

## نقش دیواره سلولی در کندی رشد میکوباکتریوم توبرکلوزیس

دکتر عزت‌ا. قائمی<sup>۱</sup>، دکتر کیومرث قاضی سعیدی<sup>۲</sup>

### چکیده

بیماری‌های میکوباکتریومی از قدیم‌ترین بیماری‌های شناخته شده بشری هستند. ذهن تاریخ پر است از خاطرات تلخ تهاجم بیماری‌های میکوباکتریومی، به خصوص سل و جذام که حتی امروز، سال‌ها پس از کشف عامل، راه‌های تشخیص، پیشگیری و درمانشان هنوز نام آنها ترس و وحشت را در انسان زنده می‌کند. اگرچه دوران اوج بیماری جذام، فروکش کرده، بیماری سل، سال‌هاست که در پی اوج‌گیری مجدد، می‌رود تا به عنوان یک خطر جدی برای بشریت و به خصوص جوامع جهان سوم خودنمایی کند و در این راه، دست ویروس ایدز را نیز سخت فشرده است تا با هم به نبرد با سلامت برخیزند. از طرفی فرصت مناسبی به دست آمده که بعضی از گونه‌های میکوباکتریومی بی‌خطر یا کم‌خطر، خود را به شکل یک عامل بیماری‌زا جدی مطرح نمایند و مولد بیماری‌هایی مرگ‌آفرین در انسان شوند. محققینی که با چهره جدید این سازواره (ارگانیزم)، آشنایی یافته‌اند، سخت در تلاشند تا با شناسایی ویژگی‌های دقیق ترشان، نقاط ضعف آنها را یافته و به مبارزه جدی‌تر با آنان برخیزند. این نوشتار نیز در پی روشن‌سازی یکی از ویژگی‌های میکوباکتریومی یعنی کندی رشد آنها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: رشد، دیواره سلولی، میکوباکتریوم توبرکلوزیس

۱- استادیار دانشگاه علوم پزشکی گرگان، نشانی: گرگان، کیلومتر ۲ جاده گرگان به ساری، ابتدای پاره شدت کلا، دانشگاه علوم پزشکی گرگان (بنیاد فلسفی)، دانشکده پزشکی، گروه

میکروپزشناسی تلفن: ۳۰ و ۴۴۲۱۶۵۱-۰۷۱

۲- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

## میکوباکتریوم‌ها

میکوباکتریوم‌ها، باسیل‌های مستقیم یا کمی خمیده گرم مثبت به قطر ۰/۲-۰/۶ میکرون و طول ۱-۱۰ میکرون می‌باشند که به علت دیواره سلولی اختصاصی که دارند رنگ گرم را به خود نگرفته و خاصیت مقاومت به اسید را نشان می‌دهند (۱). این باکتری‌ها از راسته اکتینومیتال‌ها می‌باشند ولی در کتاب برجی مستقلاً مورد بررسی قرار می‌گیرند و به علت داشتن میکولیک اسید در دیواره خود جز گروه CNM<sup>۱</sup> محسوب می‌شوند (۲).

نخستین میکوباکتریوم شناخته شده، گونه لپره می‌باشد که در سال ۱۸۷۰ شناسایی شد (۳)، از آن تاریخ تاکنون، ده‌ها گونه دیگر نیز شناسایی شده است. تا آنجا که امروزه بیش از ۶۰ گونه از آن معرفی شده‌اند.

اساس تقسیم‌بندی میکوباکتریوم‌ها بیشتر بر خصوصیات ریخت‌شناسی (مرفولوژیک)، ایجاد پیگمان، سرعت رشد و ... استوار می‌باشد (۴). در واقع رانیون در طبقه‌بندی میکوباکتریوم‌ها، سرعت رشد و ایجاد پیگمان را به عنوان اساس طبقه‌بندی در نظر گرفته است (۵). گودفلو در سال ۱۹۸۰ معیار اصلی را سرعت رشد در نظر گرفت (۶).

میکوباکتریوم‌ها را بر اساس سرعت رشد یا زمان ظهور کلنی، وقتی سوسپانسیون رقیقی از آن به محیط کشت مناسب تلقیح می‌شود، به دو گروه تقسیم می‌کنند:

گروه ۱ - انواع تند رشد، که رشد سریع دارند و در کمتر از ۷ روز کلنی ایجاد می‌کنند.

گروه ۲ - انواع کند رشد، که بعد از ۷ روز کلنی ایجاد می‌نمایند (۷). حتی تندرشدترین میکوباکتریوم‌ها به نسبت سایر باکتری‌ها، مثل اشرشیاکلی از سرعت رشد کندی

برخوردار می‌باشند.

بعضی از میکوباکتریوم‌ها مثل میکوباکتریوم لپره، عامل بیماری جذام، بسیار پرنیاز است، به طوری که هنوز امکان جداسازی آن در محیط کشت به وجود نیامده است و بعضی دیگر مثل میکوباکتریوم پاراتویرکلوزیس به سختی و در شرایط خاص، در محیط‌های پیچیده، قادر به رشد هستند ولی اکثر گونه‌های این جنس نیازمندی غذایی ساده‌ای دارند و به راحتی در محیط‌های کشت حاوی مواد اولیه مناسب، رشد می‌کنند. میکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل بیماری سل، از کندرشدترین باکتری‌های با زندگی آزاد محسوب می‌شود ولی نیازمندی غذایی ساده‌ای دارد.

## رشد میکوباکتریوم توبرکلوزیس

رشد به معنای افزایش منظم کلیه اجزاء سلولی می‌باشد که در نتیجه استفاده از مواد غذایی اتفاق می‌افتد و در باکتری‌ها، با تکثیر همراه است (۲). هرچه مواد غذایی سریع‌تر به داخل سلول نفوذ کرده و مورد استفاده قرار گیرند، سرعت رشد، بیشتر می‌شود. سرعت رشد میکوباکتریوم‌ها به وسیله سرعت تولید انرژی از سوی این باکتری کنترل می‌شود و انرژی از طریق شکستن مواد آلی وارد شده به سلول حاصل می‌گردد. به همین دلیل، سرعت رشد در محیط‌های مختلف و در حضور ترکیبات مختلف، یکسان نمی‌باشد و تامین منابع غذایی مناسب یا غنی‌ساز محیط با افزودن مواد معدنی، منبع کربن و نیتروژن مناسب، باعث کاهش این زمان می‌گردد. به علاوه مشخص شده که عوامل محیطی، مثلاً هوادهی مناسب، زمان نسل میکروب سل در محیط مایع را از ۳۳ ساعت به ۱۸ ساعت کاهش می‌دهند (۳). اما با این حال کوتاه‌ترین زمان نسل، در میکوباکتریوم توبرکلوزیس، در خارج از بدن و محیط آزمایشگاه، حداقل ۱۷ ساعت می‌باشد. این زمان در سویه‌های مختلف نیز با هم تفاوت قابل توجهی نشان می‌دهند. مثلاً سویه

<sup>۱</sup> Corynebacterium, Nocardia, Mycobacterium

وجود در کندر شده‌ها به نام  $rrnAs$ <sup>۱</sup> خوانده می‌شود. ولی در تندر شده‌ها، علاوه بر اوپرون مشابه که  $rrnAf$ <sup>۲</sup> خوانده می‌شود، یک اوپرون دیگر به نام  $rrnBf$  وجود دارد که در هیچ کدام از انواع کندر شده‌ها مشاهده نمی‌گردد. مطالعات دقیق نشان می‌دهند که  $rrnAs$  و  $rrnAf$  تشابه زیادی با یکدیگر دارند و تنها در ۹۷ جفت باز با یکدیگر تفاوت نشان می‌دهند (۱۱).

۳- نه تنها تعداد اوپرون  $rDNA$  در تندر شده‌ها بیشتر است بلکه، تعداد پروموتور یا نقطه آغاز نسخه‌برداری و تولید  $rRNA$  نیز در تندر شده‌ها بیش از کندر شده‌هاست، به طوری که در میکوباکتریوم اسگماتیس که از انواع تندر شد محسوب می‌شود، ۴ نقطه شروع وجود دارد، یکی برای اوپرون  $rrnBf$  و سه تا برای  $rrnAf$  ولی در کندر شده‌ها، فقط یک نقطه آغاز نسخه‌برداری شناسایی شده است (۱۱). بنابراین در کندر شده‌ها نه تنها تعداد اوپرون کمتر است، بلکه نقطه آغاز نسخه‌برداری نیز کمتر است و در نتیجه رشد، کندتر از انواع تندر شد و نیز باکتری‌های دیگر می‌باشد.

۴- در بعضی از انواع تندر شد میکوباکتریوم مثل گونه فلئی سه راه تنفسی وجود دارد، ولی در میکوباکتریوم توبرکلوزیس دو راه موجود است و این باکتری فاقد راه کلیدی تنفس به نام «مالات ویتامین K ردوکتاز» می‌باشد (۹).

۵- نسبت  $rRNA$  به  $DNA$  در میکوباکتریوم‌ها حدوداً یک‌دهم نسبت موجود در اشرشیاکلی می‌باشد که این به توانایی آنزیم مسؤل نسخه‌برداری در این دو باکتری بستگی دارد و نشان می‌دهد که در میکوباکتریوم‌ها از سرعت کمتری برخوردار است (۳). این نسبت در گونه‌های کندر شد پایین‌تر از گونه‌های تندر شد است (۱±۲ در مقابل ۱±۴) (۹).

ویرولان  $H_{37}Rv$  در داخل بدن، درون سلول‌های ماکروفاژ، زمان نسلی معادل ۵۳ ساعت و سویه غیرویرولان  $H_{37}Ra$  زمان نسلی معادل ۳۰ ساعت دارد (۸). این زمان‌ها در مقایسه با زمان نسل ۲۰ دقیقه‌ای اشرشیاکلی، بسیار طولانی و کند است. کندی رشد در میکوباکتریوم‌ها به دلیل نیاز بودن آنها نمی‌باشد، زیرا برخلاف تصور، این باکتری‌ها نیازمندی کمی دارند و پروتوتروف می‌باشند، یعنی قادرند در محیطی که تنها حاوی مواد معدنی و یک منبع کربن‌دار مناسب باشند، تمام مواد آلی مورد نیاز خود را ساخته و رشد و تکثیر نمایند (۱). راه‌های سوخت و سازی (متابولیک) در این باکتری، کم و بیش مشابه سایر باکتری‌هاست و موارد تفاوت اندکی می‌توان در مراحل شکستن قندها در این باکتری، با سایر باکتری‌ها، مشاهده کرد مثل وجود یک آنزیم غیرمعمول «لاکتات اکسیداز» (۹). بنابراین عوامل دیگری باید در کندی رشد مؤثر باشند که پاره‌ای از آنها به شرح زیرند:

۱- به طور تعجب‌آوری مقدار ژن اسیدریبونوکلئیک ریبوزومی ( $rRNA$ ) در میکوباکتریوم‌ها در مقابل کل ژنومشان، کوچک است و در نتیجه، توانایی تولید ریبوزوم در آنها کمتر از حد انتظار است. رابطه دقیقی بین سرعت رشد میکوباکتریوم‌ها با سنتز پروتئین و تولید ریبوزوم وجود دارد (۱۰) و کم‌بودن میزان ژنوم مسؤل سنتز  $rRNA$  (یعنی اسید دزوکسی ریبونوکلئیک نوترکیب یا  $rDNA$ ) می‌تواند باعث محدود شدن میزان سنتز پروتئین در این باکتری گشته و رشد را کندتر از حد مورد انتظار نماید.

۲- در میکوباکتریوم‌های کندر شد میزان  $rRNA$  از انواع تند رشد، کمتر است.

انواع تندر شد دارای دو اوپرون  $rDNA$  در ژنوم خود می‌باشند، در حالی که میکوباکتریوم توبرکلوزیس و سایر گونه‌های کندر شد تنها دارای یک اوپرون می‌باشند. اوپرون

<sup>۱</sup> s علامت کندی رشد یا slow growth است.  
<sup>۲</sup> f علامت تندی رشد یا fast growth است.

۶- رابطه‌ای بین نوع و مقدار مواد ترش‌چی به وسیلهٔ باکتری و رشد در میکوباکتریوم‌ها دیده شده است، به این معنی که انواعی که مواد ترش‌چی کمتری دارند و سطح سلولی آنها غنی از کربوهیدرات‌هاست مثل میکوباکتریوم آویوم و میکوباکتریوم گاستری و کانزاسی، سرعت رشد کندتر از انواعی می‌باشد که پوشش سلولی‌شان غنی از پروتئین می‌باشد و مواد ترش‌چی زیادتری دارند نظیر اسمگماتیس و فلی (۱۲).

اورتالو و همکارانش نشان دادند که تفاوت مشاهده شده در مواد سطحی و ترش‌چی میکوباکتریوم‌ها، خود ناشی از محل استقرار لیپیدها در سطح سلول می‌باشد (۱۳). ضمن آن که در سال‌های اخیر، توجه بیشتری بر نقش پلی‌ساکاریدهای بخش بیرونی پوشش معطوف شده است.

مثلاً لماسو و همکارانش در سال ۱۹۹۶ ادعا کرده‌اند که در انواع تندرشد مثل اسمگماتیس در زنجیرهٔ آرابینومانان، ریشه‌های آرابینان انتهایی به وسیله مانوز پوشیده نیست ولی در کندرشدها، پوشیده است و این واقعیت را از عوامل مؤثر مطرح نموده‌اند (۱۲).

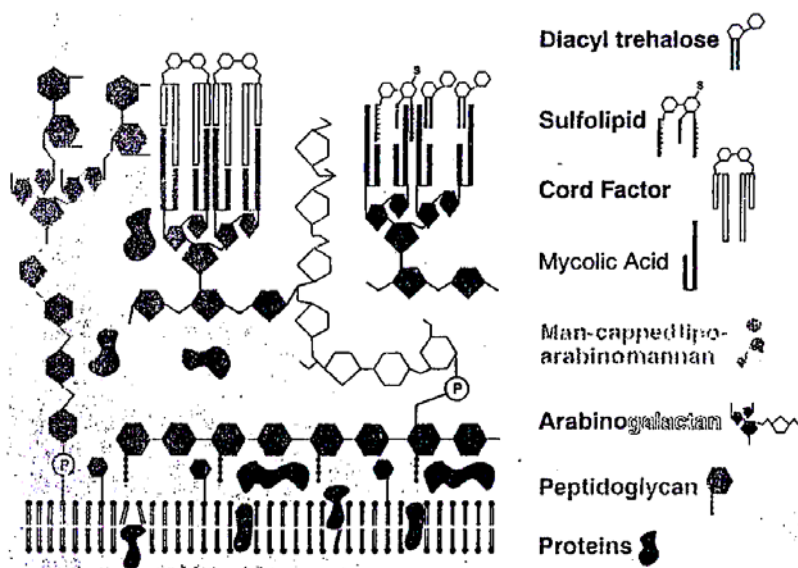
۷- نبودن یا کم بودن مکانیسم دفاعی در مقابل شرایط استرس به خصوص استرس‌های اکسیداتیو مثل تولید  $H_2O_2$  در توبرکلوزیس و زیادتر بودن سیستم‌هایی مثل oxyR در تندرشدها را از عوامل دیگر مؤثر در تفاوت سرعت رشد می‌دانند (۱۴). در ارزیابی نسبتاً دقیقی که در مقایسهٔ کارایی عوامل فوق با سرعت رشد اشرشیاکلی انجام شده، مشخص گردید که زمان همانندسازی DNA در میکوباکتریوم‌ها ۱۱-۱۰ ساعت می‌باشد و با حذف تمامی عوامل فوق، زمان همانندسازی در میکوباکتریوم توبرکلوزیس، باید به حدود ۵ ساعت برسد (۱). ولی در عمل، زمان نسل این باکتری حتی در شرایط ایده‌آل کمتر از ۱۷ ساعت نمی‌باشد. بنابراین عوامل دیگری نیز باید در کندی رشد، دخالت مؤثر و جدی داشته

باشند.

۸- وجود پوشش ضخیم و چندلایهٔ آب‌گریز که عمدتاً ۶۰ درصد از لیپید ساخته شده است.

#### اجزاء اصلی دیوارهٔ سلولی در میکوباکتریوم توبرکلوزیس

دیوارهٔ سلولی از مهم‌ترین و شاخص‌ترین اجزاء میکوباکتریوم‌ها محسوب می‌شود و در شکل دادن و حفظ تمامیت سلول و پایداری میکروب در میزبان ضروری است (۱۵). دیواره سلولی چند لایه و ضخیم، و از نظر شیمیایی بسیار پیچیده است و بیش از ۶۰ درصد وزن آن را لیپیدها تشکیل می‌دهند (۵). اجزاء اصلی لیپیدی آن میکولیک اسید می‌باشد که اسیدچربی زنجیرهٔ بلند بتاهدروکسی است، و در کربن  $\alpha$  دارای انشعاب می‌باشد و بیش از ۵۰ درصد وزن پوشش سلولی این باکتری را تشکیل می‌دهد (۲). این اسید با ایجاد یک پیوند آب‌گریز، یک پوسته لیپیدی در اطراف باکتری ایجاد می‌کند که مسؤل ایجاد «سد لیپیدی» در اطراف میکوباکتریوم‌ها می‌باشد. این لایه در نزدیکی لایهٔ پتیدوگلیکان قرار دارد و به صورت تک‌لایه می‌باشد که در واقع بخش داخلی لایه لیپیدی موجود در پوشش را تشکیل می‌دهد و کل سطح سلول را می‌پوشاند (۱۶). این ترکیب به علت دارا بودن ساختمان کریستال مانند و لیپوئیدی خاصیت آب‌گریز به سطح سلول می‌دهد و در ایجاد مقاومت میکروب در برابر مواد شیمیایی مؤثر است. همچنین می‌تواند از ورود مواد غذایی قطبی به داخل سلول جلوگیری نماید (۱۷) و حتی تا حدودی در مقابل ورود مواد آب‌گریز نیز می‌تواند مانع ایجاد نماید (۹ و ۱۸ و ۱۹). ترکیبات لیپید و گلیکولیپیدی متنوع دیگری مثل سولفانیدها، آسیل ترهالوزیدی میکولات، میکوزیدها و ... نیز وجود دارند که سازندهٔ بقیهٔ اجزاء لیپیدی پوشش هستند و در بیماری‌زایی ارگانیزم دخالت می‌کنند. علاوه بر ترکیبات لیپیدی در دیوارهٔ سلولی این باکتری، انواع



تصویر ۱: نمای اجزاء سازنده پوشش سلولی در میکوباکتریوم توبرکلوزیس

گرم منفی کمتر است و به آنها پروتئین کوچک<sup>۱</sup> می‌گویند. قطر آنها در حدی نیست که اجازه نفوذ سریع به ترکیبات مختلف بدهد، به همین دلیل این پروتئین‌ها می‌توانند عامل کندی رشد این باکتری باشند (۲۱).

مقدار پروتئین سطح خارجی دیواره با سرعت رشد میکوباکتریوم‌ها متناسب است، به طوری که گونه‌های اسمگماتیس و فلثی که در سطح خارجی خود مقدار زیادی پروتئین دارند، تندرشدتر از گونه‌های آویوم و گاستری می‌باشند که پروتئین دیواره سلولی آنها کم می‌باشد (۱۲).

با توجه به مطالعات انجام شده، شکل پوشش سلولی در میکوباکتریوم توبرکلوزیس در تصویر یک آمده است.

به دلیل پیچیدگی دیواره سلولی M.tub و نیاز باکتری به تأمین مواد غذایی دو راه اصلی برای نفوذ مواد غذایی به داخل این باکتری وجود دارد:

### الف) راه‌های آبدوست

در باکتری‌های گرم منفی که در دیواره سلولی خود غشاء

مختلفی از پلی‌ساکاریدها وجود دارند که بعضی از آنها به میکولیک اسید یا سایر لیپیدها متصلند (۳).

در مطالعاتی که با استفاده از پادتن منوکلونال علیه آرابینومانان (L9) و نیز به کمک واکنش کانکوالین A با سطح باسیل سل تیمار شده با طلا انجام شد، مشخص شد که سطح باسیل سل پوشیده از پلی‌ساکاریدها، به خصوص انواع حاوی آرابینان می‌باشد (۲۰).

جزء دیگر سازنده دیواره سلولی میکوباکتریوم توبرکلوزیس، پروتئین‌ها می‌باشند که در کل پوشش باکتری پراکنده‌اند. این اجزاء علاوه بر خواص ایمنی‌شناختی و نقش در ویرولان [پلی‌گلوتامیک اسید در سویه ویرولان M.tub یافت می‌شود و در غیر ویرولان‌ها، میزان آن خیلی کم است و در گونه‌های غیر بیماری‌زا مثل فلثی و اسمگماتیس وجود ندارد (۵)]، در انتقال ترکیبات قطبی دخالت دارند، امکان دسترسی باکتری به مواد قطبی را به وجود می‌آورند و به عنوان پورین عمل می‌کنند (۱۲). ولی مطالعات نشان داده‌اند که قدرت آنها در انتقال مواد از پورین‌های موجود در باکتری‌های

<sup>۱</sup> Minor protein

(سانتی متر/ثانیه) می باشد (۲۳).

انتقال یون‌هایی مثل یون آهن اصولاً به کمک ترکیبات موجود در دیواره سلولی مثل میکوباکتین متصل به پوشش سلولی انجام می‌شود و نیز در میکوباکتریوم اسمگماتیس یک پروتئین ۲۹ کیلودالتونی لیپوفیلیک در انتقال آهن متصل شده به اگزوجلین به داخل سلول عمل می‌کند (۲۴).

### (ب) راه‌های چربی دوست (لیپوفیلیک)

اصولاً مواد محلول در چربی یا چربی دوست‌ها باید بتوانند از طریق حل شدن در غشای لیپیدی دولایه از هر غشاء زیست‌شناختی به راحتی عبور نمایند، ولی وجود سیالیت اندک میکولیک اسید در دیواره میکوباکتریوم تا حدود زیادی آزادی عمل را در انتشار به داخل سلول از این مواد نیز گرفته است ولی با این حال با توجه به غیرمؤثر بودن روش‌های انتقال آب‌گریزانه و پورین‌ها در میکوباکتریوم‌ها به نظر می‌رسد که این راه انتقال در این باکتری از اهمیت بیشتری برخوردار باشد. در عمل نیز چنین پدیده‌ای اتفاق می‌افتد زیرا مشتقات چربی دوست بسیاری از داروهای ضد میکوباکتریومی مؤثرتر از سایر مشتقات آنها روی میکروب می‌باشند. مثلاً افزودن یک زنجیره اسید چرب ۱۶ کربنه روی ایزونیاژید، آن را علیه میکوباکتریوم آویوم مؤثرتر می‌نماید. همچنین مشتقات آب‌گریز تتراسایکلین نظیر داکسی‌سیکلین و مینوسکلین مؤثرتر از مشتقات آب‌دوست آن روی میکوباکتریوم‌های مختلف مثل چلونه، فورتوتیوم و مارینوم می‌باشد (۲۵) همچنین، کلاریترومیسین<sup>۳</sup> که مشتق شدیداً آب‌گریز اریترومایسین می‌باشد، روی میکوباکتریوم‌های نامعمول و نیز میکوباکتریوم‌های توبرکلوزیس بسیار مؤثرتر از اریترومایسین می‌باشد و همین واقعیت در مورد مشتق آب‌گریز ریفامپین

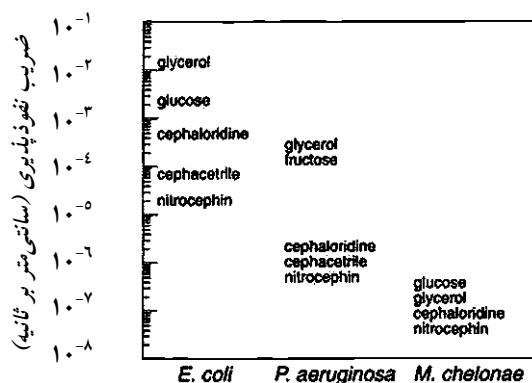
خارجی غنی از چربی دارند، برای انتقال مواد غذایی قطبی مولکول‌های پروتئینی خاصی به نام «پورین»<sup>۱</sup> وجود دارد که به صورت یک مجرا، به سلول باکتری این امکان را می‌دهد تا مواد فوق را به داخل انتشار دهد (۲۲).

در باکتری‌ای مثل میکوباکتریوم چلونی که دیواره سلولی شدیداً نفوذناپذیر می‌باشد، ورود داروهای مثل سفالوسپورین‌ها تحت تأثیر حرارت قرار نمی‌گیرد و باید راهی برای انتقال این ملکول قطبی به داخل سلول وجود داشته باشد (مثل گرم منفی‌ها). وجود چنین مجراهایی که به پروتئازها حساس هستند، در این باکتری نشان داده، و معلوم شد که پروتئینی ۵۹KD است که در پوشش سلولی به انتشار مواد کوچک آب‌دوست محلول کمک می‌نماید. قطر این مجرا در این باکتری حدود ۲ نانومتر است و در انتقال یون‌ها (کاتیون‌ها) نیز دخالت دارد. ولی نکته جالب توجه آن است که ملکول‌های فوق (پورین) جزء پروتئین کوچک در پوشش سلولی میکوباکتریوم‌ها می‌باشند (برخلاف آنتروباکتریاسه پروتئین بزرگ<sup>۲</sup> هستند) و بنابراین تنها اجازه نفوذ به ملکول‌های خیلی کوچک‌تر و تعداد کمتری از مواد قطبی می‌دهد که به همین دلیل ورود چنین موادی به داخل سلول با مشکل مواجه می‌شود (۲۱). در انتقال گلوکز، وجود پورین با وزن ملکولی ۴۰،۰۰۰ دالتون که به صورت یک منفذ در داخل لیپیدهای آب‌گریز قرار می‌گیرد، کاملاً تأیید شده است. این پورین در انتقال بعضی از اسیدهای آمینه نیز دخیل می‌باشد، اما در مقام مقایسه با پورین در باکتری‌های گرم منفی پورین در این باکتری‌ها کمتر است و سرعت انتشار مواد فوق از طریق این مجرا در میکوباکتریوم‌ها حدود  $10^{-8} \times 10^{-6} - 17$

<sup>۱</sup> porin

<sup>۲</sup> major porin

<sup>۳</sup> Clarithromycin



تصویر ۲: مقایسه سرعت نفوذ مواد مختلف در اثرشیاکلی، سودوموناس اتروژینوزا و میکوباکتریوم چلونه‌ای

یعنی ریفامیسین<sup>۱</sup> صدق می‌کند (۲۶).

از بین فلوروکینولون‌ها، آب‌گریزترین مشتق آن یعنی اسپارفلوکساسین<sup>۲</sup> روی میکوباکتریوم آویوم مؤثرتر از بقیه مشتقات است و زمانی اسپیروفلوکساسین اثر مناسب‌تر روی میکوباکتریوم‌های توپرکلوزیس نشان می‌دهد که بدان ریشه آلکیل اضافه شود (۱۸).

عواملی که بتوانند در هر کدام از این دو راه تغییری ایجاد نمایند، در نفوذ مواد به داخل سلول هم تغییر ایجاد می‌کنند. برای اثبات نقش دیواره سلولی میکوباکتریوم توپرکلوزیس در کندی رشد این باکتری، شواهد متعددی موجود است: آمینوگلیکوزیدها روی ریبوزوم موجود در عصارة سلولی میکوباکتریوم خیلی مؤثرتر از ریبوزوم درون سلولی می‌باشند. این خود نشان می‌دهد که وجود دیواره از رسیدن دارو به ریبوزوم جلوگیری می‌کند و یک سد در مقابل ورود ترکیب آب‌دوست است (۱۸).

این یافته در نفوذ ترکیبات آب‌دوست دیگر مثل سفالوسپورین‌ها نیز تأیید شده است. میزان نفوذپذیری سفالوسپورین از دیواره میکوباکتریوم اسمگماتیس که تندرشد

است، ده برابر بیش از چلونی است که کندرشد می‌باشد. به طور کلی جارلیبر نشان داد که در انواع بسیار کندرشد میزان نفوذپذیری دیواره ۱۰۰ برابر کمتر از انواع بسیار تندرشد است و بیش از ۱۰<sup>۴</sup> مرتبه کمتر از اثرشیاکلی است (۱۸) (تصویر ۲). بالا بودن مقاومت نسبت به اسیدها و بازها و سایر عوامل ضد عفونی کننده نیز می‌تواند ناشی از همین پوشش لپیدی باشد (۱۲ و ۲۰ و ۲۷). برخی محققان با افزودن داروهای مهارکننده بیوسنتز دیواره سلولی مثل ایزونیاژید، اتامپوتول، وانکوماسین و کلستین و نیز ترکیباتی که مانع از سنتز اجزای آمفی‌پایتهک غشای خارجی می‌گردند، مثل m فلور و فنیل‌آلانین توانستند نفوذ مولکول‌های آب‌دوست مثل بتاستیواسترول را به داخل غشاء و تبدیل آن به محصولات AD و ADD ۲-۳ برابر زیاد نمایند که از نقش پوشش در ممانعت از نفوذ مواد قطبی به داخل سلول حکایت می‌کند (۲۸).

در گونه‌هایی که به طور ذاتی آنزیم بتالاکتاماز تولید می‌کنند، آنزیم بعضاً به صورت مخفی و درون سلولی است، چون هیدرولیز دارو در باکتری لیز شده، خیلی سریع‌تر از میکوباکتریوم سالم است (۱۶ و ۱۷)، یعنی این لایه در مقابل خروج مواد یا آنزیم‌های ترشحی نیز به عنوان سد عمل می‌کند.

با توجه به آن که بخش عمده‌ای از دیواره را چربی و به خصوص میکولیک اسید می‌سازد که در ممانعت از نفوذپذیری، می‌تواند نقش فعالی داشته باشد، روی اثر ایزونیاژید، بسیار کار شده است، چون این دارو باعث توقف سنتز میکولیک اسید شده و باعث از بین رفتن خاصیت مقاومت به اسید و حتی تغییر در رنگ‌پذیری باسیل سل می‌شود. غلظت ۰/۲ ≥ میکروگرم در میلی‌لیتر آن اثر مهارکنندگی قوی بر رشد اکثر سویه‌های باسیل سل دارد (۲۹). ولی در دوز پایین‌تر از حد، ممانعت‌کنندگی از رشد

<sup>۱</sup> Rifamycin

<sup>۲</sup> Spar Floxacin

میکوباکتریوم اویوم کمپلکس (MAC) نسبت به داروها استفاده نمود (۳۷) و جاگنات، در مطالعه‌ای دقیق از آن برای افزایش حساسیت سویه‌های MDR باسیل سل نسبت به داروهای ضدسلولی استفاده کرد. در این مطالعه، MIC سویه‌های تیمار شده با اتامبوتول دی‌متیل سولفاکساید (DMSO) نسبت به ایزونیاژید ۱۶-۴ برابر و نسبت به ریفامپین و استریتومايسين ۶۴-۱۶ برابر کاهش یافت (۳۸).

اتانول به عنوان ترکیب شیمیایی که از طریق تقلیب پروتئین‌ها و نیز حل چربی‌ها می‌تواند در دیواره مملو از چربی و پروتئین میکوباکتریوم تأثیر بگذارد (۳۹) و غلظت‌های بالای آن می‌تواند کشنده میکوباکتریوم باشد، از جمله عواملی است که غلظت مناسب و پایین‌تر از دوز کشنده آن، باعث ایجاد منافذ مفید در دیواره شده و ورود مواد غذایی به داخل باسیل را تسهیل می‌کند.

در مطالعه ما مشخص گردید که بهترین غلظت اتانول که چنین خاصیتی را دارد، غلظت ۰/۵ درصد آن در محیط لئون‌اشتاین می‌باشد که می‌تواند رشد سویه‌های M.tub را ۳-۷ روز تسریع نماید. همچنین اتانول میزان نفوذ ترکیبات قطبی مثل نیترات سدیم به داخل سلول را تشدید و تقویت می‌کند، چون رشد در این حالت، سریع‌تر و ظهور کلنی در زمان کوتاه‌تری انجام می‌شود. این می‌تواند به علت ایجاد منافذی با قطر مناسب در دیواره چند لایه این باکتری باشد، که راه را برای ورود مواد غذایی و اکسیژن هموار می‌نماید (۴۰).

مطالعه برمودس در سال ۱۹۹۱ نیز نشان داد که اتانول اگر در غلظت مناسب ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به محیط 7H11 اضافه شود، باعث تقویت رشد سویه‌های MAC می‌گردد (۴۱) و میزان آزادسازی پروتئین‌های ترشحی را بیشتر می‌نماید (۴۲). این نشان می‌دهد ایجاد منافذ مناسب در دیواره است که

می‌تواند باعث تغییرات چندی در پوشش سلول گردد. از جمله تولید میکولیک اسید به وسیله باکتری تا ۲۰ درصد کاهش می‌یابد (۳ و ۳۰)، در نتیجه نفوذپذیری سلول، بیشتر می‌شود و به خصوص در قطب‌ها، منافذی ایجاد می‌کند و تنفس سلولی افزایش می‌یابد (۱۸). همچنین ایزونیاژید با دوز Sub Mic (۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر)، می‌تواند باعث افزایش ترشح انواع مختلف پروتئین‌ها مثل اجزاء آنتی‌ژن کمپلکس ۸۵ گردد (۳۱). این نشان می‌دهد که میکولیک اسید نه تنها در مقابل ورود مواد غذایی مانع ایجاد می‌کند، بلکه از خروج پروتئین‌های ترشحی و دفعی میکوباکتریوم‌ها، ممانعت به عمل می‌آورد (۳۱). این یافته در حضور غلظت پایین اتانول در کشت میکوباکتریوم آویوم کمپلکس (MAC) در ماکروفازها نیز تایید شد. زیرا در این حالت انواع مختلفی از پروتئین‌های ترشحی مثل پروتئین‌های ۲۷، ۳۳، ۴۵ و ۶۵ از MAC افزایش یافت (۳۲).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که در سویه‌های M.tub مقاوم به ایزونیاژید، رشد، با غلظت پایین ایزونیاژید تقویت می‌شود، این واقعیت در مطالعه رهبر در ایران نیز مورد تایید قرار گرفت، زیرا رشد سویه‌های فوق در محیطی که حاوی ۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر ایزونیاژید بود، دو روز سریع‌تر از محیط‌های کنترل بود (۳۳). در مطالعه ما (۳۴) نیز مشخص شد که علاوه بر سویه‌های مقاوم، غلظت‌های پایین ایزونیاژید، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، نیز می‌تواند رشد را تسریع نماید.

اتامبوتول هم که از داروهای اصلی ضدسلولی است از طریق مهار سنتز آرابینیان از ایجاد آرابینومانان و آرابینوگالاکتان جلوگیری کرده و یا رشته‌های ناقصی از آنها، با غلظت مناسب اتامبوتول ایجاد می‌شود (۱۵ و ۳۶).

راستوگی، از این داروها برای افزایش حساسیت سویه‌های



همیشه با موفقیت همراه نبوده است، زیرا امروزه به خوبی مشخص شده که در اکثر موارد، بروز مقاومت‌ها، ناشی از تغییرات ژنتیکی است و تنها در درصد معدودی به علت تغییر در نفوذپذیری دیوارهٔ باسیل می‌باشد، اما محققین برای استفاده از این مواد، جهت ورود مواد غذایی مناسب برای تسریع رشد میکوباکتریوم‌ها تلاش کمی به عمل آورده‌اند.

به نظر ما یکی از راه‌های ارزان‌قیمت برای کاهش زمان ظهور کلنی و تقویت رشد سویه‌های M.tub برای جداسازی آن از نمونه‌های بیماران، تلقیح آنها در محیط حاوی غلظت مناسب و پایین یک ماده افزایش‌دهنده نفوذپذیری دیوارهٔ سلولی است تا بدین طریق بر مشکل کندی رشد این باکتری غلبه کرده و رشد را تسریع نمایند. در این زمینه، افزودن ۰/۵ درصد اتانول به محیط لوون اشتاین می‌تواند انتخاب مناسبی باشد (۴۴).

هم راه ورود مواد غذایی را باز، و هم آزادسازی پروتئین‌های ترشحی را تقویت می‌کند.

استریتومايسين با اثرگذاری روی پروتئین‌های دیواره به خصوص پورین‌ها (۱) DMSO به عنوان یک حلال باعث حل شدن مواد آب‌دوست و چربی‌دوست شده (۴۳) و از آن برای نفوذپذیر کردن دیوارهٔ سلولی برای تسهیل کشتن میکوباکتریوم مقاوم به چند دارو یا افزایش حساسیت سویهٔ مقاوم به داروهای ضدسلولی استفاده شده است (۳۸).

از توئین ۸۰ نیز به همین منظور به خصوص در سویه‌های M.tub مقاوم به استریتومايسين استفاده شده است. این مطالعات، همگی دلالت بر این امر دارند که محققین در تلاش بوده‌اند برای مبارزه با سویه‌های مقاوم به چند دارو MDR باسیل سل، نفوذپذیری دیواره را افزایش دهند و بر این اصل تأکید داشته‌اند که افزایش نفوذپذیری دیوارهٔ سلولی به کاهش مقاومت باکتری، کمک می‌کند. ولی این روش‌ها

## منابع

- 1) ROM WM & Garay SM. Tuberculosis. Little brown company. 1996; Chap 2:13.
- 2) Willett HP. Mycobacterium. In: Zinsser microbiology by Joklik WK, Willett HP, Amos B, Wilfert C. Appleton & Lange Inc. 19th edition. 1992; Chap 31: 497-525.
- 3) ضیاظریفی، ابوالحسن. زیست‌شناسی و باکتری‌شناسی میکوباکتریوم‌ها. انتشارات ابوریحان. چاپ اول. ۱۳۶۶. فصول ۱۸ و ۱۴. صفحات ۳-۱۰.
- 4) ولایتی، علی‌اکبر. ضیاظریفی، ابوالحسن. طباطبایی، سیدجواد و مسجدی، محمدرضا. مبانی سل‌شناسی. دفتر نشر فرهنگ اسلامی. ۱۳۷۱. فصل دوم. صفحات: ۸۸-۳۹.
- 5) ادیب‌فر، پرویز. میکروبی‌شناسی پزشکی. چاپ اول. تهران. نشر ایران. ۱۳۶۸. صفحات: ۳۳۲-۳۳۱.
- 6) Goodfellow M and Wayne L. Taxonomy and Nomenclature. In: Ratlidge C & Stanford JL. Biology of Mycobacteria. Academic press Inc. vol 1. First edition. London. 1982; 268-269.

- 7) Sneath PA, Mair NS, Sharpe ME & Holt JG. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol2. Williams & Wilkins. 9th edition. New York. 1986; Sect 16: 1435-1437.
- 8) Paul S, Beveridge TJ. Comparable growth of virulent and avirulent M. Tuberculosis in human macrophage invitro. J Infect Dis. 1996; 174 (1): 105-112.
- 9) Ratlidge C. Nutrition growth and metabolism. In: Ratlidge C and Stanford J. Biology of mycobacteria. Academic press Inc. First edition. London. 1982; Vol 1. 53-92 & 186-211.
- 10) Bremer H & Davis PP. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell growth rate. In: Neidhart JL. E.coli and Salmonella typhimurium, cellular and Molecular Biology. First edition. Washington D.C, ASM. 1987; 1527-1542.
- 11) Genzales JA, Colston MJ & Cox RA. The rRNA

operons of mycobacterium smegmatis and mycobacterium tuberculosis. Comparison of promotor elements and of neighbouring upstream genes. *Microbiol* 1996; 142(3): 667-674.

12) Lemassu A, Ortals-Mangnal A, Bardou F, Silve G, Laneelle MA, Daffe M. Extracellular and surface exposed poly saccharids of nontuberculosis mycobacteria. *Microb* 1996; 142(6): 1513-1520.

13) Ortalo MA, Lemassu A, Lanneelle MA. Identification of the surface – exposed lipids on the cell enveloped of M.tub and other mycobacterial species. *J Bacte* 1996; 178(2): 456-461.

14) Dubnau E, Soares S, Hung TJ. Over production of mycobacterial ribosomal protein S13 induced catalase/peroxidase activity and hypersensitivity to isoniazid in M.smegmatis. *Gene* 1996; 170, 17-22.

15) Khoo KH, Douglas E, Asadi P, Wilkins E. Truncated structural variations of lipoarbinomannan in Ethambutol drug – resistant strains of M.smegmatis. Inhibition of Arabinan Biosynthesis by Ethambutal. *J Biol Chemis.* 1996; 271(45): 28682-28690.

16) Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microb Lett.* 1994; 123(1-2): 11-18.

17) Wolinsky E. Mycobacteria. In: *Microbiology*. Edited by Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. 4th edition. Lippincott. Philadelphia. 1990, 647-664.

18) Schaefer WB. Effect of Isoniazid on the dehydrogenase activity of M.tub. *J Bact.* 1960; 79: 236-245.

19) Meier A, Sander P, Schaper KJ. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance level in streptomycin – Resistant M.tub. *Antimicrob Agent & Chem.* 1996; 40(11): 2452-2454.

20) Ortalo MA, Dupont MA, Lemassu A. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacilli. *Microbiology.* 1995; 141(7): 1609-1620.

21) Trias J, Jarlier V & Benz R. Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science.* 1992; 258: 1479-1481.

22) Ariza RR, Cohen SP, Bechawat N. Repressor

mutations in the mar RAB operon that active oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in E.coli. *J Bact.* 1994; 152: 636-642.

23) Mukhopadhyay S, Basu D, Chakrabarti P. Characterization of a porin from M.Smegmatis. *J Bact.* 1997; 179(19): 6205-6207.

24) Doverl Ratledge C. Identification of a 29KD protein in the envelope of M.Smegmatis as a putative ferri – exochelone receptor. *Microb.* 1996; 142: 1521-1530.

25) Rastogi N, Gohk S. Action of 1-Isonicotinyl-2-palmitoyl hydrazide against the mycobacterium avium complex and enhancement of its activity by m-fluorophne yalanine. *Antimicrob Agent & Chemo.* 1990; 34: 2061-2064.

26) Heifets LB, Lindhom Lev PJ, Flory MA. Bactericidal activity invitro of various rifamycins against M.avium and M.tuberculosis. *Am Respir Dis.* 1990; 141: 626-630.

27) Best M, Sattar SA, Springthorpe VS & Kennedy ME. Efficacies of selected disinfectants against Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microb.* 1990; 28(10): 2234-2239.

28) Sedlaczek L, Gormiski BM & Lisowska K. Effect of inhibitors of cell envelope synthesis on beta-sito sterol side chain degradation by mycobacterium SP. NRRL MB 3683. *J Basic Microb.* 1994; 34(6): 387-399.

۲۹) رستگار، مژگان. پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی «بررسی و فزور میکوباکتریوم های محیطی در منطقه مازندران به وسیله کشت خاک». دانشکده بهداشت - دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۷۱-۱۳۷۰.

30) Bardou F, Quemard A, Dupont MA. Effects of Isoniazid on ultrastructure of mycobacterium aurum and M.tuberculosis and on production of secreted proteins. *Antimicrob Agent & Chemo.* 1996. 40(11): 2459-2467.

31) Garbe TR, Hibler NS & Deretic V. Isoniazid induced expression of the antigen 85 complex in M.tuberculosis. *Antimicrob Agent & Chemo.* 1996; 40(7): 1754-1756.

32) Bermudez LE, Young LS, Martinelli J & Pertrofsky M. Exposure to Ethanol Up-regulations the expression of mycobacterium avium complex proteins associated with bacterial virulence. *J Infect*

Dis. 1993; 168: 961-968.

۳۳) رهبر، محمد. پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری در رشته میکروبیولوژی «بررسی مقاومت دارویی میکوباکتریوم توبرکلوزیس در استان آذربایجان غربی و ارزیابی نقش مقاومت در سرعت رشد و ویروانس باکتری». دانشگاه تربیت مدرس. ۱۳۷۵. صفحات: ۱۴-۲۱۳.

۳۴) قائمی، عزت‌الله. پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری در رشته میکروبیولوژی «بررسی اثر آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل شیمیایی افزایش‌دهنده نفوذپذیری دیواره سلولی در تسریع رشد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس». دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران. سال ۷۷-۱۳۷۶.

35) Hoof Nagle JH. Hepatitis. In : Principles and practice of infectious disease. Mandell GL, Douglas RG & Bennett JE. 3rd edition. New York. Churchill Livingstone. 1990; 91: 350-352.

36) Sareen M, Khuller GK. Cell wall and membrane changes associated with ethambutol resistance in mycobacterium tuberculosis H37Ra. Antimicrob Agent & Chemo. 1990; 34: 1773-1776.

37) Rastogi N, Gohk S, David HL. Enhancement of drug susceptibility to mycobacterium avium by inhibitor of cell envelope synthesis. Antimicrob Agent & Chemo. 1990; 34: 759-764.

38) Jagannath C, Reddy V, Gangadhara PR. Enhancement of drug susceptibility of MDR strains

of mycobacterium tuberculosis by ethambutol and DMSO. J Antimicrob Agent & Chem. 1995; 35(3): 381-390.

۳۹) ایماندل، کرامت‌الله. گندزداها و ضدعفونی‌کننده و کاربرد آنها در بهداشت محیط زیست. چاپ اول. تهران، انتشارات آینه کتاب. ۱۳۷۴. صفحات: ۱۱۳-۱۰۴.

۴۰) قائمی، عزت‌الله و همکاران. بررسی اثر اتانول در نفوذپذیری مواد غذایی به داخل سلول میکوباکتریوم توبرکلوزیس. کنگره سراسری سل کاشان. سال ۱۳۷۷.

41) Bermudez LE & Young LS. Ethanol augments intracellular survival of mycobacterium avium complex and impairs macrophages responses to cytokines. J Infect Dis. 1991; 163: 1286-1292.

42) Greenberg S, Xie J, Kolls J. Ethanol suppresses mycobacterium tuberculosis induced mRNA for nitric oxide synthase in Alveolar macrophages in vivo. Alcohol Clin and Exper Reser. 1995; 19(2): 394-401.

43) Windholz M, Budavari S. The merck index. An encyclopedia of chemicals. Drugs and Biologics. 10th edition. New York: Merck & Co Inc. 1983; 207, 208, 971, 475.

۴۴) قائمی، عزت‌الله و همکاران. بررسی اثر اتانول در تقویت رشد سویه‌های میکوباکتریوم توبرکلوزیس. کنگره سراسری سل کاشان. ۱۳۷۷.

Archive of SID