

УДК 616. 98

¹А.Ж. Ахметова, ¹С.Е. Рахимова, ²Л.Т. Чингисова, ¹К.Е. Берикханова, ¹Р.Б. Исаева, ¹А.Р. Акильжанова¹Өмір туралы ғылымдар орталығы, Назарбаев Университеті, Астана²Қазақстан Республикасы Туберкулез Проблемаларының Ұлттық Орталығы, Алматы

ҚАЗАҚСТАННЫҢ ӘР ТҮРЛІ ОБЛЫСТАРЫНДА ТАРАЛҒАН *M. TUBERCULOSIS* ИЗОЛЯТТАРЫНЫҢ ИЗОНИАЗИДКЕ ТӨЗІМДІЛІГІН АНЫҚТАЙТЫН *KATG*, *FABG-INHA*, *ANRS-OXYR* ГЕНДЕРІНДЕГІ МУТАЦИЯЛАРДЫ АНЫҚТАУ

Түйін

Бұл жұмыста Қазақстанның 3 облысындағы (Алматы, Қостанай және Қызылорда) жаңа жағдайлар арасынан бөлініп алынған *M. tuberculosis* изоляттарының изониазидке төзімділікті анықтайтын гендерінде мутациялардың таралу сипаты мен спектрі бағаланды. Аталған облыстарда таралған *M. tuberculosis* популяциясына изониазидке төзімділікке жауап беретін *katG*-генінде мутациялардың 315-ші кодонда басымдылық көрсетуі (сәйкесінше 97,1%; 92,3%; 69,2 %) тән.

Негізгі сөздер: *katG* гені, *fabG-inhA* промоторлық аймағы, *oxyR-ahpC* промоторлық аймағы, изониазид-төзімділік, *Mycobacterium tuberculosis*.

Кіріспе

Массалық БЦЖ вакцинациясы мен туберкулезге қарсы препараттарды қолдануға қарамастан, туберкулез дүниежүзінде медицинадағы негізгі мәселелердің бірі болып қалуда (1). Жыл сайын жаңадан инфекцияланғандар саны өсуде, және дәріге төзімді *M. tuberculosis* штамдары кең таралуда. Кох таяқшаларының туберкулезге қарсы қолданылатын дәрі-дәрмектерге төзімділігі туберкулезге қарсы терапиядағы ең негізгі кедергі болып табылады. Өкінішке орай, біздің республикамызда да туберкулездің дәріге төзімді түрімен ауыратын науқастар саны көбеюде.

Қазақстан Республикасының Туберкулез Проблемаларының Ұлттық Орталығы 2011 ж. мәліметтері бойынша, Қостанай және Қызылорда облыстарында ауру көрсеткіштері республикалық деңгейден (95,3 адам 100 000 халыққа) әлдеқайда жоғары, сәйкесінше 100 000 халыққа 110 және 107,5 адамды құрайды. Республикалық деңгейдегі ауру көрсеткіштерінен төмен көрсеткіштер Алматы облысында тіркелген – 100 000 халыққа 80,8 адам.

Изониазид – бірінші қатардағы негізгі туберкулезге қарсы препараттардың бірі, туберкулездің әр түрлі формаларын емдеуде кең қолданылады. Препарат аэробты жағдайларда белсенді түрде бөлінетін микобактерияларға бактерицидті әсер етеді. Тыныштық күйдегі және анаэробты жағдайдағы микобактерияларға әсер етпейді. Изониазид рифампицинмен бірге барлық терапиялық сызбанұсқалардың құрамына кіреді (2, 3).

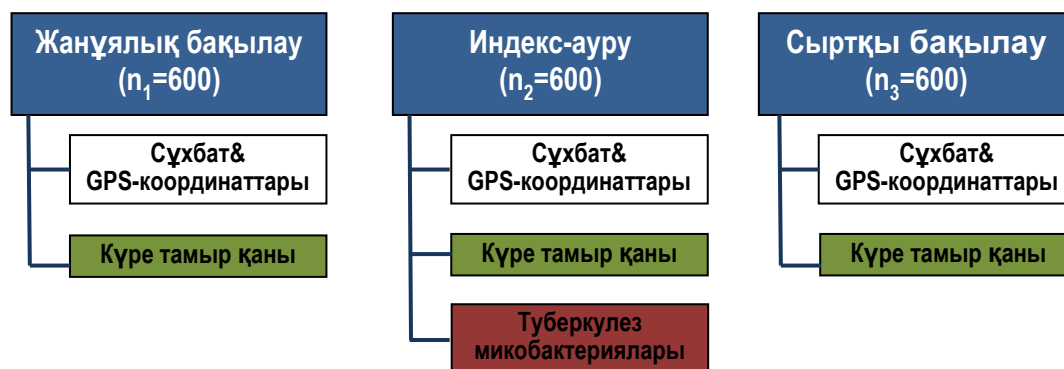
Изониазидтің микобактерияларға әсер ету механизмі рифампицинмен салыстырғанда күрделірек. Изониазид белсенді емес формадағы дәрілік препарат болып табылады. Микроб жасушасының ішіне түскеннен кейін, препарат каталаза-пероксидаза ферментінің әсерінен белсенді формаларға, яғни бос радикалды изоникотин қышқылының туындыларына айналады. Дәл осы туындылар көптеген жасушалық нысандарға зақымдаушы әсер етеді. Әсердің негізгі нысаны болып NADH-тәуелді-ACP-редуктаза (*InhA*) саналады. Бұл *M. tuberculosis* жасуша қабықшасының негізгі компоненті – микойл қышқылы (ағыл. Mycolic acid)

синтезінің негізгі ферменті. Сонымен қатар, изониазидтің белсенді бос радикалды туындылары микобактерияның ДНҚ-сы, көмірсулары мен липидтеріне тікелей зақымдаушы әсер етеді (4). Изониазидке төзімділіктің пайда болуын бірнеше генетикалық локустардағы өзгерістермен байланыстырады: *katG* (каталаза-пероксидаза гені), *inhA* аймағы (NADH-тәуелді-ACP-редуктаза гені), *ahpC* аймағы (алкил-гидропероксидредуктаза гені). Төзімділіктің пайда болуы мен *katG* геніндегі мутациялар немесе делециялардың арасындағы байланыс алғаш рет Zhang et.al (1992) жұмысында көрсетілген (5). Генетикалық өзгерістер *katG* каталазды белсенділігінің толық немесе жартылай жоғалуына әкеледі, *katG* мен изониазидтің байланысу қабілеті төмендейді, осының нәтижесінде изониазид белсенді емес формадан белсенді формаға айнамайды.

Зерттеу жұмыстары, төзімділікке әкелетін нуклеотидті алмасулар *katG* генінің көптеген позицияларында пайда болатынын көрсетеді. Бірақ, көп жағдайда 60-98% изониазид-төзімді штамдарда мутациялар 315-кодонда кездеседі (6, 7). Осы кодондағы мутациялар жоғары деңгейдегі төзімділіктің пайда болуына әкеледі (8).

Каталазды активтіліктің жоғалуы төзімділіктің тек бір ғана себебі емес. Сонымен қатар, төзімділік NADH-тәуелді-ACP-редуктазаны кодтайтын *inhA* геніндегі мутациялар нешінде де пайда болады (9). Изониазид-төзімді изоляттардың 0-5% жағдайында мутациялар құрылымдық генде табылса (10), 8-20% жағдайда мутациялар *fabG-inhA* промотор аймағында кездеседі (11, 13). *AhpC* гиперөнімділігіне әкелетін *ahpC* промоторлық аймағындағы өзгерістер мен изониазидке төзімділікпен байланыс Wilsson et al. (1996) жұмысында көрсетілген (12). Зерттеу жұмыстары, изониазид-төзімді штамдарда мутациялар *oxyR-ahpC* промоторлық аймағында болатынын да көрсетеді (14).

Зерттеу дизайні ауру-бақылау зерттеулерін (1-сурет); когортаның болжалды зерттеулерін; молекулалық-эпидемиологиялық зерттеулерді; адамның туберкулезге генетикалық сезімталдығы зерттеулерін қамтиды.



1-сурет – Ауру-бақылау зерттеулерінің дизайні.

Осы зерттеу жұмысының мақсаты: Қазақстанның 3 облысынан (Алматы, Қызылорда, Қостанай облыстары) жаңа жағдайлар арасынан бөлініп алынған *M. tuberculosis* клиникалық изоляттарының *katG* гені, *fabG-inhA*, *oxyR-ahpC* промоторлық аймағында мутациялар жиілігін анықтау.

Материалдар мен әдістер. Зерттеу жұмысында Алматы, Қызылорда және Қостанай облыстарынан жиналған фенотиптік изониазидке төзімді 60 (34 – Алматы облысынан, 13 – Қызылорда облысынан және 13 Қостанай облысынан) және сезімтал 57 (20 – Алматы облысынан, 24 – Қызылорда облысынан, 13 – Қостанай облысынан) *M. tuberculosis* клиникалық изоляттары анализденді. Изоляттардың изониазидке дәрілік сезімталдығы Қазақстан Республикасының Туберкулез Проблемаларының Ұлттық Орталығы референс-зертханасында (Алматы қаласы) абсолютті концентрациялар әдісімен анықталды. Бақылау ретінде *M. tuberculosis* H37Rv референтті штаммы (NC_000962) қолданылды. Жиналған *M. tuberculosis* клиникалық изоляттарының тіршілік белсенділігі 80°C температурада 30 минут зиянсыздандырылды. ДНҚ Supply, 2004 нұсқауына сәйкес бөлінді.

M. tuberculosis клиникалық изоляттарының изониазидке төзімділігін анықтайтын *katG* гені, *fabG-inhA* және *oxyR-ahpC* промоторлық аймағының амплификациясын құрамында 10x dNTP, 10x buffer, 2,5 mM MgCl₂, 1 бірлік Taq-полимераза (Fermentas, EC) және 10 пмоль әрбір праймер бар стандартталған реакциялық қоспада Erppendorf амплификаторында өткіздік. ПТР қоспасының жалпы көлемі 20 µl. *katG* гені, *fabG-inhA* және *oxyR-ahpC* промоторлық аймағының нуклеотидтік тізбектерін анықтауды өндіруші-компания хаттамаларына сәйкес ABI 3730 (Applied Biosystems, АҚШ) генетикалық анализаторының көмегімен жүзеге асырдық.

Зерттеу нәтижелері. 117 *M. tuberculosis* клиникалық изоляттарының (сезімтал және төзімді) изониазидке төзімділікке жауап беретін мутациялар кездесетін *katG* гені, *fabG-inhA* және *oxyR-ahpC*

промоторлық аймағының нуклеотидтік тізбектерін анықтау бойынша зерттеу жұмыстары өткізілді.

Барлық 117 *M. tuberculosis* клиникалық изоляттарының (сезімтал да, төзімді де) изониазидке төзімділікті анықтайтын гендердегі мутациялар 59 (50,4%) *M. tuberculosis* изоляттарда анықталды.

57 изониазид-төзімді изоляттардың (95%) *katG* генінде сериннің треонин аминқышқылына алмасуына әкелетін 315-ші кодондағы мутация анықталды. Соның ішінде екі жағдайда (3,5%) қос мутациялар байқалды, яғни бір уақытта мутациялар *katG* генінде және *fabG-inhA* промоторлық аймағының -15 Т-С позициясында кездесті. Екі жағдайда (3,32%) мутациялар, сәйкесінше, *fabG-inhA* промоторлық аймағының -8 Т-С позициясында және *oxyR-ahpC* промоторлық аймағының -46 G-A позициясында табылды. Қалған 1,66% (1 изолят) жағдайда барлық изониазид-төзімді *M. tuberculosis* клиникалық изоляттарының арасында мутациялар анықталмады, бұл изолятта мутациялар изониазидке-төзімділікті анықтайтын басқа гендерде болуы мүмкін деп түсіндіруге болады.

Изониазид-сезімтал 57 *M. tuberculosis* клиникалық изоляттарын зерттеу барысында *katG* гені, *fabG-inhA* және *oxyR-ahpC* промоторлық аймағында мутациялар анықталмады.

Облыстар бойынша алынған мәліметтер 1-кестеде көрсетілген. 3 облыста таралған изониазид-төзімді изоляттарда *katG* генінің Ser315Thr кодондағы мутация сәйкесінше Алматы, Қызылорда және Қостанай облыстарында 97,1%, 92,3%; 69,2% байқалды. Алматы облысындағы барлық төзімді изоляттардың арасында 1 жағдайда (2,9%) мутациялар анықталмады. Қызылорда облысындағы изониазидке-төзімді үлгілердің арасында 15,4% (2 изолят) жағдайында қос мутациялар - *katG* (Ser315Thr) + *fabG-inhA* (-15 C-T), 15,4 % жағдайында мутациялар *fabG-inhA* промоторлық аймағының -15 C-T позициясында анықталды. Қостанай облысында изониазид-төзімді клиникалық изоляттардың 7,7% жағдайында мутациялар *fabG-inhA* промоторлық аймағының -8 Т-С позициясында кездесті.

1-кесте.

Қазақстан Республикасының 3 облысынан жиналған *M. tuberculosis* клиникалық изоляттарының *katG*, *fabG-inhA*, *ahpC-oxyR* гендеріндегі мутациялар жиілігі.

Облыс	Төзімді үлгілер саны	Сезімтал үлгілер саны	<i>katG</i> (Ser315Thr) генінде мутациялар анықталған үлгілер саны (%)	<i>fabG-inhA</i> промоторлық аймағында мутациялар анықталған үлгілер саны (%)		<i>oxyR-ahpC</i> (-46G-A) промоторлық аймағында мутациялар анықталған үлгілер саны (%)	Қос мутациялар - <i>katG</i> (Ser315Thr) + <i>fabG-inhA</i> (-15 C-T) анықталған үлгілер саны (%)	Мутациялар анықталмаған үлгілер саны (%)
				-15 C-T	-8 T-C			
Алматы	34	20	33 (97,1)	-	-	-	-	1 (2,9)
Қызылорда	13	24	9 (69,2)	2 (15,4)	-	-	2 (15,4)	-
Қостанай	13	13	12 (92,3)	-	1 (7,7)	-	-	-

Қорытынды. Зерттеу жұмысының нәтижесінде, Алматы, Қостанай және Қызылорда облыстарындағы жаңа жағдайлар арасынан бөлініп алынған *M. tuberculosis* популяциясына изониазид препаратына төзімділікке жауап беретін *katG* генінің 315-ші кодонындағы мутацияның (Ser-Thr) жоғары жиілікте (сәйкесінше 97,1%; 92,3%; 69,2 %) кездесуі тән.

Әдебиеттер:

1. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing // WHO report. - 2009. - P. 303.
2. Rodrigues L., Machado D., Couto I., Amaral L., Viveiros M. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex // Infect Genet Evol. - 2012. - Vol 12(4). - P.695-700.
3. Zhang Y. Isoniazid. -In Rom W. N., Garay S. M., Lipincott W. and Wilkins (ed). Tuberculosis. A Wolters Kluwer Company, New York. 2003. - P. 739-758.
4. Leung E.T., Ho P.L., Yuen K.Y., Woo W.L., Lam T.H., Kao R.Y., Seto W.H., and Yam W.C. Molecular Characterization of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Identification of a Novel Mutation in *inhA* // Antimicrob Agents Chemother. - 2006. -Vol 50(3). - P. 1075-1078.
5. Zhang Y., Heym B., Allen B., Young D. and Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*// Nature. -1992. -Vol. 358. -P. 591-593.
6. Zhang M., Yue J., Yang Y., Zhang H., Lei J., Jin R., Zhang X., Wang H.. Detection of Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China// J. Clin. Microbiol. -2005. -Vol. 43. -P. 5477-5482.
7. Mokrousov I., Narvskaya O., Otten T., Limeschenko E., Steklova L., and Vyshnevskiy B. High Prevalence of KatG Ser315Thr Substitution among Isoniazid- Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001// Antimicrob. Agents Chemother. -2002. -Vol. 46(6). -P. 1417-1424.

8. Abate D., Tedla Y., Meressa D., Ameni G. Isoniazid and rifampicin resistance mutations and their effect on second-line anti-tuberculosis treatment// The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. -2014. - Vol. 18(8). -P. 946-951(6).

9. Jagielski T., Bakula Z., Roeske K., Kamiński M., Napiórkowska A., Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z and Bielecki J. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates// J. Antimicrob. Chemother. -2014. -Vol. 69 (9). -P. 2369-2375.

10. Zhang Y. and A. Telenti. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*// In Hatfull G, Jacobs W R (ed). Molecular genetics of mycobacteria. American Society of Microbiology Press, Washington D.C. - 2000. - P. 235-254

11. Ramaswamy, S., and J. M. Musser. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update// Tuber. Lung Dis. - 1998. - Vol. 79. - P. 3-29.

12. Costa ERD., Ribeiro M.O., Silva SNM., Arnold L.S., Rostirolla D.C. et al. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America// BMC Microbiology. -2009. - Vol. 9. - P.39.

13. Ramaswamy S.V., Dou S.J., Rendon A., Yang Z., Cave M.D., and Graviss E.A.. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico// J. Med. Microbiol. - 2004. - Vol. 53. - P. 107-113.

14. Baker L.V., Brown T.J., Maxwell O., Gibson A.L., Fang Z., Yates M.D. and Drobniewski F.A. Molecular Analysis of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from England and Wales Reveals the Phylogenetic Significance of the *ahpC* -46A // Polymorphism Antimicrob. Agents Chemother. - 2005. - Vol. 49. - P. 4 1455-1464.

Резюме

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ KATG, FABG-INHA, AHPC-OXYR, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ИЗОНИАЗИДУ, СРЕДИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ M. TUBERCULOSIS ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ОБЛАСТЕЙ КАЗАХСТАНА

¹ А.Ж. Ахметова, ¹ С.Е. Рахимова, ² Л.Т. Чингисова, ¹ К.Е. Берикханова, ¹ Р.Б. Исаева, ¹ А.Р. Акильжанова

¹ Центр Наук о жизни, Назарбаев Университет, Астана,

² Национальный Центр Проблем Туберкулеза Республики Казахстан, Алматы

В данной работе проведена оценка спектра и характера распространенности мутаций в генах, обуславливающих резистентность к изониазиду в штаммах, выделенных из трех областей Казахстана (Алматинская, Костанайская и Кызылординская область). Для популяции *M. tuberculosis*, циркулирующей в данных областях характерна высокая частота встречаемости мутаций в 315 кодоне *katG*-гена (97,1%; 92,3%; 69,2 % соответственно), определяющем устойчивость к изониазиду.

Ключевые слова: ген *katG*, промоторная область *fabG-inhA*, промоторная область *oxyR-ahpC*, изониазид-устойчивость, *Mycobacterium tuberculosis*.

Abstract

DETERMINATION OF MUTATIONS IN KATG, FABG-INHA, AHPC-OXYR GENES RESPONSIBLE FOR IZONIAZID-RESISTANCE AMONG CLINICAL ISOLATES OF M. TUBERCULOSIS FROM DIFFERENT REGIONS OF KAZAKHSTAN

¹ A.Zh. Akhmetova, ¹ S.E. Rakhimova, ² L.T. Chingissova, ¹ K.Y. Berikkhanova, ¹ R.B. Issayeva, ¹ A.R. Akilzhanova

¹ Center for Life Sciences, Nazarbayev University, Astana,

² National Center for Tuberculosis Problems, Almaty

Spectrum of mutations in genes that cause resistance to isoniazid in clinical isolates of *M. tuberculosis* circulating in 3 regions of Kazakhstan (Almaty, Kostanay, Kyzylorda regions) was estimated in this study. High frequency of mutations at 315 codon of *katG* gene (97,1%; 92,3%; 69,2% respectively) responsible for resistance to isoniazid was detected among *M. tuberculosis* isolates distributed in mentioned regions.

Key words: *katG* gene, *fabG-inhA* promoter region, *oxyR-ahpC* promoter region, isoniazid-resistance, *Mycobacterium tuberculosis*.