

Frequency Determination of thyA Mutations and Prevalence of Resistance to Para- Aminosalicylic Acid in Clinical Strains of Drug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* in Tehran from 2018 to 2021

Hanieh Bagherifard¹, Mitra Salehi^{1*}, Mona Ghazi²

1. Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: July 18, 2023; Accepted: September 11, 2023

Abstract

Background and Aim: The emergence of drug resistance and treatment- renitent *Mycobacterium tuberculosis* has made controlling the disease a challenge. World Health Organization (WHO) estimates that approximately 500,000 new cases of tuberculosis occur annually. Considering that mechanisms involved in drug resistance are yet to be elucidated and results of the studies are not consistent, we decided to investigate the correlation between mutations in thyA gene and resistance to para- aminosalicylic acid (PAS).

Methods: In this descriptive cross- sectional study, a total of 255 positive MTB specimens were isolated during a three- year period using standard microscopic and culture methods from which 68 Multidrug resistant (MDR) and extensively drug resistant (XDR) tuberculosis samples were selected through drug susceptibility testing. Then, to determine potential mutations in thyA gene, the fragment was amplified using conventional PCR and products were sequenced. Afterward, mutations which have been induced amino acid substitutions were evaluated with various protein prediction tools. Also, the correlation between mutations and drug resistance was statistically determined using chi-square test.

Results: From 255 clinical TB samples, 68 (26.7%, CI 21.3%) MDR / or XDR-TB strains were isolated. In total, 13 (19.1%) were PAS- resistant and 5 (38.4%) of them had different nucleotide mutations in thyA gene. All of the mutations were statistically correlated with drug resistance. Moreover, the results of bioinformatics showed that identified mutations could lead to the structural and functional disruption of the protein.

Conclusion: According to our results, mutations in thyA gene have appeared to be associated with resistance to PAS. Also, our findings have shed light on the potential of the analysis of short genomic regions and new computational tools in unraveling the molecular mechanisms of drug resistance.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Drug resistance; thyA; Mutation; Bioinformatics

Please cite this article as: Bagherifard H, Salehi M, Ghazi M. Frequency Determination of thyA Mutations and Prevalence of Resistance to Para- Aminosalicylic Acid in Clinical Strains of Drug- Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* in Tehran from 2018 to 2021. Pejouhesh dar Pezeshki. 2023;47(4):96-105.

*Corresponding Author: Mitra Salehi; Email: salehi.mitra.microbiology@gmail.com

Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.



بررسی فراوانی جهش ژن thyA و میزان مقاومت به داروی پارا-آمینوسالیسیلیک اسید در سویه‌های بالینی مایکروبکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو در شهر تهران در سال ۱۳۹۷-۱۴۰۰

هانیه باقری‌فرد^۱، میترا صالحی^{۱*}، مونا قاضی^۲

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۷

چکیده

سابقه و هدف: پیدایش مقاومت‌های دارویی و ظهور سویه‌های مایکروبکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به درمان، کنترل این بیماری را با چالش مواجه ساخته است. بنابرآمار سازمان بهداشت جهانی (WHO)، سالانه در سراسر جهان حدود ۵۰۰,۰۰۰ مورد ابتلای جدید سل مقاوم به دارو گزارش می‌شود. با توجه به اینکه مکانیسم‌های مرتبط با بروز مقاومت‌های دارویی به درستی شناخته نشده است و تحقیق‌های مختلف نشان‌دهنده نتایج متفاوتی است، بر آن شدیدم تا به بررسی جهش‌های ژن thyA در ارتباط با مقاومت به داروی پارا-آمینوسالیسیلیک اسید (PAS) پردازم.

روش کار: در این مطالعه توصیفی- مقطوعی، در مدت سه سال تعداد ۲۵۵ نمونه مثبت مایکروبکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از روش استاندارد کشت و اسپیر جداسازی شد، سپس با انجام آزمون حساسیت-ستنجی دارویی ۶۸ نمونه سل مقاوم به دارو انتخاب شد. برای بررسی جهش‌های ژن thyA، از روش PCR استاندارد استفاده شد و قطعه‌های حاصله توالی‌یابی شدند. جهش‌های متجر به تعییر کدون، با به کارگیری نرم‌افزارهای پیش‌بینی تغییرهای پروتئین آنالیز شدند. ارتباط جهش‌های یافت شده با مقاومت به داروی PAS از لحاظ آماری توسط آزمون مرتب کای مطالعه شد.

یافته‌ها: از ۲۵۵ نمونه مورد بررسی، ۶۸ سویه (۲۶/۷ درصد، فاصله اطمینان ۲۱/۳ درصد) مقاوم به دارو تعیین شد. مجموعاً ۱۳ نمونه (۱۹/۱ درصد) سویه مقاوم به PAS یافت شد که ۵ سویه (۳۸/۴ درصد) دارای جهش‌های نوکلئوتیدی مختلف در ژن thyA بودند. از لحاظ آماری ارتباط جهش‌های مذکور با مقاومت آنتی‌بیوتیکی معنادار بود. به علاوه، نتایج آنالیز بیوانفورماتیک نشان داد که جهش‌های یافت شده منجر به اختلال در عملکرد و نایابی‌داری در ساختار پروتئین حاصله می‌شوند.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که جهش در ژن thyA با مقاومت به داروی PAS مرتبط است. همچنین یافته‌ها ارزش تشخیصی آنالیز قطعه‌های کوچک ژنومی و ابزارهای نوین بیوانفورماتیک را در شناسایی مکانیسم‌های مقاومت دارویی نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: مایکروبکتریوم توبرکلوزیس؛ مقاومت دارویی؛ جهش ژنتیکی؛ آنالیز بیوانفورماتیک

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Bagherifard H, Salehi M, Ghazi M. Frequency Determination of thyA Mutations and Prevalence of Resistance to Para-Aminosalicylic Acid in Clinical Strains of Drug- Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* in Tehran from 2018 to 2021. Pejouhesh dar Pezeshki. 2023;47(4):96-105.

*نویسنده مسئول مکاتبات: میترا صالحی؛ آدرس پست الکترونیکی: salehi.mittra.microbiology@gmail.com
گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

مقدمه

مايكوباكتريوم توبركلوزيس يك ميكروارگانيسىم بيماري زاي انساني بوده که منجر به بيماري سل مى شود. طبق گزارش های سازمان بهداشت جهانی (WHO) در سال ۲۰۲۲، سالانه ۱۶-۱۲ ميليون نفر در اثر اين بيماري جان خود را از دست داده و فقط در سال ۲۰۲۱ بيش از ۱۰ ميليون نفر به اين بيماري مبتلا شدند (۱).

با وجود استفاده گسترده از پارا-آمینو سالیسیلیک اسید در مصارف بالینی مکانیسم عمل آن هنوز به طور كامل مشخص نشده است (۷، ۸). شbahت های ساختاری میان اين دارو با پارا-آمینوبنزويک اسید (PABA) اين نظریه را به وجود آورد که احتمالاً PAS هدف يا اهدافی را در مسیر سنتز فولات مايكوباكتريوم توبركلوزيس مهار می کند. نظریه فوق براساس مکانیسم عمل گروه دیگری از آنالوگ های ساختاری PABA يعني سولفونامیدها شکل گرفت (۵). طی سال های اخیر، مطالعه ها مشخص کردند که PAS به عنوان يك سوبسترات جايگزين برای دی هيدروپتروات سنتاز (DHPS / FolP1) عمل می کند. محصول اين واکنش يعني كمپلکس PAS-هيدروكسی دی هيدروپتروات، توسط آزيم دی هيدرو فولات سنتاز (DHFS/ FolC) گلوتامینه شده و تشکيل هيدروكسی دی هيدروفولات می دهد. در نهايیت اين ترکيب فعالیت دی هيدروفولات ردوكتاز (DfrA) را مهار کرده و از رشد مايكوباكتريوم توبركلوزيس جلوگيري می کند. به اين ترتيب جهش در ژن های کد کننده هر يك از آنژیم های دخیل در مسیر بیوسنتز فولات ممکن است سبب مقاومت به PAS شود. علاوه بر اين جهش های افزایش بيان در ژن های کد کننده آنژیم های جايگزين مسیر فولات مانند RibD به عنوان آنالوگ دی هيدرو فولات ردوكتاز نيز می تواند سبب مقاومت به PAS شود (۷). در تأیید فرضیه مذکور، مطالعه هایی که تاکنون انجام شده جهش هایی را در ژن های thyA, folC, dfrA و ribD با ایجاد مقاومت به PAS مطرح کرده اند (۵، ۹-۱۱). ژن thyA کد کننده آنژیم تیمیدیلات سنتاز است که در مسیر فولات در مايكوباكتريوم توبركلوزيس، dUMP را با استفاده از ۵-متیلن- تراهیدروفولات به عنوان دهنده متیل به dTTP تبدیل

از داروهای تزریقی گروه A خط دوم سل است (۲). برخلاف سایر باکتری ها که مقاومت دارویی اکتسابی عموماً در نتیجه انتقال افقی ژن از طریق عناصر ژنتیکی مانند پلاسمیدها، ترانسپوزون ها و یا اینتگرون ها ایجاد می شود، در مايكوباكتريوم توبركلوزيس مقاومت دارویی اساساً به دلیل جهش های خودبخودی در ژن های کروموزومی است (۳).

روش های کنونی تشخیص و کنترل مقاومت دارویی بسیار زمان بر و پرهزینه بوده و نیاز به نیروی تخصصی دارد. از سویی دیگر، ابداع روشهای نوین به شدت به اطلاعات موجود از الگوهای جهش وابسته است. توالي یابی ژنوم مايكوباكتريوم توبركلوزيس توانایی تشخیص جهش ها در اهداف مولکولی را که نقش مهمی در ایجاد مقاومت علیه داروهای ضد سل و پدیدارشدن سویه های مقاوم MDR و XDR دارد، به شدت افزایش داده است. به این ترتیب، سبب سهولت در تشخیص سریع و آسان مقاومت دارویی، فاكتورهای بیماری زایی و کشف مسیرهای انتقال بیماری می شود (۴).

پارا-آمینو سالیسیلیک اسید (PAS) يك از داروهای مهم خط دوم درمان سل است که نخستین بار در دهه ۱۹۴۰ در درمان سل استفاده شد (۵). اگرچه به دلیل درمان تک دارویی در ابتدا به سرعت مقاومت به این دارو شکل گرفت، ولی با توجه به گسترش مقاومت دارویی دوباره استفاده از آن برای درمان انواع سل مقاوم به دارو در دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی قرار گرفته است (۶).

با وجود استفاده گسترده از پارا-آمینو سالیسیلیک اسید در مصارف بالینی مکانیسم عمل آن هنوز به طور كامل مشخص نشده است (۷، ۸). شbahت های ساختاری میان اين دارو با پارا-آمینوبنزويک اسید (PABA) اين نظریه را به وجود آورد که احتمالاً PAS هدف يا اهدافی را در مسیر سنتز فولات مايكوباكتريوم توبركلوزيس مهار می کند. نظریه فوق براساس مکانیسم عمل گروه دیگری از آنالوگ های ساختاری PABA يعني سولفونامیدها شکل گرفت (۵). طی سال های اخیر، مطالعه ها مشخص کردند که PAS به عنوان يك سوبسترات جايگزين برای دی هيدروپتروات سنتاز (DHPS / FolP1) عمل می کند. محصول اين واکنش يعني كمپلکس PAS-هيدروكسی دی هيدروپتروات، توسط آزيم دی هيدرو فولات سنتاز (DHFS/ FolC) گلوتامینه شده و تشکيل هيدروكسی دی هيدروفولات می دهد. در نهايیت اين ترکيب فعالیت دی هيدروفولات ردوكتاز (DfrA) را مهار کرده و از رشد مايكوباكتريوم توبركلوزيس جلوگيري می کند. به اين ترتيب جهش در ژن های کد کننده هر يك از آنژیم های دخیل در مسیر بیوسنتز فولات ممکن است سبب مقاومت به PAS شود. علاوه بر اين جهش های افزایش بيان در ژن های کد کننده آنژیم های جايگزين مسیر فولات مانند RibD به عنوان آنالوگ دی هيدرو فولات ردوكتاز نيز می تواند سبب مقاومت به PAS شود (۷). در تأیید فرضیه مذکور، مطالعه هایی که تاکنون انجام شده جهش هایی را در ژن های thyA, folC, dfrA و ribD با ایجاد مقاومت به PAS مطرح کرده اند (۵، ۹-۱۱). ژن thyA کد کننده آنژیم تیمیدیلات سنتاز است که در مسیر فولات در مايكوباكتريوم توبركلوزيس، dUMP را با استفاده از ۵-متیلن- تراهیدروفولات به عنوان دهنده متیل به dTTP تبدیل

(استاندارد یک مک فارلن) و با استفاده از داروهای خط نخست و خط دوم درمان سل شامل داروهای آیزوپریازید (INH)، ریفامپین (RIF)، آمیکاسین (AMK)، کاپرئومایسین (CAP)، کانامایسین (KAN)، سیپروفلوکساسین (OFX)، اتمبیوتول (ETB) و اوفلوکساسین (CIP)، (Sigma-Aldrich®, Merck, Germany) هدف پژوهش یعنی پارا-آمینوسالیسیلیک اسید (PAS) با روش استاندارد انجام شد که تعداد ۶۸ نمونه سل مقاوم به دارو شناسایی شد (۱۴).

برای ارزیابی ارتباط میان جهش‌های مولکولی با مقاومت به داروی مورد مطالعه، از روش PCR و توالی‌یابی استفاده شد. به این منظور ابتدا DNA ژنومی با استفاده از روش جوشاندن (boiling) جداسازی شد؛ ابتدا سوسپانسیون سلولی به مدت ۲۰ دقیقه در 100°C و به مدت ۱۰ دقیقه در 100°C گرمادهی و سپس با دور 13500 rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در انتهای مایع رویی که حاوی DNA بوده با دقت و به کمک سمپلر جدا شده و رسوب دور ریخته شد. کیفیت DNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودرایپ 1000 (Thermo Fischer Scientific) استفاده شد.

طراحی پرایمرهای (آغازگر) ژن thyA براساس توالی استاندارد *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv سویه NC_000962.3:c 3074471_3073680) انجام شد. پرایمرهای مورد نظر با استفاده از نرمافزار آنلاین Primer3Plus نرمافزار Primerblast مرکز ملی داده‌های بیوتکنولوژی (NCBI) و Oligo v 7.0 کنترل شد. سنتز پرایمرها توسط شرکت سیناکلون انجام شد و با غلظت $1\mu\text{M}$ pmol تحويل شد (Order N105, Cat No. ps4131). توالی پرایمرهای استفاده شده به شرح جدول ۱ است.

کرده و برخی از محققان آن را عامل اصلی ایجاد مقاومت به PAS دانسته‌اند (۷، ۱۲).

با وجود مطالعه‌های گسترده در سطح جهان، مکانیسم مقاومت به داروهای خط دوم درمان سل و به ویژه داروی پارا-آمینوسالیسیلیک اسید همچنان نامشخص است، به علاوه با توجه به اطلاعات ما تاکنون مطالعه‌ای در این راستا در ایران انجام نشده است. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی وجود جهش در ژن thyA و ارزیابی ارتباط میان جهش‌ها با مقاومت به داروی پارا-آمینوسالیسیلیک اسید به عنوان یکی از داروهای مهم خط دوم درمان سل در شهر تهران طی سال ۱۳۹۷ تا ۱۴۰۰ انجام شد.

روش کار

در این مطالعه توصیفی- مقطعی که بین سال‌های ۱۳۹۷ تا ۱۴۰۰ انجام شد، از بیماران مشکوک به سل مراجعه‌کننده به بخش مایکروب‌اکتریولوژی آزمایشگاه مسعود تهران برای ورود به مطالعه نمونه‌گیری شد. نمونه‌های به دست آمده شامل: ۲۱۱ نمونه خلط ($82/8$ درصد)، دو نمونه ادرار ($8/8$ درصد)، یک نمونه بیوپسی غده لنفاوی ($4/4$ درصد)، ۱۷ نمونه مایع برونژش ($6/6$ درصد)، شش نمونه مایع نخاع ($2/4$ درصد)، ۱۵ نمونه مایع پلور ($5/9$ درصد)، سه نمونه مایع مغز استخوان ($1/2$ درصد) بودند. نمونه‌ها از نظر عفونت با مایکروب‌اکتریوم توبرکلوزیس با روش استاندارد طلائی تشخیص سل (کشت روی محیط لون اشتاین- جنسن) و اسپیر میکروسکوبی بررسی که در نهایت تعداد ۲۵۵ نمونه سل مثبت تشخیص داده شد (۱۳).

برای تعیین الگوی مقاومت دارویی و جداسازی سویه‌های مایکروب‌اکتریوم توبرکلوزیس MDR و XDR، روی تمامی نمونه‌های مایکروب‌اکتریوم توبرکلوزیس آزمون آنتی‌بیوگرام یا حساسیت دارویی طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی و با تعداد تقریبی $10^8 \times 3$ باکتری در هر میلی‌لیتر

جدول ۱- جفت پرایمر استفاده شده برای تکثیر ژن thyA

پرایمر	CCGTACTTGCTCGACGTGAT	Reverse
پرایmer	CCCTGTCATGCGTTCTTCCA	Forward
طول پرایمر	۲۰	۲۰
طول مخصوص	۵۹/۳	۵۹/۳
(%) GC	۵۵	۵۵
دماي ذوب (°C)	۵۹/۳	۵۹/۳
۲۱۹ bp		

شد. در این مطالعه از روش PCR استاندارد برای تکثیر ناحیه مورد نظر استفاده شد که برنامه تعیین شده برای ژن thyA در جدول ۲ نشان داده شده است.

با هدف تکثیر ناحیه مورد نظر از ژن thyA، مخلوط واکنش PCR در حجم نهایی $25\ \mu\text{l}$ ($12/5$ مستر میکس) آماده شد و تعیین برنامه PCR با کمک دستورالعمل شرکت سازنده مستر میکس (Ampliqon, Denmark) و شبیب دمایی (گرایدیان) انجام

جدول ۲- برنامه PCR تعیین شده برای تکثیر ژن thyA

مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد چرخه
واسرشت سازی اولیه	۹۵	۲ دقیقه	۱
واسرشت سازی ثانویه	۹۴	۳۰ ثانیه	
اتصال	۵۹	۳۰ ثانیه	۳۰
طویل سازی اولیه	۷۲	۳۰ ثانیه	
طویل سازی ثانویه	۷۲	۵ دقیقه	۱

به این ترتیب، جهش‌هایی که در آنالیز با استفاده از نرم‌افزار MEGA موجب تغییر کدون و در نهایت تغییر آمینواسید تشخیص داده شدند، در مرحله بعد با کمک نرم‌افزارها (Variation Effect Analyzer Protein) PROVEAN PredictSNP، (J. Craig Venter Institute, USA) .SNPMuSiC) DEZYME (Loschmidt, Czech) .SNPMuSiC) DEZYME (Dezyme, Belgium) (HoTMuSiC و PoPMuSiC شدند (۱۸-۱۵).

در پایان، داده‌های حاصل از آنالیز ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار IBM، USA (SPSS) و رزن ۲۳ آنالیز شدند. به این منظور ارتباط جهش‌های مختلف مشاهده شده با مقاومت به داروی پارا-آمینو سالیسیلیک اسید از طریق آزمون کیفی مربع کای بررسی و p-value کمتر از 0.05 از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از میان ۲۵۵ بیمار مبتلا به سل، ۶۸ نمونه سل مقاوم به داروهای خط نخست درمان ($26/7$ درصد)، تعداد ۳۷ نمونه ($4/4$ درصد) به آمیکاسین، 43 نمونه ($2/3$ درصد) به کاپرئومایسین، 40 نمونه ($8/8$ درصد) به کانامایسین، 17 نمونه ($0/25$ درصد) به اتامبوتول، 36 نمونه ($9/52$ درصد) به

پس از انجام PCR برای اطمینان از صحت انجام پذیرفتن واکنش‌ها، تکثیر صحیح قطعه‌های مورد نظر و نبود آلودگی‌های ناخواسته و مداخله گر در واکنش، نمونه‌ها به وسیله الکتروفوروز افقی روی ژل آگارز $1/5$ درصد بررسی شدند. سپس برای تعیین توالی ژن‌های تکثیر یافته، محصولات PCR که روی ژل آگارز باندهای مورد انتظار را ایجاد کرده بودند به همراه پرایمربه به شرکت کدون ژنتیک (گروه کدون ژنتیک، تهران، ایران) ارسال شد. شرکت مورد نظر با استفاده از دستگاه (Biosystems, USA Applied) Genetic Analyzer 3500 روش خودکار، قطعه‌های ژنی را خوانش و نتایج به صورت فایل فرمت ab1 تحويل شد. نتایج تعیین توالی توسط نرم‌افزارهای FinchTv v (Technelysium Pty Ltd.) Chromas v 2.6.6 (Geospiza Inc, USA) ۱.4 نمونه‌ها برای بررسی وجود جهش‌های احتمالی با کمک نرم‌افزار Megasoftware, PA, USA) MEGA v 10.0 مقایسه با توالی استاندارد *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv آنالیز شدند.

با هدف بررسی دقیق‌تر و بهره‌وری از به روزترین متدها در آنالیز جهش‌ها و تغییرهای ژنتیکی از چندین نرم‌افزار نسل جدید برای پیش‌بینی تغییرهای احتمالی جهش‌های شناسایی شده در این پژوهش، استفاده شد.

تغییر اسیدآمینه لوسین به آرژنین در موقعیت ۱۶۳ و نیز جایگزینی اسیدآمینه آلانین با والین در موقعیت ۱۷۹ منجر به اختلال در عملکرد پروتئین می‌شوند. همچنین نتایج دو نرمافزار مشاهده شده می‌توانند از طریق کاهش $\Delta\Delta G$ ، کاهش انتروپی جنبشی و در نهایت کاهش انعطاف‌پذیری، سبب ناپایداری در ساختار پروتئین حاصله شوند. نتایج حاصل از نرمافزارهای به کار رفته در جدول ۴ نشان داده شده است.

براساس آزمون آماری مربع کای به طور کلی جهش در ژن thyA رابطه معناداری با مقاومت به داروی پارا-آمینوسالیسیلیک اسید داشت ($P = 0.000$). علاوه بر این، تمامی چهار جهش تغییر کرده از لحاظ آماری دارای رابطه معنادار با مقاومت به داروی مورد مطالعه بودند ($P \leq 0.001$).

سیپروفلوکساسین، ۹ نمونه (۱۳/۲ درصد) به اوپلوكساسین و ۱۳ نمونه (۱۹/۱۱ درصد) به پارا-آمینوسالیسیلیک اسید مقاوم بودند.

در نتیجه تکثیر قطعه موردنظر و مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی استاندارد مایکروبکتریوم توبرکلوزیس H37Rv، به طور کلی تعداد شش جهش نوکلئوتیدی مختلف در ژن thyA در پنج نمونه (۳۸/۴ درصد) از مجموع ۱۳ نمونه مقاوم به پارا-آمینوسالیسیلیک اسید مشاهده شد؛ هشت نمونه مقاوم هیچ‌گونه جهشی در این ژن نداشتند. همچنین جهش در هیچ‌کدام از سویه‌های حساس به دارو دیده نشد. آنالیز توالی پروتئینی حاصل مشخص کرد که شش جهش مشاهده شده منجر به چهار تغییر کدون و جایگزینی اسیدآمینه شده‌اند. نتایج در جدول ۳ آورده شده است.

در ادامه از طریق آنالیز بیوانفورماتیک مشخص شد که جهش

جدول ۳- جهش‌های مشاهده شده در ژن thyA و فراوانی آنها در نمونه‌های مورد مطالعه.

تعداد نمونه‌های دارای جهش	تغییر آمینواسید	تغییر نوکلئوتید
۴	L163R	T488G
۴	A179V	C536T
		T583G
۵	S195G	C584G
		G585C
۴	I200V	A598G

جدول ۴- نتایج آنالیز بیوانفورماتیک جهش‌های مشاهده شده در ژن thyA.

جهش	PredictSNP	PROVEAN	PoPMuSiC	SNPMuSiC	HoTMuSiC
	نتیجه	امتیاز ۱	نتیجه	امتیاز ۲	نتیجه
L163R	آسیبرسان	-۵/۷۶۲	آسیبرسان	۰/۵۲	آسیبرسان
A179V	آسیبرسان	-۳/۹۹۷	آسیبرسان	۰/۳۷	آسیبرسان
S195G	خنثی	-۱/۵۷۶	خنثی	-۰/۵۱	آسیبرسان
I200V	خنثی	-۰/۰۳۰	خنثی	-۰/۴۰	آسیبرسان

- براساس دستورالعمل نرمافزار، حد آستانه برابر با $2/5$ است. جهش دارای امتیاز مساوی و کمتر از $2/5$ به عنوان آسیبرسان و جهش دارای امتیاز بالاتر به عنوان جهش خنثی پیش‌بینی می‌شود.

- براساس دستورالعمل نرمافزار، جهش دارای امتیاز مثبت به عنوان آسیبرسان و جهش دارای امتیاز منفی به عنوان جهش خنثی پیش‌بینی می‌شود.

بحث

فعالیت آنزیم تیمیدیلات سنتاز شده است (۲۰). مطالعه دیگری PAS که نقش آنزیمهای مسیر فولات را در ایجاد مقاومت به بررسی کرده است، پیشنهاد داده‌اند که PAS یک پیش‌داروی غیرفعال است و برای فعال شدن نیاز به آنزیم فعال ThyA دارد (۹). ژن thyA که ۷۹۲ جفت باز طول دارد و کدکننده آنزیم تیمیدیلات سنتاز A است، واکنش تبدیل دئوكسی یوریدین مونوفسفات (dUMP) را به دئوكسی تیمیدین مونوفسفات (dTDP) کاتالیز کرده که برای متابولیسم فولات به خصوص زمانی که تتراهیدروفولات به عنوان دهنده متیل مطرح است، ضروری است (۲۱). در اغلب ارگانیسم‌ها واکنش فوق در نهایت منجر به آزادسازی دی‌هیدروترووات گلوتامات می‌شود که باید توسط آنزیم دی‌هیدرو فولات ردوکتاز (DHFR) احیا شده و دوباره وارد چرخه متابولیسم فولات شود. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نوع دیگری از تیمیدیلات سنتاز (ThyX) را نیز کد می‌کند که تولید دوباره تتراهیدروترووات‌گلوتامات را کاتالیز می‌کند (۲۲). فعالیت آنزیم ThyA برخلاف آنزیم ThyX در گروه DHFR برای فراهم آوردن سطوح کافی از تتراهیدروترووات گلوتامات بوده و برای عملکرد داروهای مهارکننده آنزیم DHFR ضروری هستند (۲۳). برخی مطالعه‌ها جهش در موقعیت ۲۰۲ ژن thyA را به عنوان فراوان‌ترین جهش مرتبط با مقاومت به PAS معرفی کرده‌اند در حالی که این جهش در تعداد کمی از سویه‌های حساس به دارو نیز یافت شده است (۲۴). اگرچه این یافته بعدها توسط مطالعه‌ای که مشخص کرد جهش مذکور یعنی جایگزینی ترئونین و آلانین در کدون ۲۰۲ ژن thyA یک نشانگر برای رده آمریکای لاتین از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است، به چالش کشیده شد (۲۵).

آنالیز بیوانفورماتیک در مورد تأثیر جهش‌های یافت شده در این پژوهش بر عملکرد و ساختار پروتئین ThyA به طور جالب توجهی نتایج تقریباً یکسانی را در تمامی نرم‌افزارهای به کار گرفته شده، دارا بود. به این ترتیب هر سه پلتفرم SNPmuSiC و PROVEAN و PredictSNP که تأثیر جهش‌ها بر عملکرد پروتئین را ارزیابی می‌کند، دو جهش جایگزینی یافت شده در کدون‌های ۱۶۳ و ۱۷۹ را آسیب‌رسان معرفی کردند. همچنین

نتایج مطالعه حاضر نشان از وجود رابطه معنادار آماری میان جهش در ژن thyA با مقاومت به PAS در سویه‌های بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو دارد. مطالعه‌های بسیاری هم‌سو با نتایج این پژوهش، جهش در ژن thyA را با ایجاد مقاومت به PAS مرتبط می‌دانند. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط Zhang و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در شمال چین انجام شد، ارتباط جهش در سه ژن thyA، folC و ribD با مقاومت به PAS ارزیابی شد؛ نتایج آنها نشان داد که ۲۶/۷ درصد سویه‌های مقاوم دارای جهش در ژن thyA بودند (۱۱). از سوی دیگر در تازه‌ترین مطالعه‌ای که در رابطه با مکانیسم ژنتیکی مقاومت به PAS انجام شده نتایج حاکی از فراوانی حداکثری جهش در ژن thyA سویه‌های مقاوم به PAS است. در این مطالعه که در ماه نوامبر ۲۰۲۲ چاپ شده است، ۱۲ نمونه (۶۰ درصد) دارای جهش در ژن thyA بوده درحالی که جهش در ژن folC فقط در یک نمونه مشاهده شد (۱۹).

پارا-آمینوسالیسیلیک اسید دارای شbahت‌های ساختاری با سولفونامیدها است. سولفونامیدها آنالوگ‌های ساختاری از پارا-آمینوبنزوئیک اسید، سوبستراتی آنزیم دی‌هیدروترووات سنتاز (DHPS) هستند که توسط folP1 و folP2 کد می‌شود و به FolP1 این ترتیب به عنوان مهارکننده‌های رقابتی عمل می‌کنند. FolP2 تغليظ پارا-آمینوبنزوئیک اسید و ۶-هیدروکسی متیل-۷ و ۸-دی‌هیدروترین پیروفسفات را به ۷ و ۸-دی‌هیدروترووات کاتالیز می‌کند که در نهایت توسط آنزیم دی‌هیدروفولات ردوکتاز (DfrA / DHFR)، به تتراهیدروفولات تبدیل می‌شود (۹). برخلاف عملکرد اغلب سولفونامیدها و آنالوگ‌های آنها در سایر پاتوژن‌ها، فعالیت مهارکنندگی PAS علیه folP1 بسیار ضعیف گزارش شده است (۷). در مطالعه‌ای Rengarajan و همکارانش با استفاده از جهش‌زایی ترانسپوزون در مایکوباکتریوم بوویس BCG نشان دادند که احتمالاً مقاومت به PAS در نتیجه جهش در آنزیم تیمیدیلات سنتاز A (ThyA) است که برای بیوسنتر تیمین در مسیر فولات ضروری است. آنها همچنین مشخص کردند که جهش در ژن thyA منجر به کاهش در

داشته باشد و می‌توان از آن در راستای بهبود روش‌های درمان و تولید داروهای جدید ضد سل به عنوان نشانگری در شناسایی مقاومت‌های دارویی و مکانیسم‌های مولکولی استفاده کرد، به علاوه پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک جدید می‌تواند به عنوان ابزارهای کم هزینه، سریع و قدرتمند در شناخت جهش‌های ژنتیکی مؤثر بر ساختار و عملکرد پروتئین مفید واقع شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات تمامی کارکنان بخش میکروبیولوژی آزمایشگاه مسعود تهران برای همکاری‌های بی‌دریغ ایشان در مدت انجام این مطالعه، کمال تشکر را داریم. همچنین از کارکنان محترم نشریه پژوهش در پژوهشکی، بابت راهنمایی‌های ارزشمندانه قدردانی می‌کنیم.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال بررسی و با کد اخلاق IR.IAU.TNB.REC.1399.022 ثبت شده است.

تعارض منافع

نویسنندگان تعارض منافع را گزارش نکرده‌اند.

نرم‌افزارهای PoPMuSiC و HoTMuSiC که پیش‌بینی کننده عواقب ساختاری جهش‌ها روی پروتئین هستند، تمامی جهش‌های یافت شده را به نوعی ناپایدار کننده شناسایی کردند. همان‌طور که پیش‌تر نیز اشاره شد، آن‌زیم تیمیدیلات سنتاز برای فعالیت دی‌هیدروفولات ردوکتاز ضروری است و در بسیاری از پاتوژن‌ها، جهش‌های منجر به از دست رفتن عملکرد در ژن thyA سبب ایجاد آگزوتروفی تیمین و نیز فقدان شایستگی در ایجاد عفونت می‌شوند؛ با این وجود در تأیید نتایج این پژوهش که جهش‌های یافت شده در thyA را سبب اختلال در عملکرد و ساختار پروتئین معرفی کرده است، باید به این نکته اشاره کرد که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هر دو نوع تیمیدیلات سنتاز ThyX و ThyA را کد می‌کند و با توجه به اینکه ThyA می‌تواند نیاز سلول به dTMP را برآورده سازد، سویه‌های موتانت ThyA از لحاظ بیماری‌زاوی و بقا تعییف نشده و می‌توانند با مقاومت به PAS در ارتباط باشند (۲۰، ۲۱، ۹).

به طور کلی نتایج این بررسی حاکی از ارتباط قوی میان جهش در ژن thyA با مقاومت به داروی پارا-آمینوسالیسیلیک اسید است. اگرچه مطالعه‌های بیشتری برای تعیین نقش این ژن و یا سایر ژن‌های مرتبط با مسیر بیوسترنز فولات در ایجاد مقاومت به PAS مورد نیاز است. علاوه بر این مطالعه‌های بعدی می‌توانند با افزودن روش‌های سنجش تغییر در بیان ژن در کنار روش‌های ژنتیکی و بیوانفورماتیک به روشن شدن بهتر تأثیر جهش‌ها بر پروتئین‌های حاصله کمک کنند. از جمله محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به محدود بودن تعداد نمونه‌های مقاوم به MIC، عدم سنجش حداقل غلظت کشنیدگی دارو (Minimum Inhibitory Concentration) در رابطه با میزان PAS، مقاومت و نیز استفاده از قطعات کوچک ژنومی به جای Whole Genome WGS (sequencing) اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه موتاسیون‌های ژن thyA می‌تواند در بروز مقاومت به داروی PAS نقش مؤثری

References

- World Health Organization (WHO). Rapid communication: key changes to the treatment of drug-resistant tuberculosis. World Health Organization; 2022.
- Dalton T, Cegielski P, Akksilp S, Asencios L, Caoili JC, Cho S-N, et al. Prevalence of and risk factors for resistance to second-line drugs in people with multidrug-resistant tuberculosis in eight countries: a prospective cohort study. *The Lancet*. 2012;380(9851):1406-17.
- Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium* tuberculosis: classical and new drugs. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(7):1417-30.
- Gilchrist CA, Turner SD, Riley MF, Petri Jr WA, Hewlett EL. Whole-genome sequencing in outbreak analysis. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(3):541-63.
- Zheng J, Rubin EJ, Bifani P, Mathys V, Lim V, Au M, et al. Para-Aminosalicylic Acid Is a Prodrug Targeting Dihydrofolate Reductase in *Mycobacterium* Tuberculosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(32):23447-56.
- World Health Organization (WHO). WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment: World Health Organization; 2019.
- Palomino JC, Martin A. Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium* tuberculosis. *Antibiotics*. 2014 Jul 2;3(3):317-40.
- Dookie N, Rambaran S, Padayatchi N, Mahomed S, Naidoo K. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium* tuberculosis: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018 May 1;73(5):1138-51.
- Mathys V, Wintjens R, Lefevre P, Bertout J, Singhal A, Kiass M, et al. Molecular genetics of para-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates and spontaneous mutants of *Mycobacterium* tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(5):2100-9.
- Zhao F, Wang X-D, Erber LN, Luo M, Guo A-z, Yang S-s, et al. Binding pocket alterations in dihydrofolate synthase confer resistance to para-aminosalicylic acid in clinical isolates of *Mycobacterium* tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(3):1479-87.
- Zhang X, Liu L, Zhang Y, Dai G, Huang H, Jin Q. Genetic determinants involved in p-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates from tuberculosis patients in northern China from 2006 to 2012. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(2):1320-4.
- Nguyen L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Archives of toxicology*. 2016; 90:1585-604.
- Tille P. Bailey & Scott's diagnostic microbiology: Elsevier Health Sciences; 2022; p.530-550
- World Health Organization (WHO). Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. 2018.
- Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*. 2015;31(16):2745-7.
- Bendl J, Stourac J, Salanda O, Pavelka A, Wieben ED, Zendulka J, et al. PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations. *PLoS computational biology*. 2014;10(1): e1003440.
- Pucci F, Bourgeas R, Roodman M. Predicting protein thermal stability changes upon point mutations using statistical potentials: Introducing HoTMuSiC. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-9.
- Pucci F, Kwasigroch JM, Roodman M. Protein thermal stability engineering using HoTMuSiC. *Structural Bioinformatics*: Springer; 2020. p. 59-73.
- Wang W, Li S, Ge Q, Guo H, Shang Y, Ren W, et al. Determination of critical concentration for drug susceptibility testing of *Mycobacterium* tuberculosis against para-aminosalicylic acid with clinical isolates with thyA, folC and dfrA mutations. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2022;21(1):1-9.
- Rengarajan J, Sasseeti CM, Naroditskaya V, Sloutsky A, Bloom BR, Rubin EJ. The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Molecular microbiology*. 2004;53(1):275-82.
- Hameed HA, Islam MM, Chhotaray C, Wang C, Liu Y, Tan Y, et al. Molecular targets related drug resistance mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR- *Mycobacterium* tuberculosis strains. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018; 8:114.
- Myllykallio H, Lipowski G, Leduc D, Filee J, Forterre P, Liebl U. An alternative flavin-dependent

mechanism for thymidylate synthesis. *Science*. 2002;297(5578):105-7.

23. Minato Y, Thiede JM, Kordus SL, McKlveen EJ, Turman BJ, Baughn AD. Mycobacterium tuberculosis folate metabolism and the mechanistic basis for para-aminosalicylic acid susceptibility and resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(9):5097-106.

24. Meumann EM, Globan M, Fyfe JA, Leslie D, Porter JL, Seemann T, et al. Genome sequence comparisons of serial multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates over 21 years of infection in a single patient. *Microbial genomics*. 2015;1(5).

25. Feuerriegel S, Köser C, Trübe L, Archer J, Rüschen Gerdés S, Richter E, et al. Thr202Ala in thyA is a marker for the Latin American Mediterranean lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex rather than para-aminosalicylic acid resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(11):4794-8.

26. Fivian-Hughes AS, Houghton J, Davis EO. *Mycobacterium tuberculosis* thymidylate synthase gene thyX is essential and potentially bifunctional, while thyA deletion confers resistance to p-aminosalicylic acid. *Microbiology*. 2012;158(Pt 2):308.