

Original Paper

## Alterations in the methylation pattern of *N-acetyltransferase* gene in patients unresponsive to first-line treatment of *Mycobacterium tuberculosis*

Elnaz Razzagi, M.Sc in Genetics, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

ORCID 0000-0002-0419-6739

\*Changiz Ahmadizadeh (Ph.D), Corresponding Author, Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran. E-mail: ch-ahmadizadeh@iau-ahar.ac.ir

ORCID 0000-0003-0076-2446

### Abstract

**Background and Objective:** The emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and especially drug resistant strains has created problems for the treatment of tuberculosis control, worldwide. This study was performed to evaluate the changes in *N-acetyltransferase* (*NAT*) pattern of methylsonone in patients who did not respond to first-line treatment for *Mycobacterium tuberculosis*.

**Methods:** This descriptive-analytical study was performed on 200 patients with tuberculosis. After preparing the blood sample, saturated salt method was used to extract DNA. For the determination of quantity and quality of DNA, two methods of spectrophotometry and electrophoresis on agarose gel were used. The methylation pattern of *NAT1* gene was investigated by HRM method.

**Results:** 34 patients were resistant to the first line of treatment. 18 patients showed hypermethylation pattern, 12 patients showed non-methylated pattern and 4 patients showed hypomethylated pattern. 166 patients were not resistant to the first line, of which 23 patients in hypermethylated group, 120 patients in group Non-methylated and 23 patients were in the hypomethylated row. There was a statistically significant relationship between methylation level and drug resistance ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** This study showed that resistance to first-line treatment of *Mycobacterium tuberculosis* was related to the level of *N-acetyltransferase* gene methylation.

**Keywords:** Tuberculosis, *Mycobacterium Tuberculosis*, Methylation, *N-acetyltransferase*, Drug Resistance

Received 9 Oct 2019

Revised 10 Aug 2020

Accepted 26 Sep 2020

Cite this article as: Razzagi E, Ahmadizadeh Ch. [Alterations in the methylation pattern of *N-acetyltransferase* gene in patients unresponsive to first-line treatment of *Mycobacterium tuberculosis*]. J Gorgan Univ Med Sci. 2021 Winter; 22(4): 92-98. [Article in Persian]

## تغییرات الگوی متیلاسیون ژن N-استیل ترانسفراز در بیماران بی پاسخ به خط اول درمان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

ORCID 0000-0002-0419-6739

ORCID 0000-0003-0076-2446

الناز رزاقی، کارشناس ارشد رشته ژنتیک، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.  
\* دکتر چنگیز احمدی زاده، استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** ظهور مقاومت دارویی در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و به ویژه پیدایش سویه‌های مقاوم به دارو مشکلاتی را برای درمان و کنترل شیوع سل در سرتاسر جهان به وجود آورده است. این مطالعه به منظور ارزیابی تغییرات الگوی متیلاسیون ژن N-استیل ترانسفراز (*N-acetyltransferase: NAT*) در بیماران بی پاسخ به خط اول درمان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انجام شد. **روش بررسی:** این مطالعه توصیفی - تحلیلی روی ۲۰۰ بیمار مبتلا به سل انجام شد. بعد از تهیه نمونه خونی از روش نمک اشباع برای استخراج DNA استفاده گردید. سپس برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از دو روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد. بررسی الگوی متیلاسیون ژن NAT به روش HRM انجام شد. **یافته‌ها:** ۳۴ بیمار به خط اول درمان مقاوم بودند. ۱۸ بیمار دارای الگوی هایپرمتیلاسیون، ۱۲ بیمار الگوی غیرمتیله و ۴ بیمار الگوی هایپومتیله را نشان دادند. ۱۶۶ بیمار به خط اول درمان مقاوم نبودند که از این میان ۲۳ بیمار در گروه هایپرمتیله، ۱۲۰ بیمار در گروه غیرمتیله و ۲۳ نفر در ردیف هایپومتیله قرار داشتند. بین سطح متیلاسیون و مقاومت دارویی ارتباط آماری معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0/05$ ). **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که مقاوم بودن به خط اول درمان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با سطح متیلاسیون ژن N-استیل ترانسفراز مرتبط است.

**کلید واژه‌ها:** سل، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، متیلاسیون، N-استیل ترانسفراز، مقاومت دارویی

\* نویسنده مسؤل: دکتر چنگیز احمدی زاده، پست الکترونیکی ch-ahmadizadeh@iau-ahar.ac.ir  
نشانی: اهر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، گروه میکروبیولوژی، تلفن ۰۴۱-۴۴۲۲۷۸۱۱  
وصول مقاله: ۱۳۹۸/۷/۱۷، اصلاح نهایی: ۱۳۹۹/۵/۲۰، پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۷/۵

### مقدمه

متابولیسم ایزونیاژید از دو روش مستقیم و غیرمستقیم صورت می‌گیرد. در مسیر مستقیم بر اثر هیدرولیز، عامل آمید ایزونیاژید به هیدرازین و ایزونیکوتینیک اسید تبدیل می‌شود. در مسیر غیرمستقیم، ایزونیاژید ابتدا استیله شده و تولید استیل ایزونیاژید می‌نماید. سپس به وسیله آنزیم N-استیل ترانسفراز (*N-acetyltransferase: NAT*) به ایزونیکوتینیک اسید و استیل هیدرازین تبدیل می‌شود. استیل هیدرازین استیله شده و هیدرازین تولید می‌نماید. استیل هیدرازین و هیدرازین متابولیت‌های سمی هستند. در هر دو مسیر، آنزیم آمیداز نقش ویژه‌ای دارد (۶). در بحث داروهای ضدسل القاء کننده آسیب کبدی، مطالعات بر روی چند آنزیم متابولیزه کننده شامل *GSTT1*، *GSTM1*، *CYP2E1* و *NAT2* متمرکز است. سمیت کبدی ایزونیاژید، به صورت افزایش گذرا و ملایم آنزیم‌های آمینوترانسفراز در ۲۰-۱۰ درصد بیماران مبتلا به سل دیده شده است (۷). متیلاسیون DNA به منزله یک مکانیسم اپی ژنتیک مهم در تنظیم بیان ژن در سلول‌های انسان است. DNA متیلاسیون نقشی تعیین کننده در رشد و نمو عادی و نیز تمایز

سل یک بیماری باکتریال مزمن است که در اثر مجموعه مایکوباکتریوم‌ها و در بیشتر موارد توسط مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*Mycobacterium Tuberculosis: TB*) ایجاد می‌شود (۱). ایزونیاژید (*Isoniazid: INH*)، ریفامپین (*Rifampicin: RIF*)، اتامبوتول (*Ethambutol: EMB*) و پیرازینامید (*Pyrazinamide: PZA*) خط اول درمان چند دارویی سل هستند. اغلب داروهای ضدسل، القاء کننده آسیب کبدی هستند که این آسیب، یک عارضه دارویی رایج و جدی و یکی از چالش برانگیزترین مشکلات بالینی و در عین حال عامل بیمارستانی شدن و تهدید حیات بیمار است (۲). میزان بروز این سمیت در کشورهای در حال توسعه بیشتر از کشورهای توسعه یافته گزارش شده است (۳). مشکلات ژنتیکی ممکن است باعث شکست درمان، مقاومت دارویی یا عود بیماری گردند (۲). داروهای ایزونیاژید و متابولیت‌های آن، از جمله هیدرازین و استیل هیدرازین نقش اصلی در ایجاد سمیت کبدی دارند (۴و۵).

مصرف داروی ضدسل را نداشته؛ بلکه توسط یک سویه مقاوم به دارو آلوده شده است (۱۶). مقاومت اکتسابی یا ثانویه مقاومتی است که در طول درمان اتفاق می‌افتد که مسبب آن پزشک معالج و یا خود بیمار است. پزشک معالج با تجویز نامناسب یا دوز نامناسب دارو و یا این که بیمار با مصرف نامرتب داروی تجویز شده یا مصرف کم دارو باعث بروز چنین مقاومتی می‌شوند (۱۶). مقاومت چند دارویی (Multi Drug Resistant: MDR) مقاومتی است که در آن سویه جدا شده، حداقل به دو داروی اصلی و مهم ضدسل یعنی ایزونیاژید و ریفامپین مقاوم باشد. مقاومت بسیار گسترده (Extensively Drug Resistant: XDR) نوع دیگری از مقاومت‌های دارویی بیماری سل است. از عواملی که باعث افزایش مقاومت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به داروها می‌شوند؛ می‌توان به عدم درمان صحیح، تجویز نابجای دارو، عدم استفاده از درمان چنددارویی و به‌کارگیری رژیم تک دارویی، قطع مصرف دارو، نبود برنامه‌های کنترل بیماری سل در برخی از کشورها، کاهش اثر داروهای ضدسل و شیوع ایدز اشاره کرد (۱۶). این مطالعه به منظور ارزیابی تغییرات الگوی متیلاسیون ژن N-استیل ترانسفراز در بیماران بی پاسخ به خط اول درمان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انجام شد.

### روش بررسی

این مطالعه توصیفی - تحلیلی روی ۲۰۰ بیمار (۱۲۶ مرد و ۷۴ زن) مبتلا به سل مراجعه کننده به بیمارستان بین‌المللی تبریز طی سال‌های ۹۸-۱۳۹۶ انجام شد.

معیارهای ورود به مطالعه شامل تشخیص سل قطعی، پاسخ مناسب به داروهای خط اول ضدسل و مقاومت داشتن در دو گروه مختلف در زمان تشخیص بودند. معیارهای عدم ورود به مطالعه شامل عدم تطابق لام مستقیم با نتیجه کشت، کمبود سیستم ایمنی، بیماری اصلی نظیر ایدز که سل ثانویه به آن محسوب می‌شود، سیروز کبدی یا داشتن آسیب حاد کبدی قبل از تشخیص سل، سابقه کبد چرب و مثبت بودن HbsAg بودند.

پس از اخذ مجوز پژوهشی از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر و رضایت‌نامه کتبی، بیماران تحت نظر پزشک معالج در گروه‌بندی‌های مقاوم و غیرمقاوم به دارو براساس الگوی درمانی متخصصین ریه قرار گرفتند.

بعد از تهیه نمونه خونی از روش نمک اشباع برای استخراج DNA استفاده شد. سپس کیفیت و کمیت DNA استخراج شده تعیین گردید. برای کمیت DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر و کیفیت DNA از روش الکتروفورز بر روی ژل آگار استفاده شد. در روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲μl از DNA افراد بیمار که با روش پروتئیناز K (Fermentas, France) استخراج و بر روی ژل آگارز

سلولی موجودات رده بالا دارد و الگوی بیان ژن‌ها را در سلول‌ها تغییر می‌دهد (۸).

اکثر ژن‌های ناهمسان NAT1 و NAT2 هالوتیپ‌های انواع جهش‌های نقطه هستند که باعث تغییر می‌شود. به طوری که پروتئین فعالیت کاهش یافته‌ای را نشان می‌دهد (۹ و ۱۰). محل ژن‌های NAT روی کروموزوم ۸ باعث ایجاد مقایساتی در تومور مثانه و DNA نرمال ژن‌های NAT در این محل ناپایدار می‌شود. در بزرگسالان، NAT1 انسانی توزیع بافت گسترده‌تری از NAT2 انسانی دارد. در جفت نیز NAT1 انسانی در هنگام بارداری یافت می‌شود. بافت‌های جنینی فعالیت NAT1 انسانی دارند و رونوشت‌های NAT1 در مرحله چهار سلولی و در بلاستوسیت‌ها کشف شده‌اند. NAT2 انسانی نمی‌تواند در این مطالعات یافت شوند (۱۱ و ۱۲). تیولات به حد کافی برای حمله به تیواستر AcCoA فعال بوده و اجازه انتقال استیل را می‌دهد. ساختار STNAT شباهت زیادی با ساختارهای اعضای متعدد خانواده بزرگ سیستمین پروتئاز نظیر خانواده پاپائین نشان داده است (۱۳).

INH یک پروداروی خط مقدم است که در معالجه TB به کار می‌رود. این دارو در داخل سلول به وسیله یک کاتالاز پراکسیداز اکسیده می‌شود. این مرحله اکسیداسیون برای فعال‌سازی INH یک مرحله حیاتی است و بنابراین در مؤثر بودن INH به عنوان یک داروی معالجاتی در معالجه TB ضروری است. INH در شکل فعال شده خود، مسیر بیوسنتز میکولیک اسید را مختل می‌کند که برای حفظ دیواره سلولی میوباکتریایی بسیار مهم است (۱۴).

N-استیل INH هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در داخل بدن موجود زنده به لحاظ درمانی، غیرفعال است. مشاهده شده است که ابراز هترولوگ NAT مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در مایکوباکتریوم اسمگماتیس منجر به افزایش سه برابری مقاومت نسبت به INH می‌شود. بنابراین می‌توان گفت که NAT مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌تواند در مقاومت به INH نیز دخیل باشد. مجموعه مشابهی از آزمایشات با آنزیم کاهنده انول-ACP مختص NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) موجب افزایش سه برابری مقاومت نسبت به INH شد. این آنزیم در سیستم سنتاز II اسید چرب (FASII) میوباکتری‌ها نیز دخیل است. جهش‌های صورت گرفته در این ژن موجب مقاومت نسبت به INH شده‌اند (۱۵).

شیوع مقاومت دارویی در باسیل سل، به ویژه به صورت مقاومت چند دارویی همچنین بروز سل با مقاومت دارویی بسیار گسترده از جمله تهدیدهای جدی برای کنترل و مهار جهانی سل محسوب می‌شوند. مقاومت دارویی در مایکوباکتریوم‌ها شامل چند نوع (مقاومت اولیه، مقاومت ثانویه، مقاومت چنددارویی و مقاومت بسیار گسترده) است. مقاومت اولیه مقاومتی است که بیمار سابقه

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای استفاده شده

طول	دمای اتصال	توالی پرایمر	توالی (5'→3')
۲۲	۶۱/۸۶	GGAGTAGTTGGGATTATGGGTG	پرایمر مستقیم
۲۳	۶۲/۳۴	ACTTAATTACAAAAATAAACTCC	پرایمر معکوس
۲۶۳			طول محصول

جمع آوری آنها با حفظ الگوی مقاومت داشتن یا نداشتن در دو گروه، تغییرات متیلاسیون با به کارگیری نقطه ذوب با درجه تفکیک بالا، پس از استانداردسازی، محاسبه شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-19 تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه میانگین‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی و برای مقایسه بین فراوانی‌ها از آزمون کای دو استفاده شد. سطح معنی داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

میانگین سنی بیماران ۵۷/۶ سال در محدوده سنی ۳۹ تا ۸۹ سال تعیین شد. از ۲۰۰ بیمار مورد مطالعه، ۱۶۶ بیمار (۸۳ درصد) به خط اول درمانی تجویز شده از سوی متخصص ریه مقاومت نشان ندادند بودند و ۳۴ بیمار (۱۷ درصد) با بروز مقاومت به خط دوم درمانی ورود کرده بودند. نتیجه PCR و به دنبال آن محاسبه تغییر نقطه ذوب از مبدا در بیماران مورد مطالعه در شکل یک نشان داده شده است.

۳۴ بیمار به خط اول درمان مقاوم بودند. ۱۸ بیمار دارای الگوی هایپرمتیلاسیون، ۱۲ بیمار الگوی غیرمتیله و ۴ بیمار الگوی هایپومتیله را نشان دادند. ۱۶۶ بیمار به خط اول درمان مقاوم نبودند که از این میان ۲۳ بیمار در گروه هایپرمتیله، ۱۲۰ بیمار در گروه غیرمتیله و ۲۳ نفر در ردیف هایپومتیله قرار داشتند. بین سطح متیلاسیون و مقاومت دارویی ارتباط آماری معنی داری وجود داشت ( $P < 0/0001$ ).

از کل بیماران مورد مطالعه، ۲۶ بیمار مرد و ۱۵ بیمار زن، الگوی هایپرمتیلاسیون را نشان دادند و این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود. از کل بیماران مورد مطالعه، ۲۱ مرد و ۱۳ زن مقاومت دارویی به خط اول درمان نشان دادند و این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود.

اثر متیلاسیون بر سطح SGOT و SGPT از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0/05$ ). مقاومت دارویی و اثر متقابل آن با متیلاسیون، اثر آماری معنی داری بر سطح این دو عامل نداشت (جدول ۲-۴).

جدول ۲: مقایسه مقادیر آنزیم‌های SGOT و SGPT در سطوح مقاومت دارویی

میانگین و انحراف معیار		
SGOT	SGPT	
۲۹/۹۲±۱۶/۲۹	۲۷/۲۴±۲۴/۰۸۵	عدم مقاومت دارویی (n=۱۶۶)
۴۰/۲۶±۳۲/۱۲	۳۶/۸۲±۳۶/۲۹	مقاومت دارویی (n=۳۴)
-۱/۸۳۰	-۱/۴۷۴	ارزش F
۰/۷۵۰	۰/۱۴۸	ارزش P

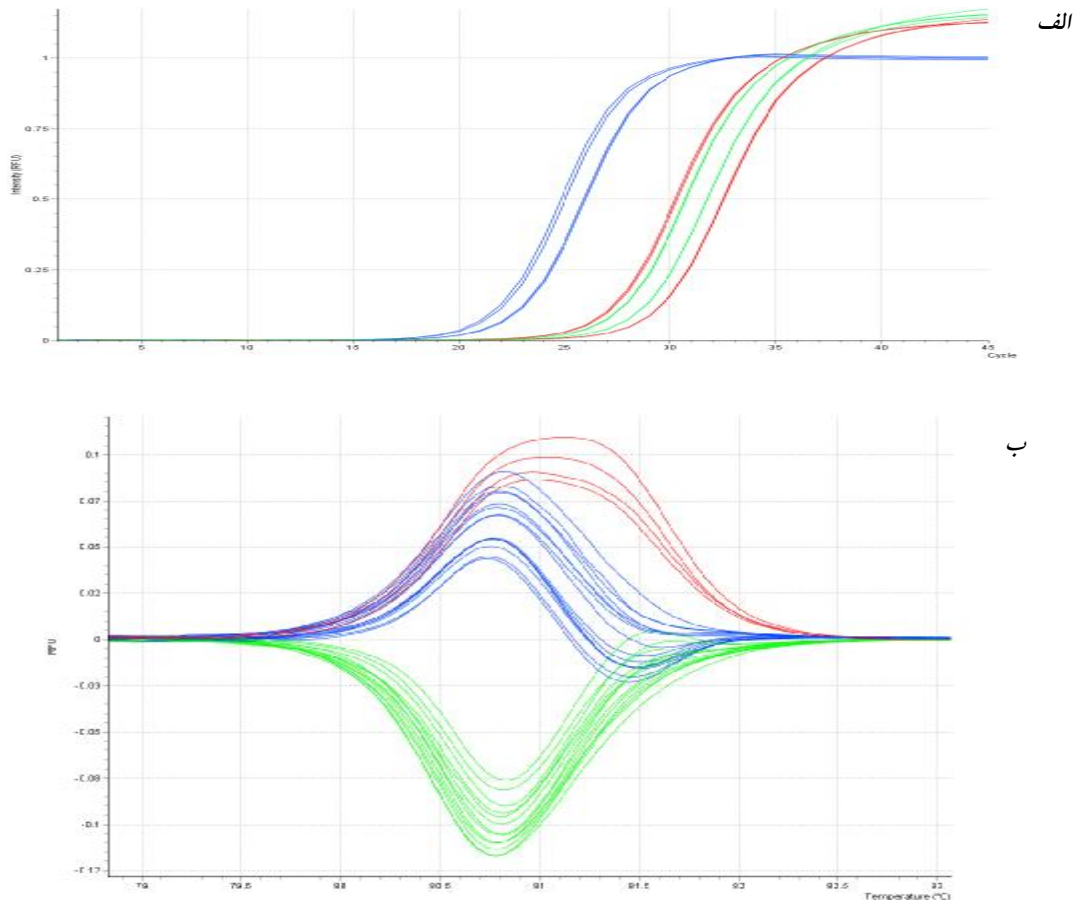
۱/۵ درصد الکتروفورز شد. مقدار DNA هر نمونه از طریق مقایسه شدت فلورسنت نمونه با باندهای DNA استاندارد محاسبه گردید.

به منظور بررسی الگوی متیلاسیون ناحیه پروموتور ژن NAT1 به روش HRM (High Resolution Melting)، از کیت شناسایی جهش (شرکت پندار اکسیر ژن، ساخت ایران) به شماره کاتالوگ EG9962100 استفاده شد و در دستگاه روتور ژن ۶۰۰۰ (Germany Qiagen, Hilden) انجام شد. کیت HRM حاوی مستر PCR است. این مستر شامل DNA پلیمرز HotStarTaqPlus، بافر PCR مدل Type it همراه رنگ EvaGreen، محلول Q و ترکیب dATP، dCTP، dGTP و dTTP است. واکنش HRM در حجم ۱۰ میکرولیتر و با ترکیب موادی شامل ۵ میکرولیتر مستر پرایمر HRM و ۰/۵ میکرولیتر DNA الگو و ۰/۳ میکرولیتر از هر پرایمر و ۹/۳ میکرولیتر آب RNase-free انجام شد.

قبل از فرآیند HRM واکنش PCR در حضور رنگ متصل به DNA دو رشته‌ای انجام شد که در این واکنش مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه سپس ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه ۵۹ درجه سانتی گراد برای جهش به مدت ۳۰ ثانیه بود و به دنبال آن مرحله HRM و افزایش دما از دمای کم به زیاد برای هر جهش انجام شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار 3 Primer طراحی شد و توسط شرکت Blonder (آلمان) سنتز شد و برای کار با غلظت‌های ۱۰۰ nm مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات آغازگرهای به کار گرفته شده در این مطالعه در جدول یک آمده است.

پس از خوشه‌بندی بیماران بر اساس الگوی متیلاسیون آنها، خوشه‌های مختلف با دو گزینه دارا بودن مقاومت و یا حساس بودن به خط اول درمان وارد مقایسه شدند.

پس از مشخص شدن دو گروه مقاوم و حساس به خط اول درمانی، سرم این بیماران انتخاب و با به کارگیری روش کمیلومینسانس سطح آنزیمی آسپاراتات آمینوترانسفراز (serum glutamic oxaloacetic transaminase: SGOT) و آلانین آمینوترانسفراز (serum glutamic-pyruvic transaminase: SGPT) اندازه گیری شدند. بازه طبیعی سطح آنزیمی SGOT ۴۰-۵ واحد و سطح آنزیمی SGPT ۵-۷ واحد به پیشنهاد کیت، در نظر گرفته شدند. پس از به دست آمدن نتایج حاصل از مطالعات آنزیماتیک و



شکل ۱: نتیجه PCR و به دنبال آن محاسبه تغییر نقطه ذوب از مبدأ در بیماران مورد مطالعه (الف) منحنی PCR ژن NAT1 قبل از ورود به مرحله HRM؛ ب) منحنی HRM ژن NAT1 با اعمال فیلترهای تضاد دمایی منحنی مشخص شده با رنگ آبی؛ الگوی متیلاسیون نرمال با پایه دمایی مشخص؛ منحنی مشخص شده با رنگ قرمز: موارد دارای هیپرمتیلاسیون؛ منحنی مشخص شده با رنگ سبز: موارد دارای هیپومتیلاسیون در ناحیه پروموتور ژن NAT1

(۲۰-۱۷) همخوانی داشت. در مطالعه Chowdhury و همکاران ترکیبات درمانی منتخب در خطوط درمانی مایوباکتریوم تویرکلوزیس به صورت رقابتی الگوی مهارتی NAT-1 را القا نمودند و ارتباط معنی داری بین متیلاسیون ژن NAT و مقاومت دارویی وجود داشت (۱۷). در مطالعه Kim و همکاران استیل ترانسفرازهای انسانی تحت تاثیر عفونت های مایکوباکتریایی تیتراژ متفاوتی پیدا نمودند که این تیتراژ می تواند ناشی از عملکرد ژن Rv2416c در MTB باشد (۱۸). در مطالعه Joshi و همکاران پروتئین های NAT در ۱۰ تیپ مختلف جز شاخص ترین پروتئین هایی بودند که می توانند در متابولیسم آنزیمی داروهای خطوط درمانی سل ایفای نقش کنند (۱۹). در مطالعه Houghton و همکاران نتیجه گیری شد که القای مقاومت در خطوط درمانی سل، می تواند از تغییر تیتراژ EIS\_Mtb داخل مایکوباکتریوم حاصل شود و این تغییر تیتراژ داخل MTB، تحت تاثیر سطح آنزیمی NAT قرار می گیرد (۲۰).

در مطالعه Field و همکاران معالجه موارد TB-XDR حتی

جدول ۳: تجزیه واریانس عوامل موثر بر سطح SGOT و SGPT

SGOT		SGPT		عرض از مبدأ متیلاسیون مقاومت دارویی متیلاسیون و مقاومت دارویی
ارزش P	مقدار F	ارزش P	مقدار F	
۰/۰۰۱	۱۲/۶۳۱	۰/۰۰۱	۲۳۰/۳۷	
۰/۰۰۱	۷/۹۵۱	۰/۰۰۱	۹/۹۳	
۰/۷۸۸	۰/۰۷۲	۰/۶۰۵	۰/۲۶۹	
۰/۹۹۴	۰/۰۰۶	۰/۱۷۴	۱/۳۰۴	

جدول ۴: مقایسه میانگین مقادیر SGOT و SGPT در سطوح متیلاسیون با استفاده از آزمون توکی

الگوی متیلاسیون	میانگین SGOT	میانگین SGPT
غیرمتیله	۲۸/۲۶ b	۲۴/۱۱ b
هایپومتیله	۲۸/۵۵ b	۲۶/۲۶ b
هایپرمتیله	۴۴/۷۳ a	۴۵/۹۰ a
SEM	۲/۸۹	۳/۸۷

حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در بین گروه های مورد مطالعه است.

### بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، بین سطح متیلاسیون و مقاومت دارویی ارتباط آماری معنی داری یافت شد. این یافته با مطالعاتی

بقاء داخل سلولی ضروری بود (۲۶) که با مطالعه ما همخوانی ندارد. مطالعه Westwood و همکاران نشان داد که محصول ژن NAT از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک هدف خوب برای درمان ضد سل بود (۲۷) که با مطالعه ما همخوانی دارد. در مطالعه Zabost و همکاران بررسی رابطه ژنوتیپ NAT2 و غلظت سرمی ایزونیاژید در یک جمعیت لهستانی بررسی و جهش در ژن NAT2 نوع استیلاتور INH در بیماران تایید شد و نتایج ژنتیکی با فوتیپ سازگار بود (۲۸). در مطالعه دوستدار و همکاران وجود جهش در ژن rpoB ارزیابی شد و بررسی مولکولی جایگاه‌های ۵۳۱ و ۵۱۶ و ۵۲۶ در تشخیص مقاومت به ریفامپین ارزشمند ارزیابی شد. بروز تغییر در این جایگاه‌ها در ایران به نسبت شایع بوده و در جایگاه‌های دیگر جهش به ندرت شناسایی می‌شود. همچنین مشخص گردید جهش در جایگاه‌های ۵۱۶-rpoB و ۵۲۶-rpoB با فراوانی متفاوت نسبت به دیگر نقاط جهان وجود دارد (۲۹). در مطالعه پورحاجی باقر و همکاران در استان مازندران با استفاده از تکنیک PCR تعداد ۱۳۴۵ بیمار از نظر وجود جهش‌های منجر به ایجاد مقاومت به ایزونیاژید و ریفامپین ارزیابی شدند و بیشترین مقاومت نسبت به ایزونیاژید و فراوانترین جهش در ژن katG تعیین شد (۳۰).

با توجه به بررسی وضعیت متیلاسیون تنظیم کننده‌های چرخه سلولی و دیگر ژن‌های مهم در این بیماری و شناسایی ژن‌های هیپرمتیله می‌توانند در کشف و توسعه داروهای کارآمد، اثرگذار باشند. این عوامل درمانی با ایجاد تغییرات در الگوی متیلاسیون ممکن است بتوانند یک کاندیدای مناسب برای درمان بیماری بوده و در کاهش مرگ و میر بیماران موثر باشند.

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که مقاوم بودن به خط اول درمان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با سطح متیلاسیون ژن N-استیل ترانسفراز مرتبط است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه (شماره ۲۲۰۳۰۵۰۳۹۵۲۰۰۷) خانم الناز رزاقی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک از دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر بود و همه هزینه‌ها توسط نویسندگان تامین شده است. بدین وسیله از تمامی کسانی که در اجرای این مطالعه ما یاری کردند؛ تشکر می‌نمایم.

### References

- Baumann S, Eddine AN, Kaufmann SHE. Progress in tuberculosis vaccine development. *Curr Opin Immunol*. 2006 Aug; 18(4): 438-48. DOI: 10.1016/j.coi.2006.05.016
- Khalili H, Fouladdel S, Sistanizad M, Hajiabdolbaghi M, Azizi E. Association of N-acetyltransferase-2 genotypes and anti-tuberculosis induced liver injury; first case-controlled study from Iran. *Curr Drug Saf*. 2011 Feb; 6(1): 17-22. DOI: 10.2174/157488611794479946

برآیندهای ضعیف تری نسبت به TB-MDR نشان داد. به خصوص در بیماران با آلودگی همزمان به HIV منجر به میزان بالای مرگ و میر می‌شود (۲۱). Kiran و همکاران (۲۲) بیان کردند که یکی از ویژگی‌های تسهیل کننده تحقیق در حوزه NAT، نقش NAT در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس باکتری مسؤول ابتلا به TB است. پیدایش مجدد TB، به خصوص با گونه‌های مقاوم به داروهای خط اول موجب توجه فزاینده به این بیماری مهلک شده است. مکانیسم ملکولی عمل حتی قدیمی‌ترین داروی ضد TB یعنی INH هنوز کاملاً مشخص نشده است. کشف NAT با فعالیت استیلاته کنندگی INH در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس اظهار می‌کند که NAT ممکن است در مقاومت به INH در TB نقش داشته باشد (۲۲) که با مطالعه ما همخوانی دارد.

کبد موش یک انتخاب ضعیف برای خالص‌سازی آنزیم‌های NAT است. NAT‌های موش برای بررسی‌های پروتئین‌های ترکیبی و بررسی توسعه NAT بهترین و مناسب‌ترین گزینه هستند. دو ژن موش NAT1 و NAT2 که بیش از ۸۰ درصد مشخص شده‌اند؛ ابتدا از زنجیره‌های استیلاته سریع و اهسته موش کلونی شدند که هر کدام یک چهارچوب خوانش باز داشتند. یک اکسون غیرکدی بالادست در NAT2 موش نیز مشخص شد (۲۳). تنها NAT2 استیلاسیون هیدرالازین، پروکاینامید و ایزونیاژید را کاتالیز می‌کند. در حالی که p-AS تنها توسط NAT1 انسانی استیلاته می‌شوند. روش‌های چندکاره در دسترس هستند که کار را برای ایجاد یک روش آسان مقایسه این خصوصیات آنزیم‌های مختلف NAT ممکن می‌کند و نشان می‌دهد که آنزیم‌های NAT انسانی پروفایل‌های متفاوت ولی متداخلی دارند (۲۴).

NAT‌ها از بسیاری از ارگانسیم‌ها و در بعضی موارد با غلظت بستر شامل هیدرالازین ایزونیاژید کریستال شده است. مطالعاتی مبنی بر این که بستر بدون اتصال قبلی استیل CoA ایزونیاژید یک زیر مجموعه از NAT2 انسان است و ایزونیاژید یک پیش‌داروی فعال توسط katG در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انجام شده است (۲۵) که با مطالعه ما همخوانی دارد. ساختن ژن جدا شده ژنی سوسپانسیون BCG مایکوباکتریوم بوویس موجب افزایش تقریباً ۳برابر حساسیت به ایزونیاژید شد. با این حال مطالعات حذف ژن نشان داده که در جدایه دیواره سلولی نقص داشت و همچنین برای

- Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, Schenker S, Jereb JA, Nolan CM, et al. An official ATS statement: hepatotoxicity of anti-tuberculosis therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Oct; 174(8): 935-52. DOI: 10.1164/rccm.200510-1666ST

- Yildiz A, Sever MS, Türkmen A, Ecdar T, Beşişik F, Tabak L, et al. Tuberculosis after renal transplantation: experience of one Turkish center. *Nephrol Dial Transplant*. 1998 Jul; 13(7): 1872-75. DOI: 10.1093/ndt/13.7.1872

5. Cho HJ, Koh WJ, Ryu YJ, Ki CS, Nam MH, Kim JW, et al. Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2007 Nov; 87(6): 551-56. DOI: 10.1016/j.tube.2007.05.012
6. Sarich TC, Adams SP, Petricca G, Wright JM. Inhibition of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits by pretreatment with an amidase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 May; 289(2): 695-702.
7. Sistanizad M, Azizi E, Khalili H, Hajiabdolbaghi M, Gholami Kh, Mahjub R. Antituberculosis Drug- Induced Hepatotoxicity in Iranian Tuberculosis Patients: Role of Isoniazid Metabolic Polymorphism. *Iran J Pharm Res*. 2011; 10(3): 633-39.
8. Law J, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*. 2010 Mar; 11(3): 204-20. DOI: 10.1038/nrg2719
9. Boakye-Appiah JK, Steinmetz AR, Pupilampu P, Ofori-Yirekyi S, Tetteh I, Frimpong M, et al. High prevalence of multidrug-resistant tuberculosis among patients with rifampicin resistance using GeneXpert *Mycobacterium tuberculosis*/rifampicin in Ghana. *Int J Mycobacteriol*. 2016 Jun; 5(2): 226-30. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2016.02.004
10. Cabibbe AM, Cirillo DM. Best approaches to drug-resistance surveillance at the country level. *Int J Mycobacteriol*. 2016 Dec; 5(1): S40-S41. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2016.09.010
11. Drobniowski F, Cooke M, Jordan J, Casali N, Mugwagwa T, Broda A, et al. Systematic review, meta-analysis and economic modelling of molecular diagnostic tests for antibiotic resistance in tuberculosis. *Health Technol Assess*. 2015 May; 19(34): 1-188. DOI: 10.3310/hta19340
12. Dziadek B, Brzostek A, Grzybowski M, Fol M, Krupa A, Kryczka J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* AtsG (Rv0296c), GlmU (Rv1018c) and SahH (Rv3248c) Proteins Function as the Human IL-8-Binding Effectors and Contribute to Pathogen Entry into Human Neutrophils. *PLoS One*. 2016; 11(2): e0148030. DOI: 10.1371/journal.pone.0148030
13. Havumaki J, Hillemann D, Ismail N, Omar SV, Georgiou SB, Schumacher SG, et al. Comparative accuracy of the REBA MTB MDR and Hain MTBDRplus line probe assays for the detection of multidrug-resistant tuberculosis: A multicenter, non-inferiority study. *PLoS One*. 2017; 12(3): e0173804. DOI: 10.1371/journal.pone.0173804
14. Korycka-Machala M, Brzostek A, Dziadek B, Kawka M, Poplawski T, Witczak ZJ, et al. Evaluation of the *Mycobactericidal* Effect of Thio-functionalized Carbohydrate Derivatives. *Molecules*. 2017 May; 22(5): 812. DOI: 10.3390/molecules22050812
15. Laborde J, Deraeve C, de Mesquita Vieira FG, Sourmia-Saquet A, Rechignat L, Villela AD, et al. Synthesis and mechanistic investigation of iron(II) complexes of isoniazid and derivatives as a redox-mediated activation strategy for anti-tuberculosis therapy. *J Inorg Biochem*. 2018 Feb; 179: 71-81. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.11.013
16. Roshdi Maleki M, Moaddab S. [Drug susceptibility pattern of *Mycobacterium tuberculosis* strains to first and second line drugs in Tabriz, Iran]. *Iran J Med Microbiol*. 2009; 3(1): 18-24. [Article in Persian]
17. Chowdhury A, Paul P, Choudhury MD. High throughput screening of 7-methylpicene-1,2-diol as arylamine N-acetyltransferase (NAT) inhibitor to establish a isoniazid supplement in anti-tubercular therapy. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2013 Nov; 16(9): 721-25. DOI: 10.2174/13862073113169990004
18. Kim KH, An DR, Yoon HJ, Yang JK, Suh SW. Structure of *Mycobacterium smegmatis* Eis in complex with paromomycin. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2014 Sep; 70(Pt 9): 1173-79. DOI: 10.1107/S2053230X14017385
19. Joshi RS, Jamdhade MD, Sonawane MS, Giri AP. Resistome analysis of *Mycobacterium tuberculosis*: Identification of aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase (AAC) as co-target for drug designing. *Bioinformation*. 2013; 9(4): 174-81. DOI: 10.6026/97320630009174
20. Houghton JL, Green KD, Pricer RE, Mayhoub AS, Garneau-Tsodikova S. Unexpected N-acetylation of capreomycin by mycobacterial Eis enzymes. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Apr; 68(4): 800-5. DOI: 10.1093/jac/dks497
21. Field SK, Escalante P, Fisher DA, Ireland B, Irwin RS, CHEST Expert Cough Panel. Cough Due to TB and Other Chronic Infections: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest*. 2018 Feb; 153(2): 467-97. DOI: 10.1016/j.chest.2017.11.018
22. Kiran D, Podell BK, Chambers M, Basaraba RJ. Host-directed therapy targeting the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma: a review. *Semin Immunopathol*. 2016 Mar; 38(2): 167-83. DOI: 10.1007/s00281-015-0537-x
23. Willby MJ, Green KD, Gajadeera CS, Hou C, Tsodikov OV, Posey JE, et al. Potent Inhibitors of Acetyltransferase Eis Overcome Kanamycin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem Biol*. 2016 Jun; 11(6): 1639-46. DOI: 10.1021/acscchembio.6b00110
24. Sachdeva KS, Raizada N, Sreenivas A, Van't Hoog AH, van den Hof S, Dewan PK, et al. Use of Xpert MTB/RIF in Decentralized Public Health Settings and Its Effect on Pulmonary TB and DR-TB Case Finding in India. *PLoS One*. 2015 May; 10(5): e0126065. DOI: 10.1371/journal.pone.0126065
25. Sandy J, Holton S, Fullam E, Sim E, Noble M. Binding of the anti-tubercular drug isoniazid to the arylamine N-acetyltransferase protein from *Mycobacterium smegmatis*. *Protein Sci*. 2005 Mar; 14(3): 775-82. DOI: 10.1110/ps.041163505
26. Upton AM, Mushtaq A, Victor TC, Sampson SL, Sandy J, Smith DM, et al. Arylamine N-acetyltransferase of *Mycobacterium tuberculosis* is a polymorphic enzyme and a site of isoniazid metabolism. *Mol Microbiol*. 2001 Oct; 42(2): 309-17. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02648.x
27. Westwood I, Bhakta S, Russell AJ, Fullam E, Anderton MC, Kawamura A, et al. Identification of arylamine N-acetyltransferase inhibitors as an approach towards novel anti-tuberculars. *Protein Cell*. 2010 Jan; 1(1): 82-95. DOI: 10.1007/s12338-010-0006-1
28. Zabost A, Brzezińska S, Kozińska M, Błachnio M, Jagodziński J, Zwolska Z, et al. Correlation of N-acetyltransferase 2 genotype with isoniazid acetylation in Polish tuberculosis patients. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 853602. DOI: 10.1155/2013/853602
29. Doustdar F, Khosravi A, Farnia P, Bahremand A. [Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* cultured from the Iranian patients]. *Iran J Med Microbiol*. 2007; 1(1): 17-22. [Article in Persian]
30. Pourhajbagher M, Nasrollahi M, Musavi S, Rahimi-Esboei B, Ghorbani Pashakolaei A. [Drug Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates to Isoniazid and Rifampin]. *J Babol Uni Med Sci*. 2012; 14(3): 66-72. [Article in Persian]