دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۵، صفحه ۷۹۴- ۷۸۴ (۱۳۹۵)

اثر عصاره گیاه تلخ‌بیان (*Sophora alopecuroides* L.) بر مهار پمپ AcrAB–TolC در باکتری *E. coli*

پروین محمدی[۱] و راضیه پوراحمد[۲*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، ایران، پست الکترونیک: Razieh_Jaktaji@yahoo.com

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۴

چکیده

باکتری‌های گرم منفی مقاوم چند دارویی، عفونت‌های واقعاً غیرقابل درمان را سبب می‌شوند. پمپ‌های انتشار به خارج نقش کلیدی در ایجاد مقاومت دارویی در باکتری‌ها دارند. AcrAB-TolC شناخته‌شده‌ترین پمپ انتشار به خارج است که اهمیتی برجسته در ایجاد فنوتیپ مقاوم چند دارویی در باکتری *E. coli* دارد. مهار این پمپ راهکاری برای مقابله با مقاومت دارویی است. هدف این پژوهش بررسی اثر عصاره گیاه تلخ‌بیان (*Sophora alopecuroides* L.) بر مهار پمپ AcrAB-TolC در موتان‌های *E. coli* بوده است. عصاره حاوی آلکالوئیدهای تام برای سنجش حداقل غلظت مهاری (MIC) به‌صورت تنها و ترکیب با سیپروفلوکساسین استفاده شد. موتان‌های مقاوم با غلظت کمتر از MIC عصاره، در دوره‌های زمانی مختلف پیش‌تیمار شده و بعد MIC سیپروفلوکساسین تعیین شد. بیان ژن *acrA* در موتان‌های تیمار شده و نشده با عصاره در حضور و عدم حضور سیپروفلوکساسین با تکنیک PCR زمان واقعی سنجش شد. نتایج نشان داد که عصاره به تنهایی اثر ضدباکتریایی دارد و در غلظتی کمتر از MIC، در ترکیب با سیپروفلوکساسین، دارای اثر سینرژیستی است. همچنین در پیش‌تیمار ۳۶ ساعته موجب کاهش MIC سیپروفلوکساسین شد. نتایج PCR زمان واقعی نشان داد که پیش‌تیمار با عصاره منجر به کاهش بیان ژن *acrA* شد. در نتیجه، عصاره گیاه در موتان‌های *E. coli* مقاوم چند دارویی، احتمالاً همانند یک مهارکننده پمپ عمل می‌کند. بنابراین جداسازی بهتر آلکالوئیدهای گیاه و بررسی اثرات آنها می‌تواند راهکاری را برای ساخت داروی جدید فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: داروی گیاهی، مقاومت چند دارویی، پمپ AcrAB-TolC، مهارکننده پمپ انتشار به خارج، گیاه تلخ‌بیان (*Sophora alopecuroides* L.).

مقدمه

تعداد باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در سال‌های اخیر افزایش یافته است و چنین مقاومتی می‌تواند به کارایی درمان ضدمیکروبی لطمه بزند. مشخص شده‌است که مقاومت فلوروکینولونی یک فاکتور خطر خاص برای مرگ و میر مربوط به عفونت‌های برخی جنس‌های باکتریایی است (Piddock *et al.*, 2010). در *E. coli* مکانیسم‌های متعددی، ازجمله جذب کاهش یافته دارو به دلیل کاهش بیان پورین‌های غشایی (مانند کاهش بیان OmpF)، جهش در آنزیم هدف این داروها (جهش در زیر واحد GyrA

آنزیم DNA ژیراز) و خارج کردن دارو توسط پمپ‌های انتشار به خارج (مانند AcrAB-TolC)، می‌توانند در مقاومت به فلوروکینولون‌ها شرکت کنند (Karczmarczyk *et al.*, 2011).

اخیراً بررسی ۵۰ سویه *E. coli* جدا شده از نمونه‌های بالینی انسانی و سگ، در ژاپن، یک رابطه قوی را میان بیان بیش از حد پمپ انتشار به خارج AcrAB-TolC و سطح بالای مقاومت فلوروکینولونی در تمام ۲۰ سویه مقاوم چندگانه نشان داد (Sun *et al.*, 2014). بیش‌بیانی این پمپ توسط جهش در پروتئین‌های تنظیمی ایجاد می‌شود که به‌طور مستقیم به‌عنوان سرکوب‌کننده‌های رونویسی عمل می‌کنند (برای مثال: AcrR، که رونویسی *acrAB* را مهار می‌کند)، یا به‌طور غیرمستقیم بیان فعال کننده‌های رونویسی بالادستی را مهار می‌کنند (Seeger *et al.*, 2008) (برای مثال: MarR که MarA را مهار می‌کند). MarA یک فعال‌کننده است که بیان *acrAB*، *tolC* و *marRAB* را فعال می‌کند (Kumar & Schweizer 2005)). آنتی‌بیوتیک‌هایی همانند تتراسیکلین و کلرامفنیکل موجب افزایش بیان *marA* می‌شوند (Hächler *et al.*, 1991).

راهبردهای مورد استفاده برای مقابله با مقاومت با واسطه انتشار به خارج، یا براساس جستجوی آنتی‌بیوتیک‌های جدید هستند که از سد سیستم‌های انتشار به خارج می‌گذرند یا براساس مهارکننده‌های پمپ انتشار به خارج (EPI: Efflux Pump Inhibitor) می‌باشند. بنابراین به نظر می‌رسد شناسایی و توسعه EPIها یک رویکرد جالب برای بهبود بخشیدن به کارایی بالینی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد، زیرا یک EPI منفرد می‌تواند علیه پمپ‌های MDR فعال باشد و به‌عنوان درمان کمکی استفاده شود (Zechini & Versace, 2009). تحقیق برای شناسایی EPIهای بالقوه در هر دوی نهادهای دانشگاهی و صنعت داروسازی در حال انجام است اما هنوز در مرحله درمانی و بالینی نیست و در حال حاضر هیچ‌گونه ترکیب‌های دارویی EPI/ضدمیکروبی در داروخانه‌ها وجود ندارد (Stavri *et al.*, 2007؛ Kourtesi *et al.*, 2013).

یکی از مهارکنندگانی که تاکنون برای پمپ AcrAB-TolC شناسایی شده‌است، ترکیب دی‌پپتید آمیدی فنیل آلانین آرژنین بتا نفتیل آمید (PAβNA: Phe-Arg-β-naphthylamide) می‌باشد که از نظر عملکردی، یک مهارکننده رقابتی است (Blair & Piddock, 2009). البته هنوز سازوکار دقیق عمل این مهارکننده بر پمپ‌های انتشار شناخته نشده‌است (Matsumoto *et al.*, 2011). این مهارکننده در آزمایشگاه به‌صورت متداول به‌عنوان یک غربال برای نشان دادن مقاومت آنتی‌بیوتیکی ناشی از انتشار به خارج استفاده می‌شود، اما به‌دلیل سمّیت و دسترسی زیستی بافت‌ها، در مطالعات بالینی استفاده نمی‌شود (Piddock *et al.*, 2010).

با توجه به طولانی بودن فرایند عرضه آنتی‌بیوتیک‌های جدید، ظهور و گسترش باکتری‌های MDR، شناسایی اهداف روشن برای متوقف کردن مکانیسم انتشار به خارج و انتخاب مولکول‌هایی با یک اثر مهاری بالا و بدون اثرات سمّی روی سلول‌های جانوران، یک نیاز مبرم می‌باشد. به‌علاوه اینکه انجام سنجش‌های بیشتر برای تعیین میزان اثر EPIها روی پمپ‌های انتشار به خارج ضروری می‌باشد (Zechini & Versace, 2009). در این میان منابع طبیعی، ازجمله گیاهان دارویی به‌دلیل ساختارهای شیمیایی متنوعی که ارائه می‌کنند، نقش متمایزی را در تلاش برای شناسایی EPIهای پیشرو و مواد ضدمیکروبی بالقوه دارند (Zhou *et al.*, 2012؛ Tegos *et al.*, 2011).

گیاه تلخ‌بیان (*Sophora alopecuroides*) گیاهی چندساله، دارای ۷–۱۲ جفت برگچه، گل‌های کرم رنگ و میوه از نوع نیام است که از خانواده بقولات بوده و به‌صورت گسترده در آسیای شرقی و جنوب‌غربی، یونان و جنوب روسیه پراکنش دارد (Küçükboyaci *et al.*, 2011). ترکیب‌های فعال زیستی گیاهان این جنس، "آلکالوئیدهای کوئینولیزیدین" می‌باشند که فعالیت‌های ضدمیکروبی، آرام‌بخشی، ضددرد، ضدتب، ضدالتهاب، ضدتوموری و فعالیت‌های قابل توجه ضدویروسی این آلکالوئیدها به اثبات رسیده است. از گیاهان جنس *Sophora* در طب سنتی

بسیاری از کشورهای آسیایی به‌ویژه چین به فراوانی استفاده می‌شود (Küçükboyaci *et al.*, 2011؛ Zhou *et al.*, 2013). هدف این مطالعه بررسی اثر آلکالوئیدهای تام استخراج شده از این گیاه بر مهار پمپ AcrAB-TolC و کاهش مقاومت به سیپروفلوکساسین در موتان‌های مقاوم چند دارویی *E. coli* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ترکیب‌های ضدمیکروبی و محیط کشت

مهارکننده پمپ PAβNA (به‌عنوان کنترل مثبت برای مهار پمپ) و آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین، سیپروفلوکساسین به‌صورت پودر از شرکت سیگما خریداری شد. برای کشت باکتری‌ها از محیط کشت LB (مرک، آلمان) و LBA حاوی ۱/۵٪ آگار (مرک، آلمان) استفاده شد.

سویه و موتان‌های باکتریایی

در این پژوهش از تیپ وحشی و سه موتان مضاعف *gyrA marR* (RE17، RE14، RE6) مربوط به باکتری *E. coli K12* سویه MG1655 حاصل از کارهای پیشین استفاده شد که مشخصات و حداقل غلظت مهاری (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) آنتی‌بیوتیک‌ها برای هر یک در جدول ۱ ارائه شده‌است (Pourahmad Jaktaji & Ebadi, 2013؛ Pourahmad Jaktaji *et al.*, 2012). با استفاده از کشت در غلظت‌های متوالی افزایشی تتراسیکلین، از موتان‌های RE17، RE14، RE6 به‌ترتیب کلون‌های PM1، PM2، PM3 ساخته شد که دارای مقاومت بالاتری نسبت به تتراسیکلین و سیپروفلوکساسین بودند (جدول ۱). از این سه کلون مقاوم برای انجام آزمایش‌های این مطالعه استفاده شد.

جدول ۱- سویه، موتان و کلون‌های مورد آزمایش

سویه/موتان/کلون	مشخصات	MIC (µg/ml)	
		Tc	Cip
MG1655	تیپ وحشی	۳	۰/۰۳۵
RE 17	موتان مضاعف *gyrA marR*	۳۰	۱
RE 14	موتان مضاعف *gyrA marR*	۳۵	۱
RE 6	موتان مضاعف *gyrA marR*	۴۵	۱
PM 1	کلون حاصل از کشت RE 17 با Tc	۱۳۰	۱۰۰
PM 2	کلون حاصل از کشت RE 14 با Tc	۱۳۰	۱۰۰
PM 3	کلون حاصل از کشت RE 6 با Tc	۱۳۰	۱۰۰

Tc و Cip به‌ترتیب حروف اختصاری برای تتراسیکلین و سیپروفلوکساسین می‌باشند.

عصاره‌گیری گیاه *Sophora alopecuroides* با هدف استخراج آلکالوئیدهای تام

ابتدا گیاه *Sophora alopecuroides* دارای میوه بالغ از منطقه شهرستان فارسان، استان چهارمحال و بختیاری، جمع‌آوری و در هرباریوم دانشگاه شهرکرد شناسایی شد. گیاهان جمع‌آوری شده دور از نور خورشید خشک شدند. سپس غلاف دانه‌ها جدا شد و دانه‌ها توسط خردکن پودر شدند.

۱۰۰gr پودر دانه گیاه به مدت دو روز در دمای اتاق، در ۲۵۰ ml اتانول ۸۰٪ خیسانده شد. عصاره حاصل با استفاده از کاغذ واتمن صاف شد. اتانول عصاره با استفاده از دستگاه روتاری در خلأ تقطیر شد و عصاره تغلیظ شده دوباره در

آب دو بار تقطیر اتوکلاو شده حل شد. در مرحله بعد، با استفاده از اسید و باز و انتقال عصاره به فاز آلی و تبخیر آن، عصاره خشک بدست آمد (Atta-Ur-Rahman *et al.*, 2000). عصاره جامد باقی مانده وزن شد و با استفاده از آب مقطر از آن استوکی با غلظت ۱۷۰mg/ml تهیه شد و در یخچال ۴ °C نگهداری شد.

آزمایش‌های تعیین MIC

برای تعیین MIC عصاره و PAβNA به‌صورت تنها، برای تیپ وحشی (MG1655) و هر یک از سه کلون مورد آزمایش (PM1، PM2، PM3) کشت LB با تراکم $۱۰^{۶}$CFU/ml به‌عنوان مایه تلقیح تهیه شد. برای هر باکتری در لوله آزمایش‌های حاوی LB، سری رقت‌های متوالی (۱–۲۲/۵mg/ml) از عصاره گیاهی و همچنین به‌صورت جداگانه سری رقت‌های متوالی PAβNA (۱۰–۱۲۵۰μg/ml) تهیه شد. تلقیح انجام شد و کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمادهی شدند. از محیط کشت بدون تلقیح برای کنترل منفی و از محیط کشت تلقیح شده و فاقد عصاره و PAβNA برای کنترل مثبت استفاده شد. تمام مراحل برای هر باکتری در سه تکرار انجام شد. پس از گرمادهی، کشت‌ها از نظر وجود کدورت مشهود به روش چشمی بررسی شدند و کمترین غلظتی که در آن کدورت یا رشد مرئی در محیط کشت وجود نداشت به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد (Pourahmad Jaktaji & Mohiti, 2010؛ Andrews, 2001).

در مرحله بعد برای تعیین MIC ترکیبی سیپروفلوکساسین و عصاره گیاهی بر باکتری‌های مورد آزمایش در سه تکرار، از میکروپلیت ۹۶ چاهکی استفاده شد. برای این کار، ابتدا برای هر یک از کلون‌های مقاوم و تیپ وحشی مورد آزمایش کشت LB با تراکم $۱۰^{۴}$CFU/ml انجام شد. حجم ۱۰۰μl از این کشت‌های باکتری در چاهک‌های مورد نظر از میکروپلیت اضافه گردید. سپس از چند غلظت زیر حد مهاری (کمتر از MIC) از عصاره (۱–۶mg/ml) به همراه چند غلظت زیر حد مهاری (۵۰۰ng/ml–۶۰μg/ml) برای کلون‌های مقاوم و ۸–۱۶ng/ml برای تیپ وحشی) سیپروفلوکساسین به‌صورت "ترکیبی" و همچنین به‌صورت "تنها" در محیط کشت چاهک‌های از قبل مشخص شده ایجاد شد. از محیط کشت مایع بدون باکتری به‌عنوان کنترل منفی و کشت فاقد عصاره و آنتی‌بیوتیک به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس به مدت ۱۶ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C در انکوباتور ثابت گرمادهی انجام شد. در نهایت جواب MIC هم به روش چشمی از لحاظ وجود کدورت در مقایسه با کشت کنترل (Zhou *et al.*, 2012) و هم به کمک اندازه‌گیری جذب نوری کشت‌ها با استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا (ELISA Reader) بررسی شد. کمترین غلظت از هر دو ماده، که در ترکیب با هم موجب مهار رشد باکتری می‌شود، به‌عنوان MICهای ترکیبی مشخص شد. به‌صورت همزمان اثر ترکیبی PAβNA، به‌عنوان EPI کنترل، (۱۰–۵۰μg/ml) (Lamers *et al.*, 2013) با سیپروفلوکساسین (۶۰μg/ml–۵۰۰ng/ml برای کلون‌های مقاوم و ۸–۱۶ng/ml برای تیپ وحشی) نیز با همین روند سنجش شد.

ارزیابی میان‌کنش سیپروفلوکساسین با عصاره گیاه و PAβNA

از شاخص غلظت مهاری نسبی (FICI: Fractional Inhibitory Concentration Index) برای ارزیابی میان‌کنش‌های سیپروفلوکساسین با عصاره گیاه و PAβNA استفاده شد. FICI با استفاده از فرمول FICI=FICA+FICB محاسبه شد. در این فرمول FICA برابر است با MIC داروی A در ترکیب/MIC داروی A به تنهایی و به همین ترتیب FICB برابر است با MIC داروی B در ترکیب/MIC داروی B به تنهایی. FICI≤۰/۵ نشانگر وجود اثر سینرژیستی و FICI>۴ نشانگر وجود اثر آنتاگونیستی میان داروی A و B است. اگر ۰/۵<FICI≤۴ باشد، میان‌کنشی میان داروی A و B وجود ندارد (Zhou *et al.*, 2012؛ Botelho, 2000).

توجه: به دلیل یکسان بودن ویژگی‌های فنوتیپی و MICهای سه کلون مقاوم مورد آزمایش، ادامه مراحل مطالعه تنها با استفاده از کلون مقاوم PM1 انجام شد.

بررسی MIC سیپروفلوکساسین پس از پیش‌تیمار باکتری با عصاره گیاه

پیش‌تیمار کلون مقاوم مورد آزمایش (PM1)، در LB حاوی غلظت ۱/۵۶mg/ml از عصاره گیاهی در دوره‌های زمانی ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعته انجام شد. گرمادهی با استفاده از شیکر انکوباتور در دمای ۳۷°C و دور ۱۵۰–۱۸۰rpm انجام شد. در پایان هر دوره زمانی مورد نظر، MIC سیپروفلوکساسین سنجش شد (Zhou *et al.*, 2012). در این آزمایش از محیط کشت مایع فاقد باکتری به‌عنوان کنترل منفی و از محیط کشت تلقیح شده بدون آنتی‌بیوتیک به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

استخراج RNA کل باکتریایی

ابتدا کشت LB با جذب نوری ۰/۶ در طول موج ۶۰۰nm ($OD_{۶۰۰}$) برای تیپ وحشی و ۵ تیمار متفاوت PM1 شامل: ۱- غلظت زیر حد مهاری سیپروفلوکساسین، ۲- غلظت زیر حد مهاری عصاره گیاه، ۳- ترکیب غلظت‌های زیر حد مهاری سیپروفلوکساسین و عصاره گیاه، ۴- ترکیب غلظت‌های زیر حد مهاری سیپروفلوکساسین و PAβNA و ۵- تیمار ۳۶ ساعته با غلظت زیر حد مهاری عصاره گیاه تهیه شد. RNA باکتریایی از کشت‌های تهیه شده با استفاده از کیت Rneasy mini Kit (کیاژن) استخراج شد. با استفاده از DNase I فاقد RNase (فرمنتاس) روی نمونه‌های RNA استخراج شده، تیمار DNase انجام گردید و DNA حذف شد. برای سنتز cDNA از کیت RevertAid Reverse Transcriptase (فرمنتاس) استفاده شد. با توجه به غلظت نمونه‌های RNA، از هر نمونه حجم مشخصی که حاوی ۵۰۰ng RNA بود، برداشته شد و با استفاده از پرایمر هگزامر تصادفی طبق روش کیت cDNA از نمونه‌های RNA سنتز شد (Pourahmad Jaktaji & Jazayeri, 2013).

بررسی بیان ژن *acrA* با تکنیک Real Time PCR

cDNAهای سنتز شده (حاصل از کشت تیپ وحشی و ۵ تیمار متفاوت PM1) برای بررسی بیان ژن *acrA* و همچنین ژن *gapA*، به‌عنوان ژن خانه‌زاد، از طریق تکنیک PCR در زمان واقعی با استفاده از کیت سایبر گرین (تاکارا، ژاپن) و ترموسایکر Rotor Gene 6000، در سه تکرار، مورد استفاده قرار گرفتند. بیان نسبی ژن با روش فافل (نسبت بیان *acrA* به بیان *gapA*) بررسی شد (Pfaffl *et al.*, 2002). پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده‌است. شرایط دمایی واکنش PCR در زمان واقعی از تحقیقات پیشین بدست آمد (Pourahmad Jaktaji & Jazayeri, 2013).

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نوع پرایمر		ترتیب توالی (۳-´۵)	اندازه محصول	منبع
acrA	F	TTGAAATTACGCTTCAGGAT	۱۸۹bp	(Pourahmad & Jazayeri, 2013)
	R	CTTAGCCCTAACAGGATGTG		
gapA	F	ACTTACGAGCAGATCAAAGC	۱۷۰bp	(Pourahmad & Jazayeri, 2013)
	R	AGTTTCACGAAGTTGTCGTT		

بررسی آماری داده‌ها

بررسی آماری با استفاده از آزمون تی (T-test) از طریق نرم‌افزار SPSS و همچنین برنامه Excel انجام شد. حدود اطمینان برای همه آزمایش‌ها ۹۵٪ در نظر گرفته شد و $P<۰/۰۵$ معنی‌دار محسوب گردید. مقادیر بیان بیش از ۲، بیش‌بیان در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج آزمایش‌های تعیین MIC و میانکنش سیپروفلوکساسین با عصاره گیاه و PAβNA

نتایج تعیین MIC، مقادیر FICI و نوع میان‌کنش ترکیب‌ها در جدول ۳ ارائه شده‌است. حداقل غلظت مهاری PAβNA برای سویه حساس از مطالعات پیشین تعیین شد (Lamers *et al.*, 2013 ؛Matsumoto *et al.*, 2011). به‌دلیل مشاهده فنوتیپ یکسان در سه کلون مورد آزمایش، ادامه کار تنها برای PM1 انجام شد.

جدول ۳- نتایج بررسی اثر ترکیبی و میانکنش سیپروفلوکساسین با عصاره گیاهی و PAβNA

ترکیب CIP- عصاره گیاه/ PAβNA	باکتری	MIC تنها هر یک از ترکیب‌ها	MIC ترکیبی برای هر یک از ترکیب‌ها	FICI	میان‌کنش
CIP (µg/mL) – عصاره گیاه (mg/mL)	MG1655	۳-۰/۰۳۵	---	---	---
	PM 1	۱۲/۵-۱۰۰	۱/۵۶-۱	۰/۱۳	SYN
	PM 2	۱۲/۵-۱۰۰	۱/۵۶-۱	۰/۱۳	SYN
	PM 3	۱۲/۵-۱۰۰	۱/۵۶-۱	۰/۱۳	SYN
PAβNA (µg/mL) – CIP (µg/mL)	MG1655	۲۵۶-۰/۰۳۵	---	---	---
	PM 1	۳۰۰-۱۰۰	۲۵-۱	۰/۰۹	SYN
	PM 2	۳۰۰-۱۰۰	۲۵-۱	۰/۰۹	SYN
	PM 3	۳۰۰-۱۰۰	۲۵-۱	۰/۰۹	SYN

SYN: مخفف برای سینرژیستی

بررسی MIC سیپروفلوکساسین پس از پیش تیمار باکتری با عصاره گیاه

پیش‌تیمار با غلظت ۱/۵۶mg/ml عصاره گیاه موجب کاهش چشمگیری در مقاومت کلون PM1 به سیپروفلوکساسین شد. بهترین نتیجه برای غلظت ۱µg/ml سیپروفلوکساسین در پیش تیمار ۳۶ ساعته بود.

نتایج بررسی بیان ژن *acrA*

منحنی ذوب برای هر دو ژن *acrA* و *gapA* یک قله شاخص را نشان داد که حکایت از تکثیر اختصاصی ژن مورد نظر و عدم آلودگی داشت. نقطه ذوب ژن‌های *acrA* و *gapA* به‌ترتیب ۸۸ و ۸۶ درجه سانتی‌گراد بود. با توجه به اینکه واکنش‌های PCR در زمان واقعی در سه تکرار انجام شد، نتایج بررسی بیان نسبی ژن *acrA* به‌صورت میانگین در جدول ۴ ارائه شده‌است.

بررسی آماری داده‌ها

مقایسه بیان ژن *acrA* در نمونه‌های PM1 تیمار شده با گیاه نسبت به نمونه تیمار نشده توسط آزمون تی مشخص کرد که در نمونه تیمار شده با غلظت زیر حد مهاری عصاره به تنهایی و همچنین نمونه تیمار شده با غلظت زیر حد مهاری CIP و عصاره گیاه به‌صورت ترکیبی $P>۰/۰۵$ است، یعنی تفاوت معنی‌داری با نمونه تیمار نشده نشان نمی‌دهند، اما بیان این ژن در نمونه پیش تیمار ۳۶ ساعته با عصاره گیاه، نسبت به نمونه تیمار نشده کاهش معنی‌داری ($P>۰/۰۵$) نشان داد.

جدول ۴- بیان نسبی ژن acrA در تیپ وحشی و چهار تیمار PM1

	سویه/ کلون	بیان نسبی ژن *acrA*
	تیپ وحشی (MG1655)	۱
	تیمار شده با غلظت زیر حد مهاری CIP	۵/۳۴
	تیمار شده با غلظت زیر حد مهاری CIP و عصاره گیاه	۴/۰۷
PM1	تیمار شده با غلظت زیر حد مهاری CIP و PAβNA	۰/۹۹
	تیمار شده با غلظت زیر حد مهاری عصاره گیاه	۳/۷۶
	تیمار شده با غلظت زیر حد مهاری عصاره گیاه به مدت ۳۶ ساعت	۲/۹۸

میزان خطای استاندارد برای تمام مقادیر کمتر از ۱۰٪ بود.

بحث

با توجه به نقش برجسته‌ای که پمپ انتشار به خارج AcrAB-TolC در ایجاد MDR در باکتری *E. coli* دارد (Szmolka & Nagy, 2013)، مهار آن با استفاده از عصاره گیاه بومی *Sophora alopecuroides*، مورد هدف این پژوهش قرار گرفت و نتایج نشان داد که عصاره حاوی آلکالوئید استخراج شده از دانه این گیاه به تنهایی دارای اثر ضدمیکروبی می‌باشد. MIC عصاره گیاه در کلون‌های مقاوم (PM1، PM2، PM3) چهار برابر بیشتر از تیپ وحشی بود که وجود مقاومت به عصاره گیاه را در این موتان‌ها مطرح می‌کند.

عصاره گیاه در غلظت زیر حد مهاری ۱/۵۶mg/ml هم به‌صورت پیش‌تیمار و هم به‌صورت ترکیب همزمان با غلظت زیر حد مهاری سیپروفلوکساسین، موجب کاهش مقاومت به سیپروفلوکساسین در کلون‌های مقاوم می‌شود. در حالت ترکیبی، با توجه به اینکه کاهش مقاومت، در غلظت‌های زیر حد مهاری عصاره رخ داد، می‌توان گفت که این اثر به‌دلیل اثر ضدمیکروبی خود عصاره به تنهایی نبوده است، بلکه ناشی از وجود میان‌کنش‌های سینرژیستی میان عصاره گیاه و سیپروفلوکساسین می‌باشد. البته بررسی شاخص غلظت مهاری نسبی نیز وجود اثر سینرژیستی میان این دو ترکیب را تأیید کرد. در پیش‌تیمار با عصاره گیاه، بهترین جواب پس از ۳۶ ساعت بدست آمد که نشانگر این است که کارایی عملکرد عصاره گیاه به مدت زمان تیمار وابسته است.

بنابراین با بررسی نتایج حاصل از PCR در زمان واقعی مشخص شد که بیان ژن *acrA* در کلون مقاوم (PM1) تیمار نشده با عصاره، پنج برابر سویه حساس مورد آزمایش می‌باشد که تأییدی بر بیش‌بیانی پمپ در کلون مقاوم مورد آزمایش می‌باشد. پیش‌تیمار ۳۶ ساعته کلون مقاوم با عصاره گیاه در غلظت زیر حد مهاری، موجب کاهش معنی‌دار در بیان ژن *acrA* شد. با توجه به نتایج تعیین MIC سیپروفلوکساسین بعد از پیش‌تیمار و نتایج بررسی بیان ژن، می‌توان گفت هر چه مدت زمان تیمار با عصاره بیشتر باشد، احتمالاً بیان ژن *acrA* کاهش بیشتری نشان می‌دهد.

عصاره گیاه توانست به خوبی PaβNA، مقاومت موتان‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین را کاهش دهد اما برای این فعالیت مهاری، در مقایسه با PAβNA (μg/ml)، باید در دوزهای بالاتری (mg/ml) استفاده شود. در مورد بیان ژن *acrA*، تیمار کلون مقاوم با PAβNA نسبت به تیمار با عصاره گیاه، به‌طور مؤثرتری موجب کاهش بیان این ژن شد که می‌تواند نشانگر این امر باشد که تنها بخشی از اثر عصاره در کاهش MIC سیپروفلوکساسین موتان مقاوم، مربوط به مهار بیان پمپ می‌باشد.

در این پژوهش تنها بیان یک ژن از سه ژن مسئول کد کردن این پمپ بررسی شد، بنابراین با توجه به اینکه برای عملکرد پمپ حضور هر سه جزء آن ضروری می‌باشد (Nikaido & Takatsuka, 2009). از این‌رو، این احتمال

وجود دارد که اثر عصاره بر کاهش بیان دو ژن دیگر مربوط به این پمپ، بیشتر از اثر آن بر بیان *acrA* باشد.

علاوه‌بر تغییر مراحل تنظیمی مربوط به بیان پمپ‌های انتشار به خارج، مکانسیم‌های عمل دیگری نیز، ازجمله: مهار سرهم‌بندی قطعات پمپ چند جزئی، مسدود کردن کانال غشای بیرونی (TolC) با یک سرپوش، زایل کردن انرژی انتشار به خارج و ایجاد مهار رقابتی یا غیررقابتی با یک مولکول غیر آنتی‌بیوتیکی به جایگاه‌های میل ترکیبی پمپ انتشار به خارج، برای مهار پمپ وجود دارد (Soto, 2013). بنابراین، این احتمال وجود دارد که عصاره گیاه مورد استفاده در این پژوهش از طریق مکانیسم دیگری نیز، ازجمله مهار رقابتی یا تداخل در میانکنش اجزای پمپ AcrAB-TolC، موجب مهار این پمپ و در نتیجه کاهش مقاومت به سیپروفلوکساسین گردد.

نتایج این پژوهش همسو با نتایجی بود که Zhou و همکارانش (۲۰۱۲) منتشر کردند. این محققان اثر کل آلکالوئیدهای استخراج شده از دانه گیاه *Sophora alopecuroides*، که در چین به‌صورت قرص تجاری تهیه شده و با نام تجاری تاسا (TASA) شناخته می‌شود، را بر دو سویه *E. coli* مقاوم به چهار آنتی‌بیوتیک (آمپی‌سیلین، آمیکاسین، سفوتاکسیم و سیپروفلوکساسین) و تیپ وحشی ATCC 25922، مورد سنجش قرار دادند و بیان کردند که تاسا علیه این سویه‌ها خاصیت ضدباکتریایی دارد و MIC تاسا در سویه های مقاوم پنج برابر MIC آن در تیپ وحشی است. آنتی‌بیوتیک های مورد آزمایش در ترکیب با تاسا، در غلظت زیر حد مهاری ۱/۲۵mg/ml، در سویه های مقاوم اثر سینرژیستی داشته و کاهش چشمگیری در MIC نشان دادند. در پیش‌تیمار سویه های مقاوم با غلظت‌های زیر حد مهاری تاسا، بهترین نتیجه برای هریک از دو سویه به طور متفاوت، بعد از ۲۴ و ۳۶ ساعت بدست آمد. آنان همچنین بیان ژن‌های *acrA*، *acrB*، *tolC* و *acrR* را در سویه‌های تیمار شده با تاسا و تیمار نشده با استفاده از تکنیک PCR در زمان واقعی بررسی کردند و نتایج این بررسی بیانگر کاهش معنی‌دار در بیان ژن‌های *acrA*، *acrB* و افزایش در بیان *acrR* بود؛ بیان ژن *tolC* نیز تغییر معنی‌داری نداشت. در مورد نحوه و مدت زمان تیمار با تاسا، قبل از استخراج RNA، توضیحی ارائه نشده‌است. آنان همچنین اثر تاسا بر رده سلولی BHK۲۱ را مورد سنجش قرار داده و بیان کردند که غلظتی از تاسا که موجب مهار ۵۰٪ رشد سلولی می‌شود (IC ۵۰)، ۳۶mg/ml می‌باشد.

این محققان از کربونیل سیانید متا-کلروفنیل هیدرازون به‌عنوان EPI برای کنترل مثبت استفاده کردند و نشان دادند که تاسا به خوبی CCCP موجب کاهش MIC آنتی‌بیوتیک های مورد آزمایش می‌شود اما برای فعالیت خود، نسبت به CCCP (μg/ml) نیازمند دوزهای بالاتر (mg/ml) می‌باشد. در توجیه این مسئله عنوان کردند که تاسا مخلوطی از آلکالوئیدهای استخراج شده از دانه *Sophora alopecuroides* است و اجزای فعال دارای اثر سینرژیستی و یا ضدمیکروبی آن، ممکن است تنها بخش کوچکی از این مخلوط باشد. در نهایت نتیجه گرفتند که اثر تاسا بر کاهش مقاومت به سیپروفلوکساسین ممکن است تا حدودی از طریق یک مکانیسم مهار فعالیت پمپ AcrAB-TolC در این ایزوله‌ها باشد، بنابراین تاسا می‌تواند به‌عنوان یک منبع طبیعی قدرتمند برای توسعه EPIهای علیه پمپ AcrAB-TolC، مورد استفاده قرار گیرد (Zhou *et al.*, 2012).

با توجه به نتایج بدست‌آمده از مطالعات Zhou و همکاران (۲۰۱۲) و این پژوهش، عصاره تهیه شده به‌صورت دستی در این پژوهش دارای اثرات مشابه با قرص تجاری تاسا در چین بوده و آلکالوئیدهای دانه گیاه *Sophora alopecuroides* در سویه‌های MDR مربوط به باکتری *E. coli*، احتمالاً به‌صورت وابسته به زمان، همانند یک مهارکننده پمپ عمل کرده و با کاهش بیان پمپ AcrAB-TolC، موجب کاهش چشمگیر در مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین می‌شوند. در واقع کاهش بیان پمپ می‌تواند یکی از مکانیسم های این عصاره

گیاهی بر مهار این پمپ و کاهش مقاومت به آنتی‌بیوتیک باشد. بنابراین جداسازی دقیق‌تر آلکالوئیدهای گیاه و بررسی اثر آنها راهی به‌سوی ساخت داروهای گیاهی جدید باز می‌کند.

همچنین با توجه به رویش خودروی این گیاه در مناطقی از ایران، می‌توان از آن به‌صورت خام یا فرآوری شده در طب سنتی و نوین برای ارتقاء سطح سلامت جامعه و نیز پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی ناشی از سویه‌های *E. coli* دارای پمپ بیش‌بیان شده، استفاده کرد. البته انجام آزمایش‌های *in vivo* برای تعیین میزان MIC عصاره گیاه در بدن ضروری می‌باشد.

منابع مورد استفاده

- Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48(suppl 1): 5-16.
- Atta-ur-Rahman, A.U., Choudhary, M.I., Parvez, K., Ahmed, A., Akhtar, F., Nur-E-Alam, M. and Hassan, N.M., 2000. Quinolizidine alkaloids from *Sophora alopecuroides*. Journal of Natural Products, 63(2): 190-192.
- Blair, J.M. and Piddock, L.J., 2009. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. Current Opinion in Microbiology, 12(5): 512-519.
- Botelho, M., 2000. Fractional inhibitory concentration index of combinations of antibacterial agents against cariogenic organisms. Journal of Dentistry, 28(8): 565-570.
- Hächler, H., Cohen, S.P. and Levy, S.B., 1991. *marA*, a regulated locus which controls expression of chromosomal multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 173(17): 5532-5538.
- Karczmarczyk, M., Martins, M., Quinn, T., Leonard, N. and Fanning, S., 2011. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. Applied and Environmental Microbiology, 77(20): 7113-7120.
- Kourtesi, C., Ball, A.R., Huang, Y.Y., Jachak, S.M., Vera, D.M.A., Khondkar, P., Gibbons, S., Hamblin, M. and Tegos, G.P., 2013. Microbial efflux systems and inhibitors: approaches to drug discovery and the challenge of clinical implementation. The Open Microbiology Journal, 7: 34-52.
- Küçükboyaci, N., Özkan, S., Adigüzel, N. and Tosun, F., 2011. Characterisation and antimicrobial activity of *Sophora alopecuroides* L. var. *alopecuroides* alkaloid extracts. Turkish Journal of Biology, 35(3): 379-385.
- Kumar, A. and Schweizer, H.P., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. Advanced Drug Delivery Reviews, 57(10): 1486-1513.
- Lamers, R.P., Cavallari, J.F. and Burrows, L.L., 2013. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PAβN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. PLoS One, 8(3): e60666.
- Matsumoto, Y., Hayama, K., Sakakihara, S., Nishino, K., Noji, H., Iino, R. and Yamaguchi, A., 2011. Evaluation of multidrug efflux pump inhibitors by a new method using microfluidic channels. PLoS One, 6(4): e18547.
- Nikaido, H. and Takatsuka, Y., 2009. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1794(5): 769-781.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research, 30(9): e36.
- Piddock, L.J., Garvey, M.I., Rahman, M.M. and Gibbons, S., 2010. Natural and synthetic compounds such as trimethoprim behave as inhibitors of efflux in gram-negative bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65(6): 1215-1223.
- Pourahmad Jaktaji, R. and Ebadi, R., 2013. Generation of clones with higher resistance to tetracycline and chloramphenicol from ciprofluoxacin resistant *Escherichia coli* mutants. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 4(10): 3063-3067.
- Pourahmad Jaktaji, R., Ebadi, R. and Karimi, M., 2012. Study of organic solvent tolerance and increased antibiotic resistance properties in *E. coli gyrA* mutants. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 11(2): 595-600.
- Pourahmad Jaktaji, R. and Jazayeri., N., 2013. Expression of *acrA* and *acrB* genes in *E. coli* mutants with or without *marR* or *acrR* mutations. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 16(12): 1254-1258.
- Pourahmad Jaktaji, R. and Mohiti, E., 2010. Study of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 9(1): 43-48.

- Seeger, M.A., Diederichs, K., Eicher, T., Brandstatter, L., Schiefner, A., Verrey, F. and Pos, K.M., 2008. The AcrB efflux pump: conformational cycling and peristalsis lead to multidrug resistance. Current Drug Targets, 9(9): 729-749.
- Soto, S.M., 2013. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. Virulence, 4(3): 223-229.
- Stavri, M., Piddock, L.J. and Gibbons, S., 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. Journal of antimicrobial Chemotherapy, 59(6): 1247-1260.
- Sun, J., Deng, Z. and Yan, A., 2014. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochemical and Biophysical Research Communications, 453(2): 254-267.
- Szmolka, A. and Nagy, B., 2013. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. Frontiers in Microbiology, 4:1-13.
- Tegos, G.P., Haynes, M., Strouse, J.J., Khan, M.M.T., Bologa, C.G., Oprea, T.I. and Sklar, L.A., 2011. Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies. Current Pharmaceutical Design, 17(13): 1291-1302.
- Zechini, B. and Versace, I., 2009. Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria. Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery, 4(1): 37-50.
- Zhou, X., Jia, F., Liu, X. and Wang, Y., 2012. Total Alkaloids of *Sophorea alopecuroides*-induced Down-regulation of AcrAB-ToLC Efflux pump reverses susceptibility to ciprofloxacin in clinical multidrug resistant *Escherichia coli* isolates. Phytotherapy Research, 26(11): 1637-1643.
- Zhou, X.Z., Jia, F., Liu, X.M., Yang, C., Zhao, L. and Wang, Y.J., 2013. Total alkaloids from *Sophora alopecuroides* L. increase susceptibility of extended-spectrum β-lactamases producing *Escherichia coli* isolates to cefotaxime and ceftazidime. Chinese Journal of Integrative Medicine, 19: 945-949.

Effects of *Sophora alopecuroides* L. extract on AcrAB-TolC pump inhibition in *E. coli*

P. Mohammadi[1] and R. Pourahmad[2*]

1- M.Sc., Department of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2*- Corresponding author, Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, E-mail: Razieh_Jaktaji@yahoo.com

Received: March 2015 Revised: February 2016 Accepted: February 2016

Abstract

Gram-negative multi-drug resistant bacteria cause untreatable infections. Efflux pumps have a key role in generation of multi-drug resistant bacteria. The inhibition of this pump is a strategy against drug resistance. The aim of this research was to study the effect of *Sophorea alopecuroides* L. extract on inhibition of AcrAB-TolC pump in *E. coli* mutants. The extract containing total alkaloids, was used to measure minimum inhibitory concentration (MIC) of extract alone and in combination with ciprofloxacin. Resistant mutants were pretreated with a concentration lower than MIC for different time periods and then MIC was measured for ciprofloxacin. The expression of *acrA* in mutants treated or untreated with the extract in present and absent of ciprofloxacin was assayed. Results showed that the extract had antibacterial activity by itself and in a concentration lower than MIC in combination with ciprofloxacin had synergistic effect. Meanwhile, a 36-hour pretreatment caused decrease in MIC of ciprofloxacin. Results of real time PCR showed that treatment with extract led to decrease in *acrA* expression. In conclusion, the extract of *Sophorea alopecuroides* in *E. coli* multi drug resistant mutants possibly acts as a pump inhibitor. Therefore, better isolation of plant alkaloids and study their effects could provide a strategy for the synthesis of new drug.

Keywords: Herbal drug, multi-drug resistance, AcrAB-TolC pump, efflux pump inhibitor, *Sophora alopecuroides* L.