Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2023; Vol. 47; No. 4

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

Hanieh Bagherifard[1], Mitra Salehi[1*], Mona Ghazi[2]

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- Aminosalycylic 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.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی- پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۷، شماره ۴، سال ۱۴۰۲ شمسی، صفحات ۹۶ تا ۱۰۵

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

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 دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۰

چکیده

سابقه و هدف: پیدایش مقاومت‌های دارویی و ظهور سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مقاوم به درمان، کنترل این بیماری را با چالش مواجه ساخته است. بنا به آمار 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 شدیم تا به بررسی جهش‌های ژن thyA در ارتباط با مقاومت به داروی پارا- آمینوسالیسیلیک اسید (PAS) بپردازیم.

روش کار: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، در مدت سه سال تعداد ۲۵۵ نمونه مثبت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* با استفاده از روش استاندارد کشت و اسمیر جداسازی شد، سپس با انجام آزمون حساسیت‌سنجی 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 منجر به تغییر کدون، با به کارگیری نرم‌افزارهای پیش‌بینی تغییرهای پروتئین آنالیز شدند. ارتباط جهش‌های یافت شده با مقاومت به داروی PAS از لحاظ آماری توسط آزمون مربع کای مطالعه شد.

یافته‌ها: از ۲۵۵ نمونه مورد بررسی، ۶۸ سویه (۲۶/۷درصد، فاصله اطمینان ۲۱/۳درصد) مقاوم به دارو تعیین شد. مجموعاً ۱۳ نمونه (۱۹/۱درصد) سویه مقاوم به PAS یافت شد که ۵ سویه (۳۸/۴درصد) 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 یافت‌شده منجر به اختلال در عملکرد و ناپایداری 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: *مایکوباکتریوم 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-Aminosalycylic 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.mitra.microbiology@gmail.com
گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

مقدمه

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک میکروارگانیسم بیماری‌زای انسانی بوده که منجر به بیماری سل می‌شود. طبق گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی (WHO) در سال ۲۰۲۲، سالانه ۱/۶-۱/۲ میلیون نفر در اثر این بیماری جان خود را از دست داده و فقط در سال ۲۰۲۱ بیش از ۱۰ میلیون نفر به این بیماری مبتلا شدند (۱).

با گسترش روز افزون مقاومت دارویی و پیدایش انواع سل مقاوم به دارو و نیز پیشروی از سطح مقاومت دارویی چندگانه MDR-TB (Multidrug- resistant) و مقاومت دارویی گسترده XDR-TB (Extensively drug- resistant) به سل غیر قابل درمان TDR-TB (totally drug- resistant)، اکنون نیازی فوری برای مدیریت و کنترل مقاومت دارویی به وجود آمده است؛ سل مقاوم به چند دارو (MDR-TB) به معنی مقاومت به داروهای خط نخست درمان و سل با مقاومت گسترده (XDR-TB) به معنی مقاومت اضافه به فلوروکینولون‌ها و یکی از داروهای تزریقی گروه A خط دوم سل است (۲).

برخلاف سایر باکتری‌ها که مقاومت دارویی اکتسابی عموماً در نتیجه انتقال افقی ژن از طریق عناصر ژنتیکی مانند پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و یا اینتگرون‌ها ایجاد می‌شود، در *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مقاومت دارویی اساساً به دلیل جهش‌های خودبخودی در ژن‌های کروموزومی است (۳).

روش‌های کنونی تشخیص و کنترل مقاومت دارویی بسیار زمان‌بر 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. توالی‌یابی ژنوم *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* توانایی تشخیص جهش‌ها در اهداف مولکولی را که نقش مهمی در ایجاد مقاومت علیه داروهای ضد سل و پدیدارشدن سویه‌های مقاوم MDR، XDR و TDR دارد، به شدت افزایش داده است. به این ترتیب، سبب سهولت در تشخیص سریع و آسان مقاومت دارویی، فاکتورهای بیماری‌زایی و کشف مسیرهای انتقال بیماری می‌شود (۴).

پارا- آمینو سالیسیلیک اسید (PAS) یکی 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 کامل مشخص نشده است (۷، ۸). شباهت‌های ساختاری میان این دارو با پارا- آمینوبنزوئیک اسید (PABA) این نظریه را به وجود آورد که احتمالاً PAS هدف یا اهدافی را در مسیر سنتز فولات *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مهار می‌کند. نظریه فوق براساس مکانیسم عمل گروه دیگری از آنالوگ‌های ساختاری PABA یعنی سولفونامیدها شکل گرفت (۵). طی سال‌های اخیر، مطالعه‌ها مشخص کردند که PAS به عنوان یک سوبسترای جایگزین برای دی هیدروپتروات سنتاز (DHPS / FolP1) عمل می‌کند. محصول این واکنش یعنی کمپلکس PAS- هیدروکسی دی هیدروپتروات، توسط آنزیم دی‌هیدرو فولات سنتاز (DHFS/ FolC) گلوتامینه شده و تشکیل هیدروکسی دی هیدروفولات می‌دهد. در نهایت این ترکیب فعالیت دی هیدروفولات ردوکتاز (DfrA) را مهار کرده و از رشد *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* جلوگیری می‌کند. به این ترتیب جهش در ژن‌های کد کننده هر یک از آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتز فولات ممکن است سبب مقاومت به PAS شود. علاوه بر این جهش‌های افزایش بیان در ژن‌های کدکننده آنزیم‌های جایگزین مسیر فولات مانند RibD به عنوان آنالوگ دی هیدرو فولات ردوکتاز نیز می‌تواند سبب مقاومت به PAS شود (۷). در تأیید فرضیه مذکور، مطالعه‌هایی که تاکنون انجام شده جهش‌هایی را در ژن‌های thyA، folC، dfrA و ribD با ایجاد مقاومت به PAS مطرح کرده‌اند (۵، ۱۱-۹). ژن thyA کدکننده آنزیم تیمیدیلات سنتاز است که در مسیر فولات در *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، dUMP را با استفاده از ۵ و ۱۰-متیلن- تتراهیدروفولات به عنوان دهنده متیل به dTTP تبدیل

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

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

با وجود مطالعه‌های گسترده در سطح جهان، مکانیسم مقاومت به داروهای خط دوم درمان سل و به ویژه داروی پارا- آمینو سالیسیلیک 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- آمینو سالیسیلیک 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 مایکوباکتریولوژی آزمایشگاه مسعود تهران برای ورود به مطالعه نمونه‌گیری شد. نمونه‌های به دست آمده شامل: ۲۱۱ نمونه خلط (۸۲/۷درصد)، دو نمونه ادرار (۰/۸درصد)، یک نمونه بیوپسی غده لنفاوی (۰/۴درصد)، ۱۷ نمونه مایع برونش (۶/۶درصد)، شش نمونه مایع نخاع (۲/۴درصد)، ۱۵ نمونه مایع پلور (۵/۹درصد)، سه نمونه مایع مغز استخوان (۱/۲درصد) بودند. نمونه‌ها از نظر عفونت با *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* با روش استاندارد طلائیی تشخیص سل (کشت روی محیط لون اشتاین- جنسن) و اسمیر میکروسکوپی بررسی که در نهایت تعداد ۲۵۵ نمونه سل مثبت تشخیص داده شد (۱۳).

برای تعیین الگوی مقاومت دارویی و جداسازی سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* MDR و XDR، روی تمامی نمونه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* آزمون آنتی‌بیوگرام یا حساسیت دارویی طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی و با تعداد تقریبی ۳×۱۰^{۸} باکتری در هر میلی‌لیتر (استاندارد یک مک فارلند) و با استفاده از داروهای خط نخست و خط دوم درمان سل شامل داروهای ایزونیازید (INH)، ریفامپین (RIF)، آمیکاسین (AMK)، کاپرئومایسین (CAP)، کانامایسین (KAN)، سیپروفلوکساسین (CIP)، اتامبوتول (ETB) و اوفلوکساسین (OFX) (Sigma- Aldrich®, Merck, Germany)، علاوه بر داروی 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 ۸۰ °C و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ °C گرمادهی و سپس با دور ۱۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۵دقیقه سانتریفیوژ شد. در انتها 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 نانودراپ ۱۰۰۰ (Thermo Fischer Scientific) استفاده شد.

طراحی پرایمرهای (آغازگر) ژن thyA براساس توالی استاندارد سویه *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3:c 3074471_3073680) انجام شد. پرایمرهای مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer3Plus طراحی و سپس صحت، اختصاصیت و دمای ذوب آنها به کمک نرم‌افزار Primerblast مرکز ملی داده‌های بیوتکنولوژی (NCBI) و Oligo v 7.0 کنترل شد. سنتز پرایمرها توسط شرکت سیناکلون انجام شد و با غلظت ۱۰۰ pmol/µl تحویل شد (Order N105, Cat No. ps4131). توالی پرایمرهای استفاده شده به شرح جدول ۱ است.

جدول ۱- جفت پرایمر استفاده شده برای تکثیر ژن thyA.

	توالی ('3-'5)	طول پرایمر	دمای ذوب (°C)	GC (%)	طول محصول
پرایمر Forward	CCCTGTCATGCGTTCTTCCA	۲۰	۵۹/۳	۵۵	۲۱۹ bp
پرایمر Reverse	CCGTACTTGCTCGACGTGAT	۲۰	۵۹/۳	۵۵	

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

با هدف تکثیر ناحیه مورد نظر از ژن thyA، مخلوط واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ µl (۱۲/۵ µl مسترمیکس) آماده شد و تعیین برنامه PCR با کمک دستورالعمل شرکت سازنده مستر میکس (Ampliqon, Denmark) و شیب دمایی (گرادیان) انجام 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.

جدول ۲- برنامه PCR تعیین شده برای تکثیر ژن thyA.

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

پس از انجام PCR برای اطمینان از صحت انجام پذیرفتن واکنش‌ها، تکثیر صحیح قطعه‌های مورد نظر و نبود آلودگی های ناخواسته و مداخله گر در واکنش، نمونه‌ها به وسیله الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱/۵درصد بررسی شدند. سپس برای تعیین توالی ژن‌های تکثیر یافته، محصولات PCR که روی ژل آگارز باندهای مورد انتظار را ایجاد کرده بودند به همراه پرایمر مربوطه به شرکت کدون ژنتیک (گروه کدون ژنتیک، تهران، ایران) ارسال شد. شرکت مورد نظر با استفاده از دستگاه Genetic Analyzer 3500 (Biosystems, USA Applied) و روش خودکار، قطعه‌های ژنی را خوانش و نتایج به صورت فایل فرمت ab1 تحویل شد. نتایج تعیین توالی توسط نرم‌افزارهای Chromas v 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd.) و FinchTv v 1.4 (Geospiza Inc, USA) بررسی شدند و در نهایت توالی نمونه‌ها برای بررسی وجود جهش‌های احتمالی با کمک نرم‌افزار MEGA v 10.0 (Megasoftware, PA, USA) و از طریق 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. به این‌ترتیب، 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 PROVEAN (Variation Effect Analyzer Protein، J. Craig Venter Institute, USA)، PredictSNP (Loschmidt, Czech) و DEZYME (SNPMuSiC، PoPMuSiC و HoTMuSiC) (Dezyme, Belgium) بررسی شدند (۱۸-۱۵).

در پایان، داده‌های حاصل از آنالیز ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار SPSS (IBM, USA) ورژن 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 ۰/۰۵ 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 (۲۶/۷درصد) ، تعداد ۳۷ نمونه (۵۴/۴درصد) به آمیکاسین، ۴۳ نمونه (۶۳/۲درصد) به کاپرئومایسین، ۴۰ نمونه (۵۸/۸درصد) به کانامایسین، ۱۷ نمونه (۲۵/۰درصد) به اتامبوتول، ۳۶ نمونه (۵۲/۹درصد) به

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

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

در نتیجه تکثیر قطعه موردنظر و مقایسه توالی‌های به دست‌آمده با توالی استاندارد *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* H37Rv، به طور کلی تعداد شش جهش نوکلئوتیدی مختلف در ژن thyA در پنج نمونه (۳۸/۴درصد) 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 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 PoPMuSiC و HoTMuSiC نشان دادند که هر چهار جهش مشاهده شده می‌توانند از طریق کاهش ΔΔG، 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 = ۰/۰۰۰). علاوه بر این، تمامی چهار جهش تغییر کرده از لحاظ آماری دارای رابطه معنادار با مقاومت به داروی مورد مطالعه بودند (P ≤ ۰/۰۰۱).

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

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

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

جهش	PredictSNP	PROVEAN		PoPMuSiC		SNPMuSiC		HoTMuSiC	
	نتیجه	امتیاز۱	نتیجه	ΔΔG2 (kcal/mol)	نتیجه	امتیاز۲	نتیجه	ΔTm3 (kelvin)	نتیجه
L163R	آسیب‌رسان	-۵/۷۶۲	آسیب‌رسان	۱/۷۳	ناپایدارکننده	۰/۵۲	آسیب‌رسان	-۰/۲۹	ناپایدارکننده
A179V	آسیب‌رسان	-۳/۹۹۷	آسیب‌رسان	۱/۱۳	ناپایدارکننده	۰/۳۷	آسیب‌رسان	-۰/۱۹	ناپایدارکننده
S195G	خنثی	-۱/۵۷۶	خنثی	۱/۲۴	ناپایدارکننده	-۰/۵۱	آسیب‌رسان	-۰/۱۸	ناپایدارکننده
I200V	خنثی	-۰/۰۳۰	خنثی	۰/۸۸	ناپایدارکننده	-۰/۴۰	آسیب‌رسان	-۰/۶۰	ناپایدارکننده

- براساس دستورالعمل نرم‌افزار، حد آستانه برابر با ۲/۵- است. جهش دارای امتیاز مساوی و کمتر از ۲/۵- 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.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

بحث

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 folC، thyA و ribD با مقاومت به PAS ارزیابی شد؛ نتایج آنها نشان داد که ۲۶/۷درصد سویه‌های مقاوم دارای جهش در ژن thyA بودند (۱۱). از سویی 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 (۶۰درصد) دارای جهش در ژن thyA بوده درحالی‌که جهش در ژن folC فقط در یک نمونه مشاهده شد (۱۹).

پارا- آمینوسالیسیلیک اسید دارای شباهت‌های ساختاری با سولفونامیدها است. سولفونامیدها آنالوگ‌های ساختاری از پارا-آمینوبنزوئیک اسید، سوبسترای آنزیم دی‌هیدروتروات سنتاز (DHPS) هستند که توسط folP1 و folP2 کد می‌شود و به این‌ترتیب به عنوان مهارکننده‌های رقابتی عمل می‌کنند. FolP1 و FolP2 تغلیظ پارا-آمینوبنزوئیک اسید و ۶-هیدروکسی متیل-۷ و ۸- دی‌هیدروترین پیروفسفات را به ۷ و ۸- دی‌هیدروتروات 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 بیوسنتز تیمین در مسیر فولات ضروری است. آنها همچنین مشخص کردند که جهش در ژن thyA منجر به کاهش در فعالیت آنزیم تیمیدیلات سنتاز شده است (۲۰). مطالعه دیگری که نقش آنزیم‌های مسیر فولات را در ایجاد مقاومت به PAS 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 دئوکسی یوریدین مونوفسفات (dUMP) را به دئوکسی تیمیدین مونوفسفات (dTMP) کاتالیز کرده که برای متابولیسم فولات به خصوص زمانی‌که تتراهیدروفولات به عنوان دهنده متیل مطرح است، ضروری است (۲۱). در اغلب ارگانیسم‌ها واکنش فوق در نهایت منجر به آزادسازی دی‌هیدروتروات 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 تتراهیدروتروات‌گلوتامات را کاتالیز می‌کند (۲۲). فعالیت آنزیم ThyA برخلاف آنزیم ThyX در گرو فعالیت DHFR برای فراهم آوردن سطوح کافی از تتراهیدروتروات 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 حالی‌که 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، 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

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

نرم‌افزارهای PoPMuSiC وHoTMuSiC که پیش‌بینی‌کننده عواقب ساختاری جهش‌ها روی پروتئین هستند، تمامی جهش‌های یافت شده را به نوعی ناپایدارکننده 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 یافت‌شده 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 ThyA و ThyX را کد می‌کند و با توجه به اینکه ThyX می‌تواند نیاز سلول به dTMP را برآورده سازد، سویه‌های موتانت ThyA از لحاظ بیماری‌زایی و بقا تضعیف نشده و می‌توانند با مقاومت به PAS در ارتباط باشند (۹، ۱۱، ۲۰، ۲۶).

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 بیوسنتز 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 PAS، عدم سنجش حداقل غلظت کشندگی دارو MIC (Minimum Inhibitory Concentration) در رابطه با میزان مقاومت و نیز استفاده از قطعات کوچک ژنومی به جای روش‌های توالی‌یابی کامل ژنوم WGS (Whole Genome 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 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 پزشکی، بابت راهنمایی‌های ارزشمندشان 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

نویسندگان تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

References

1. World Health Organization (WHO). Rapid communication: key changes to the treatment of drug-resistant tuberculosis. World Health Organization; 2022.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. World Health Organization (WHO). WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment: World Health Organization; 2019.

7. Palomino JC, Martin A. Drug resistance mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. Antibiotics. 2014 Jul 2;3(3):317-40.

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. Nguyen L. Antibiotic resistance mechanisms in M. tuberculosis: an update. Archives of toxicology. 2016; 90:1585-604.

13. Tille P. Bailey & Scott's diagnostic microbiology: Elsevier Health Sciences; 2022; p.530-550

14. World Health Organization (WHO). Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. 2018.

15. 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.

16. 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.

17. Pucci F, Bourgeas R, Rooman M. Predicting protein thermal stability changes upon point mutations using statistical potentials: Introducing HoTMuSiC. Scientific reports. 2016;6(1):1-9.

18. Pucci F, Kwasigroch JM, Rooman M. Protein thermal stability engineering using HoTMuSiC. Structural Bioinformatics: Springer; 2020. p. 59-73.

19. 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.

20. Rengarajan J, Sassetti 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.

21. 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.

22. Myllykallio H, Lipowski G, Leduc D, Filee J, Forterre P, Liebl U. An alternative flavin-dependent

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

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, Rüsch Gerdes 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.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]