مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره ۶۹ ،شماره ۱۰، دی ۱۳۹۰، ۶۰۴-۵۹۵

بررسی اثرات ضدباکتریایی، همولیتیکی و سلولی عصاره پوستی قورباغه رانا ریدیباندای ایرانی به‌عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی جدید

علی محمد اصغریان[1*]
محسن محمدی[2]

۱- گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی
۲- گروه زیست‌شناسی میکروبیولوژی

دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۷/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۸/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: پوست دوزیستان انواع مختلفی از ترکیبات ضدمیکروبی را تولید می‌کنند که روی پاتوژن‌های میکروبی اثر داشته و غالبا در پاسخ به شرایط محیطی ترشح می‌شوند. پوست قورباغه رانا ریدیباندا یک منبع غنی از ترکیبات ضدمیکروبی است که می‌تواند به‌عنوان دارو در درمان بیماری‌های عفونی توسعه یابد. در این مطالعه فعالیت ضدمیکروبی، همولیتیکی و سمیت سلولی پوست قورباغه رانا ریدیباندا بررسی شد. ***روش بررسی:*** نمونه‌های قورباغه‌های رانا ریدیباندا از منطقه مینودشت واقع در استان گلستان جمع‌آوری گردید. سپس پوست آن‌ها جداسازی گردید و ترکیبات آن‌ها استخراج شد. اثرات ضدمیکروبی عصاره پوستی روی سویه‌های میکروبی *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم و حساس به متی‌سیلین، *انتروکوک فکالیس* مقاوم و حساس به ونکومایسین، *سودوموناس آئروژینوزآ* و *کاندیدا آلبیکانس* بررسی شد. با روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون تخلیص نسبی ترکیب ضدمیکروبی انجام شد. حداقل میزان مهارکنندگی، فعالیت سمیت سلولی و همولیتیک ترکیب ضدمیکروبی عصاره پوستی نیز تعیین شد. ***یافته‌ها:*** نتایج نشان داد که اثرات ضدمیکروبی روی سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم و حساس به متی‌سیلین قابل توجه و نسبت به *اشرشیاکلی* و *انتروکوک فکالیس* مقاوم و حساس به ونکومایسین بیش‌تر بوده است. با این وجود فعالیت ضدمیکروبی علیه *سودوموناس آئروژینوزآ* و *کاندیدا آلبیکانس* وجود نداشت و اثرات همولیتیک و سمیت سلولی عصاره پوستی نیز ناچیز بود. ***نتیجه‌گیری:*** فعالیت ضدمیکروبی عصاره پوستی قورباغه رانا ریدیباندا با اثرات ترکیبات آنتی‌بیوتیکی حاصل از عصاره پوستی قورباغه جنس‌های مختلف *Rana* قابل مقایسه بود. به‌عنوان نتیجه عصاره پوستی رانا ریدیباندا قابلیت یک داروی آنتی‌بیوتیکی جدید برای مقابله با افزایش باکتری‌های مقاوم به دارو خصوصا استافیلوکوک‌های حساس و مقاوم به متی‌سیلین را دارد.

کلمات کلیدی: اثرات ضدمیکروبی، رانا ریدیباندا، عصاره پوستی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی.

*نویسنده مسئول: مازندران، تنکابن، ولی‌آباد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، ایران تلفن: ۰۹۱۲-۲۹۵۸۶۴۴
E-mail: mehranasgharian@yahoo.com

مقدمه

ظهور سوش‌هایی از میکروارگانیسم‌ها که به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاومت نشان می‌دهند باعث شده تا تحقیقات برای شناسایی ترکیبات ضدقارچی و ضدباکتریایی برای درمان پاتوژن‌های میکروبی همواره تداوم یابد.[1] منابع مولد بیولوژیک ترکیبات ضدمیکروبی متعددند و می‌توانند به دو دسته پروکاریوتی و یوکاریوتی دسته‌بندی شوند. پوست قورباغه‌های *Rana* از منابع یوکاریوتی مورد توجه در این زمینه می‌باشد.[2] شناسایی ترکیبات ضدمیکروبی از ترشحات و عصاره‌های پوستی قورباغه به سال ۱۹۸۷ بر می‌گردد که به دنبال آن کشف ترکیب Magainin در پوست وزغ آفریقایی *Xenopus laevis* انجام گرفت. از آن زمان تاکنون تحقیقات گسترده‌ای روی عصاره پوستی قورباغه‌ها در نقاط مختلف دنیا انجام گرفته است.[3و1] غدد پوستی قورباغه‌ها ترشحاتی مختلف و متعددی دارند که علیه عفونت‌های قارچی، باکتریایی و انگلی موثر است. در مجموع از این جانوران به عنوان یک منبع جدید مولد ترکیبات ضدمیکروبی پپتیدی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]

یاد می‌شود و امید است کـه بتواننـد در آینـده تـا حـدودی جانـشین آنتی‌بیوتیک‌های رایج شده و در رفع پدیده مقاومت آنتـی‌بیـوتیکی در میکروارگانیسم موثر باشند.[۱و۴] از اولین و شناخته‌تـرین ایـن ترکیبـات ماگنین‌ها (Magenine) هستند که یک خانواده پپتیدی جداسازی شـده از *Xenopus laevis* است که علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفـی و قارچ‌هایی مانند *کاندیدا آلبیکـانس*، *کریپتوکوکـوس نئوفورمـانس* و هم‌چنین *ساکارومایسس سـرویزیه* مـوثر اسـت.[۵] قورباغـه آمریکـایی جـنس *Phyllomedusa* ترشـحات پپتیـدی داشـته کـه بـه عنـوان Dermaseptin شناخته شده که یک مولکـول کاتیونیـک اسـت و ایـن ترکیب غشا باکتری‌های گرم مثبت، گـرم منفـی، مخمـر و قـارچ‌هـای رشته‌ای را نفوذپـذیر مـی‌سـازد و از طـرف دیگـر روی سـلول‌هـای پـستانداران اثـرات همـولیزی نـاچیز دارد.[۶] از قورباغـه *Bombina variegata* ترکیب پپتیدی جداسـازی شـده اسـت کـه فعالیـت ضـد میکروبی بالایی دارد.[۷] پپتید ضدمیکروبی دیگر به‌نام‌هـای Brevinin-1 و Brevinin-2 (از قورباغـه *Brevipoda porsa Rana*)،[۸] Ranalexin از قورباغه *Rana catesbeiana* به‌دست آمده کـه شـباهت ضـدمیکروبی مشابه با ترکیب آنتی‌بیوتیکی پلی‌میکسین دارد.[۹] در مطالعه‌ای جالب ۹ پپتیـد از *Rana catesbeiana* تخلـیص شـده اسـت کـه فعالیـت ضدمیکروبی علیـه *استافیلوکوک اورئـوس* داشـت و در میـان آن‌هـا Ranatuerin فعالیت ضدباکتریایی قابل ملاحظـه‌ای علیـه سـلول‌هـای *استافیلوکوک اورئوس*، *اشرشیاکلی* و قارچ *کاندیدا آلبیکانس* داشت.[۱۰] هم‌چنین دو پپتیـد Temporin-A و Temporin-B حاصـل از قورباغـه قرمـز اروپـایی *Rana temporaria* معلـوم شـده کـه در غلظـت‌هـای میکرومولار فعالیت ضدلیشمانیایی دارد بدون این‌که سـبب لیـز شـدن سلولی علیه گلبول قرمز انسانی شود. این ترکیبـات سـبب لیـز شـدن غـشا و مقاومـت پـاتوژن انگلـی را کـاهش مـی‌دهـد.[۱۱] در مجمـوع گزارشات در این زمینه متعدد است که همگـی نـشان‌دهنـده پتانـسیل منحصر به‌فرد عصاره پوستی قورباغه‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم‌ها است. رانا ریدیباندا قورباغه‌ای مردابی است که هـم در آب‌های آرام و هم در آب‌های جاری یافت می‌شود. از مشخصات این قورباغه زبان چنگالی، وجود پوسـت بـین انگـشتان پـا، مردمـک چشم افقی و قسمت پشتی بدن آن از رنگ خاکستری تا سـبز روشـن است. در پشت بدن این قورباغه لکه‌هـای تیـره رنـگ در انـدازه‌هـا و ترتیب مختلف وجود دارد. این گونـه در گـودال‌هـای کوچـک دارای گیاه و نیز در استخرهایی زندگی می‌کنند که در تابستان کاملا خـشک نمی‌شوند. بدن مرطوب این قورباغه محل مناسبی برای رشد قارچ‌هـا و باکتری‌ها است، ولی مواد مترشحه پوست آن‌هـا تـا حـد زیـادی از رشد چنین میکروارگانیسم‌هایی جلـوگیری مـی‌نمایـد. قورباغـه رانـا ریدیباندا در مناطق شمال ایـران خـصوصاً اسـتان گلـستان پراکنـدگی بالایی دارد و تابه‌حال مطالعات جامعی در زمینه اثرات ضدمیکروبی و پتانسیل دارویی عصاره پوستی آن انجام نشده است.[۳] هدف اصلی این تحقیق شناسایی و بررسی اثرات ضدمیکروبی و سلولی گونه قورباغـه رانا ریدیباندا ساکن شمال ایـران علیـه سـویه‌هـای پـاتوژن میکروبـی مختلف خصوصا سویه‌های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوک اورئوس* مقـاوم و حساس به متـی‌سـیلین، *انتروکـوک فکـالیس* مقـاوم و حـساس بـه ونکومایسین، *سودوموناس آئروژینـوزا* و قـارچ *کاندیـدا آلبیکـانس* و هم‌چنین بررسی اثرات همولیتیک روی سلول‌هـای خـونی و بررسـی سمیت سـلولی ترکیـب ضـدمیکروبی روی سـلول‌هـای اریتروییـدی K۵۶۲ انسانی بود.

روش بررسی

ایـن یـک مطالعـه تجربـی بـود کـه در سـال ۱۳۸۹-۱۳۸۸ در آزمایشگاه تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن انجام شد.

جمع‌آوری نمونه‌های رانا ریدیباندا: جمـع‌آوری نمونـه‌هـای رانـا ریدیباندا از منطقه مینودشت اسـتان گلـستان در سـال ۱۳۸۸ صـورت گرفت. نمونه‌گیری در دمـای $^{\circ}C$ ۲۰ در شـرایطی کـه قورباغـه‌هـا بـه راحتی در محیط یافت می‌شدند انجام شد. پنج قورباغه رانا ریدیبانـدا انتخاب گردید و توسط ظرفی استریل که تبادل هوایی مناسب داشـت به آزمایشگاه تحقیقات گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن انتقال داده شدند.

تهیه عصاره پوستی از قورباغه رانا ریدیباندا: جهت تهیـه عـصاره پوستی سه قورباغه انتخاب شد و بـه مـدت دو سـاعت در ظـرف در بسته محتوی یخ خشک له‌شده قرار داده شدند تـا قورباغـه‌هـا کـاملا بی‌هوش شوند و متحمل درد نشوند و در ادامه مراحـل تهیـه عـصاره پوستی روی آن‌ها انجام شد. پوست قورباغه‌هـا فـورا جـدا و توسـط قیچی تکه‌تکه و با محلول بافر فسفات (PBS) اسـتریل شـسته شـدند. پوست‌ها به ظرف تمیـز انتقـال و بـه فریـزر منفـی $^{\circ}C$ ۸۰ (GFL Co,

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]

Germany) منتقل گشت. انتقال بافت به فریزر باعث می‌شود که پوست حالت خشک به خود بگیرد.[۱۲و۱۳]

مرحله هموژنیزه کردن و استخراج شیمیایی ترکیبات بافت پوستی: بافت فریز شده در داخل دستگاه مخلوط‌کن همراه با ۱۰۰ml محلول اتانول (Merck Co, Germany) و HCL ۰/۷ مولار (به‌ترتیب با نسبت ۳:۱) هموژنیزه شد. مخلوط هموژنیزه شده را به مدت چهار ساعت در دمای صفر درجه سانتی‌گراد روی همزن قرار داده شد تا کاملا مخلوط گردد. به‌منظور جداسازی تکه‌های بافتی در دور ۵۰۰۰g به مدت ۴۰ دقیقه و در دمای صفر درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. محلول رویی برداشته و در داخل یک ظرف شیشه‌ای کاملا تمیز انتقال یافت. سپس تحت فشار منفی اتانول تبخیر و عصاره حاصل در محلول ترکیبی استونیتریل، آب و تری- فلوروواستیک اسید (به ترتیب با نسبت درصد ۱: ۲۹:۷۰) حل گردید و تا زمان آزمایشات ضدمیکروبی در فریزر منفی $^{\circ}C$ ۸۰ قرار داده شد.[۱۲و۱۳]

تهیه دیسک‌های ضدمیکروبی: به منظور بررسی خاصیت ضدمیکروبی به روش دیسک دیفیوژن، دیسک‌های ضدمیکروبی با استفاده از کاغذهای بلانک با قطر ۰/۶mm (شرکت پادتن طب، ایران) و حاوی ۲۵µl از عصاره پوستی تهیه شد.[۱۴] سویه‌های میکروبی با مشخصات زیر (جدول ۱) تهیه و در فریزر $^{\circ}C$ ۷۰- تا زمان آزمایشات ضدمیکروبی نگهداری شد. جهت آزمایشات دیسک دیفیوژن برای باکتری‌ها از محیط مولر- هینتون آگار (Mueller-Hinton Agar) (Merck Co, Germany) و برای قارچ *کاندیدا آلبیکانس* از سابرود دکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar) (Merck Co, Germany) استفاده شد. از سلول‌های باکتری و قارچ نام‌برده که لیست آن در جدول ۱ آمده مقدار ^{8}۱۰ سلول (که حدودا معادل با OD=۱ (Optical Density) در طول موج ۶۲۵ نانومتر می‌باشد) برداشته و در محیط کشت مولر- هینتون آگار و سابرود دکستروز آگار کشت داده شدند. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی حاوی عصاره پوستی تهیه شد و بروی پلیت‌هایی مولر هینتون آگار و سابرود دکستروز آگار گذاشته شد. پلیت‌های تلقیح شده دارای دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی، به مدت ۲۴ ساعت برای باکتری‌ها و ۴۸ ساعت برای قارچ *کاندیدا آلبیکانس* در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ انکوبه شدند. بعد از طی زمان قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری و نتایج ثبت شد.[۱۴] این آزمایش سه بار تکرار شد و میانگین نتایج ثبت شد.

تخلیص نسبی عصاره پوستی رانا ریدیباندا: برای تخلیص نسبی از روش ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با استفاده از سفادکس G-50 (Sigma Co, U.S.A.) و با طول ستون ۵۰cm و قطر ۲cm استفاده شد. جهت کالیبراسیون ستون کروماتوگرافی سفادکس G-50 از محلول آب و اسیداستیک (Merck Co, Germany) استفاده کردیم. ترکیب حلالی شامل محلول استونیتریل (Merck Co, Germany)، آب، تری‌فلوئوراستیک (Merck Co, Germany) با نسبت ۱٪-۱۹٪-۷۰٪ انتخاب شد.[۳۲-۳۵] میزان Flow rate (میزان تزریق مخلوط حلال از بالای ستون) نیز ۲۰ میلی‌لیتر در ساعت بود. حجم محلول خارج شده از انتهای ستون برای هر فراکشن (Fraction) به میزان 5ml بود که در لوله‌های جداگانه جمع‌آوری و تا آزمایشات ضدمیکروبی در دمای $^{\circ}C$ ۴ زمان آزمایشات نگهداری شدند. پس از جمع‌آوری فراکشن‌ها (۲۰ فراکشن)، آزمایشات ضدمیکروبی به روش دیسک دیفیوژن به‌صورت زیر انجام گرفت.[۱۲و۱۵] بررسی اثرات ضدمیکروبی فراکشن‌های مرحله تخلیص: مقدار ۲۵µl از هر فراکشن، حاصل از مرحله تخلیص نسبی، بروی کاغذهای دیسک بلانک قرار داده شد. در مرحله بعد از سویه‌های باکتریایی *استافیلوکوک اورئوس*، *انتروکوک فکالیس* و *اشرشیاکلی* کشت جوان ۱۲ ساعته تهیه شد و میزان ^{8}۱۰ سلول از نمونه‌های میکروبی باکتریایی فوق به محیط کشت مولر هینتون آگار اضافه و کشت داده شدند. برروی هر پلیت دیسک‌های ضدمیکروبی را قرار دادیم. تمامی پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور دمای $^{\circ}C$ ۳۷ قرار داده شد و در روز بعد قطر هاله‌های عدم رشد در اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج ثبت شد. فراکشن‌هایی که دارای اثرات ضدمیکروبی قابل توجه روی سویه‌های باکتریایی بودند روی هم ریخته و تحت شرایط خلا و با حفظ شرایط استریل حلال آن‌ها تبخیر شد. سپس ماده حاصل خشک دارای اثرات ضدمیکروبی تا زمان آزمایشات MIC در دمای $^{\circ}C$ ۴ نگهداری شد.

آزمون تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibition Concentration (MIC)): آزمایشات MIC در پلیت‌های ۱۲ چاهکی (Orange Co, South Korea) انجام شد. نمونه‌های باکتریایی (سویه‌های *استافیلولوک اورئوس*، سویه‌های *انتروکوک فکالیس* و *اشرشیاکلی* ابتدا در محیط مولر- هینتون براث (Merck Co, Germany) کشت داده شدند تا به شرایطی برسند که تعداد سلولی آن‌ها به ^{8}۱۰ سلول در هر میلی‌لیتر باشد. در مرحله بعد مقادیر ۱۲۸،

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]

جدول- ۱: سوش‌های میکروبی مورد استفاده همراه با مشخصات آن‌ها

نام میکروارگانیسم	مشخصات
اشرشیاکلی (Escherchia coli)	ATCC ۲۵۹۹۲
استافیلوکوک اورئوس حساس به متی‌سیلین (Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*)	ATCC ۲۹۲۱۳
استافیلوکوک اوورئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin resistance *Staphyloccus aureus*)	ATCC ۴۳۳۰۰
سودوموناس آئروژینوزآ (Pseudomonas aeruginosa)	ATCC ۲۵۳۴۴
انتروکوک فکالیس مقاوم به ونکومایسین (Vancomycin resistance *Entrococcus fecalis*)	ATCC ۵۱۲۲۹
انتروکوک فکالیس حساس به ونکومایسین (Vancomycin susceptible *Entrococcus fecalis*)	ATCC ۲۹۲۱۲
کاندیدا آلبیکانس (Candida albicans)	ATCC ۳۱۲۴۵

ATCC: American Type Culture Collection

۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴ و ۲ میکروگرم از ترکیب ضدمیکروبی به روش رقت سازی سریالی به هر چاهک پلیت اضافه شد. پلیت‌های تلقیح شده دارای ترکیب ضدمیکروبی به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور دمای $37^{\circ}C$ قرار گرفت و بعد از مدت زمان مذکور با اندازه‌گیری کدورت توسط فتومتر (Eppendorf Co, Germany) در طول موج ۶۵۰ نانومتر، میزان رشد باکتری‌های مورد آزمایش دارای مقادیر مختلف ضدمیکروبی در مقایسه با نمونه کنترل خود مقایسه و نتایج آن ثبت گردید. کم‌ترین غلظتی از ترکیب ضدمیکروبی که سبب مهار رشد باکتری گردد بنا به تعریف MIC نامیده می‌شود. آزمایشات MIC سه بار تکرار و نتایج آن ثبت شد.[۱۴]

بررسی فعالیت سیتوتوکسیک رده سلولی انسانی K۵۶۲ از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو: جهت بررسی میزان سمیت ترکیب ضدمیکروبی برای سلول‌های پستانداران از روش کشت رده‌های سلولی انسانی استفاده شد. سلول‌های K۵۶۲ که از دسته سلول‌های اریتروییدی و معلق است انتخاب شدند و برای این منظور تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول K۵۶۲ در ۲۰۰µl محیط کشت سلولی RPMI۱۶۴۰ (Biosera Co, South Korea) همراه با ۱۰٪ ترکیب FBS سرم جنین گاوی (Biosera Co, South Korea) به‌علاوه ۱٪ آنتی‌بیوتیک ترکیبی پنی‌سیلین استرپتومایسین (Biosera Co, South Korea) کشت داده شد. مقادیر ۱۶ و ۴ میکروگرم از ترکیب ضدمیکروبی به ظرف کشت سلول‌ها اضافه و در دمای $37^{\circ}C$ انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت، با روش رنگ‌آمیزی زیستی تریپان بلو و لام نئوبار درصد سمیت و درصد سلول‌های زنده تعیین شد.[۱۶و۱۷]

بررسی فعالیت همولیتیک عصاره پوستی پوستی: برای این منظور خون محیطی از یک فرد سالم به میزان ۱۰ml برداشته شد. گلبول‌های قرمز جداسازی و سه بار با بافر فسفات شستشو داده شد. سلول‌های گلبول قرمز به نسبت حجمی ۱۰٪، در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ (Biosera Co, South Korea) همراه با مقادیر ۱۶ و چهار میکروگرم از ترکیب ضدمیکروبی خالص شده در انکوباتور ۳۷ به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس میزان جذب نوری هموگلوبین رها شده در ۵۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. این میزان با جذب نوری با نمونه گلبول قرمزی که با ۲٪ تریتون X-۱۰۰ (Sigma Co, U.S.A) همراه بود اندازه‌گیری و نتایج ثبت شد.[۱۳-۱۷]

یافته‌ها

نتایج آزمایشات دیسک دیفیوژن عصاره پوستی در مرحله اول: نتایج میانگین اثرات ضدمیکروبی به روش دیسک دیفیوژن عصاره پوستی اولیه در جدول ۲ آمده است. نتایج نشان داد که عصاره پوستی خواص ضدمیکروبی مطلوبی علیه *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم و حساس به متی‌سیلین دارد. نتایج فوق نشان می‌دهد که اثرات ضدمیکروبی روی سویه‌های باکتریایی *انتروکوک فکالیس* مقاوم و حساس به ونکومایسین و *اشرشیاکلی* نیز در محدوده بینابینی بود. برای دو سویه میکروبی *سودوموناس آئروژینوزآ* و *کاندیدا آلبیکانس* قطر هاله عدم رشد کم‌تر از ۵mm بود که از لحاظ باکتری‌شناسی ارزش ندارد.

نتایج اثرات ضدمیکروبی فراکشن‌های حاصل از تخلیص نسبی عصاره پوستی رانا ریدیباندا: جهت تخلیص نسبی ترکیب

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]

ضدمیکروبی موجود در عصاره از روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون استفاده شد. در این تحقیق از روش‌هایی که توسط Conlon، Goraya و Won ارایه شده بود استفاده کردیم.[۱۰و۲و۴] در روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون مولکول‌ها براساس اندازه و جرم مولکولی جداسازی می‌شوند. در این روش مولکول‌های سنگین‌تر و بزرگ‌تر سریع‌تر از ستون خارج شده و مولکول‌های کوچک‌تر دیرتر خارج می‌شوند. در این تحقیق از ذرات سفادکس G-50 استفاده گردید. این مولکول‌ها می‌توانند ذرات با اندازه ۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ دالتون را جداسازی کنند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب ضدمیکروبی دارای وزن مولکولی بین ۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ دالتون است. آزمایشات ضدمیکروبی بر روی فراکشن‌های جمع‌آوری شده نشان داد که فراکشن‌های شماره شش الی ۹ نسبت به سایر فراکشن‌ها بیش‌ترین اثرات ضدمیکروبی را داشته است که نتایج آن در جدول ۳ آمده است. از ذکر سایر فراکشن‌ها که جواب مثبت نداشتند اجتناب شد. فراکشن‌های شش الی ۹ روی هم ریخته و حلال آن‌ها تبخیر شد و ماده خشک حاصل جهت آزمایشات MIC استفاده گردید.

نتایج آزمایشات تعیین حداقل غلظت مهارکننده یا MIC: آزمون MIC تنها بر روی سویه‌های میکروبی انجام گرفت که اثرات ضدمیکروبی علیه آن‌ها را داشتیم که شامل سویه‌های *اشرشیاکلی* ATCC ۲۵۹۹۲، *استافیلوکوک اورئوس* حساس به متی‌سیلین ۲۹۲۱۳ ATCC، *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین ۴۳۳۰۰ ATCC، *انتروکوک فکالیس* حساس به ونکومایسین ۲۹۲۱۲ ATCC و *انتروکوک فکالیس* مقاوم به ونکومایسین ۲۹۲۱۴ ATCC بود. نتایج آزمون MIC در جدول ۴ ارایه گردیده است. میزان MIC برای دو باکتری است *استافیلوکوک اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین در مقایسه با سویه‌های باکتریایی *اشرشیاکلی* ATCC ۲۵۹۹۲، *انتروکوک فکالیس* حساس به ونکومایسین ۲۹۲۱۲ ATCC و *انتروکوک فکالیس* مقاوم به ونکومایسین ۲۹۲۱۴ ATCC کم‌تر و در نتیجه قابل توجه بود. با مقایسه نتایج آزمایشات دیسک دیفیوژن و MIC ترکیب عصاره پوستی با مرجع Bailey، میزان اثرات ضدمیکروبی عصاره پوستی قورباغه رانا ریدیباندا روی سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم و حساس به متی‌سیلین از لحاظ باکتری‌شناسی ارزشمند بود.[۱۴]

نتایج آزمایشات سمیت سلولی ترکیب ضدمیکروبی: برای بررسی درجه سمیت از رنگ‌آمیزی زیستی تریپان بلو استفاده شد و در میکروسکوپ نوری تعداد سلول‌های زنده و لیز شده شمارش شد. در شکل ۱ نمونه‌ای از زمینه مورد مطالعه آورده شده است. تعداد سلول‌های زنده در دو مقدار ۴ و ۱۶ میکروگرم از ترکیب ضدمیکروبی در جدول ۵ آمده است. نتایج فعالیت همولیتیک عصاره پوستی روی گلبول‌های قرمز انسانی: نتایج همولیز گلبول قرمز نشان می‌دهد که نشان می‌دهد که میزان همولیز در مقادیر ۴ و ۱۶ میکروگرم از ترکیب عصاره پوستی به ترتیب ۹ و ۲۱ درصد بود که این مقادیر به خصوص برای مقدار ۴µl ناچیز است.

جدول- ۲: نتایج میانگین آزمایشات ضدمیکروبی (قطر هاله عدم رشد به میلی‌متر)

سویه میکروبی قطر هاله (mm)	*کاندیدا آلبیکانس* ATCC ۳۱۲۴۵	*سودوموناس آئروژینوزآ* ATCC ۲۵۳۴۴	*انتروکوک فکالیس* مقاوم به ونکومایسین ATCC ۵۱۲۲۹	*انتروکوک فکالیس* حساس به ونکومایسین ATCC ۲۹۲۱۲	*استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین ATCC ۴۳۳۰۰	*استافیلوکوک اورئوس* حساس به متی‌سیلین ATCC ۲۹۲۱۳	*اشرشیاکلی* ATCC ۲۵۹۹۲
تکرار اول	-	-	۱۴	۱۲	۲۸	۲۴	۱۷
تکرار دوم	-	-	۱۲	۱۱	۲۷	۲۸	۱۴
تکرار سوم	-	-	۱۴	۱۴	۳۰	۲۷	۱۵
میانگین± انحراف‌معیار	≤۵	≤۵	۱۳/۳۳±۱/۱۵	۱۲/۵۳±۱	۲۸/۳۳±۱/۵۲	۲۶/۳۳±۲/۰۸	۱۵/۳۳±۱/۵۲

ATCC: American Type Culture Collection

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]

جدول- ۳: نتایج آزمایشات ضدمیکروبی فراکشن‌ها (قطر هاله عدم رشد به میلی‌متر) **حاصل از ستون کروماتوگرافی روی سویه‌های میکروبی**

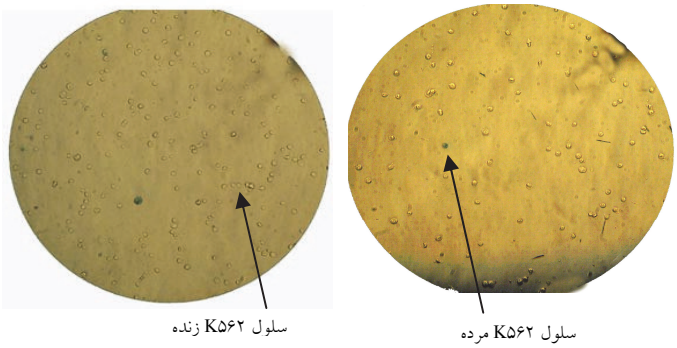
سویه میکروبی	*انتروکوک فکالیس* مقاوم به ونکومایسین ATCC ۵۱۲۹۹	*انتروکوک فکالیس* حساس به ونکومایسین ATCC ۲۹۲۱۲	*استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین ATCC ٤۳۳۰۰	*استافیلوکوک اورئوس* حساس به متی‌سیلین ATCC ۲۹۲۱۳	*اشرشیاکلی* ATCC ۲۵۹۲۲
میزان هاله عدم رشد فراکشن (mm)					
۱	–	–	–	–	–
۲	–	–	–	–	–
۳	–	–	–	–	–
۴	۱۰	۹	۲۰	۲۱	۷
۵	۱۳	۱۳	۱۸	۲۵	۱۴
۶	۱۲	۱۲	۳۰	۲۷	۱۶
۷	۱۳	۱۱	۲۷	۲۸	۱۴
۸	۱۳	۱۲	۲۸	۲۵	۱۴
۹	۱۰	۱۱	۳۰	۲۷	۱۳
۱۰	۷	۹	۱۴	۱۹	۱۰
۱۱	۵	۴	۱۲	۱۱	۸
۱۲	–	–	–	–	–

جدول- ٤: مقادیر MIC ترکیب ضدمیکروبی (µg/ml) برای سویه‌های باکتریایی مورد آزمایش بعد از تخلیص نسبی

سویه میکروبی	*انتروکوک فکالیس* مقاوم به ونکومایسین ATCC ۲۹۲۱٤	*انتروکوک فکالیس* حساس به ونکومایسین ATCC ۲۹۲۱۲	*استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین ATCC ٤۳۳۰۰	*استافیلوکوک اورئوس* حساس به متی‌سیلین ATCC ۲۹۲۱۳	*اشرشیاکلی* ATCC ۲۵۹۲۲
حداقل غلظت مهارکنندگی (µg/ml)					
تکرار اول	۱۶	۱۶	۴	۴	۱۶
تکرار دوم	۱۶	۱۶	۴	۴	۱۶
تکرار سوم	۱۶	۱۶	۴	۴	۱۶
میانگین	۱۶	۱۶	۴	۴	۱۶

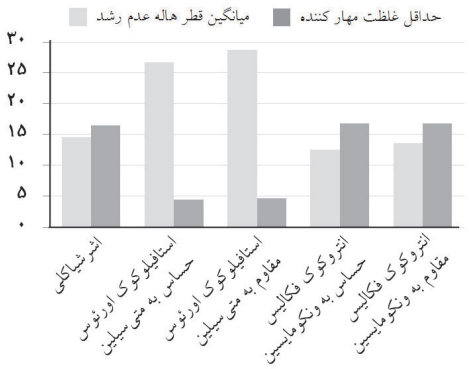
جدول- ۵: درجه سمیت عصاره پوستی در دو مقدار چهار و ۱٦ میکروگرم روی سلول‌های K٥٦٢.

مقدار ترکیب ضدمیکروبی	٤µg	۱٦µg
درصد سلول‌های زنده٪		
تکرار اول	۹۵	۸۲
تکرار دوم	۹۷	۸۳
تکرار سوم	۹۴	۷۸
میانگین	۹۵±(۱/۵۲)	۷۹/۶۶±(۲/۰۸)



شکل- ۱: تصاویری از وضعیت سلول‌های K562 در مقادیر چهار و ۱٦ میکروگرم
(به ترتیب از راست به چپ) از ترکیب ضدمیکروبی. سلول‌های بی‌رنگ سلول‌های زنده هستند.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]



نمودار- ۱: بررسی هم‌زمان نتایج دیسک دیفیوژن با MIC روی سویه‌های باکتریایی مختلف

بحث

نتایج تحقیق ما نشان داد که عصاره پوستی رانا ریدیباندا روی سویه‌های *اشرشیاکلی*، *انتروکوک فکالیس* مقاوم به ونکومایسین، انتروکوک فکالیس حساس به ونکومایسین، *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و *استافیلوکوک اورئوس* حساس به متی‌سیلین اثرات ضدمیکروبی داشته است. نمودار ۱ بررسی هم‌زمان نتایج دیسک دیفیوژن با MIC را روی سویه‌های باکتریایی مختلف نشان می‌دهد که با توجه به مرجع Bailey می‌توان اظهار نمود که نتایج قابل توجه است.[۱۴] قورباغه‌های رانا ریدیباندا در سطح دنیا پراکندگی بالایی دارند و در نقاط مختلف اروپا و آسیا زندگی می‌کنند و در مناطق جغرافیایی متفاوت تولیدات و ترشحات پوستی مختلفی دارند.[۳] با توجه به این‌که قورباغه رانا ریدیباندا در برکه‌هایی با آب‌های ساکن زندگی می‌کند که میزان و تنوع میکروبی بالایی دارند، گزارشات نشان می‌دهد که تنوع باکتریایی در سطح پوست آن کم است. Asgharian نشان داد با توجه به این‌که میزان فلور میکروبی آب برکه محل زندگی قورباغه رانا ریدیباندا از تنوع باکتریایی نسبتاً بالایی برخوردار بود ولی در پوست سطحی این قورباغه تنها شش سویه باکتریایی متفاوت وجود داشت. آن‌ها ابراز داشتند که تنوع کم باکتری در سطح پوست آن‌ها ممکن است به‌دلیل ترشح ترکیبات ضدمیکروبی توسط غدد پوستی یا وجود باکتری‌های همزیست تولیدکننده ترکیبات ضدمیکروبی در سطح پوست‌شان باشد.[۱۸و۳] نتایج تحقیق حاضر با نتایج گزارشات Goroya که روی اثرات ضدمیکروبی عصاره پوستی جنس *Rana* از قبیل *Rana pipiens*، *Rana beladeri* و *Rana luteiventris* مطالعه داشتند قابل مقایسه است. Goroya نشان داد که اثرات ضدباکتریایی عصاره پوستی *رانا ریدیباندا* برای سویه‌های گرم مثبت *استافیلوکوک اورئوس* نسبت به باکتری گرم منفی از قبیل اشرشیاکلی و قارچ *کاندیدا آلبیکانس* بیش‌تر است.[۱۹] از طرف دیگر اثرات ترکیب ضدمیکروبی حاصل از عصاره پوستی رانا ریدیباندا از اثرات ترکیب ضدمیکروبی عصاره پوستی گونه‌های *Rana esculenta* و *Rana pipiense* که دارای پپتیدهای Brevenine1E و Esculentine-1C (با میزان MIC=۶/۵ برای *S. aureus*) نیز بیش‌تر است.[۲۰] اثرات ضدمیکروبی ترکیب عصاره پوستی رانا ریدیباندا روی سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* در مقایسه با سایر ترکیبات ضدمیکروبی مشابه Esculentin1GRa، Brevinin2GR، Brevinin2GRb، Brevinin1GRa، Brevinin2GRb، Brevinin2GRc، Nigrocin2GR، Nigrocin2GRb و Nigrocin2GRc حاصل از عصاره پوستی *Rana grahami* بیش‌تر است.[۱۲] هم‌چنین میزان MIC ترکیب پپتیدی Ranalexin که از قورباغه *Rana catesbilina* به‌دست آمده روی سویه *استافیلوکوک اورئوس* نسبت به *اشرشیاکلی* بیش‌تر بود که با نتایج تحقیق حاضر قابل مقایسه است.[۲۰] بنابراین اثرات ضدمیکروبی عصاره پوستی رانا ریدیباندا در مقایسه با سایر ترکیبات پپتیدی به‌دست آمده از سایر جنس‌های *Rana* قابل مقایسه و در بسیاری موارد بیش‌تر است. باید خاطر نشان شود که یکی از مهم‌ترین جذابیت خواص آنتی‌بیوتیکی قورباغه‌های رانا در این است که قورباغه‌های ساکن مناطق مختلف و حتی آن‌هایی که از یک گونه‌اند و در مناطق‌های اکولوژیک متفاوت به‌سر می‌برند ترشحات متفاوت دارند و این خود باعث می‌شود تا تنوع تولیدات پروتئینی آن‌ها متفاوت شود. سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین یکی از موضوعات مهم و قابل توجه در درمان بیماری‌های عفونی و بیمارستانی است و همواره از نگرانی‌های بهداشت و درمان می‌باشد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و با مقایسه آن با مقالات مربوط در این زمینه می‌توان گفت که پوست قورباغه رانا ریدیباندا می‌تواند به‌عنوان یک منبع ترکیبات ضدمیکروبی جدید برای رشد باکتری‌های *استافیلوکوک اورئوس* و سویه *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین مورد توجه قرار گیرد و از لحاظ باکتری‌شناسی و مباحث آنتی‌بیوتیکی می‌تواند پتانسیل و اثرات یک ترکیب آنتی‌بیوتیکی جایگزین مناسب را در آینده‌ای نزدیک داشته

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]

باشد. هم‌چنان که عصاره پوستی رانا ریدیباندا اثرات ضدمیکروبی قابل قبولی دارد و نابودی سلول‌های انسانی نیز در کم‌ترین حد ممکن بود. آزمایشات تعیین سمیت سلولی نشان داد، درجه سمیت ترکیب ضدمیکروبی در عصاره پوستی رانا ریدیباندا برای رده سلولی انسانی K۵۶۲ بسیار پایین بود و همانند ترکیب ضدمیکروبی Esculentin-1C و Brevenin-1Eb حاصل از *Rana pipienes* و *Rana esculenta* حدود ۹۵٪ سلول‌ها زنده ماندند.[۱۲و۱۵و۲۰] اثرات *همولیتیک* ترکیب نیز ناچیز بود و در مجموع پتانسیل یک داروی مناسب را دارد. با توجه به گزارش Won حتی درجه سمیت این ترکیب نسبت به ترکیبات دیگر جداسازی شده از قبیل Brevenin-1E (۲۹٪) و Brevenin-1Ed (۱۹٪) نیز بسیار کم‌تر است.[۲۰] این احتمال می‌رود که در صورت تخلیص کامل این ترکیب این میزان کاهش یابد. گزارشات Oren و Dathe نشان داده که مکانیسم اثرپذیری ترکیبات ضدمیکروبی از جنس *Rana*، که ساختار پپتیدی کاتیونیک دارند، مانند دترجنت‌ها است و بروی غشای سلولی باکتری‌ها اثر کرده و از طریق افزایش نفوذپذیری، باکتری‌ها را از بین می‌برند.[۲۱و۲۲] سوالی که مطرح است این است که چگونه غشای سلولی پستانداران در برابر عملکرد آن‌ها مصون می‌مانند ولی روی سلول‌های باکتری‌ها اثر دارند. Kim و Hong ابراز داشتند که تفاوت در میزان خصوصیات سطحی آن‌ها است. باکتری‌ها دارای لیپوپلی ساکارید و لیپوتیکوئیک اسید با شارژ منفی هستند و این در حالی است که غشای سلول‌های پستانداران (که در این مطالعه رده سلولی K۵۶۲ استفاده شد) شارژ مثبت دارند. بنابراین ترکیبات ضدمیکروبی عصاره پوستی جنس‌های *Rana* با غشا باکتری‌ها تمایل کشش‌های الکترواستاتیک بالایی را داشته و به آن‌ها متصل شده و از طریق افزایش نفوذپذیری باکتری‌ها را از بین می‌برد.[۲۳و۲۴] نتایج آزمایشات ضدمیکروبی روی سلول‌های باکتریایی و میزان فعالیت همولیتیک عصاره پوستی رانا ریدیباندا روی سلول‌های انسانی و پستانداران با نتایج Kim و Hong مطابقت دارد و این احتمال می‌رود که ماده موثر در عصاره پوستی رانا ریدیباندا احتمالا ساختار پپتیدی کاتیونیک داشته باشد. در مجموع می‌توان نتیجه‌گیری نمود که عصاره پوستی رانا ریدیباندا پتانسیل یک آنتی‌بیوتیک مناسب را چه از لحاظ باکتری‌شناسی و چه از لحاظ سلولی دارد. البته تحقیقات مولکولی و ژنتیکی جهت بررسی میزان پاسخ‌های ایمنی سلول میزبان انسانی نسبت به ترکیب موثر قورباغه رانا ریدیباندا و بررسی آن در موجودات مدل پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل از طرح تحقیقاتی تحت عنوان بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره پوستی قورباغه Rana ridibunda بومی شمال ایران به‌عنوان یک منبع یوکاریوتی تولیدکننده مواد آنتی‌بیوتیکی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن در سال ۱۳۸۷ به کد ۵۱۵۹۳۸۷۰۸۰۹۰۰۷ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن اجرا شده است. هم‌چنین از پروفسور Conlon جهت مشاوره علمی این پروژه کمال تشکر را داریم.

References

1. Moore KS, Bevins CL, Brasseur MM, Tomassini N, Turner K, Eck H, et al. Antimicrobial peptides in the stomach of Xenopus laevis. *J Biol Chem* 1991;266(29):19851-7.
2. Wang Y, Knoop FC, Remy-Jouet I, Delarue C, Vaudry H, Conlon JM. Antimicrobial peptides of the brevinin-2 family isolated from gastric tissue of the frog, Rana esculenta. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253(3):600-3.
3. Balouch M, Kammi HG. Irnian Amphibians. Tehtan University Press; 2005. p. 20-5. [Persian]
4. Conlon JM, Sonnevend A, Patel M, Davidson C, Nielsen PF, Pál T, et al. Isolation of peptides of the brevinin-1 family with potent candidacidal activity from the skin secretions of the frog Rana boylii. *J Pept Res* 2003;62(5):207-13.
5. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(15):5449-53.
6. Amiche M, Seon AA, Wroblewski H, Nicolas P. Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family. *Eur J Biochem* 2000;267(14):4583-92.
7. Simmaco M, Barra D, Chiarini F, Noviello L, Melchiorri P, Kreil G, et al. A family of bombinin-related peptides from the skin of Bombina variegata. *Eur J Biochem* 1991;199(1):217-22.
8. Morikawa N, Hagiwara K, Nakajima T. Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, Rana brevipoda porsa. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189(1):184-90.
9. Clark DP, Durell S, Maloy WL, Zasloff M. Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (Rana catesbeiana) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. *J Biol Chem* 1994;269(14):10849-55.
10. Goraya J, Knoop FC, Conlon JM. Ranatuerins: antimicrobial peptides isolated from the skin of the American bullfrog, Rana catesbeiana. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250(3):589-92.
11. Mangoni ML, Saugar JM, Dellisanti M, Barra D, Simmaco M, Rivas L. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *J Biol Chem* 2005;280(2):984-90
12. Conlon JM, Al-Ghaferi N, Abraham B, Jiansheng H, Cosette P, Leprince J, et al. Antimicrobial peptides from diverse families

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]

isolated from the skin of the Asian frog, Rana grahami. *Peptides* 2006;27(9):2111-7.
13. Marenah L, Flatt PR, Orr DF, Shaw C, Abdel-Wahab YH. Skin secretions of Rana saharica frogs reveal antimicrobial peptides esculentins-1 and -1B and brevinins-1E and -2EC with novel insulin releasing activity. J Endocrinol 2006;188(1):1-9.
14. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 12th ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2007. p. 194-220.
15. Conlon JM, Woodhams DC, Raza H, Coquet L, Leprince J, Jouenne T, et al. Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog Hylomantis lemur (Hylidae: Phyllomedusinae). Toxicon 2007;50(4):498-506.
16. Conlon JM, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788(8):1556-63.
17. Rozek T, Wegener KL, Bowie JH, Olver IN, Carver JA, Wallace JC, et al. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs Litoria aurea and Litoria raniformis the solution structure of aurein 1.2. *Eur J Biochem* 2000;267(17):5330-41.
18. Asgharian AM. Isolation a bacterium producing antimicrobial agent from Rana ridibunda [Thesis]. Tehran: Shahid Beheshti University of Medical Sciences; 2004. [Persian]
19. Goraya J, Wang Y, Li Z, O'Flaherty M, Knoop FC, Platz JE, et al. Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American frogs Rana luteiventris, Rana berlandieri and Rana pipiens. *Eur J Biochem* 2000;267(3):894-900.
20. Won HS, Kim SS, Jung SJ, Son WS, Lee B, Lee BJ. Structure-activity relationships of antimicrobial peptides from the skin of Rana esculenta inhabiting in Korea. *Mol Cells* 2004;17(3):469-76.
21. Oren Z, Hong J, Shai Y. A repertoire of novel antibacterial diastereomeric peptides with selective cytolytic activity. *J Biol Chem* 1997;272(23):14643-9.
22. Dathe M, Kaduk C, Tachikawa E, Melzig MF, Wenschuh H, Bienert M. Proline at position 14 of alamethicin is essential for hemolytic activity, catecholamine secretion from chromaffin cells and enhanced metabolic activity in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1998;1370(1):175-83.
23. Kim S, Kim SS, Bang YJ, Kim SJ, Lee BJ. In vitro activities of native and designed peptide antibiotics against drug sensitive and resistant tumor cell lines. *Peptides* 2003;24(7):945-53.
24. Hong SY, Oh JE, Kwon M, Choi MJ, Lee JH, Lee BL, et al. Identification and characterization of novel antimicrobial decapeptides generated by combinatorial chemistry. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(10):2534-41.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 10, January 2012: 595-604

Evaluating the antibacterial, hemolytic and cytotoxic activities of the Iranian Rana ridibunda skin extract as a new source of antimicrobial compound

Ali Mohammad Asgharian Ph.D.[1*]
Mohsen Mohammadi Ph.D.[2]

1- Department of Cell and Molecular Biology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
2- Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

[*] Corresponding author: Department of Cell and Molecular Biology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Valiabad Ave., Tonekabon, Iran.
Tel: +98- 912-2958644
E-mail: mehranasgharian@yahoo.com

Received: September 25, 2011 Accepted: November 05, 2011

Abstract

***Background*:** Amphibian skins possess various antibacterial compounds that are effective against some microbial pathogens and are mostly released in response to environmental stress. In fact, the skin of *Rana ridibunda*, a large green frog, is a rich source of antimicrobial compounds that can be developed for therapeutic use. In the present study, the skin extract of Iranian *Rana ridibunda* was evaluated for its antimicrobial, hemolytic and cytototoxic activities.

***Methods*:** The frog specimens were collected from Minoodasht located in Golesten province in Iran, during 2009. Subsequently, their skins were removed and the intended compounds were extracted. The crude extract was partially purified by gel filtration chromatography. The antimicrobial effects of skin extract were assessed against various microorganisms such as *Escherchia coli*, methicillin-resistant and -sensitive *Staphyloccus aureus*, vancomycin-resistant and -susceptible *Enteroccus fecalis, Pseudomonas aeroginosa* and *Candida albicans*. In addition, its minimum inhibition concentration, cytotoxic and hemolytic activities were determined.

***Results*:** The crude extract of *Rana ridibunda* skin had valuable antimicrobial effects against methicillin-resistant and -susceptible *S. aureus* in comparison with *E.coli* and vancomycin-resistant and -susceptible *E. fecalis*. Besides, no antimicrobial activities were seen against *P. aeroginosa* or *C. albicans*. Moreover, the hemolytic and cytotoxic activities of the skin extract were minimal.

Conclusion: The antimicrobial activity of Iranian *Rana ridibunda* was comparable to those isolated from other *Rana* species. In conclusion, the skin extract of *Rana ridibunda* had the potential for a new therapeutic agent against the emerging drug-resistant bacteria, particularly methicillin-resistant and -sensitive *S. aureus*.

Keywords: Antibiotic resistance, antimicrobial, activity, *Rana ridibunda*, skin extract.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]