اثرات چربیهای مایکوباکتریومهای اتیپیک بر روی سلولهای ایمنی

نویسندگان: ، دکتر محمدرضاپورشفیع [1] ، دکتر محمد حسین نیکنام [2]

۱) استادیار گروه میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران
۲) عضو هیئت علمی گروه ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

خلاصه

در حدود ۱۲۰ سال از زمان کشف باسیل جذام توسط میکروب شناس نروژی(هنسن) و باسیل سل توسط میکروب شناس فرانسوی(کوچ) می گذرد و هنوز به دلیل پیچیدگی مایکوباکتریومها، بخصوص در ساختمان دیواره سلولی آنها، مشکلات زیادی در درمان بیماران مبتلا به این میکروبها وجود دارد. در دو دهه اخیر "مایکوباکتریومهای اتیپیک" مورد بررسی فراوانی قرار گرفته اند. مهمترین علت افزایش مایکوباکتریومهای اتیپیک در سالهای اخیر، عفونت بیماران ایدز با میکروب می باشد که به دلیل مقاومت میکروب به داروهای ضد سل در اغلب موارد درمان این بیماران ناموفق می باشد. وجود انتی ژنهای مختلف جمله گلایکوپپتایدولیپید از جایگاه خاصی برخوردار هستند. در این تحقیق برخورد آنتی ژن گلایکوپپتایدولیپید بر روی سلولهای ایمنی مورد بررسی قرار گرفت.

مقدمه

در سال ۱۹۵۴ اولین طبقه بندی «مایکوباکتریومهای اتیپیک» (Atypical mycobateria) را «رانین» با توجه به :

۱- شکل ظاهری کلونی، ۲- دانه های رنگی مایکوباکتریوم و ۳- سرعت رشد مایکوباکتریوم انجام داد[1]

اکثر «مایکوباکتریومهای اتیپیک» در یک گروه مشخص جای نمی گیرند زیرا که آنها دارای چندین خاصیت هستند و به این علت طبقه بندی مذکور با مشکلاتی مواجه شد.

مدتها بعد «شیفر» متوجه شد که «مایکوباکتریومهای اتیپیک» دارای انتی ژنهای خاصی هستند که می توان از آنها برای طبقه بندی مایکوباکتریومها استفاده کرد. او با خشک کردن مایکوباکتریومهاو جوشاندن آنها در متانول توانست انتی ژنهای خاص را جدا و سپس با تزریق به خرگوشها انتی بادی تولید کند(۲) . «شیفر» با استفاده از آنتی بادیها توانست ۳۱ نوع از «مایکوباکتریومهای اتیپیک» را که شامل مایکوباکتریوم اویوم (M. avium) ، مایکوباکتریوم انتراسلیولری (M. intracellulare) و مایکوباکتریوم اسکروفلاسوم (M. scrofulaceum) را شناسایی کند. به دلیل شباهتهای زیاد اویوم و انتراسلیولری، آن دو در یک گروه قرار داده شد و آنها را بعنوان «مجموعه مایکوباکتریوم اویوم» (M.avium comple) یا

«مک» (Mac) نامیدند. چربیها در ساختمان مایکوباکتریومها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. چهل تا شصت درصد از وزن مایکوباکتریومها را چربیها تشکیل می دهند که بدون شک در اکثر مشخصات مایکوباکتریومها چون رشد، رنگ‌آمیزی، مقاومت مایکوباکتریومها به داروها و غیره اثر می گذارند. از چربیهای شناخته شده واکس، عامل کرد (Cord Factor)، مایکوساید (Mycosides)، و گلایکوپپتایدولیپید (glycopeptidolipid) می باشد.

❑ روش تحقیق:

۱- در آزمایشها از موش حساس C57BL/6 استفاده شد. سلولهای طحال و صفاق موش بطریق استلیر جدا و در برخورد با گلایکوپپتایدولیپید تخلیص شده بمدت ۲۴ ساعت قرار گرفت.

۲- تخلیص کلایگوپپتایدولیپید، میکروب، در محیط Middlebrook 7H11 به مدت ۳ هفته کشت داده شد. برای تخلیص چربیها ابتدا از محلول کلولفرم و متانول به میزان ۲ : ۱ استفاده شد. سپس چربیها را از طریق کرومتاگرافی با استفاده از ذرات سلیکا (Silica gel) تخلیص گردید. وجود آنتی ژنهای اختصاصی کلایگوپپتایدولیپید با استفاده از Orcinol - Sulfuric acid قابل رؤیت می باشد.[۳]

۳- الکترون میکروسکوپی پس از کشت سلولهای موش با آنتی ژن، سلولها جدا و در بافر کوکدلیت (Cacodylate) که دارای ۳٪ گلوترالدهاید (Glutaraldehyde) می باشد بمدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس سلولها شسته شده و در بافرکوکدلیت که دارای ازمیوم (Osmium tetroxide) ۱٪ می باشد قرار گرفته شد. مراحل دیگر رنگ‌آمیزی نمونه انجام گرفت و سپس نمونه توسط الکترون میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت[۴].

❑ نتیجه و بحث

«مک» در خاک، گرد و غبار، آب، گیاهان خشک و جاهای دیگر بوفور یافت می شود و در بعضی از اشخاص این میکروب بطور طبیعی یافت می شود. وجود ایدز و سرطانها در رشد و تکثیر «مک» اثر می گذارد. «مک» عفونت ریوی را در بیماران مبتلا به ایدز ایجاد می کند که یکی از خطرناکترین عفونتها برای این دسته از بیماران می باشد. طبق بعضی از تحقیقات انجام یافته «مک» بیش از سایر عفونتها موجب مرگ در بیماران مبتلا به ایدز می شود[۵].

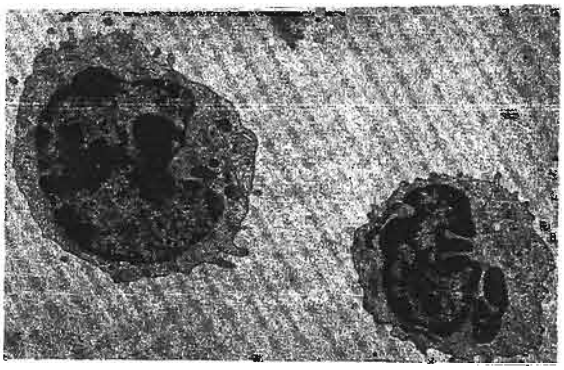
سوش ۴ از گروه «مک» در بیماران ایدز گسترده‌تر از سوشهای دیگر است که در ۴۰٪ از بیماران مبتلا به ایدز یافت شده است که بعد از آن بترتیب سوشهای ۸(۱۷٪) و ۱(۹٪) است، در حالی که سوش ۸ در بیماران فاقد ایدز از شایعترین سوشها می باشد. علت این اختلاف هنوز معلوم نیست[۶].

ضعف سیستم ایمنی موجب رشد و تکثیر میکروب "مک" در بیماران مبتلا به ایدز می گردد. رشد این میکروب همراه با کاهش لمفوسیتهای تی از حد ۱۰۰ سلول در خلط می باشد. که این کاهش سلولهای تی موجب عبور «مک» از دیواره روده یا ریه می شود و سپس میکروب وارد خون می گردد. ماکروفاژهای موجود در کبد، ریه، طحال و دیگر ارگانها پس از بلعیدن میکروبها موجب افزایش «مک» نیز می گردند. طبق نتایج بعمل آمده میزان چنین میکروبهائی در هر گرم بافت است که چنین رشد میکروبی قدرت دفاعی بدن را نسبت به میکروبهایی دیگر کاهش می دهد.

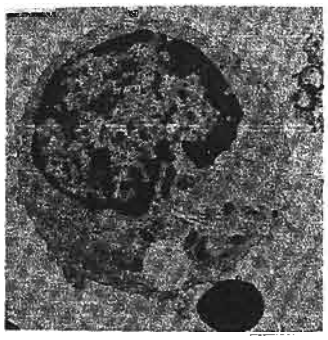
اثرات بیولوژیکی چربیها گوناگون است: مثلاً عامل کُرد موجب تخریب دیواره سلولی است و نیز ارتباط چربیهای میکروب با سلولهای کشنده طبیعی در از بین رفتن قدرت سایتوتاکسیک یا کشندگی سلولها می شود.[۷]

چربیهای مایکوباکتریوم اویوم از طریق تکنیک Thin layer chromatography قابل رؤیت هستند، ۱- قطبی و ۲ -غیرقطبی (شکل ۱) ساختمان شیمیایی آنتی ژنهای غیرقطبی توسط محققان فرانسوی تحت بررسی قرار گرفته است. این تحقیقات نشان داده است که کلایگوپپتایدولیپید، مولکولی است. حاوی قند، چربی و پپتاید(شکل ۲) به غیر از قند، ساختمان شیمیایی چربیهای قطبی یکنواخت می باشد که این اختلاف بستگی به نوع قند و تعداد آنها دارد.[۸]

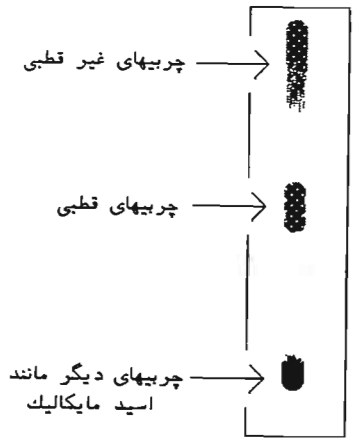
«لایه نفوذی الکترون» را در دیواره میکروب مایکوباکتریوم



(شکل ۱)

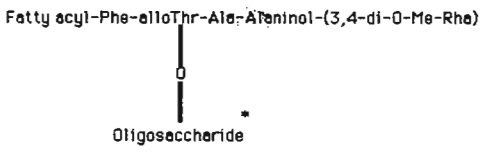


(شکل ۲)



نمودار ۱

با استفاده از تکنیک thin layer chromatography می توان چربیهای مختلف را جدا کرد. در این مورد از کلروفرم، متنال و آب به مقادیر (۱:۲:۱ : ۶۰) استفاده می شود.



* 6-deoxytalose-rhamnose-2-O-Me-fucose-4-O-Me-rhamnose

نمودار ۲

سوشهای کوناکون قندهای متفاوتی در "چربیهای قطبی" دارند برای نمونه شکل شیمیائی سوش ٤ نشان داده شده است.

ایوم می توان از طریق میکروسکوپ الکترونی مشاهده کرد و با استفاده از آنتی بادی و تکنیک gold - labelling نشان داده شده است که قسمت اعظم این لایه را چربیهای قطبی تشکیل داده است.[۹] «لایه نفوذی الکترون» در رشد و تکثیر این گروه از میکربها در سلولهای فاگوسیت مؤثرند. یکی از دلایل رشد و تکثیر «مک» عدم ادغام فاگوسیتها (Phagosome) و لایساسوم (Lysosome) می باشد زیرا که ادغام این دو از حرکتهای اولیه فاگوسیتها برای نابودی میکروبهای بلعیده شده می باشد. همانطوریکه در عکسهای الکترون میکروسکوپی دیده می شود، تغییراتی در سلولهای ایمنی پس از برخورد با کلایگوپپتایدولیپید صورت گرفته است. این تغییرات دو نوع می باشد: ۱- وجود ذرات منسجم درون سلولی و ۲- سیتوپلاسم گسیخته شده وجود این تغییرات به علت نفوذ چربیهای میکروب بدرون سلولها می باشد و در نهایت موجب تداخل در سیستم فیزیولوژی و آناتومی سلول می شود. بنظر می رسد که پس از تغییرات درون سلولی توسط آنتی ژن، سلولهای ایمنی نابود شوند و این موجب بیرون ریختن مایکوباکتریوم های درون سلولی و پخش شدن آنها به قسمتهای دیگر بدن می گردد[۴].

منابع

1. Runyon, E. H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med. Clin. N. Am, 1959,43,273 - 290.
2. Schaefer, W.B, serologic identitication and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination, amer rev resp dis, 1965,92,85-90.
3. Tassel, S.K., pourshafie, M., wright, E.L., Richmond, M.G. and barrow, W. W, Modified lymphoctye response to mitogens induced by lipopeptide fragment derived from Mycobacterium avium serouar - specific glycopeptidolipids.1992, infect immun,60,706 - 711
4. Pourshafie, M. Ayub, Q. and barrow, W.W. comparative effects of mycobacterium avium glaycopeptidolipid and lipopeptide fragment on functions and ultrastructure of mononuclear cells. 1993,Clin EXP immunol, 93,27 077.
5. Barksdale, L. and Kim, K.S. mycobacterium. 1977.Bacteriol Rev, 41,217-230.
6. Coker, R.K., Hellyer, T.J.,Brown, IN. and weber, J.N.clinical aspects of mycobacterial infections in HIV infection. 1992,res Microbiol, 143,377 - 384.
7. Roosemond, R.C. Das, P.K. and halperin, M. effect of mycobcaterial lipids on memrbane fluidity and natural killer cell - mediated cytotoxicity. 1984,ann immunol, 135,247 - 255.
8. Brennan, P.J. and Goren, M.B. structural studies on the type - specific antigens and lipids of the Mycobaterium avium - Mycobacterium intracellulare - Mycobacterium scrofulaceum serocomplex. 1979, J Biol chem, 254,4205 -4211
9. Barrow, W .W. ullom, B.p. and brennan, P. J. peptidoglycolipid nature of the superficial cell wall sheath of smooth - colony - forming mycobacteria. 1980,J bacteriol, 144,814 - 821.