

بررسی فعالیت ضد میکروبی پروتئین لاکتوفرین بر روی رشد پseudomonas 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 گسترده‌ای از باکتریهای گرم منفی و مثبت و ضد ویروسی را دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر این پروتئین بر رشد سویه پseudomonas 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 پseudomonas آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های باکتریایی از بیماران مبتلا به سوختگی (بیمارستان شهید زارع) جداسازی شدند و پس از انجام تست های تأییدی نظیر اکسیداز، کاتالاز و کشت در محیط TSI جهت فعالیت‌های میکروبی مورد استفاده قرار گرفتند. لاکتوفرین خالص شده با ۴ غلظت $\mu\text{g/ml}$ ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ و ۷۰۰ استفاده شدند. کلنی‌های پseudomonas توسط دستگاه شمارش کلنی شمارش شده و با کنترل منفی (بدون حضور لاکتوفرین) مقایسه شدند. همچنین E.coli سویه DH5 α به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کمترین غلظت مهار کنندگی مربوط به غلظت $\mu\text{g/ml}$ ۴۰۰ با ۳۵٪ و ۲۹٪ مهار کنندگی و بیشترین درصد مهار کنندگی لاکتوفرین مربوط به غلظت $\mu\text{g/ml}$ ۷۰۰ با ۸۶٪ و ۶۶٪ مهار کنندگی در سودوموناس و اشرشیاکلی بودند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که تمامی غلظت های لاکتوفرین دارای فعالیت مهار کنندگی هستند اما در غلظت $\mu\text{g/ml}$ ۷۰۰ بیشترین مهار کنندگی را علیه پseudomonas 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) و کربوکسیلی (C-lobe) است که هر کدام قابلیت اتصال به آهن آزاد را دارا می باشند (۳و۴). 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 با 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 شعر بافی 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: ۰۱۱-۳۳۶۸۷۶۵۵

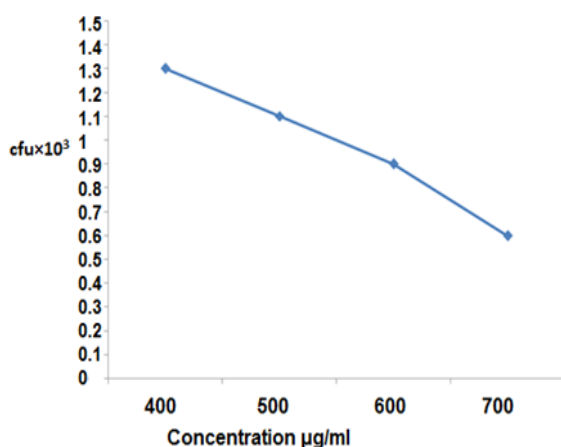
E-mail: moradi_f@yahoo.com

رقت 10^{-12} با OD حدود 0.2 تعداد کلنی‌های قابل شمارش داشته که این رقت مناسبترین تعداد کلنی‌های قابل شمارش را نشان داد. ۵ پلیت از محیط آنوزین متیلن بلو (EMB) تهیه شده و به هر پلیت ۱۰۰ میکرولیتر از رقت 10^{-12} اضافه گردید سپس به هر پلیت غلظت‌های مختلف لاکتوفرین معادل $\mu\text{g/ml}$ صفر، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰ و ۷۰۰ افزوده و به مدت ۱۸ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. همین کار برای سویه E.coli به عنوان کنترل مثبت انجام شد. پس از انکوباسیون و رشد باکتری‌ها تعداد کلنی‌ها شمارش و میزان باکتری زنده (CFU) مشخص گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: این تحقیق در قالب طرح کاملاً 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.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که لاکتوفرین بطور موثری موجب کاهش رشد پseudomonas آئروژینوزا می‌شود که درصد مهارکنندگی به ترتیب 35.058 ± 0.075 و 86% درصد بوده که غلظت $400 \mu\text{g/ml}$ دارای کمترین اثر مهارکنندگی با 35% مهارکنندگی و $700 \mu\text{g/ml}$ دارای بیشترین اثر مهارکنندگی تا 86% موجب مهار رشد باکتری‌های پseudomonas آئروژینوزا شده است (شکل ۱). لاکتوفرین موجب کاهش تعداد کلنی‌ها در E. coli نیز گردید که درصد مهارکنندگی به ترتیب 29.037 ± 0.052 و 66% درصد بوده که کمترین اثر مهارکنندگی مربوط به غلظت $400 \mu\text{g/ml}$ با 29% اثر مهارکنندگی و بیشترین درصد مهارکنندگی مربوط به غلظت $700 \mu\text{g/ml}$ با 66% اثر مهارکنندگی بوده است (شکل ۲). نتایج نشان دادند که اثر مهارکنندگی لاکتوفرین بر روی پseudomonas آئروژینوزا بیشتر از E.coli به عنوان کنترل مثبت می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۱. بررسی اثر غلظت‌های متفاوت لاکتوفرین بر روی رشد سودوموناس آئروژینوزا

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 پseudomonas آئروژینوزا ایجاد می‌شود که ناشی از نقص ایمنی یا عوامل دیگر است، عفونت پس از سوختگی می‌باشد. از آنجایی که مقاومت به انواع آنتی بیوتیک‌ها از چالش‌های مهم درمان این نوع عفونت‌ها محسوب می‌شود تحقیق در زمینه درمان جایگزین و موثرتر، از اولویت‌های پزشکی محسوب می‌شود.

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 کلستریم شیر گاو با غلظت‌های مختلف بر باکتری پseudomonas جدا شده از نمونه‌های افرادی که دچار سوختگی شده‌اند، بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری، جدا سازی و شناسایی باکتری: در این تحقیق از محل زخم بیماران مبتلا به سوختگی واقع در مرکز سوختگی بیمارستان شهید زارع شهرستان ساری با استفاده از سواب استریل نمونه برداشته شد و به پلیت حاوی محیط کشت آگار خونی منتقل گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند به منظور شناسایی باکتری‌ها تست‌های بیوشیمیایی نظیر اوره‌آز، کاتالاز، اکسیداز، اندول و سیترات مطابق با روش‌های استاندارد صورت گرفت. همچنین نمونه‌ها در محیط، KIA TSI جهت بررسی قندی کشت داده شدند (۱۱).

استخراج، خالص سازی و تعیین غلظت لاکتوفرین: لاکتوفرین از کلستریم 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 لوله‌ها افزوده شد. جذب نمونه‌ها در 595 nm نانومتر خوانده شد و غلظت لاکتوفرین خالص شده مطابق با منحنی استاندارد رسم شده برای پروتئین آلبومین گاوی، $2/5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ به دست آمد. نتایج مربوط به خالص سازی در مطالعات پیشین توسط Sharbafi و همکاران گزارش شده است (۱۲).

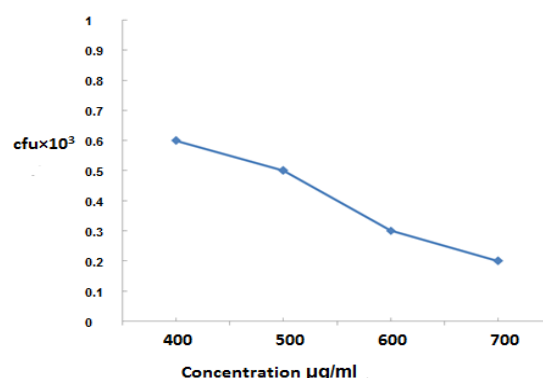
کشت میکروبی و بررسی اثر ضد باکتریایی لاکتوفرین: ابتدا سودوموناس در 5.0 ml از محیط LB broth به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد و پس از گذشت این زمان جذب (OD) محیط مایع توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری خوانده شد. جذب محیط کشت مایع پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون حدود 0.2 که معادل استاندارد ۳ مک فارلن می‌باشد، بدست آمد. سپس از محیط کشت مایع اولیه 10^{-1} تا 10^{-12} تهیه شده که جذب هر یک از رقت‌ها بطور جداگانه خوانده شد. از هر رقت میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت حاوی آنوزین متیلن بلو (EMB) کشت داده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۱۸ ساعت در دمای 37°C کلنی‌های رشد یافته شمارش شدند.

را بر روی سویه های *E.coli*، *S.aureus*، *P.aeruginosa* و *K. pneumoniae* 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 ۲/۶۷ mg/ml دارای بیشترین اثر مهارکنندگی می باشد و بیشترین تأثیر لاکتوفیرین در مهار رشد باکتریهای *E.coli* و *P. aeruginosa* بود. این دانشمندان همچنین اعلام کردند که لاکتوفیرین از طریق آسیب زدن به غشاء خارجی باکتری های گرم منفی و تغییر در نفوذ پذیری غشا موجب مهار رشد آنها می شود (۱۴). *Dionysius* و همکاران گزارش کردند که لاکتوفیرین 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 لاکتوفیرین به نوع سویه و میزان اولیه باکتریها وابسته است (۱۵).

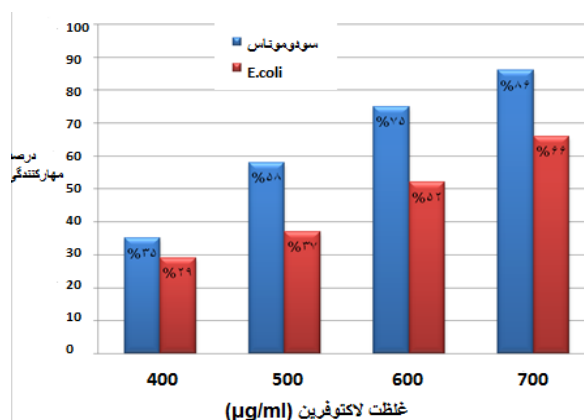
فعالیت ضد میکروبی لاکتوفیرین علیه گونه های مختلف پسودوموناس توسط چندین مکانیسم قابل شرح می باشد. مکانیسم اول این است که لاکتوفیرین یک پروتئین متصل شونده به آهن می باشد. آهن یک عنصر مهم برای تمامی میکروارگانیسم ها است. کاهش غلظت آهن آزاد در محیط اطراف میکروارگانیسم ها منجر به ایجاد شرایطی می شود که در نهایت به مرگ میکروارگانیسم ها منتهی می گردد. از طرف دیگر کمبود آهن محیط از تشکیل بیوفیلم توسط *P.aeruginosa* جلوگیری می کند. مکانیسم دوم بیانگر این مسئله است که لاکتوفیرین از طریق اتصال به بخشی از لیپید A باعث از هم گسستگی غشاء باکتری های گرم منفی می شود. 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 لاکتوفیرین را از طریق اجازه ورود به آنتی بیوتیک ها و سایر عوامل ضد میکروبی، کامل می کند (۱۶). در تحقیق حاضر، نتایج نشان داد که لاکتوفیرین 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 لاکتوفیرین نسبت به مطالعات پیشین دیده شد که می تواند بیانگر خاص تر و فعال تر بودن لاکتوفیرین بدست آمده و حساسیت بیشتر سویه های مورد آزمایش نسبت به لاکتوفیرین 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.



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



شکل ۳. مقایسه درصد مهارکنندگی لاکتوفیرین علیه سودوموناس آئروژینوزا و *E. coli*

بحث و نتیجه گیری

لاکتوفیرین 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 تأثیر گذار می باشد. تفاوت در اثر این پروتئین نسبت به نتایج گذشته در میزان غلظت مهارکنندگی آن بوده است. *Woan-sub* و همکاران در بررسی فعالیت ضد میکروبی لاکتوفیرین علیه گونه های مختلفی از پسودوموناس *P. syringae* و *P. fluorescens* گزارش کردند که بیشترین اثر مهارکنندگی لاکتوفیرین مربوط به غلظت ۱/۹ mg/ml بوده است. آنها همچنین اعلام کردند که *P. syringae* نسبت به *p.flurcens* دارای حساسیت بیشتری نسبت به لاکتوفیرین می باشد (۱۳). *Takase* و همکارانش تأثیر ضد میکروبی لاکتوفیرین

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, saliva, bile, and neutrophil granules. Lactoferrin has more potent antimicrobial activities against a wide range of gram negative and positive bacteria as well as antiviral 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 aeruginosa*. 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 aeruginosa* and also *E.coli*.

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

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

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 acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *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, Ardeshta R, Alabdulmohsen W, Fine DH, Velliyagounder K. Protective effects of human lactoferrin during aggregated bacterium actinomycetemcomitans induced bacteremia in lactoferrin efficient mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(1):397-404.
7. Crosa J.H. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Rev.* 1989;53(4):517-30.
8. Appelmek BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, de Boer HA, MacLaren DM, et al. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *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):2531-2539.
10. Rahimi MK. *Zinser Microbiology*. Tehran: Abizh Pub; 1382.p.2. [In Persian]
11. Sneath PHA. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. USA: Williams and Wilkins, 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 Extension Mag.* 2000. Available from: http://www.lifeextension.com/magazine/2000/10/report_lactoferrin/page-01