فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال نهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۵

بررسی فعالیت همولیتیک عصاره‌های بدن کرم گلوگاه انار (Zeller) *Ectomyelois ceratoniae*

عیسی جبله[۱*]، مجید کزازی[۱]، احمد آسوده[۲]

[۱] گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بو علی سینای همدان، همدان، ایران.

[۲] گروه شیمی و بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[*]E.mail: isa200863@yahoo.com

تاریخ دریافت : ۹۵/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۷

چکیده

حشرات یکی از منابع مهم پپتیدهای ضد میکروبی می‌باشند. پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) به عنوان یک کلاس جدید از عوامل ضد میکروبی مورد توجه قرار گرفته‌اند. اگر چه AMPs به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک‌ها جای امیدوار دارند، اما معایب آنها مانع رشد آنها به عنوان داروهای موثر می‌شود. یکی از مشکل کاربرد آنها به عنوان نمونه، فعالیت همولیتیک AMPs است. همولیز تخریب نا بهنگام گلبول‌های قرمز است. برای تعیین اثر همولیتیک یک ترکیب آزمایشی از تست همولیز استفاده می‌شود. در این مطالعه جهت بررسی فعالیت همولیتیک عصاره بدن لارو *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller)، از خون تازه انسان، گوسفند و مرغ استفاده گردید. از Triton X-100 (0/1)٪، که ۱۰۰٪ همولیز را تولید می‌کند، به عنوان یک کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. نتایج با کنترل در سطح یک درصد با آزمون توکی مقایسه شد. فعالیت همولیتیکی در هر سه گروه خونی در هر دو روش جذب و نشر شعاعی نسبت به تریتون 100-X به عنوان کنترل مثبت خیلی کمتر بود و اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد ثبت گردید. بیشترین فعالیت همولیتیک بترتیب در خون مرغ با میانگین کل (6/39±1/24 درصد در روش جذبی و ۵/۶۴±۱/۲۵ درصد در روش نشر شعاعی)، سلول‌های خونی انسان با میانگین کل (2/15±0/27 درصد در روش جذبی و ۱/۵۶±۰/۲۳ درصد در روش نشر شعاعی) و گوسفند با میانگین کل (0/91±0/04 درصد در روش جذبی و ۰/۲۸±۰/۰۳ درصد در روش نشر شعاعی) مشاهده گردید که در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار داشتند. نتایج نشان داد که فعالیت همولیزی بر اساس نوع خون متفاوت است. همچنین عصاره بدن لارو کرم گلوگاه انار خاصیت همولیتیکی بسیار کمی بر روی گلبول‌های قرمز را داشت. در نتیجه می‌تواند کاندیدا خوبی جهت بررسی سایر اثرات آن بعنوان یک آنتی بیوتیک در مطالعات تکمیلی باشد.

کلیدواژه‌ها: انسان، تست همولیز، خون، کرم گلوگاه انار، گوسفند، مرغ

مقدمه

در دهه‌های اخیر با استفاده‌ی گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در کشاورزی و مراکز بهداشتی و درمانی گسترش مقاومت دارویی سرعت گرفته است [۱۹]. مقاومت میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌ها یک نگرانی در حال افزایش در میان متخصصین مراقبت از سلامت می‌باشد که آن‌ها را به سمت جستجو برای داروهای جایگزین پیش می‌برد [۹]. بنابراین، صنایع داروسازی تلاش‌های خود را برای یافتن ترکیب‌های جدید غیرسمی، قوی و مؤثر برای درمان عفونت‌های میکروبی متمرکز کرده‌اند [۲۳].

در سال‌های اخیر پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. پپتیدهای ضد میکروبی به صورت طبیعی در همهٔ ارگانیسم‌ها وجود دارند و در سیستم ایمنی ذاتی آن‌ها نقشی حیاتی ایفا می‌کنند [۲۲]. در دهه‌های اخیر تعداد زیادی از آن‌ها از حشرات، دوزیستان و پستانداران جدا شده است که از میان آن‌ها می‌توان به جداسازی ملیتین از نیش زنبورعسل، سکروپین از حشرات، دیفنسین از نوتروفیل‌های پستانداران و مگنیناز پوست قورباغه اشاره نمود [۲۴] . بخش بزرگی از پپتیدهای ضد میکروبی شناخته شده، متعلق به حشرات می‌باشد. تعداد و تنوع این مولکول‌ها در گونه‌های مختلف حشرات به طور قابل توجهی متفاوت است. در حشرات پپتیدهای ضدمیکروبی از سلول‌ها و بافت‌هایی مرتبط با ایمنی ذاتی مانند سلول‌های خونی یا اجسام چربی ترشح می‌شوند و می‌توانند جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک‌های معمولی که پاتوژن‌ها نسبت به آنها مقاوم شده‌اند، باشند. زمانی که میکروب وارد بدن بی‌مهرگان از جمله حشرات می‌شود، آنها دفاع‌های مختلفی از جمله سنتز و القای پپتیدهای ضد میکروبی دارند به گونه‌ای که زمانی که میکروب وارد بدن آنها می‌شود، داخل لارو حشرات یک سری شناساگرهایی وجود دارد که قادر به شناسایی باکتری‌ها و قارچ‌ها هستند. این شناساگرها قادر به شناسایی نوع عامل میکروبی و اینکه آیا باکتری گرم منفی و یا گرم مثبت است، خواهد بود و لاروها برای تولید پپتیدهای ضد میکروب با توجه به نوع میکروب، مسیر سنتز متفاوتی را در پیش می‌گیرند [۲۷] .یکی از اولین و مهمترین راسته‌های حشرات که پپتیدهای ضد میکروبی آن بررسی گردیده است راسته بالپولکدارن Lepidoptera می باشد [2,6,24] .کرم گلوگاه انار یا شب پره خرنوب با نام علمی *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller)، از خانواده پیرالیده Pyralidae راسته بالپولکدارن Lepidoptera، آفتی با گسترش جهانی است که در قاره‌های آسیا، اروپا، آفریقا، آمریکا و اقیانوسیه انتشار دارد. این آفت از فرانسه، قبرس، هند، عراق، لبنان، الجزیره، یونان و لیبی گزارش شده است [۲۵]. اگر چه AMPs با استفاده از تعاملات الکترواستاتیک خاص باکتری‌ها به غشاء آن‌ها متصل می شوند، اما برخی از AMPs می توانند به طور مستقیم به سلول‌های میزبان از جمله سلول‌های خونی متصل و باعث لیز شدن آن‌ها می گردد [۷]. نسبت فعالیت‌های ضدمیکروبی به فعالیت همولیتیک به عنوان شاخص درمانی تعریف شده است و برای جلوگیری از همولیز سلول‌های میزبان، شاخص درمان بالا لازم است [۱۲]. پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی ترجیحا با غشاهای باکتریایی با بار منفی ارتباط برقرار می‌کنند؛ با این حال، در غلظت‌های بالا، آنها به سلول‌های پستاندار آسیب می‌رسانند [۱۳]. تجزیه و تحلیل ساختار و عملکرد AMPsها نشان داده است که

هیدروفوبیت بالا[1] و لحظه‌ای هیدروفوبیک[2] با افزایش فعالیت همولیتیک ارتباط دارد [۳]. مدل‌های مختلفی برای بررسی سمیت غشائی مواد وجود دارند، از جمله مدل‌های حیوانی که می توان آسیب‌های وارده بر غشا مخاطی را به کمک میکروسکوپ الکترونی مشاهده نمود. یکی از مدل‌های بسیار ساده برای مطالعه اثرات سمی مواد بر غشا سلولی، مدل گلبول قرمز می باشد [۱۸] که در مطالعات چندی مورد استفاده واقع شده است [۸,۱۰,۱۷]. این مدل به طور مستقیم اثرات سمی باقوه مواد را در استفاده تزریقی نشان می‌دهد ضمن اینکه می‌تواند نشانه‌ای از سمیت کلی غشائی نیز باشد. مزیت دیگر استفاده از مدل گلبول قرمز در دسترس بودن آسان خون و نیز روش ساده جداسازی گلبول‌های قرمز از خون می‌باشد [18]. اثرات ضد میکروبی یک ترکیب توسط روش‌های مختلف مورد مطالعه قرار می‌گیرد یکی از آن‌ها بررسی اثرات یک ترکیب بر همولیز گلبول قرمز می‌باشد. واژه همولیز اشاره به تخریب گلبول های قرمز (RBC)[3] دارد و برای طیف گسترده‌ای از شرایط آزمایشگاهی و بالینی، هر دو فیزیولوژیکی و پاتولوژیک است. همولیز، که به چندین نام دیگر نیز شناخته می‌شود، باعث تجزیه گلبول‌های قرمز (اریتروسیت‌ها) و انتشار محتویات آنها (سیتوپلاسم) به مایع اطراف (به عنوان مثال پلاسمای خون) می‌شود. همولیز ممکن است در in vivo یا in vitro (داخل یا خارج از بدن) رخ دهد [20]. همولیسین‌ها باعث آسیب رساندن به غشای سیتوپلاسمی میزبان می شود و باعث مرگ و میر سلولی می‌شود. فعالیت این سموم به راحتی با آزمایش‌هایی که حاوی لیز کردن گلبول‌های قرمز است، مشاهده می‌شود. برخی از همولیسین‌ها به فسفولیپید غشای سیتوپلاسمی میزبان حمله می‌کنند و برخی از همولیسین‌ها بر استرول‌های غشای سیتوپلاسمی میزبان تاثیر می‌گذارند (۱۱). بسیاری از ترکیبات مستعد دارویی به دلیل داشتن فعالیت همولیتیک نمی‌توانند به عنوان دارو مورد استفاده قرار گیرند، این ترکیبات موجب لیز شدن گلبول‌های قرمز خون شده و خون‌ریزی شدید و آنمی را سبب می‌گردند. علیرغم توان پپتیدهای ضد میکروبی، داشتن یک سری نواقص از جمله فعالیت همولیتیکی باعث محدودیت در کاربردهای بالینی آنها می‌گردد [۷]. بنابراین پپتید های ضد میکروبی که به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک‌ها مورد تحقیق قرار می گیرند، باید از لحاظ داشتن فعالیت همولیتیک مورد ارزیابی قرار گیرند [۴,۱۳,۲۶]. تاکنون سیستم ایمنی کرم گلوگاه انار در دنیا بررسی نگردیده است این حشره به فروانی در اکثر جاها یافت می‌گردد به عنوان یکی از آفات مهم انار، انجیر، پسته می‌باشد و قابلیت پرورش انبوه بر روی غذای مصنوعی را نیز دارد و داری چندین نسل در سال می‌باشد و قادر است در محیط‌های به شدت آلوده به عوامل میکروبی مانند قارچ و باکتری زندگی کند[25]. در این تحقیق نیز برای القائ مسیرهای متفاوت سنتز پپتیدها از سه عامل قارچ *B. bassiana*، یک باکتری گرم مثبت *B. thuringiensis* و یک باکتری گرم منفی *E. coli* به همولنف لاروهای کرم گلوگاه انار تزریق گردید. بنابرین در این تحقیق در جهت شناسایی پپتیدهای ضدمیکروبی کرم گلوگاه انار خواص همولیزی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مواد طبیعی سبوس گندم، مخمر،

[1] High hydrophobic
[2] Amphipathicity
[3] Red blood cells

عسل، آرد گندم و شکر از محصولاتی ایرانی موجود در بازار استفاده گردید ومواد شیمیایی مورد استفاده اعم از متانول، اتانول، تری فلورو استیک اسید، استونیتریل استیک اسید، سدیم کلرید، فرمالدهید، سدیم هیدرکسید، تری کلرو استیک اسید، استون، کلریدریک اسید، Tween (80)، گلیسرول، تریتیون **X-100** و محیط کشت‌ها همگی از شرکت مرک (آلمان) تهیه شد.

پرورش حشرات:

میوه‌های آلوده به کرم گلوگاه انار از باغات انار شهرستان کاشمر استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل می‌شوند. لاروها بر اساس یک رژیم غذایی مصنوعی شامل سبوس گندم ۳۰۰ گرم، شکر ۸۰ گرم، مخمر ۹ گرم، گلیسیرین ۱۳۰ میلی‌لیتر و آب مقطر ۱۲۰ میلی‌لیتر پرورش داده شد. شرایط رشد دما ۲ ± ۲۸ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵ ± ٦٥ درجه سلسیوس و دوره نورانی ١٦ روشنایی: ۸ تاریکی بود [۲۵].

کشت قارچ و باکتری‌ها:

سیستم ایمنی حشرات به گونه است که ورود عوامل میکروبی باعث القا و تولید عوامل دفاعی از جمله پپتیدهای ضد میکروبی می‌گردند. جهت تحریک و القایی پپتید های ضد میکروبی دستگاه ایمنی حشره، سویه‌های استاندارد از جدایه قارچ *B. bassiana* Fashand، یک باکتری گرم مثبت *B. thuringiensis* var. *kurstaki* و یک باکتری گرم منفی *Escherichia coli* استفاده گردید. قارچ *B. bassiana* روی محیط دکستروز آگار (Dextrose Agar)، باکتری *B. thuringiensis* روی محیط نوترینت آگار (Nutrient Agar) و *E. coli* روی محیط آگار مولر هینتون (Muller-Hinton Agar) کشت داده شد. برای به دست آوردن اسپور قارچ‌ها و باکتری‌ها، ورق‌ها به مدت ۱۵ روز در دمای ۱± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ٤ روز در دمای ۱± ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. جهت تهیه سوسپانسیون برای تزریق با اسپورها توسط سوزن سر نیزه‌ای استریل از سطح محیط‌کشت هر کدام از عوامل میکروبی خراشیده و سوسپانسیونی غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر در محلول آب مقطر استریل و Tween (80) تهیه شد[۲۷].

تزریق عوامل میکروبی به همولنف حشره

از سویه‌های استاندارد جدایه قارچ *B. bassiana* Fashand، یک باکتری گرم مثبت *B. thuringiensis* var. *kurstaki* و یک باکتری گرم منفی *Escherichia coli* جهت تزریق به همولنف لاروها، استفاده گردید. لارو کرم گلوگاه انار دقایقی روی یخ گذاشته و بی‌حس شدند. سطح شکمی بدن حشرات با الکل ۷۰٪ ضدعفونی شدند و سپس با استفاده از سرنگ هامیلتون، یک میکرولیتر سوسپانسیون عوامل میکروبی به سطح شکمی تزریق شد. به لاروهای شاهد آب مقطر استریل در Tween (80) تزریق شد [۲۷].

استخراج عصاره بدن حشره

جهت به‌دست آرودن عصاره خام همولنف لاروهای کرم گلوگاه انار ابتدا با الکل ۷۰٪ استریل شدند، سپس با استفاده از سرنگ هامیلتون همولنف جمع‌آوری و با نیتروژن مایع منجمد و با هاون پودر شدند، پودر حاصل با آب مقطر حاوی TFA ۱٪ اسیدی شد. ۳۰ دقیقه در یک حمام آبی سرد یخ زده با دستگاه شیکر تکان ملایم دادشد. بعد از سانتریفوژ

در دور۱۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه محلول رونشین از غشای ۱۰ کیلو دالتون مربوط به اولترافیلتراسیون عبور داده شد. سپس عصاره فیلتر شده توسط غشای ۳ کیلودالتون تغلیظ گردید و در نهایت توسط فریز درایر و نیتروژن مایع هم عصاره روی فیلتر و هم عصاره زیر فیلتر به صورت پودر درآمد. پودر حاصله جهت فعالیت‌های همولیتیکی مورد استفاده قرار گرفت [۲۷].

تهیه غلظت:

عصاره‌های رو و زیر فیلتر لاروهای تزریق شده با قارچ، باکتری‌ها و لاروهای تزریق نشده وزن شد و غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر PBS[1] تهیه شد (جدول ۱) [۱,۱۴].

بررسی فعالیت همولیزی

بر اساس روش نشر شعاعی (RDA):

در این روش از محیط کشت بلاد آگار (Blood agar) استفاده گردید، برای هرکدام از خون های انسان، گوسفند و مرغ بصورت جداگانه، سوسپانسیون ۷٪ از خون هریک به محیط آگار خونی ٤٥ درجه سانتی‌گراد اضافه و در پلیت کشت میکروبی ریخته شد. آگار خونی با حل کردن ٤٠ گرم از پودر آگار خونی در ۱ لیتر آب و ۱۵ دقیقه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد بدست آمد. بعد از آن‌که محیط کشت آگار خونی به حالت جامد درآمد، با پانچر سوراخ هایی به تعداد غلظت های استفاده شده عصاره و همچنین کنترل مثبت و منفی همولیز (تریتون X-100 (۱٪) و بافر (PBS) در آن ایجاد شد. بعد از آن در داخل چاهک‌های ایجاد شده، ۵ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره و همچنین در دو چاهک، کنترل‌های مثبت و منفی تزریق شد. پلیت‌ها در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه بمدت ۱۸ ساعت قرار داد شد. بعد از گذشت زمان مورد نظر، شعاع هاله ی ایجاد شده (بر حسب میلی‌متر) بر روی محیط کشت بیانگر میزان همولیز سلول‌های خونی است. از یک کنترل مثبت (تریتون) و یک کنترل منفی (PBS)استفاده شد و مابقی نمونه‌ها با توجه به کنترل‌های مثبت و منفی سنجیده شدند (شکل ۱) [۱,۱۴].

جدول ۱: سریال غلظت های متفاوت در تیمارهای مختلف

تیمار	علامت اختصاری	غلظت mg/ml ۰/۵	غلظت ۱ mg/ml	غلظت mg/ml ۲
عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana*	Buu	✓	✓	✓
عصاره زیر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana*	Bud	✓	✓	✓
عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli*	Ecu	✓	✓	✓
عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli*	Ecd	✓	✓	✓
عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis*	Btu	✓	✓	✓
عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis*	Btd	✓	✓	✓
عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق نشده	CLu	✓	✓	✓
عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق نشده	Cld	✓	✓	✓
بافر فسفات سالین	PBS	×	×	×
ترتیون x100	T	×	×	×

[1] Phosphate buffered saline

بر اساس جذب:

برای سنجش فعالیت همولیتیک، ۵ میلی لیتراز خون تازه انسان، گوسفند و مرغ به درون یک لوله هپارینه ریخته شد. سپس این نمونه‌ها خونی به مدت ۵ دقیقه در دور ٤٥٠٠ سانتریفیوژ گردید تا سلول‌های خون جدا شوند. سپس رسوب حاصل، پنج بار با استفاده از ٤ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین(PBS) شسته شد و بار دیگر در دور ٤٥٠٠ سانتریفیوژ گردید تا محلول رویی کاملا شفاف شود. در آخرین مرحله از خالص‌سازی، سلول‌های قرمز خون توسط ۲۰ میلی‌لیتر بافر (PBS) رقیق گردید. برای سنجش همولیز، ۱۰ میکرولیتر از سریال غلظتی پپتیدها که در بخش قبل آماده شد به لوله‌های میکرو فیوژ که شامل ۱۹۰ میکرولیتر سلول‌های خونی رقیق شده بود، اضافه گردید. میکروفیوژها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ٤٠٠٠ سانتریفیوژ شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفوژ برداشته شد و با بافر (PBS) رقیق گردید تا حجم نهایی به ۱ میلی‌لیتر برسد. جذب لوله‌ها در طول موج ٥٦٧ نانومتر اندازه‌گیری شد. از تریتیون X-100 (۱٪) که باعث لیز شدن کامل سلول‌های قرمز خون می‌شود و بافر (PBS)، به عنوان کنترل استفاده شد. در نهایت نتایج با نمونه کنترل مقایسه گردید [۱,۱۴].

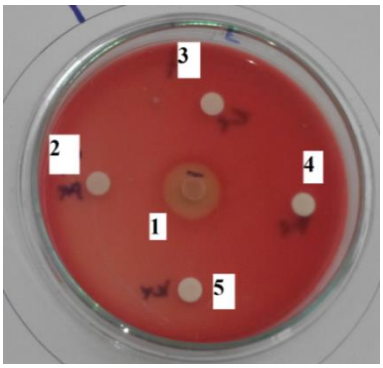
تجزیه تحلیل آماری:

این آزمایش ۱۰ تیمار، سه غلظت و در سه تکرار با دو روش جذبی و نشر شعاعی انجام شد. نتایج با استفاده نرم‌افزار SAS 9.1.3 و مقایسه میانگین با آزمون توکی با احتمال یک درصد تجزیه و تحلیل گردید($P<0.01$).

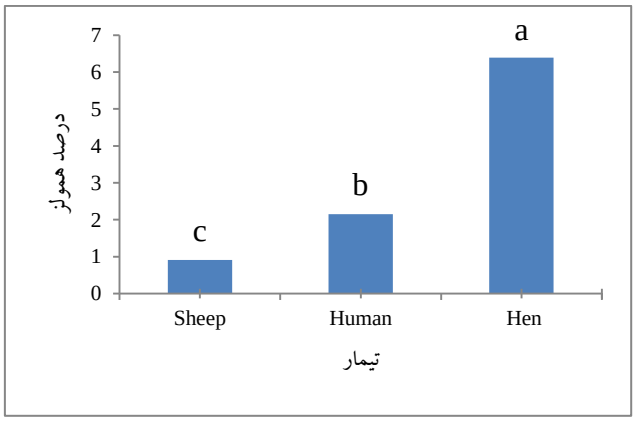
نتایج

نتایج حاصل از انجام آزمایشات بررسی میزان همولیز به صورت میانگین درصد همولیز در برابر غلظت نشان داده شده است. همان‌گونه که در نمودار ۱ و ۲ نشان داده است، با مقایسه فعالیت لیزکنندگی بین سه گروه خونی انسان، گوسفند و مرغ به طور کلی نتایج مشاهده شده چنین بود؛ فعالیت همولیتیکی در هر سه گروه خونی در هر دو روش جذب و نشر شعاعی (شکل ۱) نسبت به تریتون X-100 به عنوان کنترل مثبت خیلی کمتر بود و اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد ثبت گردید. بیشترین فعالیت همولیتیک بترتیب در خون مرغ با میانگین کل (6/39±1/24 درصد در روش جذبی و ٥/٦٤±١/٢٥ درصد در روش نشر شعاعی)، سلول‌های خونی انسان با میانگین کل (2/15±0/27 درصد در روش جذبی و ١/٥٦±٠/٢٣ درصد در روش نشر شعاعی) و گوسفند با میانگین کل (0/91±0/04 درصد در روش جذبی و ٠/٢٨±٠/٠٣ درصد در روش نشر شعاعی) مشاهده گردید. در بین تیمارهای مختلف در گروه خونی مرغ بیشترین فعالیت همولیتیک بترتیب در بالاترین غلظت (۲ میلی گرم بر میلی لیتر) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis* (Btu) با میانگین (31/17±2/20 درصد در روش جذبی و 30/47±0/28درصد در روش نشر شعاعی) ، عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana* (Buu) با میانگین (18/83±4/36 درصد در روش جذبی و 18/05±0/91 درصد در روش نشر شعاعی) و عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با *E. coli* (Ecu) با میانگین (11/98±0/88 درصد در روش جذبی و 11/19±0/85درصد در روش نشر شعاعی) فعالیت همولیزی از خود نشان دادند این سه تیمار

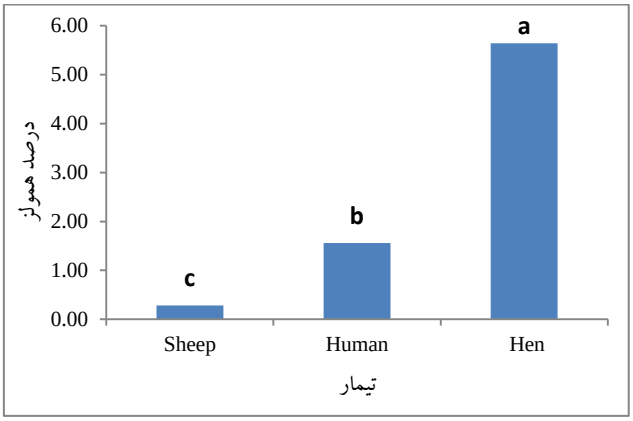
نسبت به هم و همچنین نسبت به سایر تیمارهای هر سه گروه خونی مرغ، انسان و گوسفند در هر دو روش جذب و نشر شعاعی در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری داشتند. به جز این سه تیمار مابقی تیمارها همه در یک گروه آماری قرار گرفتند. ولی در کل نسبت به تیمار تریتون X-100، در سطح یک درصد (P < 0/01) اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول شماره ۲، ۳). به گونه‌ای که در بالاترین غلظت (۲ میلی گرم بر میلی لیتر) در مقایسه با تریتون X-100، فعالیت همولیزی بسیار ناچیز بر روی سلول‌های خونی نشان می‌دهد (P<0/01).



شکل ۱: بررسی تست همولیز به روش نشر شعاعی بر روی محیط کشت بلاد آگار: ۱) ترتیون x۱۰۰؛ ۲) با غلظت mg/ml ۰/۵. عصاره زیر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana* با غلظت mg/ml ۰/۵؛ ۳) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli* با غلظت mg/ml ۰/۵؛ ٤) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis* با غلظت mg/ml ۰/۵؛ ۵) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق نشده با غلظت mg/ml ۰/۵. حروف غیر مشابه در سطح یک درصد اختلاف معنی داری دارند.



نمودار ۱: بررسی درصد اثرات همولیتیک کل به روش جذب بر روی گلبول‌های قرمز گوسفند (Sheep)، انسان (Human) و مرغ (Hen). حروف غیر مشابه در سطح یک درصد اختلاف معنی داری دارند.



نمودار ۲: بررسی درصد اثرات همولیتیک کل به روش نشر شعاعی بر روی گلبول‌های قرمز گوسفند (Sheep)، انسان (Human) و مرغ (Hen). حروف غیر مشابه در سطح یک درصد اختلاف معنی داری دارند.

جدول ۲: بررسی درصد اثرات همولیتیک غلظت‌های مختلف تیمارهای متفاوت به روش جذب بر روی گلبول‌های قرمز گوسفند (Sheep)، انسان (Human) و مرغ (Hen).

	غلظت mg/ml	Clu	Cld	Buu	Bud	Ecu	Ecd	Btu	Btd
گوسفند	۲	1/25±0/09^{d}	0/98±0/19^{d}	0/66±0/17^{d}	1/2±0/07^{d}	0/81±0/42^{d}	1/03±0/12^{d}	1/01±0/35^{d}	0/76±0/04^{d}
	۱	1/08±0/33^{d}	0/91±0/05^{d}	0/93±0/21^{d}	0/74±0/11^{d}	0.54±0/07^{d}	0/74±0/10^{d}	0/98±0/14^{d}	0/76±0/07^{d}
	۰/۵	1/23±0/49^{d}	1/01±0/21^{d}	0/69±0/22^{d}	1±0/23^{d}۰/۵	0/91±0/16^{d}	0/78±0/13^{d}	0/78±0/17^{d}	1/03±0/14^{d}
انسان	۲	3/95±0/33^{d}	4/98±2/66^{d}	1/64±1/12^{d}	3/28±1/33^{d}	2/30±1/23^{d}	4/68±3/59^{d}	1/81±0/21^{d}	0/03±0/026
	۱	1/20±0/16^{d}	0/74±0/12^{d}	3/77±1/16^{d}	1/72±0/18^{d}	1/81±0/89^{d}	3/65±2/10^{d}	1/86±0/24^{d}	0/91±0/45^{d}
	۰/۵	2/33±0/19^{d}	0/74±0/11^{d}	1/99±0/44^{d}	2/18±0/35^{d}	0/39±0/06^{d}	3/77±2/28^{d}	1/76±0/26^{d}	0/96±0/61^{d}
مرغ	۲	4/57±0/39^{d}	4/44±0/16^{d}	18/83±4/36^{b}	3/89±0/32^{d}	11/98±0/88^{c}	4/26±0/12^{d}	31/17±2/20^{a}	4/20±0/38^{d}
	۱	4/01±0/28^{d}	4/26±5/00^{d}	4/51±5/05^{d}	3/89±0/44^{d}	4/88±0/41^{d}	4/88±0/43^{d}	4/26±0/16^{d}	3/77±0/21^{d}
	۰/۵	5/62±0/60^{cd}	4/14±0/26^{d}	4/07±0/37^{d}	5/00±0/92^{d}	4/32±0/06^{d}	5/31±0/21^{d}	4/07±5/05^{d}	4/14±0/40^{d}

(Buu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana*؛ (Bud) عصاره زیر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana*؛ (Ecu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli*؛ (Ecd) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli*؛ (Btu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis*؛ (Btd) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis*؛ (Cld) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق نشده ؛ (Clu) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق نشده. تمام تیمارها در مقایسه با تیمار تریتیون X-100 (۱٪) در سطح پنج درصد اختلاف معنی داری دارند.

جدول ۳: بررسی درصد اثرات همولیتیک غلظت‌های مختلف تیمار های متفاوت به روش نشر شعاعی بر روی گلبول‌های قرمز گوسفند (Sheep)، انسان (Human) و مرغ (Hen).

	غلظت mg/ml	Clu	Cld	Buu	Bud	Ecu	Ecd	Btu	Btd
گوسفند	۲	0/41±0/08^{d}	0/29±0/04^{d}	0/27±0/11	0/35±0/05^{d}	0/63±0/14^{d}	0/2±0/13^{d}	5/01±0/01^{d}	0/09±0/05^{d}
	۱	0/41±0/29^{d}	0/07±0/04^{d}	0/29±0^{d}	0/11±0/09^{d}	0/31±0/12^{d}	0/11±0/04^{d}	0/19±0/06^{d}	0/18±0/04^{d}
	۰/۵	5/09±0/42^{d}	0/27±0/09^{d}	0/4±0/04^{d}	0/33±0/17^{d}	0/17±0/03^{d}	0/13±0/08^{d}	0/31±0/04^{d}	0/19±0/09^{d}
انسان	۲	3/1±0/37^{d}	4/2±0/19^{d}	1/13±4/36^{d}	2/42±0/29^{d}	1/9±0/9^{d}	3/63±0/09^{d}	0/94±2/23^{d}	0/84±0/36^{d}
	۱	0/33±0/25^{d}	0/27±0/48^{d}	2/9±5/02^{d}	0/86±0/41^{d}	1/21±0/41^{d}	2/89±0/4^{d}	0/98±0/14^{d}	0/62±0/18^{d}
	۰/۵	1/47±5/07^{d}	0/13±0/23^{d}	1/13±0/34^{d}	1/32±0/89^{d}	0/47±0/04^{d}	2/98±0/23^{d}	0/91±5/04^{d}	0/84±0/38^{d}
مرغ	۲	3/78±0/35^{d}	3/64±2/59^{d}	18/05±0/91^{b}	3/09±1/27^{d}	11/19±0/85^{c}	3/46±3/55^{d}	30/47±0/28^{a}	3/4±0/04^{d}
	۱	3/22±0/1^{d}	3/46±0/06^{d}	3/72±1/1^{d}	3/1±0/12^{d}	4/07±0/79^{d}	4/08±1/91^{d}	3/46±0/25^{d}	2/97±0/18^{d}
	۰/۵	4/83±0/12^{d}	3/34±0/05^{d}	3/28±0/37^{d}	4/21±0/28^{d}	3/52±0/08^{d}	4/51±2/33^{d}	3/27±0/3^{d}	3/34±0/29^{d}

(Buu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana*؛ (Bud) عصاره زیر لاروهای تزریق شده با قارچ *B. bassiana*؛ (Ecu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli*؛ (Ecd) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *E. coli*؛ (Btu) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis*؛ (Btd) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق شده با باکتری *B. thuringiensis*؛ (Cld) عصاره روی فیلتر لاروهای تزریق نشده ؛ (Clu) عصاره زیری فیلتر لاروهای تزریق نشده. حروف غیر مشابه در سطح یک درصد اختلاف معنی داری دارند.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثر عصاره بدن کرم گلوگاه انار بر همولیز گلبول های قرمز پستانداران (انسان و گوسفند) و پرندگان (مرغ) به دو روش اسپکتروفتومتری جذبی و نشر شعاعی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره بدست آمده از کرم گلوگاه انار بر روی خون انسان و گوسفند (پستاندارن) در هر سه عامل میکروبی فعالیت همولیزی نسبتا کمی داشت. در بررسی سایر محقیقن بر روی عصاره بدن و پپتیدهای ضد میکروبی استخراج شده از حشرات و

سایر جانوران داشتند عدم فعالیت ضد همولیزی این ترکیبات بر روی سلول‌های خونی پستانداران به اثبات رسیده است [۱۴-۱۱]. ولی پپتیدهای حاصل از کرم گلوگاه انار بر روی خون مرغ (پرندگان) فقط در بالاترین غلظت در هرسه عامل میکروبی دارای مقدار کمی فعالیت همولیزی بود. فعالیت همولیزی روی سلول‌های خونی مرغ ممکن است به خاطر ساختار متفات گلبول‌های قرمز پرندگان با پستانداران باشد. چون که گلبول‌های قرمز پرندگان دارای هسته، بیضی شکل و ولی گلبول قرمز پستانداران فاقد هسته و به شکل دیسکی که در وسط از دو طرف فرو رفتگی دارد. همچنین گلبول‌های قرمز پرندگان عمر کوتاه تر از پستانداران نباشد که به دلیل بیشتر بودن درجه حرارت و بالا بودن سوخت و ساز بدن آن‌ها است [۱۵,۱۶]. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت همولیزی در تیمارهای عصاره‌های روی غشاء مشاهده گردید و تیمارهای عصاره زیر غشاء دارای کمترین فعالیت همولیزی بودند[۱۴]. که در اکثر تحقیقات صورت گرفته در زمینه شناسایی و استخراج پپتید از عصاره زیر فیلتر استفاده گردیده است [۱,۱۱,۱۴]. در این تحقیق برای اولین بار سیستم ایمنی و فعالیت همولیزی عصاره استخراج شده حاوی پپتیدهای ضد میکروبی لاروهای کرم گلوگاه انار برای اولین بار در دنیا بررسی گردید. نتایج نشان داد که این عصاره دارای فعالیت همولیتیکی خیلی پایین می‌باشد و می‌توان پیشنهاد داد که پپتیدهای ضدمیکروبی آن خالص‌سازی، توالی‌یابی و اثر سمیت این پپتید یا پپتیدها بر روی مدل حیوانی مورد بررسی قرار گیرد. نتایج بدست آمده امیدوار کننده بوده و انگیزه را برای ادامه تحقیقات در این زمینه ایجاد کرده است، زیرا می‌توان پپتیدهای خالص شده را در نمونه‌های حیوانی مورد بررسی قرار داد. اگر بتوان شرایط را برای انجام مراحل مختلفی نظیر بررسی مکانیسم عمل پپتید در میزبان زنده، عوارض و پاسخ‌های بدن میزبان، دوز مناسب برای مصرف فراهم کرد، رسیدن به هدف کاربردی که ایجاد داروهای موثر جدید در مقابل عوامل بیماری زای مقاوم به آنتی بیوتیک‌های معمولی است، خیلی دور از ذهن نخواهد بود.

منابع

[1] Asoodeh, A., Zardini, H.Z. and Chamani, J., (2012). Identification and characterization of two novel antimicrobial peptides, temporin-Ra and temporin-Rb, from skin secretions of the marsh frog (Rana ridibunda). *Journal of Peptide Science*, 18(1), pp.10-16.

[2] Bulet, P., Stöcklin, R., & Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews*, 198 (1), 169-184.

[3] Chou, H. T., Kuo, T. Y., Chiang, J. C., Pei, M. J., Yang, W. T., Yu, H. C., ... & Chen, W. J. (2008). Design and synthesis of cationic antimicrobial peptides with improved activity and selectivity against Vibrio spp. *International journal of antimicrobial agents*, 32 (2), 130-138.

[4] Dathe, M., & Wieprecht, T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1462 (1), 71-87.

[5] Einhorn, T. A. (1998). The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research*, 355, S7-S21.

[6] Hancock, R. E., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24 (12), 1551.

[7] Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van't Hof, W., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V. (1999). A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS letters*, 449 (2-3), 105-110.

[8] Horie, T., Sugiyama, Y., Awazu, S., & Hanano, M. (1981). The correlation between drug binding to the human erythrocyte and its

hemolytic activity. *Journal of pharmacobio-dynamics*, 4 (2), 116-122.

[9] Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 19(3), 491-511.

[10] Litman, G. W., Litman, R. T., & Henry, C. J. (1976). Analysis of lipophilic carcinogen-membrane interactions using a model human erythrocyte membrane system. *Cancer research*, 36 (2 Part 1), 438-444.

[11] Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1997). *Brock biology of microorganisms* (Vol. 11). Upper Saddle River, NJ: Prentice hall.

[12] Malmsten, M., Kasetty, G., Pasupuleti, M., Alenfall, J., & Schmidtchen, A. (2011). Highly selective end-tagged antimicrobial peptides derived from PRELP. *PloS one*, 6 (1), e16400.

[13] Matsuzaki, K., Sugishita, K., Fujii, N., & Miyajima, K. (1995). Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry*, 34 (10), 3423-3429.

[14] Memarpoor-Yazdi, M., Zare-Zardini, H. and Asoodeh, A., (2013). A novel antimicrobial peptide derived from the insect Paederus dermatitis. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 19 (2), pp.99-108.

[15] Mohammed, Kh.A., Toson, M.A. & Hassanien, H.H.M. (2010). Effects of phytase supplementation on performance and egg quality of laying hens fed diets containing rice bran. Egyptian Journal of Poultry Science, 30, 649-659. 15.

[16] Mohsinzadeh, M., Nobakht, A. & Safamehr, A. R. (2013). Effects of different levels of crude protein and probiotic (Protexin) on performance and blood metabolites of laying hens. Animal Science Journal (Pajouhesh& Sazandegi), 103, 133-144.

[17] Oyedapo, O. O., & Famurewa, A. J. (1995). Antiprotease and membrane stabilizing activities of extracts of Fagara zanthoxyloides, Olax subscorpioides and Tetrapleura tetraptera. *International Journal of Pharmacognosy*, 33 (1), 65-69.

[18] Robertis FA, Robertis EMH (1995). Cell and molecular biology in: cell membrance Saunders London, pp. 239-245.

[19] Rosenthal, A. Z., & Elowitz, M. B. (2012). Following evolution of bacterial antibiotic resistance in real time. *Nature genetics*, 44 (1), 11-13.

[20] Schaufuss, P. and Steller, U., (2003). Haemolytic activities of Trichophyton species. *Medical mycology*, 41 (6), pp.511-516.

[21] Sessa, G., & Weissmann, G. (1968). Effects of four components of the polyene antibiotic, filipin, on phospholipid spherules (liposomes) and erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 243 (16), 4364-4371.

[22] Thomas, A., Kohler, M., Mester, J., Geyer, H., Schänzer, W., Petrou, M., & Thevis, M. (2010). Identification of the growth-hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in a nutritional supplement. *Drug testing and analysis*, 2 (3), 144-148.

[23] Torrent, M., Andreu, D., Nogués, V. M., & Boix, E. (2011). Connecting peptide physicochemical and antimicrobial properties by a rational prediction model. *PloS one*, 6 (2), e16968.

[24] Vale, P. F., Fenton, A., & Brown, S. P. (2014). Limiting damage during infection: lessons from infection tolerance for novel therapeutics. *PLoS biology*, 12 (1), e1001769.

[25] Warner, R. L. (1988). Contributions to the biology and the management of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) in ÔDeglet NoorÕ date gardens in the Coachella Valley of California. PhD dissertation, University of California, Riverside. CA.

[26] Wieprecht, T., Dathe, M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., & Bienert, M. (1997). Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochemistry*, 36 (20), 6124-6132.

[27] Zibaee, A., Bandani, A. Talaei, R. & Malagoli, D. (2011). Cellular immune reactions of the sunn pest, Eurygaster integriceps, to the entomopathogenic fungus, Beauveria bassiana and its secondary metabolites. Journal of Insect Science, 11: 138: 1-16.