

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

مائده پریشان^۱ و محمود ناطقی^۲

^۱بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه پیام نور تهران شرق، تهران، ایران؛ ^۲آکادمیک 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 mdrl (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 فاز 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 mdrl که پیش از این در سوبه‌های 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 mdrl، 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 Parishan¹ & Mahmoud Nateghi²

¹Microbial Biotechnology, Payame Noor University of East Tehran, Tehran, Iran; ²Qom 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 mdrl (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 mdrl 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, mdrl gene, pgpa gene

مقدمه

در سیتوپلاسم 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 می شود که این ژن در سال ۱۹۹۰ شناسایی شد (Ellenberger & Beverley, 1989). افزایش بیان MRPA از طریق برهم کنش با پروتئین های دیگر غشا باعث کاهش ورود آنتیموان و افزایش خروج آن می شود و به این ترتیب نقش اصلی را در مقاومت به داروی آنتیموان بازی می کند (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 mdrl 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 می نامند. آزمایشات ترانسفکت با استفاده از ژن mdrl در لیشمانیا دونووانی و لیشمانیا اینریتی ثابت کرد که افزایش بیان این ژن مسئول فنوتیپ MDR در انگل های مقاوم است (Chow et al., 1993). اغلب مطالعاتی که ذکر شدند مربوط به سویه هایی از لیشمانیا هستند که در شرایط آزمایشگاهی به دارو مقاوم شدند و وجود قطعات تکثیری خارج کروموزومی و حضور ژن های ABC Transporter و ژن آنزیم های دخیل در متابولیسم در سویه های بالینی حاصل از بیماران کمتر بررسی شده است. از سوی دیگر مطالعه در مورد ژنتیک مقاومت دارویی در لیشمانیا بر روی سویه هایی انجام شده است که با افزایش تدریجی دوز دارو در شرایط آزمایشگاهی مقاومت دارویی به آن ها القا شده است. بنابراین نتایج بررسی مقاومت دارویی در این سویه ها قابل تعمیم به سویه های بالینی نیست. از اینرو هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن های مقاومت دارویی (MRPA pgpa) و (PGP mdrl) در ایزوله های بالینی لیشمانیا است.

مواد و روش ها

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 زخم هایی که

لیشمانیازیس به گروهی از بیماری های انگلی و عفونی با انتشار جهانی اطلاق می شود، که ناشی از تک یاخته لیشمانیا (Piscopo & Mallia, 2006) و در شمار بیماری زئونوز انسان و حیوان قرار می گیرد (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 روش های 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 روش های مختلف درمان دو شکل از ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتیموان (sbv) یعنی سدیم استیوگلوکونات (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 مطالعه ای 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 ایزوله های بالینی به طور نادر انجام شده است، از جمله طی مطالعه ای در سال ۱۳۸۱ در ایران بر روی حدود ۲۴۸ بیمار بین ۲۰ تا ۴۵ سال در مشهد که بیش از ۹۴ درصد ایزوله های بالینی ناشی از لیشمانیا تروپیکا بودند که از این تعداد ۱۲ درصد آنها به گلوکانتیم پاسخ ندادند (Alizadeh et al., 2011). مقام آنتیموان در تعدادی از موارد ناشی از افزایش بیان پمپ های افلاکس وابسته به خانواده انتقال دهنده های ABC است (Hoffmeyer et al., 2000). انتقال دهنده های ABC از پروتئین های غشایی و بزرگترین خانواده از پمپ های افلاکس هستند و در تمام ارگانیسم ها از آرکی باکتر تا یوکاریوت ها از جمله سلول های انسانی حضور دارند و تعدادی از این پروتئین ها در عرض غشاهای زیستی وجود دارند که باعث مقاومت ذاتی و اکتسابی آنتی بیوتیک ها در میکروارگانیسم های مختلف می شوند (Higgins, 1992; Gokirmak et al., 2012). طی مطالعه ای نقش ABC Transport ها را در سویه های لیشمانیا دونووانی به طور طبیعی مقاوم به دارو نشان داده شده است که ژن pgpa MRPA در ایزوله ها به شکل DNA حلقوی خارج کروموزومی با روش هضم آنزیمی و سترن 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 ویزیکول هایی

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 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 آماسیگوت‌های 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 NNN(RPMI1640 (فاز جامد حاوی ۴۰ گرم آگار خون دار (No₂Oxoid) + 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	TCGCAGAACGCCCCTACC	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	TCGCAGAACGCCCCTACC	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.

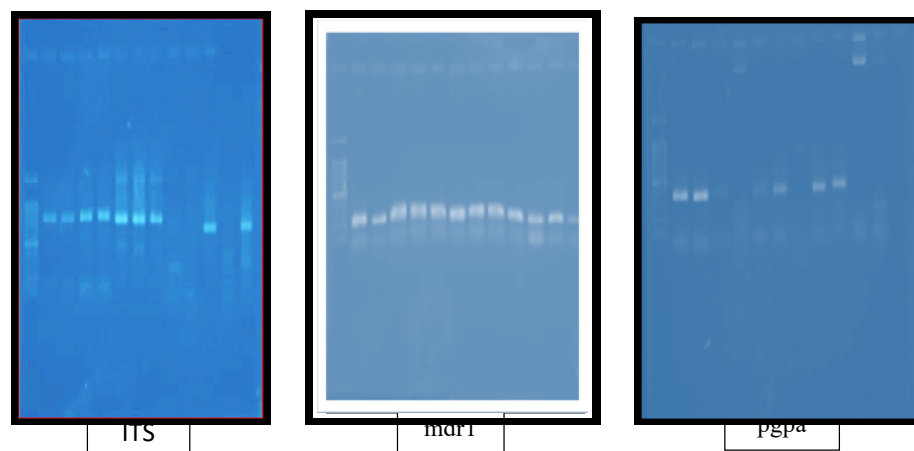
Table 2. Information of patients.

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 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 *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 *mdr1*، *pgpa* و *ITS*

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

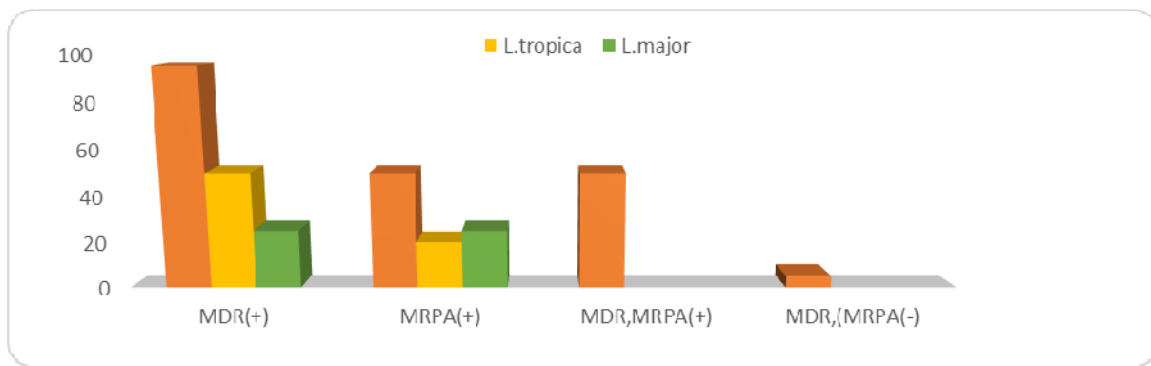
در سال ۱۹۷۶ محصول ژن *mdr1* یعنی پمپ P-GlycoProtein در سلول‌های هاستر چینی کشف شد (Juliano & Ling, 1976)؛ و همچنین در سال ۱۹۹۵ ژن *mdr1* در لیشمانیا اینریتی (*lemdr1*) و لیشمانیا مکزیکانا (*Immdr1*) کشف شد. اوایل دهه ۱۹۹۰ در طی مطالعه‌ای همولوگ *pgp* پستانداران تحت عنوان *mdr1-like* در لیشمانیا دونووانی 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 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 گایاننسیس مقاوم به گلوکانتیم تکثیر ژن *pgpa* مشاهده شد (Sundar & Chakravarty, 2014)؛ در سال ۱۹۹۰ در طی مطالعه‌ای اولین ژن انتقال دهنده 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).

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 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 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).

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	<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(L.major)	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>
MDR	1 actacgagtt gcagcgggtt gctccaaatg aagtttctgt cagagaccgt ggtatccgca 61 aagagtttgc gggcagcctt tctcgggcgg tgatcatggc cctcgtgtat ctacgtaca 121 ctatgcctt ttcttcggc tctacacag tcgaatgggg tcgccgtgac atggcggata 181 tcatttctac ctttctggcc gatgctgatg gg	1 gaggactacg agttgcagcg cccgggggttg gcctttgttg ggcagatgac ggtggtatcc 61 gcaaagagtt tgcgggcagc ctttctgcgg cggtgatcat ggccctcgtg tatctcagct 121 acactatcgc cttttcttc ggctcctacc tagtcaaatg gggctgccgt gacatggcgg 181 atatcatttc taccttctg gccga
MRPA	1 ctacgcgcg ccttctgccc gccgctcagg ttcacgccgt tctcccgat ctccgtctcc 61 agccccccgc taagtgcgc aacatccgcc tctagctggc agcaacggat tacgtctgc 121 aagtctgcgg cgcgctctc gtcgaagaac aggatgttgc tgcgaccgt cgcgttcag 181 atccacgct gctcggcac gtacgcgatg ctccgtccg cccacacctc gccgctctgc 241 acatcgtact cgcccatcat cgaaccagc attgtccact tccgctccc ggtccacca 301 ctccccattg 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 کانژوگه مقاومت را سبب می شوند. از اینرو هدف از این مطالعه بررسی مقاومت دارویی *mdr1*PGP 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., Shimke, 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.
- لشمانیا‌های 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 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 لحاظ تأمین اعتبار طرح صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

- Hadighi, R., Mohebbali, 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. & John, 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.
- Mohebbali, 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)

پیشان، 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. یافته های نوین در علوم زیستی ۹: ۲۶۶-۲۵۷.