مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۲۸/هفته چهارم اردیبهشت ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱/۱۹

مکانیسم‌های جدید مولکولی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها

داریوش شکری[۱]، دکتر محمد ربانی خوراسگانی[۲]

مقاله مروری

چکیده

فقط زمان کوتاهی بعد از کشف آنتی‌بیوتیک‌ها توسط الکساندر فلمینگ، باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش شدند. در کنار مکانیسم‌های قدیمی مقاومت در باکتری‌ها، مکانیسم‌های جدیدی توسط محققین مختلف پیشنهاد شده است. برای مثال، به تازگی، یک اپرون جدید D-آلانین-D-سرین به نام VanL، که باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین می‌شود، گزارش شد. محققین نشان داده‌اند که از دست رفتن پورین Ompk36 در یک سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه، که نقش مهمی در نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل سلول دارد، باعث مقاومت بالا به کاربانم‌ها می‌شود. در سال ۲۰۱۱، برای اولین بار مقاومت کامل به آنتی‌بیوتیک تیگسیکلین گزارش شد که در آن آنزیم منواکسیژناز وابسته به فلاوین TetX باعث هیدروکسیله شدن آنتی‌بیوتیک و در نتیجه، غیر فعال شدن آن شده بود. در سال ۲۰۱۲، یک مقاومت بالا به آنتی‌بیوتیک موپریسین توصیف شد که توسط یک لوکوس جدید به نام mupB واسطه‌گری می‌شد. همچنین، در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد که سویه‌هایی از باکتری انتروکوک فکالیس می‌توانند آنتی‌بیوتیک داپتومایسین را از محل هدف اصلی‌اش، یعنی محل تقسیم دیواره‌ی سلولی، به مکان‌های دیگر منتقل کرده، اثر آن را مهار کنند. یک مکانیسم جدید دیگر در باکتری بولخوردریا پسودومالئی گزارش شد که در آن، ژن هدف آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم (PBP3) به طور کامل حذف شده بود. از طرف دیگر، نقش جدید ریبوسویچ‌ها در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی در سال ۲۰۱۳ گزارش شد. همچنین، مطالعات اخیر نشان دهنده‌ی ارتباط پاسخ SOS و حد نصاب احساس (Quorum sensing) با مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد؛ مکانیسم‌های جدید مقاومت در بیوفیلم‌ها و سلول‌های Persister نیز شناخته شده است. در این مقاله‌ی مروری، به انواع این مکانیسم‌های جدید پرداخته شده است.

واژگان کلیدی: آنتی‌بیوتیک، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ریبوسویچ، پاسخ SOS، حد نصاب احساس، سلول‌های Persister

ارجاع: شکری داریوش، ربانی خوراسگانی محمد. **مکانیسم‌های جدید مولکولی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۸): ۴۲۸-۴۱۰

مقدمه

آنتی‌بیوتیک توسط الکساندر فلمینگ در سال ۱۹۲۸ کشف شد. او در پلیت آگار که استافیلوکوک را رشد داده بود، قسمت‌هایی بدون رشد باکتری را مشاهده کرد (۱). این آزمایش آغاز کشف پنی‌سیلین بود که همراه با بقیه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های کشف شده‌ی بعدی، جان میلیون‌ها انسان و حیوان را از ارگانیسم‌های عامل بیماری‌های عفونی نجات می‌دهد. با این وجود، زمان کوتاهی بعد از کشف پنی‌سیلین در سال ۱۹۴۰، گزارش‌هایی از عدم درمان عفونت با آنتی‌بیوتیک‌ها ارایه شد (۴-۱). برای مثال برخی از سویه‌های استافیلوکوک، دیگر به آنتی‌بیوتیک‌های آن زمان از جمله پنی‌سیلین حساس نبودند که این امر آغاز پدیده‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و سرآغاز نگرانی از

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمد ربانی خوراسگانی
Email: m.rabbani@biol.ui.ac.ir

مقاومت میکروارگانیسم‌ها بود. در شکل ۱ زمان کشف آنتی‌بیوتیک‌ها (بالای شکل) و زمان مقاومت به هر کدام (زیر شکل) نشان داده شده است.

مکانیسم‌های کلاسیک مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دو صورت است (۹-۵).

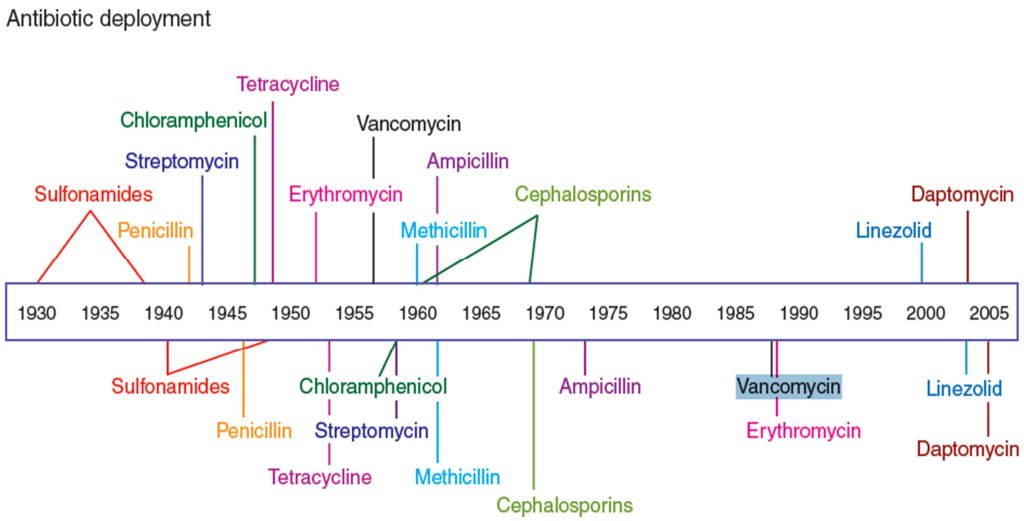
الف) مقاومت ذاتی (یا مقاومت غیر فعال): باکتری‌ها ممکن است به صورت ذاتی به یک آنتی‌بیوتیک مقاوم باشند. این مکانیسم در نتیجه‌ی فرایندهای تطابق کلی است و در ارتباط با یک کلاس آنتی‌بیوتیکی خاص نیست. یک مثال این فرایند در باکتری سودوموناس آئروژینوزا است که غشای خارجی آن به طور ذاتی نفوذپذیری کمی نسبت به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها دارد و به همین دلیل به صورت ذاتی به آن‌ها مقاوم است.

ب) مقاومت اکتسابی یا مقاومت فعال: مکانیسم اصلی مقاومت آنتی‌بیوتیکی است که در اثر فشار تکاملی ویژه برای باکتری اتفاق می‌افتد و باکتری‌هایی که قبل از آن به یک دسته آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند، به آن مقاوم می‌شوند. این مکانیسم‌ها می‌توانند در اثر جهش کروموزومی، پلاسمیدهای قابل انتقال و یا ترانسپوزون‌ها ایجاد و باعث تغییر در ژنوم باکتری‌ها شود. این مقاومت‌ها می‌توانند به صورت عمودی از سلول مادری به سلول دختری منتقل شوند، اما مکانیسم اصلی آن همان انتقال افقی ژن‌های مقاومت می‌باشد که با مکانیسم‌های ترانسفورماسیون (Transformation)، ترانسداکشن (Transduction) و کانجوگاسیون (Conjugation) به انجام می‌رسد.

به طور کلی مکانیسم‌های عمده‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی فعال شامل موارد زیر می‌باشد.

ممانعت از تجمع آنتی‌بیوتیک با کاهش جذب یا افزایش خروج آنتی‌بیوتیک از سلول از طریق پروتئین‌های پمپ کننده‌ی مرتبط با غشا

تغییر جایگاه هدف آنتی‌بیوتیک که باعث کاهش تمایل آنتی‌یوتیک‌ها می‌شود و با جهش جایگاه هدف و یا اصلاح تغییر یافته ی مولکول هدف، به صورت کیفی و یا این تغییر به صورت کمی با افزایش تعداد مولکول های هدف و در نتیجه بی‌اثر شدن آنتی‌بیوتیک به انجام می‌رسد.



شکل ۱. زمان کشف آنتی‌بیوتیک‌ها و ظهور مقاومت به آن‌ها (۱)

این مقاومت از طریق غیر فعال سازی آنتی بیوتیک با هیدرولیز آن و یا اصلاح آن به انجام می‌رسد.

کنار مکانیسم های قدیمی مقاومت در باکتری ها، مکانیسم‌های جدیدی توسط محققین مختلف توصیف شده‌اند که نشان دهنده‌ی توانایی باکتری‌ها در توسعه‌ی راه های جدید مقابله با عوامل مهار کننده‌ی آن‌ها از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. در این مطالعه‌ی مروری با بررسی مطالعات اخیر انجام گرفته، ساز و کار این مکانیسم های جدید مورد بررسی قرار گرفت.

مکانیسم‌های جدید مقاومت در باکتری‌ها

تغییرات ژنتیکی

دسته‌ی ژنی جدید D-Ala-D-Ser (D–آلانین–D–سرین) به نام VanL: در باکتری انتروکوک با تغییر D–آلانین انتهای زنجیره‌ی پپتیدوگلیکان در حال ساخت و جایگزینی آن با اسیدآمینه‌های دیگر، مقاومت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین صورت می‌گیرد و به این ترتیب آنتی‌بیوتیک قادر به شناسایی زنجیره‌ی در حال رشد نیست. جایگزینی این D–آلانین با اسیدهای آمینه‌ی مختلفی در باکتری‌ها انجام می‌شود. در انتروکوک تاکنون ۳ اپرون D-Ala-D-Ser شناسایی شده است که در آن اسیدآمینه‌ی D–سرین به جای D–آلانین می‌نشیند و بنابراین باعث میل ترکیبی پایین ونکومایسین به آن و در نتیجه مقاومت می‌شود. Boyd و همکاران یک اپرون جدید D–آلانین–D–سرین را شناسایی کردند و نام VanL به آن دادند (۱۰). جداسازی این اپرون از یک سویه‌ی انتروکوک بیمار بستری در بیمارستان بعد از دو روز به دست آمد.

مکانیسم جدید مقاومت بالا به کاربانم در باکتری کلبسیلا پنومونیه: کلبسیلا پنومونیه دو پورین اصلی به نام‌های OmpK35 و OmpK36 را در غشای خارجی بیان می‌کند که نقش مهمی در نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل سلول دارند و از دست رفتن یکی یا هر دوی این پورین‌ها، باعث مقاومت بالا به این داروها می‌شود. Sho و همکاران مکانیسم مقاومت به کاربانم را در سویه‌ی MKP4437 این باکتری بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که پورین Ompk36 در آن از بین رفته بود. تعیین توالی مستقیم ژن این پورین نشان داد که یک توالی الحاقی (Insertion sequence یا IS) جدید در چهارچوب بازخواندن این ژن وارد و باعث خاموش شدن آن شده بود (۱۱).

مکانیسم جدید مقاومت به آنتی‌بیوتیک تیگسیکلین (Tigecycline): آنتی‌بیوتیک تیگسیکلین که در سال ۲۰۰۵ معرفی شد، جزء نسل سوم تتراسایکلین‌ها است و در عفونت‌های پوستی کاربرد دارد. این آنتی‌بیوتیک باعث ممانعت از سنتز پروتئین‌های ریبوزومی به ترتیب ۳ و ۲۰ برابر کاراتر از تتراسایکلین و مینوسایکلین می‌شود. آنتی‌بیوتیک تیگسیکلین علیه باکتری‌های مقاوم چند دارویی به خصوص باکتری‌های گرم منفی مانند آسینتوباکتر و همچنین باکتری‌های مقاوم گرم مثبت مثل استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant staphylococcus aureus یا MRSA) و انتروکوک مقاوم به ونکومایسین (Vancomycin resistant enterococc یا VRE) کارا می‌باشد. برای اولین بار مقاومت کامل به این آنتی‌بیوتیک توسط Volkers و همکاران در سال

۲۰۱۱ گزارش شد که در آن آنزیم منواکسیژناز وابسته به فلاوین TetX، باعث هیدروکسیله شدن آنتی‌بیوتیک و بنابراین غیر فعال شدن آن می‌شود (۱۲).

ژن MupB، یک مکانیسم جدید مقاومت به آنتی‌بیوتیک موپریسین در استافیلوکوک اورئوس: آنتی‌بیوتیک موپریسین برای درمان عفونت‌های پوستی و ریشه‌کنی MRSA کاربرد دارد. این آنتی‌بیوتیک باعث ممانعت از سنتز پروتئین باکتریایی با مداخله در عملکرد آنزیم ایزولوسین tRNA سنتتاز و در نهایت مرگ باکتری می‌شود. پیش‌تر ثابت شده بود که مقاومت بالا به این آنتی‌بیوتیک [MIC (Minimum inhibitory concentration) بیشتر از ۵۱۲)] توسط بیان ژن mupA (یا ileS2) صورت می‌گیرد که باعث کد کردن یک آنزیم جایگزین ایزولوسین tRNA سنتتاز می‌شود (۱۳-۱۲). Seah و همکاران مقاومت بالا به این آنتی‌بیوتیک را توصیف کردند که توسط یک لوکوس جدید به نام mupB واسطه‌گری می‌شد و ۶۵/۵ درصد با mupA و ۴۵/۵ درصد با ژن اصلی آنزیم یعنی ileS شباهت داشت (۱۳). با این وجود، همولوژی کم این لوکوس حاوی موتیف‌های حفظ شده در کلاس I آنزیم‌های tRNA سنتتاز می‌باشد و بنابراین عملکرد مشابهی دارد. مطالعات هیبریداسیون ساترن (Southern) نشان داد که این لوکوس بر روی پلاسمید غیر الحاقی حمل می‌شود (۱۳).

GES18 یک آنزیم بتالاکتاماز جدید تجزیه کننده‌ی کاربانم: آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (Extended-Spectrum beta-lactamases یا ESBLs) نوع GES در بسیاری از باکتری‌های گرم منفی شامل خانواده‌ی انتروباکتریاسه و باکتری‌های غیر تخمیری گزارش شده‌اند و جزء کلاس A بسته‌بندی Ambler می‌باشند. اولین آنزیم از این دسته به نام GES1، در سال ۲۰۰۰ و در باکتری کلبسیلا پنومونیه و بعد از آن، ۲۲ واریانت دیگر از آن گزارش شد که تفاوت آن‌ها در ۲ تا ۳ اسیدآمینه بود. Bebrone و همکاران یک واریانت جدید از این باکتری به نام GES18 را در یک سویه‌ی باکتری سودوموناس آئروژینوزا گزارش کردند که تفاوت آن با GES5 در جایگزینی اسیدآمینه‌ی val-80-Ile و تفاوت آن با GES1 در دو جایگزینی Gly-170-Ser و Val-180-Ile بود. اهمیت این واریانت، کمتر حساس بودن آن به آنزیم‌های ممانعت کننده‌ی بتالاکتاماز از قبیل کلاوونات و تازوباکتام نسبت به GES1 بود (۱۴).

مقاومت جدید به آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین در نایسریا گنوره‌آ: آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین هنوز به عنوان اولین انتخاب برای بیماری سوزاک به ویژه در سویه‌های مقاوم به سفیکسیم و سفتریاکسون می‌باشد. این آنتی‌بیوتیک به قسمت 16srRNA ریبوزوم متصل شده، مانع از ادامه‌ی رونویسی می‌شود. Ilina و همکاران یک جهش در ترئونین ۲۴ و تبدیل آن به پرولین را در پروتئین S5 ریبوزوم (RPS5 یا Ribosomal protein S5) گزارش کردند که باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین شد (۱۵).

مکانیسم جدید مقاومت بالا و وسیع‌الطیف به آنتی‌بیوتیک‌ها در نایسریا گنوره‌آ: پمپ خروجی چند دارویی MtrC-MtrD-MtrE در نایسریا گنوره‌آ، باعث مقاومت به چندین عامل آنتی‌بیوتیکی با پمپ آن‌ها مانند ماکرولیدها، بتالاکتام‌ها، دترجنت‌ها و فاکتورهای

ضد میکروبی میزبان به خارج از سلول می‌شود. بیان این اپرون توسط یک مهار کننده به نام MtrC و یک فعال کننده به نام MtrA تنظیم می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده است که جهش در MtrA و یا ناحیه‌ی ادغام آن با اپرون فوق، باعث افزایش مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (۱۲). Ohneck و همکاران نشان دادند که جهش انتقالی C به T 120bp بالادست کدون شروع MtrC که پیش‌تر کشف شده بود، باعث ایجاد توالی حفظ شده در (TATA) ۱۰ و حضور آن سبب تولید یک پروموتور جدید برای رونویسی از اپرون MtrCDE می‌شود. این پروموتور جدید بسیار قوی‌تر از پروموتور نوع وحشی بوده، توسط اثر مهاری MtrO سرکوب نمی‌شود. بنابراین باعث بیان بیش از حد اپرون و مقاومت بالا به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌گردد (۱۶).

مقاومت جدید به آنتی‌بیوتیک داپتومایسین در باکتری انتروکوک فکالیس: داپتومایسین یک لیپوپپتید کاتیونی حلقوی ضد میکروبی است که دیواره‌ی تقسیم غشای سلولی را با وابستگی به کلسیم، مورد هدف قرار می‌دهد و علیه عفونت‌های مقاوم انتروکوک مقاوم به ونکومایسین (VRE) کاربرد دارد. Tran و همکاران نشان دادند که سویه‌هایی از انتروکوک فکالیس می‌توانند آنتی‌بیوتیک را از محل هدف اصلی‌اش یعنی محل تقسیم دیواره‌ی سلولی به مکان‌های دیگر منتقل کرده، اثر آن را مهار کنند. مکانیسم مقاومت به این صورت است که حذف یک اسیدآمینه در پروتئین ترانس ممبران LiaF که جزیی از سیستم تنظیمی سه جزیی به نام LiaFSR است و در یکدست‌سازی غشای سلولی نقش دارد، باعث به هم ریختگی میکرودومین‌های غنی از کاردیولیپین غشای پلاسمایی می‌شود. بنابراین آنتی‌بیوتیک از هدف خود دور و باکتری مقاوم می‌گردد (۱۷). مطالعات این محققین نشان داد که مقاومت کامل به داپتومایسین، نیازمند جهش‌های بیشتر در آنزیم‌های مسؤول سنتز غشای سلولی از جمله گلیسرو فسفریل دی‌استر، فسفو دی‌استراز و کاردیولیپین سنتتاز است که باعث تغییر محتوای فسفولیپیدی غشای سلولی می‌شود (۱۷).

آنزیم کاربانپماز متالوبتالاکتاماز جدید دهلی (New Delhi Metallo-betalactamase یا NDM): آنزیم‌های NDM جزء آنزیم‌های هیدرولیز کننده‌ی کاربانپم‌ها هستند که اولین نوع آن به نام NDM1 در سال ۲۰۰۸ در یک سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه و از بیماری که در یکی از بیمارستان‌های شهر دهلی هند بستری بود، جداسازی گردید (۱۸). این آنزیم‌ها جزء آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز هستند که باعث مقاومت بسیار بالا به اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله کاربانپم‌ها می‌شوند. بعد از آن چندین نوع دیگر شناسایی شد. در مطالعه‌ی Cuzon و همکاران، جدیدترین نوع آنزیم‌های NDM (به نام NDM-7) از یک بیمار در باکتری E.coli (Escherichia coli) شناسایی شد که به تمام آنتی‌بیوتیک‌های تست شده به جز آمیکاسین، تیگسیکلین، فسفومایسین و کلرامفنیکل مقاوم بود (۱۹).

FIM-1 یک متالوبتالاکتاماز جدید: Pollini و همکاران نوع جدیدی از متالوبتالاکتاماز به نام FIM-1 را شناسایی و معرفی کردند که از یک سویه‌ی بالینی سودوموناس آئروژینوزا جداسازی گردید. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که این ژن شباهت ۴۰ درصدی به آنزیم‌های NDM دارد. ژن این آنزیم به نام bla_{FIM-1}

در کروموزوم الحاق شده بود و با عنصرهای شبیه ISCR19 که در گرفتن و متحرک‌سازی این ژن نقش دارد، ارتباط داشت (۲۰).

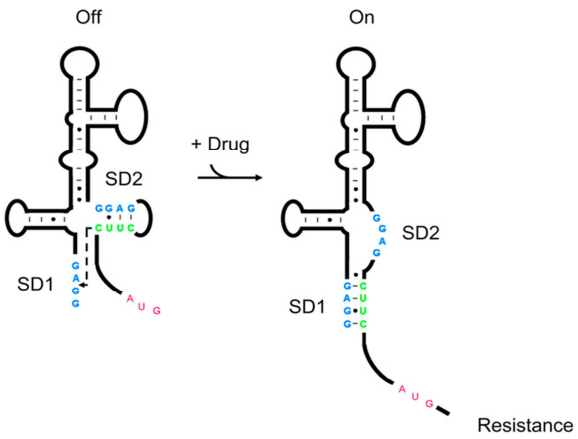
از بین رفتن کامل ژن به عنوان یک مکانیسم جدید مقاومت آنتی‌بیوتیکی: همان‌طور که اشاره شد، جهش در ژن‌های هدف آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند باعث کاهش میل ترکیبی و در نتیجه کاهش مقاومت نسبت به آن‌ها گردد. تصور این‌که باکتری‌ها یک ژن هدف آنتی‌بیوتیک خاصی را به طور کامل حذف کنند، بعید به نظر می‌رسد؛ چرا که اغلب این هدف‌ها جزء ژن‌های ضروری برای باکتری‌ها هستند که در فیزیولوژی آن‌ها نقش دارد. Torok و همکاران در دانشگاه کمبریج انگلستان، مکانیسم جدیدی را در باکتری بولخوردریا پسودومالئی (عامل بیماری مشمشه) گزارش کردند که در آن ژن هدف آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم یعنی پروتئین اتصالی پنی‌سیلین ۳ (PBP3) حذف شده بود و باکتری‌های حساس به این آنتی‌بیوتیک به باکتری‌های مقاوم تبدیل شده بودند، اما همان‌طور که انتظار می‌رفت، این باکتری‌ها توانایی رشد در محیط‌های قبلی را نداشتند و مسؤول پایداری عفونت در بیماران تحت درمان با سفتازیدیم بودند (۲۱). مطالعه‌ی آنان نشان دهنده‌ی حذف ژنومی بزرگ ۱۵۰ kb (۱۵۰ کیلو بازی) بود که در محل ژن penA (کد کننده‌ی PBP3) ایجاد شد. این حذف باعث تغییر مورفولوژی باکتری از حالت باسیل گرم منفی به حالت رشته‌ای شد که به دلیل اهمیت پروتئین PBP3 در ساخت دیواره‌ی سلولی می‌باشد. همچنین باکتری فوق در محیط کشت‌های معمولی قبلی رشد نمی‌کرد و فقط در محیط کشت غنی Ashdown بعد از ۴۸ ساعت به صورت کلنی‌های بسیار ریز رشد کرد. همچنین در مقایسه با باکتری‌های وحشی که باسیلی و متحرک بودند، جهش یافته‌ها به صورت فیلامنت‌های حاوی تیغه‌ی متصل به هم بدون حرکت و بدون توانایی تقسیم شدن مشاهده شد (۲۱).

Riboswitch به عنوان یک مکانیسم جدید مقاومت علیه آمینوگلیکوزیدها: مکانیسم Riboswitch به عنوان یک مکانیسم جدید تنظیمی ژن به طور کامل شناخته شد. این سیستم در واقع قسمتی از mRNA به نام آپتامر است که با اتصال مولکول‌های کوچک به آن، باعث تنظیم تولید پروتئین mRNA می‌گردد (بنابراین ژن خاموش یا روشن می‌شود). Jia و همکاران یک Riboswitch متصل شونده به آمینوگلیکوزید را در باکتری‌ها کشف کردند که با اتصال آنتی‌بیوتیک به آن، از حالت خاموشی به حالت روشن درمی‌آید و با این عمل، mRNA روشن می‌شود و به دنبال آن آنزیم‌های تغییر دهنده و غیر فعال کننده‌ی آنتی‌بیوتیک (یعنی آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز و آمینوگلیکوزید آدنیل ترانسفراز) فعال شده، باکتری مقاوم می‌گردد (۲۲). همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، قسمت SD2 محل اتصال mRNA به ریبوزوم می‌باشد که توسط توالی مکمل آن غیر فعال شده است، اما با اتصال آنتی‌بیوتیک در شکل mRNA تغییر ایجاد می‌شود و این آنتی SD2 به SD1 متصل می‌گردد. بنابراین SD2 آزاد شده، mRNA می‌تواند ترجمه شود.

نقش پاسخ SOS در مقاومت آنتی‌بیوتیکی

ایجاد پاسخ SOS و مقاومت آمینوگلیکوزیدها، فلوروکوئینولون‌ها و بتالاکتام‌ها: ترمیم SOS یکی از راهکارهای باکتری‌ها هنگام مواجهه با آسیب‌های

بزرگ DNA می‌باشد و به دلیل این‌که باعث افـزایش فراوانی جهش می‌گردد، به آن ترمیم مستعد خطـا نیـز گفته می‌شود. این ساز و کار القـا، محصـولات دو ژن LexA و RecA را درگیـر مـی‌کنـد. در ایـن میـان، پروتئین RecA به زنجیره‌ی تک DNA متصـل شـده، باعث تجزیه‌ی پروتئین LexA (که به عنوان سرکوبگر پاسخ SOS است) و راه‌اندازی پاسخ SOS مـی‌شـود. این پاسخ در اثر عوامل آسیب‌رسـان بـه DNA ماننـد UV (Ultraviolet) و یـا آنتـی‌بیوتیـک‌هـایی ماننـد فلوئوروکوئینولون‌ها، آمینوگلیکوزیـدها و بتالاکتـام‌هـا فعال می‌شود (۲۳). نتایج تحقیـق Miller و همکـاران در دانشگاه استنفورد، نوع جدیـدی از مکانیسـم‌هـای دفاعی باکتری‌ها را علیه آنتی‌بیوتیک‌ها گـزارش کـرد. این مکانیسـم دفـاعی از سیسـتم انتقـالی سـیگنال دو جزیی استفاده کرده، پاسخ SOS را فعال مـی‌نمایـد و در نتیجه باعـث ممانعـت مـوقتی تقسـیم سـلولی در مواجهه با آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و محدود سـاختن اثرات آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (۲۳).



شکل ۲. Riboswitch به عنوان یک مکانیسم جدید مقاومت علیه آمینوگلیکوزیدها (۲۲)

مطالعات قبلی نشان داده بود که پروتئین DpiA به عنوان عنصر تأثیرگذار بر سیستم دو جزیـی DpiBA، نه تنها باعـث تنظـیم رونویسـی، بلکـه باعـث تنظـیم همانندسازی DNA و تقسیم آن با توانایی غیر معمول برای اتصال بـه تـوالی‌هـای غنـی از AT در ناحیـه‌ی همانندســـازی کرومـــوزوم E.coli و برخـــی از پلاسمیدهای ویژه می‌شود (۲۴-۲۳). اتصـال Dpi بـه این نـواحی باعـث ممانعـت از اتصـال پـروتئین‌هـای DnA و DnB و جلوگیری از همانندسازی می‌گـردد. این جلوگیری باعث القای پاسخ SOS شده، به دنبـال آن تقسیم سلولی متوقف می‌شود. Miller و همکـاران در مطالعـه‌ی خـود بـه ایـن نتیجـه رسـیدند کـه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بیان DpiBA را بـه میـزان ۴ برابر افزایش می‌دهد. پاسخ SOS به دنبال این افزایش فعال گردیده، تقسیم سلولی به طـور موقـت متوقـف می‌شود و از آن‌جایی که عملکـرد آنتـی‌بیوتیـک‌هـای بتالاکتام بر روی سلول‌های فعال مـی‌باشـد، عملکـرد آن‌ها تأثیری ندارد (۲۳).

نقش پاسخ SOS در کنترل نوترکیبی اینتگرون‌ها و مقاومت آنتی‌بیـوتیکی: اینتگـرون‌هـا عناصـر ژنتیکـی باکتریایی هستند کـه توانـایی الحـاق و بیـان ژن‌هـای بدون پروموتـور را دارنـد. دو دسـته از اینتگـرون‌هـا توصیف شده‌انـد. دسـته‌ی اول شـامل اینتگـرون‌هـای متحرک (مقاوم) (Mobile integrons یا MI) کـه بـر روی ترانسپوزوم‌هـا قـرار گرفتـه‌انـد و دارای ۲ تـا ۸ کاسـت کـد کننـده‌ی مقاومـت بـه طیـف وسـیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشـند. دسـته‌ی دوم اینتگـرون‌هـای کرومـــوزومی (Chromosomal integrons یـــا CI) هستند که ممکن اسـت شـامل هـزاران کاسـت ژنـی باشند و اغلب آن‌ها عملکردشان ناشناخته است (۲۴). همه‌ی اینتگرون‌ها شـامل یـک ژن اینتگـراز (Inter I)

هستند که باعث ادغام ژن‌های خارجی در ناحیه‌ی ATTI و خروج تصادفی یا بازسازی دوباره‌ی کاست‌های ژنی نزدیک می‌شود. بر خلاف اهمیت این عناصر در کسب و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، اطلاعات کمی در مورد دینامیک و تنظیم کنترل آن‌ها وجود دارد.

Guerin و همکاران با بررسی نواحی بالادست چندین ژن اینتگراز MI و CI، توانستند ناحیه‌ی موتیف اتصالی پروتئین LexA در باکتری ویبریو کلرا را کشف کنند و مشاهده نمودند که پروتئین LexA به طور ویژه و اختصاصی به این ناحیه متصل می‌شود (۲۴). همچنین آن‌ها بیان اینتگراز در CI ویبریو کلرا و یک کلاس I MI در E.coli را تجزیه و تحلیل کردند که نتایج حاکی از بیان ژن‌ها توسط القای پاسخ SOS بود. القای SOS باعث کنترل نوترکیبی کاست‌های اینتگرونی می‌گردد و از آن‌جایی که LexAهای بتالاکتام، فلوئوروکوئینولون‌ها و تری‌متوپریم باعث القای پاسخ SOS می‌شوند، القای این پاسخ باعث افزایش نوترکیبی کاست‌های اینتگرون و در نتیجه ایجاد مقاومت به این LexAها می‌شود (۲۴).

مطالعات انجام شده (۲۴-۲۳) به طور قطع بیان نمود که پاسخ SOS باعث ایجاد مقاومت با القای نوترکیبی اینتگرون‌ها می‌شود، اما این امر به صورت بالینی و تجربی نشان داده نشد تا این‌که Hocquet و همکاران اولین شاهد برای اثبات این مورد را در بیماران بستری در بیمارستان گزارش کردند (۲۵). آن‌ها مکانیسم جدید مقاومت به LexA در اینتگرون‌ها را بر اساس الحاق یک عنصر ژنتیکی به نام کاست gcuF1 و در بالادست کاست bla_{OXA-28} حاصل از یک اینتگرون که یک آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف را کد می‌کرد، شناسایی کردند. این توالی الحاقی یک پروتئین ادغامی به نام GCUF1-OXA-28 را تولید می‌کرد که باعث مقاومت یک سویه‌ی سودوموناس آئروژینوزا (که پیش‌تر به سفتازیدیم حساس بود) به سفالوسپورین‌های نسل سوم از جمله سفتازیدیم شد. در مطالعه‌ی آنان، آنتی‌بیوتیک مترونیدازول باعث القای پاسخ SOS و شروع پدیده‌ی بیان اینتگراز و ایجاد نوترکیبی ذکر شده گردید (۲۵).

مکانیسم‌های جدید مولکولی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در سلول‌های Persister

در یک جمعیت میکروبی تعداد بسیار کمی از سلول‌های Persister (۰/۰۰۱ تا ۰/۱ درصد) که به عنوان سلول‌های نهفته Persister شناخته می‌شوند، وجود دارند. این سلول‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند (۲۶). سلول‌های Persister که ۷۰ سال پیش شناخته شدند، هنوز به عنوان عوامل ایجاد عفونت‌های مزمن شناخته می‌شوند؛ چرا که هر چند این سلول‌ها حالت نهفته دارند، اما می‌توانند در شرایط مناسب (به عنوان مثال بعد از برداشت آنتی‌بیوتیک از محیط کشت) دوباره به سلول‌های فعال سالم تبدیل شوند (۲۷).

بر اساس یک فرضیه‌ی قدیمی مورد قبول، علت این‌که سلول‌های Persister حالت غیر فعال و نهفته دارند، آن است که اغلب فعالیت‌های متابولیسمی آن‌ها در سطح بسیار کمی انجام می‌شود و از آن‌جایی که بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی سلول‌های فعال و نه غیر فعال تأثیر می‌گذارند، بنابراین سلول‌ها به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند. در واقع، در ژن‌های

درگیر در مسیرهای بیوسنتزی و متابولیکی این سلول‌ها، تولید انرژی و ژن‌های غیر ضروری در سطح بسیار پایینی بیان می‌شود و عده‌ای بر این باور هستند که این دلیل نمی‌تواند تنها دلیل مقاومت آن‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها باشد (۲۸-۲۷).

در مطالعه‌ی Shah و همکاران سلول‌های خفته‌ای جداسازی شد که قدرت بیان پروتئین سبز فلورسنت (Green fluorescent protein یا GFP) را تحت کنترل پروموتور وابسته به رشد(rrnBP1) داشتند. پژوهش آنان اولین مطالعه‌ای بود که فرضیه‌ی قبلی (خفته بودن تنها دلیل مقاومت این سلول‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها است) را زیر سؤال برد (۲۸). علاوه بر این، مطالعه‌ی Gefen و همکاران گزارش کرد که برخی از سلول‌های خفته E.coli، توانایی ترجمه در سطحی بالاتر از حالت خفته را دارند و این سلول‌ها به طور کامل خفته نیستند (۲۹). مطالعات دیگر (۳۲-۳۰) نشان داد که علاوه بر دلیل خفته بودن آن‌ها برای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، مکانیسم‌های فعال دیگری در این باکتری‌ها وجود دارند که در ادامه به آن‌ها اشاره شده است.

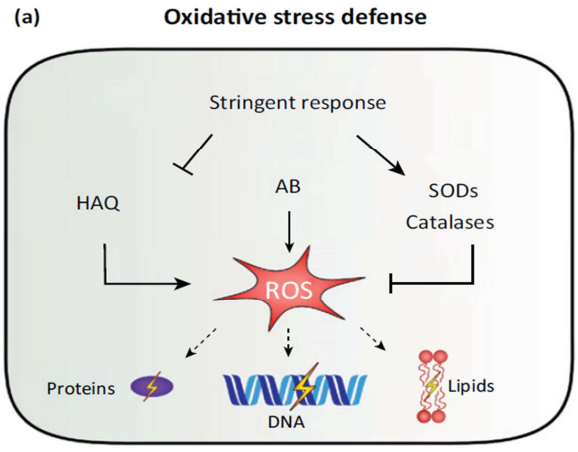
الف. نقش سرکوب استرس اکسیداتیو در مقاومت سلول‌های Persister

سلول‌های ماکروفاژ، فرآورده‌های اکسیژن فعال واکنش دهنده (Reactive oxygen species یا ROS) و نیتروژن فعال واکنش دهنده (RNS یا Reactive nitrogen species) مانند سوپراکسیداز و نیتریک اکسید را تولید می‌کنند. این فرآورده‌ها باعث القای رگولون‌های SoxRS و OxyR در باکتری‌ها می‌گردد. ژن‌های کنترل شونده توسط این رگولون‌ها باعث غیر فعال شدن اکسیدانت‌های فعال شده، تحریک شروع مکانیسم تعمیر می‌شود (به طور مثال با تولید کاتالاز). Wu و همکاران با بررسی توانایی استرس اکسیداتیو نشان دادند که انکوباسیون سلول‌ها در این حالت، باعث افزایش بسیار زیاد تعداد سلول‌های تیمار شده با آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکوئینولون شد. این سلول‌ها که در تیمار با فلوروکوئینولون‌ها زنده مانده بودند، توانایی مقاومت بالایی در برابر بقیه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های تست شده داشتند. ماده‌ی PQ باعث القای SoxRS می‌شود و این رگولون در تحریک تولید آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase یا SOD) نقش دارد، بنابراین باعث مهار اثر آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکوئینولون‌ها می‌شود و یکی از مکانیسم‌های اثر آن، تولید محصولات سمی اکسیژن از جمله سوپراکسید می‌باشد (۳۰).

Shatalin و همکاران بیان کردند که گاز H_2S (سولفید هیدروژن) در باکتری‌هایی مانند E.coli، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوک اورئوس باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌گردد و مکانیسم عملکرد آن، کاهش میزان آهن فروس (Fe^{2+}) می‌باشد. این یون باعث تولید رادیکال فعال هیدروکسیل (OH) طی واکنش فنتون می‌شود و بنابراین با کاهش آن، تولید رادیکال کشنده‌ی OH هم کاهش می‌یابد. عملکرد دیگر این گاز (H_2S)، تحریک تولید آنزیم‌های SOD و کاتالاز و کاهش استرس اکسیداتیو و در نتیجه کاهش اثرات آنتی‌بیوتیک‌های باکتریسیدال می‌باشد (۳۱).

مکانیسم انجام شده‌ی دیگر توسط Nguyen و همکاران بر روی سلول‌های Persister سودوموناس

آئروژینوزا انجام شد. مطالعات آنان تأیید کرد که مکانیسم محدودیت رادیکال‌های اکسیژن از جمله رادیکال هیدروکسیل، می‌تواند باعث مقاومت سلول‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها شود. این عمل با همان مکانیسم تولید کاتالاز و SOD و همچنین، سرکوب تولید مولکول تحریک کننده‌ی اکسیدانت‌ها [۴- هیدروکسی-۲ آلکالی کوئینولین (HAQ یا 4-hydroxy-2-alkylquinolines)] انجام می‌گیرد (۳۲). همه‌ی مطالعات صورت گرفته در چند سال اخیر (۳۲-۳۰)، نقش سرکوب استرس اکسیداتیو در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را اثبات می‌کند (شکل ۳).



شکل ۳. نقش سرکوب استرس اکسیداتیو در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها (۲۶)

ب. القای تشکیل سلول‌های Persister توسط آنتی‌بیوتیک‌ها

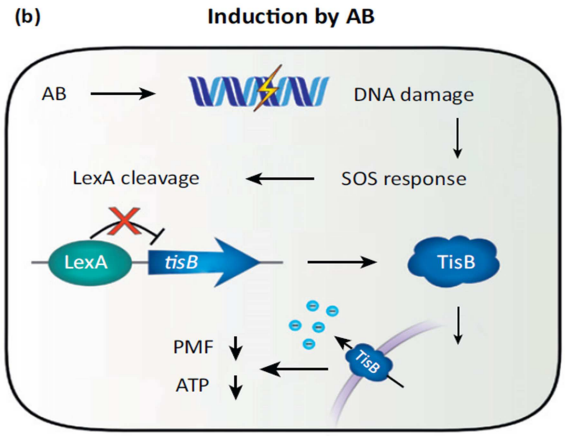
سلول‌های Persister در یک جمعیت میکروبی که تحت آنتی‌بیوتیک قرار نگرفته‌اند، نیز وجود دارد. در این خصوص، مطالعه‌ی Dorr و همکاران نشان داد که ایجاد این سلول‌ها توسط آنتی‌بیوتیک می‌تواند القا شود. آنان بیان کردند که سلول‌های Persister باکتری E.coli به طور فعالانه‌ای توسط تیمار سلول‌ها با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین که باعث آسیب DNA و در نتیجه فعال شدن پاسخ ترمیمی SOS می‌گردد، تولید می‌شود. این نتایج از آن‌جا حاصل شد که تشکیل سلول‌های Persister به طور معنی‌داری در سلول‌های جهش یافته‌ای که در ایجاد پاسخ SOS در مقابل آنتی‌بیوتیک ناتوان بودند، کاهش یافته بود. همچنین افزایش معنی‌داری در تعداد سلول‌های Persister در جهش یافته‌های LexA که در آن‌ها پاسخ SOS به طور پیوسته‌ای فعال باقی می‌ماند، مشاهده شد (۳۳).

القای وابسته به SOS حالت نهفتگی، به افزایش بیان توکسین tisB در باکتری E.coli وابسته است. این توکسین با تولید آنتی‌توکسین istR-1 و توسط یک RNA آنتی‌سنس که نقش ضد آن را دارد، غیر فعال می‌شود. مکانیسم افزایش سلول‌های Persister به این ترتیب است که با فعال شدن پاسخ SOS، سرکوب وابسته به LexA توکسین tis B حذف می‌شود و از آن‌جایی که بیان istR-1 تحت کنترل LexA نیست، نسبت بیان mRNA tisB به istR-1 افزایش می‌یابد و باعث تجمع tisB می‌گردد. این توکسین که یک پپتید هیدروفوبیک کوچک است، به غشای داخلی وارد شده، باعث اختلال در نیروی محرکه‌ی پروتون (Proton motive force یا PMF) می‌شود. این امر باعث کاهش سطح ATP (Adenosine triphosphate)، رفتن سلول‌ها به حالت نهفتگی، ایجاد سلول‌های Persister و در نهایت ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شود (شکل ۴).

ج. ایجاد سلول‌های Persister مقاوم به آنتی‌بیوتیک توسط مدل توکسین- آنتی‌توکسین

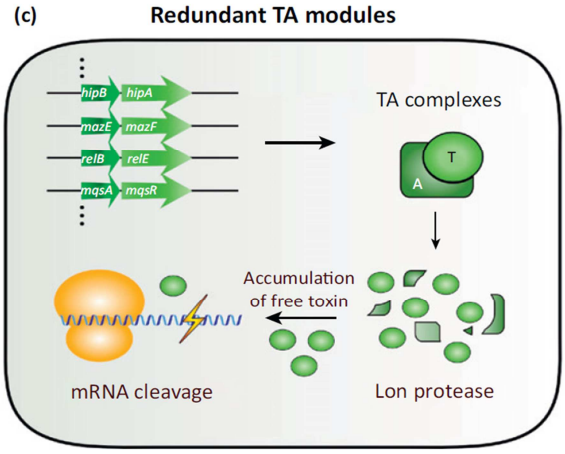
توکسین hipA قسمتی از مدل توکسین- آنتی‌توکسین

(Toxin-Antitoxin یا TA) hipA است و به عنوان اولین ژن درگیر در تشکیل سلول‌های Persister شناخته می‌شود. البته مدل‌های TA مختلف دیگری نیز در تشکیل این سلول‌ها نقش دارند. تحقیقات نشان داده است که حذف ژن این توکسین، به تنهایی نمی‌تواند از تولید سلول‌های Persister ممانعت کند. هرچند پیش‌تر کشف شده بود که عملکرد این توکسین‌ها، حذف هدف‌های آنتی‌بیوتیک‌ها در سلول است و به این ترتیب باعث مهارسازی اثر آنتی‌بیوتیک می‌شوند، اما مکانیسم‌های دقیق آن به خوبی شناخته نشده بود.



شکل ۴. القای تشکیل سلول Persister توسط آنتی‌بیوتیک (۲۶)

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که تجزیه‌ی آنتی‌توکسین‌ها باعث غیر فعال‌سازی توکسین‌ها و در نتیجه آزادسازی و عملکرد آن بر روی هدف‌های آنتی‌بیوتیک‌ها و غیر فعال‌سازی آن‌ها می‌شود. همچنین گزارش شد پروتئاز Lon که تولید آن توسط آلارمون ppGpp (p) تحریک می‌شود، باعث غیر فعال‌سازی و تجزیه‌ی این آنتی‌توکسین‌ها می‌گردد؛ چرا که با حذف این پروتئاز، سلول‌های Persister در باکتری E.coli حساسیت بالایی به آنتی‌بیوتیک از خود نشان می‌دهند و حذف می‌شوند و بر عکس افزایش تولید آن، باعث افزایش چشمگیر در تعداد سلول‌های Persister می‌شود (۲۶) (شکل ۵). مطالعه‌ی اخیر Tripathi و همکاران نشان داد که بیان سیستم TAGcdAB بر اساس پلاسمید F، در ایجاد سلول‌های Persister در باکتری E.coli نقش دارد و برای اولین بار یک فاکتور منتقل کننده‌ی مقاومت Persister در باکتری‌ها به اثبات رسید (۳۴).



شکل ۵. ایجاد سلول‌های Persister مقاوم به آنتی‌بیوتیک توسط مدل توکسین- آنتی‌توکسین (۲۶)

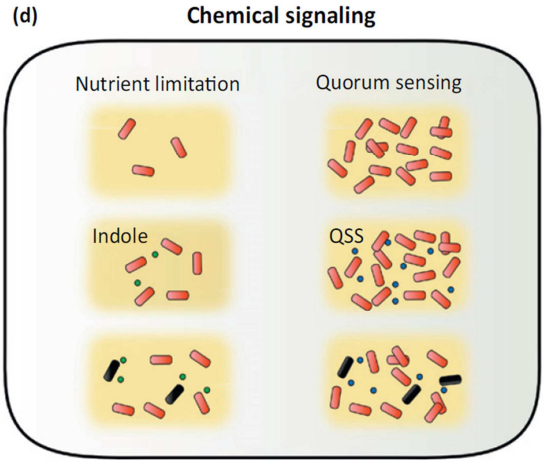
د. القای حالت خفتگی توسط سیگنال‌های شیمیایی

پدیده‌ی حد نصاب احساس (Quorum sensing یا QS) به باکتری‌ها اجازه می‌دهد که تعداد سلول‌ها و تغییرات محیطی را از طریق تشخیص مولکول‌های سیگنالی خاص به انجام رسانند. با این‌که تحقیقات انجام شده بر روی باکتری E.coli نشان دهنده‌ی ارتباط بین این پدیده و سلول‌های Persister نبود، اما مطالعه‌ی Moker و همکاران بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا بیان کرد که تعداد سلول‌های

Persister در پاسخ به سیگنال‌های وابسته به QS از جمله پپوسیانین و N-۳-اکسودودکانویل-L-هموسرین لاکتون افزایش می‌یابد (۳۵).

در تحقیق Leung و Levesque گزارش شد که پدیده‌ی خفتگی در باکتری استرپتوکوک موتانس توسط فرمون QS که همان پپتید تحریک کننده ی مستعدکنندگی (Competence-Stimulating peptide یا CSP) است، تحریک می‌شود و باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک افلوکساسین می‌گردد (۳۶). همچنین سیستم QS فعال شده، باعث بیان چندین کلاس II باکتریوسین‌ها می‌شود که این پپتیدهای ضد میکروبی با اختلال در PMF باکتری‌های مشابه، منجر به مرگ آن‌ها می‌شوند (۳۶). در مطالعه‌ی آنان باکتریوسینی به نام Mutacin V تولید شد. Leung و Levesque نشان دادند که سیستم توکسین-آنتی‌توکسین MazEF و RdBE، تعداد سلول‌های Persister را افزایش می‌دهد. همچنین، آن‌ها نقش بیوفیلم در تشکیل سلول‌های Persister و مقاومت به آنتی‌بیوتیک افلوکساسین در بیوفیلم‌های تشکیل شده توسط باکتری استرپتوکوک موتانس را تأیید کردند و نشان دادند که سلول‌های مسن‌تر این باکتری (۷۲ ساعته) در بیوفیلم تولیدی، به دلیل شرایط سخت باکتری‌های کهنه (مانند محدودیت غذایی) تعداد بالاتری از سلول‌های خفته را تولید می‌کنند. این سلول‌ها توسط فرمون تحریک می‌شوند و با ورود به غشای پلاسمایی باکتری‌های مشابه، باعث کاهش PMF و ATP و در نتیجه وارد شدن عده‌ای از آن‌ها به حالت خفتگی و تبدیل شدن به سلول‌های Persister می‌شود.

Vega و همکاران تأثیر ماده‌ی اندول در تحریک تولید سلول‌های Persister را در باکتری E.coli تأیید نمودند. اندول جزء مولکول‌های سیگنالینگ باکتریایی است و در نتیجه‌ی محدودیت مواد غذایی در طی فاز سکون تولید می‌شود. همچنین، باعث افزایش تعداد سلول‌های خفته و مقاومت آن‌ها به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی می‌گردد. تحقیق Vega و همکاران نشان داد که مکانیسم عمل اندول در این مورد به فعال‌سازی رگولون SoxR و در نتیجه سرکوب استرس اکسیداتیو برمی‌گردد (۳۷) (شکل ۶).



شکل ۶. القای حالت خفتگی توسط سیگنال‌های شیمیایی (۲۶)

ارتباط پدیده‌ی QS و مقاومت آنتی‌بیوتیکی

به علت مقاومت روزافزون نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، محققین به فکر راهکارهای تازه‌ای هستند که به جای هدف‌گیری مستقیم میکروارگانیسم‌ها، به روش‌های غیر مستقیم مانند تغییر اختصاصی در ویرولانس باکتریایی و هدف‌گیری تنظیم کننده‌های کلیدی سیستم‌های تنظیمی که در بیان فاکتورهای ویرولانس نقش دارند، با میکروارگانیسم‌ها و ایجاد مقاومت در آن‌ها مقابله کنند (۳۸). یکی از این سیستم‌های تنظیمی هدف، پدیده‌ی QS است که به نام ارتباط

سلول- سلول باکتریایی هم شناخته می‌شود. این پدیده که اولین بار در باکتری آبزی ویبریو فیشری و سپس در بسیاری از باکتری‌های گرم منفی دیگر شناخته شد، از یک مولکول به نام آسیل هموسیرین لاکتون (Acyl homoserine lactone یا AHL) به عنوان مولکول سیگنال استفاده می‌کند. LuxI در ویبریو فیشری توسط LueR سلول شناسایی و بعد از آن، تغییرات لازم در ژن‌های هدف راه‌اندازی می‌شود. علاوه بر گرم منفی‌ها، این سیستم در گرم مثبت‌ها مانند باکتری‌های باسیلوس سابتیلیس، استرپتوکوک پنومونیه و استافیلوکوک اورئوس نیز شناسایی شده است. صفت‌های باکتری که تحت کنترل سیستم QS هستند، بسیار متنوع و شامل بیولومینسانس (تولید و نشر نور)، کانجوگاسیون (ترکیب)، ندولاسیون، سوارمینگ، اسپورزایی، تولید آنتی‌بیوتیک، تشکیل بیوفیلم و نیز بیان فاکتورهای ویرولانس مانند آنزیم‌های لیتیک، توکسین‌ها، سیدروفورها و نیز مولکول‌های چسبندگی و اتصال می‌باشد.

اولین استراتژی برای مقابله‌ی باکتری از طریق پدیده‌ی QS، استفاده از ترکیباتی جهت انتقال تشخیص مولکول‌های سیگنال بود. به عنوان مثال جلبک قرمز دریایی (Delisea pulchra) مولکول‌های هالوژنه فورانوز را که می‌تواند علیه تنظیم کننده‌های رونویسی QS وارد عمل شود، تولید می‌کند (۳۸). راهکار دوم، استفاده از مولکول‌هایی برای غیر فعال کردن خود مولکول‌های سیگنال بود (مولکول‌های AHL) که شامل دو دسته از آنزیم‌ها به نام AHL لاکتوناز و AHL آسیلاز بود. استفاده از این راهکارها، نگرانی ایجاد مقاومت در اثر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سالم را کاهش داد، اما مطالعات اخیر تأیید نمود که باکتری‌ها علیه این راهکارها ممکن است از راهکارهای جایگزینی برای خود استفاده کنند که مهمترین آن، استفاده از ژن‌های مرکزی QS متنوع بود. به عنوان مثال مطالعات مختلف (۴۳-۳۹، ۳۶) وجود سیگنال‌های متفاوت AHL حتی در بین باکتری‌های یک گونه‌ی مشخص را نشان می‌دهد (جدول ۱).

Wilder و همکاران در پژوهش خود به این نتیجه رسیدند که ۲۸ مولکول سیگنال مختلف می‌توانند در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا تولید شود و بدتر از آن این‌که هیچ مولکول سیگنالی در ۸ سویه‌ی تست شده از این باکتری تولید نمی‌شد که در عمل، استفاده از ممانعت کننده‌های این سیگنال‌ها را برای مبارزه با این سویه‌ها بی‌اثر می‌کرد. علاوه بر این، باکتری‌ها به راحتی می‌توانند از گیرنده‌های سیگنالی مختلفی استفاده کنند (۴۴) و ممانعت کننده‌های QS را به کمک بیان بسیار زیاد (Overexpressing) ژن‌های گیرنده‌ی مولکول سیگنال دور بزنند. در نهایت مطالعه‌ی Koch و همکاران گزارش نمود که باکتری‌ها با یک جهش نقطه‌ای در جایگاه اتصال مولکول LuxR، باعث عدم اتصال مولکول ممانعت کننده‌ی QS به جایگاه آن و در نتیجه مقاومت باکتری به آن می‌شوند (۴۰).

ژن pvdQ در باکتری سودوموناس آئروژینوزا دو نقش اساسی دارد؛ یکی تولید آنزیم آمیلاز که باعث هیدرولیز HSL (Hormone-sensitive lipase) این باکتری می‌شود و دوم، در حرکت سوارمینگ باکتری نقش دارد که این حرکت در هنگام افزایش تعداد باکتری‌ها اتفاق می‌افتد. مطالعات نشان داده است که تمایز حرکت سوارمینگ در این باکتری، باعث تحریک افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌شود و ممکن است نقش مهمی را در مقاومت کلی

جدول ۱. وجود سیگنال‌های متفاوت AHL (Acyl homoserine lactone) در بین باکتری‌های یک گونه (۳۸)

نام باکتری	مولکول سیگنالی	تعداد مولکول‌ها
Aeromonas hydrophila	BHL و HHL	۴
Aeromonas salmonicida	BHL و HHL	۷
Agrobacterium vitis	long-chain AHLs	۱۲
Burkholderia vietnamiensis	HHL	۵
Erwinia amylovora	AI-2	۷
Fusobacterium nucleatum	AI-2	۴
Photobacterium phosphoreum	OH-OHL	۳
Porphyromonas gingivalis	AI-2	۶
Prevotella intermedia	AI-2	۷
Pseudomonas aeruginosa	OdDHL	۲۸
Vibrio campbellii	CAI-1	۷
	AI-2	۷
	OH-BHL	۷
Vibrio harveyi	CAI-1	۵
	AI-2	۵
	OH-BHL	۵
Vibrio salmonicida	AHL	۸
Vibrio vulnificus	AI-2	۱۶

BHL: N-butanoyl-L-homoserine lactone; HHL: N-hexanoyl-L-homoserine lactone; OH-OHL: N-(3-hydroxyoctanoyl)-L-homoserine lactone; OdDHL: N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone; OH-BHL: N-(3-hydroxybutanoyl)-L-homoserine lactone

باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها ایفا کند (۴۵). پژوهش انجام شده توسط Wang و همکاران نشان داد که ژن pvdQ نقش مهمی را در ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از طریق تمایز سلول‌های سوارم ایفا می‌کند. بدین ترتیب مطالعه‌ی Vang و همکاران، دو نقش اصلی این ژن که پیش‌تر ثابت شده بود را به یکدیگر ارتباط داد. ژن pvdQ آنزیم تجزیه کننده‌ی مولکول سیگنالینگ QS (AHL) را تولید می‌کند و باعث به تعادل رسیدن تعداد مولکول‌های سیگنالینگ می‌شود که بعد از این تعادل، پدیده‌ی QS اتفاق می‌افتد و سلول‌ها سوارمینگ را انجام می‌دهند. همچنین مطالعات آنان نشان داد که این ژن باعث کاهش نفوذپذیری غشای خارجی باکتری و اثر بر پمپ‌های خروج آنتی‌بیوتیک و بنابراین مقاومت می‌شود. PvdQ در تولید پیووردین (که سیدروفور اصلی جذب کننده‌ی آهن در باکتری سودوموناس آئروژینوزا است) نقش دارد و از آن‌جایی که آهن باعث تغییر نفوذپذیری غشای خارجی می‌شود، پس این پروتئین نقش خود را در سلول‌های سوارم در مقاومت به آنتی‌بیوتیک به انجام می‌رساند. Wang و همکاران این پروتئین را به عنوان یک هدف جدید برای تیمار باکتری معرفی کردند (۴۵).

مکانیسم‌های جدید مقاومت در بیوفیلم

بیوفیلم باکتریایی ساختاری است که توسط باکتری‌ها

در یک ماتریکس پلیمری طی چندین مرحله ساخته می‌شود و اغلب این ساختار شامل پلی‌ساکاریدها، پروتئین و DNA می‌باشد. بیوفیلم‌های باکتریایی به دلیل این‌که در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز مواد شیمیایی ضد بیوفیلمی از خود مقاومت نشان می‌دهند، باعث ایجاد عفونت‌های مزمن می‌شوند (۴۶). این ساختار می‌تواند در باکتری‌هایی همچون استافیلوکوک و سودوموناس آئروژینوزا تشکیل شود که با عفونت مزمن همراه می‌گردد. مطالعات قبلی نشان داده است که یکی از مکانیسم‌های اصلی مقاومت باکتری‌ها در یک مجموعه‌ی بیوفیلم به خصوص در قسمت‌های مرکزی، به رشد بسیار کم و حتی عدم رشد این سلول‌ها برمی‌گردد و از آن‌جایی که بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی باکتری‌های فعال تأثیر دارند، بنابراین این باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند (همان سلول‌های Persisiter) (۴۷).

همچنین مطالعات قبلی گزارش کردند، فراوانی جهش بسیار بالای باکتری‌های موجود در بیوفیلم و نیز افزایش انتقال افقی ژن در آن‌ها، باعث مقاومت چند دارویی بالا به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود که این امر با مکانیسم‌های مختلفی از جمله تولید آنزیم‌های غیر فعال کننده‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها، تولید اهداف با میل ترکیبی پایین برای آن‌ها و نیز بیان بالای پمپ‌های خروج آنتی‌بیوتیک‌ها انجام می‌گیرد (۵۰-۴۸). در تحقیق Mandsberg و همکاران مکانیسم جدید مقاومت سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران مبتلا به سیستیک فیبروسیز به کمک سیستم ترمیمی DNA نشان داده شد (۵۱). در مطالعه‌ی آنان مشخص گردید که فنوتیپ هایی با فرکانس بالای جهش‌زایی، در سیستم ترمیم ناجور جفت‌شدگی (Mismatch repair یا MMR) که شامل ژن‌های mutS، mutL و UVrD است، باعث ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به ویژه در اثر انتخاب ایزوله‌هایی که پمپ‌های خروج چند دارویی را بیان می‌کردند، می‌شود (۵۱).

Mai-Prochnow و همکاران در مطالعه‌ی خود به این نتیجه رسیدند که افزایش تولید ROS داخلی و یک سیستم آنتی‌اکسیدانت ناقص، باعث عدم تعادل بین بار اکسیداتیو و دفاع های آنتی‌اکسیدانت، ایجاد استرس در بیوفیلم‌ها و در نهایت افزایش سویه‌های موتان مقاوم به آنتی‌بیوتیک در بیوفیلم می‌شود (۵۲).

پژوهش Conibear و همکاران نشان داد که ساختارهای میکروکلنی ایجاد شده توسط استرس اکسیداتیو داخلی مکان‌های اختصاصی در بیوفیلم برای افزایش تطابق ژنتیکی و تغییرات تکاملی، به منظور بقا و مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. به طور خلاصه ایجاد موتان در بیوفیلم برای بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها اتفاق می‌افتد و باعث مقاومت به آن‌ها می‌شود (۵۳). مطالعه‌ی Islam و همکاران حاکی از آن بود که مقاومت به توبرامایسین در اثر بیان بالای پمپ خروج چند دارویی MexXT-Omm می‌باشد (۵۴). گزارش تحقیق Johansen و همکاران بیان کرد که مقاومت به کولیسین در اثر جهش‌هایی در سیستم pmr رخ می‌دهد که در ساختار لیپوپلی‌ساکارید (Lipopolysaccharide یا LPS) درگیر است و باعث عدم تأثیر این آنتی‌بیوتیک بر غشای محل عمل آن می‌شود (۵۳).

نتیجه‌گیری

مکانیسم‌های جدید مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیان شده

نشان دهنده‌ی توانایی تطابق سریع باکتری‌ها برای مقابله با استرس‌های وارد شده به آن‌ها از قبیل فشار آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. برخی از این مکانیسم‌ها که پیش‌تر مشابه آن‌ها شناخته نشده بود و همچنین وجود مکانیسم‌های متنوع برای مقابله با آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها، می‌تواند به انعطاف‌پذیری ذاتی ژنتیک باکتری‌ها برگردد.

تشکر و قدردانی

از خانم فاطمه خدابخش به جهت ویرایش ادبی متن مقاله تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Bockstael K, Van Aerschot A. Antimicrobial resistance in bacteria. Cent Eur J Med 2009; 4(2): 141-55.
2. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev 2010; 74(3): 417-33.
3. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Review of medical microbiology. New York, NY: Springer; 1980. p. 880-1200.
4. Zinsser H, Joklik WK. Zinsser microbiology. 20th ed. New York, NY; 1988. p. 348-420.
5. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Med 2006; 119(6 Suppl 1): S3-10.
6. Canton R, Morosini MI. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. FEMS Microbiol Rev 2011; 35(5): 977-91.
7. Theuretzbacher U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. Journal of Global Antimicrobial Resistance1(2): 63-9.
8. Shokri D, Zaghian S, Khodabakhsh F, Fazeli H, Mobasherizadeh S, Ataei B. Antimicrobial activity of a UV-stable bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by Enterococcus faecium strain DSH20 against vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) strains. J Microbiol Immunol Infect 2014; 47(5): 371-6.
9. Mobasherizadeh S, Shokri D, Zargarzadeh AH, Jalalpour S, Ebneshahidi SA, Sajadi M. Antimicrobial resistance surveillance among hospitalized and non-hospitalized extend-spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli from four tertiary-care hospitals in Isfahan, Iran; 2008-2011. Afric J Microb Res 2012; 6(5): 953-9.
10. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of Enterococcus faecalis N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(7): 2667-72.
11. Sho T, Muratani T, Hamasuna R, Yakushiji H, Fujimoto N, Matsumoto T. The mechanism of high-level carbapenem resistance in Klebsiella pneumoniae: underlying Ompk36-deficient strains represent a threat of emerging high-level carbapenem-resistant K. pneumoniae with IMP-1 beta-lactamase production in Japan. Microb Drug Resist 2013; 19(4): 274-81.
12. Volkers G, Palm GJ, Weiss MS, Wright GD, Hinrichs W. Structural basis for a new tetracycline resistance mechanism relying on the TetX monooxygenase. FEBS Lett 2011; 585(7): 1061-6.
13. Seah C, Alexander DC, Louie L, Simor A, Low DE, Longtin J, et al. MupB, a new high-level mupirocin resistance mechanism in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(4): 1916-20.
14. Bebrone C, Bogaerts P, Delbruck H, Bennink S, Kupper MB, Rezende de CR, et al. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa that contains Ile80 and Ser170 residues. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(1): 396-401.
15. Ilina EN, Malakhova MV, Bodoev IN, Oparina NY, Filimonova AV, Govorun VM. Mutation in ribosomal protein S5 leads to spectinomycin resistance in Neisseria gonorrhoeae. Front Microbiol 2013; 4: 186.
16. Ohneck EA, Zalucki YM, Johnson PJ, Dhulipala V, Golparian D, Unemo M, et al. A novel mechanism of high-level, broad-spectrum antibiotic resistance caused by a single base pair change in Neisseria gonorrhoeae. MBio 2011; 2(5).
17. Tran TT, Panesso D, Mishra NN, Mileykovskaya E, Guan Z, Munita JM, et al. Daptomycin-resistant Enterococcus faecalis diverts the antibiotic molecule from the division septum and remodels cell membrane

phospholipids. MBio 2013; 4(4).
18. Nordmann P, Boulanger AE, Poirel L. NDM-4 metallo-beta-lactamase with increased carbapenemase activity from Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(4): 2184-6.
19. Cuzon G, Bonnin RA, Nordmann P. First identification of novel NDM carbapenemase, NDM-7, in Escherichia coli in France. PLoS One 2013; 8(4): e61322.
20. Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD, et al. FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate from Italy. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(1): 410-6.
21. Torok ME, Chantratita N, Peacock SJ. Bacterial gene loss as a mechanism for gain of antimicrobial resistance. Curr Opin Microbiol 2012; 15(5): 583-7.
22. Jia X, Zhang J, Sun W, He W, Jiang H, Chen D, et al. Riboswitch control of aminoglycoside antibiotic resistance. Cell 2013; 152(1-2): 68-81.
23. Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, Cohen SN. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. Science 2004; 305(5690): 1629-31.
24. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da RS, et al. The SOS response controls integron recombination. Science 2009; 324(5930): 1034.
25. Hocquet D, Llanes C, Thouverez M, Kulasekara HD, Bertrand X, Plesiat P, et al. Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. PLoS Pathog 2012; 8(6): e1002778.
26. Kint CI, Verstraeten N, Fauvart M, Michiels J. New-found fundamentals of bacterial persistence. Trends Microbiol 2012; 20(12): 577-85.
27. Fauvart M, De Groote VN, Michiels J. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. J Med Microbiol 2011; 60(Pt 6): 699-709.
28. Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K. Persisters: a distinct physiological state of E. coli. BMC Microbiol 2006; 6: 53.
29. Gefen O, Gabay C, Mumcuoglu M, Engel G, Balaban NQ. Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(16): 6145-9.
30. Wu Y, Vulic M, Keren I, Lewis K. Role of oxidative stress in persister tolerance. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(9): 4922-6.
31. Shatalin K, Shatalina E, Mironov A, Nudler E. H2S: a universal defense against antibiotics in bacteria. Science 2011; 334(6058): 986-90.
32. Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Beer K, et al. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. Science 2011; 334(6058): 982-6.
33. Dorr T, Lewis K, Vulic M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in Escherichia coli. PLoS Genet 2009; 5(12): e1000760.
34. Tripathi A, Dewan PC, Barua B, Varadarajan R. Additional role for the ccd operon of F-plasmid as a transmissible persistence factor. Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109(31): 12497-502.
35. Moker N, Dean CR, Tao J. Pseudomonas aeruginosa increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. J Bacteriol 2010; 192(7): 1946-55.
36. Leung V, Levesque CM. A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. J Bacteriol 2012; 194(9): 2265-74.
37. Vega NM, Allison KR, Khalil AS, Collins JJ. Signaling-mediated bacterial persister formation. Nat Chem Biol 2012; 8(5): 431-3.
38. Defoirdt T, Boon N, Bossier P. Can bacteria evolve resistance to quorum sensing disruption? PLoS Pathog 2010; 6(7): e1000989.
39. Defoirdt T, Verstraete W, Bossier P. Luminescence, virulence and quorum sensing signal production by pathogenic Vibrio campbellii and Vibrio harveyi isolates. J Appl Microbiol 2008; 104(5): 1480-7.
40. Koch B, Liljefors T, Persson T, Nielsen J, Kjelleberg S, Givskov M. The LuxR receptor: the sites of interaction with quorum-sensing signals and inhibitors. Microbiology 2005; 151(Pt 11): 3589-602.
41. Joelsson A, Liu Z, Zhu J. Genetic and phenotypic diversity of quorum-sensing systems in clinical and environmental isolates of Vibrio cholerae. Infect Immun 2006; 74(2): 1141-7.
42. Hirakawa H, Tomita H. Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. Front Microbiol 2013; 4: 114.
43. LaSarre B, Federle MJ. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. Microbiol Mol Biol Rev 2013; 77(1): 73-111.
44. Wilder CN, Allada G, Schuster M. Instantaneous within-patient diversity of Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing

populations from cystic fibrosis lung infections. Infect Immun 2009; 77(12): 5631-9.
45. Wang L, Zhang C, Gong F, Li H, Xie X, Xia C, et al. Influence of Pseudomonas aeruginosa pvdQ gene on altering antibiotic susceptibility under swarming conditions. Curr Microbiol 2011; 63(4): 377-86.
46. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents 2010; 35(4): 322-32.
47. Brackman G, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(6): 2655-61.
48. Bjedov I, Tenaillon O, Gerard B, Souza V, Denamur E, Radman M, et al. Stress-induced mutagenesis in bacteria. Science 2003; 300(5624): 1404-9.
49. Conibear TC, Collins SL, Webb JS. Role of mutation in Pseudomonas aeruginosa biofilm development. PLoS One 2009; 4(7): e6289.
50. Romling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. J Intern Med 2012; 272(6): 541-61.
51. Mandsberg LF, Ciofu O, Kirkby N, Christiansen LE, Poulsen HE, Hoiby N. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(6): 2483-91.
52. Mai-Prochnow A, Lucas-Elio P, Egan S, Thomas T, Webb JS, Sanchez-Amat A, et al. Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria. J Bacteriol 2008; 190(15): 5493-501.
53. Johansen HK, Moskowitz SM, Ciofu O, Pressler T, Hoiby N. Spread of colistin resistant non-mucoid Pseudomonas aeruginosa among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros 2008; 7(5): 391-7.
54. Islam S, Oh H, Jalal S, Karpati F, Ciofu O, Hoiby N, et al. Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect 2009; 15(1): 60-6.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 23.01.2015
Vol. 33, No. 328, 4th Week, May 2015
Accepted: 08.04.2015

New Molecular Resistance Mechanisms against Antibiotics in Bacteria

Dariush Shokri MSc[1], Mohammad Rabbani-Khorasgani PhD[2]

Review Article

Abstract

Only a short time after the discovery of antibiotics by Alexander Fleming, antibiotic-resistant bacteria were reported. Besides the traditional mechanisms of resistance in bacteria, new mechanisms have been described by different researchers. For example, recently a new gene operon of D-alanine-D-serine called VanL that cuased resistant to the antibiotic vancomycin was reported. Other researchers have shown that Klebsiella pneumoniae strains lost purine Ompk36 that have a major role in the antibiotic diffusion into cells, are resistant to carbapenem. In 2011, the first full resistance to tigecycline was reported that the enzyme-linked monooxygenase flavin hydroxyl TetX cause deactivation of antibiotics. In 2012, high resistance to mupricin antibiotic was described that intermediated by a new locus named mupB. In addition, in 2013, it was showed that some strains of Enterococcus faecalis can move daptomycin antibiotic from its target to other places and so inhibit its activity. Removal of whole target gene (PBP3) of ceftazidime in Burkholderia pseudomallei was reported in 2012. In other hand, new role of riboswitch for resistance to aminoglycoside antibiotics reported in 2013. In addition, recent studies have indicated a relationship between SOS response and quorum sensing with antibiotic resistance and new antibiotic resistance mechanisms in bacterial biofilm and persister cells are known. In this review, recent studies have been conducted to identify these new mechanisms.

Keywords: Antibiotic, Antibiotic resistance, Riboswitch, SOS response, Quorum sensing, Persister cells

Citation: Shokri D, Rabbani-Khorasgani M. **New Molecular Resistance Mechanisms against Antibiotics in Bacteria.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(328): 410-28

1- PhD Candidate, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mohammad Rabbani-Khorasgani PhD, Email: m.rabbani@biol.ui.ac.ir