نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هفدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۰،
پیاپی ۴۳ : ۸۳-۷۱

مقاله پژوهشی

مطالعه اثر ضد میکروبی کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین

رویا دانشمند[۱]، منصور خاکپور[۲]*، سید اسماعیل صفوی خلخالی[۲]

۱- دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۴

چکیده

ضد میکروب‌ها به‌طورکلی به موادی گفته می‌شود که برای مقابله با میکروارگانیسم‌ها را به کار می‌روند که موجب از بین رفتن میکروب یا مهار رشد آن می‌شوند. کاندیشن مدیوم (محیط کشت شرطی شده) به دنبال تکثیر و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت آزمایشگاهی از این سلول‌ها ترشح می‌گردد. این ترکیب دارای فاکتورهایی نظیر TGF-B، TNF، GM-SCF، KGF، PDGF، VEGF، EGF، IL-1، IL-6، IL-8، BFGF، TGF-α، IGF-1، IGF-2، MCP-1، HGF، Fibronectin و Collagen می‌باشد. با توجه به وجود این عوامل و نقش آن ها در بدن، هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین بوده است. در این مطالعه تعداد ۵ جدایه استاندارد کد دار باکتریایی شامل اشریشیا کلای، استافیلو کوکوس آرئوس، سودوموناس، سالمونلا و لیستریا با استفاده از روش MBC و MIC و یک جدایه استاندارد کد دار مخمر کاندیدا آلبیکنز با استفاده از تست فاگوسیتوز در تلاقی با کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین قرار گرفتند. نتایج حاصل از آزمایش MIC و MBC نشان داد کاندیشن مدیوم روی دو باکتری سالمونلا و لیستریا مونوسایتوژنز تأثیر ممانعت از رشد و کشندگی در غلظت ۱۰۰٪ کاندیشن مدیوم دارد ولی در مابقی باکتری‌ها اثری بر روی ممانعت از رشد باکتری‌ها ندارد. نتایج دیسک نیز بی‌اثر بودن ماده بر رشد میکروارگانیسم‌ها به‌جز دو باکتری فوق به شکل جزئی را نشان داد. تست فاگوسیتوز نشان‌دهنده تقویت اثر فاگوسیتوزی و ایمنی سلولی ناشی از آن در نمونه‌های مجاور شده با کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین بود. همچنین مطالعه مورفولوژیک میکروسکوپی به‌صورت مشهود نشان داد که اندازه سلول‌های فاگوسیتر در گروه تیمار بزرگ‌تر از اندازه آن‌ها در گروه شاهد می‌باشد. به‌طورکلی می‌توان گفت مدیوم کاندیشن حاصل از سلول‌های بنیادی بند ناف جنینی تأثیر ضد باکتریایی و ضد قارچی چندانی ندارد و این تأثیر فقط در برخی موارد همچون سالمونلا و لیستریا مونوسایتوژنز مؤثر بود که آن هم تأثیر معنی‌داری را نشان نداد و به‌طورکلی نمی‌تواند جایگزین مواد ضد باکتریایی شود.

کلمات کلیدی: ضد میکروب‌ها، کاندیشن مدیوم، سلول‌های بنیادی، بند ناف.

*نویسنده مسئول: منصور خاکپور

آدرس: استادیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

پست الکترونیک: Khakpour@iaut.ac.ir

مقدمه

ضد میکروب‌ها (antimicrobial) موادی هستند که جهت مقابله با میکروارگانیسم‌ها به کار می‌روند و آن‌ها را از بین می‌برند یا رشد آن‌ها را متوقف می‌کنند (۳۰). برخی از این مواد، ترکیبات دارویی ضد میکروبی هستند که می‌توانند بیوسید (موجب از بین رفتن میکروب) یا بیواستات (موجب مهار رشد میکروب) باشند (۵). همچنین داروهای ضد میکروبی را می‌توان بر اساس نوع میکروارگانیسمی که علیه آن فعالیت می‌کنند تقسیم‌بندی نمود. به‌عنوان‌مثال آنتی‌بیوتیک‌ها علیه باکتری‌ها و آنتی فونگال‌ها علیه قارچ‌ها عمل می‌نمایند. دسته اصلی ترکیبات ضد میکروبی، ترکیباتی با نام ضدعفونی‌کننده‌ها می‌باشند که کاملاً غیرانتخابی عمل نموده و تمامی عوامل میکروبی را از بین می‌برند (۱۹).

اولین بار بیش از ۲۰۰۰ سال قبل ترکیباتی با ویژگی‌های ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت. مصریان و یونانیان باستان از عصاره‌های گیاهی خاص برای درمان عفونت‌ها استفاده می‌کردند. بعدها میکروبیولوژیست‌هایی مانند پاستور و ژوبرت خاصیت آنتاگونیستی بین برخی از باکتری‌ها را مشاهده نمودند و درباره نقش این برهم‌کنش‌ها در درمان بیماری‌ها تحقیقاتی انجام دادند. در سال ۱۹۲۸ الکساندر فلیمینگ برای اولین بار قارچی با ویژگی‌های ضد میکروبی را کشف کرد این قارچ Penicillium rubens نامیده شد. ترکیب استخراج‌شده از این قارچ پنی‌سیلین نام گرفت و در سال ۱۹۴۲ به‌صورت موفقیت‌آمیزی برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری استرپتوکوکوس مورد استفاده قرار گرفت (۳).

امروزه طیف وسیعی از ترکیبات طبیعی و شیمیایی به‌عنوان مواد ضد میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اسیدهای آلی مانند لاکتیک اسید، سیتریک اسید، استیک اسید و نمک‌های آن‌ها به‌عنوان مواد ضد میکروبی در محصولات غذایی به‌صورت گسترده استفاده می‌شوند. سطوح مخلوط فلزی حاوی مس دارای ویژگی‌های ضد میکروبی طبیعی بوده و می‌توانند میکروارگانیسم‌هایی مانند اشریشیا کلای و استافیلوکوکوس را از بین ببرند. فلزات سنگین دیگری مانند جیوه دارای خاصیت ضد میکروبی هستند. گیاه شناسان سنتی از گیاهان برای درمان بیماری‌های ناشی از آلودگی‌های میکروبی استفاده می‌کنند. به‌صورت کاملاً علمی نشان داده شده که بسیاری از این گیاهان دارای فعالیت ضد میکروبی هستند و نیز برخی از فراورده‌های گیاهی از رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن جلوگیری می‌کنند (۹).

سلول‌های بنیادی، سلول‌های باقابلیت منحصربه‌فرد تکثیر و بازسازی جمعیت‌های سلولی دیگر هستند (۱۳). سلول‌های بنیادی سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که توانایی تکثیر و تولید سلول‌های پیش ساز را در خود حفظ می‌کنند در نتیجه می‌توانند در پاسخ به تحریکات خاص به انواع سلول‌های موجود در بدن تمایز یابند (۳۲).

این سلول‌ها را می‌توان از منابع متفاوت جنینی و بالغ استخراج نمود و ازجمله منابع سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های بنیادی گرفته‌شده از خون بند ناف انسان هستند (۷). بند ناف ازنظر آناتومیکی و بافت‌شناسی از دو سیاهرگ و یک سرخرگ و یک رگ لنفی تشکیل‌شده است. این ساختارها در یک بافت همبند موکوسی به نام ژله وارتون قرارگرفته است. درواقع ژله وارتون جز اصلی بند ناف را تشکیل می‌دهد. این ژله حاوی رشته‌های بسیار اندک و سلول‌های مزانشیمی شبیه به فیبروبلاست است (۲۹). سلول‌های مزانشیمی شبیه فیبروبلاست موجود در ژله وارتون دارای رشته‌های

عضلانی صاف آلفا اکتین می‌باشند. این سلول‌های مزانشیمی سلول‌های بنیادی بوده که در محیط آزمایشگاهی قادر به تمایز به سایر سلول‌ها می‌باشند (۱۷). سلول‌های بنیادی خون بند ناف، بسیار توانمند و نامیرا بوده و دسترسی به آن‌ها به دلیل تولد روزانه تعداد زیادی نوزاد، آسان است. بررسی‌های محققان نشان می‌دهد که از این سلول‌ها می‌توان برای درمان بیماری‌های مختلفی چون بیماری‌های نورولوژیکی و صدمات نخاعی استفاده کرد (۲۴).

استفاده از سلول‌های بنیادی در داخل بدن با محدودیت‌هایی همراه می‌باشد که ازجمله آن‌ها می‌توان به تحریک سیستم ایمنی و ایجاد ضایعات توموری و همچنین کاهش بقای سلول‌ها به دنبال پیوند اشاره کرد (۴). ازاین‌رو پژوهش‌های صورت گرفته در این عرصه همگی سعی در استفاده از محصولاتی از سلول‌های بنیادی را دارند که محدودیت‌های فوق را شامل نشود. ازجمله این محصولات می‌توان به کاندیشن مدیوم (محیط کشت شرایطی شده) اشاره کرد.

فاکتورهای مترشحه از سلول‌های بنیادی می‌توانند در محیطی که سلول‌های بنیادی کشت‌شده شناسایی شوند که به این محیط، محیط کاندیشنال، کاندیشن مدیوم یا (CM) گویند. ازآنجاکه محیط کاندیشنال فاقد سلول است، از وقوع واکنش‌های ایمنی جلوگیری می‌کند و مشکل رد پیوند نیز وجود ندارد. همچنین محیط کاندیشنال دارای اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد توموری است و حاوی فاکتورهای رشد متفاوت و سیتوکین هاست که به‌وسیله انواع سلول‌های بنیادی ترشح می‌شوند. از جمله این فاکتورها می‌توان به VEGF، PDGF، TNF، EGF، HGF، NGF، BDNF، IGF-I، IGF-II، TGF-α، TGF-β، KGF، bFGF، GM-CSF، MCP-1، IL-1، IL-6، IL-8، Fibronectin، Collagen و دیگر فاکتورهای رشد اشاره کرد که توسط سلول‌های بنیادی ترشح می‌شود در محیط کاندیشنالشان وجود دارند (۱۲، ۲۱ و ۲۳). وجود مواردی چون سیتوکین های PDGF، TGF-α، TGF-β، TNF، EGF، HGF، NGF، MCP-1 و اینترلوکین هایی مثل اینترلوکین ۱، ۶ و ۸ به عنوان عوامل موثر بر گلبول های سفید و اغلب لنفوسیت ها (۱، ۲۰ و ۲۵)، همچنین وجود فاکتورهایی چون GM-CSF به عنوان فاکتور رشد گرانولوسیت‌ها و مونوسیت‌ها (۱۴) و وجود فیبرونکتین به عنوان Opsonin (۱۱) و مواردی از این قبیل در کاندیشن مدیوم، احتمال تاثیر ضدمیکروبی مستقیم و غیرمستقیم آن را مشخص می کند. ازاین‌رو هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین بوده است.

مواد و روش کار

۱- تهیه محیط کشت شرایطی شده سلول‌های بنیادی ژله وارتون بند ناف انسانی

بند ناف تهیه شده در داخل سرم فیزیولوژی و در مجاورت یخ به آزمایشگاه کشت سلولی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز منتقل گردید. ابتدا بند ناف ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ قرار گرفت. سپس به‌اندازه ۷ الی ۸ سانتی‌متر از قسمت میانی بافت بند ناف توسط قیچی جراحی جدا گردید و به داخل یک پتری دیش حاوی بافر HBSS فیلتر شده به همراه آنتی‌بیوتیک، انتقال داده شد. لایه‌های بند ناف توسط تیغ اسکالپل جدا گردیده و درنهایت ژله وارتون آن در پتری دیش دیگر که حاوی بافر HBSS و آنتی‌بیوتیک بود منتقل شد. بافت ژله وارتون جداشده توسط تیغ جراحی به قطعات بسیار ریز برش داده شد. جهت شستشو، بافر HBSS حاوی قطعات ژله وارتون به یک فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شده و به مدت ۵ دقیقه در

دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شده و قطعات بافت ژله وارتون به فلاسک T25 حاوی محیط کامل، DMEM به همراه ۲۰٪ FBS و ۱٪ آنتی‌بیوتیک Pen+Strep انتقال داده شد. فلاسک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۹۶ درصد و ۵ درصد CO2 نگهداری شدند. فلاسک های حاوی بافت ژله وارتون روزانه مورد بررسی قرار گرفته و هر ۳ روز یک‌بار محیط آن‌ها تعویض گردید. حدود ۵ الی ۱۵ روز طول می‌کشد تا سلول‌ها به کف فلاسک بچسبند و بعد از چسبیدن بافت‌ها به کف فلاسک هر ۳ روز یک‌بار باید محیط کشت آن‌ها تعویض گردد.

جهت پاساژ سلول‌های بنیادی زمانی که تراکم سلولی در فلاسک T25 به حدود بیشتر از ۷۰٪ فضای کف فلاسک رسید، پاساژ سلولی انجام گرفت. ابتدا محیط فعلی دور ریخته شد و با ۲/۵ میلی‌لیتر PBS به مدت ۳۰ ثانیه شستشو داده شد. جداسازی سلول‌ها از کف فلاسک با استفاده از ۲ میلی‌لیتر آنزیم تریپسین و ۳ دقیقه انکوباسیون انجام شد. پس از جداسازی کامل سلول‌ها، تریپسین با استفاده از محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FBS به حجم ۴ میلی‌لیتر رسانده شد تا خنثی گردد. محلول حاوی سلول با استفاده از پیپت پاستور به یک فالکون ۱۵ میلی‌لیتری استریل منتقل شده و به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از خارج کردن محیط رویی، رسوب سلولی توسط محیط DMEM کامل سوسپانسیون شده و به‌طور مساوی به دو فلاسک T25 انتقال داده شد. فلاسک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۹۶ درصد و ۵ درصد CO2 نگهداری شدند. فلاسک های حاوی سلول ژله وارتون روزانه مورد بررسی قرار گرفته و هر ۳ روز یک‌بار محیط آن‌ها تعویض گردید.

به‌منظور جمع‌آوری محیط کاندیشنال سلول‌های بنیادی ژله وارتون، زمانی که سلول‌های بنیادی ژله وارتون کشت داده‌شده به پاساژ چهارم رسیدند، سلول‌ها پاساژ داده و به داخل یک فلاسک کشت منتقل می‌شود و پس‌ازآن که سلول‌ها به کف فلاسک کشت چسبیدند، محیط رویی کشت را دور ریخته و سلول‌های چسبیده به کف فلاسک را دومرتبه هر بار با ۱ میلی‌لیتر PBS شستشو داده می‌شود. سپس حدود ۱/۵ تا ۲ میلی‌لیتر محیط DMEM تازه فاقد سرم روی سلول‌ها ریخته و مجدداً فلاسک‌ها به انکوباتور منتقل می‌شود. پس از گذشت ۷۲ ساعت محیط رویی سلول‌ها جمع‌آوری شده و در لوله فالکون ریخته می‌شود و به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ می‌شود، سپس محیط کاندیشنال با فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر می‌شود تا عاری از هرگونه سلول مرده یا قطعات سلولی شود، سپس محیط را در لوله فالکون الیکوت کرده و جهت نگهداری به فریز -۸۰ منتقل می‌شود (۲۲).

۲- MIC (حداقل غلظت مهاری) و MBC (حداقل غلظت کشندگی) کاندیشن مدیوم

جهت به دست آوردن MIC روش Microdilotion broth در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا در هر چاهک به‌وسیله سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث به‌غیراز چاهک اول ریخته شد. سپس در چاهک اول و دوم ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت شرایطی شده ریخته (به علت اینکه غلظت آن در چاهک اول ۱۰۰ درصد باشد) و از چاهک دوم ۱۰۰ میکرولیتر برداشته به چاهک سوم ریخته و به همین ترتیب تا چاهک نهم و از چاهک نهم ۱۰۰ میکرولیتر خارج گردید. به چاهک ۱۲ نیز ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت شرایطی شده اضافه گردید. از کشت ۲۴ ساعته باکتری موردنظر از کدورت نیم

مک فارلند $۱/۵\times۱۰^{۸}$ رقت ۱/۱۰۰ تهیه در تمامی چاهک‌ها به‌غیراز چاهک‌های ۱۱ و ۱۲، ۱۰۰ میکرو لیتر ریخته شد. حال از معرف Resazurin به مقدار ۳۰ میکرولیتر به‌تمامی چاهک‌ها ریخته شد. چاهک ۱۰ شاهد باکتری، چاهک ۱۱ شاهد محیط کشت و چاهک ۱۲ شاهد محیط کشت شرایطی شده (مدیوم کاندیشن) بود. آخرین چاهک شفاف به‌عنوان حداقل غلظت مهاری در نظر گرفته شد.

جهت به دست آوردن MBC منطقه‌ای (چاهک) که تغیر رنگ بینابین تشکیل‌شده از چاهک بعدی (قرمز) شده و همچنین از چاهک ماقبل بدون تغیر رنگ نداده از همان چاهک نمونه برداشت و در سطح محیط کشت BHI آگار نقطه‌ای کشت داده بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه رشد باکتری را بررسی کرده که هر کدام از محل‌های کشت که رشد باکتری منفی بود رقت نتیجه MBC در نظر گرفته شد.

باکتری‌های مورداستفاده در این آزمایش عبارت‌اند از Pse. Aeruginosa (PTCC-1310)، E.coli (PTCC-1330)، Stap. Aureus (PTCC-1764)، Salmonella. Enteric (PTCC-1709) و Listeria mon (PTCC-1298).

۳- روش دیسک (Disk Diffiusion)

جهت ارزیابی توان و اطمینان ممانعت از رشد میکروارگانیسم از روش دیسک نیز استفاده شد. بدین منظور عصاره مدیوم کاندیشن در یک سری لوله‌های ۹ تایی رقت سازی شده و یک سی‌سی از محلول DMS0 5% یا ۱۰٪ در لوله‌ها ۲ الی ۹ ریخته سپس از مدیوم کاندیشن به مقدار یک سی‌سی در لوله اول و دوم ریخته شد. پس از مخلوط کردن یک سی‌سی از لوله دوم برداشته در لوله سوم ریخته و تا لوله آخر به همین ترتیب و از ۹ به مقدار یک سی‌سی خارج شد. سپس در هر لوله دیسک Blank paper شرکت پادتن طب انداخته شده و پس از ۳۰ دقیقه دیسک خارج و در انکوباتور ۳۷ درجه خشک گردید. سپس از کشت ۲۴ ساعت باکتری موردنظر نیم مک فارلند تهیه و در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به‌وسیله سواب پنبه دار کشت صفحه‌ای داده بعد از ۵ دقیقه جذب رطوبت نسبی محیط کشت، دیسک‌ها به فاصله ۲ سانتی‌متر در سطح محیط کشت قرار داده بعد از ۲۴-۱۸ ساعت قطر هاله‌های ایجادشده برحسب میلی‌متر اندازه گرفته و ثبت شد.

٤- تست فاگوسیتوز

جهت بررسی خاصیت ضد قارچی محیط کشت شرایطی شده سلول بنیادی از تست فاگوسیتوز استفاده شد. در این روش از خون تام واجد ضد انعقاد هپیارین استفاده می‌شود. ابتدا کشت ۲۴ ساعته مخمر کاندیدا آلبیکنز در محیط آبگوشت مالتوز تهیه و با سانتریفیوژ محیط کشت در ۱۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی دور ریخته شد. با دو بار شستشوی مخمر و اضافه کردن سالین نرمال استریل به پلیت مخمر و سپس سانتریفیوژ ۵ دقیقه‌ای در ۱۰۰۰ دور نهایتاً ۴ سی‌سی سالین نرمال به مخمر شسته شده اضافه شد تا سوسپانسیون مخمر تشکیل گردید. سوسپانسیون واجد ۴×۱۰^{۶} جسم مخمری در هر میلی‌لیتر بود. برای شمارش، ۱۰۰ لاندا از سوسپانسیون برداشته و با ۹۰۰ لاندا سالین نرمال مخلوط گردید تا رقت ۱:۱۰۰ حاصل شود و سپس چند قطره از این محلول به لام هموسیتومتر انتقال داده شد. ۵ مربع از مربع بزرگ وسط (واحد ۲۵ مربع کوچک) هموسیتومتر شمارش شده و برای محاسبه بدین‌صورت عمل شد: ۱۰ × ۵ × فاکتور رقت (۱۰) × به تعداد شمرده‌شده = تعداد مخمر در هر میکرولیتر. سپس به نسبت لازم تا حصول به ۴×۱۰^{۶} مخمر در هر میلی‌لیتر، رقیق‌سازی انجام گرفت. به‌طورکلی سعی شد

برای هر نوتروفیل، حداقل دو مخمر وجود داشته باشد. پس از انکوباسیون نیم‌ساعته سوسپانسیون مخمر با مقدار هم‌حجم پلاسمای گاو در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مخلوط کردن و انکوباسیون یک‌ساعته ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمری انکوبه شده با پلاسما با ۵۰۰ میکرولیتر خون تام در همان دما، چند گسترش شعله شمعی تهیه و به روش گیمسا رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری شمارش انجام گردید. در هر گسترش در مجموع ۵۰ نوتروفیل از لحاظ ویژگی‌های زیر مورد مطالعه قرار می‌گیرد. درصد نوتروفیل‌هایی که فاگوسیتوز انجام داده‌اند. همچنین متوسط تعداد مخمر بلعیده‌شده توسط هر نوتروفیل نتیجه بررسی می‌شود.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

به‌منظور تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از بسته نرم‌افزاری ۲۳ SPSS استفاده شد. برای پارامترهای کمی حاصل از مطالعه، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد و در موارد اختلافی جهت تعیین اختلاف از آزمون کای اسکوار استفاده شد. سطح اطمینان دراین مطالعه نیز ($p<0.05$) در نظر گرفته شد.

نتایج

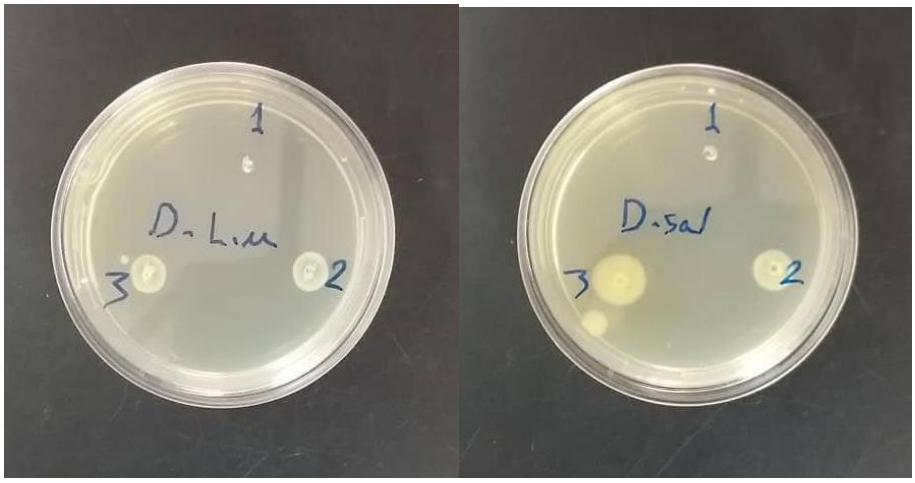
بررسی اثر ضد باکتریایی

قرار گرفتن غلظت‌های مختلف محلول استریل کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین در مجاورت سویه‌های استاندارد اشیرشیا کلای، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا و لیستریا مونوسایتوژنز به روش MIC و MBC تنها تأثیر ممانعت از رشد و کشندگی را بر روی دو باکتری سالمونلا و لیستریا مونوسایتوژنز در غلظت ۱۰۰ درصد محلول نشان داد.

جدول ۱: نتایج مربوط به آزمایش MIC و MBC

باکتری	گروه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
	درصد دارو تست	٪۱۰۰	٪۵۰	٪۲۵	٪۱۲/۵	٪۶/۲۵	٪۳/۱۲	٪۱/۵۶	٪۰/۷۸	٪۰/۳۹	٪۰/۱۹۵	کنترل باکتری	کنترل عصاره
E. coli PTCC-1330	MIC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	MBC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Pse. aeruginosa PTCC-1310	MIC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	MBC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Stap. aureus PTCC-1764	MIC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	MBC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Salmo. Enteric PTCC-1709	MIC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	MBC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Listeria. mon PTCC-1298	MIC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	MBC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

قرار گرفتن دیسک‌های آغشته به محلول استریل کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین در سطح کشت باکتری جهت اطمینان از اثر ضد باکتریایی محلول، مؤید نتایج فوق بود. هاله عدم رشد باکتری صرفاً در باکتری‌های سالمونلا انتریکا و لیستریا مونوسایتوژنز تشکیل شد که با توجه به‌اندازه هاله‌ها، تأثیر ضد باکتریایی دیسک نمی‌تواند چشمگیر باشد.



تصویر ۱: استفاده از دیسک‌های آغشته به کاندیشن مدیوم در محیط‌های کشت باکتریایی
(راست: سالمونلا انتریکا، چپ: لیستریا مونوسایتوژنز)

جدول ۲: قطر هاله‌های عدم رشد باکتری در باکتری‌های موردمطالعه

باکتری	Escherichia. Coli	Pseudomonas. Aeruginosa	Staphylococcus. Aureus	Salmonella. Enterica	Listeria. Monocytogenes
قطر (mm)	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۱۰/۲	۸/۹

بررسی اثر ضد قارچی

اثر ضد قارچی از طریق مطالعه ۵ لام از نمونه شاهد بدون کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین و تعداد ۵ لام حاوی کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین بررسی شد. پس از شمارش ۱۰۰ عدد نوتروفیل در هر لام، فاگوسیتوز و عدم فاگوسیتوز نتایج زیر را نشان داد.

جدول ۳: نتایج مربوط به میزان فاگوسیتوز و عدم فاگوسیتوز در لام‌های موردمطالعه

	فاگوسیت		عدم فاگوسیت	
لام	CM^+	CM^-	CM^+	CM^-
۱	٪۱۶	٪۱۴	٪۸۴	٪۸۶
۲	٪۲۱	٪۸	٪۷۹	٪۹۲
۳	٪۲۱	٪۱۲	٪۷۹	٪۸۸
۴	٪۲۰	٪۱۱	٪۸۰	٪۸۹
۵	٪۲۰	٪۱۵	٪۸۰	٪۸۵

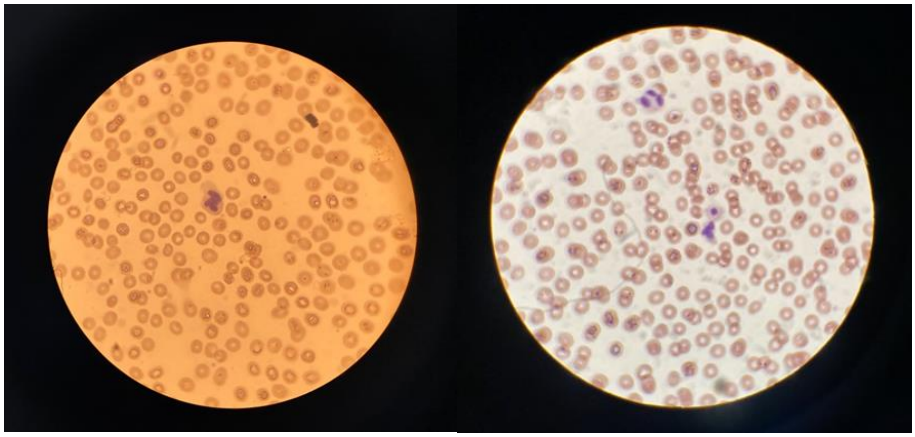
شمارش تعداد ذرات فاگوسیت شده در نوتروفیل‌های فاگوسیت کرده، در صورت وجود ۵۰ عدد نوتروفیل نتایج زیر را نشان داد.

جدول ٤: میانگین ذرات فاگوسیت شده

	فاگوسیت شده	
لام	شاهد	تیمار
۱	۱	۱/۵
۲	۱/۵	۳
۳	۱/۲	۲/۵
۴	۱/۷	۲/۷
۵	۱	۳/۱

تجزیه‌وتحلیل آماری اعداد به‌دست‌آمده در این روش، نشان داد که باوجود اختلاف کم میان اعداد حاصل از بررسی میزان فاگوسیتوز در لام‌های حاوی کاندیشن مدیوم و لام‌های فاقد کاندیشن مدیوم، اختلاف معنی‌داری میان آن‌ها وجود ندارد. ($p<0.05$)

همچنین مطالعه مورفولوژیک میکروسکوپی به‌صورت مشهود نشان داد که اندازه سلول‌های فاگوسیتر در گروه دارای کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بزرگ‌تر از اندازه آن‌ها در گروه شاهد می‌باشد.



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپی نوتروفیل‌های گسترش‌های مربوط به آزمایش فاگوسیتوز (راست: CM^+، چپ: CM^-)

بحث

امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع-الطیف در میان ایزوله‌های بالینی، از معضلات روند درمان عفونت‌های بیمارستانی است. لذا ساخت موادی با ریشه‌های غیر دارویی معمول و طبیعی که با نداشتن بحث مقاومت دارویی و درعین‌حال مؤثر باشد، همواره مورد بحث و تحقیق دانشمندان بوده است. حال‌آنکه این ترکیبات ضدمیکروبی می‌تواند به دلیل عوارض کمتر، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های صنعتی ماده مؤثرتری باشد؛ زیرا استفاده مداوم و درعین‌حال ناکافی آنتی‌بیوتیک‌های موجود، خود دلیلی بر مقاومت باکتری‌ها و درمان سخت عفونت‌های میکروبی می‌باشد. با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتیبیوتیکها، محققین تلاش‌های فراوانی جهت استفاده از مواد جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها با عوارض جانبی کمتر انجام داده‌اند.

محیط کاندیشنال یا کاندیشن مدیوم محیطی کشتی برای سلول‌های بنیادی است که فاکتورهای مترشحه از سلول‌های بنیادی می‌توانند در این محیط شناسایی شوند (۱۲ و ۲۳). محیط کاندیشنال مزیت‌های زیادی دارد ازجمله اینکه به‌راحتی تولید، فریز، بسته‌بندی شده و قابل انتقال است که به خاطر این ویژگی‌ها، از محیط کاندیشنال برای تولید دارو استفاده می‌شود و همچنین

نیاز به حفاظت ویژه مثل آنچه در مورد سلول‌های بنیادی باید رعایت کرد را ندارد. از طرفی برخلاف سلول‌های بنیادی که پیوندگیری ضعیفی دارند و احتمال خطر گسترش سرطان در آن‌ها بالاست، اما محیط کاندیشنال این مشکل‌ها را ندارد (۲۱) و همچنین مزیتی که دارد این است که می‌تواند برای درمان بیماران (به‌صورت بالینی) سریعاً بدون جداسازی سلول‌های بنیادی از بیمار مورد استفاده قرار گیرند (۶). همان‌طور که پیش‌تر نیز گفته شد، محیط کاندیشنال فاقد سلول است و از وقوع واکنش‌های ایمنی جلوگیری می‌کند. همچنین دارای اثر آنتی‌اکسیدانی و ضد توموری است و حاوی فاکتورهای رشد متفاوت و سیتوکین هاست که شامل: VEGF، PDGF، TNF، EGF، HGF، NGF، BDNF، IGF-I، IGF-II، TGF-α، TGF-β، KGF، bFGF، GM-CSF، MCP-1، IL-1، IL-6، IL-8، Fibronectin، Collagen و ... می‌باشد (۱۲، ۲۱ و ۲۳). در این مطالعه سعی شد درباره اثربخشی این محیط بر باکتری‌های مختلف و انواعی از قارچ‌ها مطالعات و بررسی‌هایی صورت گیرد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در بررسی کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین تأثیر چندانی بر روی عدم رشد باکتری‌ها مشاهده نشد و نتایج به‌گونه‌ای بود که مشخص شد عملاً کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنینی نمی‌تواند به‌عنوان یک ماده ضد باکتریایی مطرح شود. هرچند تأثیر عصاره خالص کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین بر روی باکتری‌های سالمونلا و لیستریا مونوسایتوژنز نشان‌دهنده وجود اثر ضد باکتریایی بسیار محدود این محلول هست و همین تأثیر ضد باکتریایی ضعیف در نتایج آزمایش دیسک دیفیوژن مشاهده شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه و مطالعات دیگر می‌توان گفت اثر ضد میکروبی در عصاره‌ی کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین چندان قابل توجه نیست (۱۶).

اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی ٪۱۰۰ کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین بر روی باکتری‌های سالمونلا و لیستریا مونوسایتوژنز را می‌توان ناشی از برخی از متابولیت‌های موجود در کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین از جمله LL-37، کاتلیسیدین انسانی و hcap-18 باشد (۱۶ و ۲۷).

نتایج حاصل از تست فاگوسیتوز که نشان‌دهنده تقویت اثر فاگوسیتوزی و ایمنی سلولی ناشی از آن در نمونه‌های مجاور شده با کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین بود که می‌تواند ناشی از برخی متابولیت‌های موجود در کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی بند ناف جنین باشد که در مطالعات دیگر به تفضیل خالص سازی و گزارش شده است؛ به‌عنوان نمونه وجود اینترلوکین ۱ در کاندیشن مدیوم سلول‌های بند ناف جنین علاوه بر آثار بسیار مهم بر روی اغلب سلول‌های ایمنی اثرات فعال‌کننده‌ی بسیار قوی بر روی نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها دارد که تقویت اثرات فاگوسیتی در گروه تیمار می‌تواند ناشی از آن باشد (۸).

مطالعه‌ای جهت تشخیص خواص ضد میکروبی سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط Sutton و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که سلول‌های بنیادی مولکول‌های بیواکتیو ترشح می‌کنند که در شرایط آزمایشگاهی علیه سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوک نومونیا ضد میکروبی هستند و بدون توجه به عامل بیماری‌زا، بر سرعت رشد باکتری تأثیر می‌گذارند. این مطالعه ظرفیت منحصربه‌فرد سلول‌های بنیادی را برای مدیریت پاتوژن‌های مختلف و اهمیت آن‌ها در فعالیت‌های ضد میکروبی و تقویت آنتی‌بیوتیک را نشان می‌دهد (۲۶). همچنین Alcayaga-miranda و

همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق مکانیسم‌های غیرمستقیم و مستقیم که تا حدی توسط ترشح پپتیدها و پروتئین‌های ضد میکروبی واسطه می‌شود، اثرات ضد میکروبی قوی دارند (۲). در مطالعه دیگری Chow و همکاران (۲۰۲۰) دریافتند که سلول‌های بنیادی سطوح بالایی از فعالیت مستقیم باکتری‌کشی خودبه‌خود را در شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهند. علاوه بر این عوامل ترشح‌شده از این سلول‌ها باعث کشتن هم‌افزایی باکتری‌های مقاوم به دارو در صورت ترکیب با چندین کلاس اصلی از آنتی‌بیوتیک‌ها شد. مطالعات دیگر برهمکنش این سلول‌ها پاسخ‌های ایمنی ذاتی میزبان، از جمله ایجاد تله خارج سلولی نوتروفیل و افزایش فاگوسیتوز باکتری‌ها را نشان دادند. همچنین این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی چندین فعالیت ضد میکروبی مستقیم و غیرمستقیم باواسطه ایمونولوژیک ایجاد می‌کند که ترکیبی برای کمک به حذف عفونت‌های باکتریایی مزمن می‌شوند (۱۰).

در مطالعه Krasnodembskaya و همکاران (۲۰۱۰) با عنوان اثرات ضد باکتریایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان در بخشی از ترشح پپتید ضد میکروبی LL-37، اثر MSC مشتق از مغز استخوان بر روی رشد باکتری‌های گرم منفی مانند سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کلای و هم‌چنین باکتری گرم مثبت مانند استاف آرئوس بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که مکانیسم فعالیت ضد میکروبی MSC در برابر باکتری گرم منفی با ترشح یک محلول که با چالش باکتری قبلی ایجاد شده است همراه بود (۱۶). تجزیه‌وتحلیل بیان پپتیدهای ضد میکروبی عمدتاً نشان داد که یکی از عوامل عمده‌ی ضد میکروبی MSC-CM در برابر باکتری‌های گرم منفی پپتید ضد میکروبی کاتولیسیدین انسانی، hcap 18، LL-37 بوده است (۱۶). در مطالعه Yagi و همکاران (۲۰۲۰) فعالیت ضد میکروبی کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی مشتق شده از چربی بر ضد استافیلوکوکوس اورئوس به‌وضوح ثبت گردیده است (۳۱). با توجه به منبع متفاوت به کار گرفته‌شده در این مطالعات، می‌توان به این نتیجه رسید که سلول‌های بنیادی مشتق شده از منابع مختلف می‌توانند اثر ضد باکتریایی متفاوتی را از خود نشان دهند.

نتیجه گیری نهایی

همان‌گونه که از نتایج فوق مشخص است سلول‌های بنیادی مشتق از بخش‌های مختلف بدن انسان، مستقیماً دارای خواص ضد باکتریایی قوی می‌باشند که این خواص در کاندیشن مدیوم حاصل از آن‌ها در سلول‌های بنیادی مشتق شده از بند ناف انسان تا حد زیادی تضعیف‌شده و حتی نسبت به برخی عوامل ضد میکروبی از بین می‌رود. این در حالی است کاندیشن مدیوم حاصل از سلول‌های بنیادی بخش‌های دیگر بدن همچنان خاصیت ضد میکروبی را تا حد زیادی حفظ می‌کنند. به نظر می رسد با توجه به محتویات کاندیشن مدیوم سلول های بنیادی، تاثیر ضد میکروبی به صورت غیر مستقیم و با استفاده از تاثیر بر سیستم ایمنی و اجزای آن اعمال می شود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای رشته دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تبریز است. نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند که از مساعدت های مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز برای همکاری در انجام تحقیق تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Akdis, M., Burgler, S., Crameri, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., ... & Akdis, C. A. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon-γ: receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of allergy and clinical immunology*, ***127*:**701-721.
2. Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., & Khoury, M. (2017). Antimicrobial activity of mesenchymal stem cells: current status and new perspectives of antimicrobial peptide-based therapies. *Frontiers in immunology*, ***8*:** 339 .
3. Aminov, R. (2017). History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical pharmacology*, ***133*:** 4-19.
4. Amiri, F., Jahanian-Najafabadi, A & ,. Roudkenar, M. H. (2015). In vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability in stressful microenvironments. *Cell stress and chaperones*, ***20*:**237-251 .
5. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, ***6*:** 71-79 .
6. Bhang, S. H., Lee, S., Shin, J.-Y., Lee, T.-J., Jang, H.-K., & Kim, B.-S. (2014). Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Molecular Therapy*, ***22*:** 862-872 .
7. Butler, M. G., & Menitove, J. E. (2011). Umbilical cord blood banking: an update. *Journal of assisted reproduction and genetics*, ***28*:** 669-676 .
8. Chairman, P., Mittermeier, R. A., Chairman, P. D & ,.Rylands, A. B. (1998). SERVATION SPECIES SURVIVAL BIODIVERSITAS. *Neotropical Primates*, *6*, 2 .
9. Chauhan, A., Anton, B., & Singh, M. K. (2020). Dendrimers for drug solubilization, dissolution and bioavailability. In *Pharmaceutical Applications of Dendrimers*) pp. 59-92): Elsevier.
10. Chow, L., Johnson, V., Impastato, R., Coy, J., Strumpf, A., & Dow, S. (2020). Antibacterial activity of human mesenchymal stem cells mediated directly by constitutively secreted factors and indirectly by activation of innate immune effector cells. *Stem Cells Translational Medicine*, ***9*:** 235-249 .
11. Danen, E. H., & Yamada, K. M. (2001). Fibronectin, integrins, and growth control. *Journal of cellular physiology*, ***189*:** 1-13.
12. Fontanilla, C. V., Gu, H., Liu, Q., Zhu, T. Z., Zhou, C., Johnstone, B. H., . . . Du, Y. (2015). Adipose-derived stem cell conditioned media extends survival time of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific reports*, ***5*:** 1-11 .
13. Fuchs, E., & Segre, J. A. (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell*, ***100*:** 143-155 .
14. Hamilton, J. A. (2020). GM-CSF in inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, *217*(1).
15. Kingston, W. (2008). Irish contributions to the origins of antibiotics. *Irish journal of medical science*, ***177:***87-92.
16. Krasnodembskaya, A., Song, Y., Fang, X., Gupta, N., Serikov, V., Lee, J. W., & Matthay, M. A. (2010). Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem cells*, ***28*:** 2229-2238.

17. Li, X., Li, B., Ma, J., Wang, X., & Zhang, S. (2014). Development of a silk fibroin/HTCC/PVA sponge for chronic wound dressing. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, ***29*:** 398-411 .
18. Ma, L., Feng, X.-y., Cui, B.-l., Frieda, L ,Jiang, X.-w., Yang, L.-y., . . . Huang, T.-h. (2005). Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chinese medical journal*, ***118*:** 1987-1993 .
19. Moore, S. L., & Payne, D. N. (2004). Types of antimicrobial agents. *Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*, 8-97 .
20. Oppenheim, J. J. (2001). Cytokines: past, present, and future. *International journal of hematology*, ***74*:** 3-8.
21. Pawitan, J. A. (2014). Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *BioMed research international*, *2014* .
22. Salehi, P. M., Foroutan, T., Javeri, A., & Taha, M. F. (2017). Extract of mouse embryonic stem cells induces the expression of pluripotency genes in human adipose tissue-derived stem cells. *Iranian journal of basic medical sciences*, ***20*:** 1200.
23. Schweizer, R., Tsuji, W., Gorantla, V. S., Marra, K. G., Rubin, J. P., & Plock, J. A. (2015). The role of adipose-derived stem cells in breast cancer progression and metastasis. *Stem cells international*, *2015* .
24. Stanevsky, A., Goldstein, G., & Nagler, A .(2009) .Umbilical cord blood transplantation: pros, cons and beyond. *Blood reviews*, ***23*:** 199-204 .
25. Stenken, J. A., & Poschenrieder, A. J. (2015). Bioanalytical chemistry of cytokines–a review. *Analytica chimica acta*, ***853:*** 95-115.
26. Sutton, M. T., Fletcher, D., Ghosh, S. K., Weinberg, A., van Heeckeren, R., Kaur, S., . . . Lazarus, H. M. (2016). Antimicrobial properties of mesenchymal stem cells: therapeutic potential for cystic fibrosis infection, and treatment. *Stem cells international*, *2016* .
27. Tizard, I. R. (2017). *Veterinary Immunology-E-Book*: Elsevier Health Sciences.
28. Wainwright, M. (1989). Moulds in ancient and more recent medicine. *Mycologist*, ***3*:** 21-23 .
29. Wang, H. S., Hung, S. C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J., . . . Chen, C. C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem cells*, ***22*:** 1330-1337 .
30. Webster, M. (2014) .Merriam Webster Online. In: Merriam-Webster Incorporated.
31. Yagi, H., Chen, A. F., Hirsch, D., Rothenberg, A. C., Tan, J., Alexander, P. G., & Tuan, R. S. (2020). Antimicrobial activity of mesenchymal stem cells against Staphylococcus aureus. *Stem cell research & therapy*, ***11*:** 1-12 .
32. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*, ***10*:** 1-22 .

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 17, Issue 2, Autumn & Winter 2021

Study of the antimicrobial effects of condition medium from umbilical cord stem cells

Roya Daneshmand[1], Mansour Khakpour[*2], Seyed Esmaeil Safavi Khalkhali[2]

1. Graduated Veterinarian, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Medical Sinces of Tabriz branch, Tabriz, Iran.

2. Assistant Professor of Pathobiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Medical Sinces of Tabriz branch, Tabriz, Iran.

Received: 30 April 2022 Accepted: 5 September 2022

Abstract

Antimicrobials are generally said to the materials that are used to fight with micro-organisms to eradicate or inhibit their growth. Condition medium (condition culture medium) is secreted for proliferation and cell culture of Mesenchymal stem cells in laboratory culture medium. This compound has factors such as TGF-B, TNF, GM-SCF, KGF, PDGF, VEGF, EGF, IL-1, IL-6, IL-8, BFGF, TGF-α, IGF-1, IGF-2, MCP-1, HGF, Fibronectins and Collagen. Considering the presence of these factors and their role in the body, the aim of this study has been to investigate the effect of Condition Medium of Fetal umbilical cord. In this study 5 encoded bacterial standard isolations including Escherichia Coli, Staphylococcus, Pseudomonas, Salmonella and Listeria were investigated using MBC and MIC method and a standard encoded Candida albicans yeast using Phagocytosis test in confluence of the condition Medium of fetal umbilical cord. The results of MIC and MBC showed that Condition Medium has the effect of growth inhibition in 100% of condition medium density on Salmonella and Listeria monocytogenes but it doesn't have any effect on growth inhibition of the rest of the bacteria. Also disc results showed the ineffectiveness the material on the growth of microorganisms except for the bacteria mentioned earlier. Phagocytosis test showed reinforcement in Phagocytosisic effect and cellular immune caused from it in adjacent samples with Condition medium cells of fetal umbilical cord. Furthermore, the macroscopic and morphologic study showed clearly that the size of Phagocytosis cells in treatment group is bigger than their size in the control group. Overall, we can say that medium condition of the stems cells of fetal umbilical cord don't have much antibacterial and antifungal effect, and this effect was seen insignificantly in some cases such as Salmonella and Listeria monocytogenes and it can't be a substitute for antibacterial materials.

Keywords: Antimicrobials, Condition Medium, Stem Cells, Umbilical cord.

**Corresponding author: Mansour Khakpour*

Address: Department of Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Medical Sinces of Tabriz branch, Tabriz, Iran.

E. mail: Khakpour@iaut.ac.ir