

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

رمیسا شعر بافی^۱، فاطمه مرادیان (MSc)^{۱*}، علیرضا رفیعی (PhD)^۲

۱- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی-مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲- گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

دریافت: ۹۴/۱۲/۱۱، 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، براق، صفراء 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 پسودوموناس آئروژینوزا در بیماران مبتلا به سوتختگی با مقاومت دارویی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه فعالیت ضد باکتریایی لاکتوفرین پس از جداسازی و خالص سازی از کلسترول گاو، ضد پسودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های باکتریایی از بیماران مبتلا به سوتختگی (بیمارستان شهید زارع) جداسازی شدند و پس از انجام تست‌های تاییدی نظیر اکسیداز، کاتالاز و کشت در محیط TSI جهت فعالیت‌های میکروبی مورد استفاده قرار گرفتند. لاکتوفرین خالص شده با $4\text{ }\mu\text{g/ml}$ ، $400\text{ }\mu\text{g/ml}$ ، $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ و $700\text{ }\mu\text{g/ml}$ استفاده شدند. کلینیک‌های پسودوموناس توسط دستگاه شمارش کلینی شمارش شده و با کنترل منفی (بدون حضور لاکتوفرین) مقایسه شدند. همچنین $\text{DH5}\alpha$ سویه E.coli به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کمترین غلظت مهار کنندگی مربوط به غلظت $400\text{ }\mu\text{g/ml}$ با 29% و 35% مهار کنندگی و بیشترین درصد مهار کنندگی لاکتوفرین مربوط به غلظت $700\text{ }\mu\text{g/ml}$ با 46% و 48% مهار کنندگی در سودوموناس و اشرشیاکلی بودند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که تمامی غلظت‌های لاکتوفرین دارای فعالیت مهار کنندگی هستند اما در غلظت $700\text{ }\mu\text{g/ml}$ بیشترین مهار کنندگی را علیه پسودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی دارد.

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

مقدمه

سیستم دفاعی غیر اختصاصی میزان علیه پاتوژن‌های بی‌شماری در نظر گرفته می‌شود^(۱). 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^(۲). لاکتوفرین علاوه بر جذب آهن و دورنگه داشتن آن از دسترس میکروب‌ها می‌تواند از طریق ممانتع از متابولیسم میکروبی کربوهیدرات‌ها، بی ثبات کردن دیواره سلولی باکتری‌ها و یا از طریق اتصال به کلیسیم و منیزیم فعالیت ضد میکروبی داشته باشد^(۳). استفاده از لاکتوفرین در تقدیم حیواناتی نظیر موش و خوک موجب افزایش مقاومت آنها در برابر بیماری‌های باکتریایی و التهابی گردیده است^(۴). جنس سودوموناس متشكل از بسیاری گونه‌های باسیل گرم منفی هوایی غیر تخمیری است که در

لاکتوفرین گلیکو پروتئین 80 کیلو دالتونی است که قابلیت اتصال به آهن را دارد. این پروتئین در شیر، اشک، براق، گرانولهای اختصاصی (PMNS) به خصوص نوتروفیل‌ها یافت می‌شود. خواص بیولوژیکی آن شامل تنظیم جذب آهن در روده، خواص ضد التهابی، تنظیم کننده سیستم ایمنی بدن و فعالیت ضد باکتریایی، ویروسی و توموری می‌باشد^(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 می‌باشد^(۳). در بعضی مواقع لاکتوفرین به آهن آزاد شده از ترانسفرین‌ها متصل می‌شود که همین امر تکمیر باکتریها می‌شود^(۵). تمایل لاکتوفرین برای جذب آهن به عنوان یک ترکیب اصلی

□ این مقاله حاصل پایان نامه رمیسا شعر بافی دانشجوی رشته میکروبیولوژی و طرح تحقیقاتی به شماره ۳۹-۸۷ علوم پزشکی مازندران می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر فاطمه مرادیان

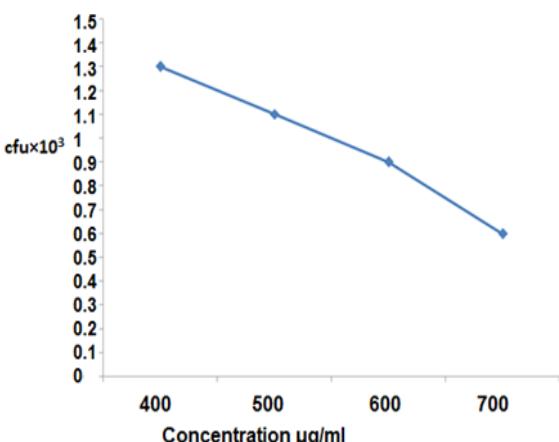
آدرس: ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم پایه. تلفن: ۰۱۱-۳۳۶۸۷۶۵۵

رقت 10^{-12} OD حدود ۰/۲ تعداد کلی های قابل شمارش داشته که این رقت مناسبترین تعداد کلی های قابل شمارش را نشان داد. ۵ پلیت از محیط اوزین متیلن بلو(EMB) تهیه شده و به هر پلیت ۱۰۰ میکرولیتر از رقت 10^{-12} اضافه گردید سپس به هر پلیت غلظت های مختلف لاكتوفرین 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 باکتری ها تعداد کلی ها شمارش و میزان باکتری زنده (CFU) مشخص گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: این تحقیق در قالب طرح کاملاً "تصادفی انجام شد و One Sample pss از اطمینان از نرمال بودن داده ها با استفاده از Kolmogorov-Smirnov Test SPSS و آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه ای دانکن بین تیمارهای مختلف صورت گرفت و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج نشان داد که لاكتوفرین بطور موثری موجب کاهش رشد پسودومonas آئروژینوزا می شود که درصد مهار کنندگی به ترتیب ۷۵، ۵۸، ۴۵ و ۳۵ درصد بوده که غلظت های مختلف لاكتوفرین بر رشد باکتری حاصل از اثر SPSS آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه ای دانکن بین تیمارهای مختلف صورت گرفت و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.



شکل ۱. بررسی اثر غلظت های متفاوت لاكتوفرین بر روی رشد سودوموناس آئروژینوزا

خاک و آب سکونت دارند به طور وسیع در طبیعت، در آب، فاضلاب، گرد و غبار، هوا و خاک پراکنده اند(۱۰). یکی از عفوتهاشایع بیمارستانی که توسط پاتوژن فرست طلبی از جمله پسودومonas آئروژینوزا ایجاد می شود که ناشی از عقص اینمی یا عوامل دیگر است، عفونت پس از سوختگی می باشد. از آنجایی که مقاومت به انواع آنتی بیوتیک ها از چالش های مهم درمان این نوع عفونتها محسوب می شود تحقیق در زمینه درمان جایگزین و موثرتر، از اولویت های پزشکی محسوب می شود.

با توجه به سابقه زیاد خواص درمانی پروتین لاكتوفرین در بیماری های مختلف و همچنین اثر مهم این پروتین خوارکی در تقویت سیستم ایمنی در مقابله با انواع پاتوژن ها از جمله باکتری ها، در این مطالعه اثر ضرباکتریایی لاكتوفرین خالص شده از کلسترول شیر گاو با غلظتها مختلف بر باکتری پسودوموناس جدا شده از نمونه های افرادی که دچار سوختگی شده اند، بررسی گردید.

مواد و روش ها

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 آغاز خونی منتقل گردید. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند به منظور شناسایی باکتری ها تست های بیوشیمیایی نظیر اوره آر، 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 لاكتوفرین: لاكتوفرین از کلسترول شیر گاو طی ۲۲ ساعت پس از زایمان جدا سازی شد و سپس توسط دستگاه کروماتوگرافی تبادل آئیونی CM-sephadex G50 خالص سازی شد و خلوص آن توسط ژل SDS-PAGE تایید گردید و غلظت آن توسط روش برادرفورد با استفاده از پروتئین آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. بدین منظور ابتدا غلظت های متفاوت از استاندارد تهیه شد سپس دو حجم متفاوت از لاكتوفرین تهیه گردید و به میزان یکسان محلول برادرفورد به تمامی لوله ها افزوده شد. جذب نمونه ها در ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت لاكتوفرین خالص شده مطابق با منحنی استاندارد رسم شده برای پروتئین آلبومین گاوی، $2/5 \mu\text{g}/\text{ml}$ به دست آمد. نتایج مربوط به خالص سازی در مطالعات پیشین توسط Sharbafi و همکاران گزارش شده است(۱۲).

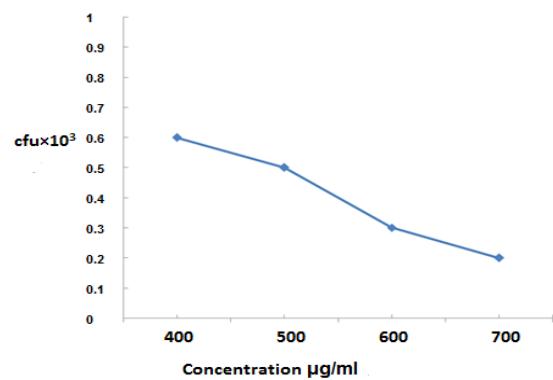
کشت میکروبی و بررسی اثر ضد باکتریایی لاكتوفرین: ابتدا سودوموناس در 50.0 ml از محیط LB broth به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد و پس از گذشت این زمان جذب (OD) محیط مایع توسط دستگاه اسپکترو فوتومتری خوانده شد. جذب محیط کشت مایع پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون حدود $0/2$ که معادل استاندارد 3 مک فارلن می باشد، بدست آمد. سپس از محیط کشت مایع اولیه 12 رقت از 10^{-12} تهیه شده که جذب هر یک از رقت ها بطور جداگانه خوانده شد. از هر رقت میزان 100 میکرولیتر بر روی پلیت حاوی اوزین متیلن بلو (EMB) کشت داده شد. پس از انکوباسیون به مدت 18 ساعت در دمای 37°C کلی های رشد یافته شمارش شدند.

K. P.aeruginosa ، S.aureus ، E.coli و pneumonia را بر روی سویه های *E.coli* و *P.aeruginosa* که از پستان گاو جدا شده بود بررسی کردند. در این آزمایشات آنها از غلظت ۰/۶۷ و ۱/۶۷ mg/ml استفاده کردند. نتایج نشان داد که غلظت ۲/۶۷ mg/ml دارای بیشترین اثرمهمکنندگی می باشد و بیشترین تأثیر لاكتوفرین در مهار رشد باکتریهای *E.coli* و *P. aeruginosa* بود. این دانشمندان همچنین اعلام کردند که لاكتوفرین 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 لاكتوفرین 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 لاكتوفرین به نوع سویه و میزان اولیه باکتریها وابسته است (۱۵).

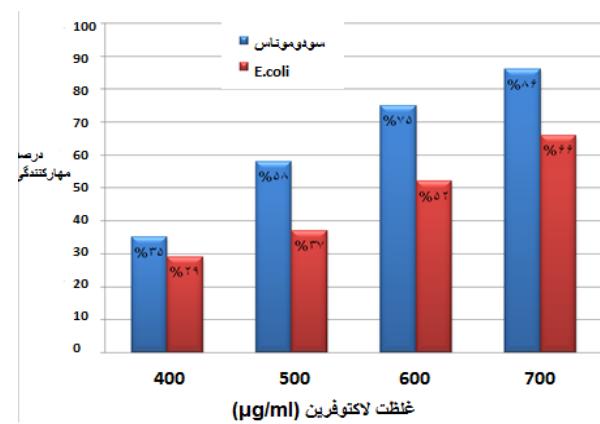
فعالیت ضد میکروبی لاكتوفرین علیه گونه های مختلف پسودوموناس توسط چندین مکانیسم قابل شرح می باشد. مکانیسم اول این است که لاكتوفرین یک پروتئین متصل شونده به آهن می باشد. آهن یک عنصر مهم برای تمامی میکروگانیسم ها است. کاهش غلظت آهن آزاد در محیط اطراف میکروگانیسم ها منجر به ایجاد شرایطی می شود که در نهایت به مرگ میکروگانیسم ها منتهی می گردد. از طرف دیگر کمبود آهن محیط از تشکیل بیوفیلم توسط لاكتوفرین از طریق اتصال به بخشی از لپید A باعث از هم گستینگی غشاء باکتری های گرم منفی می شود. بی ثبات شدن غشاء خارجی در باکتری ها موجب آزاد شدن لیپولی ساکاریدها (LPS) می گردد و در نهایت منجر به تغییر در نفوذ پذیری غشاء می شود. تغییر در نفوذ پذیری غشا، فعالیت ضد میکروبی لاكتوفرین 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 لاكتوفرین در شرایط آزمایشگاهی به طور موثری موجب کاهش رشد پسودوموناس آئروژنوزا می شود. اثر مهارکنندگی بر دو سویه *E.coli* و پسودوموناس در غلظت پایین تری از لاكتوفرین نسبت به مطالعات پیشین دیده شد که می تواند بیانگر خالص تر و فعال ترین لاكتوفرین بດست آمده و حساسیت بیشتر سویه های مورد آزمایش نسبت به لاكتوفرین 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 لاكتوفرین بر روی رشد *E.coli*



شکل ۳. مقایسه درصد مهارکنندگی لاكتوفرین علیه سودوموناس ائروژنوزا و *E. coli*

بحث و نتیجه گیری

لاكتوفرین یک پروتئین چند عملکردی است که یکی از نقشهای آن فعالیت ضد باکتریای است و بر روی طیف گسترده ای از گونه های گرم مشبت 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 *P. syringae* ضد میکروبی لاكتوفرین علیه گونه های مختلفی از پسودوموناس *P. fluorescens* و *P. fluorescens* کردند که بیشترین اثر مهارکنندگی لاكتوفرین مربوط به غلظت ۱/۹ mg/ml بوده است. آنها همچنین اعلام کردند که *P. syringae* نسبت به *P. fluorescens* دارای حساسیت بیشتری نسبت به لاكتوفرین می باشد(۱۳). Takase و همکارانش تأثیر ضد میکروبی لاكتوفرین

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 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

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 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, Ardeshta R, Alabdulmohsen W, Fine DH, Velliagounder K. Protective effects of human lactoferrin during *aggregatibacter 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.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 rods 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