بررسی برهم‌کنش عصاره الکلی بره موم، لوامیزول، بتاگلوکان و لاکتوفرین با رده سلولی CHSE-214 در شرایط آزمایشگاهی

- **مهدی محمدزاده:** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: ۱۶۵
- **امیر توکمه‌چی*:** گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی آبزیان، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: ۱۶۵

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۳

چکیده

در حال حاضر استفاده از محرک‌های رشد و ایمنی به‌طور گسترده‌ای در پرورش آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیبات دارای خواص مفیدی هستند ولی تاکنون تحقیقی پیرامون اثرات ناخواسته آن‌ها در آبزیان انجام نشده است. رده سلولی CHSE-214 عموماً در بررسی اثرات ترکیبات مختلف هم‌چون محرک‌های رشد و ایمنی در آبزیان، تکثیر ویروس‌ها در دماهای خاص و آشکار کردن پدیده آپوپتوزیس در سلول‌های مختلف، به‌واسطه دارا بودن برخی ویژگی‌های اختصاصی، کاربرد دارد. بر این اساس هدف از بررسی حاضر تاثیر غلظت‌های مختلف محرک‌هایی نظیر عصاره الکلی بره موم، لوامیزول، بتا گلوکان و لاکتوفرین بر رده سلولی CHSE-214 در شرایط آزمایشگاهی است. به‌همین خاطر، برای این کار سلول‌های فوق از انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت سلولی RPMI و در حضور سرم جنین گاوی و آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر ۵ درصدی گاز CO2 کشت داده شدند. در این بررسی اثرات ترکیبات فوق در غلظت‌های مختلف (بر حسب میکروگرم در لیتر) و زمان‌های مختلف (بر حسب ساعت) با روش رنگ‌سنجی MTT سنجیده شد. در نهایت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی (Tukey's test) انجام گرفت. یافته‌های حاضر ثابت کرد که اثرات سلول‌کشی ترکیبات فوق به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) وابسته به غلظت و مدت زمان است. از طرفی هر ترکیب بسته به غلظت می‌تواند به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) سبب القاء مرگ در رده سلولی CHSE-214 گردد و این خاصیت در بین ترکیبات متفاوت است. نتایج بررسی حاضر نشان داد که سه ترکیب بتاگلوکان، لوامیزول و لاکتوفرین به نسبت به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) دارای حداقل خاصیت سلول‌کشی هستند، درحالی که عصاره الکلی بره موم می‌تواند در غلظت‌های بالا به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) کشنده باشد.

کلمات کلیدی: عصاره الکلی بره موم، بتا-گلوکان، لوامیزول، لاکتوفرین، رده سلولی CHSE-214

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: atokmachi@gmail.com

مقدمه

در جهان با رشد جمعیت، صنعت آبزی‌پروری به‌عنوان یکی از منابع تامین پروتئین مورد نیاز انسان، مورد توجه پژوهشگران قرار دارد و با توسعه و پیشرفت این صنعت و انواع دستکاری‌ها در پرورش ماهی، بروز انواع بیماری‌ها در آن‌ها در حال افزایش است. یکی از راه‌های مقابله با این بیماری‌ها در مراکز پرورش ماهی و افزایش نرخ بقای ماهی‌ها و دست‌یابی به سود کلان استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌باشد. استفاده طولانی مدت و مداوم آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر اثرات زیست محیطی و جانبی روی ماهی‌ها، به وجود آمدن پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی و افزایش دوز مصرفی آنتی‌بیوتیک‌ها، به باقی ماندن دارو در بافت‌های ماهیان منجر می‌شود که سلامت فرد مصرف‌کننده را با خطر مواجه می‌سازد. به‌همین خاطر محققان همواره در فکر یافتن ترکیبات طبیعی ضد میکروبی برای مقابله با اثرات بیماری‌زا با کارایی مناسب بوده‌اند. بنابراین با توجه به مسئله فوق یکی از راه‌های مفید مقابله با بیماری‌های آبزیان بدون مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها تقویت سیستم ایمنی آبزیان به ویژه ماهی‌ها می‌باشد (توکمه‌چی و بندبنی، ۱۳۹۲). در این راستا استفاده از مواد محرک ایمنی به‌عنوان یک مکمل غذایی که قادر به بهبود دفاع غیراختصاصی و ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا در زمان بروز استرس‌های فراوان حین دوره پرورش ماهی باشند، مورد توجه هستند. در سال‌های اخیر به‌دلیل توجه به حفظ محیط زیست و بهره‌گیری از مواد بدون آلایندگی محیط زیست، استفاده از مواد محرک ایمنی جانوری و گیاهی در حال افزایش است. محرک‌های ایمنی، عصاره‌های زیستی و مواد سنتزی می‌باشند که با افزایش عملکرد زیستی سلول‌های فاگوسیتیک و فعالیت باکتری‌کشی و نیز با تولید آنتی‌بادی موجب تحریک پاسخ ایمنی می‌گردند (Sakai، ۱۹۹۸). در حقیقت این مواد گلبول‌های سفید را فعال می‌کنند. چنین موادی نه تنها، مقاومت موجود زنده را نسبت به بیماری‌های عفونی بیش‌تر می‌کنند، بلکه خطر شیوع بیماری را کم می‌کنند. تحقیقات در زمینه مواد محرک سیستم ایمنی در حال توسعه بوده و در حال حاضر مواد زیادی در صنعت آبزی‌پروری استفاده می‌شوند. اثرات تحریک‌کنندگی عصارهٔ اتانولی بره‌موم، بتاگلوکان، کیتین، لوامیزول (Levamisole)، لاکتوفرین (Lactoferin)، اسید آلژنیک و ارگوسان در ماهی‌ها گزارش شده است (Akbari و همکاران، ۲۰۱۴). اغلب این مواد طبیعی یا سنتزی با وجود دارا بودن اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدویروسی، ضدباکتریایی، ضدالتهابی، ضدقارچی، ضدانگلی، التیام زخم و بیماری دیابت و حتی ایمنی‌زایی در انسان و حیوانات آزمایشگاهی، در زمینه اثرات ایمنی‌زایی آن‌ها در ماهی‌ها اطلاعات بسیار محدودی در دسترس است. هم‌چنین فاکتورهای غذایی مثل هورمون رشد و پرولاکتین به‌عنوان محرک سیستم ایمنی گزارش شده‌اند. این محرک‌ها، علاوه بر افزایش عملکرد فاگوسیتوزی و افزایش فعالیت باکتری‌کشی، هم‌چنین به‌عنوان سلول کشنده طبیعی کمپلمان، لیزوزیم و پاسخ آنتی‌بادی را تحریک می‌کنند (Montero و همکاران، ۲۰۰۵؛ Sakai، ۱۹۹۸). از دیگر فواید محرک‌های ایمنی کاهش مرگ و میر، نسبت به پاتوژن‌های فرصت‌طلب، کاهش مرگ و میر آبزیان جوان و افزایش مقاومت در برابر پارازیت‌ها بوده است. در کل مشخص می‌شود محرک‌های ایمنی نرخ بقا را در موجودات زنده افزایش می‌دهند (Beyraghdar Kashkooli و همکاران، ۲۰۱۱؛ Harikrishnan و همکاران، ۲۰۱۰؛ Harikrishnan و همکاران، ۲۰۰۹؛ Kimura و همکاران، ۱۹۹۶).

نتایج مطالعهٔ Cuesta و همکاران (۲۰۰۵) با عصاره اتانولی بره موم و یا عصاره آبی بره موم در ماهی Gilthead sea bream در محیط زنده (in vivo) از اثرات تحریک‌کنندگی آن‌ها روی سیستم‌های ایمنی خبر می‌دهد. لاکتوفرین با خواص آنتی‌باکتریال علیه برخی باکتری‌های گرم منفی و مثبت، دفاع علیه عفونت‌های معده‌ای-روده‌ای، ایجاد سینرژیسم با برخی از ایمنوگلوبولین‌ها، پروتئین‌های سیستم دفاعی و محرک رشد سلول‌های بدن حیوانات به‌ویژه لنفوسیت‌ها و سلول‌های روده، کمک به جذب آهن در سطح روده که هنوز این ویژگی آخری از لحاظ علمی به اثبات نرسیده است (Caccavo و همکاران، ۲۰۰۲؛ Lee و همکاران، ۱۹۹۹؛ Zimecki و همکاران، ۱۹۹۸؛ Yamauchiو همکاران، ۱۹۹۸؛ Kruzel و همکاران، ۱۹۹۸).

در اوایل قرن بیستم پس از شناخت توانایی قارچ‌ها در تاثیرگذاری روی سیستم کمپلمان (Complement System)، توجه به پلیمرهای کربوهیدراتی از جمله گلوکان‌ها جلب گردید. مطالعات نشان داد که در دیوارهٔ قارچ‌ها ماده‌ای به‌نام زیموزان (Zymosan) وجود دارد. از مطالعات مشخص شد که تزریق مستقیم داخل وریدی این مادهٔ قارچی، منجر به فعال شدن سیستم ایمنی می‌گردد. زیموزان شامل گلوکان‌ها، مانازها، کیتین، پروتئین و چربی می‌باشد اما بتاگلوکان به‌عنوان بخش فعال زیستی و اصلی آن در تحریک سیستم ایمنی معرفی شده است (Gonzalez و همکاران، ۲۰۰۴). مطالعات نقش این پلی‌ساکاریدها را در مقابله با عفونت‌های میکروبی

نشان داد و حضور این مواد در خون افراد بیمار، ناشی از ترشح آنها توسط میکروب‌ها، مشخص گردیده است. مولکول ۱و۳ بتاگلوکان توسط میکروارگانیسم‌ها به‌وفور ساخته می‌شود اما سایر گونه‌ها قادر به سنتز آن نمی‌باشند (Colleoni-Sirghie و همکاران، ۲۰۰۳). فعالیت این مولکول بستگی به انشعابات جانبی، طول پلیمر و نیز ساختار سوم آن دارد، به‌طوری‌که بتاگلوکان‌های با وزن مولکولی بالاتر فعالیت بیش‌تری نشان می‌دهند (Kubala و همکاران، ۲۰۰۳). مطالعات در محیط آزمایشگاهی (in vitro) نشان داد بتاگلوکان می‌تواند رشد و نمو تومورهای با منشا قارچی، ویروسی و باکتریایی را با تحریک سیستم ایمنی میزبان کاهش داده یا مهار کند. نبود آنزیم گلوکاناز در سلول‌های پستانداران ممکن است یکی از دلایل فعالیت بتاگلوکان در آن‌هاست. مهم‌ترین عملکرد زیستی بتاگلوکان، فعال کردن ماکروفاژها، سلول‌های دندریتی، اندوتلیالی، نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها و سلول‌های کشنده طبیعی می‌باشد (Gonzalez و همکاران، ۲۰۰۴). گیرنده‌های بتاگلوکان‌ها به‌طور دقیق شناخته نشده‌اند، اما اتصال بتاگلوکان به سلول‌هایی مانند ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها و نیز سلول‌های غیرایمنی شامل سلول‌های اندوتلیالی، سلول‌های الوئولار، فیبروبلاست‌ها و حتی سلول‌های هیپوفیز قدامی گزارش شده است (Colleoni-Sirghie و همکاران، ۲۰۰۳؛ Brovko و همکاران، ۱۹۷۰).

لوامیزول از داروهای ایمیدازوتیازولی با خاصیت کولینرژیک که اثر تقویت‌کنندگی آن بر سیستم ایمنی از طریق مونوسیت‌ها، سلول‌های کشنده طبیعی و سلول‌های کشنده فعال شده با لنفوکاین به‌انجام نمی‌رسد، بلکه توسط سلول‌های سیتوتوکسیسیته طبیعی صورت می‌گیرد. در مجموع، این دارو به‌عنوان محرک سیستم ایمنی بدن در بیماری‌های عفونی باکتریای یا ویروسی، آرتریت روماتوئید و نیز به‌عنوان داروی کمکی در درمان بیماری‌های بدخیم مصرف می‌شود (Mori و همکاران، ۱۹۹۸؛ Clarke و همکاران، ۱۹۹۷؛ Schiller و همکاران، ۱۹۹۱).

در مراکز پرورش ماهی به‌دلیل ایجاد استرس‌های فراوان ناشی از انواع بیماری‌های عفونی و غیرعفونی تلفات بالا گزارش شده است، که می‌توان با تقویت سیستم ایمنی ماهی‌ها درصد این بیماری‌ها را کاهش داده و گامی در جهت رفع این معضل برداشت. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی برهم‌کنش‌های محرک‌های ایمنی مذکور بر رده سلولی CHSE-214 به‌عنوان نمونه‌ای از سلول‌های آبزیان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از مهرماه سال ۱۳۹۲ تا شهریور ماه سال ۱۳۹۳ در آزمایشگاه میکروبیولوژی و کشت سلول پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه طی مراحل زیر انجام گرفت:

کشت سلول‌های CHSE-214: رده سلولی CHSE-214 مورد استفاده برای این بررسی، از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و کشت داده شد. هم‌چنین محیط‌کشت RPMI 1640 از شرکت گیبکو انگلستان، پنی‌سیلین و استروپتومایسین از شرکت سیگما آمریکا و $NaHCO_3$، NaOH، اسید کلریدریک از شرکت مرک آلمان و سرم جنین گاوی[1] از شرکت گیبکو، انگلستان تهیه گردید.

بررسی میزان زنده بودن سلول‌ها: برای بررسی میزان زنده بودن سلول‌ها ابتدا محتویات فلاسک خارج شده و به یک لوله ۱۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. لوله فوق بعد از سانتریفوژ و ته‌نشین شدن سلول‌ها مایع رویی را خارج و یک میلی‌لیتر محیط RPMI استریل اضافه نموده و به آرامی تکان داده شد تا محلول یکنواخت گردد. سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون را داخل یک پلیت ۹۶ خانه‌ای ته‌گرد تمیز ریخته و به آن تریپان‌بلو به میزان ۲۰ میکرولیتر اضافه گردید. بلافاصله توسط سمپلر و سر سمپلر، این دو با هم مخلوط و بین لام نئوبار و لامل به آرامی تزریق شد و سلول‌ها در زیر میکروسکوپ معمولی شمارش شدند (دلیرژ، ۱۳۸۵). در نهایت از رابطه زیر برای محاسبه تعداد سلول استفاده شد:

= تعداد سلول‌های موجود در ۱ میلی‌لیتر از محلول سلولی
۱۰۰۰۰× ۲ × ۵ × تعداد سلول‌های موجود در ۵ خانه

روش سنجش MTT[2]: در این مطالعه برای سنجش میزان سلول‌کشی عصاره الکلی بره موم، لاکتوفرین، لوامیزول و بتا گلوکان از روش Chang و همکاران (۲۰۰۷) و Sun و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد. به‌طور خلاصه، پس از سانتریفوژ و شمارش سلول‌های CHSE-214 به‌روش تریپان بلو، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر (با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول در محیط کشت RPMI به همراه ۱۵ درصد FBS) به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی رقت‌های مختلف عصاره الکلی بره موم، لوامیزول و

۱. Fetal Bovine Serum

۲. 3-(4,5-Dimethyl Thiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide

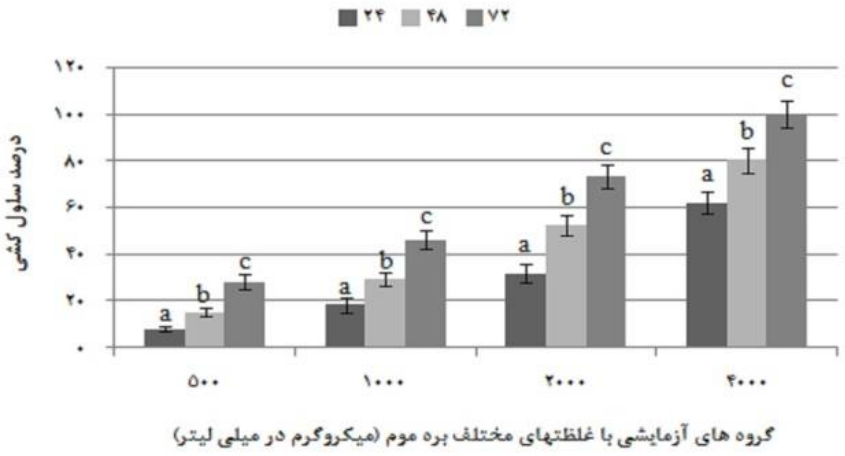
بتا گلوکان (۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محیط RPMI) به چاهک‌ها اضافه گردید. سه چاهک دیگر به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد و به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر سلول به همراه ۹۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰ میکرولیتر بافر فسفات افزوده شد. در مرحله بعد پلیت‌ها به‌طور جداگانه به‌مدت ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد گاز CO_2 گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۳ـ۴ و ۵ دی متیل تیازول ۲ـ۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید، ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بافر PBS یا Phosphate Buffer Saline) به تمامی چاهک‌ها افزوده شده و میکروپلیت به‌مدت چهار ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. در این مدت آنزیم سوکسینات - دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های سالم و زنده، برم محلول MTT را احیاء کرده و آن را به‌صورت ذرات نامحلول بنفش رنگ فورمازان در می‌آورد. در پایان کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO خالص به چاهک‌ها و قراردادن پلیت‌ها در انکوباتور شیکردار حل شدند و سرانجام شدت نور جذب شده (OD) در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر ثبت گردید. درصد سلول‌کشی دیواره‌ها با فرمول زیر محاسبه گردید (Chin-Feng و Tzu-Ming، ۲۰۱۰):

۱۰۰× [OD شاهد÷ (OD شاهد-OD نمونه)] =درصد سلول‌کشی

تجزیه و تحلیل‌های آماری: جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA؛ نرم افزار SPSS نسخه ۱۹) و آزمون توکی (Tukey's test) استفاده گردید. قبل از مقایسه میانگین تیمارها نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف بررسی شد. داده‌های به‌دست آمده به‌صورت Mean ± SD بیان شدند. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد، هم‌چنین ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) انجام گرفت.

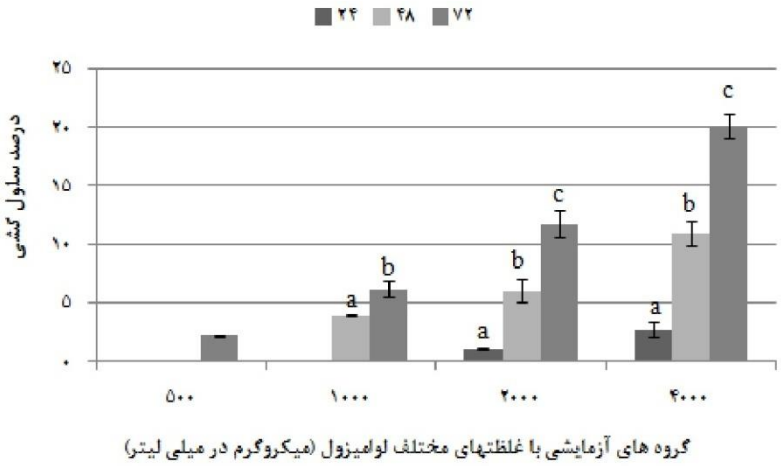
نتایج

نتایج مطالعات نشان داد اثرات سلول‌کشی ترکیبات تحت مطالعه به ساختار ترکیب و غلظت آن وابسته است. شکل ۱ نشان می‌دهد که عصاره الکلی بره موم در تمامی غلظت‌های به‌کار رفته سبب مرگ سلول‌های CHSE-214 می‌گردد. طوری‌که در زمان ۲۴ ساعت کم‌ترین درصد سلول‌کشی در غلظت ۵۰۰ میکرو گرم عصاره الکلی بره موم (۱/۰۱ ± ۸/۰۱ درصد) مشاهده شد و بیش‌ترین درصد سلول‌کشی مربوط به غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم (۵/۰۱ ± ۶۲/۱۳ درصد) آن در همان زمان بود. هم‌چنین نتایج بررسی حاصل نشان داد که درصد سلول‌کشی عصاره الکلی بره موم با افزایش مدت زمان تاثیرگذاری، افزایش می‌یابد یعنی بیش‌ترین درصد سلول‌کشی پس از گذشت ۷۲ ساعت در سلول‌ها مشاهده می‌گردد. در شکل ۱ چون اختلاف معنی‌دار در تمامی سطوح دیده می‌شود، به‌همین خاطر از حروف یا ستاره برای نشان دادن تفاوت‌های معنی‌دار استفاده نشده است.



شکل ۱: نمودار تاثیر سلول‌کشی عصاره الکلی بره موم در رده سلولی CHSE-214 در گروه‌های آزمایشی مختلف

هم‌چنین یافته‌های حاصله نشان داد لوامیزول هم دارای خاصیت سلول‌کشی بوده و مانند عصاره الکلی بره موم اثرات سلول‌کشی آن وابسته به غلظت و مدت زمان می‌باشد. البته لازم به‌ذکر است غلظت ۵۰۰ میکروگرم لوامیزول در مدت زمان ۲۴ ساعت هیچ‌گونه خاصیت سلول‌کشی نداشت. بیش‌ترین خاصیت سلول‌کشی لوامیزول پس از گذشت ۷۲ ساعت مشاهده شد که مربوط به غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۱ ± ۲۰/۱۱ درصد) آن بود (شکل ۲). در شکل ۲ ترسیم شده از داده‌های به‌دست آمده مانند شکل ۱ با توجه به مقادیر حاصله چون اختلاف معنی‌دار در تمامی سطوح دیده می‌شود، نیازی به آوردن حروف یا ستاره برای نشان دادن تفاوت‌های معنی‌دار روی نمودارها نمی‌باشد.

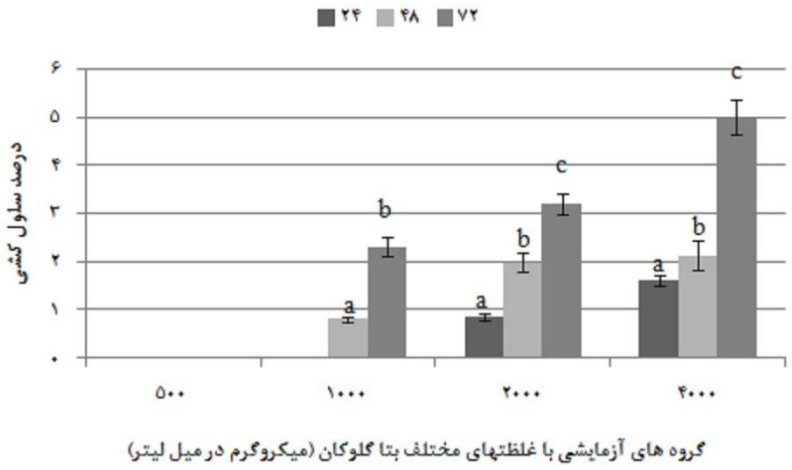


شکل ۲: نمودار تاثیر سلول‌کشی لوامیزول در رده سلولی CHSE-214 در گروه‌های آزمایشی مختلف

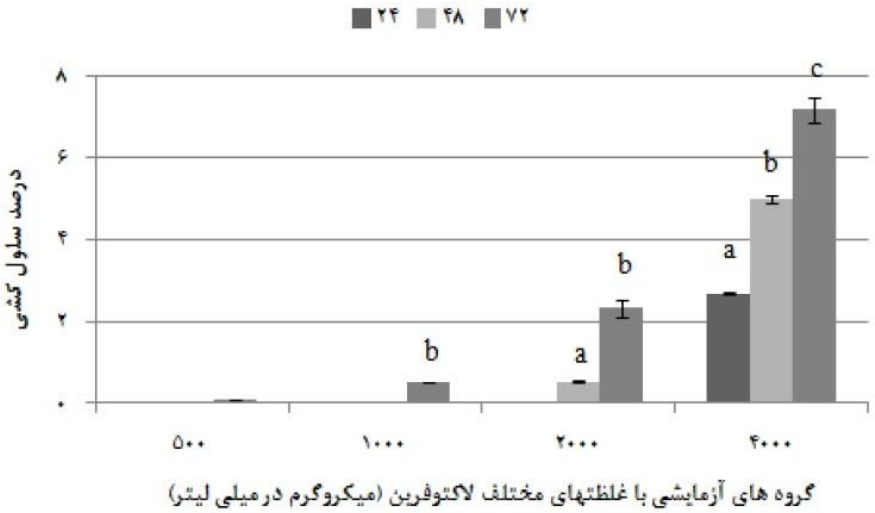
بتاگلوکان، برخلاف عصاره الکلی بره موم و لوامیزول، در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هیچ‌گونه خاصیت سلول‌کشی در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نداشت (شکل ۳). خاصیت سلول‌کشی بتاگلوکان در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مدت زمان ۴۸ ساعت مشاهده می‌شود. بیش‌ترین میزان سلول‌کشی بتاگلوکان مربوط به غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۱/۶ ± ۵/۰۶ درصد) بود که پس از گذشت ۷۲ ساعت مشاهده شد. در شکل ۳ با توجه به مقادیر حاصله چون اختلاف معنی‌دار در بیش‌تر سطوح به‌جز در گروه‌های آزمایشی با غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به هم، در مدت زمان ۴۸ ساعت دیده می‌شود، نیازی به آوردن حروف یا ستاره برای نشان دادن تفاوت‌های معنی‌دار روی نمودارها نمی‌باشد.

برخلاف عصاره الکلی بره موم و لوامیزول، لاکتوفرین در غلظت ۵۰۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر هیچ‌گونه خاصیت سلول‌کشی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت نداشت (شکل ۴). خاصیت سلول‌کشی لاکتوفرین پس از گذشت ۷۲ ساعت در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد که در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر خیلی کم بود. هم‌چنین نتایج بررسی حاصل نشان داد که درصد سلول‌کشی لاکتوفرین با افزایش مدت زمان مانند ترکیبات دیگر تحت بررسی افزایش می‌یابد یعنی بیش‌ترین درصد سلول‌کشی پس از گذشت ۷۲ ساعت از مواجه شدن مشاهده می‌گردد. بیش‌ترین میزان سلول‌کشی لاکتوفرین مانند دیگر ترکیبات تحت مطالعه مربوط به غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۱/۶ ± ۵/۰۶ درصد) بود که پس از گذشت ۷۲ ساعت از مواجه شدن مشاهده شد. در شکل ۴ با توجه به مقادیر حاصله چون اختلاف معنی‌دار در تمامی سطوح دیده می‌شود، نیازی به آوردن حروف یا ستاره برای نشان دادن تفاوت‌های معنی‌دار روی نمودارها نمی‌باشد.

بررسی آماری خاصیت سلول‌کشی عصاره الکلی بره موم، لاکتوفرین، لوامیزول و بتاگلوکان ثابت کرد که عصاره الکلی بره موم به‌طور معنی‌داری در سطح $P<۰/۰۵$ نسبت به لاکتوفرین، لوامیزول و بتاگلوکان دارای خاصیت سلول‌کشی بیش‌تری است. هم‌چنین مقایسه لوامیزول در مقایسه با بتاگلوکان و لاکتوفرین به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) از خاصیت سلول‌کشی بالاتری برخوردار است.



شکل ۳: نمودار تاثیر سلول‌کشی بتاگلوکان در رده سلولی CHSE-214 در گروه‌های آزمایشی مختلف



شکل ۴: نمودار تاثیر سلول‌کشی لاکتوفرین در رده سلولی CHSE-214 در گروه‌های آزمایشی مختلف

بحث

در حال حاضر برای درمان بیماری‌های عفونی در آبزیان از آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر ترکیبات شیمیایی مختلف نظیر سولفانامیدها، سبز مالاشیت، فرمالین و غیره استفاده می‌شود. استفاده طولانی مدت و بیش از حد این ترکیبات علاوه بر ایجاد مشکلات ناشی از مقاومت دارویی در میکروارگانیسم‌ها مشکلات عدیده دیگری نیز به‌وجود خواهد آمد. از جمله می‌توان به مشکلات زیست محیطی، بهداشت عمومی و ایجاد سرطان در انسان اشاره نمود. هم‌چنین به تازگی طی چند دهه گذشته از ترکیبات مختلفی چه طبیعی نظیر پروبیوتیک‌ها یا ترکیبات مشتق از آن‌ها مثل بتاگلوکان و غیره، چه مصنوعی مانند لوامیزول و غیره برای تقویت ایمنی و افزایش رشد آبزیان بهره گرفته می‌شود.

بنابراین در مطالعه حاضر سعی شد تاثیر این ترکیبات بر

سلول‌های مشتق از آبزیان بررسی گردد تا در صورت مشاهده هرگونه عوارض ناخواسته و جدی در مدل حیوانی آن را مورد بررسی قرار داد. سلول‌های CHSE-214 که از فیبروبلاست جنین ماهی چینوک مشتق شده‌اند جزو یکی از سلول‌های حساس آبزیان بوده و مطالعه تاثیر برخی از ترکیبات طبیعی بر آن می‌تواند رهنمون خوبی برای مطالعات آتی باشد.

یکی از پر مصرف‌ترین ترکیبات طبیعی در زمینه افزایش رشد و تقویت سیستم ایمنی آبزیان بتا- گلوکان است. این ماده که از مخمرها مشتق می‌شود یک‌نوع پلی ساکارید بوده و اثرات مفید آن بر رشد و تقویت ایمنی در آبزیان به اثبات رسیده است. برای مثال Verlhac و همکاران (۱۹۹۴) و Li و Gatlin (۲۰۰۴) آن را از طریق جیره غذایی در ماهی باس راه راه مورد استفاده قرار دادند و متوجه شدند که این ترکیب قادر است سیستم ایمنی ماهی را از طریق بهبود فعالیت آنزیم لیزوزیم تقویت نماید. هم‌چنین Engstad و همکاران (۱۹۹۲) با تزریق بتا-گلوکان در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند سبب انفجار تنفسی ماکروفاژهای کلیه قدامی، افزایش فعالیت مسیر فرعی کمپلمان سرم و آنزیم لیزوزیم گردد. یا به‌طور مشابه در مطالعات Sakai (۱۹۹۹) مشاهده کرد ماهیانی که با بتاگلوکان تغذیه شدند مسیر فرعی کمپلمان آن‌ها نسبت به ماهیان گروه شاهد از فعالیت بالاتری برخوردار می‌باشد.

هم‌چنین Bangi و همکاران (۲۰۰۵) توانستند از طریق تجویز خوراکی بتاگلوکان سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را تقویت نمایند. وجه مشترک تمام این مطالعات تلاش برای تقویت ایمنی گونه‌های مختلف آبزیان بوده بدون آن‌که هیچ‌گونه مطالعه‌ای در زمینه اثرات ناخواسته بتاگلوکان در آن‌ها مورد تحقیق قرار گیرد. بنابراین یافته‌های این بررسی می‌تواند تکمیل‌کننده این‌گونه بررسی‌ها باشد که تعدادشان نیز اندک نیست. بررسی حاضر نشان داد که غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بتاگلوکان هیچ‌گونه اثرات سلول‌کشی را حتی بعد از ۷۲ ساعت از مواجه شدن سلول القا نکرد. به تدریج با افزایش غلظت و هم‌چنین افزایش زمان مواجه شدن بر فعالیت سلول کشی این ترکیب افزوده شد.

برای مثال بیش‌ترین میزان سلول‌کشی آن در غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، پس از ۷۲ ساعت مواجه شدن سلول‌های CHSE-214 مشاهده گردید. غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم این ترکیب نیز به‌صورت حد واسط تاثیرگذار بوده و درصد سلول‌کشی آن‌ها از ۰/۹ تا ۳ درصد متغییر بود. این یافته نشان می‌دهد که بتاگلوکان دارای حداقل اثرات ناخواسته بر سلول مورد مطالعه است.

بره موم یک ترکیب طبیعی که در کندوهای زنبور عسل یافت می‌شود و به‌همین خاطر از آن‌ها جمع‌آوری می‌شود. استفاده از این ماده دارای سابقه طولانی بوده و براساس مدارک و اسناد توسط ایرانیان و چینی‌ها در طب سنتی برای درمان برخی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. برای مثال می‌توان به پیشگیری از عفونت و التیام سریع زخم، بیماری‌های قلبی و عروقی و غیره اشاره نمود. در زمینه آبزیان نیز مطالعات مورد توجهی توسط محققان انجام گرفته است که به تعدادی از آن‌ها اشاره می‌شود. Denli و همکاران (۲۰۰۵) و Meurer و همکاران (۲۰۰۹) از عصاره الکلی بره موم برای افزایش رشد طیور و ماهی استفاده کردند. هم‌چنین Chu (۲۰۰۶) از بره موم برای افزایش اثر بخشی واکسن‌ها به‌عنوان ادجوان در ماهی کپور معمولی استفاده کرد. این محقق متوجه شد که عصاره الکلی بره موم قادر است از طریق تحریک گلبول‌های سفید، افزایش سطح آنتی بادی و فعالیت آنزیم لیزوزیم سرم در ماهی کپور مقاومت آن را در برابر باکتری بیماری‌زای *آئروموناس هیدروفیلا* افزایش می‌دهد.

Abd-El-Rhman (۲۰۰۹) نیز غلظت‌های متفاوتی از بره موم را در ماهی تیلاپیا مورد استفاده قرار داد و متوجه شد که رشد این ماهی و مقاومت آن در برابر بیماری افزایش پیدا می‌کند. در این ارتباط پژوهشگران Talas and Gulhan (۲۰۰۹) در مطالعات خودشان، تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی بره موم بر شاخص‌های خون شناختی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را مورد بررسی قرار دادند. این محققان متوجه شدند بسته به غلظت و زمان مصرف شاخص‌های خون شناختی تغییر می‌کنند. در نهایت کریمی‌راد (۱۳۹۱) مصرف کوتاه مدت و بلند مدت عصاره الکلی بره موم جمع‌آوری شده از کندوهای زنبور عسل آذربایجان‌غربی را به‌صورت تغذیه‌ای در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دادند و متوجه شدند که افزایش غلظت و مواجه طولانی با آن سبب تغییرات بافتی در کبد و کلیه ماهی می‌گردد. یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج این محقق هم‌خوانی دارد طوری‌که نتایج نشان داد عصاره الکلی بره موم در غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پس از گذشت ۷۲ ساعت سبب مرگ سلول‌های CHSE-214 می‌گردد که میزان آن برابر با ۱۰۰ درصد بود. البته لازم به یادآوری است که عصاره الکلی بره موم در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر ناخواسته‌ای کم‌تری بر سلول مورد مطالعه دارد.

لاکتوفرین یک پروتئین چند عملکردی از خانواده ترانسفرین است. منبع اصلی لاکتوفرین شیر بوده و یکی از وظایف اصلی این پروتئین جذب آهن است. بنابراین با ورود لاکتوفرین به محیط دستگاه گوارش آهن را جذب نموده و آن را از دسترس عوامل بیماری‌زا دور می‌نماید و به‌طور غیرمستقیم از گسترش عفونت در بدن جلوگیری می‌کند.

امروزه مطالعات بسیاری پیرامون خاصیت تحریک سیستم ایمنی آبزیان توسط این ماده انجام شده است. برای مثال Sakai و همکاران (۱۹۹۳) غلظت‌های مختلف آن‌را به‌صورت تغذیه‌ای برای تقویت سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها متوجه شدن شاخص‌های ایمنی در این ماهی نظیر فعالیت لیزوزیم، سطح سرمی آنتی بادی و فعالین مسیر فرعی سیستم کمپلمان تحت تاثیر قرار گرفته و سیستم ایمنی تقویت می‌گردد (Sakai، ۱۹۹۸؛ Sakai و همکاران، ۱۹۹۵؛ Sakai و همکاران، ۱۹۹۳). تاکنون مطالعات بسیاری در این زمینه و در گونه‌های مختلف آبزیان انجام گرفته است اما در هیچ‌کدام از این مطالعات اثرات ناخواسته و احیاناً سمی لاکتوفرین مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین واضح است که نتایج این بررسی می‌تواند افق دیگری در ذهن محققان باز نماید تا استفاده از این ترکیبات با جهت‌گیری دیگر و احتیاط بیش‌تری انجام گیرد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که لاکتوفرین همانند بتاگلوکان از اثرات ناخواسته حداقلی بر سلول CHSE-214 برخوردار است، طوری‌که مشابه بتاگلوکان غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آن حتی پس از گذشت ۷۲ ساعت هیچ‌گونه تاثیر سلول‌کشی ندارد. هم‌چنین غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نیز قادر به القاء مرگ در این رده سلولی نیست، درحالی که غلظت‌های بالاتر آن می‌تواند باعث مرگ سلول گردد. بیش‌ترین میزان سلول‌کشی پس از گذشت ۷۲ ساعت و در غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم آن مشاهده شد که برابر با ۷/۱۹ درصد بود.

لوامیزول عضوی از خانواده تیازول‌ها بوده و به‌عنوان یک داروی ضدکرم کاربرد ویژه‌ای دارد. این دارو به‌صورت صنعتی و شیمیایی ساخته می‌شود و برخی از مطالعات نشان دادند که دارای اثرات مفیدی بر سیستم ایمنی موجودات زنده است. در واقع مصرف این دارو می‌تواند توانایی سیستم ایمنی موجود را تقویت نماید. در حوزه موجودات آبزی نیز اثرات مفید و تقویت‌کنندگی این دارو بر سیستم ایمنی اثبات شده است. برای مثال Kumari و Sahoo (۲۰۰۶) از این دارو برای تقویت سیستم ایمنی گربه ماهی آسیایی به‌صورت خوراکی استفاده کرد. این محققین متوجه شدند لوامیزول از طریق تحریک تکثیر ماکروفاژها قادر است سطح شاخص‌های ایمنی گربه ماهی را افزایش دهد. هم‌چنین این دانشمندان نشان دادند که مقاومت گربه ماهی آسیایی در برابر آلودگی تجربی با *آئروموناس هیدروفیلا* افزایش می‌یابد.

Maqsood (۲۰۰۹) اظهار داشت که رشد ماهیان می‌تواند از طریق تغذیه با لوامیزول افزایش یابد. ایشان غلظت‌های مختلف لوامیزول را به‌صورت خوراکی به‌همراه سایر ترکیبات طبیعی نظیر کیتین به‌کار بردند به‌خاطر همین نتوانستند مکانیزم عمل را توجیه نمایند. مطالعات زیادی از این قبیل در آبزیان انجام گرفته است ولی تاکنون هیچ مطالعه‌ای اثرات ناخواسته این دارو را در آبزیان به‌طور اختصاصی نشان نداده‌اند، یافته‌های مطالعه حاضر نیز نشان داد که لوامیزول یک ماده ایمن بوده و اثرات سلول‌کشی ناچیزی دارد. بیش‌ترین خاصیت سلول‌کشی آن در غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم و پس از ۷۲ ساعت مجاور شدن مشاهده گردید، درحالی که غلظت ۵۰۰ میکروگرم آن پس از گذشت ۴۸ ساعت هیچ‌گونه تاثیر سلول‌کشی ندارد.

یافته‌های مطالعه حاضر ثابت کرد که تاثیر سلول‌کشی ترکیبات وابسته به غلظت و مدت زمان مواجه شدن است. از طرفی هر ترکیب بسته به غلظت می‌تواند سبب القاء مرگ در رده سلولی CHSE-214 گردد و این خاصیت در بین ترکیبات دارای تفاوت است. نتایج بررسی حاضر نشان داد که سه ترکیب بتاگلوکان، لوامیزول و لاکتوفرین به نسبت دارای حداقل خاصیت سلول‌کشی هستند، درحالی که عصاره الکلی بره موم می‌تواند در غلظت‌های زیاد به‌طور معنی‌داری کشنده باشد. هر چند در غلظت‌های کم استفاده شدهٔ عصاره الکلی بره موم اثرات سلول‌کشی اندکی مشاهده گردید. این نشان می‌دهد که مصرف عصاره الکلی قابل پیشنهاد است اما باید با احتیاط صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی پژوهشکده مطالعات دریاچه و نیز معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه ابراز می‌دارند.

منابع

۱. **توکمه‌چی، الف. و بندبنی، م.، ۱۳۹۲.** تاثیر مکمل مخمری بر رشد و سیستم ایمنی در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۸، شماره ۱، صفحات ۶۹ تا ۷۸.

۲. **دلیرژ، ن.، ۱۳۸۵.** دومین دوره کارگاه آموزشی روش‌های کشت سلول. دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه. صفحات ۱۴ تا ۴۲.

3. **Akbari, M.; Heidarieh, M.; Mirvaghefi, A.; Farahmand, H.; Sheikhzadeh, N. and Najafi Hajivar E., 2014.** Effect of dietary Ergosan and Hilyses on growth performance, hematological variables and immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Journal of Aquatic Animal Health. Vol. 1, No. 1, pp: 1-6.

4. **Beyraghdar Kashkooli, O.; Ebrahimi Dorcheh, E.; Mahboobi-Soofiani, N. and Samie, A., 2011.** Long-term effects of propolis on serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 74, No. 3, pp: 315-318.

5. **Brovko, T.E. and Kravchuk, P.A., 1970.** "Two cases of allergic reaction after administration of propolis drugs". Zh Ushn Nos Gorl Bolezn. Vol. 30, No. 4, pp: 102-103.

6. **Caccavo, D.; Pellegrino, N.M.; Altamura, M.; Rigon, A.; Amati, L.; Amoroso, A. and Jirillo, E., 2002**. Review: Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application. Journal of Endotoxin Research. Vol. 8, No. 6, pp: 403-417.

7. **Chang, K.H.; Park, J.S.; Choi, J.H.; Kim, C.J. and Paik, H.D., 2007.** Cytotoxic effects of partially purified substances from *Bacillus polyfermenticus* SCD supernatant toward a Varity of tumor cell lines. Journal of Food Science and Biotechnology. Vol. 16, pp: 163-166.

8. **Chin-Feng, L. and Tzu-Ming, P., 2010.** In Vitro Effects of Lactic Acid Bacteria on Cancer Cell Viability and Antioxidant Activity. Journal of Food and Drug Analysis. Vol. 18, pp: 77-86.

9. **Clarke, G.R.; Burton, R.C. and Smart, Y.C., 1997.** The anti tumor effects of levamisole in mice are mediated by NC-1.1 cells. Cancer Immunology and Immunotherapy. Vol. 45, pp: 115-118.

10. **Colleoni-Sirghie, M.; Fulton, D.B. and White, P., 2003.** Structural features of water soluble (1, 3) (1, 4) β-D- glucan from high glucan and traditional oat lines. Carbohydrate Polymers. Vol. 4, No. 2, pp: 237-249.

11. **Cuesta, A.; Rodríguez, A.; Ángeles Esteban, M. and Meseguer, J., 2005.** In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 18, No. 1, pp: 71-80.

12. **Elbashir, S.M.; Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Lendeckel, W. and Tuschl, T., 2001.** Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. European Molecular Biology Organization Journal. Vol. 20, pp: 6877-6888.

13. **Gonzalez, J.A.; Digby, J.; Rice, P.J.; Breuel, K.; Deponti, W.K.; Kalbfleisch, J.H.; Browder, W. and Williams, D., 2004.** At low serum glucan and serum cytokine level in patient with infections. International Immunopharmacology. Vol. 4, No. 8, pp: 1107-1115.

14. **Harikrishnan, R.; Balasundaram, C.; Kim, M.C.; Kim, J.S.; Han, Y.J. and Heo, M.S., 2009.** Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 27, No. 3, pp: 508-515.

15. **Harikrishnan, R.; Young-Gun, M.; Man-Chul, K.; Ju-Sang, K.; Moon-Soo, H.; Chellam, B. and Subramanian, D., 2010.** Phytotherapy of Aeromonas hydrophila-infected Goldfish, *Carassius auratus*, Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 41, No. 3, pp: 391-401.

16. **Kimura, Y.; Watabe, K. and Okuda, H., 1996.** Effect of soluble sodium alginate on cholesterol excreting and glucose tolerance in rats. Ethnopharmacology. Vol. 54, pp: 47-54.

17. **Kruzel, M.L.; Harari, Y.; Chen, C.Y. and Castro, G.A., 1998.** The gut, a key metabolic organ protected by lactoferrin during experimental systemic inflammation in mice. Advanced in Experimental Medical Biology. Vol. 443, pp: 167-173.

18. **Kubala, L.; Ruzickava, J.; Nickova, K.; Sandula, J.; Ciz, M. and Lojek, A., 2003.** The effect of (1→3)- β-D-glucan, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. Carbohydrate Research. Vol. 338, No. 24, pp: 2835-2840.

19. **Kumari, J. and Sahoo, P.K., 2006.** Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants. Aquaculture. Vol. 255, pp: 133-141.

20. **Kumari, J. and Sahoo, P.K., 2006.** Dietary immunostimulants influence specific immune response and resistance of healthy and immunocompromised Asian catfish *Clarias batrachus* to *Aeromonas hydrophila* infection. Disease of Aquatic Organisms. Vol. 70, pp: 63-70.

21. **Lee, W.J.; Farmer, J.L.; Hilty, M. and Kim, Y.B., 1999.** The Protective Effects of Lactoferrin Feeding against Endotoxin Lethal Shock in Germfree Piglets. Infection Immunity. Vol. 66, No. 4, pp: 1421-1426.

22. **Maqsood, S.; Samoon, M.H. and Singh, P., 2009.** Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila.* Turk Journal of Fish Aquatic Science. Vol. 9, pp: 111-120.

23. **Montero, R.A.; Mcintosh, D.; Sanchez, R. and Felores, I., 2005.** Immunostimulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following dietary administration of Ergosan. Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 91, pp: 188-194.

24. **Mori, M.; Wakabayashi, M.; Kaneko, Y. and Hasobe, M., 1998.** Application of a suspension cultured salmonid cell line CHSE-sp to cytotoxicity test. Fish Science. Vol. 64, pp: 991-992.

25. **Sakai, M., 1998.** Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture. Vol. 172, No. 1-2, pp: 63-92.

26. **Sakai, M.; Kobayashi, M. and Yoshida, T., 1995.** Activation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, phagocytic cells by administration of bovine lactoferrin. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 110, pp: 755-759.

27. **Sakai, M.; Otubo, T.; Atsuta, S. and Kobayashi, M., 1993.** Enhancement of resistance to bacterial infection in

rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of bovine lactoferrin. Journal of Fish Disease. Vol. 16, pp: 239-247.

28. **Schiller, J.H.; Lindstrom, M.; Witt, P.L. and Hank, G.A., 1991.** Immunological effects of levamisole in vitro. Journal of Veterinary Immunotherapy. Vol. 10, No. 5, pp: 297-306.

29. **Sun, L.R.; Li, X.; Cheng, Y.N.; Yuan, H.Y.; Chen, M.H. and Tang, W., 2009.** Reversal effect of substituted 1, 3-dimethyl-1H-quinoxalin-2-ones on multidrug resistance in adriamycin-resistant K562/A02 cells. Biomedicine Pharmacotherapy. Vol. 63, No. 3, pp: 202-208.

30. **Yamauchi, K.; Wakabayashi, H.; Hashimoto, S.; Teraguchi, S.; Hayasawa, H. and Tomita, M., 1998.** Effects of orally administered bovine lactoferrin on the immune system of healthy volunteers. Journal of Advanced in Experimental Medical Biology. Vol. 443, pp: 261-265.

31. **Zimecki, M.; Wlaszczyk, A.; Cheneau, P.; Brunel, A.S.; Mazurier, J.; Spik, G. and Kubler, A., 1998.** Immunoregulatory effects of a nutritional preparation containing bovine lactoferrin taken orally by healthy individuals. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. Vol. 46, No. 4, pp: 231-240.