اثر ضدمیکروبی ملیتین تخلیص شده از سم زنبور عسل بر عوامل ایجادکننده پریتونیت

محسن مومن زاده[۱]، دلاور شهباززاده[۲]،محمد دخیلی[۳]، محمد رضا ذوالفقاری[۴]، کامران پوشنگ باقری[۵]*

۱. کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی گروه میکروبیولوژی، واحد قم
۲. دکترای تخصصی، دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و فرآورده های دارویی انستیتو پاستور ایران
۳. دکترای تخصصی، استادیار گروه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم
۴. دکترای تخصصی، استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم
۵. دکترای تخصصی، استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و فرآورده های دارویی انستیتو پاستور ایران

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران تهران، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و فرآورده های دارویی، تلفن و نمابر: ۶۶۴۸۰۷۸۰ ، کد پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، k_bagheri@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: تیر نود و دو پذیرش برای چاپ: شهریور نود و دو

چکیده

سابقه و هدف: *پریتونیت باکتریال یکی از عفونت های رایج بیمارستانی است که نتیجه آسیب مستقیم باکتری ها به پوشش صفاق است. مقاومت آنتی بیوتیکی در این بیماری نیز بسیار حائز اهمیت بوده و می تواند سبب مرگ و میر بیماران گردد. در طی دهه اخیر، جستجوی پپتیدهای آنتی باکتریال طبیعی مورد توجه قرار گرفته است. از میان این منابع، پپتید ملیتین از زهر زنبور عسل استخراج شده و اثر ضد میکروبی آن در حال بررسی است. هدف اصلی این تحقیق استخراج ملیتین از زهر زنبور عسل ایرانی (Apis Melifera meda) و تعیین اثر ضد باکتری آن بر عوامل ایجاد کننده پریتونیت بود.*

روش کار: *زهر زنبور به وسیله تحریک الکتریکی تهیه شد و کیفیت آن با الکتروفورز پروتئین تأیید گردید. ملیتین با شیب افزایش یابنده استونیتریل و ستون C18 با تکنیک کروماتوگرافی با کارایی بالا در فاز معکوس از زهر زنبور استخراج گردید. حداقل غلظت مهاری و کشندگی ملیتین بر روی باکتری های Escherichia coli، Staphylococcus aureus و Pseudomonas aeruginosa بررسی شد.*

یافته‌ها: *زهر زنبور عسل دارای ۲۰ فراکشن قابل تشخیص بود که فراکشن اصلی مربوط به ملیتین بود. رشد باکتری های Escherichia coli ، Staphylococcus aureus و Pseudomonas aeruginosa به ترتیب در ۰/۳۹ ، ۶/۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم ملیتین مهار شد و توسط ۱/۵۶ ، ۲۵ و ۵۰< میکروگرم ملیتین از بین رفت.*

نتیجه‌گیری: *ملیتین به طور اختصاصی به باکتری های مورد بررسی حمله کرده و اثر قابل توجه مهاری و کشندگی بر رشد باکتری های عامل پریتونیت دارد. مطالعات تکمیلی در مدل های حیوانی می تواند کمکی در حل معضل مقاومت های دارویی در درمان عفونت های باکتریال از جمله پریتونیت داشته باشد.*

واژگان کلیدی: ***زهر زنبور عسل، پپتیدهای ضد میکروبی، ملیتین، پریتونیت، کروماتوگرافی با کارایی بالا***

مقدمه

بیماری های عفونی یکی از علل مرگ و میر بیماران در بیمارستان ها هستند. امروزه عفونت های ایجاد شده توسط باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک از معضلات مهم جامعه پزشکی می باشد(۱). بعد از ورود یک آنتی بیوتیک جدید به بازار دارویی کشورها، ژن مقاومت به آن دارو در باکتری ها بروز پیدا کرده و مجددا مشکل ادامه پیدا می کند.

از جمله عفونت هایی که به دلیل مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها حائز اهمیت است پریتونیت باکتریال می باشد که معمولا جزء عفونت های بیمارستانی به حساب آمده و در نتیجه آسیب مستقیم باکتری ها به پوشش صفاق رخ می‌دهد(۲). از باکتری های ایجاد کننده پریتونیت باکتریال می توان به اشرشیاکلی، سودوموناس آئروجینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس استرپتوکوکوس پنومونیه و برخی از باکتری های گروه استرپتوکوک اشاره کرد(۵-۳). بیماران دچار پریتونیت باکتریال به طور معمول با درمان های آنتی بیوتیکی بهبود می یابند ولی درصد قابل توجهی نیز به دلیل مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های عامل پریتونیت، دچار مرگ و میر می شوند(۳،۴، ۸-۶).

متاسفانه سرعت توسعه داروهای جدیدتر کاهش قابل توجهی یافته است. لذا جستجوی آنتی بیوتیک های جدید با منبع طبیعی می تواند افق جدیدی را در درمان این گونه عفونت ها پدید آورد. از جمله این آنتی بیوتیک ها، پپتید های آنتی میکروبیال هستند که از منابع مختلف شامل گیاهان، جانوران، حشرات، سخت پوستان، بندپایان، نرم تنان و بی مهرگان و مهره داران استخراج گردیده اند(۱۴-۹). پپتیدهای آنتی میکروبیال دارای شارژ مثبت، اندازه کوچک، ۵۰-۱۲ اسید آمینه، غنی از اسیدآمینه های دارای شارژ مثبت، ساختار آمفی پاتیک، وسیع الطیف بر علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی می باشند(۱۹-۱۵).

زنبور عسل (Apis) یکی از منابع مهم و با ارزش پپتیدهای ضد میکروبی است که زهر آن از فرآورده های با ارزش است و از دیر باز برای درمان بیماری های مختلف از جمله ورم مفاصل، نقرس، روماتیسم و سایر بیماری های سیستم ایمنی و التهابی به کار می رفته است(۲۰، ۲۱). ملیتین یکی از پپتیدهای ضد میکروبی زهر زنبور عسل است که درحدود ۵۰٪ وزن خشک زهر را تشکیل می دهد. این پپتید از ۲۶ اسیدآمینه تشکیل شده و یک مونومر با وزن مولکولی ۲/۸ کیلودالتون است. این پپتید کوچک فاقد هر گونه پیوند دی سولفیدی می باشد(۲۲، ۲۳). تاکنون مطالعات محدودی در زمینه اثر ضد باکتریایی ملیتین صورت گرفته است. در سال ۱۹۹۹ سیتارام و هم کاران از فعالیت های بیولوژیکی قسمت C–ترمینال باقیمانده ۱۵ قطعه ملیتین استفاده کردند و از آن به عنوان آنالوگی در فعالیت ضد باکتریایی استفاده کردند(۲۴). در سال ۲۰۰۵ لازارف و هم کاران در محیط in vivo اثر ضد میکروبی ملیتین بر روی عفونت های ناشی از کلامیدیا تراکوماتیس و مایکوپلاسما هومینیس را بررسی کردند(۲۵). در سال ۲۰۱۱ یون و هم کارانش با به کار گرفتن ملیتین از پانکراتیت حاد به عنوان یکی از بیماری های عفونی جلوگیری کردند(۲۶). در این تحقیق با توجه به اهمیت افزایش مقاومت های آنتی بیوتیکی بیش از حد در بین باکتریهای ایجاد کننده پریتونیت، امکان استفاده از ملیتین به عنوان جای گزین آنتی بیوتیک ها در درمان پریتونیت باکتریال، به صورت In vitro بررسی شده است.

روش کار

زهر زنبورهای عسل ایرانی (Apis Melifera meda) واقع در منطقه شهرکرد به روش شوک الکتریکی تهیه شد. زهر زنبورها توسط دستگاه جمع آوری کننده زهر از طریق تحریک الکتریکی بر اساس پروتکل بنتون با کمی تغییرات جمع آوری گردید ۲۷). یک آکواریوم شیشه ای که دارای صفحات سیم کشی شده بود بر روی قسمت بالایی کندو قرار داده شد. زنبورهایی که روی این شبکه شروع به فعالیت و راه رفتن کردند به صورت اتوماتیک تحریک شدند، میزان این تحریک از ۱۰-۱ میلی ولت در مدت زمان ۱۰ ثانیه بود. این پروسه به مدت یک دقیقه تکرار می گردید. زنبورهای عسل در اثر تحریک الکتریکی احساس خطر کرده و سطح شبکه سیمی را نیش می زدند، سپس جریان الکتریکی قطع گردید و شبکه سیمی از دستگاه جمع آوری کننده زهر جدا گردید و در معرض هوا قرار داده شد. در نهایت زهر خشک شده توسط روش خراش با یک اسکالپل جمع آوری گردید و پودر جمع آوری شده به آزمایشگاه ونوم و فراورده های دارویی انستیتو پاستور انتقال داده شد و به منظور آزمایش در دمای ۲۰- درجه نگهداری گردید.

برای آماده سازی زهر ۵۰ میلی گرم از ونوم در ۱۰۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل کرده و به مدت دو دقیقه با دستگاه vortex مخلوط گردید. محلول حاصل در دمای اتاق، به مدت ده دقیقه و با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع روئی به آرامی برداشته شده و در میکروتیوپ های فیلتر دار با فیلتر غشایی ۰/۲ میکرومتر فیلتر گردید. مایع شفاف به دست آمده جهت آزمایشات بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگه داری شد. جهت تعیین غلظت ملیتین تخلیص شده، از روش UV در طول موج ۲۸۰nm و از دستگاه میکروپلیت اسپکتروفتومتر (Micro plate spectrophotometer Epoch, Biotek instruments, U.S.A) استفاده شد.

جهت بررسی کیفیت زهر جمع آوری شده، مقداری از زهر در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی حل شده و سپس در ژل پلی آکریل آمید ۱۵،۵ ٪ در مدت زمان ۳ ساعت با جریان ۲۰ میلی آمپر الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی با کوماسی برلیانت بلو R250 به مدت یک شب صورت گرفته و رنگ بری ژل با ۳۰٪ استیک اسید و ۱۰٪ متانل انجام گردید. نتایج با سیستم مستندسازی ژل (Gel Documentation System, BioRad) ثبت گردید.

جهت جداسازی ملیتین از زهر زنبور عسل از تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا - فاز معکوس، سیستم HPLC (Knauer GmbH, Germany) و ستون C18 استفاده گردید. فاز متحرک شامل استو نیتریل خالص حاوی ۰،۰۵٪ تری فلوئورواستیک اسید به عنوان ماده اصلی (محلول A) و آب بسیار خالص حاوی ۰،۰۵٪ تری فلوئورواستیک اسید (محلول B)، به عنوان حلال فرعی بود. متد بکار رفته یک گرادینت خطی افزایش یابنده با محلول استونیتریل بود(جدول ۱). قبل از تزریق نمونه به سیستم، ابتدا متعادل سازی ستون با محلول B انجام گردید. سپس نمونه در حجم ۵۰ میکرولیتر به ستون تزریق شده و متد در نظر گرفته شده اعمال گردید. متد اعمال شده شامل شستشوی ستون با محلول B به مدت ۵ دقیقه، ۵۵ دقیقه اعمال محلول A تا شیب غلظت ۶۰ درصد، ۵ دقیقه اعمال محلول A تا شیب غلظت ۹۰ درصد بود. در انتها ستون دوباره به مدت ۵ دقیقه با محلول B متعادل گردید. در طی آزمایش پیک های مشاهده شده جمع آوری گردیدند.

فراکشن های جمع آوری شده در دمای ۵۶°C- و فشار ۰,۰۴ اتمسفر توسط دستگاه Freeze Dryer (Christ, 2 alpha - Germany) در مدت ۲۴ ساعت لیوفیلیزه شدند. خلوص ملیتین استخراج شده با روش الکتروفورز پلی اکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) بررسی شد. فراکشن ملیتین در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی حل شده و سپس با شرایط توضیح داده شده در قسمت قبلی الکتروفورز گردید.

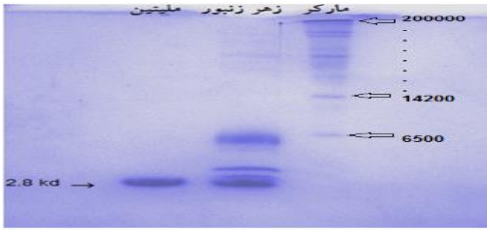
جدول۱: متد HPLC جهت جداسازی ملیتین از زهر زنبور عسل

Time	Flow rate	Solvent A	Solvent B
0.00	1	0	100
5.00	1	0	100
65	1	60	40
70	1	90	10
75	1	0	100

باکتری های مورد استفاده در این مطالعه سویه های استاندارد Escherichia coli ATCC 25922، Staphylococcus aureus ATCC 25923 و Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 بودند. در تست آنتی بیوگرام، برای تعیین خاصیت آنتی باکتریال ملیتین، از پروتکل بین المللی استاندارد NCCLS استفاده شد. بر اساس این پروتکل نیمه مک فارلند معادل ۱,۵ ×۱۰^۸ CFU/ml است. باکتری های مورد نظر در محیط کشت مولر هینتون براث به مدت یک شب در دمای ۳۷ کشت داده شدند. جهت خارج ساختن مواد محیط و فرآورده های ترشحی باکتری ها، سوسپانسیون باکتریایی در دور RPM۷۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب بدست آمده در سرم فیزیولوژی سوسپانسیونه شده و مجددا با شرایط قبلی سانتریفیوژ گردیدند. رسوب تمیز در سرم فیزیولوژی سوسپانسیونه شده و به عنوان سوسپانسیون غلیظ در تهیه نیم مک فارلند استفاده شد. جهت دقت بیشتر در تهیه نیم مک فارلند، دانسیته اپتیک سوسپانسیون مورد آزمایش با روش اسپکتروفوتومتری با دستگاه اسپکتروفتومتر (CT-5000, Chrom TECH, Thailand) در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. دانسیته اپتیک بین ۰/۱- ۰/۰۸ معادل ۱,۵ ×۱۰^۸ CFU/ml است. جهت کمی تر شدن تعداد باکتری های تهیه شده، دانسیته اپتیک ۰,۰۹ جهت تهیه نیم مک فارلند انتخاب گردید. جهت بدست آوردن MIC روش Microdilution broth در چاهک های ۹۶ خانه بکار گرفته شد. غلظت ملیتین بکار رفته در چاهک اول ۱۰۰ میکروگرم انتخاب گردید. جهت انجام تست MIC از سوسپانسیون به دست آمده باکتری در مرحله قبلی ۱۰ میکرولیتر برداشت گردید و با محیط کشت مولر هینتون براث به حجم یک میلی لیتر رسانده شد. در این حالت تعداد باکتری ۱,۵ ×۱۰^۶ CFU/ml می باشد. ابتدا در تمام چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکروگرم ملیتین در حجم ۱۰۰ میکرولیتر مولر هینتون براث به چاهک اول اضافه گردید. بعد از مخلوط کردن به کمک سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشت شده و به چاهک دوم اضافه گردید. این عمل تا چاهک آخر به همین صورت تکرار گردید. ۱۰۰ میکرولیتر نیز از چاهک آخر برداشت شده و دور ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر باکتری (۱,۵×۱۰^۵) به تمام چاهک ها اضافه شد. میکروپلیت به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ انکوبه گردید. سپس نتیجه آزمایش MIC مشاهده و ثبت شد. آخرین چاهک شفاف به عنوان حداقل غلظت مهاری در نظر گرفته شد. جهت بدست آوردن حداقل غلظت کشندگی، از تمام چاهک ها ی شفاف ۵۰ میکرولیتر نمونه برداشت شده و در محیط کشت مولر هینتون آگار در دمای ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. تعداد کلنی های رشد یافته شمارش شد و مقدار MBC محاسبه گردید. حداقل غلظت کشندگی غلظتی است که در آن ۹۹/۹۹ درصد باکتری ها از بین رفته باشند.

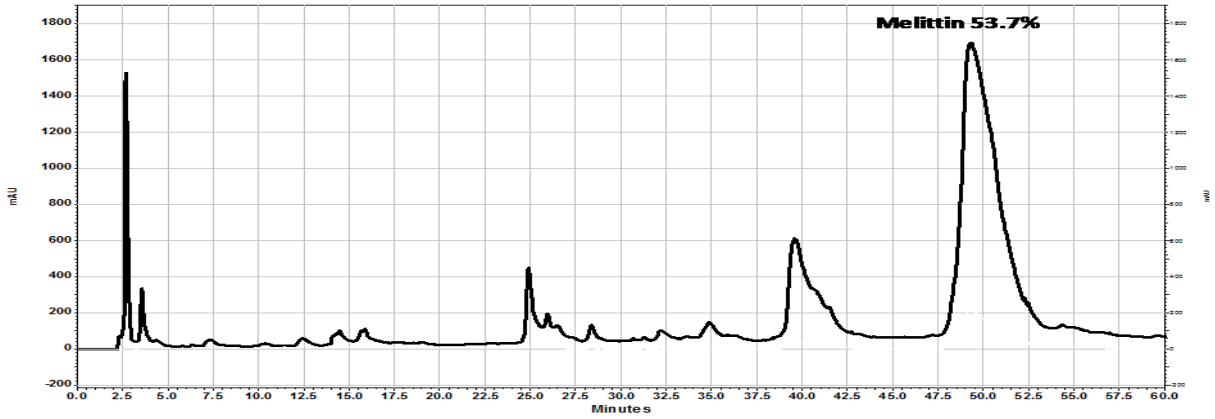
یافته ها

طیف وزن مولکولی پروتئین های زهر حدودا بین ۲/۸ الی ۱۸۰ کیلودالتون بود. نتیجه الکتروفورز نشان داد که پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر شاخص بوده و بیشترین اجزای تشکیل دهنده زهر را تشکیل می دهند. فراکشن ملیتین بعد از تخلیص تقریبا خالص و تک باند درمحدوده ۲/۸ کیلو دالتون قرار گرفته بود (شکل ۱).



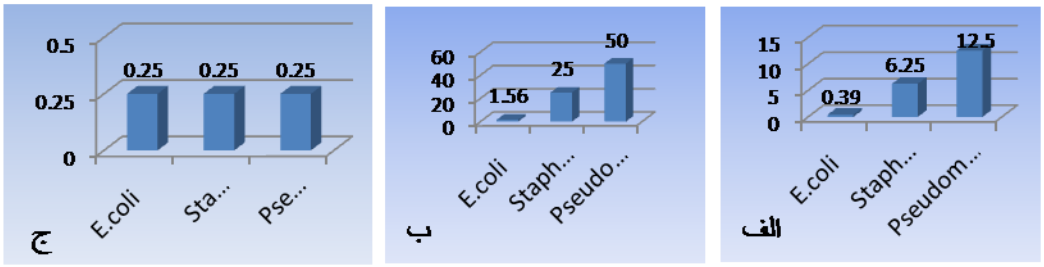
شکل۱: SDS-PAGE ونوم زنبور و ملیتین. ملتین خالص شده با ملتین ونوم زنبور قابل مقایسه است.

پس از اندازه گیری جذب خروجی ستون در طول موج ۲۱۴ و ۲۸۰ نانومتر ۲۰ فراکشن قابل تشخیص بود. فراکشن اصلی مربوط به ملیتین بود. این فراکشن تقریبا" ۵۳/۸٪ از مساحت کل فراکشن ها را تشکیل داده بود. در حدود دقیقه ۴۷/۵ تا ۵۲/۵ (معادل با ۴ دقیقه) ملیتین از ستون C18 خارج شد. این مدت زمان معادل درصد استونیتریل از میزان ۴۲/۵ تا ۴۷/۵ درصد می باشد (شکل ۲).



شکل۲: کروماتوگرام زهر زنبور عسل. فراکشن ملیتین ۵۳/۷ ٪ از کل فراکشن ها را به خود اختصاص داده بود.

رشد باکتری های Escherichia coli ، Staphylococcus aureus و Pseudomonas aeruginosa به ترتیب در ۰/۳۹ ، ۶/۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم ملیتین مهار شد(جدول ۲). باکتری های Escherichia coli ، Staphylococcus aureus و Pseudomonas aeruginosa به ترتیب به ۱/۵۶ ، ۲۵ و ۵۰< ملیتین مقاومت نشان دادند (جدول ۲). مقایسه نتایج MIC و MBC نشان داد که در باکتری های مورد مطالعه، قدرت کشندگی ملیتین چهار برابر کمتر از قدرت مهاری آن است. نمودار نتایج MIC ، MBC و MIC/MBC در نمودار ۲ نشان داده شده است.



شکل ۳: نمودار نتایج(الف) MIC ، MBC (ب) و نسبت MIC/MBC (ج).

جدول ۲: نتایج تست های MIC ، MBC و نسبت MIC/MBC سویه های مورد مطالعه

ردیف	کد سویه	نام باکتری	MIC(µg)	MBC(µg)	MIC/MBC
۱	**ATCC 25922**	**Escherichia coli**	۰/۳۹	۱/۵۶	۰/۲۵
۲	**ATCC 25923**	**Staphylococcus aureus**	۶/۲۵	۲۵	۰/۲۵
۳	**ATCC 27853**	**Pseudomonas aeruginosa**	۱۲/۵	بیش از ۵۰	۰/۲۵

بحث

عفونت‌های بیمارستانی هم واره یکی از مشکلات عمده بهداشتی و درمانی بوده و با افزایش مدت اقامت بیمار در بیمارستان موجب افزایش ابتلاء و مرگ و میر از این عفونت‌ها شده و هزینه‌های بیمارستانی را به شدت افزایش می‌دهد. یکی از عفونت های رایج بیمارستانی پریتونیت است که هم واره یک بیماری کشنده به حساب می آمده است. در طول بیش از یک صد سال گذشته با شناخت دقیق باکتری ها و منشا میکروبی پریتونیت ها و بعد از آن کشف آنتی بیوتیک ها درمان پریتونیت دگرگون شد(۳۰-۲۸). امروزه مقاومت های آنتی بوتیکی مشکلات بالینی زیادی را ایجاد کرده و این موضوع روز به روز در حال افزایش است. بنابراین جستجوی آنتی بیوتیک های جدید، به طوری که مقاومت ژنتیکی در باکتری ها ایجاد نکنند، مورد توجه قرار گرفته است(۳۱).

با توجه به تحقیقاتی که در دهه اخیر انجام شده، آنتی بیوتیک هایی با منبع طبیعی از باکتری ها، گیاهان، بی مهرگان، مهره داران و سایر جانداران یافت شده است(۱۴-۹). این مولکول ها پپتیدهایی هستند که در دفاع ذاتی سیستم ایمنی دخالت داشته و جزء اصلی تشکیل دهنده سیستم دفاعی در برابر تعداد زیادی از میکروارگانیسم های زنده هستند. آنها در التهابات سپتیک و غیر سپتیک، ترمیم زخم و تنظیم سیستم ایمنی اکتسابی هم نقش دارند(۱۴).

در این تحقیق ملیتین از زهر زنبور عسل ایرانی با تکنیک RP-HPLC جداسازی و جهت بررسی اثر ضد باکتریایی بر روی باکتری های اصلی ایجاد کننده پریتونیت باکتریال بکار گرفته شد. با توجه به اینکه پریتونیت باکتریال از مشکلات بالینی بعد از دیالیز صفاقی بوده و مقاومت باکتری های ایجاد کننده پریتونیت در برابر آنتی بیوتیک های رایج در حال افزایش بوده و آمار بیماری و مرگ و میر ناشی از آن قابل ملاحظه است، ایده استفاده از یک آنتی بیوتیک طبیعی مانند ملیتین جهت درمان پریتونیت باکتریال در آزمایشگاه ونوم و توکسین، بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران مطرح گردید. در بررسی های مشابه در سال ۲۰۱۱ ، یون و هم کاران با به کار گرفتن ملیتین از پانکراتیت حاد جلوگیری کردند(۲۶). در این مطالعه، پس از تخلیص ملیتین از ونوم زنبور، ملیتین با خلوص بسیار بالایی بدست آمد. مرحله اول این تحقیق تست های in vitro بود تا براساس نتایج آن در مطالعه in vivo استفاده گردد. باکتری های مورد بررسی، هر کدام نماینده مناسب از دسته گرم مثبت ها، گرم منفی ها و دسته فرصت طلب ها یعنی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کولای و سودوموناس آئروژینوزا بودند. جهت استاندارد سازی مطالعه از سویه های استاندارد ATCC استفاده گردید.

روش بررسی خواص آنتی باکتریال ملیتین تست Microdilution broth بود. در استاندارد های بین المللی آنتی بیوگرام مانند CLSI و NCCLS، می توان تعداد باکتری مورد آزمایش را به صورت مقایسه چشمی با محلول نیم McFarland تهیه کرد که کدورت بدست آمده معادل با $۱٫۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در میلی لیتر است. روش دیگر جهت تهیه باکتری با تعداد معادل با $۱٫۵ \times ۱۰^{۸}$ استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۲۵ nm است. دانسیته اپتیک سوسپانسیون باکتری بین۰/۱- ۰/۰۸ معادل با این تعداد است. این دامنه وسیع بین دو عدد ۰/۰۸ و ۰/۱ باعث نیمه کمی بودن این روش شده و بر اساس آن نمی توان تعداد دقیقی از باکتری ها را بدست آورد. در این تحقیق جهت دقیق تر شدن تعداد باکتری ها دانسیته اپتیک ۰/۰۹ انتخاب گردید.

نتایج بدست آمده نشان داد که ملیتین می تواند بر هر سه نوع باکتری اثر تخریبی داشته و تعداد زیادی از آنها را نابود کند. اشرشیا کولای به عنوان یک باکتری گرم منفی دارای دو غشاء خارجی و داخلی از جنس فسفولیپید بوده و پیچیدگی زیادی ندارد. به همین دلیل اثر ضد باکتری ملیتین بر آن، از دیگر باکتری ها بیشتر بوده است. در نگاه اول به نظر می رسد که استافیلوکوکس اورئوس از دیگر باکتری ها نسبت به ملیتین مقاوم تر باشد اما مقاومت سودوموناس آئروژینوزا از استافیلوکوکس اورئوس بیشتر بود. دلیل این موضوع می تواند وجود لایه های پلی ساکاریدی با نفوذپذیری کم در اطراف باکتری سودوموناس آئروژینوزا باشد.

نتایج بدست آمده در این تحقیق، امید جهت کاربرد این پپتید را بیشتر کرده و ممکن است در آینده با مطالعات بیشتر بر روی باکتری های دیگر و در مدل های حیوانی، به صورت صنعتی وارد بازار دارویی شده و کمکی در حل معضل مقاومت های دارویی در درمان عفونت های باکتریال از جمله پریتونیت داشته باشد.

REFERENCES

1. Haley RW, Culver DH, White JW. The nationwide nosocomial infection rate. Am J Epidemiol 1985;121(2):159-167 .

2. Fabian, T. C. Prevention of infections following penetrating abdominal trauma. Am. J. Surg. 1993;165(2):14S–19S.

3. Kovacs, K., D. L. Paterson, and V. L. Yu. Antimicrobial therapy for Pseudomonas aeruginosa: therapeutic issues; resistance; pneumonia; endocarditis; and infections of the GI tract, bone and joint, and urinary tract. Infect. Med. 1998;15(6):385–394.

4. Prescott L. M ,. Harley J. P ,. Klein D. A. Human diseases caused by other bacteria (chlamydiae, mycoplasmas, rickettsias); dental and nosocomial infections. in Microbiology, 2nd ed. ed KaneK. (William C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa), 1993; pp 770–780

5. Donta, S. T., P. Peduzzi, A. S. Cross, J. Sadoff, C. Haakenson, S. J. Cryz, C. Kauffman, et al. Immunoprophylaxis against Kleibsiella and Pseudomonas aeruginosa infections. J. Infect. Dis. 1991;174:537–543.

6. Bodey, G. P., L. Jadeja, and L. Elting. Pseudomonas bacteremia. Retrospective analysis of 410 episodes. Arch. Intern. Med. 1985; 145(9):1621–1629.

7. Levison M. E ,.Bush L. M .Peritonitis and other intra-abdominal infections. in Principles and practice of infectious diseases, 4th ed. eds MandellG. L., BennettJ. E., DolinR. (Churchill Livingstone, Inc. New York, N.Y). 1995; pp 705–740.

8. Neu, H. C. The crisis in antibiotic resistance. Science, 1992; 257(5073):1064–1073.

9. Pag, U. and Sahl, H.G. In Peptide Antibiotics, (Dutton, C.J. Haxell, M.A. McArthur, H.I.I. and Wax, R.G., Eds.) 2002; pp. 47-80. Marcel Dekker Inc., New York and Basel.

10. Nes, I.F., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H.H. and Nissen-Meyer, J. In Peptide Antibiotics, (Dutton, C.J., Haxell, M.A., McArthur, H.I.I. and Wax, R.G., Eds.) 2002; pp. 81-116. Marcel Dekker Inc., New York and Basel.

11. Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M. and Rodriguez-n Palenzuela, P. Biopolymers, Plant defense peptides.1998; 47(6), 479-491

12. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature, 2002; 415, 389-395.

13. Ganz, T. and Lehrer, R.I. In Innate Immunity, (Ezekowitz, R.A.B. and Hoffmann, J.A., Eds.) 2003; pp. 287-303. Humana Press, Totowa, NJ.

14. Hancock, R. E., and A. Patrzykat. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. Curr. Drug Targets Infect. Disord. 2002; 2:79–83.

15. Hultmark D. Drosophila immunity: paths and patterns. Curr Opin Immunol 2003;15:12–9.

16. Martin, E., T. Ganz, and R. I. Lehrer. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. J. Leukoc. Biol. 1995; 58(2):128–136.

17. Wang, Z., and G. Wang. APD: the Antimicrobial Peptide Database. Nucleic Acids Res. 2004; 32(1):590–592.

18. Hancock, R. E., and D. S. Chapple. Peptide antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43(6):1317–1323.

19. Hancock, R. E., and G. Diamond. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends Microbiol. 2000; 8(9):402–410.

20. Robson Ch. Bee Venom Collection Apparatus. US Patent 4739531. 1988; 26.

21. Rybak M, Skubida P. Application coupled electrical and sound stimulation for honeybee venom collection. Journal of Apicultural Science. 2007; 51(2):63-66.

22. Boeckle, S., Fahrmeir, J., Roedl, W., Ogris, M., and Wagner, E. Melittin analogs with high lytic activity at endosomal pH enhance transfection with purified targeted PEI polyplexes. J Control Release. 2006; 112(2), 240-8.

23. Boeckle, S., Wagner, E., and Ogris, M. C- versus N-terminally linked melittin polyethylenimine conjugates: the site of linkage strongly influences activity of DNA polyplexes. J Gene Med. 2005; 7(10), 1335-47.

24. N. Sitaram C. Subbalakshmi, R. Nagaraj: Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity 1999; 40(8):1123-23.

25. Lazarev VN, Shkarupeta MM, Titova GA, Kostrjukova ES, Akopian TA, Govorun VM. "Effect of induced expression of an antimicrobial peptide melittin on Chlamydia trachomatis and Mycoplasma hominis infections in vivo." Biochemical and Biophysical Research Commununications. 2005; 338(2):946-50.

26. 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, 2011; (12):2062-72.

27. Benton AW, M.R., Stewart JD., Venom collection from honeybees .Science, 1963; (3589):142: p. 228-30.

28. Mombelli A. Periodontitis as an infectious disease: specific features and their implications. Oral Dis; 2003;9 Suppl 1:6-10.

29. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontology. 2002;28(1):12-55.

30. Marsh PD. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. Oral Dis. 2003;9:16-22.

31. Marr A. K, Gooderham W. J , Hancock R. E.Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. Current Opinion in Pharmacology, 2006; 6 : 468–472.