Archive of SID

مقالهٔ پژوهشی

تأثیر احتمالی سمیت سلولی عنصر روی بر سلول‌های رده لنفوئیدی مولت ـ 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 به‌منظور بررسی تأثیر احتمالی سمیت سلولی عنصر روی بر سلول‌های ـ T (مولت ـ۴) در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است .

مواد و روش : با استفاده از روش کشت سلولی سلول رده لنفوئیدی مولت ـ۴ در شرایط آزمایشگاهی در مجاورت غلظت‌های مختلف روی در زمان‌های متفاوت (۱۲ تا ۷۲ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد Co2 انکوبه گردید. آنگاه میزان زنده ماندن و رشد سلول‌ها با رنگ‌آمیزی فلورسانس (رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید- آکریدین اورنج) بررسی شد. نتایج به‌دست 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 نتیجه گیری : ترکیبات روی بر رده سلولی مولت ـ۴ دارای اثر سمیت سلولی وابسته به دوز بوده و احتمالاً بتوان از آن در آینده در تنظیم سیستم ایمنی استفاده نمود.

گل‌واژگان : روی، سلول مولت ـ۴ ، سمیت سلولی ، کشت سلولی

مجلهٔ پزشکی ارومیه، سال چهاردهم، شمارهٔ 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

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مطالعات انجام شده در داخل بدن[1] توسط محققان مختلف نشان می‌دهد که روی در فعالیت بیش از ۳۰۰ نوع آنزیم و در متابولیسم اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، پروتئین‌ها و غیره دخالت دارد(۳، ۱). نقش روی به‌علت تولید و تخریب سریع سلول‌ها در سیستم ایمنی از بقیه سیستم‌های مختلف بدن بارزتر است (۶، ۴).

مطالعات مارتین[2] و همکاران در آزمایشگاه بر رشد و میزان سلول‌های زنده راجی و مولت ـ۴[3] نشان داد که هر گاه سلول‌های مذکور در محیط کشت فاقد روی ، کشت داده شوند، ظرفیت رشد و تکثیر خود را از دست می‌دهند. اما در حضور آن (تا ۵۰ میکرومولار)، تعداد کل سلول‌ها 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 ـ۴ میچیکو[4] و همکاران پی بردند که بعد از ۴۸ ساعت انکوبه سلول‌های مولت ـ۴ در حضور غلظت‌های ۱۰۰ میکرومولار و ۲۰۰ میکرومولار از عنصر روی، تعداد سلول‌های زنده به‌ترتیب ۸۵ درصد و ۱۰ درصد است(۸).

مطالعات محدودی در ارتباط با اثر غلظت‌های مختلف روی بر رده سلولی در محیط آزمایشگاهی انجام شده است ، با توجه به این‌که تاکنون در ایران مطالعه‌ای 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 سلول‌های مذکور در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دهد. سپس بین مشاهدات آزمایشگاهی به‌دست آمده در این مطالعه با آنچه که در داخل بدن توسط محققان مختلف گزارش شده است تطبیق به‌عمل 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

این مطالعه نوعی تحقیق تحلیلی ـ توصیفی 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 و در زیر هود بیولوژیک از سلول‌های مولت ـ۴ (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، سوسپانسیون که تعداد سلول‌های 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. سلول‌های که در زیر میکروسکوپ 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 = ۱۰۰ × تعداد کل سلول‌های زنده و مرده/ تعداد سلول‌های زنده

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

---

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

www.SID.ir

Archive of SID

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 سرحال هستند، با میکروسکوپ معکوس[1] کنترل گردیدند. بعد ازتمامی مراحل فوق بلافاصله پلیت‌های کشت سلولی در انکوباتور حاوی ۵ درصد گاز دی اکسیدکربن 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 اتیدیوم بروماید 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 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 زیر میکروسکوپ یک نمای سبز رنگ به کرومایتن سلول زنده می‌دهد.

اما اتیدیوم‌بروماید فقط سلول‌های مرده را رنگ می‌کند. اتیدیوم‌بروماید 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 ـ آکریدین اورنج سلول‌های زنده سبزرنگ و غیر زنده نارنجی تا قهوای رنگ دیده می‌شود.

برای این منظور ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اکریدین اورنج را به همراه ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید را به نسبت مساوی در ۱ میلی‌لیتر محلول (فسفات ـ بافر ـ 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[2] و یا سمیت سلولی بعمل آمد که نتایج آنها در نمودار- ۱ آمده است.

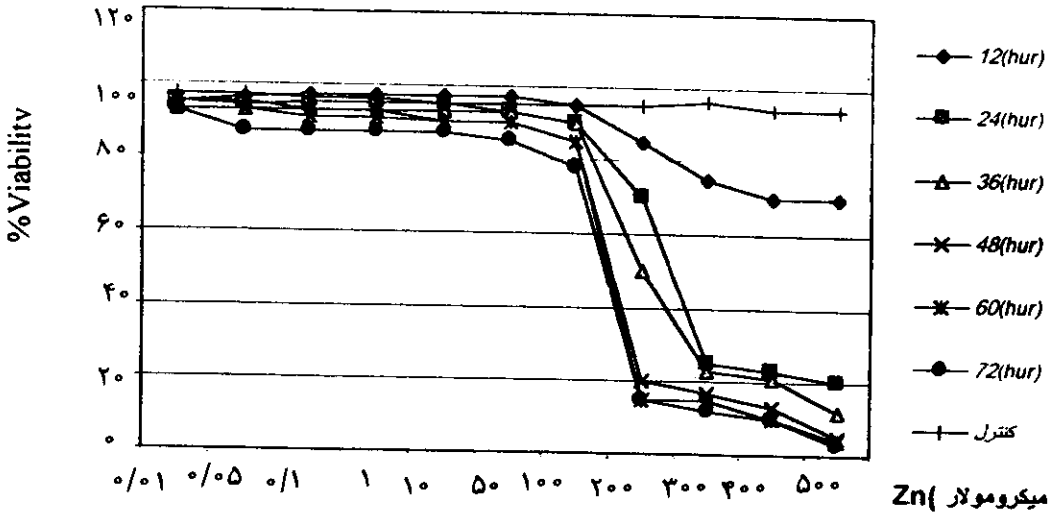
با توجه به نمودار-۱ سلول‌های مولت ـ۴ در غلظت‌های پایین روی یعنی تا ۱۰۰ میکرومول و در فواصل زمانی مختلف، از میزان زنده بودن بسیار بالائی برخوردار می‌باشند. به‌طوری‌که درصد سلول‌های زنده در گروه آزمون در اثر غلظت‌های متفاوت

1- Invert

2- Viability

www.SID.ir

Archive of SID



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

روی با درصد زنده بودن سلول‌های شاهد در همان ساعت تفاوت معنی‌داری نداشت. آزمون آماری نشان داد که میزان درصد زنده بودن سلول‌های مولت ـ۴ در فواصل زمانی مختلف (۱۲ تا ۷۲ ساعت) و در اثر غلظت‌های پایین روی یعنی ۰/۰۱ میکرولیتر تا ۱۰۰ میکرولیتر با میزان درصد زنده بودن سلول‌های شاهد همان ساعت و ساعت‌های دیگر انکوباسیون تفاوت معنی‌داری ندارد.

اما درصد سلول‌های زنده مذکور در غلظت‌های ۲۰۰ میکرولیتر تا ۵۰۰ میکرولیتر با درصد زنده سلول‌های شاهد همان ساعت تفاوت معنی داری دارد. به‌طوری‌که در غلظت ۵۰۰ میکرولیتر پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، درصد سلول‌های زنده به ۵ درصد رسید ($p<0/05$).

بحث

یافته‌های ما در مقایسه با نتایج مارتین و همکارانش تفاوت معنی‌داری 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 سلول‌ها بالای ۹۴ درصد بود(۷). در

www.SID.ir

Archive of SID

مـطالعه دیگـر کـه تـوسط مـیچیکو و هـمکارانش بـا روش فلوسایتومتری به‌عمل آمده نشان داد که روی تا ۱۰۰ میکرولیتر تأثیر سمیت سلولی بر مولت ـ۴ 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 ـ۴ 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 بـار در ایـران و در دانشگـاه تـربیت مدرس انجام گرفت. مطالعات اندکی بـر سـلولهای مـولت ـ۴ به‌عمل آمده است. یافته‌های تروز[1] همکارانش از مطالعه تأثیر روی بر لنفوسیت‌های طبیعی انسان در آزمایشگاه نشان داد که روی یک تنظیم کننده آپوپتوز است(۱۰). هـمچنین مـطالعات ایگوچی[2] و همکارانش نشان داد که روی در غلظت ۱۰۰ میکرو لیتر تا ۳۰۰ میکرو لیتر بطور نسبی باعث مرگ در سـلول‌های کارسینومای پروستات انسانی می‌شود(۱۱).

تطبیق یافته‌های به دست در ایـن مـطالعه یـا یـافته‌های سـایر محققان (در آزمایشگاه و در داخل بدن انسان) نشان می‌دهد که روی در غلظتی معادل ۱۰ برابر سطح فیزیولوژیک پلاسمائی بر سلول‌های مختلف به‌ویژه در این مـطالعه بـر مـولت ـ۴ تأثـیر سمیت سلولی دارد. تـرکیبات روی بـر رده سـلولی مـولت ـ۴ دارای اثر سمیت سلولی وابسته به دوز بوده و احتمالا بتوان از آن در آینده در تنظیم سیستم ایمنی استفاده نمود.

سپاسگزاری :

در پایان از آقای مسعود سلیمانی و کـارکنان آزمـایشگاه گـروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس تقدیر و تشکر می‌نماییم.

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 Metallobiochmistry 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; 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 monomuclear 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 Monomuclear cells and Separated monocytes. Lymph Cyt Res, 1994, 13:15-20.
7. Martin SJ, Mazdai G, Strain J, Cotter T:

1. Treves
2. Iguchi

www.SID.ir

Archive of SID

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: Cll 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 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.

www.SID.ir