

مقایسه اثر روی (Zn) بر زنده ماندن و شکل ظاهری سلول های رده لنفوییدی

Molt-4 و Raji

حسن تکمه داشی* - فرزانه اوسطی آشتیانی** - علی اکبر پور فتح اله***

* مربی گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

** استادیار گروه ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

*** دانشیار گروه ایمنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

مقدمه: عنصر روی (Zn) در ساختار و عملکرد بسیاری از آنزیمها و پروتئینها شرکت و بخصوص در حفظ و تعادل سیستم ایمنی نقش مهمی دارد. هدف: مطالعه موجود به منظور بررسی اثرهای احتمالی Zn بر زنده ماندن و شکل ظاهری سلولهای رده لنفوییدی (Raji) B و (Molt-4) T در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

مواد و روش ها: با استفاده از تکنیک کشت سلولی (Cell-culture) سلول Molt-4 و Raji در شرایط آزمایشگاهی یکسان در مجاورت غلظت های مختلف عنصر Zn در زمان های متفاوت در انکوباتور قرارداد شد و در انتهای زمان انکوباسیون میزان زنده ماندن و شکل ظاهری سلول ها با استفاده از آزمایش تریان بلوو رنگ آمیزی رایت - گیمنسا مورد بررسی قرار گرفت. سپس نتایج به دست آمده با استفاده از برنامه نرم افزار Spss (آزمون آنالیز واریانس و آزمون دانت) تحلیل شد. نتایج: آنالیز آماری داده ها نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی اختلاف معنی داری بین میزان زنده ماندن و تکثیر سلولها در گروه آزمون و گروه شاهد (سلولهای مذکور) تا غلظت $100 \mu\text{M}$ در ساعات مورد مطالعه ۱۲ تا ۷۲ وجود نداشت. به طوری که میزان زنده ماندن سلولها در گروه آزمون و گروه شاهد هر دو رده سلولی بالای ۹۰ درصد بود. در صورتی که در غلظت های $200 \mu\text{M}$ تا $500 \mu\text{M}$ بعد از ۱۲ ساعت انکوباسیون، میزان زنده ماندن سلولها به ۸۲ درصد و بعد از ۲۴ ساعت انکوبه به کمتر از ۵۰ درصد کاهش یافت ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که Zn تا غلظت $100 \mu\text{M}$ و در زمان های انکوباسیون متعدد بر روی رده سلولی Molt-4 و Raji اثر سمی بر زنده ماندن سلولها ندارد. اما در غلظت $200 \mu\text{M}$ در آزمایشگاه اثر سمی داشته و با افزایش غلظت و زمان انکوباسیون بر شدت اثر آن روی سلول Molt-4 و Raji افزوده شد. لذا با احتمال می توان از ترکیبات Zn در تنظیم سیستم ایمنی استفاده نمود.

کلید واژه ها: روی / نفوسیت های B / نفوسیت های T

مقدمه

کمبود Zn و یا مسمومیت با Zn، باعث اختلال در سیستم های بیولوژیک می شود (۷-۳). مطالعات S.J.MARTIN و همکارانش در آزمایشگاه بر تکثیر، و درصد سلولهای زنده Raji و Molt-3 نشان داد که هرگاه سلولهای مذکور در محیطی مغذی اما فاقد Zn کشت داده شوند، ظرفیت رشد و تکثیر خود را از دست می دهند. اما در حضور Zn (تا $50 \mu\text{M}$)، تعداد کل سلولها و میزان زنده ماندن سلولهای مذکور در

مطالعات انجام شده در داخل بدن انسان (Invivo) نشان داده که روی (Zn) برای فعالیت و ساختار بیش از ۳۰۰ نوع آنزیم اساسی است (۱ و ۲) این عنصر جهت ساختار ژنتیکی هر سلولی (طبیعی یا غیرطبیعی) بسیار اهمیت دارد. در متابولیسم اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدراتها، چربیها، پروتئینها دخالت دارد. نقش آن در سیستم ایمنی به علت تولید و تخریب بالای سلولهای آن از بقیه سیستم های مختلف بدن مهمتر و بارزتر است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تحلیلی - مقایسه‌ای است. ابتدا محلول‌های مورد نیاز از جمله محلول کلرید روی (2) (ZnCl₂ RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FCS^۳ (سرم گوساله جنینی FCS: Fetal Cell Serum) تهیه گردیدند. محلول کلرید روی با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون استریل، و از آن غلظت‌های ۰/۱ μM تا ۵۰۰ μM تهیه شد و صحت این غلظت‌ها بادستگاه اتیمیک ایزوریشن کنترل گردید. سپس در شرایط استریل و در زیر هود بیولوژیک از سلول‌های Raji و Molt-4 (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، سوسپانسیونی که تعداد سلولهای زنده آن بیش از ۹۷ درصد بود تهیه شد، در مرحله بعد حدود ۷۵ میکرولیتر از این سوسپانسیون‌ها (که معادل ۱۵۰۰۰ سلول بود) برداشته و به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای انتقال داده شدند. در مرحله بعد به تمام چاهکها به استثنای چاهک‌های شاهد (این چاهک‌ها صرفاً حاوی سلول‌های مذکور و محیط کشت RPMI-1640 بود) ۱۰ میکرو لیتر از غلظت‌های مختلف Zn اضافه گردید. حجم نهایی همه چاهک‌ها با استفاده از 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 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 حاوی انکوباتور ۵٪ گاز Co₂ با دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. در انتهای زمان معین از انکوباسیون سلول‌ها (فواصل زمانی ۱۲ تا ۷۲ ساعت) از هر غلظت مورد مطالعه واز هر رده

هر دو گروه آزمون و شاهد با هم برابر بود (۷). در یک مطالعه دیگر توسط Michiko H و همکارانش بر روی سلول‌های Molt-4 نتیجه گرفتند که بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون سلول‌های Molt-4 در حضور غلظت‌های ۱۰۰ μM و ۲۰۰ μM از عنصر Zn، تعداد سلول‌های زنده به ترتیب ۸۵ درصد و ۱۰ درصد است و در مجاورت با غلظت ۳۰۰ μM، بعد از ۲۴ و ۱۲ ساعت تعداد سلول‌های زنده به ترتیب به ۸۰ درصد و ۲۰ درصد خواهد رسید (۸). طی مطالعاتی که توسط نویسندگان این مقاله بر روی منابع مختلف به عمل آمده است فقط یک مورد اثر Zn بر روی سلول‌های با منشا رده لنفوئیدی B (Raji) و یک مورد بر روی سلول‌های Molt-4 یافت گردید که در فوق ذکر گردیده‌اند.

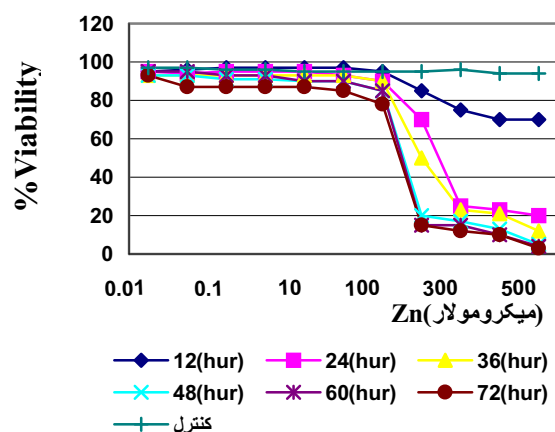
هدف از انجام این مطالعه: مطالعات محدودی در ارتباط با اثر غلظت‌های مختلف Zn بر رده سلولی Molt-4 (Raji: B- Lymphoid Cell Line) در محیط آزمایشگاهی انجام شده است. با توجه به اینکه تاکنون در ایران مطالعه‌ای در رابطه با این موضوع انجام نگرفته است، بر آن شدیم با توجه به امکانات موجود، اثرات احتمالی Zn را بر زنده ماندن و شکل ظاهری سلول‌های بدخیم Raji و Molt-4 (=T- Molt-4) (Lymphoid cell line در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دهیم. سپس بین مشاهدات آزمایشگاهی به دست آمده در این مطالعه با آنچه که در سیستم‌های بیولوژیکی توسط محققان مختلف گزارش شده است تطبیق به عمل آوردیم. در نهایت در صورت امکان با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه شاید بتوان از ترکیبات حاوی Zn در تنظیم سیستم - ایمنی (Immune Modulation) استفاده نمود.

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 ۱۰-۱۵ ثانیه لام با آب معمولی شستشو داده و پس از خشک نمودن شکل ظاهری سلول‌ها، وضعیت هسته و سیتوپلاسم آنها بررسی شد.

نتایج این مطالعه که با استفاده از نرم افزار Spss (آزمون آنالیز واریانس و آزمون دانت) تجزیه و تحلیل شده است در زیر آمده است.

نتایج

درانتهای زمان‌های معین انکوباسیون سلولها از هر غلظت به صورت سه تایی با روش تریپان بلو شمارش کل سلولی و بررسی میزان سلولهای زنده جهت ارزیابی سمیت سلولی Zn بعمل آمد که نتایج آنها در نمودار ذیل آمده است.



نمودار ۱: نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف Zn بر روی سلول Raji در فواصل زمانی مختلف (Trypan blue exclusion dye)

چنانچه نمودار ۱ نشان می‌دهد، سلول‌های Raji در غلظت‌های پایین Zn یعنی تا ۱۰۰ μM و در فواصل زمانی مختلف، از میزان درصد زنده بودن بسیار بالائی

سلولی مورد مطالعه ۳ چاهک برای بررسی تعداد سلولها و میزان زنده بودن آنها با استفاده از لام نتوبار و رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده شد و ۳ چاهک نیز برای تعیین مورفولوژی سلول‌های مذکور با استفاده از رنگ آمیزی رایت - گیمسا بررسی شد. جهت کاهش خطا، از غلظت‌های مختلف Zn به دفعات زیاد کشت سلولی انجام گردید.

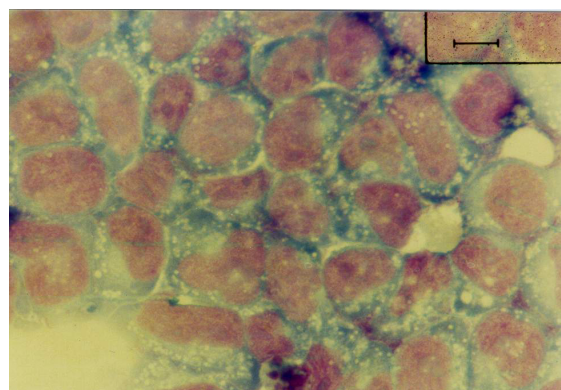
الف - بررسی میزان زنده ماندن سلولها در حضور مقادیر متفاوت Zn با آزمایش تریپان بلو (Trypan blue exclusion Dye) پس از اتمام زمان انکوباسیون، پلیت‌های کشت سلولی را از انکوباتور ۳۷ درجه بیرون آورده شد و در زیر هود و شرایط استریل به روش زیر مطالعه گردیدند. از هر چاهک ۳۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی برداشته با ۳۰ میکرو لیتر از محلول ۰/۴ درصد تریپان بلو با هم مخلوط گردید. سپس یک قطره از این مخلوط مابین لام و لامل ریخته و در زیر میکروسکوپ نوری مطالعه شد. سلول‌هایی که در زیر میکروسکوپ بیرنگ، و غشا، آنها سالم بود زنده و سلول‌هایی که رنگ آبی گرفته و غشا، آنها چروکیده بود مرده در نظر گرفته شدند. سپس با استفاده از فرمول زیر درصد زنده ماندن سلولها محاسبه گردید.

۱۰۰ × تعداد کل سلول‌های زنده و مرده / تعداد سلول‌های زنده = درصد سلول‌های زنده (Viability)

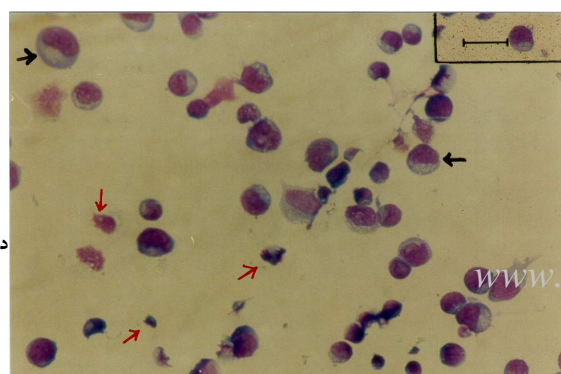
درضمن با شمارش تعداد سلول‌های زنده در انتهای انکوباسیون در گروه‌های آزمون و مقایسه با تعداد سلول‌های زنده در گروه‌های شاهد همان ساعات مورد مطالعه، تکثیر و رشد سلولها نیز بررسی گردیدند.

ب- بررسی اثر Zn بر شکل ظاهری سلولها با رنگ آمیزی رایت-گیمسا: (Wright-Gimsa, Staining) پس از اینکه پلیت‌ها در انتهای فواصل زمانی (۱۲ تا ۷۲ ساعت) از انکوباتور بیرون آورده شد، جهت بررسی اثر Zn بر شکل ظاهری سلولها با دستگاه سیتواسپین از هر غلظت مورد

برخوردار می‌باشند. به طوری که درصد سلول‌های زنده در اثر غلظت‌های متفاوت Zn با درصد زنده بودن سلول‌های شاهد در همان ساعت تفاوت چندانی ندارد. برای بررسی معنی‌دار بودن یا نبودن، از نرم افزار Spss و آزمون آنالیز واریانس و آزمون دانت استفاده گردید. این آزمون آماری نشان داد که درصد زنده بودن سلول‌های Raji در فواصل زمانی مختلف (۱۲ تا ۷۲ ساعت) و در اثر غلظت‌های پایین Zn یعنی $0.1 \mu M$ تا $100 \mu M$ با درصد زنده بودن سلول‌های شاهد همان ساعت و ساعت‌های دیگر انکوباسیون تفاوت معنی‌داری ندارد. اما درصد سلول‌های زنده مذکور در غلظت‌های $200 \mu M$ تا $500 \mu M$ با درصد زنده سلول‌های شاهد همان ساعت تفاوت معنی‌داری دارد ($p < 0.05$). بطوریکه در غلظت $500 \mu M$ پس از ۱۲ ساعت به ۸۲ درصد و پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون میزان سلول‌های زنده به ۵ درصد رسید. با توجه به نتایج بسیار مشابه که جهت سلول‌های Molt-4 تحت همین شرایط به دست آمد از ذکر توضیحات و نمودار اجتناب می‌شود.



شکل ۱: سلول‌های بدخیم Raji (شاهد) رنگ‌آمیزی:رایت - گیمسا سلول‌های شاهد Raji زنده اندازه سلولی مختلف، سیتوپلاسمی آبی رنگ و واکوئله دارند (شکل-۱)



شکل ۲: سلول‌های بدخیم Raji (در ساعت ۷۲ / $200 \mu m$ عنصر Zn) رنگ آمیزی:رایت - گیمسا

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

اما در شکل ۲- سلول‌های نامبرده تحت تاثیر غلظت‌های بالای Zn شروع به دژنره شدن نموده اند.

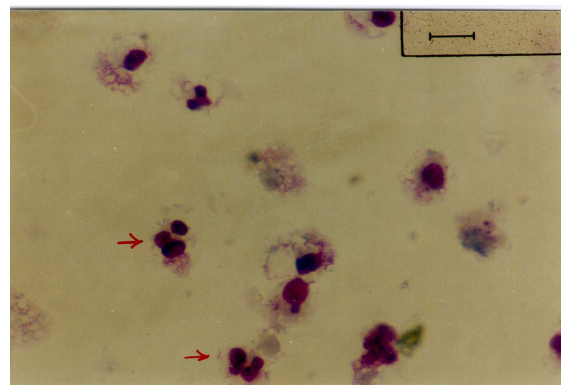
تا $500 \mu\text{M}$ در فواصل زمانی ۱۲ تا ۷۲ ساعت تاثیر چشمگیری بر میزان زنده بودن سلول‌های Molt-4Raji داشت. بعد از ۱۲ ساعت انکوباسیون این سلول‌ها در حضور $200 \mu\text{M}$ عنصر Zn، خاصیت سمی Zn آشکار گردید. و میزان سلول‌های زنده Raji به حدود ۸۲٪ و سلول‌های Molt-4 به ۸۵٪ رسید. از لحاظ آماری (آنالیز واریانس و آزمون دانت) نیز میزان زنده بودن سلول‌ها در گروه آزمون هردو رده سلولی در مقایسه با مرگ و میر و یا میزان زنده بودن سلول‌ها در گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند. در غلظت $200 \mu\text{M}$ علاوه بر کاهش معنی‌دار در میزان سلول‌های زنده، بین تکثیر سلول‌ها نیز در گروه‌های آزمون و شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید. هرچه زمان انکوباسیون را بیشتر گرفتیم و غلظت Zn را افزایش دادیم اثر سمی آن بر روی سلول‌های مورد مطالعه بیشتر شد، به طوری که پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در حضور $500 \mu\text{M}$ تعداد سلول‌های زنده در هر دو گروه به کمتر از ۵٪ رسید.

مطالعات به عمل آمده توسط محققان در آزمایشگاه و یا در داخل بدن انسان، نشان می‌دهد که اساس مولکولی تاثیر سمی (توکسیک) Zn این است که احتمالاً Zn در غلظتی معادل ۸ برابر سطح فیزیولوژیک پلاسمائی خود باعث مهار اختصاصی ریسپتور اینترلوکین یک (IL-1) همراه کیناز می‌شود (۹).

روی (Zn) در غلظت‌های $0.01 \mu\text{M}$ تا $100 \mu\text{M}$ تأثیری بر شکل ظاهری سلول‌های مذکور نداشت. اما در ساعت ۱۲ و با غلظت $200 \mu\text{M}$ تغییراتی مشاهده شد، که در مقایسه با تصویر سلول‌های شاهد غیر طبیعی بود. به طوری که تحت این شرایط بیش از ۸۰٪ سلول‌ها فاقد سیتوپلاسم، هسته سلولی متراکم و یا قطعه قطعه شده بود. مطالعات شکل ظاهری سلول‌ها نیز القا



شکل ۳: سلول‌های بدخیم Molt-4 (شاهد) رنگ آمیزی: رایت - گیمسا



شکل ۴: سلول‌های بدخیم Molt-4 (در ساعت ۱۲ / $200 \mu\text{M}$ عنصر Zn) رنگ آمیزی: رایت - گیمسا

بحث و نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در این مطالعه (با استفاده از تست‌های آزمایشگاهی تریپان بلو و رنگ آمیزی رایت - گیمسا) نشان داد که Zn در فواصل زمانی مختلف انکوباسیون تا غلظت $100 \mu\text{M}$ هیچگونه تأثیر سمی بر زنده ماندن سلول‌های Raji و Molt-4 ندارد. و از لحاظ آماری نیز بین میزان زنده ماندن سلول‌های نامبرده در چاهک‌های گروه آزمون و گروه شاهد تفاوتی دیده نشد. همچنین در انتهای زمان انکوباسیون، سرعت رشد (تکثیر سلول‌ها) از طریق شمارش تعداد کل سلول‌ها در هر دو گروه (گروه آزمون و شاهد) با هم مقایسه شد، و تا غلظت $100 \mu\text{M}$ هیچگونه تفاوت معنی‌داری در رشد سلولی این دو گروه دیده نشد. اما با افزایش زمان انکوباسیون و غلظت Zn اثرات سمی Zn خود را نشان داد. به طوری که غلظت‌های $200 \mu\text{M}$

فیزیولوژیک پلاسمائی آن است دارای اثر سمیت سلولی بر میزان زنده ماندن، رشد سلولها (تکثیر سلولها) و شکل ظاهری سلولهای Raji و Molt-4 است. وبا افزایش غلظت Zn و زمان انکوباسیون بر شدت آن افزوده می گردد و بین میزان حساسیت سلولهای Raji و Molt-4 به Zn تفاوت معنی داری در این مطالعه دیده نشد.

مرگ سلولی توسط Zn رادر سلولهای Raji و Molt-4 تایید کرد. ولی مشخص نمودن نوع مرگ سلولی (نکروزیس یا آپوپتوزیس) القاشده توسط Zn نیاز به تست های مولکولی و فلوسیتومتری دارد که پیشنهاد می شود در مطالعات دیگری به آن پرداخته شود. نتیجه گیری کلی: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که Zn در غلظت $200 \mu\text{M}$ که بیش از ۸ برابر سطح

منابع

1. 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 U.S.A, 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, Karmer 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. Proceedings of the Nutrition Society 2000: 59: 541-552.
5. Wellinghausen N, Fisher A, Kirchner H. Interaction of Zinc Ion with Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. Cellular Immunology 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 and Cytokine Research 1994: 13:15-20.

7. Martin SJ, Mazdai G, Strain J, Cotter T. Programmed Cell Death (apoptosis) in Lymphoid (Raji & Molt-4) and Myeloid (HL-60) 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. Wellinghausen N, Schromm AB, Seydel U, et al. Zinc Enhances Lypopolysaccharide Induced Monokine Secretion by a Fluidity Change of LPS. J Immunol 1996: 157: 3139-3145.

Comparison on Effect of Zinc on Viability and Morphology of

Raji and Molt-4 Cell-Line

Tokmehdashi H., Osati Ashtiani F., Purfathullah A.A.

Abstract

Introduction: Zinc has important effects on structural and functional activities of many proteins and enzymes, especially in regulation of immune system.

Objective: This study was carried out to examine the in vitro effects of different concentrations of Zinc on viability and morphology of T-Lymphoid (Molt-4) and B-Lymphoid (Raji) cell line.

Materials and Methods: In this study, the cell line was exposed to different concentrations of Zinc (100 μ M to 500 μ M) followed by incubation (37°C, 5%CO₂) at various time points (12 to 72 hrs). The cells were then evaluated with trypan blue exclusion dye, and Wright-Gimsa staining.

Results: The results of this study showed almost different responses to different amounts of Zinc by the T and B cell line. Concentrations less than 100 μ M of Zinc at different incubation time points had little to no effects on cell line when compared to the controls. Higher concentrations of Zinc (>100 μ M) diminished cell viability to 70% at 12 hrs and less than 50% at 24 to 72 hrs of incubation times.

Conclusion: We concluded that Zinc shows cytotoxic effects (Raji & Molt-4) depending on the concentrations used. At higher concentrations, it exerts cytotoxic effects.

Key words: B- Lymphaytes/ T- Lymphocytes/ Zinc