

## ارزیابی خواص ضد کاندیدیایی پپتیدهای کاتیونیک پوست قورباغه مردابی ایران (*Rana ridibunda*)

احمد عرفان منش<sup>۱،۴</sup> حجت اله شکری<sup>۲</sup> جلال حسن<sup>۳</sup> دنیا نیک آیین<sup>۱،۴</sup> ثریا غریبی<sup>۱</sup> علیرضا باهنر<sup>۵</sup> علیرضا خسروی<sup>۴\*</sup>

(۱) جهاد دانشگاهی واحد تهران، دانشگاه تهران، تهران-ایران

(۲) دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل-ایران

(۳) مرکز تحقیقات سم شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(۴) مرکز تحقیقات قارچ شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(۵) گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(دریافت مقاله: ۱۱ بهمن ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۱۵ فروردین ماه ۱۳۹۴)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** پپتیدهای ضد میکروبی به طور معمول نسبتاً کوتاه (۱۲ تا ۱۰۰ آمینو اسید) با بار مثبت (بار خالص (+۹) - (+۲)) و آمفی فیلیک هستند که از بسیاری از موجودات زنده جدا شده‌اند. چنین پپتیدهایی اخیراً به عنوان یک جزئی از پاسخ ایمنی ذاتی با خاصیت ضد میکروبی وسیع شناسایی شده‌اند. امروزه بیش از ۵۰۰ نوع پپتید ضد میکروبی با منشأ غدد پوست دوزیستان گزارش شده است. **هدف:** مطالعه حاضر به بررسی اثر ضد قارچی پپتیدهای جدا شده از پوست قورباغه بر روی مخمرهای تحت مطالعه پرداخته است. **روش کار:** در این مطالعه پپتیدهای پوست قورباغه با روش الکل اسید استخراج شده و پس از خالص سازی با ستون Sep-Pack و سفادکس، اثر ممانعت از رشد تنها فراکشن بدست آمده از آن در غلظت‌های مختلف (۰/۲-۱۰۰ µg/mL) با روش میکرودايلوشن بر روی ۹ سوش مخمري از گونه‌های کاندیدا آلبیکس حساس به فلوکونازول، کاندیدا آلبیکس مقاوم به فلوکونازول و کاندیدا گلابرا<sup>۱</sup> مورد ارزیابی قرار گرفت. **نتایج:** مقایسه آماری نشان داد که بیشترین تأثیر ممانعت از رشد پپتید در غلظت‌های ۲۵ µg/mL، ۵۰ و ۱۰۰ بوده است و پپتیدها کمترین تأثیر ممانعت از رشد را روی کاندیدا آلبیکس مقاوم به فلوکونازول داشته‌اند ( $p > 0/05$ ). **نتیجه گیری نهایی:** مطالعه حاضر اثر ضد کاندیدیایی پپتیدهای کاتیونیک پوست قورباغه را تأیید می‌نماید.

**واژه‌های کلیدی:** پپتید کاتیونیک، قورباغه مردابی ایران، کاندیدا آلبیکس، کاندیدا گلابرا<sup>۱</sup>، فلوکونازول

### مقدمه

به شمار می‌رود. این پپتیدهای فعال زیستی به صورت هولوکیرین در اثر استرس یا آسیب و به منظور حفاظت علیه تهاجم میکروارگانیسم‌های پاتوژن به ترشحات پوست آزاد می‌شوند (۱۵، ۱۰). پپتیدهای ضد میکروبی دوزیستان عموماً به صورت اعضای یک خانواده پپتیدی با ساختار مرتبط تشکیل می‌شوند. امروزه بیش از ۵۰۰ نوع پپتید ضد میکروبی با منشأ غدد پوست دوزیستان گزارش شده است (۹). هدف از این مطالعه جداسازی پپتیدهای کاتیونیک موجود در پوست قورباغه مردابی ایران و مطالعه اثرات ضد کاندیدیایی آنها می‌باشد.

### مواد و روش کار

**تهیه قورباغه:** بر اساس مطالعات انجام شده، قورباغه مردابی بیشترین جمعیت قورباغه‌های ایران را تشکیل می‌دهد. بنابراین در این تحقیق از این گونه استفاده شد. در این راستا ۵۰ قورباغه مردابی از نواحی شمالی کشور جمع آوری و به صورت زنده به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل شد. جنس و گونه قورباغه‌ها توسط آزمایشگاه دکتر فاطمی دانشکده زیست شناسی پردیس علوم دانشگاه تهران تأیید شد.

**عصاره گیری پوست:** قورباغه‌ها با روش استاندارد یعنی غوطه وری در یخ خرد شده بی هوش و بلافاصله به فریزر ۲۰- منتقل شدند. پس از یک روز پوست قورباغه‌ها جدا و مجدداً به فریزر ۲۰- منتقل شدند. این پوست‌ها

امروزه ظهور سندرم‌های نقص ایمنی، افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در میان میکروارگانیسم‌های پاتوژن از نگرانی‌های متداول در علوم زیستی است (۱۸)؛ این مسئله موجب تلاش برای کشف و به کارگیری داروهای جدید از ترکیبات طبیعی شده است که علاوه بر اثرات جانبی کمتر دارای خواص تحریک یا تعدیل کنندگی سیستم ایمنی در درمان بیماریهای عفونی خصوصاً بیماریهای نوظهور قارچی هستند (۱۳).

پپتیدهای ضد میکروبی، توسط گونه‌های مختلف جانداران از میکروارگانیسم‌های تک هسته‌ای تا پستانداران تولید می‌شوند. برای این پپتیدها عملکردهای متفاوتی از جمله اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی، ویروس کشی و ضد توموری بیان شده است (۸، ۲، ۱). از نظر بیوشیمیایی این پپتیدها دارای توالی‌های نسبتاً کوتاهی با ۱۲-۱۰ اسید آمینه، بار مثبت (بار خالص (+۹) - (+۲)) و آمفی فیلیک هستند. در نیم قرن اخیر، صدها نوع از چنین پپتیدهایی شناسایی شده و مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۷). پپتیدهای کاتیونیک علاوه بر اثرات ضد میکروبی، نقش مهمی در دفاع ذاتی علیه پاتوژن‌های مهاجم دارند (۳).

سنتز پپتیدهای با خاصیت ضد میکروبی وسیع الطیف در غدد گرانولار موجود در پوست دوزیستان از استراتژی‌های مهم دفاعی این مهره داران



پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. سپس سریال رقت دوتایی پیتید از  $100 \mu\text{g/mL}$  تا  $0.25 \mu\text{g/mL}$  تهیه گردید.  $100 \mu\text{L}$  سوسپانسیون مخمری حاوی  $5 \times 10^4$  سلول مخمری به گوده‌های ۱ تا ۱۱ اضافه شد. گوده ۱۱ به عنوان کنترل مثبت و گوده ۱۲ به عنوان کنترل منفی قرار داده شدند. رقت‌های سریال فلوکونازول به عنوان داروی شاهد و پیتید بدون مخمر به عنوان شاهد پیتید در نظر گرفته شدند. تمامی مراحل آزمایش در ۳ تکرار انجام شد.

جهت به دست آوردن منحنی رشد هر تیمار و تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی پیتید، جذب نوری پلیت‌ها توسط دستگاه الیزاریدر در طول موج  $620 \text{ nm}$  در ساعت صفر و سپس به فواصل یک ساعته تا ساعت ۲۴ خوانده شد. بر اساس این جذب‌ها منحنی رشد هر سوش رسم گردید.

**آنالیز آماری:** داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS۱۷ و تست‌های آماری  $\text{kruskal-wallis}$  و  $\text{Mann-whitney}$  آنالیز گردید. برای مقایسه آماری اطلاعات بدست آمده در این بررسی، میانگین جذب نوری فاز ایستایی هر تیمار نسبت به منحنی استاندارد خودش محاسبه شد. غلظت‌های مورد مطالعه براساس منحنی رشد به چهار گروه تقسیم گردید؛ گروه ۱: غلظت‌های  $100 \mu\text{g/mL}$ ،  $50$  و  $25$  گروه ۲:  $12.5 \mu\text{g/mL}$  و  $6.25$ ، گروه ۳:  $3.75 \mu\text{g/mL}$ ،  $1.875$  و  $0.9375$ ، گروه ۴: غلظت‌های  $0.46875 \mu\text{g/mL}$  و  $0.234375 \mu\text{g/mL}$ . سطح معنی‌داری کوچک تر از  $0.05$  در نظر گرفته شد.

## نتایج

**جداسازی و اندازه گیری پیتیدها:** اندازه گیری پیتید فراکشن‌های عبور داده شده از ستون سفادکس به روش برادفورد نشان دهنده حضور چند پیتید با وزن مولکولی نزدیک به هم می‌باشد. نتایج الکتروفورز  $\text{Tricin SDS-PAGE}$  نشان داد که پس از عبور نمونه از ژل و رنگ آمیزی، حداقل سه باند پروتئینی با وزن مولکولی کمتر از  $15 \text{ kDa}$  قابل مشاهده است.

**ارزیابی رشد سوش‌های مورد مطالعه در حضور غلظت‌های مختلف پیتید:** مقایسه آماری اثر هر غلظت در سوش‌های تحت بررسی نشان داد که به جز غلظت  $3.75 \mu\text{g/mL}$  و  $25 \mu\text{g/mL}$  گونه‌های کاندیدا گلابرانا و کاندیدا آیبیکس حساس، بین تمامی گونه‌ها اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد و بیشترین رشد مربوط به کاندیدا آیبیکس مقاوم است ( $p > 0.05$ ).

بررسی منحنی رشد سوش‌ها در مواجهه با غلظت‌های مختلف پیتید نشان داد که کمترین رشد در سه غلظت گروه یک بوده است. در کاندیدا آیبیکس مقاوم غلظت‌های  $6.25 \mu\text{g/mL}$  و پایین تر نه تنها کاهش رشدی دیده نشد بلکه افزایش رشد هم مشاهده گردید ( $p < 0.05$ )، نتایج در نمودار ۱ نشان داده شده است.

مقایسه آماری تأثیر غلظت‌های مختلف پیتید بر رشد هر یک از سوش‌ها نشان داد که گروه ۱ (غلظت‌های  $100 \mu\text{g/mL}$  و  $50$ ) در هر سه سوش ممانعت از رشد معنی‌داری در مقایسه با بقیه گروه‌ها دارد ( $p > 0.05$ ). در کاندیدا آیبیکس حساس در حالی که گروه ۲ و ۳ (غلظت‌های  $12.5 \mu\text{g/mL}$

جهت عصاره گیری مورد استفاده قرار گرفتند. عصاره‌گیری با استفاده از روش Goraya و همکاران در سال ۲۰۰۰ با اندکی تغییرات انجام شد (۶). به طور خلاصه،  $40 \text{ g}$  پوست با کمک ازت مایع، چند بار منجمد و ذوب گردید، سپس بوسیله هموژنایزر خرد شد. این پوست‌ها در محلول اتانول واسید کلریدریک  $0.7 \text{ M}$  (به نسبت  $1:7$ ) در دمای  $0^\circ\text{C}$  مخلوط شد. پس از ۲ ساعت هم زدن مخلوط حاصل با کمک همزن مغناطیسی در دمای  $0^\circ\text{C}$ ، مخلوط حاصل در  $400 \text{ g}$  به مدت  $30 \text{ min}$  در دمای  $4^\circ\text{C}$  سانتریفیوژ شد. اتانول موجود در مایع فوقانی در فشار پایین تبخیر شده و بعد از یک مرحله سانتریفیوژ مجدد در همان شرایط، عصاره حاصل به درون ستون Sep-Pack C18 با سرعت جریان  $2 \text{ mL/min}$  پمپ شد. مواد باند شده به ستون با کمک محلول استونیتریل/آب/تری فلورواستیک اسید (TFA) (به نسبت  $70:29:1$ ) شسته و لیوفیلیزه گردید. پودر حاصل تا زمان استفاده در فریزر  $-20$  - نگهداری شد.

**استحصال پیتیدهای کاتیونیک با کمک ستون سفادکس:** برای جداسازی فراکشن‌های مختلف بر اساس وزن مولکولی شان کروماتوگرافی با استفاده از ستون سفادکس  $250 \text{ G}$  به ابعاد  $6.2 \times 100 \text{ cm}$  انجام شد. بدین منظور پودر به دست آمده از مرحله قبل در  $5 \text{ mL}$  محلول TFA  $1\%$  حل شد. ستون با کمک اسید استیک  $1 \text{ M}$  اشباع گردید و جریان TFA  $1\%$  با سرعت  $2 \text{ mL/min}$  در ستون برقرار گردید. پس از شستشوی کامل ستون با محلول TFA  $1\%$ ، نمونه پیتید به ستون تزریق گردید. فراکشن‌ها پس از  $3 \text{ min}$  در حجم  $1 \text{ mL}$  جمع آوری شدند.

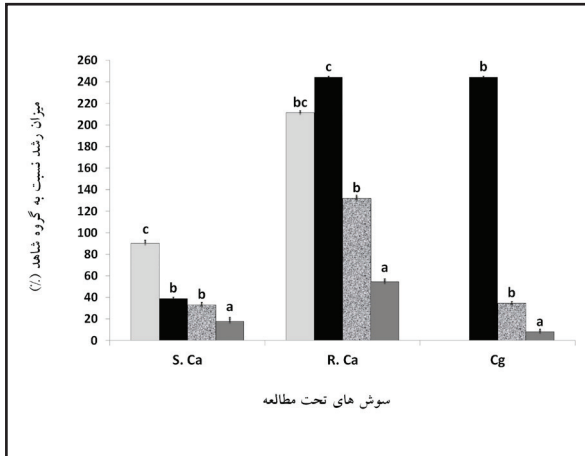
**اندازه گیری پروتئین نمونه به روش برادفورد:** برای اندازه گیری میزان پروتئین هر فراکشن با معرف برادفورد میزان جذب اسپکتروفتومتر در طول موج  $595 \text{ nm}$  قرائت گردید. میزان پروتئین هر فراکشن با استفاده از معادله خط منحنی استاندارد محاسبه شد.

**Tricin SDS-PAGE:** با استفاده از روش  $\text{Tricin SDS-PAGE}$  با ژل جدا کننده  $16.5\%$  الگوی وزن مولکولی پیتیدهای موجود در فراکشن حاصل مورد بررسی قرار گرفت. جهت آشکار شدن باندهای پروتئینی، ژل یک مرحله در محلول گلو تار آلیدیید  $2.5\%$  تثبیت شده سپس با کوماسی بریلینت بلو جی رنگ آمیزی شدند. وزن باندهای مارکر استفاده شده در این نمونه گذاری بین  $180 - 10 \text{ kDa}$  بود.

**تهیه سوش‌های مخمری:** ۹ سوش نگهداری شده در آب مقطر، از گونه‌های کاندیدا آیبیکس مقاوم و حساس به فلوکونازول و کاندیدا گلابرانا (برای هر گونه سه سوش) از مرکز تحقیقات قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه و بر روی محیط SC در دمای  $30^\circ\text{C}$  کشت داده شد.

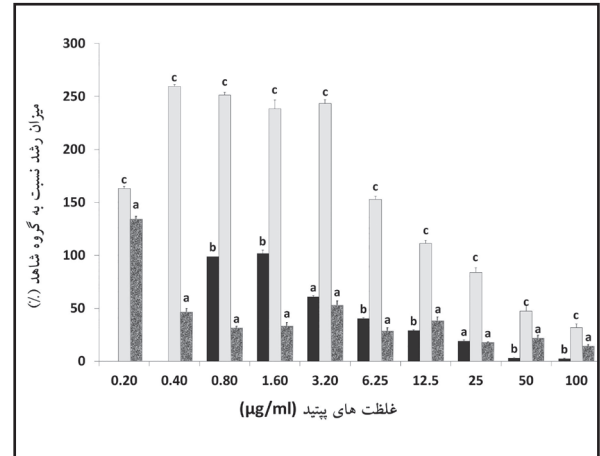
**اندازه گیری حداقل غلظت مهار کنندگی پیتیدها:** حداقل غلظت مهار کنندگی با استفاده از روش میکرودیالوژن استاندارد CLSI با اندکی تغییر اندازه گرفته شد. به طور خلاصه،  $100 \mu\text{L}$  محیط RPMI  $1640$  در گوده‌های



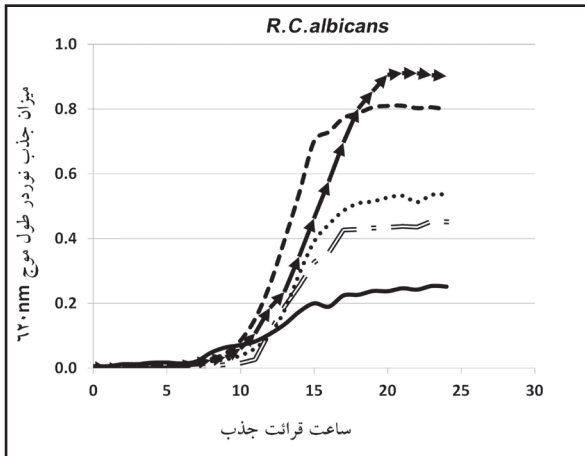


نمودار ۲. مقایسه آماری تأثیر غلظت‌های مختلف پپتید بر رشد سوش‌های تحت مطالعه کاندیدا آلبیکس حساس (S.C.a)، کاندیدا آلبیکس مقاوم (R.C.a) و کاندیدا گلابرا (C.g). (حروف متفاوت بیانگر معنی داری اثر گروه‌های غلظتی مختلف پپتید تحت بررسی است).

Group 1 ■ Group 2 □ Group 3 ▨ Group 4 ◼



نمودار ۱. مقایسه آماری غلظت‌های مختلف پپتید کاتیونیک در سه سوش کاندیدا آلبیکس حساس (S.C.a)، کاندیدا آلبیکس مقاوم (R.C.a) و کاندیدا گلابرا (C.g). (حروف متفاوت بیانگر معنی داری اثر غلظت‌های مختلف پپتیدها بین سوش‌های تحت بررسی است). S. Ca ■ R.C.a □ C.g



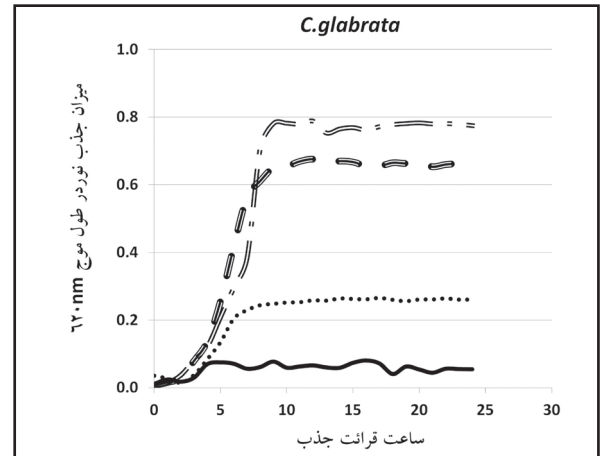
نمودار ۴. منحنی رشد کاندیدا آلبیکس مقاوم در حضور مقادیر مختلف پپتید کاتیونیک در طی ۲۴ ساعت.

Group 1 — Group 2 ..... Group 3 --- Group 4 → C+ =

تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی عوامل پاتوژن است (۵). از آنجایی که یافتن داروهای ضد قارچی جدید به دلیل یوکاریوت بودن قارچ‌ها با مشکل مواجه است و از طرفی با بروز سندرم‌های نقص ایمنی، عفونت‌های قارچی تهاجمی رو به افزایش است (۱۷)، پپتیدهای کاتیونیک به دلیل ساختار طبیعی و عملکرد متفاوتشان می‌توانند نقطه قوتی در درمان بیماریهای قارچی باشند.

در مطالعه حاضر، اثر پپتیدهای کاتیونیک به دست آمده از پوست قورباغه مردابی ایران بر منحنی رشد سوش‌های کاندیدا آلبیکس حساس و مقاوم به فلوکونازول و کاندیدا گلابرا مطالعه گردید. با استفاده از روش Tricin SDS-PAGE پپتیدهای حاصل از تنها فرکشن پوست قورباغه‌های مردابی ایران مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل بیانگر حضور حداقل سه پپتید با وزن مولکولی کمتر از ۱۵ kDa بود.

سنتز پلی‌پپتیدهایی با خاصیت ضد میکروبی وسیع الطیف در غدد



نمودار ۳. منحنی رشد کاندیدا گلابرا در حضور مقادیر مختلف پپتید کاتیونیک در طی ۲۴ ساعت.

Group 1 — Group 2 ..... Group 3 --- C+ =

نمودار ۳/۲ و ۳/۱ تفاوت معنی داری از نظر تأثیر بر رشد نداشتند ( $p < 0.05$ ) تفاوت این دو گروه با گروه ۱ و ۴ (غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۲) معنی دار است ( $p > 0.05$ ). در کاندیدا آلبیکس مقاوم، گروه ۴ با گروه ۲ و ۳ اختلاف آماری معنی داری ندارد ( $p < 0.05$ )، ولی در سایر غلظت‌ها این اختلاف از نظر آماری معنی دار است ( $p > 0.05$ ). در کاندیدا گلابرا همه گروه‌ها در مقایسه با یکدیگر تفاوت معنی داری از نظر تأثیر بر رشد دارند ( $p > 0.05$ ). نتایج در نمودار ۲ نشان داده شده است. علاوه بر این اثر ممانعتی پپتیدها بر منحنی رشد در سه نمودار ۳، ۴ و ۵ ارائه شده است.

### بحث

پپتیدهای کاتیونیک، مواد آنتی باکتریال طبیعی و بخش مهمی از دفاع ذاتی در تمامی گونه‌های جانوران هستند؛ مهم‌ترین عملکرد آنها ایجاد



و کارهای عمل فلوکونازول بر روی سلول‌های قارچی باشد. همانگونه که مشخص گردیده داروهای گروه آزول و ایمیدازول‌ها از سنتز ارگوسترول در دیواره سلولی قارچ‌ها ممانعت کرده و نفوذپذیری قارچ را افزایش می‌دهند (۱۲). مطالعه حاضر می‌تواند مقدمه‌ای جهت مطالعات آینده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و روش‌های مولکولی باشد تا بدرستی مکانیسم اثر این پپتیدها و اثر ممانعتی آنها روشن شود.

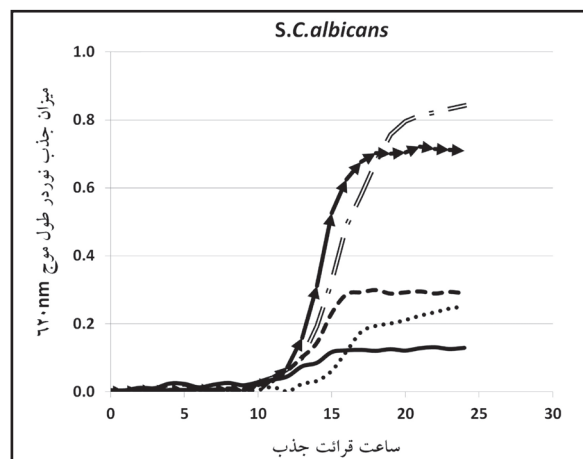
همه مطالعات بر روی پپتیدهای پوست قورباغه نشان دهنده پایین بودن وزن مولکولی آنها می‌باشد چنانکه Rollin-Smith و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که ده پپتید جداشده از پوست قورباغه‌های *Ranida* می‌توانند به طور مؤثری از رشد و اسپورزایی قارچ‌های خانواده چیتریده ممانعت کنند (۱۶). علاوه بر این، پپتیدهای دیگری نیز از پوست گونه‌های مختلف قورباغه شناسایی شده‌اند که خاصیت ضد قارچی علیه کاندیدا آلیکنس داشته‌اند (۱۱، ۴). اختلاف در نتایج بدست آمده در ارتباط با اثرات ضد میکروبی این پپتیدها می‌تواند ناشی از نوع قورباغه، روش استحصال پپتید و فرآکن‌های استفاده شده باشد. در مجموع نتایج این تحقیق بیانگر اثرات ضد کاندیدایی پپتیدهای حاصله می‌باشد و برخلاف اجزای طبیعی دیگر مثل اسانس‌های گیاهی میزان اثر این پپتیدها بر کاندیداهای حساس و مقاوم به فلوکونازول یکسان نیست و چگونگی این پدیده نیاز به بررسی‌های مفصل دیگری در آینده دارد. با توجه به وزن مولکولی پایین این پپتیدها به نظر می‌رسد که با کوژوگه کردن این مواد ضد میکروبی با برخی از مواد طبیعی مثل توکسوئید کزاز بتوان اثرات مفیدتری از این اجزا بدست آورد. این مطالعه بایستی جهت جداسازی کامل پپتیدها از یکدیگر و همچنین ارزیابی کارایی هر یک از آنها در کاهش رشد سویه‌های مختلف قارچی بخصوص قارچ‌های آیزی مثل ساپروولگنیا در آینده ادامه یابد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام شده و مؤلفین مراتب قدردانی و تشکر خود را از این معاونت اعلام می‌دارند.

### References

1. Bechinger, B. (1997) Structure and function of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J Membr Biol.* 156: 197-211.
2. Boman, H.G. (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Ann Rev Immunol.* 13: 61-92.
3. Conlon, J.M. (2011) The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. *Cell Tissue Res.* 343: 201-212.



نمودار ۵. منحنی رشد کاندیدا آلیکنس حساس در حضور مقادیر مختلف پپتید کاتیونیک در طی ۲۴ ساعت.

Group 1 — Group 2 ..... Group 3 - - - - Group 4 - - - - C+ —>

گرانولار موجود در پوست قورباغه و وزغ (anurans) ویژگی مهمی از استراتژی دفاعی این مهره داران است. این پپتیدهای فعال زیستی به صورت هولوکترین در اثر استرس یا آسیب و حفاظت علیه تهاجم میکروارگانسیم‌های پاتوژن به ترشحات پوست آزاد می‌شوند (۱۵، ۱۰). پپتیدهای ضد میکروبی دوزیستان اغلب به صورت اعضای یک خانواده پپتیدی با ساختار مرتبط ساخته می‌شوند. امروزه بیش از ۵۰۰ نوع پپتید ضد میکروبی با منشأ غدد پوست دوزیستان شناسایی شده است (۹).

در مطالعه حاضر بنا شد که خاصیت ضد قارچی احتمالی این پپتیدها با استفاده از سوش‌های حساس و مقاوم به فلوکونازول کاندیدا آلیکنس و کاندیدا گلابراتا مورد ارزیابی قرار گیرد. کاندیدا آلیکنس شایع ترین عامل برفک دهان و کاندیدایازیس سیستمیک در افراد HIV<sup>+</sup>، مبتلایان به ایدز و بدخیمی‌های خونی می‌باشد. کاندیدا گلابراتا یکی از عوامل پاتوژن مهم عفونت‌های بیمارستانی است که مقاومت اولیه یا مقاومت در حین درمان با دارو در آن شایع می‌باشد (۱۹). در این بررسی که از غلظت‌های متفاوت این پپتیدها (۱۰۰-۰/۲۱ μg/mL) استفاده شد مشخص گردید که درصد رشد فاز ایستایی در مقایسه با گروه شاهد در جدایه‌های آلیکنس در غلظت‌های متفاوت اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد، بدین معنی که با افزایش غلظت پپتیدها رشد کاندیدا بیشتر مهار می‌شود. همچنین جز در غلظت‌های ۲/۲ و ۲۵ μg/mL که اختلاف معنی‌داری بین رشد سوش‌های کاندیدا گلابراتا و کاندیدا آلیکنس حساس مشاهده نشد در بقیه موارد اختلاف معنی‌داری بین رشد سوش‌ها در هر یک از غلظت‌ها وجود داشت. نکته قابل توجه اینکه سوش‌های مقاوم به فلوکونازول روند منطقی و نسبتاً هماهنگی را در مقاومت به پپتیدها نشان دادند. این نکته فوق العاده دارای اهمیت می‌باشد زیرا بر اساس مطالعات قبلی که با استفاده از اسانس‌های گیاهی انجام گرفت، این اسانس‌ها و مواد طبیعی اثرات یکسانی بر روی جدایه‌های مقاوم و حساس داشتند (۱۴). این مسئله تأیید کننده این فرضیه است که احتمالاً پپتیدهای حاصله، مکانیسم اثرشان باید خیلی شبیه به ساز



4. Conlon, J.M., Sonnevend, A., Patel, M., Davidson, C., Nielsen, P.F., Pal, T., Rollins-Smith, L.A. (2003) Isolation of peptides of the brevinin-1 family with potent candidacidal activity from the skin secretions of the frog *Rana boylei*. *J Pept Res.* 62: 207-213.
5. Findlay, B., Zhanel, G.G., Schweizer, F. (2010) Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold. *Antimicrob Agents chemother.* 54: 4049-4058.
6. Goraya, J., Wang, Y., Li, Z., O'Flaherty, M., Knoop, F.C., Platz, J.E., Conlon, J.M. (2000) Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American frogs *Rana luteiventris*, *Rana berlandieri* and *Rana pipien*. *Eur J Biochem.* 267: 894-900.
7. Hancock, R.E., Chapple, D.S. (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 1317-1323.
8. Hancock, R.E., Lehrer, R. (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16: 82-88.
9. Jenssen, H., Hamill, P., Hancock R.E. (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 19: 491-511.
10. Lazarus, L.H., Attila, M. (1993) The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. *Prog Neurobiol.* 41: 473-507.
11. Lu, Z., Zhai, L., Wang, H., Che, Q., Wang, D., Feng, F., Zhao, Z., Yu, H. (2010) Novel families of antimicrobial peptides with multiple functions from skin of Xizang plateau frog, *Nanorana parkeri*. *Biochimie.* 92:475-481.
12. Maebeshi, K., Niimi, M., Kudoh, M., Fischer, F.J., Makimura, K., Niimi, K., Piper, R.J., Uchida, K., Arisawa, M., Cannon, R.D., Yamaguchi, H. (2001) Mechanisms of fluconazole resistance in *Candida albicans* isolates from Japanese AIDS patients. *J Antimicrob Chemother.* 47: 527- 536.
13. Mulvey, M.R., Simor, A.E. (2009) Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? *CMAJ.* 180: 408-415.
14. Naeini, A., Khosravi, A.R., Chitsaz, M., Shokri, H. Kamlnejad, M. (2009) Anti-*Candida albicans* activity of some Iranian plants used in traditional medicine. *J Mycol Med.* 19: 168-172.
15. Nicolas, P., Mor, A. (1995) Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Ann Rev Microbiol.* 49: 277-304.
16. Rollins-Smith, L.A., Carey, C., Longcore, J., Dorsam, J.K., Boutte, A., Bruzgal, J.E., Conlon, J.M. (2002) Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. *Dev Comp Immunol.* 26: 471-479.
17. Seneviratne, C.J., Jin, L.J., Samaranyake, Y.H., Samaranyake, L.P. (2008) Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 3259-3266.
18. Song, J.H. (2008) What's new on the antimicrobial horizon? *Int J Antimicrob Agents.* 32: S207-S213.
19. Yarfani, R., Khosravi, A.R., Shokri, H. (2010) The antifungal activity of Iranian propolis samples against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains isolated from HIV+ patients with oropharyngeal candidiasis. *J Apiprod Apimed Sci.* 2: 160-165.





## Evaluation of anti-Candida properties of cationic peptides derived from *Rana ridibunda* skin

Erfanmanesh, A.<sup>1,4</sup>, Shokri, H.<sup>2</sup>, Hassan, J.<sup>3</sup>, Nikaein, D.<sup>1,4</sup>, Gharibi, S.<sup>1</sup>, Bahonar, A.R.<sup>5</sup>, Khosravi, A.R.<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Academic Center of Education, Culture and Research (ACECR), Tehran-Iran

<sup>2</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of special Modern Technologies, Amol-Iran

<sup>3</sup>Department of Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

<sup>4</sup>Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

<sup>5</sup>Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

(Received 31 January 2014, Accepted 4 April 2015)

### Abstract:

**BACKGROUND:** Antimicrobial peptides with relative length (2-100 amino acids) and positive charge (pure charge (+9)-(2)) are amphiphilic that isolated from a wide range of animals. Recently, these peptides have been known as a part of innate immune response. Nowadays, more than 500 antimicrobial peptides from animals have been reported. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to evaluate the anti-Candida effects of cationic peptides derived from *Rana ridibunda* skin. **METHODS:** In this study, using alcohol-acid technique, peptides of frog's skin were isolated and purified by Sep-Pack and Sephadex column. Then the anti-Candida activity (Fluconazole Resistance *C. albicans*, Fluconazole Sensitive *C. albicans*, and *C. glabrata*) of the peptides in different concentrations were evaluated. **RESULTS:** Regarding to statistical analysis, peptides in concentration ranging from 25 to 100 µg/ml had the most anti-Candida activities. In respect to different under-study Candida species, these agents had the less effect on the Fluconazole Resistance *C. albicans* ( $p < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** The anti-Candida effects of cationic peptide obtained from frog skin are approved in this study.

**Keyword:** cationic peptides, *Rana ridibunda*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, fluconazole

### Figure Legends and Table Captions

**Graph 1.** Effect of different concentrations of Cationic peptides on fluconazole-sensitive (SC.a) and resistant (RC.a) *Candida albicans* and *Candida glabrata* strains. (\*) Unidentical letters represents significance.

**Graph 2.** Effect of different concentrations of peptides on growth of fluconazole-sensitive (SC.a) and resistant (RC.a) *Candida albicans* and *Candida glabrata* strains. (\*) Unidentical letters represents significance.

**Graph 3.** *Candida glabrata* growth curve in the presence of peptides during 24hrs.

**Graph 4.** Resistant *Candida albicans* growth curve in the presence of peptides during 24hrs is shown.

**Graph 5.** Sensitive *Candida albicans* growth curve in the presence of peptides during 24hrs is shown.

\*Corresponding author's email: khosravi@ut.ac.ir, Tel: 021-61117099, Fax: 021-66933222

