DOI: 10.22092/VJ.2022.360048.2011
شماره ۱۴۰ پاییز ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی اثر هم‌افزایی پپتیدهای ضدمیکروبی نیسین و CLF۳۶ در شرایط آزمایشگاهی

• **زهرا رشیدیان**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
• **سحر روشنک**
گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
• **محمدهادی سخاوتی**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
• **علی جوادمنش (نویسنده مسئول)**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱-۰۶-۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱-۰۹-۰۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱-۰۸-۱۸ تاریخ انتشار: ۱۴۰۱-۰۷-۰۱
Email: javadmanesh@um.ac.ir

چکیده

در سطح جهانی، ورم پستان بالینی یک بیماری مهم در صنایع دامپروری است که به دلیل کاهش قابل توجه میزان تولید شیر، تأثیر اقتصادی زیادی دارد و در حال حاضر با استفاده از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شوند. آنتی‌بیوتیک‌ها داروهایی هستند که برای درمان عفونت‌ها، به ویژه آن‌هایی که منشا باکتریایی دارند، استفاده می‌شوند. استفاده بی‌رویه از این داروهای رایج منجر به ظهور باکتری‌های مقاوم شده و نگرانی‌های بهداشت عمومی در پزشکی انسان و دام در سراسر جهان را ایجاد کرده است. لذا استفاده از جایگزین‌های طبیعی با اثرات کم توصیه می‌شود. هدف از این پژوهش، ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نیسین به تنهایی و همراه با پپتید CLF۳۶ بر روی باکتری‌های مولد ورم پستان گاو در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. پپتیدهای نیسین و پپتید نوترکیب CLF۳۶ از مطالعات قبلی بدست آمدند. آزمون تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) با استفاده از روش میکرودایلوشن بر روی باکتری‌های ایزوله شده از دام‌های مبتلا به بیماری ورم پستان شامل کلستریدیوم پرفرنجنس، پروتئوس میرابیلیس، انتروکوکوس فکالیس، سالمونلا تیفی موریوم، سودوموناس آئروژینوزا و لیستریا مونوسیتوژنز انجام شد. نتایج نشان داد که پپتید نیسین و CLF۳۶ به تنهایی به ترتیب در محدوده غلظت‌های µg/mL ۳۲- ۶۴ و ۳۲-۲۵۶ بر روی تمام باکتری‌های مورد مطالعه اثر بازدارندگی داشتند. همچنین ترکیب نیسین و CLF۳۶ یک برهمکنش هم‌افزایی کلی را برای همه سویه‌های مورد استفاده نشان داد (FIC_I<۰/۵). به طور کلی، نتایج نشان داد که ترکیب این دو پپتید می‌تواند با ایجاد اثرات هم‌افزایی و کاهش غلظت استفاده از هر یک از دو پپتید خطر ایجاد مقاومت دارویی را کاهش دهد.

کلمات کلیدی: نیسین، CLF۳۶، پپتید، اثرات هم افزایی، ورم پستان گاو

Veterinary Researches & Biological Products No 140 pp: 44-50

Synergistic effects of nisin and CLF36 antimicrobial peptides in vitro

By: Rashidian, Z., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Roshanak, S., Department of Food Science & Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Sekhavati, M. H., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. and Javadmanesh, A., (Corresponding author) Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Received: 2022-09-22 **Accepted: 2022-11-30**

Revised: 2022-11-09 **Published: 2023-09-23**

Email: javadmanesh@um.ac.ir

Globally, clinical mastitis (CM) is a significant disease in the dairy industry and has a tremendous economic impact because of the significantly reduced amount of milk production. Antibiotics are medicines used to treat infections, particularly those of bacterial origin. Misusing these common drugs leads to emerging resistance bacteria and public health concerns in human and animal medicine worldwide. Therefore, the use of natural alternatives with low effects is recommended. This article aims to evaluate the antibacterial activity of peptide nisin on mastitis bacteria and its synergistic effect with CLF36 peptide in vitro. Recombinant peptide nisin and CLF36 were obtained from previous research. The minimum inhibitory concentration (MIC) test was performed using the microdilution method on bacteria extracted from animal mastitis, such as Clostridium perfringens, Proteus mirabilis, Enterococcus faecalis, Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, and Listeria monocytogenes. This study showed that nisin and CLF36 alone had an inhibitory effect on all the studied bacteria in the 64-32 and 256-32 µg/ml concentration range, respectively. Also, the combination of nisin and CLF36 showed a general synergistic interaction for all used strains (FIC I < 0.5). This study demonstrated that combining these two peptides could reduce the risk of developing drug resistance by creating synergistic effects with a minimum concentration of each of the two peptides.

Keywords: Nisin, CLF36, Peptide, Synergistic Effects, Cattle Mastitis

مقدمه

بیماری ورم پستان از بزرگترین مشکلات اقتصادی در صنعت پرورش گاو شیری به حساب می‌آید (۱۴، ۱۶). این بیماری خسارات خود را از طریق کاهش قیمت شیر، افزایش هزینه‌های دارو و درمان، مناسب نبودن شیر برای تولید فرآورده‌های لبنی بر این صنعت اعمال می‌کند. مهمترین تغییراتی که در نتیجه این بیماری در شیر ایجاد می‌شود شامل: تغییر رنگ، وجود لخته و پیدایش تعداد زیادی لکوسیت (گلبول سفید) همراه با علائم تورم، گرمی، درد و سفت شدن غدد پستانی می‌باشد (۹). در نتیجه کنترل و درمان این بیماری بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

آنتی‌بیوتیک‌ها به طور گسترده‌ای برای مبارزه با بیماری‌ها و بهبود عملکرد حیوانات در صنعت دامپروری کاربرد دارند. آنتی بیوتیک‌هایی مانند پنی‌سیلین، سفالوسپورین، استرپتومایسین و تتراسایکلین برای درمان و پیشگیری از بیماری‌های گاوهای شیری ناشی از انواع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی استفاده می‌شود (۱۹). برای جلوگیری از ورم پستان، آنتی‌بیوتیک‌ها اغلب برای کل گله تجویز می‌شوند. به طور کلی افزایش شیوع بیماری در گله منجر به افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها شده که به نوبه خود پتانسیل باقی مانده‌های آنتی‌بیوتیکی در شیر و پتانسیل افزایش مقاومت دارویی باکتری‌ها را افزایش می‌دهد (۶). لذا یافتن جایگزین‌های مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها از جمله پپتیدهای ضد میکروبی مورد توجه محققین قرار گرفته است (۱۱، ۲۱).

پپتیدهای ضد میکروبی، مولکول‌های کاتیونی جذابی هستند که عمدتاً توسط نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و ماکروفاژها از طریق ترشح یا در طی دگرانولاسیون آزاد می‌شوند. این ترکیبات می‌توانند منشا حیوانی، گیاهی و یا حتی میکروارگانیسمی داشته باشند که به عنوان اولین خط دفاعی در برابر میکروب‌ها عمل می‌کنند. وجود آن‌ها در طبیعت برای بیش از میلیون‌ها سال و توانایی پایدار برای مبارزه با عفونت‌های ضد میکروبی، گواهی بر عدم وجود کامل یا توسعه بسیار آهسته مقاومت در برابر آن‌ها است (۲۱). علاوه بر این، این ترکیبات برخلاف سایر درمان‌ها که ممکن است متابولیت‌های بالقوه مضری تولید کنند به اسیدهای آمینه‌های بی‌خطر تجزیه می‌شوند. این امر باعث می‌شود که این ترکیبات در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها که خیلی سریع مقاومت ایجاد می‌کنند، مطلوب باشند و استفاده از این ترکیبات به همراه آنتی‌بیوتیک‌ها یا سایر ترکیبات ضد میکروبی می‌تواند به کاهش مقاومت دارویی کمک کند (۲۲). از جمله پپتیدهای ضد میکروبی مورد توجه می‌توان به نیسین و CLF۳۶

اشاره کرد.
نیسین یکی دیگر از پپتیدهای ضدمیکروبی با منشا باکتریایی (لاکتوکوکوس لاکتیس) است که توجه محققین بسیاری را به خود جلب کرده است. نیسین اولین باکتریوسینی است که تاییدیه سازمان غذا و دارو در آمریکا را کسب کرده و امروزه در بیش از ۴۸ کشور جهان به عنوان نگهدارنده مواد غذایی استفاده می‌شود (۲۳).
مطالعات نشان داده‌اند که این پپتید به دلیل خاصیت ممانعت‌کنندگی از رشد بسیاري از باکتری‌هاي گرم مثبت شامل پاتوژن‌ها و آلوده‌کننده‌هاي مواد غذایی، میکروارگانیسم‌هاي مولد فساد و برخی از باکتري‌هاي گرم منفی (که دچار آسیب‌دیدگی غشاء بیرونی هستند) جلوگیری می‌کند (۲۰). نایسین يك پپتید ضدباکتري چند حلقه‌اي است که به کلاس I باکتریوسین‌ها به نام لانتي‌بیوتیك تعلق دارد. غشاي سیتوپلاسمی، هدف اصلی براي عمل نیسین است، که با ایجاد منفذ صورت می‌گیرد (۲۰). طبیعت انعطاف‌پذیر و خصوصیات آمفی‌فیلیک مولکول نیسین نقش مهمی در عملکرد آن دارد. از طریق بر هم‌کنش نیسین‌ها با ترکیبات فسفولیپیدي غشاي سیتوپلاسمی توسط پیوندهاي یونی (با توجه به ماهیت کاتیونی نیسین) باکتریوسین‌هاي باکتري‌هاي اسید لاکتیک را می‌توان علاوه ساختار، بر اساس نحوه عمل گروه‌بندي کرد. برخی از اعضای طبقه لانتی‌بیوتیک، مانند نیسین، نشان داده‌اند به صورت دوگانه عمل می‌کند: یک-آن‌ها می‌توانند به چربی II (انتقال‌دهنده اصلی زیرواحدهای پپتیدوگلیکان از سیتوپلاسم به دیواره‌ای سلولی) متصل شوند، در نتیجه باعث جلوگیری از سنتز دیواره‌ی سلولی گردند که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود. دو- آنها می‌توانند چربی II را به عنوان یک بخش اساسی از ساختار غشا خارج کرده و منافذی در غشا ایجاد کنند که منجر به مرگ سلولی سریع می‌شود (۱۸).
لاکتوفرین از پروتئین‌های عملکردی که مجوز سازمان غذا و دارو ایالات متحده‌ی آمریکا (Food and Drug Administration(FDA)) را دارا می‌باشد. این پروتئین از خانواده‌ی ترانسفرین‌ها بوده که بار مثبت و وزن مولکولی حدود ۸۰ kDa است (۷). محققین نشان داده اند که لاکتوفرین فعالیت‌های ضدمیکروبی وسیعی بر علیه تعدادی از باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌های پاتوژن را در شرایط آزمایشگاهی دارا می‌باشد (۷، ۲۲). همچنین پژوهشگران اظهار داشته‌اند که خواص ضدمیکروبی لاکتوفرین صرفا مختص به ساختار آن نیست، بلکه برخی از پپتیدهای آن نظیر لاکتوفرامپین و لاکتوفریسین، می‌توانند فعالیت ضدمیکروبی گسترده‌ای را نشان دهند. یکی از پپتیدهای کایمری از لاکتوفرین شتری CLF۳۶ (لاکتوفرامپین- لاکتوفریسین) می‌باشد (۱۵). تنهاییان و همکاران در سال ۲۰۱۸ (۲۴)، برای اولین بار، کایمر CLF۳۶ شتری را در میزبان HEK-۲۹۳ بیان کردند و فعالیت ضدباکتریایی آن را بر روی برخی پاتوژن‌ها مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان دادند که میزان حداقل غلظت بازدارندگی این پپتید، برای باکتری‌های گرم مثبت و منفی، بین ۰.۳۹ µg/ml و ۲۵.۰۷ بود.
لذا این تحقیق به بررسی خاصیت ضد باکتریایی نیسین به تنهایی و اثر سینرژیستی آن با CLF۳۶ بر روی باکتری‌های مولد بیماری ورم پستان بعنوان دارویی امیدبخش می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

پپتیدها و باکتری‌های مورد مطالعه

پپتیدهای CLF۳۶ و نیسین از مطالعات قبلی تهیه شدند (۲۴،۲۰).
باکتری‌های استخراج شده از بیماری ورم پستان دام نظیر کلستریدیوم پرفرنجنس، پروتئوس میرابیلیس، انتروکوکوس فکالیس، سالمونلا، سودوموناس آئروژینوزا، لیستریا مونوسیتوژنز از کلکسیون میکروبی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه مشهد تهیه شدند (مشهد، ایران) و برای بررسی اثرات ضد باکتریایی مورد استفاده قرار گرفتند.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

آزمون MIC در میکروپلیت های ۹۶ خانه استریل و با روش براث میکرودایلوشن (Microdilution broth) با استفاده از محیط کشت مولرهینتون براث (مرک آلمان) استفاده شد. از سوسپانسیون میکروبی با تعداد میکروارگانیسم اولیه ۱×۱۰^{۸} cfu/ mL تهیه شد و رقت‌های (µg/ mL ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶) از پپتیدهای مورد مطالعه در مولرهینتون تهیه گردید. تیمار کنترل منفی شامل محیط مولر هینتون براث و کنترل مثبت نیز از محیط کشت به همراه باکتری و عدم حضور باکتری استفاده شد تا از شرایط مناسب کشت و رشد نرمال باکتری اطمینان حاصل شود. برای بررسی حداقل غلظت مهار کنندگی، ۱۰ mL از سوسپانسون میکروبی به ۹۰ mL رقت حاوی پپتید اضافه و پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. بعد از اتمام انکوباسیون، کدورت یا عدم کدورت در چاهک با استفاده از بررسی جذب نوری با اسپکتوفتومتری جذب نوری (STAT FAX ۲۱۰۰) در طول موج ۶۳۰ nm خوانده شد و کمترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نگردید، به عنوان MIC گزارش شد.

بررسی اثر سینرژیستی

تعامل هم‌افزایی بین نیسین و CLF۳۶ با استفاده از روش چک بورد ارزیابی شد (۲۰). بدین ترتیب هفت رقت سریال دو برابری (از MIC۲ تا MIC/۳۲) از نیسین و CLF۳۶ مطابق با MIC بدست آمده در بخش قبل برای هر میکروارگانیسم تهیه شد. مقدار مساوی (۲۵ µL) از هر رقت در هر چاهک میکروپلیت‌های ۹۶ ریخته شد تا مقدار ثابتی از هر دو پپتید ضدمیکروبی به دست آید به طوری که هر ردیف (و ستون) حاوی مقدار ثابتی از عامل اول و مقادیر فزاینده‌ای از عامل دوم وجود داشته باشد. سپس ۵۰ µL سوسپانسیون باکتری با تعداد اولیه ۱×۱۰^{۸} cfu/ mL) به هر چاهک اضافه شد و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد.
شاخص غلظت بازدارندگی کسری (FICI) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

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

کـه در آن MICA مربوط به MIC پپتید A، MICB مربوط به MIC پپتید B، و MICA/B مربوط به MIC پپتید A با پپتید B است. هم افزایی کلی ($FIC_I \leq ۰/۵$)، هم افزایی جزئی (۰/۵ /> $FIC_I \leq ۰/۵$)، بدون اثر (۰/۷۵ /> $FIC_I \leq ۲$) یا اثر متضاد ($FIC_I > ۲$) بین دو پپتید مورد اسـتفاده اس

طریق FIC_1 محاسبه می‌شود.

نتایج

اثر مهارکنندگی رشد باکتری‌ها توسط نیسین و CLF۳۶ در غلظت‌های مختلف در فاصله زمانی ۲۴ ساعت پس از تیمار بصورت جدول زیر مشاهده شد. در ارتباط با خواص ضدباکتریایی نیسین، کمترین مقدار حداقل غلظت بازدارندگی مربوط به باکتری‌های سالمونلا و پروتئوس میرابیلیس با غلظت µg/mL ۱۶ و بیشترین میزان مربوط به باکتری‌های انتروکوکوس فکالیس و سودوموناس آئروژینوزا با غلظت µg/mL ۶۴ بود. در ارتباط با خواص ضد باکتریایی CLF۳۶، کمترین مقدار حداقل غلظت بازدارندگی مربوط باکتری لیستریا مونوسیتوژنز با غلظت µg/mL ۳۲ و بیشترین میزان مربوط به باکتری‌های کلستریدیوم پرفرنجنس، انتروکوکوس فکالیس و پروتئوس میرابیلیس با غلظت µg/mL ۲۵۶ گزارش شد.

ترکیب نیسین و CLF۳۶ یک برهمکنش هم افزایی کلی را برای همه سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در مطالعه حاضر ایجاد کرد (۰/۰۹ - FIC_1 = ۰/۰۷) (جدول ۲). همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، مقادیر کمتری از هر دو عامل ضدمیکروبی برای مهار رشد میکروارگانیسم‌ها هنگام مشاهده اثر هم افزایی استفاده می‌شود.

بحث

با توجه به عملکرد اخیر باکتریوسین‌ها در درمان بیماری‌ها، احتمال استفاده از باکتریوسین‌های نوترکیب با کارایی و پایداری بالاتر در سال‌های

جدول ۱- نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (µg/mL) پپتید نایسین با و بدون پپتید CLF ۳۶ بر روی باکتری‌های مولد ورم پستان.

باکتری‌های مورد مطالعه	پپتید نیسین (µg/mL)	CLF۳۶ پپتید (µg/mL)
گرم مثبت		
کلستریدیوم پرفرنجنس	۳۲	۲۵۶
لیستریا مونوسیتوژنز	۳۲	۳۲
انتروکوکوس فکالیس	۶۴	۲۵۶
گرم منفی		
سالمونلا	۱۶	۵۱۲
پروتئوس میرابیلیس	۱۶	۲۵۶
سودوموناس آئروژینوزا	۶۴	۵۱۲

جدول ۲- نتایج FIC و FICI پپتید نایسین در ترکیب با پپتید CLF۳۶ بر روی باکتری‌های مولد ورم پستان.

باکتری‌های مورد مطالعه	FICI	CLF۳۶ + پپتید نیسین FIC (µg/mL)	اثرات هم افزایی
گرم مثبت			
کلستریدیوم پرفرنجنس	۰,۰۹۳۷۵	۳۲c / ۲n	هم افزایی کلی
لیستریا مونوسیتوژنز	۰,۰۷۸۱۲۵	۱c / ۴n	هم افزایی کلی
انتروکوکوس فکالیس	۰,۰۹۳۷۵	۳۲c / ۴n	هم افزایی کلی
گرم منفی			
سالمونلا	۰,۰۷۸۱۲۵	۶۴c / ۰,۵n	هم افزایی کلی
پروتئوس میرابیلیس	۰,۰۹۳۷۵	۱۶c / ۲n	هم افزایی کلی
سودوموناس آئروژینوزا	۰,۰۷۰۳۱۲۵	۶۴c / ۴n	هم افزایی کلی

آینده دور از انتظار نیست. با این تفاسیر مطالعه در مورد باکتریوسین‌های نوترکیب مسیر طولانی دارد که ما هنوز در ابتدای آن هستیم. در مطالعه حاضر، به بررسی تاثیر نیسین و اثر هم افزایی آن با پپتید CLF۳۶ مرتبط با باکتری‌های ورم پستان پرداخته شد.

مطالعات نشان داده‌اند که برخی از باکتری‌ها که به طور مکرر در معرض افزایش غلظت نیسین قرار می‌گیرند، می‌توانند مقاومت نیسین را کسب کنند (۸). تاکنون، مقاومت به نیسین در چندین گونه باکتریایی از جمله لاکتوباسیلوس کازئی، استرپتوکوکوس ترموفیلوس، بوویس، لیستریا مونوسیتوژنز، لیستریا اینوکوا، استافیلوکوکوس اورئوس و کلستریدیوم بوتولینوم گزارش شده است. مطالعات نشان داده‌اند که نیسین بر روی برخی از باکتری‌های گرم منفی و قارچها بی‌اثر (۱۲) و بر روی برخی دیگر می‌تواند تاثیرگذار باشد (۱۷) که این تفاوت‌ها می‌توانند ناشی از غشای خارجی سفت و سخت این میکروارگانیسم‌ها (ساختار پیچیده‌ای متشکل از گلوکان متصل به کیتین و پروتئین دیواره سلولی) باشد (۵). پژوهش‌ها اثبات کرده‌اند که حداقل غلظت بازدارندگی نیسین بر بسیاری از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از جمله استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکولا، لیستریا مونوسیتوژنز و باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب µg/mL ۷.۸، ۱، ۲۵۰ و ۱۲۵ می‌باشد. اثر بازدارندگی نیسین بر رشد اسپور گونه‌های باسیلوس و کلستریدیوم ثبت شده است (۵). اشعری و همکاران در سال ۲۰۱۹ (۱) گزارش کردند که حداقل غلظت کشندگی نیسین برای اشرشیاکلای، سودوموناس فلورسنس و آسپرژیلوس نیگار، به ترتیب IU ۵۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ بوده است. در مطالعه‌ی حاضر نیسین بر علیه تمامی باکتری‌های مورد مطالعه با میزان حداقل غلظت کشندگی µg/mL ۱۶ تا ۶۴ موثر واقع شد. نتایج به دست آمده در مطالعات مختلف متفاوت است که این امر را می‌توان به تفاوت در دوز مصرفی، دمای آزمایش، شرایط فیزیولوژیکی میکروارگانیسم (۱۲)، محیط‌های کشت و روش‌های مورد استفاده برای ارزیابی اثرات ضدمیکروبی در مطالعات مختلف نسبت داد. علاوه بر این، منشأ پپتیدهای ضدمیکروبی (طبیعی یا به صورت سنتز شده) باید در نظر گرفته شود (۲).

پژوهش‌های متعدی در ارتباط با اثرات هم‌افزایی پپتیدها با آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم، مشتقات گیاهی و سایر پپتیدها صورت گرفته است. سیرونی و همکاران در سال ۲۰۰۸ (۴) به بررسی تاثیر ترکیب دو پپتید کاتیونی ماگانین II و سکروپین A و آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین علیه سودوموناس آئروژینوزا پرداختند. این محققین یک اثر هم‌افزایی بین پپتیدها و ریفامپیسین را هم در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) و هم شرایط درون بافتی (in vivo) نشان دادند. جهانگیری و همکاران در سال ۲۰۲۱ (۱۰) به بررسی اثر ضدباکتریایی نیسین همراه با پپتید P۱۰ و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف پرداختند. این محققین نشان دادند که حداقل غلظت بازدارندگی نیسین و P۱۰ در برابر پاتوژن‌های مورد مطالعه به ترتیب µg/mL ۶۴-۲۵۶ و ۸-۳۲ بود. مخلوط P۱۰+ نیسین اثرات افزایشی را در برابر باکتری‌ها و سویه‌های مقاوم به دارو نشان داد. همچنین گزارش شد که در اکثر موارد اثر ترکیبی سفتازیدیم P۱۰+، دوریپنم P۱۰+ و نیسین+ کلستین هم‌افزایی بود. چورکلام و همکاران در سال ۲۰۲۰ (۳) اثرات هم‌افزایی ترکیب کارواکرول و نیسین را در برابر لیستریا مونوسیتوژنز و سه جدایه دیگر با مقادیر FIC_I ۰.۳۷۵ تا ۰.۵ ثبت کردند (۳). اشعری و همکاران در سال ۲۰۱۹ (۱) ادعا کردند که ترکیب نیسین و اسانس گیاهی اثر هم‌افزایی را علیه باسیلوس سرئوس، آسپرژیلوس نیگار و سالمونلا تیفی موریم نشان می‌دهد. لیو و همکاران در سال ۲۰۱۵ (۱۲) گزارش کردند که ترکیب ε-پلی‌لین+نیسین علیه اشرشیاکلای، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس بصورت اثر هم‌افزایی کلی و در برابر میکروکوکوس لوتئوس و هانسنولا آنومالی بصورت اثر هم‌افزایی جزئی گزارش شد. نتایج آن‌ها نشان داد که ترکیب ε-پلی‌لین و نیسین تأثیری بر آسپرژیلوس نیگار ندارد. علاوه بر این، مطالعات زیادی به‌منظور بررسی اثر هم‌افزایی نیسین انجام شده است (۱۳). آنچه در بین همه گزارش‌ها مشترک بود، این است که اثرپذیری نیسین بر روی برخی از میکروارگانیسم‌ها کم بوده که این موضوع می‌تواند ناشی از محدودیت نیسین در عبور از غشای خارجی سلول باشد (۱۷). گزارش‌ها حاکی از آن است که اگر عاملی بتواند عبور نیسین از این لایه‌ها را تسهیل کند، تاثیرپذیری نیسین را افزایش می‌دهد. لذا؛ یکی از روش‌هایی‌که می‌توان این مشکلات را تعدیل کرد، استفاده از نیسین به همراه یک ترکیب با اثرات جانبی کم می‌باشد (۲۰).

مزایای بالقوه مرتبط با بررسی ترکیباتی که به طور هم‌افزایی با نیسین عمل می‌کنند، بسیار زیاد است. درست است که استفاده‌ی بیش از حد از نیسین نسبت به آنتی‌بیوتیک ایجاد مقاومت دارویی کمتری می‌کند؛ اما در سطح گسترده می‌تواند آسیب‌زننده باشد. بنابراین استفاده از نیسین با سایر ترکیبات ضدمیکروبی با اثرات هم‌افزایی ممکن است بر ایجاد مقاومت دارویی غلبه کند. در واقع، چنین رویکردهایی به ویژه برای آن دسته از ترکیباتی که جایگاه‌های مختلف را هدف قرار می‌دهند، امیدوارکننده به نظر می‌رسد. لازم به ذکر است، استفاده از پپتیدها بصورت ترکیبی ممکن است به کاهش دوز استفاده از هر یک از آن‌ها کمک کند که در نتیجه با ایجاد مقاومت دارویی در باکتری‌ها مقابله می‌شود و هزینه دارو نیز کاهش می‌یابد (۲۰). بسیاری از مطالعات اثبات کرده‌اند که استفاده از µg/Kg ۳۰۰ تا ۴۰۰ نیسین ممکن است دارای اثر ضدبارداری در انسان باشد که استفاده از این پپتید بصورت ترکیبی با سایر پپتیدها می‌تواند این اثرات را بهبود بخشد (۲۵). اگرچه سازمان غذا و داروی ایالات متحده در سال ۲۰۱۷ حداکثر میزان نیسین را µg/mL ۲۵۰ توصیه کرد، اما سازمان ایمنی غذای اروپا پتانسیل سمی نیسین را مورد ارزیابی مجدد قرار داد و مصرف روزانه قابل قبول تا یک میلی‌گرم نیسین را به ازای هر کیلوگرم بدن تأیید کرد.

نتیجه‌گیری کلی

در نهایت ترکیب کردن نیسین با یک پپتید ضدمیکروبی کاتیونی دیگر به دلیل افزایش طیف اثر (باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، قارچها و ویروس‌ها)، سطح پایین ایجاد مقاومت باکتریایی، کاهش مصرف پپتید که منجر به کاهش هزینه نیز می‌شود، تعدیل جمعیت میکروبی روده و افزایش اثربخشی آن بر برخی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت دانشگاه فردوسی مشهد در این پژوهش کمال

قدردانی را دارند.

منابع مورد استفاده

1. Ashari, D.A., Nissa, A., Nursiwi, A., Sari, A.M. and Utami, R., 2019. Antimicrobial effect of Zingiber officinale var. officinale essential oil and nisin against pathogenic and spoilage microorganisms. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 633, No. 1, p. 012005). IOP Publishing.

2. Atef Yekta, M., Verdonck, F., Van Den Broeck, W., Goddeeris, B., Cox, E. and Vanrompay, D., 2010. Lactoferrin inhibits E. coli O157: H7 growth and attachment to intestinal epithelial cells. *Veterinarni Medicina*, 55(8), pp.359-368.

3. Churklam, W., Chaturongakul, S., Ngamwongsatit, B. and Aunpad, R., 2020. The mechanisms of action of carvacrol and its synergism with nisin against Listeria monocytogenes on sliced bologna sausage. *Food Control*, 108, p.106864.

4. Cirioni, O., Silvestri, C., Ghiselli, R., Orlando, F., Riva, A., Mocchegiani, F., Chiodi, L., Castelletti, S., Gabrielli, E., Saba, V. and Scalise, G., 2008. Protective effects of the combination of α-helical antimicrobial peptides and rifampicin in three rat models of Pseudomonas aeruginosa infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(6), pp.1332-1338.

5. Dielbandhoesing, S.K., Zhang, H., Caro, L.H.P., Van Der Vaart, J.M., Klis, F.M., Verrips, C.T. and Brul, S., 1998. Specific cell wall proteins confer resistance to nisin upon yeast cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), pp.4047-4052.

6. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), Saxmose Nielsen, S., Alvarez, J., Bicout, D.J., Calistri, P., Depner, K., Drewe, J.A., Garin-Bastuji, B., Gonzales Rojas, J.L., Gortázar Schmidt, C. and Michel, V., 2020. Health and welfare of rabbits farmed in different production systems. *EFSA Journal*, 18(1), p.e05944.

7. Embleton, N.D., Berrington, J.E., McGuire, W., Stewart, C.J. and Cummings, S.P., 2013, June. Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. In Seminars in Fetal and Neonatal Medicine (Vol. 18, No. 3, pp. 143-149). WB Saunders.

8. Garde, S., Ávila, M., Medina, M. and Nuñez, M., 2004. Fast induction of nisin resistance in Streptococcus thermophilus INIA 463 during growth in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 96(2), pp.165-172.

9. Holtenius, K., Waller, K.P., Essén-Gustavsson, B., Holtenius, P. and Sandgren, C.H., 2004. Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. *The Veterinary Journal*, 168(1), pp.65-73.

10. Jahangiri, A., Neshani, A., Mirhosseini, S.A., Ghazvini, K., Zare, H. and Sedighian, H., 2021. Synergistic effect of two antimicrobial peptides, Nisin and P10 with conventional antibiotics against extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii and colistin-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates. *Microbial Pathogenesis*, 150, p.104700.

11. Javadmanesh, A., Mohammadi, E., Mousavi, Z., Azghandi, M. and Tanhaiean, A., 2021. Antibacterial effects assessment on some livestock pathogens, thermal stability and proposing a probable reason for different levels of activity of thanatin. *Scientific Reports*, 11(1), pp.1-10.

12. Liu, H., Pei, H., Han, Z., Feng, G. and Li, D., 2015. The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ε-Polylysine and nisin against Bacillus subtilis. *Food Control*, 47, pp.444-450.

13. Magalhães, L. and Nitschke, M., 2013. Antimicrobial activity of rhamnolipids against Listeria monocytogenes and their synergistic interaction with nisin. Food Control, 29(1), pp.138-142.

14. Mousavi, Z., Rashidian, Z., Zeraatpisheh, Y. and Javadmanesh, A., 2022. Molecular docking of bacteriocin enterocin P peptide with mastitis-causing E. coli antigen in cattle. *Veterinary Researches & Biological Products*.

15. Mousavi, Z., Tahmoorepur, M., Sekhavati, M.H., and Javadmanesh, A., 2018. Evaluation of antibacterial properties of camel lactoferrampin-lactoferricin recombinant peptide on the growth rate of Staphylococcus aureus bacteriacauses of mastitis in Holstein dairy cows. *Journal of Veterinary Microbiology*, 14(2), pp.37-47.

16. Mousavi, Z., Tanhaeian, A. and Javadmanesh, A., 2022. Evaluation of in vitro antifungal properties of Thanatin peptide and Chinaberry extract on fungal pathogens of bovine mastitis. *Veterinary Researches & Biological Products*, 35(1), pp.215-221.

17. Murdock, C.A., Cleveland, J., Matthews, K.R. and Chikindas, M.L., 2007. The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157: H7. *Letters in Applied Microbiology*, 44(3), pp.255-261.

18. Ndlovu, B., Schoeman, H., Franz, C.M.A.P. and Du Toit, M., 2015. Screening, identification and characterization of bacteriocins produced by wine-isolated LAB strains. *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), pp.1007-1022.

19. Oliver, S.P. and Murinda, S.E., 2012. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. Veterinary Clinics: *Food Animal Practice*, 28(2), pp.165-185.

20. Roshanak, S., Shahidi, F., Yazdi, F.T., Javadmanesh, A. and Movaffagh, J., 2020. Evaluation of antimicrobial activity of Buforin I and Nisin and the synergistic effect of their combination as a novel antimicrobial preservative. *Journal of Food Protection*, 83(11), pp.2018-2025.

21. Roshanak, S., Shahidi, F., Yazdi, F.T., Javadmanesh, A. and Movaffagh, J., 2021. Buforin I an alternative to conventional antibiotics: Evaluation of the antimicrobial properties, stability, and safety. *Microbial Pathogenesis*, 161, p.105301.

22. Shahidi, F., Roshanak, S., Javadmanesh, A., Tabatabaei Yazdi, F., Pirkhezranian, Z. and Azghandi, M., 2020. Evaluation of antimicrobial properties of bovine lactoferrin against foodborne pathogenic microorganisms in planktonic and biofilm forms (in vitro). *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 15(3), pp.277-283.

23. Tafreshi, S.Y.H. and Mirdamadi, S., 2015. Survey study of lipid effect on nisin nanoliposome formation and application in pasteurized milk as a food model. *Applied Food Biotechnology*, 2(2), pp.7-14..

24. Tanhaian, A., Azghandi, M., Razmyar, J., Mohammadi, E. and Sekhavati, M.H., 2018. Recombinant production of a chimeric antimicrobial peptide in E. coli and assessment of its activity against some avian clinically isolated pathogens. *Microbial Pathogenesis,* 122, pp.73-78.

25. Yedery, R.D. and Reddy, K.V.R., 2005. Antimicrobial peptides as microbicidal contraceptives: prophecies for prophylactics–a mini review. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care*, 10(1), pp.32-42.