

بررسی اثرات ضدباکتریایی، همولیتیکی و سلولی عصاره پوستی قورباغه رانا رییدیاندای ایرانی به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی جدید

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

چکیده

علی محمد اصغریان^{۱*}
محسن محمدی^۲

۱- گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

۲- گروه زیست‌شناسی میکروبیولوژی

دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران.

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

کلمات کلیدی: اثرات ضد میکروبی، رانا رییدیاندا، 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: mehranashgharian@yahoo.com

مقدمه

زمینه می‌باشد.^۲ شناسایی ترکیبات ضد میکروبی 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.^۳ 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 ضد میکروبی پدید می‌آید.

ظهور سوش‌هایی از میکروارگانیزم‌ها که به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاومت نشان می‌دهند باعث شده تا تحقیقات برای شناسایی ترکیبات ضدقارچی و ضدباکتریایی برای درمان پاتوژن‌های میکروبی همواره تداوم یابد.^۱ منابع مولد بیولوژیک ترکیبات ضد میکروبی متعددند و می‌توانند به دو دسته پروکاریوتی و یوکاریوتی دسته‌بندی شوند. پوست قورباغه‌های *Rana* از منابع یوکاریوتی مورد توجه در این

گیاه و نیز در استخرهایی زندگی می‌کنند که در تابستان کاملاً خشک نمی‌شوند. بدن مرطوب این قورباغه محل مناسبی برای رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها است، ولی مواد مترشحه پوست آن‌ها تا حد زیادی از رشد چنین میکروارگانیسم‌هایی جلوگیری می‌نماید. قورباغه رانا ریدیباندا در مناطق شمال ایران خصوصاً استان گلستان پراکندگی بالایی دارد و تا به حال مطالعات جامعی در زمینه اثرات ضد میکروبی و پتانسیل دارویی عصاره پوستی آن انجام نشده است.^۳ هدف اصلی این تحقیق شناسایی و بررسی اثرات ضد میکروبی و سلولی گونه قورباغه رانا ریدیباندا ساکن شمال ایران علیه سویه‌های پاتوژن میکروبی مختلف خصوصاً سویه‌های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم و حساس به متی‌سیلین، *انتروکوک فکالایس* مقاوم و حساس به ونکوماسین، *سودوموناس آئروژینوزا* و قارچ *کاندیدا آلبیکانس* و هم‌چنین بررسی اثرات همولیتیک روی سلول‌های خونی و بررسی سمیت سلولی ترکیب ضد میکروبی روی سلول‌های اریتروییدی K562 انسانی بود.

روش بررسی

این یک مطالعه تجربی بود که در سال ۱۳۸۸-۱۳۸۹ در آزمایشگاه تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن انجام شد. جمع‌آوری نمونه‌های رانا ریدیباندا: جمع‌آوری نمونه‌های رانا ریدیباندا از منطقه مینودشت استان گلستان در سال ۱۳۸۸ صورت گرفت. نمونه‌گیری در دمای 20°C در شرایطی که قورباغه‌ها به راحتی در محیط یافت می‌شدند انجام شد. پنج قورباغه رانا ریدیباندا انتخاب گردید و توسط ظرفی استریل که تبادل هوایی مناسب داشت به آزمایشگاه تحقیقات گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن انتقال داده شدند.

تهیه عصاره پوستی از قورباغه رانا ریدیباندا: جهت تهیه عصاره پوستی سه قورباغه انتخاب شد و به مدت دو ساعت در ظرف در بسته محتوی یخ خشک له‌شده قرار داده شدند تا قورباغه‌ها کاملاً بی‌هوش شوند و متحمل درد نشوند و در ادامه مراحل تهیه عصاره پوستی روی آن‌ها انجام شد. پوست قورباغه‌ها فوراً جدا و توسط قیچی تکه‌تکه و با محلول بافر فسفات (PBS) استریل شسته شدند. پوست‌ها به ظرف تمیز انتقال و به فریزر منفی 80°C (GFL Co,)

یاد می‌شود و امید است که بتوانند در آینده تا حدودی جانشین آنتی‌بیوتیک‌های رایج شده و در رفع پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروارگانیسم موثر باشند.^۴ از اولین و شناخته‌ترین این ترکیبات ماگنین‌ها (Magenine) هستند که یک خانواده پپتیدی جداسازی شده از *Xenopus laevis* است که علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و قارچ‌هایی مانند *کاندیدا آلبیکانس*، *کریپتوکوکوس نئوفورمانس* و هم‌چنین *ساکارومایسس سرویزیه* موثر است.^۵ قورباغه آمریکایی جنس *Phyllomedusa* ترشحات پپتیدی داشته که به عنوان Dermaseptin شناخته شده که یک مولکول کاتیونیک است و این ترکیب غشا باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی، مخمر و قارچ‌های رشته‌ای را نفوذپذیر می‌سازد و از طرف دیگر روی سلول‌های پستانداران اثرات همولیزی ناچیز دارد.^۶ از قورباغه *Bombina variegata* ترکیب پپتیدی جداسازی شده است که فعالیت ضد میکروبی بالایی دارد.^۷ پپتید ضد میکروبی دیگر به نام‌های Brevinin-1 و Brevinin-2 (از قورباغه *Brevipoda porsa Rana*)^۸، از قورباغه *Rana catesbeiana* به دست آمده که شباهت ضد میکروبی مشابه با ترکیب آنتی‌بیوتیکی پلی‌میکسین دارد.^۹ در مطالعه‌ای جالب^۹ پپتید از *Rana catesbeiana* تخلیص شده است که فعالیت ضد میکروبی علیه *استافیلوکوک اورئوس* داشت و در میان آن‌ها Ranaturerin فعالیت ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای علیه سلول‌های *استافیلوکوک اورئوس*، *اشرشیاکلی* و قارچ *کاندیدا آلبیکانس* داشت.^{۱۰} هم‌چنین دو پپتید Temporin-A و Temporin-B حاصل از قورباغه قرمز اروپایی *Rana temporaria* معلوم شده که در غلظت‌های میکرومولار فعالیت ضد لیشمانیایی دارد بدون این‌که سبب لیز شدن سلولی علیه گلبول قرمز انسانی شود. این ترکیبات سبب لیز شدن غشا و مقاومت پاتوژن انگلی را کاهش می‌دهد.^{۱۱} در مجموع گزارشات در این زمینه متعدد است که همگی نشان‌دهنده پتانسیل منحصر به فرد عصاره پوستی قورباغه‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم‌ها است. رانا ریدیباندا قورباغه‌ای مردابی است که هم در آب‌های آرام و هم در آب‌های جاری یافت می‌شود. از مشخصات این قورباغه زبان چنگالی، وجود پوست بین انگشتان پا، مردمک چشم افقی و قسمت پشتی بدن آن از رنگ خاکستری تا سبز روشن است. در پشت بدن این قورباغه لکه‌های تیره رنگ در اندازه‌ها و ترتیب مختلف وجود دارد. این گونه در گودال‌های کوچک دارای

تخلیص نسبی عصاره پوستی رانا رییدیاندا: 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، تری فلئوراستیک (Merck Co, Germany) با نسبت ۱-۱۹-۷۰٪ انتخاب شد.^{۳۳-۳۵} میزان Flow rate (میزان تزریق مخلوط حلال از بالای ستون) نیز ۲۰ میلی لیتر در ساعت بود. حجم محلول خارج شده از انتهای ستون برای هر فراکشن (Fraction) به میزان ۵ml بود که در لوله‌های جداگانه جمع‌آوری و تا آزمایشات ضد میکروبی در دمای ۴°C زمان آزمایشات نگهداری شدند. پس از جمع‌آوری فراکشن‌ها (۲۰ فراکشن)، آزمایشات ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن به صورت زیر انجام گرفت.^{۱۲،۱۵} بررسی اثرات ضد میکروبی 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، / اترتروکوک فکالیس و / شرشیاکلی کشت جوان ۱۲ ساعته تهیه شد و میزان 10^8 سلول از نمونه‌های میکروبی باکتریایی فوق به محیط کشت مولر هیتون آگار اضافه و کشت داده شدند. بر روی هر پلیت دیسک‌های ضد میکروبی را قرار دادیم. تمامی پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور دمای ۳۷°C قرار داده شد و در روز بعد قطر هاله‌های عدم رشد در اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج ثبت شد. فراکشن‌هایی که دارای اثرات ضد میکروبی 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 ضد میکروبی تا زمان آزمایشات MIC در دمای ۴°C 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 / استافیلوکوک اورئوس، سویه‌های / اترتروکوک فکالیس و / شرشیاکلی ابتدا در محیط مولر-هیتون برات (Merck Co, Germany) کشت داده شدند تا به شرایطی برسند که تعداد سلولی آن‌ها به 10^8 سلول در هر میلی لیتر باشد. در مرحله بعد مقادیر ۱،۲۸

(Germany) منتقل گشت. انتقال بافت به فریزر باعث می‌شود که پوست حالت خشک به خود بگیرد.^{۱۲،۱۳} 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 ۰/۷ HCL مولار (به ترتیب 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 کاملاً مخلوط گردد. به منظور جداسازی تکه‌های بافتی در دور ۵۰۰g به مدت ۴۰ دقیقه و در دمای صفر درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. محلول رویی برداشته و در داخل یک ظرف شیشه‌ای کاملاً تمیز انتقال یافت. سپس تحت فشار منفی اتانول تبخیر و عصاره حاصل در محلول ترکیبی استونیتریل، آب و تری-فلورواستیک اسید (به ترتیب با نسبت درصد ۱:۲۹:۷۰) حل گردید و تا زمان آزمایشات ضد میکروبی در فریزر منفی ۸۰°C قرار داده شد.^{۱۲،۱۳} تهیه دیسک‌های ضد میکروبی: به منظور بررسی خاصیت ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن، دیسک‌های ضد میکروبی 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 ۷۰°C تا زمان آزمایشات ضد میکروبی نگهداری شد. جهت آزمایشات دیسک دیفیوژن برای باکتری‌ها از محیط مولر-هیتون آگار (Mueller-Hinton Agar) (Merck Co, Germany) و برای قارچ کاندیدا آلبیکانس از ساپرود دکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar) (Merck Co, Germany) استفاده شد. از سلول‌های باکتری و قارچ نام‌برده که لیست آن در جدول ۱ آمده مقدار 10^8 سلول (که حدوداً معادل با OD=۱ (Optical Density) در طول موج ۶۲۵ نانومتر می‌باشد) برداشته و در محیط کشت مولر-هیتون آگار و ساپرود دکستروز آگار کشت داده شدند. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی حاوی عصاره پوستی تهیه شد و بروی پلیت‌هایی مولر هیتون آگار و ساپرود 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 ۳۷°C 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.

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

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

ATCC: American Type Culture Collection

خون محیطی از یک فرد سالم به میزان ۱۰ ml 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 ضد میکروبی 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.^{۱۷-۱۳}

یافته‌ها

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

نتایج اثرات ضد میکروبی فراکشن‌های حاصل از تخلیص نسبی عصاره پوستی رانا ری‌دی‌باند: جهت تخلیص نسبی ترکیب

۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴ و ۲ میکروگرم از ترکیب ضد میکروبی به روش رقت‌سازی سریالی به هر چاهک پلیت اضافه شد. پلیت‌های تلقیح شده دارای ترکیب ضد میکروبی به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور دمای ۳۷ °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 ضد میکروبی در مقایسه با نمونه کنترل خود مقایسه و نتایج آن ثبت گردید. کم‌ترین غلظتی از ترکیب ضد میکروبی که سبب مهار رشد باکتری گردد بنا به تعریف MIC نامیده می‌شود. آزمایشات MIC سه بار تکرار و نتایج آن ثبت شد.^{۱۲}

بررسی فعالیت سیتوتوکسیک رده سلولی انسانی K۵۶۲ از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو: جهت بررسی میزان سمیت ترکیب ضد میکروبی برای سلول‌های پستانداران از روش کشت رده‌های سلولی انسانی استفاده شد. سلول‌های K۵۶۲ که از دسته سلول‌های اریترویدی و معلق است انتخاب شدند و برای این منظور تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول K۵۶۲ در ۲۰۰ μl محیط کشت سلولی RPMI ۱۶۴۰ (Biosera Co, South Korea) همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Biosera Co, South Korea) به علاوه ۱٪ آنتی‌بیوتیک ترکیبی پنی‌سیلین استرپتومایسین (Biosera Co, South Korea) کشت داده شد. مقادیر ۱۶ و ۴ میکروگرم از ترکیب ضد میکروبی به ظرف کشت سلول‌ها اضافه و در دمای ۳۷ °C انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت، با روش رنگ‌آمیزی زیستی تریپان بلو و لام نوبار درصد سمیت و درصد سلول‌های زنده تعیین شد.^{۱۶، ۱۷}

بررسی فعالیت همولیتیک عصاره پوستی پوستی: برای این منظور

اتروکوک فکالیس حساس به ونکومایسین ATCC ۲۹۲۱۲ و اتروکوک فکالیس مقاوم به ونکومایسین ATCC ۲۹۲۱۴ بود. نتایج آزمون MIC در جدول ۴ ارائه گردیده است. میزان MIC برای دو باکتری است *استافیلوکوک اورئوس* حساس و مقاوم به متی سیلین در مقایسه با سویه های باکتریایی *اشرشیاکلی* ATCC ۲۵۹۹۲، *اتروکوک فکالیس* مقاوم به ونکومایسین ATCC ۲۹۲۱۴ و *اتروکوک فکالیس* مقاوم به ونکومایسین ATCC ۲۹۲۱۴ کم تر و در نتیجه قابل توجه بود. با مقایسه نتایج آزمایشات دیسک دیفیوژن و MIC ترکیب عصاره پوستی با مرجع Bailey، میزان اثرات ضد میکروبی عصاره پوستی قورباغه رانا ریدیباندا روی سویه های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم و حساس به متی سیلین از لحاظ باکتری شناسی ارزشمند بود.^{۱۴}

نتایج آزمایشات سمیت سلولی ترکیب ضد میکروبی: برای بررسی درجه سمیت از رنگ آمیزی زیستی تریپان بلو استفاده شد و در میکروسکوپ نوری تعداد سلول های زنده و لیز شده شمارش شد. در شکل ۱ نمونه ای از زمینه مورد مطالعه آورده شده است. تعداد سلول های زنده در دو مقدار ۴ و ۱۶ میکروگرم از ترکیب ضد میکروبی در جدول ۵ آمده است. نتایج فعالیت همولیتیک عصاره پوستی روی گلبول های قرمز انسانی: نتایج همولیز گلبول قرمز نشان می دهد که نشان می دهد 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 ۴ μl ناچیز است.

ضدمیکروبی موجود در عصاره از روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون استفاده شد. در این تحقیق از روش هایی که توسط Goraya, Conlon و Won ارائه شده بود استفاده کردیم.^{۱۵} در روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون مولکول ها بر اساس اندازه و جرم مولکولی جداسازی می شوند. در این روش مولکول های سنگین تر و بزرگ تر سریع تر از ستون خارج شده و مولکول های کوچک تر دیرتر خارج می شوند. در این تحقیق از ذرات سفادکس G-50 استفاده گردید. این مولکول ها می توانند ذرات با اندازه ۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ دالتون را جداسازی کنند. بنابراین می توان نتیجه گرفت که ترکیب ضد میکروبی دارای وزن مولکولی بین ۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ دالتون است. آزمایشات ضد میکروبی بر روی فراکشن های جمع آوری شده نشان داد که فراکشن های شماره شش الی ۹ نسبت به سایر فراکشن ها بیش ترین اثرات ضد میکروبی را داشته است که نتایج آن در جدول ۳ آمده است. از ذکر سایر فراکشن ها که جواب مثبت نداشتند اجتناب شد. فراکشن های شش الی ۹ روی هم ریخته و حلال آن ها تبخیر شد و ماده خشک حاصل جهت آزمایشات MIC استفاده گردید.

نتایج آزمایشات تعیین حداقل غلظت مهارکننده یا MIC: آزمون MIC تنها بر روی سویه های میکروبی انجام گرفت که اثرات ضد میکروبی علیه آن ها را داشتیم که شامل سویه های *اشرشیاکلی* ATCC ۲۵۹۹۲، *استافیلوکوک اورئوس* حساس به متی سیلین ATCC ۲۹۲۱۲، *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی سیلین ATCC ۴۳۳۰۰،

جدول ۲- نتایج میانگین آزمایشات ضد میکروبی (قطر هاله عدم رشد به میلی متر)

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

ATCC: American Type Culture Collection

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

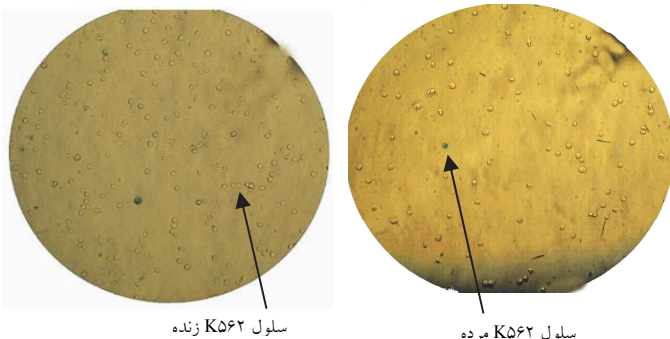
اشرشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲	استافیلوکوک اورنوس حساس به متی‌سیلین ATCC ۲۹۲۱۳	استافیلوکوک اورنوس مقاوم به متی‌سیلین ATCC ۴۳۳۰۰	انتروکوک فکالیس حساس به ونکومايسين ATCC ۲۹۲۱۲	انتروکوک فکالیس مقاوم به ونکومايسين ATCC ۵۱۲۹۹	سویه میکروبی میزان هاله عدم رشد فراکشن (mm)
-	-	-	-	-	۱
-	-	-	-	-	۲
-	-	-	-	-	۳
۷	۲۱	۲۰	۹	۱۰	۴
۱۴	۲۵	۱۸	۱۳	۱۳	۵
۱۶	۲۷	۳۰	۱۲	۱۲	۶
۱۴	۲۸	۲۷	۱۱	۱۳	۷
۱۴	۲۵	۲۸	۱۲	۱۳	۸
۱۳	۲۷	۳۰	۱۱	۱۰	۹
۱۰	۱۹	۱۴	۹	۷	۱۰
۸	۱۱	۱۲	۴	۵	۱۱
-	-	-	-	-	۱۲

جدول-۴: مقادیر MIC ترکیب ضد میکروبی (µg/ml) برای سویه‌های باکتریایی مورد آزمایش بعد از تخلیص نسبی

اشرشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲	استافیلوکوک اورنوس حساس به متی‌سیلین ATCC ۲۹۲۱۳	استافیلوکوک اورنوس مقاوم به متی‌سیلین ATCC ۴۳۳۰۰	انتروکوک فکالیس حساس به ونکومايسين ATCC ۲۹۲۱۲	انتروکوک فکالیس مقاوم به ونکومايسين ATCC ۲۹۲۱۴	سویه میکروبی حداقل غلظت مهارکنندگی (µg/ml)
۱۶	۴	۴	۱۶	۱۶	تکرار اول
۱۶	۴	۴	۱۶	۱۶	تکرار دوم
۱۶	۴	۴	۱۶	۱۶	تکرار سوم
۱۶	۴	۴	۱۶	۱۶	میانگین

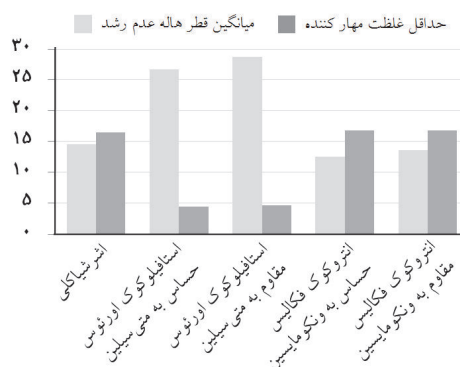
جدول-۵: درجه سمیت عصاره پوستی در دو مقدار چهار و ۱۶ میکروگرم روی سلول‌های K562

مقدار ترکیب ضد میکروبی درصد سلول‌های زنده %	۱۶µg	۴µg
تکرار اول	۸۲	۹۵
تکرار دوم	۸۳	۹۷
تکرار سوم	۷۸	۹۴
میانگین	۷۹/۶۶±(۲/۰۸)	۹۵±(۱/۵۲)



شکل-۱: تصاویری از وضعیت سلول‌های K562 در مقادیر چهار و ۱۶ میکروگرم (به ترتیب از راست به چپ) از ترکیب ضد میکروبی. سلول‌های بی‌رنگ سلول‌های زنده هستند.

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 بیش تر است.^{۱۹} از طرف دیگر اثرات ترکیب ضد میکروبی حاصل از عصاره پوستی رانا ریدیباندا از اثرات ترکیب ضد میکروبی عصاره پوستی گونه‌های *Rana esculenta* و *Rana pipiens* که دارای پپتیدهای Brevenine1E و Esculentine-1C (با میزان MIC=۶/۵ برای *S. aureus*) نیز بیش تر است.^{۲۰} اثرات ضد میکروبی ترکیب عصاره پوستی رانا ریدیباندا روی سویه‌های استافیلوکوک اورئوس در مقایسه با سایر ترکیبات ضد میکروبی مشابه Brevinin1GRa، Brevinin2GRb، Brevinin2GR، Esculentin1GRa، Brevinin2GRb، Brevinin2GRc، Nigrocin2GRb و Nigrocin2GRc حاصل از عصاره پوستی *Rana grahami* بیش تر است.^{۱۲} هم‌چنین میزان MIC ترکیب پپتیدی Ranalexin که از قورباغه *Rana catesbilina* به دست آمده روی سویه استافیلوکوک اورئوس نسبت به اشرشیاکلی بیش تر بود که با نتایج تحقیق حاضر قابل مقایسه است.^{۲۰} بنابراین اثرات ضد میکروبی عصاره پوستی رانا ریدیباندا در مقایسه با سایر ترکیبات پپتیدی به دست آمده از سایر جنس‌های *Rana* قابل مقایسه و در بسیاری موارد بیش تر است. باید خاطر نشان شود که یکی از مهم‌ترین جذابیت‌های خواص آنتی‌بیوتیکی قورباغه‌های رانا در این است که قورباغه‌های ساکن مناطق مختلف و حتی آن‌هایی که از یک گونه‌اند و در مناطق‌های اکولوژیک متفاوت به سر 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 به عنوان یک منبع ترکیبات ضد میکروبی 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



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 ونکومايسين، انتروکوک فکالیس حساس به ونکومايسين، استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و استافیلوکوک اورئوس حساس به متی‌سیلین اثرات ضد میکروبی 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 به دلیل ترشح ترکیبات ضد میکروبی توسط غدد پوستی یا وجود باکتری‌های هم‌زیست تولیدکننده ترکیبات ضد میکروبی در سطح پوست‌شان باشد.^{۳،۱۸} نتایج تحقیق حاضر با نتایج گزارشات Goroya که روی اثرات ضد میکروبی عصاره پوستی

رده سلولی K562 استفاده شد) شارژ مثبت دارند. بنابراین ترکیبات ضد میکروبی 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.^{۲۳،۲۴} نتایج آزمایشات ضد میکروبی 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 احتمالاً 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 ضد میکروبی 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 ۵۱۵۹۳۸۷۰۸۰۹۰۹۰۷ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن اجرا شده است. هم‌چنین از پروفیسور Conlon جهت مشاوره علمی این پروژه کمال تشکر را داریم.

باشد. هم‌چنان که عصاره پوستی رانا ریدیباندا اثرات ضد میکروبی قابل قبولی دارد و نابودی سلول‌های انسانی نیز در کم‌ترین حد ممکن بود. آزمایشات تعیین سمیت سلولی نشان داد، درجه سمیت ترکیب ضد میکروبی در عصاره پوستی رانا ریدیباندا برای رده سلولی انسانی K562 بسیار پایین بود و همانند ترکیب ضد میکروبی Esculentin-1C و Brevenin-1Eb حاصل از *Rana esculenta* و *Rana pipiens* حدود ۹۵٪ سلول‌ها زنده ماندند.^{۱۲،۱۵،۲۰} 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 ضد میکروبی 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.^{۲۱،۲۲} سوالی که مطرح است این است که چگونه غشای سلولی پستانداران در برابر عملکرد آن‌ها مصون می‌ماند 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

References

- 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.
- 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.
- Balouch M, Kammi HG. Iranian Amphibians. Tehtan University Press; 2005. p. 20-5. [Persian]
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Conlon JM, Al-Ghaferi N, Abraham B, Jiansheng H, Cosette P, Leprince J, et al. Antimicrobial peptides from diverse families

- 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, Sahn 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.

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

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

Abstract

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.*

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 cytotoxic 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 *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant and -susceptible *Enterococcus fecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* 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. aeruginosa* 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.

* 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