تخلیص فراکشن های زهر مار کبری ایرانی به روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و HPLC فاز معکوس و بررسی فعالیت آنتی باکتریال پپتید های جدا شده بر سویه های باکتریایی استاندارد

نیلوفر شعاعی نائینی[۱]، دلاور شهباززاده[۲]، کامران پوشنگ باقری[۳]*

۱. کارشناس ارشد. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی ، دانشگاه آزاد اسلامی –تهران-ایران
۲. دانشیار، دکتری تخصصی بیوشیمی. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور ایران
۳. استادیار، دکتری تخصصی باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور ایران

***نشانی برای مکاتبه:** مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تلفکس: ۶۶۴۸۰۷۸۰ ، کد پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، k_bagheri@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: مرداد نود و پنج پذیرش برای چاپ: آبان نود و پنج

چکیده

زمینه و هدف: *سال ها است که عفونت های سپتی سمی، عفونت سوختگی و پریتونیت مقاوم به آنتی بیوتیک از بیمارستان های زیادی گزارش می شود و هنوز هیچ نوع آنتی بیوتیکی تضمین کننده درمان قطعی نیست. یکی از راه حل های پیشنهاد شده جهت رفع این مشکل، استفاده از پپتید های آنتی میکروبیال است. هدف این تحقیق جستجوی یک پپتید آنتی میکروبیال از زهر مار کبری ایرانی و همچنین تعیین سمیت آن بر روی گلبول های قرمز انسان بود.*

روش کار: *در این مطالعه ابتدا زهر مار کبری به روش ژل کروماتوگرافی فیلتراسیون فراکشن گیری شده و فعالیت آنتی باکتریال فراکشن ها بر سویه های استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. هر کدام از فراکشن ها که فعالیت ضد باکتری داشت، انتخاب شده و با تکنیک کروماتوگرافی HPLC فاز معکوس فراکشن گیری گردید. سپس فعالیت آنتی باکتریال فراکشن های بدست آمده بررسی شده و هر کدام که مثبت بود فعالیت همولیتیک آن نیز آزمایش گردید.*

یافته ها: *محدوده وزن مولکولی پپتید ها و پروتئین های زهر مار کبری از حدود ۷ الی ۱۷۰ کیلو دالتون برآورد گردید. بر اساس نتایج کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، تعداد ۸ فراکشن مشاهده گردید. بیشترین سطح زیر منحنی مربوط فراکشن های انتهایی ۶ ، ۷ و ۸ بود. MIC فراکشن پپتیدی شماره ۶ و ۷ علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی برابر با ۵۰ µg بدست آمد. فراکشن ۷ به دلیل مقدار بیشتر پپتید جهت انجام HPLC انتخاب گردید. تعداد ۱۲ peak در کروماتوگرام HPLC مشاهده و جمع آوری گردید. بیشترین اثر آنتی باکتریال مربوط به فراکشن های ۴، ۹، ۱۰، و ۱۲ بود که از میان آن ها فراکشن ۱۲ بیشترین اثر را از خود نشان داد. MIC فراکشن پپتیدی ۱۲ بر روی اشریشیا کلای، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب برابر با ۶/۲۵ ، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بدست آمد ولی در آسینتوباکتر MIC پپتید بیشتر از ۱۰۰ میکروگرم بود. پپتید F12 فاقد هر گونه فعالیت همولیتیک بود.*

نتیجه گیری: *در این مطالعه مشخص شد که پپتید مار کبری ایرانی دارای اثر باکتریسیدال می‌باشد و هیچ گونه سمیتی بر روی گلبول های قرمز انسان دیده نشد. استفاده از ترکیبات طبیعی مانند پپتیدهای آنتی باکتریال که از زهر جانوران سمی استخراج می گردند، می تواند راهگشای مقابله با پاتوژن های مقاوم به آنتی بیوتیک در آینده باشد. این مطالعه از این لحاظ حائز اهمیت است که اولین گزارش وجود یک عامل ضد میکروبی پپتیدی از زهر مار کبری ایرانی است.*

واژگان کلیدی: مار کبری ایرانی، زهر، پپتیدهای ضد میکروبی، کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، کروماتوگرافی مایع با کار آرایی بالا در فاز معکوس

مقدمه

عفونت های باکتریایی مقاوم به دارو در چند دهه اخیر مشکلات بالینی زیادی را برای بیماران ایجاد کرده و کماکان این مشکلات در سطح جهانی ادامه دارد (۳-۱) و در موارد زیادی از عفونت های سپتی سمی، عفونت سوختگی و پریتونیت، عفونت های مقاوم منجر به مرگ و میر از بیمارستان های کشور های مختلف گزارش می گردد (۶-۴). از میان عفونت های گزارش شده، عفونت سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، و اشرشیا کلای و همچنین آسینتوباکتر بومانی، بدلیل مقاومت بیشتر به آنتی بیوتیک ها از اهمیت ویژه ای برخوردارند (۷).

با توجه به این که باکتری ها می توانند بعد از ورود یک آنتی بیوتیک شیمیایی جدید به بازار دارویی کشور ها، در مقابل آن جهش ایجاد کرده و مقاوم شوند، یکی از راه حل های پیشنهاد شده جهت رفع این مشکل استفاده از پپتید های آنتی میکروبیال است. زیرا این پپتید ها با مکانیسم حمله به غشای باکتری، فرصت جهش را از باکتری گرفته و می توانند آن ها را سریعا نابود کنند (۸). زهر گیری از مار کبری استان خراسان رضوی انجام شد و زهر لیوفیلیزه در انیستیتو پاستور آزمایشگاه ونوم و بیوملکول های درمانی موجود بود. برای آماده سازی زهر به منظور تزریق به دستگاه FPLC و سایر آزمایشات، ابتدا مقدار ۲۰۰میلی‌گرم زهر با ۵ میلی لیتر آب مقطر تزریقی مخلوط شده ، سپس آن را ۲-۱ دقیقه ورتکس کرده و برای حذف پارتیکل به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی حاوی زهر خالص بوده و از رسوب سم جدا شده و تعیین غلظت گردید.

تعیین غلظت به روش بیسینکونینیک اسید طبق دستور العمل کیت (شرکت Intronbio کره جنوبی) تعیین گردید. جهت تعیین غلظت OD نمونه در طول موج ۵۶۲ نانومتر با دستگاه میکروپلیت اسپکتوفتومتر (Micro Spectrophotometer Epoch, Biotek instrument U.S.A) خوانش گردید. غلظت نهایی با استفاده از فرمول خط بدست آمده از نمودار منحنی استاندارد BSA محاسبه گردید.

جهت بررسی پروفایل پروتئینی زهر استخراج شده از مار کبری ایرانی و همچنین بررسی کیفیت آن، SDS-PAGE با ژل ۱۵٪ در سیستم الکتروفورز شرکت BioRad (آمریکا) انجام شده و رنگ آمیزی ژل به روش کوماسی بلو (Comassie blue R250) انجام گردید.

برای کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون میزان ۸۰ گرم رزین سفادکس G75 (شرکت Biobasic کانادا) در بافر آمونیوم استات ۲۰ میلی مولار با PH = ۷/۵ حل شد و مدت ۴-۳ ساعت زمان داده شد تا پودر رزین کاملا در محلول خیسانده شود. پس از آن ستون را با سه برابر حجم توسط محلول فوق شستشو داده و ستون متعادل و آماده شد. سپس مقدار ۲۰۰ میلی گرم از زهر به ستون آماده شده تزریق گردید. جهت جداسازی فراکشن از بافر آمونیوم استات ۲۰ میلی مولار استفاده شده و فراکشن ها به صورت دستی با سرعت یک میلی لیتر در دقیقه در عرض ۶ ساعت با دستگاه FPLC مدل akta purifier10 (شرکت GE امریکا) جدا گردید و جهت بررسی و آنالیز کروماتوگرام از نرم افزار UNICORN استفاده شد. فراکشن های بدست آمده در دمای 56°C- و فشار ۰/۰۴ اتمسفر به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در سیستم فریز درایر (شرکت MartinChrist آلمان - مدل Alpha1-2 LD plus) لیوفلیزه شدند.

برای تعیین غلظت فراکشن های بدست آمده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون نمونه های خشک شده در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شده و به میکروتیوب های استریل انتقال داده و جهت حذف پارتیکل های احتمالی با 12000 دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیده و در ادامه کار از محلول رویی استفاده شد. همه فراکشن های بدست آمده به روش بیسینکونینینک اسید (BCA) تعیین غلظت شدند. وزن مولکولی نسبی این فراکشن ها با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE بدست آمده و مولکول های زیر ۱۰ کیلو دالتون که پپتید هستند، شناسایی شدند. این پپتید ها برای انجام تست آنتی بیوگرام انتخاب گردیدند.

برای بررسی فعالیت آنتی باکتریال فراکشن های بدست آمده سوسپانسیون استاندارد نیم مک فارلند به روش کمی اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۲۵ نانومتر تهیه شد. به این صورت که ابتدا یک تک کلنی از نمونه باکتری های استاندارد برداشته و در محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) به مدت یک شب کشت داده و پس از سانتریفوژ در دور ۷۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، محلول رویی دور ریخته شده و رسوب حاصله در یک میلی لیتر محیط MHB سوسپانسیونه شده و دوباره این مراحل یک بار دیگر انجام شد.

پپتیدهای ضد میکروبی در دهه ی اخیر مورد توجه مراکز مختلف تحقیقاتی و دارویی قرار گرفته و مطالعات زیادی در جهت شناسایی آنها صورت گرفته است (۹). شواهدی از وجود پپتید های آنتی باکتریال در زهر مار های کبری وجود دارد. کاتلیسیدین یک پپتید آنتی باکتریال است که در زهر شاه کبری چینی به خوبی مطالعه شده است. پپتید کامل NA-CATH سنتز شده و نشان داده شده که بر علیه گروه های مختلفی از باکتری ها خاصیت آنتی میکروبیال دارد (۱۰).

بنابراین بر اساس یافته های قبلی از مار های هم خانواده مانند مار کبری چینی، هندی و پاکستانی (۱۴-۱۱)، این مطالعه با هدف تعیین فراکشن های آنتی باکتریال پپتیدی از زهر مار کبری ایرانی انجام شد.

روش کار

با اضافه کردن مقدار کافی از سوسپانسیون غلیظ به کووت حاوی MHB ، OD سوسپانسیون در میزان جذب ۰/۰۹ تنظیم گردید. OD نیم مک فارلند در محدوده ی بین 0.08 الی 0.1 معادل با $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml می باشد. جهت افزایش دقت تعیین تعداد باکتری ها، OD سوسپانسیون برابر با 0.09 در نظر گرفته شد.

برای تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) فراکشن ها، مقدار 200µg از هر فراکشن در حجم ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک اول اضافه شده و مقادیر بعدی بصورت رقیق سازی سریالی با ضریب 1/2 تهیه شدند. پس از رقت سازی به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر باکتری با تعداد $۱/۵\times۱۰^{۵}$ عدد اضافه گردید و میکروپلیت به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. آخرین چاهک شفاف به عنوان MIC تعیین گردید.

جهت بررسی اثر کشندگی (MBC) ۱۰ میکرولیتر از چاهک های شفاف در محیط MHA به روش کلنی کانت کشت داده و بعد از یک شب تعداد کلنی ها شمارش شدند. هر کدام از فراکشن ها که فعالیت ضد باکتری بیشتری داشتند، جهت تخلیص بیشتر با تکنیک HPLC فاز معکوس، انتخاب گردید.

در کروماتوگرافی HPLC فاز معکوس ستون C18 (قطر ذرات سیلیکاژل: ۵ میکرون، قطر منافذ: ۱۰۰ آنگستروم، طول و عرض: 250×4.6mm) جهت تخلیص پپتید انتخاب گردید. دستگاه مورد استفاده، HPLC شرکت KNAUER آلمان با پمپ مدل Smartline 1000 و سیستم UV detector 2550 بود. محلول های مورد استفاده شامل محلول استونیتریل به همراه TFA 0.05% (محلول C) و محلول آب مقطر با درجه خلوص HPLC به همراه TFA 0.05% (محلول D) بود. ۵۰۰ میکروگرم از فراکشن پپتیدی کاندید را در حجم ۵۰ میکرولیتر به ستون متعادل شده با محلول D تزریق شده و اجزاء پپتیدی به ستون C18 متصل شدند. سپس با اعمال گرادیانت خطی افزایش یابنده محلول C از صفر تا ۴۵ درصد در مدت ۴۵ دقیقه با سرعت جریان یک میلی لیتر در دقیقه، فراکشن ها از ستون جدا شده و در میکروتیوب استریل جمع آوری شدند. جهت مشاهده پیک های بدست آمده از طول موج ۲۱۴ و ۲۸۰ نانومتر استفاده گردید.

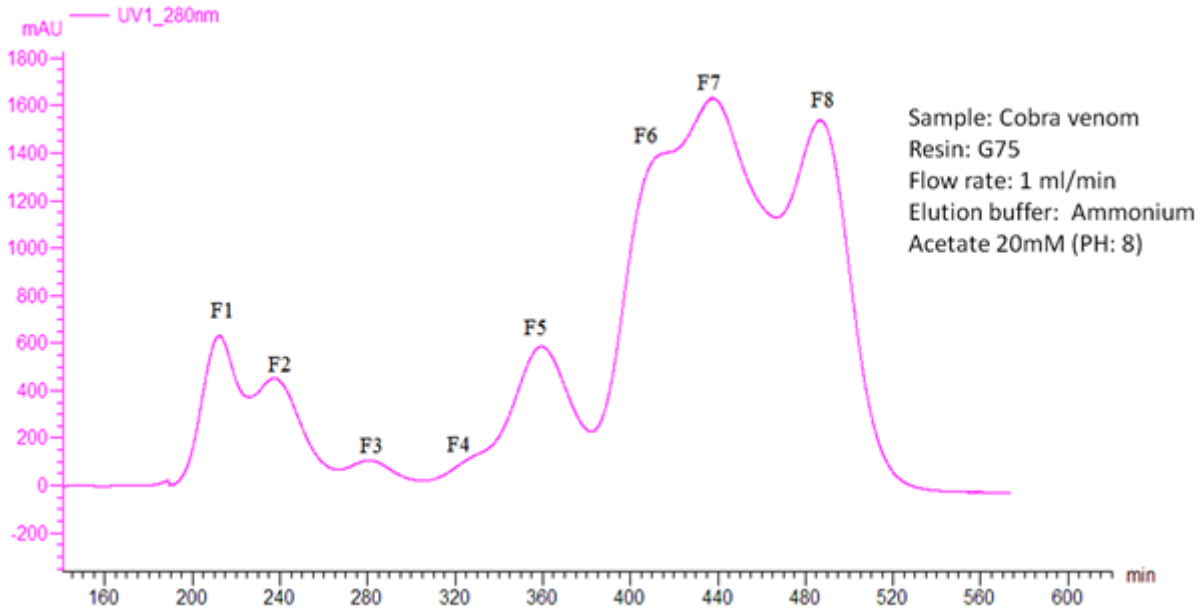
فراکشن های بدست آمده طبق روش ذکر شده با دستگاه فریز درایر خشک شده و بعد از محلول سازی به روش BCA تعیین غلظت گردید.

MIC و MBC فراکشن های بدست آمده، به روش گفته شده فوق بررسی شد. در نهایت هر کدام از پپتیدهای آنتی باکتریال که دارای فعالیت حداکثر بودند، به عنوان پپتید کاندید مشخص گردیدند.

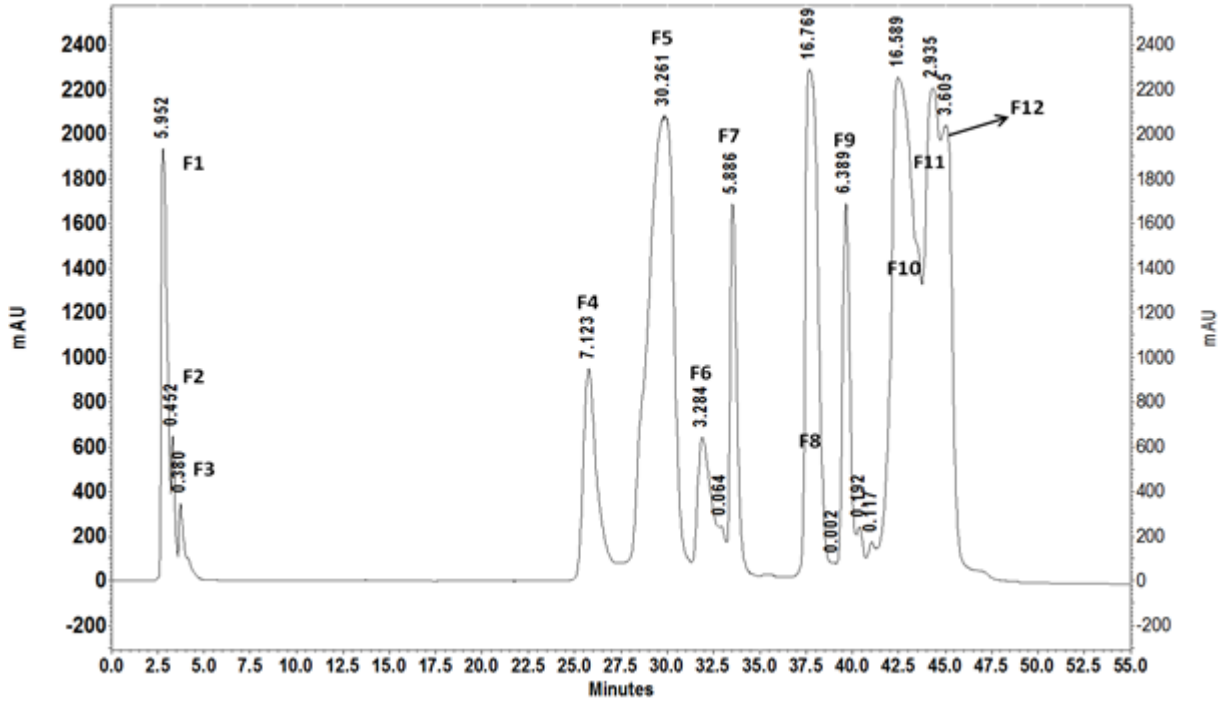
وزن مولکولی نسبی پپتید کاندید با انجام الکتروفورز در ژل آکریلامید ۱۵ درصد به مدت یک و نیم ساعت و با رنگ آمیزی استاندارد تعیین گردید.

سمیت پپتید کاندید با تست فعالیت همولیتیک مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی فعالیت همولیتیک غلظت‌های مختلف فراکشن آنتی باکتریال از ۱۰۰ میکرو گرم تا 0.78 میکرو گرم به روش رقیق سازی متوالی در میکرو پلیت ۹۶ خانه تهیه گردید. سپس سوسپاسیون ۲ درصد گلبول قرمز انسان به آنها اضافه کرده و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه نگهداری شد. میکرو پلیت را سانتریوفوژ کرده و محلول رویی به میکروپلیت دیگری منتقل شده و نهایتا میزان آزاد شدن هموگلوبین در طول موج ۵۴۰نانومتر بررسی گردید. کنترل مثبت TRITON X100 و کنترل منفی PBS می‌باشد. درصد فعالیت همولیتیک طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

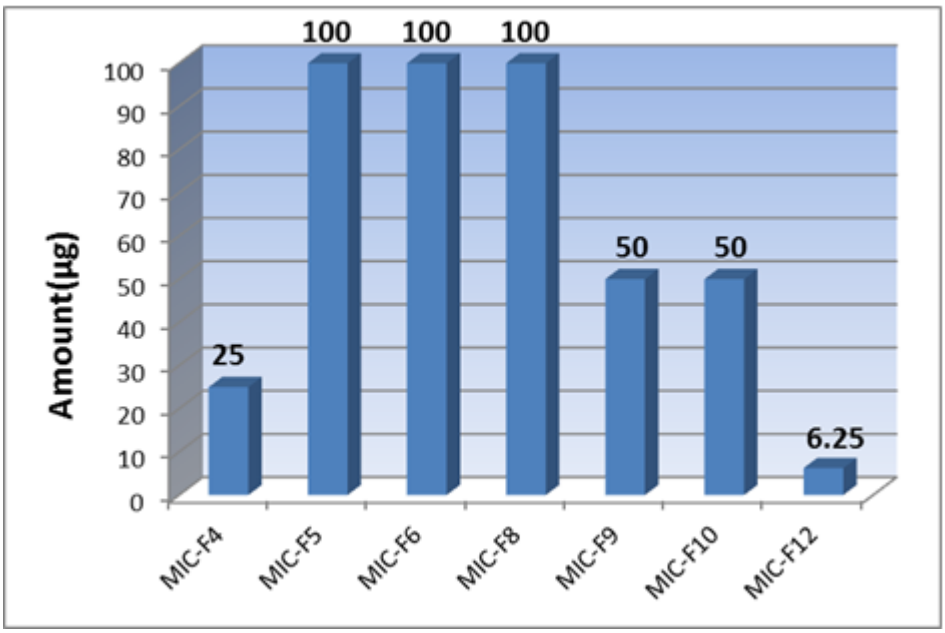
$$\frac{ODsample-ODnegative}{ODpositive-ODnegative}\times 100$$



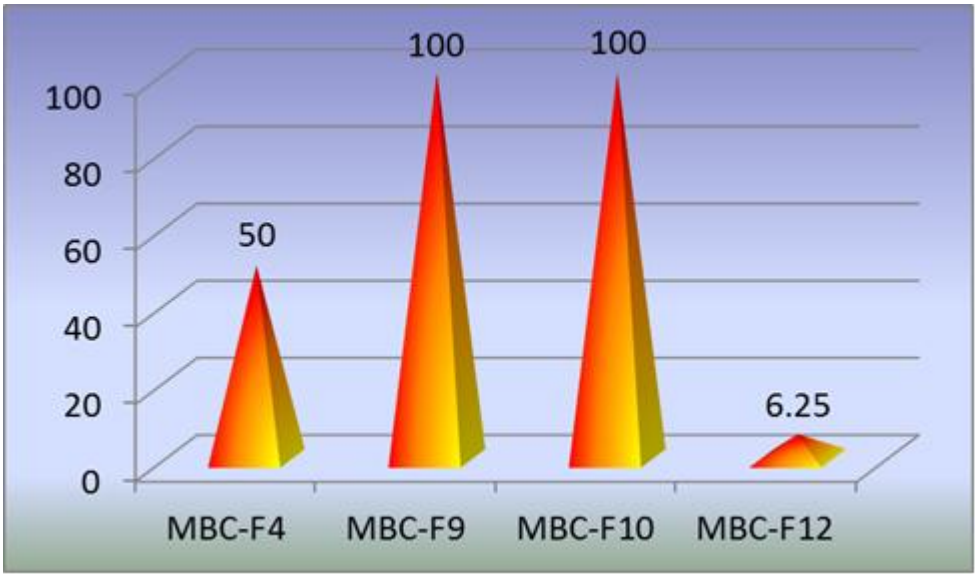
نمودار -۱ فراکشن های بدست آمده از کروماتوگرافی FPLC. براساس نتایج بدست آمده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون،تعداد ۸ فراکشن مشاهده گردید.



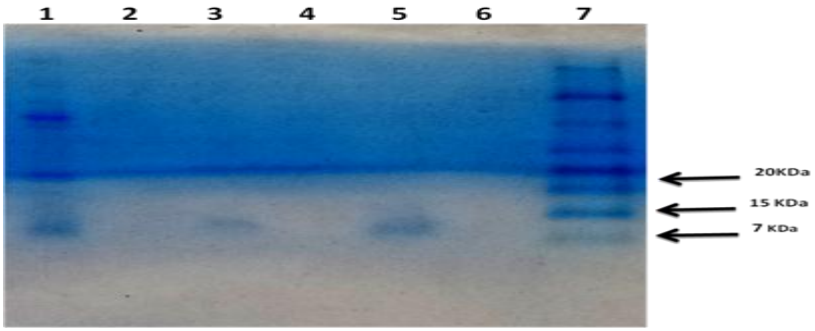
نمودار ۲- peak های به دست آمده با روش کروماتوگرافی HPLC فاز معکوس، بر اسا نتایج به دست آمده از کروماتوگرافی HPLC، تعداد ۱۲ فراکشن مشاهده گردید.



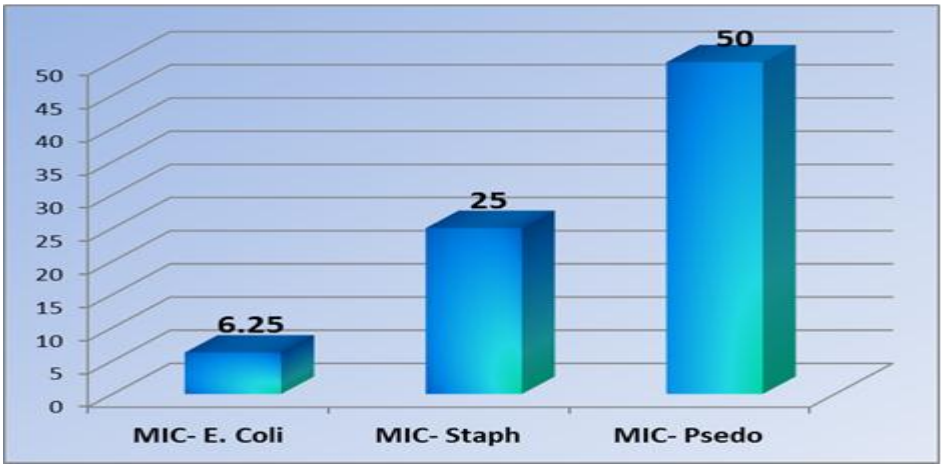
نمودار-۳. بررسی و انتخاب قوی ترین فراکنش آنتی باکتریال حاصل از HPLC فاز معکوس بر اساس MIC باکتری *E. coli* مقایسه نتایج نشان داد که فراکنش F12 از همه قوی تر بود.



نمودار-۴.بررسی و انتخاب قوی ترین فراکنش آنتی باکتریال حاصل از HPLC فاز معکوس بر اساس MBC باکتری *E. coli* مقایسه نتایج نشان داد که فراکنش F12 از همه قوی تر بود.

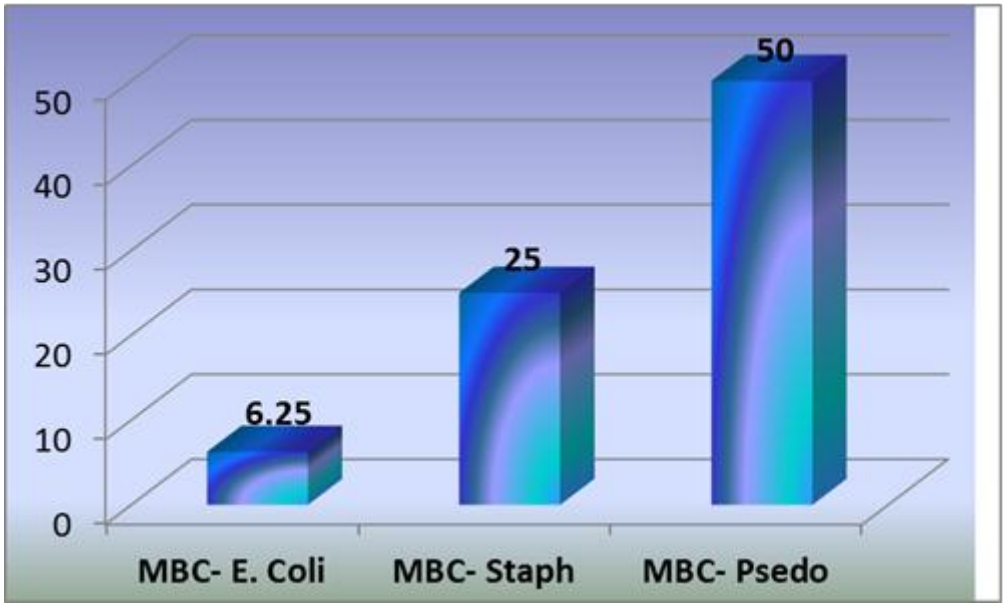


شکل -۱. الکتروفورز پپتید آنتی میکروبیال تخلیص شده به روش HPLC فاز معکوس. از چپ به راست: ۱. زهر خام مار کبری ۲. چاهک خالی ۳. فراکنش F12 در مقدار ۲ میکروگرم ۴. فراکنش F12 در مقدار ۵ میکروگرم ۶. چاهک خالی ۷. مارکر وزن مولکولی شرکت EURX (هلند)



نمودار-۵. مقایسه قدرت مهاری پپتید F12 بر باکتری های E. coli، S. aureus و P. aeruginosa بر اساس نتایج بدست آمده اثر مهاری پپتید F12 بر باکتری E. coli بیشتر از S. aureus و P. aeruginosa بود.

قدرت آنتی باکتریال پپتید F12 بر باکتری اشرشیا کلای بیشتر از استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا بود. همچنین قدرت آنتی باکتریال پپتید بر سودوموناس از سایر باکتری ها کمتر بود (نمودار-۶). این پپتید فاقد قدرت آنتی باکتریال بر باکتری آسینتوباکتر بومانی بود. پپتید F12 فاقد هر گونه فعالیت سمی همولیتیک بود.



نمودار-۶ مقایسه قدرت کشندگی پپتید F12 بر باکتری های *E. coli*، *S. aureus* و *P. aeruginosa* بعد از ۶ ساعت انکوباسیون پپتید با باکتری . بر اساس نتایج بدست آمده، اثر کشندگی پپتیدF12 بر باکتری *E.coli* بیشتر از *S. aureus* و *P. aeruginosa* بود.

بحث

آنتی بیوتیک‌ها ترکیبات طبیعی یا سنتتیک با خاصیت ضد میکروبی هستند که به طور وسیعی بر علیه عوامل بیماری زا در انسان مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۵). با آنکه داروهای ضد میکروبی در کاهش میزان بیماری‌زایی و مرگ و میر بسیاری از بیماری های عفونی نقش مهمی را ایفا نموده اند اما امروزه مقاومت های آنتی بیوتیکی مشکلات بالینی زیادی را ایجاد کرده و کماکان موارد مرگ و عوارض شدید ناشی از عفونت گزارش می‌شود (۱۶). قابل ذکر است که عفونت‌های بیمارستانی مقاوم به آنتی بیوتیک همواره یکی از مشکلات عمده بهداشتی و درمانی بوده و موجب افزایش مرگ و میر ناشی از این عفونت‌ها شده و همچنین با افزایش مدت اقامت بیمار در بیمارستان، هزینه های بیمارستانی را به شدت افزایش می‌دهند (۱۹-۱۷).

بیشترین مقاومت دارویی در بین باکتری‌های گرم منفی از جمله اشرشیا کلی، آسینتوباکتر بومانی، و سودوموناس آئروژینوزا که ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی، عفونت های مجاری ادراری و باکتریمی هستند، دیده می شود و می توان علت عمده آن را تولید آنزیم های بتالاکتاماز در آنها دانست. این باکتری ها با داشتن ژن کد کننده آنزیم های بتالاکتاماز بر روی پلاسمید و یا کروموزوم آن را به طور سریع در بین سویه های باکتریایی انتشار داده و مقاومت چند گانه به آنتی بیوتیک های وسیع الطیف را سبب شده اند. گسترش ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی از طریق ساختارهای اینتگرونی با ایجاد مقاومت های آنتی بیوتیکی چندگانه، به مشکل مهمی در درمان عفونت های حاصل از آسینتوباکترها تبدیل شده‌اند (۱۷). همچنین استافیلوکوک های مقاوم به متی سیلین از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی، عفونت زخم های جراحی و عفونت خون می‌باشند (۲۰و۱).

با توجه به مشکلات موجود، جستجوی آنتی بیوتیک های جدید نظر اکثر محققین و داروسازان و شرکت های مختلف داروسازی را به خود جلب کرده و از مهم ترین این مواد پپتیدهای آنتی میکروبیال می باشند که در سال های اخیر مطالعات گسترده ای در سراسر دنیا در مورد آن ها انجام گرفته است. پپتیدهای ضد میکروبی منبع طبیعی و ذاتی داشته و نقش بسیار مهمی در پاسخ ایمنی بدن میزبان بر علیه عفونت ها دارند (۹).

مقاومت باکتری ها به پپتیدهای ضد میکروبی در تحقیقات انجام شده نادر است، که دلیل این موضوع از بین رفتن سریع باکتری و عدم فرصت کافی باکتری جهت ایجاد جهش می باشد. این پپتیدها با فعالیت ضد باکتری، ضد قارچی و ضد ویروسی بر علیه انواع مختلفی از میکروارگانیسم ها شناخته می شوند. به علاوه این پپتیدها می توانند در جنبه های مختلف ایمنی از جمله در التهابات سپتیک و غیر سپتیک، ترمیم زخم، تنظیم سیستم ایمنی اکتسابی نقش موثر داشته باشند (۹).

امروزه از همولنف و زهر عقرب ها و مارهای خانواده کبری پپتیدهای آنتی میکروبیال متعددی نظیر Scorpine, cathelicidin, Hadrurin، Opistoporins و غیره جدا شده اند (۱۲-۱۴، ۲۲،۲۱).

اثر مهاری hadrurin بر روی باکتری هایی چون کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کلای مورد بررسی قرار گرفته، همچنین تاثیرات سایتولیتیک این پپتید بر روی اریتروسیت های خون انسان مشخص شده است (۲۳). شواهدی از وجود پپتید های آنتی باکتریال در زهر مار های کبری وجود دارد (۲۴). خانواده مار های کبری شامل گونه *Naja naja oxiana* ، *Naja. atra* (مار کبری ایرانی)، *Naja kaothia* (مار کبری پاکستانی)، و *Naja hannah* (شاه کبری چینی) می باشند. پپتید کاتلیسیدین یک پپتید آنتی باکتریال است که در زهر شاه کبری به خوبی مطالعه شده است (۱۲-۱۴). همچنین یک پپتید NATRIURETIC از مار کبری هندی و یک پپتید از مار کبری پاکستانی کشف شده اند (۲۵).

در ابتدای این پروژه، حدس زده شد که با توجه به وجود پپتیدهای ضد میکروبی در گونه های مشابه مار کبری، با احتمال زیاد در زهر مار کبری ایرانی نیز ممکن است پپتید مشابه وجود داشته باشد. در این مطالعه ابتدا زهر مار کبری به روش ژل فیلتراسیون فراکشن گیری شده و فعالیت آنتی باکتریال فراکشن ها بر سویه های استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. هر کدام از فراکشن ها که فعالیت ضد باکتری داشت، انتخاب شده و با تکنیک HPLC فاز معکوس مجددا فراکشن گیری گردید. سپس فعالیت آنتی باکتریال فراکشن های بدست آمده بررسی شده و هر کدام که مثبت بود فعالیت همولیتیک آن نیز آزمایش شد.

اهمیت این طرح تحقیقاتی، یافتن یک پپتید جدید با خواص ضد میکروبی از مار کبری ایرانی و بررسی اثر آن می باشد. باکتری های انتخاب شده جهت این تحقیق، هر کدام نماینده ای مناسب از دسته گرم مثبت ها، گرم منفی ها و دسته فرصت طلب ها یعنی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلای و آسینتوباکتر بومانی و سودوموناس آئروژینوزا بودند. جهت استاندارد سازی مطالعه از سویه های استاندارد ATCC استفاده گردید.

نتایج تست in vitro نشان داد که پپتید زهر مار کبری می تواند بر سه نوع باکتری اثر مهاری و کشندگی داشته باشد. اثر ضد باکتری آن (MIC) به ترتیب کاهشی اشریشیا کلای ۶/۲۵ میکروگرم، استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵ میکروگرم، سودوموناس آئروژینوزا ۵۰ میکروگرم، و آسینتوباکتر بیشتر از ۱۰۰ میکروگرم بود. در تمامی نمونه ها کدورت کنترل مثبت بالا بوده و و بعد از کشت به صورت غیر قابل شمارش رشد کرده بود.

اشرشیا کلای به عنوان یک باکتری گرم منفی دارای دو غشاء خارجی و داخلی از جنس فسفولیپید بوده و پیچیدگی زیادی ندارد و به همین دلیل اثر پپتید بر آن بیشتر بوده است.

استافیلوکوکوس اورئوس دارای یک غشاء پیچیده با ترکیبی از حدود ۵۰ لایه پپتیدوگلیگان و یک غشاء دو لایه است. در نگاه اول به نظر می رسد که استافیلوکوکس اورئوس از دیگر باکتری ها نسبت به پپتید زهر کبری مقاوم تر باشد اما مقاومت سودوموناس آئروژینوزا از استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر بود. دلیل این موضوع می تواند وجود لایه های پلی ساکاریدی با نفوذپذیری کم در اطراف باکتری سودوموناس آئروژینوزا باشد.

اینکه پپتید زهر کبری چگونه می تواند به غشاء زیرین لایه های پپتیدوگلیگان باکتری استافیلوکوکس اورئوس دسترسی پیدا کرده و باعث از بین رفتن باکتری گردد، باید در مطالعات تکمیلی مورد بررسی قرار گیرد.

برای بررسی اثر همولیز پپتید های زهر مار کبری ایرانی از تست همولیز گلبول های قرمز انسان استفاده شد و طبق نتایج به دست آمده این پپتید خاصیت همولیتیک بر روی گلبول های قرمز را نداشت در نتیجه می توان کاندید خوبی برای ترزیق وریدی و درمان سپتی سمی در مطالعات تکمیلی باشد.

با توجه به اینکه اکثر پپتید های آنتی میکروبیال هیدروفوبیسته متوسط یا سطح بالایی دارند در این تحقیق نیز پیک شماره ۱۲ که پیک انتهایی محسوب می شود در درصد بالاتری از استونیتریل نسبت به بقیه پیک ها از ستون جدا شد که این نشان دهنده ی این مطلب است که پپتید آنتی میکروبیال مار کبری ایرانی نیز دارای هیدروفوبیسته نسبتا بالایی باشد.

مقایسه نتایج MIC پپتید مار کبری ایرانی با کاتلسیدین نشان داد که اثر پپتید شاه کبری چینی علیه باکتری های گرم منفی تا حدودی مشابه مار ایرانی بوده است اما اثر پپتید شاه کبری علیه استافیلوکوکوس اورئوس از مار ایرانی قوی تر بوده است.

پپتید مار کبری ایرانی خاصیت باکتریسیدال کامل داشته و در نتیجه به تدریج باکتری‌ها را از بین می برد و لذا حدس زده می شود که عوارض شوک سپتیک نداشته باشد. هر دو پپتید کاتلیسیدین و پپتید مار کبری ایرانی خاصیت همولیتیک ندارند و می توان در آینده از آن ها در درمان سپتی سمی استفاده کرد.

Wangو همکاران در سال ۲۰۱۰ پپتید کاتلیسیدین BF را در زهر مار Bungarus fasciatus بدست آورده و خاصیت آنتی میکروبیال آن را بر روی باکتری های اشریشیا کلای و سودوموناس آئروژینوزا و استاف اورئوس بررسی کرده اند و نتایج حاصل نشان داد که BF اثر آنتی باکتریال قدرتمندی دارد (۲۶). طبق نتایج بدست آمده از پپتید کاتلیسیدین BF در زهر مار Bungarus fasciatus ، MIC استافیلوکوکوس اورئوس برابر ۳/۲ میکروگرم بوده در حالی که MIC استافیلوکوکوس اورئوس در زهر مار کبری ایرانی برابر با ۲۵ میکروگرم می‌باشد که نشان دهنده این است که پپتید کاتلیسیدین BF در زهر مار Bungarus fasciatus از زهر مار کبری ایرانی قوی تر است. MIC سودوموناس آئروژینوزا برابر ۲ میکروگرم بوده و MIC سودوموناس آئروژینوزا از زهر مار کبری ایرانی برابر ۵۰ میکروگرم می‌باشد. MIC اشرشیا کلی حاصل از زهر مار Bungarus fasciatus برابر ۳ میکروگرم بوده ولی MIC اشرشیا کلی از زهر مار کبری ایرانی برابر۶/۲۵ میکروگرم بدست آمد که نتایج فوق نشان دهنده این است که پپتید کاتلیسیدین BF در زهر مار Bungarus fasciatus قوی تر از مار کبری ایرانی است (۲۶).

Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۰ پپتید آنتی میکروبیال OH-CATH را در زهر شاه کبری بر روی سویه های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلای و سودوموناس آئروژینوزا بررسی کرده و نتایج MIC سه باکتری فوق به ترتیب شامل ۰/۸ میکروگرم و ۰/۸ میکروگرم و ۳/۲ میکروگرم می باشد در حالیکه نتایج MIC حاصل از زهر مار کبری ایرانی به ترتیب سه باکتری فوق برابر با ۲۵ میکروگرم، ۶/۲۵ میکروگرم و ۵۰ میکروگرم می‌باشد که نشان دهنده این است که پپتید آنتی میکروبیال-OH CATH زهر شاه کبری از مار کبری ایرانی قوی‌تر است. MIC حاصل از پپتید آنتی میکروبیال OH-CATH در زهر مار شاه کبری بر سودوموناس آئروژینوزا برابر با ۱۲/۵ میکروگرم بوده در حالیکه MIC حاصل از مار کبری ایرانی بر سودوموناس آئروژینوزا برابر با ۵۰ میکروگرم می باشد و این بیان کننده این است که اثر پپتید آنتی میکروبیال OH-CATH در زهر مار شاه کبری ۴ برابر از نوع پپتید آنتی میکروبیال مار کبری ایرانی قویتر است (۱۱).

Sachidananda و همکاران در سال ۲۰۰۷ زهر مار کبری هندی را به منظور جداسازی پپتیدهای آنتی میکروبیال جداسازی کرده و خاصیت آنتی میکروبیال مار کبری هندی را بر روی سویه های گرم منفی استاندارد نظیر اشریشیا کلی، سودوموناس و ویبریو کلرا و بر روی باکتری های گرم مثبت استاندارد نظیر استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و استرپتوکوکوس پنومونیه مورد بررسی قرار دادند. نتایج SCHIDANADA و همکاران نشان داد که این پپتید خاصیت همولیتیک نداشته است و پپتید مار کبری ایرانی نیز خاصیت همولیتیک نداشته و از این بابت مشابه مار کبری هندی می باشد (۲۷).

MIC حاصل از مار کبری هندی بر *E. coli* برابر با ۱۳۰ میکروگرم بوده در حالیکه MIC حاصل از مار کبری ایرانی بر *E. coli* برابر با ۶/۲۵ میکروگرم می باشد که بیانگر این است که خاصیت آنتی باکتریال زهر مار کبری ایرانی از زهر مار کبری هندی ۲۰ برابر بیشتر بوده است. همچنین MIC حاصل از مار کبری هندی بر استافیلو کوکوس اورئوس برابر با ۲۰۰< MIC بیان شده (۱۲) در صورتی که در این تحقیق MIC استافیلوکوکوس اورئوس برابر با ۲۵ میکروگرم بدست آمده که نشان دهنده این است که مار کبری ایرانی حداقل هشت برابر قوی تر از مار کبری هندی است. MIC حاصل از مار کبری هندی بر سودوموناس آئروژینوزا برابر با ۱۰۰ میکروگرم بوده در حالیکه MIC حاصل از مار کبری ایرانی بر سودوموناس آئروژینوزا برابر با ۵۰ میکروگرم می باشد که بیان کننده آن است که مار کبری ایرانی از مار کبری هندی دو برابر قوی تر اثر میکند.

در این تحقیق برای اولین بار یک پپتید آنتی میکروبیال از زهر مار کبری ایرانی بدست آمد. نتایج نشان داد که این پپتید همولیتیک نیست و می توان پیشنهاد داد که اثر سمیت این پپتید بر روی مدل حیوانی مورد بررسی قرار گیرد.

نتایج بدست آمده امیدوار کننده بوده و انگیزه را برای ادامه تحقیقات در این زمینه ایجاد کرده است، زیرا می توان پپتیدهای خالص شده را در نمونه های حیوانی مورد بررسی قرار داد. اگر بتوان شرایط را برای انجام مراحل مختلفی نظیر بررسی مکانیسم عمل پپتید در میزبان زنده، عوارض و پاسخ های بدن میزبان، دوز مناسب برای مصرف و... فراهم کرد، رسیدن به هدف کاربردی که ایجاد داروهای موثر جدید در مقابل عوامل بیماری زای مقاوم به آنتی بیوتیک های معمولی است، خیلی دور از ذهن نخواهد بود.

REFERENCES

1. Lee HG, Jang J, Choi JE, Chung DC, Han JW, Woo H, Jeon W, Chun BC. Blood stream infections in patients in the burn intensive care unit. Infection & chemotherapy. 2013 Jun 1;45(2):194-201.

2. Bhat KG, Ninan R, Mallya S. Fluoroquinolone resistant bacteria in nosocomial UTI. Tropical doctor. 1998 Oct 1;28(4):250-1.

3. Cross A, Allen JR, Burke J, Ducel G, Harris A, John J, Johnson D, Lew M, MacMillan B, Meers P, Skalova R. Nosocomial infections due to Pseudomonas aeruginosa: review of recent trends. Review of Infectious Diseases. 1983 Nov 1;5(Supplement 5):S837-45.

4. Hayley RW, Culver DH, White JW, Morgan WM, Emori TG. The nationwide nosocomial infection rate. Am J Epidemiol. 1985;121:159-67.

5. Evans RP. Surgical site infection prevention and control: an emerging paradigm. J Bone Joint Surg Am. 2009 Nov 1;91(Supplement 6):2-9.

6. Tancheva D, Hadjiiski O. Effect of early nutritional support on clinical course and septic complications in patients with severe burns. Annals of burns and fire disasters. 2005 Jun 30;18(2):74.

7. Dai T, Huang YY, K Sharma S, T Hashmi J, B Kurup D, R Hamblin M. Topical antimicrobials for burn wound infections. Recent patents on anti-infective drug discovery. 2010 Jun 1;5(2):124-51.

8. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. Nature Reviews Microbiology. 2005 Mar 1;3(3):238-50.

9. Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews. 2006 Jul 1;19(3):491-511.

10. Dean SN, Bishop BM, Van Hoek ML. Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa biofilm to alpha-helical peptides: D-enantiomer of LL-37. Front. Microbiol. 2011 Jan 1;2.

11. Zhang Y, Zhao H, Yu GY, Liu XD, Shen JH, Lee WH, Zhang Y. Structure–function relationship of king cobra cathelicidin. Peptides. 2010 Aug 31;31(8):1488-93.

12. de Latour FA, Amer LS, Papanstasiou EA, Bishop BM, van Hoek ML. Antimicrobial activity of the Naja atra cathelicidin and related small peptides. Biochemical and biophysical research communications. 2010 Jun 11;396(4):825-30.

13. Amer LS, Bishop BM, van Hoek ML. Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against Francisella. Biochemical and biophysical research communications. 2010 May 28;396(2):246-51.

14. Dean SN, Bishop BM, van Hoek ML. Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against Staphylococcus aureus. BMC microbiology. 2011 May 23;11(1):1.

15. G.F, et al. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 26th ed: New York: Mc Graw Hill Medical; 2012. 85-112.

16. Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed: New York: McGraw-Hill Medical; 2011. 187-196.

17. Eliopoulos GM, Maragakis LL, Perl TM. Acinetobacter baumannii: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clinical infectious diseases. 2008 Apr 15;46(8):1254-63.

18. Jamaati HR, Malekmohammad M, Hashemian MR, Nayebi M, Basharzad N. Ventilator-Associated Pneumonia: Evaluation of Etiology, Microbiology and Resistance Patterns in a Tertiary Respiratory Center. Tanaffos. 2010 Jan 1;9(1):21-7.

19. Leone M, Garnier F, Dubuc M, Bimar MC, Martin C. Prevention of nosocomial urinary tract infection in ICU patients: Comparison of effectiveness of two urinary drainage systems. CHEST Journal. 2001 Jul 1;120(1):220-4.

20. Watkins RR, David MZ, Salata RA. Current concepts on the virulence mechanisms of meticillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of medical microbiology. 2012 Sep 1;61(9):1179-93.

21. Dean SN, Bishop BM, van Hoek ML. Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against Staphylococcus aureus. BMC microbiology. 2011 May 23;11(1):1.

22. Torres-Larios A, Gurrola GB, Zamudio FZ, Possani LD. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion Hadrurus aztecus. European Journal of Biochemistry. 2000 Aug 1;267(16):5023-31.

23. Moerman L, Bosteels S, Noppe W, Willems J, Clynen E, Schoofs L, Thevissen K, Tytgat J, Van Eldere J, Van Der Walt J, Verdonck F. Antibacterial and antifungal properties of α-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. European Journal of Biochemistry. 2002 Oct 1;269(19):4799-810.

24. Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. Nucleic acids research. 2009 Jan 1;37(suppl 1):D933-7.

25. Stiles BG, Sexton FW, Weinstein SA. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from Pseudechis australis (Australian king brown or mulga snake) venom. Toxicon. 1991 Dec 31;29(9):1129-41.

26. Wang Y, Hong J, Liu X, Yang H, Liu R, Wu J, Wang A, Lin D, Lai R. Snake cathelicidin from Bungarus fasciatus is a potent peptide antibiotics. PLoS One. 2008 Sep 16;3(9):e3217.

27. Sachidananda MK, Murari SK, Channe Gowda D. Characterization of an antibacterial peptide from Indian cobra (Naja naja) venom. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2007;13(2):446-61.