

## فراوانی ژن پمپ‌های افلاکس PGP و MRPA در ایجاد مقاومت دارویی در ایزوله‌های بالینی لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور

مائده پریشان<sup>۱</sup> و محمود ناطقی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه پیام نور تهران شرق، تهران، ایران؛ <sup>۲</sup>آدانشکده 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) و pgpa (MRPA) و mdr1 (PGP) 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 آماستیگوت‌ها با میکروسکوپ نوری بررسی گردیدند، سپس به محیط کشت دو فازی اختصاصی NNN 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 در سطح غشای پلاسمایی اشاره کرد، که مواد و دارو را از لایه‌های داخلی غشای دو لایه لیپیدی به لایه‌های خارجی انتقال می‌دهد و غلظت دارو را در داخل سلول کم می‌کند و باعث مقاومت دارویی می‌شود در حالی که 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<sup>1</sup> & Mahmoud Nateghi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Microbial Biotechnology, Payame Noor University of East Tehran, Tehran, Iran; <sup>2</sup>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

## مقدمه

در سیتوپلاسم مستقر هستند و شبیه ترانسپورتهای MRP عمل می کنند ولی از نظر عملکردی متفاوت هستند (Callahan & Beverley, 1991). ژن pgpa مقاومت به آنتی‌بیوتیک را به وسیله محدود کردن thiol-metal conjugates در ویزیکول داخل سلولی ایجاد میکند و باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک 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 پروتئین‌های دیگر غشا باعث کاهش ورود آنتی‌بیوتیک و افزایش خروج آن می‌شود و به این ترتیب نقش اصلی را در مقاومت به داروی آنتی‌بیوتیک بازی می‌کند (Webster & Russel, 1993). دومین گروه ABC Transporter لیشمانیا محصول ژن mdrl 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 mdrl در لیشمانیا دونوانی 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 در شرایط 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 (MRPA pgpa) و (PGP mdrl) 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

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 قرار می‌گیرد (Ardehali et al., 1995). لیشمانیوز پوستی بیماری انگلی شایع در جهان، از جمله 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، در حال حاضر موثرترین ابزار موجود برای کنترل لیشمانیوز درمان دارویی است (Mohebbi et al., 2004). در میان روش‌های مختلف درمان دو شکل از ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی‌بیوتیک (sbv) یعنی سدیم استیوگلوکونات (pentostam) و گلوکانتیم (meaglamine) (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 آنتی‌بیوتیک 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 آنتی‌بیوتیک‌ها در میکروارگانیسم‌های مختلف می‌شوند (Higgins, 1992; Gokirmak et al., 2012). طی مطالعه‌ای نقش ABC Transporter ها را در سویه‌های لیشمانیا دونوانی 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 گروه ABC Transporter مربوط به لیشمانیا محصول ژن pgpa به نام MRPA است که در غشا ویزیکول‌هایی

افزار مخصوص طراحی پرایمر مثل primer3 پرایمر ژن *mdr1* و *pgpa* با برنامه دمایی ذکر شده در جدول ۱ 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. از ۲۰ نمونه بیماران، ۹ نمونه (۴۵ درصد) اسمیر مثبت، ۹ نمونه (۴۵ درصد) کشت در محیط NNN 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 ۸۰۰ bp 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 اتصال ۴۹/۷ 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 ۱ باند ۲۰۰ bp مربوط به ژن *mdr1* و باند ۳۶۰ bp مرتبط با ژن *pgpa* است. در ادامه از ۲۰ سویه لیشمانیا، ۱۹ نمونه (۹۵ درصد) پمپ PGP و 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 *pgpa* در پمپ MRPA را نشان داد و ۵۰ 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 جدول ۴ ذکر شده است.

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 + ۰/۶ گرم سدیم کلراید + ۹۰ سی سی آب مقطر + خون خرگوش و فاز مایع حاوی RPMI1640 (NNNN) (فاز جامد حاوی ۴۰ گرم آگار خون دار (No<sub>2</sub>Oxoid) + ۱۰۰۰ سی سی آب دو بار تقطیر شده و خون خرگوش و فاز مایع حاوی ۸ گرم سدیم کلراید + ۰/۲ گرم پتاسیم کلراید + ۰/۳ گرم مونو پتاسیم فسفات + ۲/۵ گرم 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 سانتریفوژ ۳ بار با دور ۴۰۰۰ یا ۴۵۰۰ انجام شد و محیط رویی دور ریخته شد و C.RPMI اضافه گردید. انگل‌ها به مدت ۲ الی ۳ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد و در دمای ۷۰- 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 پروتئیناز K + ۳۰۰ میکرولیتر فنل + ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم + ۳۰۰ میکرولیتر 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

جدول ۱- توالی پرایمر و برنامه زمانی PCR برای ژن ITS, mdr1, pgpa.

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

| Gene | Primer | Primer sequence(5' → 3') | Cycles               | Times | Temperature (°C) | Number of cycle |
|------|--------|--------------------------|----------------------|-------|------------------|-----------------|
| ITS  | F      | TCGCAGAACGCCCTACC        | Initial denaturation | 5s    | 95               | 1               |
|      |        |                          | Denaturation         | 30s   | 94               | 25              |
|      |        |                          | Annealing            | 45s   | 60               |                 |
|      | R      | GGATAAAATGTGGTTGGGGA     | Extension            | 60s   | 72               | 1               |
|      |        |                          | Final Extension      | 5min  | 72               |                 |
| 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               | 1               |
|      |        |                          | Final Extension      | 1min  | 72               |                 |
| pgpa | F      | TCGCAGAACGCCCTACC        | Initial denaturation | 5min  | 95               | 1               |
|      |        |                          | Denaturation         | 45s   | 94               | 35              |
|      |        |                          | Annealing            | 45s   | 50/4-49/7-49     |                 |
|      | R      | GGATAAAATGTGGTTGGGGA     | Extension            | 45s   | 72               | 1               |
|      |        |                          | Final Extension      | 5min  | 72               |                 |

## جدول ۲- اطلاعات بیماران.

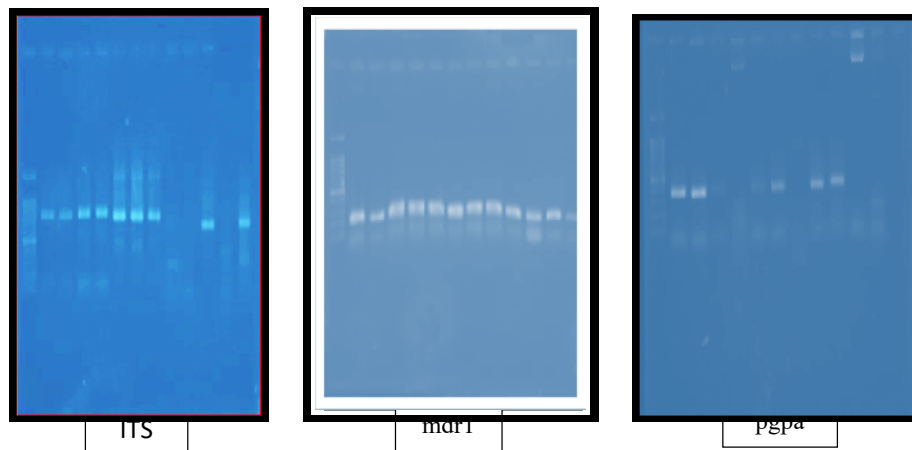
Table 2. Information of patients.

| 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

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 دونوانی 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 *mdr1PGP* و *pgpMRPA* در سویه‌های لیشمانیا ایجاد شده است، ولی مکانیسم مقاومت در سویه‌های بالینی که از بیماران جدا شده است هنوز ناشناخته است (Vincent & Barrett, 2015)؛

با توجه به اینکه مقاومت دارویی یک مشکل مهم در بیماری‌های انگلی و درمان بیماری است و مقاومت انگل‌ها امروزه مکرراً در چندین ناحیه بومی گزارش شده است، مطالعات روی مقاومت دارویی می‌تواند 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 داروهای که بی‌فایده‌اند 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



شکل ۱- محصول PCR ژن ITS, pgpa و mdrl  
 Figure 1. PCR Product of three genes mdrl, pgpa, ITS.

2011). مقاومت دارویی مکانیسم‌های متعددی می‌تواند داشته باشد، از جمله می‌توان 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 ABC اشاره 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 و MDR جزئی از انتقال‌دهنده‌های ABC هستند که پمپ MRPA در غشا سلول و پمپ MDR در غشا و بیژیکول‌هایی در سیتوپلاسم انگل مستقر هستند (Clifton et al., 2014). مطالعه حاضر به بررسی فراوانی این دو ژن در سویه‌های 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 سویه‌های 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).

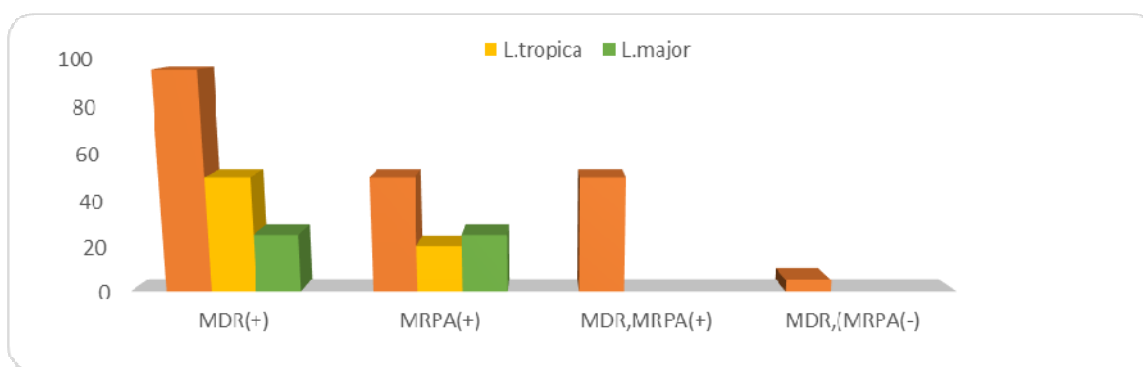
در سال ۱۹۷۶ محصول ژن mdrl یعنی پمپ P-GlycoProtein در سلول‌های هامستر چینی کشف شد (Juliano & Ling, 1976)؛ و همچنین در سال ۱۹۹۵ ژن mdrl در لیشمانیا اینریتی (lmdrl) و لیشمانیا مکزیکانا (Immdrl) کشف شد. اوایل دهه ۱۹۹۰ در طی مطالعه‌های همولوگ pgp پستانداران تحت عنوان mdrl-like در لیشمانیا دونووانی مقاوم به وینبلاستین در آزمایشگاه کشف شد (Haffmeyer et al., 2000). سپس ژن‌های شبیه در مقاومت به وینبلاستین در لیشمانیا اینریتی (lmdrl) و در لیشمانیا آمونسیس (lamdr1) و نهایتاً مقاومت دائنومایسین در لیشمانیا تروپیکا (ltmdr1) توصیف شد (Chao et al., 1990)؛ در سال ۱۹۹۶ در طی مطالعه‌ای روی سویه لیشمانیا گایانسیس مقاوم به گلوکانتیم تکثیر ژن pgpa مشاهده شد (Sundar & Chakravarty, 2014)؛ در سال ۱۹۹۰ در طی مطالعه‌ای اولین ژن انتقال‌دهنده ABC موجود در لیشمانیا به نام pgpa را شناسایی کردند (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 عمدتاً 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, RFLP و Sequencing شناسایی شد، که ۱۰ سویه اختلالات موثر در مقاومت دارویی را نشان دادند (Alizadeh et al., 2011).



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( <i>L.tropica</i> ) | 800 bp              |
|      | The third sump      | <i>L. tropica</i>                    | 800 bp              |
|      | The fourth sump     | <i>L. tropica</i>                    | 800 bp              |
|      | The fifth sump      | <i>L. tropica</i>                    | 800 bp              |
|      | The sixth sump      | <i>L. tropica</i>                    | 800 bp              |
|      | The seventh sump    | <i>L. tropica</i>                    | 800 bp              |
|      | The eighth sump     | <i>L. tropica</i>                    | 800 bp              |
|      | The ninth sump      | Negative control                     | No band             |
|      | The tenth sump      | Distance with the next sample        | -                   |
|      | The eleventh sump   | Positive control( <i>L.major</i> )   | 600 bp              |
|      | The twelfth sump    | Diluted sample                       | No band             |
|      | The thirteenth sump | <i>L. major</i>                      | 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              |



شکل ۲- نتایج پمپ MDR و MRPA در نمونه های بالینی لیشرمانیا 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.

|             | <i>L. tropica</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <i>L. major</i>                                                                                                                                                                                                                                                |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>MDR</b>  | 1 actacagatt gcagcgggtt gctccaaatg aagtttctgt<br>cagagaccgt ggtatccgca<br>61 aagagtttgc gggcagcctt tctgcgggcg<br>tgatcatggc cctcgtgtat ctcagctaca<br>121 ctatcgctt tttctcggc tctacctag<br>tcgaatgggg tcgccgtgac atggcggata<br>181 tcatttctac ctttctggcc gatgctgatg gg                                                                                                                           | 1 gaggactacg agttgcagcg cccgggggtg gcctttgttg<br>ggcagatgac ggtggtatcc<br>61 gcaaagagtt tgcgggcagc ctttctcggc cggtgatcat<br>ggccctcgtg tatctcagct<br>121 acactatcgc cttttcttc ggctcctacc tagtcaaat<br>gggtcgccgt gacatggcgg<br>181 atatcatttc tacctttctg gccga |
| <b>MRPA</b> | 1 ctacgcgcg ccttctgccc gccgctcagg ttacgcctg<br>tctcccgat ctccgtctcc<br>61 agccccccgc taagtgcgc aacatccgcc<br>tctagctggc agcaacggat tacgtcctgc<br>121 aagtctgcgg cgcgctcctc gtcgaagaac<br>aggatgttgc tgcgcacctg cgcgttcag<br>181 atccagcct gctgcccac gtacgcgatg<br>ctccgctcgc cccacacctc gccgctctgc<br>241 acatgtact cgccatcat cgaaccgagc<br>attgtccact tcccgtccc ggtcccacca<br>301 ctcccattg tc |                                                                                                                                                                                                                                                                |

دارو مقاوم شدند اشاره کرده است و در مورد مکانیسم مقاومت سویه های بالینی جدا شده از بیماران اشاره ای نشده است.

### نتیجه گیری

با توجه به اینکه افزایش بیان انتقال دهنده های ABC در مقاومت دارویی نقش دارند و از طریق عواملی چون کانژوگاسیون دارو، محدود سازی یا افزایش برون دهی داروی کونژوگه مقاومت را سبب می شوند. از اینرو هدف از این مطالعه بررسی مقاومت دارویی *mdr1PGP* و *pgpMRPA* در ایزوله های بالینی لیشرمانیا بود. مطالعات مقاومت دارویی در لیشرمانیا در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است، که با موفقیت ایزوله های بالینی

مطالعات دیگری هم که در زمینه مقاومت دارویی کار شده است، سویه های مقاوم آزمایشگاهی بوده اند که در شرایط آزمایشگاه و به طور مصنوعی با افزایش تدریجی دوز دارو مقاوم به دارو شده اند سپس عملکرد پمپ های افلاکس آنها مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله می توان به مطالعه نقش پمپها در آماستیگوت های جدا شده از لیشرمانیا دونووانی (Decuypere et al., 2005). و لیشرمانیا گایانسیس (Ferreira-Pinto et al., 1996)؛ که در شرایط آزمایشگاهی به ترکیبات آنتیموان مقاوم شده اند، اشاره کرد. طبق مواردی که در بالا ذکر شد بیشتر مطالعات بر روی ساختار و عملکرد این ژن ها در سویه های لیشرمانیا و سویه هایی از لیشرمانیا که در شرایط آزمایشگاهی به



## 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, M.C., 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.

لیشمانیا‌های عامل سالک شناسایی شد. البته این نتایج به دلایلی چون خطای کار آزمایشگاهی یا عدم بررسی میزان 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 جدام 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 لحاظ تأمین اعتبار طرح صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

- Hadighi, R., Mohebal, 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.
- Mohebal, 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).
- Ouellette, 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 leishmaniasis* 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)

پربشان، 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.