

بررسی مکانیسم مقاومت دارویی نسبت به ایزونیازید در مایکو باکتریوم توبرکلوزیس از دیدگاه ژنتیک ملکولی

ایرج پاکزاد،* فرید عزیزی جلیلیان*

چکیده

مایکو باکتریوم توبرکلوزیس یکی از عوامل مهم مرگ و میر در جوامع بشری می باشد عقیده بر این است که $\frac{1}{3}$ جمعیت جهان آلوده به این باکتری بوده و هر سال ۸ میلیون نفر به تعداد افراد آلوده اضافه می شود و ۳ میلیون نفر نیز در اثر ابتلا به سل از بین می روند هر چند زمانی گمان می رفت تا پایان قرن بیستم سل ریشه کن خواهد شد ولی با بروز مقاومت دارویی و شیوع بیماری ایدز ریشه کنی این بیماری مشکل تر از گذشته شد. مقاومت دارویی توسط مکانیزم های مختلفی از جمله جهش در ژنوم باکتری ها ایجاد می شود. مقاومت به ایزونیازید با ایجاد جهش در ژن های *kat G*، *glf*، *inh A*، *akpc* مقاومت به ریفامپین با جهش در ژن *rpoB* مقاومت به استرپتومايسين با موتاسيون در ژن *rpsL* و *rrs* و مقاومت به کوانیولون ها با جهش در ژن *gyrA* صورت می گیرد.

واژه های کلیدی: مایکو باکتریوم توبرکلوزیس، مقاومت دارویی، سل، ایزونیازید، ریفامپین،

مقدمه

مایکو باکتریوم توبرکلوزیس باکتری داخل سلولی اختیاری می باشد که عامل ایجاد بیماری سل در انسان است. اولین بار ماهیت بیماری به وسیله ویلمین در سال ۱۸۶۵ شناخته شد و او مسری بودن بیماری را ثابت کرد. در سال ۱۸۸۲ این باکتری توسط رابرت کخ کشف گردید و بدین جهت آن را باسیل کخ می نامند. انسان میزبان اصلی باسیل سل بوده و این بیماری از طریق سرفه و خلط از افراد مسلول به افراد سالم منتقل می شود [۱].

با کشف داروهای ضد سل از قبیل استرپتومايسين، ایزونیازید، ریفامپین، اتامبوتول و سایر داروها میزان سل در کشورهای پیشرفته شدیداً کاهش یافت. با کاهش میزان بیماری با استفاده از داروهای ذکر شده امید

می رفت که تا آخر قرن بیستم این بیماری ریشه کن شود ولی افزایش تعداد موارد جدید بیماری سل در کشورهای پیشرفته طی سال های اخیر این امید را به یاس تبدیل کرد. زمینه های افزایش تعداد موارد جدید بیماری را ناشی از بروز ایدز، کاهش سطح بهداشت و مراقبت های اجتماعی از افراد بی بضاعت، افزایش فقر، گسترش اعتیاد و از همه مهم تر بروز مقاومت دارویی در باکتری می دانند. ظهور مقاومت دارویی یک نگرانی جدی بهداشتی می باشد، اما ظهور سوشهای مقاوم به چندین دارو بسیار نگران کننده تر است.

امروزه تعداد کمی از داروها علیه مایکو باکتریوم توبرکلوزیس موثر هستند. حدود ۱۳ درصد موارد جدید بیماری حداقل به یکی از داروهای ایزونیازید، ریفامپین، استرپتومايسين، اتامبوتول، و پیرازینامید و ۳/۲ درصد هم به ریفامپین و هم به ایزونیازید مقاوم هستند [۲ و ۳ و ۴ و ۵].

* دانشجوی PHD باکتری شناسی دانشگاه تربیت مدرس

** دانشجوی MSC ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس

مواد و روشها

امروزه جهت استاندارد کردن درمان و مشخص کردن تاثیر درمان از استراتژی درمان کوتاه مدت با نظارت مستقیم استفاده می شود. داروهای درمان سل براساس میزان تأثیر و سمیت در دو خط قرار می گیرند. در خط اول ایزو نiazid، ریفامپین، استرپتومایسین، پاراآمینوسالسیلیک اسید قرار گرفته و در خط دوم اتیون آمید، سیکلوسرین، پیرازین آمید، کاپرئومایسین، یوماسین، پروتیون آمید، یتاستازون و احتمالاً کانامایسین می باشند. داروهای خط اول نسبت به خط دوم موثرتر بوده، سمیت کمتری دارند. امروزه جهت درمان سل از چهار داروی ایزونیازید^۱، ریفامپین، اتامبوتول و پیرازین آمید به مدت دو ماه و متعاقب آن درمان با ایزونیازید و ریفامپین به مدت ۴ ماه استفاده می شود.

یافته های پژوهش

مکانیسم های مقاومت دارویی در باکتری ها

- ۱- تولید آنزیم های غیر فعال کننده داروها که بهترین مثال آن بتا لاکتامازها می باشد. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با تولید آنزیم بتا لاکتاماز به طور ذاتی در مقابل داروهای بتالاکتام مقاوم می باشد.
- ۲- جهش در جایگاه هدف دارو (جهش در آنزیم هایی که دارو را فعال می کنند یا آنزیم هایی که خود هدف دارو هستند) بیشتر این نوع مکانیزم ها در ایجاد مقاومت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس معمول می باشد.
- ۳- تغییر در غلظت درون سلولی دارو، این مکانیزم به سه صورت انجام می شود:

الف- ترشح فعال دارو به خارج از سلول باکتری^۲

ب- کاهش نفوذ پذیری^۳ دارو

ج- کاهش جذب^۴ دارو

کاهش جذب دارو و نفوذ پذیری به درون سلول، متغیر بسیار مهمی درمقاومت دارویی می باشد. انتقال ژن مقاومت از طریق *Transposon*، *Episomal*، *plasmid* به داخل مایکو باکتریوم توبرکلوزیس تاکنون اثبات نشده است، هر چند این مکانیزم ها برای کسب مقاومت دارویی در دیگر باکتریها معمول است [۲،۳،۴].

اساس ژنتیک مقاومت در مایکوباکتریوم ها اولین بار در مایکوباکتریوم فورچوتیوم^۵ شناسایی شد. در این باکتری مقاومت به سولفانامیدها توسط آنزیم های غیر فعال کننده دارو که ژن کد کننده آن ها بر روی عناصر قابل انتقال قرار دارند رخ نمی دهد.

مکانیزم مقاومت به ایزونیازید ایزونیکوتینیک اسید هیدرازید موسوم به ایزونیازید می باشد. وزن مولکولی آن ۱۳۷ دالتون و مولکول آن محلول در آب می باشد. ساختمان این مولکول شبیه به پیریدوکسین (Vitamin B6) است.

اولین بار در اوایل قرن بیستم ایزونیازید ساخته شد ولی تا سال ۱۹۵۰ به عنوان داروی ضد سل به کار نرفت. ایزونیازید و ریفامپین ستون فقرات شیمی درمانی جهانی بر علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد. کمپلکس مایکو باکتریوم توبرکلوزیس به این دارو خیلی حساس می باشد. MIC^۶ حداقل غلظت بازدارنده ایزو نiazid برای سوش های حساس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ۰/۰۲-۰/۰۵ r/ml و برعکس ایزونیازید در محیط خارج از بدن یا آزمایشگاه^۷ بر ضد اکثر ایزوله های کمپلکس *M. avium* (and *M. intracellular*) MAC^۸ غیر فعال می باشد.

1- Isoniazid= INH

2- EFFLUX

3- Permeability

4- uptake

5- Mycobacterium-Furtuitum⁶

6- Minimum Inhibitory Concentration

7- invitro

8- Fragility

9- viscosity

10- Hidrophobity

بروک و هم کارانش در سال ۱۹۵۴ مشاهده کردند که در میکرو ارگانیزم های مقاوم به ایزونیازید فعالیت کاتالاز پراکسیدازی آن کاهش یافته است. و محققین دیگر نیز دریافتند که در میکروارگانیزم های مقاوم بین MIC ایزونیازید و فعالیت کاتالاز رابطه معکوس وجود دارد. عقیده بر این است که آنزیم های کاتالاز پراسیداز باعث تبدیل فرم غیر فعال ایزونیازید به فرم فعال می شود. ترانسفورماسیون ژن Kat G به ایزوله های مقاوم مایکوباکتریوم موجب ایجاد حساسیت مجدد به ایزونیازید در آن ها گردید. این نتیجه تأکید کرد که فرآورده های پروتئینی ژن Kat G در عملکرد ایزونیازید نقش دارد. هم چنین مشاهده شد که $\frac{1}{2}$ ایزوله های بسیار مقاوم با MIC بیشتر از $5.03 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($\text{MIC} > 5.03 \mu\text{g}/\text{ml}$) ژن KatG گرموزومشان حذف شده است.

محققین دیگر نتیجه گرفتند که در تعداد زیادی از سوش های مقاوم مایکوباکتریوم توپرکلوزیس در ژن Kat G بدون حذف کامل آن جهش صورت گرفته است. این محققین با آنالیز سوترن^۲ ملاحظه کردند که اغلب سوش های مقاوم به ایزو نیازید ظاهراً دارای ژن سالم Kat G می باشند. ولی سطح فعالیت کاتالاز پراکسیداز در این ها کاهش یافته بود. آنزیم بیان شده از ژن جهش یافته Kat G نسبت به آنزیم سالم دارای فعالیت کاتالاز پراکسیدازی کمتری، هم از لحاظ عملکرد و هم از لحاظ تمایل^۳ به ایزونیازید می باشد. محققین نتیجه گرفتند که مقاومت به واسطه ژن Kat G یا به صورت حذف کامل ژن و یا به صورت جهش در این ژن می باشد. جهش در این ژن بیشتر به صورت موتاسیون اشتباهی^۴ و سایر انواع جهش ها می باشد. چندین نوع

در مورد مکانیزم عمل ایزونیازید چندین فرضیه وجود دارد:

۱- ایزونیازید یا متابولیت های آن، سنتز اسید میکولیک را بلوکه می کنند، دلایلی که بر این فرضیه ذکر می کنند (جدا از جنبه های مولکولی) عبارتند از:

الف- افزایش شکنندگی^۵ سلول های مایکو باکتریوم

ب- افزایش غلظت^۱ درون سلولی

پ- کاهش آب دوستی^۱ سلولی

ت- از دست دادن خاصیت مقاومت به اسید

۲- تولید رادیکالهای آزاد ناشی از واکنش بین ایزونیازید و کاتالاز پراکسیداز

۳- ایزونیازید در متابولیسم NAD اختلال ایجاد می کند که منجر به اثرات چند گانه در متابولیسم انرژی و سنتز ماکرو مولکول های سلولی می شود.

۴- ایزو نیازید یک همگن^۱ متابولیتی (آنتی متابولیت) برای دو ویتامین نیکوتین آمید و پیریدوکسین می باشد. این دارو به آنزیم های تبدیل کننده ویتامین های ذکر شده به مولکول های مفید، متصل شده و آن ها را غیر فعال می کند.

۵- مهار غیر اشباع شدن در فرایند سنتز اسیدهای چرب و مهار طویل شدن اسیدهای چرب و هیدروکسی لیپیدها ضمناً این دارو نقش باکتریو استاتیک دارد. ژن هایی که احتمالاً در ایجاد مقاومت به ایزونیازید نقش دارند عبارتند از: Kat G, Inh A, gl F, pc, [۴,۶,۷].

بحث و نتیجه گیری

ژن Kat G : این ژن شامل ۲۳ جفت باز بوده و یک پروتئین با وزن مولکولی ۸ کیلو دالتون را کد^۵ می کند. این پروتئین یک ترکیب کاتالاز پراکسیداز می باشد. میدل

1- Analogous

2- Southern

3- Afinity

4- Missense Mutation

5- Amino Terminal

leading frame تشکیل شده که شامل opr1 (ma) و ژن inhA می باشد. ژن inhA پروتئین، آنزیم Fatty acyl enoylreductase را کد می کند، که جزیی از تیپ II سیستم سنتز اسیدهای چرب می باشد. این پروتئین ۲۵/۷ کیلو دالتون وزن دارد. این پروتئین در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم اسمگماتیس بیش از ۴۰ درصد شباهت با پروتئین EnvM در E. coli و Salmonella typhimurium دارد عقیده بر این است که پروتئین EnvM در احیای پروتئین crotonyle-acyl carrier protein و سنتز اسیدهای چرب نقش دارد. قابل توجه است که جایگزینی Gly-ser در موقعیت ۹۳، پروتئین EnvM باکتری E. coli منجر به مقاومت diazaboline که یک مهار کننده بيو سنتز اسیدهای چرب فسفولیپید و لیو پلی ساکارید است می گردد.

آزمایشات کلونینگ نشان داد که حضور inhA در مایکو باکتریوم اسمگماتیس برای ایجاد مقاومت به ایزو نیازید کافی می باشد. در ارگانیزم های مقاوم مشاهده شد که تغییر در یک باز T→G در جایگاه ۲۸۰ ژنوم موجب تبدیل Ser→Ala در جایگاه ۹۴ پروتئین inhA می شود. مشاهده گردید که این موتاسیون اشتباهی موجب مقاومت به ایزونیازید و اتیون آمید شد [۴،۵،۸،۹،۱۰].

انواع دیگر موتاسیون در نواحی تنظیمی inhA و یا نواحی اتصال به ریبوزوم inhA mRNA می باشد. کینیک موتانت ۹۴ inhA ser → Ala نسبت به سوش وحشی از نظر kmg Vmax متفاوت می باشد. ثابت میکائیلز برای NADH در موتانت، ۵ برابر بالاتر از سوش وحشی است.

تغییر در زنجیره های جانبی inhA و جا به جایی ile→Thr در موقعیت ۱۶ که در جایگاه اتصال آنزیم با NADH است در چندین سوش مقاوم دیده شده است. موتاسیون اشتباهی که منجر به جایگزینی ser→Ala در موقعیت ۹۴ و ile→Thr در موقعیت ۱۶ موجب

جهش به صورت غالب در ناحیه کد کننده نیمه آمینی^۵ پروتئین کد شده توسط ژن Kat G وجود دارد. معمول ترین جهش، تغییر CtG → CGG می باشد که منجر به جا به جایی leu → Arg در جایگاه ۴۶۳ است. انواع دیگر موتاسیون شامل تبدیل GTG→GCG (موقعیت اول پروتئین Fe-Met → Alu) و GAC→GCC (Thr → Pro در موقعیت ۲۷۵). و AGC→ACC (Ser→Thr در موقعیت ۳۱۵) و CTG→ATG (leu→Met در موقعیت ۵۸۷) می باشد. در تعداد دیگری از سوش هایی که بررسی شد حذف ۱۲ جفت باز رخ داده بود که منجر به حذف اسید آمینه ۱۲۳-۱۲۰ پروتئین گردید. در پژوهش های دیگر در یک سوش مقاوم مشاهده گردید که دارای جا دادن^۱ یک قطعه ۳ جفت باز (CAT)، که کد کننده Ile است بین کروم های ۱۲۵ تا ۱۲۶ بوده در این مورد اخیر فعالیت کاتالاز بر اکسیداز تا حدود ۹۰ درصد کاهش یافته بود. البته تعداد دیگری از موتاسیون ها در ژن KatG رخ داده بود که هیچ گونه تأثیری بر روی عملکرد آنزیم کاتالاز بر اکسیداز نداشت مانند جایگزینی Arg→Leu در جایگاه ۴۶۳ [۲۸].

لوکوس INHA

همان طور که ذکر شد ژن KatG به طور واضح با مقاومت به ایزو نیازید مرتبط می باشد. در تعدادی از نمونه های مقاوم به ایزونیازید ژن KatG بدون هیچ گونه موتاسیونی و به طور طبیعی وجود دارد. بنابراین می بایست ژن های مقاوم دیگری وجود داشته باشد. لازم به ذکر است که کاتالاز که توسط ژن KatG کد می شود یکی از اجزای مکانیسم دفاعی اکسیداتیو باکتری بوده و در پاسخ به فشار اکسیداتیو ناشی از واسطه های فعال اکسیژنی در ماکروفاژها القاء گردیده و باکتری را در مقابل کشتار اکسیداتیو محافظت می کند. لوکوس inhA از دو open

در سوش های مقاوم جا به جایی در مورد دو نوکلئوتید در جایگاه اتصال به ریبوزوم رخ می دهد. این ژن آنزیمی را کد می کند که در سنتز اسید میکولیک نقش دارد. این آنزیم می تواند یک هدف برای ایزو نیازید باشد که ملاحظه می شود در سوش های مقاوم، ژن این آنزیم در جایگاه اتصال به ریبوزوم دچار جهش گردیده است [۲،۱۲].

ژن glf

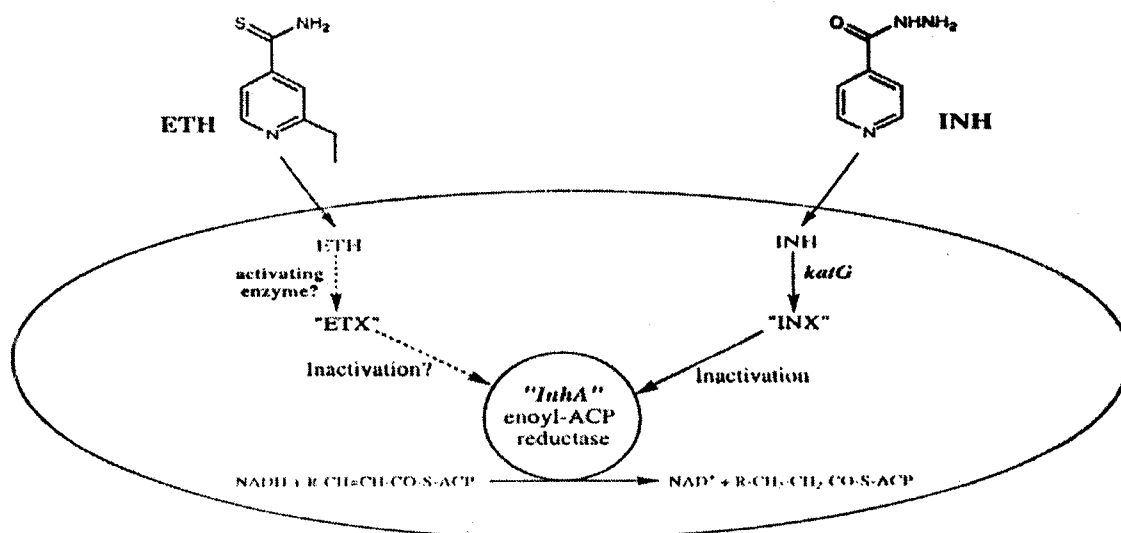
این ژن در مایکو باکتریوم توپرکلوزیس آنزیم Glf را کد می کند که تبدیل $\text{udp-galactopyranose}$ را به $\text{UDP-galactofuranose}$ کاتالیز می کند که این سوبسترای ساخت آرابینوگالاکتان می باشد که یک ترکیب اساسی دیواره سلولی مایکوباکتریوم ها است. افزایش بیان Glf موجب افزایش MIC ایزونیازید در مایکوباکتریوم بویس از 6^3 gr/ml به 8^3 gr/ml شده در مایکو باکتریوم توپرکلوزیس افزایش بیان Glf موجب ایجاد سویه ای می شود که نسبت به سویه والد دو برابر مقاوم تر هستند. احتمالاً Glf به ایزونیازید در حضور کوفاکتورهای مناسب به ایزونیازید فعال متصل می شود. از طرف دیگر Glf ممکن است ایجاد مقاومت به ایزونیازید نماید با توقف کوفاکتورهای NADH/NAD^+ می تواند بر روی فعال سازی ایزونیازید به وسیله KatG یا واکنش ایزونیازید با inhA تأثیر بگذارد و به دلیل این

کاهش تمایل آنزیم برای NADH می شود. تغییر کینتیک واکنش بین آنزیم و کوفاکتور و متعاقب آن اتصال فرم فعال ایزونیازید به آنزیم تغییر می کند نهایتاً موجب مقاومت به ایزو نیازید می شود. [۲].

ایزو نیازید در حضور NADH به آنزیم inh متصل می شود. در مطالعات دیگر مشخص شده که برای مهار inhA احتیاج به NAD^+ یا NADH می شود. InhA به NAD متصل می شود. و کمپلکس آنزیم-نوکلئوتید را تشکیل می دهد که هدف اصلی برای ایزونیازید می باشد. جهش در دومین اتصال به NADH موجب کاهش مراتب NADH به آنزیم و ایجاد مقاومت به ایزونیازید می شود. این مطالعه نشان می دهد. که نسبت درون سلولی NADH/NAD می تواند بر روی فعال سازی ایزونیازید بوسیله KatG یا واکنش بین ایزو نیازید با inhA تأثیر بگذارد [۱۱]. (شکل ۱)

سوش های مرو دیپلوئید که دارای نسخه های چند گانه از inhA هستند، مقاومت مشخصی به مهار بیوسنتز اسید میکولیک توسط ایزو نیازید دارند. [۲].

۱ orf پروتئینی با وزن $28/5$ کیلو دالتون را کد می کند. این پروتئین بیشترین شباهت را باکتو-اسیل کاریر پروتئین ردوکتاز که توسط FabG در باکتری اشرفیشیا کلی کد می شود، دارد. این آنزیم در بیوسنتز اسید چرب نقش دارد و ژن آن دارای ۷۴۴ جفت باز می باشد.



شکل ۱ - مکانیسم عمل ایزونیازید

باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ژن کد کننده فاکتور نسخه برداری *oxyr* آن در اثر جهش دچار اختلال گردیده است. باکتریهای که در اثر ژن *KatG* یا حذف آن به ایزونیازید مقاوم شده اند، قاعداً باید در برابر شرایط اکسیداتیو درون سلول های ماکروفاژ از پای درآیند ولی مشاهده شد سوش های مقاوم به راحتی در داخل ماکروفاژها بقا پیدا می کنند. مشاهده شد ژن *ahpc* در این سویه ها شدیداً افزایش بیان پیدا کرده است و جای خالی فعالیت ژن *KatG* را پر نموده است و موجب بقای درون سلولی باکتری می شود [۷].

که آنزیم *Gif* احتیاج به *FADH* یا *NADH* و یا *NADPH* برای فعالیت دارد ممکن است از طریق تأثیر بر $NADH/NAD^+$ ایجاد مقاومت نماید [۱۱].
ژن *ahpc* الکیل هیدرو پروکسید ردوکتاز^۱ این ژن *ahpc* از ژن هایی است که بیان آن وابسته به ژن *oxyr* می باشد. همان طور که قبلاً ذکر شد ژن کاتالاز پراکسیداز جزء مکانیسم دفاعی اکسیداتیو است که در پاسخ به استرس اکسیداتیو القاء می شود و باکتری ها را در مقابل کشتار اکسیداتیومی محافظت می کنند [۷].

منابع

7- Inderlied B.C;and solfinger M, Antimicrobial Agents and susceptibility tests Mycobacteria, in: medical Microbiology; Ed. Murray. R.P.

wolfe London, 1994, chapter 119, pp:1385-1390.

8-Musser M.J; Antimicrobial agent resistance, Molecular Genetic Insights; Clinical Microbiology Review, 1995, Vol 8(4):469-514

9- Musser M.J, and et al; characterization of the catalase peroxidase Gene (*katG*) and *inh A* locus in isoniazid Resistance and susceptible strain of mycobacterium tuberculosis by Automated DNA sequencing, Restricted Array of Mutations Associated with Drug resistance;

Journal Infectious diseases, 1996, 173:196-202

10- Quemard A. and et al; Enzymatic characterization of the target for Isoniazid in mycobacterium tuberculosis; Biochemistry, 1995, 34:8235-8241

11-Rozwarski A, D and et al; Modification of the *nadh* of the Isoniazid Target (*inhA*) from M. tuberculosis. Science, 1998, 279, 98-102

12- zhang y and young D; Molecular genetics of drug resistance in mycobacterium tuberculosis, a molecular study; Lancet, 1994, 344:293-298

۱- ادیب فر پرویز؛ میکروب شناسی پزشکی، چاپ سوم،

۱۳۷۱

2- Blanchard S.J; Molecular mechanisms of Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Annual Review Biochemistry; 1996, 65:215-239

3-Basso A.L and et al; Mechanisms of Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Enzymatic characterization of Enoyl Reductase mutants Identified in Isoniazid Resistance clinical Isolates; Journal Infectious Disease. 1998, 175:775-769

4-Black G.J; Microbiology principles and Explorations; 1999, pp:340-366

5-chenp; and Bishai R.W, Novel selection for isoniazid (INH) Resistance Genes supports a Role for NAD-Binding proteins in Mycobacterial INH Resistance, Infection and immunity; 1998, 66(11): 5099-5106

6-Heym B, and et al; Effect of expression of the Alkyl Hydroperoxide Reductase *Ahpc* on the virulence and Isoniazid Resistance of mycobacterium Tuberculosis; Infection and Immunity, 1997, 65(4):1395-1401

^۱ -Alkyl Hydroxy Proxide Reductase

Drug resistance mechanism towards Isoniazide in Myco bacterium Tuberculosis considering molecular genetics.

Pakzad I. , Azizi Jalilian F.

Abstract: Myco tuberculosis is an important death agent in human communities. It is believed that one third of world population are infected with this organism and 8 millions cases are added to this portion every year. It is also estimated that 3 millions die due to TB infection each year. Although TB was supposed to be eradicated by the end of twentieth century, the emergence of drug resistance and prevalence of AIDS made the task more difficult than before. Drug resistance is formed by different mechanisms such as mutation in bacterial genome. Resistance to Isoniazide by mutation in katG, inhA and glf genes, resistance to Rifampin by mutation in rpoB gene, resistance to Streptomycin by mutation in rpsL, rrb genes and resistance to Quinolons by mutation in gyrA gene are formed.

Key words: *Tuberculosis, drug resistance, Isoniazide, Rifampin.*