Research Article

Nova Biologica Reperta 9(4): 257-266 (2023)

Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115

https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.9.4.257

مقاله پژوهشی

یافته‌های نوین در علوم زیستی

جلد ۹، شماره ۴، صفحات ۲۵۷ الی ۲۶۶ (۱۴۰۱)

انتشارات دانشگاه خوارزمی

فراوانی ژن پمپ های افلاکس PGP و MRPA در ایجاد مقاومت دارویی در ایزوله های بالینی لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور

مائده پریشان[۱] و محمود ناطقی[۲]

[۱]بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه پیام نور تهران شرق، تهران، ایران؛ [۲]دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران

مسئول مکاتبات: مائده پریشان maede_parishan@yahoo.com

چکیده. هدف این تحقیق شناسایی ژن پمپ‌های MRPA و PGP در ایزوله‌های بالینی لیشمانیا است. از جمله‌ی این ژن‌های دخیل در مقاومت (MRPA) pgpa و (PGP) mdr1 هستند، که محصول آنها به عنوان انتقال‌دهنده وابسته به ATP (ABC Transporter) در افلاکس دارو از سیتوزول به خارج غشا نقش دارند. در این راستا ۴۰ داوطلب مبتلا به سالک به طور اتفاقی انتخاب گردیدند. ابتدا آماستیگوت ها با میکروسکوپ نوری بررسی گردیدند، سپس به محیط کشت دو فازی اختصاصیNNN تلقیح شدند. DNA ها به روش فنل-کلروفرم استخراج شدند و با پرایمرهای اختصاصی ناحیه ITS عامل ایجاد زخم تعیین هویت گردیدند. سپس فراوانی دو پمپ دخیل در مقاومت دارویی به کمک PCR بررسی شد. در این مطالعه ژن mdr1 که پیش از این در سویه‌های آزمایشگاهی مقاوم شده به دارو نشان داده شده بود، نسبت به pgpa فراوانی بیشتری را دارا بودند که یکی از دلایل افزایش را می‌توان به علت حضور پمپ MDR درسطح غشای پلاسمایی اشاره کرد، که مواد و دارو را از لایه های داخلی غشای دو لایه لیپیدی به لایه های خارجی انتقال می‌دهد و غلظت دارو را در داخل سلول کم می‌کند و باعث مقاومت دارویی می‌شود در حالی‌که پمپ MRPA در غشا اندامک سلولی است.

واژه‌های کلیدی. انتقال دهنده ABC، ژن mdr1، ژن pgpa، گلوکانتیم، لیشمانیوز جلدی

Frequency of PGP and MRPA efflux pump genes in drug resistance in clinical isolates of *Leishmania tropica* and *L. major*

Maedeh Parishan[1] & Mahmoud Nateghi[2]

[1]Microbial Biotechnology, Payame Noor University of East Tehran, Tehran, Iran; [2]Qom University of medical science, Health college, Qom, Iran

Correspondent author: maedeh parishan, maede_parishan@yahoo.com

Abstract. This study aimed to identify PGP and MRPA genes in clinical isolates of *Leishmania*. The genes of pgpa (MRPA) and mdr1 (PGP) are involved in the drug resistance, their products act as dependent transporters of ATP (ABC Transporter) in the reflux of drugs from the cytosol to the outer space of the cell. Hence, 40 volunteers with leishmaniasis were randomly selected. Firstly, Amastigotes were examined under a light microscope, then inoculated into NNN-specific biphasic culture medium. Deoxy ribonucleic acids were extracted by phenol-chloroform method and were determined by ITS-specific primers. Then the frequency of two pumps involved in "drug resistance" was investigated by PCR. In this study, the mdr1 gene, which had previously been shown to be present in the in vitro resistant strains, was shown to have a higher frequency of pgpas, which could be due to the presence of MDR. It transports the drug from the inner layers of the lipid bilayer membrane to the outer layers, reducing the concentration of the drug inside the cell and causing drug resistance, while the MRPA pump is in the membrane of the cell organelles.

Key words. ABC transporter, cutaneous leishmaniasis, glucantim, mdr1 gene, pgpa gene

Received 30.08.2021/ Revised 16.09.2022/ Accepted 24.09.2022/ Published 20.03.2023

دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۸/ اصلاح: ۱۴۰۱/۰۶/۲۵/ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۲/ انتشار: ۱۴۰۱/۱۲/۲۸

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.2.4]

مقدمه

لیشمانیازیس به گروهی از بیماری‌های انگلی و عفونی با انتشار جهانی اطلاق می‌شود، که ناشی از تک یاخته لیشمانیا (Piscopo & Mallia, 2006) و در شمار بیماری زئونوز انسان و حیوان قرارمی گیرد (Ardehali et al., 1995). لیشمانیوز پوستی بیماری انگلی شایع در جهان، ازجمله ایران است (Desjeux, 2004)؛ که در کشور در طی چند سال اخیر موارد ابتلا به آن رو به فزونی نهاده است. به علت عدم موفقیت روش‌های پیشگیری و کنترل مخازن و ناقل و نیز عدم دسترسی به واکسن اثر بخش انسانی، درحال حاضر موثرترین ابزار موجود برای کنترل لیشمانیوز درمان دارویی است (Mohebali et al., 2004). در میان روش‌های مختلف درمان دو شکل از ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتیموان (sbv) یعنی سدیم استیبوگلوکونات (pentostam) و گلوکانتیم (meglumine antimonite) کماکان داروهای خط اول در درمان تمام اشکال لیشمانیوز هستند (Croft et al., 2006). شکست درمان و کاهش اثر بخشی گلوکانتیم در تعدادی از تحقیقات در ایران گزارش شده است. طی مطالعه‌ای در ارتباط با مقاومت لیشمانیا تروپیکا به گلوکانتیم در بیماران مبتلا به سالک در ایران میزان اثر بخشی دارو را ۸۰ تا ۸۵ درصد گزارش شده است (Hadighi et al., 2006). مطالعه روی ایزوله‌های بالینی به طور نادر انجام شده است، از جمله طی مطالعه‌ای در سال ۱۳۸۱ در ایران بر روی حدود ۲۴۸ بیمار بین ۲۰ تا ۴۵ سال در مشهد که بیش از ۹۴ درصد ایزوله‌های بالینی ناشی از لیشمانیا تروپیکا بودند که از این تعداد ۱۲ درصد آنها به گلوکانتیم پاسخ ندادند (Alizadeh et al., 2011). مقامت آنتیموان در تعدادی از موارد ناشی از افزایش بیان پمپ‌های افلاکس وابسته به خانواده انتقال دهنده‌های ABC است (Hoffmeyer et al., 2000). انتقال دهنده‌های ABC از پروتئین‌های غشایی و بزرگترین خانواده از پمپ‌های افلاکس هستند و در تمام ارگانیسم‌ها از آرکی باکتر تا یوکاریوت‌ها از جمله سلول‌های انسانی حضور دارند و تعدادی از این پروتئین‌ها در عرض غشاهای زیستی وجود دارند که باعث مقاومت ذاتی و اکتسابی آنتی بیوتیک‌ها در میکروارگانیسم‌های مختلف می شوند (Higgins, 1992; Gokirmak et al., 2012). طی مطالعه‌ای نقش ABC Transport ها را در سویه‌های لیشمانیا دونووانی به طور طبیعی مقاوم به دارو نشان داده شده است که ژن pgpa MRPA در ایزوله‌ها به شکل DNA حلقوی خارج کروموزومی با روش هضم آنزیمی و ساترن بلات نشان داده شدند و افزایش میزان mRNA این ژن با روش Real Time PCR نیز مشاهده شد. اولین گروهABC Transporter مربوط به لیشمانیا محصول ژن pgpa به نامMRPA است که درغشا ویزیکول‌هایی درسیتوپلاسم مستقر هستند و شبیه ترانسپورترهای MRP عمل می کنند ولی از نظر عملکردی متفاوت هستند(Callahan & Beverley, 1991). ژن pgpa مقاومت به آنتیموان را به وسیله محدود کردن thiol-metal conjugates در ویزیکول داخل سلولی ایجاد میکند و باعث مقاومت به آنتیموان ۳ ظرفیتی و آرسنیک ۳ ظرفیتی می‌شود که این ژن در سال ۱۹۹۰ شناسایی شد (Ellenberger & Beverley, 1989). افزایش بیان MRPA از طریق برهم‌کنش با پروتـئین‌های دیگر غشا باعث کاهش ورود آنتیموان و افزایش خروج آن می‌شود و به این ترتیب نقش اصلی را در مقاومت به داروی آنتیموان بازی می‌کند (Webster & Russel, 1993). دومین گروه ABC Transporter لیشمانیا محصول ژن mdr1 به نام PGP است،که این محصول شباهت زیادی به P-GlycoProtein پستانداران دارد که در مقاومت دارویی نقش دارند (Henderson et al., 1992). اولین ژن mdr کشف شده در لیشمانیا Itpgpa است، که یک قطعه حلقوی خارج کروموزومی (H-Circle) است که در پروماستیگوت لیشمانیا تارنتوله مقاوم به متوتروکسات ایجاد شده است (Beverley et al., 1983). لیشمانیا حاوی یک ژن P-GlycoProtein در ناحیه H-Circle هست، که این ناحیه را Itpgpa می‌نامند. آزمایشات ترانسفکت با استفاده از ژن mdr1 در لیشمانیا دونووانی و لیشمانیا اینریتی ثابت کرد که افزایش بیان این ژن مسئول فنوتیپ MDR در انگل‌های مقاوم است (Chow et al., 1993). اغلب مطالعاتی که ذکر شدند مربوط به سویه‌هایی از لیشمانیا هستند که درشرایط آزمایشگاهی به دارو مقاوم شدند و وجود قطعات تکثیری خارج کروموزومی و حضور ژن‌های ABC Transporter و ژن آنزیم‌های دخیل در متابولیسم در سویه‌های بالینی حاصل از بیماران کمتر بررسی شده است. از سوی دیگر مطالعه در مورد ژنتیک مقاومت دارویی در لیشمانیا بر روی سویه‌هایی انجام شده است که با افزایش تدریجی دوز دارو در شرایط آزمایشگاهی مقاومت دارویی به آن‌ها القا شده است. بنابراین نتایج بررسی مقاومت دارویی در این سویه‌ها قابل تعمیم به سویه‌های بالینی نیست. از اینرو هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن‌های مقاومت دارویی (pgpa MRPA) و (mdr1 PGP) در ایزوله‌های بالینی لیشمانیا است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۴۰ داوطلب به طور تصادفی طی یک دوره ۲۴ ماهه مورد مطالعه قرار گرفتند و در مورد هر فرد اطلاعاتی در مورد سن، شغل، محل سکونت، میزان تحصیلات، نوع زخم، مدت ابتلا، تعداد ضایعات، محل ضایعه و سابقه مسافرت به مناطق آندمیک و سابقه مصرف دارو ثبت گردید. سپس از زخم‌هایی که

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.2.4]

مشکوک به سالک بودند نمونه‌گیری انجام گرفت و به سطح لام منتقل گردید و پس از آن با رنگ آمیزی گیمسا آماستیگوت‌های انگل با میکروسکوپ نوری بررسی شد. سپس بخشی از ترشحات به محیط کشت اختصاصی دو فازی NNN (فاز جامد حاوی ۱/۴ گرم آگار باکتریولوژی + ۰/۶گرم سدیم کلراید+ ۹۰ سی سی آب مقطر+ خون خرگوش و فاز مایع حاوی RPMI1640(NNNN (فاز جامد حاوی ۴۰ گرم آگار خون دار (No_2Oxoid) + ۱۰۰۰ سی سی آب دو بار تقطیر شده و خون خرگوش و فاز مایع حاوی ۸ گرم سدیم کلراید + ۰/۲گرم پتاسیم کلراید + ۰/۳ گرم مونو پتاسیم فسفات + ۲/۵گرم دکستروز) به عمق ۲ میلی متر از پایین‌ترین سطح شیب‌دار جهت جداسازی تلقیح گردید و در انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت حداکثر یک ماه نگهداری شد و یک روز در میان انگل‌ها برای بررسی رشد و نداشتن آلودگی مورد بررسی قرار گرفتند. سپس جهت تکثیر انبوه و پاساژ دادن در مرحله ایستا به محیط فاز مایع محیط C.RPMI (حاوی ۱۰-۲۰ درصد سرم جنین گوساله) انتقال داده شدند و هر روز رشد انگل‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت بررسی شدند. سپس جهت حفظ سویه انگل و ممانعت از تضعیف انگل در اثر پاساژهای متعدد در محیط کشت و صرف هزینه و زمان، اشکال پروماستیگوت درحالت انجماد نگهداری شدند. جهت انجماد کردن ابتدا پروماستیگوت‌ها توسط لام نئوبار شمارش گردید، بعد از شمارش داخل هر ویال ۳ تا ۴ میلیون انگل ریخته شد، سپس سانتریوفوژ ۳ بار با دور ۴۰۰۰ یا ۴۵۰۰ انجام شد و محیط رویی دور ریخته شد و C.RPMI اضافه گردید. انگل‌ها به مدت۲ الی ۳ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد و در دمای۷۰- درجه سانتیگراد به مدت یک شبانه روز قرار داده شدند و در نهایت در ازت مایع برای طولانی مدت نگهداری شدند و جهت خارج کردن از فریز ۰/۵ سی سی از انگل لیشمانیا ماژور یا لیشمانیا تروپیکا فریز شده در ۷۰- درجه سانتیگراد یا نیتروژن مایع به مدت ۲ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد، سپس به محیط NNN حدود ۱ سی سی از محیط C.RPMI اضافه شدند و انگل خارج شده از فریزر به آن منتقل شد. با توجه به اینکه اولین و اساسی‌ترین مرحله در مطالعات بیولوژیکی ملکولی و روش‌های وابسته به DNA استخراج و روش‌های ملکولی است، در مرحله اول انگل به رشد و تکثیر انبوه رسانده، در مرحله بعد DNA انگل به روش فنل-کلروفرم (۲۰ میکرولیتر پروتئینازK + ۳۰۰ میکرولیتر فنل + ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم + ۳۰۰میکرولیتر ایزوپروپانل + ۰/۱ حجم آن استات سدیم ۳ مولار در PH=۵/۲) استخراج گردید. پس از استخراج DNA طبق جدول شماره ۱، انگل توسط PCR تعیین هویت گردید. سپس با استفاده از نرم افزار مخصوص طراحی پرایمر مثل primer3 پرایمر ژن mdr1 و pgpa با برنامه دمایی ذکر شده در جدول۱ طراحی گردید.

نتایج

در مطالعه حاضر در مجموع ۴۰ بیمار مبتلا به سالک (لیشمانیوز جلدی) مورد مطالعه قرار گرفتند که از آن‌ها ۴۰ سویه لیشمانیا جدا شدند که در جدول ۲ تعدادی از بیماران ذکر شده است. از این تعداد ۲۰ نمونه برای رشد و تکثیر لیشمانیا و ۲۰ نمونه برای راه‌اندازی اولیه مراحل PCR مورد استفاده قرار گرفتند. از۲۰ نمونه بیماران، ۹ نمونه (۴۵ درصد) اسمیر مثبت، ۹ نمونه (۴۵ درصد) کشت در محیطNNN مثبت بودند و ۱۶ نمونه بیمار (۸۰ درصد) PCR مثبت بودند. سپس برای تعیین هویت انگل پس از انجام PCR محصول بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید و پس از عکس برداری توسط دستگاه Gel Document طبق شکل شماره ۱ لیشمانیا ماژور باند ۶۰۰ bp و لیشمانیا تروپیکا باند ۸۰۰bp را نشان داد. آزمایش PCR تعداد ۶ نمونه (۳۰ درصد) لیشمانیا ماژور و ۱۰ نمونه (۵۰ درصد) لیشمانیا تروپیکا را نشان داد و گونه عامل زخم در ۴ نمونه از بیماران (۲۰ درصد) تعیین هویت نشد. برای بررسی ملکولی فراوانی ژن پمپ‌ها ۲۰ نمونه مورد آزمایش قرار گرفتند، پس از طی مراحل متعدد setup دمای اتصال۴۹/۷ درجه سانتیگراد برای پمپ MRPA و دمای اتصال ۵۳/۵ درجه سانتیگراد برای پمپ MDR و غلظت‌های معینی از مواد واکنش به دست آمد. پس از انجام PCR محصول بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و پس از عکس برداری توسط دستگاه Gel Document طبق شکل شماره ۱باند ۲۰۰bp مربوط به ژن mdr1 و باند ۳۶۰ bp مرتبط با ژن pgpa است. در ادامه از ۲۰ سویه لیشمانیا، ۱۹ نمونه (۹۵ درصد) پمپ PGPو ۱۰ نمونه (۵۰ درصد) پمپ MRPA و تعداد ۱۰ نمونه (۵۰ درصد) هر دو پمپ را دارا بودند. در مجموع از میان سویه‌های MRPA مثبت ۱۰ نمونه را لیشمانیا تروپیکا و ۵ نمونه را لیشمانیا ماژور تشکیل می‌داد و از میان سویه‌های MDR مثبت ۱۰ نمونه را لیشمانیا تروپیکا و ۵ نمونه را لیشمانیا ماژور تشکیل می‌داد. جهت تعیین فراوانی ژن پمپ‌های افلاکس PGP و MRPA روی سویه‌های لیشمانیا بررسی ملکولی انجام گرفت، همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است ۹۵ درصد فراوانی ژن mdr1 در پمپ PGP و ۵۰ درصد فراوانی ژن pgpaدر پمپ MRPA را نشان داد و۵۰ درصد از نمونه‌ها هر دو پمپ را دارا بودند. پس از انجام PCR نمونه بیماران، توالی تکثیرشده محصول PCR برای پمپ MRPA کد سویه ۷ و برای پمپ MDR کد سویه ۱۲ در pub med ثبت گردید و در جدول۴ ذکر شده است.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.2.4]

جدول۱- توالی پرایمر و برنامه زمانی PCRبرای ۳ ژن pgpa, mdr1, ITS.

Table 1. Primer sequencing and time program PCR for ITS, mdr1, pgpa.

Gene	Primer	Primer sequence(5' → 3')	Cycles	Times	Temperature (ċ)	Number of cycle
ITS	F	TCGCAGAACGCCCCTACC	Initial denaturation	5s	95	1
			Denaturation	30s	94	25
			Annealing	45s	60	
	R	GGATAAAATGTGGTTGGGGA	Extension	60s	72	
			Final Extension	5min	72	1
mdr1	F	ACTACGAGTTGCAGCGGTTT	Initial denaturation	5min	95	1
			Denaturation	45s	94	30
			Annealing	45s	52/2-53/5-54/6	
	R	CGGCCAGAAAGGTAGAAATG	Extension	45s	72	
			Final Extension	1min	72	1
pgpa	F	TCGCAGAACGCCCCTACC	Initial denaturation	5min	95	1
			Denaturation	45s	94	35
			Annealing	45s	50/4-49/7-49	
	R	GGATAAAATGTGGTTGGGGA	Extension	45s	72	
			Final Extension	5min	72	1

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.2.4]

جدول ۲- اطلاعات بیماران.

Table 2. Information of patients.

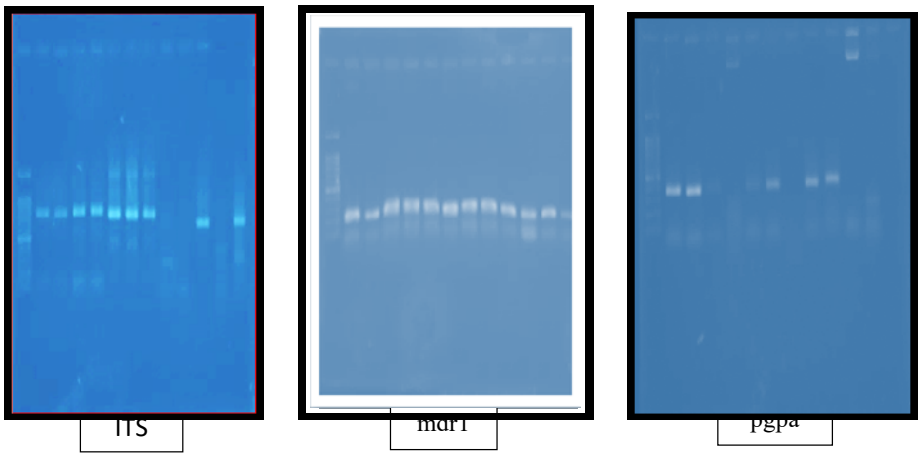
Number	City of infection	Smear	Age	Number of Damages	Cultivation	Site of Lesion	Time of infection	Sicks
1	Mashhad	-	21	1	+	Left ankeles	3to4 months with lesion	M.S.A.SH
2	Harat	+	56	4	+	Hand,Elbows	2 months with lesion	S.Y.N.A
3	Mashhad, Torbat jam	-	29	1	+	Lips,Arounds of lips	4 months before the visit	A.S.M.L.H
4	Esfehan,Qom	+	10	2	+	Foreheads,Lips	20 days before the visit	M.S.D.R
5	Zavare	+	22	1	+	Elbow	5 months with lesion	A.A.H.S
6	ELAM	+	70	2	+	Arm	10 days before the visit	SH.H.K.D
7	Esfehan	+	30	7	+	2feet	6 months with lesion	K.A.R.A
8	Torbat jam	+	49	4	+	Right ankeles	3 months with lesion	F.A.GH.R
9	Harat	+	20	4	+	Right hands	1 month before the visit	GH.Y.T.A
10	Shiraz	+	23	1	+	Arm	6 months with lesion	M.Y.A.GH
11	Mashhad	-	2	1	+	Left foot	5 to 6 month before the visit	A.A.GH.A
12	Mashhad	+	57	1	+	Left hand elbow	20 days before the visit	A.B.SH.A
13	Mashhad	+	44	2	+	Arm	2 months with lesion	M.A.A.A
14	Esfehan	+	35	2	+	Right hand,Forear	4 month before the visit	A.F.H.N
15	Ahvaz	-	53	1	+	Forehead	6 months with lesion	B.A.R.S
16	Dezfol	+	60	2	+	On the feet	1 month before the visit	A.H.B.H
17	Elam	+	30	2	+	Left hand, Right foot	20 days before the visit	A.M.H.Y
18	Dehlaran	+	29	1	+	On the hand	4 month before the visit	M.H.N.Y

بحث

با توجه به اینکه مقاومت دارویی یک مشکل مهم در بیماری‌های انگلی و درمان بیماری است و مقاومت انگل‌ها امروزه مکررا در چندین ناحیه بومی گزارش شده است، مطالعات روی مقاومت دارویی می تواند به یافتن راهکارهایی در جهت افزایش بازدهی داروهای در دسترس کمک کند. جداسازی ژن‌های دخیل در مقاومت دارویی می‌تواند این امکان را فراهم کند تا مقاومت به سرعت تشخیص داده شود و از سوی دیگر استفاده از داروهایی که بی فایده‌اند را کاهش یا محدود کند (Polat, 2014; Ouellete, 1990; Haimeur et al., 2011). مطالعات آزمایشگاهی نشان داد که انگل لیشمانیا ممکن است مقاومت را در زمان حضور آنتیموان ۵ ظرفیتی گسترش دهند (Sundar et al., 2000). انگل درجات مختلفی از مقاومت به داروهای آنتیموان در شکل پروماستیگوت و آماستیگوت در کشت‌های آزمایشگاهی نشان داده است (Vincent & Barrett, 2015)؛ از جمله می‌توان نقش پمپ‌ها در آماستیگوت‌های لیشمانیا دونووانی و لیشمانیا گایانسیس که در شرایط آزمایشگاهی به ترکیبات آنتیموان مقاوم شده اند اشاره نمود (Ferreira-Pinto et al., 1996). با وجود مطالعات فراوانی که بر روی ساختار و عملکرد ژن‌های ایجاد کننده مقاومت نظیر pgpMRPA وmdr1PGP در سویه‌های لیشمانیا ایجاد شده است، ولی مکانیسم مقاومت در سویه‌های بالینی که از بیماران جدا شده است هنوز ناشناخته است (Vincent & Barrett, 2015)؛

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.2.4]



شکل۱- محصول PCR ژن mdr1 و ITS, pgpa

Figure 1. PCR Product of three genes mdr1, pgpa, ITS.

در سال ۱۹۷۶ محصول ژن mdr1 یعنی پمپ P-GlycoProtein در سلول‌های هامستر چینی کشف شد (Juliano & Ling, 1976)؛ و همچنین در سال ۱۹۹۵ژن mdr1 در لیشمانیا اینریتی (lemdr1) و لیشمانیا مکزیکانا (lmmdr1) کشف شد. اوایل دهه ۱۹۹۰ در طی مطالعه‌ای همولوگ pgp پستانداران تحت عنوان mdr1-like در لیشمانیا دونووانی مقاوم به وینبلاستین در آزمایشگاه کشف شد (Haffmeyer et al., 2000). سپس ژن‌های شبیه در مقاومت به وینبلاستین در لیشمانیا اینریتی (lemdr1) و در لیشمانیا آموزنسیس (lamdr1) و نهایتاً مقاومت دائنومایسین در لیشمانیا تروپیکا (ltmdr1) توصیف شد (Chao et al., 1990)؛ در سال ۱۹۹۶ در طی مطالعه‌ای روی سویه لیشمانیا گایاننسیس مقاوم به گلوکانتیم تکثیر ژن pgpaمشاهده شد (Sundar & Chakravarty, 2014)؛ در سال ۱۹۹۰ در طی مطالعه‌ای اولین ژن انتقال دهنده ABCموجود در لیشمانیا به نام pgpa را شناسایی کردند (pgpa(ouellete et al., 1990 . به عنوان بخشی از DNA خارج کروموزومی تکثیر یافته تحت عنوان H-Circle در سویه‌های آزمایشگاهی مقاوم به دارو لیشمانیا تارنتوله و لیشمانیا ماژور است (Ouellete et al., 1990; Callahan & Beverley, 1991). از نظر ملکولی مقاومت دارویی در لیشمانیا عمدتا به دلیل موتاسیون‌های ژنی و یا به دلیل تکثیر بخش‌های خاصی از ژنوم است که در این راستا مطالعه‌ای بر روی ایزوله‌های بالینی در مناطق آندمیک ایران از جمله یزد، مشهد و کاشان روی ۹۰ ایزوله بالینی لیشمانیا تروپیکا و ماژور از بیماران سالک مقاوم و پاسخ‌گو به درمان انجام گرفت و موتاسیون‌های احتمالی در DNA با روش CSGE , RLFP و Sequencing شناسایی شد، که ۱۰ سویه اختلالات موثر در مقاومت دارویی را نشان دادند (Alizadeh et al., 2011). مقاومت دارویی مکانیسم‌های متعددی می‌تواند داشته باشد، از جمله می توان به افزایش بیان ژن‌ها یا موتاسیون نقطه‌ای در ساختار ژن یا پمپ دارو به بیرون و کاهش غلظت دارو در داخل سلول و یا افزایش فعالیت انتقال‌دهنده‌های ABCاشاره کرد که این انتقال‌دهنده‌ها وابسته به ATP بوده و طیف وسیعی از داروهای شیمیایی را از هدف دارو که سلول باشد دور می‌کنند و ملکول‌های مختلف و داروهای شیمیایی را در عرض غشاهای بیولوژیکی به سمت خارج غشا انتقال می‌دهند. پمپ افلاکس MRPA وMDR جزئی از انتقال دهنده‌های ABC هستند که پمپ MRPA درغشا سلول و پمپ MDR در غشا ویزیکول‌هایی در سیتوپلاسم انگل مستقر هستند (Clifton et al., 2014). مطالعه حاضر به بررسی فراوانی این دو ژن در سویه های بالینی پرداخته است. فراوانی ژن‌ها در این قسمت بیانگر نقش احتمالی پمپ‌ها در ایجاد مقاومت دارویی است. در این بررسی درصد فراوانی پمپ MDR نشان دهنده فراوانی حضور این پمپ و درصد فراوانی پمپ MRPA نشانه فراوانی کمتر نسبت به پمپ MDR در نمونه‌های بالینی است ولی این نتایج را نمی‌توان تعمیم به مکانیسم مقاومت و ایجاد مقاومت دارویی در سویه های بالینی جدا شده از بیماران داد. چون در این بررسی نیز باید میزان بیان پمپ‌ها از طریق Real time PCR هم سنجیده شود و غیر از آن ممکن است در شرایط آزمایشگاهی و در حین انجام کار خطایی در مراحل کار چون استخراج یا PCR ایجاد شده باشد که باعث جواب کاذب شده است. همچنین در یک مطالعه ژن P-glycoprotein در ایجاد مقاومت دارویی در لیشمانیازیس جلدی در تعدادی از مناطق آندمیک ایران انجام شده، ولی در این مطالعه سویه‌های لیشمانیا مجزا نشده است (Alizadeh et al., 2011).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.2.4]

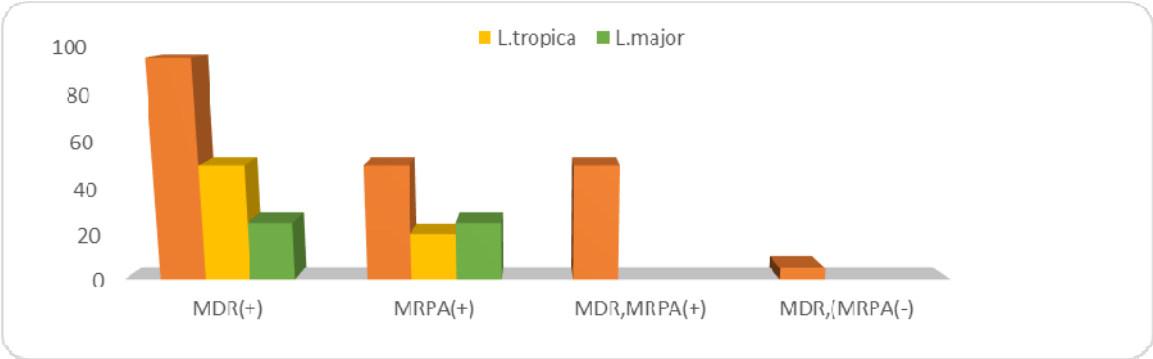
جدول ۳- اطلاعات مربوط به چاهک های محصول الکتروفورز.

Table 3. Information of electrophoresis product sums.

Gene	Number	Result	Number of base pair
ITS	The first sump	Ladder	100 bp
	The second sump	Positive control(L.tropica)	800 bp
	The third sump	*L. tropica*	800 bp
	The fourth sump	*L. tropica*	800 bp
	The fifth sump	*L. tropica*	800 bp
	The sixth sump	*L. tropica*	800 bp
	The seventh sump	*L. tropica*	800 bp
	The eighth sump	*L. tropica*	800 bp
	The ninth sump	Negative control	No band
	The tenth sump	Distance with the next sample	-
	The eleventh sump	Positive control(L.major)	600 bp
	The twelfth sump	Diluted sample	No band
	The thirteenth sump	*L. major*	600 bp
Gene	**Number**	**Result**	**Number of base pair**
mdr1	The first sump	Ladder	100 bp
	The second sump	PCR product No.12	200 bp
	The third sump	PCR product No.15	200 bp
	The fourth sump	PCR product No.2	200 bp
	The fifth sump	PCR product No.5	200 bp
	The sixth sump	PCR product No.6	200 bp
	The seventh sump	PCR product No.7	200 bp
	The eighth sump	PCR product No.9	200 bp
	The ninth sump	PCR product No.10	200 bp
	The tenth sump	PCR product No.1	200 bp
	The eleventh sump	PCR product No.23	200 bp
	The twelfth sump	PCR product No.22	200 bp
Gene	**Number**	**Result**	**Number of base pair**
pgpa	The first sump	Ladder	100 bp
	The second sump	Positive control	360 bp
	The third sump	PCR product No.7	360 bp
	The fourth sump	PCR product No.12	360 bp
	The fifth sump	PCR product No.5	360 bp
	The sixth sump	PCR product No.2	360 bp
	The seventh sump	PCR product No.10	360 bp
	The eighth sump	PCR product No.14	360 bp
	The ninth sump	PCR product No.16	360 bp
	The tenth sump	PCR product No.6	360 bp
	The eleventh sump	PCR product No.1	360 bp
	The twelfth sump	PCR product No.15	360 bp

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.2.4]



شکل۲- نتایج پمپ MDR وMRPA در نمونه های بالینی لیشمانیا به تفکیک گونه.

Figure 2. Results of MDR and MRPA pumps in clinical samples of Leishmania by species.

جدول ۴- توالی تکثیر شده محصول PCR برای دو پمپ MDR و MRPA.

Table 4. Amplified sequence product PCR for two pumps MDR and MRPA.

	L. tropica	***L. major***
MDR	1 actacgagtt gcagcggttt gctccaaatg aagtttctgt cagagaccgt ggtatccgca 61 aagagtttgc gggcagcctt tctgcggcgg tgatcatggc cctcgtgtat ctcagctaca 121 ctatcgcctt tttcttcggc tcctacctag tcgaatgggg tcgccgtgac atggcggata 181 tcatttctac ctttctggcc gatgctgatg gg	1 gaggactacg agttgcagcg cccggggttg gcctttgttg ggcagatgac ggtggtatcc 61 gcaaagagtt tgcgggcagc ctttctgcgg cggtgatcat ggccctcgtg tatctcagct 121 acactatcgc ctttttcttc ggctcctacc tagtcgaatg gggtcgccgt gacatggcgg 181 atatcatttc tacctttctg gccga
MRPA	1 ctcacgcgcg ccttctgccc gccgctcagg ttcacgccgt tctccccgat ctccgtctcc 61 agcccccgc taagctgcgc aacatccgcc tctagctggc agcaacggat tacgtcctgc 121 aagtctgcgg cgcgctcctc gtcgaagaac aggatgttgc tgcgcaccgt cgcgttcatg 181 atccacgcct gctgcggcac gtacgcgatg ctccgctccg cccacacctc gccgctctgc 241 acatcgtact cgcccatcat cgaacccagc attgtccact tcccgctccc ggtcccacca 301 ctccccattg tc	

مطالعات دیگری هم که در زمینه مقاومت دارویی کار شده است، سویه‌های مقاوم آزمایشگاهی بوده‌اند که در شرایط آزمایشگاه و به طور مصنوعی با افزایش تدریجی دوز دارو مقاوم به دارو شده‌اند سپس عملکرد پمپ‌های افلاکس آنها مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله می‌توان به مطالعه نقش پمپ‌ها در آماستیگوت‌های جدا شده از لیشمانیا دونووانی (Decuypere et al., 2005). و لیشمانیا گایاننسیس (Ferreira-Pinto et al., 1996)؛ که در شرایط آزمایشگاهی به ترکیبات آنتیموان مقاوم شده‌اند، اشاره کرد. طبق مواردی که در بالا ذکر شد بیشتر مطالعات بر روی ساختار و عملکرد این ژن‌ها در سویه‌های لیشمانیا و سویه‌هایی از لیشمانیا که در شرایط آزمایشگاهی به دارو مقاوم شدند اشاره کرده است و در مورد مکانیسم مقاومت سویه‌های بالینی جدا شده از بیماران اشاره‌ای نشده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه افزایش بیان انتقال‌دهنده‌های ABC در مقاومت دارویی نقش دارند و از طریق عواملی چون کانژوگاسیون دارو، محدود سازی یا افزایش برون دهی داروی کونژوگه مقاومت را سبب می‌شوند. از اینرو هدف از این مطالعه بررسی مقاومت دارویی pgpMRPA و mdr1PGP در ایزوله‌های بالینی لیشمانیا بود. مطالعات مقاومت دارویی در لیشمانیا در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است، که با موفقیت ایزوله‌های بالینی

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.2.4]

لیشمانیاهای عامل سالک شناسایی شد. البته این نتایج به دلایلی چون خطای کار آزمایشگاهی یا عدم بررسی میزان بیان پمپها و غیره قابل تعمیم به مکانیسم مقاومت دارویی در سویه‌های بالینی نیستند و تاکید بر نقش این ژن‌ها در مقاومت دارویی در ایزوله‌های بالینی نیازمند بررسی‌های بیشتر عملکرد آنهاست. علاوه بر بررسی این دو ژن ABC transporter در ایجاد مقاومت دارویی میتوان ژن‌های دیگر دخیل در افلاکس دارو را بررسی نمود و میزان بیان این دو ژن را نیز توسط Real time PCR مطالعه کرد.

سپاسگزاری

این تحقیق تحت پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی میکروبی در زمینه درمان سالک بر اساس بخشی از یک طرح با کد اخلاق IR.TUMS.VCR.REC.1398.672 در مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و جذام و دانشگاه علوم پزشکی است. بدین وسیله از مساعدت آقای دکتر علی خامسی پور در جهت انجام این پژوهش و مرحله نمونه گرفتن و راهنمایی در جهت انجام پایان‌نامه قدردانی می‌شود، همچنین از مرکز تحقیقات سلولی- ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قم بابت انجام کارهای آزمایشگاهی و از لحـاظ تأمین اعتبار طرح صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

REFERENCES

Ardehali, S., Rezaei, H. & Nadim, A. 1995. *Leishmania* and *Leishmaniasis* Parasites. Tehran University Publishing Center 18-24. (In Persian).

Alizadeh, R., Hooshyar, H., Bandehpor, M., Arbadi, M., Kazemi, F., Talari, A. & Kazemi, B. 2011. Detection of drug resistance gene in *cutaneous leishmaniasis* by PCR in some endemic areas of iran. Iran Red Crescent Medical Journal 13: 863-867.

Beverley, S.M., Coderre, J.A., Schimke, R.T. & Santi, D.V. 1983. Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 80: 2132-2136.

Croft, S.L., Seifert, K. & Yardley, V. 2006. Current scenario of drug development for *leishmaniasis*. Indian Journal of Medical Research 123: 399-410.

Callahan, H.L., Beverley, S.M. 1991. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. Journal of Biological Chemistry 266: 18427-18430.

Chow, L.M., Wong, A.K., Ullman, B. & Wirth, D.F. 1993. Cloning and functional analysis of an extrachromosomally amplified multidrug resistance-like gene in *Leishmania enriettii*. Molecular Biochemical Parasitology 60: 195-208.

Chao, C.C., Ma, C.M., Cheng, P.W. & Lin-Chao, S. 1990. Increased mdr gene expression and decreased drug accumulation in a human colonic cancer cell line resistant to hydrophobic drug. Biochemical and Biophysical Research Communications 172: 842-849.

Clifton, M.C., Simon, M.J., Erramilli, S.K., Zhang, H., Zaitseva, J., Hermodson, M.A. & Stauffacher, C.V. 2015. In vitro reassembly of the ribose ATP-binding cassette transporter reveals a distinct set of transport complexes. Journal of Biological Chemistry 290: 5555-5565.

Decuypere, S., Yardley, V., De Doncker, S., Laurent T. & Khanal, B. 2005. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb (v) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49: 4616-4621.

Ellenberger, T.E. & Beverley, S.M. 1989. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. Journal of Biological Chemistry 264: 15094-15103.

Ellenberger, T.E., Beverley, S.M. 1989. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. Journal of Biological Chemistry 264: 15094-15103.

Ferreira-Pinto, K.C., Miranda-Vilela, A.L., Anacleto, C., Fernandes, A.P., Abdo, MC., Petrillo-Peixoto, M.L. & Moreira, E.S. 1996. *Leishmania guyanensis*: isolation and characterization of glucantim resistance cell lines. Canadian Journal of Microbiology 42: 944-949.

Gokirmak, T., Campanale, J.P., Shipp, L.E., Moy, G.W., Tao, H. & Hamdoun, A. 2012. Localization and substrate selectivity of sea urchin multidrug (MDR) efflux transporters. Journal of Biological Chemistry 287: 43876-43883.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.2.4]

Hadighi, R., Mohebali, M., Boucher, P., Hajjaran, H., Khamesipour, A. & Ouellette, M. 2006. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian *Cutaneous leishmaniasis* due to drug resistant *Leishmania tropica* parasites. PLOS Medicine 3: 162-168.

Haimeur, A., Guimond, C., Pilote, S., Mukhopadhyay, R., Rosen, B.P., Poulin, R. & Ouellette, M. 2011. Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from over expression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*. Molecular Microbiology 34: 726-735.

Henderson, D.M., Sifri, C.D., Rodgers, M., Wirth, D.F., Hendrickson, N. & Ullman, B. 1992. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian mdr1 gene. Molecular and Cellular Biology 12: 2855-2865.

Higgins, C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. Annual Review of Cell Biology 8: 67-113.

Hoffmeyer, S., Arnold, H.P., Brockmoller, J. & Johne, A. 2000. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences 97: 3473-3478.

Juliano, R. L., Ling, V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes 455: 152-162.

Katakura, K., Iwanami, M., Ohtomo, H., Fujise, H. & Hashiguchi, Y. 1999. Structural and functional analysis of the LaMDR1 multidrug resistance gene in *Leishmania amazonensis*. Biochemical and Biophysical Research Communications 255: 289-294.

Legare, D., Richard, D., Mukhopadhyay, R., Stierhof, Y.D., Rosen, B.P. & Haimeur, A. 2001. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. Journal of Biological Chemistry 276: 26301-26307.

Mohebali, M., Yaghoobi, P., Hooshmand, B. & Khamesipour, A. 2004. Efficacy of Paromomycin ointment prepared in Iran (Paromo-U) against *cutaneous Leishmaniasis* caused by *Leishmania major* in mouse model. Iranian Journal of Dermatology 88-94. (In Persian).

Ouellete, M., Fase-Fower, F., Borst, P. 1990. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel p-glycoprotein gene. European Molecular Biology Organization Journal 9: 1027-1033.

Piscopo, T.V. & Mallia, A.C. 2006. *Leishmaniasis*. Postgraduate Medical Journal 82: 649-657.

Polat, E. & Kutlubay, Z. 2014. Four *cutaneous leishmaniosis* case resistant to meglumineantimoniate treatment. Turkish Parasitol Derg 38: 177-180.

Sundar, S., More, D.K., Singh, M.K., Singh, V.P., Sharma, S., Makharia, A., Kumar, P.C. & Murray, H.W. 2000. Failure of pentavalent antimony in *Visceral leishmaniasis* in India: report from the center of the Indian epidemic. Clinical Infectious Diseases 31: 1104-1107.

Sundar, S., Chakravarty, J. 2014. An update on pharmacotherapy for *leishmaniasis*. Expert Opinion on Pharmacotherapy 16: 237-252.

Vincent, I.M. & Barrett, M.P. 2015. Metabolomic-Based Strategies for Anti-Parasite Drug Discovery. Journal of Biomolecular Screening 20: 44-55.

*****

How to cite this article:

Parishan, M. & Nateghi, M. 2023. Frequency of PGP and MRPA efflux pump genes in drug resistance in clinical isolates of *Leishmania tropica* and *L. major*. Nova Biologica Reperta 9: 257-266. (In Persian)

پریشان، م. و ناطقی، م. ۱۴۰۱. فراوانی ژن پمپ های PGP و MRPA در ایجاد مقاومت دارویی در ایزوله های بالینی افلاکس لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۹: ۲۶۶-۲۵۷.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.2.4]