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

- **مهدی محمدزاده:** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: 165
- **امیر توکمه‌چی*:** گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی آبزیان، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: 165

تاریخ دریافت: آذر 1393 تاریخ پذیرش: اسفند 1393

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 ویژگي‌های 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 37 درجه سانتی‌گراد و اتمسفر 5 درصدی گاز CO_2 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 ($P<0/05$) وابسته به غلظت و مدت زمان است. از طرفی هر ترکیب بسته به غلظت می‌تواند به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) 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 ($P<0/05$) دارای حداقل خاصیت سلول‌کشی هستند، درحالی که عصاره الکلی بره موم می‌تواند در غلظت‌های بالا به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) کشنده باشد.

کلمات کلیدی: عصاره الکلي بره موم، بتاگلوکان، لوامیزول، لاکتوفرین، رده سلولي CHSE-214

مقدمه

در جهان با رشد جمعیت، صنعت آبزي‌پروري به‌عنوان يكي از منابع تامين پروتئين مورد نياز انسان، مورد توجه پژوهشگران قرار دارد و با توسعه و پيشرفت اين صنعت و انواع دستكاري‌ها در پرورش ماهي، بروز انواع بيماري‌ها در آن‌ها در حال افزايش است. يكي از راه‌هاي مقابله با اين بيماري‌ها در مراكز پرورش ماهي و افزايش نرخ بقاي ماهي‌ها و دستيابي به سود كلان استفاده از آنتي‌بيوتيك-هاي مختلف مي‌باشد. استفاده طولاني مدت و مداوم آنتي‌بيوتيك‌ها علاوه بر اثرات زيست محيطي و جانبي روي ماهي‌ها، به وجود آمدن پديده مقاومت آنتي‌بيوتيكي و افزايش دوز مصرفي آنتي‌بيوتيك‌ها، به باقي ماندن دارو در بافت‌هاي ماهيان منجر مي‌شود كه سلامت فرد مصرف-كننده را با خطر مواجه مي‌سازد. به‌همين خاطر محققان همواره در فكر يافتن تركيبات طبيعي ضد ميكروبي براي مقابله با اثرات

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: atokmachi@gmail.com

بيماري‌زا با كارايي مناسب بوده‌اند. بنابراين با توجه به مسئله فوق يكي از راه‌هاي مفيد مقابله با بيماري‌هاي آبزيان بدون مصرف آنتي‌بيوتيك‌ها تقويت سيستم ايمني آبزيان به ويژه ماهي‌ها مي‌باشد (توكمه‌چي و بندبني، 1392). در اين راستا استفاده از مواد محرك ايمني به‌عنوان يك مكمل غذايي كه قادر به بهبود دفاع غيراختصاصي و ايجاد مقاومت در برابر عوامل بيماري‌زا در زمان بروز استرس‌هاي فراوان حين دوره پرورش ماهي باشند، مورد توجه هستند. در سال‌هاي اخير به‌دليل توجه به حفظ محيط زيست و بهره‌گيري از مواد بدون آلايندگي محيط زيست، استفاده از مواد محرك ايمني جانوري و گياهي در حال افزايش است. محرك‌هاي ايمني، عصاره‌هاي زيستي و مواد سنتزي مي‌باشند كه با افزايش عملكرد زيستي سلول‌هاي فاگوسيتيك و فعاليت باكتري‌كشي و نيز با توليد آنتي‌بادي موجب تحريك پاسخ ايمني مي‌گردند (Sakai، 1998). در حقيقت اين مواد گلبول‌هاي سفيد را فعال مي‌كنند. چنين موادي نه تنها، مقاومت موجود زنده را نسبت به بيماري‌هاي عفوني بيشتر مي‌كنند، بلكه خطر شيوع بيماري را كم مي‌كنند. تحقيقات در زمينه مواد محرك سيستم ايمني در حال توسعه بوده و در حال حاضر مواد زيادي در صنعت آبزي‌پروري استفاده مي‌شوند. اثرات تحريك‌كنندگي عصارة اتانولي بره‌موم، بتاگلوكان، كيتين، لوامیزول (Levamisole)، لاكتوفرين (Lactoferin)، اسيد آلژنيك و ارگوسان در ماهي‌ها گزارش شده است (Akbari و همكاران، 2014). اغلب اين مواد طبيعي يا سنتزي با وجود دارا بودن اثرات آنتي‌اكسيداني، ضدويروسي، ضدباكتريايي، ضدالتهابي، ضدقارچي، ضدانگلي، التيام زخم و بيماري ديابت و حتي ايمني‌زايي در انسان و حيوانات آزمايشگاهي، در زمينه اثرات ايمني‌زايي آن‌ها در ماهي‌ها اطلاعات بسيار محدودي در دسترس است. هم‌چنين فاكتورهاي غذايي مثل هورمون رشد و پرولاكتين به‌عنوان محرك سيستم ايمني گزارش شده‌اند. اين محرك‌ها، علاوه بر افزايش عملكرد فاگوسيتوزي و افزايش فعاليت باكتري‌كشي، هم‌چنين به‌عنوان سلول كشنده طبيعي كمپلمان، ليزوزيم و پاسخ آنتي‌بادي را تحريك مي‌كنند (Montero و همكاران، 2005؛ Sakai، 1998). از ديگر فوايد محرك‌هاي ايمني كاهش مرگ و مير، نسبت به پاتوژن‌هاي فرصت‌طلب، كاهش مرگ و مير آبزيان جوان و افزايش مقاومت در برابر پارازيت‌ها بوده است. در كل مشخص مي‌شود محرك‌هاي ايمني نرخ بقا را در موجودات زنده افزايش مي‌دهند (Beyraghdar Kashkooli و همكاران، 2011؛ Harikrishnan و همكاران، 2010؛ Harikrishnan و همكاران، 2009؛ Kimura و همكاران، 1996).

نتايج مطالعة Cuesta و همكاران (2005) با عصاره اتانولي بره موم و يا عصاره آبي بره موم در ماهي Gilthead sea bream در محيط زنده (in vivo) از اثرات تحريك‌كنندگي آن‌ها روي سيستم‌هاي ايمني خبر مي‌دهد. لاكتوفرين با خواص آنتي‌باكتريال عليه برخي باكتري‌هاي گرم منفي و مثبت، دفاع عليه عفونت‌هاي معده‌اي-روده‌اي، ايجاد سينرژيسم با برخي از ايمنوگلوبولين‌ها، پروتئين‌هاي سيستم دفاعي و محرك رشد سلول‌هاي بدن حيوانات به‌ويژه لنفوسيت‌ها و سلول‌هاي روده، كمك به جذب آهن در سطح روده كه هنوز اين ويژگی آخری از لحاظ علمي به اثبات نرسيده است (Caccavo و همكاران، 2002؛ Lee و همكاران، 1999؛ Zimecki و همكاران، 1998؛ Yamauchi و همكاران، 1998؛ Kruzel و همكاران، 1998).

در اوايل قرن بيستم پس از شناخت توانايي قارچ‌ها در تاثيرگذاري روي سيستم كمپلمان (Complement System)، توجه به پليمرهاي كربوهيدراتي از جمله گلوكان‌ها جلب گرديد. مطالعات نشان داد كه در ديوارة قارچ‌ها ماده‌اي به‌نام زيموزان (Zymosan) وجود دارد. از مطالعات مشخص شد كه تزريق

مستقيم داخل وريدي اين مادة قارچي، منجر به فعال شدن سيستم ايمني مي‌گردد. زيموزان شامل گلوكان‌ها، مانازها، كيتين، پروتئين و چربي مي‌باشد اما بتاگلوكان به‌عنوان بخش فعال زيستي و اصلي آن در تحريك سيستم ايمني معرفي شده است (Gonzalez و همكاران، 2004). مطالعات نقش اين پلي‌ساكاريدها را در مقابله با عفونت‌هاي ميكروبي نشان داد و حضور اين مواد در خون افراد بيمار، ناشي از ترشح آنها توسط ميكروب‌ها، مشخص گرديده است. مولكول 1و3 بتاگلوكان توسط ميكروارگانيسم‌ها به‌وفور ساخته مي‌شود اما ساير گونه‌ها قادر به سنتز آن نمي‌باشند (Colleoni-Sirghie و همكاران، 2003). فعاليت اين مولكول بستگي به انشعابات جانبي، طول پليمر و نيز ساختار سوم آن دارد، به‌طوري‌كه بتاگلوكان‌هاي با وزن مولكولي بالاتر فعاليت بيشتري نشان مي‌دهند (Kubala و همكاران، 2003). مطالعات در محيط آزمايشگاهي (in vitro) نشان داد بتاگلوكان مي‌تواند رشد و نمو تومورهاي با منشا قارچي، ويروسي و باكتريايي را با تحريك سيستم ايمني ميزبان كاهش داده يا مهار كند. نبود آنزيم گلوكاناز در سلول‌هاي پستانداران ممكن است يكي از دلايل فعاليت بتاگلوكان در آن‌ها است. مهم‌ترين عملكرد زيستي بتاگلوكان، فعال كردن ماكروفاژها، سلول‌هاي دندريتي، اندوتليالي، نوتروفيل‌ها، مونوسيت‌ها، لنفوسيت‌ها و سلول‌هاي كشنده طبيعي مي‌باشد (Gonzalez و همكاران، 2004). گيرنده‌هاي بتاگلوكان‌ها به‌طور دقيق شناخته نشده‌اند، اما اتصال بتاگلوكان به سلول‌هايي مانند ماكروفاژها و نوتروفيل‌ها و نيز سلول‌هاي غيرايمني شامل سلول‌هاي اندوتليالي، سلول‌هاي الوئولار، فيبروبلاست‌ها و حتي سلول‌هاي هيپوفيز قدامي گزارش شده است (Colleoni-Sirghie و همكاران، 2003؛ Brovko و همكاران، 1970).

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 به انجام 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، 1998؛ Clarke و همکاران، 1997؛ Schiller و همکاران، 1991).

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 1392 تا شهریور ماه سال 1393 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

1. Fetal Bovine Serum

بودن سلول‌ها ابتدا محتویات فلاسک خارج شده و به یک لوله 15 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 20 میکرولیتر از سوسپانسیون را داخل یک پلیت 96 خانه‌ای ته‌گرد تمیز ریخته و به آن تریپان‌بلو به میزان 20 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، 1385). در نهایت از رابطه زیر برای محاسبه تعداد سلول استفاده شد:

= تعداد سلول‌های موجود در 1 میلی‌لیتر از محلول سلولی
10000× 2 × 5 × تعداد سلول‌های موجود در 5 خانه

روش سنجش MTT[1]: در این مطالعه برای سنجش میزان سلول‌کشی عصاره الکلی بره موم، لاکتوفرین، لوامیزول و بتا گلوکان از روش Chang و همکاران (2007) و Sun و همکاران (2009) استفاده شد. به‌طور خلاصه، پس از سانتریفوژ و شمارش سلول‌های CHSE-214 به‌روش تریپان - بلو، مقدار 100 میکرولیتر (با تراکم 20000 سلول در محیط کشت RPMI به همراه 15 درصد FBS) به هر یک از چاهک‌های پلیت 96 خانه‌ای ته صاف اضافه شد. سپس 100 میکرولیتر محیط کشت حاوی رقت‌های مختلف عصاره الکلی بره موم، لوامیزول و بتا گلوکان (500، 1000، 2000 و 4000 میکروگرم در میلی‌لیتر محیط RPMI) به چاهک‌ها اضافه گردید. سه چاهک دیگر به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد و به هر کدام 100 میکرولیتر سلول به همراه 90 میکرولیتر محیط کشت و 10 میکرولیتر بافر فسفات افزوده شد. در مرحله بعد پلیت‌ها به‌طور جداگانه به‌مدت 12، 24، 48 و 72 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و در حضور 5 درصد گاز CO_2 گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون 20 میکرولیتر از محلول MTT (3_4 و 5 دی متیل تیازول 2_5 دی فنیل ترازولیوم بروماید، 5 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 100 میکرولیتر محلول DMSO خالص به چاهک‌ها و قراردادن پلیت‌ها در انکوباتور شیکردار حل شدند و سرانجام شدت نور جذب شده (OD) در طول موج 492 نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر ثبت گردید. درصد سلول‌کشی دیواره‌ها با فرمول زیر محاسبه گردید (Chin-Feng و Tzu-Ming، 2010):

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

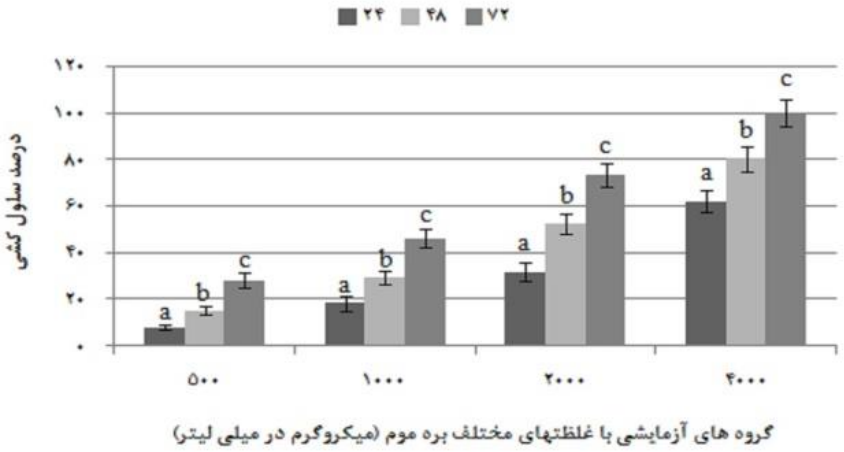
تجزیه و تحلیل‌های آماری:

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA؛ نرم افزار SPSS نسخه 19) و آزمون توکی (Tukey's test) استفاده گردید. قبل از مقایسه میانگین تیمارها نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف بررسی شد. داده‌هاي به‌دست آمده به‌صورت Mean ± SD بیان شدند. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P<0/05$ در نظر گرفته شد، هم‌چنین ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه 2010) انجام گرفت.

نتایج

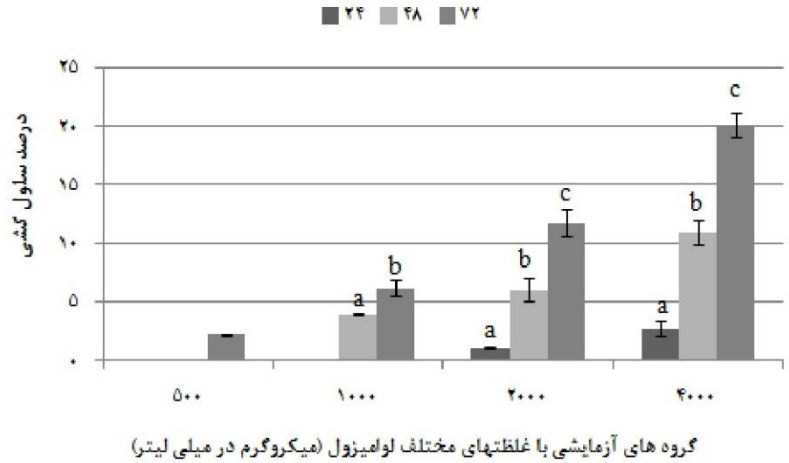
2. 3-(4,5-Dimethyl Thiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide

نتایج مطالعات نشان داد اثرات سلول‌کشی ترکیبات تحت مطالعه به ساختار ترکیب و غلظت آن وابسته است. شکل 1 نشان می‌دهد که عصاره الکلی بره موم در تمامی غلظت‌های به‌کار رفته سبب مرگ سلول‌های CHSE-214 می‌گردد. طوری‌که در زمان 24 ساعت کم‌ترین درصد سلول‌کشی در غلظت 500 میکرو گرم عصاره الکلی بره موم (1/01 ± 8/01 درصد) مشاهده شد و بیش‌ترین درصد سلول‌کشی مربوط به غلظت 4000 میکروگرم (5/01 ± 62/13 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 72 ساعت در سلول‌ها مشاهده می‌گردد. در شکل 1 چون اختلاف معنی‌دار در تمامی سطوح دیده می‌شود، به‌همین خاطر از حروف یا ستاره برای نشان دادن تفاوت‌های معنی‌دار استفاده نشده است.



شکل 1: 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 500 میکروگرم لوامیزول در مدت زمان 24 ساعت هیچ‌گونه خاصیت سلول‌کشی نداشت. بیش‌ترین خاصیت سلول‌کشی لوامیزول پس از گذشت 72 ساعت مشاهده شد که مربوط به غلظت 4000 میکروگرم در میلی‌لیتر (1 ± 20/11 درصد) آن بود (شکل 2). در شکل 2 ترسیم شده از داده‌های به‌دست آمده مانند شکل 1 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.



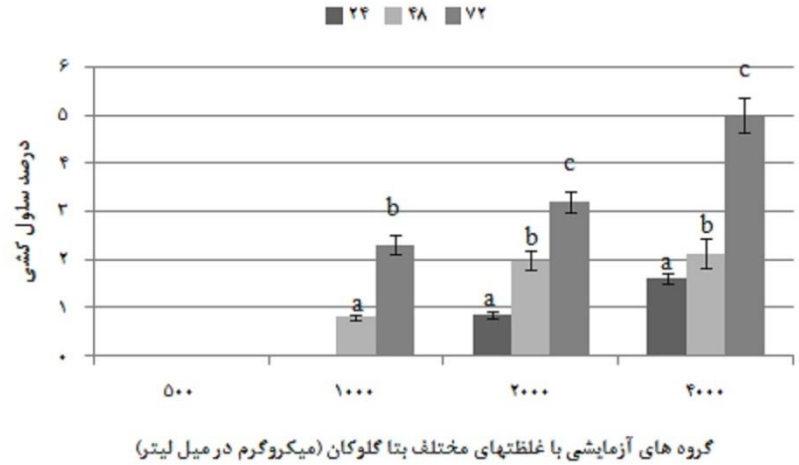
شکل 2: نمودار تاثیر سلول‌کشی لوامیزول در رده سلولی CHSE-214 در گروه-های آزمایشی مختلف

بتاگلوکان، برخلاف عصاره الکلی بره موم و لوامیزول، در غلظت 500 میکروگرم در میلی‌لیتر هیچ-گونه خاصیت سلول‌کشی در مدت زمان‌های 24، 48 و 72 ساعت نداشت (شکل 3). خاصیت سلول‌کشی بتاگلوکان در غلظت 1000 میکروگرم در میلی‌لیتر در مدت زمان 48 ساعت مشاهده می‌شود. بیشترین میزان سلول‌کشی بتاگلوکان مربوط به غلظت 4000 میکروگرم در میلی‌لیتر (1/6 ± 5/06 درصد) بود که پس از گذشت 72 ساعت مشاهده شد. در شکل 3 با توجه به مقادیر حاصله چون اختلاف معنی‌دار در بیشتر سطوح به‌جز در گروه‌های آزمایشی با غلظت‌های 2000 و 4000 میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به هم، در مدت زمان 48 ساعت دیده می‌شود، نیازی به آوردن حروف یا ستاره برای نشان دادن تفاوت‌های معنی‌دار روی نمودارها نمی‌باشد.

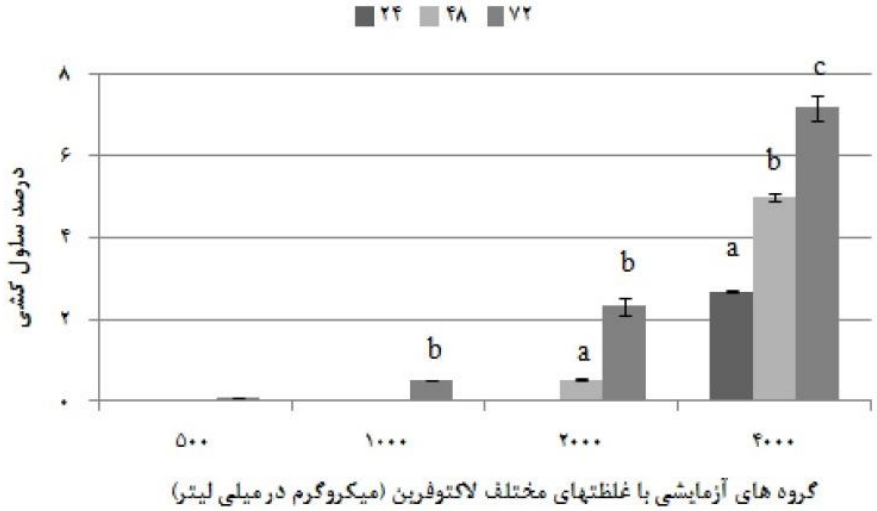
برخلاف عصاره الکلی بره موم و لوامیزول، لاکتوفرین در غلظت 500 میکرو گرم در میلی‌لیتر هیچ‌گونه خاصیت سلول‌کشی در زمان‌های 24 و 48 ساعت نداشت (شکل 4). خاصیت سلول‌کشی لاکتوفرین پس از گذشت 72 ساعت در غلظت‌های 500 و 1000 میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد که در غلظت 500 میکروگرم در میلی‌لیتر خیلی کم بود.

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 72 ساعت از مواجه شدن مشاهده می‌گردد. بیشترین میزان سلول‌کشی لاکتوفرین مانند دیگر ترکیبات تحت مطالعه مربوط به غلظت 4000 میکروگرم در میلی‌لیتر (1/6 ± 5/06 درصد) بود که پس از گذشت 72 ساعت از مواجه شدن مشاهده شد. در شکل 4 با توجه به مقادیر حاصله چون اختلاف معنی‌دار در تمامی سطوح دیده می‌شود، نیازی به آوردن حروف یا ستاره برای نشان دادن تفاوت-های معنی‌دار روی نمودارها نمی-باشد.

بررسی آماری خاصیت سلول-کشی عصاره الکلی بره موم، لاکتوفرین، لوامیزول و بتاگلوکان ثابت کرد که عصاره الکلی بره موم به‌طور معنی‌داری در سطح $P<0/05$ نسبت به لاکتوفرین، لوامیزول و بتاگلوکان دارای خاصیت سلول‌کشی بیشتری است. همچنین مقایسه لوامیزول در مقایسه با بتاگلوکان و لاکتوفرین به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) از خاصیت سلول‌کشی بالاتری برخوردار است.



شکل 3: نمودار تاثیر سلول‌کشی بتاگلوکان در رده سلولی CHSE-214 در گروه-های آزمایشی مختلف



شکل 4: نمودار تاثیر سلول‌کشی لاکتوفرین در رده سلولی CHSE-214 در گروه های 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 میکروارگانیسم-ها 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 (1994) و Li و Gatlin (2004) 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 (1992) 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 (1999) 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 (2005) 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 500 میکروگرم در میلی‌لیتر بتاگلوکان هیچگونه اثرات سلول‌کشی را حتی بعد از 72 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 4000 میکروگرم در میلی‌لیتر، پس از 72 ساعت مواجه شدن سلول‌های CHSE-214 مشاهده گردید. غلظت‌های 1000 و 2000 میکروگرم این ترکیب نیز به‌صورت حد واسط تاثیرگذار بوده و درصد سلول‌کشی آن‌ها از 0/9 تا 3 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 (2005) و Meurer و همکاران (2009) از عصاره الکلی بره موم برای افزایش رشد طیور و ماهی استفاده کردند. هم‌چنین Chu (2006) 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 *آئرومونـاس هیدروفیلا* افزایش می‌دهد.

Abd-El-Rhman (2009) 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 (2009) 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 (1391) 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 4000 میکروگرم در میلی‌لیتر پس از گذشت 72 ساعت سبب مرگ سلول‌های CHSE-214 می‌گردد که میزان آن برابر با 100 درصد بود. البته لازم به یادآوری است که عصاره الکلی بره موم در غلظت 500 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 (1993) 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، 1998؛ Sakai و همکاران، 1995؛ Sakai و همکاران، 1993). 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 500 میکروگرم در میلی‌لیتر آن حتی پس از گذشت 72 ساعت هیچ‌گونه تاثیر سلول‌کشی ندارد. هم‌چنین غلظت 1000 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 72 ساعت و در غلظت 4000 میکروگرم آن مشاهده شد که برابر با 7/19 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 (2006) 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 (2009) 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 4000 میکروگرم و پس از 72 ساعت مجاور شدن مشاهده گردید، درحالی که غلظت 500 میکروگرم آن پس از گذشت 48 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

1. توکمه‌چی، الف. و بندبنی، م.، 1392. تاثیر مکمل مخمری بر رشد و سیستم ایمنی در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره 68، شماره 1، صفحات 69 تا 78.

2. دلیرژ، ن.، 1385. دومین دوره کارگاه آموزشی روش‌های کشت سلول. دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه. صفحات 14 تا 42.

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

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.

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*