مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان / پاییز ۱۳۸۷ / دوره ۱۰ / شماره ۳ (پی در پی ۲۷) / صفحات ۱۱ تا ۱۸

تحقیقی

تغییرات مرفولوژیک مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بعد از مجاورت با عصاره کلروفرمی سیر

دکتر عباسعلی ایمانی فولادی*[1]، دکتر مرتضی ستاری[2]، دکتر کیومرث قاضی سعیدی[3]

۱- استادیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی.

۲- دانشیار گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس. ۳- استاد گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران.

چکیده

زمینه و هدف : *بیماری سل یکی از مشکلات بهداشتی جهان است. مقاومت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیاز دستیابی به داروهای جدید را به طور جدی مطرح ساخته است. سیر به عنوان یکی از گیاهان دارویی سرشار از موادی است که می‌تواند در درمان عفونت‌های میکروبی کاربرد داشته باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی تغییرات مرفولوژیک مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بعد از مجاورت با عصاره کلروفرمی سیر بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه in vitro مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه استاندارد H37RV و سویه‌های جدا شده از بیماران با غلظت‌های مختلف عصاره کلروفرمی سیر در زمان‌های ۱۲و۲۴و۴۸ و ۷۲ ساعت در محیط آبگوشتی میدل بروک 7H9 Broth و محیط لون استاین جانسون کشت داده شد. تغییرات شکلی باکتری در مطالعه میکروسکوپی بر روی مرفولوژی باکتری و در مطالعه ماکروسکوپی شکل ظاهری، قوام و سطح کلنی ایجاد شده در محیط لون استاین جانسون بررسی شد.*

یافته‌ها : *مجاورت عصاره کلروفرمی سیر با باکتری موجب تبدیل کلنی باکتری از شکل خشن با سطح گل کلمی به حالت صاف و موکوئیدی شد. در مطالعه میکروسکوپی در زمان‌های مختلف تغییرات شکلی باکتری از باسیل به کوکسی به خوبی مشهود بود. همچنین مشخص شد که در زمان‌های ۴۸و۷۲ ساعت مجاورت غلظت ۰/۶۷mg/ml از عصاره سیر با سویه حساس استانداردH37RV و سویه‌های کلینیکی مقاوم به دارو جدا شده از بیماران اثر مهاری دارد.*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد که از نظر تغییرات مرفولوژی، باسیل سل در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج و کنترل منفی باعث تبدیل باکتری از حالت باسیلی به کوکوباسیل و تغییر کلنی از ظاهری خشن به صاف شده و میزان رشد را کاهش می‌دهد.*

کلید واژه‌ها: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، عصاره سیر، مقاومت دارویی، تغییرات مرفولوژی*

---

* نویسنده مسؤول : دکتر عباسعلی ایمانی فولادی ، پست الکترونیکی : **imanifouladi.a@gmail.com**

نشانی : تهران ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) ، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی ، تلفن : ۸۸۰۳۹۸۸۳ (۰۲۱) ، نمابر : ۸۸۰۳۹۸۸۳

وصول مقاله : ۸۶/۱۰/۱۸ ، اصلاح نهایی : ۸۷/۳/۲۵ ، پذیرش مقاله : ۸۷/۴/۲۵

مقدمه

بیماری سل از بیماری‌های قدیمی و با مرگ ومیر بالا می‌باشد. این بیماری پس از یک کاهش دوره‌ای، در نقاط مختلف جهان شیوع مجددی داشته است. اپیدمی عفونت ایدز موجب افزایش تعداد موارد سل به خصوص در آفریقا و آسیای جنوب شرقی گردیده است. در بسیاری از کشورهای صنعتی نیز موارد سل رو به افزایش است. مثلاً در کشورهای اروپای شرقی و اتحاد جماهیر شوروی سابق موارد مرگ و میر ناشی از سل افزایش یافته است (۱). تعداد موارد جدید سل ۲۰۰ مورد در ۱۰۰۰۰۰ نفرگزارش شده است (۲). افزایش تعداد بیماران و رشد میزان مرگ و میر ناشی از سل در سال‌های اخیر به خصوص در بین افراد آلوده به ویروس ایدز همراه با پیدایش مایکوباکتریوم‌های مقاوم به دارو (خصوصاً مقاوم به دو داروی اصلی در درمان سل ایزونیازید و ریفامپین) منجر به پیچیده شدن درمان سل گردیده است. سالیانه بیماران جدید مبتلا به سل مقاوم به دارو در دنیا رو به افزایش است. در سال ۲۰۰۰ موارد جدید سل مقاوم به دارو ۲۷۳۰۰۰ نفر بود و در سال ۲۰۰۳ به ۴۵۸۰۰۰ نفر رسید و تخمین زده می‌شود که در حال حاضر به دو یا سه برابر سال ۲۰۰۳ افزایش یافته است (۲و۳). امروزه مقاومت دارویی در بعضی از کشورها به صورت یک معضل بهداشتی درمانی بدل شده است و روز به روز بر تعداد افرادی که بعد از گذشت چند هفته از شروع درمان با شکست روبرو هستند، افزوده می‌شود. لذا تلاش‌های جدی به منظور حذف مقاومت دارویی و دستیابی به داروهای جدید ضدسلی یک ضرورت است. رویکرد محققین به استفاده از داروهای گیاهی در درمان بیماری‌ها و حذف عوامل عفونی روز به روز افزایش می‌یابد و نویدبخش آن است که داروهای جدید ضدسلی با منشاء گیاهی مشکل مقاومت دارویی را حل کنند. در حال حاضر نزدیک به ۷۰درصد داروهای شیمیایی موجود در بازار مشتق از گیاهان است (۴). سیر از جمله گیاهان مورد استفاده در طب سنتی است که از قدیم در چین، روم باستان و مصر مورد استفاده قرار می‌گرفت. سیر حاوی مواد مختلفی از قبیل مواد معدنی مثل سدیم، پتاسیم، فسفر، کلسیم، آهن و مواد آلی مثل پروتئین‌ها، هیدرات‌های کربن، چربی، ترپنوئیدها، آنزیم‌ها، پروستاگلاندین‌ها، آلیساتین، آلوئن و آلیسین است (۴). آلیسین موجود در سیر از طریق عصاره کلروفرمی استخراج می‌شود که اثرات ضدمیکروبی گسترده‌ای دارد (۵). از طرفی شناخت مکانیسم اثر دارو در حذف مقاومت دارویی کمک کننده است. از آنجایی که اثر ضد مایکوباکتریومی عصاره کلروفرمی سیر اثبات شده (۶)، ضروری است که مکانیسم اثر آن بررسی گردد. هدف از انجام این مطالعه بررسی تغییرات مرفولوژیک مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بعد از مجاورت با عصاره کلروفرمی سیر بود.

روش بررسی

در این مطالعه in vitro مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از سویه H37RV مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به عنوان سویه استاندارد و یک سری سویه جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان مسیح دانشوری (A، B، C، D) با الگوی مقاومت دارویی مشخص استفاده گردید.

حساسیت سویه استاندارد H37RV و جدایه‌های بالینی (A، B، C، D) در مقابل چهار آنتی‌بیوتیک رایج در درمان سل (ریفامپین، ایزونیازید، اتامبوتول و استرپتومایسین) به روش استاندارد بررسی شد. سویه استاندارد H37RV حساس به چهار دارو، سویهA مقاوم به چهار دارو، سویه B مقاوم به دو دارو و سویه C وD حساس به چهار دارو بودند (جدول ۱).

۵۰۰ گرم از غوزه‌های سیر پوست کنده (از نواحی همدان) به روش ارائه شده توسط Delaha با کلروفرم عصاره‌گیری شد (۷و۸).

جدول ۱ : مشخصات آنتی‌بیوگرام به روش استاندارد در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد آزمایش

	ریفامپین ۴µg/ml	ایزونیازید ۰/۲µg/ml	اتامبوتول ۲µg/ml	استرپتومایسین ۴µg/ml
سویه استاندارد H37RV	حساس	حساس	حساس	حساس
جدایه A	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
جدایه B	مقاوم	حساس	حساس	مقاوم
جدایه C	حساس	حساس	حساس	حساس
جدایه D	حساس	حساس	حساس	حساس

جدول ۲ : نتایج اثر مهاری عصاره کلروفرمی سیر حاوی آلیسین و آنتی‌بیوتک‌های رایج روی سویه‌های بالینی و استاندارد در مدت ۱۲و۲۴و۴۸ ساعت مجاورت (نتایج ۷۲ ساعت مجاورت مشابه با ۴۸ ساعت مجاورت بود.)

		استاندارد H37RV	جدایه A	جدایه B	جدایه C	جدایه D
۰/۶۷ mg/ml	۴۸ ساعت	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
	۲۴ ساعت	حساس	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس
	۱۲ ساعت	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
۱/۳۴ mg/ml	۴۸ ساعت	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
	۲۴ ساعت	حساس	مقاوم	حساس	حساس	حساس
	۱۲ ساعت	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
۲/۶۸ mg/ml	۴۸ ساعت	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
	۲۴ ساعت	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
	۱۲ ساعت	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
۵/۳۶ mg/ml	۴۸ ساعت	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
	۲۴ ساعت	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
	۱۲ ساعت	حساس	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس
ریفامپین ۴μg/ml	۴۸ ساعت	حساس	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس
	۲۴ ساعت	حساس	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس
	۱۲ ساعت	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
ایزونیازید ۰/۲μg/ml	۴۸ ساعت	حساس	مقاوم	حساس	حساس	حساس
	۲۴ ساعت	حساس	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس
	۱۲ ساعت	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
اتامبوتول ۲μg/ml	۴۸ ساعت	حساس	مقاوم	حساس	حساس	حساس
	۲۴ ساعت	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
	۱۲ ساعت	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
استرپتومایسین ۴μg/ml	۴۸ ساعت	حساس	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس
	۲۴ ساعت	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس
	۱۲ ساعت	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم

به منظور تعیین ماده موثره موجود در سیر یک میلی‌لیتر از آن در آون ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک و وزن شد. وزن ماده خشک برابر ۱۳۴ میلی‌گرم بود. این روش با لیوفیلیزاسیون نیز تایید گردید. با روش سریال رقت در محیط میدل بروک 7H9 Broth رقت‌های متنوع یک‌بیست‌وپنجم تا یک‌دویستم (۵/۳۶ mg/ml تا ۰/۶۷ mg/ml) از آن تهیه و در آزمایشات استفاده شد. رقت‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک‌های ایزونیازید ۰/۲μg/ml، ریفامپین ۴μg/ml، اتامبوتول ۲ μg/ml و استرپتومایسین ۴μ g/ml به همراه رقت‌های یک‌بیست‌پنجم تا یک‌دویستم از عصاره کلروفرمی سیر (۵/۳۶mg/ml تا ۰/۶۷mg/ml) در محیط کشت مایع میدل بروک 7H9 broth تهیه شد وسوسپانسیون باکتری از رقت‌های ۱-۱۰ و ۳-۱۰ و ۵-۱۰ تهیه شد و به میزان ۲۰۰ µl به محیط تلقیح و به مدت ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در زمان‌های فوق با تهیه گسترش میکروسکوپی از محیط حاوی باکتری برای بررسی تغییرات مرفولوژیک به روش زیل- نلسون رنگ‌آمیزی گردید.

به منظور بررسی خاصیت ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها و عصاره سیر پس از زمان‌های ۱۲ ، ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت مجاورت با آنتی‌بیوتیک‌ها و عصاره سیر، مایکوباکتریوم‌ها به محیط لون‌استاین جانسون پاساژ داده شدند و پس از ۴۱ روز انکوبه‌گذاری شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد نتایج آنتی‌بیوگرام

قرائت شد (جدول ۲). در یک رقت بالاتر از رقت مهار کننده، کلنی‌های ایجاد شده از نظر سطح (صاف و خشن بودن)، قوام و رنگ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایشات میانگینی از سه بار تکرار آزمایش بود که با آزمون t-test و نرم‌افزار SPSS-13 آنالیز گردید.

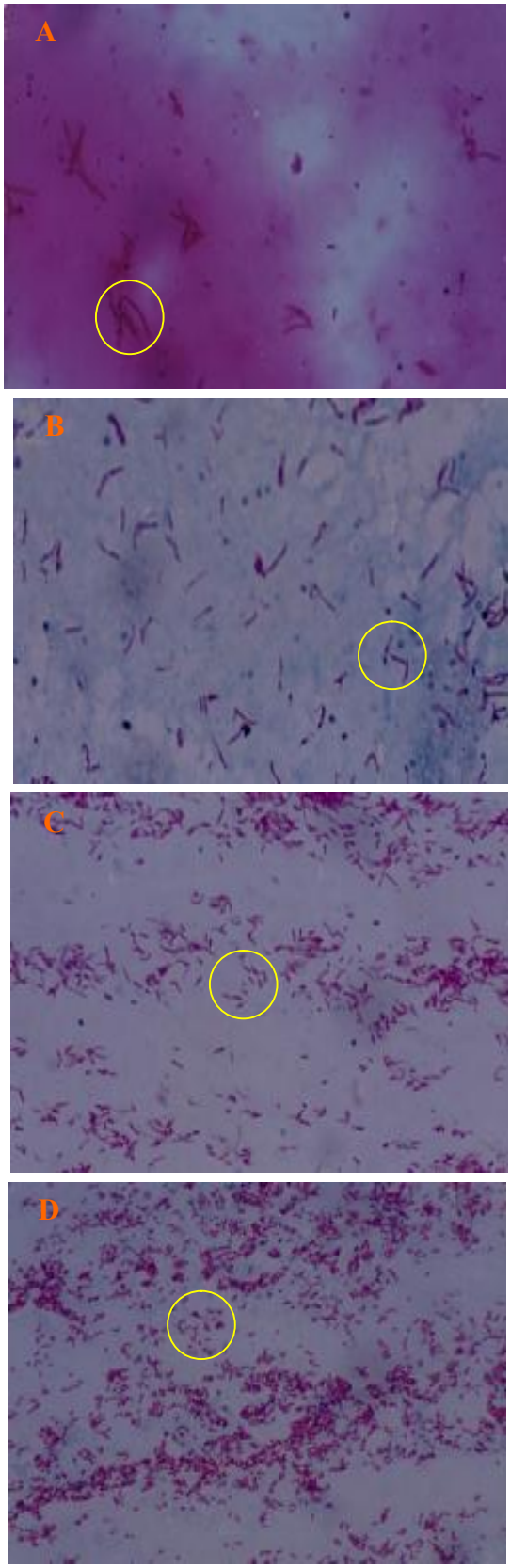
یافته‌ها

نتایج نشان داد که پس از مجاورت عصاره سیر با مایکوباکتریوم‌ها به مدت ۱۲ ساعت، سویه‌های حساس (C ،وD H37RV) نسبت به تمامی غلظت‌های (۱/۳۴mg/ml تا ۰/۶۷mg/ml) عصاره کلروفرمی سیر مقاومند و فقط در مقابل غلظت ۵/۳۶mg/ml حساسند، ولی سویه‌های مقاوم B،A به تمامی غلظت‌های عصاره سیر مقاوم بودند. تمامی سویه‌ها در طی این مدت در مقابل چهار آنتی‌بیوتیک رایج مقاوم بودند. آزمایشات میکروسکوپی نیز در مدت ۱۲ ساعت تغییرات مرفولوژیک محسوسی را نشان نداد (جدول ۲). تغییرات ماکروسکوپی محسوسی روی کلنی‌های ایجادی پس از پاساژ بر روی محیط لوناستاین جانسون مشاهده نشد.

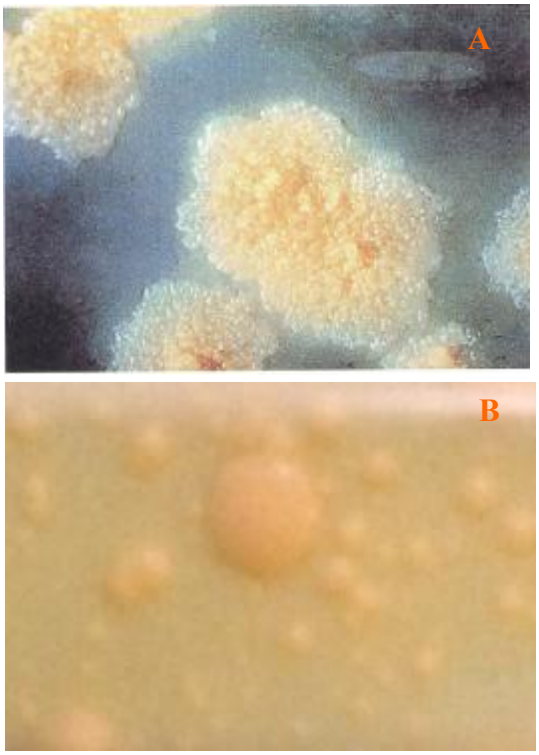
در طی۲۴ ساعت مجاورت سویه استاندارد H37RV با چهار آنتی‌بیوتیک و غلظت‌های مختلف عصاره سیر نشان داد که نسبت به تمامی آنها حساس است. سویه A نسبت به چهار آنتی‌بیوتیک مقاوم بود، ولی غلظت‌های ۵/۳۶ mg/ml و ۲/۶۸mg/ml عصاره سیر اثر مهاری بر رشد آن داشت، ولی غلظت‌های ۱/۳۴ mg/ml و ۰/۶۷ mg/ml تاثیری در مهار رشد آن نداشت. سویهB در این مدت در مقابل چهار داروی رایج مقاوم، ولی در مقابل غلظت‌های ۵/۳۶mg/ml تا ۱/۳۴mg/ml عصاره سیر حساس و در مقابل غلظت ۰/۶۷ mg/ml مقاوم بود. در طی زمان فوق سویهC در مقابل دو داروی ریفامپین و ایزونیازید حساس و در مقابل اتامبوتول و استرپتومایسین مقاوم و در مقابل تمامی غلظت‌های عصاره سیر حساس بود. سویه D در مقابل سه داروی ریفامپین، ایزونیازید و استرپتومایسین حساس و در مقابل اتامبوتول مقاوم بود. ولی در مقابل تمامی غلظت‌های عصاره سیر حساس بود. نتایج آزمایشات میکروسکوپی نشان داد که سویه‌های حساس به عصاره سیر از نظر شکل و اندازه در مقایسه با باسیل‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به عصاره سیر و سویه‌هایی که تحت تاثیر عصاره نبودند (کنترل منفی)، کوچک‌تر بودند و در برخی موارد به صورت کوکوباسیل نیز دیده شدند (شکل ۱). این تغییرات مرفولوژیک در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های رایج مشاهده نشد. در طی ۴۸ و ۷۲ ساعت مجاورت سویه استاندارد H37RV با چهار آنتی‌بیوتیک و غلظت‌های مختلف عصاره سیر نشان داد که نسبت به تمامی آنها حساسند.

سویهA نسبت به چهار آنتی‌بیوتیک مقاوم بود، ولی غلظت‌های ۵/۳۶ mg/ml تا ۰/۶۷ mg/ml عصاره سیر اثر مهاری بر روی رشد آن داشت. سویهB در این مدت در مقابل دو داروی ریفامپین و استرپتومایسین مقاوم و نسبت به ایزونیازید و اتامبوتول حساس بود. ولی در مقابل غلظت‌های ۵/۳۶mg/ml تا ۰/۶۷mg/ml عصاره سیر حساس بود. در زمان فوق سویه C و D در مقابل چهار داروی رایج و تمامی غلظت‌های عصاره سیر حساس بودند. این نتایج در ۷۲ ساعت مجاورت نیز تکرار شد و با نتایج آنتی‌بیوگرام به روش استاندارد مطابقت داشت. لذا مشخص شد که بهترین زمان مجاورت عصاره با باکتری زمان ۴۸ ساعت است. ولی در مقابل تمامی غلظت‌های عصاره سیر حساس است. نتایج بررسی آزمایشات میکروسکوپی روی گسترش‌های تهیه شده از محیط کشت حاوی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مجاور شده با عصاره سیر و آنتی‌بیوتیک‌ها به مدت ۴۸ و۷۲ ساعت نشان داد که سویه‌های حساس به عصاره سیر از نظر شکل و اندازه در مقایسه با باسیل‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به عصاره سیر و سویه‌هایی که تحت تاثیر عصاره نبودند (کنترل منفی)، به صورت کوکوباسیل و گاهی کوکسی دیده شدند (شکل ۱). این تغییرات مرفولوژیک در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های رایج کمتر مشاهده شد.

نتایج این آزمایشات حاصل سه بار تکرار آنها می‌باشد. قابل ذکر است که نتایج یک غلظت پایین‌تر از ۰/۶۷mg/ml تاثیری در رشد مایکوباکتریوم‌های توبرکلوزیس نداشت. تغییرات ماکروسکوپی محسوسی روی کلنی‌های ایجادی پس از پاساژ بر روی محیط لوناستاین جانسون در مقایسه با کنترل منفی دیده شد و کلنی باکتری از شکل خشن با سطح گل کلمی به حالت صاف و موکوئیدی تبدیل شد (شکل ۲).



شکل ۱ : مشاهده میکروسکوپی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش رنگ‌آمیزی ذیل نلسون با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر
A) باسیل سل در محیط غنی میدل بروک 7H9 broth ، B) باسل سل پس از ۱۲ ساعت مجاورت با عصاره سیر ، C) باسل سل پس از ۲۴ ساعت مجاورت با عصاره سیر ، D) باسل سل پس از ۴۸ ساعت مجاورت با عصاره سیر



شکل ۲ : A) کلنی سویه بالینی با سطح و کناره صاف و موکوئیدی مربوط به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس روی محیط لون استاین جانسون که با عصاره سیر مجاور شدن. B) کلنی سویه بالینی با سطح و کناره مضرس و حالت خشک و مربوط به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس روی محیط لون استاین جانسون که با عصاره سیر مجاور نبوده است.

بحث

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از کند رشدترین باکتری‌های با زندگی آزاد محسوب می‌شود. برای ظهور کلنی آن هفته‌ها وقت لازم است. کندی رشد این ارگانیسم دلایل مختلفی دارد که عبارتند از: میزان کم ژن rRNA در مقایسه با کل ژنوم باکتری (۹)، تعداد کم اپرون rDNA (۱۰)، مسیرهای تنفسی کم (۱۱)، میزان کم نسبت RNA به DNA در مقایسه با سایر باکتری‌ها مثلاً اشریشیاکلی (۱۲) و وجود پوشش ضخیم و چند لایه اختصاصی در مایکوباکتریوم‌ها. دیواره سلولی به عنوان یک سد تقریباً نفوذناپذیر در مقابل عوامل متعدد به خصوص ترکیبات آب دوست، اکسیژن و نمک‌های معدنی می‌باشد و نقش مهمی در مقاومت باکتری نسبت به اسیدها، بازها و آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. لذا استفاده از عوامل متعدد به منظور غلبه بر نفوذناپذیری این دیواره می‌تواند در افزایش حساسیت سویه‌های مقاوم به داروی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نقش داشته باشد. سال‌هاست که این موضوع در دست بررسی است.

Jagnannath در سال ۱۹۹۵ از دی متیل سولفوکساید و Taniguchi در سال ۱۹۹۶ از اتامبوتول استفاده کردند و حساسیت سویه‌های مقاوم را نسبت به ایزونیازید ۸ برابر و نسبت به ریفامپین و استرپتومایسین ۶۴-۱۶ برابر افزایش دادند (۱۳و۱۴). همچنین در حضور غلظت‌های پایین ایزونیازید و اتامبوتول نفوذپذیری دیواره سلولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ۳-۲ برابر افزایش یافت (۱۵). قائمی در سال ۱۹۹۷ اثر غلظت‌های مختلف استرپتومایسین را روی رشد و تغییرات ماکروسکوپی کلنی در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بررسی نمود و مشخص شد که در سویه‌های مقاوم به این دارو با افزودن ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین به محیط کشت، زمان ظهور کلنی ۷-۵ روز و در سویه‌های حساس به این دارو زمان ظهور کلنی ۵-۱ روز کاهش می‌یابد. همچنین نشان داد که در محیط لون‌استاین جانسون کلنی باکتری از نظر مرفولوژیک تغییر کرده و از کلنی زرد نخودی، خشن، خشک و با سطح مضرس به رنگ شیری با سطح پهن وگاهی تخت و موکوئیدی تغییر می‌کند (۱۶). مطالعه فوق از دوجنبه با مطالعه حاضر اختلاف و در یک جنبه مطابقت دارد. اولاً در تحقیق حاضر اثر یک گیاه دارویی (عصاره کلروفرمی سیر) در ایجاد تغییر مرفولوژیک مورد بررسی قرار گرفت که تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر استفاده از گیاهان دارویی به منظور بررسی تغییرات مرفولوژیک ماکروسکوپی و میکروسکوپی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انجام نشده است. ثانیاً در مطالعه قائمی اشاره‌ای به تغییرات میکروسکوپی باکتری نشده است. اما نتایج مربوط به تغییرات ماکروسکوپی کلنی باکتری در این دو مطالعه مشابه است و کلنی‌های صاف، موکوئیدی و شیری رنگ به دست آمده است. این تغییرات به حدی است که در نظر اول احتمال آلودگی را مطرح می‌کند و تنها با تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی و پاساژ مجدد آن روی محیط کشت فاقد دارو نشان می‌دهد که کلنی مربوط به سویه وحشی است نه آلودگی. از آنجایی که مکانیسم اثر استرپتومایسین در مهار سنتز پروتئین مایکوباکتریوم است و در غلظت‌های پایین‌تر از غلظت مهارکننده موجب تغییر شکل کلنی مشابه با تحقیق حاضر می‌گردد، می‌توان احتمال داد که عصاره سیر نیز در چرخه متابولیسمی مربوط به سنتز پروتئین تداخل ایجاد می‌کند. ازطرفی مشاهده تغییر مرفولوژی در سطح میکروسکوپی و تبدیل باسیل به کوکوباسیل احتمال تغییر در دیواره سلولی باکتری توسط عصاره سیر را هم مطرح می‌کند که در هر دو حالت نیاز به تحقیقات بیشتری است. مطالعه روی اثر آنتی‌بیوتیک و یا عصاره گیاهی روی مرفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به دلیل کندی رشد آن بسیار مشکل و زمان‌بر است و به همین دلیل کار مطالعاتی کمی در این زمینه وجود دارد. اما در مورد سایر باکتری‌ها مطالعات متعددی وجود دارد و تغییرات مرفولوژیک ناشی از مجاورت سلول‌های باکتریایی با غلظت‌های پایین‌تر یا مساوی با MIC آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه محققین بوده است. Lorian در سال ۱۹۸۲ مرفولوژی غیرمعمول از باکتری‌هایKelebsiella pnemoniae و Staphylococcus aureus در خلط بیماران تحت درمان با آنتی‌بیوتیک را گزارش کرد (۱۷). Braga در سال ۱۹۹۹ دریافت که نصف غلظت MIC آنتی‌بیوتیک روفلوکسازین باعث تغییرات مرفولوژیک و فیلامنتی شدن باکتری اشریشیاکلی می‌شود(۱۸). Drago در سال ۲۰۰۵ نشان داد که موکسی فلوکسازین روی مرفولوژی باکتری سودوموناس آئروژینوزا تاثیر دارد و موجب کروی شدن آنها می‌شود (۱۹).

Wojnicz در سال ۲۰۰۷ تغییرات مرفولوژیک ناشی از غلظت‌های پایین‌تر از MIC آمیکاسین و سیپروفلوکسازین را روی باکتری‌های Kelebsiella oxytoca ، اشریشیاکلی، Kelebsiella pnemoniae ، Acinetobacter calcoaceticus بررسی نمود و نشان داد که این آنتی‌بیوتیک‌ها سنتز اسیدنوکلئیک را مهار کرده و موجب متوقف شدن تقسیم سلولی شده و باکتری به شکل فیلامنتی دیده می‌شود. از طرف دیگر مشخص شد که با افزایش تغییرات مرفولوژیک در باکتری‌ها خاصیت چسبندگی آنها به سلول‌های اپی‌تلیال کاهش می‌یابد (۲۰). این موضوع را Tsang در بافت کلاژن ریه و باکتری سودوموناس به اثبات رسانده بود و نشان داد که مجاورت این باکتری با اریترومایسین موجب تغییر مرفولوژی باکتری و کاهش چسبندگی آن به کلاژن می‌گردد (۲۱).

از آنجایی که شناخت مکانیسم اثر دارو علیه

مایکوباکتریوم‌ها می‌توانند کمک بسیار موثری در پیدایش داروی جدید و استفاده مطلوب از آن شود، لذا در قدم اول این مطالعه تاثیر مستقیم عصاره سیر را روی ساختار مرفولوژیک باکتری در سطح میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار داد و مشخص گردید که از نظر مرفولوژی باسیل سل در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج و کنترل منفی تغییر مشهودی دارد. این نکته نویددهنده آن است که عصاره سیر احتمالاً روی دیواره سلولی باکتری تاثیر داشته و باعث نفوذپذیری آن در محیط مایع شده و باسیل قطعه قطعه می‌شود. از طرفی استفاده از این روش آنتی‌بیوگرام روتین سوالی که در زمینه نیمه‌عمر آنتی‌بیوتیک در محیط لوناستاین در سال ۱۹۸۴ توسط میتی‌سون مطرح شده است را مرتفع می‌کند (۲۲). البته اثبات این امر مستلزم تحقیقات بیشتر و در سطح میکروسکوپ الکترونی و مولکولی می‌باشد که نویسندگان سعی بر انجام آن دارند. در مورد اثر مستقیم عصاره سیر، در تحقیق قبلی ما مشخص شد که غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره سیر اثر مهاری بر سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در محیط لوناستاین جانسون دارد، اما در این تحقیق غلظت ۰/۶۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره سیر مانع رشد سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس گردید (۶و۷و۲۲). دلایل این اختلاف می‌تواند مربوط به اثر مستقیم عصاره سیر بر روی مایکوباکتریوم توبر کلوزیس باشد. در حالی که در تحقیق قبلی ماده موثره در محیط کشت قرار داشت و به طور مستقیم با باکتری مجاور نبود و مطالعه مرفولوژیک نیز این مطلب را تایید می‌کند.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که از نظر تغییرات مرفولوژی باسیل سل در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج و کنترل منفی باعث تبدیل باکتری از حالت باسیلی به کوکوباسیل و تغییر کلنی از ظاهری خشن به صاف شده است و میزان رشد را کاهش داده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از آقایان دکتر علی‌اکبر ولایتی، دکتر محمدرضا مسجدی و کارکنان محترم آزمایشگاه سل مرکز تحقیقات سل کشوری در بیمارستان مسیح دانشوری به خاطر همکاری در به نتیجه رسیدن این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1) WHO. Tuberculosis control and research strategies for the 1990. WHO metting Bull world Health organ. 1992; 70: 17-21.

2) Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(4):658-85.

3) Cheng X, Zhang J, Yang L, Xu X, Liu J, Yu W, et al. A new Multi-PCR-SSCP assay for simultaneous detection of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis. J Microbiol Methods. 2007;70(2):301-5.

4) Harris JC, Cottrell SL, Plummer S, Lloyd D. Antimicrobial properties of Allium sativum (garlic). Appl Microbiol Biotechnol. 2001; 57(3):282-6.

5) Imanifooladi A, Sattari M, Gazisaidi K. Effect of chloroform extract of garlic (Allicine) on sensitive and resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. American Society for Microbiology. General Meeting. Abstr Gen Meet Am Soc Microbiol. 1999; 99: 644 (abstract no. U-52).

6) Imani-Fooladi AA, Sattari M, Ghazi Saeidi K. Antimicrobial Effect of Chloroformic Garlic Extract on Mycobacterium Tuberculosis. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2006; 9(12): 2381-2383.

7) Delaha EC, Garagusi VF. Inhibition of mycobacteria by garlic extract (Allium sativum). Antimicrob Agents Chemother. 1985; 27(4): 485-486.

8) Imani Fouladi AA, Sattari M, Ghazi Saeidi K. [Effect of Garlic extract on Mycobacterium Tuberculosis.] Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences and Health Services. 2002; 25(9): 22-25. [Article in Persian]

9) 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 Bilogy. First Ed. Washington D.C. ASM. 1987; pp: 1527-1542.

10) Gonzalez-y-Merchand JA, Colston MJ, Cox RA. The rRNA operons of Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium tuberculosis: comparison of promoter elements and of neighbouring upstream genes. Microbiology. 1996; 142(Pt 3): 667-74.

11) Ratladge C. Nurtition growth and metabolism. In: Ratladge C, Stanford J. Biology of mycobacteria. Vol 1. 1st. London. Academic press Inc. 1982; pp: 53-92, 186-211.

12) Ghaemi E, Ghazi Saidei K. [The role of cell wall in growth rate of Mycobacterium Tuberculosis.] J Gorgan Uni Med Sci. 2002; 10(4): 66-76. [Article in Persian]

13) Taniguchi H, Aramaki H, Nikaido Y, Mizuguchi Y, Nakamura M, Koga T, et al. Rifampicin resistance and mutation of the rpoB

gene in Mycobacterium tuberculosis. FEMS Microbiol Lett. 1996;144(1):103-8.

14) Jagnannath C, Reddy VM, Gangadharam PR. Enhacement of drug susceptibility of MDR strain of mycobacterium tuberculosis by ethanol and DMSO. J Antimicrob Agent Chem. 1995; 35(3): 381-90.

15) Sedlaczek L, Górmiński BM, Lisowska K. Effect of inhibitors of cell envelope synthesis on beta-sitosterol side chain degradation by Mycobacterium sp. NRRL MB 3683. J Basic Microbiol. 1994; 34(6):387-99.

16) Ghaemi E, Ghazi Saedi K, Babai M. [The effect of different concentration of Streptomycin on growth enhancement of Mycobacterium Tuberculosis.] J Gorgan Uni Med Sci. 1999; 2(1): 11-20. [Article in Persian]

17) Lorian V, Waluschka A, Kim Y. Abnormal morphology of bacteria in the sputa of patients treated with antibiotics. J Clin Microbiol. 1982; 16(2):382-6.

18) Braga PC, Sala MT, Dal Sasso M. Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of rufloxacin on bacterial virulence factors. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(5):1013-9.

19) Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Tocalli L, Gismondo MR. Effect of moxifloxacin on bacterial pathogenicity factors in comparison with amoxicillin, clarithromycin and ceftriaxone. J Chemother. 2004; 16(1):30-7.

20) Wojnicz D, Kłak M, Adamski R, Jankowski S. Influence of subinhibitory concentrations of amikacin and ciprofloxacin on morphology and adherence ability of uropathogenic strains. Folia Microbiol (Praha). 2007;52(4):429-36.

21) Tsang KW, Ng P, Ho PL, Chan S, Tipoe G, Leung R, et al. Effects of erythromycin on Pseudomonas aeruginosa adherence to collagen and morphology in vitro. Eur Respir J. 2003; 21(3):401-6.

22) Satari M, Imani fooladi AA, Ghazisaeedi K. Antimicrobial effect of choloformic extracted from garlic against Mycobacterium Tuberculosis by modified method. Iranian Journal of Ifectious Disease and Tropical Medicine. 2000; 4(10): 91-96.