Downloaded from journal.gums.ac.ir at 20:53 IRDT on Monday July 30th 2018

مقایسهٔ اثر روی (Zn) بر زنده ماندن و شکل ظاهری سلول های ردهٔ لنفوئیدی Raji و Molt-4

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: مطالعهٔ موجود به منظور بررسی اثرهای احتمالی Zn بر زنده ماندن و شکل ظاهری سلولهای رده لنفوئیدی B (Raji) و T(Molt-4) در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

مواد وروش ها: با استفاده از تکنیک کشت سلولی (Cell-culture)سلول Raji وMolt-4 در شرایط آزمایشگاهی یکسان در مجاورت غلظت های مختلف عنصرZn در زمان‌های متفاوت در انکوباتور قرارداده شد و درانتهای زمان انکوباسیون میزان زنده ماندن و شکل ظاهری سلول‌ها با استفاده از آزمایش تریپان بلوو رنگ آمیزی رایت - گیمسا موردبررسی 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 داده‌ها 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 μM ۱۰۰ در ساعات مورد مطالعه ۱۲ تا ۷۲ وجود نداشت. به طوری که میزان زنده ماندن سلول‌ها درگروه آزمون وگروه شاهد هردو رده سلولی بالای ۹۰ درصد بود. در صورتی که در غلظت‌هایμM ۲۰۰ تا μM ۵۰۰ بعد از ۱۲ ساعت انکوباسیون ،میزان زنده ماندن سلول‌ها به۸۲ درصد و بعد از ۲٤ ساعت انکوبه به کمتر از ۵۰ درصد کاهش یافت($p < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که Zn تا غلظت μM ۱۰۰ و در زمان‌های انکوباسیون متعدد بر روی ردهٔ سلولی Raji وMolt-4 اثر سمی بر زنده ماندن سلول‌ها ندارد. اما در غلظت μM ۲۰۰ در آزمایشگاه اثر سمی داشته و با افزایش غلظت و زمان انکوباسیون بر شدت اثر آن روی سلولMolt-4 و Raji افزوده شد. لذا باحتمال می‌توان از ترکیبات Zn در تنظیم سیستم ایمنی استفاده نمود.

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

مقدمه

مطالعات انجام شده درداخل بدن انسان (Invivo) نشان داده که روی(Zn) برای فعالیت و ساختار بیش از ۳۰۰ نوع آنزیم اساسی است(۱و 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 سیستم‌های مختلف بدن مهمتر و بارزتر است. کمبود Zn و یا مسمومیت با Zn، باعث اختلال در سیستم‌های بیولوژیک می‌شود(۷-۳).

مطالعاتS.J.MARTIN و همکارانش در آزمایشگاه بر تکثیر، و درصد سلولهای زنده Raji وMolt-3 نشان داد که هرگاه سلول‌های مذکور در محیطی مغذی اما فاقد Zn کشت داده شوند، ظرفیت رشد و تکثیر خود را از دست می‌دهند. اما درحضور Zn (تا μM ۵۰)، تعداد کل سلول‌ها و میزان زنده ماندن سلول‌های مذکور در

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 20:53 IRDT on Monday July 30th 2018

هر دو گروه آزمون و شاهد با هم برابر بود(۷). در یک مطالعه دیگر توسطH Michiko وهمکارانش برروی‌سلول‌های Molt-4 نتیجه گرفتند که بعد از ٤٨ ساعت انکوباسیون سلول‌های Molt-4 در حضور غلظت‌های μM ۱۰۰ و μM ۲۰۰ از عنصر Zn، تعداد سلول‌های زنده به ترتیب ۸۵ درصد و ۱۰ درصد است و در مجاورت با غلظت μM ۳۰۰، بعداز ۱۲و۲٤ 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 مورداثرZn بر روی سلول‌های با منشا رده لنفوئیدی B (Raji) و یک مورد برروی سلول‌های Molt-4 یافت گردید که در فوق ذکر گردیده‌اند.

هدف ازانجام این مطالعه: مطالعات محدودی در ارتباط با اثرغلظت‌های مختلف Zn بر رده‌سلولی Molt-4 وRaji (Raji: B- Lymphoid Cell Line) در محیط آزمایشگاهی انجام شده است. باتوجه به اینکه تاکنون در ایران مطالعه‌ای در رابطه با این موضوع انجام نگرفته است، برآن شدیم با توجه به امکانات موجود، اثرات احتمالی Zn را بر زنده ماندن و شکل ظاهری سلول‌های بدخیم Raji وMolt-4 (Molt-4=T- 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 ـ ایمنی (Immune Modulation) استفاده نمود.

مواد وروش‌ها

این مطالعه از نوع تحلیلی ـ مقایسه‌ای است. ابتدا محلول‌های موردنیاز ازجمله محلول کلرید روی(2 Zncl) و محلول محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FCS۳ (سرم گوساله جنینی FCS: Fetal Cell Serum) تهیه گردیدند. محلول کلرید روی با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون استریل، و ازآن غلظت‌هایμM ۰/۰۱ تا μM ۵۰۰ تهیه شد و صحت این غلظت‌ها بادستگاه اتمیک ابزوربشن کنترل گردید. سپس در شرایط استریل ودر زیر هود بیولوژیک از سلول‌های Raji و Molt-4 (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، سوسپانسیونی که تعداد سلولهای زنده آن بیش از ۹۷ در صد بود تهیه شد، در مرحله بعد حدود ۷۵ میکرولیتر از این سوسپانسیون‌ها (که معادل ۱۵۰۰۰ سلول بود) برداشته وبه چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای انتقال داده شدند. در مرحله بعد به تمام چاهکها به استثنائ چاهک های شاهد (این چاهک ها صرفاً حاوی سلول های مذکور و محیط کشت RPMI-1640 بود) ۱۰ میکرو لیتر از غلظت های 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 دورانی‌دست 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 انکوباتور حاوی 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 هرده

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 20:53 IRDT on Monday July 30th 2018

سلولی مورد مطالعه ۳ چاهک برای بررسی تعداد سلولها و میزان زنده بودن آنها با استفاده از لام نئوبار و رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده شد و ۳ چاهک نیز برای تعیین مورفولوژی سلول‌های مذکور با استفاده از رنگ آمیزی رایت ـ گیمسا بررسی شد.

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

الف ـ بررسی میزان زنده‌ماندن سلول‌ها درحضور 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 ودر زیر هود و شرایط استریل به روش زیر مطالعه گردیدند. از هر چاهک ۳۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی برداشته با ۳۰ میکرولیتر از محلول ۰/٤ 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 در صد زنده ماندن سلولها محاسبه گردید.

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

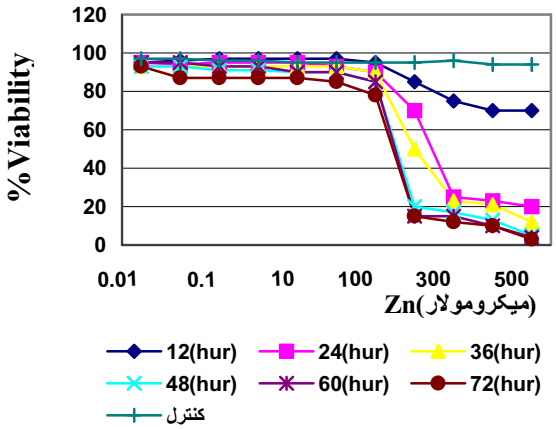
درضمن با شمارش تعداد سلول‌های زنده در انتهای انکوباسیون در گروههای آزمون و مقایسه با تعداد سلول‌های زنده در گروههای شاهد همان ساعات مورد مطالعه، تکثیر ورشد سلولها نیز بررسی گردیدند.

ب- بررسی اثر**Zn** بر شکل ظاهری سلول‌ها با رنگ‌آمیزی رایت-گیمسا: (**Wright-Gimsa,Staning**) پس از اینکه پلیت‌ها در انتهای فواصل زمانی (۱۲تا۷۲ 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) تهیه‌گردید.در مرحله بعد به میزان ۱میلی‌لیتر و به مدت ۵ دقیقه رنگ رایت-گیمسا بر روی لام ریخته، سپس به‌میزان ۰/۵میلی لیتر و به مدت ۱۰دقیقه بافر رایت روی لام حاوی رنگ اضافه نموده، سپس به مدت ۱۰-۱۵ ثانیه لام با آب معمولی شتشو 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 وآزمون دانت) تجزیه وتحلیل شده است در زیر آمده است.

نتایج

درانتهای زمان‌های معین انکوباسیون سلولها از هر غلظت به صورت سه تائی 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.



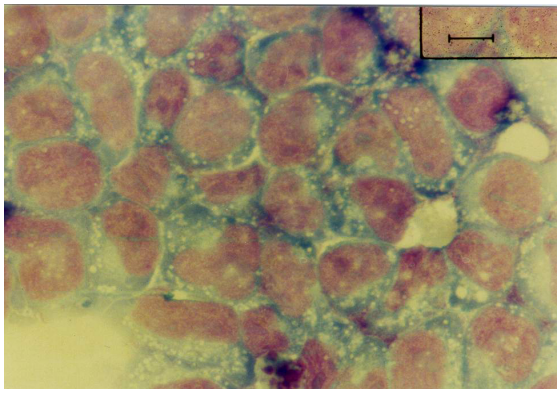
نمودار۱: نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف **Zn** بر روی سلول **Raji** در فواصل زمانی مختلف(**Trypan blue exclusion dye**)

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

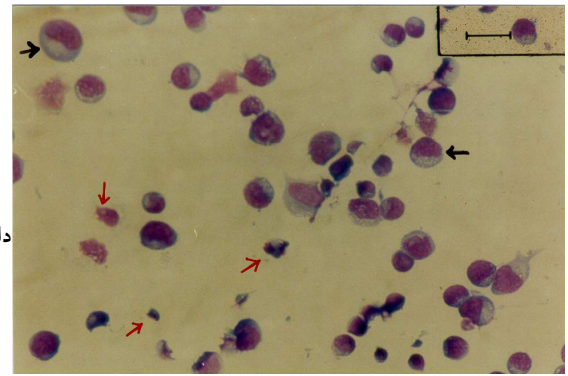
Downloaded from journal.gums.ac.ir at 20:53 IRDT on Monday July 30th 2018

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 μM ۰/۰۱ تا μM ۱۰۰ با درصد زنده بودن سلول‌های شاهد همان ساعت و ساعت‌های دیگر انکوباسیون تفاوت معنی‌داری ندارد. اما درصد سلول های زنده مذکور در غلظت‌های μM ۲۰۰تا μM ۵۰۰ با درصد زنده سلول‌های شاهد همان ساعت تفاوت معنی‌داری دارد($p<۰/۰۵$). بطوریکه در غلظت μM ۵۰۰ پس از ۱۲ ساعت به ۸۲ درصدو پس از۷۲ ساعت انکوباسیون میزان سلول‌های زنده به ۵ درصد رسید. باتوجه به نتایج بسیار مشابه که جهت سلولهای Molt-4 تحت همین شرایط به دست آمد از ذکر توضیحات و نمودار اجتناب می شود.



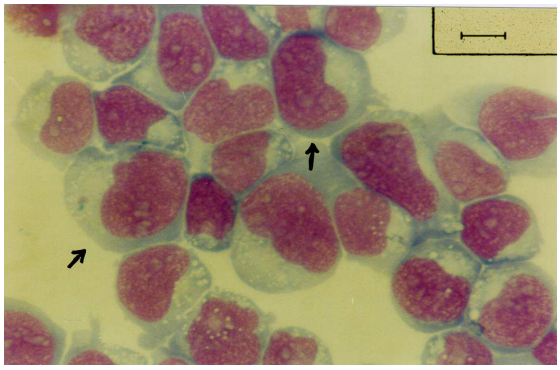
شکل۱:سلول‌های بدخیم Raji (شاهد) رنگ‌آمیزی:رایت – گیمسا
سلول های شاهد Raji زنده اندازه سلولی مختلف، سیتوپلاسمی آبی رنگ و واکوئله دارند (شکل –۱)



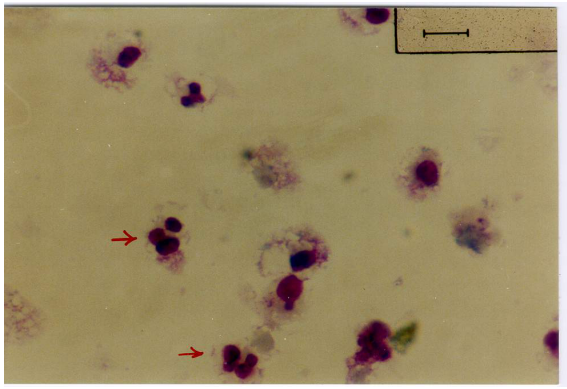
شکل۲: سلول‌های بدخیم **Raji** (در ساعت ۷۲ / μm ۲۰۰ عنصر **Zn**) رنگ آمیزی :رایت – گیمسا

همانطوریکه در شکل –۱ دیده می شود 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.



شکل۳: سلول‌های بدخیمMolt-4(شاهد)رنگ‌آمیزی:رایت- گیمسا



شکل٤:سلول‌های بدخیمMolt-4 (درساعت۱۲/ μm ۲۰۰عنصرZn)
رنگ آمیزی :رایت ـ گیمسا

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به دست 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 µM ۱۰۰ هیچگونه تأثیر سمی بر زنده‌ماندن سلول‌های Raji وMolt-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 µM ۱۰۰ 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 µM ۲۰۰ تا µM ۵۰۰ در فواصل زمانی ۱۲ تا ۷۲ ساعت تاثیر چشمگیری بر میزان زنده بودن سلول‌های وMolt-4Raji داشت.بعداز ۱۲ ساعت انکوباسیون این سلول‌ها در حضورµM ۲۰۰عنصر Zn، خاصیت‌سمیZnآشکار گردید. و میزان سلول‌های زنده Rajiبه حدود ۸۲٪ و سلولهای Molt-4به۸۵٪ 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 زنده‌بودن سلول‌ها درگروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند. در غلظت µM ۲۰۰ علاوه بر کاهش معنی‌دار در میزان سلول‌های زنده، بین تکثیر سلول‌ها نیز در گروهای آزمون و شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید. وهرچه زمان انکوباسیون را بیشتر گرفتیم و غلظت Zn را افزایش دادیم‌اثرسمی‌آن بر روی سلول‌های مورد مطالعه بیشتر شد، به طوری که پس‌از ۷۲ساعت‌انکوباسیون‌درحضورµM ۵۰۰ تعدادسلول‌های زنده در هردو 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 رسپتور اینترلوکین یک(IL-1)

همراه کیناز می‌شود(۹).

روی (Zn) در غلظت های µM ۰/۰۱ تا µM ۱۰۰ تأثیری بر شکل ظاهری سلول‌های مذکور نداشت. اما در ساعت ۱۲ و با غلظت µM ۲۰۰ 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، هستهٔ سلولی متراکم و یا قطعه قطعه شده بود. مطالعاتشکل ظاهری سلول‌ها نیز القا

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 20:53 IRDT on Monday July 30th 2018

مرگ سلولی توسطZn رادرسلولهایRajiوMolt-4 تاییدکرد.ولی مشخص‌نمودن نوع مرگ‌سلولی(نکروزیس یا آپوپتوزیس) القاشده توسط Zn نیاز به تست‌های مولکولی و فلوسیتومتری دارد که پیشنهاد می‌شود در مطالعات دیگری به آن پرداخته شود.

نتیجه گیری کلی: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که Zn در غلظتμM ۲۰۰ که بیش از ۸ برابر سطح فیزیولوژیک پلاسمائی آن است دارای اثر سمیت سلولی بر میزان زنده ماندن، رشدسلول‌ها(تکثیر سلولها)و شکل ظاهری سلولهای Raji و Molt-4 است. وبا افرایش غلظت Zn و زمان انکوباسیون برشدت آن افزوده می گردد وبین میزان حساسیت سلول‌های Raji وMolt-4به Znتفاوت معنی‌داری در این مطالعه دیده نشد.

منابع

1.Maret W. Jacob C, Vallee B, Fisher E. Inhibitory Sites in Enzymes: Zinc Removal and Reactivation by Thionein. Procedings: of the National Academy of Sciences U.S.A, 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. NewYork: Academic press, 1976: 346-361.

4. Lothar R, Philip G. Zinc and Immune System. Procedings 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,Schrommm AB, Seydel U,et al. Zinc Enhances Lypoplysacharide 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.

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 20:53 IRDT on Monday July 30th 2018

Materials and Methods: In this study, the cell line was exposed to different concentrations of Zinc (100µM to 500µM) followed by incubation (37ºC، 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 100µM of Zinc at different incubation time points had little to no effects on cell line when compared to the controls. Higher concentrations of Zinc (>100µM) 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

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 20:53 IRDT on Monday July 30th 2018