JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دهم، شماره دوم، ۱۳۹۳، پیاپی ۲۹: ۱۴۲-۱۳۱

بررسی اثر ملیتین استخراج شده از زهر زنبور عسل ایرانی روی سویه‌های کلینیکی *سودوموناس آئروژینوزا*

مرضیه رضایی[۱]، منصور بیات[۲]، دلاور شهباززاده[۳]، محسن مومن زاده[۳]، رضا اکبری[۳]، کامران پوشنگ باقری[۳]*

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۲- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۳- آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۱ مرداد ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۱ مهر ۱۳۹۲

چکیده

عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان‌های زیادی گزارش شده و با توجه به طبیعت فرصت طلب بودن آن افراد دارای ضعف سیستم ایمنی درمعرض خطر هستند. استفاده نابجا از آنتی بیوتیک‌ها به همراه مکانیسم‌های جهش پیچیده در جنس سودوموناس سبب بوجود آمدن گونه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک شده است. در خلال دهه گذشته جستجو جهت یافتن آنتی بیوتیک‌های پپتیدی طبیعی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه بررسی اثر مهاری و کشندگی پپتید ملیتین بر سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا بود. بدین منظور ۴۸ سویه مورد بررسی از یک مطالعه قبلی در دسترس بودند. پس از تهیه زهر زنبور و آماده سازی آن، کیفیت زهر با تست SDS-PAGE بررسی شد. سپس با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در فاز معکوس (RP-HPLC) پپتید ملیتین جداسازی گردید. سپس کیفیت ملیتین استخراج شده با استفاده از SDS-PAGE بررسی گردید. حداقل غلظت مهاری و کشندگی ملیتین با روش میکرودایلوشن براث و شمارش کلنی تعیین گردید. حدود بیست فراکشن از زهر زنبور عسل تخلیص گردید که پپتید ملیتین اصلی ترین فراکشن زهر بود. MIC_{50} کل سویه‌های حساس، سویه‌های موکوئیدی و غیرموکوئیدی حساس به ملیتین به ترتیب ۱۲/۵، ۶/۲۵ ، و ۱۲/۵ میکروگرم بدست آمد. ۹۴/۷۳ درصد سویه‌های موکوئیدی و ۸۶/۲ درصد سویه‌های غیر موکوئیدی نسبت به ملیتین حساس بودند. MBC_{50} در کل نمونه‌های حساس، سویه‌های موکوئیدی و غیرموکوئیدی حساس به ملیتین به ترتیب ۵۰، ۳۷/۵ و ۵۰ میکروگرم بدست آمد. ۸۹/۵۸ درصد از سویه‌ها حساس به ملیتین بوده و رشد ۱۰/۴۱ درصد از آنها در حضور ملیتین مهار نگردید.با استفاده از نتایج تست MIC و MBC مشخص شد که ملیتین اثر قابل توجه مهاری و کشندگی بر رشد سودوموناس آئروژینوزاهای جداشده از بیماران مختلف داشته است. آنالیز نتایج نشان داد که رشد سویه‌های موکوئیدی با مقدار کمتری از ملیتین مهار می‌گردد. این سویه‌ها بدلیل وجود لایه‌های پلی ساکاریدی در اطراف خود، نفوذپذیری کمتری به آنتی بیوتیک‌ها داشته و مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند. نتایج این پژوهش از این لحاظ با ارزش است که امید جهت درمان عفونت‌های سودوموناسی در مبتلایان به بیماری سیستیک فایبروزیس را افزایش می‌دهد.

کلمات کلیدی: *زهر زنبور، ملیتین، سودوموناس آئروژینوزا، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در فاز معکوس، تست MIC و MBC*

* نویسنده مسئول: کامران پوشنگ باقری

آدرس: انستیتو پاستور ایران - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی-گروه بیوتکنولوژی- آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، تهران، ایران : تلفن: ۶۶۴۸۰۷۸۰

پست الکترونیک: k_bagheri@pasteur.ac.ir

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا شایعترین علت عفونت سوختگی و گوش خارجی بوده و همچنین می تواند در موارد خاصی باعث پنومونی شود (۱۱). همچنین پنومونی مرتبط با تهویه‌ها توسط این میکروارگانیسم در بسیاری از مطالعات گزارش شده است (۹). *سودوموناس آئروژینوزا* از نمونه‌های کلینیکی جدا می‌شود و تقریبا هر بافت یا نقطه ای از بدن از جمله بافت‌های نرم بدن و سیستم ادراری و ریه‌ها می‌تواند با این باکتری آلوده شوند و حتی در اثر ضایعات موضعی، باکتری می‌تواند وارد گردش خون شده و موجب بروز سپتی سمی گردد که در این صورت درصد مرگ و میر بسیار بالاست. در بیماران سیستیک فیبروزیس پنومونی سودوموناسی باعث تخریب پیش رونده بافت ریه می‌گردد (۱۸). امروزه به علت مقاومت دارویی که این باکتری از خود نشان می‌دهد، عفونت ناشی از آن به عنوان یک مسئله مهم و جدی تلقی می‌گردد (۵). اغلب آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان عفونت‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مؤثر نیستند و میزان مقاومت رو به افزایش است (۱۵،۳۱). با توجه به مقاومت آنتی-بیوتیکی این باکتری و جهش‌های ایجاد شده هنوز هیچ آنتی بیوتیکی تضمین کننده درمان عفونت‌های *سودوموناس آئروژینوزا* نیست. لذا جستجوی آنتی بیوتیک‌های جدید با منبع طبیعی (Natural Source) ممکن است بتواند افق جدیدی را در درمان اینگونه عفونت‌ها پدید آورد.

در این میان پپتیدهای ضدمیکروبی مورد توجه مراکز مختلف تحقیقاتی و دارویی قرار گرفته و در دهه اخیر مطالعات زیادی در این زمینه، در جهت شناسایی آنها صورت گرفته است. از جمله این آنتی بیوتیک‌ها، پپتیدهای آنتی باکتریال هستند که از منابع مختلف شامل گیاهان، جانوران، سخت پوستان، بندپایان، نرم تنان و... استخراج گردیده‌اند (۱۳ و ۱۹). آنها با فعالیت آنتی-بیوتیکی و ضدقارچی و ضدویروسی بر علیه انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها مشخص می‌شوند. به علاوه التهابات سپتیک و غیر سپتیک، ترمیم زخم و تنظیم سیستم ایمنی اکتسابی هم نقش دارند (۳۴). پپتیدهای ضدمیکروبی دارای شارژ مثبت، اندازه کوچک، و دارای ۵۰-۱۲ اسیدآمینه هستند. آرژنین و لیزین مسئول بار مثبت بوده و ساختار آمفی پاتیکی، آنها را برای ارتباط با غشاهای میکروبی توانا می سازد (۸). پپتیدهای ضدمیکروبی بر علیه طیف وسیعی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی موثر هستند (۲۷).

پپتیدهای ضد میکروبی در زهر زنبور عسل (*Apis melifera*) نیز وجود داشته و میتواند یک منبع مهم طبیعی برعلیه عفونت‌های مختلف باشند. زهر از فرآورده‌های با ارزش زنبور عسل است و از دیر باز برای درمان بیماری های مختلف از جمله ورم مفاصل، نقرس، روماتیسم و سایر بیماری های سیستم ایمنی و التهابی به کار میرفته است (۱۶ و ۲۸). ملیتین کوچکترین پپتید موجود در زهر بوده و ۵۰ تا ۶۰ درصد وزن خشک زهر را شامل می‌شود (۲ و ۳). در سال ۱۹۹۹ سیتارام و همکاران از فعالیت‌های بیولوژیکی قسمت C- ترمینال باقیمانده‌ی ۱۵ قطعه ی ملیتین استفاده کردند و از آن به عنوان آنالوگی در فعالیت ضدباکتریایی استفاده کردند (۲۹). در سال ۲۰۰۵ لازارف و همکاران در محیط *In vivo* اثر ضدمیکروبی ملیتین بر روی عفونت‌های ناشی از *کلامیدیا تراکوماتیس* و *مایکوپلاسما هومینیس* را بررسی کردند (۲۰). در سال ۲۰۱۱ یون و همکارانش با به کار گرفتن ملیتین از پانکراتیت حاد به عنوان یکی از بیماری های عفونی جلوگیری کردند (۳۳).

هدف اصلی این تحقیق بررسی اثر مهاری و کشندگی ملیتین بر سویه ای بالینی جدا شده از بیماری‌های مختلف بوده است. تابحال مطالعه ای در مورد اثر ملیتین بر سویه‌های بالینی انجام نگرفته و تحقیق در این مورد، از این لحاظ حائز اهمیت است که محققین را به این اطمینان خاطر میرساند که پپتید ملیتین قادر به نابود کردن اکثر سویه‌های بالینی می‌گردد و یا میتواند سودوموناس‌های جدا شده از یک بیماری خاص را نابود کند.

مواد و روش کار

تهیه زهر

در این مطالعه زهر زنبورهای عسل ایرانی (*Apis Melifera meda*) واقع در منطقه شهرکرد به روش شوک الکتریکی تهیه شد. زهر زنبورها توسط دستگاه جمع‌آوری کننده زهر از طریق تحریک الکتریکی بر اساس پروتکل بنتون با کمی تغییرات جمع‌آوری گردید (۱). یک آکواریوم شیشه ای که دارای صفحات سیم کشی شده بود بر روی قسمت بالایی کندو قرار داده شد. زنبورها بر روی این شبکه شروع به فعالیت و راه رفتن کرده و در اثر جریان الکتریکی تحریک شدند. زنبورهای عسل در اثر تحریک الکتریکی احساس خطر کرده و سطح شبکه سیمی را نیش می‌زدند. سپس جریان الکتریکی قطع گردید و شبکه سیمی از دستگاه جمع‌آوری کننده زهر جدا گردید و در معرض هوا قرار داده شد. در نهایت زهر خشک شده توسط روش خراش با یک اسکالپل جمع‌آوری گردید و پودر جمع‌آوری شده به آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی در انستیتو پاستور انتقال داده شد و به منظور آزمایش در دمای ۲۰- درجه نگهداری گردید.

آماده سازی زهر

۵۰ میلی گرم از ونوم را در یک میلی لیتر آب دیونیزه حل کرده و به مدت دو دقیقه با دستگاه Vortex مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ده دقیقه و با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. مایع روئی به آرامی برداشته شده و در میکروتیوپ‌های فیلتر دار با فیلتر غشایی ۰/۲ میکرومتر فیلتر گردید. مایع شفاف به دست آمده جهت آزمایشات بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. جهت تعیین غلظت ملیتین تخلیص شده، از روش UV در طول موج ۲۸۰nm با استفاده از دستگاه میکروپلیت اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer, Microplate Epoch-Biotek Instruments, USA) استفاده گردید.

الکتروفورز زهر به روش SDS-PAGE

جهت بررسی کیفیت زهر جمع‌آوری شده، مقداری از زهر در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی حل شده و سپس در ژل پلی آکریل آمید ۱۵/۵ ٪ در مدت زمان ۳ ساعت با جریان ۲۰ میلی آمپر الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی با کوماسی برلیانت بلو R250 به مدت یک شب صورت گرفته و رنگ بری ژل با ۳۰٪ استیک اسید و ۱۰٪ متانل انجام گردید. نتایج با سیستم مستندسازی ژل (Gel Documentation System, BioRad) ثبت گردید.

استخراج ملیتین از زهر به روش HPLC فاز معکوس

جهت جداسازی ملیتین از زهر زنبور عسل از تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در فاز معکوس، سیستم HPLC (Knauer GmbH, Germany) و ستون C18 استفاده گردید. فاز متحرک شامل استونیتریل خالص حاوی ۰/۰۵٪ تری

فلوئورواستیک اسید به عنوان ماده اصلی (محلول A) و آب با درجه خلوص کروماتوگرافی حاوی ۰/۰۵٪ تری فلوئورواستیک اسید(محلول B)، به عنوان حلال فرعی بود. متد بکار رفته یک گرادینت خطی افزایش یابنده با محلول استونیتریل بود. قبل از تزریق نمونه به سیستم، ابتدا متعادل سازی ستون با محلول B انجام گردید. سپس نمونه در حجم ۵۰ میکرولیتر به ستون تزریق شده و متد در نظر گرفته شده اعمال گردید. متد اعمال شده شامل شستشوی ستون با محلول B به مدت ۵ دقیقه، ۵۵ دقیقه اعمال محلول A تا شیب غلظت ۶۰ درصد و سپس اعمال محلول A تا شیب غلظت ۹۰ درصد به مدت ۵ دقیقه بود. در انتها، ستون دوباره با محلول B به مدت ۵ دقیقه متعادل گردید. در طی آزمایش پیک‌های مشاهده شده جمع‌آوری گردیدند.

لیوفیلیزه کردن فراکشن‌ها

فراکشن‌های جمع‌آوری شده در دمای ۵۶°C- و فشار ۰/۰۴ اتمسفر توسط دستگاه Freeze Dryer (Christ, 2 alpha - Germany) در مدت ۲۴ ساعت لیوفیلیزه شدند.

الکتروفورز ملیتین به روش SDS-PAGE

خلوص ملیتین استخراج شده با روش الکتروفورز پلی اکریل آمید- سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) مورد بررسی قرار گرفت. فراکشن ملیتین در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی حل شده و سپس با شرایط توضیح داده شده در قسمت قبلی الکتروفورز گردید.

جمع‌آوری نمونه‌های بالینی

سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* از یک مطالعه قبلی جمع‌آوری شده و در آزمایشگاه موجود بودند. تعداد نمونه‌های مورد بررسی ۴۸ مورد از بیماری های مختلف از جمله عفونت‌های ادراری، سیستیک فیبروزیس و غیره بودند. سویه *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 به عنوان سویه استاندارد به همراه سویه‌های بالینی مورد آزمایش قرار گرفت.

بررسی اثر ضدباکتریایی ملیتین

تهیه سوسپانسیون استاندارد به روش کمی

جهت تعیین خاصیت آنتی باکتریال ملیتین، پروتکل بین المللی استاندارد CLSI مورد استفاده قرار گرفت که بر اساس این پروتکل نیمه مک فارلند معادل $1/5\times10^8$ CFU/ml است. باکتری‌های مورد نظر در محیط کشت مولر هینتون براث به مدت یک شب در دمای ۳۷ کشت داده شدند. سوسپانسیون باکتریایی در دور ۷۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب بدست آمده در سرم فیزیولوژی سوسپانسیونه شده و مجددا با شرایط قبلی سانتریفیوژ گردید. رسوب تمیز در سرم فیزیولوژی سوسپانسیونه شده و به عنوان سوسپانسیون غلیظ در تهیه نیم مک فارلند مورد استفاده قرار گرفت. جهت دقت بیشتر در تهیه نیم مک فارلند، دانسیته اپتیک سوسپانسیون مورد آزمایش با روش اسپکتروفوتومتری با دستگاه اسپکتروفتومتر (CT-5000, Chrom TECH, Thailand) در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. دانسیته اپتیک بین ۰/۱- ۰/۰۸ معادل $1/5\times10^8$ CFU/ml است. جهت کّمی تر شدن تعداد باکتری‌های تهیه شده، دانسیته اپتیک ۰/۰۹ جهت تهیه نیم مک فارلند انتخاب گردید.

حداقل غلظت مهاری (MIC) و کشندگی (MBC) ملیتین

جهت بدست آوردن MIC روش Microdilution broth در چاهک‌های ۹۶ خانه بکار گرفته شد. جهت

انجام تست MIC از سوسپانسیون به دست آمده ی باکتری در مرحله قبلی ۱۰ میکرولیتر برداشت گردید و با محیط کشت مولر هینتون براث به حجم یک میلی لیتر رسانده شد. در این حالت تعداد باکتری‌ها $1/5\times10^{6}$ CFU/ml می‌باشد. ابتدا در تمام چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکروگرم ملیتین با مولر هینتون براث به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شده و به چاهک اول اضافه گردید. بعد از مخلوط کردن به کمک سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشت شده و به چاهک دوم اضافه گردید. این عمل تا چاهک آخر به همین صورت تکرار گردید. ۱۰۰ میکرولیتر نیز از چاهک آخر برداشت شده و دور ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر باکتری ($1/5\times10^{5}$) به تمام چاهک‌ها اضافه شد. میکروپلیت به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ انکوبه گردید. سپس نتیجه آزمایش MIC مشاهده و ثبت شد. آخرین چاهک شفاف به عنوان حداقل غلظت مهاری در نظر گرفته شد. جهت بدست آوردن حداقل غلظت کشندگی، از تمام چاهک‌های شفاف ۵۰ میکرولیتر نمونه برداشت شده و در محیط کشت مولر هینتون آگار در دمای ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. تعداد کلنی‌های رشد یافته شمارش شد و مقدار MBC محاسبه گردید. حداقل غلظت کشندگی غلظتی است که در آن ۹۹/۹۹ درصد باکتری‌ها از بین رفته باشند.

نتایج

الکتروفورز زهر و ملیتین به روش SDS-PAGE

طیف وزن مولکولی پروتئین‌های زهر حدودا بین ۲/۸ الی ۱۸۰ کیلودالتون بود. نتیجه الکتروفورز نشان داد که پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر شاخص بوده و بیشترین اجزای تشکیل دهنده زهر را تشکیل می‌دهند (شکل ۱). فراکشن ملیتین بعد از تخلیص تقریبا خالص و تک باند درمحدوده ۲/۸ کیلو دالتون قرار گرفته بود (شکل ۱).

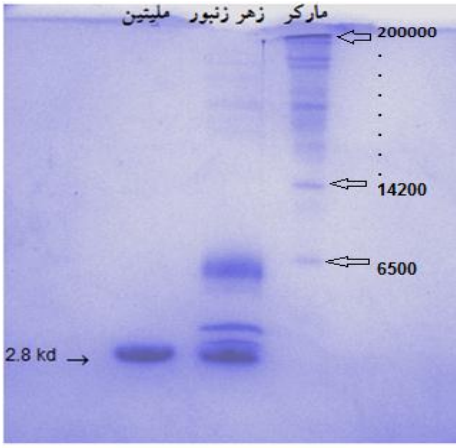
استخراج ملیتین از زهر به روش HPLC فاز معکوس

در طول موج ۲۱۴ نانومتر، ۲۰ فراکشن قابل تشخیص بوده و فراکشن اصلی مربوط به ملیتین بود. این فراکشن تقریبا" ۵۳/۸٪ از مساحت کل فراکشن‌ها را تشکیل داده و در حدود دقیقه ۴۷/۵ تا ۵۲/۵ (معادل با ۴ دقیقه)، از ستون C18 خارج شد. این مدت زمان معادل درصد استونیتریل از میزان ۴۲/۵ تا ۴۷/۵ درصد می‌باشد (شکل ۲).

بررسی اثر ضدباکتریایی

۲۲/۹۱٪ نمونه‌ها از تراشه ، ۲۷/۰۸٪ از ادرار و ۲۵٪ از سیستیک فیبروزیس و ۲۵٪ هم سایر موارد (۱۰/۴۱٪ از زخم، ۶/۲۵ ٪ از خون، ۴/۱۴٪ از مایع مغزی نخاعی، ۲/۰۸٪ از مدفوع و ۲/۰۸ از مایع مفصلی) بودند. MIC_{50} کل سویه‌های حساس، سویه‌های موکوئیدی و غیرموکوئیدی حساس به ملیتین به ترتیب ۱۲/۵، ۶/۲۵ ، و ۱۲/۵ میکروگرم بدست آمد. ۸۶/۲ درصد سویه‌های غیرموکوئیدی و ۹۴/۷۳ درصد سویه‌های موکوئیدی نسبت به ملیتین حساس بودند. MBC_{50} در کل نمونه‌های حساس، سویه‌های موکوئیدی و غیرموکوئیدی حساس به ملیتین به ترتیب ۵۰، ۳۷/۵ و ۵۰ میکروگرم بدست آمد. ۸۹/۵۸ درصد از سویه‌ها حساس به ملیتین بوده و رشد ۱۰/۴۱ درصد از آنها در حضور ملیتین مهار نگردید. نسبت MIC_{50}/MBC_{50} کل سویه‌ها، سویه‌های موکوئیدی و غیرموکوئیدی به ترتیب برابر یک دوم، یک ششم و یک دوم بدست

آمد. نمودار مقایسه ای نتایج MIC_{50} و MBC_{50} کل نمونه‌ها، نمونه‌های موکوئید و غیرموکوئیدی حساس به ملیتین در نمودار یک نشان داده شده است. MIC_{90} کل سویه‌های حساس، سویه‌های موکوئیدی و غیرموکوئیدی حساس به ملیتین، مشابه همدیگر، برابر ۲۵ میکروگرم و MBC_{90} آنها نیز مشابه همدیگر، معادل ۵۰ میکروگرم بدست آمد. نسبت MIC_{90}/MBC_{90} کل سویه‌ها و گروه‌های موکوئیدی و غیرموکوئیدی، مشابه هم، برابر یک دوم بدست آمد. مقایسه نتایج MIC_{90} و MBC_{90} کل نمونه‌ها، نمونه‌های موکوئید و غیرموکوئیدی حساس به ملیتین در نمودار ۲ نشان داده شده است. رشد سویه استاندارد *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 در ۱۲/۵ میکروگرم ملیتین مهار گردید. MBC این سویه بالاتر از مقدار ۵۰ میکروگرم ملیتین گزارش گردید.

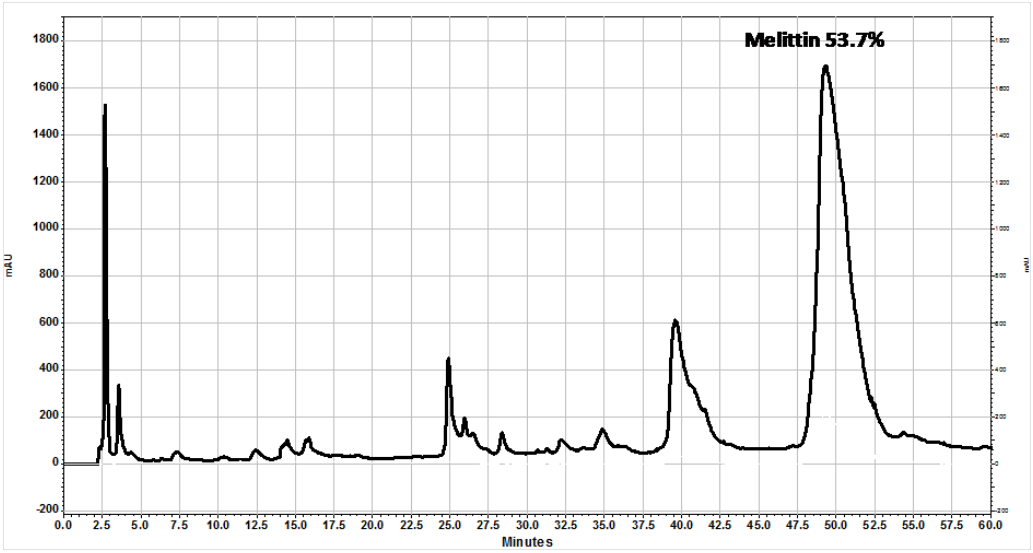


شکل ۱. SDS-PAGE ونوم زنبور و ملیتین.

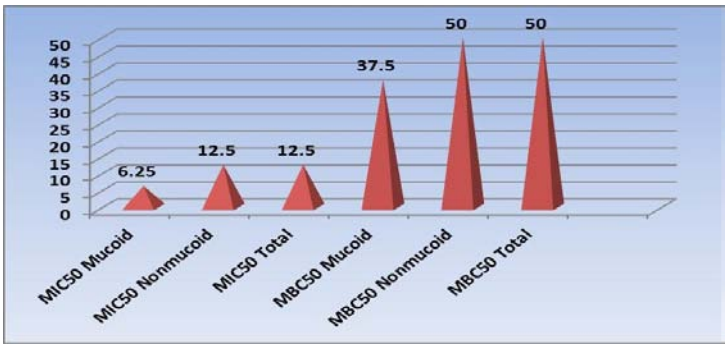
(از چپ به راست) چاهک اول: ملیتین خالص شده

چاهک دوم: زهر زنبور عسل

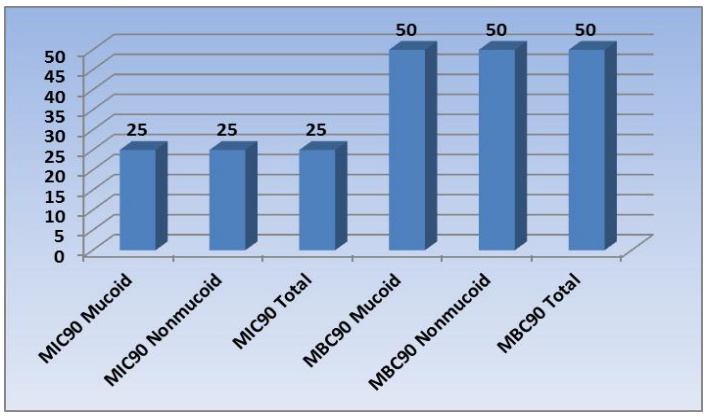
چاهک سوم: مارکر پروتئین



شکل ۲. کروماتوگرام زهر زنبور عسل. فراکشن ملیتین ۵۳/۷ ٪ از کل فراکشن‌ها را به خود اختصاص داده بود.



نمودار ۱. مقایسه نتایج MIC_{50} و MBC_{50} کل نمونه‌ها، نمونه‌های موکوئید و غیرموکوئیدی حساس به ملیتین



نمودار ۲. مقایسه نتایج MIC_{90} و MBC_{90} کل نمونه‌ها، نمونه‌های موکوئید و غیرموکوئیدی حساس به ملیتین

بحث

عفونت‌های بیمارستانی *سودوموناس آئروژینوزا* به سختی با آنتی بیوتیک‌ها قابل کنترل بوده و با افزایش مدت زمان اقامت بیمار در بیمارستان موجب عوارض بالینی و مرگ و میر از این عفونت‌ها شده و همچنین هزینه‌های بیمارستانی را به شدت افزایش می‌دهد (۶). این امر به دلیل مقاومت ذاتی این موجودات به دلیل نفوذپذیری کم غشاء خارجی آنها و همچنین وجود ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک می‌باشد (۲۳ و ۳۲). همچنین وجود *سودوموناس آئروژینوزا*های با مقاومت‌های آنتی بیوتیکی چندگانه (Multi-Drug Resistance) مشکلات بالینی زیادی را ایجاد کرده و این موضوع بسیار نگران کننده می‌باشد (۷ و ۲۵). گزارشاتی از ایجاد اپیدمی‌بیمارستانی توسط این سویه‌ها در کشورهای مختلف ثبت شده و عفونت‌های ناشی از آنها در بخش‌های سوختگی، دیالیز، مراقبت‌های ویژه، پیوند، و جراحی بسیار خطرناک بوده و نیاز به مراقبت‌های بیشتر دارد (۴، ۱۰ و ۲۴). بنابراین جستجوی آنتی بیوتیک‌های جدید، به طوری که مقاومت ژنتیکی در باکتری‌ها ایجاد نکنند، مورد توجه قرار گرفته است (۲۲). سال‌هاست که سویه‌های موکوئیدی *سودوموناس* بدلیل نفوذپذیری بسیار کم به آنتی بیوتیک‌ها مقاومت زیادی به درمان نشان داده و سبب ایجاد مشکلات بالینی در بیماران و در مواردی مرگ و میر می‌گردد (۱۷ و ۲۱). این پدیده به دلیل وجود لایه‌های پلی ساکاریدی متعدد از جنس آلژینات در اطراف باکتری و سایر مکانیسم‌ها از جمله پمپ efflux، وجود ژن‌های مقاوم و غیره است .

با توجه به تحقیقاتی که در دهه اخیر انجام شده، جستجوی بسیاری برای پیدا کردن آنتی بیوتیک‌هایی با

منبع طبیعی از خانواده‌های گوناگون (باکتری‌ها، گیاهان، بی مهرگان و مهره داران) انجام شده است (۱۳ و ۱۹). این مولکول‌ها متعلق به سیستم ایمنی ذاتی بوده و جزء اصلی سیستم دفاعی در برابر تعداد زیادی از ارگانیسم‌های زنده می‌باشند (۱۴ و ۳۰).

مقایسه نتایج MIC_{50} سویه‌های حساس موکوئیدی و غیرموکوئیدی نشان می‌دهد که رشد سویه‌های موکوئیدی در مقادیر کمتری از ملیتین مهار شده و به طور کلی رشد تمام سویه‌های حساس موکوئیدی و غیر موکوئیدی در غلظتی معادل ۴ برابر کمتر از غلظت کشندگی، مهار گردیدند. نتایج بدست آمده از مقایسه MBC_{50} سویه‌های موکوئیدی و غیرموکوئیدی ثابت می‌کند که سویه‌های موکوئیدی در مقادیر کمتری از ملیتین از بین می‌روند. بررسی نتایج MIC_{90} و MBC_{90} نشان داد که رشد ۹۰ درصد سویه‌های حساس موکوئیدی و غیرموکوئیدی در مقدار ۲۵ میکروگرم ملیتین مهار گردیده و در مقدار ۵۰ میکروگرم از بین رفتند. نسبت MIC_{90}/MBC_{90} برابر یک دوم، نشان دهنده برایند تاثیر بسیار مناسب داروی پپتیدی ملیتین بر سویه‌های موکوئیدی و غیرموکوئیدی است.

در تحقیقی که در سال ۲۰۰۵ توسط Fritche و همکاران (۱۲) بر روی مقاومت‌های دارویی سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* انجام گردید، مشخص شد که حدود ۲۷-۱۱٪ سویه‌ها مقاوم به ایمیپنم، مروپنم، سفپیم، سفتازیدیم، پیپراسیلین، آزترونام، لئوفلوکساسین و توبرامایسین بودند. مقایسه تحقیق حاضر با مطالعه Fritche و همکاران نشان می‌دهد که ۱۰/۴۱ ٪ از سویه‌ها در مقابل ملیتین مقاومت نشان داده و این مقدار مقاومت نسبت به ملیتین از آنتی-بیوتیک‌های رایج کمتر بوده است. این مطلب نشان می‌دهد که آنتی بیوتیک پپتیدی ملیتین باید مورد توجه محققین قرار گرفته و تحقیقات بیشتری در این زمینه صورت گیرد. بررسی مقاومت دارویی سویه‌های بیمارستانی *سودوموناس آئروژینوزا* در سال ۲۰۰۸ توسط Pillar و همکاران (۲۶) نشان داد که ۱۲٪ سویه‌ها مقاوم به دوریپنم، ۱۶٪ مقاوم به ایمیپنم و ۱۰٪ مقاوم به مروپنم بودند. مقایسه نتایج بدست آمده از مطالعه اخیر با تحقیق Pillar و همکاران نشان داد که مقاومت سویه‌ها نسبت به ملیتین مشابه مقاومت به مروپنم بوده و کمتر از دوریپنم و ایمی پنم بوده است. مقایسه نتایج امیدوارکننده است اما تایید نتایج مستلزم مطالعه بر روی تعداد سویه‌های بیشتری می‌باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که اثر مهاری و کشندگی ملیتین بر سویه‌های موکوئیدی بیشتر از سویه‌های غیرموکوئیدی بوده است. این مسئله از لحاظ میکروب شناسی بالینی بسیار حائز اهمیت بوده و می‌تواند تحقیقات متعددی را معطوف این موضوع نماید. می‌توان حدس زد که دلیل این پدیده شارژ مثبت ملیتین و همچنین ساختار سه بعدی مارپیچ آلفای آن و یا بدلیل عملکرد اصلی آن به صورت ترامر می‌باشد.

بر اساس نتایج تست ها، ملیتین می تواند روی انواع سویه‌های باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* اثر مهاری و تخریبی داشته و تعداد زیادی از آنها مخصوصا سویه‌های موکوئیدی را نابود کند. با توجه به نتایج بدست آمده، ملیتین اثر قابل توجه مهاری بر رشد *سودوموناس آئروژینوزا*های جداشده از بیماران مختلف داشته و می تواند در آینده با مطالعات بیشتر به صورت صنعتی وارد بازار دارویی شده و کمکی در حل معضل مقاومت‌های دارویی و سمیت داروهای شیمیایی رایج باشد. اهمیت اصلی این تحقیق، گزارش اثر قابل توجه یک پپتید طبیعی با خاصیت آنتی بیوتیکی بر ضدسویه‌های موکوئیدی *سودوموناس* است.

منابع

1. Benton, A.W., Morse, R.A., Stewart, J.D., (1963). Venom collection from honeybees. *Science* **3589**: 228-30.
2. Boeckle, S., Wagner, E., Ogris, M. (2005). C-versus N-terminally linked melittin polyethylenimine conjugates: the site of linkage strongly influences activity of DNA polyplexes. *The Journal of Gene Medicine* **7:** 1335-47.
3. Boeckle, S., Fahrmeir, J., Roedl, W., Ogris, M., Wagner, E. (2006). Melittin analogs with high lytic activity at endosomal pH enhance transfection with purified targeted PEI polyplexes. *Journal of Controlled Release* **112:** 240-8.
4. Bertrand, X., Thouverez, M., Talon, D., Boillot, A., Capellier, G., Floriot, C., Helias, J.P. (2001). Endemicity, molecular diversity and colonization routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Medicine* **27**: 1263-8.
5. Church, D., Elsayed, S., Reid, O., Winston, B., Lindsay, R. (2006). Burn wound infections. *Clinical Microbiology Reviews* **19**: 403-34.
6. Defez, C., Fabbro-Peray, P., Bouziges, N. (2004). Risk factors for multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. *Journal of Hospital Infection* **57**: 209-16.
7. Deplano, A., Denis, O., Poirel, L. (2005). Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 1198-204.
8. Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A., Kisich, K.O. (2009). The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Current Pharmaceutical* **15**: 2377-92.
9. Diekema, D.J., Pfaller, M.A., Jones, R.N., Doern, G.V., Winokur, P.L., Gales, A.C., Sader, H.S., Kugler, K. (1997). Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. *Clinical Infectious Diseases* **3**: 595-607.
10. Douglas, M.W., Mulholland, K., Denyer, V., Gottlieb, T. (2001). Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burns unit- an infection control study. *Burns* **27**: 131-5.
11. Fine, M.J., Smith, M.A., Carson, C.A., Mutha, S.S., Sankey, S.S., Weissfeld, L.A., Kapoor, W.N. (1996). Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. A meta-analysis. *Journal of the American Medical Association* **275**: 134-41.
12. Fritsche, T.R., Stilwell, M.G., Jones, R.N. (2005). Antimicrobial activity of doripenem (S-4661): a global surveillance report (2003). *Clinical Microbiology and Infection* **11**: 974-84.
13. Hancock, R.E., Patrzykat, A. (2002). Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Current Drug Targets. Infectious Disorders* **2**: 79-83.
14. Hancock, R.E. (2000). Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **9**: 1723-9.
15. Harris, A., Torres Viera, C., Venkataraman, L., Ddegirolami, P., Samore, M., Carmeli, Y. (1999). Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant Pseudomonas aeruginosa. *Clinical Infectious Diseases* **28**: 1128-83.
16. Hoskin, D.W., Ramamoorthy, A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* **1778**: 357-75.
17. Jeffrey, B.L., Carolyn, L.C., Gerald, B.P. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* **15**: 194-222.

antipseudomonal activity. *Clinical Infectious Diseases* **38**: 670-7.
26. Pillar, C.M., Torres, M.K., Brown, N.P., Shah, D., Sahm, D.F. (2008). *In vitro* activity of Doripenem, a Carbapenem for the treatment of challenging infections caused by gram-negative bacteria, against recent clinical isolates from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 4388-99.
27. Robson, Ch. (1988). Bee venom collection apparatus. US Patent No. 4739531. pp: 26.
28. Rybak, M., Skubida, P. (2007). Application coupled electrical and sound stimulation for honeybee venom collection. *Journal of Apicultural Science* **51**: 63-6.
29. Sitaram, N., Subbalakshmi, C., Nagaraj, R. (1999). Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. *FEBS Letters* **40**: 1123-33.
30. Stermitz, F.R., Lorenz, P., Tawara, J.N., Zenewicz, L.A., Lewis, K. (2000). Synergy in a medicinal plant. Antimicrobial action of berberine potentiated by 5-methoxy hydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1433-7.
31. Tam, V.H., Chang, K.T., Abdelraouf, K. (2010). Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemother*apy **54**: 1160-4.
32. Wright, G.D. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current opinion in microbiology* **13**: 589-94.
33. Yun, S.W., Bae, G.S., Kim, M.S., Park, K.C., Koo, B.S., Kim, B.J. (2011). Melittin inhibits cerulein-induced acute pancreatitis via inhibition of the JNK
18. Joklik, W.K., Willet, H.P., Amos, D.B., Wilfert, C.M. (2002). *Zinsser Microbiology,* 20th ed., Norwalk: application & lange. pp: 576-83.
19. Lars-Ove, B., Julika, M., Lea-Jessica, A., Deike, V., Thomas, P. (2012). Antimicrobial peptides: multifunctional drugs for different applications. *Polymers* **4**: 539-60.
20. Lazarev, V.N., Shkarupeta, M.M., Titova, G.A., Kostrjukova, E.S., Akopian, T.A., Govorun, V.M. (2005). Effect of induced expression of an antimicrobial peptide melittin on *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis* infections *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Commununications* **338***:* 946-50.
21. Marie, T.H., Francis, V., Hamidou, T., Michel, J.D. (2008). *In vitro* activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. *International Journal of Antimicrobial Agents* **31**: 329-36.
22. Marr, A.K., Gooderham, W.J., Hancock, R.E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology* **6**: 468-72.
23. Mathew, A.G., Cissell, R., Liamthong, S. (2007). Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathogens and Disease* **4***:* 115-33.
24. Moolenaar, R.L., Crutcher, J.M., San Joaquin, V.H. (2000). A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission? *Infection Control and Hospital Epidemiology* **21**: 80-5.
25. Paramythiotou, E., Lucet, J.C., Timsit, J.F. (2004). Acquisition of multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with

pathway. *International Immunopharmacology* **11**: 2062-72.
34. Zaiou, M. (2007). Multifunctional antimicrobial peptides: Therapeutic targets in several human diseases. *Journal of Molecular Medicine* **85**: 317-29.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 10, Issue 2, 2014

The Antibacterial Activity of Melittin Derived from Iranian Honeybee Venom on Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Rezaei, M.[1], Bayat, M.[2], Shahbazzadeh, D.[3], Momenzadeh, M.[3], Akbari, R.[3], Pooshang Bagheri, K.[3]*

1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Specialized Sciences, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Laboratory of Venom and Biotherapeutics Molecules, Department of Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received Date: 2 August 2013 *Accepted Date: 23 September 2013*

Abstract: *Infections caused by Pseudomonas aeruginosa have been reported from many hospitals, and according to its opportunistic nature, Pseudomonas aeruginosa invades to immunocompromised patients and controlling the following infection is so hard. Antibiotics misusage beside complex mutation mechanisms in pseudomonas genus led to resistance against many antibiotics. During the past decade, tracing for natural antimicrobial peptide is more considered. Among them, melittin has been extracted from honey bee venom and its antibacterial activity is being examined. The main goal of this study was to evaluate antibacterial activity of melittin against clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. 48 Clinical strains were present from previous study. Honey bee venom was prepared using electrical stimulation and the quality of venom was confirmed by SDS-PAGE. Melittin was isolated from the venom using a linear gradient of acetonitrile and C18 column by Reverse Phase-High Performance Chromatography (RP-HPLC) Technique. Minimal Inhibition and Bactericidal concentration of melittin were examined on clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Honey bee venom consisted of twenty distinct fractions in which melittin was the major one. MIC50 for melittin against all; mucoid, and non-mucoid sensitive isolates, were 12.5, 6.25, and 12.5 μg respectively. Among mucoid and non-mucoid strains, 94.73 and 86.2 % were sensitive to melittin respectively. MBC50 for melittin against total, mucoid and non-mucoid isolates were 50, 37.5, and 50 μg respectively. Totally, 89.58 % were sensitive to melittin and 10.41 % were not inhibited. The results obtained from MIC and MBC tests showed that melittin had significant inhibitory and bactericidal effect on clinical isolates of pseudomonas aeruginosa. According to the results, the less amount of melittin can suppress the growth of mucoid strain of pseudomonas. These strains due to existence of polysaccharide layers around bacteria have less permeability to antibiotics and expose more resistance. This study would be of great value to the treatment of cystic fibrosis patients with pseudomonas infections.*

Keywords: *Honey bee venom, Melittin, Pseudomonas aeruginosa, RP-HPLC, MIC, MBC.*

**Corresponding author: Pooshang Bagheri, K.*
Address: Laboratory of Venom and Biotherapeutics Molecules, Department of Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. Tel: 021-66480780
Email: k_bagheri@pasteur.ac.ir