

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی پرو-هپسیدین نو ترکیب ماهی قرمز (*Carassius auratus*) علیه باکتری های گرم مثبت و منفی

مریم قیصری^۱، فاطمه پیروی قادیکلایی^{۱*}، راحم خوشبخت^{۲*}، پولین شهره^۳، حامی کابوسی^۴

^۱گروه زیست شناسی، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران.

^۲گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران.

^۳گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران.

^۴گروه میکروبیولوژی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۲۲

چکیده

افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های بیماری زا، ضرورت شناسایی و توسعه ترکیبات ضد میکروبی جایگزین را بیش از پیش آشکار ساخته است. پپتیدهای ضد میکروبی، از جمله هپسیدین، به عنوان اجزای مهم ایمنی ذاتی مهره داران، گزینه های امیدبخش در این زمینه محسوب می شوند. هدف از مطالعه حاضر، تولید پرو-هپسیدین نو ترکیب ماهی قرمز (*Carassius auratus*) و ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی آن علیه برخی باکتری های گرم مثبت و منفی بود. بدین منظور، توالی کامل ژن پرو-هپسیدین استخراج، پس از بهینه سازی کدونی و الحاق برچسب هیستیدینی، در وکتور بیانی pET28a کلون و در باکتری *Escherichia coli* (BL21) Rosetta بیان شد. پروتئین نو ترکیب پس از خالص سازی، از نظر فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری گرم منفی (*Salmonella enterica*) و گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* و *Lactococcus garvieae*) با استفاده از روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پرو-هپسیدین نو ترکیب دارای اثر مهارتی قابل توجهی علیه هر سه باکتری است؛ حداقل دوز کشنده (MIC) مربوط به پرو-هپسیدین نو ترکیب برای *S. aureus*، *S. enterica* و *L. garvieae* به ترتیب ۵۰، ۲۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود. همچنین، تشکیل هاله های عدم رشد معنی دار در آزمون انتشار دیسک، حتی در مواردی که باکتری ها نسبت به برخی آنتی بیوتیک های رایج مقاومت نشان دادند، بیانگر توان ضد باکتریایی بالای این پپتید بود. در مجموع، یافته های این پژوهش نشان می دهد که پرو-هپسیدین نو ترکیب ماهی قرمز از طیف وسیعی از فعالیت ضد میکروبی برخوردار است و می تواند به عنوان یک کاندیدای بالقوه برای توسعه عوامل ضد میکروبی جدید و جایگزین آنتی بیوتیک ها، به ویژه در حوزه پزشکی و آبزی پروری، مورد توجه قرار گیرد.

کلید واژگان: پرو-هپسیدین، ماهی قرمز، پانژن های آبزی پروری، فعالیت ضد باکتریایی، جایگزین آنتی بیوتیک ها

مقدمه

باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در سه دهه گذشته یک تهدید جدی بوده‌اند، زیرا بسیاری از میکروب‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک مقاوم شده‌اند (Ventola, 2015). مقاومت آنتی‌بیوتیکی زمانی رخ می‌دهد که میکروب‌هایی مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها برای مدت طولانی در معرض یک آنتی‌بیوتیک خاص قرار گیرند (Hussain and Sachan, 2023). میکروب‌ها این پتانسیل را ایجاد می‌کنند که آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده برای از بین بردن آنها را شکست دهند. استفاده فشرده از آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش‌های دامپزشکی و مراقبت‌های بهداشتی انسانی بدون دانش مناسب از دوز مصرفی و ضد میکروبی‌های غیر ضروری در فعالیتهای کشاورزی باعث افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سطح جهانی می‌شود (Singhal, 2022; Hussain and Sachan, 2023). دو راه برای مقابله با مقاومت در میکروب‌ها وجود دارد: اول اصلاح در آنتی‌بیوتیک‌های موجود و تشکیل نسل‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها است. راه دیگر کشف ترکیبات ضد میکروبی جدید از منابع زیستی مختلف است. این ترکیبات می‌توانند به‌طور مؤثری بر روی میکروب‌های مقاوم عمل کنند (Chen et al., 2020). یک گروه از این ترکیبات پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) می‌باشند که در دفاع میزبان در برابر تهاجم میکروبی حائز اهمیت هستند (Shike et al., 2002). تعداد فزاینده‌ای از پپتیدهای دخیل در ایمنی ذاتی از گیاهان، بی‌مهرگان و مهره‌داران بالاتر جدا شده است (Shike et al., 2002). یکی از ترکیبات میکروبی شناخته شده هپسیدین می‌باشد که یک هورمون پپتیدی ضد میکروبی است و توسط کبد در پاسخ به محرک‌های التهابی و اضافه بار آهن (Overload) تولید می‌شود (Singh et al., 2011). آنالیز توالی اسیدهای آمینه در هپسیدین ماهیان نشان می‌دهد که این پپتید دارای چهار، شش یا هفت سیستمین در ساختار خود می‌باشند (Diamond and Masso-Silva, 2014). ژن هپسیدین در ماهیان دارای چندین کپی می‌باشد و تاکنون هشت کپی از این ژن‌ها شناسایی شده است (Cho et al., 2009). هپسیدین بالغ دارای ۳۱-۱۹ اسید آمینه و دارای وزن مولکولی ۳-۲ کیلودالتون می‌باشد. مقدار بیان ژن ایزوفرم‌های مختلف هپسیدین در بافت‌های مختلف

متفاوت است و این بیان ژن‌ها غالباً در کبد، طحال، کلیه و روده بیان می‌شوند (Diamond and Masso-Silva, 2014). مطالعات روی هپسیدین در ماهیان استخوانی ارتباط این مولکول در سیستم دفاعی در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را تأیید کرده است (Xie et al., 2019; Barroso et al., 2021; Alvarez et al., 2022).

پاتوژن‌های زئونوز مانند استریتوکوکوس اینیا، آئروموناس هیدروفیلا، ویبریو ولنیفیکوس، فوتوباکتریوم دامسله و مایکوباکتریوم مارینوم حامل ژن‌های مقاومت آنتی‌میکروبی (Antimicrobial resistance gene) هستند که از طریق شبکه غذایی پخش می‌شوند (Kumar and Pal, 2018). افراد می‌توانند از طریق تماس با حیوانات به باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و ARG آلوده شوند. (Haenen et al., 2020; Reantaso et al., 2022). بنابراین یکی از راه‌حل‌ها استفاده از پپتید ضد میکروبی طبیعی به‌جای آنتی‌بیوتیک‌ها در دامپروری می‌باشد. این پپتیدها همگام با تکامل پاتوژن‌ها تغییر می‌کنند تا توانایی دفاع از بدن در برابر انواع میکروب‌ها را داشته باشند. بنابراین از ایجاد سویه‌های پاتوژن جهش یافته مقاوم به ترکیبات ضد میکروبی جلوگیری می‌کنند (Douglas, 2011; Katzenback, 2015). تاکنون گزارشی از مقاوم شدن پاتوژن‌ها در برابر پپتیدهای ضد میکروبی ارائه نشده است و بنابراین پپتیدهای مذکور می‌توانند به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها در حوزه پزشکی و دامپزشکی مورد استفاده قرار گیرند (Katzenback, 2015; Garvey, 2023).

ماهی قرمز (*Carassius auratus*) به‌عنوان یک گونه مدل ایده‌آل در تحقیقات زیستی شناخته می‌شود. این اهمیت عمدتاً به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آن از جمله تنوع پدیداری (فنوتیپی) بسیار بالا، مقاومت و سازگاری فوق‌العاده به شرایط محیطی مختلف (از جمله کیفیت آب و دما) و چرخه زندگی نسبتاً کوتاه است (Mohammadzadeh et al., 2021). ماهی قرمز به‌طور گسترده در مطالعات ژنتیک، جنین‌شناسی، سم‌شناسی آب، فیزیولوژی استرس و حتی تحقیقات عصبی-رفتاری استفاده می‌شود. تاکنون بخش فعال این پپتیدها به فرم سنتتیک و نوترکیب تولید شده و فعالیت زیستی آنها در

تهیه و به آزمایشگاه باکتری شناسی واقع در دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل (آمل، ایران) منتقل شدند. روش انتشار دیسک برای تست حساسیت ضد میکروبی طبق روش استاندارد برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی انجام شد. باکتری‌های مورد مطالعه (تطبیق شده با استاندارد ۰/۵ مک فارلند) با استفاده از سواب استریل به طور یکنواخت بر روی پلیت‌های مولر-هینتون آگار کشت داده شدند و سپس پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه خشک شدند و برای تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. دیسک‌های پوشش داده شده با هپسیدین نوترکیب روی سطح آگار مولر-هینتون قرار گرفتند. هر پلیت آزمایش حاوی چهار دیسک: دو کنترل مثبت که شامل دیسک استاندارد آنتی‌بیوتیک‌های تجاری، (سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، پنی سلین و سفاکسین) و دو دیسک تیمار شده (۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم پروهپسیدین نوترکیب) بود. بعد از دیسک‌گذاری پلیت‌های مورد نظر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، پلیت‌ها از نظر هاله عدم رشد بررسی شدند. سپس هاله عدم رشد با استفاده از کولیس اندازه گیری و ثبت شد. در ادامه برای اطمینان از نتایج به دست آمده تست حداقل غلظت بازدارنده (MIC) با روش میکروپلیت انجام شد. باکتری‌ها بعد از کشت شبانه در محیط کشت BHI، با استفاده از سرم فیزیولوژی به غلظت 1×10^8 CFU/ml (معادل ۰/۵ مک فارلند) تنظیم شد. پیتید هپسیدین با استفاده از محیط کشت BHI برات به غلظت‌های مورد نظر (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم) رسانده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به چاهک‌ها افزوده شد. میکروپلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۰ ساعت در دمای درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. کمترین غلظتی که باکتری در آن رشدی نداشت به عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC) پیتید نوترکیب هپسیدین تعریف شد (Shirdel et al., 2019).

نتایج

فعالیت زیستی پیتید هپسیدین نوترکیب ماهی قرمز با بررسی خاصیت ضد میکروبی آنها مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۱، ۲ و شکل ۱). حداقل دوز کشنده (MIC) مربوط به هپسیدین نوترکیب ماهی قرمز برای *S. enterica*

مقابل گستره‌ای از عوامل بیماری‌زا بررسی شده است؛ اما مطالعات اندکی وجود دارد که این پیتید را به فرم پروپروتئین نوترکیب تولید کرده باشد. بنابراین در مطالعه حاضر توالی کامل پیتید هپسیدین با در نظر گرفتن همه قسمت‌های پیتید به فرم پروپروتئین در میزبان باکتریایی تولید و فعالیت زیستی آن در مقابل برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی سنجیده شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب توالی و انتقال به باکتری *E. coli* (BL21) DE3: توالی پروتئینی پیتید هپسیدین ماهی قرمز از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج شده و سپس توالی اسید آمینه هپسیدین (شش اسید آمینه) به عنوان Tag نیز به انتهای کربوکسیل طول آن افزوده شد. جهت تسهیل در امر کلونینگ، توالی پروتئین به توالی نوکلئیک‌اسید ترجمه شد (www.expasy.org/tools/translate) با در نظر گرفتن کدون‌های استاندارد ترجمه برای میزبان پروکاریوتی (*E. coli*) تغییراتی از جمله اضافه کردن کدون شروع و خاتمه، برچسب هپسیدینی روی توالی ژن صورت گرفت (شکل ۱). اندازه ژن انتخابی 287 جفت باز بود که وزن مولکولی پروتئینی آن با نرم‌افزار بیوانفورماتیک ۱۰ کیلودالتون تعیین گردید. توالی انتخابی جهت سنتز شیمیایی به کمپانی Shainegene (شانگ‌های، چین) ارسال شد و به صورت کلون شده در وکتور بیانی pET28a دریافت گردید. سپس وکتور نوترکیب pET28a+/CuHep به باکتری *E. coli* (BL21) DE3 منتقل شد و صحت انتقال با استفاده از کلونی PCR به کمک پرایمرهای تخصصی طراحی شده مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا یک کلونی از باکتری‌های نوترکیب در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین به صورت شبانه کشت داده شد سپس بعد از بیان پروتئین مورد نظر با استفاده از ستون حاوی رزین خالص شد (Mohapatra et al., 2019).

فعالیت ضد میکروبی پیتید خالص شده: باکتری گرم منفی (*Salmonella enterica*) و گرم مثبت (*Lactococcus* و *Staphylococcus aureus*) *garvieae* از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران برای بررسی فعالیت ضد میکروبی پیتید هپسیدین نوترکیب

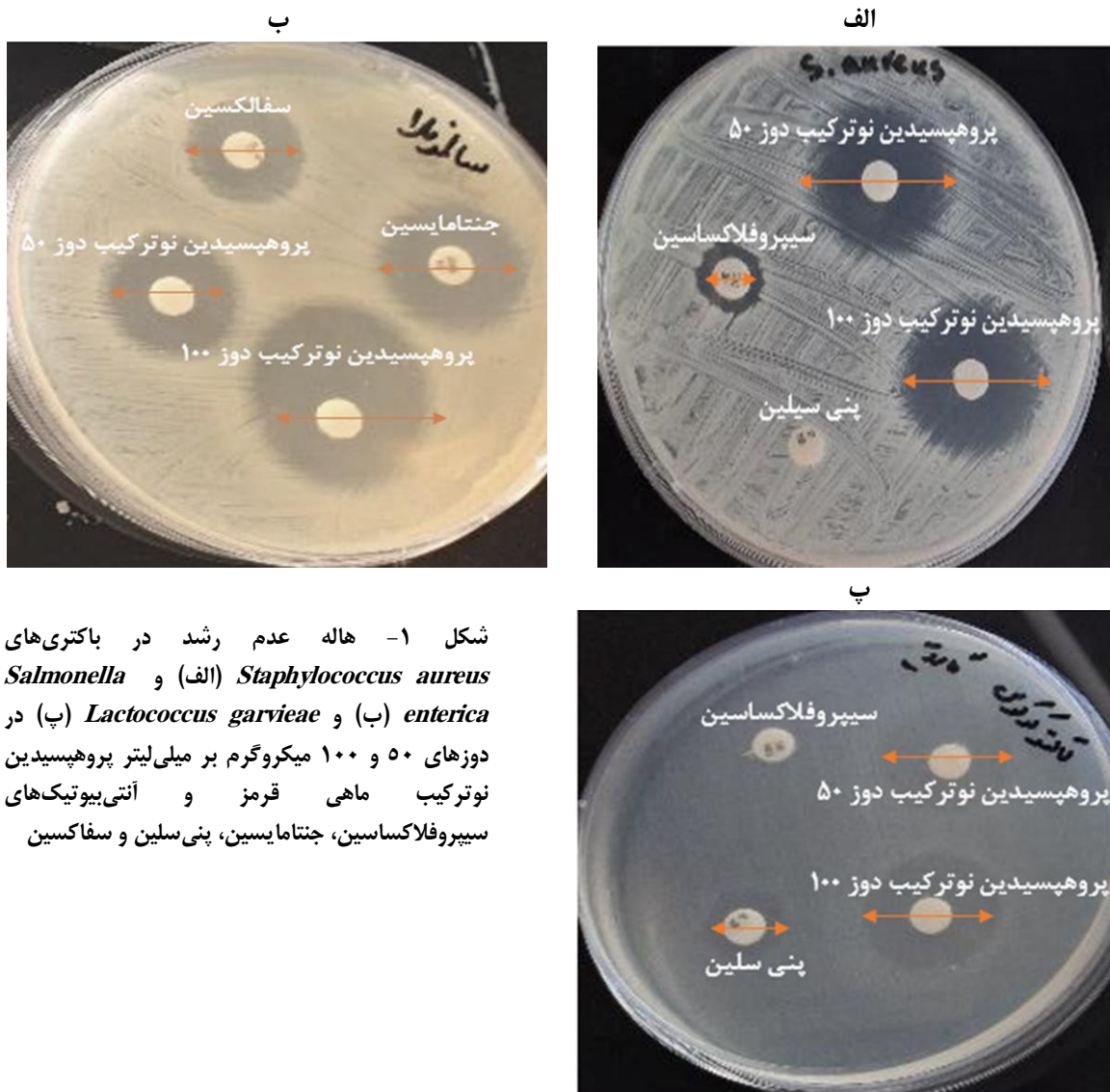
جدول ۱- حداقل دوز کشندگی از پرو-هپسیدین نو ترکیب ماهی قرمز

دوزهای تست شده (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵
<i>S. enterica</i>	-	-	-	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	+
<i>L. garvieae</i>	-	-	-	-	+
کنترل منفی	+	+	+	+	+

+: رشد، -: عدم رشد

جدول ۲- هاله عدم رشد (میلی‌متر) در باکتری‌های تست شده در برابر پرو-هپسیدین نو ترکیب ماهی قرمز

پنیسیلین	سیپروفلوکساسین ۵	هپسیدین نو ترکیب ۱۰۰	هپسیدین نو ترکیب ۵۰	
-	۲۰/۳ ± ۱/۱۵ ^b	۲۹/۰ ± ۱/۰ ^a	۲۱/۳ ± ۱/۵ ^b	<i>S. enterica</i>
۰/۰ ± ۰/۰ ^c	-	۲۸/۰ ± ۲/۰ ^a	۲۳/۳ ± ۱/۵ ^b	<i>S. aureus</i>
۱۱/۶ ± ۰/۵ ^b	-	۲۶/۰ ± ۳/۰ ^a	۲۲/۳ ± ۲/۰ ^a	<i>L. garvieae</i>



شکل ۱- هاله عدم رشد در باکتری‌های *Salmonella* (الف) و *Staphylococcus aureus* (ب) در برابر پرو-هپسیدین نو ترکیب ماهی قرمز و آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، پنی‌سلین و سفالکسین

تفاوت معنی‌داری بین آنها وجود داشت (جدول ۱، $P < 0.05$). براساس دستورالعمل‌های CLSI، هاله ≥ 23 میلی‌متر نشان‌دهنده مقاومت این باکتری در برابر CP5 است. هاله عدم رشد *S. aureus* در برابر هپسیدین نو ترکیب ماهی قرمز در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم

S. aureus و *L. garvieae* به ترتیب ۲۵، ۲۵ و ۲۱/۳ میکروگرم بود (جدول ۱). هاله عدم رشد در باکتری *S. enterica* در برابر هپسیدین نو ترکیب ماهی قرمز در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم و CP5 به ترتیب با اندازه‌های ۲۹، ۲۱/۳ و ۲۰/۳ میلی‌متر اندازه‌گیری شد و

کشتن باکتری هدف قرار دهد و علی‌رغم مقاومت به یک آنتی‌بیوتیک خاص، مؤثر واقع شود.

S. aureus به‌ویژه سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین، از جمله پاتوژن‌های خطرناک در مراکز درمانی و جامعه هستند. این سویه‌ها به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام از جمله پنی‌سیلین و اکثر سفالوسپورین‌ها (به‌جز نسل جدیدی مانند سفتراولین) مقاوم بوده و گزینه‌های درمانی را به‌شدت محدود می‌کنند. در این پژوهش، سویه *S. aureus* مورد آزمایش نیز مقاومت خود به پنی‌سیلین را تأیید کرد. با این حال، در مواجهه با هپسیدین نوترکیب، نتایج ضد باکتریایی ممتازی در دوزهای مختلف به‌دست آمد. تشکیل هاله‌های شفاف و قابل اندازه‌گیری در آزمون انتشار دیسک و مقادیر پایین MIC، قدرت این پپتید را در مهار رشد یک باکتری گرم مثبت چندمقاوم به‌خوبی نشان می‌دهد. *L. garvieae* عامل بیماری لاکتوکوکوز است که یکی از تهدیدهای اصلی در صنعت آبزی‌پروری محسوب می‌شود و سالانه خسارات اقتصادی قابل توجهی در مزارع پرورش ماهیان آب شیرین و دریایی ایجاد می‌کند (Torres-Corral and Santos, 2022). یکی از چالش‌های موجود در مطالعات مرتبط با این باکتری، کمبود داده‌های استاندارد در مراجع معتبری مانند CLSI و EUCAST در مورد مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی و قطر هاله عدم رشد برای بسیاری از ترکیبات ضد باکتریایی است. این خلأ اطلاعاتی، تفسیر نتایج حساسیت‌سنجی و مقایسه آن را با مطالعات دیگر دشوار می‌سازد (Öztürk et al., 2024). علی‌رغم این محدودیت، در تحقیق حاضر، هاله عدم رشد واضح و نتایج کمی MIC مربوط به هپسیدین نوترکیب علیه *L. garvieae*، به‌وضوح فعالیت ضد باکتریایی قوی این پپتید را اثبات کرد. این یافته از آن جهت حائز اهمیت است که نشان می‌دهد هپسیدین می‌تواند علیه پاتوژن‌های تخصصی آبزی نیز مؤثر واقع شود. تا به امروز، هیچ گزارش علمی مستقیمی در مورد اثر ضد باکتریایی هپسیدین (چه به شکل نوترکیب و چه سنتتیک) بر روی باکتری‌های *S. aureus*، *S. enterica* و *L. garvieae* منتشر نشده است. بنابراین، مقایسه مستقیم نتایج حاصل از این پژوهش با یافته‌های گذشته امکان‌پذیر نبود. با این حال، یافته حاضر در راستا و همخوان با مقالاتی است که فعالیت ضد باکتریایی

۲۳/۳ و ۲۸ میلی‌متر بود و در غلظت‌های بالاتر (۱۰۰ میکروگرم) به‌طور معنی‌داری بیشتر بود و همچنین این باکتری در برابر پنی‌سیلین ۱۰ (P10) مقاوم بود (جدول ۱، $P < 0.05$). هاله عدم رشد با اندازه‌های ۲۲/۳، ۲۶ و ۱۱/۶ میلی‌متر در برابر هپسیدین نوترکیب در *L. garvieae* در برابر هپسیدین نوترکیب در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم و P10 اندازه‌گیری شد که در غلظت‌های هپسیدین نوترکیب ماهی قرمز به‌طور معنی‌داری بیشتر از P10 بود (جدول ۱، $P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات دو دهه اخیر عملکرد مستقیم و قدرتمند پپتید هپسیدین را علیه طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا، از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها به اثبات رسانده‌اند (Xie et al., 2019; Zhang et al., 2023; Cervera et al., 2024). در راستای بررسی پتانسیل درمانی این پپتید، در مطالعه حاضر، فعالیت ضد باکتریایی پروهپسیدین نوترکیب مشتق از ماهی قرمز علیه سه پاتوژن باکتریایی مهم با روش‌های استاندارد انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) ارزیابی گردید. این پاتوژن‌ها شامل باکتری‌های گرم منفی (*Salmonella enterica*) و گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* و *Lactococcus garvieae*) بود. عفونت‌های ناشی از گونه‌های جنس *Salmonella*، به‌ویژه *S. enterica*، همواره به‌عنوان یک نگرانی عمده بهداشتی و اقتصادی در سطح جهان مطرح بوده‌اند (Traore et al., 2019). این باکتری‌ها نه تنها در دام و طیور، بلکه از بسیاری از گونه‌های ماهی دریایی نیز جدا شده‌اند و به‌عنوان یک خطر زئونوز محسوب می‌شوند. نگرانی اصلی در مورد این پاتوژن، افزایش روزافزون سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های متعارف است؛ به‌طوری که مطالعات متعدد نشان می‌دهند جدایه‌های دریایی اغلب حداقل به یک آنتی‌بیوتیک مقاومت دارند (Kakatkar et al., 2011; Onmaz et al., 2015). در آزمایش‌های حاضر، سویه *S. enterica* مورد استفاده مطابق با دستورالعمل‌های مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) در برابر آنتی‌بیوتیک CP5 مقاومت نشان داد. با این وجود، هپسیدین نوترکیب اثر مهارتی قابل توجهی علیه این باکتری ایجاد کرد. این نتیجه حاکی از آن است که هپسیدین می‌تواند مسیرهای متفاوتی را برای

میزان حساسیت باکتری‌های مختلف به هپسیدین بسته به نوع باکتری تست شده، منشاء هپسیدین، نوع توالی و میزان دوز مورد استفاده متفاوت می‌باشد. چنین تنوعی در پاسخ، لزوماً ضعف نیست، بلکه نشان‌دهنده پیچیدگی برهمکنش میزبان-پاتوژن و امکان بهینه‌سازی پپتید برای اهداف خاص است. در مورد مکانیسم دقیق عمل، اگرچه بسیاری از پپتیدهای ضد میکروبی از طریق تخریب فیزیکی غشای سلولی عمل می‌کنند، شواهد نشان می‌دهد که هپسیدین ممکن است الگوی عمل پیچیده‌تری داشته باشد. با این حال، برای هپسیدین، کشتن باکتری‌ها با یک الگوی واحد نبود و مهار سنتز DNA و پروتئین با ورود به سلول‌ها و تداخل با مولکول‌های مرتبط با متابولیک یکی دیگر از مسیرهای احتمالی به استثنای اختلال غشاء بود (Alvarez et al., 2014; Qiao et al., 2023).

در مجموع، نتایج این پژوهش همراه با شواهد موجود در ادبیات علمی، پتانسیل قوی هپسیدین نوترکیب ماهی قرمز را به‌عنوان یک عامل ضد میکروبی با طیف وسیع، علیه پاتوژن‌های مهم باکتریایی، از جمله سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، تأیید می‌کند. برای حرکت از مرحله آزمایشگاه به سمت کاربردهای عملی و تجاری، تحقیقات آتی باید بر بهینه‌سازی روش‌های تولید با بازده بالا و مقرون به صرفه، ارزیابی جامع سمیت و ایمنی‌زایی (در سلول‌های پستانداران و مدل‌های جانوری)، انجام مطالعات درون تنی برای تعیین کارایی درمانی، دوز مؤثر و فارماکوکینتیک، و شناسایی دقیق‌تر مکانیسم‌های مولکولی عمل آن متمرکز شوند. با توجه به چالش فزاینده مقاومت ضد میکروبی، توسعه و بکارگیری عوامل نوینی مانند هپسیدین، نه تنها یک امکان، بلکه یک ضرورت راهبردی برای حفظ سلامت عمومی و امنیت غذایی به‌شمار می‌آید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از همکاران در آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین امل کمال قدردانی و تشکر را دارند.

هپسیدین بالغ و کامل (به هر دو شکل سنتتیک و نوترکیب) را علیه طیف متنوعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تأیید کرده‌اند (Shirdel et al., 2019; Barroso et al., 2021; Liu et al., 2022; Zhang et al., 2023). پپتیدهای ضد میکروبی با تکامل پاتوژن‌ها تغییر می‌کنند تا بتوانند از بدن در برابر انواع میکروب‌ها دفاع کنند. بنابراین، از ایجاد سویه‌های پاتوژن جهش‌یافته مقاوم به ترکیبات ضد میکروبی جلوگیری می‌کنند. تاکنون گزارشی مبنی بر مقاوم شدن عوامل بیماری‌زا در برابر پپتیدهای ضد میکروبی ارائه نشده است، بنابراین می‌توان از آنها به‌عنوان جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها در حوزه پزشکی و دامپزشکی استفاده کرد (Garvey, 2023; Katzenback, 2015). پپتید سنتتیک هپسیدین ماهی *Pseudosciaena crocea* نیز قادر به کنترل باکتری *A. hydrophila* بوده است (Wang et al., 2009). همکاران (۲۰۰۵) نشان داده‌اند که پپتید سنتتیک هپسیدین ماهی باس راه‌راه هیبرید (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) قادر به مهار باکتری *Tersinia eterocolititica* بوده است، اما قادر به مهار باکتری *S. iniae* حتی تا غلظت ۴۴ میکرومولار نبوده است. همکاران (۲۰۰۵) گزارش دادند که پپتید سنتتیک هپسیدین ماهی *Paralichthys olivaceus* قادر به کنترل باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان از جمله *S. iniae*، *Photobacterium damseale* و *L. garvieae* می‌باشد. همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که هم پپتید سنتتیک و هم پپتید نوترکیب ماهی مداکا (*Oryzias melastigmus*) می‌تواند تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان همچون *A. hydrophila* و *P. stutzeri* را مهار کند. در مطالعات گذشته همچنین مشاهده شده است که هپسیدین نوترکیب ماهی گورخری نیز قادر به مهار باکتری *V. anguillarum* بوده است (Lin et al., 2014).

در مطالعات مختلف فعالیت ضد میکروبی هپسیدین نوترکیب (mature peptide and full-length) و هپسیدین سنتتیک (mature peptide) ثابت شده اما

منابع

Aisen P., Enns C., Wessling-Resnick M. 2001. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33(10), 940-959.

- Álvarez C.A., Santana P.A., Salinas-Parra N., Beltrán D., Guzmán F., Vega B., Acosta F. and Mercado L. 2022. Immune modulation ability of hepcidin from teleost fish. *Animals* 12(12), p.1586.
- Barroso C., Carvalho P., Nunes M., Gonçalves J.F., Rodrigues P.N., Neves J.V. 2021. The era of antimicrobial peptides: use of hepcidins to prevent or treat bacterial infections and iron disorders. *Frontiers in Immunology* 12, p.754437.
- Bondad-Reantaso M.G., MacKinnon B., Karunasagar I., Fridman S., Alday-Sanz V., Brun E., Le Groumellec M., Li A., Surachetpong W., Karunasagar I., Hao B. 2023. Review of alternatives to antibiotic use in aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 15(4), 1421-1451.
- Cai L., Cai J.J., Liu H.P., Fan D.Q., Peng H., Wang K.J. 2012. Recombinant medaka (*Oryzias melastigmus*) pro-hepcidin: Multifunctional characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 161(2), 140-147.
- Chen C.J., Huang Y.C., Shie S.S. 2020. Evolution of multi-resistance to vancomycin, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing persistent bacteremia. *Frontiers in Microbiology* 11, p.1414.
- Douglas S.E. 2011. Antimicrobial peptides and their potential as therapeutants in aquaculture. *Aquaculture Biotechnology*, pp.105-120.
- Garvey M. 2023. Antimicrobial Peptides Demonstrate Activity against Resistant Bacterial Pathogens. *Infectious Disease Reports* 15(4), 454-469.
- Haenen O.L.M., Karunasagar I., Manfrin A., Zncic S., Lavilla-Pitogo C., Lawrence M., Hanson L., Subasinghe R., Bondad-Reantaso M., Karunasagar I., 2020. Contact-zoonotic bacteria of warm water ornamental and cultured fish. *Asian Fisheries Science* 33(S1), 39-45.
- Hirono I., Hwang J.Y., Ono Y., Kurobe T., Ohira T., Nozaki R., Aoki T. 2005. Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *The FEBS journal* 272(20), 5257-5264.
- Hussain A., Sachan S.G. 2023. Fish epidermal mucus as a source of diverse therapeutical compounds. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 29(3), p.36.
- Kakatkar A.S., Pansare L.S., Gautam R.K., Shashidhar R., Karani M., Bandekar J.R. 2011. Molecular characterization of antibiotic resistant Salmonella isolates from Indian foods. *Food Research International*, 44(10), 3272-3275.
- Katzenback B.A. 2015. Antimicrobial peptides as mediators of innate immunity in teleosts. *Biology* 4(4), 607-639.
- Kumar A., Pal D. 2018. Antibiotic resistance and wastewater: Correlation, impact and critical human health challenges. *Journal of environmental Chemical Engineering* 6(1), 52-58.
- Lauth X., Babon J.J., Stannard J.A., Singh S., Nizet V., Carlberg J.M., Ostland V.E., Pennington M.W., Norton R.S., Westerman M.E., 2005. Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and in vivo hepatic response to bacterial infections. *Journal of Biological Chemistry* 280(10), 9272-9282.
- Mohapatra A., Dixit A., Garg L.C., Sahoo P.K. 2019. Hepcidin gene of Indian major carp, *Labeo rohita*: Molecular, structural and functional characterization, and antibacterial activity of recombinant hepcidin. *Aquaculture* 511, p.734218.
- Mohammadzadeh S., Milla S., Ahmadifar E., Karimi, M., Dawood M.A. 2021. Is the use of recombinant cGnRH may be a future alternative to control the fish spawning? Let us go with the goldfish example. *Fish Physiology and Biochemistry* 47(4), 951-960.
- Onmaz N.E., Abay S., Karadal F., Hizlisoy H., Telli N., Al S. 2015. Occurrence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in retail fish samples in Turkey. *Marine Pollution Bulletin* 90(1-2), 242-246.
- Öztürk R.Ç., Ustaoglu D., Ture M., Bondavalli F., Colussi S., Pastorino P., Vela A.I., Kotzamanidis C., Fernandez-Garayzabal, J.F., Bitchava, K. and Terzi, Y., 2024. Epidemiological cutoff values and genetic antimicrobial resistance of *Lactococcus garvieae* and *L. petauri*. *Aquaculture* 593, p.741340.
- Qiao D., Yan Y., Pei C., Zhang J., Zhao X., Jiang X., Zhu L., Zhang J., Li L., Kong X. 2023. Characterization of hepcidin gene and protection of recombinant hepcidin supplemented in feed against *Aeromonas hydrophila* infection in Yellow River carp (*Cyprinus carpio haematopterus*). *Fish & Shellfish Immunology* 139, p.108872.

- Shike H., Lauth X., Westerman M.E., Ostland V.E., Carlberg J.M., Van Olst J.C., Shimizu C., Bulet P., Burns J.C. 2002.** Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *European Journal of Biochemistry* 269(8), 2232-2237.
- Singh B., Arora S., Agrawal P., Gupta S.K. 2011.** Heparin: a novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clinica Chimica Acta* 412(11-12), 823-830.
- Singhal T. 2022.** Antimicrobial Resistance: The Other Pandemic! Based on 9th Dr. IC Verma Excellence Award for Young Pediatricians Delivered as Oration on 19th Sept. 2021. *Indian Journal of Pediatrics* 89(6), 600-606.
- Torres-Corral Y., Santos Y. 2022.** Predicting antimicrobial resistance of *Lactococcus garvieae*: PCR detection of resistance genes versus MALDI-TOF protein profiling. *Aquaculture* 553, p.738098.
- Traoré O., Nyholm O., Siitonen A., Bonkougou I.J.O., Traoré A.S., Barro N., Haukka K. 2015.** Prevalence and diversity of *Salmonella enterica* in water, fish and lettuce in Ouagadougou, Burkina Faso. *BMC Microbiology* 15, 1-7.
- Ventola C.L. 2015.** The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics* 40(4), p.277.
- Wang K.J., Cai J.J., Cai L., Qu H.D., Yang M., Zhang M. 2009.** Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide. *Peptides*, 30(4), pp.638–646.
- Wang, Y.D., Kung, C.W., Chi, S.C., Chen, J.Y., 2010.** Inactivation of nervous necrosis virus infecting grouper (*Epinephelus coioides*) by epinecidin-1 and hepcidin 1–5 antimicrobial peptides, and downregulation of Mx2 and Mx3 gene expressions. *Fish & Shellfish Immunology* 28(1), 113-120.
- Xie J., Obiefuna V., Hodgkinson J.W., McAllister M., Belosevic M. 2019.** Teleost antimicrobial peptide hepcidin contributes to host defense of goldfish (*Carassius auratus* L.) against *Trypanosoma carassii*. *Developmental & Comparative Immunology* 94, 11-15.
- Zhang Z., Zhou Y., Zhang H., Du X., Cao Z., Wu Y., Liu C., Sun Y. 2023.** Antibacterial activity and mechanisms of TroHepc2-22, a derived peptide of hepcidin2 from golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *International Journal of Molecular Sciences* 24(11), p.9251.

Evaluation of the antimicrobial activity of recombinant Goldfish (*Carassius auratus*) Pro-Hepcidin against gram-positive and gram-negative bacteria

Maryam Gheisari¹, Fatemeh Peyravii Ghadikolaii*¹, Rahem Khoshbakht*², Poulin Shohreh³, Hami Kaboosi⁴

¹Department of Biology, QaS.C., Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

²Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

³Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

⁴Department of Microbiology, Am.C., Islamic Azad University, Amol, Iran.

*Corresponding author: fpeyravii@gmail.com; r.khoshbakht@ausmt.ac.ir

Received: 13.Nov.2025

Accepted: 21.Dec.2025

Abstract

The increasing prevalence of antibiotic-resistant pathogenic bacteria has highlighted the urgent need for alternative antimicrobial agents. Antimicrobial peptides, including hepcidin, are key components of the innate immune system of vertebrates and represent promising candidates in this context. The present study aimed to produce full-length recombinant pro-hepcidin from goldfish (*Carassius auratus*) and to evaluate its antibacterial activity against selected Gram-positive and Gram-negative bacteria. For this purpose, the complete pro-hepcidin gene sequence was retrieved, codon-optimized, fused with a histidine tag, cloned into the pET28a expression vector, and expressed in *Escherichia coli* (BL21) Rosetta. The recombinant protein was subsequently purified and its antimicrobial activity was assessed against *Salmonella enterica* (Gram-negative), *Staphylococcus aureus*, and *Lactococcus garvieae* (Gram-positive) using the disk diffusion method and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC). The results demonstrated that recombinant pro-hepcidin exhibited significant inhibitory effects against all tested bacteria, with MIC values of 50, 25, and 25 µg/mL for *S. enterica*, *S. aureus*, and *L. garvieae*, respectively. Moreover, clear and statistically significant inhibition zones were observed in the disk diffusion assay, even against bacterial strains showing resistance to conventional antibiotics. Overall, these findings indicate that recombinant goldfish pro-hepcidin possesses broad-spectrum antibacterial activity and may serve as a promising candidate for the development of novel antimicrobial agents as alternatives to antibiotics, particularly in medical and aquaculture application.

Keywords: Pro-Hepcidin, Gold fish, Aquaculture pathogens, Antibacterial activity, Alternative to antibiotics