

## بررسی فعالیت ضد باکتریایی لاکتوفرین کایمرا و اثر هم افزایی آن با آنتی بیوتیک های جنتامایسین، سفازولین و سفتازیدیم علیه باکتری های گرم منفی بیماری زا

فخری شهیدی<sup>۱\*</sup>، سحر روشنگر<sup>۲</sup>، زانا پیرخضرائیان<sup>۳</sup>، محمد هادی سخاوتی<sup>۴</sup>، عاطفه سرادقی توپکانلو<sup>۵</sup>

- ۱- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران
- ۲- دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران
- ۳- دانش آموخته دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران
- ۴- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران
- ۵- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

\*نشانی برای مکاتبه: مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی، گروه علوم و صنایع غذایی، fshahidi@um.ac.ir  
دریافت مقاله: مهر چهارصد پذیرش برای چاپ: آذر چهارصد

### چکیده

**سابقه و هدف:** معرفی مواد ضد میکروبی جدید یا بررسی اثر هم افزایی ترکیبات موجود، به عنوان یک استراتژی درمانی در برابر سویه های میکروبی مقاوم به یک یا چند آنتی بیوتیک، ضروری است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی فعالیت ضد میکروبی و اثر هم-افزایی لاکتوفرین کایمرا (CLF)، در تعامل با برخی آنتی بیوتیک های رایج درمانی بود.

**روش کار:** فعالیت ضد میکروبی CLF و آنتی بیوتیک های جنتامایسین، سفازولین و سفتازیدیم به روش تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) تعیین و متعاقب با آن، اثر هم افزایی این پپتید با هر یک از آنتی بیوتیک های مذکور به روش چک برد، علیه *E. coli*، *S. typhi* و *P. aeruginosa*، بررسی و حداقل غلظت بازدارنده کسری (FIC) گزارش گردید. آزمون بررسی خروج مواد از سیتوپلاسم، ترسیم منحنی های زنده مانی و فعالیت پپتید و آنتی بیوتیک ها به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر، و موفقولوژی سلول باکتریایی با کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی در غلظت های MIC و FIC انجام شد.

**یافته ها:** اثر هم افزایی در ترکیب CLF با همه آنتی بیوتیک ها، مشاهده شد. نتایج نشان داد که در غلظت های FIC، خروج مواد از سیتوپلاسم و تعداد سلول های زنده مانده، به طور معنی داری به ترتیب بیشتر و کمتر از زمانی است که پپتید یا آنتی بیوتیک ها به صورت منفرد استفاده گردند. فعالیت پپتید و آنتی بیوتیک ها در غلظت FIC، روند افزایشی داشت و تصاویر SEM در این غلظت نشان دهنده آسیب شدید غشایی سلول های باکتریایی، بود.

**نتیجه گیری:** استفاده از CLF و آنتی بیوتیک ها در غلظت های FIC منجر به کاهش مقدار مصرفی هر دو ماده می گردد.

**واژگان کلیدی:** فعالیت ضد میکروبی؛ اثر هم افزایی؛ پپتیدهای ضد میکروبی؛ آنتی بیوتیک ها

### مقدمه

AMPs نقش مهمی در مکانیسم دفاع طبیعی برای از بین بردن عفونت های میکروبی بر عهده دارند (۲). AMPs دارای یک بار مثبت خالص و ساختار آمفی پاتیک بوده و معمولاً دارای ۱۲ تا ۵۰ اسید آمینه هستند (۳، ۴). لاکتوفرین کایمرا (CLF)، یک AMP است که از تلفیق دو پپتید لاکتوفرین (LFcin) و لاکتوفرامپین (LFampin) که در ناحیه N ترمینال لاکتوفرین شیر شتر وجود

ظهور سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک و شیوع روز افزون آن، یکی از بزرگترین مشکلات بهداشت عمومی است. استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها منجر به ظهور باکتری های مقاوم به یک یا چند آنتی بیوتیک، شده است (۱). بنابراین، بررسی و معرفی ترکیبات ضد میکروبی جدید، از جمله پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونیک (AMPs)، به عنوان جایگزینی برای آنتی بیوتیک ها، ضروری است.

$10^8 \times 1/5$  CFU/ml در دمای  $37^\circ\text{C}$  گرمخانه گذاری شدند (۲۰).

MIC با استفاده از روش رقت سازی میکروبراث مطابق پروتوکول پیشنهادی CLSI انجام شد (۲۱). رقت های ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر از CLF، و ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر از هر یک از آنتی بیوتیک ها در مولر MHB تهیه شد. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون های میکروبی با تراکم نوری ۶۳۰ نانومتر (OD<sub>630</sub>) برابر با ۰/۸ - ۰/۱۳، درون یک پلیت ۹۶ خانه، به ۱۹۰ میلی لیتر از هر یک از رقت های تهیه شده، اضافه گردید و پلیت ها در دمای  $37^\circ\text{C}$  گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. از محیط رشد بدون تلقیح، و سوسپانسیون میکروبی فاقد ماده ضد میکروبی به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد. برای تعیین MIC، جذب نوری هر کدام از پلیت ها در ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر مدل BioTek ELx808 خوانش شد. کمترین غلظتی که رشد میکروبی باعث افزایش کدورت در آن نشده بود، به عنوان MIC گزارش گردید (۲۲). به منظور تایید نتایج، آزمایش ها در سه بار تکرار انجام پذیرفت.

۱۰۰ میکرولیتر از محتویات چاهک هایی که کدورت ناشی از رشد میکروبی در آن ها مشاهده نشده بود، به صورت پورپلیت با استفاده از محیط مولر هینتون آگار-سیگما-آلد ریچ (MHA) کشت داده شد و در دمای  $37^\circ\text{C}$  گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. اولین غلظتی مانع از تشکیل کلنی گردید، به عنوان MBC گزارش شد (۲۳). برای تأیید نتایج، آزمایش ها با سه بار تکرار انجام شد.

اثر هم افزایی پپتید با هر کدام از آنتی بیوتیک ها با استفاده از روش چک برد بررسی شد (۱۱، ۱۲). رقت سازی ترتیبی از MIC<sub>۲</sub> تا MIC<sub>۳۲</sub> برای تهیه غلظت های CLF و هر آنتی بیوتیک بر اساس مقدار به دست آمده برای هر میکروارگانیزم تهیه گردید و ۲۵ میکرولیتر رقت های تهیه شده برای پپتید و هر کدام از آنتی بیوتیک ها به صورت مجزا، به گونه ای که هر ردیف (و ستون) حاوی مقدار ثابتی از عامل اول و مقدار افزایشی از عامل دوم باشد، در هر چاهک ریخته شد و ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری تازه ( $10^8$  CFU/ml) به آن اضافه و در دمای  $37^\circ\text{C}$  گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. شاخص غلظت بازدارنده کسری (FIC<sub>۱</sub>) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$FIC_1 = \frac{MIC_{A/B}}{MIC_A} + \frac{MIC_{B/A}}{MIC_B}$$

در فرمول فوق،  $MIC_A$  و  $MIC_B$  به ترتیب متعلق به ماده ضد میکروبی A و B؛  $MIC_{A/B}$  متعلق به MIC ماده A در ترکیب با ماده B است و چنانچه  $FIC_1 \leq 0/5$ ، نشان دهنده اثر هم افزایی؛  $0/75 < FIC_1 \leq 0/5$ ، نشان دهنده اثر هم افزایی نسبی؛  $FIC_1 > 2$  بی اثر و  $0/75 < FIC_1 > 2$ ، نشان دهنده اثر آنتاگونیسمی است.

دارند، به وجود آمده است و اخیراً در مطالعه ای که با موفقیت در آزمایشگاه گروه تحقیقاتی ما انجام شده است، در استفاده از *E. coli*، بیان و خالص سازی شده است (۵). نتایج مطالعات *in vitro* نشان داد که این پپتید دارای فعالیت های آنتی باکتریایی (۵،۷)، آنتی ویروسی (۸) و ضد سرطانی (۹) است. همچنین، استفاده از CLF در جوجه های گوشتی مبتلا به عفونت *E. coli* منجر به بهبود مورفولوژی پرزهادر ژنوم و تعادل میکروبی در ایلئوم شد و بیان ژنی سیتوکین ها را افزایش داد (۱۰). این نتایج نشان دهنده پتانسیل این پپتید در به عنوان جایگزینی برای آنتی بیوتیک ها بود. برای افزایش اثربخشی، بازگرداندن حساسیت و کاهش حداقل دوز موثر آنتی بیوتیک ها، ترکیب آن ها با سایر عوامل ضد میکروبی یکی از استراتژی های امیدوار کننده است (۱۱، ۱۲). همچنین ثابت شده است که استفاده از ترکیب APM ها و آنتی بیوتیک ها، باعث افزایش مرگ باکتری ها، صرف نظر از مکانیسم عمل، آنتی بیوتیک ها می گردد (۱۳، ۱۵). APM ها به شیوه ای بسیار متفاوت از آنتی بیوتیک ها، نفوذ پذیری غشا میکروارگانیزم ها را تحت تاثیر قرار داده و/یا به درون آن نفوذ می کنند (۱۶)، اختلال در نفوذ پذیری غشا و یا تشکیل منافذ روی دیواره سلولی و غشا باکتریایی می تواند جذب آنتی بیوتیک ها را افزایش داده و اثر آنتی باکتریایی آن ها را تشدید نماید (۱۷).

لذا این مطالعه به بررسی اثرات ترکیب CLF و برخی از آنتی بیوتیک های رایج درمانی در مقایسه با اثرات هر کدام به تنهایی، علیه برخی از باکتری های گرم منفی بیماری زا می پردازد. هدف نهایی این پژوهش، تعیین اثرات هم افزایی این ترکیبات برای کاهش دوز موثر مصرفی آن ها می باشد، که در نتیجه آن عوارض جانبی احتمالی را به حداقل رسانده و احتمال مقاومت آنتی بیوتیکی را کاهش می دهد.

## روش کار

پپتید نو ترکیب CLF از مطالعه قبلی ما تهیه شد (۵). غلظت  $1000 \text{ mg/ml}$  پپتید CLF در محیط کشت استریل مولر هینتون براث-سیگما (MHB) استریل تهیه شد و با از فیلتر سر سرنگی  $0/22 \mu\text{m}$  عبور داده شد و به عنوان استوک برای آماده سازی رقت های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (۱۸). آنتی بیوتیک ها شامل جنتامایسین، سفنازیدیم و سفازولین، که از شرکت دارویی جابر ابن حیان-تهران-ایران، و رقت های مورد استفاده بر اساس CLSI (۱۹) تهیه گردید.

سویه های باکتریایی شامل *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1707، *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Salmonella typhi* PTCC 1609، از مجموعه میکروبی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. قبل از انجام آزمایش ها، سویه های میکروبی به مدت ۲۴ ساعت برای رسیدن به غلظت برابر نیم مک فارلند که برابر

خروج مواد سیتوپلاسمی با بررسی جذب در ۲۶۰ نانومتر مطابق روش توصیف شده توسط فدلی و همکاران (۲۰۱۲) ارزیابی شد (۱۲). سلول های زنده در فاز لگاریتمی با استفاده از سانتیفریوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه) جمع آوری شدند، سه بار شستشو شده و در محلول بافر نمکی مجدداً معلق گردیدند و  $3 \text{ ml}$  از این سوسپانسیون سلولی با تعداد تقریبی  $10^8 \text{ CFU/ml}$  در حضور عامل ضد میکروبی (در غلظت MIC و FIC) در دمای  $37^\circ\text{C}$  به مدت یک ساعت گرمخانه گذاری گردید. پس از گرمخانه گذاری، سلول ها در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ شدند و جذب مایع رویی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر **WPA Lightwave S2000 UV/Vis** در ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. سوسپانسیون های میکروبی بدون عوامل ضد میکروبی به عنوان گروه کنترل استفاده شد.

برای بررسی مورفولوژی سلول های میکروبی  $100 \text{ ml}$  سوسپانسیون میکروبی در **MHB** تهیه و به ۴ قسمت تقسیم شد؛ به دو قسمت مواد ضد میکروبی در غلظت های MIC و یا FIC، اضافه و قسمت باقیمانده به عنوان شاهد بدون تیمار در نظر گرفته شد و دمای  $37^\circ\text{C}$  به مدت سه ساعت گرمخانه گذاری گردید. متعاقباً سلول ها در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ شدند و سپس در گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت تثبیت شدند. در ادامه سلول ها با استفاده از غلظت های متوالی اتانول از ۳۰ تا ۱۰۰ درصد، آبگیری شدند. پوشش طلا به وسیله اسپری کاتدیک روی نمونه ها قرار داده شد. مورفولوژی سلول های باکتریایی از طریق میکروسکوپ الکترونی روبشی (**SEM, LAO-1450VP**) - آلمان) مشاهده شد (۱۱).

#### یافته ها

MIC و MBC هر آنتی بیوتیک و cLF در جدول ۱، گزارش شده است. نتایج نشان داد که cLF فعالیت ضعیفی در برابر *P. aeruginosa* و *S. typhi* دارد، در حالی که فعالیت آن به طور قابل توجهی در برابر *E. coli* (به ترتیب ۲۵۶ در مقابل ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر) بیشتر بود.

دینامیک ضد باکتریایی با استفاده از روش مهار کشت مایع بر اساس روی لی و همکاران (۲۰۱۵)، با تغییرات جزئی انجام پذیرفت (۱).  $50 \text{ CFU/ml}$  میکروبی تازه (در غلظت MIC و FIC) همراه  $50 \text{ CFU/ml}$  میکروبی عامل ضد میکروبی (در غلظت MIC و FIC) به چاهک های یک پلیت ۹۶ خانه اضافه و میزان جذب در ۶۳۰ نانومتر به مدت در زمان های ۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۱، ۲۴، ۲۷، ۳۰، ۳۳ و ۳۶ ساعت پس از گرمخانه گذاری دمای  $37^\circ\text{C}$  ثبت گردید. از محیط رشد بدون تلقیح، و سوسپانسیون میکروبی فاقد ماده ضد میکروبی به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد. فعالیت ضد باکتریایی با استفاده از فرمول زیر محاسبه می شود:

$$U = \sqrt{\frac{A_0 - A}{A_0}}$$

در فرمول بالا  $A_0$  جذب گروه کنترل منفی و  $A$  جذب گروه مورد آزمون بود. دینامیک فعالیت ضد میکروبی با ترسیم نمودار فعالیت ضد باکتریایی در طی زمان بررسی شد.

تأثیر cLF و هر یک از آنتی بیوتیک ها به طور جداگانه (غلظت MIC) و به صورت ترکیبی (غلظت FIC) بر رشد سوبه های میکروبی با استفاده از رسم منحنی زندهمانی در طی زمان بررسی شد (۲۵).  $50 \text{ CFU/ml}$  میکروبی تازه (در غلظت MIC و FIC) به همراه  $50 \text{ CFU/ml}$  میکروبی عامل ضد میکروبی (در غلظت MIC و FIC) به چاهک های یک پلیت ۹۶ خانه اضافه و پلیت ها در دمای  $37^\circ\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید. سپس،  $100 \text{ CFU/ml}$  میکروبی از محتویات هر چاهک به روش پورپلیت و با استفاده از **MHA** کشت و مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  گرمخانه گذاری شد. در نهایت تعداد کلنی های تشکیل شده شمارش و به صورت **CFU/ml** شمارش شد. شایان ذکر است که  $50 \text{ CFU/ml}$  میکروبی از سوسپانسیون های میکروبی بدون عوامل ضد میکروبی به عنوان گروه کنترل استفاده شد. منحنی های زندهمانی با رسم نمودار تعداد بر حسب زمان ترسیم شد.

جدول ۱- مقادیر MIC/MBC (µg/ml) لاکتوفرین کایمرا و آنتی بیوتیک های جنتامایسین، سفازولین و سفنازیدیم علیه برخی از باکتری های گرم منفی بیماری زا

لاکتوفرین کایمرا		جنتامایسین		سفازولین		سفنازیدیم		میکروارگانیسم
MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	
۳۲	۲۵۶	۱۶	۳۲	۱۶	۳۲	۸	۳۲	<i>E. coli</i>
۲۵۶	> ۵۱۲	۳۲	۶۴	۳۲	>۶۴	۳۲	>۶۴	<i>P. aeruginosa</i>
۲۵۶	> ۵۱۲	۱۶	۳۲	۳۲	>۶۴	۳۲	>۶۴	<i>S. typhi</i>

MIC: حداقل غلظت بازدارندگی؛ MBC: حداقل غلظت کشندگی

شاخص FIC، ۰/۲۵ را داشت. از ترکیب cLF و کلیه آنتی بیوتیک ها اثر هم افزایی مشاهده شد به جز *E. coli* و *S. typhi* با مقدار FIC برابر ۰/۷۵ و ۰/۷۷ که نشان دهنده اثر هم افزایی نسبی بود.

سه آنتی بیوتیک جنتامایسین، سفازولین و سفنازیدیم برای بررسی اثر هم افزایی آن ها با cLF انتخاب شدند. نتایج بررسی اثر هم افزایی در جدول ۲، نشان داد که بیشترین اثر ضد میکروبی مربوط به ترکیب cLF و سفازولین علیه *P. aeruginosa* بود که کمترین

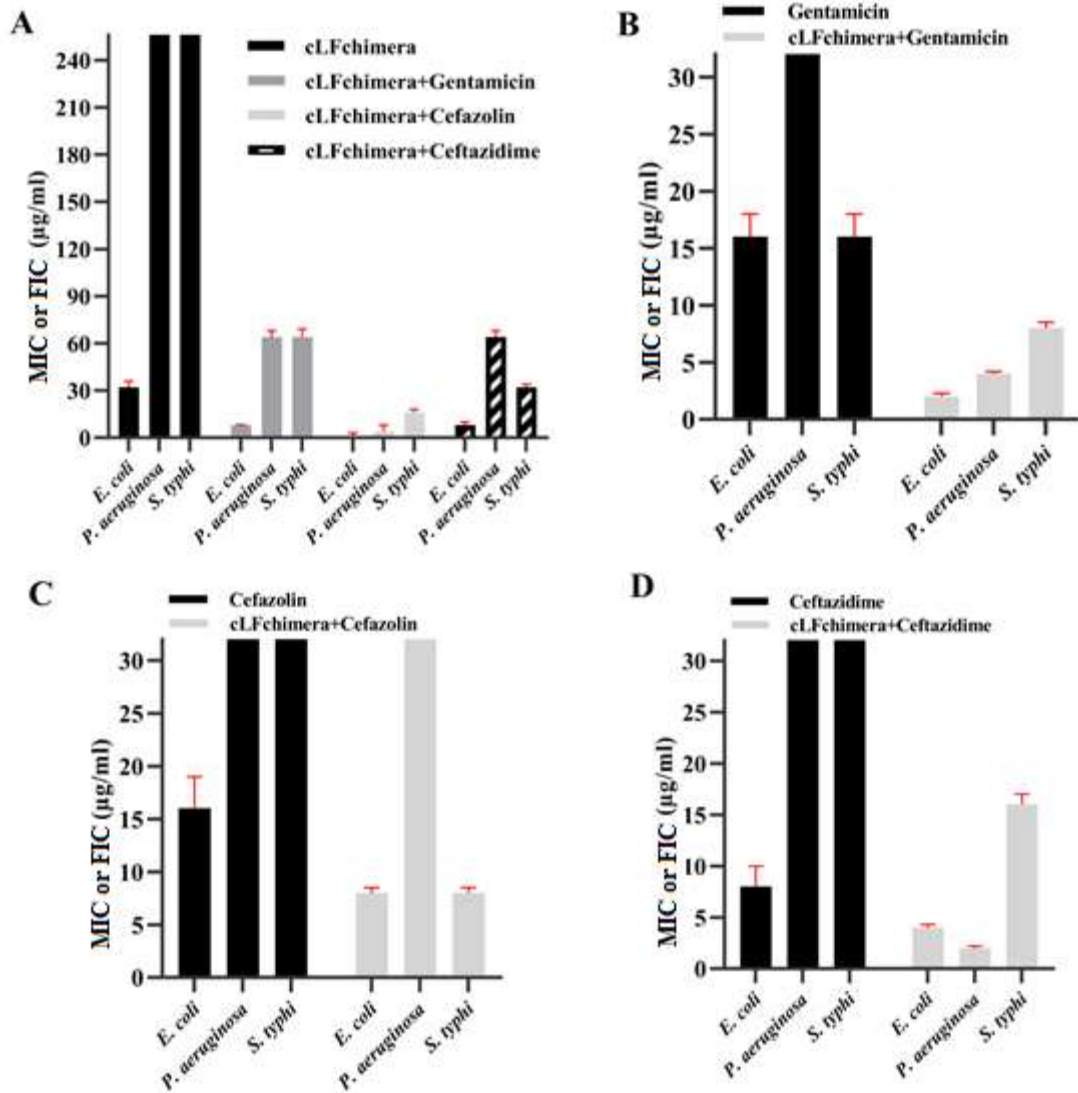
جدول ۲- بررسی اثر هم افزایی شاخص لاکتوفرین کایمرا و آنتی بیوتیک های جنتامایسین، سفازولین و سفنازیدیم علیه برخی از باکتری های گرم منفی بیماری زا

cLFchimera+ Gentamicin		cLFchimera+ Cefazolin		cLFchimera+ Ceftazidime		میکروارگانیسم
غلظت FIC (µg/ml)	FIC index	غلظت FIC (µg/ml)	FIC index	غلظت FIC (µg/ml)	FIC index	
۲+۸	۰/۵ <sup>a</sup>	۸+۱	۰/۵ <sup>a</sup>	۴+۸	۰/۷۷ <sup>b</sup>	<i>E. coli</i>
۴+۶۴	۰/۳۷ <sup>a</sup>	۳۲+۴	۰/۲۵ <sup>a</sup>	۲+۶۴	۰/۳۱ <sup>a</sup>	<i>P. aeruginosa</i>
۸+۶۴	۰/۷۵ <sup>b</sup>	۸+۱۶	۰/۳۱ <sup>a</sup>	۳۲+۱۶	۰/۵ <sup>a</sup>	<i>S. typhi</i>

FIC: شاخص غلظت بازدارنده کسری؛ <sup>a</sup> هم افزایی کامل؛ <sup>b</sup> هم افزایی جزئی

MIC سفازولین، و ۲ تا ۱۶ فولد کاهش در MIC سفتازیدیم مشاهده شد (شکل ۱، A، B، C و D).

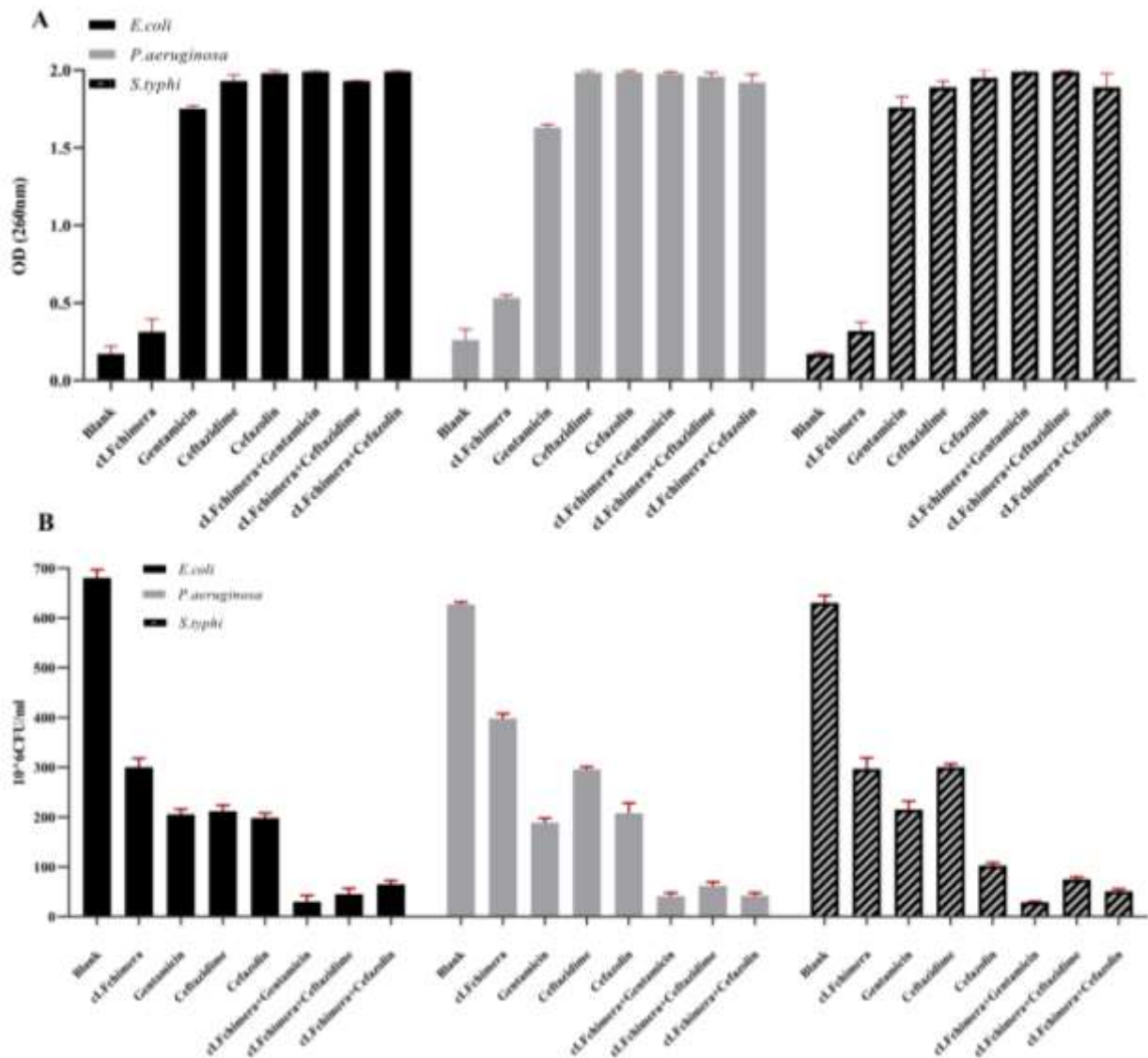
ترکیب cLF در مقادیر کم ۴ تا ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر، فعالیت ضدباکتریایی جنتامایسین، سفازولین و سفتازیدیم را بهبود داد و ۲ تا ۸ فولد کاهش در MIC جنتامایسین، ۱ تا ۲ فولد کاهش در



شکل ۱- فعالیت ضد باکتریایی آنتی بیوتیک‌ها در ترکیب با لاکتوفرین کایمرا. (A) فعالیت ضد میکروبی لاکتوفرین کایمرا در غلظت MIC و FIC در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سفازولین و سفتازیدیم؛ (B) فعالیت ضد میکروبی جنتامایسین در غلظت MIC و FIC در ترکیب با لاکتوفرین کایمرا؛ (C) فعالیت ضد میکروبی سفازولین در غلظت MIC و FIC در ترکیب با لاکتوفرین کایمرا؛ (D) فعالیت ضد میکروبی سفتازیدیم در غلظت MIC و FIC در ترکیب با لاکتوفرین کایمرا

منحنی زنده‌مانی گزارش شده‌اند، ارتباط مستقیم داشت (شکل ۲، B). در بیشتر نمونه‌ها، خروج مواد در سیتوپلاسم در غلظت FIC نسبت به غلظت MIC تفاوت معنی‌داری نداشت. این در حالی است که تعداد سلول‌های زنده مانده تحت غلظت FIC آنتی بیوتیک و cLF، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.

برای همه سویه‌های باکتریایی، خروج محتوای سلولی به محیط که از طریق اندازه‌گیری جذب در ۲۶۰ نانومتر تعیین می‌گردد، برای هر سه آنتی بیوتیک جنتامایسین، سفازولین و سفتازیدیم به‌طور قابل توجهی افزایش یافت، در حالی که برای cLF به تدریج افزایش یافت (شکل ۲، A). خروج مواد سیتوپلاسمی با مرگ میکروارگانیسم‌ها و کاهش تعداد سلول‌های زنده مانده که در

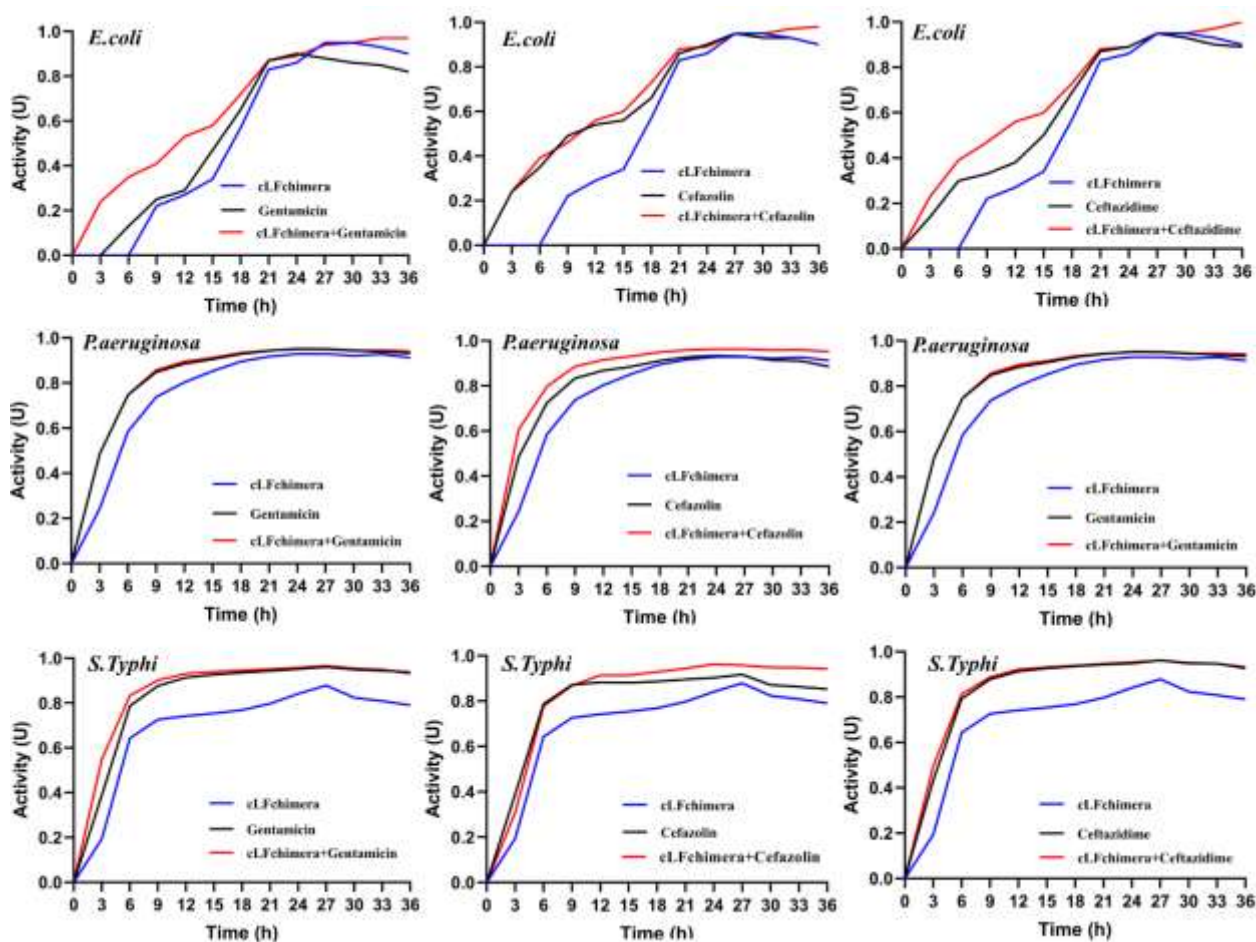


شکل ۲- A) خروج مواد سیتوپلاسمی ( جذب در ۲۶۰ نانومتر)؛ B) منحنی زنده‌مانی سویه‌های میکروبی تحت غلظت‌های MIC و FIC لاکتوفرین کایمرا و آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین، سفازولین و سفتازیدیم. Blank: سوسپانسیون میکروبی فاقد مواد ضد میکروبی



به تدریج تا ۳۶ ساعت افزایش یافت. برای *P. aeruginosa* ، فعالیت ضدباکتریایی همه آنتی بیوتیک ها و cLF به شدت افزایش یافت و در حدود ۹ ساعت به اوج خود رسید و بیش از ۲۰ ساعت بدون تغییر باقی ماند. برای *S. typhi* ، فعالیت ضد باکتریایی ترکیب آنتی بیوتیک ها با cLF به شدت افزایش یافت، و منحنی فعالیت طی ۱۱ ساعت به اوج رسید و بیش از ۲۰ ساعت بدون تغییر باقی ماند(شکل سه).

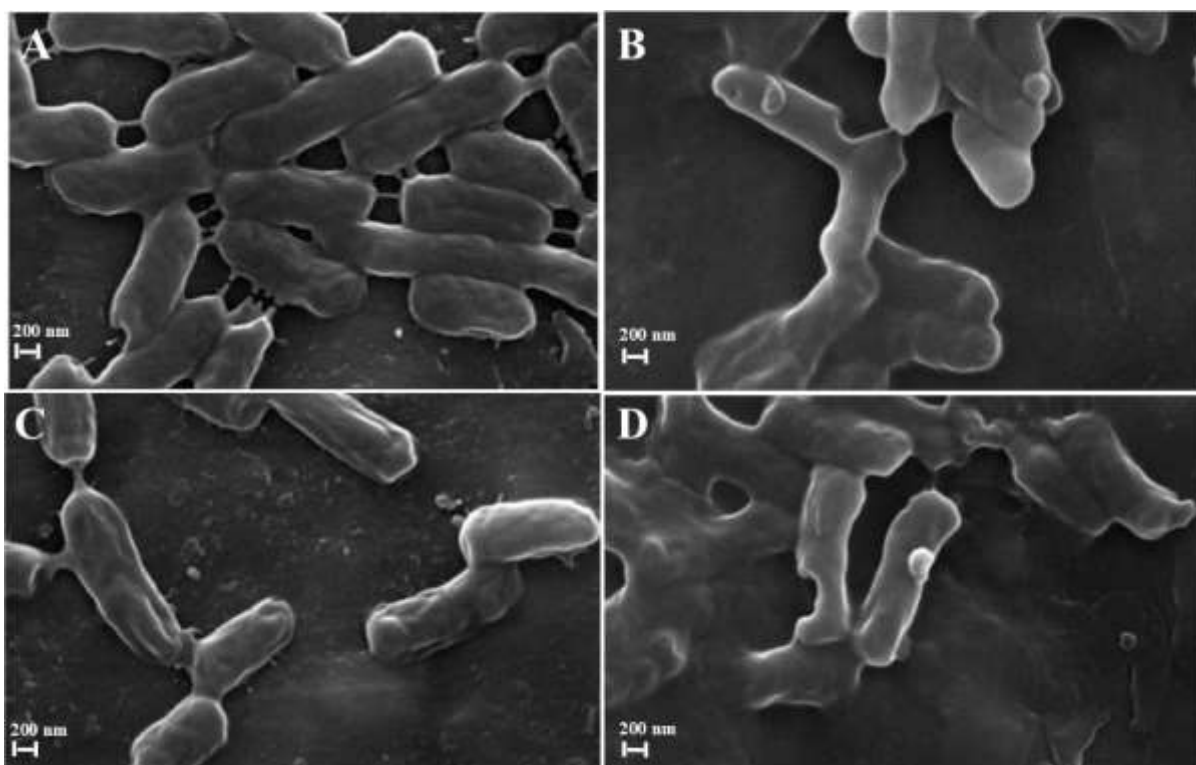
برای *E. coli* فعالیت ضدباکتریایی جنتامایسین به تدریج افزایش یافته و در ۲۰ ساعت به اوج خود رسیده و متعاقباً، پس از ۳ ساعت کاهش یافت. در حالی که فعالیت ضد باکتریایی cLF طی ۲۶ ساعت به اوج خود رسید و متعاقباً، پس از ۴ ساعت کاهش یافت. ترکیب جنتامایسین و cLF در ۳۳ ساعت به اوج خود رسید و پس از ۳ ساعت بدون تغییر ادامه یافت. فعالیت ضدباکتریایی سفازولین و سفنازیدیم طی ۲۷ ساعت به اوج خود رسید و بلافاصله کاهش یافت، در حالی که برای ترکیب آن ها با cLF، فعالیت ضدباکتریایی



شکل ۳- دینامیک ضد میکروبی، تحت غلظت های MIC و FIC لاکتوفرین کایمرا و آنتی بیوتیک های جنتامایسین، سفازولین و سفنازیدیم

دست نخورده هستند، ندارند (شکل ۴، به ترتیب A و C). در مقابل، اثر تخریبی تیمار در غلظت MIC جنتامایسین و غلظت FIC ترکیب جنتامایسین و cLF، بر دیواره سلولی کاملاً مشهود است (به ترتیب شکل ۴، به ترتیب C و D). سلول های باکتریایی تیمار شده در غلظت FIC، بطور قابل ملاحظه ای آسیب دیده، شکل خود را از دست داده و به یکدیگر چسبیده اند.

برای درک بهتر اثر cLF، جنتامایسین به تنهایی در غلظت MIC و ترکیب آنها (cLFchimera+ Gentamycin) در غلظت FIC، بر مورفولوژی سلول های *P. aeruginosa* تصاویر میکروسکوپ رویشی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). سلول های باکتریایی تیمار شده در غلظت MIC با cLF تفاوت چندانی با گروه کنترل که دارای سطح صاف با لایه بیرونی باکتری ها نسبتاً



شکل ۴- تصاویر SEM از سلول های *P. aeruginosa* (A)، بدون تیمار؛ (B) تحت تیمار در غلظت MIC جنتامایسین (۳۲ µg/mL)؛ (C) تحت تیمار در غلظت MIC لاکتوفرین کایمرا (۲۵۶ µg/mL) و (D) تحت تیمار در غلظت FIC ترکیب جنتامایسین و لاکتوفرین کایمرا

#### بحث

است (۲۸،۲۶). به علاوه، ترکیب AMP با آنتی بیوتیک ها، منجر به کاهش مصرف هر دو ترکیب شده و عوارض جانبی استفاده از آنها را، به حداقل می رساند (۲۹). AMP ها با ایجاد اختلال در غشای سلولی، عبور آنتی بیوتیک ها را از غشا تسهیل کرده و دسترسی این آنها به اهداف درون سلولی را افزایش می دهند (۳۰، ۳۱).

AMP ها گروهی از ترکیبات ضد میکروبی جدید هستند می توانند به عنوان جایگزینی برای آنتی بیوتیک ها در نظر گرفته شوند؛ زیرا دارای ویژگی های قابل توجهی مانند طیف وسیع فعالیت ضد میکروبی و مکانیسم های عملکرد غشایی متمایز هستند و فراوانی ایجاد مقاومت به آنها نسبت به آنتی بیوتیک های فعلی، بسیار کم



در مطالعه حاضر، تیمار همه باکتری‌ها در غلظت‌های MIC آنتی-بیوتیک‌ها و غلظت‌های FIC ترکیب آن‌ها با پپتید، منجر به افزایش قابل توجهی در خروج محتویات سیتوپلاسمی شد. سفنازیدیم و سفازولین با اتصال به پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین باکتریایی که در سنتز پپتیدوگلیکان نقش دارند، بیوسنتز دیواره سلولی را مهار کرده و منجر به مرگ سلول می‌شوند (۳۶). بنابراین، نتایج ما نحوه عمل سفنازیدیم و سفازولین را تایید می‌کند. از طرف دیگر، جنتامایسین با اتصال به زیرواحد 30S ریبوزوم، سنتز پروتئین‌های باکتریایی را مهار می‌نماید (۳۶).

### نتیجه گیری

نتایج ما نشان می‌دهد که از اثر هم‌افزایی CLF و آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سفازولین و سفنازیدیم می‌توان برای بهبود اثر ضدباکتریایی آنتی‌بیوتیک‌های فوق‌الذکر علیه سویه‌های *E. coli*، *S. typhi* و *P. aeruginosa* و کاهش دوز درمانی مصرفی این آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده نمود و عوارض جانبی مصرف آن‌ها را به حداقل رساند. به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که CLF با ایجاد اختلال در غشای سلولی و مکانیسم‌های درون مولکولی که نیاز به بررسی بیشتری در مطالعات آینده دارد، فعالیت‌های هم-افزایی خود را مستقل از عامل آنتی‌بیوتیک، نشان دهد.

### سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد (گرنه شماره ۲/۵۰۳۰۵) انجام شده است.

نتایج مطالعه حاضر اثر هم‌افزایی ترکیب CLF و آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سفازولین و سفنازیدیم را در برابر سویه‌های *E. coli*، *S. typhi* و *P. aeruginosa* تایید کرد. وو و همکاران (۲۰۱۷)، نشان دادند که جنتامایسین در ترکیب با پپتیدهای PD7 و CLS001 در برابر *E. coli*، *P. aeruginosa* و *A. baumannii* فعالیت هم‌افزایی دارد (۳۲). همچنین ترکیب سفنازیدیم با پپتیدهای حاوی تریپتوفان، فعالیت هم‌افزایی نسبی علیه *S. epidermidis* مقاوم به چند دارو در شرایط *in vitro* و *in vivo* نشان داده است (۳۱).

خروج محتوای سیتوپلاسمی در نمونه‌های تحت تیمار با CLF به طور قابل توجهی کمتر از گروه‌های تحت تیمار با آنتی‌بیوتیک بود. این نتایج ما را به این فرضیه رساند که CLF اثر ضد باکتریایی خود را از روش‌های دیگری به جز اختلال در غشاء اعمال می‌کند. علاوه بر این، نتایج تجزیه و تحلیل SEM نشان داد که CLF هیچ اثر مخرب قابل ملاحظه‌ای بر غشا خارجی باکتری‌ها ندارد، و این نشان می‌دهد که شاید مکانیسمی در سطح مولکولی نقش اصلی را در عملکرد هم‌افزایی CLF ایفا می‌کند. در این رابطه، ریس-کورتس و همکاران (۲۰۱۷)، نشان دادند که این پپتید با عبور از غشای باکتری و ورود به سیتوپلاسم از طریق و احتمالاً تأثیر با اهداف داخل سلولی، اثر ضدباکتریایی خود را نشان می‌دهند (۳۳). مطابق با این نتایج، پیرخضریان و همکاران (۲۰۲۰، a و b)، با استفاده از شبیه‌سازی مولکولی گزارش کردند که CLF و مشتقات آن تمایل زیادی برای اتصال به DNA دارند و اثر خود را با مکانیسم‌های درون سلولی که منجر به اختلال در عملکردهای مرتبط با DNA، مانند همانندسازی و رونویسی می‌گردد، نشان می‌دهند (۳۴، ۳۵).

## REFERENCE

---

- Ma Q, Davidson PM, Zhong Q: Antimicrobial properties of lauric arginate alone or in combination with essential oils in tryptic soy broth and 2% reduced fat milk. *International journal of food microbiology* 2013, 166(1):77-84.
- Wang S, Zeng X, Yang Q, Qiao S: Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. *International journal of molecular sciences* 2016, 17(5):603.
- Pirkhezranian Z, Tanhaeian A, Mirzaii M, Sekhavati MH: Expression of Enterocin-P in HEK platform: evaluation of its cytotoxic effects on cancer cell lines and its potency to interact with cell-surface glycosaminoglycan by molecular modeling. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 2019:1-10.
- Linde A, Ross C, Davis E, Dib L, Blecha F, Melgarejo T: Innate immunity and host defense peptides in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008, 22(2):247-265.
- Tanhaiean A, Azghandi M, Razmyar J, Mohammadi E, Sekhavati MH: Recombinant production of a chimeric antimicrobial peptide in *E. coli* and assessment of its activity against some avian clinically isolated pathogens. *Microbial pathogenesis* 2018, 122:73-78.
- Tanhaieian A, Sekhavati MH, Ahmadi FS, Mamarabadi M: Heterologous expression of a broad-spectrum chimeric antimicrobial peptide in *Lactococcus lactis*: Its safety and molecular modeling evaluation. *Microbial pathogenesis* 2018, 125:51-59.
- Tanhaeian A, Ahmadi FS, Sekhavati MH, Mamarabadi M: Expression and purification of the main component contained in camel milk and its antimicrobial activities against bacterial plant pathogens. *Probiotics and antimicrobial proteins* 2018, 10(4):787-793.
- Tahmoorespur M, Azghandi M, Javadmanesh A, Meshkat Z, Sekhavati MH: A novel chimeric anti-HCV peptide derived from camel lactoferrin and molecular level insight on its interaction with E2. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 2019:1-13.
- Tanhaeian A, Jaafari MR, Ahmadi FS, Vakili-Ghartavol R, Sekhavati MH: Secretory expression of a chimeric peptide in *Lactococcus lactis*: assessment of its cytotoxic activity and a deep view on its interaction with cell-surface glycosaminoglycans by molecular modeling. *Probiotics and antimicrobial proteins* 2019, 11(3):1034-1041.
- Daneshmand A, Kermanshahi H, Sekhavati MH, Javadmanesh A, Ahmadian M: Antimicrobial peptide, cLF36, affects performance and intestinal morphology,

- microflora, junctional proteins, and immune cells in broilers challenged with *E. coli*. *Scientific reports* 2019, 9(1):1-9.
- Liu H, Pei H, Han Z, Feng G, Li D: The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of  $\epsilon$ -Polylysine and nisin against *Bacillus subtilis*. *Food control* 2015, 47:444-450.
- Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui N-E, Pagès J-M, Hassani L: Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection–bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 2012, 19(5):464-471.
- Maisetta G, Mangoni ML, Esin S, Pichierrri G, Capria AL, Brancatisano FL, Di Luca M, Barnini S, Barra D, Campa M: In vitro bactericidal activity of the N-terminal fragment of the frog peptide esculentin-1b (Esc 1–18) in combination with conventional antibiotics against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Peptides* 2009, 30(9):1622-1626.
- Gupta K, Singh S, Van Hoek ML: Short, synthetic cationic peptides have antibacterial activity against *Mycobacterium smegmatis* by forming pores in membrane and synergizing with antibiotics. *Antibiotics* 2015, 4(3):358-378.
- Regmi S, Choi YH, Choi YS, Kim MR, Yoo JC: Antimicrobial peptide isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* K14 revitalizes its use in combinatorial drug therapy. *Folia microbiologica* 2017, 62(2):127-138.
- McCloskey AP, Gilmore BF, Laverty G: Evolution of antimicrobial peptides to self-assembled peptides for biomaterial applications. *Pathogens* 2014, 3(4):791-821.
- Nuding S, Frascch T, Schaller M, Stange EF, Zabel LT: Synergistic effects of antimicrobial peptides and antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014, 58(10):5719-5725.
- van der Kraan MI, van Marle J, Nazmi K, Groenink J, van't Hof W, Veerman EC, Bolscher JG, Amerongen AVN: Ultrastructural effects of antimicrobial peptides from bovine lactoferrin on the membranes of *Candida albicans* and *Escherichia coli*. *Peptides* 2005, 26(9):1537-1542.
- CLSI. In: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 28th ed CLSI supplement M100 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018.
- Amin Mir M, Sawhney S, Manmohan SJ: Antimicrobial Activity of Various Extracts of *Taraxacum officinale*. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 2016, 8(3):210-215.
- Moghaddam MM, Aghamollaei H, Kooshki H, Barjini KA, Mirnejad R, Choopani A: The development of antimicrobial peptides as an approach to prevention of antibiotic resistance. *Reviews in Medical Microbiology* 2015, 26(3):98-110.
- Habibipour R, Moradi Haghgou L: Study on Hydro-Alcoholic Extract Effect of Pomegranate Peel on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences* 2015, 22(3):195-202.

- Wendakoon C, Calderon P, Gagnon D: Evaluation of selected medicinal plants extracted in different ethanol concentrations for antibacterial activity against human pathogens. *Journal of Medicinally Active Plants* 2012, 1(2):60-68.
- Mackay M, Milne K, Gould I: Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *International journal of antimicrobial agents* 2000, 15(2):125-129.
- Magalhães L, Nitschke M: Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control* 2013, 29(1):138-142.
- Zasloff M: Antimicrobial peptides in health and disease. *New England Journal of Medicine* 2002, 347(15):1199-1199.
- Brogden KA: Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews microbiology* 2005, 3(3):238-250.
- Niyonsaba F, Ushio H, Hara M, Yokoi H, Tominaga M, Takamori K, Kajiwara N, Saito H, Nagaoka I, Ogawa H: Antimicrobial peptides human  $\beta$ -defensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine IL-31 by human mast cells. *The Journal of Immunology* 2010, 184(7):3526-3534.
- Soren O, Brinch KS, Patel D, Liu Y, Liu A, Coates A, Hu Y: Antimicrobial peptide novicidin synergizes with rifampin, ceftriaxone, and ceftazidime against antibiotic-resistant Enterobacteriaceae in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015, 59(10):6233-6240.
- Zhou Y, Peng Y: Synergistic effect of clinically used antibiotics and peptide antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Experimental and therapeutic medicine* 2013, 6(4):1000-1004.
- Shang D, Liu Y, Jiang F, Han X: Synergistic antibacterial activity of Trp-containing antibacterial peptides in combination with antibiotics against multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Frontiers in Microbiology* 2019, 10:27-39.
- Wu X, Li Z, Li X, Tian Y, Fan Y, Yu C, Zhou B, Liu Y, Xiang R, Yang L: Synergistic effects of antimicrobial peptide DP7 combined with antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *Drug design, development and therapy* 2017, 11:93-109.
- Reyes-Cortes R, Acosta-Smith E, Mondragón-Flores R, Nazmi K, Bolscher JG, Canizalez-Roman A, Leon-Sicairos N: Antibacterial and cell penetrating effects of LFcin17-30, LFampin265-284, and LF chimera on enteroaggregative *Escherichia coli*. *Biochemistry and Cell Biology* 2017, 95(1):76-81.
- Pirkhezranian Z, Tahmoorespur M, Daura X, Monhemi H, Sekhavati MH: Interaction of camel Lactoferrin derived peptides with DNA: a molecular dynamics study. *BMC genomics* 2020, 21(1):60-72.
- Pirkhezranian Z, Tahmoorespur M, Monhemi H, Sekhavati MH: Computational Peptide Engineering Approach for Selection the Best Engineered Camel Lactoferrin-Derive Peptide with Potency to Interact with DNA. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 2020:1-10.
- Kapoor G, Saigal S, Elongavan A: Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology* 2017, 33(3):300-310.