

مقایسه اثر آنتی باکتریال سطح اپی تلیال و مزانشیمال پرده آمنیون بر اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا

فاطمه عاصی طهرانی^۱، حبیب اله پیروی^۲، حسن نیک نژاد^{۳*}

چکیده

زمینه و هدف: پرده آمنیون انسانی به علت ویژگی های منحصر به فرد، در زمینه های مختلف پزشکی و مهندسی بافت کاربردهای فراوانی دارد. یکی از این ویژگی ها خاصیت آنتی باکتریال آن بوده که می تواند در جلوگیری از عفونت های پس از سوختگی و جراحی حایز اهمیت باشد. این مطالعه با هدف تعیین اثر آنتی باکتریال آمنیون بر روی سویه های مختلف باکتریایی و مقایسه این اثر در دو سمت پرده آمنیون انجام شد.

روش بررسی: در این تحقیق اثر آنتی باکتریال پرده آمنیون بر روی ۳ سویه باکتریایی استاندارد *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و ۲ سویه بالینی *E. coli* (*E. coli* T3 و *E. coli* T4) مورد بررسی قرار گرفت و میزان حساسیت در هر مورد اندازه گیری شد. برای اندازه گیری اثر ضد میکروبی از روشی مشابه Disk Diffusion Test استفاده شد که در آن بافت آمنیون به عنوان آزادکننده آنتی بیوتیک، در سطح آگار کشت داده شده قرار گرفت. بررسی های آماری توسط آزمون واریانس و توکی انجام شد.

یافته ها: مجاورت پرده آمنیون با سویه های *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و ۲ سویه بالینی *E. coli* باعث بروز هاله عدم رشد شد. تشکیل هاله عدم رشد در سویه های *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و ۲ سویه بالینی *E. coli*، به سطح اپی تلیال یا مزانشیمال پرده آمنیون ارتباطی نداشت.

نتیجه گیری: طبق نتایج این مطالعه، به نظر می رسد نوع سویه باکتریایی مورد استفاده می تواند در میزان بروز اثر آنتی باکتریال پرده آمنیون نقش داشته باشد. علاوه بر این، احتمالاً دو سطح اپی تلیال و مزانشیمال پرده آمنیون دارای اثر آنتی باکتریال مشابه است.

کلید واژه ها: پرده آمنیون؛ عوامل ضد باکتری؛ سطح مزانشیمال؛ سطح اپی تلیال؛ سویه باکتریایی.

^۱کارشناس ارشد میکروبی شناسی،
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و
تحقیقات، تهران، ایران.

^۲استاد جراحی، مرکز تحقیقات
نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت،
دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی،
تهران، ایران.

^۳استادیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات
نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت،
دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی،
تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

حسن نیک نژاد، مرکز تحقیقات
نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت،
دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی،
تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
niknejad@smbu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۴

تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۱۷

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Asi Tehrani F, Peirovi H, Niknejad H. Determination of Antibacterial Effect of the Epithelial and Mesenchymal Surfaces of Amniotic Membrane on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.
Qom Univ Med Sci J 2013;7(4):12-22. [Full Text in Persian]

مقدمه

پرده آمنیون انسانی، داخلی‌ترین لایه از غشاهای جنینی است که از سه بخش سلول‌های اپی‌تلیالی، غشای پایه و استرومای بدون رگ تشکیل شده است (۱). پرده آمنیون انسانی در سال ۱۹۱۰ برای اولین بار در پیوند پوست مورد استفاده قرار گرفت (۲). از آن زمان به بعد، این بافت در پیوند پوست (۳)، درمان زخم‌های ناشی از سوختگی (۴، ۵) و درمان زخم‌های مزمن پا (۶) استفاده می‌شود. علاوه بر این، در حال حاضر پرده آمنیون در جراحی‌های سطوح چشمی (۷، ۸)، لگن و حتی جلوگیری از چسبندگی پس از عمل جراحی کاربرد دارد (۹). پانسمان سوختگی با پرده آمنیون می‌تواند باعث کاهش درد و عفونت باکتریایی شود (۱۰). بروز این خصوصیات، به علت ویژگی‌های منحصر به فرد این بافت بوده است. مطالعات اخیر در این زمینه بر استفاده آمنیون به عنوان یک داربست مناسب برای کشت سلول، همچنین منبعی غنی از سلول‌های بنیادی جهت کاربرد در مهندسی بافت تأکید دارد (۱)، که نشان‌دهنده بروز تغییرات زیادی در نحوه استفاده از این بافت است.

پرده آمنیون دارای خواص متعددی بوده، و فاکتورهای تبدیل‌کننده آنژیوژنر متعددی نیز در این بافت شناسایی شده است (۱۱، ۱۲). پرده آمنیون سیستم ایمنی انسان را تحریک نمی‌کند (۱۳، ۱۴) و التهاب و اسکار ناشی از زخم را کاهش می‌دهد (۱۵). پرده آمنیون می‌تواند خواص ضد میکروبی نیز از خود بروز دهد که در اثر وجود پپتیدهای آنتی‌باکتریال طبیعی در آن است (۱۶). مطالعات حیوانی و *in vitro* زیادی بر روی اثر عفونت باکتریایی بر زایمان زودرس انجام شده است. تهاجم باکتریایی به فضای Chorionic Decidua با آزادسازی اندوتوکسین و آگزوتوکسین همراه است. این مواد، Decidua و غشاهای جنینی را برای تولید گروهی از سیتوکین‌ها، اندوتوکسین‌ها، آگزوتوکسین‌ها، سنتز و آزادسازی پروستاگلاندین‌ها تحریک می‌کنند (۱۷). علاوه بر زایمان زودرس، وجود این آلودگی‌ها در هنگام تولد می‌تواند بر روی نوزاد تأثیر گذاشته و باعث بروز بیماری‌هایی مانند سپسیس (۱۸)، کوئزکتیویت (۱۹)، استئومیلیت، مننژیت (۲۰) و ... شوند. برای جلوگیری از عوارض آلودگی‌ها در طول دوره بارداری و هنگام زایمان؛ در رحم، کانال زایمان و غشاهای جنینی، مواد

ضدمیکروب طبیعی توسط بدن مادر و جنین ترشح می‌شود. از آنجا که در حین زایمان، جنین در معرض تهاجم عوامل بیماری‌زای زیادی قرار دارد، لذا میزان این پپتیدها به حداکثر میزان خود می‌رسد. آنتی‌باکتری‌های طبیعی از اجزای ضروری برای سیستم ایمنی ذاتی بوده و محافظتی با طیف وسیع در برابر باکتری‌ها، مخمرها و برخی ویروس‌ها ایجاد می‌کنند (۱۶). دفنزین‌های انسانی گروه بزرگی از آنتی‌باکتریال‌های طبیعی هستند که به دو گروه اصلی β -defensins و α -defensins تقسیم می‌شوند. α -defensins در نوتروفیل‌ها (Human Neutrophil Peptide 1-4, HNP1-4) و در سمت اپی‌تلیال سلول‌ها (Human defensin 5-6, HD5-6) وجود دارند. β -defensin‌های انسانی (Human beta defensin, HBD) نیز جزء گروه اصلی آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی پپتیدی هستند (۲۱). HBD1-4 به‌طور وسیع در سطوح مخاطی مانند روده و شش‌ها به‌وسیله سلول‌های اپی‌تلیال و لوکوسیت‌ها ترشح می‌شوند (۲۲) و جزء اصلی سیستم ایمنی ذاتی می‌باشند (۲۳). HBDها می‌توانند به‌طور ساختاری (Constitutive) وجود داشته باشند مانند (HBD1) و یا به‌صورت القایی در پاسخ به سیتوکین‌ها یا محصولات التهابی تولید شوند مانند (HBD2-4) (۲۴، ۲۵). پرده آمنیون انسانی یکی از محل‌های تولید این پروتئین‌ها و HBD3 دفنزین غالب در اپی‌تلیال آمنیونی است. این پروتئین و mRNA آن در هنگام مواجهه با اجزای دیواره باکتری‌های گرم منفی (Lipopolysaccharide, LPS) و گرم مثبت، همچنین مخمر *Candida albicans* ساخته می‌شود (۲۴). علاوه بر دفنزین‌ها پپتیدهای آنتی‌باکتریال دیگری در بافت آمنیون گزارش شده است (۱۶).

Elafin و (Secretory Leukocyte Protease Inhibitor, SLPI) از جمله این پپتیدها هستند که فعالیت آنتی‌پروتئازی و بازدارندگی الاستاز داشته و به‌عنوان اجزایی از سیستم ایمنی ذاتی با کنترل پاسخ التهابی در سطوح مخاطی، از سطوح مرتبط با آلودگی محافظت می‌کنند. در طی دوران بارداری میزان SLPI و mRNA- محافظت می‌کنند. در طی دوران بارداری میزان SLPI به‌تدریج افزایش می‌یابد، به‌طوری‌که غلظت آن در زمان زایمان به حداکثر خود می‌رسد. مطالعات *in vitro* نشان می‌دهد SLPI توسط هر دو سطح Decidua (Basalis و Paritalis) ترشح

می‌شود (۲۶). ترشح Elafin در پوست، برونش‌ها و آلونل‌های ریوی، روده بزرگ، آندومتر و پرده آمنیون به‌وسیله سلول‌های اپی‌تلیال گزارش شده است. Elafin دارای خاصیت آنتی‌میکروبی بر علیه *S.aureus* و *P.aeruginosa* می‌باشد (۲۷). در مواجهه مستقیم با عوامل محرک ایمنی مانند LPS یا ویروس‌ها، Elafin می‌تواند در بروز فعالیت پیش‌التهابی نقش داشته باشد. در نتیجه، اثرگذاری سیستم ایمنی ذاتی و حتی اکتسابی را افزایش می‌دهد (۲۸).

علاوه بر پپتیدهای آنتی‌باکتریال، پرده آمنیون با تولید لاکتوفرین و آنتاگونیست رسپتور IL-1، خاصیت ضدباکتریایی و ضدالتهابی ایجاد می‌کند (۲۹). اسید هیالورونیک، یک گلوکوزآمینوگلیکان با وزن مولکولی زیاد است، که به مقدار قابل‌توجهی در پرده آمنیون یافت می‌شود. این ماده به‌عنوان لیگاندی برای CD44 که بر روی سلول‌های التهابی بیان می‌شود، عمل می‌کند. علاوه بر این، نقش مهمی در اتصال سلول‌های التهابی از جمله لمفوسیت‌ها به استرومای پرده آمنیون دارد (۳۰). این تحقیق با هدف بررسی اثر آنتی‌باکتریال طبیعی موجود در پرده آمنیون بر روی سویه‌های مختلف باکتریایی و مقایسه حساسیت آنها به دو سمت اپی‌تلیال و مزانشیمال انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه بافت جفت و ضمام آن، که حاصل سزارین‌های

انتخابی (Elective) بود، در شرایط استریل از بیمارستان طالقانی و عرفان تهران تهیه گردید. در این تحقیق تنها از مواردی استفاده شد که بارداری طبیعی داشته و مادر و نوزاد از سلامت کامل برخوردار بودند و مادران نیز در ۲ هفته آخر بارداری آنتی‌بیوتیک مصرف نکرده بودند. آزمایشهای سرولوژیک برای ویروس‌های HIV، هپاتیت B و C و سفلیس برای تمام موارد قبل از سزارین انجام شد. علاوه بر این، سزارین‌ها در بین هفته ۳۸-۳۶ بارداری انجام گرفت. هرچند جفت یک بافت دور انداختنی است، ولی اطلاعات لازم در زمینه استفاده از این بافت در اختیار خانواده‌ها قرار گرفت و رضایت‌نامه از آنها اخذ شد. تمامی مراحل این تحقیق با تصویب کمیته اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد.

بافت‌ها پس از خارج شدن، در ظرف استریل حاوی بافر فسفات سالین (PBS) و در دمای ۴°C سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند. تمام مراحل جداسازی و آماده‌سازی بافت در شرایط استریل و در آزمایشگاه زیر هود لامینار انجام گرفت. پرده آمنیون به روش مکانیکی (Peeling) از کوریون جدا گردید و چندین بار با PBS سرد (۴°C) شسته شد تا اثری از لکه‌های خون بر روی آن باقی نماند. سپس پرده آمنیون به قطعات ۱cm² تقسیم شده و برای استفاده در مراحل بعدی آماده شد.

در شکل شماره ۱ یک جفت و ضمام آن، قبل از جداسازی و پرده آمنیون جداشده نشان داده شده است.



شکل شماره ۱: A، جفت و ضمام آن قبل از جداسازی؛ B، پرده آمنیون در حال جداسازی و شستشو؛ C، پرده آمنیون بعد از جداسازی و شستشو

برای بررسی میزان اثرات آنتی‌باکتریال بافت بعد از آماده‌سازی آمنیون از روش Direct Disk Diffusion، بر روی ۳ سویه باکتریایی استاندارد *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و ۲ سویه

برای بررسی میزان اثرات آنتی‌باکتریال بافت بعد از آماده‌سازی آمنیون از روش Direct Disk Diffusion، بر روی ۳ سویه باکتریایی استاندارد *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و ۲ سویه

یافته‌ها

پرده آمینون بر رشد ۵ سویه باکتریایی مورد مطالعه، به میزان متفاوتی اثر مهاری داشت. همچنین بررسی اثر نوع سطح قرارگیری بافت آمینون (اپی تلپال و مزانشیمال) بر سویه‌های مورد آزمایش نشان داد، که میزان و نحوه فعالیت ضدباکتری آنها با یکدیگر تفاوتی ندارد. در کل، تعداد ۵۰ پرده آمینون مورد بررسی قرار گرفت. به طور مستقل درمورد هر سویه از باکتری و هر سطح، حداقل از ۶ پرده آمینون استفاده شد. در بررسی‌های آماری تنها از نتایج پتری دیش‌هایی استفاده گردید که هاله عدم رشد در آنها به وضوح قابل رؤیت بوده و در یک گروه بافتی (حداقل ۵۰٪ نمونه‌ها) پاسخ مهاری مشاهده شود. در کشت سوش *P.aeruginosa* ATCC 27853 بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، اثر مهاری به خوبی در زیر و اطراف بافت دیده شد (جدول شماره ۱).

باکتری‌ها ابتدا در سطح محیط بلادآگار (Merck) به عنوان یک محیط کشت عمومی کشت شده و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. از کلونی‌های ایزوله به دست آمده، سوسپانسیونی با غلظت ۰/۵ مک فارلند (1.5×10^8 CFU) در سالیین نرمال تهیه و در سطح محیط مولر هینتون آگار (Merck) به عنوان محیط انتخابی به طور یکنواخت کشت داده شد. از قطعات تهیه شده پرده آمینون در ظرف کشت، در بازه زمانی کمتر از ۳۰ دقیقه پس از آماده سازی به عنوان آزادکننده آنتی بیوتیک استفاده شد. قطعات آمینون جداگانه به دو صورت سطح اپی تلپال بالا و سطح مزانشیمال بالا در ظرف کشت قرار گرفتند، و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. بعد از این مدت شعاع ناحیه عدم رشد در همه پتری دیش‌ها اندازه گیری شد، سپس میزان بازدارندگی در زیر و اطراف بافت با هم مقایسه گردید. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شد و برای مقایسه نمونه‌ها و آنالیز نتایج به دست آمده از کشت باکتری‌ها، از آزمون واریانس و توکی استفاده گردید.

جدول شماره ۱: میزان بروز هاله عدم رشد و کاهش رشد در زیر بافت در پتری دیش‌های کشت شده

پرده آمینون				سویه‌های باکتری
مزانشیمال بالا		اپی تلپال بالا		
هاله عدم رشد ^b (n=14) ۱ ^d و ۱۳ ^c	کاهش رشد در زیر بافت ^a (n=14) ۱۴	هاله عدم رشد ^b (n=14) ۱ ^d و ۱۲ ^c	کاهش رشد در زیر بافت ^a (n=14) ۱۴	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853
هاله عدم رشد ^b (n=17) ۱ ^d و ۱۴ ^c	کاهش رشد در زیر بافت ^a (n=17) ۱ ^d و ۱۶ ^c	هاله عدم رشد ^b (n=21) ۱ ^d و ۱۹ ^c	کاهش رشد در زیر بافت ^a (n=19) ۱ ^d و ۱۴ ^c	<i>E.coli</i> T3
هاله عدم رشد ^b (n=14) ۱ ^d و ۱۲ ^c	کاهش رشد در زیر بافت ^a (n=22) ۱ ^d و ۱۹ ^c	هاله عدم رشد ^b (n=14) ۱ ^d و ۱۲ ^c	کاهش رشد در زیر بافت ^a (n=15) ۱ ^d و ۱۲ ^c	<i>E.coli</i> T4

^aتعداد پتری دیش‌های بررسی شده از نظر وجود کاهش رشد در زیر بافت

^bتعداد پتری دیش‌های بررسی شده از نظر وجود هاله عدم رشد

^cتعداد پتری دیش‌های دارای هاله عدم رشد

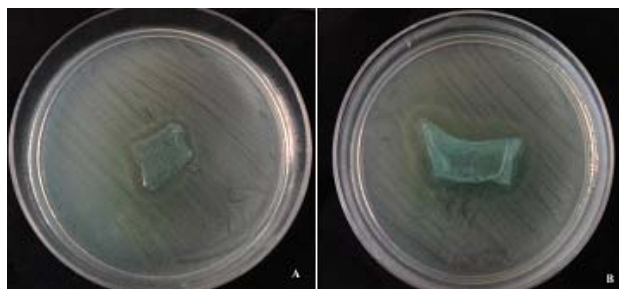
^dتعداد پتری دیش‌های فاقد هاله عدم رشد

قابل رؤیت بود. اندازه این هاله به طور میانگین حدود ۲mm در اطراف نمونه‌هایی با سطح اپی تلپال بالا و ۲/۸mm در حالت سطح مزانشیمال بالا قرار داشت (جدول شماره ۲)، در برخی از نمونه‌ها این اندازه حتی به حدود ۵mm هم می‌رسید (شکل شماره ۲).

کاهش رشد در زیر تمام نمونه‌هایی که سطح اپی تلپال آنها بالا قرار داشت، کاملاً واضح بود. در زیر نمونه‌هایی که سطح مزانشیمال آنها بالا بود، کاهش رشد در تمام موارد مشاهده گردید. در این نمونه‌ها هاله عدم رشد به وضوح در اطراف بافت

جدول شماره ۲: اندازه هاله عدم رشد در اطراف بافت آمینون به تفکیک نوع باکتری

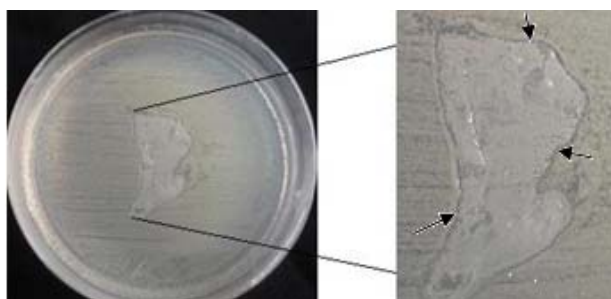
سویه‌های باکتری	پرده آمینون			
	مزانشیمال بالا		اپی‌تلیال بالا	
	بیشترین اندازه هاله	میانگین اندازه هاله	بیشترین اندازه هاله	میانگین اندازه هاله
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	۵mm	۴mm (n=14)	۲/۸mm (n=14)	۲mm (n=14)
<i>E. coli</i> T3	۲mm	۱mm (n=21)	۱/۳mm (n=17)	۱mm (n=21)
<i>E. coli</i> T4	۲mm	۲mm (n=14)	۱/۳mm (n=14)	۱mm (n=14)



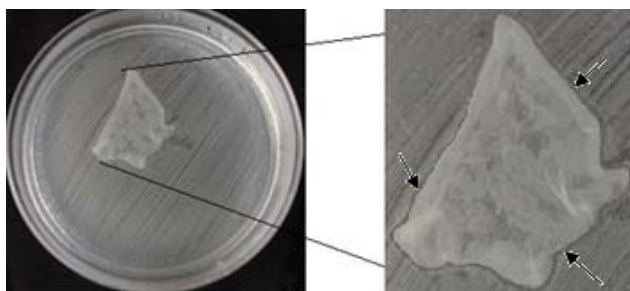
شکل شماره ۲: تشکیل هاله عدم رشد در *P.aeruginosa* ATCC 27853 در مجاورت بافت آمینون (A: نمونه دارای سطح مزانشیمال بالا; B: نمونه دارای سطح اپی‌تلیال بالا)

منفی آن در *E. coli* T3 و *E. coli* T4 ذکر شده است. در *E. coli* T3 اندازه هاله عدم رشد، در نمونه‌هایی که سطح اپی‌تلیال بالا قرار داشت، حدود ۱mm بود (شکل شماره ۳). در این گروه، کاهش رشد باکتری در زیر بافت مشاهده شد.

در سویه‌های مختلف *E. coli*، نتایج در هر مورد متفاوت بود. در ۲ سویه بالینی حساس تهیه‌شده از بیمارستان طالقانی به نام‌های T3 و T4، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷°C، هاله عدم رشد در اکثر موارد قابل مشاهده بود. در جدول شماره ۱ تعداد تکرارها برای هر سطح از بافت آمینون، همچنین تعداد پاسخ‌های مثبت و



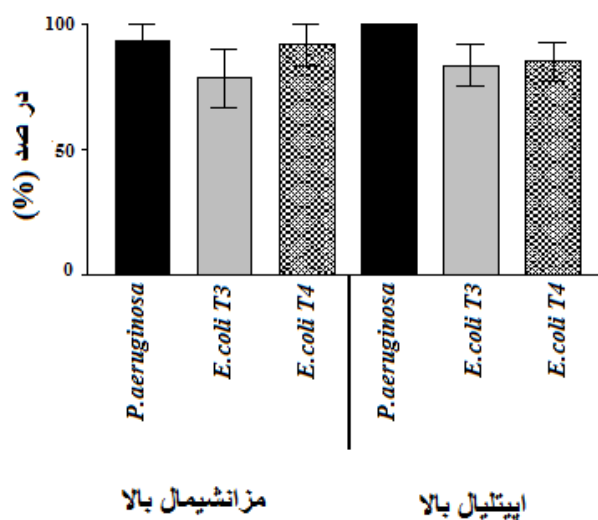
شکل شماره ۳: تشکیل هاله عدم رشد در *E. coli* T3 در مجاورت بافت آمینون دارای سطح اپی‌تلیال بالا (فلش‌ها نشان‌دهنده هاله عدم رشد است).



شکل شماره ۴: تشکیل هاله عدم رشد در *E. coli* T3 در مجاورت بافت آمینون دارای سطح مزانشیمال بالا (فلش‌ها نشان‌دهنده هاله عدم رشد است).

علاوه بر این، اندازه هاله عدم رشد در این نمونه‌ها، با *P.aeruginosa* ATCC 27853، اختلاف معنی‌داری ($p < 0.01$) داشت. (نمودار شماره ۱)

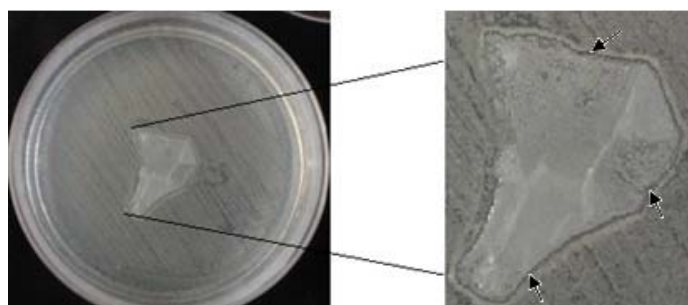
در نمونه‌هایی که سطح مزانشیمال در آنها بالا بود، هاله عدم رشد به‌طور میانگین اندازه‌ای حدود ۱/۳mm داشت (شکل شماره ۴) و حداکثر میزان آن ۲mm بود (جدول شماره ۲). در این گروه نیز کاهش رشد در زیر بافت مشاهده شد.



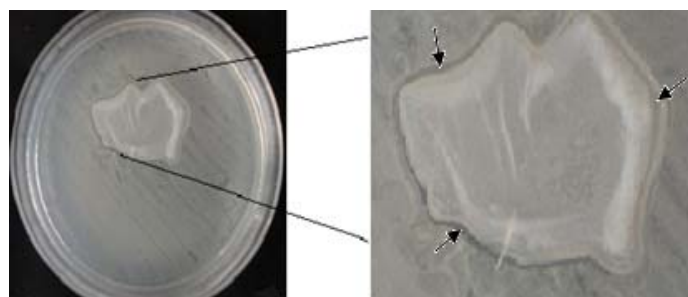
نمودار شماره ۱: مقایسه درصد تعداد پلپت‌های دارای هاله عدم رشد به تعداد کل پلپت‌ها در حالت سطح مزانشیمال بالا و سطح اپی تلپال بالا به تفکیک نوع باکتری

به‌طور میانگین حدود ۱/۳mm (شکل شماره ۵) و حداکثر میزان آن ۲mm بود.

در *E. coli T4* کاهش رشد در زیر بافت، در هر دو گروه اپی تلپال بالا و مزانشیمال بالا وجود داشت. اندازه هاله عدم رشد در نمونه‌های *E. coli T4* که سطح اپی تلپال در بالا قرار داشت،



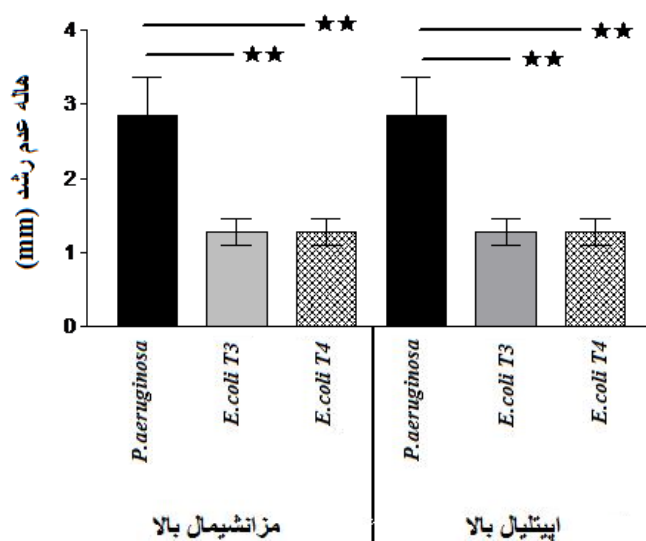
شکل شماره ۵: تشکیل هاله عدم رشد در *E.coli T4* در مجاورت بافت آمینون دارای سطح اپی تلپال بالا (فلش‌ها نشان‌دهنده هاله عدم رشد است).



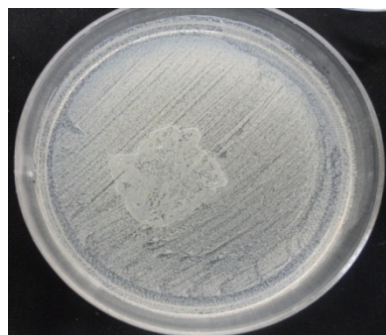
شکل شماره ۶: تشکیل هاله عدم رشد در *E.coli T4* در مجاورت بافت آمینون دارای سطح مزانشیمال بالا (فلش‌ها نشان‌دهنده هاله عدم رشد است).

۲mm بود (جدول شماره ۲)، همچنین میزان اندازه هاله با *P. aeruginosa* ATCC 27853، اختلاف معنی‌داری ($p < 0.01$) نشان داد (نمودار شماره ۲).

در نمونه‌هایی که سطح مزانشیمال در آنها بالا بود نیز هاله عدم رشد به‌طور معمول اندازه‌ای حدود ۱/۳mm داشت (شکل شماره ۶). در این گروه حداکثر میزان این هاله حدود



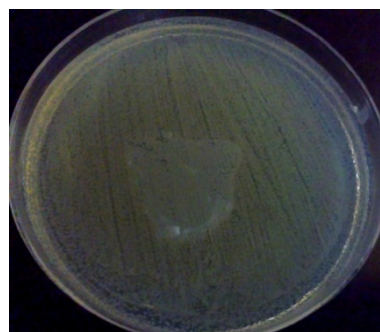
نمودار شماره ۲: مقایسه اندازه هاله عدم رشد در سطح اپی‌تلیال و مزانشیمال به تفکیک نوع باکتری ($p < 0.01$) (★★)



شکل شماره ۸: عدم تشکیل هاله عدم رشد در کشت *S. aureus* ATCC 25923 در مجاورت بافت آمینون

بررسی‌های آماری نشان داد تفاوت‌های اندک بین دو سطح مزانشیمال و اپی‌تلیال آمینون معنی‌دار نیست. در نمودار شماره ۱، درصد کاهش رشد در سطح مزانشیمال و اپی‌تلیال براساس سویه باکتریایی بیان شده است. درصدها با استفاده از تعداد پلیت‌های دارای اثر مهار به تفکیک هر بار تکرار بر روی باکتری‌های متفاوت محاسبه شدند. در بافت‌های بررسی‌شده هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در این درصد، بین بافت‌های مختلف مشاهده نشد. در نمودار شماره ۲، اندازه هاله‌های عدم رشد در هر گروه بافتی مورد بررسی قرار گرفت، که تفاوت اثر مهار بین سویه *P. aeruginosa* ATCC 27853 و *E. coli* (*E. coli T3*, *E. coli T4*) معنی‌دار بود ($p < 0.01$).

در کشت *E. coli* ATCC 25922 بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، برخلاف *E. coli T3* و *E. coli T4*، هاله عدم رشد در اطراف بافت دیده نشد. علاوه بر این، تفاوت در سطح قرارگیری (اپی‌تلیال و مزانشیمال) تأثیری در ایجاد خاصیت ضد میکروبی نداشت. در مورد کاهش رشد در زیر بافت نیز تغییری در حجم باکتری کشت داده‌شده قابل تشخیص نبود (شکل شماره ۷).



شکل شماره ۷: عدم تشکیل هاله عدم رشد در کشت *E. coli* ATCC 25922 در مجاورت بافت آمینون

در کشت *S. aureus* ATCC 25923 نیز بعد از ۲۴ ساعت قرارگیری در انکوباتور، وجود مهار در زیر و اطراف بافت قابل مشاهده نبود. در این نمونه‌ها در هر دو سطح اپی‌تلیال بالا و مزانشیمال بالا، مهار یا کاهش رشد وجود نداشت (شکل شماره ۸).

بحث

در این تحقیق میزان اثر آنتی‌میکروبی بر سویه‌های مختلف باکتریایی (استاندارد و بالینی) بررسی و مقایسه شد. علاوه بر این، اثر سطح قرارگیری نیز مورد آزمایش قرار گرفت. در تحقیقات *in vitro* انجام شده توسط Talmi و همکاران نیز از روشی مشابه با Disk Diffusion برای سنجش خاصیت آنتی‌باکتریال پرده آمینیون بر *Staphylococcus* کوآگولاز مثبت، *E. coli*، *Klebsiella*، *P. aeruginosa*، *Proteus mirabilis* استفاده شده بود، که این افراد مهار را فقط در زیر بافت قرار داده شده، گزارش کردند. این گروه ایجاد اثر مهاری را در نتیجه ارتباط نزدیک بافت و سطح محیط کشت دانستند (۳۲). اما نتایج ارائه شده توسط Kjaegaarda و همکاران، بیانگر وجود مهار در زیر پرده آمینیون و هاله‌ای در حدود ۱mm در اطراف بافت، به‌طور وابسته به گونه باکتریایی بود. این گروه از سویه‌های همولیتیک استرپتوکوکوس گروه A

P. aeruginosa، *Staphylococcus saprophyticus*، *S. aureus*، *Acinetobacter*، *Enterococcus faecalis*، *E. coli* و *calcoaceticus* گونه‌های *Lactobacillus* استفاده کردند که در هر مورد نتایج متفاوتی به دست آمد (۳۳). علاوه بر این، برای بررسی نقش اتصال بافت و سطح آگار در ایجاد اثر مهاری، این افراد بین بافت مورد بررسی و سطح آگار، فیلتر قرار دادند، ولی همچنان مهار قابل مشاهده بود. بررسی‌های انجام شده در مطالعه حاضر با استفاده از همین روش بر روی پرده آمینیون در بسیاری از موارد مؤید نتایج گذشته بود. سویه‌های میکروبی استفاده شده توسط این گروه‌ها از نمونه‌های بیمارستانی جدا شده بود، اما در تحقیق حاضر علاوه بر سویه‌های جدا شده بیمارستانی، از سویه‌های میکروبی استاندارد نیز استفاده گردید. در این تحقیقات نشان داده شد جنس و حتی سویه مورد استفاده می‌تواند در میزان بروز این اثر نقش داشته باشد. این تفاوت‌ها احتمالاً به علت وجود تفاوت در ساختارهای آنتی‌ژنیک این باکتری‌ها بوده است. LPS موجود در دیواره باکتری می‌تواند ترشح پپتیدهای آنتی‌باکتریال طبیعی را تحریک کند (۳۴)، همچنین برخی پپتیدهای آنتی‌باکتریال طبیعی نیز می‌توانند با مهار فعالیت فاکتور ویروانس خاصی، رشد باکتری خاصی را مهار کنند (۳۵).

پرده آمینیون در پتری‌دیش‌های *P. aeruginosa* ATCC 27853، *E. coli* T4 و *E. coli* T3 باعث ایجاد هاله عدم رشد واضحی شد. هاله عدم رشد در مورد ۲ سوش حساس بالینی *E. coli* (*E. coli* T3، *E. coli* T4)، مشابه تحقیقات پیشین و در مورد *P. aeruginosa* بیشتر از موارد ذکر شده در گذشته بود (۳۳، ۳۲). این نتایج مؤید گزارش قبلی در مورد وابستگی بروز اثر مهاری به ساختار باکتری است (۳۶).

اندازه هاله‌های عدم رشد ایجاد شده در این تحقیق به‌طور متوسط حدود ۱mm بود و از ۵mm فراتر نرفت که این مقدار در مقایسه با هاله عدم رشد ایجاد شده توسط دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استاندارد کم می‌باشد. بروز این اندازه کم می‌تواند دلایل زیادی داشته باشد. به نظر می‌رسد یکی از این دلایل، درون سلولی بودن این مواد و عدم ترشح کامل این پپتیدها بوده است. علاوه بر این، ساختار پروتئازی پپتیدهای آنتی‌باکتریال (۳۷) ممکن است باعث عدم پراکندگی آنها در آگار شود.

در مطالعه حاضر اندازه هاله عدم رشد و میزان مهار رشد در زیر بافت آمینیون در نمونه‌های دارای سطح اپی‌تلیال بالا در مقایسه با مواردی که در آنها سطح مزانشیمال بالا قرار داشت، تفاوت معنی‌داری نشان نداد. بنابراین، تشابه خاصیت آنتی‌باکتریال در دو سطح بافت آمینیون بیانگر این مطلب است که تنها سلول‌های اپی‌تلیال آمینیون در بروز اثر مهاری نقش ندارند، و مقداری از خاصیت آنتی‌باکتریال آمینیون در حالت سطح اپی‌تلیال بالا مربوط به ساختارهایی غیر از این سلول‌ها می‌باشد. وجود هیالورونیک اسید در غشای پایه (Basement Membrane) و حضور مهارکننده‌های ماتریکس متالوپروتئیناز در سمت استرومال آمینیون نیز می‌تواند به عنوان عامل دیگری باعث کاهش رشد باکتری شود (۳۸).

نتیجه‌گیری

در مجموع، به نظر می‌رسد اثر آنتی‌باکتریال بافت آمینیون در برابر سویه‌های مختلف باکتریایی متفاوت است. علاوه بر این، احتمالاً سطح قرارگیری آمینیون (سطح مزانشیمال بالا یا اپی‌تلیال بالا)، تأثیری در میزان بروز اثر مهاری ندارد. از آنجایی که مطالعات کمی در این زمینه انجام شده است، تحقیقات بیشتر و دقیق‌تر برای

روشن شدن جنبه‌های آنتی‌باکتریال پرده آمنیون ضروری به نظر می‌رسد.

خانم یوسفی کمال قدردانی و تشکر به عمل می‌آید. این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید. این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم فاطمه عاصی طهرانی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کارکنان محترم اتاق عمل بیمارستان‌های عرفان و آیت‌الله طالقانی به‌خصوص سرکار خانم دکتر نیرومنش و سرکار

References:

1. 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 Apr 29; 15:88-99.
2. Davis JW. Skin Transplantation with a Review of 550 Cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J* 1910;15:307-396.
3. Bujang-Safawi E, Halim AS, Khoo TL, Dorai AA. Dried Irradiated Human Amniotic Membrane as a Biological Dressing for Facial Burns-A 7-year Case Series. *Burns* 2010;36(6):876-82.
4. Gajiwala K, Gajiwala AL. Evaluation of Lyophilised, Gamma-irradiated Amnion as a Biological Dressing. *Cell Tissue Bank* 2004;5(2):73-80.
5. Mericka P. Current Trends in Safety Assurance for Tissue Grafts Used in Burn Treatment. *Acta Chir Plast* 2006;48(2):51-8.
6. Mermet I, Pottier N, Sainthillier JM, Malugani C, Cairey-Remonnay S, Maddens S, et al. Use of Amniotic Membrane Transplantation in the Treatment of Venous Leg Ulcers. *Wound Repair Regen* 2007;15(4):459-64.
7. Chandra A, Maurya OP, Reddy B, Kumar G, Pandey K, Bhaduri G. Amniotic Membrane Transplantation in Ocular Surface Disorders. *J Indian Med Assoc* 2005;103(7):364-8.
8. Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic Membrane Transplantation for Ocular Surface Reconstruction. *Cornea* 2005;24(6):643-653.
9. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, Sterilization and De-epithelialization of Human Amniotic Membrane for Use in Ocular Surface Reconstruction. *Biomaterials* 2010;31(2):216-25.
10. Adly OA, Moghazy AM, Abbas AH. Assessment of Amniotic and Polyurethane Membrane Dressings in the Treatment of Burns. *Burns* 2010;36(5):703-10.
11. Burgos H. Angiogenic and Growth Factors in Human Amnio-chorion and Placenta. *Eur J Clin Invest* 1983;13(4):289-296.
12. Kim HG, Choi OH. Neovascularization in a Mouse Model Via Stem Cells Derived from Human Fetal Amniotic Membranes. *Heart Vessels* 2011;26:196-205.
13. 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.
14. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of Interleukin 1alpha and Interleukin 1beta in Human Limbal Epithelial Cells Cultured on the Amniotic Membrane Stromal Matrix. *Br J Ophthalmol* 2001;85(4):444-9.

15. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic Membrane Transplantation with or without Limbal Allografts for Corneal Surface Reconstruction in Patients with Limbal Stem Cell Deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998;116(4):431-41.
16. Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA. Natural Antimicrobial Production by the Amnion. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196(3):255.e1-6.
17. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine Infection and Preterm Delivery. *The New England J Med* 2000;342(20):1500-7.
18. Joseph TA, Pyati SP, Jacobs N. Neonatal Early-Onset Escherichia Coli Disease. The Effect of Intrapartum Ampicillin. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1998;152(1):35-40.
19. Iroha EO, Kesah CN, Egri-Okwaji MT, Odugbemi TO. Bacterial Eye Infection in Neonates, a Prospective Study in a Neonatal Unit. *West Afr J Med* 1998;17(3):168-72.
20. Davied PA. Bacterial Infection in the Fetus and Newborn. *Arch Dis Child* 1971;46:1-28.
21. King AE, Critchley HOD, Kelly RW. Innate Immune Defences in the Human Endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:116.
22. Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the Peptide Antibiotic Human b-Defensin 1 in Cultured Gingival Epithelial Cells and Gingival Tissue. *Infect Immun* 1998;66(9):4222-4228.
23. Ganz T. Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3(9):710-20.
24. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM. The Novel Antimicrobial Peptide β 3-defensin Is Produced by the Amnion: A Possible Role of the Fetal Membranes in Innate Immunity of the Amniotic Cavity. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(5):1678-1687.
25. 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.
26. Denison FC, Kelly RW, Calder AA, Riley SC. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Concentration Increases in Amniotic Fluid with the Onset of Labour in Women: Characterization of Sites of Release Within the Uterus. *J Endocrinol* 1999;161(2):299-306.
27. Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM. SLPI and Elafin: One Glove, many Fingers. *Clin Sci* 2006;110:21-35.
28. Sallenave JM. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor and Elafin/Trappin-2: Versatile Mucosal Antimicrobials and Regulators of Immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010;42(6):635-43.
29. Kanyshkova TG, Buneva VN, Nevinsky GA. Lactoferrin and Its Biological Functions. *Biochemistry* 2001;66(1):1-7.
30. Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Hyaluronic acid-CD44 Interaction Mediates the Adhesion of Lymphocytes by Amniotic Membrane Stroma. *Cornea* 2005;24(2):206-12.
31. Institute CaL S. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 9th ed. CLSI/NCCLS M2-A9. *Clin Lab Stand Inst* 2006;26(1).
32. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial Properties of Human Amniotic Membranes. *Placenta* 1991;12(3):285-8.
33. Kjaergaard N, Heind M, Hyttelb L, Helmigb RB, Schønheyderb HC, Uldbjergd N, et al. Antibacterial Properties of Human Amnion and Chorion in Vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;94(2):224-9.
34. Stock SJ, Kelly R, Riley S. Natural Antimicrobials in Pregnancy. Edinburgh: The University Edinburgh; 2008.

35. Bellemare A, Vernoux N, Morisset D, Bourbonnais Y. Human Pre-Elafin Inhibits a *Pseudomonas aeruginosa*-Secreted Peptidase and Prevents Its Proliferation in Complex Media. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(2):483-90.
36. Simpsona AJ, Maxwellb AI, Govanb JR, Hasletta C, Sallenav JM. Elafin (elastase-specific inhibitor) Has Anti-microbial Activity Against Gram-positive and Gram-negative Respiratory Pathogens. *FEBS Lett* 1999;452(3):309-13.
37. King AE, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Innate Immune Defences in the Human Uterus during Pregnancy. *Placenta* 2007;28(11-12):1099-106.
38. Ardizzoni A, Neglia RG, Baschieri MC, Cermelli C, Caratozzolo M, Righi E, et al. Influence of Hyaluronic Acid on Bacterial and Fungal Species, Including Clinically Relevant Opportunistic Pathogens. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22(10):2329-38.