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

پروین محمدی[۱]، راضیه پوراحمد[۱*]، بهزاد شارقی[۲] و صادق فرهادیان[۲]

[۱] شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

[۲] شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۵

چکیده

عفونتهای ناشی از باکتریهای مقاوم چندداروویی 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 مهاری و تجمع درون‌سلولی سیپروفلوکساسین در موتانت مقاوم باکتری *اشریشیاکلی* بود. برای این منظور از روش رقتهای متوالی برای تعیین مقادیر حداقل غلظت مهاری و از سنجشهای اسپکتروفلوریمتری برای اندازه‌گیری میزان تجمع درون‌سلولی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین استفاده شد. نتایج نشان داد که عصاره مورد استفاده باعث کاهش حداقل غلظت مهاری سیپروفلوکساسین شد. همچنین این عصاره باعث افزایش تجمع آنتی‌بیوتیک در موتانت مقاوم باکتری *اشریشیاکلی* گردید. در نتیجه، عصاره حاوی آلکالوئیدهای دانه گیاه *تلخ‌بیان* می‌تواند از طریق تأثیر بر پمپ انتشار به خارج AcrAB-TolC غشاء باعث افزایش حساسیت به سیپروفلوکساسین در موتانتهای مقاوم شود.

واژه های کلیدی: مقاومت دارویی، سیپروفلوکساسین، گیاه *تلخ‌بیان*، اسپکتروفلوریمتری.

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

مقدمه

عفونتهای ناشی از باکتریهای مقاوم چندداروویی (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 داده‌اند. بنابراین موضوع استفاده از محصولات فیتوشیمیایی و عصاره گیاهان به عنوان عوامل اصلاح کننده مقاومت، مورد توجه روزافزون محققان قرار گرفته است (۱،۲ و۳).

از میان مکانیسمهایی که در مقاومت باکتریایی درگیر هستند، پمپهای انتشار به خارج (Eflux 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،

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 گرم‌منفی به طور ذاتی در مقایسه با باکتریهای گرم‌مثبت، حساسیت کمتری نسبت به آنتی‌بیوتیکها، به ویژه آنتی‌بیوتیکهای دوگانه‌دوست و چربی‌دوست، دارند. همان طور که اشاره شد بخشی از این تفاوت به خاطر وجود غشای خارجی در باکتریهای گرم‌منفی 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. به‌علاوه، 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 فلوئور می‌باشند (۶)، فعالیت عالی علیه باکتریهای گرم‌منفی دارند. با این حال مقاومت نسبت به آنها در میان جدایه‌های بالینی، بویژه *اشریشیاکلی*، گزارش شده‌است (۲۶). سیپروفلوکساسین یکی از قوی‌ترین فلوروکینولون‌های موجود علیه باکتریهای گرم‌منفی می‌باشد (۹) که افزایش ظهور عفونت ناشی از *اشریشیاکلی* مقاوم چندداروییی، کاربرد بالینی آن را محدود کرده‌است (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 ضدمیکروبی، آرام‌بخشی، ضددرد، ضدتب، ضدالتهاب، ضدتوموری و فعالیتهای قابل توجه ضد ویروسی این آلکالوئیدها به اثبات رسیده‌است. 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 *تلخ‌بیان*" 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 چندداروییی خاصیت ضدباکتریایی دارد و هم در غلظتهای زیر حد مهاری خود، در ترکیب با آنتی‌بیوتیکهای مورد آزمایش، از جمله سیپروفلوکساسین، اثر افزایشی علیه سویه‌های مقاوم چندداروییی نشان داده و موجب کاهش حداقل غلظت مهاری (Minimum Inhibitory Concentration، به طور اختصار: MIC) این آنتی‌بیوتیکها می‌شود. در واقع تاسا به‌خوبی 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 *تلخ‌بیان* و

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

مواد و روشها

ترکیبات شیمیایی و ضدمیکروبی: در این پژوهش از محیط کشت LB (مرک، آلمان) و LBA حاوی ۱/۵ درصد آگار (مرک، آلمان) استفاده شد. PAβNA و آنتی‌بیوتیکهای تتراسیکلین و سیپروفلوکساسین (سیگما، آمریکا) به عنوان ترکیبات ضدمیکروبی مورد استفاده قرار گرفتند. با استفاده از پودر سدیم‌فسفات (مرک، آلمان) و گلایسین (سیگما، آمریکا) به ترتیب بافر سدیم‌فسفات با pH=۷ و غلظت ۵۰ میلی‌مولار و محلول گلایسین‌هیدروکلراید 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 *اشریشیاکلی* K12 سویه MG1655 استفاده شد که MIC آنتی‌بیوتیکهای تتراسیکلین و سیپروفلوکساسین برای هر کدام، در جدول ۱ ارائه شده‌است (۲۱ و ۲۲). کلون PM1که مقاومت بالاتری نسبت به هر دو آنتی‌بیوتیک داشت، با استفاده از کشت موتانت RE17 در غلظتهای متوالی افزایشی تتراسیکلین ساخته شد (۳) (جدول۱). از کلون مقاوم PM1 برای انجام آزمایشات این مطالعه استفاده شد.

استخراج کل آلکالوئیدهای 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 اواپوراتور (ایلا، ژاپن)، با استفاده از روش اسید و باز و انتقال آلکالوئیدها به فاز آلی و تبخیر آن، عصاره خشک حاوی "کل آلکالوئیدهای 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

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

Tc و Cip به ترتیب حروف اختصاری برای تتراسیکلین و سیپروفلوکساسین می‌باشند.

تعیین MIC: جهت تعیین MIC برای عصاره گیاه و PAβNA 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 آلکالوئیدهای دانه گیاه *تلخ‌بیان* و PAβNA در لوله آزمایشهای حاوی LB به صورت جداگانه تهیه و تلقیح انجام شد و کشتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 آلکالوئیدهای دانه گیاه *تلخ‌بیان*، همچنین سیپروفلوکساسین و PAβNA، 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.

اندازه‌گیری میزان تجمع درون‌سلولی سیپروفلوکساسین: 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 کشتهایی 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 "سیپروفلوکساسین تنها"، "سیپروفلوکساسین و عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای دانه گیاه *تلخ‌بیان* " و "سیپروفلوکساسین و PAβNA" قرار گرفتند، به صورتی‌که عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای دانه گیاه *تلخ‌بیان* (mg/ml ۳) و PAβNA (۸۰ μg/ml) ۶ دقیقه بعد از افزودن سیپروفلوکساسین(۱۰ μg/ml) به محیط کشتهای مربوطه اضافه شدند. از هر کدام طی ۱۲ دقیقه در فواصل یک یا دو دقیقه نمونه‌برداری انجام شد.

جهت حذف سیپروفوکساسین برون‌سلولی، نمونه‌ها دو بار با بافر سدیم‌فسفات pH=۷ شستشو داده شدند. با استفاده از محلول گلایسین‌هیدروکلراید pH=۳ هضم سلولی انجام شد و به این ترتیب سیپروفلوکساسین 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 سیپروفلوکساسین (۸ و ۱۲)، جهت تعیین میزان سیپروفلوکساسین 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 سیپروفلوکساسین (۱۰–۱۰۰۰ ng/ml) در محلول گلایسین‌هیدروکلراید pH=۳، منحنی استاندارد تهیه شد. پس از اتمام سنجش فلورسانس نمونه‌ها، مقدار سیپروفلوکساسین تجمع یافته در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید. در نهایت نتایج به صورت مقدار سیپروفلوکساسین 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

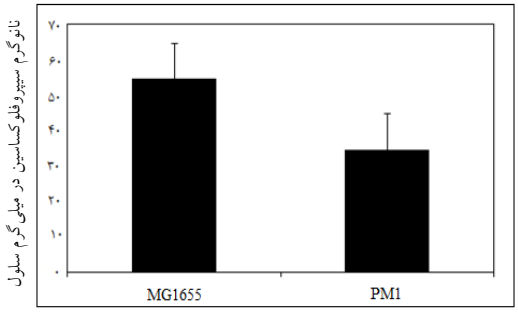
تعیین MIC: مقادیر MIC عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای دانه گیاه *تلخ بیان* و PAβNA به صورت تنها و MIC ترکیبی "سیپروفلوکساسین و عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای دانه گیاه *تلخ‌بیان*" همچنین "سیپروفلوکساسین و PAβNA"، در جدول ۲ ارائه شده است. همان طوری که جدول ۲ نشان می دهد در حالت ترکیب میزان MIC عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای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

جدول ۲- نتایج تعیین MIC

	سویه / موتان	MG1655	PM 1
MIC تنها	عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای دانه گیاه *تلخ‌بیان* (mg/ml)	۳	۱۲/۵
	PAβNA (μg/ml)	۲۵۶	۳۰۰
MIC ترکیبی	Cip (μg/ml)	–	۱
	عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای دانه گیاه *تلخ‌بیان* (mg/ml)	–	۱/۵۶
	Cip (μg/ml)	–	۱
	PAβNA (μg/ml)	–	۲۵

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

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

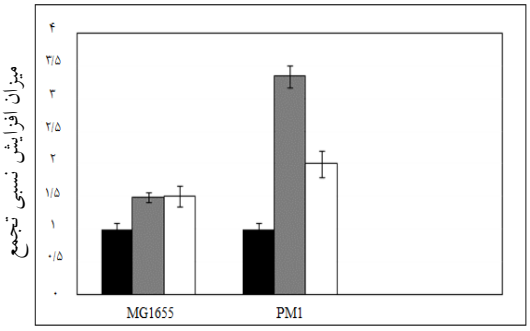


شکل ۱- مقادیر تثبیت شده سیپروفلوکساسین در سویه تیپ وحشی (MG1655) و موتانت PM1.

شکل ۲ میزان افزایش نسبی تجمع آنتی‌بیوتیک را بعد از تیمار با PAβNA 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. همان طورکه 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 PAβNA 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 کرده‌است (۱ و ۱۷). بنابراین، توسعه مهار کننده‌های مکانیسمهای مقاومت، که گسترش استفاده از آنتی‌بیوتیکهای موجود با خصوصیات به‌خوبی شناخته شده سم‌شناسی و داروشناسی را امکان‌پذیر می‌سازد، از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۵).



شکل ۲- میزان افزایش نسبی تجمع سیپروفلوکساسین در سویه تیپ وحشی (MG1655) و موتانت PM1 در شرایط مختلف بدون تیمار و تیمار شده با PAβNA 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 PAβNA (به عنوان کنترل مثبت) بر پمپ انتشار به خارج دیواره، از طریق سنجش MIC و میزان تجمع درون‌سلولی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین 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 سیپروفلوکساسین را دارد و این توانایی مرتبط با کاهش فعالیت پمپ انتشار به خارج در موتانت مقاوم می‌باشد زیرا افزودن ماده مهارکننده پمپ، PAβNA، 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 PAβNA بود. علت آن شاید مرتبط با این مسئله باشد که عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای دانه گیاه *تلخ‌بیان* است و این مواد با هم میانکش داشته باشند. جدا سازی تک تک

آلکالوئیدها و بررسی اثر آنها به صورت جداگانه بر روی MIC و تجمع سیپروفلوکسازین اطلاعات دقیق تری را فراهم می کند.

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 *اشریشیاکلی* می‌گردد (۱۴).

همچنین نشان داده شده که عصاره حاوی کل آلکالوئیدهای دانه گیاه *تلخ‌بیان* می‌تواند باعث کاهش فعالیت پمپ انتشار به خارج AcrAB-TolC در موتانت مقاوم شود ولی هنگامی که به صورت پیش تیمار و قبل از افزودن 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 کل آلکالوئیدهای 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 می گردد. از آقای بنی‌مهدی کارشناس آزمایشگاه ژنتیک نیز تشکر می‌شود.

منابع

۱- اخوان سپهی ع، شریفیان س، ذوالفقاری م، خلیلی درمنی م (۱۳۹۳) بررسی میزان مقاومت کلی فرمهای روده ای جدا شده از پسابهای صنعتی، خانگی و بخشهایی از تصفیه خانه شهر اراک به فلزات سنگین، مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) ۲۷: ۱۷۸-۱۶۷.

۲- دانشمند ف (۱۳۹۳) استخراج و خالص سازی پپتید ضد میکروبی جدید از گیاه عناب (Ziziphus jujuba) ، مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) ۲۷: ۲۲۳-۲۱۱.

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., Georgopapadakou, 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., Giadinism 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- Kasˇcˇa´kova´S, M.L., Chevalier, J., Re´ fre´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- Küçükboyaci, 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. J.r. (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 ciprofluoxacin 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 rciprofloxacin 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 S*ophora 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 S*ophora alopecuroides* can increase sensitivity to ciprofloxacin in resistant mutants through its effect on membrane efflux pump, AcrAB-TolC.

Key words: Drug resistance, Ciprofloxacin, S*ophora alopecuroides*, spectrofluorometry