DOI: 10.48305/jims.v41.i729.0615

مجله دانشکده پزشکی اصفهان | سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۲۹/هفته‌ی اول مهر ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۳۰ | تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۴ | تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۷/۷

اثرات ضدمیکروبی فیوژن پپتید TP4-LYC1 بر سویه‌های *آسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو

رسول سلطانی[۱]، فاطمه صادقی کوپایی[۱]، فاطمه شفیعی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کلیستین، تایگسایکلین و آمپی‌سیلین/سولباکتام با دوز بالا تنها آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که اثربخشی بالایی در برابر *Acinetobacter baumannii* مقاوم به چند دارو داشته و آخرین خط درمان آن هستند. بنابراین، بررسی عوامل ضدمیکروبی جدید با فعالیت بالقوه علیه این پاتوژن ضروری می‌باشد. هدف این پژوهش، تولید یک فیوژن پپتید تشکیل شده از دو پپتید ضدمیکروبی شامل TP4 (Tilapia Piscidin 4) و لیکوزین-۱ (LYC1) و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی آن در برابر *آسینتوباکتر بومانی* مقاوم و همچنین ارزیابی اثرات همزمان این پپتید با کلیستین و مروپنم بر روی *A. baumannii* مقاوم به چند دارو می‌باشد.

روش‌ها: بهینه‌سازی شرایط برش هر پپتید به منظور کسب بیشترین پپتیدهای جدا شده از تگ اینتئینی در وکتور ptwin-1 بر اساس زمان انکوباسیون و pH بافر برش انجام شد و اثرات ضدمیکروبی هر پپتید، به تنهایی یا در ترکیب با کلیستین یا مروپنم به ترتیب با روش‌های میکرودیلوشن براث و تخته شطرنجی، بررسی گردید.

یافته‌ها: بهترین شرایط برای برش TP4 استفاده از بافر B2 با pH = ۶/۵ برای ۲۴ ساعت زمان انکوباسیون بود. این شرایط برای LYC1 و TP4-LYC1 به ترتیب pH = ۴ برای ۲۴ و ۴۸ ساعت زمان انکوباسیون به دست آمد. فعالیت ضدباکتریایی TP4-LYC1 بیش از TP4 برای هر نمونه‌ی بیولوژیکی بود. همچنین TP4-LYC1 در اکثر موارد دارای اثرات سینرژیست با مروپنم و کلیستین بود.

نتیجه‌گیری: TP4-LYC1 این پتانسیل را دارد که به عنوان یک کاندید برای درمان عفونت‌های ناشی از *A. baumanni* در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر معمول به منظور کاهش دوز این آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین جلوگیری از بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی ناخواسته استفاده شود.

واژگان کلیدی: *آسینتوباکتر بومانی*؛ اثرات سینرژیست؛ پپتیدهای ضدمیکروبی

ارجاع: سلطانی رسول، صادقی کوپایی فاطمه، شفیعی فاطمه. **اثرات ضدمیکروبی فیوژن پپتید TP4-LYC1 بر سویه‌های *آسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۲۹): ۶۲۳-۶۱۵

مقدمه

پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، یک تهدید مهم و روبه رشد برای سلامت عمومی هستند (۱). درمان آنتی‌بیوتیکی نامناسب، باعث نتایج ناخوشایند از قبیل مرگ و میر بالاتر، افزایش مدت بستری و افزایش بار اقتصادی می‌شود (۲). در این بین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های گرم منفی، یک نگرانی جدی است.

Acinetobacter baumannii یک پاتوژن گرم منفی است که اغلب باعث ایجاد عفونت‌های بیمارستانی از جمله باکتریمی، پنومونی، منتژیت و عفونت‌های دستگاه ادراری می‌شود (۳). از طرفی این پاتوژن به عنوان یک عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی در سراسر جهان شناخته شده است و توسط انجمن بیماری‌های عفونی آمریکا (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) IDSA به عنوان یکی از شش میکروارگانیسم مهم و خطرناک معرفی گردیده است (٤). در حال حاضر، عفونت‌های ناشی از *A. baumannii* به یک مشکل جدی در سراسر جهان تبدیل شده است و کلیستین (Colistin)، تایگسایکلین (Tigecycline) و آمپی‌سیلین/سولباکتام (با دوز بالا)، تنها آنتی‌بیوتیک‌های با تأثیر زیاد و خط آخر درمان *آسینتوباکتر* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک می‌باشند (٤). بنابراین پیدا کردن عوامل درمانی جدید می‌تواند کمک زیادی در کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌های موجود و در نتیجه جلوگیری از بروز

۱- استاد، گروه داروسازی بالینی و خدمات دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: فاطمه شفیعی: استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: f_shafiee@pharm.mui.ac.ir

مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی ناخواسته گردد. پپتیدهای ضدمیکروبی کاتیونی ابزاری جذاب برای کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر باکتری‌ها می‌باشند.

پپتیدهای ضدمیکروبی، عوامل طبیعی هستند که از منابع مختلف از قبیل حشرات، ماهی‌ها، دوزیستان و پستانداران شناسایی و جداسازی شده‌اند و در ایمنی ذاتی علیه پاتوژن‌های میکروبی نقش مهمی دارند (۵). یکی از پپتیدهای ضدمیکروبی که اثرات آن بر سویه‌های مختلف باکتریایی و قارچی بررسی شده است TP4 (Tilapia Piscidin 4) با ۲۵ اسیدآمینه می‌باشد که از ماهی تیلاپیای رودخانه نیل با نام علمی *Oreochromis niloticus* استخراج شده است (٦).

در مطالعه‌ای، اثرات ضدمیکروبی این پپتید علیه *آسینتوباکتر بومانی* مقاوم به کارباپنم و *کلبسیلاپنومونیه* مقاوم مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که TP4 حتی نسبت به تایگسایکلین هم اثرات ضدمیکروبی بیشتری دارد و بر روی موش‌های سالم اثرات توکسیک ندارند و به کلی ایمن است (۷). مطالعه‌ی دیگر به ارزیابی اثرات ضدمیکروبی این پپتید که به صورت نوترکیب در مخمر *پیچیا پاستوریس* تولید شده بود پرداخته است. در این مطالعه نیز مشخص شد که از بین سویه‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد ارزیابی، بیشترین حساسیت را گونه‌های *لیستریا*، *پروتئوس ولگاریس* و *انتروکوک فکالیس* نشان دادند (٦).

سم عنکبوت حاوی انواع مختلف پپتیدها و پروتئین‌های دارای اثرات درمانی می‌باشد. یکی از پپتیدهای موجود در سم عنکبوت پپتیدی به نام لیکوزین-۱ (lycosin-1) LYC1 است که دارای اثرات ضدمیکروبی می‌باشد. این پپتید در ونوم عنکبوتی به نام *Lycosa singorensis* وجود دارد و دارای ٢٤ اسیدآمینه است (۸). نشان داده شده است که این پپتید دارای اثرات ضدمیکروبی علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها و قارچ‌ها و به خصوص سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه*، *شیگلا دیسانتری* و *استافیلوکوک اپیدرمیس* می‌باشد (۹).

در مطالعه‌ی دیگری اثرات ضدمیکروبی این پپتید علیه عفونت‌های ناشی از *آسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو ارزیابی گردید. نتایج مطالعه‌ی مذکور نیز نشان داد که اثرات ضدمیکروبی لیکوزین-۱ در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌هایی از قبیل آمیکاسین، مینوسایکلین و حتی تایگسایکلین نیز بیشتر است (۱۰).

با توجه به اینکه استفاده‌ی ترکیبی از عوامل ضدمیکروبی می‌تواند منجر به بروز اثرات سینرژیست بین آن‌ها، کاهش احتمال بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و کاهش دوز داروی مورد نیاز و هزینه‌های کلی درمان شود، استفاده از رویکرد پپتیدهای فیوژن که حاوی دو یا چند پپتید ضدمیکروبی در کنار هم می‌باشد با این اهداف سازگار است. بنابراین، با توجه به شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به باکتری *آسینتوباکتر بومانی* و قابلیت بالای عفونت‌های ناشی از این باکتری به عنوان عوامل تهدیدکننده‌ی حیات و اثرات امیدبخش هر کدام از پپتیدهای مذکور به تنهایی در اعمال اثرات ضدمیکروبی علیه این باکتری، هدف مطالعه‌ی حاضر در وهله‌ی اول، بهینه‌سازی تولید فرم محلول (در مرحله‌ی بیان و تخلیص) فیوژن پپتید TP4-LYC1 می‌باشد. سپس تعیین اثرات ضدمیکروبی آن در برابر باکتری *آسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران و همچنین تعیین اثرات سینرژیست آن با دو آنتی‌بیوتیک کلیستین (به عنوان یک آنتی‌بیوتیک مؤثر بر *آسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو) و مروپنم (به عنوان آنتی‌بیوتیکی که پاتوژن‌های مورد مطالعه نسبت به آن مقاومت دارند) بود.

روش‌ها

پلاسمیدهای نوترکیب، نمونه‌های بالینی و مواد مورد استفاده: پلاسمید Ptwin1 نوترکیب که به ترتیب حاوی ژن‌های TP4، LYC1 و TP4-LYC1 بود؛ توسط شرکت زیست اقتصاد ماد تهران، سنتز و تحویل گردید. سویه‌ی باکتری مورد استفاده برای بیان پپتیدهای نوترکیب *E. coli* BL21 (DE3) بود که از کلکسیون میکروبی ایران (پاستور، ایران) خریداری گردید. آمپی‌سیلین (شرکت سیگما، آلمان) به عنوان آنتی‌بیوتیک شناساگر کلونی‌های ترانسفرم شده با هر یک از پلاسمیدهای نوترکیب استفاده شد. القای بیان هر یک از پپتیدها با اضافه کردن IPTG انجام گرفت که از شرکت سیگما (آلمان) تهیه گردید. ایزوله‌های میکروبی مربوط به نمونه‌های بیولوژیک (ترشحات تراشه)، از آزمایشگاه بالینی بیمارستان الزهرا(س) اخذ شد و جهت تعیین MIC هر یک از ترکیبات کشت گردیدند.

بهینه‌سازی بیان محلول و تخلیص پپتیدها: وکتور نوترکیب حاوی ژن کد کننده‌ی هر کدام از پپتیدها به تنهایی و همچنین پپتید فیوژن با روش شوک حرارتی در باکتری *E. coli* BL21 (DE3) ترانسفرم گردید (۱۱) و یک کلنی نوترکیب از روی پلیت حاوی محیط کشت LB آگار محتوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین برداشت شد. کلنی برداشت شده برای القای بیان پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. به همین منظور، کشت شبانه با حجم ۱۰ میلی‌لیتر تهیه گردید و در روز بعد به ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه LB براث تلقیح گردید و با رسیدن به OD600 از ۰/٤ تا ۰/٦، بیان محلول هر یک از پپتیدها به صورت فیوز شده با Intein1 و Intein2 توسط IPTG با غلظت ۰/۱۵ میلی‌مولار به مدت ٢٤ ساعت و در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد القا شد. سپس سلول‌ها از طریق سانتریفیوژ در RPM

۷۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد جدا شدند. در نهایت، ارزیابی بیان پروتئین‌های نوترکیب توسط SDS-PAGE ۱۲ درصد انجام شد.

بهینه‌سازی برش اینتئین ۱ از هر یک از پپتیدهای TP4، LYC1 و TP4-LYC1 با بافر B2 (تریس هیدروکلراید ۲۰ میلی‌مولار، سدیم کلراید ۵۰۰ میلی‌مولار و EDTA ۱ میلی‌مولار) با pHهای متفاوت ٤ و ٦/٥ و در زمان‌های انکوباسیون مختلف ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت و در دماهای مختلف ٢٥ و ٣٧ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. در مرحله‌ی بعد، بر اساس شرایط بهینه برش اینتئین ۱ و طبق پروتکل سیستم IMPACT (۱۲) خالص‌سازی با استفاده از رزین کیتین و با استفاده از بافر B2 برای برش اینتئین ۱ و بافر B3 (تریس هیدروکلراید ۲۰ میلی‌مولار، سدیم کلراید ۵۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۱ میلی‌مولار و دی تیو تریتول ۵۰ میلی‌مولار) برای برش اینتئین ۲ استفاده شد. در نهایت غلظت پروتئین خالص شده با روش برادفورد تعیین گردید (۱۳) و نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از روش فیلتراسیون (فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر) استریل شدند.

انتخاب سوش‌های میکروبی: تعداد ۱۰ ایزوله‌ای که از نظر حساسیت میکروبی به روش دیسک دیفیوژن مورد ارزیابی قرار گرفته بودند و همگی دارای مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده‌ی کارباپنم و MDR (مقاومت به حداقل سه دسته آنتی‌بیوتیک سفالوسپورین‌ها، فلوروکینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها) بودند از آزمایشگاه بالینی بیمارستان الزهرا(س) انتخاب شده و در محیط کشت مولر هینتون براث به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. همزمان، اطلاعات دموگرافیک بیماران، بخش بستری، نوع عفونت و سویه‌ی جداسازی شده به صورت محرمانه دریافت گردید.

تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) پپتید فیوژن: برای تعیین حداقل غلظت مهاری هر یک از پپتیدهای تهیه شده و همچنین کلیستین و مروپنم از روش میکرودایلوشن (Microdilution) استفاده شد. به صورت خلاصه، در پلیت ۹٦ خانه مقدار ۱٤۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث (Mueller-Hinton broth) ریخته شد و سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با غلظت $۱۰^{۸}$ cfu/ml به هر کدام از چاهک‌ها اضافه گردید. در مرحله‌ی بعد ۵ رقت متوالی سریالی از غلظت استوک هر پپتید که قبلاً توسط روش برادفورد تعیین غلظت شده بودند (هر پپتید به تنهایی و پپتید فیوژن) و آنتی‌بیوتیک‌های کلیستین و مروپنم با حجم ۲۰ میکرولیتر ریخته شد. در مرحله‌ی آخر، به همه‌ی خانه‌های پلیت، مقدار ۲۰ میکرولیتر معرف آلاماربلو (Alamar blue) اضافه گردید. پلیت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت نگهداری شد و هر بار نتایج ثبت گردید. در هر ردیف، آخرین خانه‌ای که میکروارگانیسم در آن رشد نکرده و رنگ آبی بود، به عنوان MIC آن آنتی‌بیوتیک برای آن سوش، در نظر گرفته شد.

بررسی اثر سینرژیست پپتید فیوژن با کلیستین و مروپنم: روش تخته شطرنجی برای ارزیابی اثرات همزمان پپتید فیوژن (TP4-LYC1) با مروپنم و کلیستین مورد استفاده قرار گرفت به این ترتیب که پس از اضافه کردن مقدار ۱۲۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث و ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با غلظت $۱۰^{۸}$ cfu/ml به هر کدام از چاهک‌ها، غلظت‌های حوالی MIC یکی از مواد ضدمیکروبی در چاهک‌های ردیف افقی پلیت ۹٦ خانه و دیگری در چاهک‌های ردیف عمودی ریخته شد. چاهک‌های تلقیح شده‌ی حاوی محیط کشت مایع و مقادیر افزایشی از ماده‌ی ضدمیکروبی به مقدار ۲۰ میکرولیتر، از صفر تا غلظت MIC هر ترکیب مورد بررسی طوری قرار گرفتند که تمام مخلوط‌های ممکن آزمایش شوند. پس از پرکردن چاهک‌ها، در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت قرار گرفت و با مشاهده‌ی تغییر رنگ معرف آلاماربلو MIC هر عامل ضدمیکروبی در کنار عامل ضدمیکروبی دوم تعیین و مقدار (Fractional Inhibitory Concentration Index) FICI طبق فرمول زیر محاسبه شد (١٤).

$$\text{FIC index} = (\text{MICAB}/\text{FICA}) + (\text{MICBA}/\text{MICB})$$

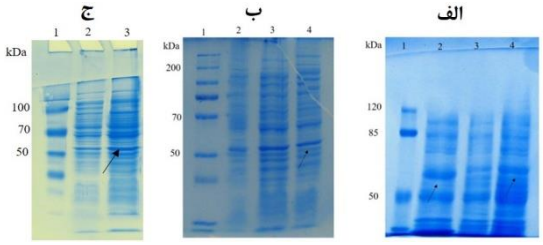
MICAB: MIC ترکیب A در حضور ترکیب B

MICBA: MIC ترکیب B در حضور ترکیب A

این مقاله با کد IR.MUI.RESEARCH.REC.1400.052 اخلاق در پژوهش در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به تصویب رسید.

یافته‌ها

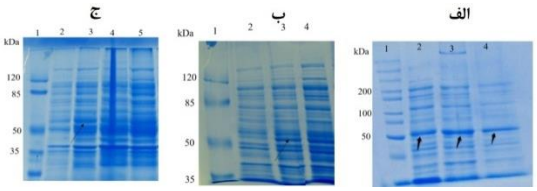
همانطوری که در شکل ۱ نشان داده شده است، بیان نامحلول و محلول سه پپتید TP4-LYC1، TP4 و LYC1 در باکتری *E. coli* BL21 (DE3) در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و با غلظت ۰/۱۵ میلی مولار IPTG، القا شد. باندهای حدود ۵۷، ۵۷ و ٦۰ کیلودالتون به ترتیب مربوط به بیان فیوژن پپتید LYC1، TP4 و TP4-LYC1 به صورت فیوز شده با اینتین ۱ و ۲ از وکتور مورد استفاده می‌باشد. همچنین در شکل ذکر شده باند مربوط به بیان دو اینتئین متصل به هم در وکتور غیرنوترکیب با وزن تقریبی ٥٤ کیلو دالتون قابل مشاهده می‌باشد (شکل ۱). شکل ۲ بیان محلول هر یک از پروتئین‌ها را در شرایط بهینه برای بیان بیشترین پروتئین به صورت محلول نشان می‌دهد.



شکل ۱. SDS-PAGE حاصل از بیان تام پروتئین‌ها

الف: بیان تام پروتئین LYC1 فیوز شده با اینتئین ۱ و ۲. ستون ۱: مارکر، ستون۲: بیان تام باکتری *E. coli* حاوی وکتور غیر نوترکیب Ptwin1، ستون ۳: بیان تام باکتری *E. coli* حاوی Ptwin 1-LYC1 قبل از القا، ستون ٤: بیان تام باکتری *E. coli* حاوی Ptwin 1-LYC1 القا شده با ۰/۱۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد. **ب:** بیان تام TP4 فیوز شده با اینتئین ۱ و ۲. ستون ۱: مارکر، ستون۲: بیان تام باکتری *E. coli* حاوی وکتور غیرنوترکیب Ptwin1، بیان تام باکتری *E. coli* حاوی Ptwin 1-TP4 قبل از القا، ستون ٤: بیان تام باکتری *E. coli* حاوی Ptwin 1-TP4 القا شده با ۰/۱۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد. **ج:** بیان تام TP4-LYC1 فیوز شده با اینتئین ۱ و ۲. ستون ۱: مارکر، ستون ۲: بیان تام باکتری *E. coli* حاوی Ptwin 1-TP4-LYC1قبل از القا، ستون ۳: بیان تام باکتری *E. coli* حاوی Ptwin 1-TP4-LYC1 القا شده با ۰/۱۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد.

در مرحله‌ی تعیین شرایط بهینه برای برش پپتید مربوطه از اینتئین ۱ در مدت زمان‌های متفاوت تحت تأثیر بافرهای با pH متفاوت، نتایج نشان داد که برای پپتید LYC1 انکوباسیون در بافر B2 با pH برابر با ٤ بعد از ٢٤ ساعت بیشترین قابلیت القای برش را دارد.



شکل ۲. SDS-PAGE حاصل از بیان محلول پروتئین‌ها

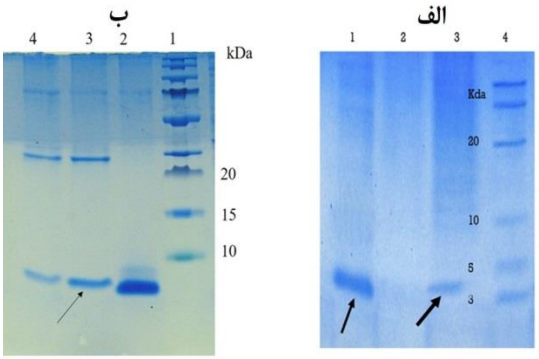
الف: بیان پروتئین LYC1 فیوز شده با اینتئین ۱ و ۲. ستون ۱: مارکر، ستون ۲: بیان محلول باکتری *E. coli* حاوی Ptwin 1-LYC1 القا شده با ۰/۱۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ستون ۳: بیان محلول باکتری *E. coli* حاوی Ptwin 1-LYC-1القا شده با ۰/۱۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ستون٤: بیان محلول باکتر ی *E. coli* حاوی Ptwin 1-LYC-1 القا شده با ۰/۱۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد. **ب:** بیان پروتئین TP4 فیوز شده با اینتئین ۱ و ۲. ستون ۱: مارکر، ستون ۲: بیان محلول *E. coli* حاوی Ptwin 1- TP4 بدون اضافه شدن القاگر، ستون ۳: بیان محلول *E. coli* حاوی Ptwin 1-TP4 القا شده با ۰/۱۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ستون ٤: بیان محلول باکتری *E. coli* حاوی Ptwin 1- TP4 القا شده با ۰/۱۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد. **ج:** بیان پروتئین TP4-LYC1 فیوز شده با اینتئین ۱ و ۲. ستون ۱: مارکر، ستون۲: بیان محلول *E. coli* حاوی Ptwin 1- TP4-LYC1 بدون اضافه شدن القاگر، ستون ۳: بیان محلول *E. coli* حاوی Ptwin 1 TP4-LYC1 القا شده با ۰/۱۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ستون ٤: بیان محلول پروتئین‌های باکتری *E. coli* حاوی Ptwin 1-TP4-LYC1 القا شده با ۰/۱۵ میلی مولار IPTG در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ستون ۵: بیان محلول پروتئین‌های باکتری *E. coli* حاوی Ptwin 1- TP4-LYC1 القا شده با ۰/۱۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد

برای پپتید TP4 و TP4-LYC1 نیز بیشترین میزان برش با انکوباسیون در بافر B2 با pH برابر با ٦/٥ و ٤ به ترتیب بعد از ٢٤ و ٤٨ ساعت به دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱. شرایط بهینه‌ی برش پپتید از اینتئین ۱

نام پپتید	شرایط بهینه‌ی برش اینتیئن ۱		
	دمای انکوباسیون (درجه‌ی سانتی‌گراد)	زمان انکوباسیون (ساعت)	pH بافر
LYC1	۲۵	۲۴	۴
TP4	۲۵	۲۴	۶/۵
TP4-LYC1	۲۵	۴۸	۴

در نهایت بررسی پپتیدهای خالص شده بر روی ژل SDS-PAGEحاوی بافر تریسین برای LYC1، TP4 و TP4-LYC1 به ترتیب باند ۳، ۳ و ٦ کیلودالتون را نشان دادند (شکل ۳).



شکل ۳. SDS-PAGE حاصل از تخلیص پپتیدها.

الف: ستون ۱: تخلیص پپتید TP4، ستون ۳: تخلیص پپتید LYC1، ستون٤: مارکر. ب: ستون ۱: مارکر، ستون ۲: انسولین NPH، ستون ۳: تخلیص پپتید TP4-LYC1

نتایج مربوط به MIC هر کدام از عوامل ضدمیکروبی مورد استفاده به تنهایی و همچنین اثرات همزمان فیوژن پپتید TP4-LYC1 در کنار دو آنتی‌بیوتیک پرکاربرد در درمان پنومونی ناشی از *آسینتوباکتر بومانی* به طور خلاصه در جدول ۲ آمده است. از مجموع ۱۰ نمونه‌ی مورد ارزیابی، ۳ نفر زن و ۷ نفر مرد با رنج سنی ۳۵ تا ۷۷ سال و از بخش‌های مختلف بیمارستان بودند.

به طور متوسط، MIC مربوط به پپتید LYC1، TP4 و TP4-LYC علیه سویه‌های مورد بررسی با مقادیر ۱۸/۹٤، ۸/٦ و ۳/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. همچنین این اندکس برای آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و کلیستین نیز به ترتیب به مقدار ۱۰۷/۱۸ و ۰/۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

جدول ۲. نتایج مربوط به MIC (میکروگرم بر میلی‌لیتر) هر یک از عوامل ضدمیکروبی و FIC در استفاده‌ی هم‌زمان

شماره نمونه	عامل ضدمیکروبی مورد استفاده	MIC	MIC کلیستین در حضور TP4-LYC1	MIC مروپنم در حضور TP4-LYC1	MIC TP4-LYC1 در حضور کلیستین	MIC TP4-LYC1در حضور مروپنم	FICI	تفسیر
۱	مروپنم	۱۸/۷	۰/۱۵۶	۹/۴	۱/۸۷۵	۰/۹۴	۰/۹۸	تجمعی
	کلیستین	۰/۶۲۵					۱/۲۴۹	فاقد اثر بر هم
	لیکوزین	۱/۸۷۵						
	TP4	۱/۸۷۵						
	TP4-LYC1	۱/۸۷۵						
۲	مروپنم	۹/۴	۰/۰۴	۴/۷	۰/۹۴	۰/۴۷	۱	تجمعی
	کلیستین	۰/۳۲					۱/۳۱	فاقد اثر بر هم
	لیکوزین	۱۵						
	TP4	۷/۵						
	TP4-LYC1	۰/۹۴						
۳	مروپنم	۷۵	۰/۰۲	۱۵	۰/۹۴	۳/۷۵	۱/۲۴	فاقد اثر بر هم
	کلیستین	۰/۱۶					۰/۲۵	سینرژیست
	لیکوزین	۱۵						
	TP4	۷/۵						
	TP4-LYC1	۳/۸۷۵						
۴	مروپنم	۲۵۰	۰/۰۲	۳۱/۲۵	۰/۲۳	۰/۴۷	۰/۳۴	سینرژیست
	کلیستین	۰/۱۶					۰/۱۵۶	سینرژیست
	لیکوزین	۱۵						
	TP4	۷/۵						
	TP4-LYC1	۰/۹۴						
۵	مروپنم	۱۸	۰/۰۸	۱۵	۷/۵	۷/۵	۲	فاقد اثر بر هم
	کلیستین	۰/۰۸					۲	فاقد اثر بر هم
	لیکوزین	۱۵						
	TP4	۷/۵						
	TP4-LYC1	۰/۹۴						
۶	مروپنم	۱۲۵	۰/۰۸	۶۲/۵	۷/۵	۷/۵	۱/۵	فاقد اثر بر هم
	کلیستین	۰/۰۸					۲	فاقد اثر بر هم
	لیکوزین	۳۰						
	TP4	۱۵						
	TP4-LYC1	۷/۵						
۷	مروپنم	۷۵	۰/۰۲	۳۱/۲۵	۰/۹۴	۰/۹۴	۱	تجمعی
	کلیستین	۰/۳۲					۰/۵۶	تجمعی
	لیکوزین	۳۰						
	TP4	۱۵						
	TP4-LYC1	۱/۸۷۵						
۸	مروپنم	۱۲۵	۰/۰۲	۱۵	۳/۷۵	۳/۷۵	۰/۶۴	تجمعی
	کلیستین	۰/۳۲					۰/۵۶	تجمعی
	لیکوزین	۳۰						
	TP4	۱۵						
	TP4-LYC1	۷/۵						

ادامه جدول ۲. نتایج مربوط به MIC (میکروگرم بر میلی‌لیتر) هر یک از عوامل ضدمیکروبی و FIC در استفاده‌ی هم‌زمان

شماره نمونه	عامل ضدمیکروبی مورد استفاده	MIC	MIC کلیستین در حضور TP4-LYC1	MIC مروپنم در حضور TP4-LYC1	MIC TP4-LYC1 در حضور کلیستین	MIC TP4-LYC1در حضور مروپنم	FICI	تفسیر
۹	مروپنم	۲۵۰	۰/۰۲	۳۱/۲۵	۰/۴۷	۰/۹۴	۰/۲۷۵	سینرژیست
	کلیستین	۰/۰۸					۰/۳۱	سینرژیست
	لیکوزین	۳۰						
	TP4	۷/۵						
	TP4-LYC1	۷/۵						
۱۰	مروپنم	۱۲۵	۰/۰۱	۱۵	۰/۴۷	۰/۴۷	۱/۱۴	فاقد اثر بر هم
	کلیستین	۰/۰۸						فاقد اثر بر هم
	لیکوزین	۷/۵						
	TP4	۱/۸۷۵						
	TP4-LYC1	۰/۴۷						

جدول ۱ نتایج استفاده‌ی هم‌زمان پپتید فیوژن با هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌ها را گزارش می‌کند. بر اساس این یافته‌ها، از مجموع ۱۰ نمونه، ۵ نمونه اثرات سینرژیستی یا تجمعی بین فیوژن پپتید مورد مطالعه با مروپنم و ۵ نمونه دارای اثرات سینرژیستی یا تجمعی با کلیستین بودند و در هر کدام، هیچ یک از دو آنتی‌بیوتیک مذکور، اثرات آنتاگونیستی مشاهده نگردید.

بحث

مطالعه‌ی پیش رو با هدف تولید فیوژن پروتئین جدید TP4-LYC1 در *E. coli*، بهینه‌سازی فرایند تخلیص آن به کمک سیستم اینتئینی IMPACT و در نهایت ارزیابی اثرات ضدمیکروبی بر سویه‌های *آسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو جدا شده از نمونه‌های بیمارستان انجام شد و نتایج نشان داد که تقریباً در نیمی از موارد استفاده همزمان از این پپتید و آنتی‌بیوتیک کلیستین یا مروپنم منجر به بروز اثرات سینرژیستی در اثرات ضدمیکروبی آن‌ها می‌شود.

عوامل متفاوتی می‌توانند منجر به بهبود فرایند القای برش در استفاده از سیستم‌های اینتئینی شود. برای مثال تغییر pH، دمای انکوباسیون یا استفاده از عوامل احیا کننده‌ی مختلف مثل دی‌تیوتریتول یا ۲-مرکاپتواتانول یا حتی اسید آمینه سیستئین و غیره از جمله‌ی این عوامل هستند (۱۵). به طور کلی، تغییر در pH راحت‌تر از اضافه کردن مواد شیمیایی مختلف است. زیرا این استراتژی به نوع اولین اسیدآمینه پروتئین هدف که مستقیماً به دنباله اینتئین متصل است، وابسته نیست در حالی که برای اینتئین‌هایی که فرایند خود برشی ناشی از افزودن عوامل کاهنده به آن‌ها است کاملاً با اسید آمینه C -ترمینال پروتئین هدف وابسته می‌باشد (۱۶). به طور مثال در مطالعه‌ای، خالص‌سازی پپتید ضدمیکروبی BR2 با واسطه‌ی اینتئین gyrA تحت تیمار DTT و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برای حدود ۴۰ ساعت با توجه به وجود یک باقی‌مانده آرژنین در انتهای کربوکسیل آن انجام شد (۱۷). راهبرد دیگر که در آن تنها تغییر در pH و زمان و دمای انکوباسیون منجر به القای فعالیت خود برشی اینتئین‌ها می‌شود، ساده‌تر است.

در مطالعه‌ای محدوده‌ی pH ۳ تا ۸ برای بافر B2 در دمای اتاق برای خالص‌سازی یک پپتید بتادفنسین به نام DFFB118 استفاده شد. نتایج این پروژه تأیید کرد که pH بهینه برای این منظور از ۵ تا ۵/۵ با بازده نهایی تقریباً ۰/۵-۱ میلی‌گرم در لیتر محیط کشت مایع می‌باشد (۱۸). به طور مشابه در تحقیق پیش رو، از بین دو pH مختلف مورد بررسی بهترین شرایط pH ٤ برای القای بیشتر خاصیت خود برشی در رابطه با پپتیدهای TP4 و LYC1 بود و در مورد TP4-LYC1 بهترین شرایط برای القای بیشتر خاصیت خودبرشی برابر pH ٦/٥ به دست آمد.

در مطالعه‌ی دیگری، شرایط برش مختلف شامل دمای ٤ و ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳ یا ۲٤ ساعت انکوباسیون استفاده شد و نتایج نشان داد که هنگامی که انکوباسیون ستون در دمای یخچال (٤ درجه‌ی سانتی‌گراد) انجام شود و زمان انکوباسیون افزایش یابد (۲٤ ساعت)، بازده پروتئین خالص افزایش می‌یابد. با این حال، برای انکوباسیون در دمای اتاق (۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد)، تفاوتی بین مقادیر نهایی پروتئین در دو زمان انکوباسیون وجود نداشت (۱۹).

TP4 سمیت قابل توجهی علیه طیف وسیعی از پاتوژن‌ها نشان می‌دهد. در اولین گزارش از فعالیت ضد میکروبی TP4 که توسط Su و همکاران منتشر شد، مقادیر MIC برای اکثر پاتوژن‌های آزمایش شده کمتر از ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید (۲۰).

در مطالعه‌ی دیگر، فعالیت ضدمیکروبی TP4 در شرایط

آزمایشگاهی و در یک مدل سپسیس موش، در مقایسه با آمپی‌سیلین، تایگسایکلین و ایمی‌پنم ارزیابی شد. در مطالعه‌ی مذکور، موش‌های آلوده به *کلبسیلا پنومونیه* و *آسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو با TP4 یا آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده برای دوره‌های زمانی مختلف (تا ۱۶۸ ساعت) تحت درمان قرار گرفتند. TP4 فعالیت قوی در برابر *K. pneumonia* و *A. baumannii* در شرایط آزمایشگاهی نشان داد، به گونه‌ای که تجویز آن به مقدار ۵۰ میکروگرم در هر موش) ۳۰ دقیقه پس از عفونت به طور قابل توجهی بقا را در موش افزایش داد (۲۱، ۲۲).

در مطالعه‌ی Neshani و همکاران، TP4 با استفاده از سیستم بیان *Pichia pastoris* GS115 تولید شد. این پپتید فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی بر روی سویه‌های حساس و مقاوم به آنتی‌بیوتیک *Acinetobacter baumannii* با MIC برابر ٤ µg/ml نشان داد (٦) که با مقدار محاسبه شده‌ی MIC در مطالعه‌ی ما (۸/٦ µg/ml) قابل مقایسه می‌باشد.

در مورد اثرات ضدمیکروبی LYC1، همانطور که در بخش نتایج اشاره شد، در غلظت‌های مورد بررسی اثرات مهاری بارزی نسبت به کنترل منفی نشان نداد. در مورد اثرات بیولوژیک این پپتید تاکنون مطالعات مختلفی انجام شده است. برای مثال در مطالعه‌ی Tan و همکاران مشخص شد که این پپتید با اثر مستقیم بر روی غشای باکتری‌ها باعث اعمال اثرات کشندگی بر روی باکتری‌ها می‌شود. بیشترین اثرات نیز بر روی سویه‌های *کلبسیلا نومونیه*، *شیگلا دیسانتری* و *استافیلوکوک اپیدرمیس* مشاهده گردید. این در حالی است که در مطالعه‌ی ما اثرات کلیستین، TP4 و فیوژن پپتید مورد بررسی به صورت قابل توجهی بیشتر از لیکوزین-۱ بود (۲۳).

اگرچه LYC1 در مطالعه‌ی ما تا حدودی اثرات ضدمیکروبی نشان داد به گونه‌ای که به طور متوسط MIC نمونه‌ها حدود ۱۸/۹٤ µg/ml محاسبه گردید اما این اثر نسبت به پپتید با میانگین MIC تقریبی ۸/٦ µg/ml برای TP4و کلیستین بیشتر بود.

نتیجه‌گیری

فیوژن پپتید TP4-LYC1 اثرات ضدمیکروبی قوی‌تری نسبت به LYC1 داشت. همچنین این فیوژن پپتید علاوه بر اینکه MIC کمتری نسبت به مروپنم دارد، بر اساس شاخص FIC در اکثر موارد دارای اثرات سینرژیست با مروپنم و کلیستین نیز می‌باشد.

به این ترتیب فیوژن پپتید TP4-LYC1 به عنوان یک کاندید جدید در درمان سویه‌های *آسینتوباکتر بومانی* مقاوم به چند دارو مطرح است تا پژوهش‌های آینده در سطح حیوانی و کارآزمایی‌های بالینی بتوانند مسیر پیش رو را تا تبدیل آن به یک داروی تجاری طی کنند. در این خصوص، پژوهش‌های آتی می‌توانند با تعیین دوز مؤثر حیوانی، بررسی‌های فارماکودینامیک و فارماکوکینتیک فیوژن پپتید بر سلول‌های انسانی و در نهایت بررسی و تحلیل بازار دارویی جهت توسعه‌ی بهترین فرم دارویی، در مسیر تولید یک داروی جدید گام بردارند.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه‌ی مقطع دکترای عمومی به شماره‌ی ۱٤۰۰۰٤ رشته‌ی داروسازی می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به انجام رسیده است.

References

1. Gröschel MI, Meehan CJ, Barilar I, Diricks M, Gonzaga A, Steglich M, et al. The phylogenetic landscape and nosocomial spread of the multidrug-resistant opportunist Stenotrophomonas maltophilia. Nat Commun 2020; 11(1): 2044.
2. Giraldi G, Montesano M, Napoli C, Frati P, La Russa R, Santurro A, et al. Healthcare-associated infections due to multidrug-resistant organisms: a surveillance study on extra hospital stay and direct costs. Curr Pharm Biotechnol 2019; 20(8): 643-52.
3. Sobouti B, Mirshekar M, Fallah S, Tabaei A, Mehrabadi JF, Darbandi A. Pan drug-resistant Acinetobacter baumannii causing nosocomial infections among burnt children. Med J Islam Repub Iran 2020; 34: 24.
4. Li X, Song Y, Wang L, Kang G, Wang P, Yin H, et al. A potential combination therapy of berberine hydrochloride with antibiotics against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Front Cell Infect Microbiol 2021; 11: 660431.
5. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. Front Microbiol 2020; 11: 582779.
6. Neshani A, Akbari Eidgahi MR, Zare H, Ghazvini K. Extended-Spectrum antimicrobial activity of the Low cost produced Tilapia Piscidin 4 (TP4) marine antimicrobial peptide. J Res Med Dent Sci 2018; 6(5): 327-4.
7. Pan CY, Chen JC, Chen TL, Wu JL, Hui CF, Chen JY. Piscidin is highly active against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii and NDM-1-producing Klebsiella pneumonia in a systemic septicaemia infection mouse model. Mar Drugs 2015; 13(4): 2287-305.
8. Liu Z, Deng M, Xiang J, Ma H, Hu W, Zhao Y, et al. A novel spider peptide toxin suppresses tumor growth through dual signaling pathways. Curr Mol Med 2012; 12(10): 1350-60.
9. Tan H, Ding X, Meng S, Liu C, Wang H, Xia L, et al.

Antimicrobial potential of lycosin-I, a cationic and amphiphilic peptide from the venom of the spider Lycosa singorensis. Curr Mol Med 2013; 13(6): 900-10.
10. Wang L, Wang YJ, Liu YY, Li H, Guo LX, Liu ZH, et al. In vitro potential of lycosin-I as an alternative antimicrobial drug for treatment of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(11): 6999-7002.
11. Sambrook J, Russell DW. The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual. New York, NY: CSHL Press; 2006.
12. New England Biolabs. IMPACTTM-TWIN. Purification, ligation and cyclization of recombinant proteins usinf self-cleavable affinity tag. version 1.5, 7/08. [Online]. Avilable from: URL: https://www.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/impact-twin-manual-e6950-708.pdf?rev=b5d93033cb034cba9987c836e30d3c4e&hash=1D202C22004B16D256C88047FAB2A3D5
13. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. In: Kruger NJ, editor. The protein protocols handbook. Berlin, Heidelberg: Springer; 2009. p. 17-24.
14. Safarika A, Galani I, Pistiki A, Giamarellos-Bourboulis EJ. Time-kill effect of levofloxacin on multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: synergism with imipenem and colistin. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015; 34(2): 317-23.
15. Li Y. Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production. Biotechnol Lett 2011; 33(5): 869-81.
16. Mujika JI, Lopez X, Mulholland AJ. Mechanism of C-terminal intein cleavage in protein splicing from QM/MM molecular dynamics simulations. Organic Biomol Chem 2012; 10(6): 1207-18.
17. Shafiee F, Minaiyan G, Moazen F. Jahanian-najafabadi A. Recombinant production and intein-mediated purification of an antimicrobial peptide, BR2. Int J Pept Res Ther 2017; 23: 501-7.
18. Hou J, Liu HY, Diao H, Yu H. The truncated human beta-defensin 118 can modulate lipopolysaccharide mediated inflammatory response in RAW264.7 macrophages. Peptides 2021; 136: 170438.
19. Xing L, Wu W, Zhou B, Lin Z. Streamlined protein expression and purification using cleavable self-aggregating tags. Microb Cell Fact 2011; 10(1): 42.
20. Su BC, Liu YC, Ting CH, Lyu PC, Chen JY. Antimicrobial peptide TP4 targets mitochondrial adenine nucleotide translocator 2. Mar Drugs 2020; 18(8): 417.
21. Pan CY, Tsai TY, Su BC, Hui CF, Chen JY. Study of the antimicrobial activity of tilapia piscidin 3 (TP3) and TP4 and their effects on immune functions in hybrid tilapia (Oreochromis spp.). PloS One 2017; 12(1): e0169678.
22. Pan CY, Chen JC, Chen TL, Wu JL, Hui CF, Chen JY. Piscidin is highly active against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii and NDM-1-producing Klebsiella pneumonia in a systemic septicaemia infection mouse model. Mar Drugs 2015; 13(4): 2287-305.
23. Tan H, Ding X, Meng S, Liu C, Wang H, Xia L, et al. Antimicrobial potential of lycosin-I, a cationic and amphiphilic peptide from the venom of the spider Lycosa singorensis. Curr Mol Med 2013; 13(6): 900-10.

DOI: *10.48305/jims.v41.i729.0615*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 41, No. 729, 1st Week, October 2023**

Received: 20.05.2023 Accepted: 26.08.2023 Published: 29.09.2023

The Antimicrobial Effects of TP4-LYC1 Fusion Protein against Multidrug-Resistant *A. Baumannii*

Rasool Soltani[1], Fatemeh Sadeghi-Koopaee[1], Fatemeh Shafiee[2]

Original Article

Abstract

Background: Colistin, tigecycline and ampicillin/sulbactam (high dose) are the only antibiotics with high efficacy against *Acinetobacter baumannii* making them the last line of treatment. So, the investigation of new antimicrobial agents with potential activity against these pathogens is crucial. Antimicrobial peptides are natural agents that play an important role in innate immunity against various types of pathogens. In this project, the antimicrobial activity of TP4-LYC1, an antimicrobial peptide consisting of Tilapia Piscidin 4 (TP4) with lycosin-1, was investigated against resistant *A. baumannii* as well as the synergistic effects of this chimeric peptide with colistin and meropenem.

Methods: Optimization of the cleavage process for each peptides (TP4, LYC1, and TP4-LYC1) to obtain the maximum amount of peptides was performed based on the incubation temperature, time of incubation and the cleavage buffer pH. Finally, the antimicrobial effects of each peptide, alone or in combination with colistin or meropenem were analyzed by broth micro-dillusion and checker board methods, respectively.

Findings: The best conditions for cleaving TP4, were pH 6.5 with a 24 Hours incubation time. These conditions for LYC1 and the chimeric peptide were concluded as pH 4 with incubation time of 24 and 48 Hours, respectively. The antibacterial activity of TP4 was lower than TP4-LYC1 for each biological sample. Also, TP4-LYC1 exhibited synergistic effects with Meropenem and Colistin in most cases.

Conclusion: TP4-LYC1 shows potential as a candidate for the treatment of infections caused by *A. baumanni* in combination with routine effective antibiotics in order to reduce the dosage of these antibiotics.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; Antimicrobial peptides; Multidrug-resistant; Synergistic effects

Citation: Soltani R, Sadeghi-Koopaee F, Shafiee F. **The Antimicrobial Effects of TP4-LYC1 Fusion Protein against Multidrug-Resistant *A. Baumannii*.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(729): 615-23.

1- Professor, Department of Clinical Pharmacy and Pharmacy Practice, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Fatemeh Shafiee, Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: f_shafiee@pharm.mui.ac.ir