

بررسی وجود بیوفیلم میکروبی در مخاط سینوس اتموئید در بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن مقاوم به درمان به کمک میکروسکوپ الکترونی اسکیننگ

*دکتر محسن نراقی^۱، دکتر یا شا عمیدی^۲، دکتر علی اسلامی فر^۳
^۱استادیار گوش، گلو، بینی، ^۲دستیار تخصصی گوش، گلو، بینی - دانشگاه علوم پزشکی تهران،
^۳بخش پاتولوژی و میکروسکوپ الکترونی انستیتو پاستور ایران

خلاصه

مقدمه: بیوفیلم های باکتریال، تجمعات پیچیده باکتریال هستند که در یک پوشش گلیکوکالیکس محصور شده و به سطوح مخاطی چسبیده اند. نکته جالب و جدید در پاتوفیزیولوژی رینوسینوزیت مزمن نقش این بیوفیلم می باشد. وجود بیوفیلم باکتریال توضیح دهنده عدم توانایی آنتی بیوتیک ها در برطرف شدن عفونت در مواردی است که باکتری در محیط آزمایشگاهی به آنتی بیوتیک حساس است. در این مطالعه برای اولین بار در ایران با کمک میکروسکوپ الکترونی اسکیننگ (SEM) وجود بیوفیلم ها در مخاط سینوس بیماران مبتلا به عود علائم رینوسینوزیت پس از یک جراحی موفق اندوسکوپییک بررسی می شود.

روش کار: تعداد ۱۰ بیمار مبتلا به عود علائم رینوسینوزیت مزمن علیرغم حداقل یک بار جراحی اندوسکوپییک که با تکنیک مناسب اجرا شده بود، انتخاب شدند و از مخاط سینوس اتموئید آنها ۴ تکه کوچک برداشته شد. بیماران به دلیل عود علائم سینوزیت مزمن مراجعه کرده بودند و در صورت داشتن مقدار کمی پولیپ سینوس ها مسدود نبودند. بیماران مبتلا به نقص ایمنی و بیمارانی که طی یک ماه قبل آنتی بیوتیک یا کورتون خوراکی مصرف کرده بودند وارد بررسی نشدند. پس از تمهیدات لازم از نمونه ها توسط میکروسکوپ الکترونی اسکیننگ عکس برداری شد.

نتایج: وجود بیوفیلم در SEM به بروز میکروکلونی محصور در ماتریکس مونوفیلامان اکسترابل ساکاریدی اطلاق می شود. بیوفیلم در داخل مخاط تشخیص داده نمی شود ولی بر روی سطوح مخاطی ایجاد می شود. در این مطالعه وجود بیوفیلم در ۶ بیمار از ۱۰ مورد مشخص گردید.

نتیجه گیری: با در نظر گرفتن نقش بیوفیلم میکروبی در پاتوفیزیولوژی ایجاد رینوسینوزیت مزمن، توجه درمانی به روش های حذف مکانیکی این تجمعات میکروبی به صورت تمیز کردن کامل سینوس ها، پیشگیری از ایجاد آلودگی حین عمل و استفاده مناسب از محلول های شستشو در دوره پس از جراحی، از اهمیت بیشتری برخوردار خواهد شد.

واژه های کلیدی: بیوفیلم، رینوسینوزیت مزمن مقاوم به درمان، میکروسکوپ الکترونی اسکیننگ

مقدمه

سینوزیت مزمن مقاوم به درمان با بر جا ماندن علائم و نشانه های سینوزیت مزمن علیرغم انجام جراحی اندوسکوپییک سینوس که با تکنیک مناسب اجرا شده باشد، تعریف می شود.

آدرس مولف مسؤول: تهران- خیابان سعدی شمالی - بیمارستان امیراعلم -
مرکز تحقیقات گوش و گلو و بینی دانشگاه علوم پزشکی تهران
تلفن تماس: ۰۲۱-۶۶۷۰۳۰۳۷ Email: naraghim@sina.tums.ac.ir
تاریخ وصول: ۸۵/۱۱/۳۰ تاریخ تایید: ۸۵/۱۲/۱۶

بخش اصلی پاتوفیزیولوژی بیماری را ناشی از پاسخ التهابی بدن به میکروب‌ها می‌دانند که در نتیجه بیماران به دلیل درد صورت یا ترشحات بینی که همراه با حملات تشدید بیماری می‌باشد زندگی راحتی نخواهند داشت.

به دلیل این که پاتوفیزیولوژی این بیماری کاملاً مشخص نشده است، راهکار درمان این بیماران هم هنوز مناسب نمی‌باشد. جهت ایجاد این بیماری یکی از مکانیسم‌های جالب توجهی که اخیراً مطرح شده است و حتی در کتاب مرجع گوش و گلو و بینی هم به آن اشاره شده است، بیوفیلم‌های میکروبی است (۱-۹). باکتریها، قارچ‌ها (۱۰) و حتی ویروس‌ها می‌توانند بیوفیلم تولید کنند. وجود بیوفیلم میکروبی در مخاط سینوس بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن، و همچنین بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن مقاوم به درمان ممکن است توجیه‌کننده علت عدم پاسخ درمانی کامل این بیماران با آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. اکثر عفونت‌های حاد ناشی از باکتری‌هایی می‌باشند که آزادانه حرکت می‌کنند (فرم planktonic) ولی در عفونت‌های مزمن با بیوفیلم‌ها، باکتری‌ها با گلیکوکالیکس احاطه شده‌اند (فرم sessile) و از دسترس سیستم دفاعی بدن مصون می‌باشند...

وقتی میکروب آزاد روی سطح مخاطی قرار گیرد ابتدا توسط فلاژل به آن می‌چسبند و سپس به کمک ژن Pili4 میکروکلونی تشکیل می‌دهد و سپس با رسیدن تعداد باکتری به تعداد مناسب و آمادگی محیط از نظر فراهم بودن مواد غذایی، واسطه‌های شیمیایی به نام عوامل حد نصاب (quorum sensing) در باکتری‌ها ایجاد و باعث تولید گلیکوکالیکس در اطرافشان می‌شود. در این مرحله ژن‌های فعال آنها هم تغییر می‌کنند و از نظر مورفولوژیک به فرم sessile تبدیل می‌شوند که منجر به تشکیل بیوفیلم میکروبی Mature می‌شود. با تغییر ژن فعال باکتریها به آنتی‌بیوتیک‌تجویز شده مقاوم شده و به دلیل گلیکوکالیکس در اطرافشان از دسترس سیستم ایمنی هم دور می‌شوند. با بهبود شرایط آنها می‌توانند دوباره به فرم planktonic برگردند و دوره‌های تشدید علائم را ایجاد کنند. با درمان آنتی‌بیوتیکی این چرخه بارها تکرار

خواهد شد. به همین دلیل بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن و همچنین سینوزیت مزمن مقاوم به درمان ذکر می‌کنند که با مصرف آنتی‌بیوتیک بهتر می‌شوند ولی با قطع آن علائم به طور مجدد عود خواهد نمود.

باکتری‌ها به فرم Sessile در محیط کشت رشد نمی‌کنند بلکه راه کشف آنها بررسی مورفولوژیک است (۱۱، ۱۲). استفاده از میکروسکوپ الکترونی روش استاندارد تشخیص بیوفیلم میکروبی است. نوع اسکینینگ روش مرسوم در اکثر مقالات است. البته گاهی نیز از نوع ترانس‌میشن استفاده شده است (۲). از لحاظ تصمیم‌درمانی، با پذیرش نقش بیوفیلم‌ها در مخاط سینوس بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن، دادن آنتی‌بیوتیک موثر نیز بیماری را ریشه‌کن نخواهد کرد، بلکه انجام جراحی به دلیل ایجاد تهویه و افزایش فشار اکسیژن در اطراف بیوفیلم و خارج کردن بیوفیلم به طور مکانیکی، در رویکرد درمانی قرار می‌گیرد.

بر اساس اطلاعات موجود در این مطالعه ما برآن شدیم که برای اولین بار در ایران با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ وجود بیوفیلم را در مخاط سینوس اتوموئید (که در مطالعات قبلی شایعترین سینوس دارای بیوفیلم بوده است) مشخص کنیم.

روش کار

تعداد ۱۰ بیمار که حائز شرایط ورود به بررسی و فاقد شرایط خروج از بررسی بودند، وارد مطالعه شدند. شرایط ورود به بررسی: هر کدام از بیماران سابقه حداقل یکبار جراحی اندوسکوپیک سینوس را داشتند که با انجام سی تی اسکن و یا اندوسکوپی بینی و سینوس مشخص شد که جراحی قبلی با تکنیک مناسب اجرا شده است (باز بودن دهانه سینوس‌ها و برداشته شدن کامل زائده آئینیت و عدم وجود پدیده recirculation). بیماران به دلیل عود علائم سینوزیت مزمن مراجعه کرده بودند و در صورت داشتن مقدار کمی پولیپ سینوس‌ها مسدود نبودند.

شرایط خروج از بررسی: بیماران مبتلا به نقص ایمنی (نارسایی کلیه، دیابت وابسته به انسولین و HIV) و بیمارانی که طی یک ماه قبل آنتی بیوتیک یا کورتون خوراکی مصرف کرده بودند وارد بررسی نشدند.

از مخاط سینوس اتموئید این بیماران، پس از بی حسی موضعی تعداد ۴ بیوسی کوچک (کوچکتر از ۰/۵ سانتی متر مربع) برداشته شد. نمونه ها در محلول گلو تارالدئید ۳ درصد حداقل به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس نمونه ها با بافر فسفات (محلول یک دهم مولار با PH معادل ۷/۲) ۳ بار و هربار به مدت نیم ساعت شستشو شدند. سپس به کمک غلظت های افزایش یافته اتانول نمونه ها آگیری شدند (با غلظت های ۲۵ و ۵۰ و ۷۰ درصد اتانول یکبار و هر کدام ۱۰ دقیقه و غلظت های ۹۶ و ۱۰۰ درصد ۲ بار و هر بار به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه). سپس نمونه ها در معرض هوا خشک شدند و روز بعد نمونه ها با چسب نقره کلویدال روی stub چسبانده و سپس

یافته ها

بر اساس عکس های میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ در شش بیمار از ۱۰ بیمار فوق بیوفیلیم میکروبی وجود داشت (تصویر شماره ۱). وجود بیوفیلیم میکروبی بر اساس نمای سه بعدی، وجود لایه گلیکوکالیکس در اطراف باکتری و وجود کانالهای آب تشخیص داده می شود. تفاوت واضحی از لحاظ علائم یا یافته های فیزیکی بین شش بیمار دارای بیوفیلیم و چهار بیمار بدون آن وجود نداشت و بدیهی است که عدم کشف بیوفیلیم در این چهار بیمار به طور قطع وجود بیوفیلیم در مخاط سایر سینوس های آنها را رد نمی کند.

از مخاط سینوس اتموئید این بیماران، پس از بی حسی موضعی تعداد ۴ بیوسی کوچک (کوچکتر از ۰/۵ سانتی متر مربع) برداشته شد. نمونه ها در محلول گلو تارالدئید ۳ درصد حداقل به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس نمونه ها با بافر فسفات (محلول یک دهم مولار با PH معادل ۷/۲) ۳ بار و هربار به مدت نیم ساعت شستشو شدند. سپس به کمک غلظت های افزایش یافته اتانول نمونه ها آگیری شدند (با غلظت های ۲۵ و ۵۰ و ۷۰ درصد اتانول یکبار و هر کدام ۱۰ دقیقه و غلظت های ۹۶ و ۱۰۰ درصد ۲ بار و هر بار به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه). سپس نمونه ها در معرض هوا خشک شدند و روز بعد نمونه ها با چسب نقره کلویدال روی stub چسبانده و سپس



تصویر ۱- عکس های گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ از یک بیمار می باشد که با بزرگ نمای های ۲۰، ۱۰۰۰ و ۴۰۰۰ برابر گرفته شده است. تصویر سمت چپ نمای کلی بیوسی می باشد که در تصاویر دیگر فقط نواحی دارای بیوفیلیم نشان داده شده است. وجود بیوفیلیم بر اساس ساختار سه بعدی و وجود لایه گلیکوکالیکس در اطراف باکتریها که بالای سطح مخاط هستند مشخص می شود. در این عکس میکرو کولونی های میکروبی متعدد چسبیده به مخاط که طی فرآیندهای متعدد شستشو باقی مانده اند و روی آنها توسط ماتریکس پلی ساکارید پوشیده شده است، به صورت ناهمواری هایی بر روی سطح مخاط دیده می شوند.

بحث

بر اساس تعریف، بیوفیلیم باکتریایی تجمعی از باکتری های مرتبط به هم هستند که به یک سطح چسبیده اند و توسط یک لایه محافظ از گلیکوکالیکس (ماتریکس پلی ساکارید) محصور شده اند. در مطالعات قبلی بیوفیلیم میکروبی در مخاط سینوس ۲۴ تا

۱۰۰ درصد بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن (که شایعترین محل در سینوس اتموئید بوده است) و یا در تمام استنت های فرونتال بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن دیده شده است.

و مستعد آلودگی مجدد با میکروب های تولید کننده بیوفيلم می باشند.

نتیجه گیری

با در نظر گرفتن نقش بیوفيلم میکروبی در پاتوفیزیولوژی ایجاد رینو سینوزیت مزمن، توجه درمانی به روش های حذف مکانیکی این تجمعات میکروبی به صورت تمیز کردن کامل سینوس ها، پیشگیری از ایجاد آلودگی حین عمل و استفاده مناسب از محلول های شستشو در دوره پس از جراحی، از اهمیت بیشتری برخوردار خواهد شد. شناسایی راهکارهای جدید بر علیه بیوفيلم ها را می توان از چالش های فرا روی دانش پزشکی در قرن جدید به شمار آورد.

تلقیح میکروب سودومونا به مخاط سینوس حیوانات منجر به تولید بیوفيلم شده است. جهت اثبات رابطه علیتی بین وجود بیوفيلم و ایجاد علائم سینوزیت مزمن باید گفت که بیوفيلم در مخاط بیماران دارای کونکابولوزا وجود نداشت (۳) و به علاوه در جدیدترین مطالعه موجود سیر و پیش آگهی بیماران دارای بیوفيلم از گروه بیماران فاقد آن واضحاً بدتر بوده است (۱). در بیماران مبتلا به بیوفيلم راهکار درمانی به جای آنتی بیوتیک، انجام جراحی است تا به طور مکانیکی این ساختارها خارج شوند. عدم موفقیت جراحی را می توان ناشی از عدم ریشه کن شده بیوفيلم و باقی ماندن آنها در برجستگی های ادماتوی مخاطی در این سینوس های ملتهب دانست. یا این که تصور کنیم سینوس هایی که به طور مزمن ملتهب بوده اند مژک های خود را از دست داده

Reference

- 1- Bendouah Z, Barbeau J, Walid H, Martin D. Biofilm formation by Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. Otolaryngology Head and Neck surgery 2006; 134(6): 991-996.
- 2- Perloff JR, Palmer TN. Evidence of Bacterial biofilms in a rabbit model of sinusitis. American journal of rhinology 2005; 19: 1-6.
- 3- Ferguson BJ, Stolz DB. Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhino sinusitis. American journal of rhinology 2005; 19: 452-457.
- 4- Ramadan HH, Scnclement JA, Thomas J. Chronic rhinosinusitis and biofilms. Otolaryngology- Head and Neck surgery 2004; 131(2): 77.
- 5- Perloff JR, palmer TN. Evidence of bacterial biofilms on frontal recess stents in patients with chronic rhinosinusitis. American journal of rhinology 2004; 18: 377-380.
- 6- Cryer J, Schipor I, Perloff JR, Palmer TN. Evidence of bacterial biofilms in human chronic sinusitis. ORL journal 2004; 66(3): 155- 158.
- 7- Desrosiers M. Refractory chronic rhinosinusitis. Current science Inc 2004; 4: 200-207.
- 8- Cummings CW, Flint PW, Harker LA, Haughey BH, Richardson MA et al. Cummings Otolaryngology Head & Neck Surgery. 4TH ed. USA: Mosby; 2005. p. 1185.
- 9- Sanclement J, Webster P, Thomas J. Bacterial biofilms in surgical patients with chronic Rhinosinusitis. Laryngoscope 2005; 115: 578-582.
- 10- Mohammed A, Douglas LJ. Biofilm matrix of Candida Albicans and Candida tropical. Journal of medical microbiology 2006; 55(8): 999-1008.
- 11- Costerton W, veeh R, shirliff M. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. Journal of clinical investigation 2003; 112(10): 1466.
- 12- Wolf G. Crespo JG. Optical and Spectroscopic method for biofilm examination and monitoring reviews in environmental. Science and biotechnology 2002; 227-251.