DOI: 10.22092/vj.2019.124816.1547
شماره ۱۲۶ بهار ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مقایسه‌ی اثرات ضد باکتریایی پپتید تاناتین با دو اسانس دارچین و پونه کوهی بر روی ایزوله‌های باکتری‌های بیماری‌زای دامی

• **علی جوادمنش (نویسنده مسئول)**
عضو هیأت علمی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد
• **زهرا موسوی**
دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
• **عباس تنهاییان**
عضو هیأت علمی گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود
• **مرجان ازغندی**
دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
تاریخ دریافت: ۲۰-۱۰-۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۳۱-۰۱-۱۳۹۸
Email: javadmanesh@um.ac.ir

چکیده

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های حیوانی رو به افزایش است که منجر به ایجاد عوارض جانبی نامطلوب نظیر مقاومت دارویی و نیز باقی‌ماندن آنتی‌بیوتیک در محصولات غذایی می‌شود. بنابراین، محققان به دنبال جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک با ترکیبات طبیعی و عوارض جانبی کمتر هستند. که از جمله این ترکیبات می‌توان به اسانس‌های گیاهی و پپتیدهای ضد میکروبی اشاره کرد. حداقل غلظت مهارکنندگی *(MIC)* بر اساس روش میکروبراث به وسیله‌ی پلیت ۹۶ خانه با چهار تکرار با استفاده از اسانس پونه‌ی کوهی، اسانس دارچین و نیز پپتید ضد میکروبی تاناتین برای باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موریوم *(Salmonella typhimurium)*، سالمونلا اینتریدیس *(Salmonella enteritidis)*، اشرشیاکلای *(Escherichia coli)* و اشرشیاکلای۰۱۵۷ (*E. coli*۰۱۵۷) صورت گرفت. بعد از اندازه‌گیری *MIC*، باکتری‌ها کشت داده شدند و حداقل غلظت کشندگی باکتری *(MBC)* سنجیده شد. نتایج آزمایش نشان داد کمترین مقدار *MIC* مربوط به پپتید تاناتین بر روی باکتری سالمونلا انتریدیس و برابر با ۶ µg/ml بود. علاوه بر این، کمترین مقدار *MBC* مربوط به پپتید تاناتین بر روی باکتری‌های اشرشیاکلای ۰۱۵۷ و سالمونلا انتریدیس به میزان ۲۵ µg/ml مشاهده شد. تاناتین یک پپتید ضدمیکروبی کاتیونی است که توجه زیادی را در رابطه با مهار رشد طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌های گرم منفی، گرم مثبت و همچنین قارچ‌ها به خود جلب کرده است. این مطالعه نشان داد که پپتید تاناتین در غلظت کمتری نسبت به اسانس پونه کوهی و اسانس دارچین فعالیت ضد باکتریایی بود. جایگزینی پپتیدهای ضد میکروبی نظیر تاناتین با آنتی‌بیوتیک‌های رایج ممکن است به پیشرفت بزرگی در مبارزه با پاتوژن‌ها در صنعت پرورش دام منجر شود.

کلمات کلیدی: عفونت باکتریایی، پپتیدهای ضد میکروبی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک، اسانس

Veterinary Researches & Biological Products No 126 pp: 47-53

Comparison of antimicrobial activity of thanatin peptide with cinnamon and oregano essential oils on some pathogenic bacteria

By:Javadmanesh, A., (Corresponding Author) Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Mousavi, Z., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Tanhaiean, A., Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran. and Azghandi, M., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Received: 2019-01-10 Accepted: 2019-04-20

Email: javadmanesh@um.ac.ir

Unfortunately, using common antibiotics to treat animal infection is increasing in which leads to undesirable side effects such as antibiotic residuals in animal products and occurrence bacterial resistance to antibiotics. Therefore, researchers are searching for an alternative to traditional antibiotics with fewer side effects like herbal essential oils and antimicrobial peptides (AMPs) such as oregano and cinnamon essential oils as well as recombinant thanatin peptide. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) was used based on a microbroth dilution method by 96-well microtiter with four replicates with oregano and cinnamon essential oils as well as thanatin peptide. After MIC, bacteria species were cultured and minimum bactericidal concentration (MBC) was determined as that showing no growth. The results of MIC assay showed a strong activity against Salmonella enteritidis bacteria with the value of MIC equal to 6 µg/ml by thanatin. Moreover, the lowest amount of MBC was observed on *E. coli*0157 and Salmonella enteritidis approximately 25 µg/ml. Thanatin is one of the member of cationic AMPs that have received a great attention regarding growth inhibitory against wide range of microorganisms including Gram-negative and Gram-positive bacteria, as well as several fungi species. Thanatin showed a strong growth inhibitory against bacteria in compare with oregano and cinnamon essential oils. Thus, developing new antibiotics such as thanatin would be a great replacement for common antibiotics and may lead to a great progress in eliminating livestock pathogens.

Key words: Bacterial infection, Antimicrobial peptides, Antibiotic resistant, Essential oil

مقدمه

در چند دهه اخیر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت دامپروری به منظور پیشگیری و درمان بیماری‌ها و همچنین محرک رشد مورد استقبال قرار گرفته است. فدراسیون سلامت حیوانات اتحادیه اروپا اعلام کرد که بخش عظیمی از تمام آنتی‌بیوتیک‌های تجویز شده در اتحادیه اروپا برای حیوانات مزرعه مصرف شده است. اگرچه آنتی بیوتیک‌ها اثرات مفیدی بر عملکرد و سلامت حیوانات دارند، اما استفاده مداوم از آن‌ها منجر به ایجاد مشکلات زیادی در ارتباط با سلامت حیوانات و انسان می‌شود. یکی از این مشکلات انتقال میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است که علاوه بر زیان‌های اقتصادی، موجب ایجاد مشکلاتی در بخش درمان شده است و می‌توانند منبعی برای ژن مقاومت باشد و در نهایت ممکن است سلامت انسان را نیز به خطر بیاندازد (۱۸). امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها به یکی از مشکلات عمده در بخش درمان بیماری‌ها تبدیل شده است که نیاز به یک جایگزین مناسب را حیاتی کرده است. همچنین محققین به دنبال یافتن ترکیباتی بجای آنتی‌بیوتیک ها بوده که اثرات جانبی و همچنین ایجاد مقاومت کمتری داشته باشند (۲۳) که در این میان اسانس‌های گیاهی و اخیرا پپتیدهای ضدمیکروبی اهمیت ویژه-ای دارند. اسانس‌های گیاهی، متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌باشند که به‌عنوان افزودنی در خوراک به منظور بهبود بازده و مبارزه با عوامل بیماری‌زا مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ترکیبات شامل دامنه‌ی وسیعی از مواد مانند الکل، استر و یا مشتقات آلدهیدی ترپنوئیدها و فنیل پروپانوئیدها می‌باشند (۴، ۱۱). فعالیت اسانس‌های گیاهی بر علیه باکتری‌ها، پروتوزوآ و قارچ‌ها به اثبات رسیده است، اما طرز عملکرد آن‌ها دقیقا روشن نیست. فرضیات متعددی ارائه شده‌اند تا فعالیت‌های ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی را توصیف نمایند. اما از آنجائی که اسانس‌های گیاهی ترکیبات بسیاری را در بر می‌گیرند، این احتمال وجود دارد که شیوه‌های عمل متعددی برای فعالیت ضدمیکروبی از خود بروز دهند (۱۱). اسانس پونه‌ی کوهی و دارچین به‌عنوان ترکیبات با خواص ضدباکتریایی شناخته

شده‌اند. اجزای اصلی اسانس پونه‌ی کوهی شامل ۲۰ جز است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به کارواکرول و تیمول (ترکیبات فنولی) اشاره کرد که دارای خواصی از جمله فعالیت‌های ضد قارچی (۱)، ضدباکتریایی (۴) و آنتی‌اکسیدانی (۶) می‌باشند. قسمت اعظم اسانس دارچین از سینامالدئید (آلدهید) تشکیل شده است. اسانس دارچین علاوه بر خواص ضدانگلی، طیف وسیعی از فعالیت ضد باکتریایی را در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی از خود نشان داده است (۱۶).

پپتیدهای ضدمیکروبی (AMP) در سال ۱۹۳۹ کشف شدند که به عنوان یک پیشنهاد مناسب به جای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی هستند. این پپتیدها یکی از گروه‌های عمده ترکیبات طبیعی هستند که حاوی ۱۲ تا ۱۰۰ آمینواسید بوده که از طیف وسیعی از جانوران زنده مانند میکروارگانیسم‌ها، حشرات، بی‌مهرگان، گیاهان، دوزیستان، پرندگان، ماهی‌ها و سایر پستانداران استخراج می‌شوند (۱۵). امروزه AMP ها به علت دارا بودن خواص متنوع بیولوژیکی در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از ویروس تا انگل، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. پپتیدهای ضدمیکروبی در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها متفاوت است. پپتیدهای ضدمیکروبی در یوکاریوت‌ها به دو دسته‌ی عمده تقسیم‌بندی می‌شوند: ۱- پپتیدهای کاتیونی که شامل سکروپین، دفنسین، تیونین، ترکیبات مشتق شده از هیستون، مارپیچ بتا و سایر ساختارهای طبیعی و فعال پروتئینی هستند. ۲- پپتیدهای آنیونی که شامل نوروپپتید، دی پپتیدهای آروماتیک و پروتئین‌های باند شده به اکسیژن هستند (۲۳).

تاناتین یکی از پپتیدهای کوچک خانواده مارپیچ بتا (پپتیدهای کاتیونی) بوده که دارای بار مثبت، غیر همولیتیک و آمفی‌پاتیک بوده که برای اولین‌بار از حشره‌ی *Podisus maculiventris* بعد از تحریک سیستم ایمنی استخراج شد. این پپتید جز اولین خط دفاعی بدن حشره است که فعالیت گسترده‌ای را در برابر پاتوژن‌های مختلف از جمله باکتری‌های گرم مثبت و منفی و همچنین قارچ‌ها نشان داده است (۱۴، ۲۲، ۷).

در این مطالعه فعالیت ضد باکتری پپتید نوترکیب تاناتین، اسانس پونه‌ی کوهی و دارچین در برابر برخی از باکتری‌های بیماریزای دامی مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های مورد مطالعه

باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موریوم (*Salmonella typhimurium*)، سالمونلا اینتریدیس (*Salmonella enteritidis*)، اشرشیاکلای (*Escherichia coli*) و اشرشیاکلای ۰۱۵۷ (*E. coli*۰۱۵۷) از دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد (مشهد، ایران) تهیه شد و برای بررسی اثرات ضدباکتریایی مورد استفاده قرار گرفتند.

کلون و بیان پپتید تاناتین و ارزیابی آن با *SDS-PAGE*

توالی مربوط به ژن تاناتین به منظور بهینه‌سازی کدون‌ها برای بیان مناسب در سلول‌های جنینی کلیه و سنتز شیمیایی آن با استفاده از پایگاه داده‌ی GenScript به دست آمد. توالی سنتزشده شامل نواحی Igk می‌باشد. این توالی، باعث انتقال پپتید به شبکه‌ی آندوپلاسمی رتیکولوم (ER) و بهبود در ترشح آن به بیرون از سلول می‌شود. وکتور pGH به همراه قطعه‌ی تاناتین به صورت مصنوعی سفارش داده شد (دنازیست، ایران). در ابتدا وکتور pGH و pcDNA۳/۱+ به وسیله‌ی آنزیم محدودکننده‌ی *Hind*III برش داده شدند (ترمو، آمریکا). محصولات ایجاد شده به‌وسیله‌ی کیت استخراج از ژل (ترمو، آمریکا) تخلیص شدند و سپس تحت آنزیم محدودکننده‌ی *Bam*HI به مدت پنج ساعت قرار گرفتند (ترمو، آمریکا). مجددا استخراج از ژل صورت گرفت و عمل الحاق قطعه‌ی تاناتین در پلاسمید pcDNA۳/۱+ توسط کیت (ترمو، آمریکا) انجام گردید. ۱۰ میکرولیتر از محصول الحاق شده به باکتری DH۵α منتقل شد (اینویتروژن، آمریکا) سپس باکتری DH۵α بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. تنها DH۵αهایی که پلاسمید حاوی قطعه‌ی تاناتین باشند می‌توانند بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک رشد کنند. کلنی‌های ایجاد شده حاوی pcDNA۳/۱+- تاناتین انتخاب و مجدد کشت داده شدند. کلنی PCR به‌منظور بررسی ترانسفورم با استفاده از پرایمرهای یونیورسال پلاسمید pcDNA۳/۱+ انجام شد. سپس استخراج پلاسمید از کلنی مورد نظر توسط کیت استخراج پلاسمیدهای پرو (HiPure) (رُش، آلمان) صورت گرفت. صحت توالی مورد نظر از طریق توالی‌یابی مورد بررسی قرار گرفت.

سلول‌های جنینی کلیه انسان (HEK293™ (ATCC® CRL-1573 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و در محیط کشت Dul-becco's modified Eagle's (DMEM/F12 حاوی 10 درصد سرم جنین گاو (FBS)، ۱ درصد آمفوتریسین بی (اینویتروژن، آمریکا) نگهداری شدند. برای ترنسفکشن، از روش فسفات کلسیم در محیط کشت DMEM/F۱۲ به همراه ۱۰ درصد FBS استفاده شد. وکتور نوترکیب (pcDNA۳/۱+- تاناتین) و همچنین pcDNA۳/۱+ (فاقد تاناتین، به عنوان شاهد منفی) در ظرف جداگانه انتقال یافتند و تحت ۴۰۰ mg/mL آنتی بیوتیک جنتیسین(سیگما-آلدریچ، آلمان) به مدت دو هفته قرار گرفتند. پس از تیمار با آنتی‌بیوتیک، محلول رویی سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب pcDNA۳/۱ + که حاوی سیگنال پپتید بود جمع‌آوری شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به منظور انجام SDS-PAGE برای مشاهده‌ی پپتید بیان شده و همچنین بررسی میزان غلظت آن نگهداری گردید. ۳۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی پپتید تاناتین و فاقد آن با استفاده از بافر Tris/glycine/SDS در ژل ۱۶ درصد آکریل آمید ران شد. سپس ژل با استفاده از کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد و باند مربوط مشاهده گردید. میزان تقریبی غلظت پپتید از طریق نرم‌افزار GelQuant نسخه ۱,۸,۹ (www.biochemlabsolutions.com) تخمین زده شد.

فرآیند اسانس‌گیری از گیاه دارچین و پونه‌ی کوهی

دارچین و پونه‌ی کوهی از رویشگاه‌های طبیعی برداشت و سپس در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه، شستشوی سطحی بافت‌های گیاهی توسط آب مقطر استریل انجام شد و گیاهان در شرایط استاندارد (دمای اتاق و سایه) خشک شدند. ابتدا ۱۰۰ گرم از بافت گیاهی خرد و سپس توسط دستگاه کلیونجر (شات، آلمان) از طریق فرآیند تقطیر به مدت شش ساعت استخراج انجام گردید. اسانس به دست‌آمده به‌وسیله سولفات سدیم آب‌گیری و در شیشه‌های تیره استریل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

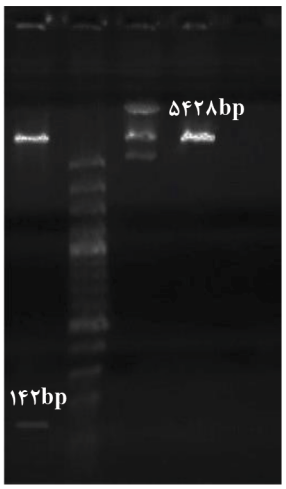
بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی باکتری

در این مطالعه از حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) به روش میکروبراث دایلوشن و با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه با چهار تکرار استفاده شد. باکتری‌ها یک شبانه روز در محیط آگار نوترینت حدود CFU mL-۱ ۱×۱۰^{۶} کشت داده شدند، سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن‌ها به خانه‌های پلیت افزوده شد. ۱۰ رقت مختلف از پپتید تاناتین، اسانس دارچین و پونه‌ی کوهی تهیه شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به چاهک‌های مربوطه اضافه گردید. میکروپلیت طی ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوباتور شد. کمترین غلظت که باعث از بین رفتن تمام باکتری شد، به‌عنوان MIC برای جدایه‌های باکتری‌های مختلف اعلام گردید. برای اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از چاهک‌های فاقد کدورت ارزیابی حداقل بازدارندگی، مقدار ۱۰ میکرولیتر در شرایط استریل برداشته شد و بر روی محیط آگار نوترینت کشت داده شد. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، کمترین رقتی که توانسته ۹۹/۹ درصد از باکتری‌ها را بکشد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. کلیه مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین ارائه گردید.

نتایج

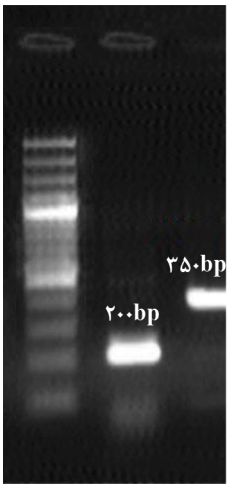
کلون و بیان پپتید تاناتین

نتایج مربوط به هضم آنزیمی (شکل ۱) و کلنی PCR (شکل ۲) نشان داد که عملیات کلون موفقیت آمیز بوده است و انتقال وکتور در باکتری DH۵α به درستی صورت گرفته است. همچنین بررسی توالی‌یابی نشان داد که قطعه‌ی تاناتین درون وکتور pcDNA۳/۱+ بدون جهش به درستی قرار گرفته است. بیان پپتید تاناتین در سلول‌های جنینی کلیه به وسیله‌ی



شکل۱- هضم آنزیمی با دو آنزیم *Bam*HI و *Hind*III

۱: قطعه ی تاناتین به همراه لیدر. ۲: مارکز ۱۰۰ جفت بازی. ۳: pcDNA۳,۱+ ۴: pcDNA۳,۱+

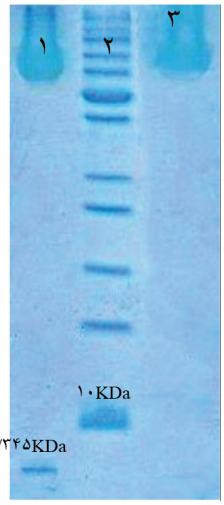


شکل۲- نتایج مربوط به کلنی PCR

۱- مارکر۱۰۰ جفت بازی. ۲: تکثیر pcDNA۳,۱+ فاقد توالی تاناتین. ۲: تکثیر pcDNA۳,۱+ حاوی توالی تاناتین .

ژل SDS-PAGE بررسی شد که نشان از ترشح قطعه‌ی تاناتین در محیط کشت بود. نتایج مربوط به آنالیز باند این پپتید نشان داد که میزان غلظت تقریبی تاناتین۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد (شکل ۳).

آزمون حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی



شکل ۳- تجزیه و تحلیل پپتید تاناتین توسط SDS-PAGE

۱- پپتید تاناتین با وزن مولکولی KDa ۲/۳۴۵ ۲: مارکر پروتئین با وزن مولکولی KDa ۲۵۰-۱۰ خط

۳: گروه شاهد (محیط کشت فاقد پپتید تاناتین)

در این مطالعه بررسی فعالیت ضدباکتریایی پپتید تاناتین، اسانس دارچین و پونه‌ی کوهی از طریق آزمون حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی در جدول ۱ نشان داده شده است. کمترین مقدار حداقل غلظت بازدارندگی مربوط به پپتید تاناتین بر روی سالمونلا اینتریدیس (۶/۲۵ µg/mL) و بیشترین میزان مربوط به اسانس دارچین بر روی باکتری‌های اشرشیاکلای و سالمونلا تیفی‌موریوم (۲۵۰ µg/mL) گزارش شد. همچنین کمترین مقدار برای حداقل غلظت کشندگی مربوط به پپتید تاناتین بر روی باکتری‌های اشرشیاکلای ۰۱۵۷ و سالمونلا اینتریدیس (۲۵ µg/mL) و بیشترین میزان مربوط اشرشیاکلای و سالمونلا تیفی‌موریوم (۵۰۰ µg/mL) می‌باشد.

بحث

چندین فرضیه جهت توصیف ویژگی‌های ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی بیان شده است. فرضیه‌ای که بیش از همه مورد پذیرش قرار گرفته است اثر متقابل اسانس‌های گیاهی با غشای سلول‌های باکتریایی است. بسیاری از اسانس‌های گیاهی دارای ماهیت آبگریز و آبدوست هستند و قادرند با غشای سلول‌های لیپیدی وارد واکنش شده، با زنجیره‌های اسید چرب موجود در غشاءها آمیخته شوند و در غشای دو لایه لیپیدی سلول‌های باکتریایی تجمع یابند (۴) که منجر به ایجاد تغییرات ساختاری در غشای سلولی شده و موجب افزایش بی‌ثباتی و سیالیت غشاء می‌گردد. بنابراین نشت یونی اتفاق می‌افتد و باکتری در اثر استفاده‌ی بیش از اندازه از پمپ‌های یونی و اتلاف انرژی از بین می‌رود (۴، ۹). هر چند اسانس‌های گیاهی قادرند ویژگی‌های ضد میکروبی خود را روی هر دو نوع باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت اعمال کنند (۲)، اما این مکانیسم در برابر باکتری‌های گرم مثبت به علت عدم وجود لایه‌های خارجی آبدوست نسبت به باکتری‌های گرم منفی موثرتر است (۴). مکانیسم اسانس‌ها در برابر باکتری-های گرم منفی از طریق عبور از دیواره‌ی سلولی محافظ به علت وزن مولکولی کم است. این ترکیبات می‌توانند از طریق لایه لیپو-پلی‌ساکاریدی خارجی یا از طریق پروتئین‌های دیواره سلولی عبور کنند و به غشاء دو لایه لیپیدی داخلی برسند (۴، ۹). همچنین اسانس‌های گیاهی در فعل و انفعالات دیواره‌ی سلولی از جمله نقل و انتقال پروتئین و الکترون، فسفوریلاسیون، و برخی از واکنش‌های وابسته به آنزیم متصل به غشاء دخالت می‌کنند (۲). از معایب استفاده از اسانس‌ها می‌توان به اکسیده شدن آن‌ها به راحتی توسط نور، گرما و هوا اشاره کرد (۲۱)، که این امر موجب محدود شدن دامنه‌ی استفاده از آن‌ها می‌شود.

پپتیدهای ضدمیکروبی که به عنوان جزء مهمی از سیستم دفاعی محسوب می‌شوند، تقریبا توسط همه گونه‌های موجودات تولید شده و شامل طیف وسیعی از فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی و ضدباکتریایی قوی می‌باشد. متاسفانه، استفاده از پپتیدهای ضدمیکروبی با فعالیت ضدباکتریایی بسیار قوی به علت ایجاد سمیت در فرآیند تولید دارو، با محدودیت روبه‌رو شده است (۱۰). مکانیسم عمل برخی از پپتیدها از طریق تعامل با غشاء است که منجر به فعالیت همولیتیکی و سمیت سلولی خواهد شد. بنابراین، قدرت انتخابی پایین یا سمیت بالا، عامل اصلی محدود شدن استفاده از پپتیدهای ضدمیکروبی است (۱۵). مطالعات نشان داده‌اند که پپتید تاناتین، پتانسیل ضدباکتری قوی در برابر باکتری‌ها بدون ایجاد مسمومیت همولایتیک و پایداری مناسبی در پلاسما دارد (۷). توالی آمینواسیدی و ساختار فضائی پپتیدهای کاتیونی موجب ایجاد خواص ضد میکروبی در آن‌ها شده است. اگرچه فعالیت ضد باکتریایی تاناتین هنوز به طور کامل مشخص نشده است اما برخی از مطالعات نشان داده‌اند پپتید تاناتین از طریق اتصال به لیپوپلی‌ساکارید یا پپتیدوگلیکان دیواره‌ی سلولی باکتری موجب ایجاد حالت آگلوتاسیون شده و ازین طریق منجر به مرگ باکتری‌ها می‌شوند (۲۲)، که می‌توان عدم ایجاد سمیت توسط این پپتید را به این نوع فعالیت آن نسبت داد. به طور کلی پپتیدهای کاتیونی اغلب از طریق قطع کردن یکپارچگی غشاهای سلولی بوسیله‌ی تعامل با مولکول فسفولیپید در دیواره‌ی سلولی باکتری، اثرات خود را اعمال می‌کنند (۷). هو و همکاران در سال ۲۰۱۳ پژوهشی را در ارتباط با اثر تاناتین بر روی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نظیر استافیلوکوکوس اپیدرمیس مقاوم به متی‌سیلین (MRSE) مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که این پپتید می‌تواند به عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان گستره‌ی وسیعی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرد (۱۲). زو و همکاران در سال ۲۰۱۶، در مطالعه‌ای قابلیت تاناتین

جدول ۱- حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی بر روی باکتری‌های استخراج شده از بیماری‌های دامی تحت تاثیر اسانس دارچین، پونه‌ی کوهی و پپتید تاناتین

باکتری ها	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
اشرشیاکلای	۲۵۰	۱۰۰	۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۵۰۰
اشرشیاکلای ۰۱۵۷	۱۲۵	۲۵	۱۲/۵	۳۵/۲۵	۶۲/۵	۲۵۰
سالمونلا اینتریدیس	۱۲۵	۲۵	۶/۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰
سالمونلا تیفی موریوم	۲۵۰	۲۰۰	۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۵۰۰

را در ایجاد محدودیت رشد و ممانعت از شکل‌گیری بیوفیلم و عامل مقاومت در برابر استافیلوکوک‌ها به اثبات رساندند و همچنین نشان دادند که تاناتین سمیت و اثرات نامطلوبی در ارزیابی‌های اولیه انسانی نداشته است (۲۵). پگیز و همکاران گزارش کردند که پروتئین نوترکیب تاناتین قادر است که فعالیت برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله کلرامفنیکل و تتراسایکلین را روی باکتری *E.aerogenes* بهبود ببخشد (۲۰). علاوه بر این وو و همکاران در مطالعه‌ای اثر پپتید تاناتین را بر روی ۶۶ سویه بالینی جداسازی شده مورد مطالعه قرار دادند و در این مطالعه مقایسه‌ای بین عملکرد این پپتید دارویی با آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم صورت گرفت و نتایج نشان داد که این پپتید در مقایسه با برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها آلرژی‌زایی بسیار کمتری دارد (۲۴). همچنین، سیریونی و همکاران نشان دادند که تاناتین نه تنها اثر قابل توجهی روی *Pseudomonas aeruginosa* نسبت به درمان‌های رایج دارد، بلکه می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی باشد (۵). فنگ و همکاران سازه ژنی هیبریدی متشکل از لاکتوفریسین گاوی و تاناتین ایجاد کردند و پس از بیان آن در باکتری اشرشیاکلای و سپس خالص‌سازی، خواص ضد میکروبی این پپتید را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها حاکی از افزایش عملکرد ضد میکروبی کایمر حاصل بود (۸). استفاده از سیستم بیانی E. coli BL۲۱ به طور رایجی به علت کم هزینه بودن، پس زمینه‌ی ژنتیکی شفاف، و کشت راحت آن مورد استفاده قرار می‌گیرد. اما مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که این سیستم برای بیان پپتیدهای کوچک که در غلظت‌های بالا بیان می‌شوند مناسب نبوده و خاصیت کشندگی برای این باکتری مانند پپتیدهای ضدمیکروبی نمی‌باشد (۳).

نتیجه‌گیری

آزمون ضدباکتریایی انجام شده در این مطالعه نشان داد که پپتید تاناتین دارای اثرات ضدباکتری قوی در غلظت‌های کمتری نسبت به دو اسانس دارچین و پونه‌ی کوهی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه می‌باشد. از جمله مزایای استفاده از پپتیدها نسبت به اسانس‌ها می‌توان به مقاومت نسبت به اکسیداسیون، حرارت و همچنین امکان دستورزی بیشتر از طریق اتصال به سایر پپتیدها به منظور افزایش فعالیت آن اشاره کرد. ممکن است بتوان از این پپتید در آینده به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های دامی مورد استفاده قرار داد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد و با گرنت شماره ۲/۴۷۱۷۳ انجام شد.

منابع مورد استفاده

1. Adam, K., A. Sivropoulou, S. Kokkini, T. Lanaras and M. Arsenakis.1998. Antifungal activities of Origanum vulgare subsp. hirtum, Mentha spicata, Lavandula angustifolia, and Salvia fruticosa essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of agricultural and food chemistry* 46: 1739-1745.

2. Benchaar, C., H. V. Petit, R. Berthiaume, D. R. Ouellet, J. Chiquette, and P. Y. Chouinard. 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *Journal of Dairy Science* 90: 886-897.

3. Bryksa, B. C., L. D. Macdonald, A. Patrzykat, S. E. Douglas and N. R. Mattatall. 2006. A C-Terminal Glycine Suppresses Production of Pleurocidin as a Fusion Peptide in E. coli. *Protein Expression and Purification* 45: 88–98.

4. Calsamiglia, S., M. Busquet, P. Cardozo, L. Castillejos and A. Ferret. 2007. Invited Review: EssentialOils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science* 90: 2580-2595.

5. Cirioni, O., G. Wu, L. Li, F. Orlando, C. Silvestri, R. Ghiselli, Z. Shen, E. Gabrielli, L. Brescini, G. Lezoche and M. Provinciali. 2011. S-thanatin in vitro prevents colistin resistance and improves its efficacy in an animal model of Pseudomonas aeruginosa sepsis. *Peptides* 32: 697-701.

6. Fasseas, M., K. Mountzouris, P. Tarantilis, M. Polissiou and G. Zervas. 2008. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry* 106: 1188-1194.

7. Fehlbaum, P., P. Bulet, S. Chemysh, J.P. Briand, J.P. Roussel, L. Letellier, C. Hetru and J.A. Hoffmann. 1996. Structure activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. Proceedings of National Academi of Science USA 93: 1221–1225.

8. Feng, X., Liu, C., Guo, J., Song, X., Li, J., Xu, W., & Li, Z. (2012). Recombinant expression, purification, and antimicrobial activity of a novel hybrid antimicrobial peptide LFT33. *Applied microbiology and biotechnology* 95: 1191-1198.

9. Griffin, S.G., S.G. Wyllie, J.L. Markham, and D.N. Leach. 1999. The role of structure and molecular properties of terpernoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal* 14:322-332.

10. Hancock, R.E., H.G. Sahl. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* 24: 1551–1557.

11. Hart, K.J., D.R. Yanez-Ruiz, S.M. Duval, N.R. McEwan, and C.J. Newbold. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. Anim. *Feed Science Technology*. 147: 8-35.

12. Hou, Z., F. Da, B. Liu, X. Xue, X. Xu, Y. Zhou, M. Li, Z. Li, X. Ma, J. Meng and M. Jia. 2013. R-thanatin inhibits growth and biofilm formation of methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis in vivo and in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57: 5045-5052.

13. Jacobsen, F., A. Mohammadi-Tabrisi, T. Hirsch, D. Mittler, P.H. Mygind, C.P. Sonksen, D. Raventos, H.H. Kristensen, S. Ga-

termann, M. Lehnhardt, A. Daigeler, H.U. Steinau and L. Steinstraesser. 2007. Antimicrobial activity of the recombinant designer host defence peptide P-novispirin G10 in infected full-thickness wounds of porcine skin. *Journal of Antimicrobial Chemother* 59: 493-498.

14. Javadmanesh, A., A. Tanhaeian, Z. Mousavi and M. Azghandi. 2018. Investigation of recombinant thanatin effects on the growth inhibition of E. coli mastitis in dairy cows. The Proceedings of the 2nd International Congress on Biomedicine PP: 875-876.

15. Jenssen, H., P. Hamill and R.E. Hancock. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 19: 491-511.

16. Lourrenco, M., P.W. ardozo, S. Calsamiglia and V. Fievez. 2008. Effects of saponins, quercetin, eugenol and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continue culture fermenters. *Journal of Animal Science* 86: 3045-3053.

17. Ma, B., C. Niu, Y. Zhou, X. Xue, L. Meng, X. Luo and Z. Hou. 2016. The disulfide bond of the peptide thanatin is dispensible for its antimicrobial activity in vivo and in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60: 4283-4289.

18. Nhung, N.T., N. Chansiripornchai and J.J Carrique-Mas. 2017. Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Frontiers in Veterinary Science* 4: 126.

19. Pagès, J.M., J.L. Dimarcq, S. Quenin, and C. Hetru. 2003. Thanatin activity on multidrug resistant clinical isolates of Enterobacter aerogenes and Klebsiella pneumoniae. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22: 265-269.

20. Sabzghabaee, A.M., F. Nili, A. Ghannadi, N. Eizadi Mood, M. 2011. Anvari. Role of menthol in treatment of candidial napkin dermatitis. *World Journal of Pediatrics* 7:167-70.

21. Sinha, S., L. Zheng, Y. Mu, W.J. Ng and S. Bhattacharjya. 2017. Structure and Interactions of a Host Defense Antimicrobial Peptide Thanatin in Lipopolysaccharide Micelles Reveal Mechanism of Bacterial Cell Agglutination. *Scientific Reports* 7: 17795.

22. Tanhaeian, A., M. Azghandi, Z. Mousavi and A. Javadmanesh. 2020. Expression of thanatin in HEK293 cells and investigation of its antibacterial effects on some human pathogens. Protein and Peptide Letters. 21: 41-47.

23. Vizioli, J. and M. Salzet. 2003. Antimicrobial peptides: new weapons to control parasitic infections? *Trends in Parasitology* 19: 32-40.

24. Wu, G., X. Li, X. Fan, H. Wu, S. Wang, Z. Shen and T. Xi. 2011. The activity of antimicrobial peptide S-thanatin is independent on multidrug-resistant spectrum of bacteria. *Peptides* 32: 1139-1145.

25. Zhou, Y., R. Zhao, B. Ma, H. Gao, X. Xue, D. Qu, M. Li, J. Meng, X. Luo and Z. Hou. 2016. Oligomerization of RNAIII-inhibiting peptide inhibits adherence and biofilm formation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in vitro and in vivo. *Microbial Drug Resistance* 22: 193-201.