DOI: 10.22092/vj.2019.124829.1548
شماره ۱۲۷ تابستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی اثر ضدباکتریایی پروتئین لاکتوپراکسیداز و پپتیدهای آن بر روی برخی از باکتری‌های مولد ورم پستان گاوشیری با داکینگ مولکولی

• **زهرا موسوی**
دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد
• **مرجان ازغندی**
دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد
• **مجتبی طهمورث پور (نویسنده مسئول)**
عضو هیأت علمی گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد
• **فهیمه محمدی**
دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۵-۱۰-۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۱۹-۰۳-۱۳۹۸
Email: mousavizara@gmail.com

چکیده

متاسفانه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری ورم پستان دام منجر به ایجاد اثرات جانبی نامطلوبی شده است. از جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک می‌توان به پروتئین‌های ضد میکروبی نظیر لاکتوپراکسیداز اشاره کرد. هدف از این پژوهش پیش‌بینی پپتیدهای پروتئین لاکتوپراکسیداز و مقایسه‌ی آن‌ها در گونه‌های انسان، شتر، گوسفند، بز، گاومیش و گاو و بررسی خواص ضد باکتریایی آن در برابر باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* مولد ورم پستان از طریق داکینگ مولکولی است. از این رو، خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین لاکتوپراکسیداز و پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از آن با استفاده از نرم‌افزار CLC Main Workbench 5 بررسی و سپس ساختار سوم آن برای شتر و انسان از طریق نرم‌افزار Swiss-Model پیش‌بینی شد. در ادامه پپتیدهای این پروتئین پیش‌بینی و در نهایت برهمکنش‌های پروتئین لاکتوپراکسیداز و پپتیدهای حاصل از آن با پروتئین‌های سطحی دو باکتری مذکور با استفاده از نرم‌افزار آنلاین ClusPro2.0 صورت گرفت. نتایج داکینگ مولکولی نشان داد که مناسب‌ترین موقعیت اتصال که در آن پروتئین لاکتوپراکسیداز حاصله با منفی‌ترین انرژی به پروتئین سطحی غشاء این دو باکتری متصل شده است، به ترتیب مربوط به گاو و بز می‌باشد. بررسی بیوانفورماتیکی هفت پپتید حاصل از این پروتئین نیز نشان داد که پپتید شماره‌ی سه مربوط به گاو، بز، گاومیش، گوسفند عملکرد بهتری در اتصال و تخریب پروتئین سطحی غشاء این دو باکتری داشته و با انرژی اتصال منفی تری نسبت به فرم کامل پروتئین لاکتوپراکسیداز به این باکتری‌ها متصل شده است. امید است بتوان در آینده از این پپتیدها به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش درمان بیماری ورم پستان استفاده کرد.

کلمات کلیدی: ورم پستان، پپتید، بیوانفورماتیک، داکینگ مولکولی

Veterinary Researches & Biological Products No 127 pp: 100-109

Antibacterial effect of lactoperoxidase protein and its peptides on some bacteria causing mastitis in dairy cattle by molecular docking method.

By: Mousavi, Z., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Azghandi, M., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Tahmourespour, M., (Corresponding Author) Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. and Mohammadi, F., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Received: 2019-01-05 **Accepted: 2019-06-09**

Email: mousavizara@gmail.com

Unfortunately, using the antibiotics to treat mastitis is increasing in which leads to undesirable side effects. One of the antibiotics alternatives with high potential are antimicrobial proteins like lactoperoxidase. The aim of this study was to predict the peptides of lactoperoxidase protein and compare them in six different species (human, camel, sheep, goat, buffalo and cattle) and also investigate its antibacterial properties against Staphylococcus aureus and Escherichia coli strains through Molecular docking. The study of physicochemical properties of the lactoperoxidase protein and the derived bioactive peptides has been done using the CLC Main Workbench 5 software. The Swiss-model server was applied to predict the third (three-dimensional) structure of lactoperoxidase protein for camel and human. The peptides of lactoperoxidase protein were predicted and ultimately, the interactions of this protein and its derived peptides with the outer membrane proteins of the mentioned names were survived using ClusPro2.0 online software. The results of the position and energy of bonding assessment using molecular docking show that the most suitable binding location, in which the derived lactoperoxidase protein is bound to the outer membrane proteins of bactria membrane, with the lowest energy, related to cattle and goat, respectively. Bioinformatics study of the seven derived peptides from this protein showed that the third peptide of cattle, goat, buffalo, and sheep has a better performance in binding and degrading the outer membrane protein of these bacteria. These peptides can be proposed as replacement antibiotics for the treatment of mastitis in the future.

Key words: Mastitis, Peptide, Bioinformatics, Molecular Docking

مقدمه

ورم پستان از شایع‌ترین و پرهزینه‌ترین بیماری‌های صنعت گاوهای شیری است که زیان‌های اقتصادی ناشی از آن چشم‌گیر است و سهم قابل‌توجهی از هزینه‌های درمانی گاوداری‌ها را به خود اختصاص می‌دهد (۵). از عوامل باکتریایی رایج در ایجاد این بیماری می‌توان به باکتری‌های گرم مثبت مانند *Staphylococcus* و *Streptococcus*، باکتری‌های گرم منفی مانند گونه‌های *Escherichia coli* اشاره کرد (۴، ۱۳، ۲۰). راه رایج درمان این بیماری استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هاست که متأسفانه امروزه تجویز و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت ابداعی و خلاف دستورالعمل رو به افزایش است که این خود عوارضی را در پی دارد (۱). در طول دو دهه‌ی گذشته گروه بزرگی از ترکیبات طبیعی با وزن مولکولی کم، از گیاهان و حیوانات استخراج شدند و فعالیت‌های ضدمیکروبی از خود نشان دادند که اصطلاحاً به آن‌ها پپتیدهای ضدمیکروبی (Antimicrobial peptides) گفته می‌شود. این ترکیبات در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و علاوه بر این‌ها انگل‌های تک‌یاخته و چندیاخته فعال هستند. محققان این پپتیدهای ضدمیکروبی را آنتی‌بیوتیک طبیعی نامیدند و اظهار داشتند که آن‌ها می‌توانند به‌عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی باشند (۱۹، ۳۰). از جمله پروتئین‌های دارای پتانسیل ضد باکتریایی می‌توان به لاکتوپراکسیداز (Lactoperoxidase) اشاره کرد. این پروتئین جز خانواده‌ی آنزیم‌های هم پراکسیداز بوده که نه تنها در ترشحات غدد پستانی، بلکه در بزاق و سایر غدد برون‌ریز مشاهده شده که دارای خواص شیمیایی و ایمونوژنیک مشابهی هستند (۶، ۳۳). لاکتوپراکسیداز یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی حدود ۷۸ کیلو دالتون است. حداقل ۱۰ فراکشن از این پروتئین شناخته شده است که از نظر فعالیت آنزیمی تفاوت چندانی با هم ندارند (۲۱). اولین مطالعه در ارتباط با اثر مهارکنندگی لاکتوپراکسیداز بر روی رشد میکروب‌ها توسط

هنسن (۱۹۲۴) گزارش شد. فعالیت پروتئین لاکتوپراکسیداز در حضور دو عنصر مهم شامل تیوسیانات (-SCN) و پراکسید هیدروژن (H۲۰۲) انجام می‌شود (۱۶). لاکتوپراکسیداز، تیوسیانات را در حضور پراکسید هیدروژن اکسید می‌کند و به این ترتیب موجب تولید محصولات واسطه‌ای با خواص ضد باکتریایی مانند هیپوتیوسیانات می‌گردد (۲۳). باکتری‌های گرم‌منفی و کاتالازمثبت نظیر سودوموناس، کلی‌فرم، سالمونلا و شیگلا توسط فعالیت لاکتوپراکسیداز مهار می‌شوند. همچنین سیستم لاکتوپراکسیداز موجب جلوگیری از فعالیت باکتری‌های کاتالازمنفی و گرم‌مثبت همانند استافیلوکوکوس‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها شده ولی آن ها را نمی‌کشد. این تفاوت می‌تواند به دلیل اختلاف در ویژگی‌های ساختار دیواره سلولی باکتری‌ها باشد. غشاء داخلی باکتری‌های گرم‌منفی بیشتر از باکتری‌های گرم‌مثبت توسط سیستم لاکتوپراکسیداز آسیب می‌بینند (۲۳). یکی از ویژگی‌های برجسته‌ی این آنزیم مقاومت حرارتی آن است که موجب مقاومت آن در برابر فرآیندهای پردازشی همچون پاستوریزاسیون (۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) می‌شود (۳۳). لاکتوپراکسیداز کاربردهای زیادی از جمله مهار باکتری‌های فاسدکننده در شیر، فرآورده‌های لبنی، گوشت و یا در محیط کشت‌های مصنوعی دارد (۱۲). علاوه بر این موارد، از این ترکیب به‌منظور محافظت در لوازم آرایشی (۱۴)، استفاده در پرورشگاه‌های ماهی، بهداشت دهان (۲۹)، از بین بردن باکتری *Listeria monocytogenes* از فیله‌ی تازه‌ی ماهی و سطح گوشت (۲۲) و مهار *salmonella enteritidis* و *Escherichia coli* در شیر خشک نوزادان (۳) استفاده می‌گردد. فعالیت‌های ضدمیکروبی پروتئین‌ها تنها مختص به فرم کامل پروتئین نیست، بلکه پژوهش‌ها نشان دادند که برخی پپتیدهای حاصل از پروتئین‌ها نیز می‌توانند فعالیت ضدمیکروبی وسیعی را، حتی بیشتر از پروتئین کامل از خود نشان دهند (۲۶). امروزه استفاده از روش‌های داکینگ مولکولی به منظور پیش‌بینی خواص ضد باکتریایی به عنوان یک روش جایگزین برای آزمایش‌های تجربی بوده که به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است. این روش‌ها به دلایلی همچون، آسان بودن و کم‌هزینه بودن در مقایسه با شرایط تجربی و آزمایشگاهی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۵). از این رو، هدف از این پژوهش پیش‌بینی پپتیدهای پروتئین لاکتوپراکسیداز و مقایسه‌ی آن‌ها در شش گونه‌ی مختلف انسان، شتر، گوسفند، بز، گاومیش و گاو و بررسی خواص ضد باکتریایی آن در برابر باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* مولد ورم پستان برای اولین بار از طریق داکینگ مولکولی است.

مواد و روش‌ها

داده‌های مورد بررسی

توالی پروتئینی مربوط به لاکتوپراکسیداز برای شش گونه شامل انسان (NP_006142.1)، شتر (NP_001290481.1)، گوسفند (NP_001009722.1)، بز (NP_001272546.1) ، گاومیش (NP_001277812.1) و گاو (NP_776358.1) که همگی از توالی مرجع هستند از سایت مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI) تهیه گردید. همچنین ساختار سه‌بعدی مربوط به پروتئین لاکتوپراکسیداز برای گاو (b۷۲۵)، گوسفند (r۵q۳)، بز (nV۵۴) و گاومیش (y۵۵۴) از سایت بانک داده‌های پروتئینی (PDB) تهیه گردید. علاوه بر این، به‌منظور پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی برای پروتئین لاکتوپراکسیداز شتر و انسان از ساختار سه‌بعدی گاو (b۷۲۵) به عنوان الگو استفاده شد. فایل ساختار سه‌بعدی مربوط به پروتئین‌های سطحی غشاء باکتری‌های *Staphylococcus aureus* (JNM) و *Escherichia coli* (I۵H) برای بررسی اثرات متقابل آن با پروتئین و پپتیدهای لاکتوپراکسیداز نیز از سایت بانک داده‌های پروتئینی استخراج شد.

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی

مقایسه هم‌ردیفی (Alignment) و میزان درصد شباهت، نقطه ایزوالکتریک و اسیدآمینه‌های پروتئین لاکتوپراکسیداز و پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از آن در شش گونه‌ی مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار CLC Main Workbench ۵ انجام شد.

آماده‌سازی ساختار سه‌بعدی پروتئین

برای پیش‌بینی ساختار سوم (سه‌بعدی) پروتئین لاکتوپراکسیداز، نرم‌افزار تحت وب Swiss-Model مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور تصحیح ساختار پیش‌بینی شده در شرایط دینامیکی (شرایط درون سلول) و استاتیکی از نرم‌افزارهای آنلاین YASARA و Galaxy Refine استفاده گردید. سپس برای ارزیابی دقت پیش‌بینی‌ها و انتخاب بهترین ساختار سه‌بعدی، تمامی فایل‌های PDB حاصله در نرم‌افزار آنلاین RAMPAGE و SAVES v۵.۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند و در نهایت بهترین ساختارهای پیش‌بینی‌شده، انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند.

پیش‌بینی پپتیدهای پروتئین لاکتوپراکسیداز

با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین PeptiMap،SPRINT وACCLUSTER، جایگاه‌های فعال پروتئین که احتمال تبدیل شدن به یک پپتید زیست‌فعال را دارد برای هر شش گونه شناسائی گردید. سپس فایل PDB مربوط به این پپتیدها برای تمامی توالی‌های پپتیدی با استفاده از نرم‌افزار PYMOL تهیه و ذخیره شد.

انجام داکینگ مولکولی

برای بررسی اثرات متقابل پروتئین لاکتوپراکسیداز و پپتیدهای زیست‌فعال آن با باکتری‌های *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* برای اولین بار، همچنین شبیه‌سازی این برهمکنش‌ها در درون سلول و تصویر حاصل از آن از نرم-افزار آنلاین ClusPro۲.۰ استفاده شد و با توجه به شرایط مختلف از جمله موقعیت مناسب و حداقل انرژی مورد نیاز برای اتصال پروتئین‌ها، نتایج برای انتخاب بهترین اتصال مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

داده‌های مورد بررسی و آنالیز خواص فیزیکوشیمیایی

پروتئین لاکتوپراکسیداز توسط ژن LPO در موجودات مختلف کدگذاری شده است. میزان شباهت مربوط به اسید آمینه‌های ژن LPO در شش

گونه‌ی (گاو، گوسفند، شتر، انسان، گاو میش و بز) توسط نرم‌افزارCLC Main Workbench ۵ مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).
همچنین، بررسی اسیدآمینه‌های تشکیل دهنده‌ی پروتئین لاکتوپراکسیداز نشان داد که بیشترین میزان اسیدآمینه در تمامی شش گونه لوسین و کمترین آن به جز انسان (هیستیدین)، اسید آمینه‌ی متیونین می‌باشد. میزان اسیدآمینه لوسین در انسان از سایر پستانداران مورد مطالعه بیشتر بود (جدول۲). بیشترین میزان Alpha helix در لاکتوپراکسیداز بوفالو و کمترین میزان مربوط به شتر و گوسفند می‌باشد. بیشترین میزان نقطه‌ی ایزوالکتریک در شتر (۹٫۳۸) و کمترین مقدار در بز (۸٫۷۴) بود.

آماده‌سازی ساختار سه‌بعدی پروتئین

ساختار سه‌بعدی مربوط به پروتئین انسان و شتر با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Swiss Model براساس الگوی ساختار سه‌بعدی پروتئین لاکتوپراکسیداز مربوط به گاو پیش‌بینی گردید و سپس ساختارها تصحیح شدند. آنالیز با نرم‌افزار آنلاین RAMPAGE بهترین پیش‌بینی را با دقت ۹۸ درصدی برای انسان و شتر نشان داد. همچنین بررسی‌ها با نرم‌افزار SAVES v5.0 میزان Verify3D را برای انسان و شتر به ترتیب ۸۷٫۱۸٪ و ۸۷٫۹۰٪ نشان داد. این نتایج حاکی از این است که ساختارهای سه‌بعدی پیش‌بینی‌شده برای انسان و شتر با دقت قابل قبولی انجام شده است. با توجه به نتایج حاصله می‌توان پیش‌بینی کرد که آرایش فضائی (ساختار سه‌بعدی) پروتئین و پپتیدها، اثر زیادی برخاصیت آنتی‌باکتریال آن‌ها خواهد داشت بطوریکه ساختار صحیح از پروتئین یا پپتید باعث می‌شود تا برهمکنش مناسبی با ساختار غشاء پروتئین سطحی باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* ایجاد شود و در نهایت مهار فعالیت باکتریایی را به دنبال خواهد داشت.

پیش‌بینی پپتیدهای پروتئین لاکتوپراکسیداز

با استفاده از نرم‌افزارهای موردنظر، هفت پپتید برای هر شش گونه مختلف از پستانداران شناسایی گردید که نتایج در جدول ۴ ارائه شده است.

داکینگ مولکولی پروتئین لاکتوپراکسیداز و پپتیدهای حاصل از آن با پروتئین‌های سطحی باکتری

بررسی عملکرد پروتئین‌های لاکتوپراکسیداز و پپتیدهای حاصل از آن برای شش گونه‌ی مورد مطالعه در برابر باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی مختص داکینگ پروتئین-پروتئین نظیر نرم‌افزار آنلاین ClusPro2.0 انجام شد. بر این اساس میزان انرژی و موقعیت اتصال پروتئین لاکتوپراکسیداز و پپتیدهای مربوطه با پروتئین سطحی غشاء این دو باکتری مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج براساس فرمول زیر در جدول ۳ و ۴ زیر نشان داده شده است.

$$E = 0.40E_{rep} + -0.40E_{att} + 600E_{elec} + 1.00E_{DARS}$$

نتایج بررسی موقعیت و انرژی اتصال نشان می‌دهد که مناسب‌ترین موقعیت اتصال که در آن پروتئین لاکتوپراکسیداز حاصله با منفی‌ترین انرژی به پروتئین سطحی غشاء باکتری *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* متصل شده است به ترتیب مربوط به گاو و بز می‌باشد. بررسی بیوانفورماتیکی مربوط به هفت پپتید حاصل از این پروتئین نشان داد که پپتید شماره‌ی سه مربوط به حیوانات گاو، بز، گاومیش و گوسفند عملکرد بهتری در اتصال و تخریب پروتئین سطحی غشاء باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* دارد. بررسی‌ها نشان داد که پپتید شماره سه با انرژی اتصال منفی‌تری نسبت به فرم کامل پروتئین لاکتوپراکسیداز به این دو باکتری متصل شده است (شکل ۱). این پپتید طولی به اندازه ۲۲ اسیدآمینه دارد و نوع اسیدآمینه‌های آن در شکل ۲ نشان داده شده است. پپتیدهای ضدمیکروبی دارای برخی خواص مشابه بوده که از جمله این ویژگی‌ها می‌توان به مواردی همچون، تعداد اسیدآمینه‌های بین ۱۲ تا ۵۰، حاوی بار مثبت و دارای ساختار آمفی‌پاتیک اشاره کرد. پپتیدهای ضدمیکروبی طبیعی معمولا فعالیت گسترده‌ای را در برابر باکتری‌های گرم‌مثبت، گرم‌منفی، قارچ‌ها، انگل‌های یوکاریوتی و ویروس‌ها دارند. امروزه استفاده‌ی بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها در

جدول ۱- بررسی میزان شباهت توالی اسید آمینه ای پروتئین لاکتوپراکسیداز در شش گونه ی مورد مطالعه

	Ovis aries	Capra	Bubalus	Bos taurus	Camelus	Homo sapiens
Ovis aries	-	۹۸٫۷۸	۹۶٫۸۷	۹۶٫۹۱	۸۷٫۸۹	۸۵٫۳۷
Capra			۹۶٫۳۱	۹۶٫۲۶	۸۷٫۳۸	۸۴٫۸۵
Bubalus				۹۸٫۵۵	۸۸٫۳۶	۸۶٫۰۲
Bos taurus					۸۸٫۱۷	۸۵٫۹۳
Camelus						۸۷٫۰۵
Homo sapiens						-

جدول ۲- مقایسه وضعیت اسیدآمینه های پروتئین لاکتوپراکسیداز در شش گونه ی مورد مطالعه

	Homo sapiens	Bos taurus	Capra	Ovis aries	Camelus	Bubalus
alanine	۵۰	۴۹	۵۲	۵۱	۴۸	۵۰
cysteine	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۵	۱۶
aspartic acid	۴۰	۳۸	۳۸	۳۹	۳۹	۴۰
glutamic acid	۳۴	۳۷	۳۸	۳۶	۳۲	۳۶
phenylalanine	۳۳	۳۵	۳۴	۳۴	۳۳	۳۶
glycine	۴۲	۴۲	۴۲	۴۲	۴۳	۴۱
histidine	۱۳	۱۵	۱۷	۱۶	۱۹	۱۵
isoleucine	۲۷	۳۱	۲۷	۳۱	۲۷	۳۰
lysine	۳۷	۴۰	۳۵	۳۸	۴۲	۴۰
leucine	۸۴	۷۹	۷۸	۷۸	۸۲	۷۸
methionine	۱۴	۱۲	۱۲	۱۲	۱۵	۱۳
asparagine	۳۲	۳۹	۳۷	۳۸	۳۳	۳۸
proline	۵۱	۴۴	۴۴	۴۳	۴۷	۴۴
glutamine	۳۲	۳۳	۳۴	۳۳	۳۴	۳۵
arginine	۴۹	۴۶	۴۷	۵۰	۴۷	۴۵
serine	۵۳	۴۳	۴۵	۴۶	۴۶	۴۳
threonine	۴۰	۴۴	۴۱	۴۰	۳۵	۴۳
valine	۳۲	۳۷	۴۴	۳۹	۴۰	۳۷
tryptophane	۱۴	۱۶	۱۵	۱۴	۱۷	۱۶
tyrosine	۱۹	۱۶	۱۶	۱۶	۱۷	۱۶

جدول۳- بررسی موقعیت و انرژی اتصال (kcal/mol) پروتئین لاکتوپراکسیداز در شش گونه ی مورد مطالعه با پروتیئن سطحی باکتری

mammalian species	Staphylococcus aureus	Escherichia coli
Bos Taurus	- ۷۹۰/۹	- ۱۰۰۲/۴
Homo sapiens	- ۷۴۰/۴	- ۸۷۳/۹
Camelus	- ۷۸۱/۱	- ۹۳۴/۰
Ovis aries	- ۷۵۱/۲	- ۹۶۲/۷
Capra	- ۷۸۷/۳	- ۱۰۲۴/۸
Bubalus	- ۷۲۷/۱	- ۹۹۲/۲

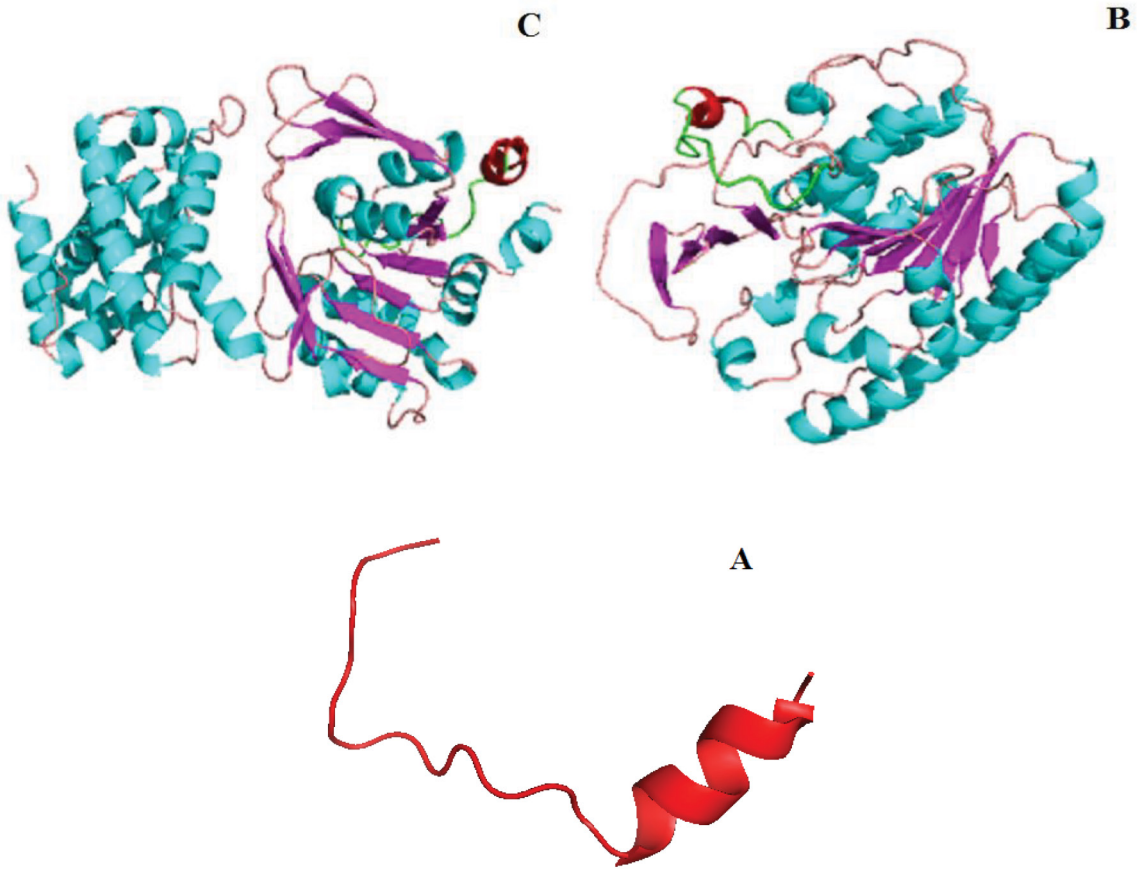
بخش درمانی سبب توسعه باکتری‌های مقاوم به دارو نظیر باکتری‌های مقاوم‌شده به چندین دارو شده است (۲) که انتقال این باکتری‌های مقاوم شده از حیوان به انسان، به یکی از معضلات غیرقابل چشم‌پوشی تبدیل شده است (۲۷). در کشورهای توسعه‌یافته‌ای مانند سوئد، استفاده از برخی آنتی‌بیوتیک‌ها در خوراک حیوانات در سال ۱۹۸۶ ممنوع شد و کشورهای عضو اتحادیه اروپا (EU) در سال ۲۰۰۶ کاربرد آنتی‌بیوتیک با هدف محرک رشد را، طبق مقررات پارلمان اروپا و شورای اروپا EC ۲۰۰۳/۱۸۳۱ ممنوع کردند (۹). یکی از مهمترین دلایل اینکه پپتیدهای ضدمیکروبی کاندیداهای مناسبی برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها هستند، این است که برخی از این ترکیبات موجب ایجاد سویه‌های مقاوم به دارو نمی‌شوند (۱۸).

در حال حاضر یکی از مباحث مهم در ارتباط با پپتیدهای

جدول۴- بررسی موقعیت و انرژی اتصال پپتیدهای پروتئین لاکتوپراکسیداز شش گونه ی مورد مطالعه با پروتئین سطحی باکتری

	Peptide sequence	Target species	(Connection energy (kcal/mol	
			Escherichia coli	Staphylococcus aureus
۱ Peptide	TAHTLLLREHNRLAREL	Bubalus, Bos taurus	- ۸۰۵/۱	- ۷۰۴/۱
	TSHTLLLREHNRLAREL	Camelus	- ۷۶۱/۳	- ۶۹۱/۴
	TVHTLLLREHNRLAREL	Capra, Ovis aries	- ۷۲۹/۸	- ۶۵۵/۳
	TSHTLFLREHNRLAREL	Homo sapiens	- ۷۸۸/۲	- ۶۹۹/۹
۲ Peptide	GAFVQIITFRDYLPIVL	Bubalus	- ۷۸۵/۷	- ۷۳۲/۵
	GAFVQIITFRDYLPILL	Homo sapiens	- ۷۶۲/۹	- ۸۳۷/۱
	GAFIQIITFRDYLPIVL	Bos taurus, Capra, Ovis aries	- ۷۹۴/۸	- ۷۵۰/۰
	GAFMQIITFRDYLPIVL	Camelus	- ۷۵۷/۱	- ۷۹۸/۰
۳ Peptide	QGYNNSVDPRISNVFTFAFRFG	Bos Taurus, Capra, Bubalus, Ovis aries	- ۱۰۷۷/۷	- ۹۴۰/۷
	QGYSESVDPRISNVFTFAFRFG	Homo sapiens	- ۹۵۵/۰	- ۸۴۳/۱
	RGYNKSVDPRISNVFTFAFRFG	Camelus	- ۱۰۲۲/۹	- ۹۲۴/۲
۴ Peptide	DGGIDPLVRGLLAKKSKLM	Homo sapiens, Bos Taurus, Ovis aries, Bubalus	- ۷۹۷/۴	- ۶۵۶/۰
	DGGIDPLVRGLLAKKSKFM	Camelus	- ۷۸۹/۸	- ۶۷۳/۹
	DGGIDPLVRGLLAKNSKLM	Capra	- ۶۱۰/۸	- ۶۶۶/۲
۵ Peptide	QQIRDGDRFWWENPGV	Homo sapiens, Bos Taurus, Capra, Bubalus, Ovis aries	- ۷۶۵/۹	- ۷۴۰/۹
	RQIRDGDRFWWENPGV	Camelus	- ۸۳۸/۳	- ۸۸۶/۴
۶ Peptide	ARWLPAEYEDGLSLPFGWTPGKT	Homo sapiens	- ۸۶۶/۰	- ۸۸۵/۰
	ARWLPAEYEDGLSLPFGWTRGKK	Camelus	- ۹۵۳/۰	- ۸۲۹/۵
	ARWLPAEYEDGLALPFGWTQRKT	Bos Taurus, Bubalus	- ۹۶۶/۶	- ۸۷۳/۸
	ARWLPAEYEDGLAVPFGWTQRKT	Ovis aries, Capra	- ۸۸۳/۰	- ۸۹۰/۲
۷ Peptide	TPGKTRNGFPLPLAREVS	Homo sapiens	- ۷۷۷/۸	- ۷۰۵/۴
	TRGKKRNGFPLPLAREVS	Camelus	- ۶۸۴/۵	- ۶۶۹/۲
	TQRKTRNGFRVPLAREVS	Bos taurus, Bubalus, Capra, Ovis aries	- ۷۸۴/۰	- ۶۹۵/۰

ضدمیکروبی، جنبه‌های ضدباکتریایی این پپتیدها می‌باشد (۳۱). مکانیسم عمل پپتیدهای ضدباکتریایی وابسته به برخی خواص فیزیکو شیمیایی آن‌ها بوده که شامل:توالی اسیدآمینه، بار، خاصیت آمفی‌پاتیک، پیچ‌خوردگی ساختار (شامل ساختار ثانویه) در غشاها، الیگومریزاسیون، غلظت پپتیدها و ترکیب غشا می‌باشد. به‌طور کلی تخریب انتخابی غشای سلول و ساختار آبگریز این پپتیدها نقش مهمی در فهم مکانیسم عملکرد پپتیدهای ضدمیکروبی دارد. حضور سرهای فسفولیپید قطبی روی غشای سلول و توزیع بار در پپتید، فاکتور کلیدی در واکنش پپتید با غشا است. پپتیدهای ضدمیکروبی هیدروفوبیک، لیپیدهای آنیونیک در سطح خارجی غشا باکتری را می‌شناسند. در سلول‌های یوکاریوت، این لیپیدها به سمت سیتوپلاسمی غشا قرار می‌گیرند (۳۴، ۱۷). عملکرد ضدباکتریایی پپتیدهای ضدمیکروبی عمدتا از طریق تعامل با غشاهای باکتریایی حاصل می‌شود (۷). مکانیسم‌های مختلفی در رابطه با فعالیت ضدباکتریایی این پپتیدها وجود دارد که ازجمله آن‌ها می‌توان به، هدف قرار دادن فرآیندهای کلیدی داخل سلولی مانند مهار سنتز پروتئین یا DNA و درنهایت مرگ باکتری از طریق ایجاد اختلال در دیواره‌ی سلولی، اتصال این ترکیبات با بار مثبت به غشا آنیونیک باکتری از طریق تعاملات الکترواستاتیک و ایجاد اختلال در آن، اتصال به گیرنده‌های زنگوله‌ای سلول میزبان و تحریک پاسخ ایمنی اشاره کرد(۲۵). مقایسه‌ی پپتیدهای ضدمیکروبی نشان می‌دهد که دو ناحیه‌ی جانبی برای فعالیت



شکل۱- A) پپتید شماره سه (گاو، بز، گاومیش، گوسفند) با استفاده از نرم افزار pymol

B) پپتید شماره سه متصل به پروتئین سطحی باکتری Staphylococcus aureus با استفاده از نرم افزار ClusPro۲,۰

C) پپتید شماره سه متصل به پروتئین سطحی باکتری Escherichia coli با استفاده از نرم افزار ClusPro۲,۰

ضدمیکروبی پپتیدها ضروری هستند. شاخه‌ی جانبی کاتیونی شامل آرژنین ، لایزین و هیستیدین در تعاملات پپتید با غشای منفی دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها مانند لیپوپلی‌ساکارید نقش دارند (۸). زنجیرهای جانبی غول‌پیکر بزرگ مانند پرولین، فنیل‌آلانین و تریپتوفان اغلب در پپتیدهای ضدمیکروبی موجب ایجاد اتصال قوی لیپوفیلی شده که در نهایت منجر به ایجاد اختلال در غشا باکتری می‌شود. پپتید شماره سه حاوی دو اسیدآمینه آرژنین، چهار اسیدآمینه فنیل آلانین و یک اسیدآمینه پرولین است که نشان می‌دهد این پپتید احتمالا فعالیت ضدباکتریایی قابل قبولی را دارا است (شکل ۲). همچنین، سایر مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت ضدمیکروبی پپتیدهای حاوی آرژنین بالاتر از پپتیدهای حاوی لایزین می‌باشد (۲۴). در حالیکه پپتیدهای حاوی تریپتوفان پتانسیل بیشتری را نسبت به پپتیدهای حاوی فنیل‌آلانین یا تیروزین دارند (۱۰). گروه گوانیدینیوم آرژنین، دارای بار مثبت بیشتری نسبت به آمین لایزین است که احتمالا باعث افزایش تعامل الکترواستاتیک بین پپتیدها و سطح غشای باکتریایی با بار منفی می‌شود (۳۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به اثرات مخرب بیماری ورم پستان بر سلامت انسان از طریق امکان انتقال سویه‌های باکتریایی مقاوم شده به آنتی‌بیوتیک از دام به انسان، جایگزین کردن آنتی‌بیوتیک‌ها با ترکیباتی که اثرات جانبی ندارند حائز اهمیت است. با توجه به پتانسیل پپتید مورد مطالعه و خواص ضد باکتریایی آن علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* و همچنین تایید آن از طریق روش های آزمایشگاهی، امید است بتوان در آینده از آن به عنوان جایگزین یا مکمل با آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری ورم پستان پیشنهاد داد.

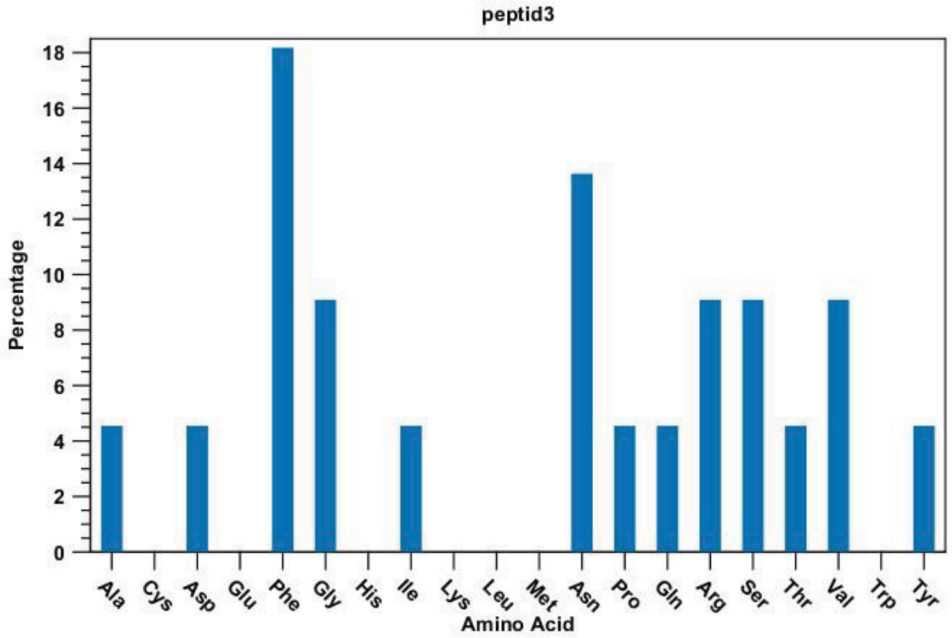
منابع مورد استفاده

۱. بلوئی راجر و ادموندسون پیتر. ۲۰۱۰. کنترل ورم پستان در گله‌های گاو شیری. تهران: پرتو واقعه.

2. Aarestrup, F.M., F. Bager, N.E. Jensen, M. Madsen, A. Meyling and H.C. Wegener. 1998. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. *Apmis,* 106 (1-6): 606-622.

3. Banks, J.G. and R.G. Board. 1985. Preservation by the Lactoperoxidase system (LP□S) of a contaminated infant milk formula. *Letters in Applied Microbiology,* 1 (5): 81-85.

4. Barkema, H.W., M.J. Green, A.J. Bradley and R.N. Zadoks.



شکل۲- مقایسه وضعیت اسیدآمینه های پپتید شماره ی ۳ (گاو، بز، گاومیش، گوسفند)

2009. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of dairy science*, 92 (10): 4717-4729.

5. Bolourchi, M., D.M. MOKHBER, R. Kasravi, E.A. MOGHIMI and P. Hovareshti. 2008. An estimation of national average of milk somatic cell count and production losses due to subclinical mastitis in commercial dairy herds in Iran. *Journal of Veterinary Research*, 63: 263-266.

6. Boscolo, B., S.S. Leal, E.M. Ghibaudi and C.M. Gomes. 2007. Lactoperoxidase folding and catalysis relies on the stabilization of the α-helix rich core domain: A thermal unfolding study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics,* 1774 (9): 1164-1172.

7. Brogden, K.A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature reviews microbiology*, 3 (3): 238.

8. Brown, K.L. and R.E. Hancock. 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current opinion in immunology*, 18 (1): 24-30.

9. Castanon, J.I.R. 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry science*, 86 (11): 2466-2471.

10. Dathe, M., H. Nikolenko, J. Klose and M. Bienert. 2004. Cyclization increases the antimicrobial activity and selectivity of arginine-and tryptophan-containing hexapeptides. *Biochemistry*, 43 (28): 9140-9150.

11. Deslouches, B., S.M Phadke, V. Lazarevic, M. Cascio, K. Islam, R.C. Montelaro and T.A. Mietzner. 2005. De novo generation of cationic antimicrobial peptides: influence of length and tryptophan substitution on antimicrobial activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy,* 49 (1): 316-322

12. Elliot, R.M., J.C. McLay, M.J. Kennedy and R.S. Simmonds. 2004. Inhibition of foodborne bacteria by the lactoperoxidase system in a beef cube system. *International journal of food microbiology,* 91 (1): 73-81.

13. Güler, L., Ü. Ok, K. Gündüz, Y. Gülcü and H.H. Hadimli. 2005. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *Journal of dairy science,* 88 (9): 3149-3154.

14. Guthrie, W.G. 1992. A novel adaptation of a naturally occurring antimicrobial system for cosmetic protection. *SOFW-Journal,* 118: 556–562.

15. Jones, G. and P. Willett. 1995. Docking small-molecule ligands into active sites. *Current opinion in biotechnology*, 6 (6): 652-656.

16. Kamau, D.N., S. Doores and K.M. Pruitt. 1990. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus in milk. *Journal of Food Protection*, 53 (12): 1010-1014.

17. Kouzayaha, A., M. Nasir, R. Buchet. 2009. Antimicrobial Peptides and Their Use in Medicine Phys. *Chem* B,113:7012-9.

18. Lata, S., B.K. Sharma and G.P.S Raghava. 2007. Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC bioinformatics,* 8 (1): 263.

19. Liu, Y., J. Luo, C. Xu, F. Ren, C. Peng, G. Wu and J.Zhao. 2000. Purification, characterization, and molecular cloning of the gene of a seed-specific antimicrobial protein from pokeweed. *Plant Physiology*, 122 (4):1015-1024.

20. Nam, H.M., S.K. Lim, H.M. Kang, J.M. Kim, J.S. Moon, K.C. Jang, Y.S. Joo and S.C Jung. 2009. Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *Journal of dairy science,* 92 (5): 2020-2026.

21. Paul, K.G. and P.I. Ohlsson. 1985. The chemical structure of lactoperoxidase. The Lactoperoxidase System, Chemistry and Biological Significance, 15-30.

22. Ramet, J. P. 2000. Current research and application of the enzyme lactoperoxidase in France. 1999. In Proceedings of the second annual meeting of the lactoperoxidase group of experts, Rome, Italy. pp. 10–13.

23. Seifu, E., E.M. Buys and E.F. Donkin. 2005. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (4): 137-154.

24. Shafer, W.M., F. Hubalek, M. Huang and J. Pohl. 1996. Bactericidal activity of a synthetic peptide (CG 117-136) of human lysosomal cathepsin G is dependent on arginine content. *Infection and immunity,* 64 (11): 4842-4845.

25. Silva, J.P., R. Appelberg and F.M. Gama. 2016. Antimicrobial peptides as novel anti-tuberculosis therapeutics. *Biotechnology advances,* 34(5): 924-940.

26. Sinha, M., S. Kaushik, P. Kaur, S. Sharma and T.P. Singh. 2013. Antimicrobial lactoferrin peptides: the hidden players in the protective function of a multifunctional protein. *International journal of peptides*, 2013.

27. Stanton, T. B. 2013. A call for antibiotic alternatives research. *Trends in Microbiology*, 21 (3): 111-113.

28. Tam, J. P., Y. A. Lu and J. L. Yang. 2002. Antimicrobial dendrimeric peptides. *Eur. J. Biochem.* 269: 923-932.

29. Van Hooijdonk, A.C., K.D. Kussendrager and J.M. Steijns. 2000. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *Brit-*

ish Journal of Nutrition, 84 (S1):127-134.
30. Vizioli, J. and M. Salzet. 2003. Antimicrobial peptides: new weapons to control parasitic infections. *Journal of Trends in Parasitology,* 18.
31. Vogel, H. J., D. J. Schibli, W. G. Jing, E. M. Lohmeier-Vogel, R. F. Epand and R. M. Epand. 2002. towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. *Biochemistry and Cell Biology,* 80 (1): 49-63.
32. Wang, Y., Y. Zhang, W.H. Lee, X. Yang and Y. Zhang. 2016. Novel peptides from skins of amphibians showed broad spectrum antimicrobial activities. *Chemical biology & drug design*, 87 (3): 419-424.
33. Wolfson, L.M. and S.S. Sumner. 1993. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: a review. *Journal of Food Protection*, 56 (10): 887-892.
34. Yang, L., T.A. Harroun, T.M. Weiss, L. Ding and H.W. Huang. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical journal,* 81 (3): 1475-1485.