مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۷، تیر ۱۳۹۵، صفحه ۲۳-۱۹

بررسی فعالیت ضد میکروبی پروتئین لاکتوفرین بر روی رشد پسودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی

رمیسا شعر بافی (MSc)[۱]، فاطمه مرادیان (PhD)[۲*]، علیرضا رفیعی (PhD)[۱]

۱-مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی-مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲-گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

دریافت: ۹۴/۱۱/۲۴، اصلاح: ۹۴/۱۲/۱۲، پذیرش: ۹۵/۳/۱۲

خلاصه

سابقه و هدف: لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین متصل به آهن است که طیف متنوعی از فعالیت‌های زیستی را دارد. لاکتوفرین ترکیب اصلی شیر است و در ترشحات خارجی همانند اشک، بزاق، صفرا و گرانولهای نوتروفیلی نیز وجود داشته و توانایی فعالیت ضد میکروبی علیه طیف گسترده ای از باکتریهای گرم منفی و مثبت و ضد ویروسی را دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر این پروتئین بر رشد سویه پسودوموناس آئروژینوزا در بیماران مبتلا به سوختگی با مقاومت دارویی می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه فعالیت ضد باکتریایی لاکتوفرین پس از جداسازی و خالص سازی از کلستروم گاو، ضد پسودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های باکتریایی از بیماران مبتلا به سوختگی (بیمارستان شهید زارع) جداسازی شدند و پس از انجام تست های تائیدی نظیر اکسیداز، کاتالاز و کشت در محیط TSI جهت فعالیت‌های میکروبی مورد استفاده قرار گرفتند. لاکتوفرین خالص شده با ۴ غلظت µg/ml ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ و ۷۰۰ استفاده شدند. کلنی‌های پسودوموناس توسط دستگاه شمارش کلنی شمارش شده و با کنترل منفی (بدون حضور لاکتوفرین) مقایسه شدند. همچنین E.coli سویه DH5α به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کمترین غلظت مهار کنندگی مربوط به غلظت µg/ml ۴۰۰ با ۳۵٪ و ۲۹٪ مهار کنندگی و بیشترین درصد مهار کنندگی لاکتوفرین مربوط به غلظت µg/ml ۷۰۰ با ۸۶٪ و ۶۶٪ مهار کنندگی در سودوموناس و اشرشیاکولی بودند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که تمامی غلظت های لاکتوفرین دارای فعالیت مهارکنندگی هستند اما در غلظت µg/ml ۷۰۰ بیشترین مهار کنندگی را علیه پسودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی دارد.

واژه‌های کلیدی: اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، فعالیت ضد میکروبی، لاکتوفرین.

مقدمه

لاکتوفرین گلیکو پروتئین ۸۰ کیلو دالتونی است که قابلیت اتصال به آهن را دارد. این پروتئین در شیر، اشک، بزاق، گرانولهای اختصاصی (PMNS) به خصوص نوتروفیل ها یافت می شود. خواص بیولوژیکی آن شامل تنظیم جذب آهن در روده، خواص ضد التهابی، تنظیم کننده سیستم ایمنی بدن و فعالیت ضد باکتریایی، ویروسی و توموری می باشد(۱). اثر لاکتوفرین در کاهش التهاب و از بین بردن باکتری‌های گرم منفی پیامدهای بالینی مثل کنترل عفونت، اختلال عملکرد ارگانهای متعدد و تهاجم باکتریایی را به دنبال دارد(۲). ساختمان پروتئینی آن شامل دو بخش، آمینی(N-lobe) وکربوکسیلی(c-lobe) است که هر کدام قابلیت اتصال به آهن آزاد را دارا می باشند (۴و۳). در بعضی مواقع لاکتوفرین به آهن آزاد شده از ترنسفرین ها متصل می‌شود که همین امر مانع تکثیر باکتریها می‌شود (۵). تمایل لاکتوفرین برای جذب آهن به عنوان یک ترکیب اصلی سیستم دفاعی غیر اختصاصی میزبان علیه پاتوژن‌های بی‌شماری در نظر گرفته می شود(۶). لاکتوفرین با جذب آهن آزاد محیط را عاری از این عنصر می‌کند و در نتیجه باکتری‌ها و پاتوژن‌هایی که برای زندگی رشد و تکثیر خود به آهن نیاز دارند از آن محروم می‌مانند و قادر به ادامه زندگی نمی‌شوند و بدین ترتیب لاکتوفرین به طور غیرمستقیم عفونت را مهار می‌کند(۷). لاکتوفرین علاوه بر جذب آهن و دورنگه داشتن آن از دسترس میکروب ها می‌تواند از طریق ممانعت از متابولیسم میکروبی کربوهیدرات‌ها، بی ثبات کردن دیواره سلولی باکتری‌ها و یا از طریق اتصال به کلسیم و منیزیم فعالیت ضد میکروبی داشته باشد(۸). استفاده از لاکتوفرین در تغذیه حیواناتی نظیر موش و خوک موجب افزایش مقاومت آنها در برابر بیماری های باکتریایی و التهابی گردیده است (۹). جنس سودوموناس متشکل از بسیاری گونه های باسیل گرم منفی هوازی غیر تخمیری است که در

▣ این مقاله حاصل پایان نامه رمیسا شعربافی دانشجوی رشته میکروبیولوژی و طرح تحقیقاتی به شماره ۳۹-۸۷ علوم پزشکی مازندران می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر فاطمه مرادیان
آدرس: ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم پایه. تلفن: ۳۳۶۸۷۶۵۵-۰۱۱
E-mail: moradi_f@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.7.3.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.7.19]

خاک و آب سکونت دارند به طور وسیع در طبیعت، در آب، فاضلاب، گرد و غبار، هوا و خاک پراکنده‌اند(۱۰). یکی از عفونتهای شایع بیمارستانی که توسط پاتوژن فرصت طلبی از جمله پسودوموناس‌آئروژینوزا ایجاد می‌شود که ناشی از نقص ایمنی یا عوامل دیگر است، عفونت پس از سوختگی می باشد. از آنجایی‌که مقاومت به انواع آنتی بیوتیک ها از چالش‌های مهم درمان این نوع عفونت‌ها محسوب می شود تحقیق در زمینه درمان جایگزین و موثرتر، از اولویت‌های پزشکی محسوب می شود.

با توجه به سابقه زیاد خواص درمانی پروتئین لاکتوفرین در بیماریهای مختلف و همچنین اثر مهم این پروتئین خوراکی در تقویت سیستم ایمنی در مقابله با انواع پاتوژن‌ها از جمله باکتری‌ها، در این مطالعه اثر ضدباکتریایی لاکتوفرین خالص شده از کلسترم شیر گاو با غلظتهای مختلف بر باکتری پسودوموناس جدا شده از نمونه‌های افرادی که دچار سوختگی شده اند، بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری، جدا سازی و شناسایی باکتری: در این تحقیق از محل زخم بیماران مبتلا به سوختگی واقع در مرکزسوختگی بیمارستان شهید زارع شهرستان ساری با استفاده از سواپ استریل نمونه برداشته شد و به پلیت حاوی محیط کشت آگار خونی منتقل گردید. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ انکوبه شدند به منظور شناسایی باکتری ها تست های بیوشیمیایی نظیر اوره‌آز، کاتالاز، اکسیداز، اندول و سیترات مطابق با روش های استاندارد صورت گرفت. همچنین نمونه ها در محیط، KIA TSI جهت بررسی قندی کشت داده شدند(۱۱).

استخراج، خالص سازی و تعیین غلظت لاکتوفرین: لاکتوفرین از کلستروم شیر گاو طی ۷۲ ساعت پس از زایمان جدا سازی شد و سپس توسط دستگاه کروماتوگرافی تبادل آنیونی CM-sephadex G50 خالص سازی شد و خلوص آن توسط ژل SDS-PAGE تایید گردید و غلظت آن توسط روش برادفورد با استفاده از پروتئین آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. بدین منظور ابتدا غلظت‌های متفاوتی از استاندارد تهیه شد سپس دو حجم متفاوت از لاکتوفرین تهیه گردید و به میزان یکسان محلول برادفورد به تمامی لوله ها افزوده شد. جذب نمونه‌ها در ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت لاکتوفرین خالص شده مطابق با منحنی استاندارد رسم شده برای پروتئین آلبومین گاوی، ۲/۵ µg/µl به دست آمد. نتایج مربوط به خالص سازی در مطالعات پیشین توسط Sharbafi و همکاران گزارش شده است(۱۲).

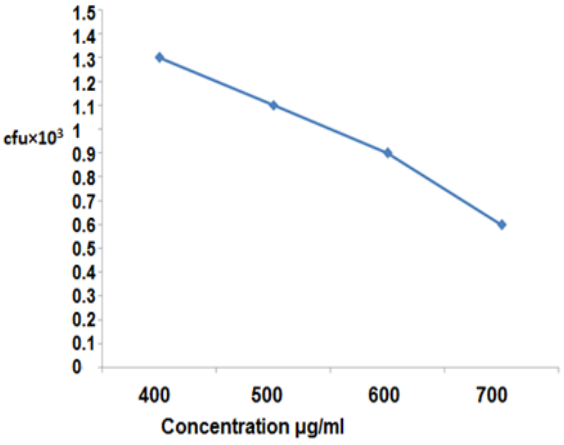
کشت میکروبی و بررسی اثر ضد باکتریایی لاکتوفرین: ابتدا سودوموناس در ۵۰ml از محیط LB broth به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد و پس از گذشت این زمان جذب (OD) محیط مایع توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری خوانده شد. جذب محیط کشت مایع پس از ۱۸ساعت انکوباسیون حدود ۰/۲ که معادل استاندارد ۳ مک فارلن می باشد، بدست آمد. سپس از محیط کشت مایع اولیه ۱۲ رقت از 10^{-1}تا 10^{-12} تهیه شده که جذب هر یک از رقت ها بطور جداگانه خوانده شد. از هر رقت میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت حاوی ائوزین متیلن بلو (EMB) کشت داده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۱۸ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ کلنی‌های رشد یافته شمارش شدند.

رقت 10^{-12}با OD حدود ۰/۲ تعداد کلنی‌های قابل شمارش داشته که این رقت مناسبترین تعداد کلنی های قابل شمارش را نشان داد. ۵ پلیت از محیط ائوزین متیلن بلو(EMB) تهیه شده و به هر پلیت ۱۰۰ میکرولیتر از رقت 10^{-12} اضافه گردید سپس به هر پلیت غلظت های مختلف لاکتوفرین معادل µg/ml صفر، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰ و۷۰۰ افزوده و به مدت ۱۸ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ انکوبه شدند. همین کار برای سویه E.coli به عنوان کنترل مثبت انجام شد. پس از انکوباسیون و رشد باکتری‌ها تعداد کلنی ها شمارش و میزان باکتری زنده (CFU) مشخص گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: این تحقیق در قالب طرح کاملا" تصادفی انجام شد و پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها با استفاده از One Sample Kolmogorov-Smirnov Test، تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های مختلف لاکتوفرین بر رشد باکتری با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۹ و آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن بین تیمارهای مختلف صورت گرفت و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

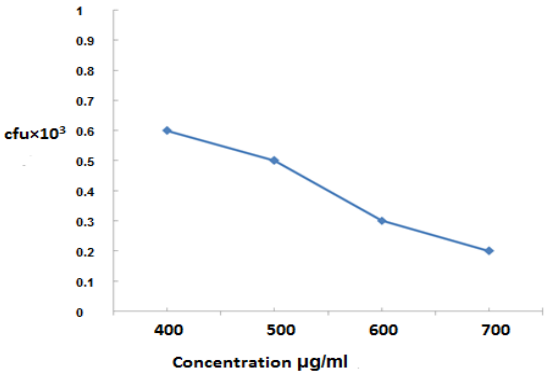
یافته ها

نتایج نشان داد که لاکتوفرین بطور موثری موجب کاهش رشد پسودوموناس آئروژینوزا می شود که درصد مهارکنندگی به ترتیب ۳۵،۵۸،۰۷۵ و ۸۶ درصد بوده که غلظت ۴۰۰ µg/ml دارای کمترین اثر مهار کنندگی با ۳۵٪ مهار کنندگی و ۷۰۰ µg/ml دارای بیشترین اثر مهارکنندگی تا ۸۶٪ موجب مهار رشد باکتریهای پسودوموناس آئروژینوزا شده است (شکل۱). لاکتوفرین موجب کاهش تعداد کلنی ها در E. coli نیز گردید که درصد مهرکنندگی به ترتیب ۲۹،۳۷،۰۵۲ و ۶۶ درصد بوده که کمترین اثر مهار کنندگی مربوط به غلظت ۴۰۰ µg/ml با ۲۹٪ اثر مهار کنندگی وبیشترین درصد مهارکنندگی مربوط به غلظت ۷۰۰µg/ml با۶۶٪ اثر مهار کنندگی بوده است (شکل۲). نتایج نشان دادند که اثر مهارکنندگی لاکتوفرین بر روی پسودوموناس آئروژینوزا بیشتر از E.coli به عنوان کنترل مثبت می باشد(شکل۳).

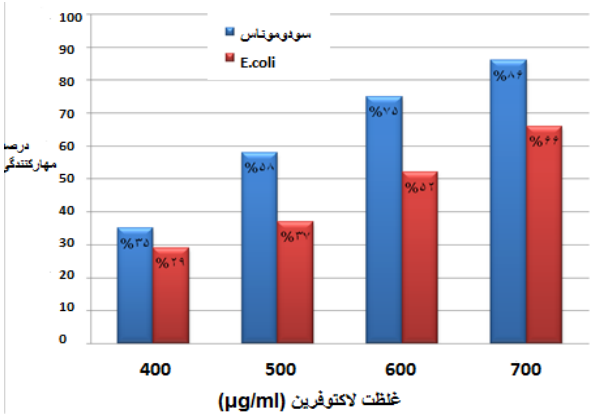


شکل۱. بررسی اثر غلظت های متفاوت لاکتوفرین بر روی رشد سودوموناس آئروژینوزا

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.7.3.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.7.19]



شکل ۲ . بررسی اثر غلظت های متفاوت لاکتوفرین بر روی رشد E.coli



شکل۳. مقایسه درصد مهارکنندگی لاکتوفرین علیه سودوموناس ائروژینوزا و E. coli

بحث و نتیجه گیری

لاکتوفرین یک پروتئین چند عملکردی است که یکی از نقشهای آن فعالیت ضد باکتریای است و بر روی طیف گسترده ای از گونه های گرم مثبت و منفی تاثیر گذار می‌باشد. تفاوت در اثر این پروتئین نسبت به نتایج گذشته در میزان غلظت مهارکنندگی آن بوده است. Woan-sub و همکاران در بررسی فعالیت ضدمیکروبی لاکتوفرین علیه گونه های مختلفی از پسودوموناس P. syringae و P. fluorescens گزارش کردند که بیشترین اثر مهارکنندگی لاکتوفرین مربوط به غلظت mg/ml ۱/۹ بوده است. آنها همچنین اعلام کردند که P.syringae نسبت به p.flurcens دارای حساسیت بیشتری نسبت به لاکتوفرین می باشد(۱۳). Takase و همکارانش تأثیر ضد میکروبی لاکتوفرین را بر روی سویه های E.coli ، S.aureus ، P.aeruginosa و K. pneumonia که از پستان گاو جدا شده بود بررسی کردند. در این آزمایشات آنها از غلظت ۰/۶۷ و ۱/۶۷ و ۲/۶۷ mg/ml استفاده کردند. نتایج نشان داد که غلظت mg/ml ۲/۶۷ دارای بیشترین اثرمهارکنندگی می باشد و بیشترین تأثیر لاکتوفرین در مهار رشد باکتریهای E.coli و P. aeruginosa بود. این دانشمندان همچنین اعلام کردند که لاکتوفرین از طریق آسیب زدن به غشاء خارجی باکتری های گرم منفی وتغییر در نفوذ پذیری غشا موجب مهار رشد آنها می شود(۱۴). Dionysius و همکاران گزارش کردند که لاکتوفرین با غلظت ۱ mg/ml موجب مهار رشد ETEC جدا شده از بیمارانی که دچار التهاب روده شده بودند، گردید. آنها بیان کردند که میزان مهارکنندگی لاکتوفرین به نوع سویه و میزان اولیه باکتریها وابسته است (۱۵).

فعالیت ضد میکروبی لاکتوفرین علیه گونه‌های مختلف پسودوموناس توسط چندین مکانیسم قابل شرح می‌باشد. مکانیسم اول این است که لاکتوفرین یک پروتئین متصل شونده به آهن می‌باشد. آهن یک عنصر مهم برای تمامی میکروارگانیسم ها است. کاهش غلظت آهن آزاد در محیط اطراف میکروارگانیسم ها منجر به ایجاد شرایطی می شود که در نهایت به مرگ میکروارگانیسم ها منتهی می‌گردد. از طرف دیگر کمبود آهن محیط از تشکیل بیوفیلم توسط P.aeruginosa جلوگیری می‌کند. مکانیسم دوم بیانگر این مسئله است که لاکتوفرین از طریق اتصال به بخشی از لیپید A باعث از هم گسستگی غشاء باکتری‌های گرم منفی می‌شود. بی ثبات شدن غشاء خارجی در باکتری ها موجب آزاد شدن لیپوپلی ساکاریدها (LPS) می گردد و در نهایت منجر به تغییر در نفوذ پذیری غشاء می شود. تغییر در نفوذپذیری غشاء، فعالیت ضد میکروبی لاکتوفرین را از طریق اجازه ورود به آنتی بیوتیک ها و سایر عوامل ضد میکروبی، کامل می‌کند (۱۶). در تحقیق حاضر، نتایج نشان داد که لاکتوفرین در شرایط آزمایشگاهی به طور موثری موجب کاهش رشد پسودوموناس آئروژینوزا می شود. اثر مهارکنندگی بر دو سویه E.coli و پسودوموناس در غلظت پایین تری از لاکتوفرین نسبت به مطالعات پیشین دیده شد که می تواند بیانگر خالص تر و فعال تربودن لاکتوفرین بدست آمده و حساسیت بیشتر سویه‌های مورد آزمایش نسبت به لاکتوفرین فوق باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان(ساری) و مرکز تحقیقات سلولی–مولکولی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران جهت همکاری در این تحقیق، تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.7.3.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.7.19]

Evaluation of Antimicrobial Activity of Lactoferrin against P.Aeruginosa and E.Coli Growth

R. Sharbafi (MSc)[1], F. Moradian (PhD)*[2], A. Rafeiei (PhD)[1]

1.Molecular and Cellular Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Science, Sari, I.R.Iran
2.Department of Basic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(7); Jul 2016; PP: 19-23
Received: Feb 13th 2016, Revised: Mar 2th 2016, Accepted: Jun 1th 2016

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Lactoferrin(LF) is an iron-binding glycoprotein that involves a diverse range of biological activities. Lactoferrin is a major component of milk and is present in exocrine secretions such as tears, salvia, bile, and neutrophil granules. Lactoferrin has more potent antimicrobial activities against a wide range of gram negative and positive bacteria as well as antivirus activities. The purpose of this study is to evaluate the effect of this protein on P.aeruginosa growth in patients with burns that show drug resistance.

METHODS: In this study, antibacterial activity of Lactoferrin has been scrutinized after isolation and purification of bovine colostrum against pseudomonas aeroginosa. Bacteria samples were isolated from scald patients (Shahid Zare Hospital); then microbial activity was confirmed with biochemical tests like oxidase, catalase and growth on TSI medium. Four concentrations 400,500,600 and 700 µg/ml of lactoferrin were assayed. Pseudomonas colonies counted and compared with negative control (without lactoferrin) as well as *E.coli* (DH5α) as positive control was considered.

FINDINGS: Our results showed that 400µg/ml concentration of lactoferrin has the least inhibitory effect with 35% and 29% growth inhibitory and 700µg/ml concentration of lactoferrin has the highest inhibitory effect with 86% and 66% on *Pseudomonas* and *E.coli*, respectively.

CONCLUSION: Our result showed that all of lactoferrin concentrations have inhibitory activity which in 700µg/ml has the highest inhibition against Pseudomonas aeroginosa and also E.coli.

KEY WORDS: *Antimicrobial activity, E.coli, lactoferrin, Pseudomonas aeroginosa*.

Please cite this article as follows:

Sharbafi R, Moradian F, Rafeiei A. Evaluation of Antimicrobial Activity of Lactoferrin against P.Aeruginosa and E.Coli Growth. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(7):19-23.

***Corresponding author: F. Moradian (PhD)**
Address: Department of Basic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, I.R.Iran
Tel: +98 11 32687655
E-mail: moradi_f@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.7.3.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.7.19]

References

1.Abrink M, Larsson E, Gobl A, Hellman L. Expression of lactoferrin in the kidney: implications for innate immunity and iron metabolism. Kidney Int. 2000;57(5):2004-10.

2.Drago-Serrano ME, de la Garza-Amaya M, Luna JS, Campos-Rodríguez R. Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. Int Immunopharmacol. 2012;12(1):1-9.

3.Metz-Boutigue MH, Jollès J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, et al. Human lactotransferrin: amino aeid sequence and structural comparisons with other transferring. Eur J Biochem. 1984;145(3):659-76.

4.Baker EN. Structure and reactivity of transferrins. Adv Inorg Chem. 1994;41:389-463.

5.Valenti P, Antonini G. Lactoferrin: an important host defense against microbial and viral attack. Cell Mol Life Sci. 2005; 62(2): 2576-87.

6.Velusamy SK, Poojary R, Ardeshna R, Alabdulmohsen W, Fine DH, Velliyagounder K. Protective effects of human lactoferrin during aggregatibacter actinomycetemcomitance induced bacteremia in lactoferrin efficient mice. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(1):397-404.

7.Crosa J.H. Genetics and molecular biology of siderophore-mediate iron transport in bacteria. Microbiol Rev. 1989;53(4):517-30.

8.Appelmelk BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, de Boer HA, MacLaren DM, et al. Lactoferrin is a lipid A- binding protein. Infect Immun. Infect Immun. 1994;62(6):2628-32.

9.Barker EN, Barker HM. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin.Cell Mol life Sci. 2005; 62(22):2531-25 39.

10.Rahimi MK. Zinser Microbiology. Tehran: Abizh Pub; 1382.p.2.[In Persian]

11.Sneath PHA. Endospore–forming gram–positive rode and cocci. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. USA: Williams and Wikins, Baltimore; 1983.p.1104-207.

12.Sharbafi R, Moradian F, Rafiei F, Barzegar A. Isolation and purification of bovine lactoferrin. J Mazandaran Univ Med Sci. 2011; 21(84): 44-51. [In Persian]

13.Woan-sub Kim, Rahman MM, Kei-Ichi Shiazaki I. Antibacterial activity and binding ability of bovine lactoferrin against pseudomonas Spp. J Food Safety. 2008; 28(1):23-33.

14.Takase K, Hagiwara K, Onodera H, Nishizawa Y, Ugaki M, Omura T, et al. Constitutive expression of human lactoferrin and its N-lobe in rice plants to confer disease resistance. Biochem Cell Biol. 2005;83(2):239-49.

15.Dionysius DA, Grieve PA, Milne JM. Forms of lactoferrin: Their Antibacterial effect on Enterotoxigenic Escherichia coli. J Dairy Sci. 1993;76(9):2597-600.

16.Brink W. Lactoferrin:the bioactive peptide that fights disease. Life Exten Mag. 2000. Available from: http://www.lifeextension.com/magazine/2000/10/report_lactoferrin/page-01

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.7.3.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.7.19]