Archive of SID

پژوهشی

فصلنامه علمی- پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مازندران
سال پانزدهم شماره ۴۶ فصل بهار سال ۱۳۸۴

مقایسه تاثیر سمیت عنصر روی بر سلول‌های رده لنفوئیدی راجی ومولت-۴باتکنیک فلورسانس

حسن تکمه‌داشی (M.Sc.)*

چکیده

سابقه و هدف : عنصر روی(Zn) درحفظ سلامتی انسان ودر ساختار و عملکرد اکثر بافت‌های بدن بویژه سیستم ایمنی نقش بارزی دارد. این مطالعه به منظور مقایسه تاثیر احتمالی سمیت عنصر روی بر سلول‌های- B (راجی) و سلول‌های T(مولت-٤) در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها : با استفاده از تکنیک کشت سلولی، سلول‌های رده لنفوئیدی راجی و مولت-٤ در شرایط آزمایشگاهی در مجاورت غلظت‌های مختلف روی در زمان‌های متفاوت (۱۲تا۷۲ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و۵ درصد Co2 انکوبه گردیدند. آنگاه میزان زنده ماندن و رشد سلول‌ها با رنگ‌آمیزی فلورسانس (رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید- آکریدین اورنج) بررسی شد. نتایج به دست آمده با برنامه نرم افزار Spss (آزمون آنالیز واریانس و دانت) مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت.

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 ۲٤ و ... ساعت انکوباسیون، میزان زنده ماندن سلول‌ها و رشد آن‌ها در گروه آزمون نسبت به گروه شاهد، کاهش معنی‌دار یافت ($p < ۰/۰۵$).

استنتاج : ترکیبات روی برده سلولی راجی و مولت-٤ دارای اثر سمیت « وابسته به مقدار» بوده واحتمالا در آینده می‌توان از آن در تنظیم سیستم ایمنی استفاده نمود.

واژه های کلیدی : روی، درصد زنده ماندن سلول‌ها، سلول راجی، مولت-٤، سمیت سلولی

مقدمه

مطالعات انجام شده توسط محققین مختلف نشان داده است که مسمومیت با عنصر روی توسط املاح آن و یا شغل‌های صنعتی که با روی سروکار دارند، ایجاد می‌شود. براساس گزارش‌های موجود، مسمومیت با روی سبب اختلالات گوارشی،بیماری‌های قلبی وسیستم ایمنی می‌شود. سطح سرمی عنصر روی ۱٦-۱۲ میکروگرم در دسی‌لیتر است. روی در عملکرد بیش از ۳۰۰ نوع آنزیم در بدن نقش بارزی دارد و در اندام تناسلی و یا غدد

* مربی دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان ✉ همدان : روبروی پارک مردم- دانشگاه علوم پزشکی همدان- دانشکده پیراپزشکی

تاریخ دریافت : ۸۲/۱۱/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۳/۱/۲٦ تاریخ تصویب: ۸۳/٦/۱۸

www.SID.ir

Archive of SID

جنسی و رشد آنها بی تاثیر نیست(۲،۱). مکانیسم تاثیر عنصر روی در بدن انسان و دیگر موجودات عمدتا از طریق کوفاکتور بودن این عنصر برای آنزیم‌های موثر در ساخت اسیدهای نوکلئیک و متابولیسم پروتئین‌ها چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها است(۳). نقش روی به علت تکثیر سریع سلول‌ها در سیستم ایمنی از بقیه سیستم‌های مختلف بدن، مهم‌تر است(۴،۵،۶).

مطالعـــه‌هـــای Martin و همکـــاران (۱۹۹۱) در آزمایشگاه بر رشد و میزان سلول‌های زنده راجی[1] ومولت –۴ نشان داد که هرگاه سلول‌های مذکور در محیط کشت فاقد روی کشت داده شوند، ظرفیت رشد و تکثیر خودرا از دست می‌دهند. اما درحضورآن (تا ۵۰ میکرومولار)، تعداد کل سلول‌ها و میزان مرگ و میر یا بیمارگنی[2] سلول‌های مذکور در هر دو گروه آزمون و شاهد یکی بود(۷). در یک مطالعه دیگر صرفا بر روی رده سلولی مولت-۴ ، Michiko و همکاران (۲۰۰۰) پی بردند که بعد از ۴۸ ساعت انکوبه سلول‌های مولت-۴ در حضور غلظت‌های ۱۰۰ میکرومولار و ۲۰۰ میکرومولار از عنصر روی، تعداد سلول‌های زنده به ترتیب ۸۵ و ۱۰ درصد است(۸).

مطالعات محدودی در ارتباط با اثر غلظت‌های مختلف روی بر رده سلولی در محیط آزمایشگاهی انجام شده است و با توجه به این که تا کنون در ایران مطالعه ای در رابطه با این موضوع انجام نگرفته است، در این مطالعه با توجه به امکانات موجود، اثرات احتمالی سمیت سلولی روی بر سلول‌های مذکور در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. سپس بین مشاهدات آزمایشگاهی به دست آمده در این مطالعه با آنچه که در داخل بدن توسط محققین مختلف گزارش شده است، تطبیق به عمل آمد. در نهایت این که 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 ها

در این مطالعه که نوعی تحقیق تحلیلی و بنیادی است، ابتدا محلول کلرید روی ۱ مولار با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شد و از آن غلظت‌های ۱ میکرومولار تا ۵۰۰ میکرومولار تهیه گردید.

سپس در شرایط استریل ودر زیر هود بیولوژیک از سلول‌های راجی و مولت-۴ (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، سوسپانسیون که تعداد سلول‌های زنده آن بیش از ۹۷ در صد بود تهیه گردید؛ بدین منظور در زیر هود و شرایط استریل 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. سلول‌هایی که در زیر میکروسکوپ غشا، آنها سالم بود زنده و سلول‌هایی 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.

$$\text{درصد سلول‌های زنده} = \frac{\text{تعداد کل سلول‌های زنده و مرده}}{\text{تعداد سلول‌های زنده}} \times ۱۰۰$$

درمرحله بعدحدود۷۵ میکرولیتر ازاین سوسپانسیون که معادل ۱۵۰۰۰ سلول بود برداشته و به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای انتقال داده شد. در مرحله بعد به تمام چاهک‌ها به استثنائ چاهک‌های شاهد، ۱۰ میکرولیتر هم از غلظت‌های مختلف روی (۱ میکرو مولار تا ۵۰۰ میکرو مولار) اضافه گردید.

1. Raji=B-lymphoid cell line
2. Morbidity rate

www.SID.ir

Archive of SID

حجم نهایی همه چاهک‌ها با استفاده از محیط کشت RPMI-1640 به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس در زیر هود با حرکت ملایم و دورانی دست چاهک‌های پلیت مخلوط گردیدند، تمامی چاهک‌ها از نظر این که به آنها سوسپانسیون سلولی اضافه شده باشد و مطمئن باشیم که سلول ها قبل از انکوباسیون زنده و سرحال هستند، با میکروسکوپ معکوس[1] کنترل گردیدند. بعد از تمامی مراحل فوق بلافاصله پلیت‌های کشت سلولی در انکوباتور حاوی ۵ درصد 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 تکنیک 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 یارشد سلول‌ها نیز بررسی گردیدند.

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

تکنیک فلورسانس:

اساس کار:

شاید بتوان گفت که رنگ‌آمیزی فلور سانس و شمارش سلول‌ها در زیر میکروسکوپ اگر با دقت انجام شود، ساده‌ترین و سریع‌ترین وسیله برای تشخیص سلول‌های 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 سلول‌های زنده جذب می‌شود. اکریدین اورنج وارد DNA سلول زنده می‌شود و در زیرمیکروسکوپ یک نمای سبز رنگ به کرومایتن سلول زنده می دهد.

اما اتیدیوم بروماید فقط سلول‌های مرده را رنگ می‌کند. اتیدیوم بروماید وارد DNA سلول مرده شده و در زیر میکروسکوپ فلورسانس رنگ نارنجی به کروماتین سلول مرده می‌دهد(۹).

در نهایت با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید- آکریدین اورنج سلول‌های زنده، سبز رنگ و غیر زنده، نارنجی تا قهوه‌ای رنگ دیده می‌شود.

روش کار:

برای این منظور ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اکریدین اورنج را به همراه ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم برو ماید 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 سو سپانسیون سلولی مخلوط نموده و از این مخلوط ۱۰ میکرولیتر روی یک لام تمیز ریخته و روی آن را با لامل می‌پوشانیم. سپس با عدسی X ۴۰ یا X ۶۰ 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 ازآنالیز واریانس و متعاقب آن آزمون دانت تجزیه وتحلیل گردید.

یافته‌ها

نتایج بررسی میزان مرگ و میر سلول‌ها جهت سهولت در مطالعه آن به صورت درصد سلول‌های زنده در جداول ۱ تا ٤ آمده است.

1. Invert

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱: نتایج اثر غلظت‌های مختلف روی بر زنده بودن سلول راجی ومولت-٤ پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون

روی(میکرومولار)	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	٤۰۰	۵۰۰	شاهد
درصد زنده ماندن سلول‌ها	۹۵	۹٤	۹٤	۹۳	۸۲	۷۵	٦۹	٦۸	۹۷
ارزش -P*	۰/۸۸۳	۰/۸۵۰	۰/۸٤۱	/۷٤۲	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	—

جدول شماره ۲: نتایج اثر غلظت‌های مختلف روی بر زنده بودن سلول راجی ومولت-٤ پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون

روی(میکرومولار)	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	٤۰۰	۵۰۰	شاهد
درصد زنده ماندن سلول‌ها	۹۵	۹۵	۹٤	۹۳	۷۸	۵۲	۲۰	۱۸	۹٦
ارزش -P	۰/۸۸۳	۰/۸۸۳	۰/۸۵۰	۰/۷٤۲	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	-

جدول شماره ۳: نتایج اثر غلظت‌های مختلف روی بر زنده بودن سلول راجی ومولت-٤ پس از ٤۸ ساعت انکوباسیون

روی(میکرومولار)	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	٤۰۰	۵۰۰	شاهد
درصد زنده ماندن سلول‌ها	۹٤/۱	۹٤	۹۳/۷	۹۳/۵	۲۷	۲۰	۱۵	۱۰	۹۵
ارزش -P	۰/۸۵۰	۰/۸٤۱	۰/۸۵۰	۰/۸۱۰	</۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	—

جدول شماره ٤: نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف روی بر زنده بودن سلول راجی ومولت-٤ پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون

روی(میکرومولار)	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	٤۰۰	۵۰۰	شاهد
درصد زنده ماندن سلول‌ها	۹۲/۹	۹۲/۷	۹۲/۵	۹۲/۲	۱۵	۱۰	۱۲	۵	۹٤
ارزش -P	۰/۷۸۸	۰/۷۸۰	۰/۷۵۰	/۷۲۰۰	۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	—

از لحاظ آماری معنی دار است ۰/۰۵ > ارزش -P*

با توجه به جداول نامبرده سلول‌های راجی و مولت-٤ در غلظت‌های پایین روی یعنی تا ۱۰۰ میکرو مولارو 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 روی با درصد زنده بودن سلول‌های شاهد در همان ساعت تفاوت معنی‌داری نداشت. آزمون آماری نشان داد که میزان درصد زنده بودن سلول‌های راجی و مولت-٤ درفواصل زمانی مختلف (۱۲ تا ۷۲ ساعت) و در اثر غلظت‌های پایین روی یعنی ۱میکرو مولار تا ۱۰۰ میکرو مولار با میزان درصد زنده بودن سلول‌های شاهد همان ساعت و ساعت‌های دیگر انکوباسیون تفاوت معنی‌داری ندارد.

اما درصد سلول‌های زنده مذکور در غلظت‌های ۲۰۰ میکرو مولار تا ۵۰۰ میکرو مولار با درصد زنده سلول‌های شاهد همان ساعت تفاوت معنی داری دارد؛ به طوری که در غلظت ۵۰۰ میکرو مولار پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، درصد سلول‌های زنده به ۵ درصد رسید($p<۰/۰۵$).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

یافته‌های حاضر در مقایسه با نتایج Martin و همکارانش (۱۹۹۱) تفاوت معنی داری را نشان نداد؛ به طوری که در هر دو مطالعه در شرایط آزمایشگاهی و در حضور ۵۰ میکرو مولار روی پس از ٤٨ ساعت انکوبه میزان زنده ماندن سلول‌ها بالای ۹٤ درصد بود(۷). مطالعه دیگری که توسط Michiko و همکارانش (۲۰۰۰) با تکنیک فلوسایتومتری به عمل آمده نشان داد که روی تا ۱۰۰ میکرومولارتاثیر سمیت سلولی بر مولت-٤ ندارد اما پس از ۱۲ ساعت در حضور غلظت‌های بالاتر، تاثیر سمی روی معلوم می‌شود(۸).

یافته‌های این مطالعه با استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسانس با نتایج MIchiko و همکارانش (۲۰۰۰) تفاوت معنی‌داری نداشت. محقق مذکور اشاره می‌کند که روی باعث القاء آپوپتوزیس و نکروزیس در مولت-٤ می‌شود. اما در این مطالعه با تکنیک فلورسانس دقیقا امکان ارزیابی نوع مرگ سلولی وجود نداشت. لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌ای دیگر با استفاده از آزمون‌های مولکولی به آن پرداخته شود.

مطالعه موجود برای اولین بار در ایران و در دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. مطالعات اندکی بر سلول‌های راجی و مولت-٤ به عمل آمده است. یافته‌های Treves همکارانش (۱۹۹٤) از مطالعه تاثیر روی بر لنفوسیت‌های طبیعی انسانی در آزمایشگاه نشان داد که روی یک تنظیم کننده آپوپتوزیس است(۱۰). همچنین مطالعات Iguchi و همکارانش (۱۹۹۸) نشان داد که روی در غلظت ۱۰۰ میکرو مولار تا ۳۰۰ میکرو مولار به طور نسبی باعث القاء نکروزیس در سلول‌های کارسینومای پروستات انسانی می‌شود(۱۱).

تطبیق یافته‌های به دست در این مطالعه با یافته‌های سایر محققین (در آزمایشگاه و در داخل بدن انسان) نشان می‌دهد که روی در غلظتی معادل ۱۰ برابر سطح فیزیولوژیک پلاسمایی بر سلول‌های مختلف بویژه در این مطالعه بر راجی و مولت-٤ تاثیر سمیت سلولی دارد. ترکیبات روی بر رده سلولی راجی و مولت-٤ دارای اثر سمیت سلولی وابسته به دوز بوده و احتمالا در آینده بتوان از آن درتنظیم سیستم ایمنی استفاده نمود. هیچ نوع تفاوتی بین میزان حساسیت سلول‌های راجی ومولت-٤ نسبت به‌عنصر روی درآزمایشگاه دراین‌مطالعه دیده‌نشد.

فهرست منابع

1. Hotz C, Lowe NM, Araya M, Brown KH. Assessment of the trace element status of individuals and populations: the example of zinc and copper. ***J Nutr.*** 2003 May; 133(5 Suppl 1): 1563S-8S.
2. Muller O, Garenne M, Reitmaier P, Van Zweeden AB, Kouyate B, Becher H. Effect of zinc supplementation on growth in West African children: a randomized double-blindplacebo-controlled trial in rural Burkina Faso. ***Int J Epidemiol.*** 2003 Dec; 32(6): 1098-102.
3. Bhatnagar S, Natchu UC. Zinc in child health and disease. ***Indian J Pediatr.*** 2004 Nov; 71(11): 991-5.
4. Lothar R, Philip G. Zinc and Immune System procedings of the Nutrition Socicty, ***J Nutr.*** 2000; 59: 541-552.

www.SID.ir

Archive of SID

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 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 in dependent of intracelluar 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 and identification of proteins increased in association with this induction. ***Eur. j. Biochem.*** 1998; 253: 766-770.

www.SID.ir