

Paper Type: Original Article



Synthesis and Antibacterial Evaluation of Liposomal Particles Containing the Recombinant Peptide rCAP18

Faezeh Habibollahi¹, Azadeh Lohrasbi-Nejad ^{*2, 1} , Akbar Hosseinipour³

¹Department of Agricultural Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

²Research and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran;*(Associate Professor: Corresponding author: a.lohrasbi@uk.ac.ir).

³Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Citation:

Habibollahi, F., Lohrasbi-Nejad, A., & Hosseinipour, A. (2024). Synthesis and Antibacterial Evaluation of Liposomal Particles Containing the Recombinant Peptide CAP18. *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 37 (Issue No. 2), PP. 1-14

Received: 2023.09.12

Accepted: 2024.01.28

Abstract

Introduction: Antibacterial peptides have been widely investigated as potential bio-antibiotics against bacteria. However, the proteolytic degradation and structural changes may lead to a decrease in their antibacterial activity. Encapsulating peptides in liposomes may be a suitable method to solve such problems.

Methods: This study used the recombinant CAP18 (rCAP18) as an antibacterial peptide. After production and purification, encapsulation was done inside the liposomes constructed by phosphatidylcholine. The main characteristics of liposomes, such as size, morphology, type of functional groups, and encapsulation efficiency, were investigated. Antibacterial activity of free and encapsulated rCAP18 in the liposomes (Lipo@rCAP18) against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, and *Staphylococcus aureus* was evaluated and compared based on the MIC and MBC values.

Results: The obtained findings showed that the minimum inhibitory concentration of free rCAP18 for *E. coli*, *P. aeruginosa*, *X. citri*, and *S. aureus* strains was determined to be 135, 101, 80, and > 320 µg/ml. MIC value of rCAP18 enclosed in the liposome was >320, 135, 180, and 320 µg/ml, for the strains mentioned above, respectively.

Conclusion: The comparison of MIC results showed that free and encapsulated forms of rCAP18 have a more growth-inhibitory effect against *P. aeruginosa*, *X. citri* strains. Consequently, vesicles containing antibacterial peptides can be used as a powerful method to preserve their function and maintain the active peptides over time.

Keywords: Antibacterial property, Liposome, phosphatidylcholine, Recombinant CAP18



سنتر و ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی ذرات لیپوزومی حاوی پپتید نوترکیب rCAP18

فائزه حبیب الهی^۱، آزاده لهراسبی نژاد^{۲*} و اکبر حسینی پور^۳

^۱ کارشناسی ارشد، بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

^۲ دانشیار، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

(*نویسنده مسئول: a.lohrasbi@uk.ac.ir)

^۳ بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

^۴ دانشیار، بخش گیاهپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۱

چکیده

مقدمه: پپتیدهای ضد باکتریایی به طور گسترده به عنوان آنتی بیوتیک‌های زیستی بالقوه علیه باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند. با این حال، تخریب پروتئولیتیک و تغییرات ساختاری ممکن است منجر به کاهش فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها شود. محصور شدن پپتیدها در لیپوزوم می‌تواند روش موثری برای رفع این گونه مشکلات باشد.

روش‌ها: در این مطالعه CAP18 نوترکیب (rCAP18) به عنوان یک پپتید ضد باکتریایی، پس از تولید و خالص سازی، درون لیپوزوم‌های حاوی فسفاتیدیل کولین محصور شد. ویژگی‌های اصلی لیپوزوم‌ها مانند سنجش گروه‌های عاملی، اندازه، کارایی کپسولاسیون و مورفولوژی آن بررسی شد. فعالیت ضد باکتریایی rCAP18 آزاد و محصور در لیپوزوم (Lipo@rCAP18) علیه باکتری‌های *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Xanthomonas citri* subsp. *citri* و *Staphylococcus aureus* بر اساس اندازه‌گیری پارامترهای MIC و MBC ارزیابی و مقایسه شد.

یافته‌ها: یافته‌های بدست آمده نشان دادند که کمترین غلظت مهارکنندگی rCAP18 (حالت آزاد) برای سویه *P. aeruginosa*، *X. citri* و *S. aureus* به ترتیب معادل ۱۳۵، ۱۰۱، ۸۰ و بیشتر از ۳۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. مقادیر MIC مربوط به rCAP18 محصور در لیپوزوم برای باکتری‌های ذکر شده در بالا به ترتیب بیشتر از ۳۲۰، ۱۳۵، ۱۸۰ و ۳۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد.

نتیجه‌گیری: مقایسه نتایج مربوط به MIC نشان داد که rCAP18 در حالت آزاد و یا به فرم Lipo@rCAP18 تاثیر بازدارندگی بیشتری علیه باکتری‌های *P. aeruginosa* و *X. citri* دارد. بنابراین، وزیکول‌های حاوی پپتیدهای ضد باکتریایی می‌توانند بعنوان ابزار قدرتمندی جهت حفظ عملکرد و نگهداری پپتیدهای فعال طی زمان به کار روند.

کلیدواژه‌ها: پپتید نوترکیب CAP18، خاصیت ضد باکتریایی، فسفاتیدیل کولین، لیپوزوم

مقدمه

امروزه مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌عنوان دغدغه‌ی مهم بهداشت جهانی مطرح می‌شود. علاوه بر این بروز میکروارگانسیم‌های مقاوم به چند دارو نیز چالش جدیدی است که موجب شده افزایش مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به یک تهدید مهم تبدیل شود [1].

پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial peptides, AMPs) به دلیل عملکرد متفاوت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های معمول، گزینه مناسبی برای درمان عفونت‌های میکروبی بدون ایجاد مقاومت در آنها است. این پپتیدها که به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی نیز شناخته می‌شوند، دسته‌ای از پپتیدها با طول کوتاه (۱۰۰ اسید آمینه و کمتر) هستند که آثار ضد میکروبی قوی از خود بروز می‌دهند. پپتیدهای ضد میکروبی عوامل ضد میکروبی طبیعی تشکیل دهنده سیستم ایمنی ذاتی هستند که عمدتاً نواحی آنیونی در غشاء میکروبی را به واسطه بار کاتیونی خود مورد هدف قرار می‌دهند و باعث ایجاد برهمکنش اولیه بین پپتید و غشای میکروبی می‌شوند. متعاقباً، اسیدهای آمینه آگریز موجود در پپتید به هسته آگریز غشاء وارد شده و بی‌نظمی فسفولیپیدها را افزایش می‌دهند و در نتیجه غشاء، عملکرد خود را از دست می‌دهد [2]، [3]، [4]، [5].

مطالعات انجام شده حضور AMPs را در همه موجودات زنده از جمله گیاهان [6]، پستانداران [7]، حشرات [8] و میکروارگانسیم‌ها [9] تایید کرده است. تعداد قابل توجهی از AMPs گزارش شده در گروه پپتیدهای کاتیونی قرار می‌گیرند ولی AMPs آنیونی که عموماً حاوی اسیدهای آمینه اسیدی (آسپاراتات و گلوتامات) هستند، نیز شناسایی شده‌اند. بعضی از انواع AMPs، اثرات انتخابی روی میکروبی‌ها دارند. به‌عنوان مثال نایسین رشد برخی از باکتری‌های گرم مثبت را مهار می‌کند، در حالی که AMPs غنی از پرولین عمدتاً رشد باکتری‌های گرم منفی، مانند *Escherichia coli* را مهار می‌کنند [10]، [11]. امروزه AMPs به دلیل زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، طیف وسیع فعالیت و خواص باکتری‌کش قوی بعنوان ترکیبات جایگزین برای از بین بردن باکتری‌ها در نظر گرفته می‌شوند [12].

این احتمال وجود دارد که پپتیدهای ضد باکتریایی در اثر شرایط محیطی و یا حضور پروتئازها در محیط عملکرد خود را از دست بدهند. یکی از رویکردهای کلیدی برای غلبه بر چنین مشکلاتی، توسعه فرمولاسیون‌هایی است که این پپتیدها را به دام اندازد [13]. تا کنون تلاش‌هایی برای بهبود پایداری پپتیدها در برابر طیف وسیعی از تنش‌های محیطی و شیمیایی صورت گرفته است. به‌عنوان مثال، استفاده از لیپوزوم‌های متشکل از فسفولیپیدها می‌تواند راه موثری در حفظ پایداری پپتیدها باشد [14]، [15]، [16]. لیپوزوم‌ها اساساً وزیکول‌هایی هستند که از یک یا چند لایه فسفولیپیدی تشکیل شده‌اند. مکانیسم تشکیل لیپوزوم مبتنی بر ایجاد برهمکنش بین سرهای قطبی فسفولیپیدها و مولکول‌های آب است، به طوری که سرهای قطبی فسفولیپیدها در معرض فازهای آبی (داخلی و بیرونی) قرار می‌گیرند و دنباله‌های هیدروکربنی آگریز از مولکول‌های آب فاصله گرفته و به یکدیگر نزدیک می‌شوند [17]. سرانجام وزیکول‌های دولایه (لیپوزوم) سازمان یافته تشکیل می‌شوند که طی این فرآیند، می‌توانند ترکیبات موجود در محیط آبی مانند پپتیدها را به دام‌اندازند [18]. لیپوزوم‌ها به‌عنوان حامل برای عوامل درمانی، به‌عنوان ابزارهای تحلیلی و همچنین مدل غشاهای بیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در صنایع غذایی، لیپوزوم‌ها برای رساندن پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات معطر بررسی شده‌اند [19]، [20]، [21]. ترکیبات به دام افتاده درون لیپوزوم‌ها در برابر طیف وسیعی از تغییرات از جمله تغییرات آنزیمی، شیمیایی (pH) و محیطی محافظت می‌شوند [18]، [19]. از آنجایی که لیپوزوم‌ها می‌توانند از اجزای طبیعی تهیه شوند، موانع نظارتی که ممکن است از کاربرد آنها در سیستم‌های غذایی جلوگیری کند، کم یا حذف می‌شود و فرمول‌های جدید به سرعت مورد استفاده قرار می‌گیرد [18]، [20].

تا کنون، اشکال مختلف کپسوله‌سازی مانند لیپوزوم‌ها یا فیلم‌ها برای آزادسازی کنترل شده پپتیدهای ضد باکتریایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که باعث حفظ خاصیت ضد باکتریایی و پایداری مواد فعال درون آنها شده‌اند. نتایج بدست آمده نشان داده‌اند که کپسوله‌سازی پپتیدها توسط لیپوزوم‌ها، یک استراتژی موثر برای حفظ پایداری، حفظ ویژگی ضد باکتریایی و انتشارکنترل شده مواد کپسوله شده است [2]، [22]، [23]، [24].

یکی از گسترده ترین گروه AMPs، کاتلسیدین (Cathelicidin) است که در طیف وسیعی از موجودات از جمله انسان [25]، گاو [26]، خوک [27]، میمون [28] و خرگوش [29] دیده می‌شود. کاتلسیدین خرگوش یک پپتید ۱۸ کیلو دالتونی است (CAP18) که توسط گرانولوسیت‌ها ترشح می‌شود [30]. در مطالعه پیشین ما، مشخص شد که CAP18 نوترکیب دارای فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های بیماری‌زای حیوانی [31] و باکتری بیماری‌زای گیاهی [32] است. بنابراین، به دام افتادن rCAP18 درون لیپوزوم‌ها ممکن است موجب پایداری بیشتر و حفظ عملکرد طولانی مدت آن شود. در این تحقیق تولید لیپوزوم‌های ساخته شده از فسفاتیدیل کولین (CP) برای محصور کردن rCAP18 بررسی شد. سپس، میزان رهایش پپتید در طول زمان، سنجش خاصیت ضد باکتریایی آن و مشخصه یابی لیپوزوم تولید شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تولید و تخلیص پپتید نوترکیب CAP18

برای تولید پپتید rCAP18، مخمر *Pichia pastoris* جدایه X-33 حاوی ژن نوترکیب cap18 که در مطالعه پیشین ما [31] ایجاد شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا ۱۰ میکرولیتر از کشت پایه حاوی جدایه یاد شده بر روی ظرف پتری حاوی محیط YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose) حاوی آگار ۱/۲ درصد، پپتون ۲ درصد، عصاره مخمر ۱ درصد و گلوکز ۱ درصد) کشت داده شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس یک تک پرگنه به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع YPD انتقال داده شد و به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس سلول‌های رشد یافته، توسط سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور رسوب داده شد. رسوب سلولی به ۵ میلی‌لیتر محیط YPG (Yeast extract-Peptone-Glycerol) حاوی گلیسرول ۱ درصد، پپتون ۲ درصد، عصاره مخمر ۱ درصد) افزوده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سلول‌های رشد یافته در محیط جدید، مجدداً توسط سانتریفیوژ (با شرایط یاد شده) رسوب داده شده و به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط YPM (Yeast extract-Peptone-Methanol) حاوی متانول ۰/۵ درصد، پپتون ۲ درصد، عصاره مخمر ۱ درصد) انتقال داده شدند تا OD₆₀₀ محیط به یک برسد. در این مرحله با افزودن متانول به محیط کشت در بازه زمانی ۲۴ ساعته، بیان rCAP18 توسط سلول‌های مخمر القا گردید و محیط کشت، ۵۴ ساعت پس از القا جمع‌آوری شد. سپس سلول‌های رشد یافته توسط سانتریفیوژ (۸۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شدند و فاز رویی حاوی پپتید نوترکیب جمع‌آوری شد. با توجه به حضور دم پلی‌هیستیدین در ساختار پپتید نوترکیب، تخلیص rCAP18 توسط ستون نیکل سفارز بر اساس مطالعات قبلی انجام شد [31]. سرانجام کیفیت rCAP18 خالص شده توسط الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید (تریس-تریسین) ۱۶ درصد ارزیابی شد.

تهیه لیپوزوم حاوی پپتید rCAP18

برای تهیه لیپوزوم حاوی پپتید، از پروتوکل رشیدی نژاد و همکاران (۲۰۱۶) همراه با کمی تغییرات استفاده شد [33]. ابتدا ۰/۱ گرم از پودر فسفاتیدیل کولین در ۱۰ میلی‌لیتر بافر استات سدیم ۰/۲۵ مولار (pH ۳/۸) حل شد. محلول rCAP18 خالص شده با غلظت ۱/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و محلول حاوی فسفاتیدیل کولین با ضریب ۱ به ۴ (حجمی/حجمی) با یکدیگر مخلوط شدند و به کمک دستگاه همگن ساز با دور rpm 24000 طی ۵ سیکل ۱ دقیقه‌ای با ۳۰ ثانیه توقف بین هر سیکل، همگن شدند. در این حالت سوسپانسیون، شیری رنگ شده و وزیکول‌های لیپوزومی شکل می‌گیرند. برای جدا سازی پپتیدهای آزاد از لیپوزوم‌های حاوی پپتید، نمونه بدست آمده به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا شده و غلظت پپتید آزاد محصور نشده به کمک آزمون بیوره محاسبه شد. رسوب به دست آمده (لیپوزوم Lipo@rCAP18) در بافر PBS (pH ۷/۸) معلق و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. لیپوزوم‌های فاقد پپتید (لیپوزوم Lipo@control) مطابق همین روش ساخته و به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

بازده به دام‌اندازی پپتید در لیپوزوم‌ها بر اساس مطالعه انجام شده در سال ۲۰۰۱ محاسبه شد [34]. ابتدا یک میلی‌لیتر از محلول حاوی لیپوزوم ساخته شده به یک میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد اضافه و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد. سپس، نمونه بدست آمده به مدت یک دقیقه به شدت هم زده شد و از صافی ۰/۴ میکرون عبور داده شد. غلظت پپتید آزاد

شده از لیپوزومها به کمک آزمون برادفورد محاسبه و بازده به داماندازی پپتید rCAP18 درون لیپوزومها، از طریق فرمول زیر اندازه گیری شد.

$$\text{rCAP18 به دام اندازه‌ی} = \frac{\text{غلظت rCAP18 محصور شده}}{\text{غلظت rCAP18 کل}} \times 100$$

به منظور بررسی میزان رهایش rCAP18 از درون لیپوزومهای ساخته شده، طی فاصله زمانی هر دو ماه یکبار، یک میلی‌لیتر از Lipo@rCAP18 سانتریفیوژ و پس از رسوب لیپوزومها، میزان پپتیدهای آزاد در رانشین اندازه گیری شد.

طیف سنجی FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy)

طیف سنجی FTIR براساس برهم‌کنش تابش مادون قرمز با نمونه و جذب آن به علت ارتعاش‌های خمشی و کششی پیوندهای مولکولی صورت گرفت و نمونه‌های rCAP18، Lipo@rCAP18 و Lipo@control در محدوده $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی ریخت شناسی Lipo@rCAP18

جهت بررسی شکل شناسی Lipo@rCAP18، ابتدا نمونه توسط دستگاه التراسونیک معلق شد و سپس بر روی گرید مسی فیلم کربن، یک تا دو قطره چکانده شد و سپس گرید داخل دستگاه قرار داده شد. تصویر برداری با استفاده از دستگاه الکترونی عبوری (TEM) مدل Zeiss-EM10C-100 KV توسط شرکت دی پترونیک انجام گرفت.

بررسی اندازه لیپوزومهای ساخته شده

اندازه لیپوزومهای ساخته شده به کمک روش پراکندگی نور دینامیک (DLS Dynamic light scattering) تعیین شد. برای انجام آزمون DLS، دو میلی‌لیتر از لیپوزومهای ساخته شده (Lipo@rCAP18 و Lipo@control) توسط دستگاه آنالیز ذرات (مدل ZEN 3600 شرکت Malvern Instruments) بر اساس تفرق نور لیزر مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

خاصیت ضد باکتریایی پپتید rCAP18 با توجه به روش M7-MA کمیته ملی استاندارد آزمایشگاه بالینی (National Committee for Clinical Laboratory Standards) [35] علیه عامل بیماری شانکر باکتریایی مرکبات، *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) (جداسازی و شناسایی شده در آزمایشگاه گیاهپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان) و نیز برخی از باکتری‌های بیماریزای حیوانی شامل *Escherichia coli* (PTCC 11229)، *Staphylococcus aureus* (PTCC 29213) و *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 9027) ارزیابی گردید.

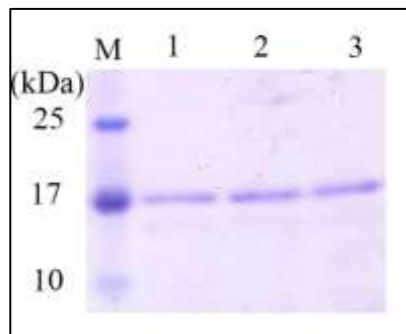
آماده سازی باکتری *Xcc* بر اساس مطالعه پیشین انجام شد [32]. برای باکتری‌های بیماریزای حیوانی شرایط کشت و آماده‌سازی یکسان بود. ابتدا کشت شبانه از باکتری‌ها در محیط کشت مغذی (Nutrient Broth, NB) تهیه شد. سپس از سوسپانسیون هر باکتری، ۱۰۰ میکرولیتر به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع جدید اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۲۰ rpm به مدت ۳ ساعت نگهداری شد. سوسپانسیون باکتری به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب حاصل در سرم فیزیولوژی معلق شد تا کدورت سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ باکتری) شود. جهت سنجش حداقل غلظت بازدارندگی rCAP18 آزاد و محصور در لیپوزوم، ۳۰ میکرولیتر بافر PBS به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. حجمی از rCAP18 آزاد و Lipo@rCAP18 به چاهک اول اضافه شد که در هر دو حالت، غلظت پپتید مصرفی یکسان باشد. رقیق سازی نمونه حاوی پپتید در چاهک‌های بعدی انجام شد.

۶۰ میکرولیتر محیط کشت به تمامی چاهک‌ها اضافه شد و در نهایت حجمی از باکتری رقیق شده به چاهک‌ها اضافه شد که تعداد باکتری نهایی در هر چاهک معادل 5×10^4 باکتری شود. چاهک شاهد منفی فاقد باکتری و چاهک مربوط به شاهد مثبت فاقد rCAP18 و Lipo@rCAP18 در نظر گرفته شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد. سرانجام پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و مهار رشد باکتری با پایش کدورت سنجی هر چاهک (OD_{600}) توسط دستگاه پلیت ریدر بررسی شد.

نتایج و بحث

تخلیص پپتید rCAP18

پس از تخلیص rCAP18، کیفیت نمونه‌های خارج شده از ستون Ni-NTA sepharose بر روی SDS-PAGE بررسی شد. حضور نوار پپتیدی در موقعیت تقریبی ۱۷ کیلودالتون (شکل ۱) بیانگر خالص سازی موفق rCAP18 از بین سایر پروتئین‌های غیر اختصاصی است.



شکل ۱- ژل الکتروفورز پلی‌اکریل آمید پپتید rCAP18 خالص شده با ستون Ni-NTA sepharose (ردیف‌های ۱ تا ۳ به ترتیب مربوط به پپتید نو ترکیب خارج شده از ستون است)، M: مارکر پروتئین (10-170 kDa)

Figure 1- SDS-PAGE of purified rCAP18 with Ni-NTA sepharose column (1-3 lanes belonging to the recombinant peptides eluted from the column), M: protein ladder (10-170 kDa)

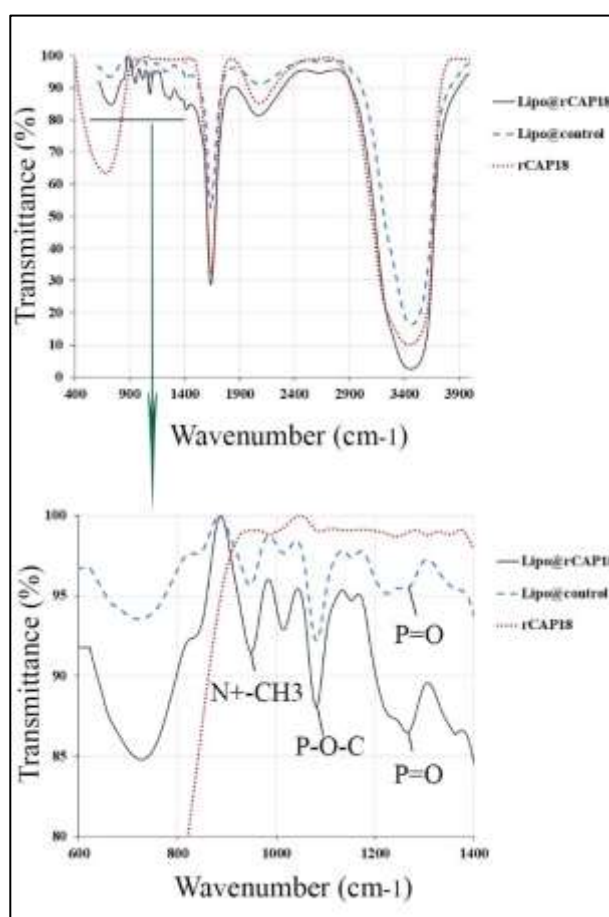
از میان ۲۴۰ نمونه جمع‌آوری شده از بخش‌های بستری بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های بیمارستان‌ها و درمانگاه‌های سطح شهر قم، تعداد ۸۲ جدایه با روش‌های بیوشیمیایی و کشت (گرم مثبت، کاتالاز مثبت، کوآگولاز مثبت، DNase مثبت و دارای همولیز بتا) به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شد. بررسی ژن‌های femA، norB و rpoD به‌صورت هم‌زمان و با واکنش Multiplex PCR انجام شد. از میان ۸۲ جدایه بررسی شده، ۴۰ سویه حاوی هر سه ژن femA، norB و rpoD تشخیص داده شدند (شکل ۱).

مقایسه گروه‌های عاملی در Lipo@control و Lipo@rCAP18

به منظور شناسایی و مقایسه گروه‌های عاملی سطحی لیپوزوم‌ها از محلول‌های حاوی rCAP18 Lipo@rCAP18 و Lipo@control استفاده شد. منحنی بدست آمده از آزمون FTIR (شکل ۲) نشان می‌دهد که در ناحیه 3481 و 3471 cm^{-1} مربوط به پیوند H است. محدوده $1680 - 1620$ cm^{-1} مربوط به کشش C=C و C=O است. در این ناحیه دو باند در موقعیت‌های 1681 و 1640 cm^{-1} به ترتیب در Lipo@rCAP18 و Lipo@control دیده شد. حضور باند 1640 cm^{-1} در نمودار متعلق به rCAP18 می‌تواند مربوط به آمین نوع اول یا آمین نوع دوم در ساختار اسیدهای آمینه (آرژنین) باشد علاوه بر آن محدوده $1630 - 1680$ cm^{-1} می‌تواند مربوط به پیوند آمیدی اسکلت پروتئین یا اسید آمینه گلوتامین و آسپاراژین باشد.

در ناحیه مربوط به اثر انگشت (محدوده $1500 - 600$ cm^{-1})، دو باند در موقعیت‌های 1417 و 1419 cm^{-1} به ترتیب در نمودارهای Lipo@rCAP18 و Lipo@control دیده می‌شود که مربوط به کشش نامتقارن C-H در گروه متیل است. در موقعیت‌های 1263 cm^{-1}

و ۱۲۶۵ مربوط به نمودارهای Lipo@rCAP18 و Lipo@control باندهایی دیده می‌شود که مربوط به کشش P=O در گروه فسفات آلی است. علاوه بر این، در موقعیت 1082 cm^{-1} یک باند در نمودارهای متعلق Lipo@rCAP18 و Lipo@control دیده می‌شود که مربوط به ارتعاش کشش متقارن PO_2^- موجود در سر قطبی فسفولیپید است. باند موجود در نمودارهای متعلق به Lipo@control و Lipo@rCAP18 در موقعیت‌های 947 cm^{-1} و 950 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کشش نامتقارن N^+-CH_3 موجود در گروه کولین (سر قطبی فسفولیپید فسفاتیدیل کولین) است. حضور باندهای مربوط به گروه‌های عاملی موجود در سر قطبی فسفولیپید PC در نمودارهای مربوط به Lipo@rCAP18 و Lipo@control تشکیل ساختار لیپوزومی را تایید می‌کند. محدوده 720 cm^{-1} تا 750 cm^{-1} مربوط به ارتعاش $-(\text{CH}_2)_n$ ($n \geq 3$) است. در این محدوده، باندهایی در موقعیت 723 cm^{-1} و 730 cm^{-1} به ترتیب در نمودارهای Lipo@control و Lipo@rCAP18 دیده شد. محدوده 710 cm^{-1} تا 685 cm^{-1} در پروتئین‌ها مربوط به کشش CH_2-S یا $\text{C}-\text{S}$ در گروه‌های تیول یا تیواتر است. بنابراین باند 680 cm^{-1} در نمودار rCAP18 حضور اسید آمینه سیستئین یا متیونین در ساختار را نشان می‌دهد. مقایسه انجام شده بین سه نمودار نشان می‌دهد که Lipo@rCAP18 علاوه بر داشتن باندهای اختصاصی مربوط به لیپوزوم‌ها (Lipo@control) شباهت‌های اندکی با نمودار rCAP18 به ویژه در موقعیت‌های 3471 cm^{-1} و 1640 cm^{-1} نیز دارد.

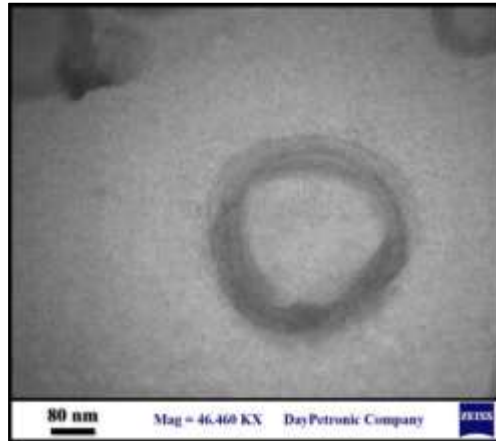


شکل ۲- طیف FTIR مربوط به نمونه‌های rCAP18، Lipo@rCAP18 و Lipo@control. مقایسه طیف‌های بدست آمده در محدوده 400 cm^{-1} تا 3900 cm^{-1} (شکل بالا) و در ناحیه اثر انگشت (شکل پایین). باندهای مربوط به $\text{P}=\text{O}$ ، PO_2^- و N^+-CH_3 در نمودارهای مربوط به لیپوزوم‌ها نشان دهنده حضور سر قطبی PC است

FTIR spectra of rCAP18, Lipo@rCAP18, and Lipo@control. Comparison of spectra in the 400 cm^{-1} to 3900 cm^{-1} range (figure Figure 2-above) and the fingerprint area (figure below). The bands related to $\text{P}=\text{O}$ ، PO_2^- ، and N^+-CH_3 in the graphs of liposomes indicate the presence of a PC polar head

ریخت شناسی میکروسکوپی Lipo@rCAP18

بررسی لیپوزوم‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد که وزیکول‌های Lipo@rCAP18 کروی شکل هستند. لیپوزوم‌های ساخته شده تک دیواره هستند و توسط یک غشا دو لایه فسفولیپیدی احاطه شده‌اند (شکل ۳).



شکل ۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری لیپوزوم ساخته شده حاوی rCAP18

Figure 3- Transmission electron microscope image of the constructed liposome containing rCAP18

بررسی اندازه لیپوزوم‌های ساخته شده حاوی rCAP18

نتایج حاصل از آزمون DLS نشان داد که لیپوزوم‌های Lipo@control و Lipo@rCAP18 به ترتیب دارای متوسط اندازه 50.4 ± 1 و 112.1 ± 1 نانومتر هستند. علاوه بر این محاسبه اندازه گیری شاخص پراکندگی (Polydispersity Index, PDI) برای لیپوزوم‌های Lipo@rCAP18 و Lipo@control (جدول ۱)، نشان داد که لیپوزوم‌های ساخته شده از نظر اندازه ذرات یکنواخت هستند.

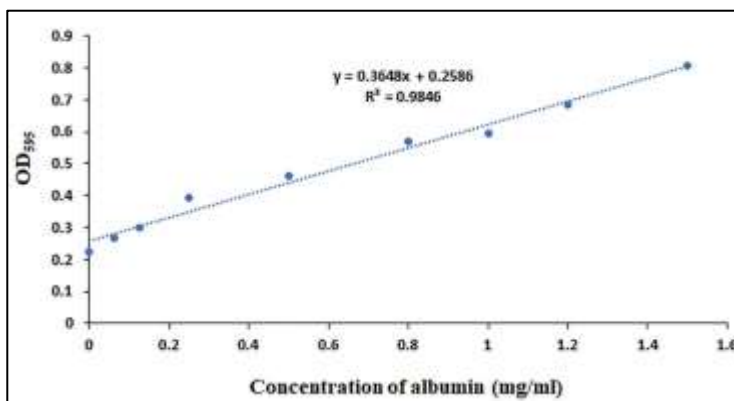
جدول ۱- مقایسه پارامترهای حاصل از آزمون DLS مربوط به لیپوزوم‌های Lipo@rCAP18 و Lipo@control

Table 1- Comparison of DLS parameter tests for the Lipo@control and Lipo@rCAP18 liposomes

Liposome type	SIZE (nm)	PDI
Lipo@control	50.4±1	0.2
Lipo@rCAP18	112.1±1	0.4

محاسبه بازده به دام‌اندازی و رهایش rCAP18 توسط لیپوزوم‌های Lipo@rCAP18

میزان به دام‌اندازی rCAP18 درون وزیکول‌های لیپوزومی (Lipo@rCAP18) محاسبه شد. برای این منظور ساختار وزیکول‌های ساخته شده از بین برده شد تا محتویات درونی آزاد شود. غلظت پپتیدهای آزاد شده به کمک معادله خط منحنی کالیبراسیون (شکل ۴) تعیین شد و در نهایت بازده به دام‌اندازی rCAP18 درون وزیکول‌های لیپوزومی معادل ۶۰ درصد بدست آمد.



شکل ۴- منحنی استاندارد برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین بر اساس تست برادفورد. جذب محلول آلبومین با غلظت‌های مختلف در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد

Figure 4- Standard curve for measuring protein concentration based on Bradford test. The absorbance of the albumin solution with different concentrations was measured at 595 nm

رهایش rCAP18 از لیپوزوم Lipo@rCAP18 در فواصل هر دو ماه یکبار اندازه‌گیری شد. میزان رهایش پپتید از درون لیپوزوم به درون بافر نگهدارنده (بافر فسفات، pH ۷/۸ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) طی دو ماه اول معادل ۲۶ درصد کل پپتید به دام افتاده بود. این مقدار طی دو ماه دوم، سوم و چهارم ثابت و حدود ۵۴ درصد کل پپتید به دام افتاده محاسبه شد.

تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد باکتری (MIC)

کمترین غلظت موثر پپتید که موجب مهار رشد باکتری به میزان ۹۰ درصد می‌شود بعنوان MIC گزارش شد. همانطور که در شکل ۵a دیده می‌شود، تفاوت معنی‌داری بین درصد زنده ماندن باکتری *E. coli* در حضور و عدم حضور rCAP18 دیده شد. درصد زنده ماندن باکتریها در حضور تیمار ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از rCAP18 ۴۰/۲ درصد تعیین شد. با افزایش غلظت پپتید به کار رفته درصد زنده ماندن باکتریها کمتر شد. بنابراین MIC و MBC برای rCAP18 آزاد علیه باکتری *E. coli* به ترتیب معادل ۱۳۵ و ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. در حالت دیگر سلول‌های باکتری *E. coli* توسط Lipo@rCAP18 تیمار شدند. بر اساس میزان rCAP18 به دام افتاده درون لیپوزوم‌ها حجمی از لیپوزوم برای تیمار باکتریایی به کار برده شد که غلظت پپتید rCAP18 درون آن معادل پپتید آزاد باشد. بر اساس نتایج بدست آمده (شکل ۵b) درصد زنده ماندن باکتری‌های تیمار شده توسط لیپوزوم که حاوی ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از rCAP18 بود، ۵۰ درصد تعیین شد. در حضور بالاترین غلظت به کار رفته (۳۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) rCAP18 محصور شده در لیپوزوم، درصد زنده ماندن باکتری *E. coli* معادل ۱۹/۷۵ درصد تعیین شد.

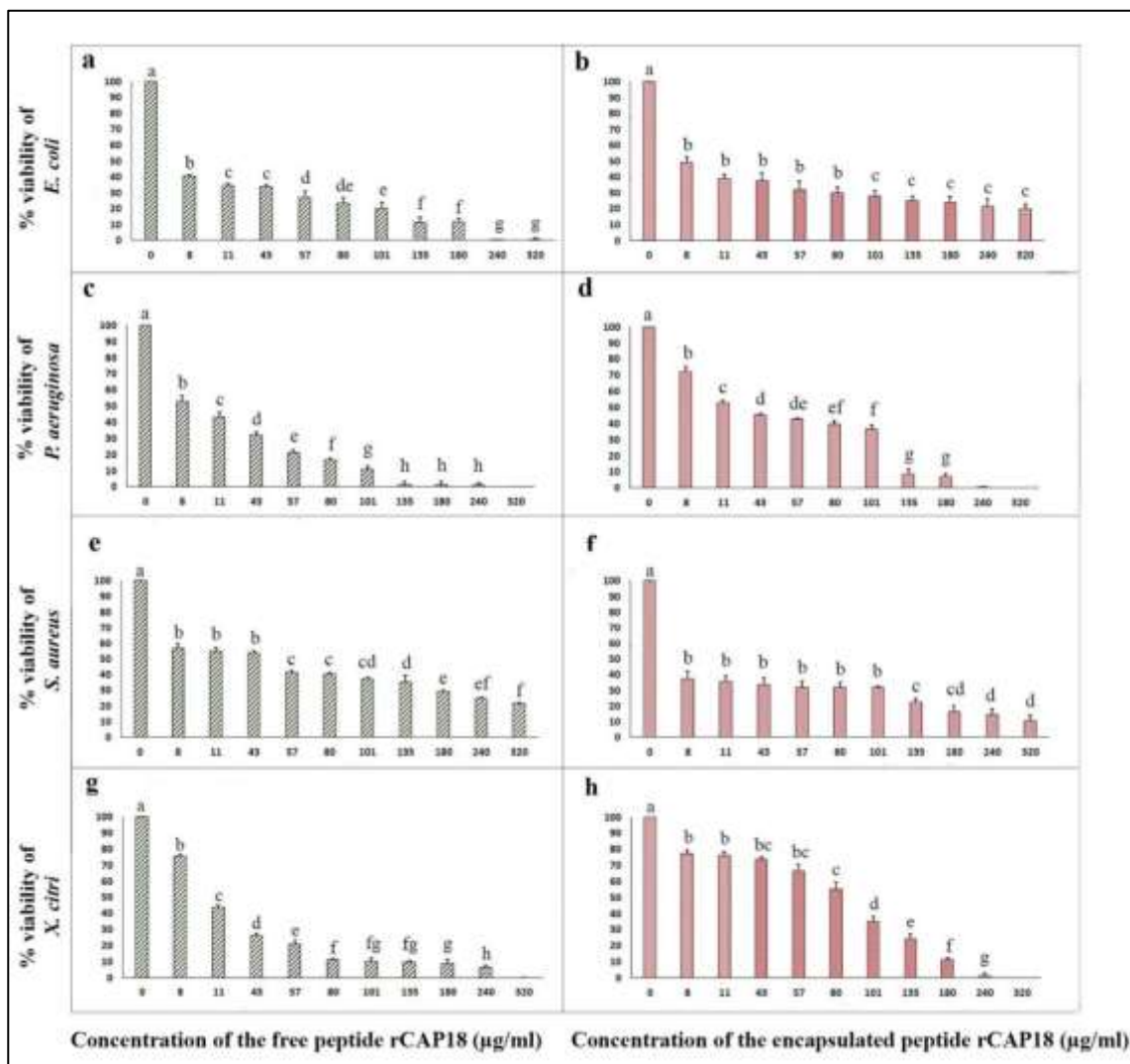
بررسی فعالیت ضد باکتریایی rCAP18 آزاد علیه باکتری‌های *P. aeruginosa* (شکل ۵c) نشان داد که با افزایش غلظت پپتید، درصد زنده ماندن سلول‌های باکتریایی کاهش یافته است. بر اساس نتایج بدست آمده پارامتر MIC و MBC پپتید rCAP18 علیه باکتری‌های *P. aeruginosa* به ترتیب معادل ۱۰۱ و ۱۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. تیمار باکتری‌ها بوسیله rCAP18 محصور در لیپوزوم‌ها (Lipo@rCAP18) نشان داد با افزایش غلظت پپتید نوترکیب درصد زنده ماندن باکتری‌های *P. aeruginosa* کاهش یافته است (شکل ۵d). بر اساس نتایج بدست آمده پارامتر MIC و MBC، Lipo@rCAP18 علیه باکتری‌های *P. aeruginosa* به ترتیب معادل ۱۳۵ و ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. سنجش فعالیت ضد باکتریایی rCAP18 علیه *S. aureus* نشان داد درصد زنده ماندن سلول‌های باکتریایی در بالاترین غلظت rCAP18 آزاد (۳۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) معادل ۲۱/۵۵ درصد بود (شکل ۵e). هنگامی که غلظت ۳۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از rCAP18 محصور شده مورد استفاده قرار گرفت درصد زنده ماندن سلول‌های باکتریایی ۱۰/۵۲ درصد تعیین شد (شکل ۵f).

علاوه بر باکتری‌های بیماری‌زای جانوری تاثیر ضد باکتریایی rCAP18 آزاد و محصور در لیپوزوم‌ها علیه باکتری بیماری‌زای گیاهی مانند *Xcc* نیز بررسی و مقایسه شد. بر اساس نتایج بدست آمده (شکل ۵g) پارامتر MIC و MBC برای rCAP18 آزاد علیه باکتری‌های

Xcc به ترتیب ۸۰ و ۳۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. عملکرد ضد باکتریایی rCAP18 محصور در لیپوزوم (Lipo@rCAP18) علیه باکتری *Xcc* بررسی و پارامتر MIC و MBC به ترتیب ۱۸۰ و ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد (شکل ۵h). نتایج بدست آمده در جدول ۲ مقایسه شده‌اند.

جدول ۲- مقایسه پارامترهای MIC و MBC مربوط به rCAP18 و Lipo@rCAP18 علیه باکتری‌های مختلف
Table 2- Comparison of MIC and MBC values for rCAP18 and Lipo@rCAP18 against various bacteria

Bacteria sp.	rCAP18		Lipo@rCAP18	
	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*
<i>Escherichia coli</i>	135	240	>320	>320
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	101	135	135	240
<i>Staphylococcus aureus</i>	>320	>320	320	>320
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	80	320	180	240



شکل ۵- تاثیر غلظت‌های مختلف rCAP18 در حالت آزاد (a, c, e, g) و محصور در لیپوزوم (b, d, f, h) بر بقای سلولی باکتری‌های *E. coli*، *P. aeruginosa*، *S. aureus* و *X. citri* subsp. *citri*؛ حروف مختلف تفاوت معنی دار بین گروه‌های تیمار شده با غلظت مختلف پپتید را بر اساس آزمون LSD (Least significant difference) نشان می‌دهد (significant difference در سطح $P \leq 0.05$ نشان می‌دهد)

Figure 5- Dose-dependent effects of free (a, c, e, g) and encapsulated rCAP18 (b, d, f, h) on *E. coli*، *P. aeruginosa*، *S. aureus*، and *X. citri* subsp. *citri* cell viability. According to the LSD (Least significant difference) test, treatments that share at least one letter in common do not exhibit statistically significant differences at $P \leq 0.05$

نتیجه‌گیری

یکی از مشکلات استفاده از ترکیبات بیولوژیک، ناپایداری آن‌ها در محیط‌های آزمایشگاهی است. محصور کردن آن‌ها در وزیکول‌های ساخته شده یکی از روش‌های پایدارسازی ترکیبات فعال به شمار می‌رود. از این وزیکول‌ها می‌توان به نانولیپوزوم‌ها، میکروسفرها، نانوسفرها، نیوزوم‌ها، ارکوزوم‌ها و نانوذرات لیپیدی جامد اشاره کرد که می‌توانند به طور موثر در انتقال ترکیبات بیولوژیک مورد استفاده قرار بگیرند [36]، [37].

از آنجا که ساختار لیپوزوم‌ها، مشابه غشاهای بیولوژیکی است. می‌تواند به آسانی به میکروبی‌های پاتوژن الحاق گردد و با آنها تعامل نشان دهد. بنابراین این ساختارها به عنوان پرکاربردترین حامل برای داروهای ضد میکروبی مطرح می‌شوند و جهت مصارف پزشکی و آرایشی به یک محصول امن و کارآمد تبدیل شده‌اند. بعلاوه، کپسوله کردن ترکیبات ضد میکروبی درون لیپوزوم‌ها موجب حفظ پایداری و اثربخشی بیشتر آن می‌شود [38]. تعدادی از پپتیدهای ضد باکتریایی علیرغم داشتن خواص ضد باکتری، ضد ویروسی، ضد قارچی دارای نیمه عمر کوتاه و یا حساسیت پروتئازی هستند که موجب محدودیت در استفاده از آن‌ها می‌شود [39].

CAP18 متعلق به خرگوش (*O. cuniculus*) یک پپتید ضد باکتریایی کاتیونی با وزن مولکولی ۱۸ کیلودالتون است. این پپتید حاوی ۲۹ اسید آمینه در ناحیه سیگنال و ۱۴۲ اسید آمینه در زنجیره اصلی است. CAP18 یک پپتید مقاوم در برابر حرارت بدون اثرات سیتوتوکسیک و همولیتیک است [29]. در بدن خرگوش این پپتید در سلول‌های نوتروفیل بیان می‌شود، به لیپوپلی ساکارید (LPs) متصل می‌شود و غشای میکروارگانیسم‌ها را هدف قرار می‌دهد [30].

در مطالعه ما در سال ۲۰۲۲ بیان نوترکیب این پپتید ترشخی توسط مخمر پیکیا پاستوریس تایید شد [31]. در مطالعه حاضر پس از تولید پپتید نوترکیب rCAP18 توسط *P. pastoris* و تخلیص آن، مهار رشد باکتری‌های مختلف در حضور آن ارزیابی شد. جهت حفظ پایداری ساختار پپتید و حفظ عملکرد آن، محصور شدن آن در لیپوزوم انجام شد. میزان به‌دام‌اندازی پپتیدهای rCAP18 در لیپوزوم معادل ۶۰ درصد تعیین شد. با توجه به مطالعه انجام شده در سال ۲۰۰۳ توسط Were و همکارانش مشخص شد که غلظت ترکیبات به دام افتاده در لیپوزوم‌ها به نوع ترکیبات لیپیدی به کار رفته و برهمکنش‌های الکترواستاتیک و آبگریز بین پپتیدهای ضد باکتریایی و فسفولیپیدها مرتبط است [40]. مطالعاتی که بر روی پپتید کاتیونی نایسین (۳/۵ kDa) انجام شد، نشان داد که پپتید ضد میکروبی نایسین با توجه به اندازه کوچکی که دارد می‌تواند در فاز آبی داخل لیپوزوم محصور شود و یا اینکه در غشاهای لیپوزوم تثبیت گردد [41]. راندمان به دام افتادن نایسین معمولاً در لیپوزوم‌های ساخته شده از فسفولیپیدهای خنثی مانند فسفاتیدیل کولین (PC) در مقایسه با لیپوزوم‌های حاوی لیپیدهای آنیونی مانند فسفاتیدیل گلیسرول (PG) بالاتر گزارش شده است [40]، [42]. مطالعه انجام شده توسط Laridi و همکارانش (۲۰۰۳) که بر روی کپسولاسیون نایسین انجام شده بود، نشان داد که هر چه میزان بار منفی فسفولیپید سازنده لیپوزوم کمتر باشد بازده به دام‌اندازی بیشتر می‌شود. بر این اساس بالاترین راندمان کپسوله سازی نایسین (۳۴/۶ درصد) در لیپوزوم‌هایی که دارای فسفاتیدیل اینوزیتول کمتر (۱ درصد از کل محتوای فسفولیپید) و فسفاتیدیل کولین بیشتر (۸۵ درصد از کل محتوای فسفولیپید) بودند دیده شد [41]. از آنجایی که لیپوزوم‌های دارای PC خواص تک‌لایه‌های بدون بار را در مقادیر pH نزدیک به خنثی نشان می‌دهند، احتمالاً برهمکنش‌های الکترواستاتیکی با پپتیدها حذف می‌شوند. بنابراین، ورود پپتیدها درون وزیکول‌های PC احتمالاً به دلیل فعل و انفعالات آبگریز اتفاق می‌افتد [40]، [43]. آزاد سازی پپتید از درون لیپوزوم نیز به ترکیبات سازنده و نوع پپتید آنتی باکتریال بستگی دارد. به طور مثال مشخص شد که C-ترمینال نایسین که شامل بخش عمده ای از بار مثبت در مولکول نایسین است، واسطه برهمکنش‌های الکترواستاتیک نایسین با غشاهای می‌باشد که بر میزان رهایش پپتید از درون لیپوزوم تأثیر دارد [44]. در یک غشاء طبیعی برهمکنش‌های الکترواستاتیکی به عنوان گام اولیه برای رویدادهای بعدی که منجر به تشکیل منافذ غشایی می‌شود، در نظر گرفته می‌شود [44]، [45]. مطالعات Were در سال ۲۰۰۳ نشان داد که در لیپوزوم‌های دارای فسفاتیدیل گلیسرول (PG)، اتصال نایسین به گروه‌های دارای بار منفی در سر فسفولیپیدها منجر به تشکیل منافذ ناپایدار روی لیپوزوم‌ها می‌شود که بر میزان آزادسازی پپتید اثر می‌گذارد [38].

در مطالعه حاضر میزان رهائش rCAP18 از لیپوزوم حاوی PC پس از ۸ ماه حدود ۵۴ درصد تعیین شد. بنابراین این احتمال وجود دارد که برهمکنش کم بین پپتید rCAP18 و PC بعنوان فسفولیپید خنثی در ساختار لیپوزوم، موجب رهائش آهسته پپتید از درون لیپوزوم شده است. این نتیجه هم راستا با نتایج Taylor و همکارانش است که نشان دادند ترکیب فسفولیپیدهای سازنده لیپوزومها نقش حیاتی در روند آزاد سازی پپتیدهای کاتیونی دارد. لیپوزومهای ساخته شده توسط PC که حاوی ۵ تا ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر نایسین بودند کندترین آزادسازی پپتید ضد میکروبی را نشان دادند، در حالی که لیپوزومهای حاوی PG محتویات خود را بسیار سریع آزاد کردند [42].

مقایسه عملکرد rCAP18 آزاد و محصور در لیپوزوم در مهار رشد باکتری‌ها نشان داد که rCAP18 آزاد در زمان یکسان تاثیر بیشتری در مهار رشد باکتری داشته است. این پدیده می تواند ناشی از رهائش آهسته پپتید نو ترکیب از درون لیپوزوم باشد. با توجه به اینکه مکانیسم برهمکنش بین لیپوزومها و باکتری‌ها شامل همجوشی غشا است [46]، [47]، بایستی این احتمال را نیز در نظر گرفت که ممکن است برهمکنش کمتری بین لیپوزوم با غشا باکتری‌ها بویژه باکتری‌های گرم مثبت ایجاد شده است که نیاز به بررسی بیشتر دارد.

سنجش اندازه لیپوزومها نشان داد که بارگیری rCAP18 درون لیپوزومها موجب افزایش اندازه لیپوزوم به میزان دو برابر شده است. Taylor و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که کپسوله کردن ۵ میلی گرم بر میلی لیتر نایسین در لیپوزومهای حاوی PC منجر به افزایش اندازه وزیکولها شد. در مطالعه آنها، اندازه وزیکول دارای پپتید نایسین ۳۱۰ نانومتر بود که در مقایسه با لیپوزومهای خالی (به طور متوسط ۱۰۳ نانومتر) بزرگتر بود [48]. افزایش اندازه لیپوزوم حاوی نایسین در مطالعات Were و همکارانش نیز تایید شد [38].

بررسی مورفولوژی لیپوزوم حاوی rCAP18 توسط TEM، نشان داد که در حضور پپتید آنتی باکتریال غشا دفورمه نشده و شکل کروی خود را حفظ کرده است. مطالعات انجام شده بر روی لیپوزومهای حاوی نایسین نشان داد که پپتیدهای ضد میکروبی می توانند هم در فاز آبی و هم در فاز چربی لیپوزومها وارد شود. بنابراین می توانند هم در کوتاه مدت (با آزادسازی نایسین کپسوله شده در مرکز لیپوزوم) و هم در دراز مدت (با آزاد سازی نایسین تثبیت شده در غشاء) اثرات ضد باکتریایی ایجاد کند [41]، [42].

محدودیت اصلی برای به دام افتادن پپتیدهای ضد باکتریایی در لیپوزومها، پتانسیل ذاتی این پپتیدها برای تعامل با غشاهای لیپوزومی و ایجاد اختلال در آنها است. با این حال، لیپوزومهای حاوی پپتیدهای ضد باکتریایی می توانند بعنوان ابزار قدرتمندی برای حفظ عملکرد و نگهداری پپتیدهای فعال به کار روند. همچنین توجه به استفاده از منابع مقرون به صرفه تر فسفولیپیدها، مانند فسفاتیدیل کولین برای تولید لیپوزومهای حاوی پپتید می تواند در تجاری سازی آنها نقش مهمی ایفا کند.

اعلام تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ تضاد منافع مرتبط با نگارش و یا انتشار این مقاله ندارند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی با شماره گرنت ۹۰۰/۱۰۶ در دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است.

منابع

- [1] Sulis, G., Sayood, S., Katukoori, S., Bollam, N., George, I., Yaeger, L. H., Chavez, M. A., Tetteh, E., Yarrabelli, S., Pulcini, C., & Harbarth, S. (2022). Exposure to WHO AWaRe antibiotics and isolation of multi-drug resistant bacteria: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 28 (9), 1193-1202.
- [2] Cantor, S., Vargas, L., Rojas A, O. E., Yarcce, C. J., Salamanca, C. H., & Oñate-Garzon, J. (2019). Evaluation of the Antimicrobial Activity of Cationic Peptides Loaded in Surface-Modified Nanoliposomes against Foodborne Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (3), 680.
- [3] Ciumac, D., Gong, H., Hu, X., & Lu, J. R. (2019). Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of colloid and interface science*, 537, 163-185.

- [4] Sato, H., & Feix, J. B. (2006). Peptide–membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758, 1245-1256.
- [5] Szymczak, P., Mozejko, M., Grzegorzec, T., Jurczak, R., Bauer, M., Neubauer, D., Sikora, K., Michalski, M., Sroka, J., Setny, P., Kamysz, W., Szczurek, E. (2023). Discovering highly potent antimicrobial peptides with deep generative model HydrAMP. *Nature Communications*, 14, 1453.
- [6] Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H., & Tan, W. L. (2015). Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*, 8, 711-757.
- [7] Kelly L, B., & Hancock, R. E. W. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current opinion in immunology*, 18, 24-30.
- [8] Sahoo, A., Swain, S. S., Behera, A., Sahoo, G., Mahapatra, P. K., & Panda, S. K. (2021). Antimicrobial peptides derived from insects offer a novel therapeutic option to combat biofilm: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10, 661195.
- [9] Simons, A., Alhanout, K., & Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*, 8 (5), 639.
- [10] Liu, J., Huang, R., Song, Q., Xiong, H., Ma, J., Xia, R., & Qiao, J. (2021). Combinational antibacterial activity of nisin and 3-phenyllactic acid and their co-production by engineered *Lactococcus lactis*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612105.
- [11] Wu, M., Ma, Y., Dou, X., Aslam, M. Z., Liu, Y., Xia, X., Yang, S., Wang, X., Qin, X., Hirata, T., & Dong, Q. (2023). A review of potential antibacterial activities of nisin against *Listeria monocytogenes*: the combined use of nisin shows more advantages than single use. *Food Research International*, 164, 112363.
- [12] Chen, N., Jiang, C. (2023). Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 255, 115377.
- [13] Narsaiah, K., Jha, S., Wilson, R. A., Mandge, H., Manikantan, M., & Malik, R. (2013). Pediocin-loaded nanoliposomes and hybrid alginate–nanoliposome delivery systems for slow release of pediocin. *Bionanoscience*, 3, 37–42.
- [14] Alipour, M., Halwani, M., Omri, A., & Suntres, Z. E. (2008). Antimicrobial effectiveness of liposomal polymyxin B against resistant Gram-negative bacterial strains. *International Journal of Pharmaceutics*, 355 (1-2), 293-298.
- [15] Mosquera, M., Gimenez, B., Da Silva, I. M., Boelter, J. F., Montero, P., Gómez-Guillen, M. C., & Brandelli, A. (2014). Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food Chemistry*, 156, 144-150.
- [16] Ron-Doitch, S., Sawodny, B., Kühbacher, A., David, M. M. N., Samanta, A., Phopase, J., Burger-Kentscher, A., Griffith, M., Golomb, G., & Rupp, S. (2016). Reduced cytotoxicity and enhanced bioactivity of cationic antimicrobial peptides liposomes in cell cultures and 3D epidermis model against HSV. *Journal of Controlled Release*, 229, 163-171.
- [17] Jesorka, A., & Orwar, O. (2008). Liposomes: technologies and analytical applications. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1, 801-832.
- [18] Mozafari, M. R., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. (2008a). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18, 309e327.
- [19] Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., Pardakhty, A., & Yurdugul, S. (2008b). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11 (4), 833-844.
- [20] Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2005a). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 587-605.
- [21] Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2005b). Ultrasonic spectroscopy and differential scanning calorimetry of liposomal-encapsulated nisin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (22), 8722-8728.
- [22] da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., & Brandelli, A. (2010). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 21 (6), 284-292.
- [23] Gomaa, A. I., Martinent, C., Hammami, R., Fliss, I., & Subirade, M. (2017). Dual Coating of Liposomes as Encapsulating Matrix of Antimicrobial Peptides: Development and Characterization. *Frontiers in Chemistry*, 5, 00103.
- [24] Millette, M., Le Tien, C., Smoragiewicz, W., & Lacroix, M. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control*, 18 (7), 878-884.
- [25] Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H. G., & Gudmundsson, G. H. (1995). FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92 (1), 195-199.
- [26] Gennaro, R., Skerlavaj, B., & Romeo, D. (1989). Purification, composition, and activity of two bacteriocins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infection and immunity*, 57 (10), 3142-3146.
- [27] Storici, P., & Zanetti, M. (1993). A cDNA derived from pig bone marrow cells predicts a sequence identical to the intestinal antibacterial peptide PR-39. *Biochemical and biophysical research communications*, 196 (3), 1058-1065.
- [28] Zhao, C., Nguyen, T., Boo, L. M., Hong, T., Espiritu, C., Orlov, D., Wang, W., Waring, A., & Lehrer, R. I. (2001). RL-37, an α -helical antimicrobial peptide of the rhesus monkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (10), 2695-2702.
- [29] Larrick, J. W., Morgan, J. G., Palings, I., Hirata, M., & Yen, M. H. (1991). Complementary DNA sequence of rabbit CAP18—a unique lipopolysaccharide binding protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 179 (1), 170-175.
- [30] Larrick, J. W., Hirata, M., Zheng, H., Zhong, J., Bolin, D., Cavaillon, J. M., Warren, H. S., & Wright, S. C. (1994). A novel granulocyte-derived peptide with lipopolysaccharide-neutralizing activity. *Journal of immunology* 152 (1), 231-240.
- [31] Nikpoor, M., Lohrasbi-Nejad, A., & Zolala, J. (2022). Heterologous Expression and Functional Characterization of CAP18 from *Oryctolagus Cuniculus*. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 10 (4), 622-632.
- [32] Habibollahi, F., Hosseinipour, A., & Lohrasbi-Nejad, A. (2022). Antibacterial activity of the CAP18 peptide against *Xanthomonas citri* sp. *citri*, the causative agent of citrus canker, as evaluated by in vitro and in silico studies. *Annals of Applied Biology*, 181 (1), 93-106.

- [33] Rashidinejad, A., Birch, E. J., Sun-Waterhouse, D., & W., E. D. (2016). Effect of liposomal encapsulation on the recovery and antioxidant properties of green tea catechins incorporated into a hard low-fat cheese following in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food and bioproducts processing*, 100, 238-245.
- [34] Ishii, F., & Yoshihide, N. (2001). Simple and convenient method for estimation of marker entrapped in liposomes. *Journal of dispersion science and technology*, 22, 97-101.
- [35] CLSI. (2018). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th ed. CLSI standard M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [36] Eroglu, İ., & İbrahim, M. (2020). Liposome-ligand conjugates: a review on the current state of art. *Journal of Drug Targeting*, 28 (3), 225-244.
- [37] Patel, V. (2020). Liposome: A novel carrier for targeting drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 8, 67-76.
- [38] Sozer, N., & Kokini, J. L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in biotechnology*, 27, 82-89.
- [39] Pinilla, C. M. B., & Brandelli, A. (2016). Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. *Innovative food science & emerging technologies*, 36, 287-293.
- [40] Were, L. M., Bruce, B. D., Davidson, M., & Weiss, J. (2003). Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipids nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 8073e8079.
- [41] Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. O., Vuilleumard, J. C., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 13 (4), 325-336.
- [42] Taylor, T. M., Bruce, B. D., Weiss, J., & Davidson, P. M. (2008). *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition in vitro by liposome-encapsulated nisin and ethylene diaminetetraacetic acid. *Journal of Food Safety*, 28, 183e197.
- [43] Teixeira, M. L., Santos, J., Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2008). Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria Monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9 (1), 49-53.
- [44] Breukink, E., & de Kruijff, B. (1999). The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462, 223-234.
- [45] Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16 (9), 1058-1071.
- [46] Mugabe, C., Halwani, M., Azghani, A. O., Lafrenie, R. M., & Omri, A. (2006). Mechanism of enhanced activity of liposome-entrapped aminoglycosides against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (6), 2016-2022.
- [47] Colas, J. C., Shi, W., Rao, V. S. N. M., Omri, A., Mozafari, M. R., & Singh, H. (2007). Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 38, 841-847.
- [48] Taylor, T. M., Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2007). Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by z-potential, vesicle size, and encapsulation efficiency. *Food Biophysics*, 2, 1-9.