

ارزیابی اثر مهارى و تخریبی پپتید LL-37 بر بیوفیلیم سویه‌های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادرارى در اصفهان

نرگس سادات مصطفوی دارانی^۱، فاتح رحیمی^۲، علی قاسمی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پپتید ضد میکروبی کاتالسیسین انسانی LL-37، به عنوان بخشی از سیستم ایمنی ذاتی میزبان، قادر به مقابله با بیوفیلیم‌های باکتریایی می‌باشد. این مطالعه با هدف ارزیابی تأثیر غلظت‌های sub-MIC کاتالسیسین LL-37 بر بیوفیلیم سویه‌های بالینی *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران در اصفهان در سال ۱۴۰۳ انجام شد.

روش‌ها: در مجموع ۲۴۷ ایزوله مشکوک به *اشرشیا کلای* جمع‌آوری و پس از شناسایی با آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد با استفاده از آزمون PCR با پرایمر ژن *tufA* مورد تأیید قرار گرفتند. توانایی تشکیل بیوفیلیم با روش‌های کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت ارزیابی گردید و فراوانی ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلیم تعیین شد. ابتدا حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) پپتید LL-37 (ProteoGenix، فرانسه) تعیین شد و سپس فعالیت LL-37 در غلظت‌های Sub-MIC بر مهار و تخریب بیوفیلیم در ۶ سویه منتخب (به عنوان نماینده گروه‌های بیوفیلیم قوی، متوسط و ضعیف) بررسی گردید.

یافته‌ها: از مجموع ۲۰۴ سویه تأیید شده، ۵۷ درصد بیوفیلیم مثبت بودند. ژن *yedQ* در تمامی سویه‌های مولد بیوفیلیم شناسایی شد. غلظت ۱۲ میکرومولار LL-37 تشکیل بیوفیلیم را در سویه‌های بیوفیلیم قوی و متوسط به ترتیب به میزان ۳۴-۴۰ درصد و ۴۱-۴۸ درصد کاهش داد. همچنین این غلظت توانست بیوفیلیم‌های از پیش تشکیل شده را با کارایی ۳۸-۵۳ درصد تخریب نماید؛ اما غلظت ۶ میکرومولار تأثیر کمتر از ۱۰ درصد بر سویه‌های بیوفیلیم ضعیف داشت.

نتیجه‌گیری: پپتید LL-37 در غلظت‌های زیرمهارى دارای فعالیت ضد بیوفیلیمی قابل توجهی علیه سویه‌های بالینی *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، به ویژه سویه‌های مولد بیوفیلیم قوی است. این یافته‌ها پتانسیل LL-37 را به عنوان عامل کمکی در مدیریت عفونت‌های ادرارى برجسته می‌سازد.

واژگان کلیدی: *اشرشیا کلای*؛ بیوفیلیم‌ها؛ کاتالسیسین‌ها؛ عفونت‌های مجاری ادرارى؛ مقاومت دارویی باکتریایی

ارجاع: مصطفوی دارانی نرگس سادات، رحیمی فاتح، قاسمی علی. ارزیابی اثر مهارى و تخریبی پپتید LL-37 بر بیوفیلیم سویه‌های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادرارى در اصفهان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۵؛ ۴۴ (۸۶۴): ۸۶۸-۸۷۵.

مقدمه

عفونت‌های دستگاه ادرارى (UTIs (Urinary tract infection)، از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی هستند که سالانه میلیون‌ها نفر را در جهان درگیر می‌کند و بار درمانی سنگینی را تحمیل می‌نمایند (۱). اگرچه این عفونت‌ها با آنتی‌بیوتیک‌ها قابل درمان هستند، اما تشخیص نادرست و مقاومت فزاینده باکتریایی باعث عود مکرر عفونت (Recurrent UTIs) می‌شود که ممکن است ناشی از عوامل حدت (Virulence factors) باکتریایی یا بیماری‌های زمینه‌ای میزبان باشد.

(۲، ۳). *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک (UPEC) عامل اصلی بیش از ۸۰ درصد این عفونت‌ها است و با داشتن مجموعه‌ای از عوامل بیماری‌زایی، قادر به بقا و ایجاد عفونت پایدار در دستگاه ادرارى می‌باشد (۴).

در میان این عوامل، تشکیل بیوفیلیم به عنوان یک استراتژی کلیدی برای بقا و مقاومت باکتریایی مطرح می‌باشد. بیوفیلیم‌ها جوامع پیچیده‌ای هستند که با ایجاد یک ماتریکس پلیمری خارج سلولی،

۱- دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، گروه سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دکتری تخصصی باکتری‌شناسی، دانشیار، بخش میکروبیولوژی، گروه سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دکتری تخصصی میکروبیولوژی، استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

نویسنده مسؤول: فاتح رحیمی؛ دکتری تخصصی باکتری‌شناسی، دانشیار، بخش میکروبیولوژی، گروه سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Email: Fateh.rahimi@hotmail.com

اداراری در اصفهان و همچنین بررسی ارتباط آن با ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم طراحی گردید.

روشها

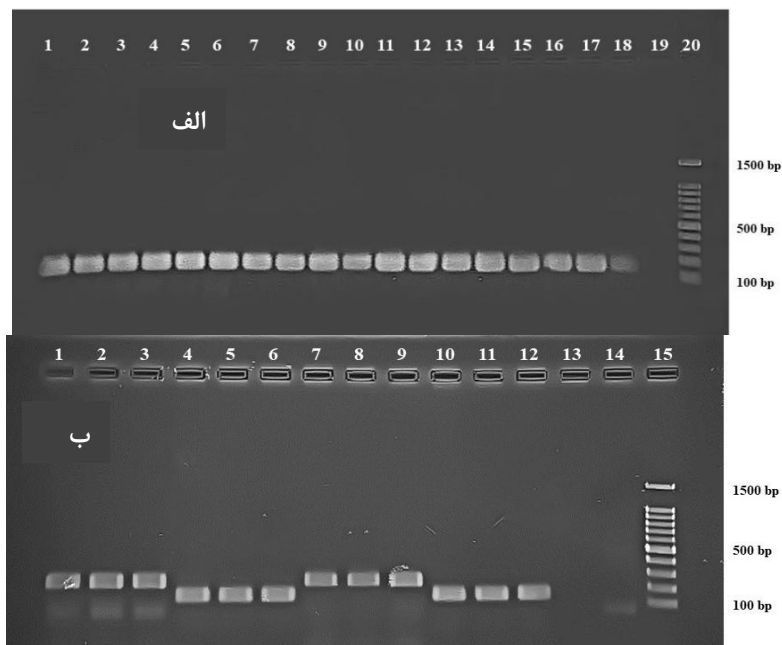
جمع‌آوری و شناسایی ایزوله‌های باکتریایی

جهت انجام این مطالعه، حجم نمونه بر اساس فرمول کوکران با در نظر گرفتن شیوع تقریبی ۶۰ درصد، خطای ۵ درصد و سطح اطمینان ۹۵ درصد، معادل ۲۴۷ نمونه برآورد گردید. ایزوله‌های مشکوک به /شرشیا کلای از بیماران سرپایی مبتلا به عفونت اداراری در اصفهان در سال ۱۴۰۳ جمع‌آوری شدند. پس از کشت اولیه بر روی محیط ژلوز/مک‌کانکی، کلنی‌های منفرد صورتی رنگ (لاکتوز مثبت) انتخاب و جهت تأیید اولیه، تست‌های بیوشیمیایی استاندارد شامل تولید ایندول، متیل رد، و گز-پروسکاتر، مصرف سیترات (IMViC)، اوره‌آز و کشت بر روی محیط TSI انجام گرفت. سویه‌هایی که پروفایل بیوشیمیایی منطبق با /شرشیا کلای داشتند (ایندول و متیل رد مثبت، VP، سیترات و اوره‌آز منفی) در ویال‌های حاوی محیط تریپتیک سوی برایا (TSB) (Scharlau, Barcelona, Spain) و گلیسرول در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شدند. هویت تمامی ایزوله‌ها، با استفاده از آزمون PCR و پرایمرهای اختصاصی گونه‌ای ژن *tufA* مورد شناسایی و تأیید نهایی قرار گرفتند (شکل ۱).

محافظت قابل توجهی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و سیستم ایمنی میزبان ایجاد می‌کند و باعث تداوم حضور باکتری در دستگاه اداراری می‌شوند (۵، ۶). اجزای اصلی این ماتریکس در UPEC، فیبرهای آمیلوئیدی کورلای (Curli) و پلی‌ساکارید سلولز هستند. کورلای در چسبندگی به سطوح و تجمع سلولی نقش دارد و هنگامی که همراه با سلولز بیان می‌شود، یک ماتریکس بسیار آبگریز و مقاوم در اطراف باکتری‌ها ایجاد می‌کند که به پایداری بیوفیلم کمک شایانی می‌نماید (۷، ۸).

مقاومت فزاینده آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های UPEC مولد بیوفیلم، چالش درمانی جدی را به وجود آورده و ضرورت جستجو برای رویکردهای درمانی جایگزین را آشکار می‌سازد. پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs)، از جمله پپتید کاتالیزیدین انسانی LL-37، به عنوان بخشی از سیستم ایمنی ذاتی، نقش مهمی در دفاع میزبان ایفا می‌کنند. سلول‌های اپیتلیال دستگاه اداراری قادر به تولید پپتید LL-37 بوده و تولید آن را پس از عفونت با UPEC افزایش می‌دهند (۹، ۱۰). این پپتید با برهمکنش با غشاء باکتریایی، می‌تواند مستقیماً باعث لیز سلول‌ها و اختلال در تشکیل بیوفیلم شود (۱۱).

با وجود دانش کلی در مورد پتانسیل درمانی LL-37، تحقیقات جامعی در مورد اثربخشی آن بر سویه‌های بالینی UPEC که از مناطق جغرافیایی خاص جداسازی شده‌اند، صورت نگرفته است. بنابراین، این مطالعه با هدف ارزیابی فعالیت ضد بیوفیلمی پپتید LL-37 بر سویه‌های UPEC بیوفیلم مثبت جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت



شکل ۱- الف) محصول PCR ژن *tufA* و ب) ژنهای بیوفیلمی *csgA*، *csgD*، *yedQ* و *bcsA* در تعدادی از سویه‌های /شرشیاکلای اداراری بیوفیلم مثبت با نشانگر ۱۵۰۰ جفت بازی.

* وزن محصول PCR: ژن *tufA* (۲۰۰ جفت باز)، *csgA* (۲۰۴ جفت باز)، *csgD* (۱۵۳ جفت باز)، *yedQ* (۱۰۶ جفت باز) و *bcsA* (۱۶۶ جفت باز)

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم

از دو روش کیفی ژلوز قرمز کنگو (CRA) و کمی میکروتیتر پلیت (MTP) استفاده شد (۹). در روش کمی، پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته، چاهک‌ها سه مرتبه با سرم فیزیولوژی (۰/۸۵٪ NaCl) شستشو داده شدند. پس از رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله و حل کردن رنگ، جذب نوری (OD) در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت، سویه‌ها بر اساس استاندارد به ۴ گروه طبقه‌بندی شدند: بیوفیلم منفی ($ODs \leq OD_{nc}$)، بیوفیلم ضعیف ($ODs \leq 2OD_{nc} > OD_{nc}$)، بیوفیلم متوسط ($ODs \leq 4OD_{nc} > 2OD_{nc}$) و بیوفیلم قوی ($ODs > 4OD_{nc}$). تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار بیولوژیک مستقل انجام شد.

بررسی ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم در سویه‌های

اشرشیاکلاهی اوروپاتوزنیک

حضور ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلم (*csgA*, *csgD*, *yedQ* و *bcsA*) در سویه‌های بیوفیلم مثبت با استفاده از آزمون PCR و پرایمرهای اختصاصی هر ژن بررسی شد (۲). وزن مورد انتظار برای ژن‌های *yedQ*, *csgD*, *csgA* و *bcsA* نیز به ترتیب ۲۰۰، ۱۵۳، ۱۰۶ و ۱۶۶ جفت باز بود (شکل ۱).

بررسی فعالیت ضدبیوفیلمی پپتید ضد میکروبی LL-37

برای این آزمون، از شش سویه منتخب (دو سویه از هر گروه بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف که بالاترین جذب نوری را در گروه خود داشتند) استفاده شد. پیش از بررسی اثر ضدبیوفیلمی پپتید LL-37 (خریداری شده از شرکت ProteoGenix, France)، ابتدا حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) پپتید LL-37 با روش استاندارد میکروبراث دایلوژن (Microbroth Dilution) در پلیت‌های ۹۶ خانه تعیین گردید. بر این اساس، غلظت‌هایی که باعث عدم رشد باکتری نشدند به عنوان غلظت‌های زیر بازدارنده (Sub-MIC) انتخاب شدند. برای این منظور، دو غلظت Sub-MIC شامل ۶ و ۱۲ میکرومولار مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون باکتریایی در مجاورت پپتید به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه و سپس میزان بیوفیلم تشکیل شده به روش کریستال ویوله که پیشتر شرح داده شد، سنجیده شد. درصد مهار و تخریب بیوفیلم با فرمول زیر محاسبه گردید: درصد مهار/تخریب = $\frac{OD_{Control} - OD_{Treated}}{OD_{Control}} \times 100$

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه‌ی ۹ و SPSS نسخه‌ی ۲۶ (IBM Corporation, Armonk, NY) تحلیل شدند. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey و برای متغیرهای

کیفی از آزمون Chi-square استفاده شد. سطح معناداری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. این مقاله با کد اخلاق IR.UI.REC.1403.154 در دانشگاه اصفهان به انجام رسیده است.

یافته‌ها

شناسایی ایزوله‌های باکتریایی

از مجموع ۲۴۷ ایزوله بالینی، ۲۰۴ سویه (۸۳ درصد) با استفاده از PCR، واجد باند اختصاصی برای ژن *tufA* بودند و به عنوان سویه‌های /شرشیاکلاهی تأیید شدند. ۴۳ ایزوله باقیمانده (۱۷ درصد) که به جنس‌های باکتریایی دیگر تعلق داشتند، از مطالعه حذف گردیدند.

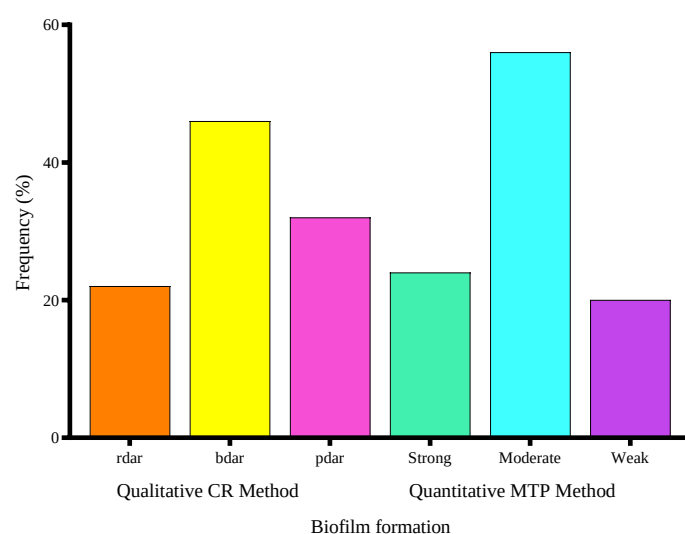
توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های /شرشیاکلاهی

اوروپاتوزنیک

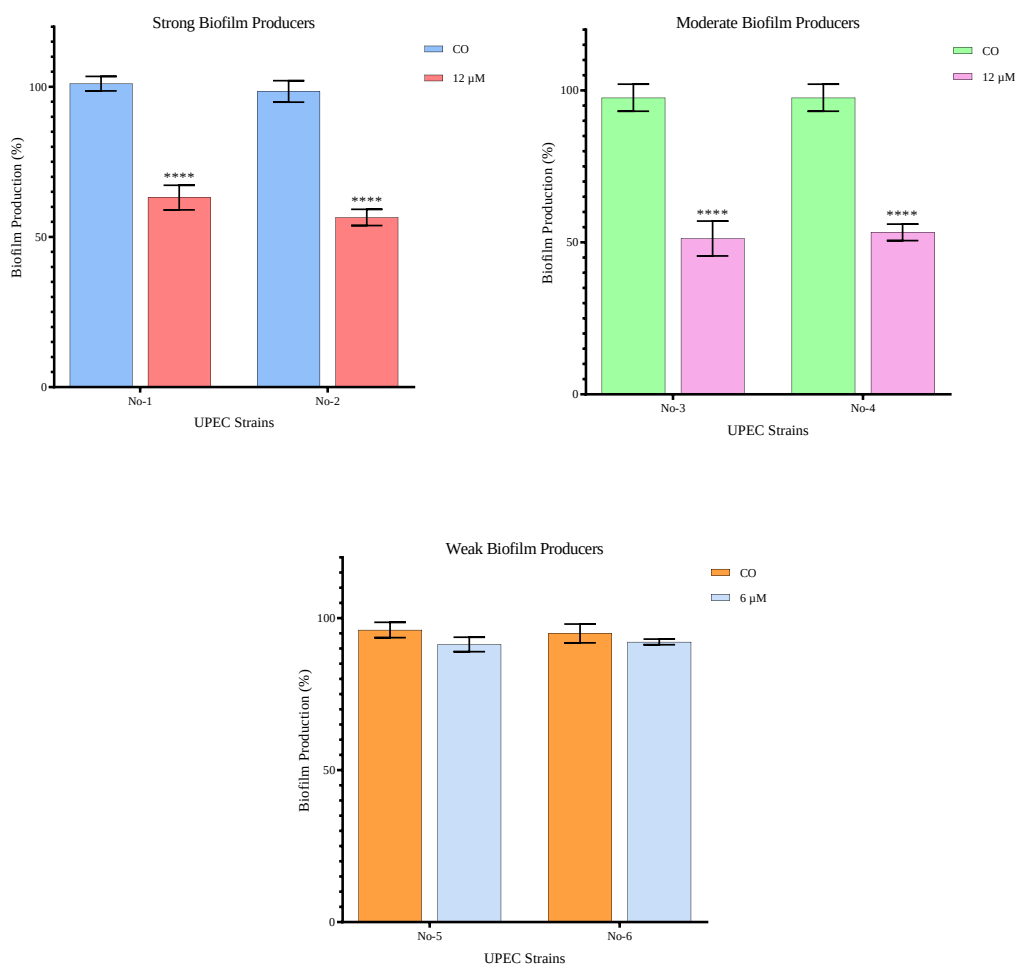
ارزیابی کیفی بر روی ۲۰۴ سویه /شرشیاکلاهی با روش ژلوز قرمز کنگو نشان داد که ۱۱۶ سویه (۵۷ درصد) مورفوتایپ‌های *rdar* (۱۳ درصد)، *bdar* (۲۶ درصد) و *pdar* (۱۸ درصد) را نشان دادند و به عنوان بیوفیلم مثبت برای ارزیابی کمی تولید بیوفیلم انتخاب شدند. ۸۸ سویه /شرشیاکلاهی (۴۳ درصد) نیز با مورفوتایپ *saw* به عنوان بیوفیلم منفی در نظر گرفته شدند (شکل ۱). سنجش کمی تولید بیوفیلم تأیید کرد که تمامی ۱۱۶ سویه مولد کورلای و/یا سلولز قادر به تشکیل بیوفیلم بودند؛ که از این میان، ۲۸ سویه (۲۴ درصد) بیوفیلم قوی، ۶۵ سویه (۵۶ درصد) بیوفیلم متوسط و ۲۳ سویه (۲۰ درصد) بیوفیلم ضعیف تولید کردند (شکل ۲).

بررسی ویژگی‌های دموگرافیک و فنوتیپی سویه‌ها

از مجموع ۱۱۶ سویه /شرشیاکلاهی مولد بیوفیلم، ۷۹ سویه (۶۸ درصد) از زنان و ۳۷ سویه (۳۲ درصد) از مردان جداسازی شده بودند که این اختلاف از نظر آماری معنادار بود ($P < 0.0001$). توزیع سنی بیماران نشان داد که بیشترین فراوانی سویه‌ها به ترتیب متعلق به گروه‌های سنی ۶۱-۷۰ سال (۳۱ درصد)، ۵۱-۶۰ سال (۲۷ درصد) و ۴۱-۵۰ سال (۱۶ درصد) بود و کمترین میزان در گروه‌های سنی زیر ۲۰ سال مشاهده شد. بررسی مورفوتایپ‌ها نشان داد که فرم *bdar* با فراوانی ۴۶ درصد (۵۳ مورد) شایع‌ترین فنوتیپ در میان کل جدایه‌ها بود و پس از آن مورفوتایپ‌های *pdar* با ۳۲ درصد (۳۷ مورد) و *rdar* با ۲۲ درصد (۲۶ مورد) قرار داشتند؛ توزیع این مورفوتایپ‌ها بین دو جنس تفاوت معناداری نداشت ($P > 0.05$). همچنین در سنجش کمی، اکثریت سویه‌ها (۵۶ درصد) بیوفیلم متوسط تولید کردند، در حالی که ۲۴ درصد مولد بیوفیلم قوی و ۲۰ درصد مولد بیوفیلم ضعیف بودند. اگرچه فراوانی بیوفیلم قوی در مردان (۳۰ درصد) نسبت به زنان (۲۲ درصد) بیشتر بود، اما برخلاف تعداد کلی، این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود ($P = 0.259$).



شکل ۱. درصد فراوانی تشکیل بیوفیلم در میان سویه‌های/شرشیا کلای اوروپاتوژنیک.



شکل ۲. بررسی اثر غلظت‌های پپتید LL-37 بر تشکیل بیوفیلم سویه‌های/شرشیا کلای اوروپاتوژنیک. سویه‌های شماره ۱ و ۲ مولد بیوفیلم قوی و مورفوتایپ **rdar**، سویه‌های شماره ۳ و ۴ مولد بیوفیلم متوسط و مورفوتایپ **bdar** و سویه‌های شماره ۵ و ۶ مولد بیوفیلم ضعیف و مورفوتایپ **pdar** بودند.

فراوانی ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم

بر اساس نتایج حاصل از آزمون‌های PCR، ژن *yedQ* در تمامی ۱۱۶ سویه/شرشیا کلای اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت حضور داشت و فراوانی کلی ژن‌های *csgD*، *csgA* و *bcsA* به ترتیب ۹۶، ۸۴ و ۷۵ درصد بود (جدول ۱). همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود، فراوانی هر چهار ژن مورد بررسی در سویه‌های با مورفوتایپ *rdar* و همچنین سویه‌های دارای قدرت تشکیل بیوفیلم قوی، ۱۰۰ درصد بود که نشان‌دهنده همبستگی کامل حضور این ژن‌ها با تشکیل بیوفیلم قوی و مورفوتایپ *rdar* است.

اثر مهار پیپتید LL-37 بر تشکیل بیوفیلم

غلظت ۱۲ میکرومولار LL-37 به طور معنی‌داری تشکیل بیوفیلم را در سویه‌های/شرشیا کلای اوروپاتوژنیک با بیوفیلم قوی و متوسط (واجد مورفوتایپ‌های *rdar* و *bdar*) کاهش داد. این کاهش در سویه‌های با مورفوتایپ *rdar* (۳۴-۴۰ درصد) کمتر از سویه‌های با مورفوتایپ *bdar* (۴۱-۴۸ درصد) بود (شکل ۲). غلظت ۶ میکرومولار LL-37، تأثیر قابل توجهی بر سویه‌های با بیوفیلم ضعیف (واجد مورفوتایپ *pdar*) نداشت و تنها منجر به کاهش جزئی (۳-۷ درصد) در تشکیل بیوفیلم گردید.

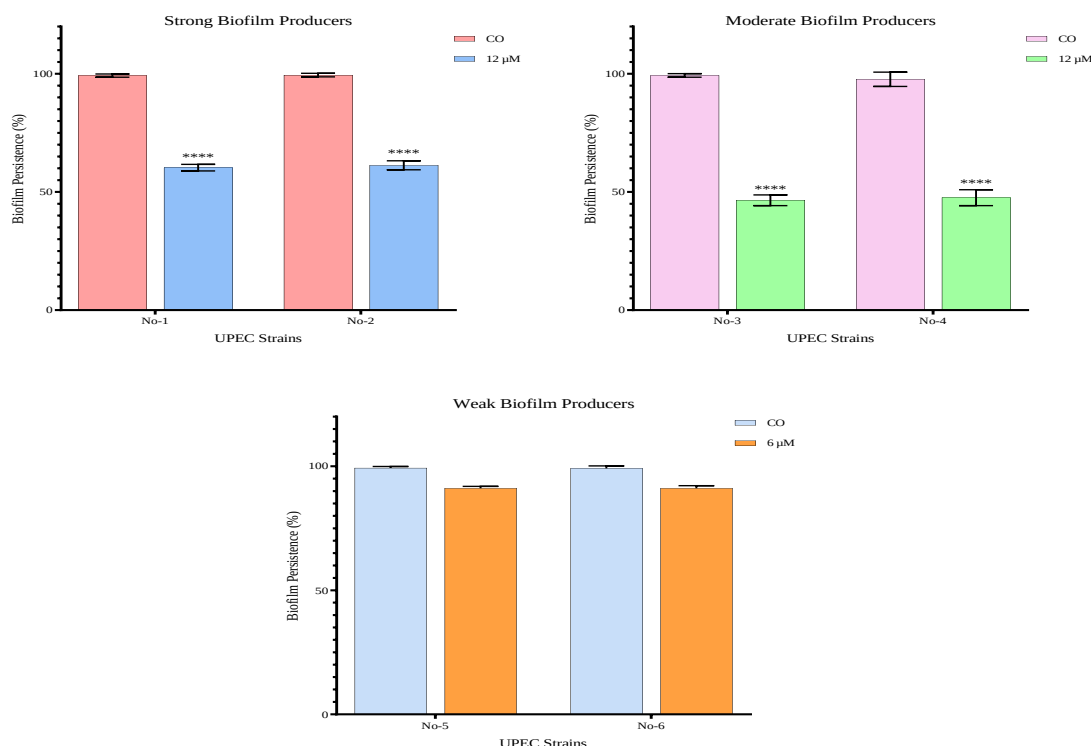
جدول ۱. فراوانی ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم در میان سویه‌های

/شرشیا کلای واجد مورفوتایپ‌ها و گروه‌های بیوفیلیمی مختلف

مورفوتایپ/ تولید بیوفیلم	<i>csgA</i>	<i>csgD</i>	<i>yedQ</i>	<i>bcsA</i>	تعداد (درصد)
<i>rdar</i>	۲۶ (۱۰۰)	۲۶ (۱۰۰)	۲۶ (۱۰۰)	۲۶ (۱۰۰)	۲۶ (۱۰۰)
<i>bdar</i>	۵۳ (۱۰۰)	۵۳ (۱۰۰)	۵۳ (۱۰۰)	۲۴ (۴۵)	۵۳ (۴۶)
<i>pdar</i>	۱۸ (۵۱)	۳۲ (۸۶)	۳۷ (۱۰۰)	۳۷ (۱۰۰)	۳۷ (۳۲)
تعداد (درصد)	۹۷ (۸۴)	۱۱۱ (۹۶)	۱۱۶ (۱۰۰)	۸۷ (۷۵)	۱۱۶
قوی	۲۸ (۱۰۰)	۲۸ (۱۰۰)	۲۸ (۱۰۰)	۲۸ (۱۰۰)	۲۸ (۲۴)
متوسط	۵۵ (۸۵)	۶۵ (۱۰۰)	۶۵ (۱۰۰)	۴۷ (۷۲)	۶۵ (۵۶)
ضعیف	۱۴ (۶۱)	۱۸ (۷۸)	۲۳ (۱۰۰)	۱۲ (۵۲)	۲۳ (۲۰)
تعداد (درصد)	۹۷ (۸۴)	۱۱۱ (۹۶)	۱۱۶ (۱۰۰)	۸۷ (۷۵)	۱۱۶

اثر تخریبی پیپتید LL-37 بر بیوفیلم بالغ

غلظت ۱۲ میکرومولار LL-37 به طور معنی‌داری بیوفیلم‌های از پیش تشکیل شده توسط سویه‌های/شرشیا کلای اوروپاتوژنیک با بیوفیلم قوی (۳۸-۴۲ درصد) و متوسط (۴۹-۵۳ درصد) را تخریب کرد (شکل ۳). با این حال، این غلظت تأثیر محدودی بر سویه‌های بیوفیلم ضعیف داشت و تنها باعث کاهش ۶-۸ درصدی بیوفیلم شد.



شکل ۳. بررسی اثر غلظت‌های پیپتید LL-37 بر تخریب بیوفیلم تشکیل شده در سویه‌های/شرشیا کلای اوروپاتوژنیک. سویه‌های شماره ۱ و ۲ مولد بیوفیلم قوی و مورفوتایپ *rdar*، سویه‌های شماره ۳ و ۴ مولد بیوفیلم متوسط و مورفوتایپ *bdar* و سویه‌های شماره ۵ و ۶ مولد بیوفیلم ضعیف و مورفوتایپ *pdar* بودند.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که تشکیل بیوفیلم یک ویژگی رایج (با فراوانی ۵۷ درصد) در میان ایزوله‌های بالینی UPEC در ایران است که این میزان با مطالعات پیشین همخوانی داشت (۹، ۱۲). فراوانی بالاتر سویه‌های مولد بیوفیلم در زنان نسبت به مردان نیز با داده‌های اپیدمیولوژیک جهانی مطابقت داشت (۴، ۵).

یکی از یافته‌های مهم این پژوهش، ارتباط مستقیم میان قدرت تشکیل بیوفیلم و الگوی تولید اجزای ماتریکس، به ویژه فیبریل‌های کورلای و سلولز بود. حضور ۱۰۰ درصدی ژن‌های *csgA* (زیرواحد اصلی کورلای) و *csgD* (تنظیم‌کننده اصلی) در سویه‌های با بیوفیلم قوی، نقش محوری این مسیر را در ایجاد ساختارهای بیوفیلمی پایدار تأیید می‌کند. این یافته‌ها با تحقیقات پیشین که بر نقش حیاتی کورلای و سلولز در معماری و یکپارچگی بیوفیلم‌های/شرشیاکلای تأکید کرده‌اند، مطابقت داشت (۱۳، ۱۴).

همچنین، حضور ژن *yedQ* در تمامی سویه‌های مولد بیوفیلم، بیانگر یک سازوکار ژنتیکی مشترک در پایداری بیوفیلم است (۱۵). این یافته‌ها همسو با تحقیقات Serra و همکاران در اروپا است که بر نقش حیاتی کورلای و سلولز در معماری فضایی و یکپارچگی مکانیکی بیوفیلم‌های/شرشیاکلای تأکید کرده‌اند؛ که این موضوع با فراوانی بالای ژن‌های *csgA* و *csgD* در سویه‌های بیوفیل قوی در این مطالعه مطابقت داشت (۱۳).

مطالعات آسیایی، مانند تحقیقاتی در چین، فراوانی بیوفیلم را تا ۷۰ درصد در سویه‌های مقاوم، به ویژه سویه‌های/شرشیاکلای اوروپاتوژنیک با مقاومت چنددارویی، نیز گزارش کرده‌اند (۷). در مجموع فراوانی بالای این ژن‌ها در مطالعه حاضر، نشان‌دهنده پتانسیل ژنتیکی سویه‌ها برای تشکیل بیوفیلم است. لازم به ذکر است که در این مطالعه تنها حضور ژن‌ها، بررسی شد و ارزیابی تأثیر پپتید LL-37 بر میزان بیان این ژن‌ها مدنظر نبود که می‌تواند موضوع مطالعات آینده باشد.

یافته‌ی کلیدی و برجسته این مطالعه، فعالیت ضدبیوفیلمی چشمگیر پپتید LL-37 بود. اثر بخشی بالای LL-37 بر روی سویه‌های مولد کورلای (*rdar* و *bdar*) و تأثیر ناچیز آن بر سویه‌های فاقد کورلای (*pdar*) قویاً نشان می‌دهد که سازوکار عمل این پپتید به طور ویژه با اجزای پروتئینی ماتریکس مرتبط است. این پپتید احتمالاً با برهم‌کنش مستقیم الکترواستاتیک با زیرواحدهای *CsgA*، پلیمریزاسیون کورلای را مختل کرده و منجر به بی‌ثباتی ساختار

ماتریکس می‌گردد (۱۶، ۱۷). این یافته با نقش فیزیولوژیک LL-37 به عنوان یک مولکول دفاعی خط اول در اپیتلیوم دستگاه ادراری که در پاسخ به عفونت افزایش می‌یابد، همخوانی داشت (۱۸، ۱۹). توانایی LL-37 در تخریب بیوفیلم‌های بالغ (با کارایی تا ۵۷ درصد) از اهمیت بالینی ویژه‌ای برخوردار است، زیرا هدف قرار دادن بیوفیلم‌های تثبیت شده، چالش اصلی درمان‌های مبتنی بر آنتی‌بیوتیک است. این ویژگی، LL-37 را به یک کاندیدای ایده‌آل برای استراتژی‌های درمانی نوین، مانند درمان ترکیبی با آنتی‌بیوتیک‌ها یا پوشش‌دهی سوندهای ادراری، تبدیل می‌کند (۲۰، ۲۱).

نتیجه‌گیری

در مجموع، این مطالعه نشان داد که پپتید LL-37 قادر به مهار تشکیل و تخریب بیوفیلم‌های وابسته به کورلای در سویه‌های بالینی UPEC است. این یافته‌ها، LL-37 را به عنوان یک کاندیدای امیدوارکننده برای توسعه راهکارهای درمانی نوین علیه عفونت‌های ادراری مقاوم به آنتی‌بیوتیک و مرتبط با بیوفیلم معرفی می‌کند.

با وجود نتایج امیدوارکننده، این مطالعه با محدودیت‌هایی نیز همراه بود. تمام آزمایش‌ها در شرایط *in vitro* انجام شده و نتایج ممکن است به طور کامل منعکس‌کننده شرایط *in vivo* نباشد. همچنین، ایزوله‌ها از یک مرکز واحد جمع‌آوری شده‌اند و تعداد سویه‌های منتخب برای آزمون LL-37 نسبتاً کم بود. یکی دیگر از محدودیت‌های این پژوهش، عدم استفاده از کنترل مثبت (یک آنتی‌بیوتیک رایج) در تست‌های بیوفیلم بود؛ هرچند مقایسه گروه تیمار شده با گروه کنترل رشد (تیمار نشده) صورت گرفت، اما مقایسه کارایی پپتید با داروهای استاندارد می‌توانست ارزش بالینی یافته‌ها را شفاف‌تر کند. همچنین محدودیت عدم ارزیابی تأثیر پپتید LL-37 بر میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه، که جزء اهداف این مطالعه نبود؛ نیز می‌تواند موضوع مطالعات آینده باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه‌ی دکتری خانم نرگس سادات مصطفوی دارانی است که با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان و همچنین بنیاد ملی علم ایران (طرح مصوب شماره ۴۰۳۹۶۵۲) به انجام رسیده است. نویسندگان مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از زحمات آقای عباس میرگلوی بیات و خانم ملیکا ترکی باغبادرانی اعلام می‌نمایند.

References

1. Tullus K, Shaikh N. Urinary tract infections in children. The Lancet. 2020;395(10237):1659-68.
2. Rahimi F, Khashei S. Investigation the effect of nitric oxide on biofilm-producing uropathogenic

- Escherichia coli* strains isolated from patients [in Persian]. *Tehran Univ Med Sci J* 2024; 82(7): 528-37.
3. Mahale RP, Solomon AP, Maheshwarappa YD, Mahadevaiah S. Comparative evaluation of biofilm-forming capacity in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol* 2025; 15: 1570422.
 4. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13(5): 269-84.
 5. Micali S, Isagro G, Bianchi G, Miceli N, Calapai G, Navarra M. Cranberry and recurrent cystitis: more than marketing? *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014; 54(8): 1063-75.
 6. Jhang J-F, Kuo H-C. Recent advances in recurrent urinary tract infection from pathogenesis and biomarkers to prevention. *Tzu Chi Medical Journal* 2017; 29(3): 131-7.
 7. Soto SM, Marco F, Guiral E, Vila J. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: Relationship with urovirulence factors and antimicrobial resistance. *Clinical Management of Complicated Urinary Tract Infection*. 1st ed. London, UK: IntechOpen; 2011.
 8. Oelschlaeger T, Dobrindt U, Hacker J. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19(6): 517-21.
 9. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Clonal groups of extended-spectrum β -lactamase and biofilm producing uropathogenic *Escherichia coli* in Iran [in Persian]. *Pathogens and Global Health* 2022; 116(8): 485-97.
 10. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Genetic diversity and virulence characteristics of biofilm-producing uropathogenic *Escherichia coli*. *Int Microbiol* 2022; 25(2): 297-307.
 11. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Patho* 2008; 85(1): 11-9.
 12. Zhao F, Yang H, Bi D, Khaledi A, Qiao M. A systematic review and meta-analysis of antibiotic resistance patterns, and the correlation between biofilm formation with virulence factors in uropathogenic *E. coli* isolated from urinary tract infections. *Microb Pathog* 2020; 144: 104196.
 13. Serra DO, Richter AM, Hengge R. Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *Microb Pathog* 2013; 195(24): 5540-54.
 14. Verma P, Ho R, Chambers SA, Cegelski L, Zimmer J. Insights into phosphoethanolamine cellulose synthesis and secretion across the Gram-negative cell envelope. *Nat Commun* 2024; 15(1): 7798.
 15. Lindenberg S, Klauck G, Pesavento C, Klauck E, Hengge R. The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in ac-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control. *EMBO J* 2013; 32(14): 2001-14.
 16. Kai-Larsen Y, Lüthje P, Chromek M, Peters V, Wang X, Holm Å, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. *PLoS Pathog* 2010; 6(7): e1001010.
 17. Santos J, Ventura S, Pallarès I. LL-37 and CsgC exemplify the crosstalk between anti-amyloid, antimicrobial, and anti-biofilm protein activities. *Neural Regen Res* 2023; 18(5): 1027-8.
 18. Chromek M, Slamová Z, Bergman P, Kovács L, Podracka Lu, Ehrén I, et al. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med* 2006; 12(6): 636-41.
 19. Ridyard KE, Elsayy M, Matrasingh D, Klein D, Strehmel J, Beaulieu C, et al. Synergy between human peptide LL-37 and polymyxin B against planktonic and biofilm cells of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)* 2023; 12(2): 389.
 20. Pereira AC, Aguiar AP, Araujo LM, Dantas LO, Mayer MP, Karygianni L, et al. Antibiofilm activity of LL-37 peptide and D-amino acids associated with antibiotics used in regenerative endodontics on an ex vivo multispecies biofilm model. *Life (Basel)* 2022; 12(11): 1686.
 21. White JK, Muhammad T, Alsheim E, Mohanty S, Blasi-Romero A, Gunasekera S, et al. A stable cyclized antimicrobial peptide derived from LL-37 with host immunomodulatory effects and activity against uropathogens. *Cell Mol Life Sci* 2022; 79(8): 411.

Evaluation of the Inhibitory and Destructive Effects of LL-37 Peptide on Biofilms of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Urinary Tract Infections in Isfahan

Narges Sadat Mostafavi Darani¹, Fateh Rahimi², Ali Qasemi³

Original Article

Abstract

Background: The human cathelicidin antimicrobial peptide (LL-37), a component of the host innate immune system, possesses the capability to combat bacterial biofilms. This study aimed to evaluate the effect of sub-MIC concentrations of LL-37 on biofilms formed by clinical uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains isolated from patients in Isfahan, Iran, during 2024.

Methods: A total of 247 suspected *E. coli* isolates were collected from patients and identified by standard biochemical tests, and finally confirmed using PCR by specific primers for *tufA* gene. Biofilm-forming ability was assessed using qualitative Congo Red Agar (CRA) and quantitative Microtiter Plate (MTP) methods, and the frequency of biofilm-associated genes was determined. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the LL-37 cathelicidin (ProteoGenix France) was evaluated; and subsequently, the activity of LL-37 at sub-MIC concentrations on biofilm inhibition and destruction among six selected strains (strong, moderate, and weak biofilm-producers) was investigated.

Findings: Of the 204 confirmed strains, 57% were biofilm producers. The *yedQ* gene was detected in all biofilm-producing strains. The 12 μ M concentration of LL-37 reduced biofilm formation in strong and moderate biofilm producers by 34-40% and 41-48%, respectively. Furthermore, this concentration disrupted pre-formed biofilms with an efficacy of 38-53%; however, the 6 μ M concentration showed a limited effect (<10%) on weak biofilm producers.

Conclusion: The LL-37 peptide exhibits significant anti-biofilm activity at sub-MIC concentrations against clinical UPEC strains, particularly strong biofilm producers. These findings highlight the potential of LL-37 as an adjunctive therapeutic agent in the management of urinary tract infections.

Keywords: *Escherichia coli*, Biofilms, Cathelicidins, Urinary Tract Infections, Bacterial Drug Resistance

Citation: Mostafavi Darani NS, Rahimi F, Qasemi A. Evaluation of the Inhibitory and Destructive Effects of LL-37 Peptide on Biofilms of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Urinary Tract Infections in Isfahan. J Isfahan Med Sch 2026; 44(864): 868- 75.

1- PhD Candidate of Microbiology, Division of Microbiology, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2- PhD of Bacteriology, Division of Microbiology, Associate Professor, Department of Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3- PhD of Microbiology, Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

Corresponding Author: Fateh Rahimi, PhD of Bacteriology, Associate Professor, Division of Microbiology, Department of Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran; Email: Fateh.rahimi@hotmail.com