

## عملکرد ضد باکتریایی پپتید ترکیبی MELITININ+BMAP-27 بر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا

نویسندگان:

ریحانه روحی جهرمی<sup>۱</sup>، محمد کارگر<sup>۲\*</sup>، فرزانه مدرس<sup>۳</sup>، شهرام نظریان<sup>۴</sup>، مجتبی جعفری نیا<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

۳- استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، ایران

۴- دانشیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، ایران

۵- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.1, Spring 2022

### چکیده:

**مقدمه:** سویه‌های باکتریایی دارای مقاومت چندگانه به سرعت گسترش یافته‌اند. این پژوهش با هدف طراحی و سنتز پپتید ترکیبی موثر از ترکیب دو پپتید به منظور دستیابی به بیشترین فعالیت ضدباکتریایی و ارزیابی تاثیر مهاری آن بر روی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا طراحی گردید.

**روش کار:** این پژوهش به صورت تجربی با سنتز یک پپتید ترکیبی از MELITININ+BMAP-27 انجام شد. سپس تاثیر ضدباکتریایی این پپتید ترکیبی بر روی سویه‌های استاندارد و جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا ارزیابی گردید.

**یافته‌ها:** سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت ۰/۱٪ پپتید ترکیبی به ترتیب هاله عدم رشد ۱۵ و ۱۵ میلی‌متر و در غلظت ۰/۵٪ به ترتیب هاله عدم رشد ۱۹ و ۲۰ میلی‌متر را نشان دادند. سویه‌های بالینی هر دو گونه باکتری نسبت به سویه‌های استاندارد مقاومت بالاتری نسبت به آنتی بیوتیک‌ها و پپتید ترکیبی نشان دادند. در برخی از غلظت‌ها، ترکیب پپتید ترکیبی و آنتی‌بیوتیک‌ها موجب افزایش حساسیت فعالیت ضدباکتریایی شد، اما این تاثیر در تمامی غلظت‌ها معنی‌دار نبود.

**نتیجه گیری:** پپتید ترکیبی حاصل از دوپپتید MELITININ+BMAP-27 و بر سویه‌های بالینی و استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا تاثیر ضدباکتریایی داشتند. نتایج نشان داد که ترکیب این پپتید با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند در کاهش عوارض جانبی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی مؤثر باشد.

**واژگان کلیدی:** پپتید ترکیبی، ملیتینین، BMAP-27، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، اثر ضدباکتریایی

Pars J Med Sci 2022;20(1):50-62

### مقدمه:

این باکتری گرم منفی اکسیداز مثبت، غیرتخمیری و هوازی است و در خاک، آب، محیط‌های مرطوب و روی سطح بدن انسان یافت می‌شود [۳].

استافیلوکوکوس اورئوس یکی دیگر از باکتری‌های بیماری‌زای ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی است که مقاومت دارویی نسبت به آن در حال افزایش است. استافیلوکوکوس اورئوس

استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها موجب ظهور سریع سویه‌های مقاوم به درمان آنتی‌بیوتیکی شده است به طوری که حدود ۵۰ تا ۶۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی به دلیل این سویه‌ها می‌باشند [۱].

سودوموناس آئروژینوزا یکی از اصلی‌ترین عوامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی در مراکز درمانی و سوختگی می‌باشد [۲].

\* نویسنده مسئول، نشانی: استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.

تلفن تماس: پست الکترونیک: mkargar@jia.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۷

اصلاح: ۱۴۰۱/۰۱/۰۸

دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۵

مثبت این پپتید کاتیونی برکلبسیلا نمونیه و سالمونلا انتریکا سرووار تایفی موریم را گزارش نمودند [۱۲].  
گرانول‌های سیتوپلاسمی نوتروفیل‌های پستانداران، منبع غنی از پپتیدهای ضد میکروبی نظیر خانواده کاتلیسیدین‌ها می‌باشند [۱۳]. کاتلیسیدین‌ها به دلیل دارا بودن مناطق بسیار محافظت شده درپایانه N با سیگنال‌های پپتیدی با هومولوژی زیاد نسبت به کاتلیسیدین و تنوع پایانه C، ویژگی‌های ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد سرطانی را دارند [۱۳، ۱۴]. کاتلیسیدین گاو BMAP-27 دارای ویژگی‌های فعالیت ضد میکروبی در گسترده‌ی زیادی از باکتری‌های گرم منفی، گرم مثبت، ویروس‌ها و قارچ‌ها و توانایی مهار تشکیل بیوفیلم و خنثی کننده قوی لیپوپلی ساکارید می‌باشد. این ویژگی‌ها برای درمان باکتری‌های گرم منفی مفید می‌باشد و BMAP-27 را به عنوان یک عامل درمانی بالقوه در برابر باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بسیار جذاب کرده است [۱۳-۱۵]. با این وجود ممکن است سبب ایجاد سمیت در گلوبول‌های قرمز گردند [۱۳، ۱۴]. یانگ و همکاران در سال ۲۰۱۹ در کره جنوبی فعالیت ضد میکروبی و ضد سرطانی مطلوبی از BMAP-27 گزارش نمودند [۱۳]. زانتی و همکاران در ۲۰۰۳ در ایتالیا تاثیر مطلوب BMAP-27 بر باکتری‌های گرم منفی را گزارش کردند [۱۶].

با توجه به رویکرد جامعه جهانی به استفاده از منابع موجود در طبیعت مانند پپتیدهای ضد باکتریایی با اثرات جانبی کم و به دلیل گزارش نشدن مقاومت، این تحقیق با هدف ارزیابی ویژگی‌های ضد باکتریایی پپتید ترکیبی MELITININ+BMAP-27 علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد.

## روش کار:

### مواد شیمیایی و محیط‌های کشت:

دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت MAST انگلستان و تمامی مواد، محیط‌های کشت و معرف‌های شیمیایی از کمپانی مرک آلمان و سیگمای آمریکا تهیه و طبق توصیه سازنده از آن‌ها استفاده گردید. از بین آنتی‌بیوتیک‌های پیشنهادی CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) آنتی‌بیوتیک‌های مشترک در دو باکتری مورد مطالعه، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، تری متوپریم (۵ میکروگرم) و جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) انتخاب گردید.

### میکروارگانیزم‌ها:

سویه‌های استاندارد مورد استفاده در این تحقیق *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC27853) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC

دارای سموم و آنزیم‌های مختلفی می‌باشد. جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین نه تنها به بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف (ESBLs) و سفالوسپورین‌ها بلکه به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاومت نشان می‌دهند [۴]. پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) جایگزین‌های امیدوارکننده‌ای برای مبارزه با باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌باشند [۵].

این پپتیدها به طور طبیعی در سیستم ایمنی ذاتی مهره‌داران و بی‌مهره‌ها وجود دارند و به صورت شیمیایی نیز سنتز می‌شوند. از آنجا که محل اثرگذاری این پپتیدها غشای باکتری‌ها می‌باشد، مقاومت باکتری به آن‌ها بسیار نادر است و بر مجموعه‌ای از عوامل بیماری‌زا مانند باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت، قارچ‌ها، انگل‌ها و ویروس‌ها تاثیر دارند [۵].

پپتیدها مولکول‌های بیولوژیک کاتیونی و آمفی‌فیلک با ویژگی‌های مشترکی چون بار مثبت بین +۲ تا +۱۱، تمایل به تشکیل ساختار ثانویه آمفی پاتیک در غشا و آرایش پپتیدهای خطی با ساختار مارپیچ آلفا دارند. به دلیل داشتن ۲ تا ۷ اسید آمینه پایه اضافه مانند (آرژینین، لیزین و هیستیدین) شارژ خالص دارند. معمولاً این پپتیدها متنوع و کوتاه (دارای ۱۰ تا ۵۰ آمینو اسید) هستند. همچنین نسبت قابل توجهی (معمولاً ۵۰٪) نیز جایگاه آب‌گریز دارند [۵، ۶].

زهر زنبور عسل (Bee Venom=BV) با ۱۸ جزء فعال از پپتیدهایی مانند ملیتین، آپامین، آدولاپین و آنزیم‌های آمینی فعال بیولوژیکی چون هیستامین، هیالورونیداز، فسفولیپاز A2 اپی‌نفرین و اجزای غیر پپتیدی با خواص دارویی فراوان تشکیل شده است [۷].

ملیتین و فسفولیپاز A2 دو جزء اصلی BV می‌باشند. ملیتین، پروتئین کوچکی با ۲۶ اسید آمینه ۶۰-۵۰ درصد زهر خشک را تشکیل می‌دهد و جزء اصلی زهر است. نفوذ مقداری از مولکول‌های ملیتین در غشای سلولی، موجب شکست فسفولیپیدها و از دست رفتن تمامیت دو لایه فسفولیپیدی و لیز سلول می‌گردد [۷].

در سال ۱۹۹۹ سینتارام و همکاران از فعالیت بیولوژیکی قسمت C ترمینال ۱۵ قطعه انتهایی ملیتین به عنوان آنالوگی در فعالیت ضد باکتریایی استفاده کردند [۸]. در سال ۲۰۰۵ لازارو همکاران در محیط *in vivo* اثر ضد میکروبی ملیتین بر روی عفونت‌های ناشی از کلامیدیا تراکوماتیس و مایکوپلازما هومینیس را بررسی کردند [۹]. در سال ۲۰۱۱ یون و همکاران با به کار گرفتن ملیتین از پانکراتیت حاد به عنوان یکی از بیماری‌های عفونی جلوگیری کردند [۱۰]. در سال ۲۰۱۷ میر نژاد و همکاران تاثیر پپتید کاتیونی CM11 (هیبرید ملیتین و سیکروپین) بر بروسلا ملیتینسیس را گزارش نمودند [۱۱]. در سال ۲۰۱۴ فصیحی و همکاران تاثیر

آنتی‌بیوتیک و همچنین آنتی‌بیوتیک‌ها به تنهایی انجام گردید. همچنین برای دست یابی به غلظت موثرتر پپتید ترکیبی، با تهیه رقت از دو غلظت ۰/۱٪ و ۰/۵٪ آزمون با روش ایجاد چاهک انجام شد به منظور دست‌یابی به نتایج آماری دقیق‌تر هر آزمون سه بار تکرار شد [۱۷، ۱۸].

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده نرم افزار آماري ANOVA و t-test در نرم افزار گراف پد انجام شد [۱۸].

### یافته‌ها:

در جدول ۱ اطلاعات مربوط به توالی اسیدهای آمینه، فرمول شیمیایی و تعداد اتم‌های تشکیل‌دهنده پپتیدهای والد و پپتیدهای هیبریدی نشان داده شده است.

در شکل ۱ نتایج حاصل از کروماتوگرام بر اساس میلی ولت در دقیقه نشان داده شده است. از مجموع ۲۵ دقیقه مورد بررسی، در دقیقه ۱۵/۰۲۵ یک قله تا ۱۲۵۰ میلی ولت مشاهده گردید.

در شکل ۲، نتایج طیف سنجی جرمی نشان دهنده داده شده است، همان‌گونه که ملاحظه می‌شود بالاترین پیک مثبت (Positive intensity) ۴۳۴/۲ در جرم ۴۲۲/۷ مشاهده گردید.

جهت تفسیر نتایج بر اساس قطر هاله عدم رشد به میلی‌متر برای سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس از معیار پیشنهادی CLSI استفاده شده است.

حداقل غلظت بازدارندگی پپتید ترکیبی در روش ایجاد چاهک با غلظت ۰/۱٪ قطر هاله عدم رشد برای سودوموناس آئروژینوزا ۱۵ میلی‌متر و برای استافیلوکوکوس اورئوس ۱۶ میلی‌متر و برای غلظت ۰/۵٪ پپتید ترکیبی قطر هاله عدم رشد برای سودوموناس آئروژینوزا ۱۹ میلی‌متر و برای استافیلوکوکوس اورئوس ۲۰ میلی‌متر بود. با توجه به موثرتر بودن غلظت ۰/۵٪، از این غلظت به منظور تهیه رقت و ادامه پژوهش استفاده گردید.

نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام برای سویه‌های میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دهنده حساسیت (Sensitive) سویه‌های استاندارد به هر سه آنتی‌بیوتیک و نیمه حساس (Intermediate) بودن سویه‌های بالینی هر دو باکتری مورد بررسی به تری متوپریم بود.

نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد رقت‌های مختلف پپتید ترکیبی در باکتری‌ها با ایجاد چاهک نشان می‌دهد که سودوموناس آئروژینوزا استاندارد با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۷ میلی‌متر در رقت ۱۰۰ (µg/µL) و ۱۵ میلی‌متر در رقت ۵۰ (µg/µL) و سویه بالینی در رقت‌های ۱۰۰ (µg/µL) و ۵۰ (µg/µL) با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۵ میلی‌متر تاثیر بازدارندگی مانند آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و جنتامایسین دارد. همچنین در رقت ۲۵ (µg/µL) نیز هاله عدم رشد با قطر ۱۰ میلی‌متر و در رقت (µg/µL)

از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران (PTCC) تهیه و طبق عملکرد مرکز استفاده گردید. همچنین از یک سویه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا جدا شده در مطالعات نیز استفاده گردید.

### طراحی پپتید ترکیبی:

در ابتدا با توجه به ویژگی‌های دو پپتید ضد میکروبی MELITININ+BMAP-27 یک توالی پپتیدی ترکیبی از دو پپتید (GLPLLSWIKRKKLFKLLSP) تهیه گردید. سپس در برخی آمینواسیدها به منظور بهبود شرایط ضد میکروبی تغییراتی داده شد. طراحی پپتید ترکیبی و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک بر روی خواص آنتی‌باکتریال پپتیدها با قطع و جایگزینی اسیدهای آمینه بر اساس شکل چرخشی سیلیکونی و ساختار سه بعدی پپتید انجام گردید. طراحی‌های پیش‌بینی شده از ساختارهای سه بعدی پپتید ترکیبی، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک و نرم افزارهای اختصاصی مانند (Hierarchical Neural Network= HNN) به منظور ایجاد شکل‌های چرخشی ماریچی و تعیین ارتباط این ساختارها با موقعیت‌های هیدروفوبی پپتیدها انجام شد و در نهایت توالی آمینواسیدی (WGKVLIVIKHKLKFKLKS) بدست آمد که از نظر بیوانفورماتیک نشان دهنده خاصیت ضد میکروبی بود.

### سنتر پپتید:

توالی پپتید ترکیبی جدید توسط شرکت GenScript USA Inc سنتر گردید و تایید صحت سنتر و خلوص بالاتر از ۹۵٪ توسط HPLC و اسپکترومتری بررسی گردید [۱۶].

### بررسی اثر ضدباکتریایی پپتید ترکیبی:

اثرات ضدباکتریایی پپتید ترکیبی با غلظت‌های ۰/۷۸، ۰/۱۲، ۱/۵۶، ۳/۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر [۱۷] بر روی سویه استاندارد و بالینی سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس با روش انتشار در آگار (Disk Diffusion Agar) انجام شد. به وسیله سواب استریل از کدورت معادل ۶CFU/ml  $10 \times 10^5$  سوسپانسیون باکتریایی روی محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت یکنواخت کشت داده شد. سپس در فاصله‌های مناسب، تعدادی چاهک به قطر شش میلی‌متر با عمق ۵ میلی‌متر ایجاد گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه شده از پپتید درون چاهک مربوط به آن ریخته و پس از یک ساعت استراحت برای ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد و قطر هاله عدم رشد نمونه‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید. با همین روش به منظور بررسی اثر هم‌افزایی پپتید ترکیبی و آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر با غلظت برابر پپتید ترکیبی و

ترکیبی در ترکیب با تتراسایکلین و جنتامایسین اثر ضد باکتریایی معنی دار بالاتری نسبت به ترکیب با تری متوپریم داشت.

باکتری سودوموناس آئروژینوزا استاندارد در رقت (μg/μL) ۱۰۰ به ترکیب تری متوپریم با پیتید ترکیبی ۳۳/۳٪ حساسیت و به ۲ ترکیب تتراسایکلین و جنتامایسین با پیتید ترکیبی ۶۶/۷٪ واکنش نیمه حساس نشان داد و در رقت (μg/μL) ۵۰ به ۲ ترکیب تتراسایکلین و تری متوپریم با پیتید ترکیبی ۶۶/۷٪ حساسیت و به ترکیب جنتامایسین با پیتید ترکیبی ۳۳/۳٪ واکنش نیمه حساس نشان داد. در رقت (μg/μL) ۱۲/۵ و ۲۵ به ۲ ترکیب ۶۶/۷٪ تتراسایکلین و جنتامایسین با پیتید ترکیبی حساسیت و به ترکیب تری متوپریم با پیتید ترکیبی ۳۳/۳٪ واکنش نیمه حساس نشان داد. در رقت (μg/μL) ۶/۲۵ به ۲ ترکیب تتراسایکلین و جنتامایسین با پیتید ترکیبی ۶۶/۷٪ حساسیت و به ترکیب تری متوپریم با پیتید ترکیبی ۳۳/۳٪ مقاومت نشان داد. اما در رقت (μg/μL) ۳/۱۲ به ۲ ترکیب تتراسایکلین و جنتامایسین با پیتید ترکیبی ۶۶/۷٪ واکنش نیمه حساس و به ترکیب تری متوپریم با پیتید ترکیبی ۳۳/۳٪ واکنش حساسیت و به ترکیب تری متوپریم با پیتید ترکیبی ۶۶/۷٪ مقاومت داشت. در رقت (μg/μL) ۱/۵۶ به ترکیب تتراسایکلین با پیتید ترکیبی ۳۳/۳٪ واکنش حساسیتی و به ۲ ترکیب جنتامایسین و تری متوپریم با پیتید ترکیبی ۶۶/۷٪ مقاومت و برای رقت های (μg/μL) ۰/۷۸ تا ۰/۰۴ به تمامی ترکیب ها ۱۰۰٪ مقاومت نشان داد.

جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا به ترکیب تتراسایکلین و پیتید ترکیبی در رقت ۱۰۰ تا (μg/μL) ۱۲/۵ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۷ و ۱۸ میلی متر حساسیت نشان داد و در رقت ۶/۲۵ تا ۱/۵۶ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۴ و ۱۲ میلی متر واکنش نیمه حساس و در رقت ۰/۷۸ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۵ میلی متر و در رقت ۰/۳۹ تا ۰/۰۴ بدون هاله عدم رشد به آن مقاومت نشان دادند. ترکیب جنتامایسین و پیتید ترکیبی در رقت های (μg/μL) ۲۵ تا ۱۲/۵ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۶ و ۱۵ میلی متر حساسیت داشت و در رقت های (μg/μL) ۱۰۰ و ۵۰ و ۶/۲۵ و ۳/۱۲ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۴ و ۱۳ میلی متر واکنش نیمه حساس و در رقت های (μg/μL) ۱/۵۶ و ۰/۷۸ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۰ و ۵ میلی متر و بقیه رقت ها تا رقت ۰/۰۴ بدون هاله عدم رشد به آن مقاومت نشان دادند. ترکیب تری متوپریم و پیتید ترکیبی در رقت های (μg/μL) ۱۰۰ و ۵۰ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۷ و ۱۶ میلی متر حساسیت نشان داد و در رقت های (μg/μL) ۲۵ و ۱۲/۵ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۵ و ۱۱ میلی متر نیمه حساس و در رقت (μg/μL) ۶/۲۵ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۵ میلی متر و بقیه رقت ها تا رقت (μg/μL) ۰/۰۴ بدون هاله عدم رشد به آن مقاومت نشان داد. سودوموناس آئروژینوزا استاندارد به ترکیب تتراسایکلین و جنتامایسین با پیتید ترکیبی در رقت های ۱۲/۵ و ۶/۲۵ و ۳۳/۳٪ حساسیت معنی داری نشان داد (جدول ۲). به عبارتی، در غلظت های ۱۲/۵ تا ۰/۷۸ پیتید

۱۲/۵ هاله عدم رشد به قطر ۵ میلی متر در واکنش به پیتید ترکیبی ایجاد نمود که در مقایسه با آنتی بیوتیک های مورد استفاده بازدارندگی موثر نداشت.

همچنین استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۹ میلی متر در رقت (μg/μL) ۱۰۰ و ۱۸ میلی متر در رقت (μg/μL) ۵۰ و ۱۶ میلی متر در رقت (μg/μL) ۲۵ تاثیر بازدارندگی مانند آنتی بیوتیک های تتراسایکلین و جنتامایسین و تری متوپریم دارد. و جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس در رقت (μg/μL) ۱۰۰ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۹ میلی متر تاثیر بازدارندگی مانند آنتی بیوتیک های تتراسایکلین و جنتامایسین داشت. در رقت (μg/μL) ۵۰ تا ۶/۲۵ نیز هاله عدم رشد با قطر ۱۴ میلی متر تا ۵ میلی متر در واکنش به پیتید ترکیبی ایجاد نمود که در مقایسه با آنتی بیوتیک های مورد استفاده بازدارندگی موثر ندارند. مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد پیتید ترکیبی در غلظت های مختلف بین سویه های استاندارد و بالینی هر کدام از گونه های باکتریایی نشان داد که تنها در غلظت ۳/۱۲ اختلاف معنی داری در استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارد (نمودار ۱).

سودوموناس آئروژینوزا استاندارد در واکنش به ترکیب تتراسایکلین و پیتید ترکیبی در رقت (μg/μL) ۵۰ و ۲۵ و ۱۲/۵ و ۶/۲۵ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۷ تا ۲۲ میلی متر حساسیت داشت و در رقت (μg/μL) ۱۰۰ و ۳/۱۲ و ۱/۵۶ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۳ و ۱۴ و ۱۲ میلی متر نیمه حساس بود و در رقت (μg/μL) ۰/۷۸ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۵ میلی متر و بقیه رقت ها تا رقت (μg/μL) ۰/۰۴ بدون هاله عدم رشد به آن مقاومت نشان داد. ترکیب جنتامایسین و پیتید در رقت های (μg/μL) ۲۵ تا ۶/۲۵ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۶ تا ۱۵ میلی متر حساسیت داشت و در رقت های (μg/μL) ۱۰۰ و ۵۰ و ۳/۱۲ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۴ و ۱۳ میلی متر نیمه حساس بود و در رقت های (μg/μL) ۱/۵۶ و ۰/۷۸ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۰ و ۵ میلی متر و بقیه رقت ها تا رقت ۰/۰۴ بدون هاله عدم رشد به آن مقاومت نشان داد.

ترکیب تری متوپریم و پیتید ترکیبی در رقت های (μg/μL) ۱۰۰ و ۵۰ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۷ و ۱۶ میلی متر حساسیت نشان داد و در رقت های (μg/μL) ۲۵ و ۱۲/۵ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۵ و ۱۱ میلی متر نیمه حساس و در رقت (μg/μL) ۶/۲۵ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۵ میلی متر و بقیه رقت ها تا رقت (μg/μL) ۰/۰۴ بدون هاله عدم رشد به آن مقاومت نشان داد. سودوموناس آئروژینوزا استاندارد به ترکیب تتراسایکلین و جنتامایسین با پیتید ترکیبی در رقت های ۱۲/۵ و ۶/۲۵ و ۳۳/۳٪ حساسیت معنی داری نشان داد (جدول ۲). به عبارتی، در غلظت های ۱۲/۵ تا ۰/۷۸ پیتید

هاله عدم رشد به آن مقاومت نشان داد (جدول ۴). در غلظت ۱/۵۶ ترکیب پیتید ترکیبی با تتراسایکلین و بطور معنی داری اثر بیشتر از ترکیب با جنتامایسین و تری متوپریم بود. باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استاندارد در رقت (۱۰۰  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) به ۲ ترکیب تری متوپریم و تتراسایکلین با پیتید ترکیبی ۶۶/۷٪ حساسیت و به ترکیب جنتامایسین با پیتید ترکیبی ۳۳/۳٪ واکنش نیمه حساس نشان داد و در رقت (۵۰  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) تا ۱۲/۵ به هر سه ترکیب تتراسایکلین و تری متوپریم و جنتامایسین با پیتید ترکیبی ۱۰۰٪ حساسیت نشان داد. در رقت (۶/۲۵  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) به ۲ ترکیب تتراسایکلین و جنتامایسین با پیتید ترکیبی ۶۶/۷٪ حساسیت و به ترکیب تری متوپریم با پیتید ترکیبی ۳۳/۳٪ واکنش نیمه حساس نشان داد. در رقت (۳/۱۲  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) به هر سه ترکیب تتراسایکلین و جنتامایسین و تری متوپریم با پیتید ترکیبی ۱۰۰٪ واکنش نیمه حساس داشت و در رقت (۱/۵۶  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) واکنش نیمه حساس به ترکیب تری متوپریم و جنتامایسین با پیتید ترکیبی ۶۶/۷٪ مقاومت نشان داد و برای رقت های (۱۰۰، ۵۰، ۲۵  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) و ۱۲/۵ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۹ تا ۲۲ میلی متر حساسیت دارد و در رقت (۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۷ و ۱۵ میلی متر واکنش نیمه حساس داشت و در رقت (۰/۷۸  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) تا ۰/۱۹ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۰ تا ۵ میلی متر و بقیه رقت ها تا رقت (۰/۰۴  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) بدون هاله عدم رشد به آن مقاومت داشت. ترکیب جنتامایسین و پیتید ترکیبی در رقت های (۱۰۰  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) تا ۶/۲۵ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۶ تا ۱۵ میلی متر حساسیت داشت و در رقت های (۳/۱۲ و ۱۰۰  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۴ میلی متر واکنش نیمه حساس داشت و در رقت های (۱/۵۶  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) تا ۱۲/۵ تا ۱۲ میلی متر و بقیه رقت ها تا رقت (۰/۰۴  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) بدون ایجاد هاله عدم رشد، مقاومت داشت. ترکیب تری متوپریم و پیتید در رقت های (۱۰۰ و ۵۰  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۸ و ۱۷ میلی متر حساسیت نشان داد و در رقت های (۲۵  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) و ۳/۱۲ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۷ تا ۲ میلی متر و رقت (۰/۰۴  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) بدون

پیتید ترکیبی با تتراسایکلین بطور معنی داری تاثیر بیشتری در مقایسه با ترکیب با جنتامایسین و تری متوپریم داشت. جدایه بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*، در رقت (۱۰۰  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) به ۲ ترکیب تتراسایکلین و تری متوپریم با پیتید ترکیبی ۶۶/۷٪ حساسیت و به ترکیب جنتامایسین با پیتید ترکیبی ۳۳/۳٪ واکنش نیمه حساس نشان داد و در رقت (۵۰  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) به ۲ ترکیب تتراسایکلین و تری متوپریم با پیتید ترکیبی ۶۶/۷٪ حساسیت و به ترکیب جنتامایسین با پیتید ترکیبی ۳۳/۳٪ واکنش نیمه حساس نشان داد. در رقت (۱۲/۵ و ۲۵  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) به ۲ ترکیب ۶۶/۷٪ تتراسایکلین و جنتامایسین با پیتید ترکیبی حساسیت و به ترکیب تری متوپریم با پیتید ترکیبی ۳۳/۳٪ واکنش نیمه حساس داشت. در رقت (۶/۲۵ و ۳/۱۲  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) به ۲ ترکیب تتراسایکلین و جنتامایسین با پیتید ترکیبی ۶۶/۷٪ واکنش نیمه حساس و به ترکیب تری متوپریم با پیتید ترکیبی ۳۳/۳٪ مقاومت نشان داد. در رقت (۱/۵۶  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) به ترکیب تتراسایکلین ۳۳/۳٪ با پیتید ترکیبی واکنش نیمه حساس و به ترکیب جنتامایسین و تری متوپریم ۶۶/۷٪ با پیتید ترکیبی مقاومت نشان داد. اما در رقت های (۰/۷۸  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) تا ۰/۰۴ نسبت به ترکیبها مقاومت نشان داد.

نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد در ترکیب آنتی بیوتیک های مختلف با پیتید ترکیبی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استاندارد با ایجاد چاهک نشان داد که *استافیلوکوکوس اورئوس* در واکنش به ترکیب تتراسایکلین و پیتید ترکیبی در رقت (۱۰۰ و ۵۰ و ۲۵ و ۱۲/۵ و ۶/۲۵  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۹ تا ۲۲ میلی متر حساسیت داشت و در رقت (۳/۱۲ و ۱/۵۶  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۷ و ۱۵ میلی متر واکنش نیمه حساس و در رقت (۰/۷۸  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) تا ۰/۱۹ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۰ تا ۵ میلی متر و بقیه رقت ها تا رقت (۰/۰۴  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) بدون هاله عدم رشد به آن مقاومت نشان داد. ترکیب جنتامایسین و پیتید ترکیبی در رقت های (۵۰  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) تا ۶/۲۵ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۶ تا ۱۵ میلی متر حساسیت نشان داد و در رقت های (۳/۱۲ و ۱۰۰  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۴ میلی متر واکنش نیمه حساس داشت و در رقت های (۱/۵۶  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) تا ۱۲/۵ تا ۱۲ میلی متر و بقیه رقت ها تا رقت (۰/۰۴  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) بدون هاله عدم رشد به آن مقاومت نشان دادند. ترکیب تری متوپریم و پیتید ترکیبی در رقت های (۱۰۰  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) تا ۱۲/۵ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۸ تا ۱۶ میلی متر حساسیت نشان داد و در رقت های (۶/۲۵  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) و ۳/۱۲ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۱۱ و ۱۲ میلی متر واکنش نیمه حساس داشت و در رقت (۱/۵۶  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) تا ۰/۰۹ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۷ تا ۲ میلی متر و رقت (۰/۰۴  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) بدون

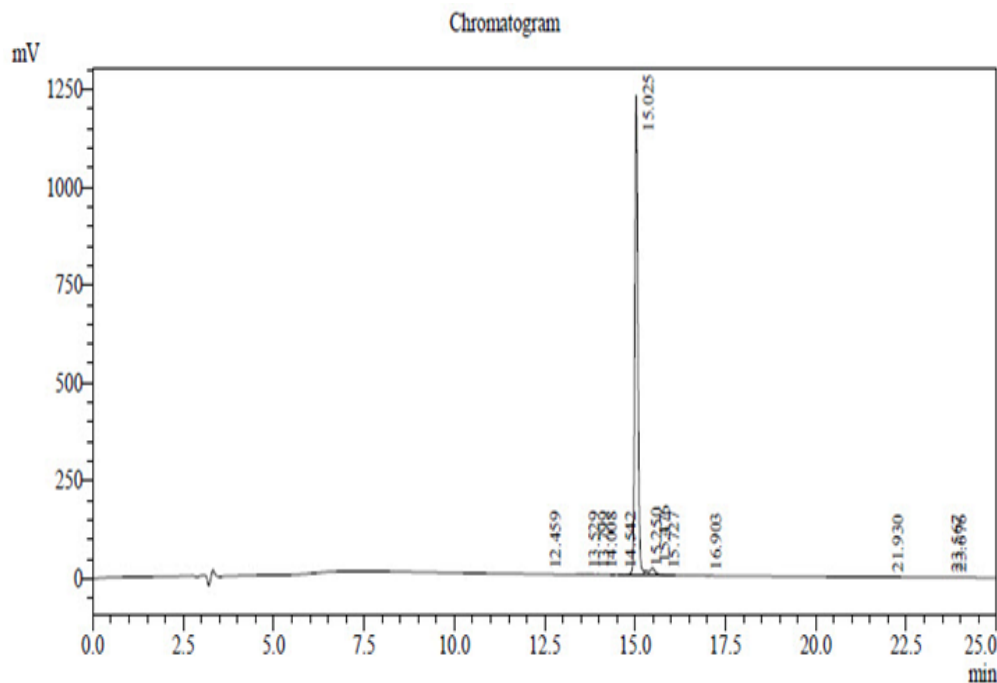
( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ۶/۲۵ به ۲ ترکیب تتراسایکلین و تری متوپریم با پپتید ترکیبی ۶۶/۷٪ واکنش نیمه حساس داشت و به ترکیب جنتامایسین با پپتید ترکیبی ۳۳/۳٪ حساسیت نشان داد. در رقت ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ۳/۱۲ به هر سه ترکیب تتراسایکلین و جنتامایسین و تری متوپریم با پپتید ترکیبی ۱۰۰٪ واکنش نیمه حساس نشان داد. همچنین در رقت ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ۱/۵۶ به ترکیب تتراسایکلین با پپتید ترکیبی ۳۳/۳٪ واکنش نیمه حساس داشت و به ترکیب تری متوپریم و جنتامایسین با پپتید ترکیبی ۶۶/۷٪ مقاومت نشان داد و برای رقت‌های ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ۰/۷۸ تا ۰/۰۴ به تمامی ترکیب‌ها ۱۰۰٪ مقاومت داشت.

( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ۱/۵۶ تا ۰/۰۹ با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۷ تا ۲ میلی‌متر و رقت ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ۰/۰۴ بدون هاله عدم رشد نسبت به آن مقاومت نشان داد (جدول ۵). در غلظت‌های ۱/۵۶، ۰/۷۸ و ۰/۰۹ ترکیب پپتید ترکیبی با تتراسایکلین و جنتامایسین بطور معنی‌داری اثر بیشتر از ترکیب با تری متوپریم بود.

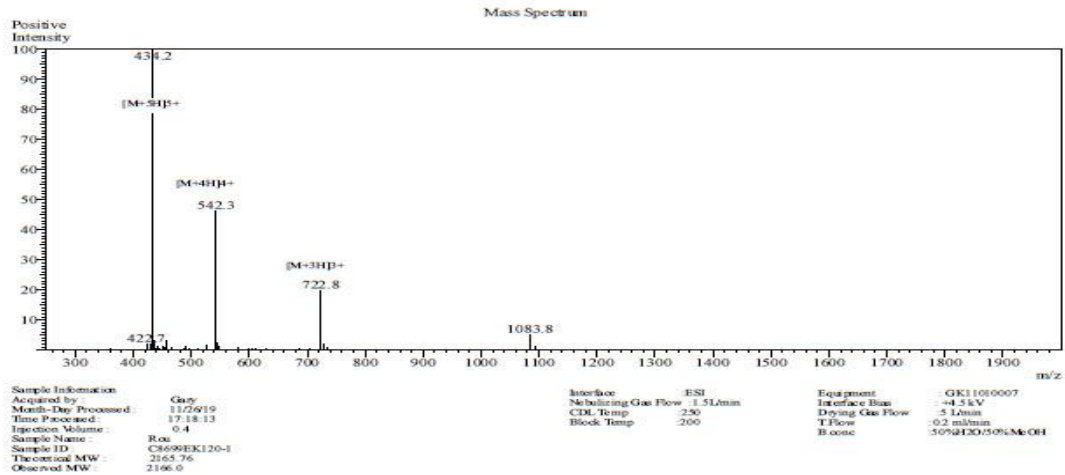
جدایه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* به چند دارو در رقت ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ۱۰۰ و ۵۰ به هر ۳ ترکیب تتراسایکلین و جنتامایسین و تری متوپریم با پپتید ترکیبی ۱۰۰٪ حساسیت نشان داد و در رقت ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ۲۵ و ۱۲/۵ به هر ۲ ترکیب تتراسایکلین و جنتامایسین با پپتید ترکیبی ۶۶/۷٪ حساسیت داشت و به ترکیب تری متوپریم با پپتید ترکیبی ۳۳/۳٪ واکنش نیمه حساس نشان داد. در رقت

جدول ۱: ویژگی‌های پپتیدهای والد و پپتیدهای ترکیبی

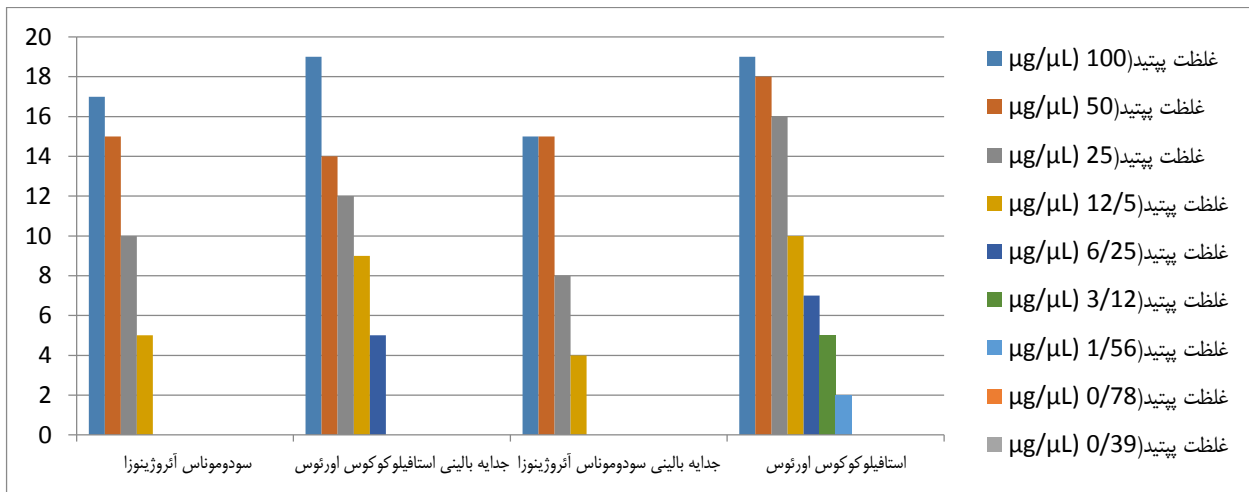
پپتید	توالی	فرمول	مجموع تعداد اتم‌ها
ملیتینین	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH2	C131H228N38O32	429
BMAP-27	GRFKRFRKKFKKLFKKLSPVIPLHL	C158H262N44O28	492
پپتید ترکیبی اولیه	GLPLLISWIKRKKLFKKLSP	C116H197N29O23	365
پپتید نهایی (ROU)	WGKVLIVIKHKLKFKLKS	C107H181N27O20	335



شکل ۱: نتایج کروماتوگرام.



شکل ۲: طیف سنجی جرمی



نمودار ۱: میانگین قطر هاله عدم رشدی های مختلف پیتید ترکیبی در باکتری‌ها با ایجاد چاهک (میلی متر)

جدول ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی متر) در ترکیب آنتی‌بیوتیک های مختلف با پیتید ترکیبی در باکتری سودوموناس آئروژینوزا استاندارد

p value	تری متوپریم+پیتید ترکیبی (v/v) ۱/۱	جنتامایسین+پیتید ترکیبی (v/v) ۱:۱	تتراسایکلین+پیتید ترکیبی ۱/۱(v/v)	concentration (µg/µL)
۰/۸۹۹	(S) ۱۷	(I) ۱۴	(I) ۱۳	۱۰۰
۰/۸۷۷	(S) ۱۶	(I) ۱۳	(S) ۲۰	۵۰
۰/۷۸۹	(I) ۱۵	(S) ۱۶	(S) ۲۲	۲۵
<۰/۰۰۱	(I) ۱۱	(S) ۱۵	(S) ۲۰	۱۲/۵
<۰/۰۰۱	(R) ۵	(S) ۱۵	(S) ۱۷	۶/۲۵
<۰/۰۰۱	(R) ۰	(I) ۱۳	(I) ۱۴	۳/۱۲
<۰/۰۰۱	(R) ۰	(R) ۱۰	(I) ۱۲	۱/۵۶
<۰/۰۰۱	(R) ۰	(R) ۵	(R) ۵	۰/۷۸
-	(R) ۰	(R) ۰	(R) ۰	۰/۳۹
-	(R) ۰	(R) ۰	(R) ۰	۰/۱۹
-	(R) ۰	(R) ۰	(R) ۰	۰/۰۹
-	(R) ۰	(R) ۰	(R) ۰	۰/۰۴

جدول ۳: نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد در ترکیب آنتی بیوتیک های مختلف با پیتید ترکیبی در باکتری *Sordomonas atrozinosa* بالینی با ایجاد چاهک (میلی متر)

p value	تری متوپریم+پیتید ترکیبی (v/v) ۱/۱	جنتامایسین+پیتید ترکیبی (v/v) ۱/۱	تتراسایکلین+پیتید ترکیبی ۱/۱ (v/v)	concentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
۰/۸۹۹	(S)۱۷	(I)۱۴	(S)۱۷	۱۰۰
۰/۷۷۸	(S)۱۶	(I)۱۳	(S)۱۸	۵۰
۰/۸۹۹	(I)۱۵	(S)۱۶	(S)۱۷	۲۵
۰/۷۷۷	(I)۱۱	(S)۱۵	(S)۱۷	۱۲/۵
۰/۰۲۲	(R)۵	(I)۱۳	(I)۱۴	۶/۲۵
<۰/۰۰۰۱	(R)۰	(I)۱۳	(I)۱۲	۳/۱۲
<۰/۰۰۰۱	(R)۰	(R)۱۰	(I)۱۲	۱/۵۶
<۰/۰۰۱	(R)۰	(R)۵	(R)۵	۰/۷۸
-	(R)۰	(R)۰	(R)۰	۰/۳۹
-	(R)۰	(R)۰	(R)۰	۰/۱۹
-	(R)۰	(R)۰	(R)۰	۰/۰۹
-	(R)۰	(R)۰	(R)۰	۰/۰۴

جدول ۴: نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد در ترکیب آنتی بیوتیک های مختلف با پیتید ترکیبی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استاندارد با ایجاد چاهک (میلی متر).

p value	تری متوپریم+پیتید (v/v) ۱/۱	جنتامایسین+پیتید (v/v) ۱/۱	تتراسایکلین+پیتید ۱/۱(v/v)	concentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
۰/۶۷۸	(S)۱۸	(I)۱۴	(S)۱۹	۱۰۰
۰/۶۸۸	(S)۱۷	(S)۱۵	(S)۲۰	۵۰
۰/۵۸۶	(S)۱۶	(S)۱۶	(S)۲۲	۲۵
۰/۶۶۷	(S)۱۶	(S)۱۵	(S)۲۰	۱۲/۵
۰/۴۳۷	(I)۱۲	(S)۱۵	(S)۲۰	۶/۲۵
۰/۳۳۴	(I)۱۱	(I)۱۴	(I)۱۷	۳/۱۲
<۰/۰۰۱	(R)۷	(R)۱۲	(I)۱۵	۱/۵۶
۰/۰۰۲	(R)۶	(R)۱۰	(R)۱۰	۰/۷۸
۰/۹۸۸	(R)۵	(R)۶	(R)۷	۰/۳۹
-	(R)۵	(R)۵	(R)۵	۰/۱۹
-	(R)۲	(R)۰	(R)۰	۰/۰۹
-	(R)۰	(R)۰	(R)۰	۰/۰۴

جدول ۵: نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد در ترکیب آنتی بیوتیک های مختلف با پیتید ترکیبی در جدایه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* با ایجاد چاهک (میلی متر).

p value	تری متوپریم+پیتید ۱/۱(v/v)	جنتامایسین+پیتید ۱/۱(v/v)	تتراسایکلین+پیتید ۱/۱(v/v)	concentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
۰/۹۸۸	(S)۱۸	(S)۱۵	(S)۱۹	۱۰۰
۰/۷۸۸	(S)۱۷	(S)۱۵	(S)۲۰	۵۰
۰/۷۹۹	(I)۱۶	(S)۱۶	(S)۲۲	۲۵
۰/۹۷۸	(I)۱۶	(S)۱۵	(S)۲۰	۱۲/۵
۰/۶۸۸	(I)۱۲	(S)۱۵	(I)۱۷	۶/۲۵
۰/۶۷۷	(I)۱۱	(I)۱۴	(I)۱۷	۳/۱۲
<۰/۰۰۱	(R)۷	(R)۱۲	(I)۱۵	۱/۵۶
<۰/۰۰۱	(R)۵	(R)۱۰	(R)۱۰	۰/۷۸
۰/۹۹۹	(R)۶	(R)۵	(R)۶	۰/۳۹
۰/۹۹۹	(R)۵	(R)۶	(R)۵	۰/۱۹
<۰/۰۰۰۱	(R)۲	(R)۰	(R)۰	۰/۰۹
-	(R)۰	(R)۰	(R)۰	۰/۰۴



**بحث:**

پپتیدهای ضد میکروبی برای درمان عفونت‌های باکتریایی و قارچی بسیار کارآمد هستند و دارای تعدد زیاد با ساختار و عملکردهای مختلف می‌باشند [۱۹].

طراحی یک پپتید ضد میکروبی با استفاده از روش‌های مبتنی بر کامپیوتر یکی از سریع‌ترین تکنیک‌ها در توسعه دارو محسوب می‌شود. در این مطالعه پپتید کاتیونی ترکیبی جدید با استفاده از دنباله‌های MELITININ و BMAP-27 با کمک نرم‌افزارهای زیست‌سنجی طراحی گردید که فعالیت ضد میکروبی افزایش یافته را در برابر سلول‌های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی نشان داد.

از آنجا که طول توالی و ماهیت اسید آمینه پپتیدها در قیمت تمام شده آنها موثر است، کاهش طول پپتید با حفظ عملکرد میکروبی آن یکی از مهمترین چالش‌ها می‌باشد. در این مطالعه، طول پپتید ترکیبی تا حد امکان کاهش داده شد به طوری که پپتید ترکیبی نهایی ۱۸ اسید آمینه داشت (جدول ۱) [۲۰]. با توجه به ماهیت کاتیونیک پپتیدها و داشتن بار مثبت با فسفولیپیدهای دارای بار منفی غشای میکروبی ها میان کنش می‌دهد و موجب برهم خوردن تمامیت غشا و از بین رفتن باکتری‌ها می‌گردد. وجود نواحی هیدروفوب در ساختار پپتید و آمفی پاتیک بودن آن نیز به نفوذ پپتید به ساختار درونی هیدروفوب میکروبی‌ها کمک می‌کند. در ساختار پپتید ترکیبی این مطالعه چندین آمینواسید بازی (لیزین) که در pH خنثی دارای بار خالص مثبت می‌باشند گنجانده شده که میان کنش با غشا و تخریب آن و در نهایت از بین رفتن میکروبی‌ها توسط این پپتید را توجیه می‌کند. همچنین با حفظ کل شارژ مثبت پپتید، سعی شده است که نیمه N ترمینال ناحیه هیدروفوب و نیمه C ترمینال ناحیه هیدروفیل پپتید باشد (جدول ۱) [۱۹].

نتایج آزمون آنتی بیوگرام نشان داد دو سویه استاندارد به هر سه آنتی بیوتیک حساس و سویه‌های بالینی به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و تتراسایکلین حساس می‌باشند، اما نسبت به آنتی بیوتیک تری متوپریم حساسیت نداشتند. صادری و همکاران در سال ۲۰۱۴ درصد مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس *Aeruginosa* نسبت به جنتامایسین و تتراسایکلین را به ترتیب ۴۴٪ و ۱۰۰٪ [۲۱]، فولادی و همکاران در ۲۰۱۰، ۸۶/۴٪ و ۲۵/۵٪ را اعلام کردند [۲۲]. بهار و همکاران در سال ۲۰۱۰ در تهران مقاومت به جنتامایسین را ۱۰۰٪ [۲۳]، صادقی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در اراک ۱۵/۷٪ [۲۴]، Gales AC و همکاران در سال ۲۰۰۲ در برزیل ۲۹/۷٪ [۲۵]، ساتی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در پاکستان ۸۳٪ [۲۶]، اوزرو همکاران در سال ۲۰۱۲ در ترکیه ۳۸٪ [۲۷]، ماهفود و همکاران در سال ۲۰۱۵ در سوریه ۷۳٪ [۲۸] گزارش کردند. همچنین شاهچراغی و همکاران در سال

۲۰۰۵ در تهران مقاومت به تتراسایکلین را ۲۳٪ [۲۹]، و انجم و همکاران در ۲۰۰۹ در پاکستان این مقاومت را ۹۹٪ اعلام کردند [۳۰].

برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* امیری و همکاران در سال ۲۰۱۷ در رشت مقاومت به جنتامایسین ۳۷٪ و مقاومت به تتراسایکلین را ۳۲٪ گزارش نمودند [۳۱] در حالی که مقاومت به جنتامایسین در مطالعه طبایی و همکاران در همین سال در مشهد ۲۴٪ گزارش گردید [۳۲]. نوربخش و همکاران در سال ۲۰۱۵ در اصفهان مقاومت به جنتامایسین ۷۶٪ به تتراسایکلین ۸۲٪ و به تری متوپریم را ۲۹٪ گزارش نمودند [۳۳]. مقاومت سویه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه از حدود ۲۰٪ تا ۱۰۰٪ در هر دو سویه بالینی متفاوت می‌باشد که احتمالاً ناشی از تفاوت در نحوه درمان و آنتی بیوتیک‌های تجویز شده موقعیت جغرافیایی فرهنگ کشورها و شهرها در میزان و روش استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و یا انتشار باکتری‌های مقاوم به درمان در یک ناحیه می‌باشد [۳۱].

حساسیت به پپتید ترکیبی در غلظت‌های مختلف بین سویه‌های استاندارد و بالینی هر کدام از گونه‌های باکتریایی نشان داد که تنها در رقت ۳/۱۲ اختلاف معنی‌داری در *استافیلوکوکوس اورئوس* استاندارد وجود داشت (نمودار ۱).

در مطالعه جوادی منش و همکاران در سال ۲۰۲۱ در مشهد بر روی پپتید کاتیونی تاناتین برای باکتری‌های گرم منفی حساسیت در رقت‌های ۲۵/۶ تا ۲۵  $\mu\text{g/mL}$  گزارش گردید [۳۴].

در مطالعه عربستانی و همکاران در سال ۲۰۱۶ در لرستان رقت حساسیتی برای عصاره متانولی و آبی گیاه بن سرخ (*Allium Jesdianum*) برای سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* و سویه مقاوم به دارو ۱۴ تا ۳۲ و برای سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* و سویه مقاوم به دارو ۱۴ تا ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش نمودند [۳۵]. پپتید ترکیبی BMAP-27 و LL-37 در مطالعه Tall و همکاران در سال ۲۰۱۹ در اردن حساسیت برای باکتری‌های گرم مثبت از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس*  $\mu\text{M}$  ۲۰ و برای *سودوموناس آئروژینوزا*  $\mu\text{M}$  ۱۰ گزارش گردید [۲۰]. پپتید ترکیبی LH28 و CL23 در مطالعه Tian و همکاران در سال ۲۰۰۹ در چین حساسیت  $\mu\text{M}$  ۳/۱۳ را برای هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش نمودند [۳۶].

در مطالعه Intorasoot و همکاران در سال ۲۰۱۸ در تایلند، حساسیت پپتید کاتیونی ترکیبی برای باکتری گرم مثبت ۶۶/۶ و برای باکتری گرم منفی ۴۱/۶ گزارش کردند [۳۷]. در مطالعه Yang و همکاران در سال ۲۰۱۹ در کره جنوبی حساسیت نسبت به پپتید BMAP-27 در مورد باکتری‌های گرم مثبت ۲-۱ و برای باکتری‌های گرم منفی  $\mu\text{M}$  ۴-۲ گزارش شد، به طوری که در

### نتیجه گیری:

درمان ترکیبی یا به اصطلاح مطالعات هم افزایی در طول کاربرد پپتیدها به شدت مورد توجه و مطالعه قرار دارند. اگر چه مقاومت باکتریایی در برابر این داروها به دلیل منحصر به فرد بودن مکانیسم عمل شان، هنوز ظهور نکرده‌اند، اما ممکن است در آینده نزدیک مقاومت ایجاد شود. از این رو به منظور جلوگیری از استفاده زیاد یا نادرست از این پپتیدها درمان ترکیبی راه حل مناسبی برای جلوگیری از احتمال بروز مقاومت، افزایش کارایی، کاهش دوز پپتید و در نهایت کاهش هزینه‌ها می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که پپتید هیبریدی متشکل از دوپپتید MELITININ+BMAP-27 بر سویه های بالینی و استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا تاثیر ضد باکتریایی دارد. ترکیب این پپتید با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند در کاهش عوارض جانبی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی موثر باشد. پژوهش‌های دقیق تری نیز در این زمینه مورد نیاز است.

### تشکر و قدردانی:

این مقاله از نتایج پایان نامه دکتری با کد اخلاق IR. IAU. M. REC. 1399. 052 استخراج گردیده که نویسندگان از حمایت‌های دانشگاه آزاد واحد مرودشت و همکاری دانشگاه علوم پزشکی جهرم و دانشگاه جامع امام حسین (ع)، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

### تعارض منافع:

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

غلظت  $2 \mu\text{M}$  بر روی تمام باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در مدت ۲۰ دقیقه موثر بود [۱۳]. در مطالعه Faccone و همکاران در ۲۰۱۳ حساسیت پپتید ترکیبی کاتیونی برای سودوموناس آئروژینوزا ۶۴ و برای استافیلوکوکوس اورئوس  $32 \text{ mg/L}$  گزارش شد [۳۸]. همچنین حساسیت پپتید ملیتینین در باکتری‌های گرم منفی  $0.3 \mu\text{M}$  تا  $1/2$  و در باکتری‌های گرم مثبت  $0.9 \mu\text{M}$  تا  $1/5$  بود [۳۹، ۴۰].

همچنین در ترکیب پپتید ترکیبی با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف برای سودوموناس آئروژینوزا استاندارد در رقت‌های  $12/5$  تا  $0.78$  و در جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا در رقت‌های  $3/12$  تا  $0.78$  حساسیت معنی داری داشت (جدول ۳ و ۲).

ترکیب آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با پپتید ترکیبی در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد حساسیت تنها در رقت  $1/56$  و در استافیلوکوکوس اورئوس بالینی در رقت‌های  $1/56$ ،  $0.78$  و  $0.9$  به طور معنی داری حساسیت نشان دادند (جدول ۴ و ۵). رقت‌های حساسیتی برای پپتید ترکیبی melittin- thanatin برای باکتری‌های گرم مثبت و منفی  $1/2-2/5$  میکرومول بر لیتر اندازه‌گیری شد [۳۹]. رقت حساسیتی برای پپتید ترکیبی LL-(B1)-37 BMAP-27 برای سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا استاندارد و بالینی به ترتیب ۲۰ و ۱۰ میکرومولار اندازه‌گیری شد که این مقادیر در هنگام ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به ترتیب به  $0.25-0.5$  و  $0.25-0.5$  میکرومولار کاهش یافت [۲۰].

## References:

- Kim MK, Kang HK, Ko SJ, Hong MJ, Bang JK, Seo CH, Park Y. Mechanisms driving the antibacterial and antibiofilm properties of Hp1404 and its analogue peptides against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep* 2018; 8(1): 1-16.
- Ekrami A, Kalantar E. Bacterial infections in burn patients at a burn hospital in Iran. *Indian J. Med. Res* 2007; 126(6): 541.
- Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front. Microbiol* 2014; 8(4):422.
- Farajzadeh Sheikh Ah, Ranjbar Y. Evaluation of antibiotic susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens of patients admitted to Ahvaz teaching hospitals against antibiotics of methicillin, vancomycin, linezolid and macrolides in 2013. *Jundishapur J. Health Sci.* 2013; 13 (4):74. (Persian)
- Wimley WC. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem. Biol.* 2010; 5(10): 905-917.
- Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2012; 32(2): 143-171.
- Nabiuni M, Parivar K, Divsalar A, Safayinejad Z, Nazari Z. A review on antineoplastic effects of honey bee venom. *Zahedan J Res Med Sci.* 2012; 13(9):1-7.
- Nabiuni M, Parivar K, Divsalar A, Safayinejad Z, Nazari Z. A review on antineoplastic effects of honey bee venom. *Zahedan J Res Med Sci.* 2012; 13(9): 1-7.
- Subbalakshmi C, Nagaraj R, Sitaram N. Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. *FEBS Lett.* 1999; 448(1):62-66.
- Lazarev VN, Shkarupeta MM, Vitova GA, Kostjukova ES, Akopian TA, Govorun VM. Effect of induced expression of an antimicrobial peptide melittin on *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*

- hominis infections in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 338(2): 946-950.
10. Yun SW, Bae GS, Kim MS, Park KC, Koo BS, Kim BJ, et al. Melittin inhibits cerulein-induced acute pancreatitis via inhibition of the JNK pathway. *Int. Immuno pharmacol.* 2011; 11(12): 2062-2072.
  11. Azad ZM, Moravej H, Fasihi-Ramandi M, Masjedan F, Nazari R, Mirnejad R, Moghaddam MM. In vitro synergistic effects of a short cationic peptide and clinically used antibiotics against drug-resistant isolates of *Brucella melitensis*. *J. Med. Microbiol.* 2017; 66(7): 919-926.
  12. Moghaddam MM, Barjini KA, Ramandi MF, Amani J. Investigation of the antibacterial activity of a short cationic peptide against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella typhimurium* strains and its cytotoxicity on eukaryotic cells. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2014; 30(5): 1533-1540.
  13. Yang S, Lee CW, Kim HJ, Jung HH, Kim JI, Shin SY, Shin SH. Structural analysis and mode of action of BMAP-27, a cathelicidin-derived antimicrobial peptide. *Peptides.* 2019; 118: 170106.
  14. Ho Wong J, Juan Ye X, Bun Ng T. Cathelicidins: peptides with antimicrobial, immunomodulatory, anti-inflammatory, angiogenic, anticancer and pro-cancer activities. *Curr. Protein Pept.Sci.* 2013; 14(6): 504-514.
  15. Sahoo BR, Maruyama K, Edula JR, Tougan T, Lin Y, Lee YH, Horii T, Fujiwara T. Mechanistic and structural basis of bioengineered bovine Cathelicidin-5 with optimized therapeutic activity. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 1-16.
  16. Benincasa M, Skerlavaj B, Gennaro R, Pellegrini A, Zanetti M. In vitro and in vivo antimicrobial activity of two  $\alpha$ -helical cathelicidin peptides and of their synthetic analogs. *Peptides.* 2003; 24(11): 1723-1731.
  17. Birla SS, Tiwari VV, Gade AK, Ingle AP, Yadav AP, Rai MK. Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009; 48(2): 173-179.
  18. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 2008; 3(2): 163-175.
  19. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front. cell infect. microbiol.* 2016; 6: 194.
  20. Al Tall Y, Abualhajja A, Alsaggar M, Almaaytah A, Masadeh M, Alzoubi KH. Design and characterization of a new hybrid peptide from LL-37 and BMAP-27. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12: 1035.
  21. Oliya P, Sadri H. Evaluation of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in Tehran hospitals in 2013. *Shahed Uni J.* 2013; 23 (121): 37-29 (persian)
  22. Foladi A, Shapoori R. Antibiotic resistance and abundance of broad-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimens. *JAUMS.* 2010; 10 (3): 189-98.(persian)
  23. Bahar MA, Jamali S, Samadikuchaksaraei A. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains carry metallo- $\beta$ -lactamase gene blaVIM in a level Iranian burn hospital. *Burns.* 2010; 36(6): 826-830.
  24. Sadeghi A, Rahimi B, Shojapour M. Molecular detection of metallo-lactamase genes blaVIM-1, blaVIM-2, blaIMP-1, blaIMP-2 and blaSPM-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in Markazi province by Duplex-PCR. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2012; 6(12): 2965-2969.
  25. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52(4): 699-702.
  26. Satti L, Abbasi S, Kumar TA, Khan MS, Hashmi ZA. In vitro efficacy of Cefepime against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*—an alarming situation in our setup. *Drug Resistance J.* 2011; 1(1).
  27. Ozer B, Duran N, Onlen Y, Savas L. Efflux pump genes and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit. *Antibiotics.* 2012; 65(1): 9-13.
  28. Mahfoud M, Al Najjar M, Hamzeh AR. Multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from nosocomial respiratory and urinary infections in Aleppo, Syria. *JIDC.* 2015; 9(02): 210-213.
  29. Shahcheraghi F, Nik Bin V. Metallobeta lactamase enzyme and detection the resistance to ceftazidime and imipenem antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens in hospital of Imam khomeini and pediatrics medical center in 2005. *IJIDTM.* 2007; 12 (36): 19-22.
  30. Anjum F, Mir A. Susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* against various antibiotics. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2010; 4(10): 1005-1012.
  31. Amiri E, Anvari M. Evaluation of drug resistance of *Staphylococcus aureus* strains resistant to the antibiotic vancomycin in some hospitals in Rasht. *J. Med. Sci.* 2018; 28 (1): 74-80. (Persian)
  32. Tabaei S, AmelJamedar S. Pattern of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical specimens: Imam Reza (AS) Hospital. *mjms.* 2016; 59 (2): 64-70. (Persian)
  33. Nourbakhsh F, Momtase H. Detection of antibiotic resistance patterns in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients admitted to Isfahan hospitals during 2014-2015. *Feyz.* 2015; 19 (4): 356-363. (Persian)
  34. Javadmanesh M, Tanhayan A. Comparison of antibacterial effects of tanatine peptide with two essential oils of cinnamon and oregano on isolates of pathogenic bacteria. *VJ.* 2020; 33 (1): 47-53. (Persian)
  35. Gholami A, Ahmadi M. Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanol extracts of *Allium Jeddianum* plant on a number of pathogenic bacteria resistant to antibiotics. *psj.* 2016; 14 (4): 18-26. (Persian)
  36. Tian ZG, Dong TT, Teng D, Yang YL, Wang JH. Design and characterization of novel hybrid peptides from LFB15 (W4, 10), HP (2-20), and cecropin A based on structure parameters by computer-aided method. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 82(6): 1097-1103.
  37. Wanmakok M, Orrapin S, Intorasoot A, Intorasoot S. Expression in *Escherichia coli* of novel recombinant hybrid antimicrobial peptide AL32-P113 with

- enhanced antimicrobial activity in vitro. *Gene*. 2018; 671: 1-9.
38. Faccone D, Veliz O, Corso A, Noguera M, Martínez M, Payes C, et al. Antimicrobial activity of de novo designed cationic peptides against multi-resistant clinical isolates. *Eur. J. Med. Chem.* 2014; 71: 31-35.
39. Jiang X, Qian K, Liu G, Sun L, Zhou G, Li J, Fang X, Ge H, Lv Z. Design and activity study of a melittin–thanatin hybrid peptide. *AMB Express*. 2019; 9(1): 1-6.
40. Wu R, Wang Q, Zheng Z, Zhao L, Shang Y, Wei X, et al. Design, characterization and expression of a novel hybrid peptides melittin (1–13)-LL37 (17–30). *Mol. Biol. Rep.* 2014; 41(7): 4163-4169.

## Antibacterial performance of MELITININ - BMAP27 hybrid peptide against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains

Rehane Rouhi Jahormi<sup>1</sup>, Mohammad Kargar<sup>2\*</sup>, Farzan Modaresi<sup>3</sup>, Shahram Nazarian<sup>4</sup>  
Mojtaba Jafarinia<sup>5</sup>

Received: 2021.12.06

Revised: 2022.03.28

Accepted: 2022.04.27

1. Ph.D. student, Department of Biology, Marvdasht Islamic Azad University, Marvdasht, Iran
2. Ph.D, Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Jahrom Islamic Azad University, Jahrom, Iran
3. Assistant Professor, Department of Microbiology, Jahrom University of Medical Sciences, Iran
4. Associate Professor of Microbiology, Department of Biology, Imam Hossein University, Iran.
5. Assistant Professor, Department of Biology, Marvdasht Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.1, Spring 2022

Pars J Med Sci 2022; 20(1):50-62

### Abstract:

#### Introduction:

Multiple drug-resistant (MDR) bacterial strains have spread in different parts of hospitals. The aim of this study was to design and synthesize an effective hybrid peptide by combining different parts of two peptides to achieve the highest antibacterial activity and its inhibitory effect against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains.

#### Materials and Methods:

From two antimicrobial peptides MELITININ + BMAP27, a hybrid peptide of the both peptides was considered and synthesized. The antibacterial effect of this peptide on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains was determined.

#### Results:

*P. aeruginosa* exhibited a growth inhibition zone with a diameter of 15 mm and *S. aureus* by creating a growth inhibition zone of 16 mm in diameter. Further, at 0.5% peptide concentration, *P. aeruginosa* exhibited a growth inhibition zone with a diameter of 19 mm and *S. aureus* outlined a growth inhibition zone with a diameter of 20 mm against peptide. Clinical strains from both bacterial species demonstrated higher resistance rates to antibiotics and peptides. In some concentrations, the combination of peptides and antibiotics increased the susceptibility of bacterial species but was not significant in all concentrations.

#### Conclusion:

A hybrid peptide consisting of two peptides, melitinin and BMAP-27, has antibacterial effect on clinical and standard strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The combination of this peptide with antibiotics can be effective in reducing side effects and antibiotic resistance.

**Keywords:** Hybrid Peptide, Melitinin, BMAP-27, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*, Antibacterial Effect

\* Corresponding author Email: mkargar@jia.ac.ir