

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

• علی جوادمنش (نویسنده مسئول)

عضو هیأت علمی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد

• زهرا موسوی

دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

• عباس تنهاییان

عضو هیأت علمی گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

• مرجان ازغندی

دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۲۰-۱۰-۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۳۱-۰۱-۱۳۹۸

Email: javadmanesh@um.ac.ir



چکیده

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های حیوانی رو به افزایش است که منجر به ایجاد عوارض جانبی نامطلوب نظیر مقاومت دارویی و نیز باقی‌ماندن آنتی‌بیوتیک در محصولات غذایی می‌شود. بنابراین، محققان به دنبال جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک با ترکیبات طبیعی و عوارض جانبی کمتر هستند. که از جمله این ترکیبات می‌توان به اسانس‌های گیاهی و پپتیدهای ضد میکروبی اشاره کرد. حداقل غلظت مهارکنندگی (*MIC*) بر اساس روش میکروبراث به وسیله‌ی پلیت ۹۶ خانه با چهار تکرار با استفاده از اسانس پونه‌ی کوهی، اسانس دارچین و نیز پپتید ضد میکروبی تاناتین برای باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موریوم (*Salmonella typhimurium*)، سالمونلا اینتریدیس (*Salmonella enteritidis*)، اشرشیاکلای (*Escherichia coli*) و اشرشیاکلای ۰۱۵۷ (*E. coli* ۰۱۵۷) صورت گرفت. بعد از اندازه‌گیری *MIC*، باکتری‌ها کشت داده شدند و حداقل غلظت کشندگی باکتری (*MBC*) سنجیده شد. نتایج آزمایش نشان داد کمترین مقدار *MIC* مربوط به پپتید تاناتین بر روی باکتری سالمونلا اینتریدیس و برابر با $6 \mu\text{g/ml}$ بود. علاوه بر این، کمترین مقدار *MBC* مربوط به پپتید تاناتین بر روی باکتری‌های اشرشیاکلای ۰۱۵۷ و سالمونلا اینتریدیس به میزان $25 \mu\text{g/ml}$ مشاهده شد. تاناتین یک پپتید ضد میکروبی کاتیونی است که توجه زیادی را در رابطه با مهار رشد طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌های گرم منفی، گرم مثبت و همچنین قارچ‌ها به خود جلب کرده است. این مطالعه نشان داد که پپتید تاناتین در غلظت کمتری نسبت به اسانس پونه کوهی و اسانس دارچین فعالیت ضد باکتریایی بود. جایگزینی پپتیدهای ضد میکروبی نظیر تاناتین با آنتی‌بیوتیک‌های رایج ممکن است به پیشرفت بزرگی در مبارزه با پاتوژن‌ها در صنعت پرورش دام منجر شود.

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

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

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

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

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

Email: javadmanesh@um.ac.ir

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

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

مقدمه

در چند دهه اخیر استفاده از آنتی بیوتیک ها در صنعت دامپروری به منظور پیشگیری و درمان بیماری ها و همچنین محرک رشد مورد استقبال قرار گرفته است. فدراسیون سلامت حیوانات اتحادیه اروپا اعلام کرد که بخش عظیمی از تمام آنتی بیوتیک های تجویز شده در اتحادیه اروپا برای حیوانات مزرعه مصرف شده است. اگرچه آنتی بیوتیک ها اثرات مفیدی بر عملکرد و سلامت حیوانات دارند، اما استفاده مداوم از آن ها منجر به ایجاد مشکلات زیادی در ارتباط با سلامت حیوانات و انسان می شود. یکی از این مشکلات انتقال میکروارگانیسم های مقاوم به آنتی بیوتیک است که علاوه بر زیان های اقتصادی، موجب ایجاد مشکلاتی در بخش درمان شده است و می توانند منبعی برای ژن مقاومت باشد و در نهایت ممکن است سلامت انسان را نیز به خطر بیاندازد (۱۸). امروزه مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها به یکی از مشکلات عمده در بخش درمان بیماری ها تبدیل شده است که نیاز به یک جایگزین مناسب را حیاتی کرده است. همچنین

محققین به دنبال یافتن ترکیباتی بجای آنتی بیوتیک ها بوده که اثرات جانبی و همچنین ایجاد مقاومت کمتری داشته باشند (۲۳) که در این میان اسانس های گیاهی و اخیراً پپتیدهای ضد میکروبی اهمیت ویژه ای دارند. اسانس های گیاهی، متابولیت های ثانویه گیاهی می باشند که به عنوان افزودنی در خوراک به منظور بهبود بازده و مبارزه با عوامل بیماری زا مورد استفاده قرار می گیرند. این ترکیبات شامل دامنه ی وسیعی از مواد مانند الکل، استر و یا مشتقات آلدهیدی ترپنوئیدها و فنیل پروپانوئیدها می باشند (۴، ۱۱). فعالیت اسانس های گیاهی بر علیه باکتری ها، پروتوزوا و قارچ ها به اثبات رسیده است، اما طرز عملکرد آن ها دقیقاً روشن نیست. فرضیات متعددی ارائه شده اند تا فعالیت های ضد میکروبی اسانس های گیاهی را توصیف نمایند. اما از آنجائی که اسانس های گیاهی ترکیبات بسیاری را در بر می گیرند، این احتمال وجود دارد که شیوه های عمل متعددی برای فعالیت ضد میکروبی از خود بروز دهند (۱۱). اسانس پونه ی کوهی و دارچین به عنوان ترکیبات با خواص ضد باکتریایی شناخته

pGH به همراه قطعه‌ی تاناتین به صورت مصنوعی سفارش داده شد (دنازیست، ایران). در ابتدا وکتور pGH و pcDNA^{3/1} به وسیله‌ی آنزیم محدودکننده‌ی HindIII برش داده شدند (ترمو، آمریکا). محصولات ایجاد شده به وسیله‌ی کیت استخراج از ژل (ترمو، آمریکا) تخلیص شدند و سپس تحت آنزیم محدودکننده‌ی BamHI به مدت پنج ساعت قرار گرفتند (ترمو، آمریکا). مجدداً استخراج از ژل صورت گرفت و عمل الحاق قطعه‌ی تاناتین در پلاسمید pcDNA^{3/1} توسط کیت (ترمو، آمریکا) انجام گردید. ۱۰ میکرولیتر از محصول الحاق شده به باکتری DH5 α منتقل شد (اینویترژن، آمریکا) سپس باکتری DH5 α بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. تنها DH5 α هایی که پلاسمید حاوی قطعه‌ی تاناتین باشند می‌توانند بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک رشد کنند. کلنی‌های ایجاد شده حاوی pcDNA^{3/1}+ تاناتین انتخاب و مجدداً کشت داده شدند. کلنی PCR به منظور بررسی ترانسفورم با استفاده از پرایمرهای یونیورسال پلاسمید pcDNA^{3/1}+ انجام شد. سپس استخراج پلاسمید از کلنی مورد نظر توسط کیت استخراج پلاسمیدهای پرو (HiPure) (ژش، آلمان) صورت گرفت. صحت توالی مورد نظر از طریق توالی‌یابی مورد بررسی قرار گرفت.

سلول‌های جینی کلیه انسان (ATCC® CRL-1573 TMHEK293) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO₂ و در محیط کشت Dul-becco's modified Eagle's (DMEM/F12) حاوی 10 درصد سرم جنین گاو (FBS)، ۱ درصد آمفوتریسین بی (اینویترژن، آمریکا) نگهداری شدند. برای ترنسفکشن، از روش فسفات کلسیم در محیط کشت DMEM/F12 به همراه ۱۰ درصد FBS استفاده شد. وکتور نوترکیب (pcDNA^{3/1}+ تاناتین) و همچنین pcDNA^{3/1}+ (فاقد تاناتین، به عنوان شاهد منفی) در ظرف جداگانه انتقال یافتند و تحت ۴۰۰ mg/mL آنتی‌بیوتیک جنتیسین (سیگما-آلد ریچ، آلمان) به مدت دو هفته قرار گرفتند. پس از تیمار با آنتی‌بیوتیک، محلول رویی سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب pcDNA^{3/1}+ که حاوی سیگنال پپتید بود جمع‌آوری شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به منظور انجام SDS-PAGE برای مشاهده‌ی پپتید بیان شده و همچنین بررسی میزان غلظت آن نگهداری گردید. ۳۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی پپتید تاناتین و فاقد آن با استفاده از بافر Tris/glycine/SDS در ژل ۱۶ درصد آکریل آمید ران شد. سپس ژل با استفاده از کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد و باند مربوط مشاهده گردید. میزان تقریبی غلظت پپتید از طریق نرم‌افزار GelQuant نسخه ۱.۸.۹ (www.biochemlabsolutions.com) تخمین زده شد.

فرآیند اسانس‌گیری از گیاه دارچین و پونه‌ی کوهی

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

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

پپتیدهای ضد میکروبی (AMP) در سال ۱۹۳۹ کشف شدند که به عنوان یک پیشنهاد مناسب به جای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی هستند. این پپتیدها یکی از گروه‌های عمده ترکیبات طبیعی هستند که حاوی ۱۲ تا ۱۰۰ آمینو اسید بوده که از طیف وسیعی از جانوران زنده مانند میکروارگانیزم‌ها، حشرات، بی‌مهرگان، گیاهان، دوزیستان، پرندگان، ماهی‌ها و سایر پستانداران استخراج می‌شوند (۱۵). امروزه AMP ها به علت دارا بودن خواص متنوع بیولوژیکی در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیزم‌ها از ویروس تا انگل، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. پپتیدهای ضد میکروبی در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها متفاوت است. پپتیدهای ضد میکروبی در یوکاریوت‌ها به دو دسته‌ی عمده تقسیم‌بندی می‌شوند: ۱- پپتیدهای کاتیونی که شامل سکرورین، دفنسنین، تیونین، ترکیبات مشتق شده از هیستون، ماریچ بتا و سایر ساختارهای طبیعی و فعال پروتئینی هستند. ۲- پپتیدهای آنیونی که شامل نوروپپتید، دی پپتیدهای آروماتیک و پروتئین‌های باند شده به اکسیژن هستند (۲۳). تاناتین یکی از پپتیدهای کوچک خانواده ماریچ بتا (پپتیدهای کاتیونی) بوده که دارای بار مثبت، غیر همولیتیک و آمفی‌پاتیک بوده که برای اولین بار از حشره‌ی *Podisus maculiventris* بعد از تحریک سیستم ایمنی استخراج شد. این پپتید جز اولین خط دفاعی بدن حشره است که فعالیت گسترده‌ای را در برابر پاتوژن‌های مختلف از جمله باکتری‌های گرم مثبت و منفی و همچنین قارچ‌ها نشان داده است (۱۴، ۲۲، ۷). در این مطالعه فعالیت ضد باکتری پپتید نوترکیب تاناتین، اسانس پونه‌ی کوهی و دارچین در برابر برخی از باکتری‌های بیماری‌زای دامی مقایسه شدند.

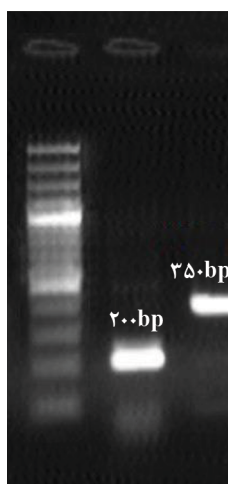
مواد و روش‌ها

باکتری‌های مورد مطالعه

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

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

توالی مربوط به ژن تاناتین به منظور بهینه‌سازی کدون‌ها برای بیان مناسب در سلول‌های جینی کلیه و سنتز شیمیایی آن با استفاده از پایگاه داده‌ی GenScript به دست آمد. توالی سنتز شده شامل نواحی Igk می‌باشد. این توالی، باعث انتقال پپتید به شبکه‌ی آندوپلاسمی رتیکولوم (ER) و بهبود در ترشح آن به بیرون از سلول می‌شود. وکتور



شکل ۲- نتایج مربوط به کلنی PCR

۱- مارکر ۱۰۰ جفت بازی. ۲: تکثیر ۱، pcDNA۳+ فاقد تواتی تاناتین. ۳: تکثیر ۱، pcDNA۳+ حاوی تواتی تاناتین .

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی باکتری

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

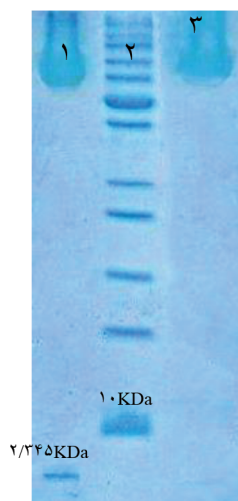
نتایج

کلون و بیان پپتید تاناتین

نتایج مربوط به هضم آنزیمی (شکل ۱) و کلنی PCR (شکل ۲) نشان داد که عملیات کلون موفقیت آمیز بوده است و انتقال وکتور در باکتری DH5α به درستی صورت گرفته است. همچنین بررسی توالی‌یابی نشان داد که قطعه‌ی تاناتین درون وکتور ۳/۱+pcDNA بدون جهش به درستی قرار گرفته است. بیان پپتید تاناتین در سلول‌های جنینی کلیه به وسیله‌ی

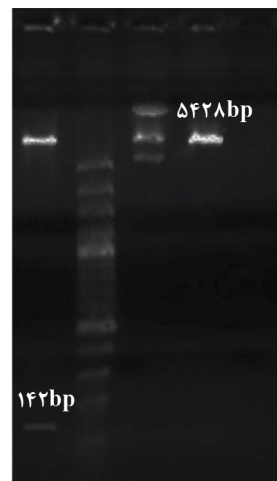
ژل SDS-PAGE بررسی شد که نشان از ترشح قطعه‌ی تاناتین در محیط کشت بود. نتایج مربوط به آنالیز باند این پپتید نشان داد که میزان غلظت تقریبی تاناتین ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد (شکل ۳).

آزمون حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی



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

۱- پپتید تاناتین با وزن مولکولی KDa ۲/۲۴۵: مارکر پروتئین با وزن مولکولی KDa ۱۰-۲۵۰ خط ۳: گروه شاهد (محیط کشت فاقد پپتید تاناتین)



شکل ۱- هضم آنزیمی با دو آنزیم BamHI و HindIII

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

و الکترون، فسفوریلاسیون، و برخی از واکنش‌های وابسته به آنزیم متصل به غشاء دخالت می‌کنند (۲). از معایب استفاده از اسانس‌ها می‌توان به اکسیده شدن آن‌ها به راحتی توسط نور، گرما و هوا اشاره کرد (۲۱)، که این امر موجب محدود شدن دامنه‌ی استفاده از آن‌ها می‌شود.

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

در این مطالعه بررسی فعالیت ضدباکتریایی پپتید تاناتین، اسانس دارچین و پونه‌ی کوهی از طریق آزمون حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی در جدول ۱ نشان داده شده است. کمترین مقدار حداقل غلظت بازدارندگی مربوط به پپتید تاناتین بر روی سالمونلا اینتریدیس ($6/25 \mu\text{g/mL}$) و بیشترین میزان مربوط به اسانس دارچین بر روی باکتری‌های اشرشیاکلای و سالمونلا تیفی‌موریوم ($250 \mu\text{g/mL}$) گزارش شد. همچنین کمترین مقدار برای حداقل غلظت کشندگی مربوط به پپتید تاناتین بر روی باکتری‌های اشرشیاکلای ۰۱۵۷ و سالمونلا اینتریدیس ($25 \mu\text{g/mL}$) و بیشترین میزان مربوط به اشرشیاکلای و سالمونلا تیفی‌موریوم ($500 \mu\text{g/mL}$) می‌باشد.

بحث

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

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

MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	باکتری‌ها
۵۰۰	۱۲۵	۲۵۰	۲۵	۱۰۰	۲۵۰	اشرشیاکلای
۲۵۰	۶۲/۵	۳۵/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۱۲۵	اشرشیاکلای ۰۱۵۷
۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۶/۲۵	۲۵	۱۲۵	سالمونلا اینتریدیس
۵۰۰	۱۲۵	۱۲۵	۵۰	۲۰۰	۲۵۰	سالمونلا تیفی موریوم

- quette, and P. Y. Chouinard. 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *Journal of Dairy Science* 90: 886-897.
3. Bryksa, B. C., L. D. Macdonald, A. Patrzykat, S. E. Douglas and N. R. Mattatall. 2006. A C-Terminal Glycine Suppresses Production of Pleurocidin as a Fusion Peptide in *E. coli*. *Protein Expression and Purification* 45: 88-98.
4. Calsamiglia, S., M. Busquet, P. Cardozo, L. Castillejos and A. Ferret. 2007. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science* 90: 2580-2595.
5. Cirioni, O., G. Wu, L. Li, F. Orlando, C. Silvestri, R. Ghiselli, Z. Shen, E. Gabrielli, L. Brescini, G. Lezoche and M. Provinciali. 2011. S-thanatin in vitro prevents colistin resistance and improves its efficacy in an animal model of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *Peptides* 32: 697-701.
6. Fasseas, M., K. Mountzouris, P. Tarantilis, M. Polissiou and G. Zervas. 2008. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry* 106: 1188-1194.
7. Fehlbaum, P., P. Bulet, S. Chemysh, J.P. Briand, J.P. Roussel, L. Letellier, C. Hetru and J.A. Hoffmann. 1996. Structure activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proceedings of National Academy of Science USA* 93: 1221-1225.
8. Feng, X., Liu, C., Guo, J., Song, X., Li, J., Xu, W., & Li, Z. (2012). Recombinant expression, purification, and antimicrobial activity of a novel hybrid antimicrobial peptide LFT33. *Applied microbiology and biotechnology* 95: 1191-1198.
9. Griffin, S.G., S.G. Wyllie, J.L. Markham, and D.N. Leach. 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal* 14:322-332.
10. Hancock, R.E., H.G. Sahl. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* 24: 1551-1557.
11. Hart, K.J., D.R. Yanez-Ruiz, S.M. Duval, N.R. McEwan, and C.J. Newbold. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Anim. Feed Science Technology*. 147: 8-35.
12. Hou, Z., F. Da, B. Liu, X. Xue, X. Xu, Y. Zhou, M. Li, Z. Li, X. Ma, J. Meng and M. Jia. 2013. R-thanatin inhibits growth and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in vivo and in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57: 5045-5052.
13. Jacobsen, F., A. Mohammadi-Tabrisi, T. Hirsch, D. Mittler, P.H. Mygind, C.P. Sonksen, D. Raventos, H.H. Kristensen, S. Ga-

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

نتیجه‌گیری

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

تشکر و قدردانی

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

منابع مورد استفاده

- Adam, K., A. Sivropoulou, S. Kokkini, T. Lanaras and M. Arsenakis. 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of agricultural and food chemistry* 46: 1739-1745.
- Benchaar, C., H. V. Petit, R. Berthiaume, D. R. Ouellet, J. Chi-

- termann, M. Lehnhardt, A. Daigeler, H.U. Steinau and L. Steins-traesser. 2007. Antimicrobial activity of the recombinant designer host defence peptide P-novispirin G10 in infected full-thickness wounds of porcine skin. *Journal of Antimicrobial Chemother* 59: 493-498.
14. Javadmanesh, A., A. Tanhaeian, Z. Mousavi and M. Azghandi. 2018. Investigation of recombinant thanatin effects on the growth inhibition of E. coli mastitis in dairy cows. The Proceedings of the 2nd International Congress on Biomedicine PP: 875-876.
15. Jenssen, H., P. Hamill and R.E. Hancock. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 19: 491-511.
16. Lourrenco, M., P.W. ardozo, S. Calsamiglia and V. Fievez. 2008. Effects of saponins, quercetin, eugenol and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continue culture fermenters. *Journal of Animal Science* 86: 3045-3053.
17. Ma, B., C. Niu, Y. Zhou, X. Xue, L. Meng, X. Luo and Z. Hou. 2016. The disulfide bond of the peptide thanatin is dispensible for its antimicrobial activity in vivo and in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60: 4283-4289.
18. Nhung, N.T., N. Chansiripornchai and J.J Carrique-Mas. 2017. Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Frontiers in Veterinary Science* 4: 126.
19. Pagès, J.M., J.L. Dimarcq, S. Quenin, and C. Hetru. 2003. Thanatin activity on multidrug resistant clinical isolates of Enterobacter aerogenes and Klebsiella pneumoniae. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22: 265-269.
20. Sabzghabae, A.M., F. Nili, A. Ghannadi, N. Eizadi Mood, M. 2011. Anvari. Role of menthol in treatment of candidial napkin dermatitis. *World Journal of Pediatrics* 7:167-70.
21. Sinha, S., L. Zheng, Y. Mu, W.J. Ng and S. Bhattacharjya. 2017. Structure and Interactions of a Host Defense Antimicrobial Peptide Thanatin in Lipopolysaccharide Micelles Reveal Mechanism of Bacterial Cell Agglutination. *Scientific Reports* 7: 17795.
22. Tanhaeian, A., M. Azghandi, Z. Mousavi and A. Javadmanesh. 2020. Expression of thanatin in HEK293 cells and investigation of its antibacterial effects on some human pathogens. *Protein and Peptide Letters*. 21: 41-47.
23. Vizioli, J. and M. Salzet. 2003. Antimicrobial peptides: new weapons to control parasitic infections? *Trends in Parasitology* 19: 32-40.
24. Wu, G., X. Li, X. Fan, H. Wu, S. Wang, Z. Shen and T. Xi. 2011. The activity of antimicrobial peptide S-thanatin is independent on multidrug-resistant spectrum of bacteria. *Peptides* 32: 1139-1145.
25. Zhou, Y., R. Zhao, B. Ma, H. Gao, X. Xue, D. Qu, M. Li, J. Meng, X. Luo and Z. Hou. 2016. Oligomerization of RNAIII-inhibiting peptide inhibits adherence and biofilm formation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in vitro and in vivo. *Microbial Drug Resistance* 22: 193-201.

