

## مقایسه تاثیر سمیت عنصر روی بر سلول‌های رده لنفوئیدی راجی و مولت-۴ با تکنیک فلورسانس

\*حسن تکمه‌داشی (M.Sc.)

### چکیده

**سابقه و هدف :** عنصر روی (Zn) در حفظ سلامتی انسان و در 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-۴) در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

**مواد و روش‌ها :** با استفاده از تکنیک کشت سلولی، سلول‌های رده لنفوئیدی راجی و مولت-۴ در شرایط آزمایشگاهی در مجاورت غلظت‌های مختلف روی در زمان‌های متفاوت (۱۲ تا ۷۲ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در صد CO<sub>2</sub> 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 دات) 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 ساعت 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 ( $p < 0.05$ ).

**استنتاج :** ترکیبات روی بر رده سلولی راجی و مولت-۴ دارای اثر سمیت «وابسته به مقدار» بوده و احتمالاً در آینده می‌توان از آن در تنظیم سیستم ایمنی استفاده نمود.

**واژه‌های کلیدی :** روی، درصد زنده ماندن سلول‌ها، سلول راجی، مولت-۴، سمیت سلولی

### مقدمه

سبب اختلالات گوارشی، بیماری‌های قلبی و سیستم ایمنی می‌شود. سطح سرمی عنصر روی ۱۲-۱۶ میکرومولار در دسی‌لیتر است. روی در عملکرد بیش از ۳۰۰ نوع آنزیم در بدن نقش بارزی دارد و در اندام تناسلی و یا غدد

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

\* مرتبی دانشکده پرآپریشنکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان- دانشکده پرآپریشنکی همدان: دوپروردی پارک مردم- دانشگاه علوم پزشکی همدان- دانشکده پرآپریشنکی  
\*\* تاریخ دریافت: ۸۲/۱۱/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۳/۷/۱۸ تاریخ تصویب: ۸۳/۱/۲۶

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 و در زیر هود بیولوژیک از سلول‌های راجی و مولت-۴ (تهیه شده از انسیتو پاستور ایران)، سوسپانسیون که تعداد سلول‌های زنده آن بیش از ۹۷ درصد بود تهیه گردید؛ بدین منظور در زیر هود و شرایط استریل ۳۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی را بر داشته با ۳۰ میکرو لیتر از محلول ۰/۰ درصد تریپان بلو با هم مخلوط نمودیم. سپس یک قطره از این مخلوط مطالعه گردیدند. سلول‌هایی که در زیر میکروسکوپ نوری غشاء، 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.

$$\text{درصد سلول‌های زنده} = \frac{\text{تعداد کل سلول‌های زنده و مرده}}{\text{تعداد سلول‌های زنده}} \times 100$$

در مرحله بعد حدود ۷۵ میکرو لیتر 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 میکرو لیتر هم از غلظت‌های مختلف روی (۱ میکرو مولار تا ۵۰۰ میکرومولار) اضافه گردید.

جنسي و رشد آنها بی تاثير نیست(۱،۲). مکانیسم تاثير عنصر روی در بدن انسان و ديگر موجودات عمدتاً از طریق کوفاکتور بودن این عنصر برای آنزیمه‌های موثر در ساخت اسیدهای نوکلئیک و متabolیسم پروتئین‌ها چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها است(۳). نقش روی به علت تکثیر سريع سلول‌ها در سیستم ایمنی از بقیه سیستم‌های مختلف بدن، مهم‌تر است(۴،۵،۶).

مطالعه‌های Martin و همکاران (۱۹۹۱) در آزمایشگاه بر رشد و میزان سلول‌های زنده راجی<sup>۱</sup> و مولت-۴ نشان داد که هرگاه سلول‌های مذکور در محیط کشت فاقد روي کشت داده شوند، ظرفیت رشد و تکثیر خودرا از دست می‌دهند. اما در حضور آن (تا ۵۰ میکرومولار)، تعداد کل سلول‌ها و میزان مرگ و میر یا بیمارگنی<sup>۲</sup> سلول‌های مذکور در هر دو گروه آزمون و شاهد یکی بود(۷). در یک مطالعه دیگر صرفاً بر روی رده سلولی مولت-۴، Michiko و همکاران (۲۰۰۰) بی بردن 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 مطالعه‌ای 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

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

و در زیر میکروسکوپ یک نمای سیز رنگ به کرومایتن سلول زنده می دهد.

اما اتیدیوم بروماید فقط سلول های مرده را رنگ می کند. اتیدیوم بروماید وارد DNA سلول مرده شده و در زیر میکروسکوپ فلورسانس رنگ نارنجی به کرومایتن سلول مرده می دهد<sup>(۹)</sup>.

در نهایت با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید آکریدین اورنج سلول های زنده، سیز رنگ و غیر زنده، نارنجی تا قهوه ای رنگ دیده می شود.

#### روش کار:

برای این منظور ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر آکریدین اورنج را به همراه ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر اتیدیوم بروماید را به نسبت مساوی در ۱ میلی لیتر محلول (فسفات- بافر- سالین) حل نموده و سپس ۱۰ میکرو لیتر از محلول فوق را با ۲۵۰ میکرو لیتر از سو سپانسیون سلولی مخلوط نموده و از این مخلوط ۱۰ میکرو لیتر روی یک لام تمیز ریخته و روی آن را با لامل می پوشانیم. 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 می دهیم. تعداد سلول های سیز رنگ (زنده) تقسیم بر مجموع کل سلول های سیز رنگ (زنده) و سلول های مرده (نارنجی رنگ) معادل درصد سلول های زنده است. در نهایت نتایج این مطالعه با استفاده از آنالیز واریانس و مت تعاقب آن آزمون دانت تجزیه و تحلیل گردید.

#### یافته ها

نتایج بررسی میزان مرگ و میر سلول ها جهت سهولت در مطالعه آن به صورت درصد سلول های زنده در جداول ۱ تا ۴ آمده است.

حجم نهایی همه چاهک ها با استفاده از محیط کشت RPMI-1640 به ۱۰۰ میکرو لیتر رسانده شد. سپس در زیر هود با حرکت ملایم و دورانی دست چاهک های پلیت مخلوط گردیدند، تمامی چاهک ها 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<sup>۱</sup> کنترل گردیدند. بعد از تمامی مراحل فوق بلا فاصله پلیت های کشت سلولی در انکوباتور حاوی ۵ درصد گاز CO<sub>2</sub> با دمای ۳۷ درجه انکوبه گردیدند. در انتهای زمان معین از انکوباسیون سلول ها (فواصل زمانی ۱۲ تا ۷۲ ساعت) از هر غلاظت مورد مطالعه ۳ تا چاهک برای بررسی تعداد سلول ها و زنده بودن آنها با استفاده از تکنیک رنگ آمیزی فلورسانست استفاده شد. در ضمن با شمارش تعداد سلول های زنده در انتهای انکوباسیون در گروه های آزمون و مقایسه با تعداد سلول های زنده گروه های شاهد همان ساعت مطالعه، تکثیر یارشد سلول های نیز بررسی گردیدند.

جهت کاهش خطای غلط های مختلف روی به دفعات زیاد، کشت سلولی انجام گردید.

#### تکنیک فلورسانس:

##### اساس کار:

شاید بتوان گفت که رنگ آمیزی فلورسانس و شمارش سلول ها در زیر میکروسکوپ اگر با دقت انجام شود، ساده ترین و سریع ترین وسیله برای تشخیص سلول های زنده و غیر زنده می باشد.

در این روش از رنگ های فلورسانس اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید استفاده شد. آکریدین اورنج یک رنگ حیاتی است و توسط سلول های زنده جذب می شود. اکریدین اورنج وارد DNA سلول زنده می شود

1. Invert

جدول شماره ۱: نتایج اثر غلظت‌های مختلف روی بر زنده بودن سلول راجی و مولت-۴ پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون

روی(میکرومولار)	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	شاهد
درصد زنده ماندن سلول‌ها	۹۵	۶۸	۶۹	۷۰	۸۲	۹۳	۹۴	۹۴	۹۷
ارزش- <i>P</i> *	۰/۸۸۳	۰/۸۵۰	۰/۸۴۱	۰/۷۴۲	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	-

جدول شماره ۲: نتایج اثر غلظت‌های مختلف روی بر زنده بودن سلول راجی و مولت-۴ پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون

روی(میکرومولار)	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	شاهد
درصد زنده ماندن سلول‌ها	۹۶	۱۸	۲۰	۵۲	۷۸	۹۳	۹۴	۹۰	۹۷
ارزش- <i>P</i>	۰/۸۸۳	۰/۸۵۰	۰/۸۴۱	۰/۷۴۲	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	-

جدول شماره ۳: نتایج اثر غلظت‌های مختلف روی بر زنده بودن سلول راجی و مولت-۴ پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون

روی(میکرومولار)	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	شاهد
درصد زنده ماندن سلول‌ها	۹۰	۱۰	۱۰	۲۰	۲۷	۹۳/۵	۹۳/۷	۹۴	۹۴/۱
ارزش- <i>P</i>	۰/۸۵۰	۰/۸۴۱	۰/۸۱۰	۰/۷۴۲	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	-

جدول شماره ۴: نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف روی بر زنده بودن سلول راجی و مولت-۴ پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون

روی(میکرومولار)	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	شاهد
درصد زنده ماندن سلول‌ها	۹۴	۵	۱۲	۱۰	۱۰	۹۲/۲	۹۲/۰	۹۲/۷	۹۲/۹
ارزش- <i>P</i>	۰/۷۸۸	۰/۷۸۰	۰/۷۸۰	۰/۷۲۰	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	-

از لحاظ آماری معنی دار است  $<0/05$  < ارزش-*P*\*

میکرو مولار با میزان درصد زنده بودن سلول‌های شاهد همان ساعت و ساعت‌های دیگر انکوباسیون تفاوت معنی داری 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( $p<0/05$ ).

با توجه به جداول نامبرده سلول‌های راجی و مولت-۴ در غلظت‌های پایین روی یعنی تا ۱۰۰ میکرومولاو در فواصل زمانی مختلف، از میزان زنده بودن سلول‌های زنده در گروه آزمون در اثر غلظت‌های بسیار بالایی برخوردار می‌باشد؛ به طوری که درصد سلول‌های زنده در زنده بودن سلول‌های شاهد در متفاوت روی با درصد زنده بودن سلول‌های شاهد در همان ساعت تفاوت معنی داری نداشت. آزمون آماری نشان داد که میزان درصد زنده بودن سلول‌های راجی و مولت-۴ در فواصل زمانی مختلف (۱۲ تا ۷۲ ساعت) و در اثر غلظت‌های پایین روی یعنی ۱ میکرومولار تا ۱۰۰

## بحث

تریبت مدرس انجام گرفت. مطالعات اندکی بر سلول‌های راجی و مولت-۴ به عمل آمده است. یافته‌های Treves همکارانش (۱۹۹۴) از مطالعه تاثیر روی بر لنفوسيت‌های طبیعی انسانی در آزمایشگاه نشان داد که روی یک تنظیم کننده آپوپتوزیس است<sup>(۱۰)</sup>. 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<sup>(۱۱)</sup>.

تطبيق 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-۴ تاثیر سمیت سلولی دارد. ترکیبات روی بر رده سلولی راجی و مولت-۴ دارای اثر سمیت سلولی وابسته به دوز بوده و احتمالاً در آینده بتوان از آن در تنظیم سیستم ایمنی استفاده نمود. هیچ نوع تفاوتی بین میزان حساسیت سلول‌های راجی و مولت-۴ نسبت به عنصر روی در آزمایشگاه در این مطالعه دیده نشد.

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 ۴۸ ساعت انکوبه میزان زنده ماندن سلول‌ها بالای ۹۴ درصد بود<sup>(۷)</sup>. مطالعه دیگری که توسط Michiko و همکارانش (۲۰۰۰) با تکنیک فلوسایتومتری به عمل آمده نشان داد که روی تا ۱۰۰ میکرومولار تاثیر سمیت سلولی بر مولت-۴ ندارد اما پس از ۱۲ ساعت در حضور غلظت‌های بالاتر، تاثیر سمی روی معلوم می‌شود<sup>(۸)</sup>.

یافته‌های این مطالعه با استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسانس با نتایج Michiko و همکارانش (۲۰۰۰) تفاوت معنی داری نداشت. محقق مذکور اشاره می‌کند که روی باعث القاء آپوپتوزیس و نکروزیس در مولت-۴ می‌شود. اما در این مطالعه با تکنیک فلورسانس دقیقاً 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

## فهرست منابع

- 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.
- 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-blind placebo-controlled trial in rural Burkina Faso. *Int J Epidemiol*. 2003 Dec; 32(6): 1098-102.
- Bhatnagar S, Natchu UC. Zinc in child health and disease. *Indian J Pediatr*. 2004 Nov; 71(11): 991-5.
- Lothar R, Philip G. Zinc and Immune System proceedings of the Nutrition Society, *J Nutr*. 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 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 independent 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 and identification of proteins increased in association with this induction. *Eur. j. Biochem.* 1998; 253: 766-770.