Sci J Iran Blood Transfus Organ 2023;20 (3): 179-188

Orginal Article

Defensin peptide extraction from leukoreduction filters and determination of minimum inhibitory concentration on Staphylococcus aureus growth

Sasani N.[1], Roghanian R.[1], Emtiazi G.[1], Jalali S.M.[2], Aghaie A.[3]

[1]Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
[2]Iranian Blood Research and Fractionation, Tehran, Iran
[3]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Discovery of antibiotics has been one of the important achievements of mankind in the field of infectious diseases, although after a short time, the phenomenon of antibiotic resistance was created. Nowadays, there is a need for an innovation in the control of microbial infections such as the use of antimicrobial peptides. These peptides are abundantly found in neutrophils and since leukoreduction filters are a valuable source of these cells, it has been studied as an available option.

Materials and Methods

In this experimental study, leukoreduction filters was selected by easy non-probability sampling method. First, leukocytes were extracted from leukoreduction filters and then neutrophils were isolated. Defensin peptide was extracted after sonication of neutrophils and was purified by HPLC. Staphylococcus aureus bacteria was cultured and the amount of bacterial inoculation was determined and the minimum inhibitory concentration was measured by macrodilution method. Microbial inhibition halo diameter size of defensin was determined for the intended bacteria.

Results

Using defensin standard, purified defensin peak was collected and the minimum inhibitory concentration was determined as 2.5 µg/mL on Staphylococcus aureus by macrodilution method. Microbial inhibition halo diameter size was calculated as 9 mm.

Conclusions

The treatment of infectious diseases has faced a challenge with the widespread emergence of drug resistance, and the use of new innovations is inevitable. Defensin as an antimicrobial peptide is a suitable option that is abundantly found in neutrophils obtained from leukoreduction filters and is suggested for research on new antimicrobial drugs.

Key words: Defensin, Minimum Inhibitory Concentration, Staphylococcus aureus

Received: 13 Feb 2023
Accepted: 1 Mar 2023

Correspondence: Aghaie A., PhD of Immunology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052183; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: *aghaie.a@gmail.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۲۰ شماره ۳ پاییز ۱۴۰۲ (۱۸۸-۱۷۹)

مقاله پژوهشی

استخراج پپتید دیفنسین از فیلترهای لکوسیتی و تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد بر استافیلوکوکوس اورئوس

نیلوفر ساسانی[۱]، رسول روغنیان[۲]، گیتی امتیازی[۲]، سید مهرداد جلالی[۳]، افسانه آقایی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

شناسایی و کشف آنتی‌بیوتیک‌ها از دستاوردهای مهم بشر در زمینه بیماری‌های عفونی بوده است، اگر چه پس از زمان کوتاهی، پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد شد. امروزه نیاز به نوآوری در کنترل عفونت‌های میکروبی نظیر استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی وجود دارد. این پپتیدها در نوتروفیل‌ها به وفور یافت می‌شوند و از آن جایی که فیلترهای کاهنده لکوسیتی منبع ارزشمندی از این سلول‌ها می‌باشد، به عنوان یک گزینه در دسترس مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی جامعه مورد مطالعه فیلترهای کاهنده لکوسیتی بودند که با روش نمونه‌گیری غیر احتمالی آسان انتخاب شدند. ابتدا لکوسیت‌ها استخراج و سپس نوتروفیل‌ها جداسازی شد. پپتید دیفنسین پس از سونیکاسیون نوتروفیل‌ها استخراج شد و خالص‌سازی پپتید با دستگاه HPLC صورت گرفت. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس کشت و میزان تلقیح باکتری تعیین و حداقل غلظت بازدارندگی رشد به روش ماکرودایلوشن سنجیده شد. سپس قطر هاله عدم رشد پپتید دیفنسین برای باکتری مورد نظر تعیین گردید.

یافته‌ها

با استفاده از استاندارد دیفنسین، پیک دیفنسین خالص جمع‌آوری گردید و حداقل غلظت بازدارندگی رشد به میزان ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به روش ماکرودایلوشن تعیین شد. منطقه مهار رشد در بررسی قطر هاله عدم رشد برابر با ۹ میلی‌متر محاسبه گردید.

نتیجه گیری

درمان بیماری‌های عفونی با ظهور گسترده مقاومت‌های دارویی با چالش مواجه و استفاده از نوآوری‌های جدید اجتناب‌ناپذیر شده است. دیفنسین به عنوان پپتید ضدمیکروبی گزینه مناسبی است که در نوتروفیل‌های حاصل از فیلترهای کاهنده لکوسیتی به وفور یافت می‌شود و برای تحقیقات در خصوص داروهای جدید ضدمیکروبی پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: **دیفنسین، حداقل غلظت بازدارندگی، استافیلوکوک اورئوس**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰

۱- دانشجوی دکترای میکروبیولوژی ـ دانشکده علوم دانشگاه اصفهان ـ اصفهان ـ ایران
۲- دکترای میکروبیولوژی ـ استاد دانشکده علوم دانشگاه اصفهان ـ اصفهان ـ ایران
۳- دکترای داروسازی ـ شرکت پالایش و پژوهش خون ـ تهران ـ ایران
۴- مؤلف مسئول: PhD ایمنی‌شناسی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

مقدمه

در آغاز قرن بیستم، مرگ و میر ناشی از بیماری‌های عفونی با کشف عوامل ضد میکروبی و ساخت آنتی‌بیوتیک‌ها و واکسن‌ها، به عنوان مهم‌ترین دستاوردهای بشر در زمینه پزشکی کاهش یافت (۱). اولین آنتی‌بیوتیک توسط فلمینگ در سال ۱۹۲۸ و در پلیت حاوی استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی و سرآغاز کشف پنی‌سیلین شد که همراه با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به نجات جان میلیون‌ها انسان و حیوان گردید. اما پس از مدت زمان کوتاهی، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به دلایل استفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها در پزشکی و دامپزشکی پدیدار گشت (۲). بر این اساس، در معرض قرار گرفتن طولانی مدت و مداوم میکروارگانیسم‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، خطر مقاومت آن‌ها را به آنتی بیوتیک‌ها افزایش داده است (۳).

امروزه در کنترل عفونت‌های میکروبی نیاز به نوآوری‌هایی نظیر استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs, Anti Microbial Peptides) می‌باشد. پپتیدهای ضد میکروبی؛ بیومولکول‌های حفاظت شده در تمام پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها هستند و اولین خط دفاع ایمنی ذاتی در برابر ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها می‌باشند (۶-۴). کشف AMPs یا دفاع کاتیونی به سال ۱۹۳۹ باز می‌گردد (۷). این AMPs از اجزای مهم دفاع طبیعی بدن علیه عوامل بیماری‌زا هستند و توسط گرانولوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های اپی‌تلیال در انسان تولید می‌شوند. پپتیدهای ضد میکروبی، به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های جدید در مقابله با باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در درمان‌های بالینی به صورت آزمایشی استفاده شده است (۴). نوتروفیل‌ها، گرانولوسیت‌های با توانایی تولید AMPs می‌باشند و از آن جایی که بیش از ۶۰ درصد گلبول‌های سفید خون را نوتروفیل‌ها تشکیل می‌دهند، می‌توانند به عنوان منبع غنی از این پپتیدها مورد استفاده قرار گیرند (۸).

از طرف دیگر واکنش‌های ناخواسته انتقال خون به واسطه حضور گلبول‌های سفید بروز می‌نماید و جداسازی لکوسیت‌ها، با هدف کم نمودن عوارض انتقال خون ضروری می‌باشد (۹). یکی از عملکردهای معمول در مراحل فرآوری خون، کاهش لکوسیت‌ها است که قبل از ذخیره‌سازی در سازمان‌های انتقال خون در بسیاری از کشورها انجام می‌شود (۱۰). بر اساس آمار سازمان انتقال خون ایران، سالیانه تعداد زیادی کیسه‌های خون فیلتردار مصرف می‌شود و این فیلترها پس از استفاده به عنوان ضایعات دور ریخته می‌شوند، در حالی که منبع بسیار غنی از سلول‌های خون محیطی و هم چنین آنزیم‌ها می‌باشند و می‌تواند در مطالعه‌های پایه و سپس بالینی مورد استفاده قرار گیرد (۱۱).

هدف اصلی این مطالعه، استخراج پپتید ضد میکروبی دیفنسین از فیلترهای کاهنده لکوسیتی و تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی MIC (Minimum Inhibitory Concentration) پپتید دیفنسین استخراج شده از نوتروفیل‌های به دام افتاده در فیلترهای کاهنده لکوسیتی برای مقابله با میکروب‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بوده است.

مواد و روش‌ها

فیلترهای کاهنده لکوسیتی:

در این مطالعه تجربی از فیلترهای کاهنده لکوسیتی به عنوان جامعه مورد مطالعه و با روش نمونه‌گیری غیر احتمالی آسان و با ابزار چک لیست و مقایسه استفاده شد. بدین منظور فیلترهای Leucoflex LCR5 متصل به کیسه‌های چهارتایی شرکت ماکوفارمای فرانسه، برای جداسازی ابتدایی لکوسیت‌ها و سپس جداسازی اختصاصی نوتروفیل‌ها و سپس استخراج دیفنسین مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). در فرآیند موجود در پایگاه‌های انتقال خون، در حدود ۴۵۰ میلی‌لیتر از خون کامل اهداکنندگان از این فیلترها عبور داده و خون بدون گلبول‌های سفید در کیسه‌های جمع‌کننده خون که متصل به سمت دیگر این فیلترها هستند جمع‌آوری می‌شود.

سیستم بافری شستشوی فیلتر:

فیلترها روزانه از پایگاه انتقال خون تهران تهیه و شستشوی فیلتر به روش شستشوی معکوس یعنی در

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

خلاف جهت ورودی فیلتر (Back Flush) بـه روش دسـتی صورت گرفت. برای شستشوی دستی، میزان ۱۵۰ میلی‌لیتـر بافر توسط سـرنگ ۶۰ میلـی‌لیتـری بـا فشـار پیسـتون و از جهت مخالف ورودی وارد فیلتر شد و بـاقی‌مانـده بـافر در فیلتر با استفاده از سرنگ پـر شـده از هـوا تخلیـه گردیـد. سپس برای انجام سریع‌تر شستشوی فیلترها از یک سیسـتم مکانیکی طراحی و ست آپ شده اسـتفاده شـد (شـکل ۲).

بدین ترتیب فیلترها در دمای اتاق با بـافر PBS در pH ۷/۲ حاوی ۲ میلی‌مولار EDTA و ۴٪ دکستران ۴۰ شستشو داده شد. شمارش سلولی با دستگاه اتوهموآنـالیزور سیسـمکس انجـام گرفـت و درصـد و تعـداد سـلول‌هـای لکوسـیتی (نوتروفیل، لنفوسـیت، مونوسـیت، بازوفیـل و ائوزینوفیـل) اندازه‌گیری و سپس زنده‌مانی لکوسیت‌هـای بازیـابی شـده ۸۵/۵٪ گزارش شد (۱۲).



شکل ۱: فیلتر Leucoflex LCR5



شکل ۲: قسمت A: شستشوی مکانیکی با کمک پمپ پریستالتیک، قسمت B: شستشوی دستی فیلتر به صورت معکوس

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

جداسازی نوتروفیل‌ها از سایر سلول‌ها:

از سانتریفیوژ شیب چگالی و دکستران برای جداسازی گرانولوسیت‌ها استفاده گردید (۱۳). به طور خلاصه ۱۵۰ میلی‌لیتر از محلول به دست آمده از شستشوی فیلتر برای جداسازی نوتروفیل‌ها استفاده شد. برای حذف سلول‌های دیگر شامل منوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها از هیستوپک (آلمان، سیگما ۱۰۷۷ ®Histopaque) و سانتریفیوژ گرادیانت به نسبت ۵ میلی‌لیتر خون و ۲ میلی‌لیتر هیستوپک استفاده شد. به آرامی به صورتی که خون با هیستوپک مخلوط نشود، توسط پیپت پاستور خون روی هیستوپک ریخته و در دور g × ۸۰۰ مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، ۴ لایه شامل پلاسما، سلول‌های تک هسته، لایه محتوی هیستوپک و در نهایت لایه گرانولوسیت‌ها به همراه سلول‌های قرمز خون ایجاد گردید. در ادامه سه لایه فوق دور ریخته شد و لایه گرانولوسیتی به همراه لایه گلبول‌های قرمز توسط محلول هنکس (HBSSHanks' Balanced Salt Solution) شرکت گیبکو به نسبت ۱ به ۱ رقیق شد. برای حذف گلبول‌های قرمز از روش رسوب‌دهی با دکستران High Fractionation استفاده شد، برای این کار خون به نسبت ۱ به ۱ در فالکون‌های mL ۵۰ با دکستران ۶٪ (۴۵۰۰۰-۳۵۰۰۰، سیگما)، دارای ۰/۹٪ NaCl مخلوط و به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا گلبول‌های قرمز کاملاً ته‌نشین شود. فاز شفاف بالایی شامل نوتروفیل‌ها، با پیپت پاستور جمع‌آوری گردید. رسوب‌دهی با دکستران همه گلبول‌های قرمز را حذف نمی‌کند، بنابراین به منظور حذف باقی‌مانده از محلول لیز گلبول‌های قرمز استفاده گردید. بعد از جداسازی نوتروفیل‌ها، زنده‌مانی آن‌ها با استفاده از تریپان بلو ۰/۴٪ در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد.

استخراج پپتید دیفنسین از نوتروفیل‌ها:

بعد از جداسازی نوتروفیل‌ها و شستشوی آنها با PBS ، لیز سلولی با محلول ۰/۳۴ مولار سوکروز در pH ۷/۴ ، انجام گرفت. در مرحله بعد خرد کردن نوتروفیل‌ها به کمک سونیکاتور در حضور یخ، سه بار و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. بعد از اتمام سونیکاسیون به منظور حذف قطعات یاخته‌ای به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه با دور g ×۲۰۰ سانتریفیوژ و عصاره سیتوزولی برداشته و رسوبات قطعات یاخته‌ای دور ریخته شد. مایع رویی دوبار به مدت ۳۰ دقیقه در دور g ×۵۰۰ در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ گردید، پلت حاوی گرانول‌های نوتروفیلی در سوکروز ۰/۳۴ مولار حل گردید و برای ادامه مراحل مورد استفاده قرار گرفت (۱۴).

خالص‌سازی پپتید دیفنسین با دستگاه HPLC :

برای خالص‌سازی پپتید دیفنسین از دستگاه HPLC مدل شیماتزو با ستون TSK G3000PW به اندازه ۷/۵ میلی‌متر در ۶۰ سانتی‌متر متصل به گارد ستون (TSKgel guardcolumn PWH) ۷/۵ میلی‌متر در ۷/۵ سانتی‌متر استفاده گردید. برای آماده‌سازی و متعادل‌سازی دستگاه، سرعت جریان دستگاه روی mL/min ۰/۵ تنظیم و دستگاه به مدت ۳۰ دقیقه با متانل ۷۰ درصد و سپس نیم ساعت با آب مقطر شستشو داده شد. پمپ‌ها به مدت ۳ دقیقه تخلیه (Purge) شدند. برنامه ران کاری بر اساس استفاده از یک پمپ با سرعت ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه با حلال اصلی استونیتریل ۰/۳۴ درصد دارای TFA ۰/۱ درصد بدون شیب غلظت تنظیم و خوانش در طول موج ۲۲۰ نانومتر انجام شد. پس از رسیدن به خط زمینه (Baseline)، محلول استاندارد پپتید دیفنسین بارگیری شد و در نهایت محل پیک نمونه مورد آزمایش تعیین گردید. سپس نمونه مورد نظر فیلتر شد و مجددا مراحل تکرار گردید و پیک مربوط به دیفنسین جمع‌آوری شد (۱۵).

تهیه و کشت باکتری:

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 33591 از مرکز ذخایر ملی ژنتیک خریداری گردید. سوسپانسیون میکروبی در محیط کشت مایع مولر هینتون براث (مرک، آلمان) تهیه شد. برای این کار یک لوپ از میکروب در ۵ میلی‌لیتر محلول محیط کشت فوق تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس ازکشت اول، کشت مجدد تهیه و در همان شرایط نگهداری شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

تهیه میزان تلقیح باکتری:

از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده مقادیر مختلفی برداشته و در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد تا جذب نوری ۰/۰۵ تا ۰/۱ به دست آید و سپس از آن رقت سریال تهیه گردید. از هر رقت به پلیت‌های حاوی BHI آگار اضافه و کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس تعداد باکتری‌ها شمارش شد و از این طریق تعداد باکتری‌ها در کووت حاوی سوسپانسیون باکتری با جذب نوری معادل ۰/۱ محاسبه شد. میانگین تعداد باکتری‌ها در کووت با جذب نوری ۰/۱ معادل با محلول ۰/۵ مک فارلند برابر با $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/mL محاسبه شد. با مشخص شدن این عدد هرگاه که سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۱ تهیه شود، تعداد باکتری در آن معادل عدد محاسبه شده و می‌توان از این سوسپانسیون غلظت‌های دلخواه را تهیه نمود.

بررسی خاصیت ضد باکتری پپتید دیفنسین:

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) رشد:

حداقل غلظت مهارکنندگی پپتید تخلیص شده به روش ماکرودایلوشن سنجیده شد (۱۶). به طور خلاصه، ابتدا رقت سریال پپتید در مبنای ۲ به صورت، رقت‌های ۱ به ۱ تا ۱ به ۳۲ پپتید دیفنسین محلول در محیط کشت آبگوشت مولر هینتون و پلیت ۹۶ خانه‌ای تهیه گردید. در واقع برای پپتید مورد نظر، غلظت‌های ۲۰ تا ۰/۶۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. در مرحله بعد، تراکم ثابتی از باکتری معادل نیم مک فارلند یا $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/mL به همه چاهک‌های میکروپلیت افزوده شد. سپس پلیت به مدت ۲، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط هوازی انکوبه گردید.

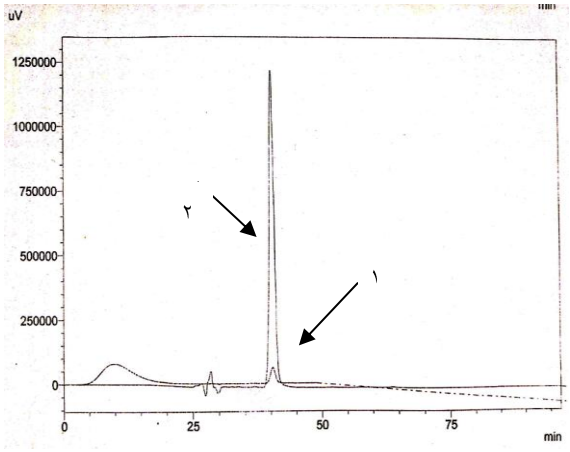
بررسی قطر هاله عدم رشد:

به کمک این آزمون، قطر هاله عدم رشد پپتید تخلیص شده برای باکتری مورد نظر تعیین گردید. برای این کار ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) با کشت ۲۴ ساعته باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با تراکم نیم مک فارلند مخلوط و در یک پلیت استریل ۱۰ سانتی‌متری ریخته شد. سپس با یک سواپ استریل به صورت چمنی باکتری مذکور کشت داده شد. در ادامه یک دیسک استریل آغشته به پپتید تخلیص شده در مرکز محیط کشت قرار داده شد و سپس پلیت با همان شرایط ذکر شده انکوبه گردید.

یافته‌ها

نتایج خالص‌سازی پپتید دیفنسین به روش HPLC:

فرکشن شماره ۲ در شکل ۳ حاوی پیک به دست آمده از تزریق پپتید و فراکشن شماره ۱ حاوی پیک استاندارد دیفنسین می‌باشد. در مقایسه با کروماتوگرام استاندارد، دیفنسین تخلیص شده غلظت ۲۵۰ برابر غلظت استاندارد را نشان می‌دهد (غلظت نمونه استاندارد ppm ۲۰۰ می‌باشد) و هم‌پوشانی دقیقی با نمونه استاندارد دارد و با سرعت ورودی فاز متحرک به میزان ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه، و بعد از ۴۰ دقیقه از دستگاه خارج شد.



شکل ۳: کروماتوگرام استاندارد و نمونه: فلش ۱ مربوط به آلفا دیفنسین تجاری و فلش ۲ مربوط به نمونه حاصل از سونیکاسیون نوتروفیل‌های خارج شده از فیلتر

نتایج بررسی خاصیت ضد باکتری پپتید دیفنسین:

حداقل غلظت بازدارندگی رشد پپتید دیفنسین به میزان ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به روش ماکرودایلوشن تعیین شد . بررسی‌های

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

باکتری‌کشی نشان داد که این پپتید سبب مهار رشد باکتری مذکور می‌شود.

نتایج بررسی قطر هاله عدم رشد:

پس از گذشت ۲۴ ساعت، پلیت زیر نور چراغ بررسی گردید و قطر منطقه مهار رشد برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برابر با ۹ میلی‌متر با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری گردید.

بحث

در این مطالعه از فیلترهای کاهنده لکوسیتی Leucoflex LCR5 استفاده شد، سپس لکوسیت‌ها از فیلترهای کاهنده لکوسیتی توسط جریان معکوس بازیافت شد و جداسازی گرانولوسیت‌ها از سایر سلول‌ها بر مبنای سانتریفیوژ شیب چگالی و رسوب دکستران صورت گرفت. از روش سونیکاسیون برای شکستن گرانول‌های نوتروفیلی و آزادسازی دیفنسین و از روش کروماتوگرافی طرد مولکولی برای تخلیص دیفنسین استفاده شد. بررسی فعالیت ضد میکروبی دیفنسین بر روی گونه مقاوم استافیلوکوکوس اورئوس نشان‌دهنده اثربخشی بر روی گونه مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج بود.

اگر چه در طول قرن گذشته، کشف طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها و واکسن‌ها، عوارض مرگ و میر ناشی از عفونت‌های میکروبی را کاهش داد، اما امروزه مقاومت‌های آنتی بیوتیکی ناشی از استفاده بیش از حد و نامناسب آنتی‌بیوتیک‌ها، دنیا را با چالش‌های جدیدی مواجه کرده است. به همین دلیل نیاز به دستیابی به نوآوری‌هایی در کنترل عفونت‌های میکروبی وجود دارد و استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان جایگزینی بالقوه و با ارزش اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است (۱۸، ۱۷).

این پپتیدهای ضد میکروبی که از اجزای مهم دفاع طبیعی بدن علیه عوامل بیماری‌زا هستند، توسط گرانولوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های اپی‌تلیال در انسان تولید می‌شوند و از آن جایی که بیش از ۶۰ درصد گلبول‌های سفید خون را نوتروفیل‌ها تشکیل می‌دهند، می‌توانند به عنوان منبع غنی از این پپتیدها مورد استفاده قرار گیرند (۸، ۶).

از طرف دیگر برخی عوارض جانبی بالقوه در انتقال خون ناشی از اجزای لکوسیتی اهداکننده می‌باشد و به همین دلیل کاهش لکوسیت‌ها به عنوان یکی از عملکردهای بهینه در مراحل فرآیندهای خون در انتقال خون‌های سراسر دنیا قرار گرفته است (۱۹). فیلترهای کاهنده لکوسیتی متعددی در سازمان انتقال خون ایران برای کاهش لکوسیت در فرآورده‌های خونی استفاده می‌شود که از دسته فیلترهای پیش‌ذخیره هستند. در این مطالعه فیلترهای Leucoflex LCR5 متصل به کیسه‌های چهارتایی شرکت ماکوفارمای فرانسه، برای جداسازی ابتدایی لکوسیت‌ها و سپس جداسازی اختصاصی نوتروفیل‌ها و استخراج دیفنسین مورد استفاده قرار گرفت. فیلترهای LCR5 دارای ۲۷ لایه مشتمل بر ۵ لایه ۳۰ میکرومتری و ۲۲ لایه ۹ میکرومتری می‌باشد. ۵ لایه ابتدایی جهت جداسازی لخته‌ها بوده و از جنس پلی اتیلن ترفتالات می‌باشند. لایه‌های ۹ میکرومتری از جنس پلی‌پروپیلن بوده و در سه سطح مکانیسمی به ترتیب به روش‌های جداسازی براساس اندازه، جداسازی تمایلی و جداسازی سلولی (به دام انداختن سلول‌ها) عمل می‌کنند (۲۰). این فیلترهای کاهنده لکوسیتی پس از استفاده به عنوان ضایعات تلقی شده و دور ریخته می‌شوند. در حالی که این فیلترها منبع بسیار غنی از سلول‌های خون محیطی می‌باشند که به راحتی می‌توان از این منبع ارزشمند در مطالعات پایه و یا بالینی استفاده نمود و راهی برای استفاده از این سرمایه ملی ارزشمند در درمان گشود(۱۱).

روش رایج کنونی برای بازیابی لکوسیت‌ها از فیلترهای کاهنده لکوسیتی، جریان معکوس است که شامل عبور جریان مایع در جهت معکوس جریان اصلی فیلترها می‌باشد. لانگلی و همکاران، بافر سالین فسفات (PBS) را از جریان معکوس عبور دادند (۲۱). در سال‌های بعد کولیگان و همکاران، پس از جریان معکوس و برای تخلیص بیشتر از سانتریفیوژ شیب فایکول هایپک استفاده کردند و سلول‌های لکوسیتی حاصل را با PBS شستشو دادند (۱۱). در سال ۲۰۱۷ وگهاوپت و همکاران نیز از جریان معکوس شستشو برای استحصال لکوسیت‌های به دام افتاده در فیلتر استفاده کردند (۲۲). در مطالعه حاضر از

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

سیستم جریان معکوس و از بافر شستشوی PBS در pH برابر با ۷/۲ ، حاوی ۲ میلی مولار EDTA و ۴ درصد دکستران۴۰٪ استفاده گردید. هم‌چنین برای جلوگیری از دستکاری کمتر در شستشوی فیلتر، یک سیستم مکانیکی با حجم و فشار تعیین شده شامل یک اتصال سه طرفه قابل تنظیم، یک پمپ پریستالتیک و یک دمنده هوا، با سرعت و تکرارپذیری بالا طراحی و استفاده شد. هم‌چنین برای جداسازی گرانولوسیت‌ها از سایر سلول‌ها، از روش مقبل و همکاران بر مبنای سانتریفیوژ شیب چگالی و رسوب دکستران تحت شرایط دمایی و pH تعریف شده و با انجام تغییراتی در روش استفاده شد (۱۳).

در یک مطالعه در سال ۲۰۱۴، برای تحریک ترشح دیفنسین از سیتوکالازین b (*Cytochalasin B*) و N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine استفاده شد (۲۳). در مطالعه حاضر به دلیل استفاده از فیلترهای کاهنده لکوسیتی که گرانولوسیت‌های حاصل از حدود ۴۵۰ میلی‌لیتر خون می‌باشد و به دلیل میزان فراوان لکوسیت در دسترس، نیاز به این غنی سازی نبود. برای شکستن گرانول‌های نوتروفیلی و آزادسازی دیفنسین از روش سونیکاسیون استفاده شد و برای تخلیص دیفنسین از کروماتوگرافی طرد مولکولی (Size Exclusion Chromatography) استفاده شد، هم‌چنان که در مطالعه‌های بسیاری از روش‌های متفاوتی نظیر کروماتوگرافی تعویض یونی و کروماتوگرافی فاز معکوس و کروماتوگرافی طرد مولکولی برای تخلیص پپتیدهای ضد میکروبی استفاده شده است (۲۶-۲۴).

دیفنسین‌ها به طور هم‌زمان دارای فعالیت ضد میکروبی و ضد سرطانی هستند و در حال حاضر تحقیقات بسیاری بر روی این اثرات متمرکز شده است (۲۷). اغلب پپتیدهای ضد میکروبی ضد باکتری، کاتیونیک هستند که غشا سلول باکتری را هدف قرار داده و موجب تجزیه ساختار لیپید دولایه می‌گردد. در حالی که برخی از پپتیدهای ضد میکروبی قادر به مهار واکنش‌های درون سلولی نیز می‌باشند (۷). در این مطالعه اثر پپتید دیفنسین استخراج شده از نوتروفیل‌های حاصل از فیلترهای کاهنده لکوسیتی، بر روی گونه مقاوم استافیلوکوکوس اورئوس، نشان‌دهنده اثربخشی بر روی گونه مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج بود و این پپتید در غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر،که غلظت مناسبی برای خاصیت باکتری‌کشی محسوب می‌شود، قادر به مهار رشد باکتری شد. در این مطالعه حداقل غلظت مهاری (MIC) پپتید دیفنسین با مطالعه وُسیر و همکاران در سال ۲۰۱۴ مطابقت نشان داد (۲۳).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه از دیفنسین به عنوان پپتید ضدمیکروبی و برای بررسی تعیین حداقل غلظت مهار رشد باکتری استافیلوکوک اورئوس استفاده گردید و نشان داده شد که با توجه به ظهور گسترده مقاومت‌های دارویی می‌تواند به عنوان یک گزینه مناسب و در دسترس و با پتانسیل جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها مد نظر قرار گیرد. با وجود مطالعه‌های بسیاری که بر روی فعالیت ضد باکتریایی دیفنسین انجام گرفته است، تاکنون خاصیت باکتری‌کشی پپتید دیفنسین بازیابی شده از فیلترهای کاهنده لکوسیتی گزارش نگردیده بود. از طرفی یکی از منابع در دسترس سلول‌های خونی، فیلترهای کاهنده لکوسیتی می‌باشد که به دلیل سهل‌الوصول بودن، مورد توجه بسیاری از مراکز تحقیقاتی انتقال خون قرار گرفته است. قابلیت‌های فوق‌العاده گلبول‌های سفید از جمله تولید پپتیدهای ضد میکروبی و کموکاین‌های مختلف، سبب شده است مطالعه‌ها در زمینه بازیابی حداکثری گلبول‌های سفید به دام افتاده در این فیلترها در مراکز تحقیقاتی انتقال خون صورت پذیرد. مطالعه‌ها در مورد بازیابی سلول‌های حاصل از فیلترهای کاهنده لکوسیتی و نقش پپتیدهای ضد میکروبی و سایر مدیاتورهای حاصل از این سلول‌ها می‌تواند ابزار قدرتمندی در تحقیقات سلول درمانی و مطالعه‌های برهمکنش سلولی باشد و در پیشرفت‌های مولکولی جدید در کشف دارو اهمیت داشته باشد.

حمایت مالی

این پروژه تحقیقاتی توسط مؤسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران و مؤسسه عالی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین مالی شده است.

ملاحظات اخلاقی

این پروژه از مؤسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران دارای کد اخلاق IR.NIMAD.REC.1396.294 و از مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون دارای کد اخلاق IR.TMI.REC.1396.019 می‌باشد.

عدم تعارض منافع

نویسندگان اظهار کردند در انتشار این اثر منافع تجاری نداشتند و در مقابل ارائه اثر وجهی دریافت نکرده‌اند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مؤسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران و مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تشکر می‌شود.

References:

1- Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. Medicina (Kaunas) 2011; 47(3): 137-46.
2- Bockstael K, Van Aerschot A. Antimicrobial resistance in bacteria. Central European Journal of Medicine 2009; 4(2): 141-55.
3- Donadio S, Maffioli S, Monciardini P, Sosio M, Jabes D. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. J Antibiot (Tokyo) 2010; 63(8): 423-30.
4- Seo MD, Won HS, Kim JH, Mishig-Ochir T, Lee BJ. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. Molecules 2012; 17(10): 12276-86.
5- Conlon JM, Sonnevend A. Antimicrobial peptides in frog skin secretions. Methods Mol Biol 2010; 618: 3-14.
6- Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. J Biochem Mol Biol 2005;38(2): 128-50.
7- Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. Pharmaceuticals (Basel) 2013; 6(12): 1543-75.
8- Dewald B, Bretz U, Baggiolini M. Release of gelatinase from a novel secretory compartment of human neutrophils. J Clin Invest 1982; 70(3): 518-25.
9- Kim EJ, Yeo GD, Pai CM, Kang IK. Preparation of surface-modified poly(butylene terephthalate) nonwovens and their application as leukocyte removal filters. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2009; 90(2): 849-56.
10- Dzik S. Leukodepletion blood filters: filter design and mechanisms of leukocyte removal. Transfus Med Rev 1993; 7(2): 65-77.
11- Schuck P, Braswell EH. Measuring protein-protein interactions by equilibrium sedimentation. Curr Protoc Immunol 2007; Chapter 18:18.8.1-18.8.28.
12- Sasani N, Roghanian R, Emtiazi G, Jalali S, Zarif MN, Aghaie A. Design and introduction of a rational mechanical eluting system for leukocyte recovery from leukoreduction filters: A cell differential approach. Transfus Clin Biol 2020; 27(3): 172-8.
13- Maqbool M, Vidyadaran S, George E, Ramasamy R. Optimisation of laboratory procedures for isolating human peripheral blood derived neutrophils. Med J Malaysia 2011; 66(4):296-9.
14- Tan BH, Meinken C, Bastian M, Bruns H, Legaspi A, Ochoa MT, *et al*. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. J Immunol 2006; 177(3): 1864-71.
15- Sasani N, Roghanian R, Emtiazi G, Aghaie A. A Novel Approach on Leukodepletion Filters: Investigation of Synergistic Anticancer Effect of Purified α-Defensins and Nisin. Adv Pharm Bull 2021; 11(2): 378-84.
16- Baxter AA, Poon IK, Hulett MD. The plant defensin NaD1 induces tumor cell death via a non-apoptotic, membranolytic process. Cell Death Discov 2017; 3(1): 1-11.
17- Van Wyk H. Antibiotic resistance. SA Pharmaceutical Journal 2015; 82(3): 20-3.
18- Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol Rev 2003; 55(1): 27-55.
19- Wortham ST, Ortolano GA, Wenz B. A brief history of blood filtration: clot screens, microaggregate removal, and leukocyte reduction. Transfus Med Rev 2003; 17(3): 216-22.
20- Mönninghoff J, Moog R. Investigation of a new in-line leukocyte reduction filter for packed red blood cells. Transfus Apher Sci 2012; 46(3): 253-6.
21- Longley RE, Stewart D. Recovery of functional human lymphocytes from Leukotrap filters. J Immunol Methods 1989; 121(1): 33-8.
22- Wegehaupt AK, Roufs EK, Hewitt CR, Killian ML, Gorbatenko O, Anderson CM, *et al*. Recovery and assessment of leukocytes from LR Express filters. Biologicals 2017; 49: 15-22.
23- Vossier L, Leon F, Bachelier C, Marchandin H, Lehmann S, Leonetti JP, *et al*. An innovative biologic recycling process of leukoreduction filters to produce active human antimicrobial peptides. Transfusion 2014; 54(5): 1332-9.
24- Eisenhauer P, Harwig S, Szklarek D, Ganz T, Selsted M, Lehrer R. Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils. Infect Immun 1989; 57(7): 2021-7.
25- Bals R, Wilson JM. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. Cell Mol Life Sci 2003; 60(4): 711-20.
26- Jones EA, Cheng Y, O'Meally D, Belov K. Characterization of the antimicrobial peptide family

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

27- Gaspar D, Freire JM, Pacheco TR, Barata JT, Castanho MA. Apoptotic human neutrophil peptide-1 anti-tumor activity revealed by cellular biomechanics. Biochim Biophys Acta 2015; 1853(2): 308-16.

defensins in the Tasmanian devil (Sarcophilus harrisii), koala (Phascolarctos cinereus), and tammar wallaby (Macropus eugenii). Immunogenetics 2017; 69(3): 133-143.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]