



نشریه آموزشی - پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۴۴، پاییز ۱۴۰۱

ص:ص: ۱۶-۷

اثر توامان لاکتوفرین و نانوبادی بارگذاری شده بر روی کیتوزان علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا

شیوا سلیمانی^۱، سعید زبانی^{۲*}

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲- دانشیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، بخش تحقیق و توسعه فرآورده‌های بیولوژیک، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۱

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۳۰۴۵۹۱۹

Email: S.zibae@rvsri.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/aasrj.2022.128151

چکیده:

لاکتوفرین دارای وزن مولکولی حدود ۸۰ کیلودالتون و یک گلیکوپروتئین گلوبولار است. لاکتوفرین پس از جداسازی از شیر شتر، با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی سی ام سفادکس سی ۵۰ خالص گردید. با تزریق دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* همراه با ادجوانت‌های کیتوزان و آلوم به شتر، نانوبادی تهیه و با استفاده از آزمایش الیزا تولید آنتی‌بادی اختصاصی مورد تایید قرار گرفت. لاکتوفرین و نانوبادی با استفاده از روش تیامین پیروفسفات بر روی کیتوزان بارگذاری شدند. اثر توامان لاکتوفرین و نانوبادی بارگذاری شده بر روی کیتوزان علیه باکتری‌ها با استفاده از آزمایش بررسی میزان رشد باکترها در حضور نمونه یاد شده و یا عدم حضور (کنترل) بررسی گردید. جهت بررسی آماری ابتدا با استفاده از نرم افزار گراف پد پرسم ۹ آزمون آنالیز واریانس یک طرفه انجام و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار $P < 0.05$ به منظور تفکیک گروه‌ها از آزمون توکی استفاده شد. براساس نتایج، بسته به غلظت لاکتوفرین و رقت نانوبادی میزان رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب ۷۷/۵-۵۷ درصد و ۷۱/۵-۵۳/۵ درصد کاهش یافت. با توجه به نتایج می‌توان بیان داشت که لاکتوفرین و نانوبادی بارگذاری شده بر روی کیتوزان بر روی باکتری‌های گرم مثبت موثرتر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشند. با توجه به نتایج می‌توان بیان نمود که لاکتوفرین و نانوبادی بارگذاری شده بر روی کیتوزان به عنوان یک ماده ضدباکتریایی می‌توانند در انواع برنامه‌های تجاری برای کنترل رشد و بقای عوامل بیماری‌زا مفید باشند.

واژه‌های کلیدی: لاکتوفرین، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، کیتوزان

Applied Animal Science Research Journal No 44 pp: 7-16

Combined effect of lactoferrin and nanobody loaded on chitosan against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa***By: Shiva Soleimani¹, Saeed Zibaei^{2*}**

1-Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

2-Associate Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Northeast Branch, Department of Research and Development of Biological Products, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran

* Corresponding author: Saeed Zibaei Tel: 09153035919 Email: S.zibae@rvsri.ac.ir

Received: May 2022**Accepted: September 2022**

Lactoferrin has a molecular weight of about 80 kDa and a globular glycoprotein. After isolation from camel milk, lactoferrin was purified using CM Sephadex C-50 ion exchange chromatography. By injecting two bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, with chitosan and alum adjuvants to camel. Nanobodies were prepared and the production of specific antibodies was confirmed using ELISA. Lactoferrin and nanobody were loaded on chitosan using thiamine pyrophosphate method. The combined effect of lactoferrin and nanobody loaded on chitosan against bacteria was investigated using a bacterial growth test in the presence or absence (control) of the sample. For statistical analysis, first using Prism graph pad software 9 one-way analysis of variance was performed and if there was a significant difference of $P < 0.05$, Tukey test was used to separate the groups. Based on the results, depending on the concentration of lactoferrin and nanobody dilution, the growth rate of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* decreased by 57-77.5% and 51-53.5%, respectively, compared to the control group. It was stated that lactoferrin and nanobody loaded on chitosan are more effective on gram-positive bacteria than gram-negative bacteria. Based on the results, it can be stated that lactoferrin and nanobody loaded on chitosan as an anti-Bacteria can be useful in a variety of commercial programs to control the growth and survival of pathogens.

Key words: lactoferrin , aeruginosa , Staphylococcus aureus , Pseudomonas aeruginosa**مقدمه**

ارگانسیم‌ها نشان دهنده نقش مهم آن‌ها در پاسخ ایمنی است. لاکتوفرین جزء اصلی شیر و یک گلیکوپروتئین متصل به آهن می‌باشد (۱). لاکتوفرین طیف متنوعی از فعالیت‌های بیولوژیکی از جمله فعالیت‌های ضد میکروبی، فعالیت‌های ضد ویروسی و غیره را به نمایش می‌گذارد. اخیراً مشخص شده است که تجویز خوراکی لاکتوفرین اثرات محافظتی میزبان را در برابر عفونت‌ها در حیوانات و انسان‌ها اعمال می‌کند (۸،۹). ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، به ویژه سویه‌های بیمارستانی

امروزه مطالعات گسترده‌ای در مورد ترکیب شیر انواع حیوانات شیرده مانند گاو، میش، گوسفند، بز و شتر و اثرات تغذیه‌ای آن بر انسان انجام شده است. تعداد پپتیدهای فعال بیولوژیکی شناسایی شده و مشتق شده از پروتئین‌های شیر در حال افزایش است. پپتیدهای ضد میکروبی دسته‌ای از پپتیدهای کوچک هستند که بطور گسترده در طبیعت وجود دارند و بخش مهمی از سیستم ایمنی ذاتی موجودات مختلف هستند (۱۴). افزایش تعداد پپتیدهای کاتیونی ضد میکروبی شناسایی شده از طیف وسیعی از

۵-۲- خالص سازی ایمونوگلوبولین شتر (آنتی بادی اختصاصی یا نانوبادی)

جهت خالص سازی نانوبادی ابتدا ۱ میلی لیتر سرم را با ۵ میلی لیتر سولفات آمونیوم اشباع و ۴ میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفوژ انجام گردید. در مرحله بعد در یک میکروتیوب ۱ میلی گرم سی ام سفادکس سی ۵۰ در pH برابر ۶ ریخته و ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر نمونه با ۳۰ میکرولیتر بافر CM و ۲۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط گردید و به مدت ۳ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ انجام شد و محلول رویی دور ریخته و رقت نمکی ۰/۳ ریخته شد. ۲۰ دقیقه زمان داده و ۲ بار در ۳۰۰۰ دور به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ و در نهایت محلول رویی نگهداری و رسوب دور ریخته شد. برای تأیید از SDS-PAGE استفاده گردید.

۶-۲- تأیید وجود آنتی بادی های اختصاصی

جهت تایید حضور آنتی بادی اختصاصی از آزمایش الایزای غیرمستقیم استفاده شد.

۷-۲- خالص سازی لاکتوفرین

خالص سازی لاکتوفرین براساس روش راعی و همکاران ۲۰۱۵ (روش تغییر یافته یوشیدا ۱۹۹۱) انجام گرفت (۶،۱۳). خالص سازی لاکتوفرین شیر شتر پس از چربی زدایی (توسط سانتریفوژ و عبور از کاغذ صافی) با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی سی ام سفادکس سی ۵۰ انجام شد. برای تأیید از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید^۱ و آزمایش تترامیل بنزیدین^۲ استفاده گردید و میزان پروتئین به روش برادفورد اندازه گیری شد. جهت افزایش غلظت لاکتوفرین فراکسیون ها لیوفیلیزه شدند (۷،۱۳).

۸-۲- بارگذاری لاکتوفرین و نانوبادی بر روی کیتوزان

بارگذاری لاکتوفرین و نانوبادی بر روی کیتوزان با استفاده از TPP (تیامین پیروفسفات) انجام شد. پس از حل کردن TPP در آب دیونیزه و تنظیم pH آن، ۱۲۰ میکرولیتر از نمونه نانوبادی به آن اضافه گردید و بر روی شیکر ۱۰ میلی لیتر کیتوزان با pH برابر

استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا در سراسر جهان افزایش یافته و به یک اپیدمی جهانی تبدیل شده است. بنابراین، جستجو برای جایگزین های ضد میکروبی طبیعی مناسب ضروری است (۳). نانوبادی آنتی بادی تک دومنی است، که از یک دومن آنتی بادی متغیر منومریک منفرد، تشکیل شده است و بهتر از یک آنتی بادی کامل، قادر است بطور انتخابی به یک آنتی-ژن خاص متصل گردد (۵).

مطالعه حاضر جهت ارزیابی اثر توامان لاکتوفرین و نانوبادی بارگذاری شده بر روی کیتوزان علیه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا انجام گرفت.

۲- مواد و روش کار

۱-۲- تهیه سوش باکتریایی

سودوموناس آئروژینوزا (ATCC27853) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923) از موسسه سرم سازی و تحقیقات رازی شعبه شمال شرق تهیه شد.

۲-۲- اندازه گیری تعداد باکتری ها (CFU)

باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا را در محیط مایع BHI کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. تعداد باکتری ها بعد از کشت داخل پلیت اندازه گیری شدند و از رقت های ۱۰^۶، ۱۰^۷ و ۱۰^۸ استفاده گردید (۹).

۳-۲- تهیه واکسن

باکتری های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس به نسبت ۱ درصد با فرمالین ۳۷ درصدی غیرفعال شدند. بعد از غیرفعال سازی باکتری ها به میزان مساوی (W/W) ادجوانت کیتوزان و آلوم اضافه گردید. به منظور ایمن نمودن شترها، دو نفر شتر یک تا دو ساله انتخاب و به هر یک از شترها واکسن تزریق شد. هر دو تزریق به صورت زیرجلدی در دو ناحیه از گردن شترها انجام شد. تزریق دوم ۱۴ روز بعد از تزریق اول انجام گردید.

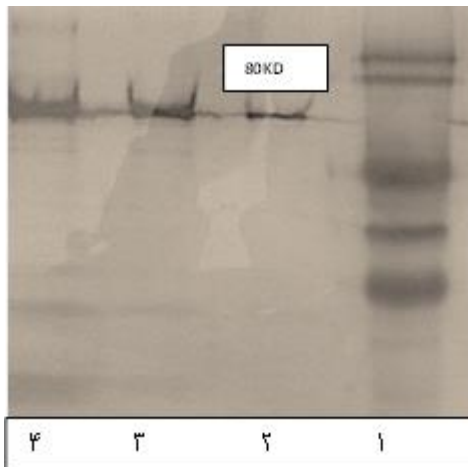
۴-۲- خون گیری و جدا کردن سرم

جهت تهیه سرم خون شتر سانتریفوژ شد (۴۰۰۰ دور در ۱۰ دقیقه) و سرم شتر جدا گردید.

¹ Polyacrylamide Gel Electrophoresis PAGE (SDS-PAGE)

² TMB=Tetramethylbenzidine

میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد. نتایج آزمایش TMB نشان داد که فراکسیون‌های ۰/۶، ۰/۷ و ۰/۸ لاکتوفرین می‌باشند.



شکل ۱-۲-۳- تصویر ژل پلی اکریل امید آزمایش SDS-PAGE تایید وجود لاکتوفرین در فراکسیون‌های حاصل از ستون تعویض یونی شماره ۱-مارکر پروتئینی شماره ۲-فراکسیون ۰/۶ شماره ۳-فراکسیون ۰/۷ شماره ۴-فراکسیون ۰/۸

۳-۳- نتایج تهیه واکسن

میزان ۲ میلی لیتر برای هر سویه واکسن تهیه گردید که در هر تزریق ۱ میلی لیتر به شتر تزریق شد.

۳-۴- نتایج خون گیری و جدا کردن سرم

میزان ۱۵ میلی لیتر خون از شتر گرفته شد که ۷ میلی لیتر سرم از آن جدا گردید.

۳-۵- نتایج تایید تولید نانوبادی اختصاصی و خالص سازی آن

نتایج نشان داد که بر علیه هر دو باکتری نانوبادی اختصاصی تولید شده است.

۵ اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۵۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت (۱۲).

۹-۲- بررسی لاکتوفرین و نانوبادی بر روی کیتوزان

جهت سنجش بارگذاری نانوبادی بر روی کیتوزان، از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده گردید. جهت آماده سازی نانوبادی تهیه شده بر روی کیتوزان برای تست میکروسکوپ الکترونی روبشی، ۸۰ میکرولیتر از نمونه را بر روی یک ورقه آلومینیوم قرار داده و دمای اتاق خشک گردید.

۱۰-۲- بررسی اثر ضد میکروبی توامان کیتوزان

بارگذاری شده با لاکتوفرین و نانوبادی

برای این منظور سه گروه کنترل مثبت، گروه کنترل منفی و نانوبادی‌های بارگذاری شده برای مقایسه و تعیین میزان ممانعت از رشد در نظر گرفته شد. برای کنترل مثبت از دو نمونه باکتری خالص و سرم باکتری آلوده به شتر استفاده گردید.

۱۱-۲- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تجزیه و تحلیل آماری بر روی یافته‌های به دست آمده، ابتدا با استفاده از نرم افزار گراف پد پرسم ۳۹ آزمون آنالیز واریانس یک طرفه^۴ انجام و از نظر آماری مقادیر $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد. در صورت وجود اختلاف معنی دار میان گروه‌ها به منظور تفکیک گروه‌هایی که با یکدیگر اختلاف معنی دار داشتند از آزمون توکی^۵ استفاده شد. نمودارها توسط نرم افزار اکسل^۶ رسم گردیدند.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج اندازه گیری تعداد باکتری‌ها

تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (CFU) 33×10^9 در میلی لیتر و تعداد باکتری سودوموناس آئروژینوزا (CFU) 31×10^{11} در میلی لیتر به دست آمد.

۳-۲- نتایج خالص سازی لاکتوفرین

شیر شتر پس از چربی زدایی با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی خالص شد. در SDS-PAGE باندهای پروتئینی حدود ۸۰ کیلودالتونی مشاهده گردید (تصویر ۱-۲-۳) و میزان پروتئین ۴۳۳

³ GraphPad Prism 9

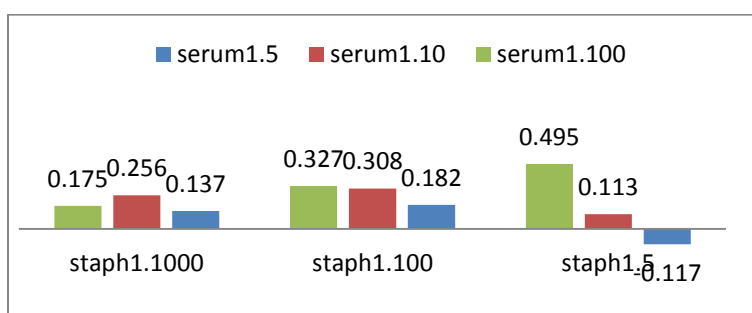
⁴ ANOVA one-way

⁵ Tukey

⁶ Excel

جدول ۱-۵-۳ نتایج حاصل از جذب نوری در آزمایش الیزا جهت تولید آنتی‌بادی اختصاصی مربوط به سرم شتر شماره یک، ۱۴ روز پس از تزریق دوم

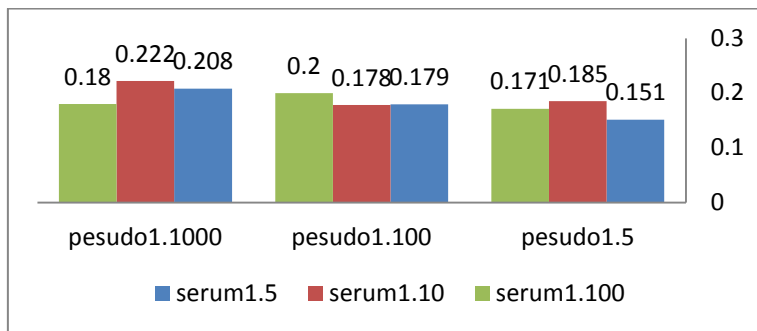
<i>S.aureus</i>	سرم شتر	سرم با رقت ۱/۵	سرم با رقت ۱/۵۰	سرم با رقت ۱/۱۰۰	انحراف معیار	Cut off
باکتری با رقت ۱/۵		۰/۴۳۳	۰/۶۶۳	۱/۰۴۵	۰/۲۱۸۶	۰/۵۵۰
باکتری با رقت ۱/۱۰۰		۰/۴۰۶	۰/۵۳۲	۰/۵۵۱	۰/۰۵۵۷	۰/۲۲۴
باکتری با رقت ۱/۱۰۰۰		۰/۳۳۶	۰/۴۵۶	۰/۳۷۵	۰/۰۴۳۳	۰/۲۰۰
کنترل منفی		۰/۱۱۳	۰/۱۱۳	۰/۱۱۳	-	-



نمودار ۱-۵-۳ نتایج حاصل از جذب نوری در آزمایش الیزا جهت تولید آنتی‌بادی اختصاصی پس از کسر Cut off مربوط به سرم شتر شماره یک، ۱۴ روز پس از تزریق دوم

جدول ۲-۵-۳ نتایج حاصل از جذب نوری در آزمایش الیزا جهت تولید آنتی‌بادی اختصاصی مربوط به سرم شتر شماره دو، ۱۴ روز پس از تزریق دوم

<i>P.aeruginosa</i>	سرم شتر	سرم با رقت ۱/۵	سرم با رقت ۱/۵۰	سرم با رقت ۱/۱۰۰	انحراف معیار	Cut off
باکتری با رقت ۱/۵		۰/۲۹۳	۰/۳۲۷	۰/۳۱۳	۰/۰۱۲۱	۰/۱۴۲
باکتری با رقت ۱/۱۰۰		۰/۳۲۰	۰/۳۱۲	۰/۳۳۴	۰/۰۰۷۹	۰/۱۳۴
باکتری با رقت ۱/۱۰۰۰		۰/۳۵۶	۰/۳۷۰	۰/۳۲۸	۰/۰۱۵۱	۰/۱۴۸
کنترل منفی		۰/۱۱۸	۰/۱۱۸	۰/۱۱۸	-	-



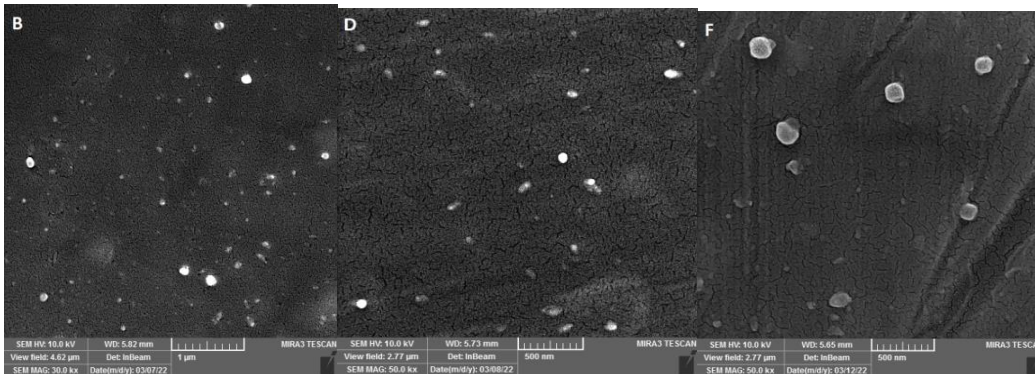
نمودار ۲-۳ نتایج حاصل از جذب نوری در آزمایش الیزا جهت تولید آنتی بادی اختصاصی پس از کسر Cut off مربوط به سرم شتر شماره دو، ۱۴ روز پس از تزریق دوم

نتایج SDS-PAGE خالص سازی نانوبادی را تایید نمود، باندهای پروتئینی حدود ۴۰ کیلودالتونی مشاهده گردید (شکل ۱-۵-۳)



شکل ۱-۵-۳ تصویر ژل پلی اکریل امید آزمایش SDS-PAGE باند پروتئینی ۴۰ کیلودالتونی تایید خالص سازی نانوبادی توسط کروماتوگرافی CM-Cephadex C-50

۳-۶ نتایج بارگذاری نانوبادی و لاکتوفرین بر روی کیتوزان توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی



شکل ۱-۶-۳ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی

B: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی غلظت ۳۵۰ لاکتوفرین بارگذاری شده بروی کیتوزان

D: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی رقت یک دوم نانوبادی (سودوموناس) بارگذاری شده بروی کیتوزان

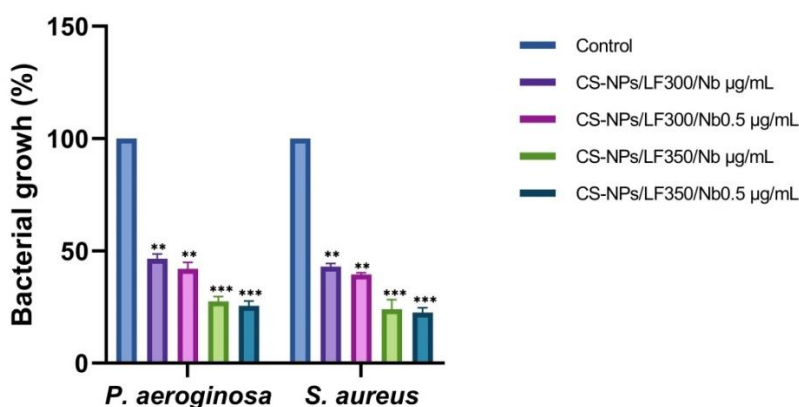
F: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی رقت یک دوم نانوبادی (استافیلوکوکوس) بارگذاری شده بروی کیتوزان

شده بر روی کیتوزان در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بوده و میزان پی ویو آن‌ها $p \text{ value} < 0.01$ می‌باشد (نمودار ۱-۷-۳).
میزان کاهش رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا پس از تیمار با غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفرین و هر دو رقت نانوبادی (یک و یک دوم) بارگذاری شده بر روی کیتوزان در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بوده و میزان پی ویو آن‌ها $p \text{ value} < 0.001$ می‌باشد (نمودار ۱-۷-۳).

۳-۷- نتایج بررسی اثر ضد میکروبی توامان لاکتوفرین و

نانوبادی بارگذاری شده بر روی کیتوزان

بر اساس نتایج، لاکتوفرین و نانوبادی بارگذاری شده بر روی کیتوزان میزان رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دادند.
میزان کاهش رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا پس از تیمار با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفرین و هر دو رقت نانوبادی (یک و یک دوم) بارگذاری



* p-value<0.05 ** p-value<0.01 *** p value<0.001 **** p value<0.0001

لاکتوفرین (LF) با غلظت های ۳۰۰ و ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

CS-NPs=نانوبادی با رقت های یک (Nb) و یک دوم (Nb0.5) بارگذاری شده بر روی کیتوزان

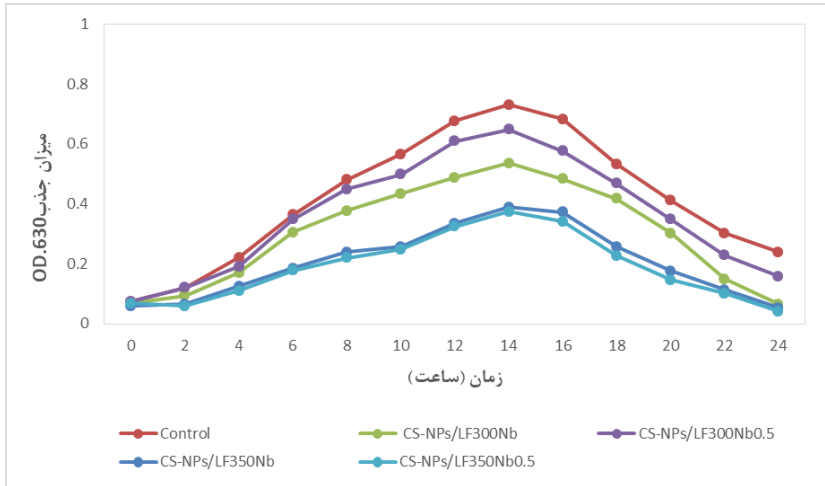
نمودار ۱-۷-۳ بررسی اثر ضد میکروبی کیتوزان بارگذاری شده با لاکتوفرین و نانوبادی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا

بر روی کیتوزان در مقایسه با گروه کنترل با $p \text{ value} < 0.001$ معنی دار می‌باشد.

منحنی رشد باکتری‌ها بر اساس دانسیته نوری در نمودارهای ۳-۷-۳ و ۳-۷-۴ نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود لاکتوفرین و نانوبادی، بطور معنی دار سبب کاهش رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا شدند. با توجه به منحنی‌های رشد می‌توان نتیجه گرفت که لاکتوفریسین و نانوبادی بارگذاری شده بر روی کیتوزان بر روی باکتری‌های گرم مثبت موثرتر از باکتری‌های گرم منفی عمل کرده‌اند.

میزان کاهش رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا پس از تیمار با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفرین و هر دو رقت نانوبادی (یک و یک دوم) بارگذاری شده بر روی کیتوزان در مقایسه با گروه کنترل با $p \text{ value} < 0.01$ معنی دار

می‌باشد. میزان کاهش رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا پس از تیمار با غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفرین و هر دو رقت نانوبادی (یک و یک دوم) بارگذاری شده

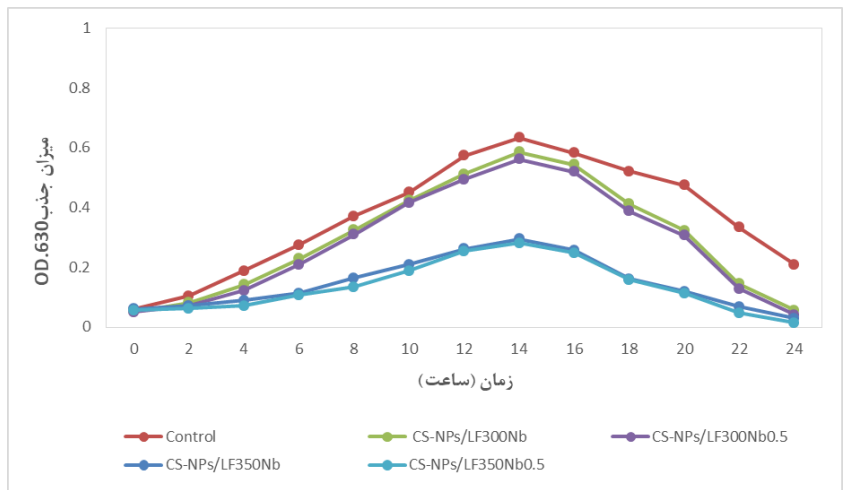


لاکتوفیرین (LF) با غلظت های ۳۰۰ و ۳۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر

CS-NPs=نانوبادی با رقت های یک (Nb) و یک دوم (Nb0.5) بارگذاری شده بر روی کیتوزان

نمودار ۲-۷-۳ منحنی رشد باکتری سودوموناس آئروژینیوزا بر اساس دانسیته نوری

لاکتوفیرین و نانوبادی، بطور معنی دار سبب کاهش رشد سودوموناس آئروژینیوزا شدند.



لاکتوفیرین (LF) با غلظت های ۳۰۰ و ۳۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر

CS-NPs=نانوبادی با رقت های یک (Nb) و یک دوم (Nb0.5) بارگذاری شده بر روی کیتوزان

نمودار ۳-۷-۳ منحنی رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس دانسیته نوری

لاکتوفیرین و نانوبادی بارگذاری شده، بطور معنی دار سبب کاهش رشد استافیلوکوکوس اورئوس شدند.

۴- بحث و نتیجه گیری

پتیدهای ضد میکروبی مجموعه بزرگی از مولکول‌ها می‌باشند و توسط موجودات زنده تولید می‌شوند که می‌توانند موانع طبیعی برای عفونت باشند. لاکتوفرین نقش مهمی در سیستم ایمنی ذاتی دارد و به عنوان یک مولکول دفاعی مهم میزبان در نظر گرفته می‌شود و دارای فعالیت ضد باکتری، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد انگلی است (۲،۶).

نتایج این بررسی نشان داد که غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفرین و رقت یک دوم میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوبادی و غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفرین و رقت یک دوم میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوبادی به ترتیب کمترین و بیشترین اثر را در کاهش رشد سودوموناس آئروژینوزا دارند و غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفرین و رقت یک میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوبادی و غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوفرین و رقت یک دوم میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوبادی به ترتیب کمترین و بیشترین اثر را در کاهش رشد استافیلوکوکوس اورئوس دارند.

بسته به غلظت لاکتوفرین و رقت نانوبادی مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب ۷۷/۵-۵۷ درصد و ۷۴/۵-۵۳/۵ درصد می‌باشد.

لاکتوفرین با برهمکنش مستقیم با بخش لیپولی ساکارید لیپید A در باکتری‌های گرم منفی و آسیب رساندن به غشای باکتری، نفوذپذیری غشای خارجی و آزادسازی لیپولی ساکارید را تغییر می‌دهد. دیپلاریزاسیون و متعاقب آن از دست دادن یکپارچگی غشای داخل سیتوپلاسمی ممکن است مکانیسم اصلی لاکتوفرین برای مرگ سلولی در باکتری‌های مورد مطالعه باشد (۳،۴،۱۰).

تحقیق انجام شده توسط یاهو و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان داد که ایمونوسوربنت بارگذاری شده با نانوبادی می‌تواند یک فناوری پلت فرم ساده و اقتصادی برای کاهش ایمنی سیتوکین‌های منفرد یا حتی چندگانه از پلاسما باشد (۱۱).

زیبائی و همکاران در سال ۱۳۹۹ آنزیم لاکتوپراکسیداز و لاکتوفرین را از شیر بز جداسازی نموده و بیان نمودند که

لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز، از مهمترین بیواکتیوهای شیر محسوب می‌شوند و عملکردهای کلیدی و متنوعی دارند و به عنوان فاکتورهای آنتی‌باکتریال مهم در شیر محسوب می‌گردند که از آن‌ها می‌توان برای کاهش رشد باکتریایی استفاده نمود (۱۵).

زیبائی و همکاران در سال ۱۴۰۰ اثر هم‌افزایی لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز شیر شتر بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را بررسی نمودند. این محققین نتیجه گرفتند که لاکتوفرین در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سبب رشد بهتر باکتری و در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۳۷ درصد کاهش رشد نسبت به کنترل مثبت داشته است، لاکتوپراکسیداز در هر سه غلظت ۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر جلوی رشد باکتری را گرفته و اثر غلظت ۰/۰۲ و ۰/۰۴ اثر مشابهی داشته است. در کشت ترکیبی آنزیم‌ها در هر سه غلظت بطور کامل رشد باکتری را جلوگیری کرده و لاکتوفرین اثر لاکتو-پراکسیداز را افزایش داده است. این دو پروتئین اثر هم‌افزایی برای مقابله با باکتری از خود نشان داده‌اند (۱۶).

با توجه به خواص ضد میکروبی لاکتوفرین و نانوبادی بارگذاری شده بر روی کیتوزان، مطالعه بیشتر پتید لاکتوفرین و تأثیر آن‌ها بر پاتوژن‌ها و استفاده درمانی از آن‌ها توصیه می‌گردد.

منابع

- 1- Akbari N, Qazvini K, Beheshti A, Ahadi Mitra, Sheikhi, Maryam. A review of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Iran and the world. *Scientific Journal of Medical University*, 2017; 60 (4): 661-648.
- 2- Bolori Moghaddam M, Bahmanpoor S, Zibae S, Izadi M, Lal Alizade S. Isolation of Lactoperoxidase Enzyme from Camels' Milk and Survey Its Antibacterial Effects against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Veterinary Microbiology*, 2011; 7 (2): 17-24
- 3- Farnaud S, Patel A, Odel EW, Evans RW. Variation in antimicrobial activity of lactoferricin-derived peptides explained by structure modelling. *FEMS Microbiology Letters*. 2004 Sep 1; 238(1): 221-6.

- 4- Haukland HH, Vorland LH. Post-antibiotic effect of the antimicrobial peptide lactoferricin on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001; 48 (4) :569-571.
- 5- Jovčevska I, Muyldermans S. The therapeutic potential of nanobodies. *BioDrugs*. 2020; 34 (1) :11-26.
- 6- Raei, M., Rajabzadeh, G., Zibaei, S., Jafari, S.M., & Sani, A.M. Nano-encapsulation of isolated lactoferrin from camel milk by calcium alginate and evaluation of its release. 2015. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol.79 pp: 669-673.
- 7- Rascón-Cruz Q, Espinoza-Sánchez EA, Siqueiros-Cendón TS, Nakamura-Bencomo SI, Arévalo-Gallegos S, Iglesias-Figueroa BF. Lactoferrin: A glycoprotein involved in immunomodulation, anticancer, and antimicrobial processes. *Molecules*. 2021; 26 (1) :1-15.
- 8- Sarhadi H, Jahandar MH, Tanhaeian A. Designing and Expression of Bovine Chimeric Lactoferrampine-Lactoferricin Peptide with Aim of Recombinant Protein Production in Tobacco. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*. 2021; 9 (1) :40-54.
- 9- 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.
- 10- 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.
- 11- Yao G, Huang C, Ji F, Ren J, Zang B, Jia L. Nanobody-loaded immunosorbent for highly-specific removal of interleukin-17A from blood. *Journal of Chromatography A*. 2021 Sep 27; 1654:462478.
- 12- Yang Y, Zhao X, Li X, Yan Z H, Liu Z H, Li Y. (2017). Effects of anti-CD44 monoclonal antibody IM7 carried with chitosan polylactic acid-coated nano-particles on the treatment of ovarian cancer. *Oncology Letters* .13:99-104.
- 13- 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.
- 14- Zibaei S, Rajabzadeh, Q, Mohammadi Thani A, Rai M. Nanoencapsulation of lactoferrin extracted from camel milk by calcium alginate. *Journal of Innovation in Food Science and Technology Quarterly*, 2013; 17:58-49.
- 15- Zibae S, Rahmani H, Rai M, Naeimipour M, Farzin H. Isolation of lactoperoxidase and lactoferrin from goat milk. Twenty-third National Congress of Food Science and Technology of Iran, Quchan, <https://civilica.com/doc/564417>. 2015 November
- 16- Zibae S, Shamloo, M, Mohammadi Sani, A. The Study effect of lactoferrin and lactoperoxidas from camel milk on *Staphylococcus aureus*. 2021. *Journal of Veterinary Microbiology*. Vol 17 .No 1. pp73-84.