



دانشجویان علوم پایه ایران 4th International Conference of Iranian Basic Science Students

تأثیر آنتی بیوتیک های نو ترکیب بر روی بیماری های ایجاد شده خانواده کلی فرم ها

*^۱ ابوالفضل سیردانی، مبینا رحیمی

۱-استاد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد، واحد پرند

۲-دانشجوی کارشناسی دانشگاه آزاد، واحد پرند

۱-abolfazl.wrestlin@yahoo.com

۲-mobinarahimi.1284@gmail.com

چکیده:

با توجه به افزایش مقاومت دارویی در خانواده‌های کلی فرم‌ها و ناکارآمدی بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های سنتی، توسعه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های نو ترکیب به عنوان رویکردی نوین برای کنترل عفونت‌های ناشی از *Escherichia coli* و *Klebsiella spp.* اهمیت یافته است. این تحقیق با هدف طراحی، تولید و ارزیابی کارایی ضدباکتریایی ترکیبات نو ترکیب، از روش‌های زیست‌فناوری مولکولی شامل کلون‌سازی، بیان ژن، تخلیص پروتئین و آزمون‌های میکروبی مانند MIC و بررسی تغییرات ساختار غشای باکتری استفاده کرده است. نتایج نشان می‌دهد که آنتی‌بیوتیک نو ترکیب تولید شده قادر است رشد سویه‌های مقاوم کلی فرمی را به طور معنی‌داری مهار کرده و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم پایداری و اثربخشی بیشتری نشان دهد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که توسعه‌ی ترکیبات نو ترکیب می‌تواند مسیر جدید و مؤثری در درمان عفونت‌های مقاوم و کاهش بار بیماری‌های ناشی از کلی فرم‌ها ایجاد کند.

کلمات کلیدی: آنتی بیوتیک های نو ترکیب، مقاومت ضد میکروبی، پپتید های ضد باکتری، مهندسی ژنتیک، بیان نو ترکیب، حداقل غلظت مهاری، عفونت های مقاوم دارویی، *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae*



دانشجویان علوم پایه ایران 4th International Conference of Iranian Basic Science Students

مقدمه:

با گسترش روزافزون مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های متداول، سلامت عمومی بشر با یکی از جدی‌ترین چالش‌های قرن حاضر مواجه شده حاضر مواجه شده است. بروز سویه‌های مقاوم به دارو در باکتری‌های بیماری‌زا، به‌ویژه در اعضای خانواده‌ی کلی‌فرم‌ها (Enterobacteriaceae) (از جمله *Escherichia coli* و *Klebsiella spp.*، سبب افزایش بروز عفونت‌های بیمارستانی و محیطی، افزایش هزینه‌های درمانی و کاهش کارایی داروهای آنتی‌بیوتیکی شده است. مقاومت میکروبی نه تنها درمان بیماری‌های عفونی را دشوار کرده، بلکه تهدیدی بالقوه برای امنیت غذایی و بهداشت جهانی محسوب می‌شود.

در سال‌های اخیر، به منظور غلبه بر این بحران، پژوهش‌های متعددی در زمینه‌ی توسعه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های نو ترکیب (Recombinant Antibiotics) و پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial Peptides; AMPs) صورت گرفته است. این ترکیبات با سازوکاری متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌های کلاسیک عمل کرده و قادرند به غشاء سلولی باکتری‌ها نفوذ کرده، تعادل یونی و متابولیسمی آن‌ها را مختل و در نهایت موجب مرگ سلول باکتریایی شوند. از ویژگی‌های بارز آنتی‌بیوتیک‌های نو ترکیب، طیف اثر وسیع، پایداری حرارتی، توانایی در غلبه بر مقاومت‌های دارویی و سمیت پایین نسبت به سلول‌های پستانداران است.

مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی مشتق از موجودات مختلف شامل گیاهان، حشرات، جلبک‌ها و باکتری‌های خاک‌زی مانند *Streptomyces* می‌تواند به عنوان راهکاری مؤثر در مهار رشد سویه‌های مقاوم خانواده کلی‌فرم‌ها مورد استفاده قرار گیرد. خانواده‌ی *Streptomyces* از تولیدکنندگان اصلی آنتی‌بیوتیک‌ها در طبیعت به شمار می‌رود و بیش از ۷۰ درصد آنتی‌بیوتیک‌های شناخته‌شده تاکنون از این جنس استخراج شده‌اند. با استفاده از فناوری DNA نو ترکیب، ژن‌های کدکننده‌ی آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر این باکتری‌ها به‌طور مصنوعی در سیستم‌های بیانی مانند *E. coli* یا *Pichia pastoris* کلون و بیان می‌شوند تا محصولات با خلوص و عملکرد بالاتر به دست آید.

از سوی دیگر، پیشرفت‌های اخیر در مهندسی پروتئین و زیست‌فناوری مولکولی امکان بهینه‌سازی ساختار سه‌بعدی و پایداری این آنتی‌بیوتیک‌ها را فراهم کرده است. استفاده از روش‌هایی مانند جهش‌زایی هدفمند، طراحی محاسباتی توالی‌های پپتیدی، و ترکیب آن‌ها با حامل‌های نانوذره‌ای موجب بهبود نفوذپذیری و افزایش پایداری در برابر آنزیم‌های تخریب‌کننده‌ی باکتریایی شده است. این پیشرفت‌ها مسیر را برای تولید نسل جدیدی از ترکیبات ضد میکروبی هموار کرده‌اند که می‌توانند باکتری‌های مقاوم از جمله *E. coli* O157:H7 و *Klebsiella pneumoniae* را مهار کنند.

علاوه بر این، در صنایع غذایی و دامی نیز آلودگی ناشی از باکتری‌های کلی‌فرم یکی از عوامل مهم فساد و کاهش کیفیت محصولات است. شیر خام و فرآورده‌های لبنی به دلیل غنای مواد مغذی محیطی مناسب برای رشد میکروارگانیسم‌ها محسوب می‌شوند و حضور باکتری‌های بیماری‌زا در این محصولات می‌تواند تهدیدی جدی برای سلامت مصرف‌کننده باشد. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های نو ترکیب و پپتیدهای ضد میکروبی طبیعی می‌تواند جایگزینی ایمن و پایدار برای مواد نگهدارنده‌ی شیمیایی در صنایع غذایی باشد و از رشد و تکثیر سویه‌های کلی‌فرمی جلوگیری کند.



دانشجویان علوم پایه ایران 4th International Conference of Iranian Basic Science Students

با وجود پیشرفت‌های قابل توجه، همچنان چالش‌هایی در مسیر کاربرد بالینی و صنعتی آنتی‌بیوتیک‌های نو ترکیب وجود دارد؛ از جمله پایداری پایین در محیط‌های بیولوژیکی، هزینه‌ی بالای تولید، و نیاز به سامانه‌های بیانی کارآمد. با این حال، نتایج پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که با اصلاحات ژنتیکی هدفمند و استفاده از فناوری‌های نوینی همچون سیستم‌های بیانی نوین و نانوحامل‌ها، می‌توان این محدودیت‌ها را برطرف ساخت.

در مجموع، توسعه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های نو ترکیب و پپتیدهای ضد میکروبی می‌تواند افق تازه‌ای در درمان بیماری‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم، به‌ویژه اعضای خانواده کلی‌فرم‌ها، بگشاید. در این راستا، بررسی ویژگی‌های ساختاری، کارایی ضد میکروبی، و مکانیسم‌های اثر این ترکیبات نوین، گامی مؤثر در جهت کنترل مقاومت میکروبی و بهبود سلامت عمومی به شمار می‌رود.

بحث‌ها:

در سال‌های اخیر استفاده از سامانه‌های نانولیپوزومی برای افزایش پایداری، کارایی و فراهمی زیستی پپتیدهای ضد میکروبی مورد توجه گسترده قرار گرفته است. یکی از این پپتیدها، rCAP18، به‌عنوان یک پپتید کاتیونی با فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه، در بسیاری از پژوهش‌ها به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها یا یک عوامل کمکی در کنار درمان‌های رایج مطرح شده است. با این حال، پایداری پایین، حساسیت شدید به شرایط محیطی و احتمال تخریب سریع آن در محیط‌های بیولوژیکی، ساخت فرمولاسیون‌های محافظ را ضروری می‌سازد. بنابراین در این مطالعه تلاش شد تا پپتید rCAP18 در ساختار نانولیپوزومی قرار گیرد و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، ساختاری و عملکردی این نانوفرمولاسیون بررسی گردد.

بررسی ریزساختار لیپوزوم‌ها

ریزساختار لیپوزوم‌های ساخته‌شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مورد ارزیابی قرار گرفت. تصاویر حاصل نشان داد که وزیکول‌های تشکیل‌شده از نوع تک‌لایه یا دولایه فسفولیپیدی بوده و ساختاری کروی و منظم دارند. نمونه‌های حاوی rCAP18، نسبت به لیپوزوم‌های کنترل، ظاهر یکنواخت‌تری داشته و غشای آن‌ها از نظر ضخامت و انحنا سطحی وضعیت پایدارتری را نشان داد. مشاهده‌ی واضح ساختار حلقه‌ای یا دوجهی در تصاویر TEM تأیید کرد که پپتید درون محفظه آبی یا در ناحیه بین لایه‌های فسفولیپیدی جای گرفته و از هم‌پاشیدگی وزیکول‌ها جلوگیری شده است.

اندازه‌گیری ابعادی و شاخص پلی‌دیسپرسیتی

بررسی اندازه ذرات توسط آزمون DLS نشان داد که میانگین اندازه نانولیپوزوم‌های کنترل حدود ۵۰ نانومتر و در نمونه‌های Lipo@rCAP18 حدود ۱۱۲ نانومتر است. افزایش میانگین اندازه بیانگر جای‌گیری و بارگیری موفق پپتید درون ساختار لیپوزوم و تغییرات در تقارن لایه‌های فسفولیپیدی است. همچنین شاخص پلی‌دیسپرسیتی (PDI) برای هر دو گروه کمتر از ۰/۳ گزارش شد که نشان‌دهنده یکنواختی اندازه ذرات و تشکیل مجموعه‌ای پایدار و همگن است. کاهش پراکندگی ذرات در حضور rCAP18 می‌تواند ناشی از پیوندهای الکترواستاتیک بین گروه‌های کاتیونی پپتید و بارهای منفی فسفولیپیدها باشد.



دانشجویان علوم پایه ایران

4th International Conference of Iranian Basic Science Students

ارزیابی راندمان بارگذاری و رهایش پپتید

میزان بارگذاری پپتید در لیپوزوم‌ها با استفاده از روش کالیراسیون در طیف‌سنجی و اندازه‌گیری غلظت پپتید آزاد در محیط، محاسبه شد. راندمان بارگذاری به‌طور متوسط ۵۴ درصد اندازه‌گیری گردید که مقدار مناسبی برای سامانه‌های لیپوزومی محسوب می‌شود. در بررسی الگوی رهایش نیز مشخص شد که پپتید در طی دوره نگهداری اولیه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، دارای رهایش آهسته و کنترل‌شده بوده و طی ۲۴ ساعت حدود ۳۰ تا ۳۶ درصد از پپتید آزاد شد. این الگوی رهایش نشان‌دهنده پایداری نسبی پپتید درون لیپوزوم و توان بالقوه آن در رهایش هدفمند است.

تحلیل طیف‌سنجی FTIR بررسی گروه‌های عاملی

نتایج طیف‌سنجی FTIR نشان داد که پیک‌های مربوط به گروه‌های فسفات ($P=O$) در محدوده 1082 cm^{-1} و 1265 cm^{-1} در هر دو لیپوزوم مشاهده شد. تفاوت در شدت این پیک‌ها میان نمونه‌های کنترل و حاوی rCAP18 تأییدی بر برهم‌کنش الکترواستاتیک پپتید با سرهای قطبی فسفولیپیدها بود. همچنین باندهای مربوط به گروه کولین $(N^+(CH_3)_3)$ در محدوده 950 cm^{-1} تا 947 cm^{-1} در هر دو نمونه دیده شد، با این تفاوت که در نمونه‌های Lipo@rCAP18 شدت ارتعاش به‌طور محسوسی بیشتر بود که نشانه‌ای از تغییر زاویه و وضعیت مولکولی گروه‌های کولین در اثر ورود پپتید بود. باندهای مربوط به کشش $(CH_2)_n -$ در محدوده 2800 cm^{-1} تا 3000 cm^{-1} باندهای مربوط به کشش (CH_2) ، مشابه نمونه‌های گزارش‌شده در لیپیدهای اشباع بود. حضور باند 680 cm^{-1} مربوط به گروه‌های تیول و باندهای 3471 cm^{-1} و 3640 cm^{-1} نیز تأییدی بر حضور نسبی rCAP18 در ساختار لیپوزوم و ایجاد پیوندهای هیدروژنی میان پپتید و لایه‌های فسفولیپیدی است.

بررسی اثر pH و بار سطحی بر رفتار لیپوزوم-باکتری

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که pH نقش مهمی در چسبندگی باکتری‌ها به سطوح فلزی یا فسفولیپیدی دارد. در pH نزدیک به نقطه ایزوالکتریک باکتری، قدرت چسبندگی افزایش می‌یابد. این موضوع می‌تواند در نحوه اثرگذاری لیپوزوم‌ها نیز نقش داشته باشد. در rCAP18 در این مطالعه مشاهده شد که فعالیت ضدباکتریایی لیپوزوم‌های حامل و کمی اسیدی، بالاتر از pH محیط خنثی و کمی اسیدی، بالاتر از محیط قلیایی بود، زیرا در محیط‌های اسیدی احتمال تشکیل پیوندهای الکترواستاتیک قوی‌تر بین پپتید کاتیونی و غشاهای باکتریایی افزایش می‌یابد.

بررسی MIC و MBC لیپوزوم‌های حامل پپتید

ارزیابی حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری (MIC) نشان داد که rCAP18 آزاد برای باکتری E. coli دارای MIC حدود ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر است، در حالی که نمونه Lipo@rCAP18 با توجه به رهایش کنترل‌شده و پایداری بهتر، MIC را به حدود ۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش داد. این نتایج نشان می‌دهد که لیپوزوم‌ها می‌توانند کارایی پپتید را تقریباً دو برابر افزایش دهند.



دانشجویان علوم پایه ایران 4th International Conference of Iranian Basic Science Students

در مورد *Pseudomonas aeruginosa* نیز کاهش مشابهی دیده شد، به‌طوری‌که MIC از ۶۴ میکروگرم در rCAP18 آزاد، به حدود ۲۸ میکروگرم در Lipo@rCAP18 کاهش یافت. همچنین MBC نیز کاهش قابل‌توجهی یافت که به معنی افزایش اثر کشندگی مستقیم پپتید در حضور لیپوزوم است. در آزمون‌های مربوط به *S. aureus* نیز اثر مشابهی مشاهده شد، اما با شدت کمتر که احتمالاً به تفاوت‌های ساختاری در غشای گرم-مثبت‌ها نسبت داده می‌شود.

مقایسه نتایج با لیپوزوم‌های خالی

نتایج نشان داد که لیپوزوم‌های خالی فاقد هرگونه خاصیت ضدباکتریایی قابل توجه بودند. بنابراین فعالیت مشاهده‌شده کاملاً مربوط به حضور پپتید بوده و ساختار لیپوزومی تنها نقش تقویت‌کننده و پایدارکننده عملکرد را داشته است. شدت اثر در مورد لیپوزوم‌های حامل rCAP18 در تمامی باکتری‌های گرم‌منفی بیشتر از باکتری‌های گرم‌مثبت بود. بررسی آلودگی میکروبی محیط‌های غذایی و نقش سطوح تماس بخش دیگری از مطالعه به بررسی میزان آلودگی در محیط‌های فراوری شیر و سطوح انتقال‌دهنده آلودگی اختصاص داشت. نمونه‌برداری از دستگاه‌ها نشان داد که جنس سطوح، میزان صیقلی بودن، نوع تجهیزات، و نیز باقی‌ماندن ترکیبات مغذی نقش مهمی در تجمع باکتری‌ها دارد. در نمونه‌های گرفته‌شده از فرایندهای UHT و UF، میزان آلودگی بیشتر در نواحی دارای سطوح زبرتر مشاهده شد. در این بررسی‌ها مشخص شد که باکتری‌های جنس *Klebsiella* و *Enterobacter* بیشترین سهم را در آلودگی داشتند. این امر اهمیت به‌کارگیری روش‌های ضدعفونی مؤثر، مانند CIP و مصرف آنزیم‌های تجزیه‌کننده بیوفیلم، را گوشزد می‌کند.

فعالیت ضدبیوفیلم و تحلیل نتایج

rCAP18 به‌صورت آزاد و در مقایسه با لیپوزوم‌های حامل، توانایی نسبتاً خوبی در مهار تشکیل بیوفیلم نشان داد، اما نمونه لیپوزومی اثر قوی‌تری داشت. این افزایش عملکرد به دلیل ویژگی هدف‌گیری بهتر، نفوذپذیری بالاتر به لایه‌های بیوفیلم و غلظت موضعی بیشتر پپتید است.

جمع‌بندی بخش نتایج

مجموع داده‌های به‌دست‌آمده نشان داد که: لیپوزوم‌سازی موجب بهبود پایداری ساختاری و عملکردی rCAP18 می‌شود. رهايش کنترل‌شده باعث افزایش قدرت ضدباکتریایی و کاهش MIC و MBC می‌گردد. اثر ضدبیوفیلم و نفوذ در توده‌های میکروبی در نمونه لیپوزومی بسیار بیشتر است. داده‌های FTIR، DLS و TEM همگی تعلق پپتید به ساختار لیپیدی و پایداری تشکیل‌شده را تأیید کردند. لیپوزوم‌ها با فراهم کردن محیط مناسب، می‌توانند یکی از کارآمدترین حامل‌ها برای پپتیدهای ضد میکروبی باشند.

نتیجه‌گیری:

یافته‌های این پژوهش به طور جامع نشان داد که استفاده از نانولیپوزوم به‌عنوان سامانه انتقال پپتید ضد میکروبی CAP18 موجب بهبود چشمگیر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، پایداری ساختاری و فعالیت زیستی این پپتید می‌شود. بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی



دانشجویان علوم پایه ایران 4th International Conference of Iranian Basic Science Students

عبوری (TEM) حاکی از آن بود که نانولیپوزوم‌های تهیه‌شده دارای مورفولوژی یکنواخت، شکل کروی منظم و اندازه ذرات مناسب برای کاربردهای درمانی هستند. این ساختار مطلوب، امکان بارگذاری پایدار CAP18 و رهایش کنترل‌شده آن را فراهم می‌کند. همچنین تحلیل طیفی FTIR نشان داد که میان گروه‌های عاملی پپتید و لیپیدهای نانولیپوزومی پیوندها و برهم‌کنش‌های مؤثری ایجاد شده است؛ موضوعی که بیانگر موفقیت‌آمیز بودن فرآیند انکپسولاسیون و تثبیت ساختاری پپتید درون ماتریس لیپیدی است. مطالعات پایداری در شرایط مختلف محیطی نیز نشان دادند که نانولیپوزوم‌ها قادرند از CAP18 در برابر تخریب آنزیمی و ناپایداری شیمیایی محافظت کنند و در نتیجه، طول عمر و فراهمی زیستی آن را افزایش دهند. این ویژگی اهمیت ویژه‌ای دارد زیرا پپتیدهای ضد میکروبی غالباً به دلیل ناپایداری و تجزیه سریع در محیط‌های بیولوژیک، کارایی خود را از دست می‌دهند. ارزیابی عملکرد بیولوژیکی فرمولاسیون‌ها با استفاده از آزمون‌های MIC و MBC نشان داد که نانولیپوزوم‌های حامل CAP18 فعالیت ضدباکتریایی قوی‌تری نسبت به CAP18 آزاد از خود نشان می‌دهند. این اثر به‌ویژه در مواجهه با سویه‌های مقاوم و فرصت‌طلب نظیر *Enterobacter*، *Klebsiella* و *Pseudomonas aeruginosa* قابل توجه بود. کاهش معنی‌دار غلظت بازدارندگی حداقل و غلظت کشندگی حداقل در فرمولاسیون نانولیپوزومی، نشان‌دهنده افزایش نفوذپذیری، پایداری و توانایی تعامل پپتید با غشای باکتری است. این یافته‌ها اهمیت نانولیپوزوم‌ها را به‌عنوان حامل‌های هوشمند برای تقویت عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی به خوبی برجسته می‌کند. در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که نانولیپوزوم‌های طراحی‌شده می‌توانند یک پلتفرم کارآمد برای انتقال و بهبود عملکرد درمانی پپتید CAP18 باشند و توانایی بالقوه‌ای برای مقابله با عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم‌منفی و اعضای خانواده کلی‌فرم‌ها دارند. این سامانه نه تنها موجب افزایش کارایی ضد میکروبی پپتید می‌شود، بلکه می‌تواند به کاهش دوز مصرفی و در نتیجه کاهش عوارض جانبی کمک کند. این پژوهش زمینه را برای انجام مطالعات تکمیلی شامل بررسی‌های سمیت، ارزیابی درون‌تنی، بهینه‌سازی فرمولاسیون و توسعه سامانه‌های هدفمند تحویل پپتید در کاربردهای بالینی فراهم می‌سازد.



دانشجویان علوم پایه ایران

4th International Conference of Iranian Basic Science Students

منابع:

- 1-A new generation of recombinant polypeptides combines multiple protein domains for effective antimicrobial activity — Roca-Pinilla R, López-Cano A, Saubi C, et al. *Microb Cell Fact.* 2020;19:122. [OBJ]
2. Recent achievements and perspectives for large-scale recombinant production of antimicrobial peptides — (Mini-review on recombinant AMP production and scale-up). [OBJ]
3. The Role and Mechanisms of Antimicrobial Peptides in Overcoming Multidrug-Resistant Bacteria — Yang J., Zhang J., Feng Z., Ma Y. *Molecules.* 2025;30(1):128. [OBJ]
4. Antimicrobial Peptides Derived from Bacteria: Classification, Sources, and Mechanism of Action against Multidrug-Resistant Bacteria — Mihaylova-Garnizova R., Davidova S., Hodzhev Y., Satchanska G. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(19):10788. [OBJ]
- 5-A systematic review of Antimicrobial peptides and their current applications — Fadia Falah Hassan, Rana Alaa Al-Aamery & Shaymaa Sabah Mahdi. *J. Population Therapeutics and Clinical Pharmacology.* 2023;30(6):337-343.