

اثر عصاره آلکالوئیدی گیاه تلخ‌بیان بر میزان MIC و تجمع داخل سلولی سیپروفلوکساسین در موتانت مقاوم به سیپروفلوکساسین/شریشیاکلی

پروین محمدی^۱، راضیه پوراحمد^{۱*}، بهزاد شارق^۲ و صادق فرهادیان^۲

^۱ شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

^۲ شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱۲

چکیده

عفونت‌های ناشی از باکتریهای مقاوم چنددارویی یک مشکل در حال افزایش می‌باشد. علت آن ظهور و انتشار مقاومت دارویی میکروبی و عدم توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید است. استفاده از محصولات فیتوشیمیایی و عصاره گیاهان به عنوان عوامل کاهنده مقاومت به طور فزاینده‌ای، به یک موضوع تحقیق فعال تبدیل شده است. هدف این پژوهش مطالعه اثر عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای استخراج شده از دانه گیاه تلخ‌بیان بر میزان حداقل غلظت مهار و تجمع درون‌سلولی سیپروفلوکساسین در موتانت مقاوم باکتری/شریشیاکلی بود. برای این منظور از روش رفتهای متوالی برای تعیین مقادیر حداقل غلظت مهار و از سنجش‌های اسپکتروفلوریمتری برای اندازه‌گیری میزان تجمع درون‌سلولی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین استفاده شد. نتایج نشان داد که عصاره مورد استفاده باعث کاهش حداقل غلظت مهار سیپروفلوکساسین شد. همچنین این عصاره باعث افزایش تجمع آنتی‌بیوتیک در موتانت مقاوم باکتری/شریشیاکلی گردید. در نتیجه، عصاره حاوی آلکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان می‌تواند از طریق تأثیر بر پمپ انتشار به خارج AcrAB-ToIC غشاء باعث افزایش حساسیت به سیپروفلوکساسین در موتانت‌های مقاوم شود.

واژه‌های کلیدی: مقاومت دارویی، سیپروفلوکساسین، گیاه تلخ‌بیان، اسپکتروفلوریمتری.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۰۱-۷، پست الکترونیکی: Razieh_Jaktaji@yahoo.com

مقدمه

داده‌اند. بنابراین موضوع استفاده از محصولات فیتوشیمیایی و عصاره گیاهان به عنوان عوامل اصلاح‌کننده مقاومت، مورد توجه روزافزون محققان قرار گرفته است (۱، ۲ و ۳). از میان مکانیسم‌هایی که در مقاومت باکتریایی درگیر هستند، پمپ‌های انتشار به خارج (Efflux pumps)، که آنتی‌بیوتیک‌ها را خارج می‌کنند و در نتیجه غلظت درون سلولی آنتی‌بیوتیک را کاهش می‌دهند، به عنوان یکی از مهمترین علل در مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نظر گرفته می‌شوند (۲۴). اگرچه پمپ‌های انتشار به خارج دارو، هم در باکتریهای گرم‌منفی و هم گرم‌مثبت یافت شده‌اند اما مقاومت با واسطه انتشار به خارج در باکتریهای گرم‌منفی،

چنددارویی مقاوم باکتریهای مقاوم چنددارویی (multidrug resistance) به دلیل ظهور و انتشار مقاومت دارویی میکروبی و عدم توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید، یک مشکل در حال افزایش می‌باشد. روش‌های سنتی کشف آنتی‌بیوتیک برای همگام شدن با تحول مقاومت، با شکست مواجه شده‌اند. بنابراین، استراتژیهای جدید برای کنترل عفونت‌های باکتریایی بسیار مطلوب است. متابولیت‌های ثانویه گیاهی (فیتوکمیکال‌ها)، در حال حاضر، زمانی که به تنهایی مورد استفاده قرار می‌گیرند، همچنین زمانی که به عنوان هم‌افزا (synergists) با دیگر ترکیبات ضدباکتری استفاده می‌شوند، پتانسیل خود را به عنوان آنتی‌باکتریال نشان

(۹) که افزایش ظهور عفونت ناشی از *اشریشیاکلی* مقاوم چنددارویی، کاربرد بالینی آن را محدود کرده است (۲۶).

در *اشریشیاکلی* چند مکانیسم، از جمله: کاهش بیان پورینهای غشایی مانند OmpF و متعاقباً کاهش جذب دارو، جهش در آنزیم هدف این دارو و فعالیت پمپهای انتشار به خارج مانند پمپ AcrAB-TolC، ممکن است در مقاومت به سیپروفلوکساسین نقش داشته باشند (۱۱).

گیاه تلخ بیان (*Sophora alopecuroides*)، گونه‌ای از جنس سوفورا، از خانواده بقولات، است. ترکیبات فعال زیستی گیاهان این جنس، "آلکالوئیدهای کوئینولیزیدین" می‌باشند که فعالیتهای ضد میکروبی، آرام‌بخشی، ضد درد، ضد تب، ضد التهاب، ضد توموری و فعالیتهای قابل توجه ضد ویروسی این آلکالوئیدها به اثبات رسیده است. گیاهان جنس سوفورا در طب سنتی بسیاری از کشورهای آسیایی به ویژه چین استفاده فراوانی دارند (۱۳ و ۲۷).

در سال ۲۰۱۲، زو و همکارانش اثر قرصی تجاری به نام تاسا (TASA)، که "کل آلکالوئیدهای استخراج شده از دانه گیاه تلخ بیان" می‌باشد، را علیه سویه‌های *اشریشیاکلی* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک، از جمله سیپروفلوکساسین، مورد سنجش قرار داده و نشان دادند که تاسا هم به تنهایی علیه این سویه‌های مقاوم چنددارویی خاصیت ضدباکتریایی دارد و هم در غلظتهای زیر حد مهارتی خود، در ترکیب با آنتی‌بیوتیکهای مورد آزمایش، از جمله سیپروفلوکساسین، اثر افزایشی علیه سویه‌های مقاوم چنددارویی نشان داده و موجب کاهش حداقل غلظت مهارتی (Minimum Inhibitory Concentration) به طور اختصار: MIC) این آنتی‌بیوتیکها می‌شود. در واقع تاسا به خوبی توانست در سویه‌های *اشریشیاکلی* مورد آزمایش، موجب کاهش چشمگیر مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین شود (۲۶).

هدف این پژوهش تعیین اثر عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای استخراج شده از دانه گیاه تلخ بیان و

به دلیل ساختار مولکولی پوشش سلولی، یک مشکل پیچیده‌تر است، چراکه از یک طرف به دلیل کم بودن نفوذپذیری غشای خارجی، داروی کمتری می‌تواند وارد سلول باکتری شود (۱۶) و از طرف دیگر داروی وارد شده، از طریق پمپهای انتشار به خارج، به صورت فعال به خارج از باکتری منتقل می‌شود (۱۹).

اغلب باکتریهای گرم منفی به طور ذاتی در مقایسه با باکتریهای گرم مثبت، حساسیت کمتری نسبت به آنتی‌بیوتیکها، به ویژه آنتی‌بیوتیکهای دوگانه‌دوست و چربی‌دوست، دارند. همان‌طور که اشاره شد بخشی از این تفاوت به خاطر وجود غشای خارجی در باکتریهای گرم منفی است که به عنوان یک سد نفوذپذیر بسیار مؤثر عمل می‌کند. ورود داروهای آب‌دوست از طریق کانالهای پورین دشوار است، چرا که این داروها معمولاً بسیار بزرگتر از مولکولهای غذایی معمول هستند. به علاوه، داروهای چربی‌دوست (با توجه به ماهیت بسیار منظم مولکولهای آب درون کانالها) نمی‌توانند از طریق این کانالها وارد باکتری شوند، انتشار نیز در سراسر دو لایه لیپیدی غشای خارجی، که شامل یک لایه خارجی لیپوساکاریدی با سیالیت کم است، بسیار آرام صورت می‌گیرد (۱۸).

فلوروکینولون‌ها، گروهی از آنتی‌بیوتیکها هستند که علیه طیف گسترده‌ای از باکتریها عمل می‌کنند. این آنتی‌بیوتیکها با مهار آنزیم توپوایزومراز (II و IV) از رونویسی و همانندسازی DNA در سلول باکتری جلوگیری کرده و به این ترتیب باکتری را از بین می‌برند (۱۰). فلوروکینولون‌ها، که در موقعیت کربن شماره ۶ هسته کینولونی خود دارای یک اتم فلورین می‌باشند (۶)، فعالیت عالی علیه باکتریهای گرم منفی دارند. با این حال مقاومت نسبت به آنها در میان جدایه‌های بالینی، بویژه *اشریشیاکلی*، گزارش شده است (۲۶). سیپروفلوکساسین یکی از قوی‌ترین فلوروکینولون‌های موجود علیه باکتریهای گرم منفی می‌باشد

از روش اسید و باز و انتقال آلكالوئیدها به فاز آلی و تبخیر آن، عصاره خشک حاوی "کل آلكالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان" به دست آمد (۷). عصاره خشک وزن شد و با استفاده از آب مقطر از آن محلول ذخیره تهیه شد.

جدول ۱- مشخصات سویه، موتانت و کلون مورد آزمایش

MIC ($\mu\text{g/ml}$)		سویه/موتانت/کلون
Cip	Tc	
۰/۰۳۵	۳	MG1655 (تیپ وحشی)
۱	۳۰	RE 17 (موتان مضاعف <i>gyrA marR</i>)
۱۰۰	۱۳۰	PM 1 (کلون حاصل از کشت RE 17 با Tc)

Tc و Cip به ترتیب حروف اختصاری برای تتراسیکلین و

سیپروفلوکساسین می‌باشند.

تعیین MIC: جهت تعیین MIC برای عصاره گیاه و PABNA به صورت جداگانه، از هر یک از دو سویه تیپ وحشی (MG1655) و موتانت مقاوم PM1، کشت LB با تراکم 10^6 CFU/ml، به عنوان مایه تلقیح، تهیه شد. برای هر باکتری، سری رقت‌های متوالی (روش broth dilution) از عصاره حاوی کل آلكالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان و PABNA در لوله آزمایش‌های حاوی LB به صورت جداگانه تهیه و تلقیح انجام شد و کشتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمادهی شدند. پایین‌ترین غلظتی که در آن، پس از گرمادهی، کدورت یا رشد مرئی در محیط کشت وجود نداشت به عنوان MIC در نظر گرفته شد. تمام مراحل در سه تکرار انجام شد (۵ و ۲۳).

برای تعیین MIC ترکیبی سیپروفلوکساسین و عصاره حاوی کل آلكالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان، همچنین سیپروفلوکساسین و PABNA، از روش microbroth dilution checkerboard و میکروپلیت ۹۶ چاهکی استفاده شد. کمترین غلظت از هر دو ماده، که در ترکیب با هم موجب مهار رشد باکتری می‌شود، به عنوان MIC ترکیبی در نظر گرفته شد (۲۶). این آزمایش نیز سه بار تکرار شد.

فنیل‌آلانین بتانفتیل‌آمید (مهارکننده پمپ AcrAB-TolC، با نام اختصاری PABNA) بر پمپ انتشار به خارج فعال دیواره سلولی AcrAB-TolC از طریق اندازه‌گیری میزان MIC و تجمع آنتی‌بیوتیک درون سلولی در تیپ وحشی و موتان مقاوم به سیپروفلوکساسین باکتری/شیریشی‌کلی بود.

مواد و روشها

ترکیبات شیمیایی و ضد میکروبی: در این پژوهش از محیط کشت LB (مرک، آلمان) و LBA حاوی ۱/۵ درصد آگار (مرک، آلمان) استفاده شد. PABNA و آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین و سیپروفلوکساسین (سیگما، آمریکا) به عنوان ترکیبات ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفتند. با استفاده از پودر سدیم فسفات (مرک، آلمان) و گلیسین (سیگما، آمریکا) به ترتیب بافر سدیم فسفات با pH=۷ و غلظت ۵۰ میلی‌مولار و محلول گلیسین هیدروکلراید با pH=۳ و غلظت ۰/۱ مولار تهیه شد.

سویه و موتانت باکتریایی: در این مطالعه از یک موتانت مضاعف *gyrA marR* (RE17) و تیپ وحشی مربوط به باکتری/شیریشی‌کلی K12 سویه MG1655 استفاده شد که MIC آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین و سیپروفلوکساسین برای هر کدام، در جدول ۱ ارائه شده است (۲۱ و ۲۲). کلون PM1 که مقاومت بالاتری نسبت به هر دو آنتی‌بیوتیک داشت، با استفاده از کشت موتانت RE17 در غلظتهای متوالی افزایشی تتراسیکلین ساخته شد (۳) (جدول ۱). از کلون مقاوم PM1 برای انجام آزمایشات این مطالعه استفاده شد.

استخراج کل آلكالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان: گیاه تلخ‌بیان دارای میوه بالغ، جمع‌آوری و پس از شناسایی در هرباریوم دانشگاه شهرکرد، دور از نور خورشید خشک شدند. سپس دانه‌ها توسط خردکن پودر شدند. پس از خیساندن پودر دانه در الکل ۸۰ درصد و تغلیظ عصاره حاصل به وسیله روتاری اوپوراتور (ایلا، ژاپن)، با استفاده

اندازه‌گیری میزان تجمع درون‌سلولی سیپروفلوکسازین: ابتدا از تیپ وحشی (MG1655) و موتانت مقاوم PM1، کشت LB با تراکم 10^6 CFU/ml به عنوان مایه تلقیح تهیه شد. برای هر باکتری در ۳ ارلن حاوی LB تلقیح انجام شد و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه کشتگاهی با جذب نوری ۰/۷ در طول موج ۶۶۰nm تهیه شد. جهت تهیه رسوب سلولی از هر کشت، سانتریفیوژ انجام شد. رسوب سلولی هر کشت دوباره در LB (یک بیستم حجم اولیه) حل شد.

با استفاده از بن ماری ۳۷ درجه، ۳ کشت مربوط به هر باکتری به صورت جداگانه تحت تیمار با "سیپروفلوکسازین تنها"، "سیپروفلوکسازین و عصاره حاوی کل آکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان" و "سیپروفلوکسازین و PAβNA" قرار گرفتند، به صورتی که عصاره حاوی کل آکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان (mg/ml) ۳ و PAβNA ($80 \mu\text{g/ml}$) ۶ دقیقه بعد از افزودن سیپروفلوکسازین ($10 \mu\text{g/ml}$) به محیط کشت‌های مربوطه اضافه شدند. از هر کدام طی ۱۲ دقیقه در فواصل یک یا دو دقیقه نمونه‌برداری انجام شد.

جهت حذف سیپروفلوکسازین برون‌سلولی، نمونه‌ها دو بار با بافر سدیم فسفات pH=۷ شستشو داده شدند. با استفاده از محلول گلایسین هیدروکلراید pH=۳ هضم سلولی انجام شد و به این ترتیب سیپروفلوکسازین تجمع یافته در درون سلول باکتری آزاد شد. پس از سانتریفیوژ، سوپرناتانت برای ادامه آزمایش جدا شد و رسوب سلولی جهت تعیین وزن خشک هر نمونه، نگهداری شد (۱۵ و ۲۰).

با توجه به خاصیت فلورسانس ذاتی هسته کینولونی سیپروفلوکسازین (۸ و ۱۲)، جهت تعیین میزان سیپروفلوکسازین تجمع یافته در هر نمونه، از دستگاه اسپکتروفلوریمتری (شیمادزو، ژاپن) برای سنجش فلورسانس در طول موج‌های تهییج و نشر به ترتیب ۲۷۹ و ۴۴۷ نانومتر استفاده شد. با استفاده از سنجش فلورسانس

سری رقت‌های متوالی سیپروفلوکسازین ($10-1000 \text{ ng/ml}$) در محلول گلایسین هیدروکلراید pH=۳، منحنی استاندارد تهیه شد. پس از اتمام سنجش فلورسانس نمونه‌ها، مقدار سیپروفلوکسازین تجمع یافته در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید. در نهایت نتایج به صورت مقدار سیپروفلوکسازین وارد شده بر حسب نانوگرم در میلی‌گرم وزن خشک باکتری، به ازای زمان نمونه‌برداری بر حسب دقیقه بیان شد. آزمایشات سه بار تکرار شدند و میزان خطا کمتر از ۲۰ درصد بود (۱۵ و ۲۰).

نتایج

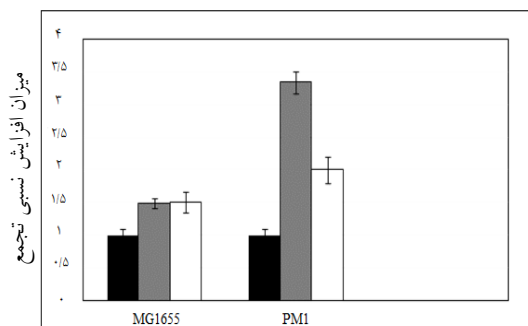
تعیین MIC: مقادیر MIC عصاره حاوی کل آکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان و PAβNA به صورت تنها و MIC ترکیبی "سیپروفلوکسازین و عصاره حاوی کل آکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان" همچنین "سیپروفلوکسازین و PAβNA"، در جدول ۲ ارائه شده است. همان طوری که جدول ۲ نشان می‌دهد در حالت ترکیب میزان MIC عصاره حاوی کل آکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان و PAβNA به ترتیب به مقدار ۸ و ۱۲ برابر کاهش یافت.

جدول ۲- نتایج تعیین MIC

PM 1	MG1655	موتانت / سویه	
		موتانت	سویه
۱۲/۵	۳	MIC ترکیبی	
		عصاره حاوی کل آکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان (mg/ml)	
۳۰۰	۲۵۶	MIC ترکیبی	
		PAβNA ($\mu\text{g/ml}$)	
۱	-	MIC ترکیبی	
		Cip ($\mu\text{g/ml}$)	
۱/۵۶	-	MIC ترکیبی	
		عصاره حاوی کل آکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان (mg/ml)	
۱	-	MIC ترکیبی	
		Cip ($\mu\text{g/ml}$)	
۲۵	-	MIC ترکیبی	
		PAβNA ($\mu\text{g/ml}$)	

اندازه‌گیری میزان تجمع درون سلولی سیپروفلوکسازین: شکل ۱ میزان تجمع سیپروفلوکسازین را در سویه تیپ وحشی (MG1655) و موتانت مقاوم (PM1) به

خصوصیات به‌خوبی شناخته شده سم‌شناسی و داروشناسی را امکان‌پذیر می‌سازد، از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۵).

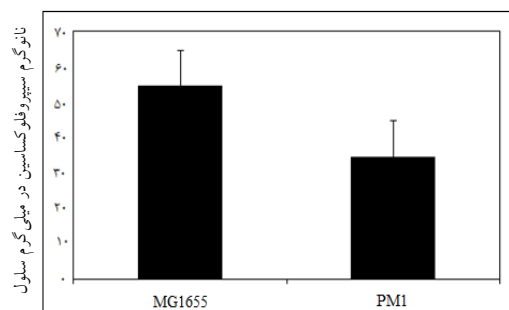


شکل ۲- میزان افزایش نسبی تجمع سیپروفلوکسازین در سویه تیپ وحشی (MG1655) و موتانت PM1 در شرایط مختلف بدون تیمار و تیمار شده با $\text{PA}\beta\text{NA}$ و عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان.

به همین جهت، تعیین اثر عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای استخراج شده از دانه گیاه تلخ‌بیان و همچنین $\text{PA}\beta\text{NA}$ (به عنوان کنترل مثبت) بر پمپ انتشار به خارج دیواره، از طریق سنجش MIC و میزان تجمع درون‌سلولی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین در تیپ وحشی و موتانت مقاوم باکتری *اشریشیاکلی* مورد هدف این پژوهش قرار گرفت.

نتایج MIC و سنجش تجمع آنتی‌بیوتیک هر دو نشان داد که عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان توانایی کاهش MIC سیپروفلوکسازین را دارد و این توانایی مرتبط با کاهش فعالیت پمپ انتشار به خارج در موتانت مقاوم می‌باشد زیرا افزودن ماده مهارکننده پمپ، $\text{PA}\beta\text{NA}$ ، نیز باعث کاهش MIC در نتیجه افزایش تجمع آنتی‌بیوتیک در سلول موتانت شد. عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان هم دارای اثر مشابهی بود ولی تأثیر آن روی MIC و تجمع آنتی‌بیوتیک کمتر از $\text{PA}\beta\text{NA}$ بود. علت آن شاید مرتبط با این مسئله باشد که عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان است و این مواد با هم میانکشی داشته باشند. جدا سازی تک تک

سیپروفلوکسازین نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان تجمع آنتی‌بیوتیک در PM1 کمتر از MG1655 است. به علت تجمع کم آنتی‌بیوتیک در PM1 این سویه مقاوم به سیپروفلوکسازین می‌باشد. این مسئله با سنجش MIC نشان داده شد.



شکل ۱- مقادیر تثبیت شده سیپروفلوکسازین در سویه تیپ وحشی (MG1655) و موتانت PM1

شکل ۲ میزان افزایش نسبی تجمع آنتی‌بیوتیک را بعد از تیمار با $\text{PA}\beta\text{NA}$ و عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان نسبت به تجمع آنتی‌بیوتیک در تیپ وحشی در دو سویه در فاز ثابت (steady state) نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود این دو ماده باعث افزایش تجمع آنتی‌بیوتیک در دو سویه شدند ولی تأثیر آنها بر افزایش تجمع در سویه تیپ وحشی مقادیر یکسان و در سویه موتانت مقادیر بیشتر و متفاوت بود. علت این مسئله شاید به این خاطر باشد که $\text{PA}\beta\text{NA}$ و عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان روی پمپ فعال در موتانت PM1 تأثیر بیشتر از پمپ غیر فعال در سویه تیپ وحشی دارد.

بحث

امروزه اشاعه باکتریهای، به ویژه گرم‌منفی، مقاوم نسبت به چندین دارو کارآیی خانواده‌های آنتی‌بیوتیکی را به شدت مختل و استفاده‌های بالینی آنها را محدود کرده است (۱) و (۱۷). بنابراین، توسعه مهارکننده‌های مکانیسمهای مقاومت، که گسترش استفاده از آنتی‌بیوتیکهای موجود با

آنتی‌بیوتیک به‌کار رود (۳). بنابراین به نظر می‌آید جزئیات مکانیسم عمل آن کاملاً شبیه PAβNA نباشد.

عصاره گیاهان دارویی می‌توانند بازدارنده پمپ‌های انتشار به خارج و عامل از بین بردن موتانت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها باشند. از عصاره حاوی کل‌آلکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان می‌توان به عنوان بازدارنده پمپ انتشار به خارج AcrAB-TolC استفاده نمود ولی برای این منظور باید روی مواد مؤثره عصاره و سمیت آن روی سلول‌های یوکاریوتی و به ویژه سلول‌های انسانی مطالعاتی انجام شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد جهت حمایت مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد. از آقای بنی‌مهدی کارشناس آزمایشگاه ژنتیک نیز تشکر می‌شود.

آلکالوئیدها و بررسی اثر آنها به صورت جداگانه بر روی MIC و تجمع سیپروفلوکسازین اطلاعات دقیق‌تری را فراهم می‌کند.

تأثیر PAβNA در کاهش بیان پمپ انتشار به خارج AcrAB-TolC و در نتیجه کاهش MIC قبلاً نشان داده شد (۳). همچنین مطالعات ماتسوماتو و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داده بود که PAβNA موجب افزایش نفوذپذیری غشای بیرونی باکتری *اشریشیا کلی* می‌گردد (۱۴).

همچنین نشان داده شده که عصاره حاوی کل‌آلکالوئیدهای دانه گیاه تلخ‌بیان می‌تواند باعث کاهش فعالیت پمپ انتشار به خارج AcrAB-TolC در موتانت مقاوم شود ولی هنگامی که به صورت پیش‌تیمار و قبل از افزودن

منابع

- ۱- اخوان سپه‌ی ع، شریفیان س، ذوالفقاری م، خلیلی درمی م (۱۳۹۳) بررسی میزان مقاومت کلی فرم‌های روده ای جدا شده از پسابهای صنعتی، خانگی و بخش‌هایی از تصفیه‌خانه شهر اراک به فلزات سنگین، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲۷: ۱۶۷-۱۷۸.
- ۲- دانشمند ف (۱۳۹۳) استخراج و خلص سازی پپتید ضد میکروبی جدید از گیاه عناب (*Ziziphus jujuba*)، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲۷: ۲۱۱-۲۲۳.
- ۳- محمدی پ، پوراحمد ر. (۱۳۹۵) اثر عصاره گیاه تلخ‌بیان بر مهار پمپ AcrAB-TolC در باکتری *E. coli*، دو ماهنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۳۲: ۷۸۴-۷۹۴.
- 4- Abreu, A.C., McBain, A.J., Simoes, M. (2012) Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural product reports*, 29, 1007-1021.
- 5- Andrews, J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (Suppl 1), 5-16
- 6- Andriole, V.T. (2005) The quinolones: past, present, and future. *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 2, S113-119.
- 7- Atta-Ur-Rahman, M., Choudhary, M.I., Parvez, K., Ahmed, A., Akhtar, F., Nur-E-Alam, M., Hassan, N.M. (2000). Quinolizidine alkaloids from *Sophora alopecuroides*. *Journal of Natural Products*, 63, 190-192.
- 8- Chapman, J.S., Georgopapadaku, N.H. (1989). Fluorometric assay for fleroxacin uptake by bacterial cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 33, 27-29.
- 9- Emmerson, A.M., Jones, A.M. (2003) The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother*, 51 Suppl 1, 13-20.
- 10- Filioussis, G., Tzivara, A., Petridou, E., Giadinis, N.D., Burriel, A.R., Kritas, S.K. (2013) Ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolated from the intestinal microbiota of goats in Greece in the absence of selective pressure.

- Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76, 352-355.
- 11- Karczmarczyk, M., Martins, M., Quinn, T., Leonard, N., Fanning, S. (2011). Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 7113-7120.
 - 12- Kasčáková S, M.L., Chevalier, J., Réfre'giers, M., Page's, J.M. (2012) Antibiotic Transport in Resistant Bacteria: Synchrotron UV Fluorescence Microscopy to Determine Antibiotic Accumulation with Single Cell Resolution. *PLoS ONE*, 7, e38624.
 - 13- Küçükboyacı, N., Özkan, S., AdigÜzel, N., Tosun, F.(2011) Characterisation and antimicrobial activity of *Sophora alopecuroides* L. var. *alopecuroides* alkaloid extracts. *Turkish Journal of Biology*, 35:379-385.
 - 14-Matsumoto, Y., Hayama, K., Sakakihara, S., Nishino, K., Noji, H., Iino, R., Yamaguchi, A.(2011). Evaluation of multidrug efflux pump inhibitors by a new method using microfluidic channels. *PLoS One*, 6, e18547
 - 15-Mortimer, P., Piddock, L. (1991). A comparison of methods used for measuring the accumulation of quinolones by Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 28, 639-653.
 - 16-Nikaido, H.(2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 593-656.
 - 17-Nikaido, H., Pagès, J.M.(2012). Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 340-363.
 - 18-Nikaido, H., Zgurskaya, H.I. (2001). AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3, 215-218.
 - 19-Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Saier, M.H. Jr. (1998). Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J Mol Biol*, 277, 573-592.
 - 20-Piddock, L.J., Johnson, M. (2002). Accumulation of 10 fluoroquinolones by wild-type or efflux mutant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46, 813-820.
 - 21-Pourahmad Jaktaji, R., Ebadi, R. (2013). Generation of clones with higher resistance to tetracycline and chloramphenicol from ciproflouxacin resistant *Escherichia coli* mutants. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 4, 3063-3067.
 - 22-Pourahmad Jaktaji, R., Ebadi, R., Karimi, M. (2012). Study of organic solvent tolerance and increased antibiotic resistance properties in *E. coli gyrA* mutants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11, 595-600.
 - 23-Pourahmad Jaktaji, R., Mohiti, E. (2010). Study of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9, 43-48.
 - 24-Savjani, J.K., Gajjar, A.K., Savjani, K.T., 2009, Mechanisms of resistance: useful tool to design antibacterial agents for drug - resistant bacteria. *Mini Rev Med Chem*, 9, 194-205.
 - 25-Van Bambeke, F., Lee, V.J. (2006). Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery*, 1, 157-175.
 - 26-Zhou, X., Jia, F., Liu., X., Wang, Y. (2012). Total alkaloids of *Sophorea alopecuroides*-induced down-regulation of AcrAB-TolC efflux pump reverses susceptibility to ciprofloxacin in clinical multidrug resistant *Escherichia coli* isolates. *Phytotherapy Research*, 26, 1637-1643.
 - 27-Zhou, X.z., Jia, F., Liu, X.m., Yang, C., Zhao, L., Wang, Y.j. (2013). Total alkaloids from *Sophora alopecuroides* L. increase susceptibility of extended-spectrum β -lactamases producing *Escherichia coli* isolates to cefotaxime and ceftazidime. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 19, 945-952.

The effect of alkaloid extract of *Sophora alopecuroides* on MIC value and intracellular accumulation of ciprofloxacin in a ciprofloxacin resistant mutant of *Escherichia coli*

Mohamadi P.¹, Pourahmad R.¹, Shareghi B.² and Farhadian S.²

¹ Genetic Dept., Faculty of Science, University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. of Iran

² Biology Dept., Faculty of Science, University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. of Iran

Abstract

Infections, which are caused by multiple drug resistance bacteria is an increasing problem. This is due to emergence and distribution of microbial drug resistance, and none development of new antibiotics. The use of phytochemical products and plant extract as a resistance reducing agent is an increasingly active subject of research. This study was aimed to study the effect of total alkaloides extract of *Sophora alopecuroides* on Minimum Inhibitory Concentration value and intracellular accumulation of ciprofloxacin in an *Escherichia coli* ciprofloxacin resistant mutant. For this purpose serial dilution method for determining Minimum Inhibitory Concentration value and spectrofluorometric assay assays for measuring intracellular accumulation of ciprofloxacin antibiotic were used. Results showed that plant extract decreased ciprofloxacin Minimum Inhibitory Concentration. This extract also increased intracellular accumulation of antibiotic in the *Escherichia coli* ciprofloxacin resistant mutant. In conclusion, extract containing alkaloids of *Sophora alopecuroides* can increase sensitivity to ciprofloxacin in resistant mutants through its effect on membrane efflux pump, AcrAB-TolC.

Key words: Drug resistance, Ciprofloxacin, *Sophora alopecuroides*, spectrofluorometry