اثر ضد بیوفیلم پپتید ملیتین علیه جدایه های کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از عفونت های سوختگی بیمارستانی

ریحانه شمس خوزانی [۱]، دلاور شهباززاده [۲]، محمد مهدی فیض آبادی[۳]، ناصر هرزندی[۱]، کامران بوشنگ باقری[۲]*

۱-گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرج ، دانشگاه آزاد اسلامی. کرج، ایران
۲- آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران. تهران- ایران
۳-گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران. تهران- ایران

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

دریافت مقاله: تیر نود و نه پذیرش برای چاپ: مرداد نود و نه

چکیده

سابقه و هدف: *بیوفیلم اجتماعی از میکروارگانیسم ها است که به یک سطح متصل شده و توسط مواد پلی‌مری خارج سلولی پوشیده می شوند. گاهی بیوفیلم را می‌توان به عنوان یک استراتژی دانست که بعضی از میکروارگانیسم ها از آن استفاده می‌کنند تا بتوانند خود را از اثرات زیانباری که در محیط طبیعی و بدن میزبان است حفظ کرده و اینگونه شانس بقای خود را افزایش دهند. هدف این مطالعه بررسی اثر ضد بیوفیلم پپتید ملیتین روی سویه های کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده بیوفیلم جدا شده از عفونت های سوختگی بیمارستانی بود.*

روش کار: *در این مطالعه میزان اثر ضد بیوفیلمی، میزان درصد کاهش تشکیل بیوفیلم و کینتیک تخریب بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا در غلظت های مختلف ملیتین به روش رنگ سنجی با کریستال ویوله اندازه گیری شد. عدم رشد در محیط مولر هینتون اگار و کاهش دانسیته اپتیک نشان دهنده تاثیر پپتید ملیتین بر روی بیوفیلم باکتری سودوموناس ائروژینوزا می باشد.*

یافته ها: *نتایج تخریب و کشندگی باکتری های داخل بیوفیلم نشان داد که ملیتین می تواند در مدت کوتاهی در عرض ۲ ساعت از بیوفیلم عبور کرده و باکتری های داخل آن را نابود کند. در همین راستا نتایج درصد کاهش تشکیل بیوفیلم نیز نشان داد که در ۱۸ ساعت بیشترین کاهش رخ داده است.*

نتیجه گیری: *ملیتین به مقدار ۴ و ۸ میکروگرم تمام باکتری های پلانکتونیک مورد بررسی را مهار یا از بین برد در حالی که در ۵۰ میکروگرم لایه بیوفیلم را تخریب و تمام باکتری های داخل آن پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از بین برد. نتایج این پژوهش از این لحاظ با ارزش است که امید جهت درمان عفونت های سودوموناسی مرتبط با بیوفیلم در مبتلایان به سوختگی درجه ۳ را افزایش می دهد.*

واژگان کلیدی: بیوفیلم، سودوموناس آئروژینوزا، عفونت سوختگی، پپتید آنتی میکروبیال، ملیتین

مقدمه

یکی از شناخته شده ترین باکتری های گرم منفی عامل عفونت سوختگی، سودوموناس ائروژینوزا می باشد. از مهم ترین چالش های درمان عفونت در بیماران سوختگی، افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی و ایجاد سوش های مقاوم به درمان می باشد. محققان به دلیل اهمیت بیوفیلم در ایجاد بیماری ها و مقاومت دارویی در جستجوی راه های مناسبی برای مهار و پیشگیری از تشکیل بیوفیلم هستند. خصوصیات آگزوپلی ساکاریدی بیوفیلم مانع درمان موثر بیوفیلم می گردد. آنتی بیوتیک به اگزوپلی ساکارید وارد شده اما در آن رقیق شده و زمانی که به سلول باکتری می رسد غلظت کافی برای از بین بردن باکتری ها را پیدا نمی کند. به همین علت در درمان بیوفیلم توصیه می شود دارو با دوز بالا تجویز شود. در واقع بیوفیلم به عنوان سد غیر قابل نفوذ عمل کرده و مانع نفوذ آنتی بیوتیک شده و یا با مولکولهای اگزو پلی ساکارید واکنش می دهد.شارژمنفی اگزوپلی ساکارید از ورود آنتی بیوتیک های با شارژ مثبت مانند آمینوگلیکوزیدها به دلیل اتصال مولکولی یا واکنش شیمیایی جلوگیری می نماید. اگر آنتی بیوتیک به سطح بیوفیلم اتصال یابد طبیعی است که نمی تواند به عمق بیوفیلم نفوذ و اثر نماید. ماتریکس بیوفیلم سودوموناس ائروژینوزا حاوی آلژینات، پروتئین های میزبان و DNA خارج سلولی است (۱).عوامل اصلی تعیین کننده ویرولانس در این باکتری نه تنها شامل فاکتورهای سطحی باکتریایی، فلاژل، پیلی و پلی ساکارید ها هستند بلکه فرایندهای فعالی مانند ترشح توکسین، تولید بیوفیلم و کروم سنسینگ نیز در این دسته قرار می گیرند. با هدف قرار دادن این فاکتورها می توان درمانهای تازه ای برای عفونت های شدید ناشی از سودوموناس آئروژینوزا طراحی کرد. علاوه بر این زمانی که باکتری ها در فرم بیوفیلم هستند ،۱۰ تا ۱۰۰۰ برابر مقاومت بیشتری نسبت به انتی بیوتیک ها نشان می دهند (۲).استفاده از پپتیدهای آنتی میکروبیال می تواند راه حل مناسبی برای این مشکل باشد. این پپتیدها به دلیل خصوصیات مناسب مانند کشندگی سریع و طیف وسیع فعالیت، بسیار مورد توجه هستند (۳).در این تحقیق از پپتید ضد میکروبی ملیتین که از زهر زنبور عسل استخراج کردیم، استفاده شد. با توجه به این که ملیتین دارای اثر ضد باکتری بر سویه های استاندارد می باشد، جهت بررسی اثر مهاری و کشندگی بر سویه های بیمارستانی در محیط آزمایشگاهی به عنوان یک کاندید مناسب انتخاب گردید (۴). ویژگی های پپتیدهای آنتی میکروبیال ها از جمله اندازه کوچک (۱۲-۶۰ اسید آمینه)، بار مثبت بین + ۲ تا + ۹ ، آبگریزی در حدود ۵۰٪ ، و دستیابی به ساختارهای ثانویه مختلف در غشا است. ملیتین یک پپتید کاتیونی است که از ۲۶ اسید آمینه تشکیل شده و از لحاظ ساختاری دارای ساختار مارپیچ آلفا است. ۲۰ اسیدآمینه اول ملیتین در ناحیه (N-terminal) عمدتاً اسیدهای آمینه آبگریز هستند. این ناحیه به پپتید اجازه می دهد تا با غشاهای فسفولیپید ارتباط برقرار کند (۵). در مقایسه با داروهای ضد میکروبی معمولی، پپتیدهای ضد میکروبی دارای چندین مزیت جذاب از جمله کشتن سریع و فعالیت ضد میکروبی با طیف گسترده، و به طور معمول عدم القای مقاومت باکتریایی هستند. پپتیدهای ضدمیکروبی ابتدا به غشا متصل می شوند و بعدا به لایه های زیرین حمله می کنند و تخریب باکتری توسط مکانیسم تشکیل منافذ صورت می گیرد (۶). در این مطالعه ملیتین به عنوان یک کاندیدای قدرتمند برای اثبات این فرضیه که پپتید ملیتین می تواند لایه های بیوفیلم را تخریب کرده و باکتریهای حاوی آن را از بین ببرد، به کار برده شد.

روش کار

نمونه های سودوموناس ائروژینوزا در بیمارستان شهید مطهری از بیماران دچار عفونت سوختگی در یک دوره یکساله جمع اوری شدند. تعداد نمونه های مورد بررسی ۳۰ عدد بوده است. باکتری ها بعد از کشت در محیط stock حاوی ۲۰٪ گلیسرول و در دمای ۲۰- نگه داشته شدند. جدایه های تولید کننده بیوفیلم مثبت قوی جدا شدند.

زهر زنبور عسل خریداری شد. سپس برای آماده سازی زهر ابتدا ۲۰ میلی گرم از آن در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل شده و سپس در ۱۲۴۷۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. برای تخلیص ملیتین از زهر زنبور از کروماتوگرافی فاز معکوس و ستون C۱۸ استفاده شد. محلول های مورد استفاده در این آزمایش شامل محلول B (استونیتریل به همراه آب TFA ۰/۰۵ ٪(تری فلورواستیک اسید) و محلول D (آب دیونیزه به همراه آب TFA ۰/۰۵ ٪ بود. برای لیوفیلیزه کردن نمونه ها ابتدا ملیتین تخلیص شده را در یک بشر ریخته و جهت خشک کردن، به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه فریز درایر قرار گرفت. برای تعیین غلظت ملیتین از روش BCA استفاده و بعد دانسیته اپتیک آن در طول موج ۵۶۲ نانومتر خوانده شد و غلظت نهایی محاسبه گردید.

برای تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) ملیتین، مقدار ۱۶ میکروگرم در حجم ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک اول اضافه شده و مقادیر بعدی به صورت رقیق سازی سریالی با ضریب۱/۲ تهیه شد. پس از رقت سازی به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر باکتری با تعداد $10^5 \times 5$ عدد اضافه گردید و میکروپلیت به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از آن تعداد کلنی های رشد کرده در محیط، شمارش گردید.

جهت بررسی تولید بیوفیلم در جدایه های مورد بررسی، در پلیت ۹۶ خانه ای برای هر باکتری دو چاهک در نظر گرفته شد. چاهک اول مربوط به TSB با گلوکز ۱٪ و بدون باکتری (به عنوان کنترل ۲۰۰ میکرولیتر) و چاهک دوم TSB با گلوکز ۱٪ (۱۰۰میکرولیتر) و سوسپانسیون باکتری (۱۰۰میکرولیتر) می باشد. تعداد 10^7 باکتری از هر جدایه به میکروپلیت ۹۶ خانه ای اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. سپس محلول

رویی با سمپلر از هر دو چاهک برداشته و با سرم فیزیولوژی سه مرتبه چاهک ها شسته شدند. سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر متانول ۱۰۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه اضافه گردید. سپس محلول داخل چاهک دور ریخته شده و به آن ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه اینکوبه شد. سپس رنگ با سمپلر خارج شده و چندین بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد تا رنگ اضافه شسته شود. بعد از خشک شدن چاهک ها ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ به همه چاهک ها اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. محلول رویی به یک چاهک دیگر منتقل شده و در نهایت دانسیته اپتیک پلیت در طول موج ۵۹۵ نانومتر با اسپکتوفوتومتر ثبت گردید.

جهت بررسی اثر تخریبی ملیتین بر بیوفیلم جدایه ها، ابتدا طبق روش فوق بیوفیلم جدایه ها در چاهک های میکروپلیت تشکیل گردید. سپس مقادیر مختلف ملیتین به روش رقت سازی سریال از ۵۰تا ۰/۶۲میکروگرم تهیه گردید و به چاهک های شسته شده اضافه گردید. بعد از طی زمان ۶ ساعت، طبق روش فوق چاهک ها به آرامی شسته شده و رنگ آمیزی گردید. سپس دانسیته اپتیک نمونه ها خوانده شد. کاهش دانسیته اپتیک در چاهک ها نشان دهنده تخریب بیوفیلم تلقی گردید. به منظور بررسی اثر کشندگی ملیتین بر باکتری های داخل بیوفیلم ، به روش فوق ملیتین تهیه شده و به بیوفیلم تشکیل شده اضافه گردید. بعد از طی زمان ۶ ساعت، کف چاهک ها با یک سرسمپلر خراشیده شده و حجم ۱۰ میکرولیتراز سوسپانسون باکتری در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس بعد از زمان ۲۴ ساعت، تعداد کلنی های باکتری ها شمارش گردید. محیط کشت TSB حاوی قند گلوکز و TSB حاوی قند و باکتری به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت جهت کنترل کیفی نتایج مورد استفاده قرار گرفت.

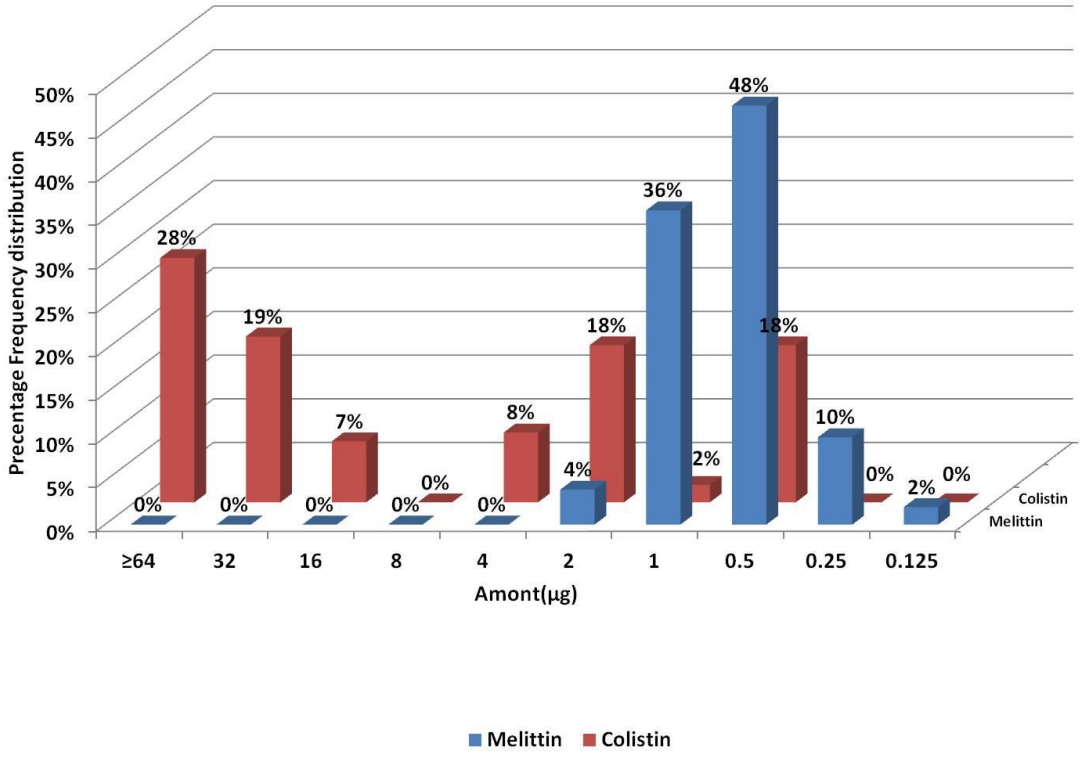
یافته ها

در بین ۳۰ سویه، ۱۸/۲٪ (۶ مورد) مقاوم و۱۸/۲٪ (۶ مورد) حساس به تمام آنتی بیوتیک های مورد بررسی بودند (جدول ۱)

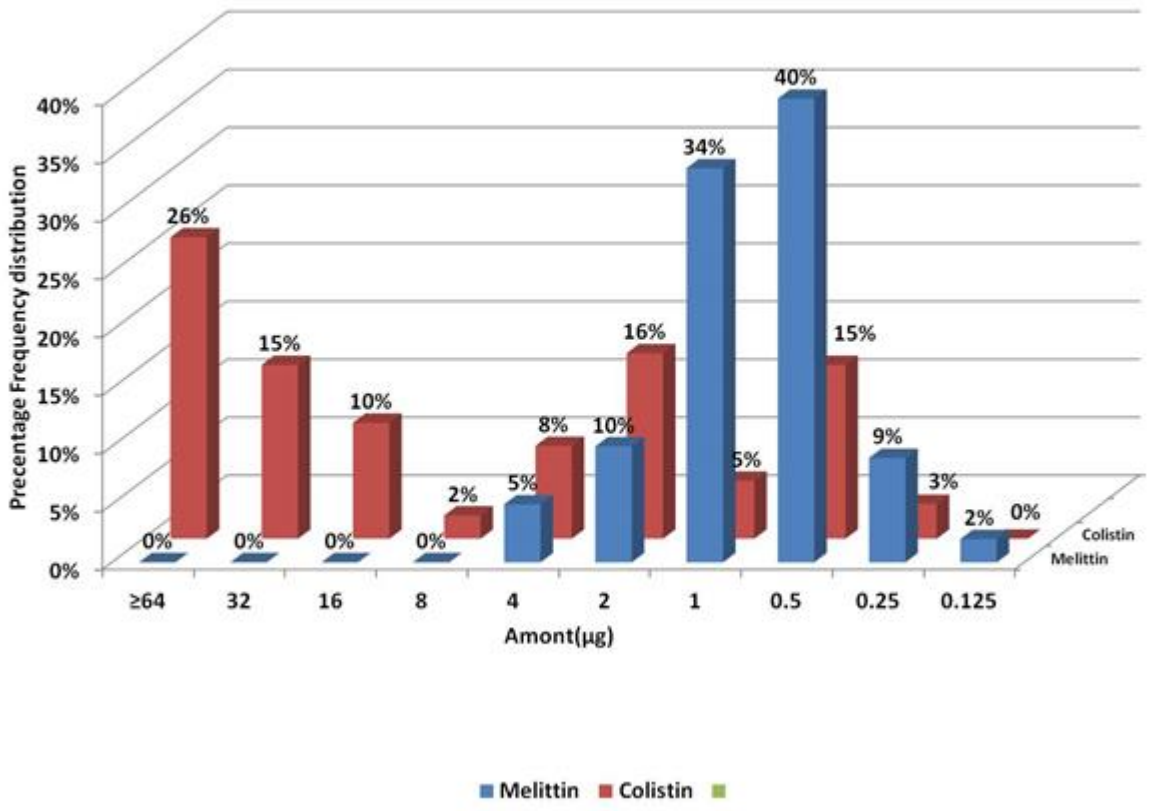
جدول ۱: نتایج انتی بیوگرام برای ایزوله های سودوموناس آیروژینوزا

نوع دیسک	نیمه حساس درصد	مقاوم درصد	حساس درصد
جنتامایسین(GM)	%۲۵	%۵	**%۷۰**
سفتازیدیم (CAZ)	%۴۶	%۰	**%۵۴**
سیپروفلوکساسین (CIP)	%۴۰	%۲	**%۵۸**
دوری پنم (DOR)	%۷۵	%۱۵	**%۲۰**
لووفلوکساسین(Lev)	%۶۶	%۰	**%۳۴**
سفتازیدیم(Ceph)	%۴۵	%۰	**%۵۵**
مروپنم(Meropenem)	%۳۴	%۲	**%۶۴**
ایمی پنم(Imipenem)	%۴۳	%۴	**%۵۳**

ملیتین به ترتیب در مقادیر ۴ و ۸ میکروگرم باعث مهار و کشته شدن تمام سویه های مورد بررسی شد(نمودار ۱و۲). اکثر جدایه ها در مقادیر کمی از ملیتین مهار شدند. ملیتین به مقدار ۴ میکروگرم رشد تمام جدایه ها را مهار کرد. مطابق نمودار کلستین در حداکثر غلظت ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر نتوانست همه جدایه ها را مهار کند (نمودار ۱). طبق نتایج آزمون t تفاوت عمده ای بین MIC کلیستین و ملیتین مشاهده شد (مقدار $P < ۰/۰۵$). مقایسه نتایج MIC و MBC ملیتین با کلیستین نشان داد که ملیتین به ترتیب ۱۶ و ۸ برابر فعالیت مهار رشد و کشندگی بیشتری نسبت به کلیستین دارد.

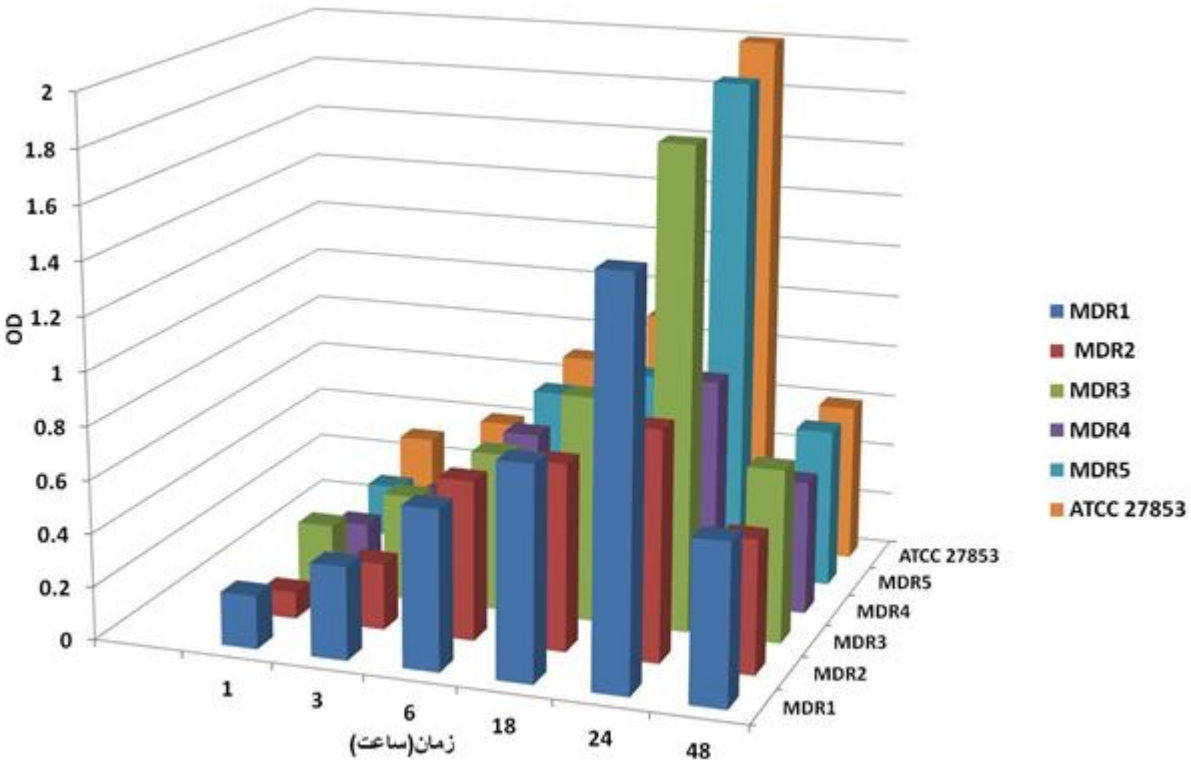


نمودار ۱: توزیع فراوانی MIC برای ملیتین و کلیستین. اکثر سویه ها در مقادیر کمی از ملیتین مهار شدند. ملیتین به مقدار ۴ میکروگرم رشد تمام سویه ها را مهار کرد. مطابق نمودار کلستین در حداکثر غلظت ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر نتوانست همه جدا شده ها را مهار کند. تفاوت عمده ای بین MIC کلیستین و ملیتین مشاهد شد (P <۰/۰۵)



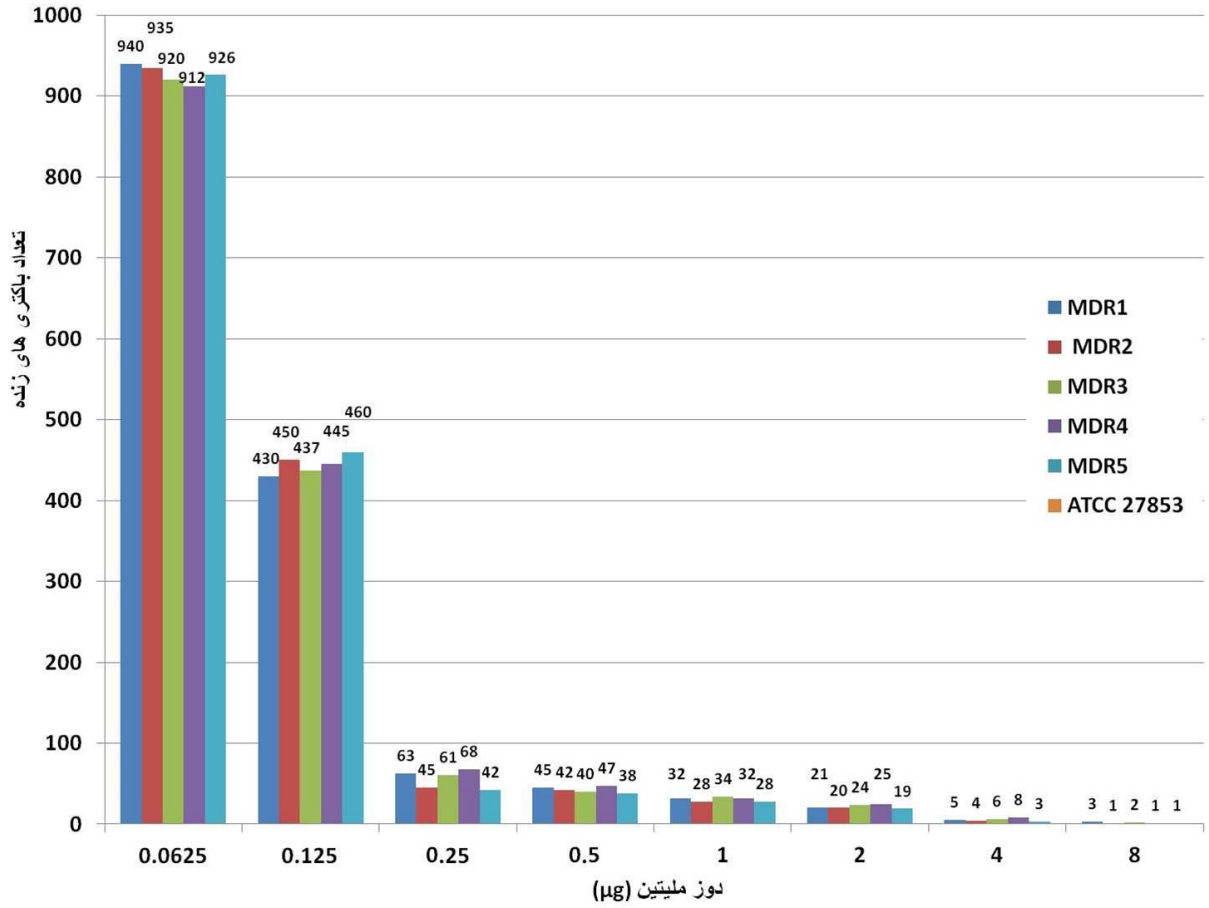
نمودار ۲: توزیع فراوانی MBC برای ملیتین و کلیستین. با توجه به نتایج، اکثر سویه ها در مقایسه، با مقادیر کمتری از ملیتین کشته شدند. ملیتین به مقدار ۸ میکروگرم توانست ۱۰۰ درصد سویه ها را نابود کند. کلیستین در حداکثر غلظت ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر قادر به از بین بردن همه موارد نبود .در کل تفاوت عمده ای بین MBC آنتی بیوتیک کلیستین و ملیتین وجود دارد (P <۰/۰۵)

بالاترین میزان دانسیته اپتیک برای همه جدایه های مـورد بررسـی پس از ۲۴ ساعت بین ۰/۵ تا ۲ بود. شـیب تشـکیل بیـوفیلم در ۲۴ ساعت به سرعت بالا بود و پس از آن یک کـاهش واضـح در سـاعت ۴۸ دیده شد (نمودار ۳).



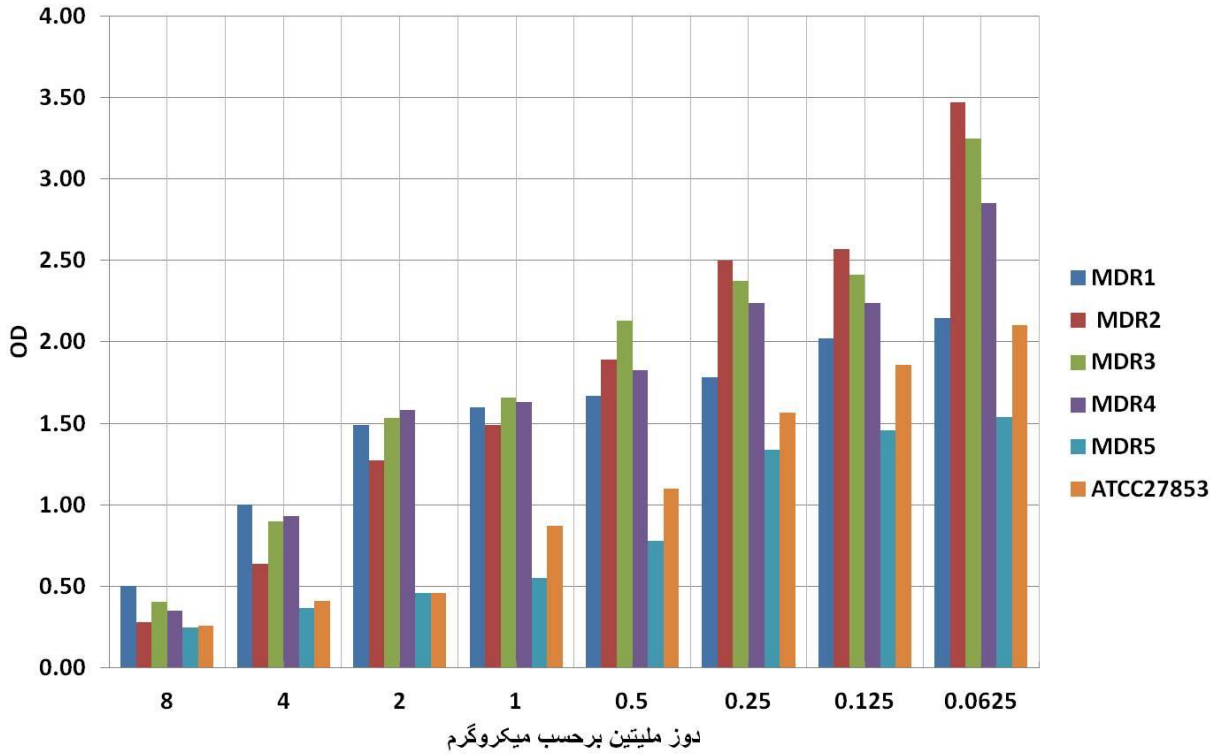
نمودار ۳: کینتیک تشکیل بیوفیلم. طبق نمودار، مدت زمان ۲۴ ساعت، اوج تولید بیوفیلم در سویه های مورد بررسی بود.

در مقدار ۸ میکروگرم، ملیتین توانست اکثر باکتری ها را نابود کند اما در مقدار ۵۰ میکروگرم پس از ۴۸ ساعت تمام باکتری ها را کاملاً ریشه کن کرد. این مسئله نشان داد که ملیتین پایداری خود را در این مدت حفظ می کند، به تدریج بـه لایـه های بیوفیلم نفوذ می کنـد و سـپس فعالیـت هـای کشـندگی خود را القا می کند(نمودار ۴).



نمودار ۴: منحنی کینتیک کشندگی، توانایی ملیتین را در از بین بردن باکتریهای داخل بیوفیلم نشان می دهد.

مقادیر صعودی مختلف ملیتین از ۰/۰۶ تا ۸ میکروگرم تهیه و به بیوفیلم از پیش تشکیل شده اضافه شد. ارزیابی فعالیت ملیتین نشان داد که مقدار ۸ میکروگرم بیشترین فعالیت را برای تخریب لایه بیوفیلم در مقایسه با سایر دوزها داشت (نمودار ۵).



نمودار ۵: نتایج بررسی تخریب بیوفیلم توسط ملیتین به روش اسپکتروفوتومتری. با افزایش مقدار ملیتین میزان OD کاهش یافت که این نتیجه نشان دهنده تخریب بیوفیلم باکتری است.

بحث

بیوفیلم از عوامل مهم مرگ و میر در بیماران سوختگی است. در پنج روز اول پس از سوختگی، ۷۳٪ از بیماران بر اثر عفونت ناشی از تهاجم باکتری به خون جان خود را از دست می‌دهند.پس از قطع آنتی بیوتیک، باکتری های مقیم بیوفیلم رشد و تکثیر پیدا نموده و بیماری عفونی برگشت دوباره ای خواهد داشت. از طرفی اگر سیستم ایمنی میزبان مشکل داشته باشد، مقاومت دارویی و عود زودتر مشاهده می شود. با توجه به وجود بیوفیلم و مقاومت آنتی بیوتیکی، درمان‌های آنتی بیوتیکی نمی‌توانند جوابگوی بیماران باشند. بنابراین یکی از راه‌حل‌های پشنهاد شده پپتیدهای آنتی ماکروبیال است که در این مطالعه از پپتید ملیتین استفاده گردید (۷).

جبل عاملی و همکاران در سال ۲۰۱۸ ، ۱۴۳ سویه سودوموناس را مورد بررسی قرار دادند که طی آزمایشات آنها ۹۳,۴٪ سویه‌ها بیوفیلم مثبت بودند (۸). در مطالعه ما از بین ۳۰ سویه، ۴۴٪ سویه‌ها بیوفیلم مثبت بودند. نمونه‌های جبل عاملی و همکاران نیز از بیماران مبتلا به عفونت سوختگی بوده است لذا این اختلاف در درصد سویه‌های بیوفیلم مثبت می‌تواند تفاوت در شیوع باکتری های مختلف باشد.قربانی و همکاران ، فعالیت هم افزایی و درمان ترکیبی را بر علیه بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا پیشنهاد کردند و اثر سینرژیستی بین آمیکاسین /سفتازیدیم و توبرامایسین / کلی ستین به ترتیب ۵۸/۳ و ۵۵/۶ و ۵۲/۸ ٪ گزارش شده بوده که احتمالاً به دلیل افزایش نفوذپذیری درغشا بیوفیلم می‌باشد (۹).

هیرت و گور در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که GL13K به عنوان یک پپتید مهندسی شده در مقادیر ۷۰ میکرومول می تواند باکتری های موجود در بیوفیلم سودوموناس آیروژینوزا را به میزان ۹۹,۹ ٪ در طی ۴ ساعت بکشد، در حالی که ملیتین در مطالعه ما همه باکتری های MDR جدا شده را در مقدار ۵۰ میکروگرم ریشه کن کرد. اطلاعات ما نشان داد که عملکرد ملیتین در مقایسه با GL13Kبرای از بین بردن باکتری ها در عمق بیوفیلم بهتر عمل می کند (۱۰).

پولیدو و همکاران در سال ۲۰۱۶ فعالیت ضد بیوفیلم پپتید RN3 (5-17P22-36) را مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که

این پپتید در مقدار ۲۵ میکروگرم ۱۰۰ درصد فعالیت کشندگی داشت. در حالی که ملیتین در مطالعه ما در مقدار ۸ میکروگرم صد درصد فعالیت کشندگی نشان داد (۱۱).

طبق اطلاعات منابع معتبر، دوز توکسیک ملیتین در کشت سلولی در حدود نیم میکروگرم می باشد. با توجه به این مسئله می‌توان از دوزی پایین‌تر از دوز سمی به همراه یک آنتی‌بیوتیک به صورت هم‌افزایی جهت از بین بردن باکتری استفاده کرد. با توجه به اینکه پپتید ملیتین بر غشای باکتری‌ها اثر تخریبی گذاشته و آنها را از بین می‌برد می توان پیشنهاد کرد که در آینده، ملیتین بعنوان یک آنتی‌بیوتیک جهت از بین بردن باکتری‌ها ی داخل بیوفیلم در مطالعات پیش بالینی عفونت زخم سوختگی بکار رود. کاربرد ملیتین در دوز غیر سمی، اثر ضد التهابی و ترمیمی آن، و امکان سینرژیسم با آنتی‌بیوتیک‌های دیگر از مزیت‌های استفاده از ملیتین نسبت به آنتی بیوتیک‌ها می باشد (۱۲، ۵).

شیوع باکتری های XDR در مراکز سوختگی در حال توسعه است. در این شرایط، درمان این عفونت ها توسط یک آنتی بیوتیک جایگزین برای جلوگیری از گسترش باکتری های XDR، بسیار مهم است (۱۳).

توزیع فراوانی جدایه های مقاوم در برابر دیسک های آنتی بیوتیکی مورد بررسی نشان داد که ۱۸/۸ درصد ایزوله ها در برابر ۹ آنتی بیوتیک معمولی مقاوم بودند. این مساله می تواند منجر به نتایج ویرانگر در مراکز سوختگی ای شود که این جدایه ها از آنها جمع آوری شده است. همچنین سنجش MIC و MBC، نشان داد که ملیتین فعالیت مهاری و کشندگی بیشتری در مقایسه با کلیستین علیه جدایه های بالینی دارد و این حاکی از آن است که ملیتین از ارزش دارویی بسیار ارزشمندی برخوردار است.

پومپیلو و همکاران در سال ۲۰۱۲ فعالیت مهاری پپتید ضد میکروبی BMAP-27 و BMAP-28 را در ۲۵ جدایه سودوموناس آیروژینوزا جدا شده از بیماران سیستیک فیبروزیس به ترتیب در محدوده ۱۶-۴ و ۳۲-۴ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آوردند که در مقایسه با آن ملیتین در مطالعه ما فعالیت بیشتری نشان داد (۱۴).

در مطالعه سانچز-گومز و همکاران در سال ۲۰۱۵، فعالیت ضد باکتریایی یک سری پپتیدها و لیپوپپتیدها علیه سودوموناس آیروژینوزا در حالت پلانکتونی کاملاً پایین تر از ملیتین بود (۱۵).

برینگر و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که MIC پپتید Rhesus θ-defensin-1 (RTD-1) روی ۲۹ جدایه سودوموناس آیروژینوزا جدا شده از بیماران فیبروز سیستیک ۶۴/۸ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است. در مقایسه، فعالیت مهاری ملیتین ۱۶ برابر پپتید فوق علیه جدایه های سودوموناس آیروژینوزا بود (۱۶).

با توجه به اینکه باکتری ها در داخل بیوفیلم متابولیسم بسیار کندی دارند، بنابراین حتی اگر آنتی بیوتیک های رایج به داخل بیوفیلم نفوذ کنند، نمی توانند باعث از بین رفتن باکتری ها داخل بیوفیلم شوند، چون تقریبا تمام آنتی بیوتیک های موجود هنگامی بر باکتری ها اثر می گذارند که باکتری متابولیسم نرمالی داشته و در حال تکثیر باشد (۱۷). بنابراین با توجه به اینکه پپتید ملیتین بیوفیلم را تخریب کرده و بر غشای باکتری ها اثر تخریبی گذاشته و آنها را از بین می برد میتوان امیدوار بود که در آینده، ملیتین بعنوان یک آنتی بیوتیک جهت از بین بردن باکتری ها در بیوفیلم تشکیل شده در سطح زخم سوختگی بکار رود. با توجه به نتایج بدست آمده میتوان به اهمیت پپتید های آنتی میکروبیال در عبور از بیوفیلم و از بین بردن باکتری ها پی برد.

نتایج کینتیک تخریب بیوفیلم و کشتن آن نشان می دهد که ملیتین در مقدار ۵۰ میکروگرم پس از ۲۴ ساعت لایه بیوفیلم را به طور قابل توجهی تخریب و تمام باکتریها را بعد از ۴۸ ساعت کاملاً ریشه کن کرد. این مساله نشان داد که ملیتین در این مدت پایداری خود را حفظ می کند و به تدریج به لایه های بیوفیلم نفوذ کرده و باعث تخریب و کشتن آن ها می شود. برای ریشه کن کردن عفونتهای مرتبط با بیوفیلم، هم تخریب بیوفیلم و هم از بین رفتن باکتری های داخل آن ضروری است .

نتیجه گیری

ملیتین توانست از بیوفیلم عبور کرده و باکتری های داخل آنرا نابود کند. با توجه به نتایج موفق اثر پپتید ملیتین در از بین بردن باکتری‌ها می توان پیشنهاد کرد که در بدو ورود بیماران با سوختگی درجه ۳ در بیمارستان، ملیتین بصورت موضعی استفاده شود تا باکتری های کلنیزه شده را از بین ببرد، همچنین در صورت پیوند پوست از عفونت باکتریایی جلوگیری کرده و از پس زدن پیوند ممانعت به عمل خواهد آمد.

در آزمایشاتی که طی این تحقیق انجام شد ملیتین به مراتب موثر تر از انتی بیوتیک کلیستین ارزیابی گردید و چه بسا با توجه به مقاومت های روز افزونی که نسبت به انتی بیوتیک های مورد استفاده وجود دارد، جایگزین بسیار مناسبی بجای انتی بیوتیک ها در آینده باشد.

REFERENCES

1. Ghotaslou R, Salahi B. Effects of oxygen on Invitro biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosae*." Pharm Sci. 2013;19(3):96

2. Muhammad Yasir, Mark Duncan PerryWillcox , Debarun Dutta. Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. Materials. 2018; 11, 2468

3. Jeffrey L. Veesenmeyer,1 Alan R. Hauser, Thiago Lisboa, Jordi Rello *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Therapy: Evolving Translational Strategies Crit Care Med. 2009; 37(5): 1777–1786

4. Jun Lei, Jeffrey L. Veesenmeyer,1 Alan R. Hauser. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. Am J Transl Res. 2019; 11(7):3919-3931

5. Shams Khozani R, Shahbazzadeh D, Harzandi N, Feizabadi MM, Pooshang Bagheri K. Kinetics study of antimicrobial peptide, melittin, in simultaneous biofilm degradation and eradication of potent biofilm producing MDR *Pseudomonas aeruginosa* isolates. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2019; 25 (1), 329-338

6. Pashaei F, Bevalian P, Akbari R, Pooshang Bagheri K. Single dose eradication of extensively drug resistant Acinetobacter spp. in a mouse model of burn infection by melittin antimicrobial peptide. Microbial pathogenesis. 2019; 127, 60-69

7. Belguesmia Y, Matthew P, Carvalho A, Daniela A. Ferreira, Niamh M. Mohan, Functionalized Nanomaterials for the Management of Microbial Infection A Strategy to Address Microbial Drug Resistance Micro and Nano Technologies. 2017; 1-22

8. Jabalameli F, Mirsalehian A, Khoramian B, Aligholi M, Khoramrooz SS, Asadollahi P, Taherikalani M.,Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Iranian Journal of Microbiology 2017; 11(7): 3919–3931.

9. Ghorbani H. Villalba C, Albacar M et al .,In vitro synergy of antibiotic combinations against planktonic and biofilm *Pseudomonas aeruginosa* GMS Hygiene and Infection Control. 2017; 12

10. Hirt H, Gorr S-U .Antimicrobial peptide GL13K is effective in reducing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(10):4903–491011.

11. Pulido D, Prats-Ejarque G, Villalba C, Albacar M, Gonzlez-López JJ,Torrent M et al. A novel RNase 3/ECP peptide for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm eradication that combines BMC Microbiol 2016; 57(10):5983–491324.

12. Akbari R, Hakemi-Vala M, Pashaie F, Bevalian P, Hashemi A, Pooshang Bagheri K. Highly Synergistic Effects of Melittin with Conventional Antibiotics Against Multidrug-Resistant Isolates of Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa. Microbial Drug Resistance. 2019; 25 (2):193-202

13. Ghasemian Safaei H et al., Distribution of the Strains of Multidrug-resistant, Extensively Drug-resistant, and Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Burn Patients. Advanced Biomedical Research. 2017; 6: 74

14. Pompilio A, Crocetta V, Scocchi M, Pomponio S, Di Vincenzo V, Potential novel therapeutic strategies in cystic fibrosis: antimicrobial and anti-biofilm activity of naturaland designed α-helical peptides against *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, and Stenotrophomonas maltophilia*. BMC Microbiol. 2012; 12(1):145

15. Snchez-Gomez S, Ferrer-Espada R, Stewart PS, Pitts B, Lohner K,de Tejada GM. Antimicrobial activity of synthetic cationic peptides and lipopeptides derived from human lactoferricin against *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cultures and biofilms. BMC Microbiol. 2015; 15(1):137

16. Beringer PM, Bensman TJ, Ho H, Agnello M, Denovel N, Nguyen A et al. Rhesus θ-defensin-1 (RTD-1) exhibits in vitro and in vivo activity against cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 2015; 71(1):181–188

17. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Yixuan Du, Bonsu E, Herman O Sintim .Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents Future Med. Chem. 2015; 7(4), 493–51