

اللَّهُ
الرَّحْمَنُ الرَّحِيمُ

۱۵۵۵۴

دانشگاه تهران
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه :

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم سلولی و مولکولی

موضوع :

پپتیدهای ضد میکروبی پوست برخی از قورباغه های ایران

به راهنمایی :

استادارجمند سرکار خانم دکتر راضیه یزدان پرست

نگارش :

مهدخت حسین عقدائی

تیرماه ۱۳۷۰

تقدیم به :

پدر و مادر عزیزم که پیشرفت خود را در زندگی مدیون
زحمات ، گذشت و فداکاریهای بیدریغ و ارزشمند
آنها میدانم .

تقدیم به :

انسانهای صبور و اندیشمندی که در راه درک نشانه های
آفرینش و حکمت آنکه به عالم بیجان هستی بخشیدند
در کمال شکیبائی تلاش می کنند .

کارهای تحقیقاتی این پایان نامه در مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک
دانشگاه تهران انجام گرفته است.

بانهایت قدر دانی از:

سرکار خانم دکتر راضیه یزدان پرست استاد ارجمند مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران که مسئولیت راهنمایی اینجانب را در راه تدوین این پایان نامه بعهدہ داشته‌اند و همواره در جهت پیشرفت و بر طرف نمودن نقاط ضعف علمی موجود، از هیچگونه مساعدت و کوشش دریغ ننموده و مرا همواره به تدبر و تعقل منطقی و عمیق در زمینه‌های علمی تشویق نموده‌اند.

با تشکر از:

جناب آقای دکتر حمید فهیمی استاد گرامی دانشکده علوم دانشگاه تهران که در طول گذران این تز از راهنماییها و همکاری ایشان برخوردار بوده‌ام و به عنوان استاد مشاور در برطرف ساختن ایرادات متن پایان نامه حداکثر کوشش را مبذول داشته و زحمت قضاوت این پایان نامه رابعهدہ داشته‌اند.

باسپاس از:

جناب آقای دکتر محمد بلوچ استاد محترم دانشکده علوم دانشگاه تهران که همواره از راهنماییهای علمی ایشان برخوردار بوده و در سمت مشاور و داور علاوه بر قبول زحمت تصحیح پایان نامه قضاوت این پایان نامه رابعهدہ داشته‌اند.

باتشکر از :

آقای قوجق، خانم میرزاوی و سایر اعضای گروه پژوهشی آزمایشگاه خانم دکتر یزدان پرست که با همکاری خود در آزمایشگاه موجب پیشرفت کار من بوده‌اند.

کادر آموزشی، اداری، فنی، خدمات و نگرهبانی مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران

خانم اسدی و آقای معارفی نژاد بخاطر خدمات کتابخانه‌ای
آقای اختریان بخاطر ترسیم منحنی‌ها
آقای سلیمانی بخاطر همکاری در امور تکثیر
آقای فلاح بخاطر تهیه عکس‌ها و اسلایدها
آقای علیپور و کارکنان فضای سبز پارک لاله تهران و دانشگاه تهران
خانم مریم چگینی بخاطر تایپ متن پایان نامه

"فهرست مطالب"

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۱ - ۲	خلاصه فارسی <u>مقدمه</u> دوزیستان
۳ - ۱۰	خصوصیات مورفولوژیک راسته‌های مختلف دوزیستان
۱۰	خون دوزیستان
۱۰	تنفس دوزیستان
۱۱ - ۲۳	نقش پوست در دوزیستان
۲۴ - ۲۵	ترکیبات موجود در پوست
۲۵ - ۴۵	بپتیدهای موجود در پوست
۴۵ - ۴۸	سیستماتیک قورباغه‌های ایران
۴۵	هدف از انجام کار
	<u>مواد و روشها :</u>
۴۹ - ۵۲	الف - مواد
۵۲ - ۶۱	ب - روشها
۶۲ - ۱۱۲	نتایج
۱۱۳ - ۱۱۷	بحث
۱۱۸ - ۱۱۹	خلاصه انگلیسی
۱۲۰ - ۱۳۴	منابع

به نام خدا

خلاصه فارسی

از مجموعه تحقیقات پنجاه ساله محققین چنین بر می آید که پوست قورباغه ها منبع خارق العاده ای از نظر پپتیدهای مهم بیولوژیکی است که بویژه از نظر وفور، تنوع فعالیت و نیز تشابه به ترکیباتی از منابع پستانداران حائز اهمیت فوق العاده می باشد. شاید بدین دلیل بتوان قورباغه ها را مدل مناسبی جهت دستیابی به ترکیبات جدید بیولوژیکی از منابع جانوری دانست. برخی از ترکیبات شناخته شده فیزیولوژیکی از پوست برخی از قورباغه ها به همراه ترکیبات مشابه از منابع جانوری (که در پرانتزها نشان داده شده اند) عبارتند از:

Xenopsin (Neurotensin), Caerulein (Gastrin), Magainin, 1,2 (Cecropins)

قابل ذکر است که تاکنون بیش از ۵۰۰ نوع قورباغه از تمامی قاره ها جهت بررسی ترکیبات بیولوژیکی پوستشان مورد مطالعه قرار گرفته اند. حاصل این مطالعات گسترده نشان می دهد که پراکندگی " نوع و کمیت " این نوع ترکیبات پوست قورباغه ها به وجود عوامل گوناگون جغرافیایی بستگی دارد. بدین معنی که برخی از پپتیدهای مهم بیولوژیکی فقط در برخی از گونه های قورباغه ها یافت می شوند که در یک منطقه جغرافیایی خاص زیست می نمایند. این ارتباط شاید گویای بارز " تاثیر عوامل طبیعت در سیستم حیاتی (بویژه سیستم ژنتیکی) قورباغه ها و سازگار ساختن آنها با عوامل متنوع محیط زیست خود باشد".

جهت بررسی فرضیه فوق، در رساله حاضر مطالعاتی در زمینه پراکندگی " نوع و کمیت " ترکیبات ضد میکروبی پوست برخی از قورباغه های ایران صورت گرفته است. در این مطالعات پتانسیل ضدباکتریایی ترشحات سطح پوست و نیز ترکیبات استخراج شده از پوست قورباغه های Bufo و Rana که از شهرهای تهران و لاهیجان جمع آوری شده اند مورد بررسی قرار گرفته است. نتیجه آزمایشات با استفاده از استخراجهای خام و نیز استخراجهای نیمه خالص شده از قورباغه های

سالم و نیز قورباغه‌هایی که محلولهای *Escherichia coli* بدانها تزریق شده است نشان می‌دهند که ترکیبات حاصل از قورباغه‌های ایران از نظر ساختمانی و از نظر کمیت با ترکیبات گزارش شده توسط آقای دکتر Zuszloff تفاوت داشته و خاصیت ضد باکتریایی ترکیبات قورباغه‌های ایران عمدتاً در ترکیبات پپتیدیست که وزن مولکولی آنها بیش از ۲۰KD می‌باشد. بعلاوه نتایج حاصله نشان می‌دهد که برخلاف گزارشات موجود، ترکیبات فوق در قورباغه‌های ایران قابلیت تشدید از طریق کار برد عوامل مصنوعی (نظیر تزریق قورباغه‌ها با محلولهایی از *E. coli*) را نداشته و اصولاً از نظر کمی بسیار ناچیز می‌باشند. از مطالعه نتایج حاصل بر می‌آید که پپتیدهای شناسایی شده از قورباغه‌های ایران احیاناً به ترکیبات سیستم دفاعی قورباغه‌ها متعلق نبوده و فعالیت باکتریایی آنها حاصل نفوذ پذیری آنها بدرون غشاء سلولی میکروبیها و تداخل با فعالیت حیاتی آنها می‌باشد و طبیعتاً فعالیت‌های دیگر فیزیولوژیکی برای ترکیبات فوق در سیستم حیاتی قورباغه‌ها وجود دارد.

جویبارهای کوچک و زمین های نمناک یافت میشوند. پوست آنها صاف و در برخی مواقع دارای زگیل است (۲).

ب - سمندره‌های فاقدشش : سمندره‌های بدون شش اکثراً " روی زمینی زندگی می‌کنند و تعداد کمی از آنها نیز در آب زیست می‌نمایند . تنفس آنها فقط از راه پوست و پوشش سطح‌دهان صورت می‌گیرد (۲).

ج- نیوت‌ها : از آنجائیکه جانوران بالغ بیشتر مدت عمر خود را در خشکی می‌گذرانند و فقط برای تولید مثل وارد آب می‌شوند، بیشتر شبیه قورباغه‌های بدون دم هستند. سطح بدن آنها مانند سمندرها لیز نیست و پوست خشن تری دارند (۲).

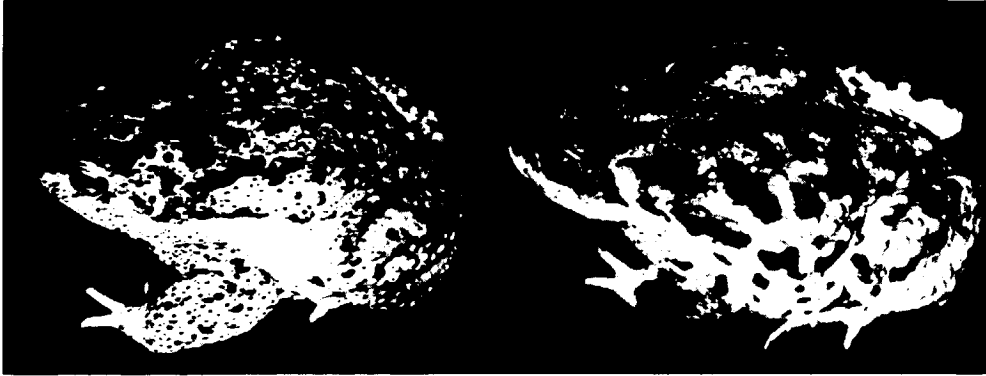
۳- دوزیستان فاقد دم : دوزیستان فاقد دم در اصطلاح علمی آنورا (Anura = در زبان لاتین به مفهوم بدون دم می‌باشد) و یاسالی‌نیتیا (Salientia = در زبان لاتین به معنای جست و خیز است) نامیده میشوند. دوزیستان این گروه از تنوع زیادی برخوردارند . از جمله آنها میتوان قورباغه‌های واقعی (True frog) وزغهای واقعی (True Toad) و قورباغه‌های درختی (Three Frog) را نام برد (۳).

قورباغه‌های واقعی: یکی از تیره‌های قورباغه‌های واقعی ، تیره رانیدی (Ranidae) می‌باشد، که از این خانواده جنس (Genus) رانا (Rana) را میتوان نام برد. این دوزیستان بدنی کشیده ، پا‌های بلند ، کمر باریک و پوست صاف و مرطوب دارند. حرکت آنها بصورت جهشی است . انگشتان دست آزاد و پنجه‌های پای آنها توسط پرده‌ای به یکدیگر متصل می‌باشد. در نرها کیسه‌های صوتی دزکنار گلو به چشم می‌خورد و انتهای انگشت نرهای که در حال تولیدمثل هستند دارای جسم پنبه‌ای (Nuptial Excrescence) می‌باشد (شکل ۱) . بازوی جلوئی نرها بحالت متورم است . قورباغه ماده بزرگتر از قورباغه نر بوده و طول بدن آن ۱/۵ برابر طول بدن جانور نر می‌باشد.

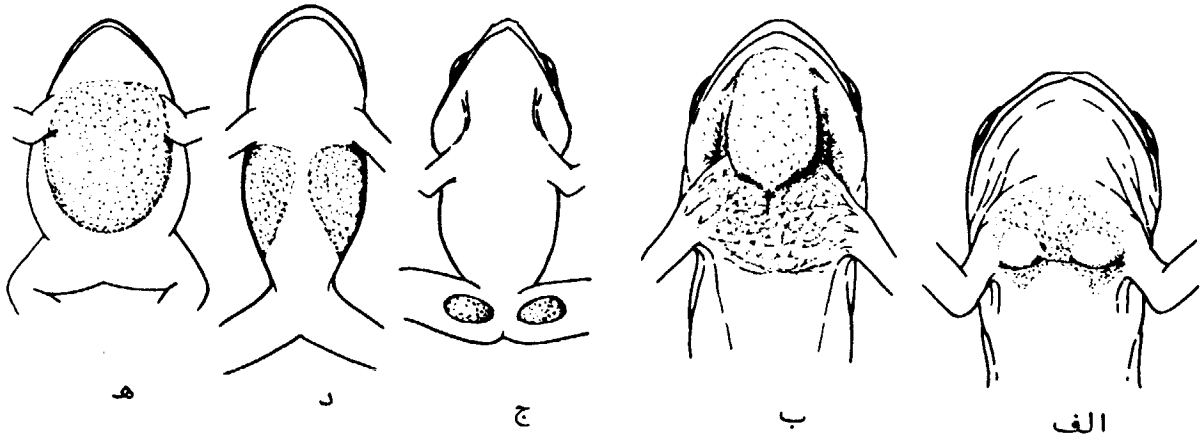
وزغهای واقعی: وزغهای واقعی در اصطلاح علمی True Toad

نامیده میشوند . این دوزیستان دارای غدد پاراتوئید هستند . اعضای حرکتی در جانوران مذکور کوتاه ، پوست خشن وزگیل دار و کمر نسبت به قورباغه های راننا پهن تر است . وزغهای حرکتی شبیه لیلی دارند . ماده ها درشت تر از نرها هستند . نرها کیسه های صوتی و گردن تیره داشته و رنگ پوست براساس تغییر درجه حرارت محیط تغییر می یابد . اکثر این جانوران تمام مدت سال را در نواحی خشک زندگی می کنند و فقط برای تولیدمثل وارد آب میشوند . روی اندام حرکتی جلویی جانور نر جسم پنبه ای وجود دارد (شکل ۱) . اختلافات رنگی ثابتی بین نرهای بالغ و ماده های برخی از گونه های وزغها مشاهده می گردد . علاوه بر این بافت پوست در جانور نر و ماده متفاوت است (شکل ۲) . بعنوان یکی از تیره های مربوط به وزغها بوفونیدی (Bufonidae) را میتوان نام برد ، که جنس بوفو (Bufo) جزء تیره مذکور بشمار می رود .

قورباغه های درختی: قورباغه های درختی دارای اندام حرکتی بلند هستند . انتهای پنجه های پای این قورباغه ها دیسکهای چسبنده دارد که توسط آنها به شاخه ها و تنه درختان می چسبند ولی نمیتوانند تا ارتفاع زیادی از درخت بالا بروند . روی بوته ها ، سبزیجات ، زمین های نمناک چوبی و نقب های داخل زمین زندگی می نمایند . تغییرات رنگ در پوست آنها کاملاً محسوس است و براساس تغییرات نور ، رطوبت ، حرارت و فشار عصبی رنگشان تغییر می کند . نرها کیسه صوتی دارند که در هنگام متورم شدن به شکل بادکنک گردی در زیر گلو نمایان می شود . قورباغه های نر دارای غده های در سطح شکم ، سینه و زنخدان هستند که حاوی ترشحات چسبنده ای است که در امر تولیدمثل موثرند (شکل ۳) . یکی از ویژگیهای دیگر جانور نر وجود جسم پنبه ای می باشد (شکل ۱) . علاوه بر این خارهایی روی اعضای حرکتی قورباغه نر بعضی از گونه های قورباغه درختی وجود دارد که هنگام دفاع مورد استفاده قرار می گیرد (شکل ۵) .

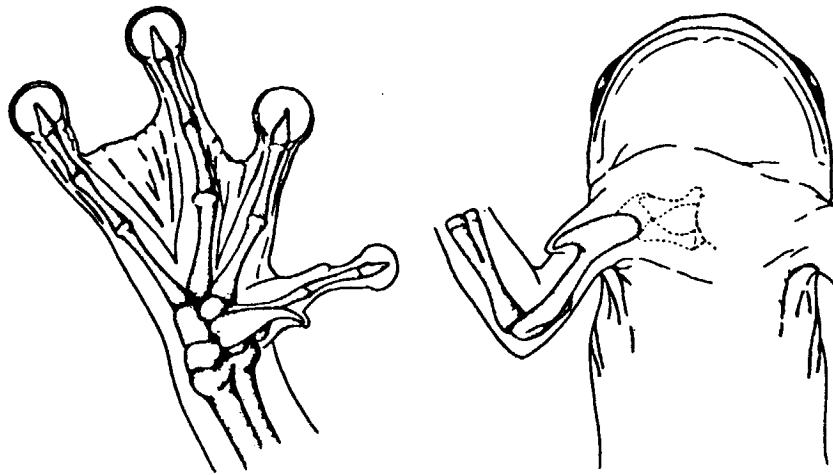


شکل ۲ - تفاوت جنسی در بافت پوست وزغهای نر و ماده از
 جنس و گونه *Bufo spinulosus* (۴).
 سمت چپ : جانور نر
 سمت راست : جانور ماده



شکل ۳- غدد موجود در قورباغه های نر (۴)

- الف - غدد زنخدانی (Mental Gland) قورباغه *Kassina senegalensis*
- ب - غدد سینه‌ای (Pectoral Gland) قورباغه *Leptopelis karissimbensis*
- ج - غدد رانی (Femoral Gland) قورباغه *Mantidactylus pseudoaspens*
- د - غدد شکمی پهلوئی (Ventrolateral Glands) قورباغه *Ptychocheilichthys schmidtorum*
- ه - غدد شکمی (Abdominal Glands) قورباغه *Kaloula . verrucosa*



ب

الف

شکل ۴ - خارهای موجود براندامهای حرکتی جانور نر دوزیستان

فاقددم (Anuran) (۴).

الف - خارهای موجود بر استخوان شانه‌ای قورباغه

(Centrolenella buckleyi)

ب - خارهای موجود در انگشت شست قورباغه درختی

(Hyla rosenbergi)