



Biological Journal of Microorganisms

Year 12, No.45, Spring 2023

Received: 2022-02-05

Accepted: 2022-04-19

(Research Paper)

Investigating the Effects of Lactoferricin Obtained from Lactoferrin on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Bacteria

Shiva Soleimani

Department of Biology, Faculty of Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran,
soleimani_shiva63@yahoo.com

Saeed Zibaei*

Department of Biology, Faculty of Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
Department of Research and Development of Biological Products, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Razi Vaccine and Serum Research Institute, Mashhad, Iran,

s.zibae@rvsri.ac.ir

Masoumeh Anvari

Department of Biology, Faculty of Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran,
Anvariir@yahoo.com

Abstract

Introduction: Lactoferricin, a cationic peptide, contains 25 amino acids and is located in domain I of the N-lactoferrin lobe. This peptide has more antibacterial activity than lactoferrin. The aim of the present study was to investigate the effects of Lactoferricin on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Materials and Methods: After isolation from camel milk, lactoferrin was purified using CM-Sephadex C-50 ion-exchange chromatography. Then, Lactoferricin was prepared by modified Law and Reiter methods and the protein was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and the antibacterial effect of different concentrations of lactoferricin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* was investigated.

Results: According to the obtained results, a concentration of 5 µg/ml Lactoferricin had the least inhibitory effect on the studied bacteria. Also, concentrations of 15 and 23 µg/ml

* Corresponding author

2322-5181/ © 2023 The Authors. Published by University of Isfahan

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2022.132468.1445](https://doi.org/10.22108/BJM.2022.132468.1445)



Lactoferricin with the inhibitory potency of 26-48 and 42-50% had the greatest inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively.

Discussion and Conclusion: Based on the results of the study, Lactoferricin has a significant and dose-dependent inhibitory effect on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The results show that Lactoferricin as an antibacterial agent can be useful in a variety of commercial programs to control the growth and survival of many pathogens.

Key words: Lactoferricin, Lactoferrin, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus Aureus*, Antimicrobial Peptides



زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال دوازدهم، شماره ۴۵، بهار ۱۴۰۲، صفحه ۶۵ - ۷۵
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰

مقاله پژوهشی

بررسی اثر لاکتوفریسین به دست آمده از لاکتوفرین بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا

شیوا سلیمانی:

دانشجوی دکتری گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران،
soleimani_shiva63@yahoo.com

سعید زیبایی*:

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
دانشیار بخش تحقیق و توسعه فرآورده‌های بیولوژیک، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی
شعبه شمال شرق، مشهد، ایران
s.zibae@nvsri.ac.ir
دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران،
anvariir@yahoo.com

چکیده

مقدمه: لاکتوفریسین، پپتیدی کاتیونی با ۲۵ اسید آمینه است و در دامین I لوب N لاکتوفرین قرار دارد. این پپتید در مقایسه با لاکتوفرین فعالیت ضدباکتریایی بیشتری دارد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر لاکتوفریسین بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا است.

مواد و روش‌ها: لاکتوفرین پس از جداسازی از شیر شتر، با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی CM-Sephadex C-50 خالص‌سازی گردید. سپس لاکتوفریسین به روش تغییر یافته Law و Reiter تهیه شد و بررسی پروتئین با الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید، انجام و اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف لاکتوفریسین علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد.

* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2022.132468.1445](https://doi.org/10.22108/BJM.2022.132468.1445)

نتایج: براساس نتایج، غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفریسین، کمترین اثر مهارى را بر باکتری‌های مطالعه‌شده داشت. همچنین غلظت‌های ۱۵ و ۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفریسین با قدرت مهارکنندگی ۴۸-۲۶ و ۵۰-۴۲ درصدی به ترتیب بیشترین اثر مهارى را بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مشخص شد لاکتوفریسین به‌طور معنی‌دار و وابسته به دوز بر رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* اثر مهارى دارد. نتایج نشان می‌دهند لاکتوفریسین به‌عنوان یک ماده ضدباکتریایی می‌تواند در انواع برنامه‌های تجاری برای کنترل رشد و بقای بسیاری از عوامل بیماری‌زا مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوفریسین، لاکتوفرین، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، پپتیدهای ضد میکروبی

مقدمه

امروزه مطالعات گسترده‌ای دربارهٔ ترکیبات شیر انواع حیوانات شیرده مانند گاو میش، گوسفند، بز و شتر و اثرات تغذیه‌ای آن در انسان صورت گرفته است. شیر شتر به‌عنوان یک منبع پروتئینی غنی (۴/۹-۲/۵ درصد) و همچنین وجود اسیدهای چرب غیراشباع بالا (۴۳ درصد)، داشتن اثرات ضدسرطانی^۱، کاهش دهندهٔ آلرژی^۲ و اثر ضددیابتی^۳ شایان توجه قرار گرفته و به تازگی نیز به‌عنوان یک جایگزین برای کودکانی پیشنهاد شده است که حساسیت به شیر گاو دارند. تعداد پپتیدهای فعال زیستی شناسایی شده و مشتق شده از پروتئین‌های شیر در حال افزایش است (۲،۱).

عمل ضد میکروبی در ایمنی ذاتی توسط پروتئین‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی مختلف انجام می‌شود که به‌صورت تکاملی حفظ شده‌اند (۳-۶).

لاکتوفرین^۴ جزء اصلی شیر و یک گلیکوپروتئین متصل به آهن است که در بیشتر ترشحات برون‌ریز مانند شیر، اشک، ترشحات بینی، بزاق، ادرار، ترشحات رحمی و مایعات آمنیوتیک^۵ یافت می‌شود (۷-۹).

همچنین لاکتوفرین در گرانول‌های ثانویه

نوتروفیل‌ها^۶ یافت شده است (۱۰).

محققان دریافته‌اند لاکتوفرین هضم‌شده توسط پپسین فعالیت ضد میکروبی قوی تری نسبت به پروتئین بومی دارد. پپتید ضد میکروبی مشتق شده از لاکتوفرین، لاکتوفریسین^۷ نامیده می‌شود. لاکتوفریسین برای اولین بار توسط تومیتا و همکاران^۸ با اثر پپسین معده بر لاکتوفرین گاوی جدا شد که متعلق به گروه متنوعی از پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی است و در ناحیه N ترمینال لاکتوفرین قرار دارد و در بسیاری از عملکردهای دیگر لاکتوفرین نیز نقش دارد (۱۱، ۱۲).

پپتیدهای ضد میکروبی، پپتیدهای کوچکی هستند که فعالیت آنتی‌بیوتیکی گسترده‌ای را علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مختلف، قارچ‌ها، تک‌یاخته‌ها و ویروس‌ها نشان می‌دهند (۱۹-۱۳).

ظهور و انتشار سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ویژه سویه‌های بیمارستانی *استافیلوکوکوس اورئوس*^۹ و *سودوموناس آئروژینوزا*^{۱۰} در سراسر جهان افزایش یافته و به اپیدمی جهانی درآمده است؛ از این رو، جستجو برای یافتن جایگزین‌های ضد میکروبی مناسب ضروری است (۲۰، ۲۱).

با توجه به اینکه فعالیت ضد میکروبی لاکتوفرین در

اورئوس (ATCC25923) از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شمال شرق، تهیه و تعداد باکتری‌ها^{۱۴} اندازه‌گیری شدند و از رقت‌های 10^6 ، 10^7 و 10^8 استفاده شد (۲۴، ۱۸).

بررسی اثر غلظت‌های مختلف لاکتوفریسین بر

باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس

آئروژینوزا: اثر غلظت‌های 10^6 ، 10^7 و 10^8 میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفریسین بر رشد و تکثیر استافیلوکوکوس اورئوس و اثر غلظت‌های 10^6 ، 10^7 و 10^8 میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفریسین بر رشد و تکثیر سودوموناس آئروژینوزا از ساعت‌های ۰ تا ۲۴ (به فاصله هر دو ساعت) بررسی شد. در این بررسی تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، 33×10^6 ، 33×10^7 و 33×10^8 بر میلی‌لیتر و تعداد باکتری سودوموناس آئروژینوزا، $15/5 \times 10^4$ ، $15/5 \times 10^5$ و $15/5 \times 10^6$ بر میلی‌لیتر است. از محیط BHI^{۱۵} برای رشد باکتری‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برای هر چاهک استفاده شد. به منظور مقایسه کنترل رشد برای استافیلوکوکوس اورئوس از 33×10^6 ، 33×10^7 و 33×10^8 باکتری بر میلی‌لیتر، فسفات بافر سالین^{۱۶} و BHI و به منظور مقایسه کنترل رشد برای سودوموناس آئروژینوزا از $15/5 \times 10^4$ ، $15/5 \times 10^5$ و $15/5 \times 10^6$ باکتری بر میلی‌لیتر، فسفات بافر سالین و BHI استفاده شد (۲۵، ۲).

آنالیز داده‌ها: به منظور تجزیه و تحلیل آماری روی

یافته‌های به دست آمده، ابتدا با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریسم^{۱۷} ۹ آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه^{۱۸}، انجام و از نظر آماری مقادیر $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار میان گروه‌ها به منظور تفکیک گروه‌هایی که با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند، از آزمون توکی^{۱۹} استفاده شد. نمودارها توسط

تحقیقات به اثبات رسیده است، مطالعه حاضر برای ارزیابی بررسی اثر لاکتوفریسین به دست آمده از لاکتوفرین بر باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

خالص‌سازی لاکتوفرین: خالص‌سازی لاکتوفرین

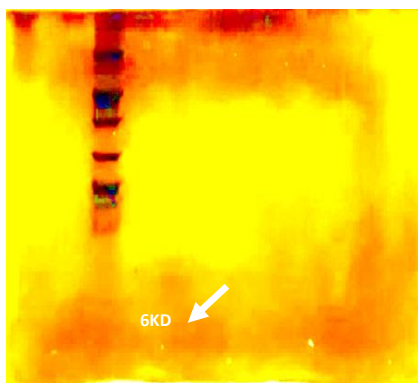
شیر شتر پس از چربی‌زدایی (توسط سانتریفوژ و عبور از کاغذ صافی) با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی سی‌ام سفاکس سی ۱۱۵۰ انجام شد. برای تأیید از الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید^{۱۲} و آزمایش تترامیل بنزیدین^{۱۳}، استفاده و میزان پروتئین به روش برادفورد اندازه‌گیری شد. برای افزایش غلظت لاکتوفرین فراکسیون‌ها لیوفیلیزه شدند (۲۲، ۲۳).

تهیه لاکتوفریسین: برای به دست آوردن

لاکتوفریسین، لاکتوفرین در آب مقطر با غلظت ۵ درصد (w/v)، حل و برای رسیدن به pH=۳، اسید کلریدریک ۱ نرمال، افزوده و پسین با غلظت نهایی ۳ درصد (w/w سوپسترا) اضافه شد. سپس هیدرولیز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انجام شد. واکنش با حرارت دادن در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه خاتمه یافت و برای رسیدن به pH=۷، هیدروکسید سدیم ۱ نرمال افزوده شد. رسوب تشکیل شده از طریق سانتریفوژ برداشته و مایع رویی لیوفیلیز و نگهداری شد. برای تأیید از SDS-PAGE با استفاده از پلی‌آکریل آمید ۲۰ درصد و رنگ آمیزی نیترا نقره استفاده و پروتئین به روش برادفورد اندازه‌گیری شد (۲۴).

تهیه سوش باکتریایی: باکتری‌های سودوموناس

آئروژینوزا (ATCC27853) و استافیلوکوکوس



شکل ۲- باند پروتئینی حدود ۶ کیلوالتونی لاکتوفریسین با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید ۲۰ درصد و رنگ‌آمیزی نترات نقره

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف لاکتوفریسین بر

باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس

آئروژینوزا: براساس نتایج، لاکتوفریسین میزان رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس *آئروژینوزا* را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد. نتایج حاصل از بررسی آماری غلظت‌های ۵، ۸ و ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفریسین روی ۳ رقت 10^6 ، 10^7 و 10^8 باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و غلظت‌های ۵، ۱۳ و ۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفریسین روی ۳ رقت 10^6 ، 10^7 و 10^8 سودوموناس *آئروژینوزا* در تصویر به صورت گروه یک، دو و سه بیان شده است. نتایج نشان دادند کاهش رشد در تمام رقت‌های استافیلوکوکوس اورئوس پس از تیمار با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفریسین موجب کاهش رشد شد؛ اما در بررسی آماری معنی‌دار نبود. تأثیر غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر رقت‌های 10^6 و 10^7 استافیلوکوکوس اورئوس معنی‌دار بود ($p < 0/05$) و غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفریسین باعث کاهش رشد هر سه رقت باکتریایی شد. با افزایش رقت باکتری‌ها، اثربخشی لاکتوفریسین نیز کاهش یافت. همچنین کاهش میزان جذب در تمام رقت‌های سودوموناس *آئروژینوزا* پس از تیمار با غلظت ۵

نرم‌افزار اکسل^{۲۰} رسم شدند.

نتایج

نتایج خالص‌سازی لاکتوفریسین: شیر شتر پس از

چربی‌زدایی با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی خالص شد. در SDS-PAGE باندهای پروتئینی حدود ۸۰ کیلوالتونی مشاهده شد (شکل ۱) و میزان پروتئین ۴۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. نتایج آزمایش TMB نشان دادند فراکسیون‌های ۰/۶، ۰/۷ و ۰/۸ لاکتوفریسین است.



شکل ۱- باند پروتئینی حدود ۸۰ کیلوالتونی لاکتوفریسین

نتایج تهیه لاکتوفریسین: در SDS-PAGE باندهای

پروتئینی حدود ۶ کیلوالتونی مشاهده شد (شکل ۲) که نشان‌دهنده لاکتوفریسین نسبتاً خالص بوده است و میزان پروتئین ۷۴/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

میکروگرم بر میلی لیتر لاکتوفریسین به ترتیب در محدوده ۱۹ تا ۴۱ درصدی و ۲۶ تا ۴۸ درصدی مشاهده شد (شکل ۳).

غلظت‌های ۱۳ و ۲۳ میکروگرم بر میلی لیتر لاکتوفریسین به ترتیب موجب مهار ۳۵ تا ۴۳ درصدی و ۴۲ تا ۵۰ درصدی سودوموناس آئروژینوزا شدند (شکل ۴).

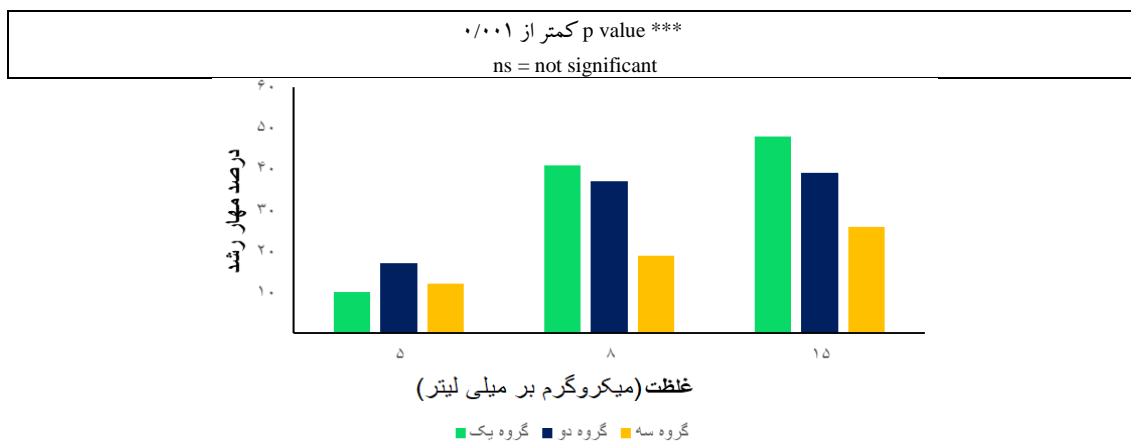
در شکل ۵ مقایسه میزان رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا پس از تیمار با غلظت‌های ۱۵ و ۲۳ میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با گروه کنترل آورده شده است.

میکروگرم بر میلی لیتر لاکتوفریسین موجب کاهش رشد شد؛ اما معنی دار نبود. غلظت ۱۳ میکروگرم بر میلی لیتر لاکتوفریسین، روی رقت 10^6 سودوموناس آئروژینوزا معنی دار بود و باعث کاهش رشد شد ($p < 0/05$). همچنین تأثیر لاکتوفریسین بر رقت‌های 10^7 و 10^8 سودوموناس آئروژینوزا معنی دار بود و در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش رشد شد ($p < 0/01$). غلظت ۲۳ میکروگرم بر میلی لیتر لاکتوفریسین نیز روی رقت‌های 10^6 ، 10^7 و 10^8 سودوموناس آئروژینوزا معنی دار بود و باعث کاهش رشد شدند که مقادیر معنی داری به ترتیب $p < 0/01$ ، $p < 0/05$ و $p < 0/001$ بودند (جدول ۱ و شکل ۵).

میزان درصد مهار کنندگی در غلظت‌های ۸ و ۱۵

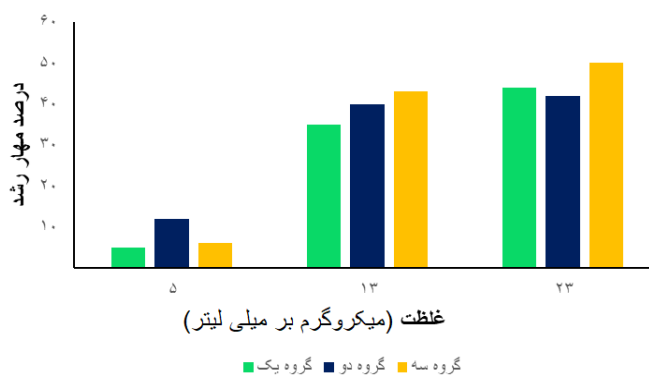
جدول ۱- تأثیر مهار رشد باکتری‌های مطالعه شده پس از تیمار با غلظت‌های مختلف لاکتوفریسین در مقایسه با گروه کنترل

نتایج آماری		رقت‌های باکتری	غلظت‌های لاکتوفریسین	باکتری
مقادیر p value	مقادیر p value			
ns	۰/۹	CFU 10^6	۵ میکروگرم بر میلی لیتر	استافیلوکوکوس اورئوس
ns	۰/۱	CFU 10^7		
ns	۰/۲	CFU 10^8		
**	۰/۰۰۴	CFU 10^6	۸ میکروگرم بر میلی لیتر	
**	۰/۰۰۴	CFU 10^7		
ns	۰/۱۴	CFU 10^8		
***	۰/۰۰۴	CFU 10^6	۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر	
**	۰/۰۰۴	CFU 10^7		
*	۰/۱۴	CFU 10^8		
ns	۰/۰۳	CFU 10^6	۵ میکروگرم بر میلی لیتر	سودوموناس آئروژینوزا
ns	۰/۹۸	CFU 10^7		
ns	۰/۹۸	CFU 10^8		
*	۰/۰۰۱	CFU 10^6	۱۳ میکروگرم بر میلی لیتر	
**	۰/۰۰۷	CFU 10^7		
**	۰/۰۱	CFU 10^8		
***	۰/۰۰۰۷	CFU 10^6	۲۳ میکروگرم بر میلی لیتر	
**	۰/۰۰۳	CFU 10^7		
*	۰/۰۱	CFU 10^8		
* p value کمتر از ۰/۰۵				
** p value کمتر از ۰/۰۱				



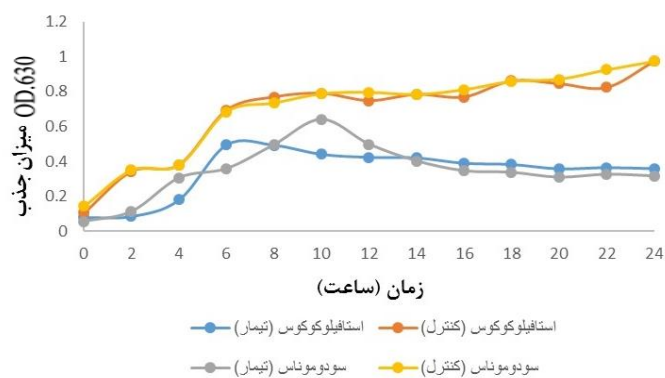
شکل ۳- مقایسه درصد مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط لاکتوفریسین

میزان درصد مهار کنندگی در غلظت‌های ۸ و ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفریسین به ترتیب در محدوده ۱۹ تا ۴۱ درصدی و ۲۶ تا ۴۸ درصدی مشاهده شد.



شکل ۴- مقایسه درصد مهار رشد باکتری *سودوموناس آتروئرتینوزا* توسط لاکتوفریسین

غلظت‌های ۱۳ و ۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفریسین به ترتیب موجب مهار ۳۵ تا ۴۳ درصدی و ۴۲ تا ۵۰ درصدی *سودوموناس آتروئرتینوزا* شدند.



شکل ۵- مقایسه میزان رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا پس از تیمار با غلظت‌های ۱۵ و ۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفریسین در مقایسه با کنترل‌ها

بحث و نتیجه گیری

مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها سبب به وجود آمدن سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و تهدیدی برای سلامت تبدیل شده است و تحقیق را برای توسعه عوامل ضد میکروبی جدید لازم می‌کند (۲۶، ۲۰).

پپتیدهای ضد میکروبی مجموعه وسیعی از مولکول‌های تولید شده توسط موجودات زنده هستند که موانع طبیعی در برابر عفونت‌اند. لاکتوفرین نقش مهمی در سیستم ایمنی ذاتی دارد و به عنوان یک مولکول مهم دفاعی میزبان به شمار می‌رود. پپتیدهای مشتق شده از لاکتوفرین، نظیر لاکتوفریسین و لاکتوفرامپین، اثرات ضد میکروبی قوی تری نسبت به پروتئین کامل از خود نشان می‌دهند؛ به ویژه، لاکتوفریسین فعالیت ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد انگلی قوی با کاربردهای امیدوارکننده برای پیشگیری و درمان را نشان داده است (۲۷، ۲۵).

لاکتوفریسین یک پپتید مشتق شده از لاکتوفرین است و تحقیقات انجام شده اثرات ضد میکروبی این پپتید را نشان می‌دهد. لاکتوفریسین از هضم لاکتوفرین توسط پپسین شناسایی شد. این پپتید طیف متنوعی از فعالیت‌های بیولوژیکی از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، تعدیل سیستم ایمنی، تعدیل رشد سلولی و اتصال و مهار چندین ترکیب زیست‌فعال مانند لیپوپلی ساکارید را دارد (۲، ۱۸، ۲۴، ۲۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهند لاکتوفریسین شتر در شرایط آزمایشگاهی کاهش رشد سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس را باعث شده است. غلظت‌های ۱۳ و ۲۳ میکروگرم بر

میلی‌لیتر لاکتوفریسین در بازه زمانی ۲۴ ساعته به صورت وابسته به دوز موجب مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا در مقایسه با گروه کنترل و غلظت‌های ۸ و ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفریسین موجب مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با گروه کنترل شدند؛ با این حال، غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفریسین تأثیر معنی‌داری بر کاهش رشد استافیلوکوکوس اورئوس نداشته است. همچنین بر اساس نتایج، کاهش رشد در استافیلوکوکوس اورئوس وابسته به دوز بود؛ به صورتی که با افزایش غلظت لاکتوفریسین میزان مهار رشد نیز افزایش یافت. این مشاهدات نشان داد لاکتوفریسین برای ممانعت از رشد و بقای عوامل بیماری‌زا می‌تواند مفید باشد.

در پژوهش برونوی و همکاران^{۲۱}، لاکتوفریسین به عنوان یک عامل ضد باکتریایی قوی‌تر از لاکتوفرین معرفی شد. در این پژوهش مقایسه فعالیت لاکتوفریسین گونه‌های مختلف (گاو، موش و بز) نشان داد لاکتوفریسین گاوی^{۲۲} اثر ضد میکروبی بیشتری دارد. این محققان بیان کردند MIC لاکتوفریسین گاوی در برابر سویه‌های *اشریشیا کلی*^{۲۳} حدود ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است؛ در حالی که MIC لاکتوفریسین انسانی^{۲۴} ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است (۲۵).

نتایج پژوهش واکابایاشی و همکاران^{۲۵} نشان دادند *لیستریا مونوسیتوژنز* توسط لاکتوفریسین مهار و غیرفعال می‌شود. این محققان نشان دادند در شرایط مختلف، لاکتوفریسین اثربخشی مشابه بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌هایی را نشان می‌دهد که باعث مهار رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در غلظت‌های کمتر از ۱۰

از محیط بیان کردند؛ اما یافته‌های جدیدتر برهمکنش‌های سلولی گسترده‌تری را دخیل می‌دانند. لاکتوفریسین با برهمکنش مستقیم با قسمت لیپید A در لیپولی ساکارید باکتری‌های گرم منفی و آسیب‌رساندن به غشای باکتری موجب تغییر در نفوذپذیری غشای خارجی و آزادسازی لیپولی ساکارید^{۳۲} می‌شود (۳۱).

ایجاد دپلاریزاسیون و متعاقب آن از دست دادن یکپارچگی غشای داخل سیتوپلاسمی، مکانیسم اصلی لاکتوفریسین برای مرگ سلولی در باکتری‌های مدنظر می‌تواند باشد (۳۲).

مکانیسم ضد میکروبی لاکتوفریسین علیه باکتری‌های گرم مثبت، همانند لاکتوفریسین می‌تواند به دلیل برهمکنش آن با اسید لیپوتیکوئیک باشد که به کاهش بار منفی در غشا منجر می‌شود؛ در این صورت لیزوزیم به پپتیدو گلیکان دسترسی پیدا می‌کند و سبب ایجاد منفذ در باکتری می‌شود (۳۳).

با بررسی‌های انجام‌شده مشخص شد در جهان تحقیقات بسیار کمی انجام گرفته و در ایران نیز تحقیقی انجام نشده است. با توجه به خاصیت ضد میکروبی لاکتوفریسین، بررسی بیشتر پپتیدهای مشتق‌شده از لاکتوفریسین و بررسی تأثیر آنها بر عوامل بیماری‌زا و استفاده درمانی آنها پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از حمایت‌های مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شمال شرق و جناب آقای دکتر حسین زحمتکش برای یاری‌های ارزنده‌شان طی پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌شود. علاوه بر این، لاکتوفریسین باعث از بین رفتن سریع و برگشت‌ناپذیر بقای هر چهار سویه لیستریا مونوسیتوزنر مدنظر شد (۲۴).

نتایج پژوهش بلامی و همکاران^{۲۶} نشان دادند طیف گسترده‌ای از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت توسط لاکتوفریسین مهار و غیرفعال می‌شوند (۱۸).

در پژوهش فارنود و همکاران^{۲۷} نشان داده شد لاکتوفریسین انسانی و لاکتوفریسین گاوی پپتیدهای ضد میکروبی هستند که از ناحیه N ترمینال لاکتوفریسین گاوی و لاکتوفریسین انسانی مشتق شده‌اند و فعالیت ضد میکروبی بیشتری دارند (۲۸).

همچنین در پژوهش هو و همکاران^{۲۸} بیان شد لاکتوفریسین به غشای سلولی نفوذ می‌کند و فعالیت‌های درون سلولی دارد. نتایج نشان دادند لاکتوفریسین تحمل /شریشیا کلی را در برابر محرک‌های محیطی کاهش می‌دهد و با تأثیر مستقیم بر فسفوریلاسیون سیستم دو جزئی^{۲۹} از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌کند (۲۹).

کاتیلا و همکارانش^{۳۰} اثر ضد باکتریایی غلظت‌های ۰/۶۷، ۱/۶۷ و ۲/۶۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لاکتوفریسین بر ایزوله‌های اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی^{۳۱} و همچنین بر سودوموناس آئروژینوزا و کلبسیلا پنومونیه جداشده از پستان گاو را بررسی کردند. بیشترین فعالیت بازدارندگی علیه اشریشیا کلی و سودوموناس مشاهده شد. همچنین لاکتوفریسین اثر چشمگیری بر حداکثر جذب (۰/۱۴ = p) استافیلوکوکوس اورئوس داشت؛ درحالی‌که هیچ اثر معنی‌داری برای CNS مشاهده نشد (۳۰).

در مطالعات اولیه، محققان علت مهار رشد باکتری‌ها توسط لاکتوفریسین و لاکتوفریسین را کسب آهن ضروری

References

- to consumption and its nutritional importance. Tehran; 2015. (<https://civilica.com/doc365440>).
- (2) Théolier J., Fliss I., Jean J., Hammami R. MilkAMP: a comprehensive database of antimicrobial peptides of dairy origin. *Journal of Dairy Science & Technology* 2014; 94 (2): 181-193.
- (3) Hancock R. E., Patrzykat A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Journal of Current Drug Targets-Infectious Disorders* 2002; 2 (1): 79-83.
- (4) Brogden K. A., Ackermann M., McCray Jr P. B., Tack B. F. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2003; 22 (5): 465-478.
- (5) Pasupuleti M., Schmidtchen A., Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Journal of Critical Reviews in Biotechnology* 2012; 32 (2): 143-171.
- (6) Maes M., Loyter A., Friedler A. Peptides that inhibit HIV-1 integrase by blocking its protein-protein interactions. *The FEBS Journal* 2012; 279 (16): 2795-2809.
- (7) Masson PL, Heremans JF. Metal-Combining Properties of Human Lactoferrin (Red Milk Protein) 1. The Involvement of Bicarbonate in the Reaction. *European Journal of Biochemistry* 1968; 6 (4): 579-584.
- (8) Masson P. L., Heremans J. F., Ferin J. Presence of an Iron-binding Protein (Lactoferrin) in the Genital Tract of the Human Female: I. Its Immunohistochemical Localization in the Endometrium. *Journal of Fertility and Sterility* 1968; 19 (5): 679-689.
- (9) Masson P. L., Heremans J. F., Schonke E. Lactoferrin, an iron-binding protein Ni neutrophilic leukocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 1969; 130 (3): 643-658.
- (10) Masson P., Heremans J. F., Prignot J. Immunohistochemical localization of the
- (1) Sherafati R, Dadkhah S, Kazemi N, Badrouj N. Investigation of nutritional and biological properties of camel milk. In: *2th national conference on milk health from production iron-binding protein lactoferrin in human bronchial glands. Experientia* 1965; 21 (10): 604-605.
- (11) Wakabayashi H., Takase M., Tomita M. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Journal of Current Pharmaceutical Design* 2003; 9 (16): 1277-1287.
- (12) Tomita M., Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of Dairy Science* 1991; 74 (12): 4137-4142.
- (13) Huan Y., Kong Q., Mou H., Yi H. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Journal of Frontiers in Microbiology* 2020; 11 (11): 1-21.
- (14) Mahlapuu M., Håkansson J., Ringstad L., Björn C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Journal of Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2016; 6 (6): 1-12.
- (15) Zhang Q. Y., Yan Z. B, Meng Y. M., Hong X. Y., Shao G., Ma J. J., Cheng X. R., Liu J., Kang J., Fu C. Y. Antimicrobial peptides: Mechanism of action, activity and clinical potential. *Journal of Military Medical Research* 2021; 8 (1): 1-25.
- (16) Lei J., Sun L., Huang S., Zhu C., Li P., He J., Mackey V., Coy D. H., He Q. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research* 2019; 11 (7): 3919-3931.
- (17) Boparai J. K., Sharma P. K. Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recent applications. *Journal of Protein and Peptide Letters* 2020; 27 (1): 4-16.

- (18) Bellamy W., Takase M., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Journal of Applied Bacteriology* 1992; 73 (6): 472-479.
- (19) Tang Z., Zhang Y., Stewart A. F., Geng M., Tang X., Tu Q., Yin Y. High-level expression, purification and antibacterial activity of bovine lactoferricin and lactoferrampin in *Photobacterium luminescens*. *Journal of Protein Expression and Purification* 2010; 73 (2): 132-139.
- (20) Lee B., Hwang J. S., Lee D. G. Antibacterial action of lactoferricin B like peptide against *Escherichia coli*: reactive oxygen species-induced apoptosis-like death. *Journal of Applied Microbiology* 2020; 129 (2): 287-295.
- (21) Akbari N., Ashrafi F., Salehi M. Antibacterial Effects of Chitosan Nanoparticles Loaded with Amoxicillin and Clavulanic acid against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences* 2009; 27 (2): 187-197.
- (22) Yoshida S. Isolation of lactoperoxidase and lactoferrins from bovine milk acid whey by carboxymethyl cation exchange chromatography. *Journal of Dairy Science* 1991; 74 (5): 1439-1444.
- (23) Rascón-Cruz Q., Espinoza-Sánchez E. A, Siqueiros-Cendón T. S, Nakamura-Bencomo S. I, Arévalo-Gallegos S., Iglesias-Figueroa B. F. Lactoferrin: A glycoprotein involved in immunomodulation, anticancer, and antimicrobial processes. *Molecules* 2021; 26 (1): 1-15.
- (24) Wakabayashi H., Bellamy W., Takase M., Tomita M. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferricin, a potent antimicrobial peptide derived from cow's milk. *Journal of Food Protection*. 1992; 55 (4): 238-240.
- (25) Bruni N., Capucchio M. T., Biasibetti E., Pessione E., Cirrincione S., Giraud L., Corona A., Dosio F. Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. *Molecules* 2016; 21 (6): 752.
- (26) Kalantar E., Maleki A., Khosravi M., Mahmodi S. Evaluation of Ultrasound Waves Effect on Antibiotic Resistance *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus* Isolated from Hospital and their Comparison with Standard Species. *Iranian Journal of Health & Environment* 2010; 3 (3): 319-326.
- (27) Reddy K. V., Yedery R. D., Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2004; 24 (6): 536-547.
- (28) Farnaud S., Patel A., Odel E. W., Evans R. W. Variation in antimicrobial activity of lactoferricin-derived peptides explained by structure modelling. *FEMS Journal of Microbiology Letters* 2004; 238 (1): 221-226.
- (29) Ho Y. H., Sung T. C., Chen C. S. Lactoferricin B inhibits the phosphorylation of the two-component system response regulators BasR and CreB. *Journal of Molecular & Cellular Proteomics* 2012; 11 (4): 1-10.
- (30) Kutila T., Pyörälä S., Saloniemi H., Kaartinen L. Antibacterial effect of bovine lactoferrin against udder pathogens. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2003; 44 (1): 1-8.
- (31) Ellison 3rd R. T., Giehl T. J., LaForce F. M. Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Journal of Infection and Immunity* 1988; 56 (11): 2774-2781.
- (32) Haukland H. H., Vorland L. H. Post-antibiotic effect of the antimicrobial peptide lactoferricin on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 48 (4): 569-571.
- (33) Weber-Dąbrowska B., Zimecki M., Kruzel M., Kochanowska I., Łusiak-Szelachowska M. Alternative therapies in antibiotic-

resistant infection. *Adv. Med. Sci.* 2006; 51 (51): 242-244.

- ¹- Anti-Cancer
- ²- Allergy Reducer
- ³- Anti-Diabetic
- ⁴- Lactoferrin (LF)
- ⁵- Amniotic Fluid
- ⁶- Neutrophils Secondary Granules
- ⁷- Lactoferricin (LFcin)
- ⁸- Tomita et al.
- ⁹- *Staphylococcus aureus*
- ¹⁰- *Pseudomonas aeruginosa*
- ¹¹- CM-Sephadex C-50
- ¹²- Polyacrylamide Gel Electrophoresis PAGE (SDS-PAGE)
- ¹³- TMB=Tetramethylbenzidine
- ¹⁴- CFU=Colony Forming Unit
- ¹⁵- Brain Heart Infusion
- ¹⁶- PBS=Phosphate-Buffered Saline
- ¹⁷- GraphPad Prism 9
- ¹⁸- ANOVA one-way
- ¹⁹- Tukey
- ²⁰- Excel
- ²¹- Bruni et al.
- ²²- bLfcin
- ²³- *E.coli*
- ²⁴- hLfcin
- ²⁵- Wakabayashi et al.
- ²⁶- Bellamy et al.
- ²⁷- Farnaud et al.
- ²⁸- Ho et al.
- ²⁹- Two-component Systems (TCS)
- ³⁰- Kutila et al.
- ³¹- CNS
- ³²- LPS=Lipopolysaccharide