دانشکده علوم
گروه شیمی

پایان‌نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد بیوشیمی

عنوان :

استخراج و خالص‌سازی پپتیدهای ضد میکروبی از ترشحات پوستی قورباغه مردابی (*Rana ridibunda*) بومی استان خراسان رضوی

استاد راهنما:

دکتر احمد آسوده

استاد مشاور:

دکتر جمشیدخان چمنی

نگارش:

هادی زارع زردینی

زمستان۸۹

فصل اول: مقدمه

۱-۱ پپتید ۱

۱-۲ تقسیم بندی پپتیدها بر اساس عملکرد ۲

۱-۲-۱ پپتیدهای تنظیم کننده سیستم ایمني ۲

۱-۲-۲ پپتیدهای تنظیم کننده سلولي ۲

۱-۲-۳ پپتیدهای آنتي ترومبوتيك ۲

۱-۲-٤ پپتید هاي آنتي اکسیدانت ۳

۱-۲-٥ پپتیدهای ضد میکروبي ۳

۱-۲-۵-۱ استفاده از پپتیدهاي ضد میکروبی در علوم پزشكي ٤

۱-۲-۵-۲ استفاده از پپتیدهاي ضد میکروبی در صنایع غذایي ٤

۱-۲-۵-۳ کاربرد پپتیدهاي ضد میکروبی در بیوتکنولوژي ٥

۱-۳ ساختار پپتیدهاي ضد میکروبي ٦

۱-٤ نحوه عملکرد پپتیدهاي ضد میکروبی بر روی پاتوژن‌های مختلف ۱۳

۱-٤-۱ نحوه عملکرد پپتیدهاي ضد میکروبی بر روي باکتری‌ها ۱۳

۱-٤-۱-۱ مدل تخریب کننده غشایي ۱۳

۱-٤-۱-۲ مدل تخریب کننده غیر غشایي: اهداف درون سلولي ۱٦

۱-٤-۲ نحوه عملکرد پپتیدها بر روي قارچ‌ها ۱۸

۱-٤-۳ نحوه عملکرد پپتیدها بر روي ویروس‌ها ۱۹

۱-٤-۳-۱ مسدود کردن ورود ویروس از طریق میان کنش با هپاران سولفات ۱۹

۱-٤-۳-۲ جلوگیري از پخش ویروس بین سلول‌ها ۱۹

۱-٤-۳-۳ جلوگیري از ورود ویروس از طریق میان کنش با گلیکوپروتئینهاي ویروسي ۱۹

۱-٥ بررسی پپتیدهاي ضد میکروبی بدست آمده از رده‌های مختلف جانوري ۲۰

۱-٥-۱ پپتیدهاي ضد میکروبی و باکتری‌ها ۲۰

۱-٥-۲ پپتیدهاي ضد میکروبی و ویروس‌ها ۲۱

۱-٥-۳ پپتیدهاي ضد میکروبی و حشرات ۲۱

۱-٥-٤ پپتیدهاي ضد میکروبی و گیاهان ۲٤

۱-٥-٥ پپتیدهاي ضد میکروبی و منابع دریایي ۲٥

۱-۵-۵-۱ پپتيدهاي ضد ميكروبی بدست آمده از ماهی‌ها ۲۵
۱-۵-۵-۲ پپتيدهاي ضد ميكروبی بدست آمده از سخت پوستان ۲۶
۱-۵-۵-۳ پپتيدهاي ضد ميكروبی بدست آمده از نرم تنان ۲۶
۱-۵-۶ پپتيدهاي ضد ميكروبی و پستانداران ۲۶
۱-۵-۶-۱ ديفنسين هاي پستانداران ۲۶
۱-۵-۶-۲ Cathelecidins ۲۷
۱-۶ پپتيدهاي سنتزي ۲۹
۱-۷ پپتيدهاي ضد ميكروبی و دوزيستان ۳۰
۱-۸ قورباغه مردابی ۳۵
۱-۹ ضرورت پروژه ۳۷
۱-۱۰ هدف ٤۰

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد مورد نياز ٤۲
۲-۲ محلول‌های مورد نياز ٤٤
۲-۲-۱ بافر فسفات برای شستشوي عصاره پوستي قورباغه بعد از تحريك ٤٤
۲-۲-۲ محلول‌های ژل SDS-PAGE - الكتروفورز ٤٤
۲-۲-۳ محلول‌های ژل الكتروفورز اوره ٤٥
۲-۲-٤ محلول‌های لازم برای كروماتوگرافي مايع با كارايي بالا (HPLC) ٤٦
۲-۲-۵ محلول‌های لازم برای سنجش‌های ميكروبی پپتيدها ٤٦
۲-۳ روش ٤۷
۲-۳ -۱ نمونه گيري ٤۷
۲-۳-۲ عصاره گيري از قورباغه ٤۹
۲-۳-۳ تغليظ ترشحات پوستي ٤۹
۲-۳-٤ خشك كردن نمونه‌ها ۵۰
۲-۳-۵ بررسي الگوي الكتروفورز ۵۱
۲-۳-۵-۱ الكتروفورز با روش SDS-PAGE ۵۱
۲-۳-۵-۲ الكتروفورز ژل اوره ۵۵
۲-۳-۶ كروماتوگرافي مايع با كارايي بالا ۵۷
۲-۳-۶-۱ خالص سازي اوليه نمونه‌ها با استفاده از كروماتوگرافی با كارايی بالا ۵۸

۲-۳-٦-۲ خالص سازي نهايي نمونه‌ها ٦٠

۲-۳-۷ سنجش فعاليت ضد ميكروبي ٦٢

۲-۳-۷-۱-روش سنجش نشر شعاعي ٦٢

۲-۳-۸ تعيين توالي ٦٤

۲-۳-۹ تعیین جایگاه فیلوژنتیکی پپتیدها ٦٤

۲-۳-۱۰ پیش بینی ساختار پپتیدها ٦٥

۲-۳-۱۱ تعیین MIC ٦٥

۲-۳-۱۱-۱ - ساخت سريال غلظتي از پپتيدها ٦٥

۲-۳-۱۱-۲ روش كار ٦٦

۲-۳-۱۲ سنجش همولیز ٦٨

۲-۳-۱۲-۱ تهیه گلبول‌های قرمز خون ٦٨

۲-۳-۱۲-۲ روش سنجش ٦٨

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱ جمع آوري ترشحات پوستي ۷۰

۳-۲ نتایج مولکولی ۷۰

۳-۲-۱ الکتروفورز SDS-PAGE ۷۰

۳-۲-۲ الکتروفورز اوره ۷۲

۳-۳ RP-HPLC ۷۳

۳-۳-۱ خالص سازي اوليه نمونه‌ها با استفاده از کروماتوگرافی با کارایی بالا ۷۳

۳-۳-۲ خالص سازي نهايي نمونه‌ها ۷۴

۳-٤ گزینش پیک‌های مناسب ۷۷

۳- ٥ تعيين توالي ۷۹

۳- ٦ پیش بینی ساختار پپتیدها ۸۱

۳-۷ اطلاعات ساختاري، هم رديفي و رسم درخت فيلوژنتيكی ۸۳

۳-۸ سنجش‌های میکروبي ۸٦

۳-۸-۱ عصاره خام و عصاره ۱-۱۰ کیلو دالتون ۸٦

۳-۸-۲ نتايج ميكروبي پپتيدهاي خالص ۸۷

۳-۹ تعیین MIC ۹۱

۳-۱۰ سنجش همولیز ۹٥

۳-۱۰-۱ روش سنجش نشر شعاعي ۹۵
۳-۱۰-۲ روش سنجش بر مبناي جذب ۹۶
۳-۱۱ بحث ۹۸
۳-۱۲ پيشنهادات ۱۰۳
فصل چهارم: منابع ومأخذ ۱۰۴

فهرست اشکال

شکل ۱-۱- انواعی از ساختارهای پپتیدهای ضد میکروبی.. ۱۲

شکل ۱-۲- مدل فرشی ۱۴

شکل ۱-۳- مدل barrel-stave. ۱۵

شکل ۱-۴- مدل toroidal. ۱۶

شکل ۱-۵- اهداف درون سلولی پپتیدهای ضد میکروبی. ۱۷

شکل ۱-۶- مسیرهای سیگنال دهی IMDو Toll در حشرات. ۲۳

شکل ۱-۷- ساختارهای متفاوت در پپتیدهای ضدمیکروبی حشرات. ۲۴

شکل ۱-۸- ساختار Cathelecidins. ۲۸

شکل ۱-۹- اثر پپتید ضد میکروبی درماسپتین بر روی اسپرم. ۳۳

شکل ۱-۱۰- مهار تحرک اسپرم‌های موش توسط ماگائینین-A.. ۳۳

شکل ۱-۱۱- قورباغه مردابی (*Rana ridibunda*) ۳۶

شکل ۱-۱۲- پراکنش قورباغه مردابی در ایران ۳۶

شکل ۱-۱۳- انواع روش‌های مورد استفاده توسط باکتری برای مقاومت در برابر عملکرد آنتی‌بیوتیک‌ها. ۳۸

شکل ۱-۱۴- سرعت مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم در فاصله سال‌های ۲۰۰۴-۱۹۹۵ ۳۹

شکل ۲-۱- موقعیت جغرافیایی سد طرق(منطقه جمع‌آوری قورباغه مردابی) ۴۸

شکل ۲-۲- شکل شماتیک میان کنش پپتیدها (A) و پروتئین‌ها (B) با ستون‌های RP-HPLC ۵۸

شکل ۲-۳- شکل شماتیک ساخت سریال غلظتی از پپتید. ۶۶

شکل ۲-۴- نحوه تزریق نمونه‌ها روی پلیت ۹۶ خانه‌ای برای بررسی و تعیین MIC. ۶۵

شکل ۳-۱- الگوی الکتروفورزی عصاره خام روی ژل SDS-PAGE ۷۱

شکل ۳-۲- الگوی الکتروفورزی عصاره خام روی ژل اوره. ۷۲

شکل ۳-۳- نمودار مربوط به تزریق اولیه نمونه روی ستون RP-HPLC ۷۳

شکل ۳-۴- کروماتوگرافی مجدد پیک‌های ۱۲،۱۱ و ۱۴ ..... ۷۴

شکل ۳-۵- کروماتوگرافی مجدد پیک‌های ۲۵، ۲۶ و ۲۷. ..... ۷۵

شکل ۳-۶- کروماتوگرافی مجدد پیک‌های ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳ و ۲۴..... ۷۵

شکل ۳-۷- کروماتوگرافی مجدد پیک ۲۰ بدست آمده از تزریق دوم نمونه روی ستون فاز معکوس ۷۶

شکل ۳-۸- کروماتوگرافی مجدد پیک ۲۲ ..... ۷۶

شکل ۳-۹- کروماتوگرافی مجدد پیک ۲۳. ..... ۷۷

شکل ۳-۱۰- پیک‌های فعال از لحاظ اثر ضد میکروبی روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ۷۹

شکل ۳-۱۱- آنالیز اسپکترومتری جرمی پیک ۲۰ و ۲۷ با استفاده از روش MS-MS ۸۰

شکل ۳-۱۲- چرخ توزیع ادمنسون آمینواسیدهای پپتید R27در ساختار مارپیچ آلفا..... ۸۲

شکل ۳-۱۳- چرخ توزیع ادمنسون آمینواسیدهای پپتید R20در ساختار مارپیچ آلفا ۸۲

شکل ۳-۱۴- هم ردیفی دو پپتید R20 و R27 با ۱۱ و رسم درخت فیلوژنتیکی پپتیدهای R20 و R27 ..... ۸۵

شکل ۳-۱۵- اثرات ضد میکروبی عصاره خام و عصاره تغلیظ شده روی باکتری *باسیلوس سرئوس*..... ۸۶
شکل ۳-۱۶- اثرات ضد میکروبی پیک‌های ۷، ۱۱ و ۱۴ روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس آرئوس*. ۸۸
شکل ۳-۱۷- اثرات ضد میکروبی پیک‌های ۲۰، ۲۲ و ۲۳ روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس آرئوس* ۸۸
شکل ۳-۱۸- اثرات ضد میکروبی پیک‌های ۲۷ و ۲۸ روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس آرئوس*. ۸۹
شکل ۳-۱۹- اثرات ضد میکروبی پیک‌های ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴ و ۲۶ روی باکتری گرم منفی *کلبسیلا* ۸۹
شکل ۳-۲۰- اثرات ضد میکروبی پیک‌های ۱۱، ۱۴، ۱۵، ۲۷ و ۲۸ روی باکتری گرم منفی *کلبسیلا* ۹۰
شکل ۳-۲۱- نمودار مربوط به MIC برای Temporin-Ra برای باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ۹۲
شکل ۳-۲۲- نمودار مربوط به MIC برای Temporin-Ra برای باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ۹۳
شکل ۳-۲۳- مقاومت دارویی استافیلوکوکوس آرئوس در برابر پنی‌سیلین، کانامایسین و اریترومایسن در مقایسه با اثر عصاره خام ۹۴
شکل ۳-۲۴- مقاومت دارویی استرپتوکوکوس آگالاکته در برابر پنی‌سیلین، کانامایسین و اریترومایسن در مقایسه با اثر عصاره خام ۹۴
شکل ۳-۲۵- سنجش همولیزپپتید Temporin-Ra برای سلول‌های خونی انسان ۹۵
شکل ۳-۲۶- سنجش همولیزپپتید Temporin-Rb برای سلول‌های خونی انسان ۹۶
شکل ۳-۲۷- سنجش همولیز پپتید Temporin-Ra برای سلول‌های خونی انسان ۹۷
شکل ۳-۲۸- سنجش همولیز پپتید Temporin-Rb برای سلول‌های خونی انسان. ۹۷

فهرست جداول

جدول ۱-۱- درصد ساختارهای مختلف در ۱۶۱۸ پپتید ضد میکروبی ۶

جدول ۱-۲- درصد آمینواسیدهای مختلف در ساختار ۱۶۱۸ پپتید ضد میکروبی ۷

جدول ۱-۳ نمونه‌ای از پپتیدهای ضد میکروبی با ساختار مارپیچ آلفا ۸

جدول ۱-۴- نمونه‌ای از پپتیدهای ضد میکروبی با ساختار صفحات β ۱۰

جدول ۱-۵- نمونه‌ای از پپتیدهای ضد میکروبی با ساختار پیچه نامنظم ۱۱

جدول ۱-۶- نمونه‌ای از پپتیدهای ضد میکروبی با ماکروسیکلیک ۱۱

جدول ۱-۷- انواع مدل‌های عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی در کشتن باکتری‌ها ۱۸

جدول ۱-۸- نمونه‌ای از پپتیدهای ضد میکروبی در حشرات ۲۲

جدول ۱-۹- طبقه بندی پپتیدهای ضد میکروبی Cathelecidin در پستانداران ۲۸

جدول ۱-۱۰- پپتیدهای ضد میکروبی با اثرات متفاوت بیولوژیکی استخراج شده از ترشحات پوستی قورباغه و وزغ ۳۴

جدول ۱-۱۱- جایگاه قورباغه مردابی در رده بندی جانوری ۳۶

جدول ۲-۱- لیست مواد مورد نیاز ۴۲

جدول ۲-۲- درصد مواد سازنده ژل SDS-PAGE ۵۲

جدول ۲-۳- درصد مواد سازنده ژل الکتروفورز اوره ۵۵

جدول ۲-۴- روش مورد استفاده برای خالص سازی اولیه نمونه پپتیدی ۵۹

جدول ۲-۵- روش مورد استفاده برای خالص سازی کامل پیک‌های ۱۱، ۱۲ و ۱۴ ..... ۶۱

جدول ۲-۶- روش مورد استفاده برای خالص سازی کامل پیک های ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳ و ۲۴ ..... ۶۲

جدول ۳-۱- ساختار اول و وزن مولکولی پیک‌های ۲۰ و ۲۷ که توسط روش MS-MS تعیین گردیده است ۸۱

جدول ۳-۲- اطلاعات مربوط به آمینواسیدهای سازنده پپتید ۲۷ با توجه به داده پایگاه پپتیدهای ضد میکروبی ۸۳

جدول ۳-۳- اطلاعات مربوط به آمینواسیدهای سازنده پپتید ۲۰ با توجه به پایگاه اطلاعاتی پپتیدهای ضد میکروبی ۸۳

جدول ۳-۴- نتایج هومولوژی پپتیدهای ۲۷ و ۲۰ با پپتیدهای موجود در داده پایگاه پپتیدهای ضد میکروبی ۸۴

جدول ۳-۵- میزان فعالیت ضد میکروبی عصاره خام، عصاره فیلتر شده و پپتیدهای خالص در مقایسه با کانامایسین و اریترومایسین ۹۰

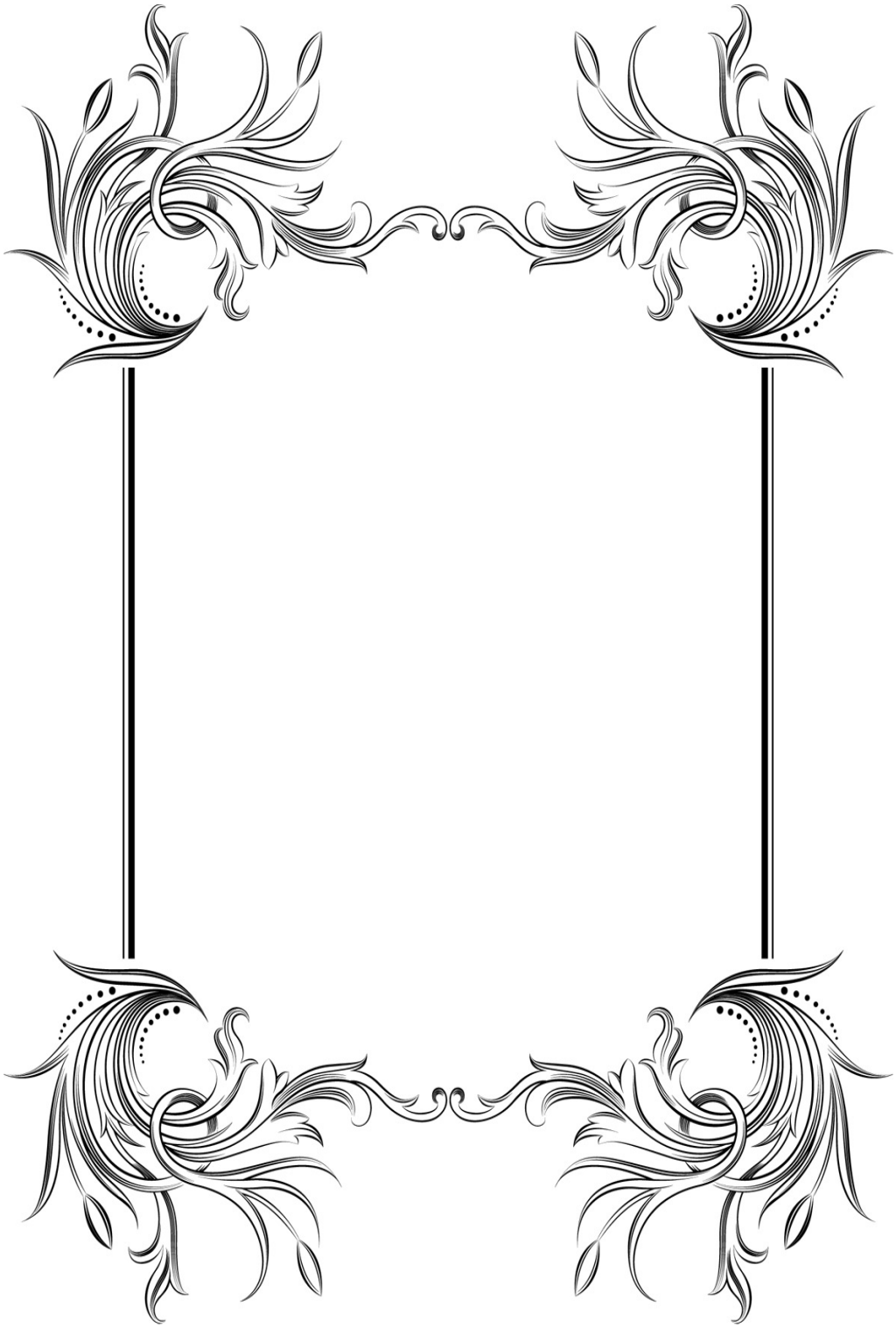
جدول ۳-۶- MIC پپتیدهای ۲۰ و ۲۷ روی انواع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ۹۱

جدول ۳-۷- مقایسه MIC پیک‌های ۲۰ و ۲۷ با برخی از پپتیدهای ضد میکروبی ۱۰۲

خلاصه

استفاده روزافزون از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان انواع بیماری‌های عفونی زمینه را برای ایجاد سویه‌های مقاوم فراهم کرده است به طوری که امروزه برخی از سویه‌های باکتریایی تحت تأثیر هیچ یک از آنتی‌بیوتیک‌های رایج امروزی قرار نمی‌گیرند؛ بنابراین امروزه باید به دنبال جایگزینی مناسب برای این ترکیبات بود تا بتوان با این مشکل مقابله کرد. در این بین مشخص شده است که ترشحات پوستی دوزیستان سرشار از ترکیباتی با ماهیت پپتیدی است که اثرات قابل توجهی علیه انواع میکروب‌ها دارند. در این تحقیق با استفاده از ترشحات پوستی قورباغه مردابی بومی خراسان سعی بر آن داریم تا پپتیدهای جدید با اثرات ضد میکروبی را جداسازی کنیم. در این مطالعه دو پپتید ضد میکروبی جدید Temporin-Ra و Temporin-Rb با استفاده از کروماتوگرافی فاز معکوس از ترشحات پوستی قورباغه مردابی (*Rana ridibunda*) خالص‌سازی و شناسایی شد. پپتیدهای جدید Temporin-Ra و Temporin-Rb به ترتیب از ۱۴ و ۱۲ اسیدآمینه ساخته شده‌اند. نتایج ما نشان داد که این دو پپتید اثر مهاری بر روی انواع باکتری گرم مثبت و گرم منفی به ویژه باکتری‌های مقاوم بیمارستانی مانند *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus agalactiae* را دارند. توالی و وزن مولکولی این دو پپتید با استفاده از اسپکتروسکوپی جرمی تعیین شد. پپتید Temporin-Ra دارای وزن مولکولی ۱۵۸۵/۱ دالتون و پپتید Temporin-Rb دارای وزن مولکولی ۱۲۴۲/۵ دالتون است. سلول‌های خونی انسان به خوبی این دو پپتید را تحمل می‌کنند به طوری که در غلظت ۶۰µg/mL پپتید Temporin-Ra ، تنها ۱/۳ درصد و پپتید Temporin-Rb ، ۱/۱ درصد همولیز نشان دادند. مقدار حداقل غلظت مهاری (MIC) این دو پپتید بسیار مناسب است و در غلظت‌های پایین خاصیت میکروب‌کشی وسیعی دارند. به دلیل فعالیت ضد میکروبی با طیف وسیع و خاصیت همولیتیک پایین، احتمالاً بتوان از این دو پپتید جدید ، در درمان عفونت های موضعی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: پپتیدهای ضد میکروبی، قورباغه مردابی، RP-HPLC، MIC، همولیز.



۱-۱ پپتید[۱]

پپتید به ترکیبی که از اتصال اسیدهای آمینه توسط پیوند پپتیدی ایجاد شده و دارای ۱۵ تا ۴۵ اسیدآمینه با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلو دالتون باشد اطلاق می‌گردد. نیمه عمر پپتیدها با توجه به نحوه عملکرد آن‌ها بسیار متفاوت است، اما عموماً از نیمه عمر پایینی برخوردار هستند. تحقیقات اخیر نشان داده است که پپتیدها در رده‌های مختلف جانداران فرایندهای زیستی بسیار مهمی را انجام می‌دهند[۱].

همان‌طور که ذکر شد اسیدهای آمینه به عنوان واحد ساختاری پپتیدها به شمار می‌آیند. اسیدهای آمینه دارای یک بخش مشترک (کربن آلفا، گروه آمین، گروه کربوکسیل و H) و یک بخش متغیر موسوم به زنجیره جانبی می‌باشند. اساس اختلاف بیست اسید آمینه از تفاوت در ساختار و خواص فیزیکوشیمیایی گروه زنجیره جانبی ناشی می‌شود.

در یک مولکول پپتید اسیدهای آمینه با پیوند پپتیدی به هم متصل شده و زنجیره‌های بدون انشعاب را تشکیل می‌دهند. اساس تشکیل پیوند به این صورت می‌باشد که با حذف عنصر آب از عوامل کربوکسیلی و آلفا آمینی دو اسید آمینه مجاور پیوند پپتیدی تشکیل می‌شود. یک زنجیره پپتیدی دارای سمت و جهت است زیرا واحدهای تشکیل دهنده آن دارای دو انتهای متفاوت می‌باشند بر اساس قرارداد انتهای آمینی به عنوان ابتدای زنجیره قرار می‌گیرد. بنابراین در تعیین توالی یک زنجیره پپتیدی انتهای آمینی به عنوان مبدأ در نظر گرفته می‌شود. به طور کلی ساختمان پپتیدها را در دو سطح می‌توان بررسی کرد که عبارتند از :

- ساختمان اولیه پپتیدها: توسط ترتیب قرار گرفتن بیست نوع اسیدآمینه مشخص می‌شود؛ بنابراین برای تعیین ساختمان اولیه پپتیدها باید تعداد، ساختمان و ترتیب همه ریشه‌های اسیدآمینه مشخص شود. ساختمان اولیه پپتیدها بر فعالیت بیولوژیکی آن‌ها مؤثر است و تغییر در هر یک از اسیدهای آمینه‌های سازنده یک پپتید می‌تواند اثرات قابل ملاحظه‌ای در عملکرد آن داشته باشد.
- ساختمان دوم: ساختمان دوم پپتیدها عمدتاً مارپیچ‌های آلفا می‌باشد. وجود ساختارهای بتا و پیچه نامنظم[۲] نیز در مورد پپتیدها به اثبات رسیده است.

لازم به ذکر است که ممکن است در ساختمان پپتیدها اسیدآمینه‌های غیر معمول نیز وجود داشته باشد. این حالت بیشتر در پپتیدهایی که توسط قارچ‌ها، باکتری‌ها و حیوانات پست‌تر سنتز می‌شود، صدق می‌کند. به عنوان مثال آنتی‌بیوتیک‌های

[۱].Peptide
[۲].Random Coil

تیروسیدین[۳] و گرامیسیدین S ترکیبات پپتیدی حلقوی هستند این ترکیبات حاوی D- فنیل‌آلانین و اورنیتین (که مشابه لیزین است) می‌باشند همچنین پپتیدهای باکتریایی نیسین، سوبتیلین و اپیدرمین دارای اسیدآمینه غیر معمول لانیتونین می‌باشند. وجود اسید آمینه‌های نوع D نیز در برخی از پپتیدهای جانوران عالی گزارش شده است که می‌توان به D- تیروزین و D-آلانین در هپتاپپتید دلتورفین در پوست قورباغه درختی آمریکای جنوبی اشاره کرد[۲].

۱-۲ تقسیم بندی پپتیدها بر اساس عملکرد

پپتیدها دارای نقش‌های زیستی متفاوتی می‌باشند بر اساس نوع عملکرد پپتیدها را به گروه‌های مختلف تقسیم بندی می‌کنند. لازم به ذکر است این گروه بندی نسبی است، چون برخی از پپتیدها واجد عملکرد چندگانه هستند و می‌توان آن‌ها را در چند گروه قرار داد. در این جا پپتیدها را بر اساس عملکردشان به ۵ گروه تقسیم کردیم. این گروه‌ها عبارتند از:

۱-۲-۱ پپتیدهای تنظیم کننده سیستم ایمنی

این پپتیدها عملکرد سیستم ایمنی را از طریق اثر بر تکثیر لنفوسیت، سنتز آنتی بادی‌ها و تنظیم سیتوکین‌هاافزایش می‌دهند. در برخی موارد مشاهده شده است که پپتیدهای تنظیم کننده سیستم ایمنی سبب کاهش واکنش‌های آلرژیک می‌شوند[۳-۴]. این پپتیدها از طریق تجزیه پروتئولیزی پروتئین‌های رژیم غذایی توسط آنزیم تریپسین در دستگاه گوارش تولید می‌شوند[۵-۶]

۱-۲-۲ پپتیدهای تنظیم کننده سلولی

پپتیدهای تنظیم کننده سلولی روی میزان دسترس پذیری سلول (یعنی تکثیر، افتراق و مرگ سلول[۴]) تأثیر می‌گذارند. از این پپتیدها می‌توان به پپتیدهای مشتق از پروتئین‌های شیر در رژیم غذایی اشاره کرد. این پپتیدها سبب راه اندازی مسیر مرگ سلولی در سلول‌های بدخیم شده و تأثیر کمی بر روی سلول‌های طبیعی دارند. بنابراین پپتیدهای تنظیم کننده سلولی نامزدهای مناسبی برای مبارزه با سلول‌های سرطانی می‌باشند[۷].

---

۳. Thirocidin
۱. Apoptosis

۱-۲-۳ پپتیدهای آنتی ترومبوتیک

این گروه از پپتیدها سبب تجمع پلاکت‌های خونی شده و اتصال فیبرینوژن به گیرنده‌های سطح پلاکت‌ها را مهار می‌کنند. منشأ این پپتیدها در بدن پروتئین κ-کازئین است. شکست کازئین با رنین سبب تولید این دسته از پپتیدها می‌شود. مشخص شده است که این پپتیدها در خون نوزادانی که تازه متولد شده‌اند بلافاصله بعد از خوردن شیر مادر به میزان زیادی تولید می‌شوند[۸].

۱-۲-۴ پپتید های آنتی اکسیدانت

این گروه از پپتیدها در کنار عوامل آنتی اکسیدانت غیر پپتیدی همانند BHT[۵] و BHA[۶] بدن را در برابر عوامل اکسیدانتی مانند رادیکال اکسیژن محافظت می‌کنند. این پپتیدها در اثر گوارش α-کازئین شیر در سیستم گوارشی ایجاد می‌شوند[۶].

۱-۲-۵ پپتیدهای ضد میکروبی

پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs[۷]) ترکیبات حفاظت شده‌ای هستند که توسط سیستم ایمنی در پاسخ به پاتوژن‌ها ساخته می‌شوند. این نوع پاسخ ایمنی در تمامی رده‌های جانوری از پروکاریوت‌ها گرفته تا انسان وجود دارد. این پپتیدها معمولاً کوتاه بوده و طیف وسیعی از فعالیت‌های ضد میکروبی را از خود نشان می‌دهند. مکانیسم ویژه‌ای که توسط این ترکیبات برای مبارزه با پاتوژن‌ها به کار می‌رود سبب شده است که میکروب‌ها به راحتی در مقابل عملکرد آن‌ها از خود مقاومت نشان ندهند.

امروزه هزاران پپتید با عملکرد ضد میکروبی کشف و گزارش شده است. این پپتیدها توسط طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها شامل پستانداران، پرندگان، دوزیستان، حشرات، سخت پوستان، ماهی‌ها، گیاهان و میکروب‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد[۹-۱۱]. برخی از این ترکیبات به طور پیوسته در بدن ساخته می‌شوند در حالی که برخی دیگر تنها زمانی که بدن مورد حمله میکروب‌ها قرار گیرد، سنتز می‌شوند. در موقع حمله میکروب‌ها سیستم دفاعی اولیه بدن ارگانیسم، سنتز این ترکیبات را تا حد بسیار زیادی افزایش می‌دهد و بر این اساس سد اولیه دفاعی بدن با کارایی بیشتری در مقابل تهاجمات خارجی عمل می‌کند [۱۲-۱۴].

---

۱. Butylated hydroxyl toluene
۲. Butylated hydroxyl anisole
۳. Antimicrobial peptides

تحقیقات نشان داده است که برخی از این پپتیدهای ضد میکروبی علاوه بر فعالیت ضد میکروبی ذاتی به صورت پیام‌های تنظیم کننده سیستم ایمنی عمل می‌کنند و از این طریق نیز در فعالیت سیستم ایمنی مؤثر می‌باشند [۱۴].

بر مبنای اطلاعات حاصل از پایگاه پپتیدهای ضد میکروبی (http://aps.unmc.edu/AP/main.php) تاکنون در حدود ۱۶۱۸ پپتید ضد میکروبی گزارش شده است. میانگین طول این پپتیدها ۳۰/۷۵ اسیدآمینه و متوسط بار خالص آن‌ها ۳/۸۱ می‌باشد. از بین این تعداد پپتید، ۱۰۱ پپتید (۶/۲۴٪) فعالیت ضد ویروسی، ۴۸۵ پپتید (۲۹/۹۷٪) فعالیت ضد قارچی،۱۲۶۱ پپتید (۷۷/۹۳٪) فعالیت ضد باکتری و ۱۰۰ پپتید (۶/۱۸٪) فعالیت ضد سرطانی دارند.

همان گونه که ذکر شد پپتیدهای ضد میکروبی بسیاری از خصوصیات مطلوب یک کلاس جدید از آنتی‌بیوتیک‌ها را دارا می‌باشند و می‌توانند مکمل درمانی آنتی‌بیوتیک‌های سنتی باشند. علاوه بر این مشخص شده است که این ترکیبات اندوتوکسین‌ها را خنثی می‌کنند. بهترین کاربرد این پپتیدها در موجودات زنده دفع میکروب‌های کشنده از سیستم داخلی بدن می‌باشد. با پیشرفت روزافزون علم، می‌توان این پپتیدها را استخراج کرد و در محیط آزمایشگاهی آن‌ها را به عنوان ترکیبات دارویی جدید در صنایع مختلف مورد استفاده قرار داد. در ذیل به برخی از این کاربردها اشاره شده است.

۱-۲-۵-۱ استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی در علوم پزشکی

پپتیدهای ضد میکروبی کاربرد بسیار وسیعی در زمینه پزشکی دارند. این ترکیبات به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های جدید بسیاری از عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های مقاوم را از بین می‌برند. مشخص شده است که عفونت‌های سیستم گوارشی، عفونت‌های قارچی، ذات‌الریه، خلط و عفونت‌های مربوط به یرقان یا زردی تحت تأثیر پپتیدهای ضد میکروبی قرار می‌گیرند و می‌توان به عنوان روش درمانی جدید معرفی کرد.

پپتیدهای ضد میکروبی امید تازه‌ای در جلوگیری از انتقال ویروس HIV هستند. در طی سال‌های اخیر چهارده پپتید مشتق از ترشحات پوستی دوزیستان بر روی این ویروس مورد مطالعه قرار گرفته است. طی این تحقیقات مشخص شده است که این پپتیدها توانایی مهار عفونت‌های ویروس ایدز را دارند. سه پپتید از این ۱۴ پپتید به طور کامل عفونت ویروس ایدز را در غلظت‌هایی که برای سلول هدف سمی نیست، مهار می‌کنند. لازم به ذکر است که این پپتیدها عفونت‌های ناشی از ویروس لوسمی موشی را نیز مهار می‌کنند. مشخص شده است که تیمار سلول‌ها با این پپتیدها از ادغام ذره ویروسی با سلول هدف جلوگیری کرده و پوشش ویروس ایدز را تخریب می‌کند. از طرفی این پپتیدها از انتقال ویروس توسط سلول‌های دندریتیک به T سل‌ها جلوگیری می‌کنند؛ بنابراین این پپتیدها امید تازه‌ای در مهار موضعی انتقال موکوزی ویروس ایدز فراهم کرده‌اند.

همچنین پپتیدهای ضد میکروبی امید تازه‌ای برای پیشگیری از سرطان می‌باشند. پپتیدهای ضدمیکروبی توانایی اتصال به مولکول‌های باردار منفی در غشای هدف را دارا می‌باشند. ترکیب غشایی سلول‌های توموری با غشای سلول‌های نرمال متفاوت است. مطالعات نشان داده است که میزان فسفاتیدیل سرین در سلول‌های ملانوما و کارسینوما نسبت به سلول‌های نرمال بیشتر است. چنین خصوصیتی به پپتیدهای ضد میکروبی کمک می‌کند تا به آسانی غشای سلول‌های سرطانی را لیز کرده و سبب مرگ آن‌ها شوند. برخی از مهم‌ترین پپتیدهای ضد سرطانی Magainins،Defensin و خانواده Cecropin می‌باشد[۱۵–۱۸].

۱-۲-۵-۲-استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی در صنایع غذایی

هدف انحصاری استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی در صنایع غذایی تولید مواد غذایی با ماندگاری طولانی است. این پپتیدها قادر به نابود کردن باکتری‌های فاسد کننده مواد غذایی می‌باشند، بنابراین وقتی به همراه مواد غذایی از قبیل گوشت خام، شیر و سایر فراورده‌های کنسروی به کار روند ماندگاری این مواد را افزایش داده و از این طریق در صرفه جویی مواد غذایی مؤثر خواهند بود. لازم به ذکر است که این پپتیدها هیچ اثر سویی روی سلامت انسان ندارند. از مهم‌ترین پپتیدهای مورد استفاده در کشتن پاتوژن‌های غذایی می‌توان به RR39، اسفنیسین[۸] و پروتامین[۹] اشاره کرد[۱۹].

۱-۲-۵-۳ کاربرد پپتیدهای ضد میکروبی در بیوتکنولوژی

پپتیدهای ضد میکروبی دارای کاربرد فراوانی در بیوتکنولوژی هستند. محصولات کشاورزی در بسیاری از موارد تحت تأثیر باکتری‌ها و ویروس‌ها قرار می‌گیرند و در این حالت میزان محصول کاهش می‌یابد. فیتوپاتوژن‌ها[۱۰] یک مشکل بزرگ در کشاورزی هستند که سالانه منجر به کاهش محصولات کشاورزی در حدود ۵۰–۳۰ میلیون دلار می‌شوند. این آلودگی‌ها همچنین باعث افزایش کارسینوژن‌ها و به خطر افتادن سلامت انسان می‌شوند. یکی از کاربردهای عمده این پپتیدها تولید گیاهان ترانسژنیک است. آفت‌کش‌ها به دلیل هزینه بالا و آلودگی‌های زیست محیطی گزینه مناسبی برای مقابله با این پاتوژن‌ها نیستند. امروزه این طور فرض شده است که تولید گیاهان ترانسژنیک که پپتیدهای ضد میکروبی را بیان می‌کنند بسیاری از این مشکلات را حل خواهد کرد. به عنوان مثال امروزه ماهی‌هایی با مهندسی ژنتیک تولید می‌شود که به میزان زیادی پپتید ضدمیکروبی تولید می‌کنند، به طوری که این ماهی‌ها تحت تأثیر عفونت‌ها قرار نمی‌گیرند. امروزه پپتیدهای ضد میکروبی که از

۱. spheniscin
۲. protamine
۳. phytopatogens

منابع طبیعی مختلف به دست آمده‌اند مهندسی شده و در محصولاتی مانند سیب زمینی، موز، گوجه فرنگی و نخودفرنگی بیان می‌شوند. چنین محصولاتی در مقایسه با محصولات معمولی مقاومت بیشتری را در مقابل میکروب‌های مهاجم نشان می‌دهند[۲۰-۲۱].

کاربرد دیگر پپتیدهای ضد میکروبی تولید اسپری‌هایی برای بیمارانی است که به فیبروز سیستیک مبتلا هستند. در این بیماری به دلیل افزایش غلظت نمک کلرید میزان عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی در شش‌ها کاهش می‌یابد و فرد بیشتر تحت تأثیر عفونت باکتری‌های فرصت طلب مانند *pseudomonas aeruginosa* قرار می‌گیرد. از طریق مهندسی ژنتیک می‌توان پپتیدهای ضد میکروبی را به گونه‌ای تغییر داد که کمتر تحت تأثیر غلظت بالای نمک قرار گیرند[۲۲].

به طور کلی پپتیدهای ضد میکروبی از تنوع بسیار فراوانی برخوردار می‌باشند. این پپتیدها دارای اثرات ضد میکروبی بسیار فراوان روی طیف وسیعی از باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها بوده و در ضمن این گروه از پپتیدها از اجزای مهم سیستم ایمنی اولیه در رده‌های مختلف جانوری هستند[۲۳-۲۴]؛ بنابراین در سال‌های اخیر بررسی و مطالعه این نوع پپتیدها بخش وسیعی از تحقیقات را به خود اختصاص داده است.

۱-۳ ساختار پپتیدهای ضد میکروبی

بر اساس ترکیب، منشأ و ساختار می‌توان پپتید های ضد میکروبی را به گروه‌های مختلف تقسیم بندی نمود. عمده‌ترین سیستم تقسیم بندی این پپتیدها بر اساس ساختار آن‌هاست که شامل ساختارهای آلفا، بتا، مخلوط آلفا و بتا، ساختارهای واجد پل دی سولفیدی و بدون ساختار می‌باشد. جداول ۱-۱ و ۱-۲ به ترتیب نشان دهنده درصد ساختارهای مختلف و درصد اسیدآمینه در ۱۶۱۸ پپتید ضد میکروبی گزارش شده می‌باشد. طبق آمار جدول، در حدود ۴۵ درصد از پپتیدهای گزارش شده فاقد ساختار مشخص هستند و بیشترین ساختار مشاهده شده در پتیدهای ضد میکروبی ساختار مارپیچی می‌باشد.

جدول ۱-۱- درصد ساختارهای مختلف در ۱۶۱۸ پپتید ضد میکروبی.

خصوصیت ساختاری	تعداد	درصد
ساختار مارپیچی[۱۱]	۲۵۱	۱۵/۵۱
ساختارβ[۱۲]	۸۲	۵/۰۶
ساختار مارپیچαوβ[۱۳]	۵۲	۳/۲۱
غنی از اسیدهای آمینه‌های غیرمعمول	۱۱۶	۷/۱۶
دارای پل‌های دی سولفیدی	۳۷۷	۲۳/۳
ساختار نامشخص[۱۴]	۷۳۶	۴۵/۴۸

[۱].α-helical structure
[۲].β-sheet structure
[۳].Mixture of α-helical/β-sheet structure
[۴].Irregular structure

جدول ۱-۲- درصد آمینواسیدهای مختلف در ساختار ۱۶۱۸ پپتید ضد میکروبی.

اسیدهای آمینه	درصد
ایزو لوسین	۶/۱۳
والین	۵/۷۷
لوسین	۸/۴۷
فنیل آلانین	۳/۹۸
سیستئین	۷/۵۹
متیونین	۱/۱۱
آلانین	۷/۹۵
تریپتوفان	۱/۵۸
گلیسین	۱۱/۷۷
پرولین	۴/۸
ترئونین	۴/۳۶
سرین	۵/۸۲
تیروزین	۲/۵۴
گلوتامین	۲/۳
آسپاراژین	۳/۷۱
گلوتامات	۲/۴۶
آسپارتات	۲/۴۱