فصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال دوازدهم، شماره ۲، صفحه ۱۱۸ - ۱۱۱ (پاییز ۱۳۸۸)

بررسی نقش ژن‌های HP۰۶۰۵ و HP۰۹۷۱ پمپ‌های افلاکس در مقاومت هلیکوباکترپیلوری به مترونیدازول

دکتر محمدحسن شیرازی*[۱]، مهراندخت سیروس[۲]، دکتر سیدسعید اشراقی[۱]، دکتر جلیل فلاح‌مهرآبادی[۳]، دکتر ناصر ابراهیمی دریانی[۴]، دکتر محمدرضا پورمند[۵]، دکتر محمدمهدی سلطان دلال[۶]، سارا حاجی‌خانی[۷]

[۱] دانشیار میکروب‌شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۲] دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۳] استادیار باکتری شناسی، انستیتو بیوانفورماتیک عصر نوین، تهران

[۴] استاد بیماری های داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۵] استادیار میکروب‌شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۶] استاد میکروب‌شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۷] کارشناس میکروب شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه: مقاومت دارویی در هلیکوباکتر پیلوری یک عامل مهم شکست درمان می‌باشد. پنج خانواده از پمپ‌های افلاکس چند دارویی در باکتری‌ها شناسایی شده است. پمپ‌های RND (Resistance/Nodulation/Division) عمدتاً در باکتری‌های گرم منفی یافت می‌شوند. TolC از اجزای پمپ‌های RND بوده و در ایجاد مقاومت دارویی اهمیت دارد. نقش مقاومت دارویی پمپ‌های RND در هلیکوباکترپیلوری تا کنون ثابت نشده است. در این مطالعه، نقش دو ژن هومولوگ TolC در مقاومت هلیکوباکتر پیلوری به مترونیدازول، از طریق ارزیابی افزایش بیان ژن بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: RNA پنج سویه هلیکوباکترپیلوری مقاوم به مترونیدازول، در غلظت‌های کمتر از حداقل غلظت مهاری (MIC) استخراج شد. RNA با DNase تیمار گردید، سپس به cDNA تبدیل شد. واکنش RT-PCR برای ژن‌های HP۰۶۰۵، HP۰۹۷۱ انجام شد. میزان بیان این ژن‌ها با نرم‌افزار لاب آنالایزر (Lab analyzer) ارزیابی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه، نقش ژن‌های HP۰۶۰۵ و HP۰۹۷۱ در مقاومت دارویی هلیکوباکترپیلوری بررسی شد. در پنج نمونه با افزایش غلظت مترونیدازول، افزایش بیان HP۰۶۰۵ مشاهده شد. سه نمونه بیان HP۰۹۷۱ را نشان دادند. یک نمونه تنها در غلظت مترونیدازول معادل ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیان HP۰۹۷۱ داشت. اما در دو نمونه دیگر با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک، افزایش بیان HP۰۹۷۱ مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: مطابق نتایج این مطالعه، هر دو ژن با افزایش غلظت مترونیدازول، افزایش بیان داشتند. بنابراین افزایش مقدار این دارو بر سیستم افلاکس هلیکوباکترپیلوری در سطح نسخه‌برداری سلولی مؤثر می‌باشد.

واژگان کلیدی: هلیکوباکترپیلوری، پمپ افلاکس، TolC، مترونیدازول

دریافت مقاله: ۸۸/۳/۲۳- پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۶

* بخش میکروب‌شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Email :mhshirazi@sina.tums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-15]

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری باکتری گرم منفی و اسپیرال شکلی است که در معده انسان‌ها کلونیزه می‌شود (۱) و در ایجاد بیماری‌های گاستریت، زخم معده و سرطان معده نقش مهمی دارد (۲). درمان موفق این بیماری شامل ترکیبی از یک مهارکننده پمپ پروتون و دو آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین و مترونیدازول یا کلاریترومایسین می‌باشد (۳). مقاومت آنتی‌بیوتیکی عامل عمده شکست درمان است (۴). سه مکانیسم عمده که در مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها نقش دارند شامل تغییر هدف، غیرفعال کردن آنتی‌بیوتیک با استفاده از آنزیم‌ها و ممانعت از تجمع داروها درون سلول به وسیله سیستم‌های افلاکس می‌باشد. اگر چه تعداد زیادی از مقاومت‌های دارویی در باکتری‌ها، یک صفت ذاتی است، اما در بسیاری از موارد نیز، این پدیده در اثر فشار آنتی‌بیوتیکی ایجاد شده و به وسیله ارگانیسم‌ها کسب می‌گردد (۷-۵).

غشاء پیچیده باکتری‌های گرم منفی شامل کانال‌های پروتئینی متنوعی است که در انتقال تعداد زیادی از مواد غذایی و ترکیبات سمی نقش دارند. در میان این انتقال دهنده‌ها، پمپ‌های افلاکس وابسته به انرژی وجود دارند که مواد سمی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها را تشخیص داده و این مواد را از درون سلول به محیط خارج پمپ می‌کنند، بنابراین باعث کاهش تجمع داخل سلولی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌گردند. افزایش بیان یک یا چند پمپ افلاکس باعث ممانعت از ایجاد تجمع داخل سلولی در حد آستانه مورد نیاز برای فعالیت داروها می‌گردد (۱۲-۸).

پمپ‌های افلاکس آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها از نظر فیلوژنی به پنج خانواده بزرگ تعلق دارند. از بین آن‌ها پمپ‌های خانواده RND (Resistance/Nodulation/Division) منحصراً در باکتری‌های گرم منفی یافت شده و باعث انتقال طیف گسترده‌ای از مواد شامل آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات آنتی‌سپتیک، رنگ‌ها و دترجنت‌ها می‌گردند (۱۳). سیستم افلاکس خانواده RND، شامل سه جزء اساسی می‌باشد: یک پروتئین ناقل در غشاء داخل (مانند AcrB)، یک پروتئین مستقر در فضای پری‌پلاسمیک (مانند AcrA) و یک کانال پروتئینی در غشاء خارجی (مانند TolC) که به پروتئین غشاء خارجی هم معروف است. پروتئین غشاء داخلی از طریق فضای پری‌پلاسمیک یا دو لایه لیپیدی به سوبسترای خود متصل می‌شود و در نهایت به کمک پروتئین غشاء خارجی آن را به فضای خارجی انتقال می‌دهد، ارتباط بین اجزای داخلی و خارجی به وسیله پروتئین مستقر در فضای پری‌پلاسمیک برقرار می‌گردد (۱۶-۱۴). پروتئین TolC با انتقال توکسین‌های پروتئینی بزرگی مانند همولیزین α و یا ترکیبات سمی کوچک همانند آنتی‌بیوتیک‌ها مرتبط می‌باشد. خانواده TolC در تولید مقاومت چند دارویی و فاکتورهای ویرولانس در باکتری‌های بیماری‌زا نقش مهمی دارند (۱۷).

در این مطالعه، نقش پمپ‌های افلاکس RND در ایجاد مقاومت دارویی هلیکوباکترپیلوری به مترونیدازول در پنج ایزوله بالینی بررسی گردید. از آنجایی که مقاومت دارویی عمده در این باکتری مربوط به داروی مترونیدازول است و این دارو جزء درمان‌های ردیف اول و دوم بیماری‌های مرتبط با این باکتری است، در این تحقیق مقاومت دارویی نسبت

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-15]

به مترونیدازول مورد بررسی قرار گرفت. ایزولـه‌ها تحت تاثیر غلظت‌های متفاوت مترونیدازول کشت داده شدند، سپس بیان دو ژن هومولوگ TolC به نام‌های HP۰۶۰۵ و HP۰۹۷۱ در سطح RNA سلولی ارزیابی گردید.

مواد و روش‌کار

نمونه‌گیری و جداسازی ایزوله‌ها

تعداد ۱۰۴ نمونه بیوپسی معده از بیماران واجد زخم معده و نیز سوءهاضمه بدون زخم در بخش آندوسکوپی بیمارستان لاله تهران تهیه گردید. نمونه‌های بیوپسی روی محیط کشت بروسلا آگار حاوی ۱۰ درصد خون دفیبرینه گوسفند، ۷ درصد سرم جنین گاوی و مکمل ضدمیکروبی شامل ونکومایسین، تریمتوپریم و پلی‌میکسین B و آمفوتریسین B کشت داده شدند و در شرایط میکروآئروفیلیک (مولکول اکسیژن ۵ درصد، مولکول دی‌اکسید کربن ۱۰ درصد، مولکول نیتروژن ۸۵ درصد) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷-۵ روز گرماگذاری گردیدند. تشخیص ایزوله ها بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، مورفولوژی کلونی، واکنش‌های مثبت در آزمایش‌های اکسیداز و کاتالاز و اوره‌آز سریع انجام گرفت.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و حداقل غلظت مهاری (MIC)[1]

با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، باکتری‌های مقاوم به مترونیدازول تعیین گردید. در این مرحله از محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند و ۷ درصد سرم جنین گاوی بدون مکمل آنتی میکروبی استفاده شد. از کلونی‌های تازه، سوسپانسیون با کدورت معادل مک فارلند شماره ۲ تهیه گردیـد و به میزان ۵ میـکرولیتر بر سـطح محیط، کشـت داده شد و دیسک مترونیدازول ۵ میکروگرم (Himedia) روی سطح محیط قرار گرفت. محیط‌ها برای ۳ روز در شرایط میکروآئروفیلیک و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. ایزوله‌هایی که ناحیه ممانعت معادل ۱۶ میلی‌متر یا بالاتر داشتند، به عنوان ایزوله مقاوم مشخص گردیدند. سپس این ایزوله‌های مقاوم برای آزمایش MIC استفاده شدند. آزمایش MIC بر اساس NCCLS[2] به روش آگار رقیق‌سازی انجام شد (۱۸) و از محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند و ۷ درصد سرم جنین گاوی بدون مکمل آنتی‌میکروبی و دارای غلظت‌های متفاوت مترونیدازول استفاده گردید. در این مرحله نیز از سوسپانسیون باکتریایی معادل مک فارلند شماره ۲ استفاده شد و ۵ میکرولیتر از این سوسپانسیون بر سطح محیط کشت داده شد و به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط میکروآئروفیلیک گرماگذاری شد. پس از ۳ روز ایزوله-هایی که ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر≤MIC داشتند به عنوان باکتری مقاوم به مترونیدازول تعیین شدند.

استخراج DNA و واکنش PCR

استخراج ژنوم و انجام PCR به منظور تنظیم واکنش PCR و هم چنین اثبات وجود دو ژن مورد مطالعه در ایزوله‌های بالینی صورت گرفت. در این تحقیق، بررسی دو ژن هومولوگ TolC در باکتری هلیکوباکترپیلوری به نام HP۰۶۰۵ و HP۰۹۷۱ مورد نظر بود و برای این ژن‌ها واکنش PCR تنظیم شد. برای کنترل این واکنش از سویه هلیکوباکتر پیلوری ۲۶۶۹۵ استفاده شد.

پرایمرهای ژن‌های HP۰۶۰۵ و HP۰۹۷۱ (ژن‌های

[1] minimum inhibitory concentration

[2] national committee for clinical laboratory standards

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-15]

هومولوگ TolC) در این مطالعه طراحی گردید و مورداستفاده قرار گرفت. توالی پرایمرهای این دو ژن در این تحقیق در زیر آمده است.

F: HP0605 (5′ACCGCTTGACTTTAGAATACC- 3′)
R: HP0605 (5′ATTCAAAGTCGCAGTAACCC- 3′)
F: HP0971 (5′GTATGTGCAACGAGAAGCG- 3′)
R: HP0971 (5′GATAGATATTTTTAGGCGTTACC-3′)

مخلوط واکنش شامل ۱/۵ میکرولیتر (۱۰ پیکومول) از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مول)، ۰/۷۵ میکرولیتر (کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X)، ۱ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز Taq (۱ واحد در میکرولیتر) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط زیر انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، حرارت مجدد در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، مجدداً در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و سپس در مرحله نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه. پس از انجام PCR، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

استخراج RNA کلی

از پنج نمونه بالینی مقاوم به مترونیدازول در محیط کشت بروسلا آگار حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند و ۷ درصد سرم جنین گاوی در شرایط بدون مترونیدازول و غلظت‌های ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۸ مترونیدازول کشت داده شد و در شرایط میکروآئروفیلیک و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. از کلونی‌هایی که در فاز لگاریتمی بودند، برداشت شده و در سرم فیزیولوژی سوسپانسیون تهیه شد. سپس سوسپانسیون‌ها در دور ۹۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی خارج شد و پلت برای استخراج RNA کلی استفاده گردید.

استخراج RNA با کیت کیاژن (Qiagen) انجام گرفت. استخراج RNA به شرایط کاملاً استریل نیاز دارد. به منظور انجام بهتر این پروسه، محلول پایدارکننده RNA (Qiagen) استفاده شد. تمام مراحل کار مطابق با دستور کار کیت در دمای ۲۵- ۱۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از استخراج RNA کلی، نمونه‌ها روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شدند. پس از مشاهده باند RNA کلی روی ژل الکتروفورز، به منظور حذف آلودگی DNA، هضم آنزیمی DNase با استفاده از کیت شرکت فرمنتاس (Fermentas) انجام شد. در مرحله بعد، روی نمونه‌ها واکنش PCR انجام شد، در صورتی که نتیجه این واکنش منفی بود (آلودگی DNA وجود نداشت)، از این نمونه‌ها برای تهیه cDNA استفاده گردید. در این مرحله با دستگاه بیوفتومتر، تراکم نوری نمونه‌های RNA تام در طول موج ۲۶۰ نانومتر به دست آمد.

تولید cDNA

برای تهیه cDNA از ابزار first strand cDNA synthesis kit (شرکت فرمنتاس) استفاده شد. مقدار ۷ میکرولیتر از RNA تام با استفاده از ۱ میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس[3] (۲۰۰ واحد در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر پرایمر راندوم (۰/۲ میکروگرم در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مول)، ۴ میکرولیتر بافر (۵X) و ۱ میکرولیتر RiboLock™[4] (۲۰ واحد در میکرولیتر) به cDNA تبدیل شد. به‌طور خلاصه، ابتدا RNA کلی و پرایمر راندوم و آب دبس زده با هم مخلوط شده و به مدت ۵

[3] Reverse transcriptase

[4] آنزیم مهار کننده ریبونئوکلئاز

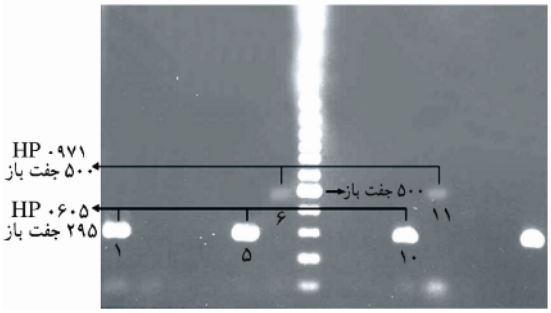
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-15]

دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و سپس در یخ قرار گرفت. پس از آن همان‌طور که مواد درون یخ بودند، بافر و Ribolock و dNTPs افزوده شد و مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. بعد از آن آنزیم ترانس کریپتاز معکوس اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و پس از آن درون یخ قرار گرفت. محلول نهایی به‌عنوان cDNA برای انجام واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش PCR

مقدار ۲ میکرولیتر از cDNA برای انجام واکنش PCR استفاده شد. مراحل واکنش PCR همانند آنچه در بخش واکنش PCR آمده است، انجام گرفت. پس از انجام PCR، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید (شکل ۱).

شکل ۱: الکتروفورز محصول RT-PCR ژن‌های مورد بررسی بر روی ژل آگاروز



۱: ژن HP۰۶۰۵ درغلظت بدون مترونیدازول
۵: ژن HP۰۶۰۵ درغلظت ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر مترونیدازول
۶: ژن HP۰۹۷۱ درغلظت ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر مترونیدازول
۱۰: ژن HP۰۶۰۵ درغلظت ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر مترونیدازول
۱۱: ژن HP۰۹۷۱ درغلظت ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر مترونیدازول

سپس تصویر باندهای حاصل با استفاده از نرم افزار لاب آنالایزر (Lab analyzer)، تولید انستیتو بیوانفورماتیک عصر نوین، دانسیتومتری گردید. در نهایت با مقایسه تراکم نوری مربوط به RNA تام و اعداد به‌دست آمده از نرم‌افزار، مقدار افزایش بیان ژن تعیین شد.

یافته‌ها

در همه پنج ایزوله مورد مطالعه، در غلظت‌های متفاوت آنتی‌بیوتیکی، افزایش بیان ژن HP۰۶۰۵ مشاهده شد. این ژن در حالت بدون مترونیدازول، بیان داشت و در غلظت‌های ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز بیان شده بود. اما در غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به شرایط بدون آنتی‌بیوتیک افزایش بیان ژن مشاهده گردید. همچنین در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیان ژن افزایش یافته بود.

در سه ایزوله هلیکوباکترپیلوری، بیان ژن HP۰۹۷۱ مشاهده شد. در یک ایزوله، تنها در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر ژن بیان داشت. در یک ایزوله دیگر، بیان ژن در هر سه غلظت ۱۶، ۸ و ۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر وجود داشت و همچنین در غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به بدون آنتی‌بیوتیک و در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش بیان ژن دیده شد. در ایزوله سوم، در حالت فاقد مترونیدازول، بیان ژن دیده نشد، ولی در غلظت‌های ۱۶ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر مترونیدازول، ژن بیان شده بود و در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر، افزایش شدت باند و در نتیجه افزایش بیان ژن مشاهده گردید (جدول ۱).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-15]

جدول ۱: اطلاعات آنالیز تراکم سنجی و تراکم نوری مربوط به یک سویه مورد بررسی

غلظت مترونیدازول	ژن	تراکم سنجی	تراکم نوری
بدون آنتی‌بیوتیک	HP۰۶۰۵	۴۶۴/۲۲	
	HP۰۹۷۱	–	۰/۰۱۶
	HP۱۳۲۷	–	
	HP۱۴۸۹	–	
۸ میکروگرم در میلی‌لیتر	HP۰۶۰۵	۴۹۹/۳۵	
	HP۰۹۷۱	۱۰/۹۱	۰/۰۱۶
	HP۱۳۲۷	–	
	HP۱۴۸۹	–	
۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر	HP۰۶۰۵	۳۸۳/۳۸	
	HP۰۹۷۱	۱۷/۹۹	۰/۰۱۰
	HP۱۳۲۷	۱۶/۰۲	
	HP۱۴۸۹	–	

بحث

انتشار سریع باکتری‌های بیان‌کننده مقاومت دارویی، باعث شده است که کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید و عوامل تعدیل‌کننده مقاومت دارویی، ضروری به‌نظر برسد. استفاده از عوامل تعدیل‌کننده مقاومت دارویی همانند عوامل مهار کننده پمپ‌های افلاکس، که باعث ایجاد مقاومت دارویی می‌گردند می‌تواند امکان درمان مجدد با آنتی‌بیوتیک‌های غیر مؤثر در کلینیک را فراهم کند و حتی ممکن است خطر سویه‌های بیان کننده مقاومت دارویی را مهار کند (۱۹).

در سال‌های اخیر، به دلیل افزایش مقاومت دارویی آنتی‌میکروبی، ریشه‌کنی با درمان‌های موفق در بیماری‌های مربوط به هلیکوباکتر پیلوری کاهش یافته است (۲۰ و ۲۱). سیستم‌های افلاکس در هلیکوباکتر پیلوری شناسایی شده‌اند، اما تا کنون نقش این سیستم‌ها در مقاومت دارویی این باکتری به اثبات نرسیده است. در این مطالعه، دو ژن HP۰۶۰۵ و HP۰۹۷۱ از هومولوگ‌های TolC که در باکتری هلیکوباکتر پیلوری پروتئین‌های افلاکس غشاء خارجی را کد می‌کنند، مورد مطالعه قرار گرفت و افزایش بیان این ژن‌ها، از طریق اندازه‌گیری مقدار RNA بررسی شد.

در مطالعه کنونی، اثر مداخله‌ای آنتی بیوتیک مترونیدازول در افزایش بیان دو ژن هومولوگ TolC (HP۰۶۰۵ و HP۰۹۷۱) در سویه‌های بالینی هلیکوباکتر پیلوری مورد ارزیابی قرار گرفت. در پنج سویه بالینی مورد مطالعه، بیان ژن HP۰۶۰۵ بین غلظت بدون آنتی‌بیوتیک مترونیدازول و غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش داشت. یعنی افزایش غلظت مترونیدازول باعث افزایش بیان این ژن می‌گردد. در سه سویه نیز اثر مداخله‌ای مترونیدازول در افزایش بیان ژن HP۰۹۷۱ مثبت شد. در یک سویه تنها در بالاترین غلظت آنتی‌بیوتیک یعنی ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیان ژن HP۰۹۷۱ مشاهده شد و در دو سویه دیگر با افزایش مقدار مترونیدازول، افزایش بیان در این ژن دیده شد.

بینا (Bina) و همکاران در سال ۲۰۰۰ سه سیستم افلاکس RND را در هلیکوباکتر پیلوری به نام‌های hef ABC, hef DEF, hef GHI شناسایی کردند. hef A, hef D, hef G هومولوگ TolC هستند که پروتئین افلاکس غشاء خارجی را کد می‌کنند. با این حال، آن‌ها بیان کردند که سیستم افلاکس در مقاومت دارویی هلیکوباکترپیلوری هیچ نقشی ندارد (۲۲). ون آمستردام (Van Amesterdam) و همکاران در سال ۲۰۰۵، ۲۷ ترانس‌لوکاز را در ژنوم هلیکوباکترپیلوری ۲۶۶۹۵ شناسایی کردند، اما تنها چهار هومولوگ TolC را تعیین کردند. آن‌ها در یک سویه ژن HP۰۶۰۵ و در یک سویه ژن HP۰۹۷۱ را خاموش کردند و سویه‌های موتانت ناک اوت (knockout) تولید کردند. در یک سویه نیز هر دو

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-15]

ژن را خاموش کرده و یک موتانت ناک اوت دوگانه (double knockout) تولید کردند. سپس MIC این سه موتانت را با سویه وحشی اولیه مقایسه کردند و مشاهده کردند که سویه‌های موتانت نسبت به سویه وحشی حساسیت بیشتری به مترونیدازول دارند و بنابراین بیان کردند که پمپ‌های افلاکس در مقاومت دارویی هلیکوباکتر پیلوری مؤثر می‌باشد (۲۳). لیو (Liu) و همکاران در سال ۲۰۰۸ وجود ژن hefA (HP۰۶۰۵) را در سویه‌های هلیکوباکترپیلوری مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها در پنج سویه بالینی سطح بیان mRNA ژن hefA را تعیین کردند. آن‌ها درون این ژن یک الحاق انجام دادند و سپس این موتانت‌ها را با سویه‌های اولیه مقایسه کردند. مقدار MIC در سویه های موتانت ۲ بار یا بیشتر افزایش یافته بود و بدین ترتیب بیان کردند که این ژن در مقاومت دارویی هلیکوباکتر پیلوری به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها تأثیر دارد (۲۴).

در مطالعه حاضر، بیان ژن‌های HP۰۶۰۵ و HP۰۹۷۱، دو ژن هومولوگ TolC، در هلیکوباکترپیلوری بررسی شد و مشاهده گردید که با افزایش مقدار مترونیدازول، میزان بیان این ژن‌ها در سطح نسخه‌برداری RNA افزایش می‌یابد. بنابراین داروی مترونیدازول به صورت یک محرک، باعث افزایش بیان ژن‌های افلاکس مورد مطالعه گردیده است. یافته‌های به دست آمده از این تحقیق با مطالعات ون آمستردام و لیو مشابه بوده و این نتایج نشان می‌دهد که سیستم‌های افلاکس در مقاومت دارویی این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها نقش دارند.

در مطالعات اخیر نواحی مشابه جهت اتصال، در ساختمان پمپ‌های افلاکس و مهار کننده‌های آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. به‌دلیل طراحی یک ساختمان آنتی‌بیوتیکی که کمتر به وسیله پمپ‌های افلاکس شناسایی گردد و بهبودی در ایجاد پیوند بین مهارکننده با پمپ‌های افلاکس و به‌منظور طراحی مهارکننده‌های کانال که قادر به مسدود کردن کانال خارجی این پمپ‌ها باشند، شناسایی این بخش از مولکول‌ها، نواحی مشابه جهت اتصال، بسیار ارزشمند خواهد بود (۲۷-۲۵). همچنین تشخیص این نوع از باکتری‌ها بر اساس استفاده از مهارکننده‌های افلاکس و یا پروب ژن‌های افلاکس، توانایی ما را برای تعیین پاتوژن‌های مقاوم و در نتیجه انتخاب درمان مناسب افزایش می‌دهد (۲۸). واضح است که تحقیقات جدید برای تولید و گسترش مولکول‌های مهارکننده پمپ های افلاکس نیاز می‌باشد. توسعه مهارکننده های پمپ‌های افلاکس به ما امکان استفاده مجدد از آنتی‌بیوتیک‌های متنوعی که تحت تأثیر پمپ‌های افلاکس قرار می‌گیرند را خواهد داد و این باعث کنترل خطر و محدودیت سویه‌های مقاوم حاوی پمپ‌های افلاکس خواهد گردید (۲۹).

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه تهران می‌باشد. بخشی از هزینه‌های این تحقیق از گرنت انستیتو بیوانفورماتیک عصر نوین تأمین شده است. بدین وسیله از پرستاران محترم بخش آندوسکوپی بیمارستان لاله خانم‌ها کتابچی، محمدی و موسوی جهت همکاری در تهیه نمونه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1. Shubert TT, Schubert AB, Ma CK. Symptoms, gastritis, and Helicobacter pylori in patients reffered for endoscopy. Gastrointest Endosc 1992; 38: 357-60.
2. Crowe SE. Helicobacter infection, chronic inflammation, and the development of

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-15]

malignancy. Curr Opin Gastroenterol 2005; 21: 32-8.
3. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut 2007;56:772-81.
4. Wolle K, Malfertheiner P. Treatment of Helicobacter pylori. Best practice & research clinical gastroenterology 2007; 21: 315-24.
5. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection, J Antimicrob Chemother 2003; 51: 1109-17.
6. Bush K, Miller GH. Bacterial enzymatic resistance: beta-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes, Curr Opin Microbiol 1998; 1: 509-15.
7. P. Courvalin. Transfer of antibiotic resistance genes between Grampositive and Gram-negative bacteria, Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 1447-51.
8. Levy SB. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. J Appl Microbiol 2002; 92 Suppl: 65-71.
9. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drugs 2004; 64: 159-204.
10. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 2005; 56: 20-51.
11. Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plesiat P, et al. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 1055-65.
12. Koronakis V. TolC-the bacterial exit duct for proteins and drugs. FEBS Lett 2003; 555: 66-71.
13. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 382-402.
14. Koronakis V, Eswaran J, Hughes C. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. Annu Rev Biochem 2004;73:467-89.
15. Aires JR, Nikaido H. Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of Escherichia coli. J Bacteriol 2005;187:1923-9.
16. Eswaran J, Koronakis E, Higgins MK, et al. Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. Curr Opin Struct Biol 2004; 14:741-7.
17. Andrew S, Cristina F, Jiye S, et al. The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. Eur J Biochem 2001;268: 5011-26.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Sixth edition: Approved Standard M07-A6. Villanova, Pennsylvania, USA: NCCLS, 2003.
19. Stavri M, Piddock LJ, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. J Antimicrob Chemother 2007;59:1247-60.
20. Egan BJ, Katicic M, O'Connor HJ, et al. Treatment of Helicobacter pylori. Helicobacter 2007; 12 Suppl 1: 31-7.
21. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut 2007; 56: 772-81.
22. Bina JE, Alm RA, Uria-Nickelsen M, et al. Helicobacter pylori uptake and efflux: basis for intrinsic susceptibility to antibiotics in vitro. Antimicrob agents chemother 2000; 44: 248-54.
23. van Amsterdam K, Bart A, van der Ende A. A Helicobacter pylori TolC efflux pump confers resistance to metronidazole. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 1477-82.
24. Liu ZQ, Zheng PY, Yang PC. Efflux pump gene hefA of Helicobacter pylori plays an important role in multidrug resistance. World J Gastroenterol 2008;14:5217-22.
25. Poole K. Uninhibited antibiotic target discovery via chemical genetics. Nat Biotechnol 2004; 12: 1528-9.
26. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenge and responses Nat Med 2004; 10 Suppl, 122-9.
27. Grkovic S, Brown MH, Skurray RA. Regulation of bacterial drug export systems. Microbiol Mol Biol Rev 2002;66:671-701.
28. Pages JM, Masi M, Barbe J. Inhibitors of efflux pumps in gram negative bacteria. Trends Mol Med 2005; 11: 382-9.
29. Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol Mol Biol Rev 2000; 64: 672-93.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-15]