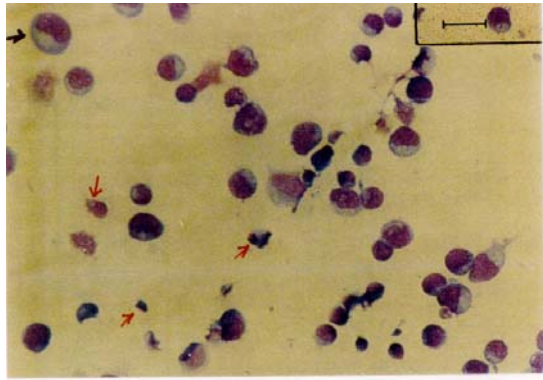
Zn(μM)	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۱	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	شاهد
درصد زنده ماندن سلولها	۹۵	۹۵	۹۴/۲	۹۴/۱	۹۴	۹۳/۷	۹۳/۵	۲۷	۲۰	۱۵	۱۲	۹۵
P-value	۰/۹۹۴	۰/۹۹۱	۰/۹۱۳	۰/۹۰۰	۰/۸۸۹	۰/۸۵۰	۰/۸۱۰	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	—

جدول ۵: نتایج اثر غلظت‌های مختلف Zn بر زنده بودن سلول Molt-4 پس از ۶۰ ساعت انکوباسیون

Zn(μM)	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۱	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	شاهد
درصد زنده ماندن سلولها	۹۴	۹۳/۵	۹۳	۹۳	۹۲/۹	۹۲/۶	۹۲	۱۸	۱۵	۱۱	۱۰	۹۴
P-value	۰/۹۹۰	۰/۹۵۰	۰/۹۲۰	۰/۹۱۴	۰/۹۰۳	۰/۸۹۱	۰/۸۶۷	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	—

جدول ۶: نتایج اثر غلظت‌های مختلف Zn بر زنده بودن سلول Molt-4 پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون

Zn(μM)	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۱	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	شاهد
درصد زنده ماندن سلولها	۹۴	۹۳/۳	۹۳	۹۲/۹	۹۲/۷	۹۲/۵	۹۲/۲	۱۵	۱۰	۱۰	۵	۹۴
P-value	۰/۹۹۱	۰/۹۴۵	۰/۹۳۰	۰/۹۱۷	۰/۹۰۵	۰/۸۹۳	۰/۸۷۰	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	—



شکل ۲: سلول‌های Molt-4
(در ساعت ۱۲ / $200 \mu\text{M}$ عنصر Zn) (x 40)
(رنگ آمیزی رایت - گیمسا)

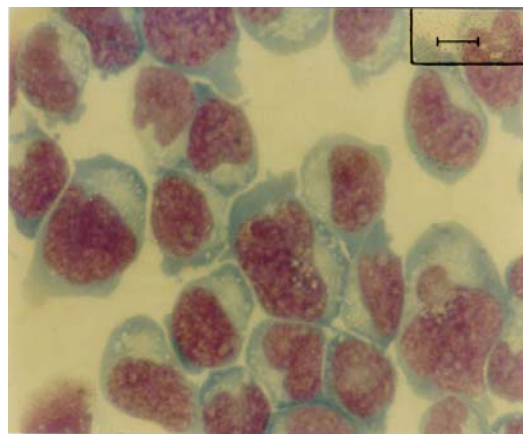
بحث:

نتایج بدست آمده در این مطالعه (با استفاده از تستهای آزمایشگاهی تریپان بلوو رنگ آمیزی رایت - گیمسا) نشان داد که Zn در فواصل زمانی مختلف انکوباسیون تا غلظت $100 \mu\text{M}$ هیچگونه تأثیر توکسیک بر زنده ماندن سلول‌های Molt-4 ندارد و از لحاظ آماری نیز بین درصد زنده ماندن سلولها در چاهکهای گروه آزمون و گروه شاهد دیده نشد. همچنین از طریق شمارش تعداد سلولها در هر دو گروه (گروه آزمون و شاهد) در انتهای زمان انکوباسیون، سرعت رشد (تکثیر سلولها) در این دو گروه با هم مقایسه گردیدند. تا غلظت $100 \mu\text{M}$ هیچگونه تفاوت معنی داری در رشد سلولی این دو گروه دیده نشد. اما با افزایش زمان انکوباسیون و غلظت Zn اثرات توکسیک آن خود را نشان داد. بطوریکه غلظت‌های $200 \mu\text{M}$ تا $500 \mu\text{M}$ در فواصل زمانی ۱۲ تا ۷۲ ساعت تأثیر چشمگیری بر درصد زنده بودن سلولهای Molt-4 داشت. بعد از ۱۲ ساعت انکوباسیون این سلولها در حضور $200 \mu\text{M}$ عنصر Zn، خاصیت سیتوتوکسیک Zn آشکار گردید و درصد سلولهای زنده به حدود ۸۲٪ رسید. از لحاظ آماری نیز درصد زنده بودن سلولها در گروه آزمون در مقایسه با مرگ و میر و یا درصد زنده بودن سلولهای در گروه شاهد تفاوت معنی داری داشت. در غلظت $200 \mu\text{M}$ علاوه بر کاهش معنی دار در درصد سلولهای زنده، بین تکثیر سلولها نیز در گروه آزمون و شاهد تفاوت معنی داری مشاهده گردید و هرچه زمان انکوباسیون را بیشتر گرفتیم و غلظت Zn را افزایش دادیم اثر توکسیک آن بیشتر شد،

چنانچه جداول نشان می‌دهند، سلول‌های Molt-4 در غلظت‌های پایین Zn یعنی تا $100 \mu\text{M}$ و در فواصل زمانی مختلف، از میزان درصد زنده بودن بسیار بالایی برخوردار می‌باشند. بطوریکه درصد سلولهای زنده Molt-4 در اثر غلظت‌های متفاوت Zn با درصد زنده بودن سلول‌های شاهد Molt-4 در همان ساعت تفاوت چندانی ندارد.

برای بررسی معنی دار بودن یا عدم معنی داری، از آزمونهای آماری استفاده گردید. این آزمونها نشان داد که میزان درصد زنده بودن سلول‌های Molt-4 در فواصل زمانی مختلف (۱۲ تا ۷۲ ساعت) و در اثر غلظت‌های پایین Zn یعنی $0.1 \mu\text{M}$ تا $100 \mu\text{M}$ با میزان درصد زنده بودن سلول‌های شاهد همان ساعت و ساعت‌های دیگر انکوباسیون تفاوت معنی داری ندارد اما درصد سلولهای زنده Molt-4 در غلظت‌های $200 \mu\text{M}$ تا $500 \mu\text{M}$ با درصد زنده سلولهای شاهد همان ساعت تفاوت معنی داری دارد ($p < 0.05$)، بطوریکه در غلظت $500 \mu\text{M}$ پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، درصد سلولهای زنده به ۵ درصد رسید.

همانطوریکه در شکل ۱ دیده می‌شود سلولهای Molt-4 زنده اندازه سلولی مختلف و سیتوپلاسمی آبی رنگ دارند.



شکل ۱: سلول‌های Molt-4 شاهد (x 1000)
(رنگ آمیزی رایت - گیمسا)

اما در شکل ۲ سلولهای نامبرده تحت تأثیر غلظتهای بالای Zn شروع به دژنره شدن نموده‌اند.

انجام شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که Zn در غلظت $200 \mu\text{M}$ که بیش از ۱۰ برابر سطح فیزیولوژیک پلاسمائی آن است بر زنده ماندن، رشد سلولها (تکثیر سلولها) و شکل ظاهری سلولهای Molt-4 اثر توکسیک (مهارى) دارد و با افزایش غلظت Zn و زمان انکوباسیون سلولها، بر شدت آن افزوده می گردد.

منابع:

1. Maret W, Jacob C, Vallee B, Fisher E. Inhibitory sites in enzymes: Zinc removal and reactivation by thionein. *Proc Nat Acad Sci* 1999; 96: 1936-1940.
2. Vallee B, Galde A. The metalbiochemistry 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: 346-361.
4. Lothar R, Philip G. Zinc and immune system. *Proc Nutr 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. *Lymphokine Cytokine Res*, 1994; 13: 15-20.
7. Martin SJ, Mazdai G, Strain J, Cotter T. 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.

بطوریکه پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در حضور $500 \mu\text{M}$ تعداد سلولهای زنده به ۵٪ رسید.

روی در غلظت های $0.1 \mu\text{M}$ تا $100 \mu\text{M}$ تأثیری بر شکل ظاهری سلولهای مذکور نداشت. اما در ساعت ۱۲ و با غلظت $200 \mu\text{M}$ تغییراتی در رده سلولی Molt-4 مشاهده شد، که در مقایسه با تصویر سلولهای شاهد غیر طبیعی بود. این تغییرات غیر طبیعی شامل هسته سلولی متراکم و یا قطعه قطعه سلولها و فاقد سیتوپلاسم بودند. بطوریکه پس از ۷۲ ساعت در حضور غلظت $300 \mu\text{M}$ ، بیش از ۸۰٪ سلولها فاقد سیتوپلاسم، هسته سلولی متراکم و یا قطعه قطعه شده بود. مطالعات شکل ظاهری سلولها القا مرگ سلولی توسط Zn را در سلولهای Molt-4 تایید کرد.

طی این مطالعه درصد زنده بودن سلولهای Molt-4 بعد از ۴۸ ساعت و در حضور غلظت $100 \mu\text{M}$ عنصر با آزمایش تریپان بلو در حدود ۹۳٪ بود. اما Michiko. H در مطالعه خود اشاره میکند که میزان زنده بودن سلولهای Molt-4 در شرایط غلظت $100 \mu\text{M}$ عنصر Zn بعد از ۴۸ ساعت ۸۵٪ است. همچنین محقق نام برده اشاره می کند که Zn در غلظت های بالا (عدم اشاره به غلظت خاصی) باعث نکروزیس و آپوپتوزیس در سلولهای Molt-4 می شود (۸). در این مطالعه بسیاری از یافته های ما (به استثنای دو مورد فوق) با نتایج Michiko. H مطابقت داشت. با بررسی شکل ظاهری سلولهای Molt-4 در غلظت های $200 \mu\text{M}$ و بالاتر دیده شد که هسته سلولها متراکم و گاهی قطعه قطعه شده و سلولها دژنره شده بودند و از این نظر با یافته های Michiko. H مطابقت داشت. ولی مشخص نمودن نوع مرگ سلولی القا شده توسط Zn نیاز به تستهای مولکولی و فلوسیتومتری دارد که لازم است در مطالعات دیگری به آن پرداخته شود.

این مطالعه یک مطالعه بنیادی است که با استفاده از تکنیک کشت سلولی و در شرایط آزمایشگاهی