DOI: 10.22122/jims.v35i457.8916 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ۴۵۷/هفته‌ی اول بهمن ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۷

شناسایی و خالص‌سازی پپتیدهای کروم سنسینگ ایجاد کننده‌ی مرگ برنامه‌ریزی شده در باکتری Staphylococcus Aureus به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های درمانی جدید

علیرضا مردادی[۱]، فهیمه حاجی احمدی[۲]، امید زارعی[۱]، محمدرضا عربستانی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: با توجه به افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها، به ویژه باکتری‌هایی که درمان آن‌ها بسیار مشکل شده است، نیاز اساسی به داروهای جدید وجود دارد. از این رو، هدف از انجام این مطالعه، شناسایی و خالص‌سازی پپتیدهای کروم سنسینگ ایجاد کننده‌ی مرگ برنامه‌ریزی شده در باکتری Staphylococcus aureus به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های درمانی جدید بود.

روش‌ها: در این مطالعه، مایع رویی حاصل از سه سویه‌ی Staphylococcus aureus، Enterococcus faecalis و Enterococcus faecium پس از سانتریفیوژ جمع‌آوری گردید. سپس، مایع رویی نمونه‌هایی که بیشترین تأثیر در کاهش رشد باکتری‌ها را داشتند، به منظور تعیین و جداسازی ماده‌ی مؤثره از دستگاه کروماتوگرافی مایع جهت تخلیص استفاده شد. در مرحله‌ی بعد، غلظت پروتئین به دست آمده توسط روش Bradford، مورد آزمایش قرار گرفت و برای تأیید پروتئین حاصل، از الکتروفورز دو بعدی استفاده گردید. در نهایت، جهت تعیین فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای خالص شده به صورت کمی، حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum inhibitory concentration یا MIC) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum bactericidal concentration یا MBC) مربوط به پپتیدها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: ماده‌ی مؤثره‌ی به دست آمده، یک پلی‌پپتید بود که بر علیه باکتری‌های مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک مؤثر بود. نتایج حاصل از MIC برای باکتری‌های Staphylococcus aureus مقاوم به متی‌سیلین، Escherichia coli، Pseudomonas aeruginosa، Salmonella paratyphi گونه‌های A و B، Klebsiella oxytoca، Acinetobacter baumannii و Shigella dysenteriae به ترتیب ۳/۲، ۰/۷، ۰/۵، ۰/۵، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۰ و ۰/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

نتیجه‌گیری: پلی‌پپتید حاصل از این مطالعه، فرایند ضد میکروبی وسیعی را بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از خود نشان داد.

واژگان کلیدی: پپتید، دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

ارجاع: مردادی علیرضا، حاجی احمدی فهیمه، زارعی امید، عربستانی محمدرضا. **شناسایی و خالص‌سازی پپتیدهای کروم سنسینگ ایجاد کننده‌ی مرگ برنامه‌ریزی شده در باکتری Staphylococcus aureus به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های درمانی جدید.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۵۷): ۱۷۲۵-۱۷۳۱

مقدمه

امروزه، مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های موجود، یکی از نگرانی‌های اصلی جهان می‌باشد. بسیاری از باکتری‌ها، امروزه به حداقل یکی از عوامل آنتی‌بیوتیکی و در بیشتر موارد به چندین مورد از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند (۱). این امر، باعث شده است که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های جدیدتر و آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، امری ناگزیر باشد و متأسفانه، از نقاط مختلف جهان گزارش‌هایی مبنی بر مقاومت باکتری‌ها حتی به آخرین خط درمانی موجود وجود دارد. همچنین، مقاوم شدن باکتری‌ها به عوامل ضد میکروبی، باعث عدم موفقیت در درمان بیماری‌های ایجاد شده توسط آن‌ها می‌شود و در مواردی مانند عفونت‌های کشنده، درصد مرگ و میر بیماران رو به افزایش خواهد بود. در نتیجه، یافتن عوامل ضد میکروبی جدید امری ضروری به نظر می‌رسد (۲).

امروزه، جایگزین‌هایی که برای آنتی‌بیوتیک‌های موجود پیشنهاد

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۲- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۳- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: محمدرضا عربستانی
Email: mohammad.arabestani@gmail.com

می‌شوند، عبارت از ترکیبات گیاهی، باکتریوفاژها، فاژهای لیز کننده، استفاده از مولکول‌های RNA، پروبیوتیک‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی هستند که از منابع متفاوتی به دست می‌آیند. یکی از پپتیدهای ضد میکروبی که امروزه بسیار مورد توجه هستند، گروهی از پپتیدها می‌باشند که باعث ایجاد مرگ برنامه‌ریزی شده در باکتری‌ها (External death factor یا EDF) می‌شوند (۳). بسیاری از پپتیدها، در برابر هدف‌های بالینی نظیر باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، بسیار اختصاصی عمل می‌کنند که این امر، یکی از مزایای این عوامل ضد میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های موجود می‌باشد.

همچنین، گروهی از پپتیدها به صورت وسیع‌الطیف عمل می‌کنند و بر روی بسیاری از باکتری‌ها مؤثر می‌باشند (۴). کروم سنسینگ، یک سیستم است که به وسیله‌ی باکتری‌ها برای ایجاد ارتباط بین سلولی با استفاده از مولکول‌های کوچک قابل ترشح که به وسیله‌ی یک سلول منفرد ترشح می‌شود، مورد استفاده قرار می‌گیرد. این مولکول‌های پیام‌رسانی، با افزایش توده‌ی باکتری افزایش پیدا می‌کنند و باعث یک پاسخ هماهنگ جمعیت باکتریایی می‌شوند. بسیاری از رفتارهای باکتری‌ها نظیر تشکیل بیوفیلم، بیولومینسانس، حرکت، آمادگی برای برداشت مواد ژنتیکی و ترشح عوامل بیماری‌زا، اغلب به وسیله‌ی کروم سنسینگ تنظیم می‌شود (۵).

امروزه، به خوبی مشخص شده است که مکانیسم کروم سنسینگ باکتریایی، می‌تواند فراتر از یک شمارش سلولی ساده باشد. مطالعات انجام شده بر روی پپتیدهای حاصل از فرایند کروم سنسینگ، نشان داده‌اند که این ترکیبات، منجر به فعال‌سازی مرگ برنامه‌ریزی شده در باکتری‌ها می‌شوند (۶). اکنون چند سال است که در رابطه با خاصیت‌های بالقوه‌ی سیستم توکسین- آنتی‌توکسین در مرگ برنامه‌ریزی شده، علاقه‌ی بسیار زیادی ایجاد شده است (۷). این سیستم، شامل یک توکسین پایدار و یک آنتی‌توکسین نشان‌دار شده است که فعالیت سم را خنثی می‌کند (۸).

از این رو، هدف از انجام این مطالعه، شناسایی و خالص‌سازی پپتیدهای کروم سنسینگ ایجاد کننده‌ی مرگ برنامه‌ریزی شده در باکتری‌ها به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های درمانی جدید بود.

روش‌ها

در این مطالعه، از ۳ سویه‌ی استاندارد موجود در آزمایشگاه میکروب‌شناسی شامل Staphylococcus aureus ATCC 25423، Enterococcus faecalis ATCC 29212 و Enterococcus faecium ATCC 51299 استفاده شد.

کشت و ایجاد شرایط استرس‌زا: در این مطالعه، ابتدا سویه‌های Staphylococcus aureus، Enterococcus faecium و Enterococcus faecalis در محیط Blood agar کشت داده شدند تا کشت تازه‌ای از آن‌ها به دست آید. سپس، از باکتری‌های کشت داده شده به محیط مایع Brain heart infusion (BHI) (Merck, Germany) افزوده شد. دمای رشد باکتری‌ها، ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH محیط در محدوده‌ی ۷/۴-۷/۲ در نظر گرفته شد. در مرحله‌ی بعد، سویه‌های پیش‌گفته در حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر در مدت زمان ۱۲ ساعت تحت تأثیر اشعه‌ی ماورای بنفش قرار داده شدند. به دلیل تخریب ساختارهای کلی باکتریایی، مواد زیادی در محیط باکتری آزاد می‌گردد که برای به حداقل رساندن این مواد باید محیط را فیلتر نمود. در این مطالعه، از فیلترهای ۰/۴۵ نانومتر استفاده شد. همچنین، در ادامه برای بررسی اثرگذاری آنتی‌بیوتیکی از آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین استفاده شد. با توجه به جدول آنتی‌بیوگرام در Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)، غلظت آنتی‌بیوتیک‌های پیش‌گفته جهت تلقیح به حجم خاصی از باکتری‌های مورد بررسی قرار داده شد؛ به گونه‌ای که در حجم ۱۵۰ سی‌سی مورد آزمایش، ۴۰۰ میکرولیتر از رقت‌های به دست آمده از پودر این آنتی‌بیوتیک به حجم ۱۵۰ سی‌سی از باکتری‌های مورد مطالعه که به مرحله‌ی لگاریتمی رسیده بودند، اضافه گردید.

در نهایت، حجم‌های مختلفی از مایع رویی به دست آمده از یک باکتری خاص، به محیط‌های مایع BHI دیگری به حجم ۶ میلی‌لیتر، اضافه شد و باکتری‌های مختلف، همراه با مایع رویی به دست آمده، کشت داده شدند. پس از کشت به مدت ۳۰ دقیقه، میزان رشد و تعداد باکتری‌ها به ترتیب با جذب نوری و فرایند شمارش کلنی، اندازه‌گیری و ثبت گردید.

تغلیظ و خالص‌سازی پپتید: در این مرحله، مایع رویی نمونه‌هایی که بیشترین تأثیر در کاهش رشد باکتری‌ها را داشتند، جداسازی شدند و به منظور تغلیظ ماده‌ی مؤثره که اغلب ماهیت پروتئینی دارند یا ممکن است موادی با ترکیبات دیگر باشند، از دستگاه Freeze dryer (CREST, Germany) استفاده گردید.

پس از تغلیظ، پپتیدهای موجود به واسطه‌ی دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High-performance liquid chromatography یا HPLC) (Cecill 2000, UK) با کمک ستون C18 خالص‌سازی شدند. از شیب ۱۰۰-۱۰ درصد محلول اسیدونیتریل در سه مرحله برای جداسازی پپتیدها استفاده شد. جداسازی بر اساس زمان انجام گرفت؛ به طوری که هر قسمت پس از جداسازی، از لحاظ فعالیت ضد میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت، پیکی که بیشترین فعالیت ضد میکروبی را دارا بود، جهت انجام آزمون Bradford مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین غلظت پروتئین به واسطه‌ی آزمون Bradford: در

مرحله‌ی اول، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول Bradford به پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید. سپس، رقت‌سازی پروتئین استاندارد Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, USA) در رقت‌های ۱۰۰۰–۱۰۰ میکروگرم تهیه شد. در مرحله‌ی بعد، به تمامی چاهک‌های مربوط، به میزان ۲ میکرولیتر از رقت‌های استاندارد تهیه شد و به چاهک‌های مربوط به نمونه‌ی مجهول، ۲ میکرولیتر از نمونه‌ی مجهول ریخته شد. سپس، به میزان ۵ دقیقه در Shaker گذاشته شد و در نهایت، در طول موج ۵۷۰ نانومتر، جذب آن خوانده شد (۹).

الکتروفورز دو بعدی (Isoelectric focusing یا IEF):

جهت تأیید خالص بودن پپتید به دست آمده، از الکتروفورز دو بعدی استفاده شد. در بعد اول الکتروفورز، پروتئین‌ها بر اساس نقطه‌ی ایزوالکتریک، به صورت خطی جدا شدند. در بعد دوم، مولکول‌ها با ۹۰ درجه تفاوت نسبت به بعد اول، بر اساس وزن مولکولی جدا شدند. در ابتدا، میزان ۸/۶ میلی‌گرم از پلی‌پپتید مربوط در Rehydration buffer (شامل ۸ مولار Urea، ۴ درصد از CHAPS، ۰/۲ درصد از Biolyte 100x، ۰/۰۰۰۲ درصد از Bromphenol blue solution و ۵۰ میلی‌مولار از Dithiothreitol یا DTT) مخلوط گردید.

سپس، سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با شتاب ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. پس از قرار دادن نوار (IPG) (۷ سانتی‌متری) به مدت ۱۵ ساعت در محفظه، در نهایت در دستگاه IEF (BIO-RAD, UK) قرار گرفت. سپس، در بعد دوم، جداسازی پروتئین‌ها به واسطه‌ی انجام فرایند Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Sigma, USA) انجام پذیرفت. در مرحله‌ی بعد، رنگ‌آمیزی با استفاده از Coomassie blue انجام گردید (۱۰).

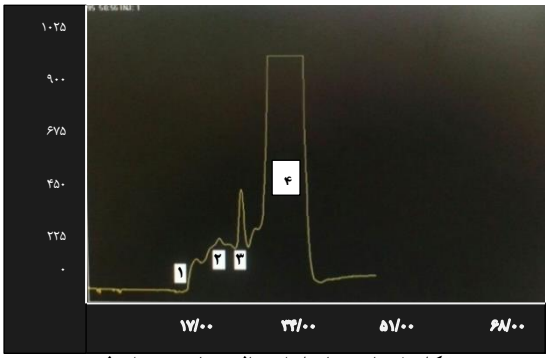
سنجش فعالیت ضد میکروبی: برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum inhibitory concentration یا MIC)، ابتدا از محیط Muller-Hinton broth به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به درون چاهک‌ها ریخته شد. سپس، به اولین چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از پپتید مورد نظر با غلظت ۱۲۰ میکروگرم ریخته و رقت‌سازی انجام شد. در نهایت، به تمامی چاهک‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از سویه‌های مورد نظر با تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ اضافه گردید. پس از ۱۸–۱۶ ساعت، میزان حداقل غلظت مهار کنندگی (شفاف‌ترین چاهک) مشخص گردید. سپس، جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی (Minimum bactericidal concentration یا MBC) از تمامی چاهک‌های شفاف، به میزان ۱۰ میکرولیتر به روی محیط Muller-Hinton agar برده و به روش شمارش کلنی کشت داده شد و پس از ۱۸–۱۶ ساعت حداقل غلظت کشندگی به واسطه‌ی شمارش کلنی‌ها مشخص گردید (۱۱).

یافته‌ها

در این مطالعه، مایع نهایی حاصل از فیلتر محلول هر کدام از سه نوع باکتری (Staphylococcus aureus، Enterococcus faecium و Enterococcus faecalis) بر روی کشت تازه‌ی هر کدام از باکتری‌ها از زمان رسیدن به مرحله‌ی لگاریتمی آن‌ها مورد اثر قرار داده شدند که از کشت تازه‌ی باکتری به حجم ۶ میلی‌لیتر و از مایع رویی حاصل از فیلتراسیون، ۳ میلی‌لیتر استفاده شد و از نظر چگالی نوری (Optical density یا OD) و شمارش کلنی مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به این که OD و شمارش کلنی باکتری‌های در معرض اشعه قرار داده شده، خیلی قابل توجه نبود، میزان OD اولیه، ۰/۴۶۸ و تعداد کلنی باکتری قبل از قرار گرفتن در معرض اشعه، ۱۹ واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بود و بعد از قرار گرفتن در معرض اشعه، این مقادیر به ترتیب، ۰/۴۷۵ و ۱۲ واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بود.

بعد از انجام سه بار آزمون با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین با غلظت‌های پیش‌گفته، بهترین نتیجه با استفاده از غلظت ۴۰۰ میکروگرم حاصل شد؛ به نحوی که میزان OD اولیه، ۰/۴۶۸ و تعداد واحدهای تشکیل کلنی باکتری قبل از قرار گرفتن در معرض آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، ۱۹ واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر و بعد از قرار گرفتن در معرض آنتی‌بیوتیک، میزان OD ۰/۴۷۵ بود و تعداد کلنی باکتری ۲ واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر کاهش پیدا کرد.

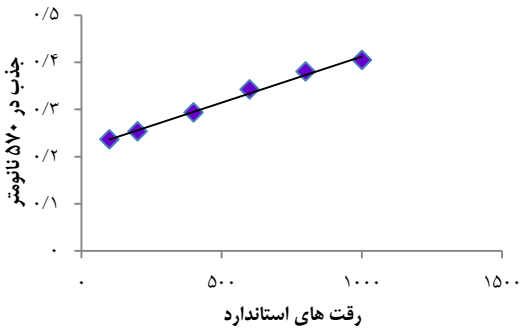
نتایج حاصل از خالص‌سازی به واسطه‌ی HPLC: همان گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است. در نهایت، چندین پیک از این خالص‌سازی جمع‌آوری گردید که پیک شماره‌ی ۴، واجد اثر ضد میکروبی بود. در نتیجه، این پیک جهت تعیین غلظت و تأیید، مورد آنالیز قرار گرفت.



شکل ۱. نتایج حاصل از خالص‌سازی به واسطه‌ی High-performance liquid chromatography (HPLC)

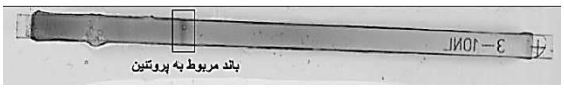
شماره‌های ۴–۱ نشانگر پیک‌های مورد استفاده جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی پپتیدها است که پیک شماره‌ی ۴ بیشترین فعالیت را داشت.

نتایج حاصل از تعیین غلظت پروتئین به واسطه‌ی آزمون Bradford: پس از رسم نمودار استاندارد پروتئین BSA در رقت‌های ۱۰۰۰–۱۰۰ میکروگرم (شکل ۲)، غلظت پروتئین مجهول برابر با ۱۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد.



شکل ۲. تعیین غلظت پروتئین به واسطه‌ی آزمون Bradford

نتایج حاصل از الکتروفورز دو بعدی: نتایج حاصل از الکتروفورز دو بعدی نشان داد که پروتئین به دست آمده، تک باند و فاقد هر گونه ناخالصی بود که در شکل ۳ آمده است. همچنین، وزن مولکولی نسبی پروتئین به دست آمده، کمتر از ۱۰ کیلودالتون به دست آمد که در شکل ۴ آمده است.



شکل ۳. نتیجه‌ی حاصل از الکتروفورز دو بعدی

تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی:
حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی پپتید خالص شده، بر علیه سویه‌های مورد نظر به دست آمد (جدول ۱).

شکل ۴. نتیجه‌ی حاصل از جداسازی پروتئین‌ها با فرایند SDS-PAGE

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

جدول ۱. نتایج حاصل از حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC یا Minimum inhibitory concentration) و حداقل غلظت کشندگی (MBC یا Minimum bactericidal concentration) پپتید خالص شده

نام سویه	حداقل غلظت مهار کنندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
Staphylococcus aureus مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)	۳/۲	۷/۵
Escherichia coli	۷	۸
Pseudomonas aeruginosa	۵	۶
Salmonella paratyphi نوع A	۵	۶
Salmonella paratyphi نوع B	۳	۴
Klebsiella oxytoca	۶	۷
Acinetobacter baumannii	۱	۱
Shigella dysenteriae	۶	۷

MRSA: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus

بحث

استفاده از پپتیدهای EDF به عنوان عوامل ضد میکروبی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تاکنون آزمایش‌ها، تنها در باکتری‌های محدودی انجام پذیرفته است. پپتیدهای دخیل در پدیده‌ی کروم سنسینگ تنها در باکتری‌های گرم منفی مانند Escherichia coli نیست و در باکتری‌های گرم منفی دیگر نظیر Pseudomonas aeruginosa و همچنین، در باکتری‌های گرم مثبت مانند Bacillus subtilis نیز شناسایی شده است (۱۲). همچنین، مسیرهای مرگ برنامه‌ریزی شده mazEF به طور فراوان در کروموزم باکتری‌های بیماری‌زا نظیر Staphylococcus aureus، Bacillus anthracis و Mycobacterium tuberculosis وجود دارد. سیستم مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی mazEF، بیشتر بر روی باکتری Escherichia coli مطالعه شده است (۱۳). با این حال، فعال شدن مسیر تولید این پپتیدها، تنها در مسیر رشد لگاریتمی در حداقل محیط کشت ایجاد می‌شود. تئوری‌های موجود، پیشنهاد کننده‌ی آن است که سیستم‌های توکسین- آنتی‌توکسین در مدیریت شرایط استرس درگیر هستند؛ چه به وسیله‌ی قربانی کردن نوع دوستانه‌ی بسیاری از جمعیت باکتریایی (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی) چه با ایجاد یک مرحله‌ی خفتگی سلولی که به آن‌ها اجازه‌ی مقابله با استرس را می‌دهد (۱۴).

پس از ایجاد استرس سلولی، DNA، یک برنامه‌ی پاسخ به استرس را القا می‌کند که شامل مکانیسم تعمیر DNA و مسیرهای

مرگ سلولی است. این پاسخ، شامل مکانیسم‌هایی است که مانع از تقسیم سلولی می‌شوند تا این که همه‌ی منابع موجود برای تعمیر DNA به کار روند (۱۵). اگر سطح آسیب کم باشد، مکانیسم‌های تعمیر برای بازسازی سلول و برگشت آن به حالت عادی، مناسب و کافی خواهد بود. اگر آسیب جبران ناپذیر باشد، ماشین تعمیر سلولی ناکارآمد خواهد بود و یک مرگ برنامه‌ریزی شده را به دنبال خواهد داشت.

نفوذپذیری توسط CidA-LrgA القا می‌شود و لیز سلولی در باکتری‌ها رخ می‌دهد و مرگ اتفاق می‌افتد (۱۶). در واقع، سیستم توکسین باید از سیستم آنتی‌توکسین جدا گردد که این شرایط زمانی رخ می‌دهد که باکتری در شرایط استرس‌زا قرار گیرد. این شرایط استرس‌زا، می‌تواند شامل برخورد با آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر ریفامپین، کلرانفنیکل، اسپکتینومایسین، سیپروفلوکساسین (۱۷)، نالیدکسیک اسید (۱۸) و غیره باشد. آنتی‌بیوتیک‌های خانواده‌ی فلئوروکوئینولون مانند نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین که هدف آن‌ها آنزیم DNA gyrase (دخیل در همانندسازی ارگانیسم) است و باعث آسیب به DNA و تخریب آن می‌گردند یا آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر ریفامپیسین که هدف آن‌ها آنزیم RNA polymerase است که در نسخه‌برداری دخیل است و باعث نقص در نسخه‌برداری می‌شود. همچنین، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند کلرامفنیکل، کلیندامایسین و تتراسایکلین که هدف آن‌ها ریبوزوم باکتریایی است و باعث نقص در سنتز پروتئین می‌گردند، از این دسته آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند.

همان طور که اشاره گردید، هدف آنتی‌بیوتیک‌های مختلف متفاوت است، اما از نظر عملکرد، به طور تقریبی، همگی باعث ایجاد شرایط استرس‌زا و هدایت باکتری به سمت سیستم‌های مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی mazEF می‌گردند. همچنین، قرارگیری باکتری در برابر اشعه‌ی فرابنفش (Ultraviolet یا UV)، استرس اکسیداتیو و تخریب DNA به واسطه‌ی قحطی تیمیدین نیز از عوامل دیگری هستند که می‌توانند باعث ایجاد شرایط استرس‌زا گردند (۱۹-۱۷).

در این مطالعه، با توجه به اثرات قابل قبول حاصل از روش چاهک و سپس شمارش کلنی‌ها و مهار رشد برخی از گونه‌های باکتریایی، مسیر آزمایش‌ها برای ادامه‌ی کار با اثرگذاری آنتی‌بیوتیک‌ها برای رساندن باکتری مورد نظر به مرحله‌ی مرگ هموار گردید. در ادامه، برای بررسی اثرگذاری آنتی‌بیوتیکی از ۲ آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید استفاده شد.

پس از آن که نتایج مورد بررسی در مورد هر سه باکتری (Staphylococcus aureus، Enterococcus faecium و Enterococcus faecalis) و همچنین، آنتی‌بیوتیک‌های مطالعه شده بررسی مورد ارزیابی قرار گرفت، مشاهده شد که بهترین حجم برای اثرگذاری، ۴۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین است که مناسب برای وارد نمودن باکتری‌های مورد نظر به مرحله‌ی مرگ و در نتیجه‌ی آن، تولید متابولیت‌های ثانویه برای مهار رشد سایر باکتری‌ها و عمل نمودن آن به عنوان یک عامل مهاری در رشد آن‌ها می‌باشد. در مرحله‌ی بعد، خالص‌سازی پپتیدهای مورد نظر به واسطه‌ی روش HPLC انجام گردید که پس از خالص‌سازی، جهت تأیید آن از الکتروفورز دو بعدی استفاده شد. تفاوت پپتیدهای به دست آمده در این مطالعه با باکتریوسین‌ها –همان‌گونه که در جدول ۱ آمده است–، طیف اثر آن‌ها بر روی باکتری‌های گرم منفی نظیر Escherichia coli، Pseudomonas aeruginosa و تعدادی باکتری دیگر گرم منفی خانواده‌ی Enterobacteriaceae بود، اما طیف اثر باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های گرم مثبت، به طور معمول محدود می‌باشد و بر روی باکتری‌های گرم منفی مؤثر نیست (۲۰) و با توجه به این که سیستم‌های مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی mazEF که تاکنون شناسایی شده‌اند، بر روی کروموزم قرار گرفته‌اند و همچنین، بعد از این که نمونه‌ی به دست آمده با استفاده از HPLC برای تعیین توالی با روش Matrix-assisted laser desorption ionization/mass spectrometry (MALDI/MS/MS) ارسال گردید، پنج پپتید مختلف گزارش شد که نتایج بلاست کردن آن‌ها، بیشترین شباهت همولوژیک را با آنزیم لیزواستافین نوترکیب به همراه داشت که اطلاعات آن در بانک اطلاعاتی National Center for Biotechnology Information (NCBI) وجود دارد.

در واقع، فعالیت ضد میکروبی پلی‌پپتید به دست آمده، بین سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک و سویه‌های استاندارد تفاوتی ندارد؛ این مسأله، نشان دهنده‌ی آن است که پپتید به دست آمده، بر یک جزء مشترک در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مانند غشای سلولی (همچون سایر پپتیدهای ضد میکروبی) اثر می‌گذارد (۲۱).

تفاوت مطالعه‌ی حاضر با سایر مطالعات در نوع پلی‌پپتید حاصل از سیستم کروم سنسینگ در سویه‌ی Staphylococcus aureus است؛ به طوری که در مطالعه‌ی Dufour و Levesque، یک سیگنال کروم سنسینگ با نام Competence stimulating peptide (CSP) در Streptococcus mutans شناسایی گردید. آنان نشان دادند که این سیگنال، می‌تواند باعث ایجاد مرگ برنامه‌ریزی شده در این باکتری شود. این شرایط زمانی رخ می‌دهد که باکتری در شرایط استرس‌زا قرار گیرد که در نتیجه‌ی آن، باعث القای مرگ اتولیز در باکتری می‌شود (۸).

در مطالعه‌ی Kolodkin-Gal و همکاران، پپتیدهای Extracellular death factor (EDF) در باکتری Escherichia coli شناسایی کردند. این پپتیدها، باعث مرگ برنامه‌ریزی شده در این باکتری می‌شدند. آنان، گزارش کردند که این پپتیدها در حقیقت، یک پنتاپپتید هستند که واجد توالی Asn-Asn-

Trp-Asn-Asn می‌باشند و وجود هر ۵ اسیدآمینه جهت فعالیت و ایجاد مرگ برنامه‌ریزی شده، ضروری است (۲۲).

در مطالعه‌ی دیگری که توسط Kumar و همکاران انجام گرفت، شناسایی و تعیین خصوصیات EDFهای Bacillus subtilis و Pseudomonas aeruginosa و همچنین، نشان دادن نقش EDFهای گوناگون در مرگ باکتری‌ها در بین گونه‌های مختلف صورت گرفت. آنان نشان دادند که Bacillus subtilis واجد یک EDF متشکل از شش اسیدآمینه است. همچنین، در Pseudomonas aeruginosa سه نوع توالی EDF مختلف شامل یک توالی شش اسیدآمینه‌ای و دو توالی شانزده اسیدآمینه‌ای را شناسایی کردند (۱۲).

در واقع، نتایج حاصل از این مطالعه، یک پلی‌پپتید وسیع‌الطیف را شناسایی کرد که به طور مؤثری بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی قابل استفاده می‌باشد. در واقع، این پلی‌پپتید می‌تواند به عنوان یک جایگزین آنتی‌بیوتیکی مؤثر بر علیه باکتری‌های مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک مورد استفاده قرار گیرد. پلی‌پپتید به دست آمده در این مطالعه، فرایند ضد میکروبی وسیعی را بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از خود نشان داده است که در نتیجه‌ی آن، می‌توان از این پلی‌پپتید به طور وسیعی به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های موجود بر علیه سویه‌های مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از آن معاونت محترم ابراز می‌دارند.

References

1. Amitai S, Kolodkin-Gal I, Hananya-Meltabashi M, Sacher A, Engelberg-Kulka H. Escherichia coli MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both "death proteins" and "survival proteins". PLoS Genet 2009; 5(3): e1000390.
2. Blaser M. Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria. Nature 2011; 476(7361): 393-4.
3. Breukink E, van KC, Demel RA, Siezen RJ, Kuipers OP, de Kruijff B. The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. Biochemistry 1997; 36(23): 6968-76.
4. Breukink E, Wiedemann I, van Kraaij C, Kuipers OP, Sahl HG, de Kruijff B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. Science 1999; 286(5448): 2361-4.
5. de Kruijff B, van Dam V, Breukink E. Lipid II: A central component in bacterial cell wall synthesis and a target for antibiotics. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2008; 79(3-5): 117-21.
6. Diggle SP, Crusz SA, Camara M. Quorum sensing. Curr Biol 2007; 17(21): R907-R910.
7. Engelberg-Kulka H, Amitai S, Kolodkin-Gal I, Hazan R. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. PLoS Genet 2006; 2(10): e135.
8. Dufour D, Levesque CM. Cell death of Streptococcus mutans induced by a quorum-sensing peptide occurs via a conserved streptococcal autolysin. J Bacteriol 2013; 195(1): 105-14.
9. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. In: Walker JM, editor. Basic protein and peptide protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 1994. p. 9-15.
10. Garfin DE. Gel electrophoresis of proteins. In: Davey J, Lord M, editors. Essential cell biology, Vol 1: Cell structure, a practical approach.Oxford, UK: Oxford University Press; 2003. p. 197-268.
11. Jorgensen JT. Susceptibility test methods: Dilution and disk diffusion methods. In: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, et al., editors. Manual of clinical microbiology. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p. 1253-73.
12. Kumar S, Kolodkin-Gal I, Engelberg-Kulka H. Novel quorum-sensing peptides mediating interspecies bacterial cell death. MBio 2013; 4(3): e00314-13.
13. Kumar S, Engelberg-Kulka H. Quorum sensing peptides mediating interspecies bacterial cell death as a novel class of antimicrobial agents. Curr Opin Microbiol 2014; 21: 22-7.
14. Hochman A. Programmed cell death in prokaryotes. Crit Rev Microbiol 1997; 23(3): 207-14.
15. Pang X, Moussa SH, Targy NM, Bose JL, George NM, Gries C, et al. Active Bax and Bak are functional holins. Genes Dev 2011; 25(21): 2278-90.
16. Vousden KH. Outcomes of p53 activation--spoilt for choice. J Cell Sci 2006; 119(Pt 24): 5015-20.
17. Wen Y, Behiels E, Devreese B. Toxin-Antitoxin systems: Their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. Pathog Dis 2014; 70(3): 240-9.
18. Ramisetty BC, Natarajan B, Santhosh RS. mazEF-mediated programmed cell death in bacteria: "what is this?". Crit Rev Microbiol 2015; 41(1): 89-100.
19. Sat B, Hazan R, Fisher T, Khaner H, Glaser G, Engelberg-Kulka H. Programmed cell death in Escherichia coli: Some antibiotics can trigger mazEF lethality. J Bacteriol 2001; 183(6): 2041-5.
20. Garsa AK, Kumariya R, Sood SK, Kumar A, Kapila S. Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. Probiotics Antimicrob Proteins 2014; 6(1): 47-58.
21. Gambacurta A, Piro MC, Ascoli F. Cooperative homodimeric hemoglobin from Scapharca inaequivalvis. cDNA cloning and expression of the fully functional protein in E. coli. FEBS Lett 1993; 330(1): 90-4.
22. Kolodkin-Gal I, Hazan R, Gaathon A, Carmeli S, Engelberg-Kulka H. A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in Escherichia coli. Science 2007; 318(5850): 652-5.

DOI: 10.22122/jims.v35i457.8916 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School Received: 07.10.2017

Vol. 35, No. 457, 1st Week, February 2018 Accepted: 07.012018

Identification and Purification of Quorum Sensing Peptides Causing Apoptosis in Staphylococcus Aureus as New Treatment Antibiotics

Alireza Mordadi[1], Fahimeh Hajiahmadi[2], Omid Zarei[1], Mohammad Reza Arabestani[3]

Original Article

Abstract

Background: Due to the increasing in antibiotic resistance in bacteria, especially the infections which their treatment is very difficult, there is a need for producing new drugs. The aim of this study was identification and purification of quorum sensing peptides causing apoptosis in Staphylococcus aureus as new treatment antibiotics.

Methods: The supernatant from Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, and Enterococcus faecium were collected after centrifugation. Then, the supernatant was isolated from the specimens that had the greatest effect on the growth of bacteria. Liquid chromatography was used to purify it. In next step, for detection of protein concentration, Bradford test and for confirmation, two dimensional electrophoresis were used. Finally, to determine the antimicrobial activity of purified peptides, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum inhibitory concentration (MBC) of peptides were investigated.

Findings: The obtained effective ingredient was a polypeptide that was effective against multi-drug resistant bacteria. The results of MIC for methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella paratyphi A and B, Klebsiella oxytoka, Acinetobacter Bumanni, and Shigella dysenteria were 3.2, 7.0, 5.0, 5.0, 3.0, 6.0, 1.0, and 7.0 µg/ml, respectively.

Conclusion: The polypeptide derived from this study showed a vast antimicrobial property against gram-positive and gram-negative bacteria.

Keywords: Peptide, Liquid Chromatography (HPLC), Antibiotic resistance

Citation: Mordadi A, Hajiahmadi F, Zarei O, Arabestani MR. **Identification and Purification of Quorum Sensing Peptides Causing Apoptosis in Staphylococcus Aureus as New Treatment Antibiotics.** J Isfahan Med Sch 2018; 35(457): 1725-31.

1- Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
2- PhD Student, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
3- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
Corresponding Author: Mohammad Reza Arabestani, Email: mohammad.arabestani@gmail.com