



## بررسی نقش ژن‌های HP۰۶۰۵ و HP۰۹۷۱ پمپ‌های افلاکس در مقاومت

### هلیکوباکتریلوری به مترونیدازول

دکتر محمدحسن شیرازی<sup>۱\*</sup>، مه‌راندخت سیروس<sup>۲</sup>، دکتر سیدسعید اشراقی<sup>۱</sup>، دکتر جلیل فلاح‌مهرآبادی<sup>۳</sup>،

دکتر ناصر ابراهیمی دریانی<sup>۴</sup>، دکتر محمدرضا پورمند<sup>۵</sup>، دکتر محمدمهدی سلطان دلال<sup>۶</sup>، سارا حاجی‌خانی<sup>۷</sup>

<sup>۱</sup> دانشیار میکروبی‌شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۲</sup> دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبی‌شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۳</sup> استادیار باکتری‌شناسی، انستیتو بیوانفورماتیک عصر نوین، تهران

<sup>۴</sup> استاد بیماری‌های داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۵</sup> استادیار میکروبی‌شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۶</sup> استاد میکروبی‌شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۷</sup> کارشناس میکروبی‌شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

### چکیده

**زمینه:** مقاومت دارویی در هلیکوباکتریلوری 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. از اجزای پمپ‌های RND بوده و در ایجاد مقاومت دارویی اهمیت دارد. نقش مقاومت دارویی پمپ‌های RND در هلیکوباکتریلوری تا کنون ثابت نشده است. در این مطالعه، نقش دو ژن همولوگ ToIC در مقاومت هلیکوباکتریلوری به مترونیدازول، از طریق ارزیابی افزایش بیان ژن بررسی شده است.

**مواد و روش‌ها:** RNA پنج سویه هلیکوباکتریلوری مقاوم به مترونیدازول، در غلظت‌های کمتر از حداقل غلظت مهار (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 هلیکوباکتریلوری 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 هلیکوباکتریلوری در سطح نسخه‌برداری سلولی مؤثر می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** هلیکوباکتریلوری، پمپ افلاکس، ToIC، مترونیدازول

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

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

Email :mhshirazi@sina.tums.ac.ir

## مقدمه

هلیکوباکتریپیلوری 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 ارگانیزم‌ها کسب می‌گردد (۵-۷).

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 انتقال‌دهنده‌ها، 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 (۸-۱۲).

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 (۱۴-۱۶). پروتئین TolC با انتقال توکسین‌های پروتئینی بزرگی مانند همولیزین  $\alpha$  و یا ترکیبات سمی کوچک همانند آنتی‌بیوتیک‌ها مرتبط می‌باشد. خانواده TolC در تولید مقاومت چند دارویی و فاکتورهای ویروالانس در باکتری‌های بیماری‌زا نقش مهمی دارند (۱۷).

در این مطالعه، نقش پمپ‌های افلاکس RND در ایجاد مقاومت دارویی هلیکوباکتریپیلوری 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

گردید و به میزان ۵ میکرولیتر بر سطح محیط، کشت داده شد و دیسک مترونیدازول ۵ میکروگرم (Himedia) روی سطح محیط قرار گرفت. محیطها برای ۳ روز در شرایط میکروآتروفیلیک 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<sup>۲</sup> به روش آگار رقیق‌سازی انجام شد (۱۸) و از محیط کشت مولر هیتون 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 میکروآتروفیلیک گرماگذاری شد. پس از ۳ روز ایزوله‌هایی که ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر  $MIC \geq$  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 هم‌چنین اثبات وجود دو ژن مورد مطالعه در ایزوله‌های بالینی صورت گرفت. در این تحقیق، بررسی دو ژن هومولوگ TolC در باکتری هلیکوباکترپیلوری به نام HP0605 و HP0971 مورد نظر بود و برای این ژن‌ها واکنش PCR تنظیم شد. برای کنترل این واکنش از سویه هلیکوباکتر پیلوری ۲۶۶۹۵ استفاده شد.

پرایمرهای ژن‌های HP0605 و HP0971 (ژن‌های

به مترونیدازول مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله‌ها تحت تاثیر غلظت‌های متفاوت مترونیدازول کشت داده شدند، سپس بیان دو ژن هومولوگ TolC به نام‌های HP0605 و HP0971 در سطح RNA سلولی ارزیابی گردید.

#### مواد و روش کار

##### 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 ضد میکروبی شامل ونکومايسين، تریمتوپریم و پلی میکسین B و آموتریسین B کشت داده شدند و در شرایط میکروآتروفیلیک (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 ایزوله‌ها 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)<sup>۱</sup>

با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، باکتری‌های مقاوم به مترونیدازول تعیین گردید. در این مرحله از محیط کشت مولر هیتون آگار حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند و ۷ درصد سرم جنین گاوی بدون مکمل آنتی‌میکروبی استفاده شد. از کلونی‌های تازه، سوسپانسیون با کدورت معادل مک فارلند شماره ۲ تهیه

<sup>۲</sup> national committee for clinical laboratory standards

<sup>۱</sup> minimum inhibitory concentration

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<sup>۳</sup> (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<sup>TM</sup> (۲۰ واحد در میکرولیتر) به cDNA تبدیل شد. به‌طور خلاصه، ابتدا RNA کلی و پرایمر راندوم و آب دیس‌زده با هم مخلوط شده و به مدت ۵

هومولوگ (ToIC) در این مطالعه طراحی گردید و مورد استفاده 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'GATAGATATTTTATAGCGTTACC-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 پلیمرز 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 میکروآتروفیلیک 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

<sup>۳</sup> Reverse transcriptase

<sup>۴</sup> آنزیم مهار کننده ریونوکلاز

سپس تصویر باندهای حاصل با استفاده از نرم افزار لاب آنالایزر (Lab analyzer)، تولید انستیتو بیوانفورماتیک عصر نوین، دانسیتمتری گردید. در نهایت با مقایسه تراکم نوری مربوط به RNA تام و اعداد به دست آمده از نرم افزار، 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 هلیکوباکتر پیلوری، بیان ژن HP۰۹۷۱ مشاهده شد. در یک ایزوله، تنها در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر 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).

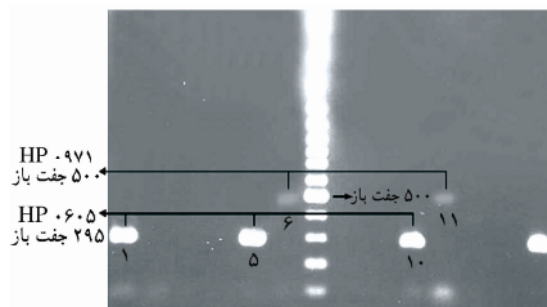
دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و سپس در یخ قرار گرفت. پس از آن همان‌طور که مواد درون یخ بودند، بافر و Ribolock و dNTPs افزوده شد و مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. بعد از آن آنزیم ترانس کریپتاز معکوس اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۶۰ 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 به عنوان 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 در غلظت بدون مترونیدازول

۵: ژن HP۰۶۰۵ در غلظت ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر مترونیدازول

۶: ژن HP۰۹۷۱ در غلظت ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر مترونیدازول

۱۰: ژن HP۰۶۰۵ در غلظت ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر مترونیدازول

۱۱: ژن HP۰۹۷۱ در غلظت ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر مترونیدازول

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 هلیکوباکتر پیلوری هیچ نقشی ندارد (۲۲). ون آمستردام (Van Amsterdam) و همکاران در سال ۲۰۰۵، ۲۷ ترانس‌لوکاز را در ژنوم هلیکوباکتر پیلوری 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 ناک‌اوت (knockout) تولید کردند. در یک سویه نیز هر دو

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	-
	HP۱۳۲۷	-
	HP۱۴۸۹	-
۸ میکروگرم در میلی‌لیتر	HP۰۶۰۵	۴۹۹/۳۵
	HP۰۹۷۱	۱۰/۹۱
	HP۱۳۲۷	-
	HP۱۴۸۹	-
۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر	HP۰۶۰۵	۳۸۳/۳۸
	HP۰۹۷۱	۱۷/۹۹
	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 مهارکننده 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 بیان‌کننده مقاومت دارویی را مهار کند (۱۹).

در سال‌های اخیر، به دلیل افزایش مقاومت دارویی آنتی‌بیوتیکی، 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

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 (HP0605) را در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری 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 سویه‌های 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 HP0605 و HP0971، دو ژن هومولوگ TolC، در هلیکوباکتر پیلوری 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 مهارکننده‌های آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. به دلیل طراحی یک ساختمان آنتی‌بیوتیکی که کمتر به وسیله پمپ‌های افلاکس شناسایی گردد و بهبودی در ایجاد پیوند بین مهارکننده با پمپ‌های افلاکس و به منظور 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 پمپ‌های افلاکس نیاز می‌باشد. توسعه مهارکننده‌های 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 گرت انستیتو بیونفورماتیک 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:

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

- 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 Gram-positive 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.