

## Evaluation of antibacterial effect of antimicrobial peptide D28 and its dimeric analogs

Salehi M(M.Sc)<sup>1\*</sup>, Saadati M(Ph.D)<sup>1</sup>, Barati B(M.Sc)<sup>1</sup>, Saberi M(Ph.D)<sup>2</sup>, Olad G(M.Sc)<sup>1</sup>, Rahimi A(M.Sc)<sup>1</sup>

1- Department of biology, Faculty of basic science, Imam Hosein university, Tehran, Iran

2- Pharmacology Dept., Faculty of Medical Science ,Baqiatallah university, Tehran , Iran

Received: 13 Nov 2010, Accepted: 29 Dec 2010

### Abstract

**Background:** The major aim of this study was synthesis and assay of antimicrobial activity of peptide D28 and its new analogues derivatives as dimeric peptides.

**Materials and Methods:** Three antimicrobial peptides known as D28, Di-D28-Lys, Di-Cys-D28 including 20, 41, 42 residues were synthesized respectively. For peptide synthesis, solid phase peptide synthesis method using blocked amino acids with flourenyl methoxy carbonyl group and for peptide purification HPLC were used. Peptides compositions were confirmed by amino acid analysis and SDS-PAGE electrophoresis. Antimicrobial tests against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were performed as disk and well diffusion on plate and by adding to liquid broth culture (Broth macrodilution) in different concentrations.

**Results:** Three required peptides (D28, Di-D28-Lys, Di-Cys-D28) successfully were synthesized. All three peptides were effective against *S. aureus*, but Di-Cys-D28 on the contrary to two other ones, showed no antimicrobial activity against *P. aeruginosa*. The inhibitory activity of Di-D28-Lys against *P. aeruginosa* was more than that of D28 peptide.

**Conclusion:** Improvement of antimicrobial peptides activity through dimerization depends on the methods of dimerization and the strain of bacterium. Di-D28-Lys peptide in comparison with D28 and Di-Cys-D28 showed wide range and more antimicrobial activity. Therefore, Di-D28-Lys peptide could be a suitable antibiotic candidate for future studies.

**Keywords:** Antimicrobial peptide, Peptide antibiotic, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

\*Corresponding author:

Address: Department of biology, Faculty of basic science, Imam Hossein university, Shahid Babaei high way, Tehran, Iran

Email: baghersal@yahoo.com

## بررسی خاصیت ضد باکتریایی پپتید صناعی D28 و آنالوگ‌های دیمری شکل آن

محمدباقر صالحی\*<sup>۱</sup>، مجتبی سعادتی<sup>۲</sup>، بابک براتی<sup>۳</sup>، مهدی صابری<sup>۴</sup>، غلامرضا اولاد<sup>۱</sup>، علی اصغر رحیمی<sup>۱</sup>

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

۲- دانشیار، دکتری تخصصی میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

۳- کارشناس ارشد، بیولوژی سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

۴- دانشیار، دکتری تخصصی فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۸

### چکیده

**زمینه و هدف:** هدف این تحقیق سنتز و بررسی خواص ضد میکروبی پپتید D28 و مشتقات جدید هم خانواده آن به صورت پپتیدهای دیمری شکل می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، سه نوع پپتید ضد میکروبی Di-CYS-D28، Di-D28-LYS و D28 که به ترتیب متشکل از ۴۲، ۴۱ و ۲۰ اسید آمینه هستند، سنتز گردیدند برای سنتز پپتیدها از روش سنتز پپتید روی فاز جامد با استفاده از اسیدهای آمینه بلوکه شده با فلوتورنیل متوکسی کربونیل و برای تخلیص پپتید از روش کروماتوگرافی با دستگاه HPLC استفاده شد. ساختمان پپتیدها با روش آنالیز اسیدهای آمینه و الکتروفورز تأیید شد. تست ضد میکروبی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا به صورت دیسک دیفیوژن و ول دیفیوژن روی پلیت و با افزودن به محیط کشت مایع براث در غلظت‌های مختلف انجام شد.

**یافته‌ها:** سه نوع پپتید مورد نیاز Di-CYS-D28، Di-D28-LYS و D28 با موفقیت سنتز گردیدند. هر سه پپتید بر روی استافیلوکوکوس اورئوس مؤثر بودند، ولی Di-CYS-D28 برخلاف دو پپتید دیگر بر روی سودوموناس آئروژینوزا فعالیت ضد میکروبی نداشت و فعالیت مهارکنندگی Di-D28-LYS بر روی سودوموناس بیشتر از پپتید D28 بود.

**نتیجه‌گیری:** تقویت فعالیت ضد میکروبی پپتیدها از طریق دیمریزاسیون، وابسته به روش‌های دیمریزاسیون و سویه باکتری می‌باشد. پپتید Di-D28-LYS در مقایسه با پپتیدهای D28 و Di-CYS-D28 اثر ضد میکروبی بیشتر و وسیع‌تری نشان داد. بنابر این پپتید Di-D28-LYS می‌تواند به عنوان آنتی بیوتیک مناسبی برای مطالعات آینده باشد.

**واژگان کلیدی:** پپتیدهای ضد میکروبی، آنتی بیوتیک پپتیدی، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوک اورئوس

\*نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه شهید بابایی، دانشگاه امام حسین (ع)، دانشکده علوم پایه، گروه و مرکز تحقیقات زیست‌شناسی

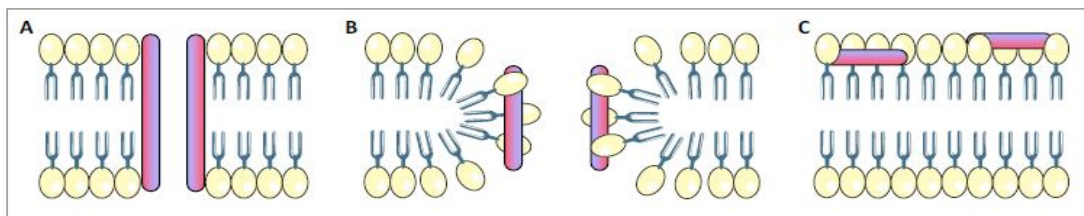
Email: baghersal@yahoo.com

## مقدمه

مقاومت دارویی در باکتری‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌های رایج باعث شده است تا هر روز داروهای جدیدی جهت درمان عفونت‌ها عرضه شود. در ضمن به منظور کاهش هزینه‌های درمانی، تحقیقات در زمینه داروهای ضد باکتری و تکوین داروهای جدید نیز در جهان همچنان ادامه دارد. هم اکنون بیش از ۴۰۰۰۰ ماده آنتی بیوتیکی معرفی شده و بیش از ۱۰۰ نوع آنتی بیوتیک جهت مصارف درمانی به صورت تجاری به بازار عرضه می‌شود (۱). در ۳۰ سال گذشته پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان آنتی بیوتیک‌های جدید برای مقابله با میکروب‌های مقاوم مطرح شده‌اند و انواع زیادی از آنها تاکنون علاوه بر استخراج از طبیعت با روش شیمیایی تولید شده‌اند. تاکنون بیش از ۱۰۰۰ نوع پپتید ضد میکروبی از یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها جدا شده و صدها نوع به صورت شیمیایی سنتز شده است. این مواد در انسان به وسیله گرانولوسیت‌ها، ماکروفاژها و بسیاری از سلول‌های اپی تلیال تولید می‌شوند که دارای فعالیت ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد ویروسی و

حتی ضد پروتوزوا هستند. این گونه پپتیدها علاوه بر نقش ضد میکروبی دارای فعالیت‌های دیگری نیز مانند تحریک سیستم ایمنی، خاصیت ضد سرطانی و نقش در انتقال پیام دارند (۲-۴).

پپتیدهای ضد میکروبی با نفوذ به غشاء سلولی و ایجاد منفذ و یا پس از ورود به سیتوپلاسم ضمن مهار آنزیم‌ها و واکنش‌های درون سلولی موجب تخریب باکتری می‌گردند. عواملی مانند توالی اسیدهای آمینه، چند قطبی بودن، بار و شکل آنها موجب می‌شود که به غشاء دولایه‌ای سلول‌ها به خصوص باکتری‌ها چسبیده و با سه نوع مکانیسم وارد غشا شوند (شکل ۱). تحقیقات انجام شده نشان داده که پپتیدها با ورود به درون سلول از سنتز اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها جلوگیری می‌کنند (۲). اکثر آنها از نظر نوع بار الکتریکی کاتیونیک و برخی آنیونیک هستند. پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس خصوصیات فیزیکی شیمیایی و زیستی به ۵ دسته طبقه‌بندی شده‌اند (۵-۸).



شکل ۱. مدل‌های نفوذ پپتید به غشاء باکتری

استفاده از روش بیوانفورماتیک و یک مدل زبان شناسی مشخص نمودند که در نوعی از پپتیدهای ضد میکروبی حشرات بنام سکروپین‌ها توالی پپتیدی با الگوی Q x EAGxLxKxxK در بیش از ۹۰ درصد موارد تکرار شده است و D28 نیز با این الگو مطابقت دارد. در جدول ۱ فعالیت آنتی بیوتیکی پپتیدهای مورد مطالعه در تحقیقات منجر به معرفی D28 دیده می‌شود (۹).

استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروجینوزا به عنوان سوش‌های بسیار مقاوم به آنتی بیوتیک شناخته می‌شوند (۴) با این که انواع زیادی از پپتیدها با فعالیت ضد میکروبی گزارش شده‌اند، بر مبنای مطالعات لوس و همکاران که در سال ۲۰۰۶ منتشر شده است، پپتید بیست اسید آمینه‌ای D28 که در بین پپتیدهای ضد میکروبی از وزن مولکولی متوسطی برخوردار است، بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس و باسیلوس آنتراسیس فعالیت ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای را نشان داده است (۹). لوس و همکاران با

پپتید علیه سودوموناس آئروجینوزا نیز بررسی شد. در عین حال برای اولین بار نسبت به بررسی اثر مشتقات دیمری شکل D28 به عنوان مولکول‌های جدید اقدام گردید.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، اسیدهای آمینه با گروه آمین بلوکه شده با فلئورنیل متوکسی کربونیل، پارا-آلکوکسی بنزیل الکل-رزین (wang resin) مواد کاتالیست مانند HBTU, HOBT, DIC, DIPEA از شرکت جی ال بیوچم (GL BIOCHEM) و حلال‌ها و مواد شیمیایی دیگر مانند دی میتیل فرمامید - دی کلرومتان - اسید تری فلئورو استیک اسید، ید، استونیتریل، اتانول از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

سه نوع پپتید-رزین مطابق با توالی‌های زیر و استفاده از مواد ذکر شده در جدول ۱ و روش‌های رایج سنتز پپتیدها (۱۶-۱۳) روی بستر جامد (رزین Wang) با کوپلینگ تریبی اسیدهای آمینه سنتز شدند.

- I. Phe-Lys-Gly-Val-Val-phe-Lys-Ala-Ser-Lys-Val-Phe-Pro-Ala-Val-phe-Gly-Lys-Val
- II. Di (Phe-Lys-Gly-Val-Val-phe-Lys-Ala-Ser-Lys-Val-Phe-Pro-Ala-Val-phe-Gly-Lys-Val) - Lys
- III. S-SDisulfide,2 (Cys-Phe-Lys-Gly-Val-Val-phe-Lys-Ala-Ser-Lys-Val-Phe-Pro-Ala-Val-phe-Gly-Lys-Val)

کلیه واکنش‌های تشکیل پیوند پپتیدی در ظرف واکنش فیلتردار مخصوص سنتز پپتید با استفاده از مواد ذکر شده در جدول ۲ انجام شد (۱۳). اسیدهای آمینه با تشکیل ایندرید متقارن به کمک DI,CHOBT فعال شده (به ازای هر اکسی والان گروه هیدروکسیل روی رزین ۲ اکسی والان اسید آمینه بلوکه با Fmoc) ابتدا به رزین و سپس به ترتیب توالی با پیوند پپتیدی به هم وصل شدند.

جدول ۱. میزان MIC پپتید D28 و انواع دیگر پپتیدهای استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس آنتراسیس با روش بیوانفورماتیکی (Linguistic model)

MIC(mg ml <sup>-1</sup> )	S.aureus	B.anthraxis
۸	D28	
۱۶	D51	D28, D51
۳۲		
۶۴	D22	D22
۱۲۸	D63, S51	D5, D35 D43, D63
۲۵۶	D5,D35,D43	S51
>۲۵۶	S5,S22,S28	S5, S22, S28
	S35, S43, S63	S35, S43, S63

D: Designed on the basis of motifs, S: Shuffled control

همان گونه که در جدول فوق دیده می‌شود فعالیت ضد میکروبی D28 علیه باکتری پسودوموناس گزارش نشده است. اخیراً گزارش جدیدی در مورد استفاده از D28 به عنوان ماده ضد میکروبی پوشش دهنده لوازم جراحی، کاربردی بودن این ماده را نشان داده است (۱۰).

یکی از راه‌های تقویت توان ضد میکروبی پپتیدها افزایش پایداری پپتید و نفوذپذیری آن به غشاء باکتری از طریق دیمریزاسیون می‌باشد (۱۱، ۱۲). دیمریزاسیون همیشه باعث افزایش قدرت میکروب کشی نمی‌شود، به عنوان مثال می‌توان به بعضی از پپتیدهای مشتق از هیستاتین (یک نوع پروتئین بزاقی) که دیمریزاسیون موجب کاهش فعالیت آنتی بیوتیکی شده است. اشاره نمود (۱۲).

با توجه به گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها لازم است نسبت به سنتز و بررسی اثر پپتیدهای فعال زیستی با خاصیت ضد میکروبی مانند D28 و فرم‌های دیمری شکل آن علیه باکتری‌های بیماری زا در داخل کشور اقدام نمود. در این تحقیق که در قالب پایان نامه دانشجویی اجرا شده، علاوه بر تکرار تجربه‌های قبلی در خصوص تاثیر پپتید D28 بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، فعالیت این

جدول ۲. مواد مورد استفاده برای سنتز D28 و 2D28-Lys-OH و 2Cys-D28

نوع اسید آمینه	مقدار استفاده شده (میلی گرم)	مقدار دی ایزوپروپیل کاربودی ایمید (DIC)، میلی لیتر	مقدار HOBT، میلی گرم
FMOC-Val-OH	۳۴۰	۰/۱	۱۵۳
FMOC-Lys (BOC) -OH	۴۶۹	۰/۱	۱۵۳
FMOC-Gly-OH	۲۹۸	۰/۱	۱۵۳
FMOC-Phe-OH	۳۸۸	۰/۱	۱۵۳
FMOC-Ala	۳۱۱	۰/۱	۱۵۳
FMOC-Pro	۳۴۰	۰/۱	۱۵۳
FMOC-Ser (t But) -OH	۳۸۴	۰/۱	۱۵۳
FMOC-Leu-OH	۳۵۴	۰/۱	۱۵۳
FMOC-Cys (Acm) -OH	۴۲۰	۰/۱	۱۵۳

پس از تهیه پپتید-رزین با استفاده از محلول جداکننده (5-2.5: 2-95: TFA-H<sub>2</sub>O-TIS) سرد شده در فریزر که به ازای هر گرم ماده خشک ۱۰ میلی لیتر محلول در ظرف واکنش فیلتردار افزوده شد، پپتید از رزین جدا شده و به شکل محلول درآمد. سپس محلول به ۸ برابر حجم خود دی اتیل اتر سرد در لوله فالکون ریخته شده و رسوب ژله‌ای سفید رنگ با سانتریفوز (بادور ۳۰۰۰) جدا گردید.

برای خالص سازی بیشتر از دستگاه HPLC دارای ستون هیدروفوب با ماتریکس اکتادسیل-سیلیکا (ODS-C18) و فاز حامل شامل مخلوط آب و استونیتریل استفاده گردید و محلول پیک اصلی جمع آوری شده از HPLC با دستگاه روتاری و پوراتور به کمک خلاء و دمای ۶۰ درجه تغلیظ و پس از انجماد در فریزر ۷۰ - درجه سانتی گراد با دستگاه لئوفیلز خشک شد.

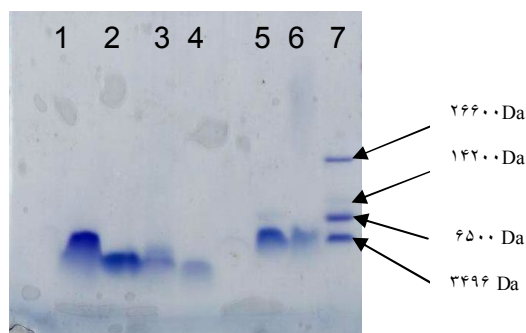
برای الکتروفورز نمونه‌های پپتیدی از روش جاد و همکاران استفاده شد (۱۷). نمونه‌های پپتیدی تحت شرایط دناتوره به همراه نشانگر پروتئینی SM 0671 بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید با غلظت ۱۲ درصد و جریان ۲۵ میلی‌آمپر به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شدند. از هر یک از پپتیدهای محلول (با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب مقطر) به میزان ۲ میکرولیتر بر روی ژل آکریلامید بار گذاری گردید. پس از اتمام الکتروفورز، ژل به مدت یک شب در محلول تثبیت کننده نگهداری و سپس با رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی گردید، پس از آن نسبت به رنگ بری از ژل اقدام گردید.

تست آنالیز اسیدهای آمینه موجود در ساختمان پپتیدها پس از هیدرولیز با اسید کلریدریک ۶ مولار در شرکت جی ال بیوچم (GL BIOCHEM) انجام شد.

در این تحقیق از باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC:25923) و سودوموناس آئروجینوزا (ATCC:9027) استفاده شد. این باکتری‌ها به صورت لئوفیلز بوده که با افزودن یک میلی‌لیتر از محیط کشت نوترینت برات به هر یک از ویال‌ها و تلقیح آنها به محیط کشت نوترینت آگار و نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلنی باکتری‌های مورد نظر آماده آزمایش شدند.

پپتیدهای سنتز شده D28، Di- D28-Lys و - Di- D28 Lys, Di- D28 Cys در آب مقطر با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل گردیده و در غلظت نهایی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مورد آزمون قرار گرفتند. ابتدا نمونه‌ها با روش ول دیفیوژن در چاهک‌های ایجاد شده در پلیت حاوی محیط کشت به صورت کیفی بررسی شدند. سپس با روش رقیق سازی در برات میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) تعیین شد (۱۸). برای انجام آزمایش، سوسپانسیون میکروبی معادل با کدورت نیم مک فارلند از کلنی ۲۴ ساعته باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروجینوزا تهیه گردید. در این روش رقت‌های مختلفی از ماده آنتی باکتریال با ضریب یک دوم تهیه و با غلظت ثابتی از باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون اولین غلظتی که مانع از رشد باکتری شده بود به عنوان حداقل غلظت

مولکولی و پپتید SP36 که یک پپتید استاندارد به وزن ۴/۵ کیلو دالتون می‌باشد، وزن مولکولی D28 و دیم‌های ساخته شده (دو نوع دیم‌ر) تأیید گردید (شکل ۲)



شکل ۲. الکتروفورز پپتیدها

- ۱- پپتید 2D28-LYS به وزن مولکولی ۴/۱۸ کیلو دالتون
- ۲- پپتید D28 به وزن مولکولی ۲/۱۵۴ کیلو دالتون
- ۳- پپتید Di - cys D28 به وزن ۴/۴۹۶ کیلو دالتون
- ۴- پپتید Di - cys D28 همراه با ۲-مرکاپتوتانول
- ۵- پپتید SP36 به عنوان کنترل به وزن ۴/۵ کیلو دالتون
- ۶- پپتید 2P113-lys-NH2 به عنوان کنترل به وزن ۳/۰۷۷ کیلو دالتون
- ۷- مارکر با وزن مولکولی پایین

نتایج آنالیز اسیدهای آمینه پپتید D28 و نوع دیم‌ری شکل آن در جدول ۳ خلاصه گردیده و مطابقت پپتیدهای سنتز شده را با ساختمان شیمیایی پپتیدها نشان داده شده است.

جدول ۳. مقادیر مولار آمینو اسیدهای موجود در پپتید مونومر و دیم‌ر در هر مول

پپتید/اسید آمینه	Lys	Phe	Leu	Val	Pro	Ala	Gly	Ser
D28	۳/۰۷	۳/۶۲	۲/۱۷	۴/۲۶	۱/۱۱	۲/۲۳	۲	۱/۱
2D28-Lys	۶/۲۴	۶/۱۴	۳/۹۳	۷/۰۹	۱/۹۷	۴/۱۳	۴	۱/۶۷

Cys-D28 بر رشد باکتری سودوموناس آئروجینوزا تأثیر نداشته و در مجاورت این پپتید باکتری رشد نموده است. از لحاظ کمی پپتیدها فعالیت متفاوتی را نشان داده‌اند به طوری که کمترین غلظت مهار کنندگی را برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس پپتیدهای D28 و Di D28-lys داشته ولی پپتید Di D28-lys با حداقل غلظت مهار کنندگی بر روی باکتری سودوموناس آئروجینوزا تأثیر بیشتری داشته است.

مهار کنندگی در نظر گرفته شد. جهت کنترل نمونه‌ها به یکی از لوله‌های محیط کشت فقط از سوسپانسیون باکتری مورد آزمایش اضافه گردید.

جهت قرائت نتایج پس از اتمام زمان فوق نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۶۳۰ نانومتر جذب قرائت شد. در لوله‌هایی که باکتری رشد کرده جذب بین ۰/۶ تا ۱/۲ بود. پس از قرائت جذب تمام لوله‌ها، عدد مربوطه با عدد قبل از انکوباسیون مقایسه شد، اولین لوله‌ای که در آن افزایش در عدد جذب، جذب پس از انکوباسیون نسبت به قبل از انکوباسیون دیده نشد، یاد داشت شده و غلظت ماده مورد آزمایش موجود در آن لوله به عنوان حداقل غلظت مهار کنندگی در نظر گرفته شد.

### نتایج

پپتید D28 با ۲۰ اسید آمینه و یک نوع دیم‌ر آن با ۴۱ اسید آمینه (2D28-Lys) و دیم‌ر دیگر آن (2Cys) (D28 با ۴۲ اسید آمینه به عنوان مولکول‌های انتخابی بر روی پارا -آلکوکسی بنزیل الکل رزین (wang Resin) سنتز گردیده و پس از تخلیص با HPLC و لئوفیلز به صورت پودر خالص به دست آمد. هم‌وزنی پپتیدهای سنتز شده ابتدا با الکتروفورز (Tricin-SDSPAGE) بررسی شدند و هر یک از پپتیدهای سنتز شده فقط یک باند را نشان داد و از نظر وزن مولکولی در مقایسه با مارکر وزن

نتیجه بررسی کیفی خواص ضد میکروبی پپتیدها بر روی دو نوع باکتری با روش انتشار از چاهک ایجاد شده در پلیت و مشاهده هاله عدم رشد تأثیر یا عدم تأثیر پپتید علیه باکتری را نشان داد.

در جدول ۴ نتایج بررسی کیفی فعالیت ضد میکروبی و نتایج کمی آورده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود هر سه پپتید سنتز شده در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قادر بودند که مانع از رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شوند، ولی در این میان تنها Di

جدول ۴. نتیجه بررسی کیفی مهار باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروجینوزا* در پلیت با روش انتشار از چاهک و تعیین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی پپتیدهای سنتز شده بر حسب میکروگرم در میلی لیتر

پپتید آنتی میکروبیال	استافیلوکوکوس اورئوس	سودوموناس آئروجینوزا	حداقل غلظت مهارکنندگی استافیلوکوکوس اورئوس	حداقل غلظت مهارکنندگی سودوموناس آئروجینوزا
D28	+	+	۶۲/۵	۲۵۰
Di D28-lys	+	+	۶۲/۵	۱۲۵
Di - cys-D28	+	-	۱۲۵	-

+ تاثیر بازدارندگی بر رشد باکتری - عدم تاثیر بازدارندگی بر رشد باکتری

## بحث

واکنش سنتز پپتیدها ابتدا در فاز مایع اجرا می‌شد ولی با پیدایش روش سنتز پپتید بر روی بستر جامد توسط بروس مرفیلد پروتئین‌های کوچک با سهولت بیشتری سنتز شدند (۱۳). در این روش ابتدا اسید آمینه C-ترمینال پپتید در حلال آلی مانند دی متیل فرمالید به یک پایه پلیمری مناسب (به عنوان مثال در این تحقیق رزین wang) وصل می‌شود. سپس با استفاده از مواد متصل کننده و در مراحل جداگانه بقیه اسیدهای آمینه به ترتیب به زنجیره افزوده شده و با شستشوی متوالی مواد اضافی پس از واکنش‌های تشکیل پیوند پپتیدی از محیط واکنش حذف می‌گردند. پس از تکمیل واکنش‌های اتصالی، زنجیره پپتیدی به وسیله اسید تری فلئورواستیک از رزین جدا شده و با استفاده از دستگاه HPLC خالص سازی می‌شود. با توجه به این که از روش استاندارد برای تهیه پپتیدها استفاده شده است. این گونه پپتیدها از خلوص بالای ۹۰ درصد برخوردار بوده و می‌توانند برای تست‌های بعدی استفاده شوند.

باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در برابر پپتیدهای ضد میکروبی حساس بوده و دلیل آن می‌تواند به مکانیسم عمومی در ایجاد منفذ در غشاء سلول ربط داشته باشد (۴). سه خصوصیت مهم پپتیدهای ضد میکروبی شامل توانایی مهار میکروبی (Potency)، عملکرد گزینشی (Selectivity) و فعالیت تحت شرایط فیزیولوژیک می‌باشد (۱۹). با توجه به این که پپتید ضد میکروبی D28 در سال‌های اخیر معرفی شده است هنوز از جنبه‌های فوق بررسی‌های زیادی به عمل نیامده است (۸). در عین حال میزان فعالیت این پپتید در مقایسه با پپتیدهای مشابه قابل

ملاحظه بوده (میزان کمترین غلظت مهارکنندگی علیه استافیلوکوکوس اورئوس ۱۶ میکروگرم در میلی لیتر) و از سوی محققین به عنوان پپتید مناسب علیه عوامل میکروبی معرفی شده است. با توجه این ویژگی از آن به عنوان ماده ضد میکروبی پوشش دهنده لوازم جراحی استفاده شده است (۱۰). این در حالی است که احتمال استفاده آن در آینده به صورت آنتی بیوتیک مؤثر علیه باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک وجود دارد. با توجه به گزارشات محققین در خصوص تاثیر پپتید D28 بر روی میکروارگانیسم‌ها شکل دایمری آن ممکن است بر فعالیت ضد میکروبی آن تأثیر داشته باشد (۱۲، ۱۹). در این تحقیق دو شکل دایمری پپتید D28 سنتز گردید که پس از بررسی فعالیت آنها مشاهده گردید که تأثیر متفاوتی بر روی میکروبی‌های مورد آزمایش داشته‌اند. این تأثیر متفاوت می‌تواند ناشی از اختلافات در ساختمان دو باکتری باشد.

سنتز D28 به صورت دایمر علاوه بر این که آنالوگ‌های جدیدی را برای مطالعه فراهم ساخت، موجب دستیابی روش پایه برای سنتز پپتیدهای دندریمری گردید (۲۲-۲۰). ساده‌ترین دندریمر از اتصال دو مولکول پپتیدی بر روی یک پایه به دست می‌آید در این تحقیق که دو مولکول D28 به طور همزمان بر روی اسید آمینه لیزین متصل به رزین سنتز شده است، یک دندریمر بوده و مسیر را برای تولید سایر پپتیدهای دندریمریک با استفاده از تکنولوژی سنتز پپتید روی فاز جامد هموار نموده است.

در این مطالعه نشان داده شد که هر سه نوع پپتید علیه استافیلوکوکوس اورئوس مؤثر بوده با این تفاوت که دایمر ساخته شده از طریق پیوند دی سولفیدی فعالیت

مواد اولیه آزمایشگاهی و آنالیز پپتیدها صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

### منابع

1. Shafiee A, Ghanbarpoor A. The Sorce of Antibiotics. 1St ed. Tehran univ. publishers; 1990
2. Kamysz W. Are antimicrobial peptides an alternative for conventional antibiotics? Nuclear Medicine Review. 2005;8(1):78-86.
3. Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. Central European Journal of Biology. 2007;2(1):1-33.
4. Wikipedia contributors, Antimicrobial peptides. [cited 2011 July 31]. Available from: <http://en.wikipedia.org/w/index.php>
5. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature Reviews Microbiology. 2005;3(3):238-50.
6. Berends E. Role of antimicrobial peptides in human innate defense against bacteria. Faculty of Medicine Theses [Master thesis]. 2010.
7. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature. 2002; 415(6870): 389-95.
8. Rivas-Santiago B, Serrano CJ, Enciso-Moreno JA. Susceptibility to infectious diseases based on antimicrobial peptide production. Infection and immunity. 2009;77(11):4690.
9. Loose C, Jensen K, Rigoutsos I, Stephanopoulos G. A linguistic model for the rational design of antimicrobial peptides. Nature. 2006; 443(7113):867-869.
10. Ferreira L, Langer R, Loose C, O'Shaughnessy W, Zumbuehl A, Stephanopolous G. Medical devices and coatings with non-leaching antimicrobial peptides. Available Form: <http://ip.com/pdf/Patapp/us20070254006.pdf>.
11. Dempsey CE, Ueno S, Avison MB. Enhanced membrane permeabilization and antibacterial activity of a disulfide-dimerized magainin analogue. Biochemistry. 2003; 42(2): 402-409.

کمتری را نشان داد. دو پپتید D28 و Di D28-lys علیه سودوموناس آئروجینوزا موثر بوده ولی Di cys-D28 در غلظت استفاده شده (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بی‌اثر می‌باشد. دلیل عدم تاثیر Di cys-D28 ممکن است مربوط به حلالیت ضعیف آن در آب و محیط کشت و احتمال احیاء پیوند دی سولفیدی توسط اجزاء محیط کشت باشد، که نیاز به بررسی بیشتر دارد. تهیه پپتید به صورت دایمر بر پایه پیوند کووالان روی اسید آمینه لیزین موجب تهیه دایمر موثر و پایدار از پپتید D28 گردیده است، به طوری که میزان فعالیت ضد میکروبی نوع دایمر (Di-D28-Lys) در مقایسه با D28 در مورد سودوموناس آئروجینوزا دو برابر گردیده است.

### نتیجه گیری

در این تحقیق که پپتید ضد میکروبی D28 و دایمرهای آن به صورت Di-D28-Lys و Di-cys-D28 سنتز و آنالیز گردیدند، از نظر طیف فعالیت ضد میکروبی و قدرت مهارکنندگی نوع دایمر به صورت Di-D28-Lys به دلیل تأثیر بر روی هر دو گونه باکتری (استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروجینوزا) و پایین تر بودن کمترین غلظت مهارکنندگی مناسب تر از دو نوع دیگر تشخیص داده شد. بدین ترتیب در مورد کارآیی روش دایمریزاسیون جهت تقویت قدرت ضد میکروبی پپتیدها چنین نتیجه گیری می‌شود. که میزان مهارکنندگی میکروبی پپتیدهای دایمر بستگی به نوع روش دایمریزاسیون و نوع باکتری دارد. در مجموع دایمر سنتز شده روی پایه لیزین بهتر از دایمر به دست آمده از طریق پیوند دی سولفیدی و پپتید مونومر (D28) باکتری‌های مورد مطالعه را مهار نموده است.

### تشکر و قدردانی

از همکاران عضو گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی دانشگاه امام حسین (ع) به خاطر همکاری در اجرای این تحقیق و آقای دکتر اسماعیل صابرفر در خصوص تهیه



12. Welling MM, Brouwer CPJM, van't Hof W, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV. Histatin-derived monomeric and dimeric synthetic peptides show strong bactericidal activity towards (Multi-drug resistant) *Staphylococcus aureus* in vivo. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(9): 3416-3419.
13. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*. 1963; 85(14):2149-2154.
14. Carpino LA, Han GY. 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *Journal of the American Chemical Society*. 1970; 92(19): 5748-5749.
15. Chan WC, White PD. Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach: Oxford University Press, USA; 2000.
16. Pennington MW. Peptide synthesis protocols: Humana Pr Inc; 1994.
17. Judd R. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of peptides. *The protein protocols handbook*. 2002:73-79.
18. Barry L, Craig WA, Nadler H, Reller LB, Sanders CC, Swenson JM. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline*. Wayne (PA): National Committee for Clinical Laboratory Standards; September 1999. p. M26-A.
19. Lee CC, MacKay JA, Fréchet JM, Szoka FC. Designing dendrimers for biological applications. *Nature biotechnology*. 2005; 23(12): 1517-1526.
20. Bracci L, Lozzi L, Pini A, Lelli B, Falciani C, Niccolai N, et al. A branched peptide mimotope of the nicotinic receptor binding site is a potent synthetic antidote against the snake neurotoxin -bungarotoxin. *Biochemistry*. 2002; 41(32): 10194-10199.
21. Tencza SB, Creighton DJ, Yuan T, Vogel HJ, Montelaro RC, Mietzner TA. Lentivirus-derived antimicrobial peptides: increased potency by sequence engineering and dimerization. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999;44(1):33-41.
22. Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(15):5409-5413.