

Evaluation of plant-derived small molecules targeting FnBPA and sortase A of *Staphylococcus aureus* through molecular docking and minimum inhibitory concentration assays

Reza Tohidi 

*Corresponding author: Assistant professor, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, University of Torbat-e Jam, Iran. E-mail: r.tohidi@tjamcaas.ac.ir

Kiarash Ghazvini 

Professor, Department of Microbiology and Virology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. E-mail: ghazvinik@mums.ac.ir

Marzieh Gharouni 

Assistant professor, Metabolic Syndrome Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. E-mail: gharouniM4031@mums.ac.ir

Mohammadreza Nassiri 

Professor, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: nassiry@um.ac.ir

Abstract

Objective

Mastitis, an inflammation of the mammary glands, is a common infectious disease of dairy cows worldwide. Controlling this disease is challenging due to the emergence of antibiotic resistance. Using alternative or complementary compounds alongside antibiotics can be a sustainable solution for preventing and treating this disease. This study aimed to evaluate the effectiveness of plant-derived micromolecules in inhibiting *Staphylococcus aureus*, an important cause of mastitis, using molecular docking and determining the minimum inhibitory concentration (MIC).

Materials and methods

The 3D structures of the target proteins, including FnBPA and sortase A, were extracted from structural databases. After modeling and energy optimization, the structures were validated. A library of 460 plant-derived micromolecules was collected from reliable databases, and 3D structures were prepared for each molecule. Initial screening of the compounds was performed using computational tools based on pharmacodynamic properties and ADMET indices. Then, molecular docking was performed using PyRx version 0.8 software to investigate ligand-receptor interactions and calculate binding energies. Finally, the minimum inhibitory concentration (MIC) of two selected compounds, curcumin and indigo carmine, against *Staphylococcus aureus* in vitro was determined using the agar dilution method.

Results

The results of the protein structure validation process confirmed the quality of the models. Among 460 compounds, several small molecules with favorable binding energies in the range of -6 to -10 kcal/mol were identified. Compounds such as indigo, gliasperin A, sanguinarine,

camptothecin, and indigo carmine exhibited the strongest binding affinity to FnBPA due to hydrogen bonds and stable hydrophobic interactions with receptor amino acids. Sortase A formed hydrogen and hydrophobic bonds with several small molecules whose binding energies ranged from -6.4 to -7.3 kcal/mol. In vitro results showed that curcumin and indigo carmine inhibited bacterial growth; their MIC values indicated effective antibacterial activity.

Conclusions

The findings of this study illustrated that several plant-derived micromolecules can effectively inhibit key pathogenic factors of *Staphylococcus aureus*. Combining computational and experimental results suggest that these compounds are promising candidates for the development of novel strategies to control mastitis and reduce reliance on antibiotics. They can also help address the growing challenge of antibiotic resistance.

Keywords: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, small molecule, molecular docking, MIC.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Tohidi, R., Ghazvini, K., Gharouni, M., & Nassiri M. (2026). Evaluation of plant-derived small molecules targeting FnBPA and sortase A of *Staphylococcus aureus* through molecular docking and minimum inhibitory concentration assays. *Agricultural Biotechnology Journal*, 18(4), 87-110.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(4), 87-110.

DOI: 10.22103/jab.2026.13660.1882

Received: May 13, 2026.

Received in revised form: July 20, 2026.

Accepted: July 21, 2026.

Published online: August 30, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.



© the authors

Introduction

Bovine mastitis is one of the most common and costly infectious diseases in the livestock industry. It significantly affects milk production, dairy product quality and general herd health. It is mainly caused by bacterial agents and occurs in animals with high milk production. Among these agents, *Staphylococcus aureus* is recognized as one of the most important pathogens. Due to the ability of this bacterium to adhere to host tissues, form biofilms and evade the immune response, the disease is difficult to control. Antibiotics have been used excessively in recent years and it has led to an increase in antibiotics resistance in infectious bacteria and has reduced the effectiveness of conventional treatments. Accordingly, it is important to explore alternative or complementary compounds, particularly those of natural origin. Plant-derived micromolecules are considered promising sources of novel antibacterial agents because of their structural diversity, environmental compatibility, and broad range of biological activities. Advances in computational approaches, particularly molecular docking, have enabled the rapid and cost-effective investigation of interactions between ligands and protein targets. Bacterial virulence factors play a crucial role in pathogenicity and are closely associated with inflammatory responses in the mammary gland. Among these, proteins such as fibronectin-binding protein A (FnBPA) and sortase A of *Staphylococcus aureus* are regarded as promising drug targets because of their essential roles in bacterial adhesion and virulence. Therefore, this study aimed to identify and

evaluate plant-derived micromolecules with inhibitory potential against these proteins. We used computational methods and validated their antibacterial activity through *in vitro* experiments.

Materials and methods

In this study, the 3D structures of target proteins, including FnBPA and sortase A, were extracted from structural databases. In cases where the complete structure was not available, homology modeling methods were used to predict it, and the resulting models were evaluated using structural validation tools to ensure their accuracy and stability. In the next step, a library of 460 plant-derived micromolecules was collected from reliable databases and their 3D structures were prepared and optimized. For initial screening, the pharmacokinetic and toxicity properties of these compounds were investigated using pharmacokinetic criteria and ADMET indices to eliminate inappropriate compounds. Molecular docking was subsequently performed using PyRx software (version 0.8). Interactions between ligands and target proteins, binding energies, and interactions with key amino acid residues were analyzed. Docking results were ranked according to binding affinity (lowest binding energy) and the nature of the ligand–protein interactions, including hydrogen bonds and hydrophobic interactions. Top-performing compounds were selected for further analysis. In the experimental section, two commercially available compounds that revealed favorable molecular docking results were selected to evaluate their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using agar dilution methods. *Staphylococcus aureus* was cultured under standard laboratory conditions. Effects of different compound concentrations on bacterial growth were assessed. To ensure the accuracy and reproducibility of the results, all experiments were performed in duplicate.

Results

Validating protein structures indicated that predicted models were of sufficient quality for molecular docking studies. Molecular docking analyses revealed that several numbers of 460 micromolecules showed favorable binding affinities toward target proteins. Binding energies of all 460 micromolecules ranged from -1.1 to -9.8 kcal/mol for FnBPA and from -0.9 to -7.3 kcal/mol for sortase A. Micromolecules with binding energies between -6 and -10 kcal/mol were selected for both proteins, they signified strong binding affinity to target proteins. Among compounds evaluated, indigo, gliasperin A, sanguinarine, camptothecin, and indigo carmine exhibited the strongest binding affinities to FnBPA. Their binding energies were -9.8 , -9.6 , -9.4 , -9.2 , and -8.9 kcal/mol, respectively. These compounds interacted with key amino acids within the active site and formed stable ligand–protein complexes through hydrogen bonds and hydrophobic interactions. In the present study, curcumin formed three hydrogen bonds with sortase A, one of which was with arginine 197 in the active site. This small molecule, which is a polyphenolic compound in turmeric, has been reported to have antibacterial effects in several studies. Other small molecules, such as sanguinarine, phaseollidin, phaseolin, and sugeroside, showed good binding energy with the receptor. On the other hand, they only contained hydrophobic bonds and were not located in the active site of sortase A. Arginine 197 crystallized hydrophobic bonds with phaseollidin, sanguinarine, and camptothecin in the active site of sortase A. Although these bonds are weaker than hydrogen bonds, they may still inhibit the receptor. Structural analyses showed that the arrangement of these ligands in the binding site could disrupt normal function of the protein and prevent bacterial adhesion to host cells. *In vitro*, MIC determinations illustrated that curcumin and indigo carmine significantly inhibited the growth of

Staphylococcus aureus. Both compounds inhibited bacterial growth at certain concentrations, even though their efficacy was different. These results were consistent with molecular docking results, which can indicate that compounds with low binding energy have favorable antibacterial activity.

Conclusions

The results of this study indicated that the simultaneous use of computational and laboratory approaches is an effective method for identifying new antibacterial compounds. The plant-derived micromolecules investigated in this study showed promise in inhibiting the pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. They were especially those with high binding energies and stable interactions with essential bacterial proteins. Validation of the antibacterial activity of these compounds in vitro reinforces the importance of results obtained from molecular docking. It also demonstrates that these methods can serve as initial screening tools in drug discovery process. Assuming increasing prevalence of antibiotic resistance and limitations of current therapeutic approaches, these natural compounds may represent as promising alternatives or complementary options to improve management of bovine mastitis. However, further studies are required before these compounds can be translated into practical applications. They include comprehensive evaluations of their toxicity, stability, pharmacokinetic properties, and in vivo efficacy. Overall, this study provides a foundation to identify novel natural antibacterial agents to control bacterial infections in veterinary medicine and supports future development of plant-based therapeutics.

Author contributions

Conceptualization, Reza Tohidi and Mohammadreza Nassiri; Methodology, Reza Tohidi, Marzieh Gharouni and Kiarash Ghazvini; Investigation, Reza Tohidi, Mohammadreza Nassiri; Formal analysis, Reza Tohidi and Marzieh Gharouni; Data curation, Reza Tohidi and Marzieh Gharouni; Writing-original draft preparation, Reza Tohidi; Writing-review and editing, Reza Tohidi, Marzieh Gharouni and Kiarash Ghazvini. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data availability statement

Data are available from the corresponding author on request.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the University of Torbat-e Jam and the Microbiology Laboratory of Mashhad University of Medical Sciences for their support and collaboration during this study.

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

This article was financially supported by the University of Torbat-e Jam, Iran, TP 14051.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

بررسی قابلیت ریزمولکول‌های گیاهی در مهار پروتئین‌های FnBPA و سورتاز A باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش‌های داکینگ مولکولی و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی

 **رضا توحیدی**

*نویسنده مسئول: استادیار، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی تربت جام، ایران. رایانامه: r.tohidi@tjamcaas.ac.ir

 **کیارش قزوینی**

استاد، بخش میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: ghazvinik@mums.ac.ir

 **مرضیه قارونی**

استادیار، مرکز تحقیقات سندرم متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران. رایانامه: gharouniM4031@mums.ac.ir

 **محمدرضا نصیری**

استاد، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران. رایانامه: nassiryf@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۲۳ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۵/۰۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۲۹

چکیده

هدف: ورم پستان یک بیماری عفونی شایع گاوهای شیری در سراسر جهان است که موجب التهاب غدد پستانی می‌شود. کنترل این بیماری به دلیل ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی چالش برانگیز است. معرفی ترکیبات جایگزین یا مکمل آنتی بیوتیک‌ها می‌تواند راه حلی پایدار در پیشگیری و درمان این بیماری باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثربخشی میکرومولکول‌های گیاهی در مهار باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، یکی از عوامل مهم ایجاد ورم پستان، از طریق داکینگ مولکولی و تعیین حداقل غلظت مهار (MIC) بود.

مواد و روش‌ها: ساختارهای سه‌بعدی پروتئین‌های هدف شامل FnBPA و sortase A، از پایگاه‌های داده ساختاری استخراج و پس از مدل‌سازی و بهینه‌سازی انرژی، ساختارها اعتبارسنجی شدند. کتابخانه‌ای متشکل از ۴۶۰ میکرومولکول گیاهی از پایگاه‌های داده معتبر جمع‌آوری و ساختارهای سه‌بعدی برای آن‌ها تهیه شد. غربالگری اولیه ترکیبات با استفاده از ابزارهای محاسباتی و بر اساس خواص فارماکودینامیکی و شاخص‌های ADMET انجام شد. سپس، داکینگ مولکولی با نرم‌افزار PyRx نسخه ۰.۸ برای بررسی برهمکنش‌های لیگاند-گیرنده و محاسبه انرژی‌های اتصال انجام گرفت. در نهایت، دو ترکیب انتخاب شده، کورکومین و ایندیگو کارمین، با استفاده از روش رقت در آگار برای تعیین حداقل غلظت مهار (MIC) در برابر استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شدند.

نتایج: نتایج اعتبارسنجی ساختار پروتئین، کیفیت مدل‌ها را تأیید کرد. چندین مولکول کوچک با انرژی‌های اتصال مطلوب (در محدوده ۶- تا ۱۰- کیلوکالری بر مول) در بین ۴۶۰ ترکیب شناسایی شدند. ترکیباتی مانند ایندیگو، گلیاسپرین A، سانگوینارین، کامپتوسین و ایندیگو کارمین قوی‌ترین میل اتصال را به FnBPA نشان دادند که ناشی از پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش‌های آبگریز پایدار با آمینواسیدهای گیرنده بودند. سورتاز A با چندین مولکول کوچک که انرژی‌های اتصال آنها از ۶.۴- تا ۷.۳- کیلوکالری بر مول متغیر بود، پیوندهای هیدروژنی و آبگریز تشکیل داد. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که کورکومین و ایندیگو کارمین رشد باکتری را مهار کرده و مقادیر MIC آنها نشان‌دهنده فعالیت ضد باکتریایی موثر آنها بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که برخی از ریزمولکول‌های گیاهی به طور قابل توجهی عوامل بیماری‌زای کلیدی در استافیلوکوکوس اورئوس را می‌توانند مهار کنند. ترکیب نتایج محاسباتی و آزمایشگاهی نشان می‌دهد که این مولکول‌ها می‌توانند کاندیداهای امیدوارکننده‌ای برای توسعه استراتژی‌های جدید کنترل ورم پستان، کاهش وابستگی به آنتی‌بیوتیک‌ها و راه حلی برای چالش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشند.

کلیدواژه‌ها: ورم پستان، استافیلوکوکوس اورئوس، ریزمولکول، داکینگ مولکولی، حداقل غلظت مهارکنندگی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: توحیدی رضا، قزوینی کیارش، قارونی مرضیه، نصیری محمدرضا (۱۴۰۵) بررسی قابلیت ریزمولکول‌های گیاهی در مهار پروتئین‌های FnBPA و سورتاز A باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش‌های داکینگ مولکولی و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۴)، ۸۷-۱۱۰.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

شیر و محصولات لبنی تامین کننده بسیاری از مواد مغذی ضروری انسان است. پروتئین شیر محرک IGF-1^۱ است که برای رشد طولی و تراکم استخوان در دوران کودکی لازم است (Givens, 2020). تولید شیر گاو طی دهه‌های گذشته افزایش داشته و همچنان این افزایش با واسطه اصلاح ژنتیکی، غذایی و بهداشتی و همچنین افزایش تعداد مزارع و یا تولید به ازای هر گاو ادامه دارد (USDA, 2025). افزایش تولید شیر با افزایش بعضی بیماری‌ها در گاو مانند ورم پستان ارتباط معنی‌داری دارد (Fleischer et al., 2001). ورم پستان یک پاسخ تورمی بافت پستانی ناشی از آسیب فیزیکی یا آلودگی‌های میکروارگانیزمی است (Cheng & Han, 2020). این بیماری بسیار شایع است و باعث کاهش سودآوری صنعت گاو شیری می‌شود (Gomes & Henriques, 2016). به طور متوسط، سود از دست رفته ناشی از این بیماری حدود ۱۴۷ دلار به ازای هر گاو در سال برآورد می‌شود که عمدتاً نتیجه کاهش تولید و حذف دام است (Hogeveen et al., 2019). تخریب بافت پستانی باعث می‌گردد که تولید شیر تا هفتاد درصد کاهش یابد. ورم پستان به سه شکل کلینیکال، تحت کلینیکال و مزمن وجود دارد. عوارض نوع کلینیکال آشکار است و

¹ Insulin-like Growth Factor 1

شامل پستان متورم و قرمز، تب و وجود لخته در شیر می‌شود (Khan & Khan, 2006). علائم ورم پستان تحت کلینیکی خیلی آشکار نیست ولی موجب کاهش تولید شیر و افزایش سلول‌های سوماتیک شیر می‌گردد (Abebe et al., 2016). علاوه بر آن که ورم پستان تولید شیر را کاهش می‌دهد، باعث افزایش هزینه‌های درمانی نیز می‌شود. ورم پستان توسط گروه زیادی از باکتری‌ها شامل کوکسی‌های گرم مثبت، باسیل‌های گرم منفی و مایکوپلاسما بوویس ایجاد می‌شود. در این میان کوکسی‌های گرم مثبت و باسیل‌های گرم منفی مهمترین گروه پاتوژنی هستند. این باکتری‌ها قادرند عوامل تهاجمی متعددی برای تسهیل تشکیل کلنی و ایجاد عفونت در بافت پستان گاوهای شیری تولید کنند. به علاوه، استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس آگالکتیه می‌توانند در بافت غدد پستانی گاوهای بیمار برای مدت طولانی باقی بمانند، در شیر پخش شوند و از طریق ماشین شیردوشی و دست کارگران و حوله‌ها به گاوهای سالم منتقل شوند (Keane, 2019). سلول‌های اپیتلیال پستان گاو (bMECs) مهمترین هدف باکتری‌های عفونت‌زا هستند. فاکتورهای تهاجمی باکتری‌ها اغلب TLR²ها یا گیرنده‌های NOD-like³ روی bMECها را تحریک کرده و سیستم ایمنی ذاتی در غدد پستانی را تحریک می‌کنند (Tong et al., 2025). فاکتورهای تهاجمی نقش حیاتی در افزایش بیماری‌زایی باکتری داشته و همبستگی زیادی با پاسخ‌های تورمی درون غدد پستانی دارند (Johnzon et al., 2016). استافیلوکوکوس اورئوس یک گونه گرم مثبت، پروکسیداز-و کوآگولاز مثبت، خوشه‌ای شکل، غیر محرک و بی‌هوازی اختیاری بدون اسپور است که در حین شیردوشی بین گاوها منتشر می‌شود (Vrieling et al., 2015). این باکتری می‌تواند موجب ورم پستان کلینیکی شود، ولی بیشتر نوع تحت کلینیکی و اغلب مزمن بیماری را همراه با افزایش SCC⁴ موجب می‌گردد (Exel et al., 2022). اتصال به سلول‌های bMEC احتمالاً یک مکانیسم کلیدی در بیماری‌زایی استافیلوکوکوس اورئوس است (Pereyra et al., 2016). این باکتری از اجزای متعدد تشخیص دهنده سطحی برای تشکیل کلنی در bMECs، شامل پروتئین اتصال فیبرونکتین A (FnBPA)، پروتئین اتصال فیبرونکتین B (FnBPB)، کلامپینگ فاکتور A (ClfA)، پروتئین‌های چسبنده کلاژن (Cna) و پروتئین A (SpA) استفاده می‌کند (Artursson et al., 2016; Ashraf et al., 2017). در غدد پستانی گاو، چسبیدن و تهاجم باکتری عمدتاً توسط FnBPA و FnBPB انجام می‌شود. آزمایش سویه‌های جهش یافته فاقد FnBPs نشان داد که آن‌ها توانایی کمتری برای تشکیل کلنی در غدد پستانی موش‌ها داشتند که تایید می‌کند FnBPs فاکتور تهاجمی مهمی برای تشکیل کلنی باکتری در غدد پستانی هستند (Brouillette et al., 2003). روش اصلی مقابله با بیماری ورم پستان استفاده از آنتی بیوتیک است. هرچند، گزارش‌های متعددی از افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک وجود دارد (Kovacevic et al., 2022; Pascu et al., 2022). ضمن آن که باقیمانده آنتی بیوتیک در شیر برای سلامتی انسان نگران کننده است. واکسیناسیون نیز به عنوان یکی از روش‌های پیشگیری معرفی شده است. هرچند، موفقیت آن با محدودیت‌هایی رو به رو است (Talbot & Lacasse, 2005). طی قرن ۲۱ روش‌های جایگزینی برای مقابله با ورم پستان در حال توسعه بوده است. نانوتراپی و استفاده از ذرات نانو در انتقال دارو، کاربرد باکتریوفاژها (Sharun et al., 2021)، گیاهان دارویی (Lopes et al., 2020)، پپتیدهای ضد باکتری (Zhang et al., 2021) و مولکول‌های کوچک از جمله این روش‌ها هستند. استفاده از مولکول‌های کوچک به عنوان یک رویکرد نوین در درمان و کنترل عفونت‌های باکتریایی، به‌ویژه ورم پستان گاوی، مورد توجه بسیاری از

² Toll like receptors³ NOD-like receptors⁴ Somatic cell count

محققان قرار گرفته است. این ترکیبات می‌توانند با هدف قرار دادن مسیرهای متابولیک یا ساختارهای حیاتی باکتری‌ها، جایگزین یا مکمل آنتی بیوتیک‌های سنتی باشند. برای نمونه، یک مولکول کوچک جدید (PHT-427) با فعالیت ضد استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده که پتانسیل بالایی در درمان ورم پستان گاوی نشان داده است (Shin et al., 2021). همچنین، برخی از پپتیدهای سنتتیک کوتاه و مولکول‌های شبه‌لاکتوفرین توانسته‌اند نقش ضد التهابی یا ضد میکروبی ایفا کنند، هرچند کارایی آن‌ها بسته به ساختار متفاوت است (Komine et al., 2006; Pei et al., 2025). در کنار این موارد، استفاده از نانوذرات و لیزوپپتیدها نیز به عنوان جایگزین‌های آنتی بیوتیکی در درمان ورم پستان پیشنهاد شده است (Algharib et al., 2020). کاهش مقاومت میکروبی و کاهش دورریزی شیر از مزایای مهم این دسته درمان‌ها به شمار می‌روند (Gomes & Henriques, 2016; Tomanic et al., 2023). شبیه‌سازی‌های کامپیوتری و داکینگ مولکولی با بررسی بیوانفورماتیکی برهمکنش لیگاند-رستپورها کمک زیادی در جهت شناسایی ترکیبات موثر دارویی، طراحی پپتیدهای ضد میکروبی جدید و غربالگری تعداد زیادی ترکیب منتخب می‌کند. این تکنیک‌ها به همراه فعالیت‌های آزمایشگاهی باعث شناسایی ترکیبات موثر دارویی می‌شوند (Theerawatanasi et al., 2021). با توجه به نقش کلیدی FNBPA در برهمکنش‌های سلول با سلول هوموفیلیک و تجمع بیوفیلیم‌های باکتریایی (Speziale & Pietrocola, 2020) و همچنین، ایجاد قابلیت تهاجمی و بیماری‌زایی آنزیم سورتاز A (Sortase A) برای باکتری (Nitulescu et al., 2017)، این دو پروتئین می‌توانند انتخاب مناسبی برای مطالعات داکینگ مولکولی باشند. بنابراین، مطالعه حاضر امکان به کارگیری مولکول‌های کوچک را در کنترل استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد ورم پستان گاو با قابلیت مهار FNBPA و سورتاز A به روش داکینگ مولکولی و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی بررسی می‌کند و جایگزینی را برای پشتیبانی از توسعه درمان جدید ورم پستان گاو ارائه می‌دهد.

مواد و روش‌ها

ابتدا ساختار کریستالی FNBPA از بانک داده RCSB (www.rcsb.org) با کد 4B5Z استخراج شد. آمینواسیدهای مفقود در ساختار کریستالی با استفاده از نرم افزار MODELLER V. 10.2 اضافه شدند و ساختار سه بعدی آن ایجاد شد. با استفاده از سرور YASARA (yasara.org/minimizationserver) (Krieger et al., 2009) ساختار پروتئین بهینه شد. ساختار بهینه‌سازی شده با استفاده از سرور SAVES v6.1 (saves.mbi.ucla.edu) کنترل شد. تمام مراحل فوق برای آنزیم سورتاز A با کد 1T2P انجام گرفت. در این مطالعه کتابخانه اولیه‌ای شامل ۴۶۰ مولکول کوچک گیاهی دارای فعالیت زیستی با مطالعه مقالات از پایگاه‌های داده اسکوپوس، پابمد، گوگل اسکالر و... تهیه شد و ساختار سه بعدی آن‌ها از پایگاه داده PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) استخراج گردید. ارزیابی فارماکوکینتیک ترکیبات کوچک مولکولی شامل جذب، توزیع، متابولیسم، دفع و سمیت (ADMET) امری بسیار حیاتی است که حدود قابل قبولی را برای ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ترکیبات کوچک بالقوه دارویی تعیین می‌کند. توسعه دارو مستلزم ارزیابی زودهنگام ADMET در مرحله کشف است؛ مرحله‌ای که در آن چندین کاندیدای دارویی بررسی می‌شوند، اما نمونه‌های فیزیکی محدود هستند. بنابراین، پیش‌بینی‌های درون محاسباتی (in silico) برای ADMET لیگاندهای شناسایی‌شده به صورت مجازی انجام شد. تمامی پروفایل‌های ADMET لیگاندها با

استفاده از نرم افزار DruLiTo تحلیل شدند. شناخته شده ترین قانون مرتبط با داروگونی شامل چهار دستورالعمل تجربی برگرفته از داروهای فاز دوم بالینی است:

الف) $500 \leq \text{وزن مولکولی (الف)}$

ب) $\text{LogP} \leq 5$ (ضریب تقسیم اکتانول/آب)

ج) $5 \leq \text{تعداد دهنده های پیوند هیدروژنی}$

د) $10 \leq \text{تعداد پذیرنده های پیوند هیدروژنی}$

انجام داکینگ مولکولی در سه مرحله انجام گرفت: (۱) معرفی فایل های رسپتور و لیگاند به نرم افزار، (۲) اوپتیمایز باند های هیدروژنی، (۳) محاسبه انرژی واکنش متقابل لیگاند-رسپتور. نرم افزار PyRx V. 0.8 مبتنی بر موتور AutoDock Vina برای آنالیز برهمکنش لیگاند-رسپتور مورد استفاده قرار گرفت و خروجی نرم افزار توسط نرم افزار LigPlot+ V.2.2.9 به تصویر درآمد. در فرآیند داکینگ، الگوریتم جستجوی Lamarckian Genetic Algorithm به کار گرفته شد. مقدار گریدباکس برای رسپتور FnBPA حداکثر در نظر گرفته شد ولی برای آنزیم سورتاز A روی نواحی جایگاه فعال شامل هیستیدین ۸۰، سیستئین ۱۸۴ و آرژنین ۱۹۷ (Jacobitz et al., 2017) متمرکز شد. FnBPA، یک پروتئین چسبنده سطحی است و برخلاف سورتاز A دارای یک جایگاه کاتالیتیکی مشخص و تجمیع یافته نیست. (Stemberk et al. (2014) ناحیه اتصال FnBPA را در حدود ۳۶۳ آمینواسید گزارش کردند. بنابر پیش بینی وب سرور Prankweb (<https://prankweb.cz>) ناحیه اتصال، بین آمینواسید ۳۵ تا ۳۱۲ پراکنده است. از آنجا که هدف این مطالعه شناسایی نواحی بالقوه اتصال ریزمولکول ها و جلوگیری از برهمکنش های چسبندگی با میزبان بود، از روش Blind Docking استفاده شد تا تمام سطح پروتئین برای یافتن جایگاه های اتصال احتمالی مورد بررسی قرار گیرد.

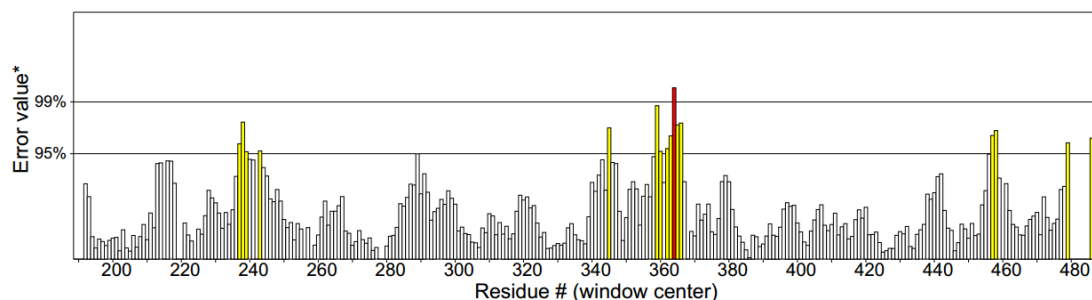
تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC): تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی برای کورکومین و ایندیگو کارمین که به صورت تجاری قابل تهیه بودند به روش آگار دایلووشن با آگار BHI انجام شد. این دو ریزمولکول قابلیت مهار باکتریایی مناسبی طی انجام داکینگ مولکولی نشان دادند. برای این منظور ۵۲ گرم BHI در یک لیتر آب مقطر اضافه و تا حل کامل آگار، حرارت داده شد. سپس محلول در دمای 121°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. محلول کورکومین (Merck: S8455354) در DMSO با رقت سریالی ۲ برابری به نحوی تهیه شد که پس از اضافه شدن در پلیت، غلظت های $256-32 \mu\text{g/mL}$ را ایجاد نماید و با روش مشابه محلول ایندیگوکارمین (Merck: 73015) در آب مقطر با رقت سریالی ۲ برابری آماده شد تا غلظت های $1024-128 \mu\text{g/mL}$ را در پلیت ایجاد نماید. سپس هر محیط کشت با تعداد 10^4 CFU از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به صورت لکه ای تلقیح شد. محیط های کشت به مدت ۲۴ h و دمای 37°C در آنکوباتور قرار گرفتند. پتری دیش های کنترلی شامل فقط آگار BHI و باکتری، و بدون باکتری بودند.

نتایج و بحث

شاخص ERRAT2 برای ساختار بهینه سازی شده FnBPA، ۹۳/۴۴۸ بود. همچنین، شاخص رامچاندرا برای این رسپتور تایید شد (شکل ۱ و ۲ و جدول ۱). نتیجه آزمون فاکتور کیفیت برنامه ERRAT2 در سرور SAVES برای رسپتور سورتاز A،

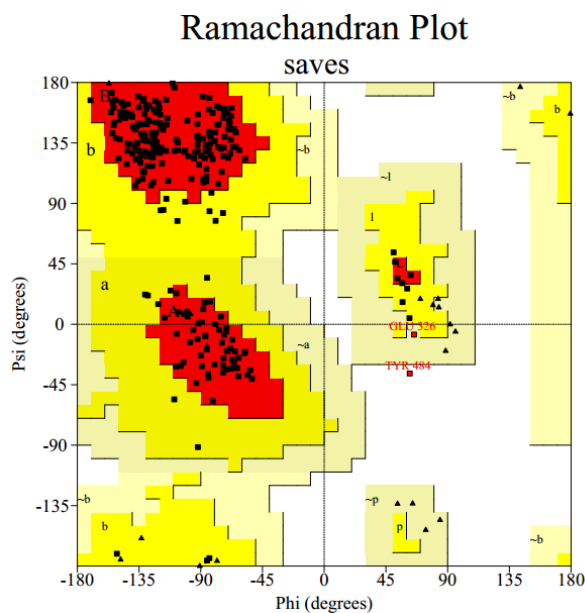
۹۷/۶۷۴ بود و شاخص رامچاندرا نیز برای ساختار بهینه سازی شده این رسپتور تایید شد (شکل ۳ و ۴ و جدول ۱). تعداد آمینواسیدهای رسپتورها که بعد از مدل سازی در بیشترین نواحی مطلوب قرار داشتند برای هر دو رسپتور مورد تایید بود.

Program: ERRAT2
File: Prora Yasara.pdb
Chain#:
Overall quality factor**: 93.448



شکل ۱. نتیجه ارزیابی کیفیت رسپتور FnBPA با برنامه ERRAT2

Figure 1. FnBPA quality assessment with ERRAT2 program



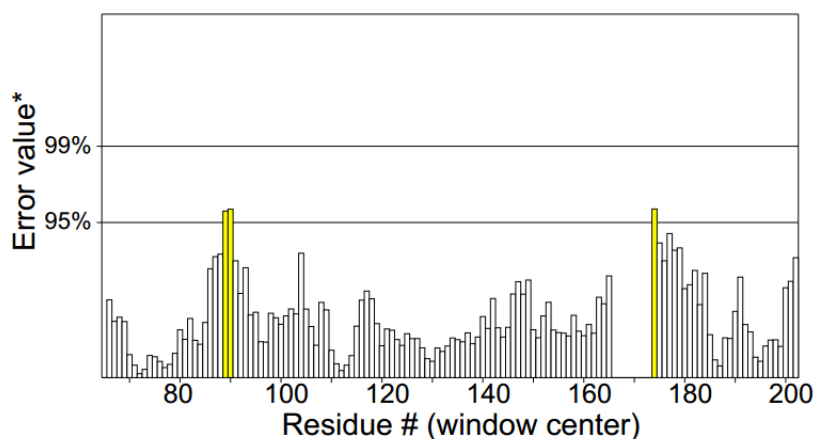
شکل ۲. نتیجه ارزیابی کیفیت رسپتور FnBPA با نمودار رامچاندرا

Figure 2. FnBPA quality assessment by Ramachandran plot

تعداد ۴۶۰ ریزمولکول با رسپتورها داک شدند و نتایج اتصال برتر لیگاند- رسپتور در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده‌اند. خصوصیات ADMET ترکیبات برتر در جدول ۴ نشان داده شده‌اند. انرژی اتصال تمام ۴۶۰ ریزمولکول بین ۱/۱- الی ۹/۸- برای FnBPA، و ۰/۹- الی ۷/۳- برای سورتاز A بود. ریزمولکول‌های دارای انرژی اتصال در محدوده ۶- تا ۱۰- برای هر دو پروتئین انتخاب شدند. چهار ریزمولکول ایندیگو (Indigo)، گلیاسپرین A (Glyasperin A)، سانگوئینارین (Sanguinarine)، کامپوتوسین

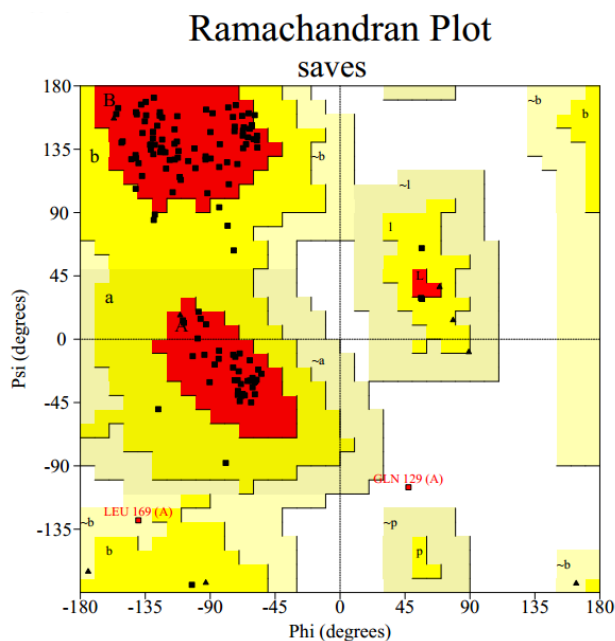
(Camptothecin) و ایندیگو کارمین (Indigo carmine) با انرژی اتصال به ترتیب ۹/۸-، ۹/۶-، ۹/۴-، ۹/۲- و ۸/۹- به رسپتور FnbPA متصل شدند. شکل ۵ و شکل ۱ فایل مکمل برهمکنش FnbPA با لیگاندها را نشان می‌دهند.

Program: ERRAT2
File: 1T2P-SortaseA.pdb
Chain#:A
Overall quality factor**: 97.674



شکل ۳. نتیجه ارزیابی کیفیت رسپتور سورتاز A با برنامه ERRAT2

Figure 3. Sortase A quality assessment by ERRAT2 program



شکل ۴. نتیجه ارزیابی کیفیت رسپتور سورتاز A با نمودار رامچاندرا

Figure 4. Sortase A quality assessment by Ramachandran plot

جدول ۱. تعداد آمینواسیدهای رسپتورها که بر اساس نمودار رامچاندرا در نواحی مجاز و غیر مجاز ساختار مدل شده قرار دارند

Table 1. The number of receptor amino acids that are in the allowed and disallowed regions of the modeled structure based on the Ramachandran plot

Characteristics	ویژگی	FnBPA	Sortase A
تعداد (%) آمینواسیدی که در بیشترین نواحی مطلوب قرار دارند		90.7%	88.9%
Residues in most favoured regions			
تعداد (%) آمینواسیدی که در نواحی مجاز قرار دارند		8.5%	9.5%
Residues in additional allowed regions			
تعداد (%) آمینواسیدی که در نواحی قابل قبول قرار دارند		0.4%	0.8%
Residues in generously allowed regions			
تعداد (%) آمینواسیدی که در نواحی غیر مجاز قرار دارند		0.4%	0.8%
Residues in disallowed regions			

ایندیگو علاوه بر پیوندهای هیدروفوبیک، یک پیوند هیدروژنی با آمینو اسید سرین ۳۵۱ رسپتور FnBPA با فاصله $2/8 \text{ \AA}$ تشکیل داد. گلیاسپرین A دو پیوند هیدروژنی با هیستیدین ۲۲۰ و ایزولوسین ۳۰۷ با فاصله به ترتیب $3/35 \text{ \AA}$ و $3/26 \text{ \AA}$ تشکیل داد. برای سانگوئینارین پیوند هیدروژنی مشاهده نشد ولی کامپوتوسین دو پیوند هیدروژنی با آرژنین ۲۲۴ و هیستیدین ۲۵۴ با فاصله پیوندی به ترتیب $3/03$ و $3/06$ آنگستروم برقرار کرد. به علاوه اتصال ایندیگو کارمین و FnBPA با پنج پیوند هیدروژنی انجام گرفت که می‌تواند موجب استحکام اتصال شود (جدول ۲). پیوندهای هیدروفوبیک با آمینو اسیدهای متعددی در برهمکنش‌های لیگاند-رسپتوری وجود داشتند. ایندیگو در یک ناحیه هیدروفوبیک قرار دارد و پیوندهای واندروالسی با رسپتور دارند. در این جایگاه آمینواسیدهای قطبی و غیر قطبی وجود دارند. آمینواسید ایزولوسین ۳۰۷ پیوند هیدروژنی نسبتاً پایداری با گلیاسپرین A تشکیل داده است و در مجموع این دو پیوند هیدروژنی اتصال پایداری با رسپتور تشکیل می‌دهند. به علاوه، وجود هیستیدین ۲۲۰ و ایزولوسین ۳۰۷ می‌تواند موجب اتصال پایدار قطبی-هیدروفوبیک باشد. دو پیوند هیدروژنی قوی بین آرژنین ۲۲۴ و هیستیدین ۲۵۴ با کامپوتوسین وجود دارند که پایداری اتصال مناسبی ایجاد می‌کنند. آمینواسیدهای فنیل آلانین ۳۰۶ و والین ۳۵۶ درون پیوندهای هیدروفوبیک وجود دارند که می‌توانند پیوندهای قطبی پایداری ایجاد کنند. وجود پرولین نیز می‌تواند باعث پایداری اتصال شود. آنزیم سورتاز A با چند ریزمولکول با انرژی پیوند $6/4$ تا $7/3$ تشکیل پیوند هیدروژنی و هیدروفوبیک داد. تیوفنوزاید (Tebufenozide)، ایندیگو کارمین، فازولیدین (Phaseollidin)، شوگروزاید (Sugeroside)، فازولین (Phaseolin)، کمپوتوسین و کورکومین (Curcumin) توانایی ایجاد پیوند هیدروژنی در دو و یا سه آمینواسید را نشان دادند (جدول ۳). چندین آمینواسید نیز در ایجاد پیوندهای هیدروفوبیک مشارکت داشتند. آرژنین ۱۹۷ با تیوفنوزاید دو پیوند هیدروژنی با فاصله $2/93$ و $3/04$ آنگستروم ایجاد کرد که نشان دهنده اتصال قوی است. یک پیوند هیدروژنی کوتاه با اکسیژن کربونیل مشاهده می‌شود (شکل ۲ فایل مکمل). وجود تریپتوفان ۱۹۴ و پرولین ۱۶۳ در برقراری پیوندهای هیدروفوبیک می‌تواند ایجاد برهمکنش‌های آروماتیک با

حلقه‌های لیگاند ایجاد کنند. این پیوندها می‌توانند باعث تثبیت لیگاند در جایگاه فعال شوند. همچنین، ریزمولکول کورکومین با آرژنین ۱۹۷ سورتاز A پیوند هیدروژنی به فاصله $3/18 \text{ \AA}$ تشکیل داد (شکل ۶). هرچند، دو پیوند هیدروژنی دیگر با آسپارژین ۱۱۴ و سرین ۱۱۶ داشت. به غیر از شوگروزاید، فازولین و گلیاسپرین A، دیگر ریزمولکول‌ها با آرژنین ۱۹۷ پیوند هیدروفوبیک داشتند. ریزمولکول‌های گلیاسپرین A، کامپتوتسین و ایندیگو کارمین با هر دو رسپتور پیوند هیدروژنی برقرار کردند (جدول ۳).

جدول ۲. انرژی اتصال و باندهای هیدروژنی و هیدروفوبیک بین لیگاند و FnBPA

Table 2. Binding energy and hydrogen bonds between ligand and FnBPA

نام لیگاند Ligand	فرمول شیمیایی Chemical formula	انرژی اتصال (Kcal/mol)	اتصال لیگاند- رسپتور با پیوند هیدروژنی Ligand-receptor interaction with hydrogen bonds	برهمکنش لیگاند-رسپتور با پیوندهای هیدروفوبیک Ligand-receptor interaction with hydrophobic bonds
Indigo	$C_{16}H_{10}N_2O_2$	-9.8	Ser351(2.8)	Pro219, Gly222, Gly255, Val256, Phe306, Pro309, Ile352, Glu353, Ser412, Val413, Tyr414
Glyasperin A	$C_{25}H_{26}O_6$	-9.6	Hsd220(3.35), Ile307(3.26)	Pro219, Gly222, Arg224, Val256, Phe306, Pro309, Ser351, Ile352, Phe355, Leu498, Val499
Sanguinarine	$C_{20}H_{14}NO_4^+$	-9.4	-	Pro219, Hsd 220, Gly222, Arg224, Gly255, Val256, Phe306, Pro309, Ser351, Ser412, Leu498, Val499, Pro219, Hsd220, Gly222, Val256, Ser257, Phe306, Phe306, Pro309, Ser351
Camptothecin	$C_{20}H_{16}N_2O_4$	-9.2	Arg224(3.04), Hsd254(3.06)	Hsd220, Gly255, Val256, Phe306, Ile307, Pro309, Tyr337, Leu498
Indigo carmine	$C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$	-8.9	Arg224(3.28), Hsd254(3.31), Ser351(3.02), Ser412(3.93), Val499(2.90)	

آمینواسید سرین رسپتورها توانایی تشکیل پیوند هیدروژنی با ایندیگو، ایندیگو کارمین و کورکومین را نشان دادند. وجود سرین در ساختار پروتئینی امکان تشکیل پیوند هیدروژنی را به دلیل وجود گروه هیدروکسیل ایجاد می‌کند (Simonin et al., 2015). هیستیدین از رسپتور FnBPA با ریزمولکول‌های گلیاسپرین A، کامپتوتسین و ایندیگو کارمین تشکیل پیوند هیدروژنی داد. آرژنین و والین نیز از هر دو رسپتور در تشکیل پیوند هیدروژنی با ریزمولکول‌ها شرکت داشتند. برهمکنش‌های هیدروفوبیکی بین آمینواسیدهای هر دو رسپتور با ریزمولکول‌ها وجود داشت که در آن آمینواسیدهای والین، لوسین و ایزولوسین نیز شرکت داشتند. وجود این سه آمینواسید خوشه شدیداً هیدروفوبیکی ایجاد می‌کند که پایداری زیادی به مولکول می‌دهد (Kathuria et al., 2016).

جدول ۳. انرژی اتصال و باندهای هیدروژنی و هیدروفوبیک بین لیگاند و سورتاز A

Table 3. Binding energy and hydrogen bonds between ligand and Sortase A

نام لیگاند Ligand	فرمول شیمیایی Chemical formula	انرژی اتصال (Kcal/mol)	اتصال لیگاند- رستپور با پیوند هیدروژنی Ligand- receptor interaction with hydrogen bonds	برهمکنش لیگاند-رستپور با پیوندهای هیدروفوبیک Ligand-receptor interaction with hydrophobic bonds
Tebufenozide	$C_{22}H_{28}N_2O_2$	-7.3	Arg197(2.92, 3.04) Asn107(3.05)	Glu105, Asn114, Ser116, Pro163, Val168, Leu169, Thr180, Ile182, Val193, Trp194, Glu195
Indigo carmine	$C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$	-7.3	Asp112(2.87) Arg197(2.92)	Glu105, Glu108, Ser116, Pro163, Leu169, Asp170, Ile182
Phaseollidin	$C_{20}H_{20}O_4$	-7.1	Val168(2.70), Glu195(2.90)	Glu105, Ser116, Pro163, Thr164, Leu169, Thr180, Ile182, Trp194, Arg197, Ile199
Sanguinarine	$C_{20}H_{14}NO_4^+$	-6.9	-	Glu105, Ser116, Pro163, Leu169, Ile182, Val193, Arg197
Coptisine	$C_{19}H_{14}NO_4^+$	-6.9	-	Ser116, Pro163, Leu169, Thr180, Ile182, Val193, Glu195, Arg197, Ile199
Sugereoside	$C_{26}H_{42}O_8$	-6.8	Gly192 (2.90, 3.11)	Pro91, Ala92, Ala104, Glu105, Pro163, Thr164, Val193, Trp194, Glu195
Phaseolin	$C_{20}H_{18}O_4$	-6.7	Trp194(2.99), Glu195(2.79)	Pro163, Val168, Leu169, Thr180, Ile182, Val193, Ile199
Glyasperin A	$C_{25}H_{26}O_6$	-6.6	Trp194(2.61)	Glu105, Asn114, Ser116, Lys162, Thr164, Val168, Leu169, Thr180, Ile182, Val193, Glu195, Ile199
Camptothecin	$C_{20}H_{16}N_2O_4$	-6.5	Trp194(3.07), Glu195(3.05)	Pro163, Thr164, Leu169, Ile182, Val193, Arg197, Ile199
Curcumin	$C_{21}H_{20}O_6$	-6.4	Asn114(2.087), Ser116(3.18), Arg197(3.18)	Pro91, Ala92, Thr93, Glu105, Val168, Thr180, Gly192, Val193, Ile199

آرژنین به دلیل وجود زنجیره جانبی گوانیدینیوم توانایی تشکیل باندهای متعدد الکترواستاتیکی و هیدروژنی با مولکول‌های دیگر دارد (Guler, 2025). نتایج ارزیابی شاخص‌های فارماکوکینتیکی (ADMET) نشان داد که لیگاندهای مورد بررسی دارای ویژگی‌های مطلوب دارومندی بودند (جدول ۴). همچنین، ایندیگو، سانگوینارین، کامپتوتسین، تبوفنوزاید، کاپتیسین، فازولین و فازتولیدین دارای جذب خوراکی بالا بودند. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد استافیلوکوکوس اورئوس در آزمون آگار دایلوشن برای کورکومین $128 \mu\text{g/mL}$ و برای ایندیگو کارمین $512 \mu\text{g/mL}$ تعیین شد (شکل ۷).

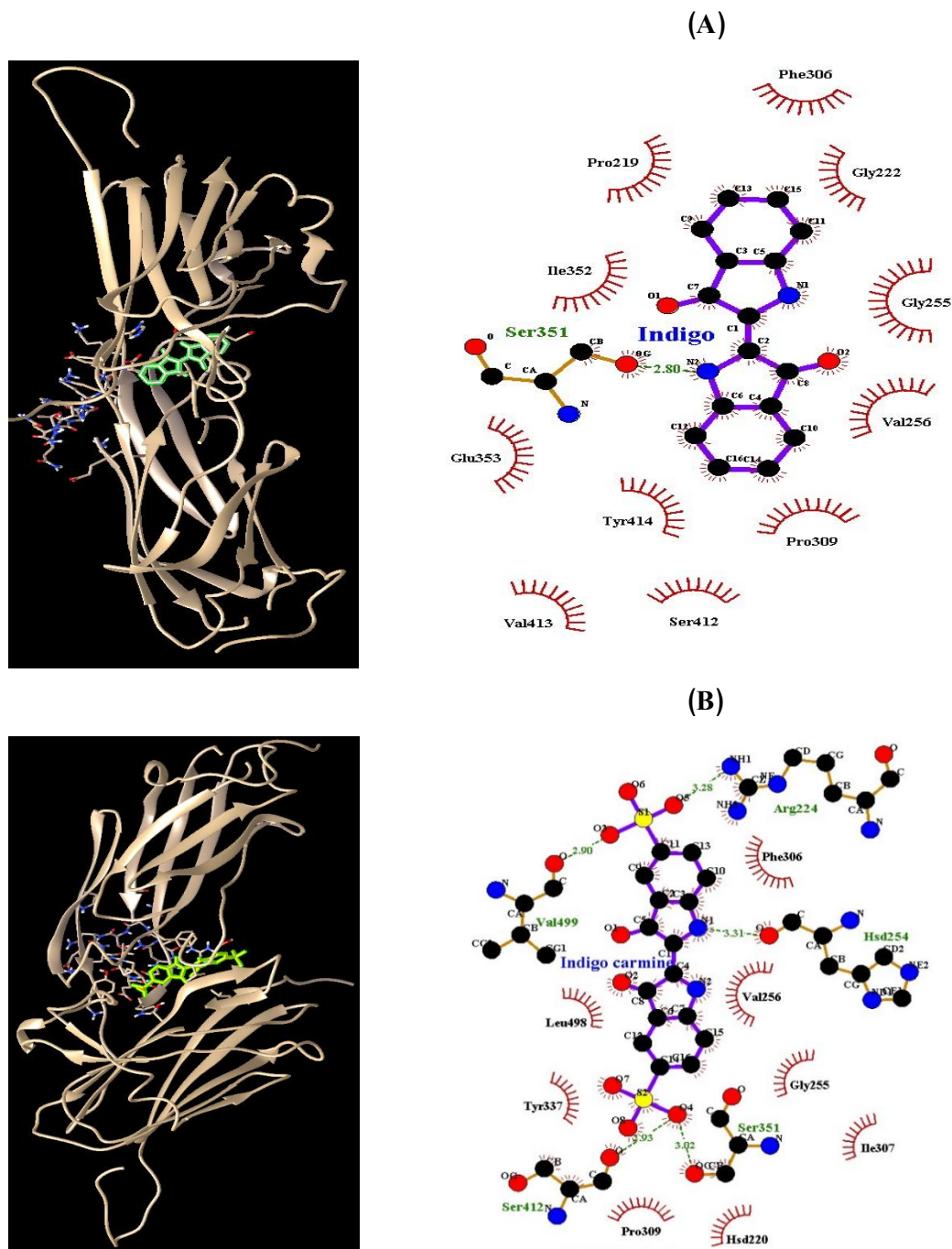
جدول ۴. شاخص‌های فارماکوکینتیک لیگاندها

Table 4. Pharmacokinetic indices of ligands

نام لیگاند Ligand	شاخص ADMET	شاخص جذب رودهای/خوراکی HIA	عبور از سد خونی- مغزی BBB	سمیت کبدی (Human hepatotoxicity) *	CYP450 (especially CYP3A4)**
Indigo	Yes	High	Yes	0.798	-
Glyasperin A	Yes	Low	No	0.538	--
Sanguinarine	Yes	High	Yes	0.161	+++
Camptothecin	Yes	High	No	0.974	--
Indigo carmin	Yes	Low	No	1.0	---
Tebufenozide	Yes	High	Yes	0.683	+++
Phaseollidin	Yes	High	Yes	0.62	++
Coptisine	Yes	High	Yes	0.15	+++
Sugereoside	Yes	High	No	0.402	---
Phaseolin	Yes	High	Yes	0.631	++
Curcumin	Yes	High	No	0.429	---

* سمیت کبدی: 1: مثبت (سمی) و 0: منفی. اعداد بین یک و صفر میزان سمیت را نشان می‌دهند. ** + یعنی مهارکنندگی و - تعداد آن قدرت مهارکنندگی را نشان می‌دهد.

در این مطالعه با کمک فناوری داکینگ مولکولی سعی شد که از بین ۴۶۰ ریزمولکول، آن‌هایی که پتانسیل درمان ورم پستان گاوی را دارند انتخاب شوند. برای تایید اثر ضد باکتریایی ریزمولکول‌های انتخاب شده آزمایش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی انجام شد هرچند، فقط کورکومین و ایندیگو کارمین به صورت خالص و تجاری در دسترس بودند. یک رسپتور سطحی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که یکی از عوامل عفونت‌زای ورم پستان تحت کلینیکی است، انتخاب شد. رسپتور FnBPA نقش مهمی در اتصال به سلول‌های bMEC و ایجاد کلنی دارد (Tong et al., 2025). پروتئین‌های سطحی این باکتری اتصال آمیدی به پل پنتاگلیسینی دیواره سلولی باکتری از طریق دنباله C ترمنال ترئونین دارند (Marraffini et al., 2006). سورتاز A یک پروتئین غشایی نوع II است که با اتصال به پپتیدوگلاپیکان دیواره سلولی به اتصال پروتئین‌های سطحی به غشاء دیواره سلولی باکتری کمک می‌کند (Schneewind & Missiakas, 2019).



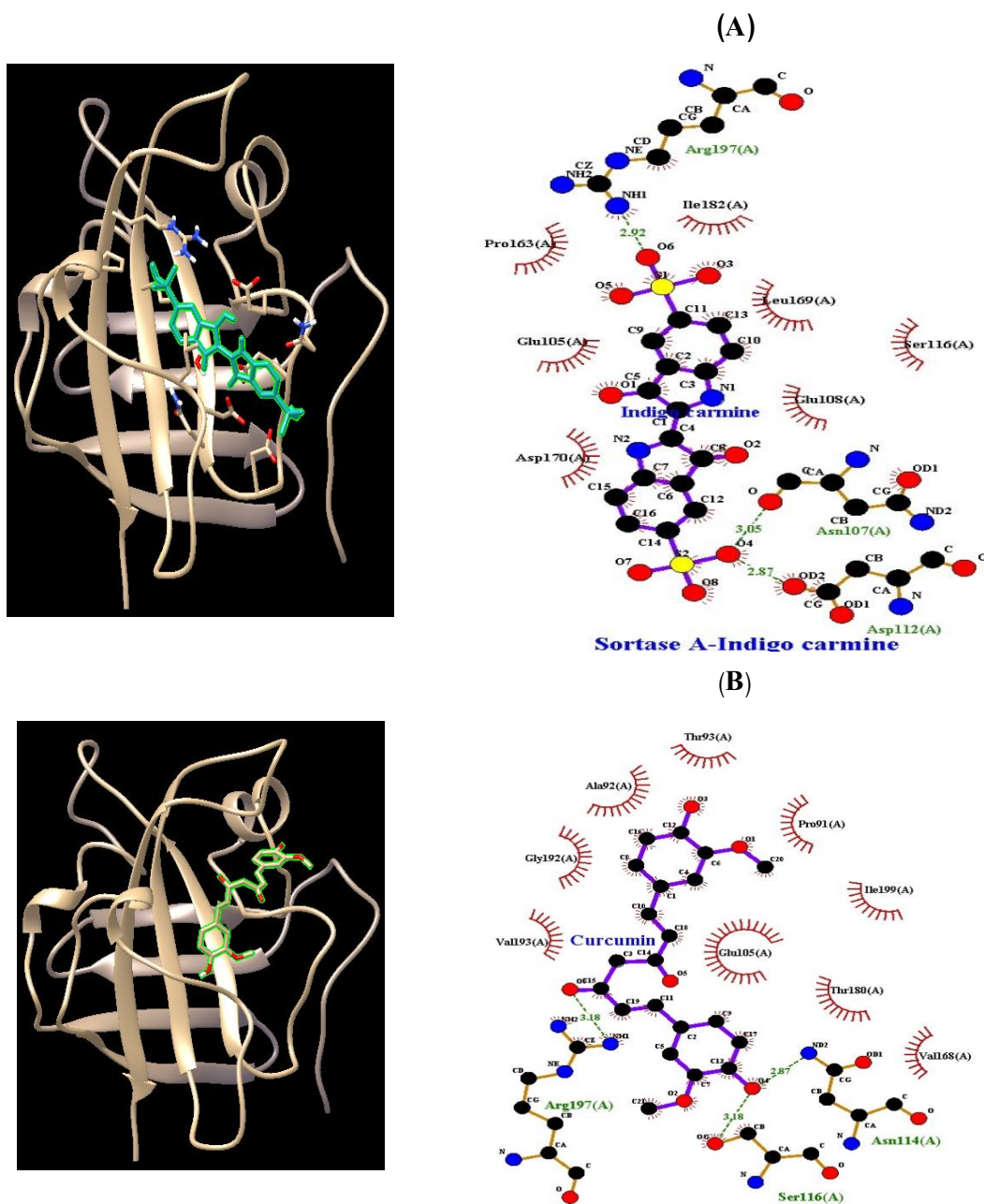
شکل ۵. برهم کنش لیگاند-رستپتور خروجی برنامه ⁺Ligplot (A) ایندیگو-FnBPA، (B) ایندیگو کارمین -

FnBPA

Figure 5. Ligand-receptor interaction output of Ligplot+ program: A) Indigo-FnBPA, B) Indigo carmine-FnBPA

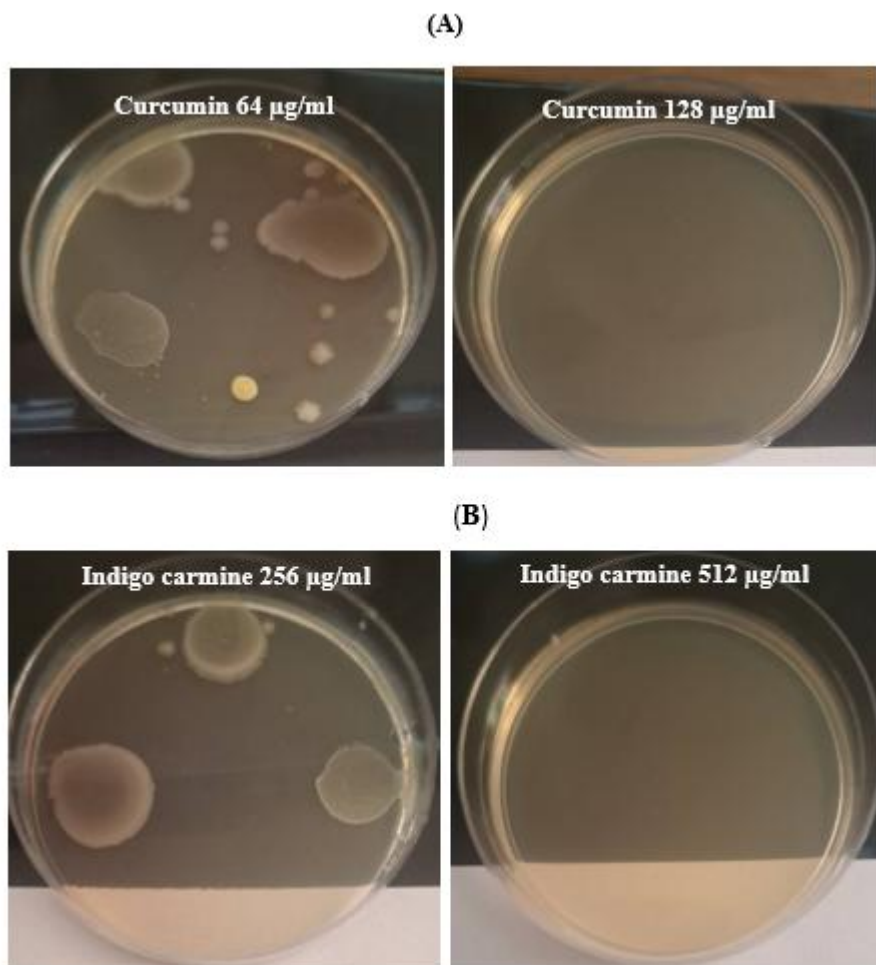
ایندیگو یک رنگ آبی طبیعی است که از برگ برخی گیاهان دارویی مانند پای خرس (Acanthacea)، گیاه هفت بند (Polygonaceae)، شب بو (Brassicaceae) و باقلانیان (Fabaceae) استخراج می شود (Al-Dhabi et al., 2012). در

طب چینی از خواص ضد تورمی، خون سازی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی این ماده استفاده می گردد (Begum et al., 2020). ترکیبی از ایندیگو به نام ایندیگو کارمین خاصیت ضد باکتریوفازی نشان داده است (Raza et al., 2025).



شکل ۶. برهم کنش لیگاند-رسپتور خروجی برنامه Ligplot⁺. A) ایندیگو کارمین-سورتاز A، B) کور کومین-سورتاز A

Figure 6. Ligand-receptor interaction output of Ligplot⁺ program: a) Indigo carmine-sortase A, b) Curcumin-sortase A



شکل ۷. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی با روش آگار دایلوژن. (A) کورکومین، (B) ایندیگو کارمین

Figure 7. Determination of minimum inhibitory concentration by agar dilution method. A) Curcumin, B) Indigo carmine

در مطالعه حاضر، وجود یک پیوند هیدروژنی بین ایندیگو و سرین ۳۵۱ رسپتور FnBPA با فاصله ۲/۸ آنگستروم و همچنین وجود برهمکنش‌های هیدروفوبیک باعث انرژی اتصال ۹/۸- بود که نشان دهنده امکان اتصال محکم لیگاند-رسپتور و مهار رسپتور توسط ایندیگو است. همچنین، وجود پنج پیوند هیدروژنی بین ایندیگو کارمین و FnBPA و سه پیوند هیدروژنی با سورتاز A که یکی از این پیوندها با Arg 197 در جایگاه فعال آنزیم بود نشان از قابلیت این ریزمولکول در کنترل استافیلوکوکوس اورئوس دارد. باندهای هیدروژنی نقش مهمی در حفظ ساختار پروتئین و ترکیبات پروتئین-لیگاند دارند. همه آمینواسیدها می‌توانند به عنوان دهنده یا گیرنده پیوند هیدروژنی نقش داشته باشند. هیستیدین در این میان یک آمینواسید بی هم‌تاست زیرا در شکل‌های خنثی یا بار مثبت و در pH بین ۵ تا ۷ می‌تواند حضور داشته باشد. بنابراین، هیستیدین با سایر ترکیبات آروماتیک و یا قطبی و باردار تشکیل پیوند هیدروژنی می‌دهد (Patronov et al., 2014). اگرچه پیوندهای هیدروژنی در پایداری لیگاند-رسپتور نقش دارند، انرژی آزاد اتصال یک پدیده چند عاملی است که تحت تأثیر اتصالات آبریز، برهمکنش‌های الکترواستاتیک، اثرات حلال، دینامیک ساختاری و پارامترهای هندسی مانند طول و جهت پیوند قرار می‌گیرد (Ferreira de Freitas, & Schapira, 2017). غلظت

مهارکنندگی $512 \mu\text{g/mL}$ برای ایندیگو کارمین علیه استافیلوکوکوس اورئوس تعیین شد. مطالعات زیادی در خصوص خاصیت آنتی باکتریایی این ریزمولکول انجام نشده است. (Raza et al., 2025) خاصیت ضد باکتریوفازی ایندیگو کارمین را گزارش کرد. به علاوه، آزمایشات درون تنی با توجه به شاخص سمیت کبدی زیاد این ترکیب مورد نیاز است و به طور خوراکی نیز قابل مصرف نیست. گلیاسپرین A به عنوان یک ریزمولکول از موم نوعی زنبور عسل (*T. biori Friese*) یا از برگ درخت ماکارانگا در نواحی استوایی استخراج شده است (Ragasa et al., 2015; Arung et al., 2019). برای این ریزمولکول خواص ضد آنتی اکسیدانی و ضد سرطان پوست گزارش شده است (Arung et al., 2019). همچنین، با مهار CKD می‌تواند خاصیت ضد گذار اپیتلیال-مزانشی می و ضد تومری داشته باشد (Liu et al., 2016). وجود دو پیوند هیدروژنی در اتصال گلیاسپرین FNBPA-A می‌تواند نشان دهنده مهار پایدار FNBPA باشد. به علاوه، وجود فنیل آلانین در برهمکنش‌های هیدروفوبیک با حلقه‌های آروماتیک گلیاسپرین A ممکن است استحکام بیشتری از طریق برهمکنش π - π داده باشد (Trujillo et al., 2015). کامپوتوسین به عنوان یک آلکالوئید ضد سرطان شناخته شده و مورد تایید سازمان غذا و داروی آمریکا قرار گرفته است. این ریزمولکول ابتدا از پوست درخت شاد چینی (*Camptotheca acuminata Decne*) به دست آمد (Martino et al., 2017). کامپوتوسین برای DNA توپوایزومراز I سمی است و بنابراین مانع همانندسازی DNA می‌شود (Nishida et al., 2022). ترکیبات نانوی کامپوتوسین اثرات ضد استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کولی و کلبسیلا پنومونیا نشان دادند (Al-Gethami & Al-Qasbi, 2021). ایجاد دو پیوند هیدروژنی بین کامپوتوسین و FNBPA و همچنین با سورتاز A، قابلیت مهار باکتری استافیلوکوکوس اورئوس توسط این ریزمولکول را در مطالعه حاضر نشان می‌دهد. غلظت‌های 0.05 ، 0.25 و 0.5 میلی‌گرم در میلی لیتر این ریزمولکول توانایی مهار باکتری *Acidovorax avenae* در برنج از طریق آسیب غشا و اختلال در عملکرد توپوایزومراز را نشان داد (Dong et al., 2016). تیوفنوزاید دو پیوند هیدروژنی قوی با آرژنین ۱۹۷ تشکیل داد که بخشی از جایگاه فعال سه تایی سورتاز A است، و نشان دهنده امکان مهار آنزیمی است. هرچند، مطالعات زیادی در مورد اثر ضد باکتریایی تیوفنوزاید انجام نشده است. این ریز مولکول اساساً به عنوان حشره کش به کار می‌رود و تاثیر منفی زیادی بر اکوسیستم ندارد ولی به طور نامحسوس تغییری در جمعیت‌های میکروبی ایجاد می‌کند (Edge et al., 2022; Suarez-Lopez et al., 2023). کورکومین ریزمولکول دیگری بود که در مطالعه حاضر سه پیوند هیدروژنی با سورتاز A نشان داد که یکی از آن‌ها در جایگاه فعال آرژنین ۱۹۷ بود. کورکومین یک ترکیب پلی فنولیک موجود در گیاه زردچوبه است و تاکنون در مطالعات متعددی اثرات ضد باکتریایی آن گزارش شده است (Zheng et al., 2020; Gorski et al., 2022). کورکومین از طریق مکانیسم‌های متعددی باعث کاهش فعالیت باکتریایی می‌شود. مهار سیستم کواروم سنسینگ توسط کورکومین مانع رشد بیوفیلم‌های باکتریایی می‌گردد (De Kievit et al., 2001). ممانعت از ترمیم DNA و فتوتوکسیسیته (Zheng et al., 2020)، مهار سورتاز A و ATP (Jung et al., 2012; Coleman et al., 2007) و تخریب دیواره غشای سلولی (Tyagi et al., 2015) از جمله مسیرهای مهار باکتریایی توسط کورکومین هستند. آزمایش حداقل غلظت ممانعت کننده رشد نشان داده است که غلظت $219 \mu\text{g/mL}$ موجب مهار فعالیت استافیلوکوکوس اورئوس شده است (Gunes et al., 2016). حداقل غلظت مهارکنندگی کورکومین برای استافیلوکوکوس اورئوس در مطالعه حاضر $128 \mu\text{g/mL}$ بود. حداقل غلظت مهارکنندگی $125-500 \mu\text{g/mL}$ برای کورکومین علیه استافیلوکوکوس اورئوس گزارش شده است (Adamczak et al. 2020). در مطالعه حاضر ریزمولکول‌های دیگری مانند سانگوینارین (Sanguinarin)، فازولیدین، فازولین، شوگروزاید نیز انرژی اتصال مناسبی با رسپتور نشان دادند هرچند، فقط شامل پیوندهای

هیدروفوبیک بودند و یا در جایگاه فعال آنزیم سورتاز A قرار نداشتند. آرژنین ۱۹۷ در جایگاه فعال سورتاز A با فازولیدین، سانگوئینارین و کامپوتوسین پیوند هیدروفوبیک داشت. این پیوندها هرچند ضعیف‌تر از پیوند هیدروژنی هستند ولی ممکن است باعث مهار رسپتور شوند. سانگوئینارین انسجام غشای پلاسمایی استافیلوکوکوس اورئوس را به مخاطره می‌اندازد و همچنین، با ممانعت از سنتز ال-هیستیدین از تشکیل بیوفیلم باکتریایی جلوگیری می‌کند (Qu et al., 2025). در مقابل برای فازولیدین فعالیت ضد استافیلوکوکوس اورئوس کمتری نسبت به فازولین گزارش شده است (Kalli et al., 2021).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج مطالعه حاضر، ریزمولکول‌های ایندیگو، ایندیگو کارمین، گلیاسپرین A، کامپوتوسین، تیوفنوزاید و کورکومین به عنوان ریزمولکول‌های غیر آنتی بیوتیکی معرفی می‌شوند که قابلیت ممانعت از رشد استافیلوکوکوس اورئوس و پیشگیری و درمان ورم پستان تحت کلینیکی را دارند. هرچند، این مطالعه حداقل غلظت مهارکنندگی قابل قبولی برای ایندیگو کارمین و کورکومین جهت مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس را در محیط کشت تایید کرد ولی، برای تایید عملکرد این ریزمولکول‌ها آزمایشات درون تنی توصیه می‌شود.

سپاسگزاری: از معاون محترم پژوهشی مجتمع آموزش عالی تربت جام و همچنین واحد آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به دلیل حمایت و همکاری در اجرای این پژوهش صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد. این پژوهش با حمایت مالی مجتمع آموزش عالی تربت جام با کد مصوب TP14051 انجام گرفت.

References

- Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., & Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 12(1), Article 270. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0905-3>
- Adamczak, A., Ożarowski, M., & Karpiński, T. M. (2020). Curcumin, a natural antimicrobial agent with strain-specific activity. *Pharmaceuticals*, 13(7), Article 153. <https://doi.org/10.3390/ph13070153>
- Al-Dhabi, N. A., Balachandran, C., Raj, M. K., Duraipandiyan, V., Muthukumar, C., Ignacimuthu, S., Khan, I. A., & Rajput, V. S. (2012). Antimicrobial, antimycobacterial and antibiofilm properties of *Couroupita guianensis* Aubl. fruit extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, Article 242. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-242>
- Al-Gethami, W., & Al-Qasbi, N. (2021). Antimicrobial activity of Ca-alginate/chitosan nanocomposite loaded with camptothecin. *Polymers*, 13(20), Article 3559. <https://doi.org/10.3390/polym13203559>
- Algharib, S. A., Dawood, A., & Xie, S. (2020). Nanoparticles for treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Drug Delivery*, 27(1), 292–308. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1724209>
- Artursson, K., Söderlund, R., Liu, L., Monecke, S., & Schelin, J. (2016). Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. *Veterinary Microbiology*, 193, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.012>
- Arung, E. T., Sinamabela, J. R., Rosamah, E., Kusuma, I. W., Kuspradini, H., Alam, A. E., & others. (2015). Antioxidant and antmelanogenesis activities of glyasperin A from *Macaranga pruinosa* leaves. *Natural Product Communications*, 10(1), 1–5.
- Ashraf, S., Cheng, J., & Zhao, X. (2017). Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* interacts with AnnexinA2 on mammary epithelial cells. *Scientific Reports*, 7, Article 40608. <https://doi.org/10.1038/srep40608>
- Begum, K., Motobayashi, T., Hasan, N., Appiah, K. S., Shammi, M., & Fujii, Y. (2020). Indigo as a plant growth inhibitory chemical from the fruit pulp of *Couroupita guianensis* Aubl. *Agronomy*, 10(9), Article 1388. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091388>

- Brouillette, E., Talbot, B. G., & Malouin, F. (2003). The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. *Infection and Immunity*, 71(4), 2292–2295. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.2292-2295.2003>
- Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(11), 1699–1713. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>
- Coleman, K. J., Ngor, E., Reynolds, K., Quinn, V. P., Koebnick, C., Young, D. R., Sternfeld, B., & Sallis, R. E. (2012). Initial validation of an exercise "vital sign" in electronic medical records. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 44(11), 2071–2076. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3182630ec1>
- De Kievit, T. R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., & Iglewski, B. H. (2001). Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Their role and expression patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1865–1873. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1865-1873.2001>
- Dong, Q., Luo, J., Qiu, W., Cai, L., Anjum, S. I., Li, B., Hou, M., Xie, G., & Sun, G. (2016). Inhibitory effect of camptothecin against rice bacterial brown stripe pathogen *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* RS-2. *Molecules*, 21(8), Article 978. <https://doi.org/10.3390/molecules21080978>
- Edge, C., Baker, L., Smenderovac, E., Heartz, S., & Emilson, E. (2022). Tebufenozide has limited direct effects on simulated aquatic communities. *Ecotoxicology*, 31(8), 1231–1240. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02582-y>
- Exel, C. E., Halasa, T., Koop, G., Steeneveld, W., Lam, T. J. G. M., Benedictus, L., & Gussmann, M. (2022). A stochastic modelling approach to determine the effect of diverse *Staphylococcus aureus* strains on the economic and epidemiological outcomes of mastitis intervention strategies in dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 199, Article 105566. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105566>
- Ferreira de Freitas, R., & Schapira, M. (2017). A systematic analysis of atomic protein-ligand interactions in the PDB. *MedChemComm*, 8(10), 1970–1981. <https://doi.org/10.1039/c7md00381a>
- Fleischer, P., Metzner, M., Beyerbach, M., Hoedemaker, M., & Klee, W. (2001). The relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84(9), 2025–2035. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74646-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74646-2)
- Givens, D. I. (2020). MILK Symposium review: The importance of milk and dairy foods in the diets of infants, adolescents, pregnant women, adults, and the elderly. *Journal of Dairy Science*, 103(11), 9681–9699. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18296>
- Gomes, F., & Henriques, M. (2016). Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic approaches. *Current Microbiology*, 72(4), 377–382. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>
- Górski, M., Niedźwiadek, J., & Magryś, A. (2022). Antibacterial activity of curcumin – a natural phenylpropanoid dimer from the rhizomes of *Curcuma longa* L. and its synergy with antibiotics. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 29(3), 394–400. <https://doi.org/10.26444/aaem/148393>
- Guler, A. (2025). Thermodynamic and structural signatures of arginine self-assembly across concentration regimes. *Processes*, 13(7), Article 1998. <https://doi.org/10.3390/pr13071998>
- Gunes, H., Gulen, D., Mutlu, R., Gumus, A., Tas, T., & Topkaya, A. E. (2016). Antibacterial effects of curcumin: An in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicology and Industrial Health*, 32(2), 246–250. <https://doi.org/10.1177/0748233713498458>
- Hogeveen, H., Steeneveld, W., & Wolf, C. A. (2019). Production diseases reduce the efficiency of dairy production: A review of the results, methods, and approaches regarding the economics of mastitis. *Annual Review of Resource Economics*, 11, 289–312. <https://doi.org/10.1146/annurev-resource-100518-093954>

- Jacobitz, A. W., Kattke, M. D., Wereszczynski, J., & Clubb, R. T. (2017). Sortase transpeptidases: Structural biology and catalytic mechanism. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 109, 223–264. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2017.04.008>
- Johnzon, C. F., Artursson, K., Söderlund, R., Guss, B., Rönnerberg, E., & Pejler, G. (2016). Mastitis pathogens with high virulence in a mouse model produce a distinct cytokine profile in vivo. *Frontiers in Immunology*, 7, Article 368. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00368>
- Jung, H. J., Seu, Y. B., & Lee, D. G. (2007). Candidicidal action of resveratrol isolated from grapes on human pathogenic yeast *C. albicans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(8), 1324–1329.
- Kalli, S., Araya-Cloutier, C., Hageman, J., & Vincken, J. P. (2021). Insights into the molecular properties underlying antibacterial activity of prenylated (iso)flavonoids against MRSA. *Scientific Reports*, 11(1), Article 14180. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92964-9>
- Kathuria, S. V., Chan, Y. H., Nobrega, R. P., Özen, A., & Matthews, C. R. (2016). Clusters of isoleucine, leucine, and valine side chains define cores of stability in high-energy states of globular proteins: Sequence determinants of structure and stability. *Protein Science*, 25(3), 662–675. <https://doi.org/10.1002/pro.2860>
- Keane, O. M. (2019). Symposium review: Intramammary infections—Major pathogens and strain associated complexity. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 4713–4726. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15326>
- Khan, M., & Khan, A. (2006). Basic facts of mastitis in dairy animals: A review. *Pakistan Veterinary Journal*, 26(4), 204–208.
- Komine, Y., Komine, K., Kai, K., Itagaki, M., Kuroishi, T., Aso, H., Obara, Y., & Kumagai, K. (2006). Effect of combination therapy with lactoferrin and antibiotics against staphylococcal mastitis on drying cows. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 68(3), 205–211. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.205>
- Kovačević, Z., Samardžija, M., Horvat, O., Tomanić, D., Radinović, M., Bijelić, K., Vukomanović, A. G., & Kladar, N. (2022). Is there a relationship between antimicrobial use and antibiotic resistance of the most common mastitis pathogens in dairy cows? *Antibiotics*, 12(1), Article 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010003>
- Krieger, E., Joo, K., Lee, J., Lee, J., Raman, S., Thompson, J., Tyka, M., Baker, D., & Karplus, K. (2009). Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins*, 77(Suppl 9), 114–122. <https://doi.org/10.1002/prot.22570>
- Liu, N., Li, L., Zhu, X., Ling, Z., Feng, J., Hu, Y., Wang, Y., Mou, L., & Wang, Y. (2016). A high content screening assay to identify compounds with anti-epithelial-mesenchymal transition effects from the Chinese herbal medicine Tong-Mai-Yang-Xin-Wan. *Molecules*, 21(10), Article 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules21101340>
- Lopes, T. S., Fontoura, P. S., Oliveira, A., Rizzo, F. A., Silveira, S., & Streck, A. F. (2020). Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*, 131, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025>
- Marraffini, L. A., Dedent, A. C., & Schneewind, O. (2006). Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 192–221. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.192-221.2006>
- Martino, E., Della Volpe, S., Terribile, E., Benetti, E., Sakaj, M., Centamore, A., ... & Pacifico, S. (2017). The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(4), 701–707. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.12.085>
- Menchinelli, G., Squitieri, D., Magri, C., De Maio, F., D’Inzeo, T., Cacaci, M., De Angelis, G., Sanguinetti, M., & Posteraro, B. (2024). Verification of the Vitek Reveal system for direct antimicrobial susceptibility testing in Gram-negative positive blood cultures. *Antibiotics*, 13(11), Article 1058. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13111058>

- Nishida, M., Terabayashi, T., Matsuoka, S., et al. (2022). Mechanism of action of non-camptothecin inhibitor Genz-644282 in topoisomerase I inhibition. *Communications Biology*, 5(1), Article 982. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03920-w>
- Nitulescu, G., Nicorescu, I. M., Olaru, O. T., Ungurianu, A., Mihai, D. P., Zanfirescu, A., Nitulescu, G. M., & Margina, D. (2017). Molecular docking and screening studies of new natural sortase A inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), Article 2217. <https://doi.org/10.3390/ijms18102217>
- Pascu, C., Herman, V., Iancu, I., & Costinar, L. (2022). Etiology of mastitis and antimicrobial resistance in dairy cattle farms in the western part of Romania. *Antibiotics*, 11(1), Article 57. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010057>
- Patronov, A., Salamanova, E., Dimitrov, I., Flower, D. R., & Doytchinova, I. (2014). Histidine hydrogen bonding in MHC at pH 5 and pH 7 modeled by molecular docking and molecular dynamics simulations. *Current Computer-Aided Drug Design*, 10(1), 41–49.
- Pei, J., Xiong, L., Wu, X., Chu, M., Bao, P., Ge, Q., & Guo, X. (2025). Bovine lactoferricin exerts antibacterial activity against four Gram-negative pathogenic bacteria by transforming its molecular structure. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, Article 1508895. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1508895>
- Pereyra, E. A., Picech, F., Renna, M. S., Baravalle, C., Andreotti, C. S., Russi, R., Calvinho, L. F., Diez, C., & Dallard, B. E. (2016). Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, 183, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.002>
- Qu, Q., Huang, X., Zhu, Z., Wang, J., Zhao, M., Cui, W., Zheng, Y., Liu, Y., Chen, X., Zhang, Z., Dong, N., Dong, C., & Li, Y. (2025). Targeting membrane integrity and imidazoleglycerol-phosphate dehydratase: Sanguinarine multifaceted approach against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Phytomedicine*, 138, Article 156428. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2025.156428>
- Ragasa, C. Y., Galian, R. A. F., Ebajo, V. D., & others. (2015). Propolins and glyasperin A from stingless bee nests. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(2), 177–179. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.03.006>
- Raza, S., Bończak, B., Atamas, N., Karpińska, A., Ratajczyk, T., Łoś, M., Hołyst, R., & Paczesny, J. (2025). The activity of indigo carmine against bacteriophages: An edible antiphage agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 109(1), Article 24. <https://doi.org/10.1007/s00253-025-13414-4>
- Schneewind, O., & Missiakas, D. (2019). Sortases, surface proteins, and their roles in *Staphylococcus aureus* disease and vaccine development. *Microbiology Spectrum*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PSIB-0004-2018>
- Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Iqbal Yatoo, M., Patel, S. K., Pathak, M., Karthik, K., Khurana, S. K., Singh, R., Puvvala, B., Amarpal, Singh, R., Singh, K. P., & Chaicumpa, W. (2021). Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: A comprehensive review. *The Veterinary Quarterly*, 41(1), 107–136. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>
- Shin, M., Mun, D., Choi, H. J., Kim, S., Payne, S. M., & Kim, Y. (2021). Identification of a new antimicrobial agent against bovine mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(34), 9968–9978. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02738>
- Simonin, A., Montalbetti, N., Gyimesi, G., Pujol-Giménez, J., & Hediger, M. A. (2015). The hydroxyl side chain of a highly conserved serine residue is required for cation selectivity and substrate transport in the glial glutamate transporter GLT-1/SLC1A2. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(51), 30464–30474. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689836>
- Speziale, P., & Pietrocola, G. (2020). The multivalent role of fibronectin-binding proteins A and B (FnBPA and FnBPB) of *Staphylococcus aureus* in host infections. *Frontiers in Microbiology*, 11, Article 2054. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02054>

- Stemberk, V., Jones, R. P., Moroz, O., Atkin, K. E., Edwards, A. M., Turkenburg, J. P., Leech, A. P., Massey, R. C., & Potts, J. R. (2014). Evidence for steric regulation of fibrinogen binding to *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A (FnBPA). *The Journal of Biological Chemistry*, 289(18), 12842–12851. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.543546>
- Suarez-Lopez, Y. A., Pons, B. de la N., Fernández Martín, F., & Rodríguez Hernández, P. (2016). Comparative study of the behavior of six strains of arbuscular mycorrhizal fungi in their interaction with tomato (*Lycopersicon esculentum* M. var “Amalia”). *Ecología Aplicada*, 3(1-2), 162–171. <https://doi.org/10.21704/rea.v3i1-2.286>
- Suarez, J. L., & Viana, R. M. (2024). Tebufenozide has limited direct effects on simulated aquatic communities. *Ecotoxicology*, 31(8), 1231–1240. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02582-y>
- Talbot, B. G., & Lacasse, P. (2005). Progress in the development of mastitis vaccines. *Livestock Production Science*, 98(1-2), 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.10.018>
- Theerawatanasirikul, S., Thangthamniyom, N., Kuo, C. J., Semkum, P., Phecharat, N., Chankeeree, P., & Lekcharoensuk, P. (2021). Natural phytochemicals, luteolin and isoginkgetin, inhibit 3C protease and infection of FMDV, in silico and in vitro. *Viruses*, 13(11), Article 2118. <https://doi.org/10.3390/v13112118>
- Tomanić, D., Samardžija, M., & Kovačević, Z. (2023). Alternatives to antimicrobial treatment in bovine mastitis therapy: A review. *Antibiotics*, 12(4), Article 683. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040683>
- Tong, X., Barkema, H. W., Nobrega, D. B., Xu, C., Han, B., Zhang, C., Yang, J., Li, X., & Gao, J. (2025). Virulence of bacteria causing mastitis in dairy cows: A literature review. *Microorganisms*, 13(1), Article 167. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010167>
- Trujillo, C., Rodriguez-Sanz, A. A., & Rozas, I. (2015). Aromatic amino acids-guanidinium complexes through cation- π interactions. *Molecules*, 20(5), 9214–9228. <https://doi.org/10.3390/molecules20059214>
- Tyagi, P., Singh, M., Kumari, H., Kumari, A., & Mukhopadhyay, K. (2015). Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PLOS ONE*, 10(3), Article e0121313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121313>
- USDA. (2025). Dairy: World markets and trade. <https://esmis.nal.usda.gov/publication/dairy-world-markets-and-trade>
- Vrieling, M., Koymans, K. J., Heesterbeek, D. A., Aerts, P. C., Rutten, V. P., de Haas, C. J., van Kessel, K. P., Koets, A. P., Nijland, R., & van Strijp, J. A. (2015). Bovine *Staphylococcus aureus* secretes the leukocidin LukMF' to kill migrating neutrophils through CCR1. *mBio*, 6(3), Article e00335. <https://doi.org/10.1128/mBio.00335-15>
- Zhang, Q. Y., Yan, Z. B., Meng, Y. M., Hong, X. Y., Shao, G., Ma, J. J., Cheng, X. R., Liu, J., Kang, J., & Fu, C. Y. (2021). Antimicrobial peptides: Mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, 8(1), Article 48. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>
- Zheng, D., Huang, C., Huang, H., Zhao, Y., Khan, M. R. U., Zhao, H., & Huang, L. (2020). Antibacterial mechanism of curcumin: A review. *Chemistry & Biodiversity*, 17(8), Article e2000171. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000171>