Archive of SID

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 ۸میلیون 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 داوریی 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 ، inh A ، glf ، akpc مقاومت به ریفامپین با جهش در ژن rpoB مقاومت به استرپتومایسین با موتاسیون در ژنrpsl و rrs و مقاومت به کوانیولون ها با جهش در ژنgyrA صورت می گیرد.

واژه های کلیدی: مایکوباکتریوم توبر کلوزیس، 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 سال۱۸۸۲ این باکتری توسط رابرت کخ کشف گردید و بدین جهت آن را باسیل کخ می نامند.

انسان میزبان اصلی باسیل سل بوده واین بیماری از طریق سرفه و خلط از افراد مسلول به افراد سالم منتقل می شود[۱].

با کشف داروهای ضد سل از قبیل استرپتومایسین، 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 سال‌های 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 مهم‌تر 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، استرپتومایسین، اتامبوتول، و پیراز ینامید و۳/۲درصد هم به ریفامپین و هم به ایزونیازید مقاوم هستند[۵و۴و۳و۲].

* دانشجوی PHD باکتری شناسی دانشگاه تربیت مدرس
** دانشجوی MSC ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس

www.SID.ir

Archive of SID

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 نیازید، ریفامپین، استرپتومایسین، پاراآمینوسالیسیلیک 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[1]،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 ها ی 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[2]

ب- کاهش نفوذ پذیری[3] دارو

ج- کاهش جذب[4] 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[5] 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 ایزونیکوتنیک 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 این‌دارو خیلی حساس می باشد. MIC[6]حداقل غلظت بازدارنده ایزو نیازیدی برای سوش های حساس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس۰/۰۲-٪۵r/ml و برعکس ایزونیازید در محیط خارج از بدن یا آزمایشگاه[7] بر ضد اکثر ایزوله های کمپلکس M.avium (and M. intracellular) MAC 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

www.SID.ir

Archive of SID

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[8] سلول های مایکو باکتریوم

ب- افزایش غلظت[9] درون سلولی

پ-کاهش آب دوستی[10] 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[1] 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 ، ah pc [۴،۶،۷].

بحث و نتیجه گیری

ژن Kat G : این ژن شامل۲۳جفت باز بوده و یک پروتئین با وزن مولکولی۸ کیلو دالتون را کد[7] می‌کند. این پروتئین یک ترکیب کاتالاز پراکسیداز می باشد. میدل بروک و هم‌کارانش در سال۱۹۵۴مشاهده 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 بینMIC ایزونیازید و فعالیت کاتالاز رابطه معکوس وجود دارد. عقیده بر این است که آنزیم های کاتالاز پر اسید از 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 ژنKat Gدر عملکرد ایزونیازید نقش دارد.هم چنین مشاهده شد که $\frac{2}{3}$ ایزوله های بسیار مقاوم باMIC بیشتر از۵۰۳g۲/ml (MIc>۵۰۳g۲/ml) ژن KatG (g/m۲l۵۰۳کروموزومشان حذف شده است.

محققین دیگر نتیجه گرفتند که در تعداد زیادی از سوش هـــای مقـــاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ژن Kat G بدون حذف کامل آن جهش صورت گرفته است. این محققین با آنالیز سوترن[2] ملاحظه کردند که اغلب سوش های مقاوم به ایزو نیازید ظاهراً دارای ژن سالمKat G می باشند. ولی سطح فعالیت کاتالاز پراکسیداز در این ها کاهش یافته بود. آنزیم بیان شده از ژن جهش یافتهKat G نسبت به آنزیم سالم دارای فعالیت کاتالاز پراکسیدازی کم‌تری، هم ازلحاظ عملکرد و هم از لحاظ تمایل[3] به ایزونیازید می باشد. محققین نتیجه گرفتند که مقاومت به واسطه ژنKat 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[4] و سایر انواع جهش ها می باشد. چندین نوع

1- Analogous
2- Southern
3-- Afinity
4- Missense Mutation
5- Amino Terminal

www.SID.ir

Archive of SID

جهش به صورت غالب در ناحیه کد کننده نیمه آمینی[5] پروتئین کد شده توسط ژن Kat G وجود دارد.

معمول ترین جهش، تغییر CGG → CtG می باشد که منجر به جا به جایی Arg → leu 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→Metدرموقعیت۵۸۷)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[1] یک قطعه ۳ جفت باز (CAT ، که کد کنندهIle است) بین کرون های ۱۲۵ تا ۱۲۶ بوده در این مورد اخیر فعالیت کاتالاز پر 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 پر اکسیداز نداشت مانند جایگزینی Arg→Leu در جایگاه ۴۶۳ [۸و۲].

لوکوس INHA

همان طور که ذکر شد ژن KatG به طور واضح با مقاومت به ایزو نیازید مرتبط می باشد. در تعدادی از نمونه‌های 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 ژنKatG 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 leading frame تشکیل شده که شامل (ma)opr1 و ژن inhA می باشد . ژنinhA پروتئین، آنزیم Fatty acyl enoylreductase را کد می کند، که جزیی از تیپII سیستم سنتز اسیدهای چرب می باشد. این پروتئین ۲۵/۷ کیلو دالتون وزن دارد. این پروتئین در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بوبیس و مایکوباکتریوم اسمگماتیس بیش از ۴۰ درصد شباهت با پروتئین Envm در E.celi و Salmonella.typhimurium دارد عقیده بر این است که پروتیئن Envm در احیای پروتئین crotonyle- acyle carrier protein و سنتز اسیدهای چرب نقش دارد. قابل توجه است که جایگزینی Gly- serدر موقعیت ۹۳، پروتئین Envm باکتریE.coli منجر به مقاومت diazaboline که یک مهار کننده بیو سنتز اسیدهای چرب فسفولیپید و لیپو پلی ساکارید است می گردد.

آزمایشات کلونینگ نشان داد که حضورinhA 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 تبدیلAla→Serدر جایگاه۹۴پروتیئن 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 MRNA inhA می باشد.

کینیک موتانت inhA ser →Ala ۹۴ نسبت به سوش وحشی از نظر kmg Vmax متفاوت می باشد. ثابت میکائیلس 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

1- Insertion

www.SID.ir

Archive of SID

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-نوکلئوئید 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 تاثیر 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].

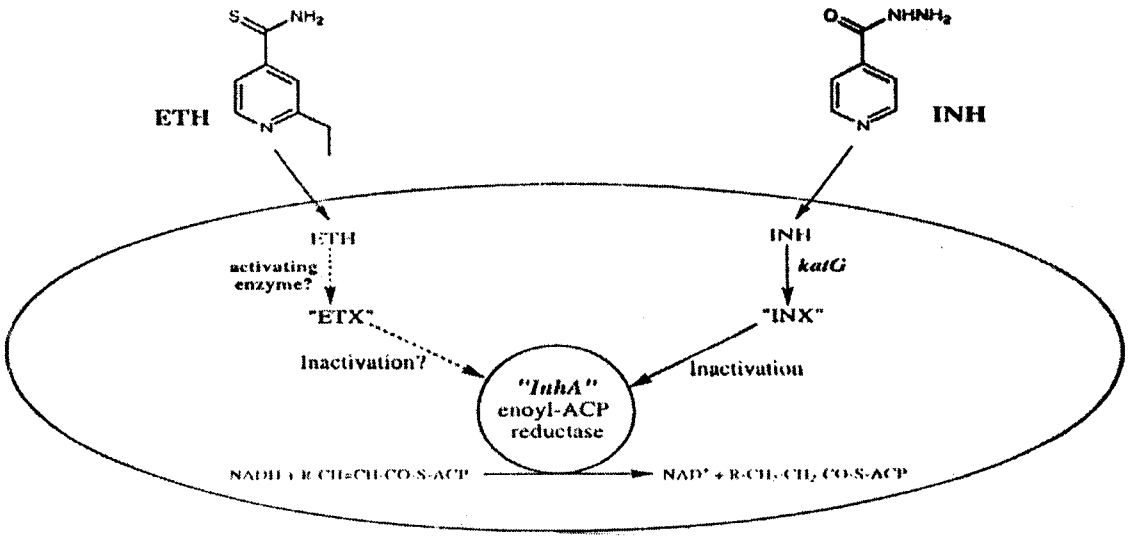
orf ۱ پروتئینی با وزن ۲۸/۵ کیلو دالتون راکد می کند. این پروتئین بیشترین شباهت را باکتو- اسیل کاریر پروتئین ردوکتاز که توسط FabG در باکتری اشر یشیا کلی کد می شود، دارد. این آنزیم در بیوسنتز اسید چرب نقش دارد و ژن آن دارای ۷۴۴ جفت باز می باشد.

در سوش های مقاوم جا به جایی در مورد دو نوکلئوتید در جایگاه اتصال به ریبوزوم رخ می دهد. این ژن آنزیمی راکد 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 توبرکلوزیس آنزیم Glf راکد می کند که تبدیل udp-galactopyranose را به UDP-galactoforanose 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 gr/ml^3 ۶ ٪ به gr/ml^3 ۸٪ شده در مایکو باکتریوم توبرکلوزیس 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



شکل ۱ – مکانیسم عمل ایزونیازید

www.SID.ir

Archive of SID

که آنزیم Glf 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[1]:

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].

باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ژن کد کننده فاکتور نسخه برداریoxyr آن در اثر جهش دچار اختلال گردیده است. باکتریهای که در اثر ژنKatG یا حذف آن به ایزونیازید مقاوم شده اند، قاعدتاً 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 وجای خالی فعالیت ژن KatG را پر نموده است و موجب بقای درون سلولی باکتری می شود[۷].

منابع

۱- ادیب فر پرویز؛ میکروب شناسی پزشکی، چاپ سوم، ۱۳۷۱

2- Blanchard S.J : Molecular mechanisms of Resistance in Mycobectrium tyuberculo sis. 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 Identi fied in Isoniazid Resistance clinical I solates;Journal Infections Disease.1998,175:775-769

4-Black G.J;Microbiology princi ples 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 explession of the Alkyl Hydroperoxide Reductase Ahpc on the virulance and Isoniazid Resistance of mycobacterium Tuberculosis; Infection and Immunity,1997,65(4):1395-1401

7- Inderlied B.C;and solfinger M,Antimicrobial Agents and susceptibility tests Mycobateria,in: medical Microbiology;Ed.Murray.R.P. wolfeLondon,1994,chapter 119,pp:1385-1390.

8-Musser M.J;Antimicrobial agent resistance, Molecular Genetic Insights;Clinical Microbiology Revie,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 Auto mated DNA sequencing, Restricted Array of Mutatious Associated with Drug resistance; Journal Infectious diseas,1996,173:196-202

10- QuemardA. and et al; Enzymatic characterization of the target for Isonia zid 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. Scince,1998,279,98-102

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

[1] –Alkyl Hydroxy Proxide Reductase

www.SID.ir

Archive of SID

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

Pakzad I. , Azizi Jalilian F.

Abstract: **Myco tuberclosis 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 prevalance 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 rpsi, rrb genes and resistance to Quinolons by mutation in gyrA qene are formed.**

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

www.SID.ir