ISSN: 2538-5887; Pathobiology Research. 2019;22(1):63-68

Role of Mutation in Sb (V)-As (V) Reductase Enzyme of Leishmania tropica Isolates Resistant to Glucantim in Iran

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Fozoungari F.[1] *MSc,*
Dalimi A.H.*[1] *PhD,*
Arab S.Sh.[2] *PhD,*
Behmanesh M.[3] *PhD*

How to cite this article
Fozoungari F, Dalimi A.H, Arab S.Sh, Behmanesh M. Role of Mutation in Sb (V)-As (V) Reductase Enzyme of Leishmania tropica Isolates Resistant to Glucantim in Iran. Pathobiology Research . 2019;22(2):63-68.

[1]Parasitology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Biophysics Department, Biology Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Genetic Department, Biology Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code:14-11713116
Phone: +98 (21) 82883838
Fax: +98 (21) 82883568
dalimi_a@modares.ac.ir

Article History
Received: October 10, 2018
Accepted: February 4, 2019
ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Aims Glucantime has been considered as a drug of choice for treating cutaneous leishmaniasis for many years. In the recent years, resistance to Glucantime has been increasingly reported in some regions of Iran. In the Leishmania, Arsenate/Antimony reductase acts on the basis of thiol metabolism; it can donate the electron from reduced glutaredoxin to pentavalent (sbV) antimony and arsenate and reduce them to trivalent (sbIII) antimony and arsenite, based on its enzymatic property. It has been assumed that a functional mutation in the enzyme can result in drug resistance. In the present study, the role of Sb (V)-As (V) reductase of Leishmania tropica in drug resistant to glucantime was investigated.

Materials & Methods In the present experimental research, 15 glucantime sensitive samples and 15 glucantime resistant specimens were collected from different regions of Iran through patients with cutaneous leishmaniasis. For mutation detection, first degenerate primers were designed; then, sequencing and simulation techniques were used based on molecular dynamics method.

Findings In Leishmania tropica-resistant isolates, only one mutation was seen as replacing alanine (Ala) at position 80 instead of valine (Val). The analysis of the radius of gyration did not reveal any increase in the radius of gyration while simulation.

Conclusion Mutations in glucantime-resistant isolates did not significantly change simulated active site of antimony ion.

Keywords Leishmania; Glucantime; Drug Resistance; ACR_2 Gene; Molecular Dynamic

CITATION LINKS

[1] Leishmania parasites and Leishmaniases [2] Monitoring drug resistance in leishmaniasis [3] Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments. [4] Crystallization and preliminary crystallographic characterization of LmACR2, an arsenate/antimonate reductase from Leishmania major [5] Structural characterization of the As/Sb reductase LmACR2 from Leishmania major [6] Leishmania major LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam [7] Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery. [8] Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals [9] Assessment of drug resistance related genes as candidate markers for treatment outcome prediction of cutaneous leishmaniasis in Brazil [10] Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs [11] Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis [12] Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line [13] Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1 [14] Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene gsh1 and of the ABC transporter gene pgpA in arsenite-resistant Leishmania tarentolae [15] Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis [16] Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione [17] Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate [18] Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor 1B [19] Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione [20] Rapid reduction of pentavalent antimony by trypanothione: potential relevance to antimonial activation

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

نقش جهش در آنزیم آرسنات/آنتیموان‌ردوکتاز در ایزوله‌های *لیشمانیا تروپیکای* مقاوم به گلوکانتیم در ایران

فاطمه فزون‌گری MSc
گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
عبدالحسین دلیمی* PhD
گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
سیدشهریار عرب PhD
گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
مهرداد بهمنش PhD
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده
اهداف: گلوکانتیم سال‌هاست که به‌عنوان داروی انتخابی برای درمان لیشمانیوز جلدی استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر مقاومت در برابر گلوکانتیم به‌طور فزاینده‌ای در برخی از مناطق ایران گزارش شده است. در انگل لیشمانیا آرسنات/ آنتیمونات‌ردوکتاز بر مبنای متابولیزم تیول عمل می‌کند؛ این آنزیم می‌تواند الکترون را از گلوتاردوکسین کاهش‌یافته به آنتیموان پنج‌ظرفیتی و آرسنات اهدا کند و آنها را به آنتیموان سه‌ظرفیتی و آرسنیت کاهش دهد. فرض شده است که یک جهش عملکردی در آنزیم می‌تواند به مقاومت درمانی منجر شود. در این مطالعه نقش پروتئین آرسنات/ آنتیموان‌ردوکتاز *لیشمانیا تروپیکا* در ایجاد مقاومت نسبت به گلوکانتیم مورد بررسی قرار گرفته است.
مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر ۱۵ نمونه حساس و ۱۵ نمونه مقاوم به گلوکانتیم از بیماران مبتلا به لیشمانیازیس جلدی، از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شد. برای تشخیص موتاسیون از پرایمرهای دژنره طراحی‌شده و تکنیک‌های توالی‌یابی و شبیه‌سازی براساس روش دینامیک مولکولی استفاده شد.
یافته‌ها: در جدایه‌های مقاوم به *لیشمانیا تروپیکا*، فقط یک جهش به‌صورت جایگزینی آمینواسید آلانین در موقعیت ۸۰ به‌جای آمینواسید والین دیده شد. آنالیز شعاع ژیراسیون هیچ‌گونه افزایش شعاعی را در زمان شبیه‌سازی نشان نداد.
نتیجه‌گیری: جهش در جدایه‌های مقاوم به گلوکانتیم موجب تغییر در جایگاه فعال یون آنتیموان نشده است.
کلیدواژه‌ها: لیشمانیا، گلوکانتیم، مقاومت دارویی، ژن *ACR2*، دینامیک مولکول

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۵
*نویسنده مسئول: dalimi_a@modares.ac.ir

مقدمه
لیشمانیوز پوستی بیماری عفونی انگلی مزمنی است که در برخی از کشورهای جهان از جمله ایران به شکل بومی دیده می‌شود. پیش از این اشکال بالینی، لیشمانیوز دنیای قدیم را به دو گروه خشک یا شهری ناشی از *لیشمانیا تروپیکا* (*Leishmania tropica*) و نوع مرطوب یا روستایی ناشی از *لیشمانیا ماژور* (*Leishmania major*) تقسیم‌بندی می‌کردند[1]. ضایعات ناشی از *لیشمانیا ماژور* غالباً ملتهب و حاد بوده ولی ضایعات ناشی از *لیشمانیا تروپیکا* شدت کمتری داشته و تعداد آنها محدودتر است[1]، ولی اشکال بالینی متفاوتی در هر دو نوع بیماری دیده می‌شوند و مشکل است که بتوان براساس دوره کمون و شکل بالینی بیماری، گونه انگل را تشخیص داد یا با تشخیص گونه انگل سیر بالینی بیماری را مشخص کرد[1].
داروی آنتیموان پنج‌ظرفیتی به نام مگلومین‌آنتیموان یا گلوکانتیم به‌عنوان خط اول درمان سالک در ایران شناخته شده است. در سال‌های اخیر گزارشاتی مبنی بر مقاومت به این دارو در ایران گزارش شده است[1]. در صورتی که پس از دو هفته از تکمیل درمان سیستمیک یا موضعی علایمی از بهبودی در ضایعه مشاهده نشود به‌عنوان شکست درمان مجدداً درمان سیستمیک با همان دوز قبلی تجویز می‌شود. و اگر دوبار درمان سیستمیک با شکست یا عود مواجه شود به‌عنوان موارد مقاومت بالینی در نظر گرفته می‌شوند[1]. تحمل دارویی بسته به نوع دارو، دوزاج آن و تعداد دفعات استفاده از آن برگشت‌پذیر است ولی مقاومت دارویی به دو صورت ذاتی و اکتسابی به‌صورت غیربرگشت‌پذیر اتفاق می‌افتد. در انگل لیشمانیا تفاوت ذاتی در حساسیت گونه‌های لیشمانیا به داروهای آنتی‌مونیال وجود دارد[2]. ولی در مقاومت اکتسابی نسبت به داروی گلوکانتیم در گونه‌های مختلف لیشمانیا، سهولت کسب مقاومت در برابر دارو و در مرحله بعد گسترش سویه مقاوم به دارو، نقشی تعیین‌کننده دارد[2, 3]. از آنجایی که در لیشمانیوز پوستی، آماستیگوت‌ها ممکن است به‌طور مستقیم از فردی به فرد دیگر منتقل شوند، شرایطی از قبیل بازبودن زخم بیمار و وجود خراش جلدی در پوست فرد پذیرنده انتقال لیشمانیا را در صورت فقر بهداشت عمومی و کنترل ضعیف انتقال بیماری، در بیمارستان‌ها و محیط زندگی تسهیل می‌کند و احتمال دارد سویه‌های مقاوم به داروی گلوکانتیم لیشمانیا که در اثر جهش‌های جدید در ساختار ژنی تارگت دارویی به وجود آمده‌اند حتی در نبود دارو نیز تکثیر پیدا کرده (پدیده سازگاری) یا در اثر انتقال افقی ژن‌های مقاوم به جمعیت جدید گسترش پیدا کنند. جهش‌های جدید احتمالی در ساختار ژنی لیشمانیا به‌عنوان تارگت دارویی، می‌تواند منجر به تغییراتی در جهت ایجاد مقاومت دارویی مانند تغییر در ساختار سه‌بعدی آنزیم‌های مرتبط با متابولیزم دارویی گلوکانتیم و کاهش تکثیر ژن‌های هدف و بیان آنها و نیز افزایش انتشار دارو به خارج از سلول خود شود[2, 3].
یکی از پروتئین‌های مرتبط با متابولیزم داروی گلوکانتیم پروتئین آرسنات/آنتیموان ردوکتاز با نام ژنی *ACR2* در انگل لیشمانیا است. ساختار این پروتئین تا آمینواسید ۱۲۷ با طول قطعه ۳۸۴جفت‌باز توسط متد X-RAY شناسایی شده است (Protein_id=AAS73185.1) در آنزیم‌شناسی این پروتیئن با خاصیت کاتالیزوری در عملکرد داروی آنتیموان پنج‌ظرفیتی (گلوکانتیم) که باید به فرم سه‌ظرفیتی برای اعمال خاصیت‌کشندگی تبدیل شود، موثر است. این آنزیم می‌تواند الکترون را از یک آنزیم ردوکس به نام گلوتاردوکسین (که توسط کوفاکتور گلوتاتیون (GSH) از طریق مکانیزم‌های غیرآنزیمی کاهیده شده است) به آنتیموان پنج‌ظرفیتی اهدا کند و سبب تبدیل آن به آنتیموان سه‌ظرفیتی شود[4, 5]. نشان داده شده است که ژن *ACR2* مربوط به آنزیم آرسنات/ آنتیموان ردوکتاز *لیشمانیای ماژور* که به‌عنوان آنزیم کاهش‌دهنده داروی پنج‌ظرفیتی آنتیمونال و آرسنات است در وکتورهای بیانی *اشریشیا کلی* فاقد arsC و در گونه *ساکارومایسس سرویزیه* که فاقد ژن *ScACR2*، وارد و به انگل *لیشمانیا اینفانتوم* ترانسفکت شد که با بیان این ژن و بررسی آن حساسیت انگل در برابر داروی پنتوستام افزایش یافته است[6].
در صورتی که ایزوله‌های مقاوم به گلوکانتیم لیشمانیازیس جلدی به‌دلیل مقاومت دارویی و نه تولرانس دارویی به گلوکانتیم به وجود آمده باشند، می‌توان فرض گرفت که جهش‌های ساختاری در این

آنزیم و دیگر آنزیم‌های دخیل در عملکرد داروی گلوکانتیم می‌توانند به‌عنوان هدف‌های بالقوه برای طراحی داروهای جدید عمل کنند (از ژن تا طراحی دارو) [7]. از طرفی زیست‌شناسی محاسباتی در ترکیب با بیولوژی مولکولی می‌تواند در آشکارسازی مکانیزم مقاومت به داروی گلوکانتیم نقش مهمی ایفا کند.

هدف مطالعه حاضر بررسی نقش پروتئین آرسنات/آنتیموان ردوکتاز در ایجاد مقاومت به گلوکانیم در ایزوله‌های لیشمانیازیس جلدی به روش تعیین توالی و تحلیل مولکولی- رایانه‌ای بود.

مواد و روش‌ها

تشخیص موتاسیون

نمونه‌برداری: در مطالعه تجربی حاضر ۱۵ نمونه حساس بالینی (از مناطق مختلف ایلام، لرستان، مشهد و اصفهان) و ۱۵ نمونه مقاوم بالینی از مناطق مختلف مشهد (۷ نمونه مقاوم)، کرمان (۴ نمونه مقاوم) و اصفهان (۴ نمونه مقاوم) به داروی گلوکانتیم اخذشده به‌صورت لام، ابتدا در الکل ۹۶درجه رنگ‌بری‌شده و سپس با اب مقطر از سطح لام جمع‌آوری شدند و به مقدار ۲۰۰میکرولیتر در یک تیوب ۱/۵میلی‌لیتری قرار داده شدند. سپس با کیت GeneAll®ExgeneTMCellSV (GeneAll Biotechnology؛ کره‌جنوبی) ماده ژنتیکی DNA استخراج شد. نمونه‌های مورد نظر به مقدار ۲۵میکرولیتر به‌همراه پرایمرهای رفت و برگشت به میزان ۱۰میکرولیتر به شرکت پیشگام برای توالی‌یابی فرستاده شدند و با استفاده از نرم‌افزار Sequencher 4.1.4 فایل‌های AB1 برای هر یک از توالی‌های حساس و مقاوم پاک‌سازی شده، سپس قطعات توالی‌های حساس و مقاوم به گلوکانتیم با یکدیگر تراز شدند و جهش‌های ساختاری در این قطعات مشخص شد.

طراحی پرایمرهای دژنره: پرایمرهای دژنره ترکیبی از سکانس‌های الیگونوکلئوتیدی هستند که در برخی از جایگاه‌ها شامل تعدادی از بازهای احتمالی هستند. پرایمرهای دژنره جمعیتی از پرایمرها با سکانس مشابه هستند که همه ترکیبات نوکلئوتیدی ممکن را برای یک سکانس پروتیئنی خاص پوشش می‌دهند. این پرایمرها زمانی طراحی می‌شوند که سکانس پروتئین گونه مورد نظر شناخته نشده ولی سکانس پروتئین گونه‌های نزدیک به آن شناخته شده باشند. بدین‌منظور سکانس‌های مربوط به قطعات ژنی مورد نظر (*ACR2*) در سایت NCBI بلاست و سکانس قطعات ژنی گونه‌های مشابه با آنها به فرمت فستا ذخیره شد. سپس در برنامه مگا ۶ قطعات در کنار هم‌تراز شده و پرایمرهای دژنره با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner 6.5 طراحی شدند. پرایمرهای مربوط به قطعه ژنی *ACR2* به طول ۶۹۸جفت‌باز طراحی شد. قطعه ژنی مورد نظر به‌دلیل ساختار اولیه یوکاریوت فاقد قطعات اینترون و اگزون هستند. بنابراین قطعه ژنی وقطعه کدشونده به پروتئین (CDS) با یکدیگر یکسان هستند و طول بیشتر قطعه تکثیرشونده به‌دلیل افزایش دقت در بررسی جهش‌های نقطه‌ای در سکانس‌ها است. توالی قطعه فوروارد 5'-CCRGCYRTCAAAGACKMGCTCTTGC-3' و توالی قطعه برگشت 5'-GTGCGTGAGTGMGTGCCATTCACC-3' است. که برنامه زمانی آن شامل دناتوراسیون اولیه ۵دقیقه در دمای ۹۵°C، ۳۰ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۵°C، ۲۰ثانیه اتصال در دمای ۶۳°C و یک‌دقیقه گسترش در دمای ۷۲°C با تکرار ۴۰X و ۱۰دقیقه گسترش نهایی در دمای ۷۲°C است.

مطالعات محاسباتی

مدل‌سازی مولکولی: با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 سکانس‌های DNA به‌دست‌آمده برای قطعات حساس و قطعات مقاوم به گلوکانتیم با یکدیگر تراز و به سکانس‌های پروتیئنی در نرم‌افزار ترجمه شدند. سکانس‌های پروتئینی به‌دست‌آمده در نمونه‌های حساس و مقاوم به گلوکانتیم در سرور همولوژی مدلینگ SWISS MODEL قرار داده شدند که این سرور ساختار پروتئین هدف را با استفاده از پروتئین‌های همولوگ با ساختار سه‌بعدی شناخته‌شده در فایل PDB آنها مقایسه کرده و چندین مدل با بیشترین همپوشانی با ساختارهای موجود را مدل‌سازی می‌کند و به‌صورت PDB در اختیار قرار داد.

تعیین جایگاه فعال آنتیموان سه‌ظرفیتی در مدل ایجادشده و فواصل ژئومتریک: براساس تعیین جایگاه فعال در آنزیم مورد مطالعه، ساختار کریستالوگرافی جایگاه فعال یون آنتیموان در پروتئین تریپانوتیون ردوکتاز که مربوط به گونه *لیشمانیا اینفانتوم* بود استفاده شد. پروتئین‌های هدف مورد مطالعه در هر دو نمونه‌های حساس و مقاوم مربوط به گونه *لیشمانیا تروپیکا* در نرم‌افزار یاسارا ۱۱/۹ وارد شدند. و جایگاه یون آنتیموان بررسی شد. بعد از شبیه‌سازی جایگاه فعال در نرم‌افزار یاسارا فاصله بین کربن‌های آلفای (CA) رزیدوهای اطراف جایگاه فعال یون آنتیموان برای پروتئین‌های مدل‌سازی‌شده در سویه‌های حساس و مقاوم به گلوکانتیم *لیشمانیا تروپیکا* اندازه‌گیری شد.

تعیین شعاع ژیراسیون اطراف جایگاه فعال شبیه‌سازی‌شده: برای محاسبه توزیع شعاعی حول دسته‌ای از اتم‌ها یا مرکز جرم دسته‌ای از اتم‌ها می‌توان از برنامه gmx gyrate در نرم‌افزار گروماکس ۱/۳ استفاده کرد بدین‌منظور کلیه رزیجوهای موجود در ۶آنگستروومی اطراف آنتموان چه در سویه‌های حساس و چه در سویه‌های مقاوم در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

موتاسیون در آرسنات/آنتیموان‌ردوکتاز جمعیت‌های حساس و مقاوم به گلوکانتیم *لیشمانیا تروپیکا*: DNA نمونه‌های مورد نظر به شرکت پیشگام برای توالی‌یابی فرستاده شد و با استفاده از نرم‌افزار sequencher4.1.4 فایل‌های AB1 برای هر یک از توالی‌های حساس و مقاوم پاک‌سازی شدند. پس از ترجمه توالی‌های ژنی نمونه‌های حساس و مقاوم به گلوکانتیم به توالی‌های پروتئینی (به طول ۱۲۷آمینواسید)، با توالی پروتئینی مربوط به پروتئین آرسنات آنتیموان ردوکتاز *لیشمانیا ماژور* (Protein_ID=AAS73185.1) به‌صورت چندگانه تراز شدند. مشخص شد که تنها در موقعیت ۸۰ آمینواسید آلانین (Ala) در ۱۰% جدایه‌های مقاوم به گلوکانتیم جایگزین آمینواسید والین (V) در جدایه‌های حساس به گلوکانتینم شده است (جدول ۱، شکل‌های ۱ و ۲).

جدول ۱) تشخیص موتاسیون در آرسنات/ آنتیموان‌ردوکتاز جمعیت‌های حساس و مقاوم به گلوکانتیم *لیشمانیا تروپیکا* (در موقعیت: ۳۶)

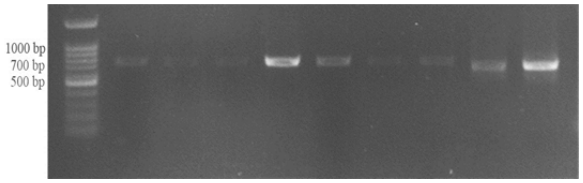
در ایزوله‌های حساس	
اختصار آمینواسید	V والین (Val)
در ایزوله‌های مقاوم	
اختصار آمینواسید	A آلانین (Ala)

```
tr|Q6Q1Q5|Q6Q1Q5_LEIMA      MTNYTYIKPEELVELLDNPDSLVKAAVIDCRDSDRDCGFIVNSINMPTISCTEEMYEKLA    60
resistant                  MANYTYMKPEELVELLDNPDSLAKAAVIDCRDSDRDCGFIVNSISMPTISCTEEMYERLA    60
sensitive                  MANYTYMKPEELVELLDNPDSLAKAAVIDCRDSDRDCGFIVNSISMPTISCTEEMYERLA    60
                           *:****:***************.********************.************:**

tr|Q6Q1Q5|Q6Q1Q5_LEIMA      KTLFEEKKELAVFHCAQSLVRAPKGANRFALAQKKLGYVLPAVYVLRGGWEAFYHMYGDV    120
resistant                  KTLFEEKKEVAVFHCAQSLARAPKGANRFALAQKKLGYVLPAVYVLRGGWEAFYHMYGDV    120
sensitive                  KTLFEEKKEVAVFHCAQSLVRAPKGANRFALAQKKLGYVLPAVYVLRGGWEAFYHMYGDV    120
                           *********:*********.****************************************

tr|Q6Q1Q5|Q6Q1Q5_LEIMA      RPDLMYV    127
resistant                  RPDLMYV    127
sensitive                  RPDLMYV    127
                           *******
```

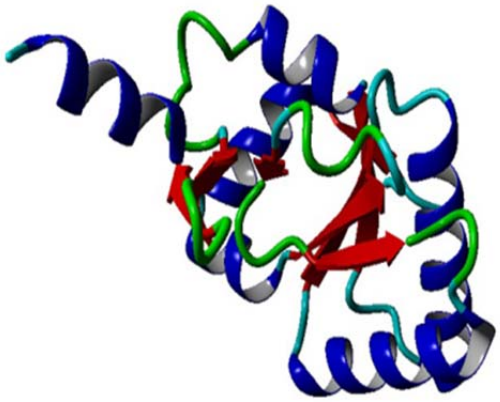
شکل ۱) تراز چندتایی سکانس‌های ژنی تریپانوتیون ردوکتاز جمعیت‌های حساس و مقاوم به گلوکانتیم *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا اینفانتوم*



شکل ۲) قطعه ژنی *ACR2* استخراج‌شده از ژل جمعیت‌های حساس و مقاوم به گلوکانتیم *لیشمانیا تروپیکا*

مطالعات محاسباتی

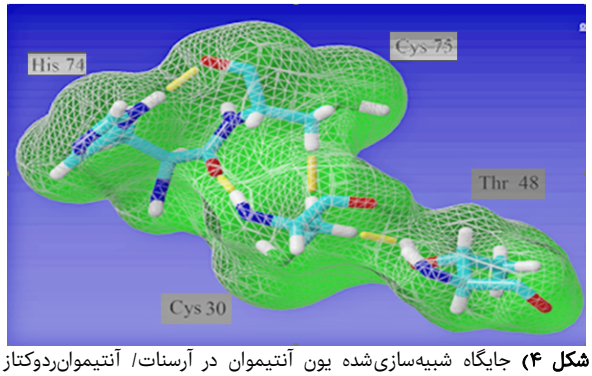
مدل‌سازی: توالی پروتئنی ژن *ACR2* در سرور پردازنده ساختار پروتئین به نام SWISS MODEL قرار داده شد که سرور ساختار پروتئین هدف را با استفاده از پروتئین‌های همولوگ با ساختار سه‌بعدی شناخته‌شده در فایل PDB آنها مقایسه کرده و چندین مدل با بیشترین همپوشانی با ساختارهای موجود را مدل‌سازی کرده، و به‌صورت PDB در اختیار قرار می‌دهد. در صورتی که این مدل‌های شبیه‌سازی‌شده با توالی پروتئین هدف بیش از ۷۰% شباهت داشته باشند می‌توانند برای محاسبات بعدی مورد استفاده قرار گیرند. برای توالی پروتیئنی ژن *ACR2* به‌دست‌آمده از ایزوله‌های حساس و مقاوم به گلوکانتیم مدل ساخته‌شده حدود ۹۸% با پروتئین آرسنات آنتیموان‌ردوکتاز با PDB کد 2j6p شباهت داشت (شکل ۳).



شکل ۳) مدل آرسنات/ آنتیموان ردوکتاز (ACR2) *لیشمانیا تروپیکا* (PDB code 2j6p)

جایگاه فعال آنتیموان سه‌ظرفیتی در مدل‌های ایجادشده و فواصل ژئومتریک آمینواسیدهای اطراف آنها

ساختار کریستالوگرافی یون آنتیموان سه‌ظرفیتی در مرکز یک هندسه چهارضلعی یا تتراهدرال در تریپانوتیون‌ردوکتاز قرار گرفته است و گوشه‌های این چهارضلعی اتم‌های SG آمینواسیدهای سیستئین ۵۲ (۲/۸آنگستروم) و سیستئین ۵۷ (۳آنگستروم) و اتم OG1 آمینواسید ترئونین ۳۳۵ (۳آنگستروم) از زنجیره اول و اتم ND1 آمینواسید هیستیدین ۴۶۱ (۳/۲آنگستروم) از زنجیره مشابه دوم یا فولد دوم این پروتئین، قرار گرفته‌اند. پروتئین‌های هدف مورد مطالعه در هر دو نمونه‌های حساس و مقاوم مربوط به گونه‌های لیشمانیا در نرم‌افزار یاسارا وارد شدند و جایگاه یون آنتیموان شبیه‌سازی و پیدا شد. با استفاده از فایل PDB مدل اصلاح‌شده در نرم‌افزار یاسارا، فاصله بین کربن‌های آلفای (CA) رزیدوهای اطراف جایگاه فعال پروتئین آرسنات آنتیموان‌ردوکتاز در جدایه‌های حساس و مقاوم به گلوکانتیم گونه‌های لیشمانیا اندازه‌گیری شد. آمینواسیدهای اطراف جایگاه شبیه‌سازی‌شده یون آنتیموان در آرسنات/ آنتیموان *لیشمانیا تروپیکا* شامل ترئونین ۴۸، سیستئین ۷۵، سیستئین ۳۰ و هیستیدین ۷۴ بود (شکل ۴). اندازه‌گیری فواصل ژئومتریک بین کربن‌های آلفای آمینواسیدهای اطراف یون آنتیموان نشان داد که میانگین مجموع فواصل بین کربن‌های آلفا در ایزوله‌های مقاوم به گلوکانتیم ۵/۸آنگستروم و بین ایزوله‌های حساس ۵/۹۹آنگستروم است که در حدود ۰/۲آنگستروم جایگاه فعال ایزوله‌های مقاوم بالینی کوچک‌تر شده است (جدول‌های ۲ و ۳).



شکل ۴) جایگاه شبیه‌سازی‌شده یون آنتیموان در آرسنات/ آنتیموان‌ردوکتاز *لیشمانیا تروپیکا*

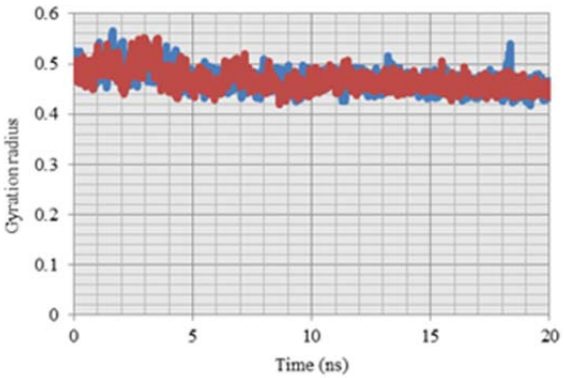
جدول ۲) اندازه‌گیری فواصل ژئومتریک بین کربن‌های آلفای آمینواسیدهای اطراف یون آنتیموان در آرسنات/ آنتیموان ردوکتاز ایزوله‌های مقاوم به گلوکانتیم *لیشمانیا تروپیکا*

آمینواسید	سیستئین ۳۰	سیستئین ۷۵	ترئونین ۴۸	هیستیدین ۷۴
سیستئین ۳۰	-	۴/۵۹۷	۴/۶۲۱	۵/۹۳۵
سیستئین ۷۵	۴/۵۹۷	-	۶/۹۳۶	۳/۷۷۳
ترئونین ۴۸	۴/۶۲۱	۶/۹۳۶	-	۸/۹۷۵
هیستیدین ۷۴	۵/۹۳۵	۳/۷۷۳	۸/۹۷۵	-
میانگین	۵/۸			

جدول ۳) اندازه‌گیری فواصل ژئومتریک بین کربن‌های آلفای آمینواسیدهای اطراف یون آنتیموان در آرسنات/ آنتیموان ردوکتاز ایزوله‌های حساس به گلوکانتیم *لیشمانیا تروپیکا*

آمینواسید	سیستئین ۳۰	سیستئین ۷۵	ترئونین ۴۸	هیستیدین ۷۴
سیستئین ۳۰	-	۴/۳۳۴	۵/۴۲۶	۵/۷۶۹
سیستئین ۷۵	۴/۳۳۴	-	۷/۴۱۴	۳/۷۷۲
ترئونین ۴۸	۴/۴۲۶	۷/۴۱۴	-	۹/۲۳۹
هیستیدین ۷۴	۵/۷۶۹	۳/۷۷۲	۹/۲۳۹	-
میانگین	۵/۹۹			

تعیین شعاع ژیراسیون در اطراف جایگاه فعال شبیه‌سازی‌شده:
تغییرات شعاع ژیراسیون در اطراف جایگاه شبیه‌سازی‌شده یون آنتیموان برای ایزوله‌های مقاوم و حساس در هر دو پروتئین تریپانوتیون‌ردوکتاز و آرسنات/ آنتیموان‌ردوکتاز محاسبه شد. بدین‌منظور کلیه رزیجوهای موجود در ٦آنگستروومی اطراف یون آنتیموان در نظر گرفته شدند. تغییرات شعاع ژیراسیون در جایگاه شبیه‌سازی‌شده یون آنتیموان آرسنات/ آنتیموان‌ردوکتاز برای ایزوله مقاوم و حساس تقریباً بدون تغییر طی زمان شبیه‌سازی به دست آمد (نمودار ۱).



نمودار ۱) تغییرات شعاع ژیراسیون در جایگاه شبیه‌سازی‌شده یون آنتیموآن آرسنات/ آنتیموان‌ردوکتاز برای دو ایزوله حساس و مقاوم به گلوکانتیم؛ خط قرمز مربوط به ایزوله حساس و خط آبی مربوط به ایزوله مقاوم به گلوکانتیم است.

بحث

تاکنون مطالعات متعددی در رابطه با کشف ژن‌های دخیل در ایجاد مقاومت نسبت به داروهای مختلف از جمله مقاومت لیشمانیا نسبت به ترکیبات آنتیموان انجام شده است. با شناسایی این ژن‌ها می‌توان دریچه‌ای برای شناسایی تارگت‌های جدید دارویی و داروهای جدید یا تغییریافته و در نتیجه شناسایی سازوکارهای مقاومت دارویی یا مکانیزم‌های عمل دارویی را گشود. در یک مطالعه آنزیم تریپانوتیون‌ردوکتاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز توسط آنتیموانال‌های سه‌ظرفیتی مهار شده و درنتیجه باعث افزایش استرس‌اکسیداتیو که در صورت جهش در ساختارهای خود می‌توانند به‌عنوان عوامل بالقوه برای مقاومت دارویی در نظر گرفته شوند[8]. در مطالعه *تورس* و همکاران با هدف ارزیابی ژن‌های مقاوم به درمان به‌عنوان یک مارکر تشخیصی، برای لیشمانیازیس از زیر جنس ویانا (*لیشمانیا برازیلینسیس* و *لیشمانیا گویاننسیس*) مشاهده شد که پلی‌مورفیسم در ژن‌های *AQP1*، *MRPA* و *TRYR* به‌جزء *HSP70* ارتباط معنی‌داری با پاسخ بیماران به درمان یا شکست‌درمانی نداشته و درنتیجه این ژن‌ها نمی‌توانند به‌عنوان مارکر تشخیصی برای بیماری در حالت کلینیکال مورد استفاده قرار بگیرند[9]. برای مکانیزم عمل داروی آنتیمونال فرض شده است که دارو به‌صورت ترکیب پنج‌ظرفیتی غیرفعال وارد بدن می‌شود[10] و در اثر واکنش با تیول‌ها به‌عنوان مکانیزم غیرآنزیمی درون ماکروفاژ میزبان یا در خود انگل کاهش می‌یابد[11, 12]. گلوتاتیون می‌تواند تحت شرایط اسیدی بدون دخالت آنزیم در دمای ۳۷°C سبب احیا sbV به sbIII شود که این امر یا در سیتوزول ماکروفاژ میزبان یا سیتوزول خود انگل می‌تواند انجام شود. در مطالعه *دنتون* و همکاران مشخص شد که بین آنزیم TDR1 که یک رودکتاز وابسته به تیول است و موجب کاهش داوری پنج‌ظرفیتی به سه‌ظرفیتی می‌شود و حساسیت به داروی آنتیمونال ارتباط مستقیم وجود دارد[13] مکانیزم‌های آنزیمی TDR1 و ACR2 آنتیموان را از فرم پنج‌ظرفیتی کاهش داده و به فرم Sb(III) تبدیل می‌کنند[6, 13]. نشان داده شده است که ژن *ACR2* مربوط به آنزیم آرسنات/ آنتیموان‌ردوکتاز *لیشمانیای ماژور* که به‌عنوان آنزیم کاهش‌دهنده داروی پنج‌ظرفیتی آنتیمونال و آرسنات است در وکتورهای بیانی *اشریشیا کلی* فاقد arsC و در گونه ساکارومایسس *سرویزیه* که فاقد ژن *ScACR2* قرار داده شد و به انگل *لیشمانیا اینفانتوم* ترانسفکت شد که با بیان این ژن و بررسی آن حساسیت انگل در برابر داروی پنتوستام افزایش یافته است[6]. در برخی از مطالعات نشان داده شده است که ژن‌های کدکننده گلوتاتیون سیستئین سینتتاز در موارد *لیشمانیای ترانتوله* مقاوم به درمان آرسنیت افزایش بیان داشته‌اند که این خود بیانگر نقش تیول‌ها در ایجاد مقاومت دارویی است[14]. داروی گلوکانتیم در موارد فعال یعنی سه‌ظرفیتی تمایل بالایی به واکنش با گروه‌های تیول دارد که در سطوح پروتئین‌ها و آنزیم‌ها به شکل آمینواسید سیستئین به شکل TSH2 یا GSH دیده می‌شود که موجب تشکیل یک‌سری کمپلکس‌های پایدار T-Sb و Sb(GS)3 می‌شود که در مطالعات مختلف نشان داده‌اند واکنش با گروه‌های حاوی تیول سبب خروج تیول‌ها به خارج از سلول یا جلوگیری از ورود آنها به داخل سلول می‌شوند که در موارد مقاومت دارویی نقش دارند. در موارد ایجاد سویه‌های مقاوم به گلوکانتیم افزایش گلوتاتیون همرا با عوامل دیگر مانند تریپانوتیون، تیول، سیستئین و اسپرمیدین درون انگل مشاهده شده است. از طرفی انتشار کونژوگه‌های تیول-فلز از طریق پمپ‌ها به خارج از انگل زیاد شده و ورود آنها به درون انگل کم می‌شود[8, 10, 15-20]. در هر شکل اگر دارو وارد سلول شود می‌تواند با ترکیبات دومین زینک‌فینگر پروتئین‌ها واکنش داده که موجب خروج یون روی و القای مرگ آپوپتیک توسط دارو می‌شود یا توسط آنزیم کاهش‌دهنده تریپانوتیون ردوکتاز از تشکیل بیشتر کمپلکس‌های T(SH)2 جلوگیری می‌کند[10, 15]. در این بررسی با استفاده از روش‌های ذکرشده نشان داده شد که جهش در سویه‌های مقاوم به گلوکانتیم به‌صورت ساختاری رخ داده ولی این تغییر ساختار به‌صورت معنی‌دار در جایگاه فعال آنتیموان تاثیر نداشته و

سبب بازشدن اندازه جایگاه فعال به مقدار محسوس نشده است تا بتواند به احتمال در ارتباط با یون آنتیموان در جایگاه فعال تاثیری داشته باشد.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر مشکل‌بودن تشخیص صحیح موارد بالینی مقاومت دارویی است و پیشنهاد می‌شود این تغییرات، در مدل حیوان آزمایشگاهی بررسی شود.

نتیجه‌گیری

مقاومت به گلوکانتیم در برخی از جمعیت‌های گونه‌های لیشمانیا در ایران در اثر جهش‌های ساختاری در ژن *ACR2* نیست.

تشکر و قدردانی: از اقایان دکتر *مهدی محبعلی*، دکتر *مهدی اعظمی*، دکتر *ایرج شریفی*، دکتر *سیدحسین حجازی*، دکتر *بهروز عزت‌پور*، دکتر *نائب علی‌احمدی* و خانم‌ها، دکتر *آنیتا محمدی‌ها*، دکتر *الهام کاظمی* و دکتر *فریبا برنجی* بابت ارسال نمونه‌های مقاوم و حساس *لیشمانیا تروپیکا* از مناطق مختلف ایران و سرکار خانم *آناهیتا خمری* دانشجوی دکتری بیوفیزیک و جناب آقای *احسان رنجبر* دانشجوی دکتری روان‌شناسی بابت مساعدت‌های ارزشمند ایشان در جهت بهبود کمی و کیفی این مقاله صمیمانه تشکر می‌نمایم.

تاییدیه‌اخلاقی: این تحقیق دارای شناسه IR.TMU.REC.1394.27 کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه تربیت مدرس در تاریخ ۱۳۹٤.۰۲.۰۸ بوده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فاطمه فزونگری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰%)؛ عبدالحسین دلیمی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰%)؛ سیدشهریار عرب (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰%)؛ مهرداد بهمنش (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰%)؛

منابع مالی: این تحقیق بخشی از رساله دکترای انگل‌شناسی است و کلیه هزینه‌های آن توسط دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است.

منابع

1- Nadim A, Javadian E, Mohebali M, Momeni AZ. Leishmania parasites and Leishmaniases. Tehran: Tehran University Press; 2009. p. 288. [Persian]

2- Croft SL. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. Trop Med Int Health. 2001;6(11):899-905.

3- Padron-Nieves M, Ponte-Sucre A, Diaz E. Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments. Heidelberg: Springer-Verlag Wien; 2012. p. 462.

4- Bisacchi D, Zhou Y, Rosen BP, Mukhopadhyay R, Bordo D. Crystallization and preliminary crystallographic characterization of LmACR2, an arsenate/antimonate reductase from Leishmania major. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2006;62(10):976-9.

5- Mukhopadhyay R, Bisacchi D, Zhou Y, Armirotti A, Bordo D. Structural characterization of the As/Sb reductase LmACR2 from Leishmania major. J Mol Biol. 2009;386(5):1229-39.

6- Zhou Y, Messier N, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. Leishmania major LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. J Biol Chem. 2004;279(36):37445-51.

7- Blundell TL, Sibanda BL, Montalvao RW, Brewerton S, Chelliah V, Worth CL, Harmer NJ, Davies O, Burke D. Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006;361(1467):413-23.

8- Cunningham ML, Zvelebil MJ, Fairlamb AH. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. Eur J Biochem. 1994;221(1):285-95.

9- Torres DC, Ribeiro-Alves M, Romero GA, Davila AM, Cupolillo E. Assessment of drug resistance related genes as candidate markers for treatment outcome prediction of cutaneous leishmaniasis in Brazil. Acta Trop. 2013;126(2):132-41.

10- Frezard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. Molecules. 2009;14(7):2317-36.

11- Saha P, Mukhopadhyay D, Chatterjee M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. Int Immunopharmacol. 2011;11(11):1668-79.

12- Wyllie S, Fairlamb AH. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. Biochem Pharmacol. 2006;71(3):257-67.

13- Denton H, McGregor JC, Coombs GH. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. Biochem J. 2004;381(Pt 2):405-12.

14- Grondin K, Haimeur A, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Ouellette M. Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene gsh1 and of the ABC transporter gene pgpA in arsenite-resistant Leishmania tarentolae. EMBO J. 1997;16(11):3057-65.

15- Baiocco P, Colotti G, Franceschini S, Ilari A. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. J Med Chem. 2009;52(8):2603-12.

16- Ferreira Cdos S, Martins PS, Demicheli C, Brochu C, Ouellette M, Frezard F. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): A comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. Biometals. 2003;16(3):441-6.

17- Frezard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MA. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(3):913-6.

18- Vickers TJ, Fairlamb AH. Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor 1B. J Biol Chem. 2004;279(26):27246-56.

19- Yan S, Li F, Ding K, Sun H. Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione. J Biol Inorg Chem. 2003;8(6):689-97.

20- Yan S, Wong IL, Chow LMC, Sun H. Rapid reduction of pentavalent antimony by trypanothione: potential relevance to antimonial activation. Chem Commun (Camb). 2003;(2):266-7.