مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره بیستم، شمارهٔ ۱، دی ۱۳۹۶، صفحه ۱۹-۱۳

اثر ضد باکتری آمنیون کرایوپرزرو شده بر رشد اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا

فاطمه عاصی طهرانی (MSc)[۱]، سارا عزیزیان (MSc)[۲]، خشایار مدرسی‌فر (MSc)[۲]، حبیب‌الله پیروی (MD)[۳]، حسن نیک‌نژاد (PhD)[۱*]

۱-گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲-گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران
۳-بخش جراحی، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت:۹۶/۳/۳۱، اصلاح: ۹۶/۶/۱۵، پذیرش: ۹۶/۸/۳۰

خلاصه

سابقه و هدف: پرده آمنیون خواص کاربردی فراوانی از جمله خاصیت ضدباکتری دارد که به‌واسطه پپتیدهایی مانند الافین اعمال می‌شود. به دلیل محدودیت‌های استفاده از بافت تازه تهیه شده، روش‌های گوناگونی برای نگهداری طولانی مدت آمنیون وجود دارد. این مطالعه به منظور تعیین تاثیر کرایوپرزویشن، به‌عنوان یکی از روش‌های معمول نگهداری پرده آمنیون، بر خاصیت ضدباکتری آن علیه رشد باکتری‌های شایع در بالین انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی تاثیر پرده آمنیون تازه (از سزارین انتخابی) و کرایوپرزرو (۱۰٪ دی متیل سولفوکساید) بر رشد ۳ سویه باکتریایی استاندارد شامل *اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا* و دو سویه بالینی *اشریشیاکلی* با روش انتشار از دیسک بررسی شد. در این روش پس از کشت باکتری‌ها، قطعه‌ای از بافت تازه یا کرایوپرزرو، در پلیت کشت قرار داده شد. پس از انکوباسیون، تعداد پلیت های دارای هاله عدم رشد و اندازه هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. همچنین مقدار الافین در آمنیون با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری گردید.

یافته ها: پرده آمنیون تازه مانع از رشد *سودوموناس آئروژینوزا* و دو سویه بالینی *اشریشیاکلی* شد ولی تاثیری بر رشد سویه‌های اشریشیاکلی استاندارد و استافیلوکوکوس اورئوس نداشت. پرده آمنیون کرایوپرزرو در مورد تعداد پلیت های دارای هاله عدم رشد تفاوتی با بافت تازه نداشت. میزان الافین بصورت معنی داری در بافت کرایوپرزرو کاهش یافت ($p<۰/۰۱$).

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که خاصیت ضد باکتریایی پرده آمنیون وابسته به سویه باکتری است. همچنین فرآیند کرایوپرزرویشن خواص ضدمیکروبی سلول های بنیادی در پرده آمنیون را حفظ می‌کند.

واژه های کلیدی: پرده آمنیون، ضد باکتری، کرایوپرزرویشن، سویه باکتری

مقدمه

در طی سالیان طولانی پرده‌های جنینی یکی از بافت‌های جایگزین مورد استفاده در جراحی ها بوده‌اند (۳-۱). پرده آمنیون داخلی‌ترین لایه پرده جنینی است که از پنج لایه شامل لایه اپیتلیال، غشای پایه، لایه فشرده، لایه فیبروبلاستی و لایه اسفنجی تشکیل شده و خواص منحصر به فردی دارد (۴). این بافت می‌تواند بر آنژیوژنز اثر بگذارد (۵)، باعث القا آپوپتوز شود (۶) و پاسخ‌های التهابی و ایمنی را کاهش دهد (۸و۷). همچنین با دارا بودن خاصیت ضدمیکروبی می‌تواند رشد باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها را مهار کند (۱۰و۹). ترکیبات ماتریکس سلولی در غشای پایه پرده آمنیون یک داربست طبیعی برای کاشت سلول و استفاده در مهندسی بافت است (۱۲و۱۱). پرده آمنیون حاوی تعداد زیادی سلول بنیادی انسانی است که می‌توانند کاربردهای بسیاری داشته باشند. دسترسی به این بافت آسان بوده و جهت استفاده مشکلات اخلاقی ندارد (۱۴و۱۳). یکی از خواص مورد توجه پرده آمنیون، خاصیت ضدمیکروبی آن است که کاربردهای بالینی بسیاری دارد (۱۵). خاصیت ضدباکتری پرده آمنیون به دلیل وجود پپتیدهای ضد میکروبی از جمله دفنزین‌ها (Defensins)، مهار کننده پپتیداز لوکوسیت ترشحی (SLPI) و الافین (Elafin) است. این مولکول‌ها در سطوح مخاطی و اغلب به وسیله سلول‌های اپیتلیال تولید و ترشح می‌شوند. "پپتید اسیدی وی" (WAP=Whey acidic peptide) گروهی از پپتیدهای ضدمیکروبی در پرده آمنیون هستند که شامل الافین و SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) می‌باشند (۱۶). این مولکول‌ها کم‌وزن بوده و فعالیت آنتی‌پروتئازی (۱۷و۱۶) و بازدارندگی الاستاز دارند (۲۰-۱۸) و به‌عنوان اجزایی از سیستم ایمنی ذاتی، با کنترل پاسخ التهابی در سطوح مخاطی، از سطوح مرتبط با آلودگی محافظت می‌کنند (۲۰). بتا-دفنزین‌های انسانی گروه دیگری از پپتیدها

▣ این مقاله حاصل پایان نامه فاطمه عاصی طهرانی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته میکروب شناسی و طرح تحقیقاتی به شماره۱۰۴۱۷ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر حسن نیک نژاد
آدرس: تهران، ولنجک، بلوار دانشجو، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی. تلفن:۰۲۱-۲۲۴۳۹۹۶۹
E-mail: niknejad@sbmu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.1.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.1.19]

هستند که در ایجاد پاسخ‌های ایمنی در پرده آمنیون نقش دارند (۱۷). یکی از روش‌های رایج استفاده از پرده آمنیون در بالین، استفاده از بافت تازه است که بلافاصله پس از زایمان جداسازی می‌شود. یکی از محدودیت‌های استفاده از پرده آمنیون تازه، تخریب سریع آن است. سلول‌های موجود در این بافت تا مدت کوتاهی پس از زایمان زنده می‌مانند و علاوه بر این به دلیل وجود دوره نهفتگی، امکان انتقال برخی بیماری‌ها در هنگام استفاده از بافت تازه بیشتر است. از این رو روش‌هایی برای نگهداری پرده آمنیون پیشنهاد شده است.

نگهداری به روش کرایوپرزرویشن یکی از روش‌های رایج برای نگهداری طولانی مدت پرده آمنیون است. در این روش با استفاده از غلظت‌های متفاوتی از مواد نگهدارنده مانند گلیسرول و دی‌متیل‌سولفوکساید می‌توان بافت را برای ماه‌ها در دمای۸۰- و یا ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. اگرچه کرایوپرزرویشن می‌تواند با تاثیر بر سلول‌ها و ساختار بافتی پرده آمنیون، خواص آن را تحت تاثیر قرار دهد (۲۲و۲۱)، به دلیل محدودیت دسترسی به بافت تازه و نیاز به نگهداری بافت به مدت طولانی ضروری است که اثر روش‌های نگهداری بر خواص پرده آمنیون بررسی گردد. به همین منظور در این مطالعه اثر کرایوپرزرویشن بر خاصیت ضدباکتری پرده آمنیون مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

این مطالعه تجربی پس از تایید در کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با IR.SBMU.MSP.REC.۱۳۹۴.۱۳۹ انجام شد. به منظور جداسازی و آماده‌سازی پرده آمنیون، بافت جفت حاصل از سزارین‌های انتخابی زنان سالم بدون مصرف آنتی‌بیوتیک در دوران بارداری در هفته‌های ۳۸ تا ۴۰ بارداری، در شرایط استریل از بیمارستان عرفان تهران تهیه شد. نمونه‌های جفت در ظرف حاوی بافر فسفات سالین استریل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند.

تمام مراحل جداسازی و آماده‌سازی نمونه‌های پرده آمنیون در شرایط استریل انجام گرفت. پرده آمنیون به روش مکانیکی از کوریون جدا گردید و چندین بار با بافر فسفات سالین سرد برای پاک کردن باقیمانده‌های خون شسته شد تا اثری از لکه‌های خون بر روی آن باقی نماند. به‌منظور کرایوپرزرویشن پرده آمنیون، نمونه-های این بافت پس از جداسازی و شستشو در محلول بافر فسفات سالین استریل حاوی ۱۰٪ دی‌متیل‌سولفوکساید (Merck, Germany) و ۱۰٪ سرم گاوی (Gibco,USA) و ۱۰٪ محیط کشت Dubbelco’s modified Eagle medium (DMEM)/F12 (Gibco, USA) قرار داده شدند و به مدت ۶ ماه در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از طی این مدت نمونه‌ها در دمای محیط از حالت یخ زده خارج شدند و سه مرتبه با محلول بافر - فسفات سالین استریل شستشو داده شده و سپس به قطعات حدود ۱ سانتی‌متر مربع برش داده شدند. به منظور بررسی میزان اثرات ضدباکتری پرده آمنیون از روش انتشار مستقیم دیسک (diffusion direct disk) بر روی ۳ سویه استاندارد شامل *اشریشیاکلی* ATCC 25922، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 و دو سویه بالینی *اشریشیاکلی* (*E.coli* T3 و *E.coli* T4)، استفاده شد. سویه‌های بالینی از بیماران بیمارستان آیت‌الله طالقانی تهران تهیه شد. سویه‌های استاندارد براساس دستورالعمل انستیتو استاندارد آزمایشگاهی و بالینی انتخاب شدند؛ در ضمن تمام مراحل کار مطابق با ضوابط موجود در این پروتکل انجام گرفت (۲۳). باکتری‌ها در ابتدا در سطح محیط بلاد آگار (Merck) به عنوان یک محیط کشت عمومی کشت داده شده و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. از کلونی‌های ایزوله به‌دست آمده، سوسپانسیونی با غلظت ۰/۵ مک فارلند (۱/۵×۱۰^CFU) در نرمال سالین تهیه گردید و در سطح محیط مولر هینتون آگار(Merck)، به عنوان محیط انتخابی به طور یکنواخت کشت داده شدند. سپس قطعات تهیه شده از پرده‌های آمنیون تازه و کرایوپرزرو، در پلیت‌های کشت باکتری قرار داده شدند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از این مدت اندازه‌ی ناحیه عدم رشد در همه پلیت‌ها (بر حسب میلی‌متر) اندازه‌گیری شده و میزان بازدارندگی در اطراف پرده‌های آمنیون با هم مقایسه شد. برای بررسی احتمال آلودگی پرده آمنیون پس از طی مراحل نگهداری، یک نمونه از هر بافت آماده شده بر روی سطح پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار، به‌عنوان گروه کنترل قرار گرفت.

پس از آماده شدن پرده آمنیون، یک قطعه ۵×۵ سانتی‌متری از بافت‌های تازه و کرایوپرزرو جدا شده و پس از خرد کردن، ۱۰میلی‌لیتر بافر نرمال سالین به آنها اضافه شد. با استفاده از سونیکاسیون با قدرت ۸۰ وات و با فاصله‌های ۰/۵ ثانیه در مدت ۱۲ دقیقه، عصاره بافتی به دست آمد. سپس نمونه ها به‌مدت ۵ دقیقه در در ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. پس از آن مایع رویی جمع‌آوری‌شده به مدت ۲ دقیقه در ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. در نهایت مقدار الافین (بر حسب pg/ml) در مایع رویی با استفاده از کیت الایزا (Abcam, USA) براساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده اندازه‌گیری شد تا میزان الافین موجود در مایع رویی بافت تازه و کرایوپرزرو با یکدیگر مقایسه شوند.

نتایج به دست آمده به صورت Mean±SEM گزارش شده‌اند. برای آنالیز آماری از نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۵/۰۴ و از آزمون One-Way ANOVA و پس آزمون Tukey استفاده شد و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

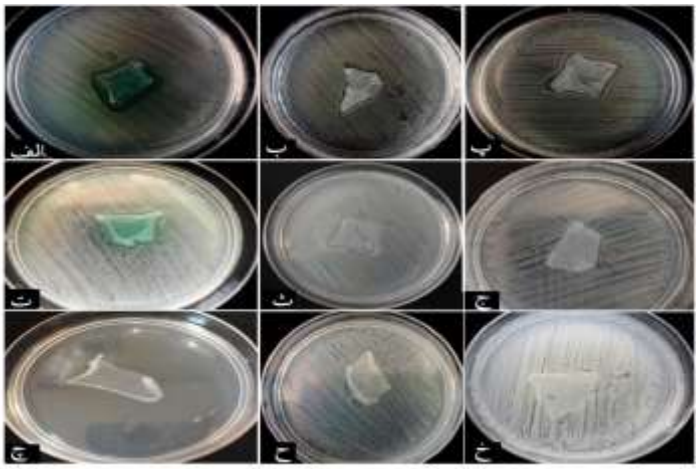
یافته‌ها

در این مطالعه فعالیت ضدباکتری پرده آمنیون تازه و کرایوپرزرو بر روی ۵ سویه باکتری شامل استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923، سودوموناس ائروژینوزا ATCC 27853، اشریشیاکلی ATCC 25922 و دو سویه بالینی اشریشیاکلی (T3,T4) به روش انتشار دیسک بررسی شد.

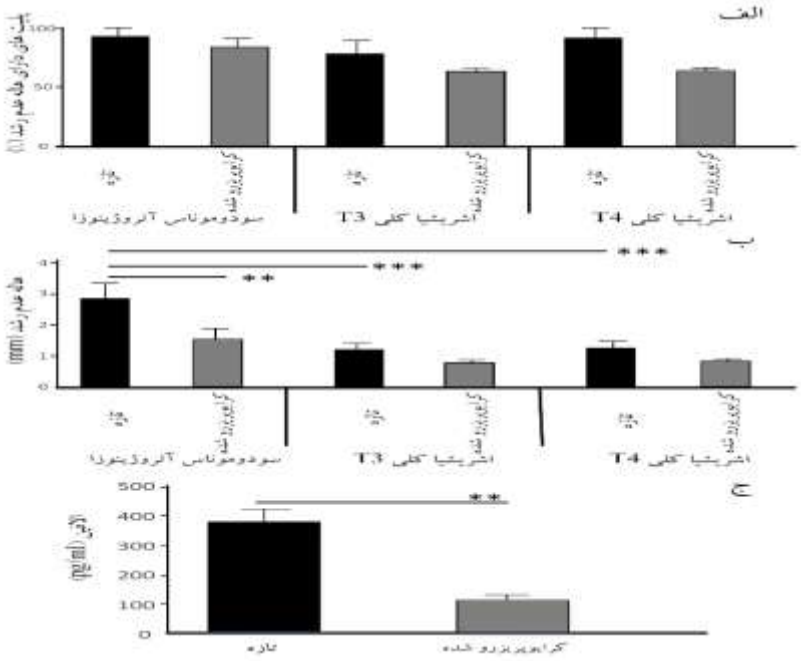
اثر مهاری در زیر و اطراف لبه‌های پرده آمنیون تازه در *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 و دو سویه بالینی *اشریشیاکلی* (T3,T4)، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون دیده شد (شکل ۱ الف، ب و پ). این اثر مهاری در پرده آمنیون کرایوپرزرو نیز دیده شد. در شکل ۱ ت، ۱ث و ۱ج اثر مهاری پرده آمنیون نگهداری شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد در *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 و دو سویه بالینی *اشریشیاکلی*(T3,T4) نشان داده شده است. هیچ‌گونه رشدی در نمونه‌های گروه کنترل دیده نشد (شکل۱ چ). بر خلاف سایر سویه‌های مورد آزمایش اثر مهاری در دو سویه *استافیلوکوکس اورئوس* ATCC 25923 و *اشریشیاکلی* ATCC 25922 مشاهده نشد (شکل ۱ ح

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.1.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.1.19]

و خ). تعداد پلیت‌های دارای هاله عدم رشد و هم چنین مهار رشد در زیر بافت پرده آمنیون تفاوت معنی‌داری را بین بافت‌های تازه و کرایوپرزرو، نشان نداد (شکل۲ الف) (جدول ۱). هاله عدم رشد در این تحقیق در کناره‌های پرده آمنیون کرایوپرزرو مشابه با بافت تازه بود. پرده آمنیون تازه در پلیت کشت داده شده با سودوموناس آئروژینوزا و دو سویه بالینی اشریشیاکلی (T3,T4) هاله عدم رشد تشکیل داد. بیشترین اندازه هاله عدم رشد ایجاد شده توسط بافت تازه در پلیت کشت داده شده با سودوموناس آئروژینوزا، ۱/۱±۵ میلی‌متر بود که این میزان به طور معنی داری در کشت‌های اشریشیاکلی (T3,T4) کاهش پیدا کرد ($p<۰/۰۰۱$). علاوه بر این، اندازه هاله عدم رشد در پرده‌های آمنیون کرایوپرزرو در مقایسه با نمونه‌های تازه در کشت‌های سودومونا آئروژینوزا کاهش معنی داری داشت ($p<۰/۰۱$)، که البته این حالت در کشت‌های اشریشیاکلی (T3, T4) دیده نشد (شکل ۲ ب). نتایج به دست آمده نشان داد که مقدار الافین در بافت تازه به‌طور معنی داری بیشتر از بافت کرایوپرزرو است (جدول ۲)($p<۰/۰۱$) (شکل۲ج).



شکل ۱. (الف، ب و پ) تشکیل هاله عدم رشد در مجاورت بافت پرده آمنیون تازه : الف) سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 ؛ ب) اشریشیا کلیT3؛ ج) اشریشیا کلی T4. (ت، ث و ج) تشکیل هاله عدم رشد در مجاورت بافت پرده کرایوپرزرو: ت) سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853، ث) اشریشیا کلیT3 و ج) اشریشیا کلیT4. (چ) کشت کنترل پرده آمنیون (هیچ کلونی مشاهده نشد). چ) اشریشیا کلی ATCC25922 کشت شده با پرده آمنیون تازه؛ ح) استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 کشت شده با پرده آمنیون تازه. (هیچ‌گونه هاله عدم رشد در کشت استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 و اشریشیا کلی ATCC25922 دیده نشد)



شکل ۲. (الف) مقایسه درصد پلیت‌های دارای هاله عدم رشد به تعداد کل پلیت‌ها در مجاورت با پرده آمنیون تازه و کرایوپرزروشده به تفکیک نوع باکتری کشت داده شده. (ب) میانگین اندازه هاله عدم رشد به میلی‌متر (mm) در سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیا کلی T3 و T4 که پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در مجاورت با بافت پرده آمنیون تازه و کرایوپرزروشده، ظاهر می‌شود ($p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۰۱$***). (ج) میزان الافین موجود در پرده آمنیون تازه و کرایوپرزروشده ($p<۰/۰۱$**)**

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.1.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.1.19]

جدول ۱. مقایسه اثر ضد باکتری در بافت کرایوپرزرو شده با بافت تازه

سویه باکتری	بافت کرایوپرزرو شده		بافت تازه	
سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853	کاهش رشد در زیر بافت✦ (n=۱۱) ۱۱	هاله عدم رشد▲ (n=۱۱) ۷★ ،۴★	کاهش رشد در زیر بافت ✦ (n=۱۴) ۱۴	هاله عدم رشد ▲ (n=۱۴) ۱۲★ ،۲★
اشریشیا کلیT3	کاهش رشد در زیر بافت✦ (n=۱۱) ۷★ ،۴★	هاله عدم رشد▲ (n=۱۲) ۷★ ،۵★	کاهش رشد در زیر بافت ✦ (n=۱۹) ۱۴★ ،۵★	هاله عدم رشد▲ (n=۲۱) ۱۹★ ،۲★
اشریشیا کلیT4	کاهش رشد در زیر بافت✦ (n=۱۱) ۷★ ،۴★	هاله عدم رشد▲ (n=۱۱) ۶★ ،۵★	کاهش رشد در زیر بافت ✦ (n=۱۵) ۱۲★ ،۳★	هاله عدم رشد ▲ (n=۱۴) ۱۲★ ،۲★

▲ تعداد پلیت های بررسی شده از نظر وجود کاهش رشد در زیر بافت، ✦ تعداد پلیت های بررسی شده از نظر وجود هاله عدم رشد

★ تعداد پلیت های دارای هاله عدم رشد، ✶ تعداد پلیت های فاقد هاله عدم رشد

جدول ۲. اثر روش‌های فراوری بر میانگین و بیشترین اندازه هاله عدم رشد در سه سویه باکتری

گروه	بافت کرایوپرزرو شده		بافت تازه	
	بیشترین اندازه هاله (mm)	میانگین اندازه هاله (mm)	بیشترین اندازه هاله (mm)	میانگین اندازه هاله (mm)
سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853	۳	۱/۵ (n=۱۱)	۵	۲/۸ (n=۱۴)
اشریشیاکلی T3	۱	۰/۸ (n=۱۲)	۲	۱/۲ (n=۲۱)
اشریشیاکلی T4	۱	۰/۹ (n=۱۱)	۲	۱/۳ (n=۱۴)

بحث و نتیجه‌گیری

براساس نتایج این مطالعه، پرده آمنیون تازه در پلیت‌های *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 و دو سویه بالینی *اشریشیاکلی* T3 و T4 باعث ایجاد هاله عدم رشد شدند. اما اثرات مهاری بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923 و *اشریشیاکلی* ATCC25922 در زیر و اطراف پرده آمنیون دیده نشد. این نتایج نشان می‌دهد که اثر ضد باکتری پرده آمنیون به جنس و سویه باکتری بستگی دارد که این یافته توسط Kjaegaarda و همکاران نیز تایید شده است. Kjaegaarda و همکارانش وجود هاله عدم رشد باریکی (حدود ۱میلی‌متر) را در اطراف پرده آمنیون در مجاورت با استرپتوکوک گروه A و *استرپتوکوکوس ساپروفیتیکوس* گزارش کرده‌اند (۹).

بیشترین اندازه هاله عدم رشد در این تحقیق مربوط به *سودوموناس آئروژینوزا* (حدود ۵ میلی‌متر) بود. تفاوت در میزان هاله عدم رشد و نوع باکتری به کار رفته می‌تواند مربوط به ساختار متفاوت باکتری‌ها باشد (۲۴). برای مثال الافین که از پپتیدهای ضد میکروبی پرده آمنیون است، یکی از فاکتورهای ویرولانس *سودوموناس آئروژینوزا* به نام سرین پپتیداز را مهار می‌کند (۲۵). بنابراین به نظر می‌رسد به این دلیل اثر این بافت بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* بیشتر دیده شد. اگرچه اثرات ضد باکتری بافت‌هایی نظیر آمنیون و کوریون (۲۶) که اهمیت بالایی در درمان سوختگی‌ها (۲۷) و بیماری‌های چشمی (۲۸) دارند در مطالعات پیشین نشان داده شده‌اند، تاکنون مطالعات اندکی به تاثیر روش‌های نگهداری بر خواص این بافت‌ها پرداخته‌اند. نتایج نشان دادند که روند کرایوپرزرویشن پرده آمنیون به طور معنی داری میزان الافین را نسبت به بافت تازه کاهش می‌دهد. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که زیست‌پذیری سلول‌های اپیتلیال پرده آمنیون پس از نگهداری به روش انجماد حدود ۵۰٪ کاهش می‌یابد (۲۹و۲۱)، با این حال علی‌رغم کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها و کاهش میزان الافین، همچنان خاصیت ضدباکتری پرده آمنیون حفظ شده است. بنابراین علاوه بر پپتیدهای ترشحی از سلول‌های پرده آمنیون، عوامل دیگری نیز می‌توانند در ایجاد خاصیت ضدباکتری آن موثر باشند. پپتیدهای ضدمیکروبی موجود در غشای پایه پرده آمنیون مثل لاکتوفرین (۳۰) و اجزای ماتریکس خارج سلولی می‌توانند در ایجاد خاصیت ضدباکتری در بافت کرایوپرزرو نقش داشته باشند. برای مثال هیالورونیک اسید موجود در ماتریکس خارج‌سلولی آمنیون می‌تواند به‌صورت وابسته به غلظت رشد انتروکوکسی، *استرپتوکوکوس موتانس*، دو سویه از *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* را مهار کند(۳۰). نتایج مطالعه حاضر نشان داد روش نگهداری کرایوپرزرویشن قادر به حفظ خواص ضد باکتری پرده آمنیون است و خواص ضدباکتری پرده آمنیون وابسته به سویه باکتری می‌باشد که می‌تواند امکان استفاده از پرده آمنیون کرایوپرزرو را در بالین مقدور سازد. مطالعات بیشتری برای بررسی خواص ضدمیکروبی پرده آمنیون و استفاده‌های بالینی آن مورد نیاز است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از کمیته گرنت پژوهشگران فرهیخته مؤسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران (نیماد) جهت حمایت مالی از این طرح و از همکاری مدیریت و کارکنان اتاق عمل بیمارستان عرفان تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.1.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.1.19]

The Antibacterial Effect of Low Temperature Stored Amnion on Growth of Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus and Pseudomonas Aeruginosa

F.A. Tehrani (MSc)[1], S. Azizian (MSc)[2], KH. Modaresifar (MSc)[2], H. Peirovi (MD)[3], H. Niknejad (PhD)[1•]

1.Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
2.Department of Biomaterials, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, I.R.Iran
3.Department of Surgery, Taleghani Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(1); Jan 2018; PP:13-9
Received: Jan 21st 2017, Revised: Sep 6th 2017, Accepted: Nov 21st2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Amniotic membrane (AM) has a lot of applied properties like anti-bacterial characteristic mediated by peptides such as elafin. Because of limitations in use of freshly prepared tissue, there are various methods for long-term preservation of amniotic membrane. This study was conducted to determine the effect of cryopreservation, as one of the common methods of preservation of amniotic membrane, on its antibacterial property against the growth of commonly occurring bacteria in the clinic.

METHODS: In this experimental study, the effect of fresh AM (from elective Cesarean) and cryopreserved (by 10% DMSO) AM on the growth of three standard bacterial strains including Escherichia coli ATCC 25922, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa and two clinical isolated strains of E.coli were evaluated using disk diffusion test. In this method, pieces of fresh or cryopreserved AM was placed in the culture plate after bacterial culturing. After incubation, the number of plates with inhibition zone and amount of inhibition zone were measured. The amount of elafin was measured in AM samples using ELISA.

RESULTS: Fresh AM inhibit the growth of Pseudomonas aeruginosa and two clinical isolated strains of E.coli. However, it has no effect on the growth of standard strain of Escherichia coli and Staphylococcus aureus strain. There is no difference in the number of plates including inhibition zone between fresh and cryopreserved AM. The amount of elafin decreased significantly in cryopreserved AM ($p<0.01$).

CONCLUSION: The results of this study showed that the anti-bacterial property of the AM depends on bacterial species. In addition, the cryopreservation process maintains anti-bacterial properties of amniotic stem cells.

KEY WORDS: *Amniotic membrane, Anti-bacterial, Cryopreservation, Bacterial strain.*

Please cite this article as follows:

Tehrani FA, Azizian S, Modaresifar KH, Peirovi H, Niknejad H. The Antibacterial Effect of Low Temperature Stored Amnion on Growth of Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus and Pseudomonas Aeruginosa. J Babol Univ Med Sci. 2018; 20(1):13-9.

•Corresponding Author; H. Niknejad (PhD)
Address: Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Koodakyar St, Daneshjoo Blvd, Velenjak, Tehran, I.R.Iran.
Tel: +98 21 22439969.
E-mail: niknejad@sbmu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.1.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.1.19]

References

1.Peirovi H, Rezvani N, Hajinasrollah M, Mohammadi SS, Niknejad H. Implantation of amniotic membrane as a vascular substitute in the external jugular vein of juvenile sheep. J Vasc Surg. 2012;56(4):1098-104.

2.Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. Cornea. 2005;24(6):643-53.

3.Yildiz EH, Nurozler AB, Ozkan Aksoy N, Altiparmak UE, Onat M, Karaguzel H. Amniotic membrane transplantation: indications and results. Eur J Ophthalmol. 2008;18(5):685-90.

4.Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. Surv Ophthalmol. 2004;49(1):51-77.

5.Niknejad H, Paeini-Vayghan G, Tehrani FA, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. Placenta. 2013;34(4):340-5.

6.Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H, Abolghasemi H. Human amniotic epithelial cells induce apoptosis of cancer cells: a new anti-tumor therapeutic strategy. Cytotherapy. 2014;16(1):33-40.

7.Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. Cornea. 2000;19(3):348-52.

8.Hori J, Wang M, Kamiya K, Takahashi H, Sakuragawa N. Immunological characteristics of amniotic epithelium. Cornea. 2006;25(10):53-8.

9.Kjaergaard N, Hein M, Hyttel L, Helmig RB, Schønheyder HC, Uldbjerg N, et al. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2001;94(2):224-9.

10.Tehrani F A, Ahmadiani A, and Niknejad H. The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane. Cryobiol. 2013;67(3):293-8.

11.Deihim T, Yazdanpanah G, Niknejad H. Different light transmittance of placental and reflected regions of human amniotic membrane that could be crucial for corneal tissue engineering. Cornea. 2016;35(7):997-1003

12.Kakavand M, Yazdanpanah G, Ahmadiani A, Niknejad H. Blood compatibility of human amniotic membrane compared with heparin-coated ePTFE for vascular tissue engineering. J Tissue Eng Regen Med. 2017;11(6):1701-9.

13.Niknejad H, Yazdanpanah G, Ahmadiani A. Induction of apoptosis, stimulation of cell-cycle arrest and inhibition of angiogenesis make human amnion-derived cells promising sources for cell therapy of cancer. Cell Tissue Res. 2016;363(3):599-608.

14.Niknejad H, Deihim T, Ahmadiani A, Jorjani M, Peirovi H. Permanent expression of midbrain dopaminergic neurons traits in differentiated amniotic epithelial cells. Neurosci Lett. 2012;506(1):22-27.

15.Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. Placenta. 1991;12(3):285-8.

16.Sallenave JM. Antimicrobial activity of antiproteinases. Biochem Soc Trans. 2002;30(2):111-5.

17.King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. Placenta. 2007;28(2-3):161-9.

18.Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. Eur Cell Mater. 2008;15:88-99.

19.Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA. Natural antimicrobial production by the amnion. Am J Obstet Gynecol. 2007;196(3):255.

20.King AE, Critchley HO, Sallenave JM, Kelly RW. Elafin in human endometrium: an antiprotease and antimicrobial molecule expressed during menstruation. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(9):4426-31.

21.Niknejad H, Deihim T, Solati-Hashjin M, Peirovi H. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. Cryobiology. 2011;63(3):145-51.

22.Yazdanpanah G, Paeini-Vayghan G, Asadi S, Niknejad H. The effects of cryopreservation on angiogenesis modulation activity of human amniotic membrane. Cryobiology. 2015;71(3):413-8.

23.Institue C a LS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility. 2006;26(1):1-59.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.1.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.1.19]

24.Niknejad H, Asi Tehrani F, Peirovi H, Abolghasem H. The sources of microbial contamination of stem cells of application in cell therapy. J Babol Univ Med Sci. 2014;16:95-105.[In Persian]
25.Bellemare A, Vernoux N, Morisset D, Bourbonnais Y. Human pre-elafin inhibits a Pseudomonas aeruginosa-secreted peptidase and prevents its proliferation in complex media. Antimic Agent Chem. 2008;52(2):483-90.
26.Zare Bidaki M, Lessani T, Khazaie Z. Evaluation of anti-bacterial effects of chorionic membranes in vitro. J Birjand Univ Med Sci. 2012;19(2):140-7. [In Persian].
27.Niknejad H, Yazdanpanah G. Anticancer effects of human amniotic membrane and its epithelial cells. Med Hypotheses. 2014;82(4):488-9.
28.Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. Curr Opin Ophthalmol. 2005;16(4):233-40.
29.Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001;42(7):1539-46.
30.Kanyshkova TG, Buneva VN, Nevinsky GA. Lactoferrin and its biological functions. Biochemistry. Biokhimiia. 2001;66(1):1-7.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.1.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.1.19]