

بررسی فعالیت ضد باکتری اجزاء زهر عقرب ایرانی *Hemiscorpius lepturus*شبنم رادبخش^۱، دلوار شهباز زاده^۲، امیر محمود زاده^۲، کامران پوشنگ باقری^۲

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات مرکزی، تهران، ایران
 ۲. آزمایشگاه زهرشناسی و بیومولکول‌های درمانی، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۲/۰۴/۱۰

پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۱۰

انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۰۲/۱۵

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM 1392; 7(3): P 26-33

نویسنده مسئول:

کامران پوشنگ باقری

آزمایشگاه زهر شناسی و
 بیومولکول‌های درمانی، گروه
 بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات
 بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران.

تلفن: ۶۶۴۸۰۷۸۰

پست الکترونیک:

k_bagheri@pasteur.ac.ir

زمینه و اهداف: جستجو جهت یافتن پادزیست‌هایی که باعث القاء مقاومت ژنتیکی در باکتری‌ها نمی‌گردند از اهمیت زیادی برخوردار است. مطالعات زیادی، جداسازی پادزیست‌های طبیعی از جمله پپتیدهای ضد میکروبی را از منابع مختلف گزارش کرده‌اند. این پپتیدها از منابعی چون انسان، مهره‌داران، بی‌مهرگان، حشرات، حیوانات سمی و گیاهان استخراج‌شده و نقش دفاعی ذاتی دارند. هدف از این مطالعه تخلیص پلی پپتیدهای ضد باکتری عقرب ایرانی *Hemiscorpius lepturus* بود.

مواد و روش کار: زهر عقرب به وسیله تحریک الکتریکی تهیه‌شده و کیفیت آن با الکتروفورز پروتئین تأیید گردید. پپتیدهای زهر طی دو مرحله، ابتدا با روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و سپس با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در فاز معکوس جدا گردیدند. سپس فعالیت ضد باکتری پپتیدها با روش دیسک دیفیوژن بر روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج با دیسک سفتریاکسون به عنوان کنترل مثبت مقایسه شدند.

یافته‌ها: از کروماتوگرام به دست آمده از زهر کامل عقرب، ۷ جزء شناسایی شد که اجزای ۴ و ۵ حاوی پپتیدهایی با وزن زیر ۱۰ کیلو دالتون بودند. در بررسی به روش انتشار دیسک مشخص شد که جزء ۵ اثر ضد باکتری بر سودوموناس آئروژینوزا داشت و این اجزا برای جداسازی پپتیدهای خالص تر با تکنیک RP-HPLC انتخاب شد. از آنالیز دوم، پنج جزء اصلی به دست آمد که وزن مولکولی پپتیدهای ضد سودوموناسی حدود ۷ کیلو دالتون برآورد شد. نهایتاً در بررسی خاصیت ضد باکتری پپتیدها با روش دیسک دیفیوژن، دو جزء بر روی باکتری سودوموناس اثر ضد باکتری داشتند.

نتیجه‌گیری: در این بررسی مشخص شد که از میان پپتیدهای استخراج‌شده، دو پپتید بر روی باکتری سودوموناس اثر کشندگی واضح داشت. این مطالعه از این لحاظ حائز اهمیت است که اولین گزارش وجود یک عامل ضد میکروبی از زهر عقرب بومی ایران، همیسکورپیوس لپتوروس، است.

کلمات کلیدی: زهر عقرب، همیسکورپیوس لپتوروس، پپتیدهای ضد میکرب، سودوموناس آئروژینوزا، کروماتوگرافی

کپی‌رایت © حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروپزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

می‌دهد، عفونت ناشی از آن می‌تواند منجر به مرگ‌ومیر گردد (۲).

راه حل اصلی مقابله با یک بیماری عفونی از بین رفتن کامل عامل بیماری بدون ایجاد عوارض بالینی است. در طی دهه‌های اخیر پپتیدهای ضد میکروبی که از منابع طبیعی بدست می‌آیند، مورد توجه میکروپزشناسان بالینی قرار گرفته‌اند (۳، ۴). این پپتیدها عمدتاً مولکول‌هایی کوچک (در حدود ۱۰۰-۱۲

بیماری‌های عفونی یکی از علل مرگ‌ومیر بیماران در بیمارستان‌ها هستند. امروزه عفونت‌های ایجادشده توسط باکتری‌های مقاوم به پادزیست از معضلات مهم جامعه پزشکی می‌باشد (۱). بعد از ورود یک پادزیست جدید به بازار دارویی کشورها، ژن مقاومت به آن دارو در باکتری‌ها بروز پیدا کرده و مجدداً مشکل ادامه پیدا می‌کند. امروزه سودوموناس آئروژینوزا با منشأ فلور نرمال، عامل اصلی عفونت‌های سوختگی در اکثر مراکز سوختگی است که به علت مقاومت دارویی که این باکتری از خود نشان

حدود ده هزار عقرب همیسکورپیوس لپتوروس از مناطق مختلف استان خوزستان در فصل پاییز تهیه شده و زهر آنها به روش شوک الکتریکی تهیه گردید. به این ترتیب که با استفاده از دو الکترود که در طرفین غده‌ی سمی قرار می‌گیرند، شوک الکتریکی بین ۶ تا ۱۲ ولت به وسیله دستگاه الکتروشوک به ابتدای غده سمی جانور وارد شده و زهر شیری رنگ از انتهای غده خارج شده و در یک ظرف شیشه‌ای جمع‌آوری گردید. زهر تهیه شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردیده و به محل آزمایش منتقل گردید. زهر تهیه شده در دستگاه خشک کن انجمادی در دمای ۵۶- درجه سلسیوس و فشار ۰/۰۳ میلی بار به مدت ۴۸ ساعت لیوفیلیزه گردید.

آماده سازی زهر

ابتدا مقدار ۵ میلی گرم زهر لیوفیلیزه را با ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی مخلوط کرده و به مدت ۲-۱ دقیقه با دستگاه ورتکس هموژنیزه گردید. سپس جهت حذف موکوس و مواد اضافی، میکروتیوب محتوی زهر به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. محلول رویی که حاوی پروتئین های زهر است از رسوب سم جدا شد. مایع شفاف به دست آمده جهت آزمایشات بعدی در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید.

تعیین غلظت پروتئین زهر

برای تعیین غلظت پروتئین زهر از روش بیسینکونینیک اسید (Smart BCA protein assay kit, Intronbio-Korea) استفاده گردید. اساس تست، احیای مس توسط پیوندهای پپتیدی است. به طور خلاصه، نمونه با محلول واکنش ترکیب شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. نهایتاً جذب نمونه با استفاده از دستگاه Microplate spectrophotometer Epoch, Biotek - USA قرائت شد.

الکتروفورز زهر به روش SDS-PAGE

جهت بررسی کیفیت زهر جمع‌آوری شده، مقدار ۵ میلی گرم از زهر در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی حل شده و بعد از آماده سازی در ژل پلی آکریل آمید ۱۸٪ در مدت زمان یک ساعت با جریان ۳۰ میلی آمپر الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی با کوماسی برلیانت بلو R250 به مدت یک شب صورت گرفته و رنگ بری ژل با ۳۰٪ استیک اسید و ۱۰٪ متانول انجام گردید.

اسید آمینه)، با بار الکتریکی مثبت (بار خالص ۹ - ۲)، آمفی فیلک بوده و از جانداران تک سلولی، حشرات و سایر بندپایان، دوزیستان، گیاهان، پرندگان، ماهی ها، پستانداران و انسان قابل جداسازی هستند (۳، ۴). بیان و ایجاد این پپتیدها می‌تواند در اثر عفونت باکتری یا پاسخ های التهابی مانند تقسیم های غیرمعمول سلولی و یا مولکول های حاصل از حضور باکتری ها همانند LPS که پاسخ های ایمنی ذاتی را القا می‌کنند، باشد (۶، ۵). از آن جا که بی‌مهرگان فاقد سیستم ایمنی اکتسابی هستند (۷)، صرفاً به سیستم های ایمنی ذاتی خود برای دفاع و مقابله با تهاجم پاتوژن ها متکی اند. با توجه به موفقیت تکاملی فوق‌العاده این گروه از موجودات زنده، آشکار می‌شود که سازوکار های ایمنی ذاتی در این جانداران بسیار موثر هستند. این امر موجب مطالعات زیادی روی گونه‌های بی‌مهرگان مانند حشرات، بندپایان و ... شده است. راسته‌ی عقرب‌ها از رده‌ی عنکبوتیان و شاخه‌ی بندپایان هستند که آثار آنها روی کره‌ی زمین از دوره‌ی سیلورین یعنی حدود ۴۲۰ میلیون سال پیش به صورت سنگواره یافت شده است (۸). امروزه از همولف و زهر عقرب‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی زیادی نظیر (۱۰) scorpine و (۱۱) opisthoporins و (۹) hadrurin و غیره جدا شده‌اند. عقرب همیسکورپیوس لپتوروس که به زبان محلی خوزستان به نام گادیم معروف است، خطرناک‌ترین کژدم خوزستان و یکی از خطرناک‌ترین کژدم های جهان است (۱۲). مطالعات متعددی در ارتباط با تظاهرات بالینی و بیوشیمیایی ایجاد شده توسط زهر عقرب خانواده Scorpionidae وجود دارد (۱۳-۱۸).

با توجه به این مسئله که عقرب‌ها از زهر خود به عنوان یک عامل ضد عفونی کننده علیه عفونت های سطحی خود استفاده می‌کنند (۱۹) و همچنین شواهدی مبنی بر جداسازی چند پپتید ضد میکروبی از عقرب‌ها (۹-۱۱)، عقرب بومی ایران، همیسکورپیوس لپتوروس، جهت بررسی وجود این پپتیدها انتخاب گردید. هدف از این مطالعه تخلیص پپتیدهای زهر عقرب به روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در فاز معکوس و غربالگری اثر کشندگی آنها بر ضد سویه استاندارد *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 بود.

مواد و روش‌ها:

تهیه زهر

نتایج با سیستم مستندسازی ژل (Gel Documentation System, BioRad) ثبت گردید.

استخراج پپتیدها از زهر به روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون

جهت آماده سازی ستون، ۱۰ گرم رزین سفادکس G50 در بافر آمونیوم استات ۲۰ میلی مولار با $\text{pH}=8.5$ مخلوط شده و ستون طبق پروتکل های استاندارد آماده گردید. پس از آن ستون با سه برابر حجم آمونیوم استات ۲۰ میلی مولار شستشو داده شده و متعادل گردید. مقدار ۳۰ میلی گرم زهر آماده شده به ستون تزریق گردید و ستون آماده شده به سیستم FPLC (ActaPurifier10 (GE- USA) متصل شده و اجزاها با سرعت جریان ۰/۳ میلی لیتر در دقیقه توسط دستگاه Fraction collector در مدت زمان ۱۲ ساعت جمع آوری گردید. طول موج شناسایی اجزاء ۸۰ نانومتر بود و کروماتوگرام نهایی توسط نرم افزار Unicorn بدست آمد. اجزاء بدست آمده با سیستم Freeze dryer (alpha2, Christ-Germany) در دمای ۵۶- درجه سانتی گراد و فشار ۰/۰۴ اتمسفر به مدت ۲۴ ساعت لیوفیلیزه شده و با روش بیسینکونینیک اسید تعیین غلظت گردیدند. جهت تعیین وزن مولکولی اجزاء و همچنین شناسایی اجزایی که حاوی پپتید بودند، الکتروفورز پروتئین به روش فوق انجام شد.

بررسی اثر ضد باکتری اجزاء بدست آمده از ژل فیلتراسیون

تهیه سوسپانسیون استاندارد به روش کمی: باکتری مورد استفاده در این مطالعه سویه *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 بود. در تست آنتی بیوگرام، برای تعیین خاصیت ضد باکتری اجزا پپتیدی، پروتکل استاندارد CLSI مورد استفاده قرار گرفت که بر اساس این پروتکل نیم مک فارلند معادل 1.5×10^8 CFU/ml است. باکتری مورد نظر در محیط کشت مولر هینتون براث به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شد. جهت خارج ساختن مواد محیط و فرآورده های ترشحاتی باکتری ها، سوسپانسیون باکتری در دور ۷۰۰۰ RPM به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب بدست آمده در سرم فیزیولوژی سوسپانسیونه شده و مجدداً با شرایط قبلی سانتریفیوژ گردید. رسوب تمیز در سرم فیزیولوژی سوسپانسیونه شده و به عنوان سوسپانسیون غلیظ در تهیه نیم مک فارلند مورد استفاده قرار گرفت. جهت دقت بیشتر در تهیه

نیم مک فارلند، دانسیته اپتیک سوسپانسیون مورد آزمایش با روش اسپکتروفوتومتری با دستگاه اسپکتروفوتومتر (CT-5000, Chrom TECH, Thailand) در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت شد. دانسیته اپتیک بین ۰/۱ - ۰/۰۸ معادل 1.5×10^8 CFU/ml است. به دلیل دقت بیشتر در تعداد باکتری های تهیه شده، دانسیته اپتیک ۰/۰۹ جهت تهیه نیم مک فارلند انتخاب گردید.

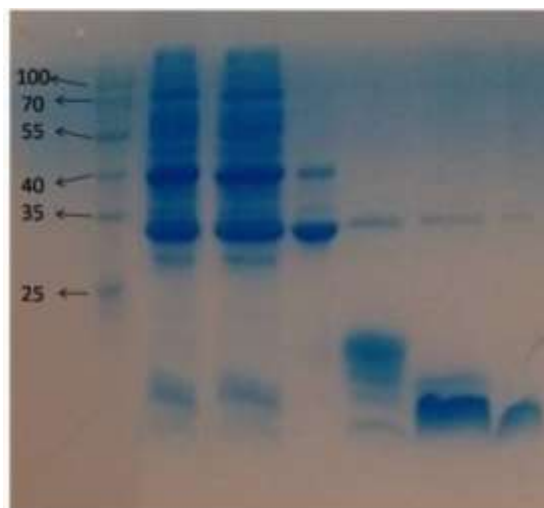
دیسک دیفیوژن

ابتدا برای آماده سازی دیسک ها، مقدار ۱۰۰ میکروگرم از اجزاها را با سمپلر بر روی دیسک های بلانک ریخته و مدت ۳-۲ ساعت زمان داده شد تا دیسک ها کاملاً خشک شوند.

سپس پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار را با یک سوآپ آغشته به سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک فارلند کشت داده و سپس دیسک های آماده شده بر سطح پلیت قرار داده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شده و سپس تأثیر اجزا پپتیدی روی باکتری با مشاهده و اندازه گیری هاله عدم رشد بررسی شد. در این آزمایش از دیسک آنتی بیوتیک سفتریاکسون (30 µg) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در فاز معکوس

جهت تخلیص بیشتر پپتید، از اجزاء ضد باکتری بدست آمده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در فاز معکوس انجام شد. سیستم مورد استفاده HPLC شرکت Knauer آلمان مدل Smartline بوده و فاز جامد ستون C18 شرکت با مشخصات طول ۲۵ سانتی متر، عرض ۴/۶ میلی متر، قطر ۵ میکرون و اندازه منافذ ۱۰۰ آنگستروم، بود. فاز متحرک شامل استونیتریل خالص (شرکت مرک) حاوی ۰/۰۵٪ تری فلئورواستیک اسید (شرکت سیگما) به عنوان ماده اصلی (محلول A) و آب با درجه خلوص HPLC حاوی ۰/۰۵٪ تری فلئورواستیک اسید (محلول B)، به عنوان حلال فرعی بود. متد بکار رفته یک گرادینت خطی افزایش یابنده با محلول A بود.



شکل ۱: الکتروفورز زهر عقرب و اجزا های FPLC. (از چپ به راست) ردیف ۱: Protein Molecular Weight Marker، ردیف ۲: زهر عقرب، ردیف ۳: جزء ۱، ردیف ۴: جزء ۲، ردیف ۵: جزء ۳، ردیف ۶: جزء ۴، ردیف ۷: جزء ۵

آنالیز پپتیدهای استخراج شده با استفاده از RP-HPLC

آنالیز کروماتوگرام بدست آمده از تخلیص جزء ۵ نشان داد که حدود ۲۰ جزء پپتیدی در این اجزا وجود دارند (نمودار ۲). طبق نتایج SDS-PAGE، طیف وزنی پپتیدهای تخلیص شده مازور با فعالیت ضد سودوموناس حدود ۷ کیلودالتون تخمین زده شد (شکل ۲).

شکل ۲: پپتیدهای به دست آمده از تخلیص جزء ۵ به روش RP-HPLC. چاهک شماره ۱: Protein Molecular Weight Marker، چاهک شماره ۲: پپتید شماره ۱ و چاهک ۳: پپتید شماره ۴ (به ترتیب از چپ به راست)

اجزا بدست آمده با سیستم Freeze dryer (alpha2, Christ-Germany) در دمای ۵۶- درجه سلسیوس و فشار ۰/۰۴ اتمسفر بمدت ۲۴ ساعت لیوفیلیزه شده و با روش بیسینکونینیک اسید تعیین غلظت گردیدند. جهت تعیین وزن مولکولی اجزاها و همچنین شناسایی اجزا هایی که حاوی پپتید بودند، الکتروفورز پروتئین به روش فوق انجام شد.

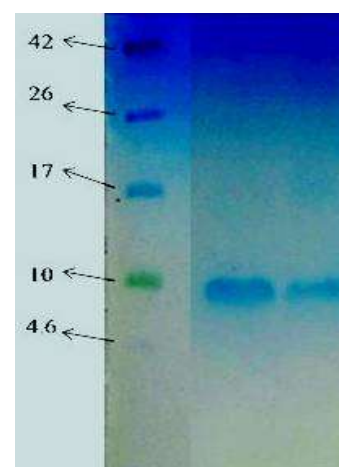
بررسی اثر ضد باکتریایی اجزا های بدست آمده از RP-HPLC

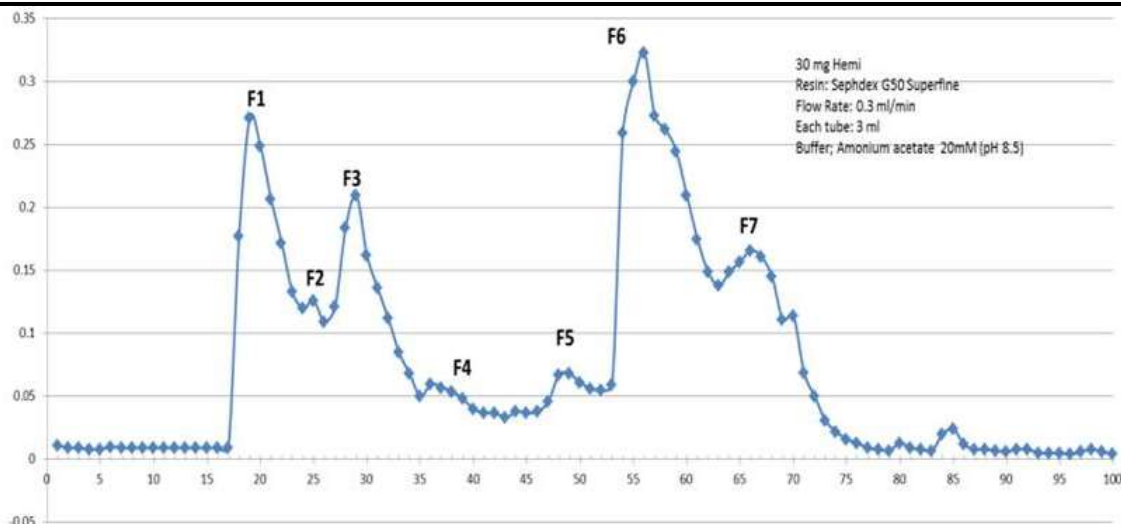
سوسپانسیون استاندارد باکتری *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 به روش فوق تهیه گردید و تست بررسی اثر ضد میکروبی ۵ پپتید مازور به دست آمده از HPLC مجدداً با روش دیسک دیفیوژن آزمایش شد. در این آزمایش از دیسک آنتی بیوتیک سفتریاکسون (30µg) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

یافته ها

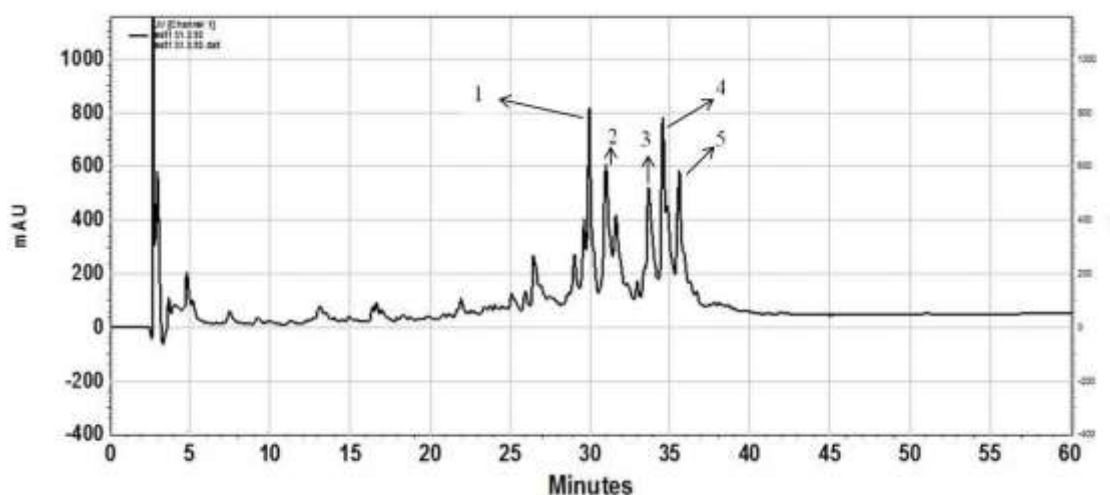
آنالیز زهر به روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون

از زهر تزریق شده به ستون، ۷ جزء به دست آمد که در زمان های مختلفی از دقیقه ۱۷ تا ۸۰ از ستون خارج شدند (نمودار ۱). با توجه به نتایج بدست آمده از تست SDS-PAGE مشخص شد که وزن مولکولی اجزا های بدست آمده از ۴ تا ۱۶۰ کیلودالتون بودند (شکل ۱). مقایسه وزن مولکولی اجزا با مارکر پروتئینی نشان داد که جزء شماره ۵ حاوی پپتیدهایی با وزن زیر ۱۰ کیلو دالتون بودند (شکل ۱).





نمودار ۱: کروماتوگرام زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس. هفت جزء اصلی با محلول جدا کننده استات آمونیوم ۲۰ میلی مولار با سرعت ۰/۳ میلی لیتر در دقیقه از ستون سفاد کس G50 جدا گردید.



نمودار ۱: کروماتوگرام پپتیدهای جدا شده از تخلیص جزء ۵ به روش RP-HPLC. اجزا های ضد باکتری یک و چهار در شکل نشان داده شده است.

بررسی اثر ضد باکتریایی

بحث

عقربها از جمله جانداران قدیمی بر روی کره زمین هستند که غالبا از اسپری کردن زهر خود بر روی بدنشان برای مقابله با میکروارگانیسم های ساپروفیت، از قبیل باکتری ها و قارچ ها استفاده می کنند. این امر نشان دهنده وجود ترکیباتی موثر در زهر این جانداران برای از بین بردن میکروارگانیسم های فوق می باشد (۱۹). زهر عقربها منبع بسیار مناسبی برای ترکیبات دارویی است. Kievit و همکاران به ترکیبی در زهر عقرب دست

قطر هاله عدم رشد اجزا ۵ به دست آمده از FPLC برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا حدود ۰/۹ سانتی متر بود. نتایج تست انتشار دیسک برای پنج جزء پپتیدی ماژور بدست آمده از HPLC نشان داد که دو اجزا اصلی یک و چهار دارای قدرت باکتری کشی مشابه بوده و قطر هاله عدم رشد حدود یک سانتی متر برآورد شد. قطر هاله عدم رشد دیسک سفتریاکسون ۱/۵ سانتی متر بدست آمد.

نشان داد که پپتیدهای جدا شده از زهر عقرب بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا موثر بوده و هاله عدم رشد به وضوح اطراف دیسک های حاوی پپتید مشاهده شد.

مقایسه نتایج اثر ضد سودوموناس پپتید های ایزوله شده با سفتریاکسون نشان داد که این پادزیست اثر قوی تری داشته است. اما این مقایسه یک برآورد آزمایشگاهی بوده و بدون فرمولاسیون انجام گردیده است. لذا نتایج بدست آمده در مرحله مقدماتی ارزشمند به نظر می رسد.

اثر ضد باکتری زهر بدست آمده از عقرب ها در مطالعات مختلفی نشان داده شده است. مطالعه Wenxin, Zhijian Cao, Li و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی اثر ضد باکتری زهر عقرب چینی *Isometrus maculatus* نشان داد که زهر این عقرب بر باکتری های گرم مثبت اثر داشته فاقد اثر بر باکتری های گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا و *اشریشیا کلی* بوده است (۳۰). مقایسه نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می دهد که مکانیسم اثر ضد باکتری زهر عقرب چینی با اثر زهر عقرب ایرانی همیسکورپیوس لپتوروس متفاوت بوده است.

Gerardo CORZO و همکاران در سال ۲۰۰۱ با استفاده از روش بررسی هاله عدم رشد، نشان دادند که زهر عقرب آفریقایی *Pandinus imperator* دارای خاصیت ضد باکتری بسیار بیشتر بر علیه باکتری های گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا و *اشریشیا کلی* بوده و اثر آن بر باکتری های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* کمتر می باشد (۳۱). این مطالعه از لحاظ اثر بر باکتری های گرم منفی با مطالعه Gerardo CORZO و همکاران مطابقت دارد.

مطالعه Nauman Khalid و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که زهر عقرب پاکستانی *Heterometrus xanthopus* بر باکتری سودوموناس اثر ضد باکتری داشته (۳۲) و از این لحاظ مشابه عقرب همیسکورپیوس می باشد.

در این بررسی مشخص شد که از میان پپتیدهای استخراج شده، دو پپتید بر روی باکتری سودوموناس اثر کشندگی واضح داشت. این مطالعه از این لحاظ حائز اهمیت است که اولین گزارش وجود یک عامل ضد میکروبی از زهر عقرب بومی ایران، همیسکورپیوس لپتوروس، است. مطالعات تکمیلی جهت بررسی خواص ضد میکروبی این پپتید خالص شده بر علیه باکتری های

یافته اند که قابل استفاده در ژن تراپی برای بیماریانی ست که دچار تومور های مغزی بدخیم هستند (۲۰-۲۱). امروزه از زهر و همولف عقرب ها پپتیدهای ضد میکروبی زیادی استخراج شده اند (۹-۱۱). با توجه به تحقیقاتی که در دهه اخیر انجام شده، پادزیست هایی با منبع طبیعی از باکتری ها، گیاهان، بی مهرگان، مهره داران و سایر جانداران جدا شده است (۲۴، ۲۳). این مولکول ها پپتیدهایی هستند که در دفاع ذاتی سیستم ایمنی دخالت داشته و جزء اصلی تشکیل دهنده سیستم دفاعی در برابر تعداد زیادی از میکروارگانیسم های زنده هستند. با پیشرفت علم ایمونولوژی و بررسی های انجام شده بر روی مولکول های سیستم ایمنی و مکانیسم عمل آن ها، امروزه پپتیدهای زیادی شناخته شده اند که دارای خواص ضد ویروسی، ضد باکتری و ... هستند (۲۴، ۲۳). AMP ها یا پپتیدهای ضد میکروبی با استفاده از مکانیسم های مختلف در لپوزوم های غشا نفوذ می کنند (۲۶، ۲۵). مدل های مولکولی مختلفی برای توضیح بیشتر در ارتباط با نحوه ورود پپتیدهای ضد میکروبی و مکانیسم عمل آن ها به غشای سلول های مختلف از جمله پروکاریوت ها در نظر گرفته شده که از جمله آن ها می توان به مدل (۲۶، ۲۵) Carpet، Barrel-Stave (۲۸، ۲۷) و Toroidal (۲۹) اشاره کرد. تاثیر یک پپتید بر روی باکتری های مختلف یکسان نیست و تا حد زیادی به نوع باکتری و ساختار دیواره میکروارگانیسم بستگی دارد. امروزه به کمک روش های مولکولی و دستگاه های موجود، مطالعات زیادی بر روی انواع پپتیدهای ضد میکروبی و نحوه عمل آن ها انجام گرفته است (۲۹-۲۶).

عفونت های بیمارستانی همواره یکی از مشکلات عمده بهداشتی و درمانی بوده و با افزایش مدت اقامت بیمار در بیمارستان موجب افزایش ابتلاء و مرگ و میر از این عفونت ها شده و همچنین هزینه های بیمارستانی را به شدت افزایش می دهد. امروزه مقاومت های پادزیستی باکتری سودوموناس آئروژینوزا مشکلات بالینی زیادی را ایجاد کرده و این موضوع روز به روز در حال افزایش است (۲). بنابراین جستجوی آنتی بیوتیک های جدید، به طوری که مقاومت ژنتیکی در باکتری ها ایجاد نکنند، مورد توجه قرار گرفته است (۲۲).

هدف از این پژوهش جستجوی یک پپتید ضد باکتری بر ضد باکتری سودوموناس آئروژینوزا در زهر عقرب بومی ایران، همیسکورپیوس لپتوروس، بود. نتایج به دست آمده از این تحقیق

دیگر و همچنین بررسی خاصیت ضد میکروبی این پپتید بر علیه سویه های بالینی در حال برنامه ریزی است.

References

1. Su BH, Hsieh HY, Chiu HY, Lin HC, Lin HC. Nosocomial infection in a neonatal intensive care unit: A prospective study in Taiwan. *American Journal of Infection Control* 2007. 35(3):190-5.
2. Pathmanathan SG, Samat NA, Mohamed R. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Malaysian Hospital. *Malay J Med Sci* 2009. 16(2):28-33.
3. Martin, E., T. Ganz, and R. I. Lehrer. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J. Leukoc. Biol.* 1995. 58:128-136
4. Wang, Z., and G. Wang. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res.* 2004. 32:590-592.
5. Cunliffe, R. N., and Y. R. Mahida. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J. Leukoc. Biol.* 2004. 75:49-58.
6. Hancock, R. E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.* 2001. 1:156-164.
7. Pipelzadeh MH, Jalali A, Taraz M, Pourabbas R and Zaremira-kabadi A, An epidemiological and a clinical study on scorpionism by the Iranian Scorpion *Hemiscorpius lepturus*. *Toxicon*. 2007. 50: 984-992
8. Pipelzadeh MH, Dezfoulian AR, Jalali MT, Mansouri AK. In vitro and in vivo studies on some toxic effects of the venom from *Hemiscorpius lepturus* scorpion. *Toxicon* 2006. 48:93-103.
9. Moerman, L., S. Bosteels, W. Noppe, J. Willems, E. Clynen, L. Schoofs, K. Thevissen, J. Tytgat, J. Van Eldere, J. Van Der Walt, and F. Verdonck. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur. J. Biochem.* 2002. 269(19):4799-810.
10. Conde, R., F. Z. Zamudio, M. H. Rodriguez, and L. D. Possani. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.* 2000. 471:165-168.
11. Torres-Larios, A., G. B. Gurrola, F. Z. Zamudio, and L. D. Possani. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur. J. Biochem.* 2000. 267:5023-5031
12. Shahbazzadeh D, Amirkhani A, Djadid ND, Bigdeli S, Akbari A, Ahari H, Amini H, Dehghani R. Epidemiological and clinical survey of scorpionism in Khuzestan province, Iran (2003). *Toxicon*. 2009. 53(4):454-9.
13. Radmanesh, M., Clinical study of *Hemiscorpius lepturus* sting in Iran. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1990. 93: 327-332.
14. Radmanesh, M., Cutaneous manifestation of *Hemiscorpius lepturus* sting: a clinical study. *Int. J. Dermatol.* 1998. 37: 500-507.
15. Shahbazzadeh, D., Amirkhani, A., Djadid, N.D., Bigdeli, S., Akbari, A., Ahari, H., Amini, H., Dehghani, R., Epidemiological and clinical survey of scorpionism in Khuzestan province, Iran. *Toxicon* 2009. 53 (4): 454-490.
16. Lamia Borchani, Atfa Sassi, Delavar Shahbazzadeh, Jean-Marc Strub, Haïfa Tounsi-Guetteti, Mohamed Samir Boubaker, Abolfazl Akbari, Alain Van Dorsselaer, Mohamed El Ayeb. Heminecrosis, the first hemolytic dermonecrotic toxin purified from scorpion venom. *Toxicon*. 2001. 58: 130-139
17. Mojgan Heidarpour, Emna Ennaifer, Hamed Ahari, Najet Srairi-Abid, Lamia Borchani, Ghader Khalili, Hossein Amini, Amir Ali Anvar, Samir Boubaker, Mohamed El-Ayeb, Delavar Shahbazzadeh. Histopathological changes induced by *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom in mice. *Toxicon*. 2012. 59: 373-378
18. Shahbazzadeh D, Abdollahi T, Pooshang Bagheri K, Hosseini-Nejad Chafi M, Sasani F, Torkashvand F, Khalili G, Vaziri B. "Purification of Haemolytic/Necrotic Protein from the Venom of Deathful *Hemiscorpius Lepturus* Scorpion in Khuzestan Province". *Iranian Journal of Infectious Diseases*, 2012. 55:
19. Torres-Larios A, Gurrola GB, Zamudio FZ, Possani LD. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur J Biochem* 2002. 267:5023-31.
20. Kievit FM, Veisheh O, Fang C, Bhattarai N, Lee D, Ellenbogen RG, et al. Chlorotoxin labeled

- magnetic nanovectors for targeted gene delivery to glioma. *ACS Nano* 2010.4:4587-94.
21. Wulff H, Miller MJ, Hänsel W, Grissmer S, Cahalan MD, Chandy KG,. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel, IKCa1 : A potential immunosuppressant. USA: *Proc Nat Acad Sci*; 2000. 97(14):8151-6.
22. Marr A. K, Gooderham W. J, Hancock R. E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 2006. 6: 468-472.
23. Pag, U. and Sahl, H.G. In *Peptide Antibiotics*, (Dutton, C.J. Haxell, M.A. McArthur, H.I.I. and Wax, R.G., Eds.) 2002; pp. 47-80. Marcel Dekker Inc., New York and Basel.
24. Hancock, R. E., and A. Patrzykat. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2002. 2:79-83.
25. Zhao, H., Mattila, J. P., Holopainen, J. M. & Kinnunen, P. K. Comparison of the membrane association of two antimicrobial peptides, magainin 2 and indolicidin. *Biophys.J.* 2001. 81: 2979-2991
26. Silvestro, L., Gupta, K., Weiser, J. N. & Axelsen, P. H. The concentration-dependent membrane activity of cecropin A. *Biochemistry.* 1997. 36: 11452-11460
27. Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. & Shai, Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 1992. 31: 12416-12423
28. Oren, Z. & Shai, Y. Mode of action of linear amphipathic helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 1998. 47: 451-463
29. Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L. & Huang, H.W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* 2001.81: 1475-1485
30. Zhenhuan Zhao, Yibao Ma, Chao Dai, Ruiming Zhao, SongRyong Li, Yingliang Wu, Zhijian Cao, and Wenxin Li. Imcroporin, a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Venom of the Scorpion *Isometrus maculatus*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 2009. 35 (8): 3472–3477
31. Gerardo CORZO, Pierre ESCOUBAS, Elba VILLEGAS., Kevin J. BARNHAM., Weilan HE., Raymond S. NORTON and Terumi NAKAJIMA. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem. J.* 2001. 359: 35-45
32. Umair Ahmed, Malik Mujaddad-ur-Rehman, Nauman Khalid, Sardar Atiq Fawad, and Anees Fatima. Antibacterial activity of the venom of *Heterometrus xanthopus*. *Indian J Pharmacol.* 2012. 44(4): 509–511