

Investigation of the impact of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains on inflammatory pathways and cell death in A549 lung epithelial cells

Rouhollah Abdolhamidi¹, Setareh Haghighat¹, Arfa Moshiri², Abolfazl Fateh², Seyed Davar Siadat²

¹Department of Microbiology, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran; Microbiology Research Center (MRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Background: Tuberculosis has long been a significant challenge to global healthcare. The host-pathogen interaction with *Mycobacterium tuberculosis* plays a critical role in the progression of the infection, influencing immune responses and regulating cell death processes such as apoptosis and necrosis. However, the relationship between these processes and inflammation remains unclear. This study examines the expression levels of genes related to apoptosis, necrosis, and inflammation in A549 lung epithelial cells infected with drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains.

Materials and methods: Strains of *Mycobacterium tuberculosis* with varying antibiotic resistance (sensitive, rifampin-resistant, multidrug-resistant, and extensively drug-resistant) were obtained from the Pasteur Institute of Iran. A549 cells were cultured and infected. Genes linked to the studied pathways were selected using bioinformatics, and their expression levels were assessed using RT-PCR.

Results: All strains showed increased expression of anti-apoptotic genes (*BCL2*, *RBI*), chemokines (*IL8*, *MCPI*), and pro-inflammatory cytokines (*TNF- α* , *IFN- γ*), alongside reduced expression of anti-inflammatory genes (*IL10*) and pro-apoptotic genes (*BAD*, *BAX*) post-infection. The Beijing genotype (sensitive strain) induced higher inflammatory and apoptotic gene expression than the New-1 genotype (resistant strains). No significant changes were observed in necrosis-related genes (*FADD*, *RIPK1*).

Conclusion: Variations in apoptosis and inflammation-related gene expression appear to stem more from genotypic differences than drug resistance. This underscores the pivotal role of the *Mycobacterium tuberculosis* genotype in modulating host immune responses during infection.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Drug resistance, Inflammation, Apoptosis, Necrosis.

Cited as: Abdolhamidi R, Haghighat S, Moshiri A, Fateh A, Siadat SD. Investigation of the impact of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains on inflammatory pathways and cell death in A549 lung epithelial cells. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2025; 35(4): 436-449.

Correspondence to: Seyed Davar Siadat

Tel: +98 9121442137

E-mail: d.siadat@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-6892-5603

Received: 16 Nov 2024; **Accepted:** 31 Dec 2024

بررسی تاثیر سويه‌های حساس و مقاوم مايكوباكترىوم توبركلوزيس بر مسيره‌های التهابی و مرگ سلولی در رده سلولی A549 اپیتلیال ریه

روح اله عبدالحمیدی^۱، ستاره حقیقت^۱، ارفع مشیری^۲، ابوالفضل فاتح^۲، سید داور سیادت^۲

^۱ گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۲ گروه تحقیقات سل و ریوی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران؛ مرکز تحقیقات میکروبیولوژی (MRC)، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سل یکی از چالش‌های مهم سیستم بهداشتی است و تعامل میزبان با باکتری مايكوباكترىوم توبركلوزيس در پیشرفت عفونت نقش کلیدی دارد. این عفونت از طریق تأثیر بر فرایندهای آپوپتوز، نکروز و التهاب، به رشد درون سلولی باکتری کمک می‌کند. اما ارتباط دقیق میان این مسیرها به‌طور کامل شناخته نشده است.

روش بررسی: سويه‌های حساس و مقاوم مايكوباكترىوم توبركلوزيس از انستیتو پاستور ایران جمع‌آوری شده و رده سلولی A549 آلوده شدند. بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای آپوپتوز، نکروز و التهاب با استفاده از RT-PCR بررسی شد.

یافته‌ها: در سويه‌های حساس و مقاوم، افزایش بیان ژن‌های ضد آپوپتوزی (*BCL2*, *RBI*)، کموکاین‌ها (*IL8*, *MCP1*) و سیتوکین‌های پیش‌التهابی (*TNF-α*، *IFN-γ*) مشاهده شد، درحالی‌که بیان ژن‌های ضدالتهابی (*IL10*) و پیش‌آپوپتوزی (*BAX*, *BAD*) کاهش یافت. همچنین، ژنوتیپ *Beijing* (سويه حساس) نسبت به ژنوتیپ *New-1* (سويه‌های مقاوم) بیان بیشتری در ژن‌های التهابی و آپوپتوزی داشت. هیچ تغییر معناداری در بیان ژن‌های نکروز (*FADD* و *RIPK1*) در هیچ‌کدام از سويه‌ها مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: تفاوت در بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و التهاب بیشتر به ژنوتیپ‌ها وابسته بود تا مقاومت دارویی. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ژنوتیپ باکتری نقش مهمی در شدت پاسخ التهابی و آپوپتوز در عفونت سل ایفا می‌کند.

واژگان کلیدی: مايكوباكترىوم توبركلوزيس، مقاومت دارویی، التهاب، آپوپتوز، نکروز.

مقدمه

وجود تلاش‌های فراوان برای کنترل بیماری سل، اکنون سويه‌های مقاوم به دارو به تهدیدی جهانی برای سلامت انسان تبدیل شده‌اند (۳). در سطح جهانی در سال ۲۰۲۳، تعداد ۱۷۵،۹۲۳ نفر به سل مقاوم به چند دارو یا مقاوم به ریفامپین (MDR/RR-TB) تشخیص داده شده و تحت درمان قرار گرفتند؛ این تعداد معادل ۴۴٪ از ۴۰۰،۰۰۰ نفری (دامنه عدم قطعیت ۹۵٪: ۳۶۰،۰۰۰-۴۴۰،۰۰۰) است که برآورد می‌شود در سال ۲۰۲۳ به MDR/RR-TB مبتلا شده‌اند (۲). ژنوتیپ‌های *Beijing* و *Haarlem* در ایزوله‌های MDR-TB (سل مقاوم به چند دارو) در خاورمیانه شایع هستند که ممکن است به مشکلات بهداشتی، افزایش هزینه‌ها و نرخ بالاتر مرگ‌ومیر منجر شود (۴).

بیماری مهلک سل از دیرباز به عنوان یکی از مخرب‌ترین بیماری‌ها در تاریخ بشر شناخته شده است (۱). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۲۴، تعداد کل موارد در سال ۲۰۲۳ برابر با ۱۰/۸ میلیون (دامنه عدم قطعیت ۹۵٪: ۱۰/۱-۱۱/۷ میلیون) بود، که اندکی افزایش نسبت به ۱۰/۷ میلیون در سال ۲۰۲۲ دارد، هرچند هنوز بالاتر از ۱۰/۴ میلیون در سال ۲۰۲۱ و ۱۰/۱ میلیون در سال ۲۰۲۰ است (۲). با

آدرس نویسنده مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی (MRC)، گروه تحقیقات سل و ریوی، سید داور سیادت (email: d.siadat@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-6892-5603

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۸/۲۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۱۱

کنترل عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس همچنان به طور کامل قابل توضیح نیست و مکانیسم‌های پیشرفت بیماری نیز به خوبی روشن نشده‌اند. از این رو، شناسایی راهکارهای نوین برای بهبود روش‌های کنترل سل ضروری است. در حقیقت، دستیابی به اطلاعات جامع درباره سل، به‌ویژه در زمینه تعاملات بین میزبان و پاتوژن، برای کنترل این بیماری و تحقق اهداف برنامه جهانی «پایان سل» اهمیت حیاتی دارد (۵). این بیماری هم‌چنان به عنوان یکی از بزرگ‌ترین مشکلات سیستم بهداشت و درمان بسیاری از کشورهای بخصوص کشورهای در حال توسعه مثل ایران محسوب می‌شود (۶). تعداد کمی از پاتوژن‌ها توانایی تطبیق و بقا در محیط درون سلولی میزبان را دارند و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یکی از آن‌هاست (۷). شیوع سل در ایران تقریباً ۱۱ (۱۴-۸/۵) مورد از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر گزارش شده است (۲). میزان بروز سل در استان‌های مختلف ایران متفاوت است و بر اساس گزارش وزارت بهداشت و درمان، بالاترین میزان بروز سل در ایران مربوط به استان گلستان با شیوع ۳۵/۸ مورد در ۱۰۰۰۰۰ نفر از جمعیت است. پس از آن، به ترتیب استان‌های سیستان و بلوچستان (۳۴/۱۳) مورد در ۱۰۰۰۰۰ نفر، گیلان (۱۷/۹۸) مورد در ۱۰۰۰۰۰ نفر، خوزستان (۱۷/۷۹) مورد در ۱۰۰۰۰۰ نفر و خراسان رضوی (۱۵/۷) مورد در ۱۰۰۰۰۰ نفر در رده‌های بعدی از نظر میزان بروز سل قرار دارند (۸).

عفونت سل از طریق مسیرهای سیگنالینگ درون سلولی و با تغییر در پاسخ‌های سیستم ایمنی و کنترل مسیرهای مرگ سلولی، به‌ویژه مرگ برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوز و مرگ برنامه‌ریزی نشده یا نکروز، رشد درون سلولی خود را تسهیل می‌کند (۹، ۱۰). اکثر فرآیندهای فیزیولوژیکی سیستم ایمنی میزبان، تحت تأثیر مسیرهای مرگ سلولی قرار دارند (۱۱). در سیستم ایمنی، آپوپتوز نقش اساسی در حفظ هموستازی سلولی ایفا می‌کند (۱۲). در آپوپتوز، سلول از لحاظ زمانی اسکلت سلولی خود را فرو می‌ریزد، پوشش هسته را از هم می‌پاشد، DNA را تکه تکه می‌کند و بقایای سلولی را بدون دستکاری محتوای سلولی در "وزیکول‌های آپوپتوتیک" کوچک قرار می‌دهد (۱۳). دو مسیر اصلی آپوپتوز شامل مسیر ذاتی Bcl-2 و مسیر وابسته به کاسپاز ۸ و ۱۰ است (۱۴، ۱۵). اکنون مشخص شده که نکروز نیز که زمانی مرگ سلولی منفعل و بدون تنظیم تلقی می‌شد، می‌تواند مانند آپوپتوز توسط فرایندی ژنتیکی و کنترل شده رخ دهد و با از دست رفتن یکپارچگی غشا و تورم سلول و اندامک‌ها همراه باشد (۱۶-۱۸).

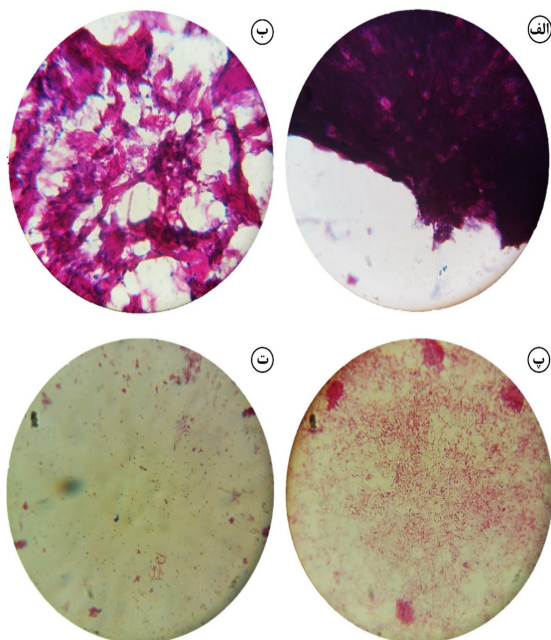
مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در فضای آلوئولی ریه به دلیل برهمکنش با سلول‌های اپیتلیالی، فنوتیپ تکثیری و تهاجمی بالایی پیدا می‌کند و به عنوان بخشی از راهبرد بقای خود در میزبان، مسیرهای مختلف مرگ سلولی و التهابی را تحریک می‌کند (۱۹). گاهی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به جای ایجاد التهاب حاد، وارد مرحله نهفتگی می‌شود تا از نابودی توسط سیستم ایمنی جلوگیری کند. در این مرحله، با استفاده از پروتئین‌های اثربخش، محیطی پایدار ایجاد کرده و پاسخ‌های ایمنی میزبان را تعدیل می‌کند. این باکتری می‌تواند برای دهه‌ها در حالت نهفتگی باقی بماند، بدون تشدید علائم، اما در عین حال باعث اختلالات متابولیکی و عدم تعادل در سیستم ایمنی فرد مبتلا می‌شود (۷). همه سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به طور یکسان مسیرهای آپوپتوز و التهابی را القا نمی‌کنند. شواهد نشان می‌دهند که سویه‌های تضعیف شده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (مانند H37Ra) سطح بالاتری از آپوپتوز را نسبت به عفونت‌های سویه‌های بیماری‌زا (مانند H37Rv) القا می‌کنند. به نظر می‌رسد سویه‌های بیماری‌زا از این راهبرد برای بقا درون سلولی و سرکوب سیستم ایمنی استفاده می‌کنند (۲۰). سویه‌های تضعیف شده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس معمولاً نسبت به سویه‌های بیماری‌زا، فاکتورهای التهابی بیشتری ترشح می‌کنند و باعث آپوپتوز بالاتری می‌شوند (۲۱، ۲۲). در واقع، تغییر در مسیر آپوپتوز و عوامل التهابی برای دفاع در برابر عفونت ناشی از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ضروری است و در سویه‌های با بیماری‌زایی کمتر، بیان این عوامل بیشتر است. با این حال، این پرسش که آیا سویه‌های مقاوم‌تر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارای بیماری‌زایی بیشتری هستند یا نه، همچنان بدون پاسخ باقی مانده است (۲۳، ۲۴). در بسیاری از باکتری‌ها با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بیماری‌زایی نیز افزایش می‌یابد، اما این موضوع در مورد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس صدق نمی‌کند (۲۳، ۲۵). سویه‌های مختلف مقاوم به داروی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با تنظیم بیان ژن‌های پرو آپوپتوتیک، ضد آپوپتوزی، نکروز، سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها، باعث افزایش شدت عفونت می‌شوند. این تنظیمات منجر به افزایش بیماری‌زایی و تضعیف پاسخ‌های سیستم ایمنی میزبان شده و به باکتری در ایجاد عفونت پایدار کمک می‌کند (۲۶).

برای پیشگیری، درمان و کنترل کارآمدتر عفونت سل، بررسی ارتباطات میان ژن‌های مسیرهای مرگ سلولی و التهابی در برهمکنش بین میزبان و سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ضروری است. با این حال، همچنان رابطه دقیق بین آپوپتوز،

انکوبه شدند تا باکتری‌ها به فاز لگاریتمی رشد برسند (۳۱). تایید فاز لگاریتمی با خواندن غلظت در OD با طول موج ۲۶۰ با استفاده از نانودراپ (Thermo scientific, USA) صورت گرفت و تایید عدم آلودگی محیط‌ها هم به صورت ماکروسکوپی با بررسی شفافیت محیط و به صورت میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی زیل نلسون که پیشتر توضیح داده شد، انجام گرفت.

آماده سازی سویه‌ها برای عفونی کردن رده سلولی A549

با توجه به تمایل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس برای تجمع و تشکیل کلامپ، برای عفونی کردن سلول‌ها بر اساس Multiplicity of infection (MOI) لازم است، این ارگانسیم‌ها تا حد ممکن به صورت تک سلولی درآورده شدند. بدین منظور، با استفاده از توپین ۸۰ و شستشو با بافر فسفات سالین (PBS) کلامپ‌های هر یک از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به حداقل رسیدند. سپس، رقت برابر نیم مک فارلند با استفاده از PBS برای سویه‌های حساس و مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تهیه شد. با رنگ‌آمیزی زیل نلسون کاهش کلامپ‌های سویه‌های مورد مطالعه تایید شد تا عفونی کردن رده سلولی A549 توسط هر یک از سویه‌ها انجام گیرد (شکل ۱).



شکل ۱. نمای میکروسکوپی از روند کاهش کلامپ در سویه‌های مورد مطالعه با استفاده از توپین ۸۰؛ الف) نمای میکروسکوپی سلول‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بدون استفاده از توپین ۸۰، ب) نمای میکروسکوپی سلول‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پس از افزودن توپین ۸۰ و قبل از تکان دادن شدید با شیکر، پ) نمای میکروسکوپی سلول‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پس از افزودن توپین ۸۰ و پس از تکان دادن شدید، ت) نمای میکروسکوپی سلول‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پس از افزودن توپین ۸۰ و تهیه غلظت نیم مک‌فارلند.

نکروز و التهاب در عفونت سل مهیم است. در این مطالعه، رده سلولی A549 که با سویه‌های مختلف مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (شامل H37Rv، حساس، مقاوم به ریفامپین، MDR و XDR) آلوده شده بودند، برای ارزیابی سطح بیان ژن‌های آپوپتوز، نکروز، سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. این داده‌ها می‌توانند به درک بهتر شدت عفونت سل و میزان حساسیت میزبان کمک کنند.

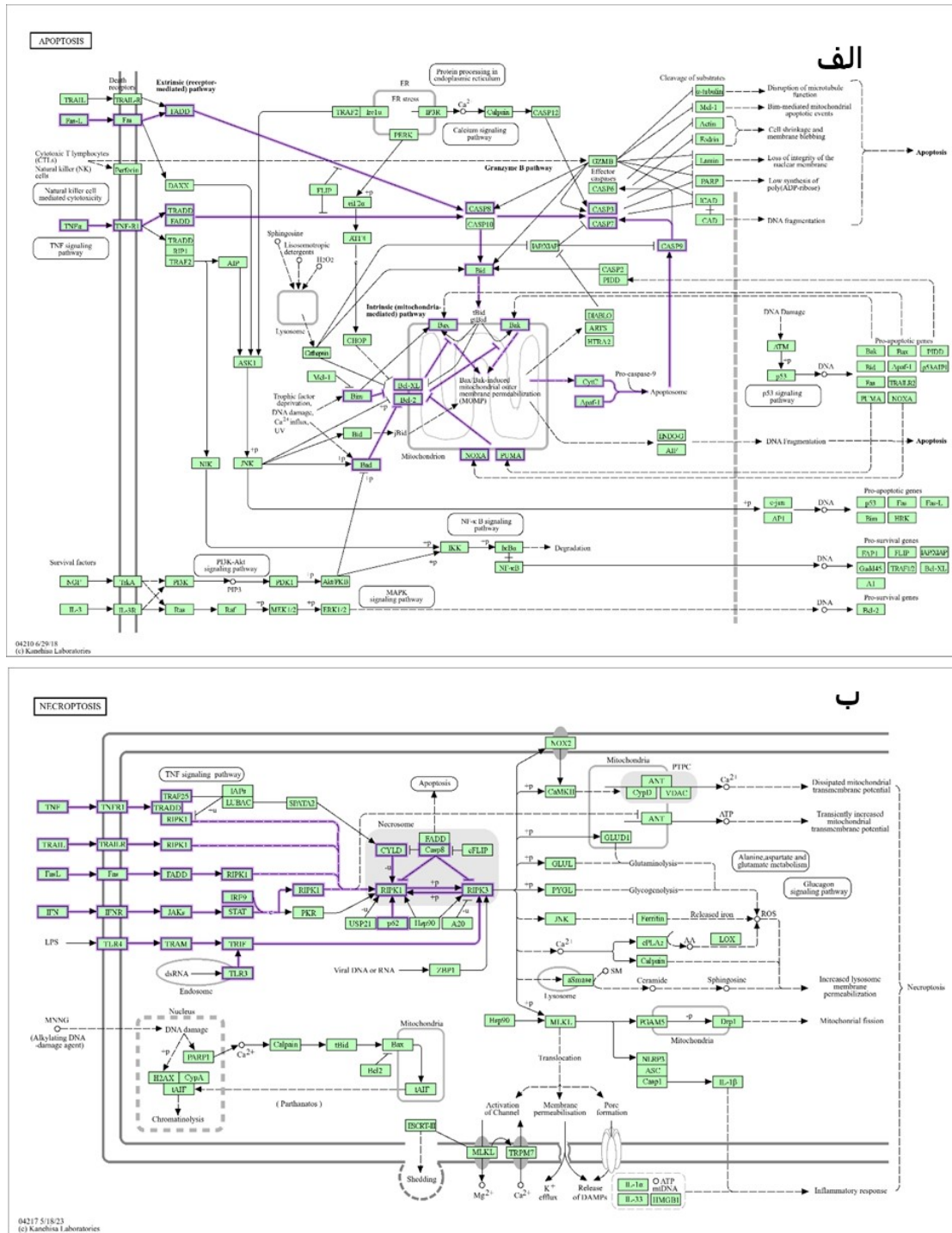
مواد و روشها

کشت، فعال سازی و تست حساسیت آنتی بیوتیکی

در این پژوهش، از سویه‌های حساس با ژنوتایپ Beijing و سویه‌های مقاوم (RR-TB و XDR-TB و MDR-TB) با ژنوتایپ New-1 استفاده شد. سویه H37Rv (ATCC 27249) به عنوان مرجع انتخاب گردید. تمامی سویه‌ها از بانک بخش سل و تحقیقات ریوی انستیتو پاستور ایران تأمین شدند. از هر یک از سویه‌ها اسمیر تهیه شد و با رنگ‌آمیزی زیل نلسون و مشاهده نمای طنابی شکل از لحاظ میکروسکوپی تایید شدند.

تست حساسیت دارویی با استفاده از روش تناسی بر روی محیط Löwenstein-Jensen (LJ) انجام شد تا الگوی مقاومت سویه‌ها تایید شود (۲۷). تست حساسیت دارویی با استفاده از مقادیر استاندارد برای تأیید فنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک‌های خط اول و دوم به این ترتیب انجام شد: ریفامپیسین (۴۰ $\mu\text{g/mL}$)، ایزونیاژید (۰/۲ $\mu\text{g/mL}$)، استرپتومایسین (۴ $\mu\text{g/mL}$)، اتامبوتول (۲ $\mu\text{g/mL}$)، کانامایسین (۴۰ $\mu\text{g/mL}$)، آمیکاسین (۳۰ $\mu\text{g/mL}$)، افلوکساساسین (۴ $\mu\text{g/mL}$) و کاپرئومایسین (۴۰ $\mu\text{g/mL}$) (۲۸). آزمایش‌ها مطابق با دستورالعمل‌های مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC) ایالات متحده آمریکا انجام شدند (۲۹).

ژنوتیپ تمامی سویه‌ها پیش‌تر از طریق توالی‌یابی کل ژنوم مورد بررسی و تایید قرار گرفته بود (۳۰). سویه حساس از ژنوتایپ Beijing و سویه‌های مقاوم از ژنوتایپ New-1 انتخاب گردید. برای فعال سازی هر یک از سویه‌ها و انجام ادامه تست‌ها، کشت هر یک از سویه‌های تایید شده از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط کشت مایع میدل بروک 7H9 (Sigma Aldrich)، سنت لوتیس، میزوری) حاوی ۰/۰۵٪ توپین ۸۰، ۱۰٪ (v/v) اسید اولئیک، آلومین، دکستروز و کاتالاز (Becton Dickinson، آکسفورد، بریتانیا) انجام گرفت تا هر یک از سویه‌ها در فاز لگاریتمی برای انجام تست‌ها مورد استفاده قرار گیرند. تمامی محیط‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ تا ۲۱ روز



شکل ۲. الف) شبکه مسیر مرگ سلولی آپوپتوز و ژن‌های دخیل در این مکانیسم. ب) شبکه مسیر مرگ سلولی نکروپتوز و ژن‌های دخیل در این مکانیسم

شد. این رده سلولی در محیط کشت Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) که با استریتومايسين، پنی‌سیلین و ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS؛ Gibco، انگلستان) غنی شده بود، در پلیت‌های شش‌خانه‌ای (Sofra، ژجیانگ، چین) کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO₂

کشت رده سلولی A549 و عفونی کردن با سویه‌های حساس و مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس برای انجام کشت سلولی از استوک رده سلولی اپیتلیال ریه A549 (ATCC CCL-185) اهدایی انستیتو پاستور ایران استفاده

انسان از دیتابیس KEGG استخراج شده و با استفاده از پلاگین KeggParser در نرم‌افزار Cytoscape وارد شد. سپس، با اپلیکیشن Centiscape2.2 شاخص‌های مهم شبکه ژنی، نظیر *degree*، *betweenness* و *closeness* تحلیل گردید تا ژن‌های کلیدی هر مسیر مشخص شوند. ژن‌های کلیدی در پایگاه داده String وارد شده و شبکه‌ها ترسیم و تحلیل شدند. در ادامه، با استفاده از Reactome، مسیرهای سلولی مربوطه بررسی شده و ژن‌های منتخب تایید شدند. در نهایت، تمام شبکه‌ها در String رسم و ارتباطات بین ژن‌ها ارزیابی شدند تا ژن‌های اختصاصی و مشترک به دست آیند (شکل‌های ۲ و ۳).

استخراج RNA و سنتز cDNA:

استخراج RNA از سلول‌های عفونی شده با سویه‌های فعال مایکوباکتریوم توپرکلوزیس مورد مطالعه، مطابق پروتکل روش استخراج RNA با ترایزول (شرکت Invitrogen، گرند آیلند، نیویورک، آمریکا) انجام شد. برای تعیین غلظت و کیفیت RNA از اسپکتروفوتومتر نانودراپ (Nanodrop ND-1000، Nanodrop Technologies) استفاده گردید. سنتز cDNA نیز با استفاده از کیت پارس طوس (Easy cDNA Synthesis kit, Parstous) انجام گرفت.

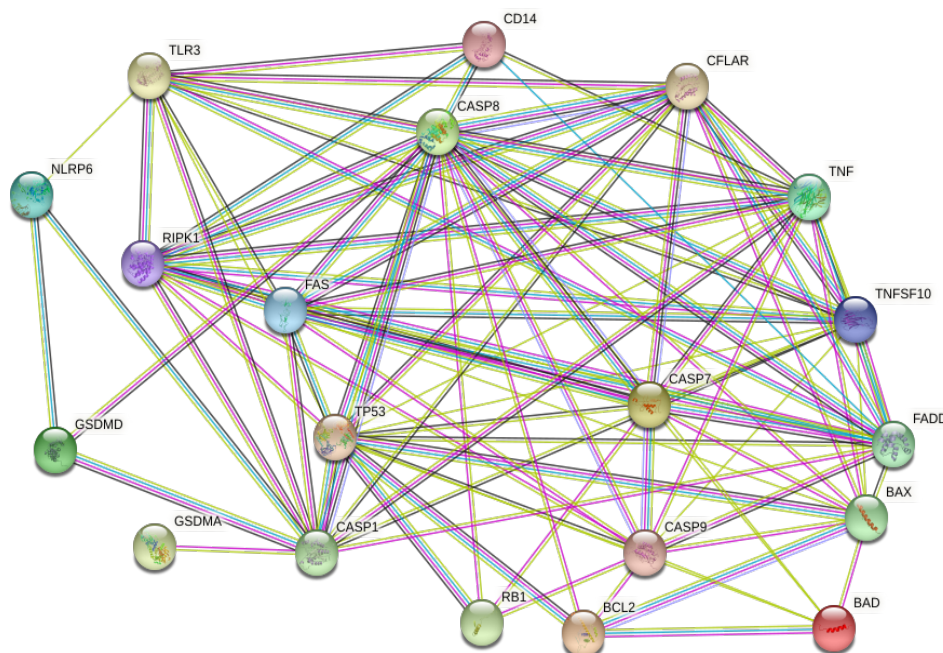
بررسی میزان بیان ژن‌ها با روش qRT-PCR:

برای بررسی میزان بیان ژن‌های نکروز (*FADD* و *RIPK1*)، پیش‌آپوپتوزی (*BAD* و *BAX*)، ضد‌آپوپتوزی (*BCL2* و *RBI*)،

انکوبه گردید. پیش از استفاده در آزمایش‌ها، سلول‌ها با محیط تازه شسته شده، در پلیت‌های شش‌خانه‌ای ریخته شدند و اجازه داده شد تا به ۷۰-۶۰ درصد تراکم برسند. پس از آلوده‌سازی با هر یک از سویه‌های مورد مطالعه (حساس، RR، MDR، XDR و H37Rv) با نسبت باکتری به سلول 1:1 (MOI) در سه تکرار، سلول‌های A549 به مدت دو ساعت انکوبه شدند (۳۲). سلول‌های A549 که به عفونت آلوده نشده بودند، به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. پس از این مدت، برای حذف باکتری‌های خارج سلولی، سلول‌های آلوده به‌طور کامل با محیط DMEM شست‌وشو داده شدند. سپس، برای نگهداری سلول‌های A549 عفونی شده، DMEM حاوی ۱٪ FBS در شرایط ۵٪ CO₂ به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت استفاده شد. برای ارزیابی زنده بودن سلول‌های اپیتلیالی آلوده به سویه‌های مایکوباکتریوم توپرکلوزیس، از تست رنگ‌آمیزی تریپان بلو (Sigma Aldrich، آلمان) بر اساس دستورالعمل‌های سازنده استفاده شد (۳۳). در نهایت، برای تأیید ورود باکتری به داخل سلول‌ها، از روش رنگ‌آمیزی اورامین استفاده شد.

تحلیل بیوانفورماتیک برای انتخاب ژن‌های مسیرهای مرگ سلولی و التهابی در سلول‌های اپیتلیالی آلوده به مایکوباکتریوم توپرکلوزیس

برای انتخاب ژن‌های کلیدی در مسیرهای مرگ سلولی و التهابی، ابتدا مسیرهای موردنظر و عفونت مایکوباکتریوم توپرکلوزیس در



شکل ۳. شبکه و هاب‌های مهم استخراج شده دخیل در مسیرهای مرگ سلولی

GraphPad Prism 10 آنالیز شدند. نسبت تغییر بیان ژن با مقایسه بیان نسبی ژن مورد نظر بین گروه کنترل و گروه تست محاسبه شد (۳۴). از لحاظ آماری، داده‌ها با تست ناپارامتری من‌ویتنی بررسی شد و معنی‌داری داده‌های آماری با $p < 0.05$ مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه آماری برای تعیین تفاوت بین گروه‌های مختلف با استفاده از آنالیز واریانس ناپارامتری Kruskal-Wallis تعیین شدند.

یافته‌ها

تغییر بیان ژن‌های مسیر التهابی القا شده توسط توسط سوبه های حساس و مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

مسیرهای التهابی نقش مهمی در کنترل یا شدت بیماری سل دارند. به همین دلیل، ژن‌های مختلفی از کموکاین‌ها و سایتوکاین‌ها در تنظیم این مسیرهای التهابی نقش دارند؛ در این مطالعه، ژن‌هایی مانند MCP1, IL8, IFN- γ , TNF- α و IL10 مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۴). در پاسخ به تمامی سوبه‌های حساس و مقاوم، افزایش معنی‌داری در بیان IL8 (حساس [p<0.0001; p<0.0001], مقاوم به ریفامپین [p=0.0001; p=0.0004] MDR, [p=0.0001; p=0.0004] XDR [p=0.001; p=0.0007], (حساس) [p=0.0002; p<0.0001], مقاوم به ریفامپین [p<0.0001; p<0.0001] MDR [p=0.0002; p<0.0001]) IFN- γ (حساس [p=0.0003; p=0.002], مقاوم به ریفامپین [p=0.0008; p=0.002] MDR, [p=0.002; p=0.0008] TNF- α (حساس) [p=0.0005; p=0.005] XDR, [p=0.002; p=0.005] مقاوم به ریفامپین [p=0.0008; p=0.0006] XDR, [p=0.0005; p=0.0001] MDR [p=0.0005; p=0.0001])، به ترتیب پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از عفونت سلول‌های A549 مشاهده شد. در مقابل، بیان IL10 در پاسخ به عفونت سلول‌های A549 توسط سوبه‌های حساس [p=0.002; p=0.004]، مقاوم به ریفامپین [p=0.002; p=0.004] MDR [p=0.01; p=0.004] و XDR [p=0.01; p=0.004] سوبه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از عفونت به‌طور معناداری کاهش یافت. بیان این ژن‌های کموکاین و سایتوکاین در پاسخ به ژنوتیپ‌ها نیز قابل توجه بود. ژنوتیپ Beijing (ایزوله حساس) پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از عفونت، به‌طور معناداری باعث افزایش و کاهش بیان این ژن‌ها شد، در حالی که سوبه‌های دارای ژنوتیپ New-1 (شامل مقاوم به ریفامپین، MDR و XDR) تأثیر کمتری داشتند.

سیتوکین‌های پیش‌التهابی (*TNF- α* و *IFN- γ*)، ضد التهابی (*IL10*) و کموکاین‌ها (*MCP1* و *IL8*) با روش qRT-PCR استفاده از کیت مسترمیکس سایبرگرین (شرکت زیست فناوری پیشگام، ایران) و دستگاه Roche LightCycler 2.0 انجام شد. برای بررسی معنی‌داری بیان ژن‌های نکروز، آپوپتوز و مسیر التهابی در سلول‌های A549، میزان تغییر بیان هر ژن در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون سلول‌ها بررسی شد. برای هر نمونه، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، ۱ میکرولیتر پرایمرهای Forward و Reverse و ۷ میکرولیتر آب استریل استفاده شد. پس از افزودن ۱ میکرولیتر dDNA، حجم نهایی هر نمونه به ۲۰ میکرولیتر رسید و هر نمونه در سه تکرار آزمایش شد. از ژن *GAPDH* به عنوان ژن خانه دار استفاده شد. برنامه دمایی شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و سپس ۴۰ چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ مشخص شده است.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مسیر مرگ سلولی و التهابی مورد بررسی در فاز سلولی

پرایمر	توالی پرایمر	دما (°C)	طول محصول (bp)
BCL2-F	GGTGGGGTCATGTGTGTGG	۵۹	۸۹
BCL-R	CGGTTCAAGTACTCAGTCATCC		
BAD-F	CCCAGAGTTTGAGCCGAGTG	۵۸	۲۴۹
BAD-R	CCCATCCCTTCGTCCTCT		
BAX-F	CCCGAGAGGCTTTTTCCGAG	۵۸	۱۵۵
BAX-R	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT		
RB1-F	CTCTCGTCAGGCTTGAGTTTG	۵۸	۲۱۴
RB1-R	GACATCTCATCTAGGCAACTGC		
RIPK1-F	GGGAAGGTGCTCTGTGTTC	۵۹	۹۱
RIPK1-R	CCTCGTTGTGCTCAATGCAG		
FADD-F	GTGGCTGACCTGGTACAAGAG	۵۸	۹۶
FADD-R	GGTAGATGCGTCTGAGTCCAT		
TNF α -F	AGCCCATGTTGTAGCAAACC	۵۵	۱۳۴
TNF α -R	TGAGGTACAGGCCCTCTGAT		
IL-8-F	TGCCAAGGAGTGCTAACAG	۵۸	۱۹۷
IL-8-R	CTCCACAACCCTCTGCAC		
IL-10-F	GCTGTCATCGATTCTTCCC	۵۵	۱۰۳
IL-10-R	CTCATGGCTTGTAGATGCTC		
IFNG-F	TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA	۵۸	۹۳
IFNG-R	TCGCTTCCCCTTTTAGCTGC		
MCP1-F	CAGCCAGATGCAATCAATGCC	۵۸	۱۹۰
MCP1-R	TGGAATCCTGAACCCACTTCT		
GAPDH F	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	۵۸	۱۹۷
GAPDH R	GGCTGTGTACATACTTCTCATGG		

بررسی‌های آماری

بررسی نسبت تغییر بیان ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام گرفت و داده‌های حاصل با نرم افزار

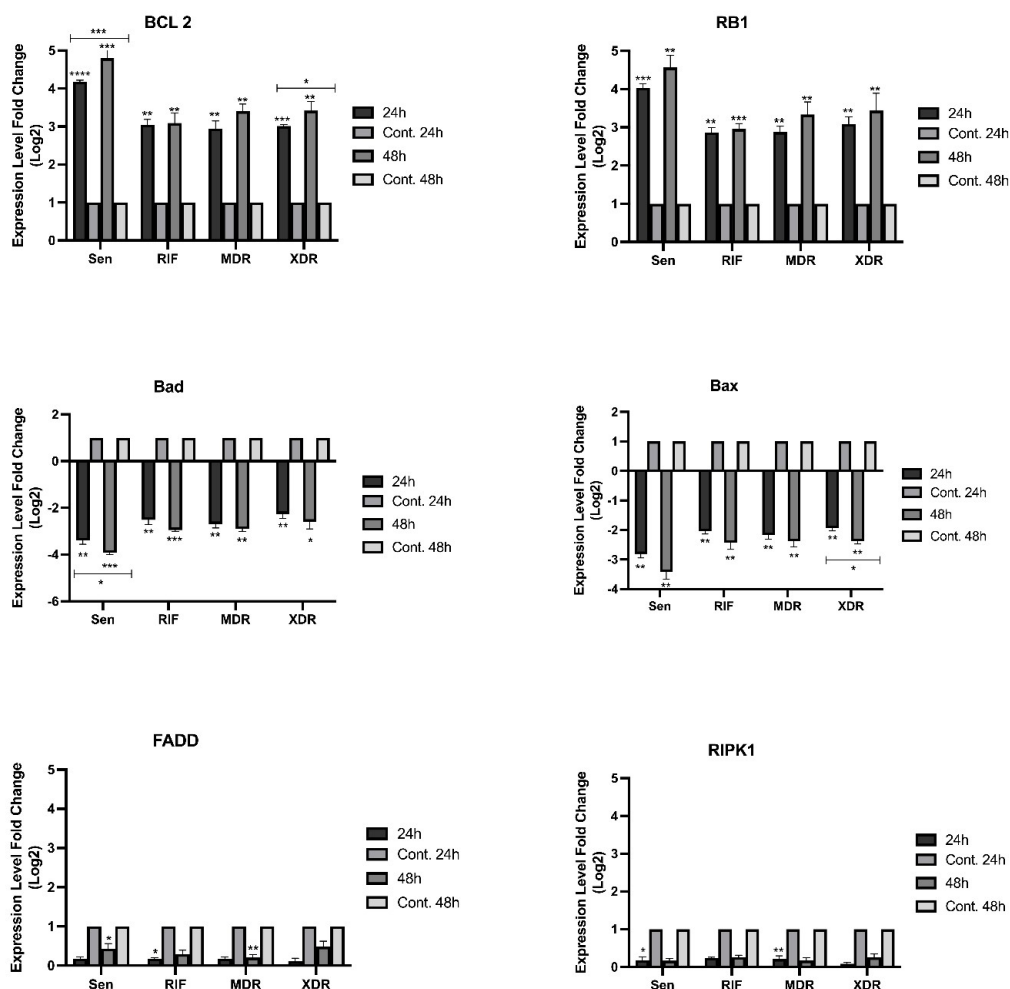
XDR و MDR (rank of difference: -0.91; $p=0.03$)
 مورد توجه قرار (rank of difference: -2.88; $p=0.0002$)
 گرفت. پاسخ به سایر سویه‌های مقاوم مثل RR (rank of difference: -0.66; $p=0.3$)
 MDR (rank of difference: -0.66; $p=0.2$)
 XDR (rank of difference: -0.66; $p=0.3$)
 difference: -0.66; $p=0.3$) نشان دهنده تغییر بیان ژن
 $IFN-\gamma$ بین زمان‌های انکوباسیون بود. در مورد ژن
 $TNF-\alpha$ هم تغییر بیان در پاسخ به سایر سویه‌های مورد مطالعه از
 جمله RR (rank of difference: -0.91; $p=0.09$) در زمان
 های ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون مشاهده شد. مقایسه زمان
 های انکوباسیون در بیان ژن سایتوکاین ضدالتهابی $IL10$
 نشان داد که تغییر بیان معنی‌داری در پاسخ به سویه MDR
 (rank of difference: 1.72; $p=0.01$) وجود دارد. در حالی
 که، در پاسخ به سایر سویه‌های حساس (rank of difference: 1.02; $p=0.09$)
 RR (rank of difference: 1.02; $p=0.09$)
 XDR (rank of difference: 1.98; $p=0.1$) و (rank of difference: 1.22; $p=0.1$)
 (rank of difference: 1.07) به صورت معنی‌دار تغییر بیان بین زمان‌های مختلف
 انکوباسیون گزارش نشد.

تغییر بیان ژن‌های مسیر مرگ سلولی القا شده توسط سویه‌های حساس و مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

پس از عفونت توسط تمامی سویه‌های حساس و مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، بیان ژن‌های $BCL2$ و RBI به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، در حالی که بیان ژن‌های BAX و BAD به‌طور معنی‌داری پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از عفونت کاهش نشان داد، همچنین در ژن‌های مرتبط با نکروز ($FADD$ و $RIPK1$) تغییر بیان معنی‌داری دیده نشد (شکل ۵). علاوه بر این، ژنوتیپ‌ها نیز بر رونویسی ژن‌های پرو آپوپتوتیک و ضد آپوپتوتیک تأثیر داشتند. در مقایسه با سویه‌های دارای ژنوتیپ New-1 (شامل مقاوم به ریفامپین، MDR و XDR)، ژنوتیپ Beijing (ایزوله حساس) باعث افزایش و کاهش قابل‌توجه در بیان ژن‌های ضد آپوپتوتیک ($BCL2$ و RBI) و پرو آپوپتوتیک (BAX و BAD) پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از عفونت شد. به‌طور جزئی‌تر، افزایش بیان $BCL2$ (حساس) [$p=0.0007$; $p=0.0007$]; مقاوم به ریفامپین [$p=0.002$; $p=0.002$]; MDR [$p=0.0001$; $p=0.001$]; XDR [$p=0.0001$; $p=0.001$]; RBI و ($p=0.001$]; حساس [$p=0.0006$; $p=0.001$]; مقاوم به ریفامپین [$p=0.0007$; $p=0.001$]; MDR [$p=0.003$; $p=0.005$]; XDR [$p=0.002$; $p=0.003$]

در سلول‌های A549 عفونی‌شده با تمامی ایزوله‌های حساس و مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت عفونت، به‌ترتیب، مشاهده شد. از سوی دیگر، کاهش بیان BAD (حساس) [$p=0.002$; $p=0.0005$]; مقاوم به ریفامپین [$p=0.006$; $p=0.0005$]; MDR [$p=0.0075$; $p=0.01$]; [$p=0.003$; $p=0.001$]; BAX (حساس) [$p=0.002$; $p=0.004$]; مقاوم به ریفامپین [$p=0.004$; $p=0.006$]; [$p=0.002$; $p=0.008$]; XDR [$p=0.002$; $p=0.002$] در پاسخ به تمامی سویه‌های حساس و مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، به‌ترتیب پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از عفونت مشاهده شد. همچنین، در ژن‌های نکروز $FADD$ (حساس) [$p=0.1$]; مقاوم به ریفامپین [$p=0.01$]; مقاوم به ریفامپین [$p=0.02$; $p=0.1$]; $RIPK1$ و [$p=0.008$; $p=0.2$]; XDR [$p=0.1$; $p=0.1$]; حساس [$p=0.01$; $p=0.1$]; مقاوم به ریفامپین [$p=0.2$; $p=0.2$]; MDR [$p=0.2$; $p=0.2$]; XDR [$p=0.2$; $p=0.2$]; ($p=0.1$) افزایش یا کاهش بیان معنی‌داری دیده نشد.

مقایسه تفاوت بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی (شکل ۵)، تفاوت معنی‌داری در بیان $BCL2$ را در سویه‌های حساس (rank of difference: -0.62; $p=0.009$) و XDR (rank of difference: -0.46; $p=0.1$) مشاهده شد. همچنین، تفاوت معنی‌داری در بیان $BCL2$ در پاسخ به عفونی شدن رده سلولی A549 با سویه MDR (rank of difference: -0.53; $p=0.06$)، حساس (rank of difference: -0.09; $p=0.5$)، MDR (rank of difference: -0.45; $p=0.1$) و XDR (rank of difference: -0.35; $p=0.3$) در ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون مشاهده نشد. بیان ژن RBI در پاسخ به سویه حساس (rank of difference: -0.53; $p=0.06$)، MDR (rank of difference: -0.09; $p=0.5$)، XDR (rank of difference: -0.45; $p=0.1$) و XDR (rank of difference: -0.35; $p=0.3$) در ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون دیده شد که معنی‌دار نبود. علاوه بر این، سلول‌های A549 عفونی شده با سویه حساس کاهش بیان معناداری در ژن BAD (rank of difference: 0.53; $p=0.04$) در مقایسه زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از انکوباسیون را نشان داد. به‌طور مشابه، کاهش معنی‌دار بیان ژن BAX (rank of difference: 0.44; $p=0.04$) در پاسخ به سویه XDR پس از زمان‌های انکوباسیون مشاهده شد. بیان ژن BAD در پاسخ به سایر سویه‌های مورد مطالعه از جمله RR (rank of difference: 0.43; $p=0.1$)، MDR (rank of difference: 0.21; $p=0.3$)



شکل ۵. تغییر بیان ژن‌های پرو آپوپتوتیک (BAD و BAX) و آنتی آپوپتوتیک (BCL2 و RB1) و نکروز (FADD و RIPK1) مورد مطالعه در سلول‌های A549 عفونی شده با سویه‌های حساس و مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت

مسیرهای مرگ سلولی و التهابی، سلول‌های اپیتلیال ریه نقش مهمی در شروع تعاملات میزبان با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارند. مشخص نیست که چگونه این دو مسیر در طول عفونت سل با سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو تعامل دارند. در مسیر آپوپتوز، پروتئین‌های Bcl-2 نقش مهمی را به عنوان یک نقطه کنترلی درون سلولی ایفا می‌کنند (۳۵). این مسیر شامل اعضای است که پرو آپوپتوتیک و ضد آپوپتوز هستند و در پاسخ‌های التهابی نقش دارند. زمانی که ژن‌های پرو آپوپتوتیک و ضد آپوپتوز بیان می‌شوند، چندین محرک مرگ سلولی، از جمله ترشح سیتوکین‌ها، بر سطح التهابی پاسخ‌های سیستم ایمنی تأثیر می‌گذارند (۳۶). با توجه به یافته‌های مربوط به عفونت سل، عوامل باکتریایی با فعال کردن اجزای خاص مسیرهای آپوپتوز، تعدیل کشتن

و XDR (rank of difference: 0.33; $p=0.3$) هم گزارش گردید که معنی‌دار نبودند. به طور مشابه، تفاوت بیان ژن معنی‌دار BAX در پاسخ به سویه حساس (rank of difference: 0.61; $p=0.08$)، MDR (rank of difference: 0.39; $p=0.1$) و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعته (difference: 0.2; $p=0.4$) انکوباسیون مشاهده نشد.

بحث

یک راهکار مهم برای کنترل عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مطالعه برهمکنش‌های میزبان-باکتری برای شناسایی شاخصه‌های مولکولی میزبان است. با دستکاری

مایکوباکتری‌های داخل سلولی و تحریک ایمنی تطبیقی، آپوپتوز سلول میزبان را القا می‌کنند (۳۷). با این حال، بسته به ژنوتیپ یا مقاومت سویه درگیر، ممکن است وضعیت‌های مختلفی وجود داشته باشد (۳۸، ۳۹). اکنون این موضوع پذیرفته شده است که برخی زیرگروه‌ها یا حتی رده‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به دلیل ساختار جمعیتی سل، از اهمیت بالینی بیشتری نسبت به سایرین برخوردارند (۴). به منظور درک پاتوژن سل و کنترل موثر سل، ممکن است درک تعاملات میزبان با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مفید باشد (۴۰). این مطالعه با هدف تعیین سطح بیان ژن‌های پرو آپوپتوتیک، ضد آپوپتوز، نکروز، سیتوکین و کموکاین در سلول‌های اپیتلیال آلوئولی (A549) آلوده به سویه‌های مقاوم و حساس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (H37Rv، حساس، مقاوم به ریفامپین، MDR و XDR) انجام شد.

نتایج نشان داد که عفونت توسط همه سویه‌های حساس و مقاوم در ارتباط با افزایش قابل توجهی در بیان ژن‌های ضد آپوپتوز (*BCL2* و *RBI*)، کموکاین‌ها (*IL8* و *MCPI*) و سایتوکاین‌های پیش التهابی (*IFN-γ* و *TNF-α*) است. در حالی که، کاهش قابل توجهی در ژن‌های پیش آپوپتوز (*BAD* و *BAX*) و ژن ضد التهابی (*IL10*) پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از عفونت مشاهده شد. علاوه بر مقاومت سویه‌های مورد بررسی، ژنوتیپ‌های سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیز بر بیان ژن‌های فوق‌الذکر تأثیر گذاشتند. در مقایسه با سویه‌های دارای ژنوتیپ New-1 (سویه‌های مقاوم به ریفامپین، MDR و XDR)، ژنوتیپ Beijing (سویه حساس) تغییر بیان ژن‌های التهابی و آپوپتوز ذکر شده را با شدت بیشتری القا کردند. بر اساس برخی شواهد، سویه‌های با ژنوتیپ Beijing با قابلیت حدت قوی‌تر و پاسخ پیش التهابی مرتبط هستند (۴۱). سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با توانایی کم در ایجاد بیماری، سلول‌های میزبان را تحریک می‌کنند تا تحت تأثیر آپوپتوز قرار گیرند و در نتیجه یک پوشش غیرقابل نفوذ ایجاد می‌شود که از گسترش باکتری‌ها جلوگیری می‌کند (۴۲). این فرآیند منجر به مهار و کشتن باکتری‌ها و همچنین فعال‌سازی سریع سلول‌های سیستم ایمنی می‌شود. برخلاف این، سویه‌های مایکوباکتری‌های با حدت بیشتر، مانند ژنوتیپ Beijing، قادر به القای سریع آپوپتوز نیستند و سلول‌های میزبان را غالباً با نکروز از بین می‌برند و در نتیجه یک غشای سلولی نفوذپذیر ایجاد می‌کنند که باکتری‌ها را قادر می‌سازد تا فرار کرده و گسترش یابند (۲۲، ۴۲، ۴۳). بنابراین، یکی از عوامل اصلی که به کشته شدن و حدت بیشتر این پاتوژن

کمک می‌کند، توانایی آن در دستکاری محیط داخلی سلول‌ها، به ویژه سلول‌های اپیتلیال آلوئولی است. این سلول‌ها به عنوان یک جایگاه مطلوب برای بقا و رشد درون سلولی این باکتری‌های مهاجم عمل می‌کنند (۴۲). اعتقاد بر این است که سلول‌های اپیتلیال مهم‌ترین سلول‌های تولیدکننده کموکاین‌ها و سیتوکین‌ها در طول عفونت سل هستند، که پاسخ‌های التهابی موضعی را القا می‌کنند و همچنین بر مسیرهای آپوپتوز تأثیر می‌گذارند (۴۴، ۴۵). در طول عفونت سل، IL-8 بسیار ترشح شده که با بیان بیش از حد ژن‌های *BAX* و *BAD* در سلول‌های میزبان باعث التهاب می‌شود (۴۶). آپوپتوز همچنین توسط MCP-1 از طریق گیرنده‌های سنش‌کننده CaSR و پروتئین MCP1P تنظیم می‌شود (۴۷). از طرفی، $TNF-\alpha$ فعالیت کاسپازها را افزایش داده و ژن‌های پرو آپوپتوز *BAX* و *BAD* را القا می‌کند (۴۸).

نشان داده شده است که سلول‌های A549 ژن‌های پرو آپوپتوز (*BAX*، *BAD* و *FAS*) را بیان می‌کنند و در حضور $IFN-\gamma$ و فعال شدن مسیرهای آپوپتوز، تحت آپوپتوز قرار می‌گیرند (۴۹). از طریق مکانیسم وابسته به STAT3، IL-10 همچنین به القای آپوپتوز در سلول‌ها کمک می‌کند (۵۰). در مجموع، ژن‌های سیتوکین و کموکاین برای دفاع اولیه در برابر عفونت ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ضروری هستند. نشان داده شده است که افزایش بیان ژن سیتوکین‌ها و کموکاین‌ها معمولاً در سویه‌هایی دیده می‌شود که بیماری‌زایی کمتری دارند (۲۱). البته باید توجه داشت که این موضوع که آیا سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم‌تر بیماری‌زا هستند یا نه، هنوز در مورد این پاتوژن مورد بحث است (۲۳). شکی نیست که ژنوتیپ‌های خاصی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، به ویژه ژنوتیپ Beijing، به‌طور بالقوه بیماری‌زایی بالاتری نسبت به سایر سویه‌ها نشان می‌دهند (۵۱).

علاوه بر مسیر آپوپتوز، مسیر نکروز نیز ممکن است در مراحل عفونت توسط مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دخیل باشد. با این حال، در مطالعه حاضر تغییر بیان معناداری در ژن‌های مرتبط با نکروز (*FADD* و *RIPK1*) مشاهده نشد که ممکن است نشان‌دهنده عدم فعال‌سازی این مسیر در مراحل اولیه عفونت باشد. این یافته‌ها با مطالعاتی که نشان داده‌اند سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از نکروز برای گسترش عفونت و فرار از پاسخ‌های ایمنی استفاده می‌کنند، مطابقت دارد (۱۹). نتایج ما نشان می‌دهد این مسیر ممکن است در مراحل اولیه عفونت سل کمتر فعال شود. بر اساس شواهد، به نظر می‌رسد سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به جای نکروز، آپوپتوز را

به عنوان یک مکانیسم مرگ سلولی در مراحل اولیه تحریک می‌کنند (۲۲).

علیرغم این واقعیت که عوامل مختلف به تعادل بین بقای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در داخل سلول، تولید مثل و انتقال آن کمک می‌کنند، هنوز درک بسیار کمی از نحوه عملکرد مکانیسم های بیماری زا وجود دارد. به طور کلی، توانایی سویه های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس برای حفظ این تعادل در سلول (بقا، تولید مثل درون سلولی و انتقال) برای تعیین پتانسیل بیماری زایی آن ها استفاده می شود (۲۳). همچنین تصور می شود که القای این حالت تعادل در ارتباط بین توانایی بیماری زایی سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با مقاومت آنتی بیوتیکی است. عملکرد آنتی بیوتیک ها ارتباط نزدیکی با هدف قرار دادن نقاط کلیدی بقای ارگانیسم دارد. این موارد شامل سنتز دیواره های سلولی، تنظیم تکثیر ژنوم، رونویسی و ترجمه پروتئین ها است (۵۲). با توجه به این واقعیت که بیشتر مکانیسم های پشت سر مقاومت آنتی بیوتیکی به کاهش رشد و تکثیر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و همچنین افزایش زمان تقسیم مربوطه می شود، این احتمال وجود دارد که برخی از سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک ها توانایی حفظ این وضعیت را نداشته باشند (۵۳). اساساً، سویه های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ممکن است سرعت رشد و ویژگی های بیماری زایی متفاوتی داشته باشند، صرف نظر از اینکه آیا الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی دارند یا خیر (۲۳). با وجود این، مهم است که توجه شود که در برخی از سویه های مقاوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، جهش های

اضافی ممکن است به این معنی باشد که آنها قادر به جبران جهش های رخ داده و حفظ این تعادل هستند، در نتیجه بیماری زایی خود را افزایش می دهند (۵۳).

نتیجه گیری

در نتیجه، تفاوت در نحوه بیان ژن ها در رابطه با مسیرهای مرگ سلولی و التهابی مورد بررسی در مطالعه حاضر، احتمالاً به دلیل ژنوتیپ این سویه ها است تا وضعیت مقاومت آنها، زیرا در مورد بیشتر ژن ها، بیان این ژن ها در سویه های مقاوم (مقاوم به ریفامپین، MDR و XDR) متعلق به ژنوتیپ New-1 در مقایسه با سویه های حساس (متعلق به ژنوتیپ Beijing) کمتر بود. از سوی دیگر، عدم مشاهده افزایش یا کاهش بیان معنا دار ژن های مرگ سلولی نکروز می تواند نشانگر عدم فعال سازی این مسیر در مراحل اولیه عفونت به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس باشد. با توجه به این موضوع، مطالعات بیشتری برای درک دیدگاه های عمیق تر از ارتباط بین آپوپتوز، نکروز و مسیرهای التهابی و مکانیسم های درگیر که هنوز در رابطه با نقش آنها در عفونت سل و همچنین مکانیسم های احتمالی درگیر شناسایی نشده اند، ضروری است. در درازمدت، چنین مطالعاتی به توسعه درمان های کارآمدتر و مؤثرتر برای عفونت سل کمک می کند و در نتیجه بار جهانی این بیماری را کاهش می دهد. بنابراین، برای به دست آوردن درک عمیق تر از بیماری سل و نحوه انتقال آن، ارزیابی تعاملات میزبان و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تحت شرایط مختلف عفونت سل می تواند از اهمیت قابل توجهی برخوردار باشد.

REFERENCES

1. Natarajan A, Beena P, Devnikar AV, Mali S. A systemic review on tuberculosis. *Indian J Tuberc* 2020;67:295-311.
2. World Health Organization. Global tuberculosis report 2024. Geneva: WHO; 2025. [Available from: <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>]
3. Park M, Satta G, Kon OM. An update on multidrug-resistant tuberculosis. *Clin Med* 2019;19:135-9.
4. Ferdosnejad K, Sholeh M, Abdolhamidi R, Soroush E, Siadat SD, Tarashi S. The occurrence rate of Haarlem and Beijing genotypes among Middle Eastern isolates of multi drug resistant Mycobacterium tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Respir Invest* 2024;62:296-304.
5. Bialvaei AZ, Asgharzadeh M, Aghazadeh M, Nourazarian M, Kafil HS. Challenges of tuberculosis in Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2017;10:e37866.
6. Torkaman MRA, Nasiri MJ, FaRnia P, Shahhosseiny MH, Mozafari M, Velayati AA. Estimation of recent transmission of Mycobacterium tuberculosis strains among Iranian and Afghan immigrants: A cluster-based study. *J Clin Diagn Res* 2014;8:DC05-8.
7. Ferdosnejad K, Zamani MS, Soroush E, Fateh A, Siadat SD, Tarashi S. Tuberculosis and lung cancer: metabolic pathways play a key role. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2024:1-20.
8. Iran MoHo. Ministry of Health of Iran. National Center for Tuberculosis and Leprosy Control web site 2017. Available from: http://tb-lep.behdasht.gov.ir/TB_HIV_Situation_in_Iran.aspx.

9. Kim JK, Silwal P, Jo E-K. Host-pathogen dialogues in autophagy, apoptosis, and necrosis during mycobacterial infection. *Immune Netw* 2020;20:e37.
10. Tarashi S, Omrani MD, Moshiri A, Fateh A, Siadat SD, Fuso A. The correlation of microbiota and host epigenome in tuberculosis. In: Rezaei N, ed. *Tuberculosis. Integrated Studies for a Complex Disease*. SpringerLink; 2023. p. 977-1002.
11. Ekert PG, Vaux DL. Apoptosis and the immune system. *Br Med Bull* 1997;53:591-603.
12. Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 2003;4:410-5.
13. Walker N, Harmon B, Gobe G, Kerr J. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 1988;13:18-54.
14. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003;22:8590-607.
15. MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* 2004;5:674-8.
16. Berghe TV, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:135-47.
17. Rello S, Stockert J, Moreno V, Gamez A, Pacheco M, Juarranz A, et al. Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis* 2005;10:201-8.
18. Flores-Romero H, Ros U, Garcia-Saez AJ. Pore formation in regulated cell death. *EMBO J* 2020;39:e105753.
19. Danelishvili L, McGarvey J, Li Yj, Bermudez LE. Mycobacterium tuberculosis infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cell Microbiol* 2003;5:649-60.
20. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, et al. Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 1997;65:298-304.
21. Mvubu NE, Pillay B, McKinnon LR, Pillay M. Mycobacterium tuberculosis strains induce strain-specific cytokine and chemokine response in pulmonary epithelial cells. *Cytokine* 2018;104:53-64.
22. Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol* 2000;164:2016-20.
23. Zhan L, Wang J, Wang L, Qin C. The correlation of drug resistance and virulence in Mycobacterium tuberculosis. *Biosafety and Health* 2020;2:18-24.
24. Rezaei N, Hosseini N-S, Saghazadeh A, Fateh A, Duse A, Ahmad A, et al. Tuberculosis: integrated studies for a complex disease 2050. SpringerLink; 2023. P.1063-98.
25. Schroeder M, Brooks BD, Brooks AE. The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. *Genes* 2017;8:39.
26. Lam A, Prabhu R, Gross CM, Riesenber LA, Singh V, Aggarwal S. Role of apoptosis and autophagy in tuberculosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017;313:L218-L29.
27. van Klingeren B, Dessens-Kroon M, van der Laan T, Kremer K, van Soolingen D. Drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex by use of a high-throughput, reproducible, absolute concentration method. *J Clin Microbiol* 2007;45:2662-8.
28. Woods GL, Brown-Elliott BA, Conville PS, Desmond EP, Hall GS, Lin G, et al. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes [Internet]. 2nd ed. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011 Mar. Report No.: M24-A2.
29. Association NT. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. New York: National tuberculosis association; 1940.
30. Vaziri F, Kohl TA, Ghajavand H, Kargarpour Kamakoli M, Merker M, Hadifar S, et al. Genetic diversity of multi- and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in the capital of Iran, revealed by whole-genome sequencing. *J Clin Microbiol* 2019;57: e01477-18.
31. Caceres N, Vilaplana C, Prats C, Marzo E, Llopis I, Valls J, et al. Evolution and role of corded cell aggregation in Mycobacterium tuberculosis cultures. *Tuberculosis* 2013;93:690-8.
32. Sequeira PC, Senaratne RH, Riley LW. Inhibition of toll-like receptor 2 (TLR-2)-mediated response in human alveolar epithelial cells by mycolic acids and Mycobacterium tuberculosis mce1 operon mutant. *Pathog Dis* 2014;70:132-40.

33. Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol* 2011;740:7-12.
34. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25:402-8.
35. Danial NN. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res* 2007;13:7254-63.
36. Schmidt E, Tuder R. Role of apoptosis in amplifying inflammatory responses in lung diseases. *J Cell Death* 2010;3:41-53.
37. Srinivasan L, Ahlbrand S, Briken V. Interaction of Mycobacterium tuberculosis with host cell death pathways. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4:a022459.
38. Abdalla AE, Ejaz H, Mahjoob MO, Alameen AAM, Abosalif KOA, Elamir MYM, Mousa MA. Intelligent mechanisms of macrophage apoptosis subversion by mycobacterium. *Pathogens* 2020;9:218.
39. Tarashi S, Fateh A, Mirsaedi M, Siadat SD, Vaziri F. Mixed infections in tuberculosis: the missing part in a puzzle. *Tuberculosis* 2017;107:168-74.
40. Tarashi S, Badi SA, Moshiri A, Nasehi M, Fateh A, Vaziri F, et al. The human microbiota in pulmonary tuberculosis: Not so innocent bystanders. *Tuberculosis* 2018;113:215-21.
41. Tong J, Meng L, Bei C, Liu Q, Wang M, Yang T, et al. Modern Beijing sublineage of Mycobacterium tuberculosis shift macrophage into a hyperinflammatory status. *Emerg Microbes Infect* 2022;11:715-24.
42. Porcelli SA, Jacobs Jr WR. Tuberculosis: unsealing the apoptotic envelope. *Nat Immunol* 2008;9:1101-2.
43. Behar SM, Divangahi M, Remold HG. Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol* 2010;8:668-74.
44. Lin Y, Zhang M, Barnes PF. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 1998;66:1121-6.
45. Guiedem E, Pefura-Yone EW, Ikomey GM, Nkenfou CN, Mesembe M, Yivala MM, et al. Cytokine profile in the sputum of subjects with post-tuberculosis airflow obstruction and in those with tobacco related chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Immunol* 2020;21:1-11.
46. Alemán M, Garcia A, Saab MA, De La Barrera SS, Finiasz M, Abbate E, et al. Mycobacterium tuberculosis-induced activation accelerates apoptosis in peripheral blood neutrophils from patients with active tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:583-92.
47. Zhang W, Zhu T, Chen L, Luo W, Chao J. MCP-1 mediates ischemia-reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis via MCP1P1 and CaSR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2020;318:H59-H71.
48. Ooppachai C, Limtrakul P, Yodkeeree S. Dicentrine potentiates TNF- α -induced apoptosis and suppresses invasion of A549 lung adenocarcinoma cells via modulation of NF- κ B and AP-1 activation. *Molecules* 2019;24:4100.
49. Wen L-P, Madani K, Fahrni JA, Duncan SR, Rosen GD. Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by IFN- γ and Fas. *Am J Physiol* 1997;273:L921-L9.
50. Bailey DP, Kashyap M, Bouton LA, Murray PJ, Ryan JJ. Interleukin-10 induces apoptosis in developing mast cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 2006;80:581-9.
51. San LL, Aye KS, Oo NAT, Shwe MM, Fukushima Y, Gordon SV, et al. Insight into multidrug-resistant Beijing genotype Mycobacterium tuberculosis isolates in Myanmar. *Int J Infect Dis* 2018;76:109-19.
52. Nguyen L. Antibiotic resistance mechanisms in M. tuberculosis: an update. *Arch Toxicol* 2016;90:1585-604.
53. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 2010;8:260-71.