تأثیر روی بر زنده ماندن و شکل ظاهری سلول های رده لنفوئیدی راجی

حسن تکمه داشی * دکتر فرزانه اوسطی آشتیانی ** دکتر علی اکبر پور فتح الله ***

Effect of zinc on viability and morphology of Raji cell-line

H.Tokmehdashi F. Osati-Ashtiani A.A. Pourfathullah

Downloaded from journal.qums.ac.ir at 9:18 +0430 on Monday May 20th 2019

✱Abstract

Background: Zinc has important effects on structural and functional activities of many proteins and enzymes, specially regulation of immune system.

Objective: This study was carried out to examine the in vitro effects of different concentration of zinc on viability and morphology of Raji cell line.

Methods: In this study the cell line was exposed to different concentration of zinc(10nM to 500µM)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.

Findings: The results showed almost different responses to different amount of zinc by the Raji cells. less than 100µM at different incubation time points had no effects on cell line when compared to the controls. Higher concentrations of zinc (>100µM) viability diminished to 70% at 12 hrs and less than 50% at 24 hrs of incubation times .

Conclusion: We conclude that Zn has dose-dependent cytotoxic effect on Raji cells and probably application for immune-modulation.

Keywords: Zinc, Immune System, Cells, Cell Death, Raji Cell, Elements

✱چکیده

زمینه : عنصر روی در ساختار و عملکرد بسیاری از آنزیم ها و پروتئین ها شرکت می نماید و در سیستم ایمنی نقش بارزی دارد.

هدف : مطالعه به منظور تعیین اثر روی بر زنده ماندن و شکل ظاهری سلول های راجی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد وروش ها : این مطالعه تحلیلی- مقایسه ای در سال ۱۳۸۱ در دانشگاه تربیت مدرس با استفاده از روش کشت سلولی انجام شد. سلول راجی در شرایط آزمایشگاهی (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ٪۵ گاز دی اکسید کربن) در مجاورت غلظت های ۱۰ نانومولار تا ۵۰۰ میکرومولار روی در زمان های متفاوت (۱۲ تا ۷۲ ساعت) نگه داری شد. میزان زنده ماندن ورشد سلول ها با آزمایش تریپان بلوو شکل ظاهری آنها با رنگ آمیزی رایت- گیمسا بررسی شد. داده ها با آزمون های آماری دانت و واریانس تجزیه وتحلیل شدند.

یافته ها : بین میزان زنده ماندن و رشد سلول ها در گروه های آزمون و شاهد تا غلظت ۱۰۰ میکرومولار در ساعت های ۱۲ تا ۷۲ اختلاف معنی داری وجود نداشت، اما در غلظت های بیش از ۱۰۰ میکرومولار بعد از ۱۲ ساعت نگه داری، میزان زنده ماندن سلول ها و رشد آنها در گروه آزمون نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری یافت($p<۰/۰۵$).

نتیجه گیری : ترکیبات روی بر سلول های راجی اثر سمی وابسته به دوز دارد و می توان از آن برای تنظیم عملکرد سیستم ایمنی استفاده نمود.

کلید واژه ها : روی، دستگاه ایمنی، سلول ها، مرگ سلولی، سلول راجی، عناصر

* مربی و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان

** استادیار گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران

*** دانشیار گروه ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس

آدرس مکاتبه : همدان، بلوار شهید فهمیده، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پیراپزشکی، Email: ToKmeh@yahoo. Com

Downloaded from journal.qums.ac.ir at 9:18 +0430 on Monday May 20th 2019

*** مقدمه :**

مطالعه های انجام شده در داخل بدن(Invivo) توسط محققین مختلف نشان داده است که عنصرروی برای فعالیت و ساختار بیش از ۳۰۰ نوع آنزیم اساسی است.[۱و۲] روی در متابولیسم اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدرات ها، چربی ها، پروتئین ها و غیره دخالت دارد و نقش آن به علت تولید و تخریب سریع سلول ها در سیستم ایمنی از بقیه سیستم های مختلف بدن بارزتر است.[۳و۴و۵و۶]

مطالعه های مارتین وهمکاران در آزمایشگاه بر تکثیر و تعداد سلول های زنده راجی(Raji) مولت ۳– (Molt-3) واچ ال–۶۰ (HL-60) نشان داد که هرگاه سلول های مذکور در محیط فاقد روی کشت داده شوند، ظرفیت رشد و تکثیر خود را از دست می دهند، اما در حضور روی (تا ۵۰ میکرومولار) تعداد کل سلول ها و میزان زنده ماندن آنها در هر دو گروه آزمون و شاهد برابر بودند.[۷] دریک مطالعه دیگر بر رده سلولی مولت–۴ ، میچیکوو همکاران پی بردند که بعداز ۴۸ ساعت نگه داری سلول های نامبرده در حضور غلظت‌های ۱۰۰ و۲۰۰ میکرومولار روی، میزان سلول های زنده به ترتیب ۸۵ درصد و ۱۰ درصد است.[۸] با توجه به مطالعه های محدودی که در ارتباط با اثر غلظت های مختلف روی بر رده سلولی راجی در محیط آزمایشگاهی انجام شده است، این مطالعه با هدف تعیین اثرات احتمالی روی بر زنده ماندن و شکل ظاهری سلول های مذکور در محیط آزمایشگاهی انجام شد.

*** مواد و روش ها :**

این مطالعه تحلیلی- مقایسه ای در سال ۱۳۸۱ در دانشکده تربیت مدرس انجام شد. ابتدا محلول های مورد نیاز از جمله محلول کلرید روی (Zncl2) و محلول محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم گوساله جنینی تهیه شدند. محلول کلریدروی با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون استریل و از آن غلظت های۰/۰۱ تا ۵۰۰ میکرولیتر تهیه شد و صحت این غلظت ها با دستگاه اتمیک ابزوبشن کنترل شد. سپس در شرایط استریل و در زیر هود بیولوژیک از سلول های راجی (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، سوسپانسیون سلولی که میزان سلول های زنده آن بیش از۹۷ درصد بود، تهیه شد. در مرحله بعد حدود ۷۵ میکرولیتر از این سوسپانسیون که معادل۱۵۰۰۰ سلول بود برداشته و به چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای انتقال داده شد. سپس به تمام چاهک ها به استثنای چاهک های شاهد که فاقد روی بودند، ۱۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف روی اضافه شد. حجم نهایی همه چاهک ها با استفاده از RPMI-1640 به ۱۰۰ میکرو لیتر رسانده شد وچاهک های پلیت در زیر هود با حرکت ملایم و دورانی به خوبی مخلوط شدند. تمامی چاهک ها با میکروسکوپ معکوس(Invert) کنترل شدند. بلافاصله بعد از تمامی مراحل فوق پلیت های کشت سلولی در انکوباتور حاوی ۵ درصد گاز دي اکسیدکربن با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

در انتهای زمان معین از نگه داری سلول ها (فواصل زمانی ۱۲ تا ۷۲ ساعت) از هر غلظت مورد مطالعه ۳ تا چاهک برای بررسی تعداد سلول‌ها و میزان زنده ماندن آنها با استفاده از لام نئوبار و رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده شد. ۳ تا چاهک نیز برای بررسی تغییرات احتمالی شکل ظاهری سلول های مذکور با استفاده رنگ آمیزی رایت-گیمسا مورد بررسی قرار گرفت. جهت کاهش خطا، از غلظت های مختلف روی به دفعات زیاد کشت سلولی انجام شد.

Downloaded from journal.qums.ac.ir at 9:18 +0430 on Monday May 20th 2019

برای بررسی میزان زنده ماندن سلول ها در حضور مقادیر متفاوت روی از آزمایش تریپان بلو استفاده شد. بدین ترتیب که پس از اتمام زمان نگه داری، پلیت های کشت سلولی از انکوباتور ۳۷ درجه خارج شده و در زیر هود و شرایط استریل از هر چاهک ۳۰ میکرو لیتر سوسپانسیون سلول بر داشته و با ۳۰ میکرولیتر از محلول ۰/۴ درصد تریپان بلو مخلوط شد. سپس یک قطره از این مخلوط حد فاصل لام و لامل ریخته و در زیر میکروسکوپ نوری مطالعه شد. سلول هایی که در زیر میکروسکوپ بی رنگ بودند و غشاء آنها سالم بود زنده و سلول هایی که رنگ آبی گرفته و غشاء آنها چروکیده بود مرده در نظر گرفته شدند. سپس با استفاده از فرمول زیر درصد زنده ماندن سلول ها محاسبه شد.

$$\text{درصد سلول های زنده} = \frac{\text{تعدادسلول های زنده}}{\text{کل سلول های زنده و مرده}} \times ۱۰۰$$

در ضمن با شمارش تعداد سلول های زنده در انتهای مدت نگه داری در گروه های آزمون و مقایسه آن با تعداد سلول های زنده در گروه های شاهد همان زمان تکثیر (رشد سلول ها) نیز بررسی شد. بررسی تکثیر سلولی به آزمون های دقیق تری نیاز دارد که پیشنهاد می شود در مطالعه دیگری به آن پرداخته شود.

بررسی اثر روی بر شکل ظاهری سلول ها با رنگ آمیزی رایت- گیمسا بدین صورت بود که پس از بیرون آوردن پلیت ها در انتهای فواصل زمانی (۱۲تا۷۲ ساعت) با دستگاه سیتواسپین از هر غلظت مورد مطالعه، گسترش سلولی (لام) تهیه شد. در مرحله بعد۱میلی لیتر رنگ رایت- گیمسا به مدت ۵ دقیقه بر روی لام ریخته و ۰/۵میلی لیتر بافر رایت به مدت ۱۰ دقیقه به لام حاوی رنگ اضافه شد. سپس لام را به مدت۱۰ تا ۱۵ ثانیه با آب معمولی شستشو داده و پس از خشک نمودن، شکل ظاهری سلول ها، وضعیت هسته و سیتوپلاسم آنها بررسی شد.

داده هابا استفاده از نرم افزارSPSS و آزمون های آماری آنالیز واریانس و دانت تجزیه و تحلیل و معنی دار در نظر گرفته شد ($p<۰/۰۵$).

* یافته ها :

بررسی میزان سلول های زنده و سمیت سلولی نشان داد که سلول‌های راجی در غلظت‌های پایین روی یعنی تا ۱۰۰میکرومولار و در فواصل زمانی مختلف، از میزان زنده بودن (Viability) بسیار بالایی برخوردار هستند. به طوری که درصد سلول های زنده در گروه آزمون در اثر غلظت‌های متفاوت روی با درصد زنده بودن سلول‌های شاهد در همان ساعت تفاوت چشمگیری نداشت (جدول های شماره ۱ تا۴).

جدول ۱- اثر غلظت های مختلف روی بر زنده بودن سلول های راجی پس از ۱۲ساعت نگه داری

غلظت روی برحسب میکرومولار	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۱	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	شاهد
درصدزنده ماندن سلول ها	۹۷	۹۶	۹۵	۹۵	۹۴	۹۴	۹۳	۸۲	۷۵	۷۰	۷۰	۹۷
سطح معنی داری	۰/۹۹۵	۰/۹۹۰	۰/۸۹۱	۰/۸۸۳	۰/۸۵۰	۰/۸۴۱	۰/۸۳۰	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	_

Downloaded from journal.qums.ac.ir at 9:18 +0430 on Monday May 20th 2019

جدول ۲- اثر غلظت های مختلف روی بر زنده بودن سلول های راجی پس از ۲٤ ساعت نگه داری

غلظت روی برحسب میکرومولار	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۱	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	شاهد
درصدزنده ماندن سلول ها	۹۶	۹۶	۹۵	۹۵	۹۵	۹۴	۹۳	۷۸	۵۲	۲۰	۲۰	۹۶
سطح معنی داری	۰/۹۸۴	۰/۹۷۷	۰/۸۵۹	۰/۸۵۰	۰/۸۴۱	۰/۷۵۳	۰/۷۴۲	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	_

جدول ۳- اثر غلظت های مختلف روی بر زنده بودن سلول های راجی پس از ٤۸ ساعت نگه داری

غلظت روی برحسب میکرومولار	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۱	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	شاهد
درصدزنده ماندن سلول ها	۹۵	۹۵	۹۴/۲	۹۴/۱	۹۴	۹۳/۷	۹۳/۵	۲۷	۲۰	۱۵	۱۲	۹۵
سطح معنی داری	۰/۹۹۴	۰/۹۹۱	۰/۹۱۳	۰/۹۰۰	۰/۸۸۹	۰/۸۵۰	۰/۸۱۰	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	_

جدول ٤- اثر غلظت های مختلف روی بر زنده بودن سلول های راجی پس از ۷۲ ساعت نگه داری

غلظت روی برحسب میکرومولار	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۱	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	شاهد
درصدزنده ماندن سلول ها	۹۴	۹۳/۵	۹۳	۹۳	۹۲/۹	۹۲/۶	۹۲	۱۸	۱۵	۱۱	۱۰	۹۴
سطح معنی داری	۰/۹۹۰	۰/۹۵۰	۰/۹۲۰	۰/۹۱۴	۰/۹۰۳	۰/۸۹۱	۰/۸۶۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	_

آزمون آماری نشان داد که میزان درصد زنده بودن سلول‌های راجی در فواصل زمانی مختلف (۱۲ تا ۷۲ ساعت) و در اثر غلظت‌های پایین روی یعنی ۰/۰۱ تا ۱۰۰ میکرومولار با درصد زنده بودن سلول‌های شاهد همان ساعت و مدت های دیگر نگه داری تفاوت معنی داری نداشت، اما درصد سلول های زنده در غلظت‌های ۲۰۰ تا ۵۰۰ میکرومولار با درصد سلول‌های زنده شاهد همان ساعت تفاوت معنی دار داشت، به طوری که درغلظت ۵۰۰ میکرومولار پس از۷۲ ساعت نگه داری، درصد سلول های زنده به ۵ درصد رسید($p<۰/۰۵$).

*** بحث و نتیجه گیری :**

این مطالعه نشان داد که غلظت روی در فواصل زمانی مختلف نگه داری تا حد ۱۰۰ میکرومولار فاقد اثر سمی بر زنده ماندن سلول‌های راجی است. البته با افزایش زمان نگه داری و غلظت روی اثرات سمی آن مشخص می شود. مطالعه های به عمل آمده توسط محققین در آزمایشگاه یا در داخل بدن انسان، نشان می دهد که اساس مولکولی تأثیر سمی روی این است که احتمالاً این عنصر در غلظتی معادل ۸ برابر سطح فیزیولوژیک پلاسمایی خود باعث مهار اختصاصی گیرنده اینترلوکین یک همراه کیناز می شود.[۹]

روی در غلظت های ۰/۰۱ تا ۱۰۰ میکرومولار تأثیری بر شکل ظاهری سلول های راجی نداشت، اما در ساعت ۱۲ و با غلظت۲۰۰ میکرومولار تغییراتی در ردهٔ سلولی راجی مشاهده شد که در مقایسه با تصویر سلول‌های شاهد، غیر طبیعی به نظر می رسید، به طوری که پس از ۷۲ساعت در

حضور غلظت ۲۰۰ میکرومولار بیش از ۸۰ درصد سلول ها فاقد سیتوپلاسم و هستهٔ سلول ها متراکم یا قطعه قطعه شده بود. مطالعه شکل ظاهری سلول ها القا مرگ سلولی توسط روی را در سلول های راجی تأیید کرد.[۷] نتایج مطالعه های میچیکو در آزمایشگاه بر رده سلولی مولت-۴ که نوعی سلولT بدخیم است نشان داد که روی در غلظت بیش از ۱۰۰ میکرومولار باعث، مرگ سلول های مولت-۴ می شود.[۸] یافته های این مطالعه در مورد رده سلولی دیگر با منشأ سلولی راجی بسیار مشابه یافته های میچیکو بود. به عبارت دیگر تفاوت معنی داری بین میزان حساسیت سلول های راجی و مولت-۴ به ترکیبات روی در آزمایشگاه دیده نشد. مشخص نمودن نوع مرگ سلول های راجی (نکروزیس یا آپوپتوزیس) که توسط روی القا شده به آزمون های مولکولی و فلوسیتومتری نیاز دارد که پیشنهاد می شود در مطالعه های دیگر مورد توجه قرار گیرد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که روی در غلظت۲۰۰میکرومولار که بیش از ۸ برابر سطح فیزیولوژیک پلاسمایی آن است بر زنده ماندن، رشدسلول ها (تکثیر سلول ها) و شکل ظاهری سلول های راجی اثر سمی دارد و با افزایش غلظت روی و زمان نگه داری، برشدت آن افزوده می شود.

*** سپاسگزاری :**

بدین وسیله از همکاری سرپرست آزمایشگاه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس قدردانی می شود.

*** مراجع :**

1.Maret W, Jacob C, Vallee B, Fisher E. Inhibitory sites in enzymes: Zinc removal and reactivation by thionein. Proc Nati Acad Sci USA 1999; 96:1936-40

2.Vallee B, Galdes A. The Metallobiochemistry of Zinc enzymes. Adv Enzymol 1984; 56: 282-430

3.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

4.Lothar R, Philip G. Zinc and immune system. Proc Nutr Soc 2000; 59: 541-52

5.Spencer H, Osis D, Karmer. Trace elements in human health and disease. NewYork, Academic press, 1976, 346-61

6.Wellinghausen N, Fisher A, Kirchner H. Interaction of Zinc ion with human peripheral blood mononuclear cells. Cell Immunol 1996; 171: 255-61

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: 933-9

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: 3139-45

Downloaded from journal.qums.ac.ir at 9:18 +0430 on Monday May 20th 2019