AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences
Alborz University of Medical Sciences Journal, Winter 2026, Vol. 15, No 2: 127-137

Time-dependent analysis of biofilm-regulatory gene expression during biofilm maturation in Pseudomonas aeruginosa

Siavash Aynesazi[1]
Parastoo Sharifian[2]
Mahnaz Tavakoli[3]
Mohammad Mohammadzadeh[2*]

1. Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding Author:
M.mohammadzadeh@abzums.ac.ir

Abstract

Introduction: Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that frequently causes severe healthcare-associated infections, particularly in immunocompromised patients. Biofilm formation is a major virulence factor that contributes to bacterial persistence and increased resistance to antimicrobial agents. This study aimed to evaluate the expression patterns of key biofilm-regulatory genes during different stages of biofilm maturation.

Methods: The standard strain Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145 was cultured, and biofilm formation was quantified using a microtiter plate assay. The expression levels of the biofilm-associated regulatory genes lasR, rhlR, gacA, and retS were assessed at multiple time points over a five-day period using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0. The study was approved by the Ethics Committee of Alborz University of Medical Sciences (IR.ABZUMS.REC.1398.066) and was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

Results: Expression analysis demonstrated a significant time-dependent increase in the expression levels of all investigated genes (lasR, rhlR, gacA, and retS) throughout the biofilm maturation process, from the planktonic phase (day 0) to mature biofilm formation (day 5) ($P < 0.0001$). The greatest increases were observed for gacA and lasR, with approximately 56-fold and 50-fold upregulation, respectively, compared with baseline expression levels.

Conclusion: The biofilm maturation process in P. aeruginosa is associated with significant upregulation of key regulatory genes involved in quorum sensing and two-component regulatory systems. The observed increase in both activating and inhibitory regulatory genes highlights the complexity of the genetic network governing biofilm development and may provide potential targets for future anti-biofilm therapeutic strategies.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa; Biofilms; Quorum Sensing; Two-Component Regulatory Systems; Gene Expression Regulation, Bacterial; Virulence Factors

How to cite this article: Mohammadzadeh M, Aynesazi S, Sharifian P, Tavakoli M. Time dependent analysis of biofilm regulatory gene expression during biofilm maturation in Pseudomonas aeruginosa. Alborz University Medical Journal 2026; 15 (2): 127 -137

.Copyright © 2026 The Authors. Published by Alborz University of Medical Sciences
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-.nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited

AUMJ Journal
Alborz University of Medical Sciences
نشریه دانشگاه علوم‌پزشکی البرز، بهار ۱۴۰۵، دوره ۱۵، شماره ۲، صفحه‌های ۱۳۷-۱۲۷

بررسی وابسته به زمان بیان ژن های تنظیم کننده بیوفیلم طی مراحل بلوغ بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا

سیاوش آینه سازی[۱]
پرستو شریفیان[۲]
مهناز توکلی[۳]
محمد محمدزاده[۲*]

چکیده

مقدمه: سودوموناس آئروژینوزا پاتوژن فرصت‌طلبی است که اغلب منجر به عفونت‌های بیمارستانی خطرناکی در افراد با سیستم ایمنی ضعیف شده می‌شود. از مهم‌ترین عوامل مهم بیماری‌زایی این باکتری توانایی تولید بیوفیلم بوده که با مقاوم ساختن باکتری در مقابل اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها درمان عفونت با این باکتری را دشوار می‌سازد. کنترل تولید بیوفیلم و مراحل بلوغ آن تحت‌تأثیر ژن‌های متعددی است. هدف از این مطالعه ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های اصلی کنترل‌کننده تولید بیوفیلم در طی مراحل بلوغ آن است.

روش کار: این مطالعه بر روی سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC۱۰۱۴۵ صورت گرفت. پس از کشت و تأیید نهائی سویه، باکتری از لحاظ تولید بیوفیلم با میکروتیتر – پلیت مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس میزان تغییرات بیان ژن‌های retS, gacA, rhlR, lasR در زمان‌های مختلف در پروسه تولید و بلوغ بیوفیلم با استفاده از روش Real-time PCR انجام گرفت و نتایج با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism ۰,۸ مورد تجزیه – تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج سنجش بیان ژن نشان داد که بیان تمامی ژن‌های lasR, rhlR, gacA, retS در طول دوره پنج‌روزه بلوغ بیوفیلم به‌صورت کلی از زمان صفر (پلانکتونی) تا روز پنجم (بیوفیلم بالغ) روند افزایشی معنی‌داری داشت (P<۰,۰۰۰۱). به طور خاص، بالاترین میزان افزایش بیان مربوط به ژن gacA (تقریباً ۵۶ برابر) و lasR (تقریباً ۵۰ برابر) بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که در طی تولید و بلوغ بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا، بیان ژن‌های کنترل‌کننده، حتی ژن‌هایی که اثر مهاری بر تولید بیوفیلم دارند روند افزایش وابسته به زمان دارند که حاکی از ارتباط پیچیده این ژن‌ها در حین کنترل تولید بیوفیلم در این باکتری است.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، بیوفیلم، سیستم‌های تنظیم‌کننده دوجزئی، کوئوروم سنسینگ

۱. گروه میکروبشناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲. گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۳. گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول:
M.mohammadzadeh84@yahoo.com

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باسیل گرم منفی، غیرتخمیری، متحرک و اکسیداز مثبت است که به عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب، عامل یک سوم از عفونت‌های ریوی در افراد با نقص ایمنی و شایع‌ترین دلیل مرگ بیماران سیستیک فیبروزیس می‌باشد. از مهم‌ترین مکانیسم‌های بیماری‌زایی این باکتری، توانایی بالای آن در تولید بیوفیلم است که منجر به مقاومت گسترده نسبت به اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها و شکست‌های درمانی می‌شود (۱). بیوفیلم تجمعی پیچیده از باکتری‌ها است که در یک ماتریکس گلیکوکالیکس محصور شده و در سطوح مختلفی مانند مفصل مصنوعی، کاتترهای وریدی، سوندها و بافت‌های مخاطی تشکیل می‌شود. این ساختارها مقاومت بسیار بالایی در برابر عوامل محیطی و درمانی نشان داده و به کانون انتشار باکتری تبدیل می‌شوند (۵-۲). تشکیل و بلوغ بیوفیلم یک فرآیند هماهنگ و چندمرحله‌ای است که تحت کنترل شبکه‌های پیچیده سیگنالینگ بین‌سلولی و تغییرات بیان ژنی قرار دارد (٦). این فرآیند حدود ۵ روز طول می‌کشد و شامل مراحل اتصال اولیه، اتصال برگشت‌ناپذیر، تشکیل میکروکلونی‌ها، بلوغ سه‌بعدی و در نهایت آزادسازی باکتری‌ها از بیوفیلم است (۷).

در سودوموناس آئروژینوزا، سیستم‌های حساس شامل سیستم‌های تنظیم‌کننده دوجزئی (Two-component regulatory systems) و کوئوروم سنسینگ (Quorum-sensing) نقش مهمی در بیماری‌زایی و تشکیل بیوفیلم ایفا می‌کنند. سیستم‌های اصلی کوئوروم سنسینگ شامل سیستم Las (با ژن‌های lasR و lasI) و سیستم Rhl (با ژن‌های rhlR و rhlI) هستند که فعالیت‌های رونویسی و تولید فاکتورهای ویرولانس کلیدی (مانند الاستاز، رامنولیپید، اگزوتوکسین A و پیوسیانین) را تنظیم می‌کنند (۱۱-۸). سیستم GacA/GacS نیز به عنوان یک سیستم دوجزئی اصلی، ارتباط قطعی با کنترل تشکیل بیوفیلم دارد (۱۲, ۱۳). علاوه بر این، سیستم تنظیمی RetS/LadS که بر بسیاری از فاکتورهای بیماری‌زایی اثر می‌گذارد، نیز شناخته شده است. RetS یک کیناز حسگر هیبریدی است که در مطالعات جهش‌یافته، کاهش فاکتورهای عفونت حاد و افزایش سطح بیان اپرون‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم را نشان داده است (۱۴, ۱۵). با وجود مطالعات پیشین درباره نقش ژن‌های تنظیمی در بیوفیلم، الگوی زمانی هماهنگ بیان این ژن‌ها در طول مراحل متوالی تشکیل بیوفیلم، تحت شرایط کنترل‌شده و در یک مدل واحد، هنوز به‌طور نظام‌مند بررسی نشده است. بنابراین، هدف از این مطالعه ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های کنترل‌کننده تولید بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا طی مراحل مختلف تولید و بلوغ بیوفیلم می‌باشد.

روش کار

آماده‌سازی سویه‌های موردمطالعه

برای مطالعه سویه‌های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا (ATCC:۱۰۱٤٥) به‌عنوان کنترل مثبت و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC ۲۷۸۵۳) به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. جهت تهیه کشت تازه، سویه‌ها در محیط کشت TSB (مرک، آلمان) کشت داده و محیط‌های کشت به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

بهینه سازی تولید بیوفیلم در سویه مورد مطالعه به روش میکروپلیت تیتر

برای ارزیابی توانایی تولید بیوفیلم، ابتدا از کشت تازه هر دوسویه، سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک‌فارلند تهیه شد. سوسپانسیون با محیط کشت TSB به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق و ۱۰۰ میکرولیتر از آن درون چاهک‌های ته‌گرد میکروپلیت ۹٦ خانه ریخته شد. پس از بستن درپوش، میکروپلیت‌ها به مدت ٤٨ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند.

پس از رشد، جهت حذف سلول‌های پلانکتونی، پلیت به مدت ۵ ثانیه روی شیکر قرار گرفت و مایع رویی تخلیه شد. چاهک‌ها یک‌بار با سرم فیزیولوژی استریل شست‌وشو داده شدند. سپس به هر چاهک ۱۲۵ میکرولیتر محلول کریستال ویوله ۰/۱٪ افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه گردید. بعد از تخلیه، چاهک‌ها دو بار با سرم فیزیولوژی استریل شسته و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ٢٤ ساعت خشک شدند.

در ادامه، ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۰٪ به هر چاهک افزوده و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. میانگین OD ده چاهک برای هر سویه محاسبه شد و بر اساس رابطهٔ زیر، توان تولید بیوفیلم تعیین گردید (۱٦, ۱۷).

عدم تشکیل بیوفیلم = $-OD^{Co+} \leq OD^{Co}$

تولیدکننده بیوفیلم ضعیف = $OD^{Co+} > OD^{Co-}: \leq 2\times OD^{Co-}$

تولیدکننده بیوفیلم متوسط = $OD^{Co+} > OD^{Co-}: 2-4\times OD^{Co-}$

تولیدکننده بیوفیلم قوی = $OD^{Co}+ > OD^{Co-}: > 4\times OD^{Co-}$

استخراج RNA و تولید cDNA

برای استخراج RNA، باکتری تولیدکنندهٔ بیوفیلم طبق شرایط بهینه در پلیت‌های ٦ خانه‌ای کشت داده شد. در زمان‌های ٢٤ ساعت، ٤٨ ساعت و ٥ روز، مایع رویی (حاوی سلول‌های پلانکتونی) حذف و از سلول‌های چسبیده به کف چاهک‌ها جهت استخراج RNA استفاده گردید.

تمام نمونه‌ها با سرم فیزیولوژی استریل به کدورت نیم مک‌فارلند رسانده شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته، ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و رسوب دوباره شسته شد. استخراج RNA طبق دستورالعمل کیت RNX (سیناژن، ایران) انجام شد. غلظت و خلوص RNA توسط نانودراپ (Boeko، آلمان) در نسبت OD۲٦۰/۲۸۰ ارزیابی و غلظت نمونه‌ها به ۲۰۰ نانوگرم/میکرولیتر تنظیم شد.

برای سنتز cDNA از کیت cDNA سنتز (سیناژن، ایران) استفاده گردید. غلظت و کیفیت cDNA با همان روش اندازه‌گیری شده و به ۵۰۰ نانوگرم/میکرولیتر رسانده شد.

کیفی جهت ارزیابی شرایط PCR و عملکرد پرایمرها و cDNA

پیش از انجام Real–Time PCR، عملکرد پرایمرها و کیفیت cDNA توسط PCR کیفی بررسی شد. پرایمرهای ژن‌های هدف (lasR, rhlR, gacA, retS) و ژن مرجع (tufB به‌عنوان کنترل داخلی) با نرم‌افزار Allele ID ٦,۰ طراحی و در پایگاه NCBI مورد BLAST قرار گرفتند.

PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲ میکرولیتر مسترمیکس (یکتا تجهیز، ایران)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۵ پیکومول)، ۹ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و ۲ میکرولیتر cDNA در ۳۵ چرخه دمایی با دستگاه چرخش گر حرارتی گرادیان (اپندورف، آلمان) اجرا شد. الگوی تک‌باند حاصل کیفیت مناسب نمونه‌ها را تأیید کرد. توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. مشخصات و توالی پرایمر ها

پرایمر	توالی پرایمر از ۵`→ ۳`
tufB F	GTGAGAACGTTGGTATCCTG
tufB R	GTGGTACGGAAGTAGAACTG
gacA F	AGGTGCAGCGTGATTAAG
gacA R	GCATCTTCACGTCCATCAG
retS F	TCCCTATTTCCGCCAGAC
retS R	CCAGCTTGACCACGATTG
lasR F	TGGATGCTCAAGGACTACG
lasR R	TTCACATTGGCTTCCGAG
rhlR F	CTGGAAAAGGAAGTGCGG
rhlR R	GTAGTTCTGCATCTGGTATCG

ارزیابی بیان ژن با روش Real–Time PCR

بیان نسبی ژن‌های هدف با استفاده از دستگاه Rotor–Gene ٦۰۰۰ (کیاژن، آمریکا) و مسترمیکس سایبر گرین در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. اجزای واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۵ پیکومول)، ۱ میکرولیتر cDNA و ٤/۵ میکرولیتر آب مقطر بود.

ژن tufB به‌عنوان ژن مرجع انتخاب شد، زیرا این ژن یک ژن خانه‌دار پایدار بوده و بیان آن در شرایط مختلف رشد باکتری و در طول زمان نسبتاً ثابت گزارش شده است؛ بنابراین گزینه‌ای مناسب برای نرمال‌سازی داده‌های Real–Time PCR در مطالعات مرتبط با سودوموناس آئروژینوزا محسوب می‌شود.

همچنین، زمان صفر که معادل وضعیت پلانکتونی باکتری پیش از شروع تشکیل بیوفیلم است، به‌عنوان مرجع نرمال‌سازی زمانی انتخاب شد تا تغییرات بیان ژن‌ها در مراحل مختلف بلوغ بیوفیلم به‌صورت مقایسه‌ای و وابسته به زمان ارزیابی گردد.

برنامه حرارتی شامل ۳۵ چرخه طبق جدول ۱ بود. تحلیل منحنی ذوب جهت بررسی اختصاصی‌بودن تکثیر انجام شد. مقادیر بیان نسبی با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید.

آنالیز آماری

آنالیز آماری مطالعه با استفاده از نرم‌افزار GraphPad prism ورژن ۸ استفاده گردید. تمامی آزمایش‌های کمی تولید بیوفیلم و آنالیز بیان ژن به روش Real-Time PCR در ۱۰ تکرار تکنیکی مستقل انجام شدند. داده‌های حاصل از این تکرارها به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شده، و برای تحلیل آماری از آزمون t-test مستقل (برای مقایسه دو گروه) و ANOVA یک‌طرفه (برای مقایسه بیش از دو گروه) استفاده شد. حد آستانه معنی داری آماری $p\ value \leq ۰,۰۵$ در نظر گرفته شد و نتایج در قالب بیان حداکثر، حد میانه و حداقل ارائه گردید.

یافته‌ها

تعیین کمیت تولید بیوفیلم

نتایج حاصله از روش میکروتیتر پلیت سودوموناس ائروژینوزا ATCC۱۰۱۴۵ به نسبت سویه سودوموناس ائروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ به عنوان کنترل منفی نشان داد که سویه سودوموناس ائروژینوزا ATCC ۱۰۱۴۵ در شرایط آزمایشگاهی طراحی شده توانائی تولید بیو فیلم قوی دارد که نسبت های OD مقایسه در جدول ۳ آمده است.

جدول ۲. نتایج جذب نوری سویه کنترل مثبت به نسبت کنترل منفی جهت ارزیابی شرایط اپتیمم تست تولید بیوفیلم

	جذب نوری کنترل مثبت	جذب نوری کنترل منفی	جذب نوری کنترل مثبت به منفی	میزان تولید بیوفیلم
۱	۰/۳۶	۰/۰۸	۴/۵	+++
۲	۰/۳۲	۰/۰۶	۵/۳	+++
۳	۰/۳۹	۰/۰۸	۴/۹	+++
۴	۰/۲۸	۰/۰۸	۳/۵	++
۵	۰/۳۰	۰/۰۹	۳/۳	++
۶	۰/۴	۰/۰۷	۵/۷	+++
۷	۰/۳۱	۰/۰۷	۴/۴	+++
۸	۰/۳۸	۰/۰۸	۴/۷	+++
۹	۰/۳۷	۰/۰۶	۶/۱	+++
۱۰	۰/۳۵	۰/۰۹	۳/۹	++
میانگین	**۰/۳۴**	**۰/۸**	**۴/۶**	**+++**
قوی +++، متوسط ++، ضعیف +				

نتایج PCR کیفی جهت ارزیابی شرایط PCR و عملکرد پرایمرها و cDNA

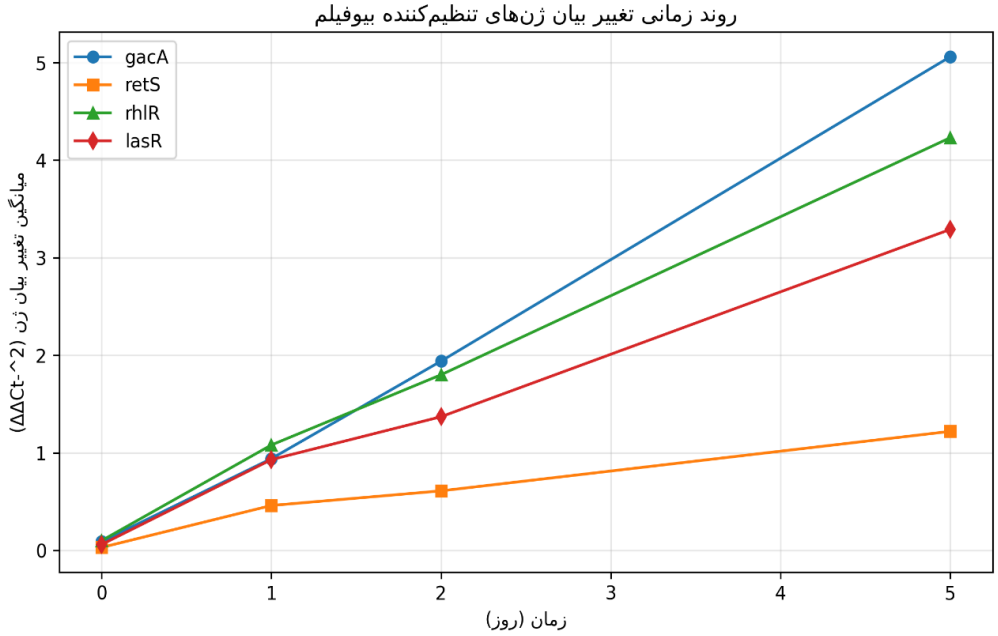
تمام آمپلیکون‌های ژن‌های مورد بررسی روی آگارز ۱٪ و با استفاده از مارکر DNA لدر ۵۰ نوکلئوتیدی الکتروفورز شدند. برای تمام ژن‌ها الگوی تک باند در محدوده وزنی موردانتظار مشاهده گردید و از کیفیت cDNA و پرایمرها اطمینان حاصل گردید.

نتایج تغییرات بیان ژن‌ها با روش Real-time PCR

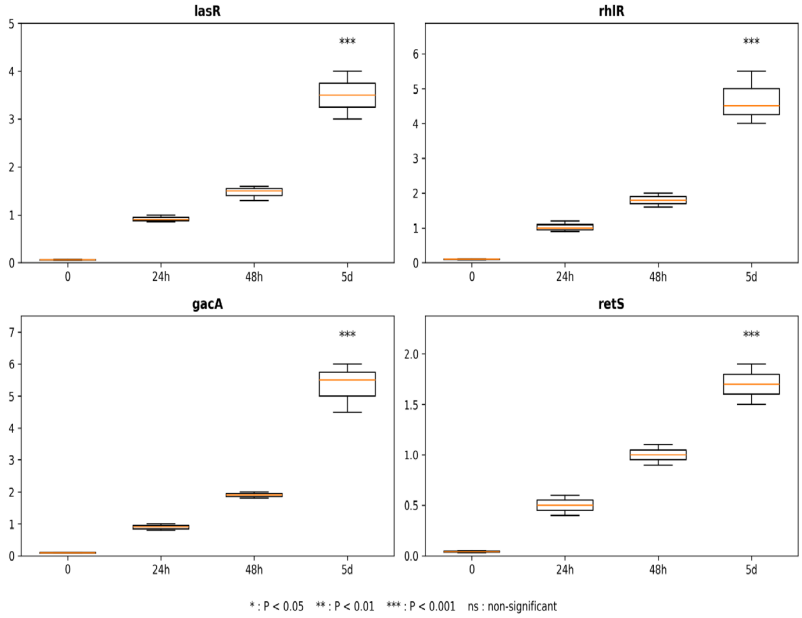
تغییرات بیان ژن‌های rhlR، lasR، retS، gacA به نسبت ژن tufB در زمان‌های صفر، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۵ روز ارزیابی گردید (تصویر ۱). نتایج نشان از افزایش بیان تمامی ژن‌ها از زمان صفر (فرم پلانکتونی) تا زمان ۵ روز (فرم بیوفیلم بالغ) داشت (P <۰/۰۰۰۱). جزئیات نتایج به‌صورت حداقل بیان، حداکثر بیان و میانگین بیان در زمان‌های مختلف در جدول ۳ آورده شده است. همچنین نسبت تغییرات بیان ژن‌ها در زمان‌های مختلف صفر به ۲۴ ساعت، صفر به ۴۸ ساعت، صفر به ۵ روز، ۲۴ به ۴۸ ساعت، ۴۸ ساعت به ۵ روز و ۲۴ ساعت به ۵ روز در تصویر ۲ نشان‌داده‌شده است.

جدول ۳. تغییرات بیان ژن های مورد مطالعه در مدت زمان بلوغ بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی

ژن	زمان	حداقل بیان	حداکثر بیان	میانگین بیان	SD	میانگین نسبت بیان به *tufB*	P value
gacA	۰	۰/۰۷	۰/۱	۰/۰۹	۰/۰۱	۰/۰۹	P <۰/۰۰۰۱
	۲۴ ساعت	۰/۷۲	۱/۰۷	۰/۹۴	۰/۱	۰/۸۹	
	۴۸ ساعت	۱/۹۳	۱/۹۷	۱/۹۴	۰/۰۱	۱/۹۵	
	۵ روز	۴/۳۲	۶/۰۴	۵/۰۶	۰/۵۴	۵/۱۳	
retS	۰	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۳	۰/۰۱	۰/۰۴	P<۰/۰۰۰۱
	۲۴ ساعت	۰/۳۳	۰/۵۷	۰/۴۶	۰/۰۷	۰/۸۹	
	۴۸ ساعت	۰/۴۱	۰/۷۵	۰/۶۱	۰/۱	۱/۹۵	
	۵ روز	۰/۹	۱/۷۹	۱/۲۲	۰/۳۲	۵/۱۳	
rhlR	۰	۰/۰۸	۰/۱	۰/۱	۰/۰۱	۰/۱	P<۰/۰۰۰۱
	۲۴ ساعت	۰/۷۲	۱/۵۳	۱/۰۸	۰/۲۸	۱/۰۹	
	۴۸ ساعت	۱/۳۹	۲/۲۴	۱/۸	۰/۲۷	۱/۷۸	
	۵ روز	۳/۴۹	۵/۸۴	۴/۲۳	۰/۷۳	۴/۶۹	
lasR	۰	۰/۰۴	۰/۰۷	۰/۰۶	۰/۰۱	۰/۰۶۶	P<۰/۰۰۰۱
	۲۴ ساعت	۰/۷۵	۱/۰۶	۰/۹۳	۰/۱۱	۰/۹۳	
	۴۸ ساعت	۱/۱۳	۱/۸	۱/۳۷	۰/۲۲	۱/۶۱	
	۵ روز	۲/۷	۴/۳۴	۳/۲۹	۰/۵۷	۳/۴۳	



تصویر ۱. روند تغییرات وابسته به زمان بیان ژن‌های تنظیم‌کننده تولید بیوفیلم شامل gacA، retS، rhlR و lasR در سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC۱۰۱٤٥ در شرایط آزمایشگاهی . نمونه‌ها در زمان صفر (فرم پلانکتونی)، ٢٤ ساعت، ٤٨ ساعت و ٥ روز (بیوفیلم بالغ) جمع‌آوری شدند. میزان بیان ژن‌ها با استفاده از روش RealTime PCR و بر اساس فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه و نسبت به ژن مرجع tufB نرمال‌سازی شد. نمودار نشان‌دهنده افزایش تدریجی و وابسته به زمان بیان تمامی ژن‌های مورد بررسی در طی فرآیند بلوغ بیوفیلم می‌باشد.



تصویر ۲. نمودارهای جعبه‌ای مقایسه بیان نسبی ژن‌های gacA، rhlR، lasR و retS در زمان‌های مختلف بلوغ بیوفیلم (۰، ٢٤ ساعت، ٤٨ ساعت و ٥ روز) در سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC۱۰۱٤٥. داده‌ها بر اساس مقادیر بیان نسبی ژن‌ها رسم شده‌اند.

بحث

در این مطالعه، تغییرات بیان ژن‌های کلیدی کنترل‌کننده تولید بیوفیلم در سویه استاندارد سودوموناس ائروژینوزا ATCC۱۰۱۴۵ طی مراحل مختلف تولید و بلوغ بیوفیلم بررسی شد. نوآوری این مطالعه در بررسی هم‌زمان و مقایسه‌ای الگوی زمانی بیان چهار ژن کلیدی تنظیم‌کننده بیوفیلم در یک چارچوب آزمایشی واحد است که امکان درک بهتر تعاملات سلسله‌مراتبی و هماهنگی این مسیرها در طول مراحل مختلف تشکیل و بلوغ بیوفیلم را فراهم می‌آورد. بیوفیلم‌ها ساختارهای پیچیده و مقاومی هستند که در برابر عوامل محیطی و درمانی مقاومت بالایی از خود نشان می‌دهند. تشکیل آن‌ها نتیجه تعامل پیچیده بین سیگنال‌های سلولی و بیان ژن‌های تنظیم‌کننده است. در سودوموناس ائروژینوزا، سیستم‌های کوئوروم سنسینگ Las و Rhl و همچنین سیستم دوجزئی GacA/S نقش حیاتی در تنظیم تولید بیوفیلم و فاکتورهای ویرولانس دارند.

نتایج Real–Time PCR نشان داد که بیان تمامی ژن‌های lasR, rhlR, gacA و retS از حالت پلانکتونیک (زمان ۰) تا بیوفیلم بالغ (روز پنجم) به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. این یافته‌ها حاکی از آن است که فرایند بلوغ بیوفیلم با افزایش تدریجی فعالیت ژن‌های تنظیم‌کننده همراه است و بیان این ژن‌ها به زمان وابسته است.

افزایش بیان lasR و rhlR که جزء سیستم‌های کوئوروم سنسینگ هستند، نشان‌دهنده تقویت تعاملات سلول به سلول و هماهنگی تولید فاکتورهای ویرولانس در طول بلوغ بیوفیلم است. این یافته با مطالعات قبلی مطابقت دارد که بیان lasR و rhlR در مراحل میکروکلونی و بلوغ بیوفیلم افزایش می‌یابد و نقش مهمی در پایداری و ساختار سه‌بعدی بیوفیلم ایفا می‌کند. به‌عنوان مثال موهان و همکارانش نشان دادند که در شرایط تولید بیوفیلم در سویه سودوموناس آئروژینوزا PO۱، هر دو ژن افزایش بیان داشتند و با اضافه‌کردن ماده آرتوکارپسین که خاصیت ضد بیوفیلم دارد بیان این ژن‌ها به‌صورت معنی‌داری کاهش یافته است (۱۸).

در یک مطالعه دیگر به بررسی شبکه‌های تنظیمی مرتبط با عوامل بیماری‌زای سودوموناس آئروژینوزا پرداخته شد و نقش کوئوروم سنسینگ را در تنظیم بیان ژن‌های ویرولانس مورد بررسی قرار داده شد. در این مطالعه نشان داده شد که هر دو ژن در تولید بیوفیلم نقش اساسی دارند؛ ولی نقش ژن rhlR در تولید بیوفیلم نسبت به lasR اهمیت بالاتری دارد (۱۹).

همچنین گزارش شده که بیان هر دو ژن در حضور ترکیبات ضد بیوفیلم به طور معنی‌داری نسبت به حالت نبود این ترکیبات در سویه PO۱ کاهش پیدا کرده است که تأییدکننده نقش مهم هر دو در شرایط تولید بیوفیلم است (۲۰).

مطالعه جسک و همکاران نشان داد که الگوهای بیان ژن در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا تحت شرایط بیوفیلم به طور مستقل تکامل یافته‌اند و نقش مهم‌تر ژن rhlR را نسبت به ژن lasR در شرایط تولید بیوفیلم نشان داد. به‌طوری که در شرایط تولید بیوفیلم بر خلاف مطالعه حاضر کاهش بیان در ژن lasR و مطابق مطالعه ما افزایش بیان rhlR نسبت به شرایط پلانکتونی مشاهده گردید (۲۱). البته نتایج مطالعه ما افزایش حدودا ٤ برابری در ژن rhlR و افزایش ۳ برابری در ژن lasR از شرایط پلاکتونی به شرایط بیوفیلم دیده شد که می تواند نشان از اهمیت بالاتر ژن rhlR در تولید بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا باشد. البته در مطالعه جسک نتایج بیشتر بر اساس ایزوله های بالینی صورت گرفت در حالیکه مطالعه حاضر روی سویه استاندارد انجام شد که می تواند حاکی از تفاوت در نحوه کنترل بیان ژن در ایزوله‌های جدا شده از بالین به نسبت سویه‌های استاندارد باشد.

در مطالعه حاضر افزایش بیان حدود ۵ برابری در ژن gacA نیز مشاهده شد که حاکی از نقش مرکزی این سیستم دو جزئی در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلم است. نتایج مطالعات مشابه هم حاکی از نقش پر رنگ این ژن در کاهش تحرک باکتری و افزایش تولید کننده بیوفیلم در تغییر فاز از حالت پلانکتونی به فاز بیوفیلم دارد و حذف این ژن در سویه‌های موتانت باعث شد تا تولید بیوفیلم کاهش معنی داری داشته باشد (۲۲, ۲۳).

جالب‌توجه است که ژن retS که به طور شناخته شده نقش مهاری بر برخی مسیرهای بیوفیلم دارد، نیز در طول زمان افزایش بیانی به‌اندازه gacA نشان داد. در تقریباً تمامی مطالعات مرتبط نقش این ژن در سرکوب تولید بیوفیلم ذکر شده است که نتایج مطالعه حاضر را به چالش می‌کشد. لازم است تأکید شود که این نتیجه‌گیری صرفاً مبتنی بر داده‌های بیان ژن است و هیچ‌گونه ارزیابی عملکردی یا فنوتیپی مستقیم از نقش این ژن انجام نشده است. ازآنجاکه بیان یک ژن الزاماً به معنای فعالیت عملکردی آن نیست، احتمال دارد افزایش بیان retS بخشی از یک شبکه تنظیمی جبرانی و پیچیده باشد که طی آن ژن‌های فعال‌کننده و مهارکننده به‌صورت هماهنگ پایداری و سازگاری بیوفیلم را مدیریت می‌کنند.

مقایسه نسبت تغییرات بیان ژن‌ها در زمان‌های مختلف نشان داد که بیشترین تغییرات در فاصله زمانی ۰ تا ۵ روز رخ داده است، که نشان‌دهنده اهمیت مراحل اولیه و میانی تولید بیوفیلم در ایجاد بلوغ کامل و پایداری آن است. این یافته می‌تواند راهنمایی برای هدف‌گیری ژن‌ها در طراحی درمان‌های ضدبیوفیلم باشد. در این مطالعه محدودیت‌های شامل استفاده از یک سویه استاندارد و شرایط آزمایشگاهی کنترل شده وجود داشت، که ممکن است به طور کامل رفتار بیوفیلم در محیط بالینی را منعکس نکند. بنابر این مطالعات آینده می‌توانند شامل سویه‌های بالینی و بررسی تعامل ژن‌ها با شرایط استرس محیطی یا حضور آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. یکی دیگر از محدودیت‌های مطالعه حاضر آن است که تحلیل‌ها صرفاً بر اساس داده‌های بیان ژن انجام شده و ارزیابی عملکردی یا فنوتیپی مستقیم از بیوفیلم صورت نگرفته است. بنابراین، اگرچه افزایش بیان ژن‌های تنظیم‌کننده در طی بلوغ بیوفیلم مشاهده شد، تعمیم این یافته‌ها به عملکرد واقعی بیوفیلم نیازمند انجام مطالعات تکمیلی شامل سنجش‌های فنوتیپی، آنالیز موتانت‌ها و بررسی‌های ساختمانی بیوفیلم در آینده می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تولید و بلوغ بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا نتیجه تغییرات زمان‌مند بیان ژن‌های کلیدی است و بیان هم‌زمان ژن‌های فعال‌کننده و مهاری بیانگر شبکه پیچیده تنظیم‌کننده در این باکتری است. این دانش می‌تواند مبنایی برای طراحی راهکارهای درمانی هدفمند علیه بیوفیلم‌ها فراهم کند.

اعلان‌ها

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز به‌خاطر حمایت از این طرح پژوهشی و همچنین گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی البرز به دلیل در اختیار قراردادن فضای آزمایشگاه برای این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی بین نویسندگان وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی البرز (IR.ABZUMS.REC.۱۳۹۸,۰٦٦) تأیید شده است. در طول تحقیق، قوانین اعلامیه هلسینکی رعایت شده است.

استفاده از هوش مصنوعی: در نگارش این مقاله از هوش مصنوعی استفاده نشده است.

مشارکت نویسندگان: طراحی پروژه توسط محمد محمدزاده، اجرای عملی پروژه توسط سیاوش آینه‌سازی و پرستو شریفیان، نگارش مقاله توسط محمد محمدزاده و سیاوش آینه‌سازی، مشارکت در نگارش مقاله و ویرایش ادبی توسط مهناز توکلی.

References

1. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms. PLoS pathogens. 2008;4(11):e1000213. [DOI:10.1371/journal.ppat.1000213]
2. Reza G, Behnaz S. Effects of Oxygen on In-vitro Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance of Pseudomonas aeruginosae. 2013.
3. Wagner VE, Iglewski BH. P. aeruginosa biofilms in CF infection. Clinical reviews in allergy & immunology. 2008;35(3):124-34. [DOI:10.1007/s12016-008-8079-9]
4. Telles JP, Cieslinski J, Tuon FF. Daptomycin to bone and joint infections and prosthesis joint infections: a systematic review. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2019;23:191-6. [DOI:10.1016/j.bjid.2019.05.006]
5. Frausing MHJP, Nielsen JC, Johansen JB, Jørgensen OD, Olsen T, Kristensen J, et al. Cardiac surgery in patients with cardiac implantable electronic devices and risk of device infections: a nationwide nested case-control study. Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology. 2023;66(4):897-904. [DOI:10.1007/s10840-022-01236-7]
6. Wang S, Payne GF, Bentley WE. Quorum sensing communication: molecularly connecting cells, their neighbors, and even devices. Annual review of chemical and biomolecular engineering. 2020;11(1):447-68. [DOI:10.1146/annurev-chembioeng-101519-124728]
7. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BH. Pseudomonas aeruginosa biofilms. International journal of molecular sciences. 2020;21(22):8671. [DOI:10.3390/ijms21228671]
8. Capatina D, Lupoi T, Feier B, Blidar A, Hosu O, Tertis M, et al. Label-free electrochemical aptasensor for the detection of the 3-O-C12-HSL quorum-sensing molecule in Pseudomonas aeruginosa. Biosensors. 2022;12(7):440. [DOI:10.3390/bios12070440]
9. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Signal transduction and targeted therapy. 2022;7(1):199. [DOI:10.1038/s41392-022-01056-1]
10. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in Pseudomonas aeruginosa. Protein & cell. 2015;6(1):26-41. [DOI:10.1007/s13238-014-0100-x]
11. Duplantier M, Lohou E, Sonnet P. Quorum sensing inhibitors to quench P. aeruginosa pathogenicity. Pharmaceuticals. 2021;14(12):1262. [DOI:10.3390/ph14121262]
12. Song H, Li Y, Wang Y. Two-component system GacS/GacA, a global response regulator of bacterial physiological behaviors. Engineering Microbiology. 2023;3(1):100051. [DOI:10.1016/j.engmic.2022.100051]
13. Yu X, Chen M, Jiang Z, Hu Y, Xie Z. The two-component regulators GacS and GacA positively regulate a nonfluorescent siderophore through the Gac/Rsm signaling cascade in high-siderophore-yielding Pseudomonas sp. strain HYS. Journal of bacteriology. 2014;196(18):3259-70. [DOI:10.1128/JB.01756-14]
14. Kaler KMR, Nix JC, Schubot FD. RetS inhibits Pseudomonas aeruginosa biofilm formation by disrupting the canonical histidine kinase dimerization interface of GacS. Journal of Biological Chemistry. 2021;297(4). [DOI:10.1016/j.jbc.2021.101193]
15. Liu C, Sun D, Zhu J, Liu W. Two-component signal transduction systems: a major strategy for connecting input stimuli to biofilm formation. Frontiers in Microbiology. 2019;9:3279. [DOI:10.3389/fmicb.2018.03279]
16. Coffey BM, Anderson GG. Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. Pseudomonas methods and protocols: Springer; 2014. p. 631-41. [DOI:10.1007/978-1-4939-0473-0_48]

17. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of microbiological methods. 2000;40(2):175-9. [DOI:10.1016/S0167-7012(00)00122-6]
18. Mohan MS, Salim SA, Ranganathan S, Parasuraman P, Anju V, Ampasala DR, et al. Attenuation of Las/Rhl quorum sensing regulated virulence and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa PAO1 by Artocarpesin. Microbial Pathogenesis. 2024;189:106609. [DOI:10.1016/j.micpath.2024.106609]
19. Wang Y, Gao L, Rao X, Wang J, Yu H, Jiang J, et al. Characterization of lasR-deficient clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Scientific Reports. 2018;8(1):13344. [DOI:10.1038/s41598-018-30813-y]
20. Vetrivel A, Vetrivel P, Dhandapani K, Natchimuthu S, Ramasamy M, Madheswaran S, et al. Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and virulence factor production in Pseudomonas aeruginosa PAO1 by selected LasR inhibitors. International Microbiology. 2023;26(4):851-68. [DOI:10.1007/s10123-023-00338-0]
21. Jeske A, Arce-Rodriguez A, Thöming JG, Tomasch J, Häussler S. Evolution of biofilm-adapted gene expression profiles in lasR-deficient clinical Pseudomonas aeruginosa isolates. NPJ biofilms and microbiomes. 2022;8(1):6. [DOI:10.1038/s41522-022-00268-1]
22. Song H, Li Y, Wang Y. Two-component system GacS/GacA, a global response regulator of bacterial physiological behaviors. Eng Microbiol 3: 100051. 2022. [DOI:10.1016/j.engmic.2022.100051]
23. Ali-Ahmad A, Fadel F, Sebban-Kreuzer C, Ba M, Pélissier GD, Bornet O, et al. Structural and functional insights into the periplasmic detector domain of the GacS histidine kinase controlling biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa. Scientific reports. 2017;7(1):11262. [DOI:10.1038/s41598-017-11361-3]