

Research Paper

Evaluating the Antiviral Activities of Human Cathelicidin LL-37 Peptide Against Rotavirus in Vitro



Zohreh Hosseini¹, Angila Ataei-Pirkooh², *Mohammad Bagher Habibi Najafi¹, Masoud Yavarmanesh¹

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Department of Virology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.



Citation Hosseini Z, Ataei-Pirkooh A, Bagher Habibi Najafi M, Yavarmanesh M . Evaluating the Antiviral Activities of Human Cathelicidin LL-37 Peptide Against Rotavirus in Vitro. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences. 2019; 23(3):214-225. <https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.3.214>

doi <https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.3.214>



Received: 22 Feb 2018

Accepted: 13 Dec 2018

Available Online: 01 Aug 2019

Keywords:

Cathelicidin,
Rotavirus, Antiviral
peptide, LL-37

ABSTRACT

Background Rotavirus is the most prevalent cause of severe gastroenteritis, hospitalizations, and deaths among infants and young children, globally. No specific antiviral drug is available against rotavirus infection.

Objective The current study aimed to assess the antiviral effect of human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 on rotavirus infection in vitro.

Methods This study was conducted in the laboratory conditions of Iran University of Medical Sciences, in Tehran City, Iran. The neutral red assay was performed to assess the cytotoxicity of different concentrations of the peptide on the MA-104 cell line, and its antiviral activity was determined by TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) assay.

Findings According to the cytotoxicity results, viability maintained more than 90% up to the concentration of 50 µg/mL of LL-37 peptide. The antiviral assays results revealed that the concentration of 50 µg/mL LL-37 peptide could significantly reduce (3.36 log₁₀ TCID₅₀) the production of rotavirus progeny when administered before virus exposure (P= 0.0001). However, no inhibitory effect was detected after cell exposure to virus.

Conclusion The obtained data suggested that LL-37 can be considered as a new antiviral agent for protecting infants and young children against gastroenteritis caused by rotaviruses. However, further in vivo investigations are required to confirm this finding.

Extended Abstract

1. Introduction

Rotavirus infection is the most common cause of severe gastroenteritis among children under 5; it is responsible for 440000 deaths worldwide annually. Currently, no effective antiviral drug or specific treatment exists for this infection [1, 2]. Hence, the development of novel ther-

apeutics is of significant interest. The present in vitro study aimed to evaluate the antiviral activity of the only human cathelicidin LL-37 antimicrobial peptide against rotavirus infection.

2. Materials and Methods

The rotavirus stock was prepared by infecting the cell monolayers with the virus at the multiplicity of infection (MOI) of 1 (1 viral particle per cell). The infectious vi-

* Corresponding Author:

Mohammad Bagher Habibi Najafi

Address: Department of Virology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Tel: +98 (915) 3139466

E-Mail: habibi@um.ac.ir

rus titer was then determined by tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀), according to the Reed and Muench method [24]. We used the neutral red uptake assay to evaluate the cytotoxicity of LL-37 peptide on MA-104 cells. Optical density (OD) was subsequently measured at 550 nm using a microplate reader. We also examined the *in vitro* antiviral potency of the LL-37 against rotavirus infection before and after the infection.

For pre-treatment assay, the rotavirus stock was serially diluted in DMEM (dulbecco's modified eagle medium) to prepare 100 TCID₅₀/mL of rotavirus suspension. The media were then removed, and the cultured cells were washed with phosphate buffer saline (PBS). Next, the cells were pre-treated with the different non-cytotoxic concentrations of the LL-37 for 3 hours before the infection. After that, the peptide solutions were removed, and cells were washed with PBS, and then infected with 100 TCID₅₀/mL of rotavirus. After one hour incubation, the inoculums were discarded, the cells were washed with PBS to remove any unattached virus, and overlaid with the serum-free medium at 37°C in 5% CO₂ for 72 hours.

For post-treatment assay, the monolayers were washed with PBS and then incubated with 100 TCID₅₀ of rotavirus suspension. After one hour incubation, the inoculums were discarded, and LL-37 in serum-free DMEM was added at various non-toxic concentrations. Finally, the treated cells were placed at 37°C in 5% CO₂ for 72 hours.

The plates were being observed by inverted microscope daily to detect any prevention of cytopathic effect (CPE) by the peptide. At post-72 hours incubation time (when virus control produced an obvious CPE), virus titer was calculated by the TCID₅₀ method. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism. Statistical significance was assessed using the one-way analysis of variance (ANOVA) and P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

The cells were treated with various peptide concentrations to examine cytotoxicity. According to the results, LL-37 (up to 50 µg/mL) produced no toxicity in MA-104 cells, and cell viability was maintained above 90% up to 50 µg/mL of LL-37. Therefore, LL-37 was used in activities related to antiviral assays (AVA) at concentrations showing ≤10% cytotoxicity. To assess the antiviral potential of LL-37 against rotavirus, different concentrations of the peptide before/after infection with rotavirus treated cells, and then assessed by determination of viral titer by TCID₅₀ after 72 hours.

According to the findings, LL-37, when cells were exposed to the peptide before virus infection, significantly inhibited the CPE associated with rotavirus infection in infected cells *in vitro*. That is LL-37 pre-treatment (50 µg/mL) of MA-104 cells resulted in a significant reduction of CPE as rotavirus shows a distinct CPE characterized by cell rounding, detachment of cells from the monolayer, and lytic foci. The CPE formation was affected by peptide pre-treatment of monolayers before infection. In contrast, treatment of rotavirus-infected MA-104 cells (post-infection) had minimal impact on rotavirus infection. Moreover, this pre-infection exposure of cells to LL-37 resulted in a significant, concentration-dependent reduction in infectivity when compared with the virus alone, so that three hours pre-treatment of cells with 50 µg/mL LL-37 before infection reduced virus titer by 3.36 log₁₀ TCID₅₀ compared to the virus control group (P=0.0001).

4. Conclusion

Differences in the efficacy of LL-37 at reducing rotavirus infection before and after the infection may be partly due to the time of addition and mainly to the LL-37 mode of action. One possible hypothesis may be masking of epithelial cell surface receptors, which prevents attachment and subsequent virus entry into the cells [27]. Although the present study has been one of the first attempts to examine the antiviral activity of LL-37 peptide against a non-enveloped virus, the specific mechanism(s) by which LL-37 acts against rotavirus is not fully understood yet. Some evidence suggests the involvement of activities other than direct damage to viral envelopes [30]. To sum up, it seems that LL-37 peptide may be utilized as a prophylactic agent in the management of acute rotavirus gastroenteritis. However, further *in vivo* investigations are required to confirm the present findings.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This research did not involve interaction with human samples.

Funding

This research is based on the Phd. thesis of Zohreh Hosseini in The Ferdowsi University of Mashhad financially supported this research (Proposal No. 39199).

Authors' contributions

Performed the experiments, collected the data, conceived , designed the analysis, and wrote the paper: Zohre Hosseini; Supervised the experiments, determined the study methods, identified the path for data collection, provided lab equipment, helped to resolve technical problems, and edited the paper: Angila Ataei-Pirkooh; Provided financial support, supervised the experiments, monitored research progress, suggested a timetable for writing up, gave guidance on research, and edited the paper: Mohammad Bagher Habibi Najafi; Helped in selecting topic, supervised the experiments, and checked progress regularly: Masoud Yavarmanesh.

Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Ahmad Tavakkoli for his technical assistance and help with this research over the past three years, and Dr. Davoud Javanmard for helpful advice and comments.

بررسی فعالیت ضدویروسی پپتید کاتالسیسیدین انسانی LL-37 بر روتاویروس در محیط برون تنی

زهره حسینی^۱، آنژیلا عطائی پیرکوه^۲، *محمدباقر حبیبی نجفی^۱، مسعود یاورمنش^۱

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲- گروه ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۳۱ شهریور ۱۳۹۷
تاریخ پذیرش: ۲۲ آذر ۱۳۹۷
تاریخ انتشار: ۱۰ مرداد ۱۳۹۸

زمینه: روتاویروس شایع‌ترین عامل التهاب عفونی حاد معده و روده در میان نوزادان سراسر جهان محسوب می‌شود که با مواردی از بستری و مرگ‌ومیر همراه است. هم‌اکنون هیچ داروی ضدویروسی خاصی علیه عفونت ناشی از این ویروس وجود ندارد.

هدف: این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات ضدویروسی پپتید کاتالسیسیدین LL-37 علیه عفونت روتاویروس در سیستم کشت سلولی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی در گروه ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است. در این مطالعه تجربی ابتدا سمیت غلظت‌های مختلف پپتید برای سلول‌های MA-104 جهت تعیین محدوده غلظت مناسب پپتید برای سلول‌ها در آزمون نوترال رد بررسی شد. سپس در محدوده غلظت‌های غیرسمی پپتید، پیش‌تیمار سلول‌های کشت‌شده با پپتید و نیز تیمار سلول‌ها با پپتید پس از آلوده کردن سلول‌ها با ویروس و ایجاد عفونت انجام گرفت و در هر مرحله، اثر ضدویروسی آن با اندازه‌گیری تیترا عفونت‌زایی ویروس به روش دز عفونی‌کننده ۵۰ درصد کشت سلولی (TCID₅₀) ارزیابی شد.

یافته‌ها: طبق نتایج آزمون بررسی سمیت، حیات سلول‌ها در بالاترین غلظت مورد استفاده (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از پپتید LL-37 تا بیش از ۹۰ درصد حفظ شد. نتایج تست‌های بررسی اثرات ضدویروسی نیز نشان دادند در پیش‌تیمار سلول‌ها با پپتید، غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پپتید توانست به طور قابل ملاحظه‌ای تولید ویرون‌های عفونی روتاویروس را به اندازه ۳/۳۶ لگاریتم کاهش دهد (P=۰/۰۰۱). با این حال هیچ‌گونه اثر ضدویروسی، زمانی که LL-37 بعد از آلودگی سلول‌ها با روتاویروس اضافه شد، قابل مشاهده نبوده است.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد پپتید LL-37 را می‌توان به عنوان یک عامل ضدویروسی جدید جهت پیشگیری از التهاب ناشی از عفونت روتاویروس در کودکان در نظر گرفت. با وجود این جهت تأیید یافته‌های این مطالعه، بررسی‌های بیشتری به‌خصوص در شرایط درون تنی (در موجود زنده) مورد نیاز است.

کلیدواژه‌ها:

کاتالسیسیدین،
روتاویروس، پپتید
ضدویروسی، LL-37

مقدمه

پنج سال و حدود ۴۵۳ هزار مورد مرگ در کل جهان می‌شود [۲]. عفونت اغلب مدفوعی دهانی و عموماً از طریق غذا، سطوح، دست‌ها و اسباب‌بازیهای آلوده و احتمالاً تنفس از فرد به فرد انتقال می‌یابد [۳]. روتاویروس‌ها، انتروسیست‌های بالغ موجود در رئوس پرزهای روده کوچک را آلوده می‌کنند و با تکثیر در سیتوپلاسم آن‌ها غالباً به تب، اسهال آبکی شدید، استفراغ و درد شکمی در کودکان منجر می‌شوند [۴].

در حال حاضر، درمان اسهال ویروسی بر اساس تزریق داخل وریدی مایعات است که به طور موفقیت‌آمیزی طول دوره و شدت اسهال را کاهش می‌دهد. عفونت روتاویروس تاکنون درمان دارویی خاصی نداشته است و چالش‌های قابل توجهی در مسیر توسعه عوامل ضدویروسی جدید باقی مانده است [۵، ۶].

روتاویروس^۱، ویروس فاقد پوشش با ژنوم ریبونوکلیتیک اسید دو رشته و متعلق به خانواده رئوویریده^۲ است. روتاویروس شایع‌ترین علت التهاب عفونی حاد معده و روده در کودکان کمتر از پنج سال هم در کشورهای توسعه‌یافته و هم کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود. این بیماری یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر شیرخواران و کودکان کم‌سن‌وسال در سراسر جهان است [۷]. عفونت روتاویروس سالانه باعث حدود ۱۱۱ میلیون اپیزود گاستروانتریت^۳ حاد در کودکان کمتر از

1. Rotavirus
2. Reoviridae
3. Gastroenteritis

* نویسنده مسئول:

محمدباقر حبیبی نجفی

نشانی: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی.

تلفن: ۳۱۳۹۴۶۶ (۹۱۵) ۹۸+

رایانامه: habibi@um.ac.ir

به عنوان عوامل ضدویروسی مؤثری مطرح شده است که از طریق مهار تکثیر ویروس در داخل سلول میزبان یا از طریق مهار ورود ذره^{۱۲} ویروسی در خارج از سلول میزبان، عمل خود را انجام می‌دهند. مشخص شده است که پپتید LL-37 اثرات مهاری مستقیمی را علیه ویروس‌های مختلف اعمال می‌کند [۲۲، ۲۳]. مطالعات روی خصوصیات ضدقارچی و ضدباکتریایی آن تا حدی انجام شده است و اطلاعات در این زمینه در دسترس است، اما به دلیل فقدان اطلاعات کافی در ارتباط با تأثیر این پپتید روی ویروس‌ها، به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است. در مطالعه حاضر امکان استفاده از این پپتید را در کنترل عفونت ناشی از روتاویروس و قابلیت ضدویروسی آن را در عفونت‌زایی این ویروس در سیستم کشت سلولی بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع آزمایشگاهی برون‌تنی^{۱۳} است. پپتید LL-37 با توالی LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFL-RNLVPRTES و خلوص بالای ۹۵ درصد از شرکت اینوواژن^{۱۴} سوئد خریداری شد. این پپتید دارای ۳۷ اسیدآمینه است. طبق دستورالعمل شرکت سازنده، پپتید مذکور که به صورت پودر لیوفیلیزه در ویال قرار داشت، با یک میلی‌لیتر آب دیونیزه به صورت محلول درآمد تا محلول استوک نهایی با غلظت هزار میکروگرم در میلی‌لیتر از این پپتید فراهم شود. جهت ارزیابی سمیت سلولی و خواص ضدویروسی این پپتید، غلظت‌های مختلفی از آن در محیط کشت سلولی تهیه و تا انجام آزمایشات بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

رده سلولی MA-104 (سلول‌های اپیتلیال کلیه میمون سبز آفریقای) از بانک سلولی گروه ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران فراهم شد. برای رشد سلول‌ها از محیط کشت سلولی DMEM^{۱۵} حاوی ۸ تا ۱۰ درصد سرم جنین گاوی^{۱۶} و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین استفاده شد. سپس فلاسک‌های کشت سلولی جهت رشد و تشکیل مونولایر سلولی در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با جریان پنج درصد دی‌اکسید کربن قرار داده شدند.

سویه SA-11 روتاویروس نیز از گروه ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران فراهم شد. جهت کشت روتاویروس، مونولایر سلولی MA-104 در فلاسک‌های کشت با حجم ۲۵ سانتی‌متر مکعب، با مقدار ۱۰۰ / TCID₅₀^{۱۷} میلی‌لیتر از سوسپانسیون روتاویروس آلوده شدند. سپس این فلاسک‌ها ۴۸ ساعت

پپتیدهای ضد میکروبی^۴، اولیگوپپتیدهای زنجیره کوتاه (با تعداد متغیری از ۵ تا ۱۰۰ آمینواسید) هستند که علیه بسیاری از عوامل بیماری‌زا^۵، از ویروس‌ها تا انگل‌ها، طیف وسیعی از فعالیت‌های ضد میکروبی را نشان می‌دهند. این پپتیدها در بسیاری از موجودات زنده از پستانداران تا گیاهان و حتی بندپایان یافت می‌شوند [۷]. پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان مولکول‌های سیستم ایمنی ذاتی (طبیعی) دفاعی میزبان، اولین خط دفاعی علیه عوامل بیماری‌زا هستند و همچنین به پاسخ‌های ثانویه ایمنی اکتسابی منجر می‌شوند [۸]. تا به حال نزدیک به ۲۳۰۰ پپتید ضد میکروبی در بانک داده پپتیدهای ضد میکروبی ثبت شده‌اند. دو گروه مهم و عمده پپتیدهای ضد میکروبی در پستانداران، دفنسنین‌ها^۹ و کاتلیسیدین‌ها^{۱۰} هستند [۹].

از لحاظ ساختاری، کاتلیسیدین‌ها از یک انتهای آمینی شدیداً محافظت‌شده و یک انتهای کربوکسیلی شدیداً متغیر با خاصیت ضد میکروبی تشکیل شده‌اند [۱۰]. تنها کاتلیسیدین انسانی، پروپیتید^{۱۱} hCAP18 است که به دنبال بیان در سلول‌های نوتروفیل و اگزوسیتوز، توسط آنزیم پروتئیناز^{۱۲} متحمل شکست آنزیمی می‌شود. در اثر شکست، از ناحیه کاتیونیک انتهای کربوکسیلی، پپتید باقی با فعالیت ضد میکروبی به نام LL-37 متشکل از ۳۷ اسیدآمینه حاصل می‌شود. قطعه پپتیدی حاصل به دلیل طیف وسیع فعالیت‌های ضد میکروبی و نقش در تعدیل پاسخ‌های ایمنی و التهابی در انسان، به طور گسترده مطالعه و بررسی شده است. پپتید LL-37 علاوه بر نوتروفیل‌ها، در بسیاری سلول‌های ایمنی مانند مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و نیز سلول‌های اپیتلیال تولید می‌شود [۱۱، ۱۲].

فعالیت ضد میکروبی پپتید LL-37 علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها و اثر ضدقارچی آن در عفونت کاندیدا گزارش شده است [۱۳-۱۷]. علاوه بر اثرات ضدقارچی و ضدباکتریایی LL-37 شامل تخریب غشا، از اثرات ضدویروسی ثابت شده LL-37 می‌توان به جلوگیری از تکثیر ویروس نقص ایمنی اکتسابی تیپ ۱^{۱۱}، جلوگیری از ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱^{۱۱}، جلوگیری از تکثیر ویروس واکسینیا و برخی سروتیپ‌های آدنووویروس در غلظت‌های مشخص از پپتید ضد میکروبی LL-37 اشاره کرد [۱۸-۲۱].

خواص ضدباکتریایی پپتیدها به طور گسترده بررسی شده است، اما اطلاعات در مورد خواص ضدویروسی آن‌ها به اندازه کافی در دسترس نیست. در حال حاضر، اهمیت این پپتیدها

4. Antimicrobial peptides (AMPs)
5. Pathogen
6. Defensins
7. Cathelicidins
8. Pro-peptide
9. Proteinase 3
10. HIV-1
11. HSV-1

12. Particle
13. In vitro experimental study
14. Innovagen
15. Dulbecco's modified eagle's medium
16. Fetal bovine serum (FBS)
17. Tissue culture infectious dose 50%

بافری فسفات استریل^{۲۴} شست‌وشو شدند. سپس به تمامی چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگی نوترال‌رد با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شد و پلیت‌ها مجدداً سه ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در ادامه، محتویات چاهک‌ها تخلیه شد و سلول‌ها دوبار با محلول بافر فسفات به‌آرامی شست‌وشو داده شدند. سپس رنگ موجود در سلول‌ها با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از محلول رنگ‌بر (محلولی متشکل از یک درصد اسیداستیک، ۵۰ درصد اتانول و ۴۹ درصد آب مقطر) از سلول‌ها خارج شد. پلیت‌ها ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفتند و سپس ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار داده شدند. در انتها جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر الایزا (Hyperion MPR4+ ساخت کشور آلمان) قرائت شد و درصد حیات سلولی در مورد غلظت هر کدام از ترکیبات در مقایسه با نتایج چاهک‌های کنترل سلول محاسبه شد.

سه ساعت قبل از آلوده کردن سلول‌ها با روتاویروس، سوسپانسیون حاوی غلظت‌های مختلف پپتید در محدوده غیرسمی برای سلول‌ها به مونولایر سلولی MA-104 اضافه شد. همچنین چاهک‌های سلولی نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند که به جای سوسپانسیون پپتیدی، سه ساعت با محیط کشت سلولی مجاورت داشتند. پس از گذشت این مدت انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مختلف پپتید، محتویات چاهک‌ها تخلیه و سلول‌ها سه‌بار با بافر فسفات استریل شست‌وشو داده شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 100TCID50 روتاویروس به تمامی چاهک‌ها اضافه شد. پلیت‌ها یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند و سپس محتویات هر چاهک تخلیه و سلول‌ها سه‌بار با بافر فسفات استریل شست‌وشو داده شدند. در ادامه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت سلولی فاقد سرم به تمامی چاهک‌ها اضافه شد. پس از بروز آثار تخریب سلولی در چاهک‌های کنترل ویروس، محتویات تمامی چاهک‌های پلیت‌های ۹۶‌خانه برداشت شد و جهت بررسی کاهش عیار ناشی از فعالیت ضد روتاویروسی پپتید LL-37 قبل از آلودگی سلول‌ها به ویروس (پیش‌تیمار سلول‌ها با پپتید)، تیترا (عیار) عفونی محتویات هر چاهک به روش TCID50 سنجیده شد.

ابتدا مونولایر سلولی MA-104 در چاهک‌های پلیت‌های ۹۶‌خانه‌ای تهیه شد. سپس سلول‌ها یک‌بار با محلول استریل بافر فسفات شست‌وشو داده شدند و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 100TCID50 روتاویروس به تمامی چاهک‌ها اضافه شد. پلیت‌ها یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا عمل جذب ویروس به داخل سلول انجام شود. در ادامه پلیت‌ها خارج شدند و سلول‌ها سه‌بار با بافر فسفات استریل شسته شدند تا ویروس‌های اتصال نیافته از چاهک‌ها خارج شوند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف پپتید تهیه شده در محیط

در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای جریان پنج درصد دی‌اکسیدکربن قرار داده شدند. بعد از گذشت این مدت و ظهور آثار تخریب سلولی^{۱۸} ناشی از عفونت روتاویروس در سلول‌ها، مایع روئی^{۱۹} حاوی ویروس، از فلاسک‌های کشت سلولی برداشت و در لوله‌های انجماد^{۲۰} مجزا تقسیم شد و در نهایت جهت استفاده در آزمایشات بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. عیار ویروس نیز به روش TCID50 سنجیده شد.

جهت تعیین عیار عفونی روتاویروس به روش TCID50، مونولایری از سلول‌های MA-104 در یک پلیت ۹۶‌چاهکی تهیه شد. بدین ترتیب که در هر چاهک به میزان 1×10^4 سلول وارد شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از محیط کشت خارج و ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت از رقت‌های سریالی استوک ویروس به تمامی چاهک‌ها اضافه شد. سپس پلیت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا عمل جذب ویروس‌ها به سلول صورت گیرد. بعد از گذشت این مدت، محتویات هر چاهک تخلیه و با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم پر شدند. پلیت این‌بار ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. سپس با توجه به آثار تخریب سلولی ظاهر شده در چاهک‌ها، عیار ویروس بر حسب TCID50 میلی‌لیتر به روش راماکریشان^{۲۱} محاسبه شد [۲۴]. در روش رنگ‌آمیزی حیاتی نوترال‌رد^{۲۲}، فقط سلول‌های زنده رنگ می‌گیرند. رنگ نوترال‌رد می‌تواند از غشای پلاسمایی سلول عبور کند و در لیزوزوم سلول‌های زنده متراکم شود. جذب نوترال‌رد توسط سلول‌های زنده به تمامیت و یکپارچگی^{۲۳} غشای لیزوزوم زنده بستگی دارد و غشای لیزوزوم سلول‌های مرده قادر به جذب رنگ نیستند. بنابراین مقدار رنگ نوترال‌رد جذب شده توسط سلول‌های زنده، متناسب با تعداد سلول‌های زنده است.

ابتدا سوسپانسیون سلولی MA-104 با غلظت $1/5 \times 10^5$ عدد سلول در هر میلی‌لیتر تهیه و به هر چاهک از میکروپلیت‌های ۹۶‌خانه به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول اضافه شد. سپس پلیت‌های ۹۶‌خانه، ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا مونولایر سلولی در کف هر چاهک از پلیت‌ها تشکیل شود. بعد از تشکیل مونولایر سلولی، محیط موجود در هر چاهک خارج شد و غلظت‌های مختلف از پپتید به هر چاهک افزوده شد. چاهک‌هایی نیز به عنوان کنترل سلولی در نظر گرفته شدند که تنها حاوی محیط کشت DMEM بودند. پلیت‌ها ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت این مدت، محتویات چاهک‌ها خارج شد و سلول‌ها دوبار با محلول

18. Cytopathic effects (CPE)

19. Supernatant

20. Cryovials

21. Ramakrishnan

22. Neutral Red

23. Integrity

24. Phosphate buffer saline (PBS)

جدول ۱. نتایج سمیت غلظت‌های مختلف پپتید LL-37 روی سلول‌های MA-104 به روش نوترال‌رد در مقایسه با کنترل سلولی طی آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه

غلظت پپتید (میکروگرم/میلی‌لیتر)	حیات سلولی (درصد)	معنی‌داری
۰/۱	۱۰۰	۰/۹
۰/۵	۱۰۰	۰/۹
۱	۱۰۰	۰/۹
۵	۹۹/۲۳	۰/۵
۱۰	۹۸/۴۷	۰/۰۴*
۲۰	۹۷/۵۰	۰/۰۰۰۷*
۳۰	۹۶/۵۷	۰/۰۰۰۱*
۴۰	۹۳/۷۳	۰/۰۰۰۱*
۵۰	۹۲/۱۷	۰/۰۰۰۱*

* سطح معنی‌داری $P < 0/05$

مجله علمی
دانشگاه علوم پزشکی قزوین

آزمون‌های ارزیابی فعالیت ضدویروسی بعدی استفاده شدند. این نتایج نشان داده است سمیت سلولی پپتید LL-37 در محدوده غلظت بین ۱۰ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$).

نتایج آزمون‌های بررسی اثرات ضدویروسی نشان می‌دهد هیچ‌گونه اثر ضدویروسی در زمانی که پپتید LL-37 بعد از آلودگی سلول‌ها با روتاویروس اضافه شد، قابل مشاهده نبوده است و اثرات مهار ویروسی تنها زمانی مشاهده شد که سلول‌ها سه ساعت با پپتید LL-37 (قبل از آلودگی سلول‌ها با روتاویروس) پیش‌تیمار شده بودند. همچنان که در شکل شماره ۱ به طور واضح مشخص است، با افزایش غلظت پپتید LL-37، ضایعات سلولی ایجاد شده توسط روتاویروس کاهش می‌یابد که در چنین حالتی می‌توان یک مکانیسم وابسته به دُز را برای آن مطرح کرد. همچنین آثار تخریب سلولی روتاویروس روی سلول‌های MA-104 با گردش سلول‌ها، جداسدن سلول‌ها از کف فلاسک و تشکیل کانون‌های لیز سلولی مشخص می‌شود.

کاهش عیار روتاویروس نسبت به کنترل ویروس در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از پپتید LL-37 از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است ($P = 0/0001$). اما این کاهش عیار در مورد غلظت ۰/۱ میکروگرم/میلی‌لیتر از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است ($P = 0/69$). از بین تمامی غلظت‌های مورد استفاده پپتید، غلظت ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر توانست با کاهش ۳۳/۳۶٪ عیار عیار عفونی روتاویروس در مقایسه با کنترل ویروس، بالاترین کاهش عیار ویروسی را به خود اختصاص دهد ($P = 0/0001$) (شکل شماره ۲). شکل شماره ۲ بیانگر فعالیت پپتید در مهار عفونت روتاویروس از طریق کاهش تیتراژ اولیه ویروس است.

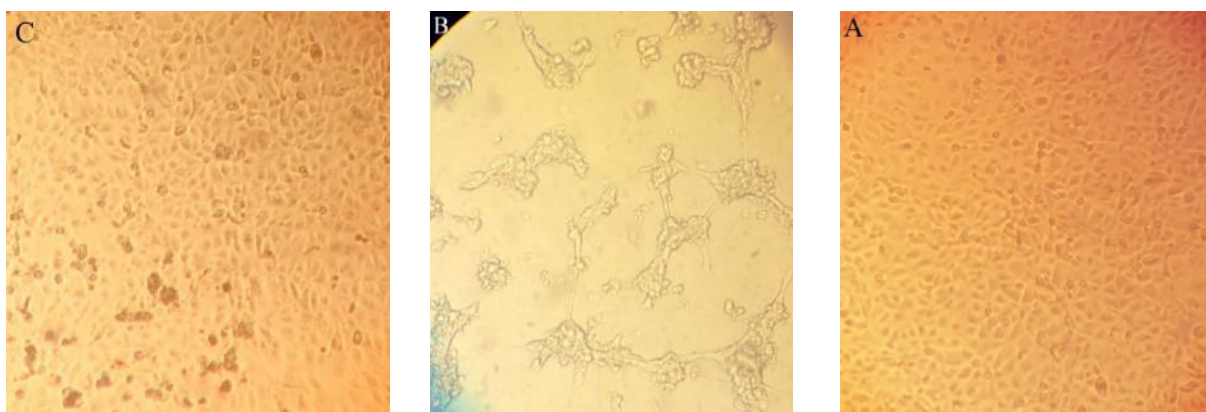
کشت سلولی فاقد سرم در محدوده غیرسمی برای سلول‌ها به چاهک‌های سلولی اضافه شد. همچنین چاهک‌هایی نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد که در آن‌ها بعد از آلودگی سلول با ویروس، به جای سوسپانسیون حاوی پپتید، محیط کشت سلولی فاقد سرم اضافه شد. سپس پلیت به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از تشکیل اثرات تخریب سلولی در چاهک‌های کنترل ویروس، محتویات تمامی چاهک‌های پلیت‌های ۹۶‌خانه برداشت شد و مقدار عیار عفونی محتویات هر چاهک به روش TCID₅₀ سنجیده شد.

تمامی آزمون‌ها به صورت تکرارهای سه‌تایی انجام و داده‌ها به صورت میانگین نمایش داده شده‌اند. از آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه^{۲۵} جهت بررسی تفاوت‌های آماری بین گروه‌ها استفاده شد. تمامی بررسی‌های آماری و همچنین ترسیم تصاویر و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism انجام گرفت. $P < 0/05$ بیانگر معنی‌دار بودن داده است.

یافته‌ها

سمیت پپتید LL-37 روی سلول‌های MA-104 به روش نوترال‌رد ارزیابی شد. جدول شماره ۱ نتایج آزمون حیات سلولی را نشان می‌دهد که به صورت درصد حیات در مقایسه با گروه کنترل فاقد پپتید برآورد شده است. طبق نتایج آزمون نوترال‌رد، حیات سلول‌ها در بالاترین غلظت مورد استفاده (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از پپتید LL-37 تا بیش از ۹۰ درصد حفظ شد. بر اساس این نتایج، غلظت‌هایی از پپتید LL-37 که فعالیت سمی را روی سلول به میزان کمتر از ۱۰ درصد نشان داده‌اند، برای انجام

25. One-way ANOVA



مجله علمی
دانشگاه علوم پزشکی قزوین

شکل ۱. مهار ضایعات و آثار تخریب سلولی ناشی از عفونت روتاویروس در سلول‌های MA-104 پیش‌تیمار شده با پپتید (A) کنترل سلولی؛ (B) کنترل ویروسی؛ (C) سلول‌های آلوده با روتاویروس تیمار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم / میلی‌لیتر از پپتید LL-37

بحث و نتیجه‌گیری

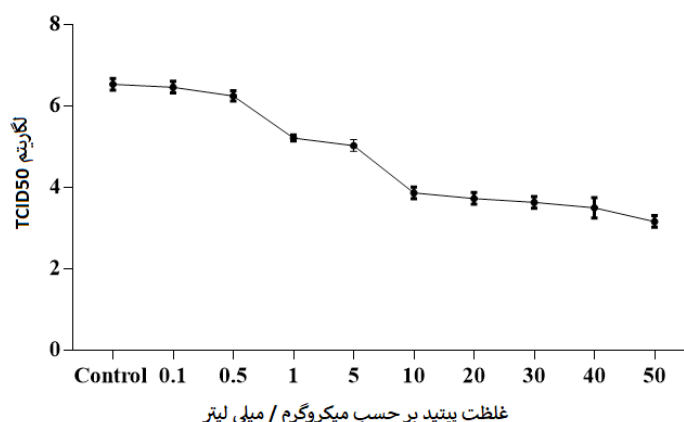
سیستم دفاع ایمنی ذاتی است که توسط گلبول‌های سفید (عمدتاً نوتروفیل‌ها) و بسیاری از سلول‌های دیگر از جمله سلول‌های اپیتلیال و ماکروفاژ تولید شده و در بسیاری از بافت‌های انسانی و مایعات بدن یافت می‌شود [۲۵]. افزایش بیان این پپتید در پاسخ به التهابات و عفونت‌ها گزارش شده است [۲۶]. پیشرفت‌های اخیر در ساخت پپتید LL-37 با استفاده از روش‌های مختلف، به افزایش استفاده از این پپتید به عنوان یک عامل ضد میکروبی به طور خاص علیه بسیاری از عوامل بیماری‌زای باکتریایی و ویروسی منجر شده است. در همین راستا، در مطالعه حاضر برای نخستین بار به بررسی آزمایشگاهی^{۲۶} خصوصیات ضد ویروسی پپتید LL-37 علیه روتاویروس به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل اسهال حاد کودکان پرداخته شده است.

با استناد به یافته‌های این پژوهش، پپتید LL-37 بر تکثیر

تیترا عفونت‌زایی اولیه ویروس به روش دُز عفونی‌کننده ۵۰ درصد، $TCID_{50} 10^{6/5}$ / میلی‌لیتر تعیین شد. نتایج آزمون سمیت نشان داد پپتید در غلظت‌های مورد استفاده، فاقد اثر سمی برای سلول‌های MA-104 در ۷۲ ساعت بود و حیات سلولی در حضور غلظت‌های مورد استفاده پپتید حفظ شد. نتایج تعیین تیترا در تیمار سلول‌های آلوده با پپتید و مقایسه با تیترا اولیه نشان داد پپتید LL-37 در هیچ‌یک از غلظت‌ها کاهش قابل ملاحظه‌ای در تیترا ویروس در مقایسه با کنترل ایجاد نکرده است؛ در حالی که تیمار کشت سلولی با پپتید قبل از آلودگی سیستم کشت به روتاویروس، به طور مؤثر فعالیت ویروس را تحت تأثیر قرار داده است و تیترا ویروس در مقایسه با کنترل به طور معنی‌دار کاهش پیدا کرده است.

کاتالیزیدین انسانی LL-37، یکی از پپتیدهای کاتیونیک

26. In vitro



مجله علمی
دانشگاه علوم پزشکی قزوین

شکل ۲. اثر ضد ویروسی پپتید LL-37 بر تیترا اولیه ویروس به روش دُز عفونی‌کننده ۵۰ درصد ($TCID_{50}$) در پیش‌تیمار سلول‌های MA-104 با غلظت‌های مختلف پپتید، سه ساعت قبل از آلودگی کشت سلولی با روتاویروس

کردند پیش تیمار ویروس تب دانگ^{۳۰} با پپتید LL-37 به کاهش قابل ملاحظه‌ای از عفونت‌زایی در مقایسه با کنترل ویروس منجر شده است. در حالی که تیمار سلول‌های Vero با پپتید LL-37 قبل و بعد از عفونت ویروسی، تأثیر قابل توجهی بر عیار ویروس نداشت [۱۷]. طبق نتیجه‌گیری این گروه از محققان، پپتید مستقیماً با ویروس میان‌کنش می‌کند و این تعامل به اشغال گیرنده‌های ویروسی و متعاقباً جلوگیری از ورود ویروس به سلول و در نتیجه عدم ایجاد عفونت منجر می‌شود. در تطابق با این نتایج، پیش تیمار ویروس هپاتیت C با پپتید LL-37 به کاهش قابل توجهی در عیار عفونت‌زایی این ویروس منجر شد [۲۹].

هم‌راستا با مطالعات اشاره شده، پیش تیمار ویروس سینسیشیال تنفسی^{۳۱} با LL-37، به کاهش سطوح ذرات ویروسی به داخل محیط کشت سلولی منجر شد [۳۰]. در تمامی موارد اشاره شده، ویروس‌های مورد مطالعه، پوشش‌دار^{۳۲} بوده‌اند. درباره مشاهدات مذکور می‌توان توضیح داد پوشش^{۳۳} لیپیدی ویروسی به پپتید LL-37 حساس است و در حضور پپتید تخریب می‌شود. در مطالعات مشابه روی باکتری‌ها نیز مشاهده شده است که پپتید LL-37 با تخریب غشای لیپیدی باکتری، اثر ضد میکروبی خود را اعمال می‌کند.

به طور خلاصه مطالعه حاضر، اولین تلاش برای اثبات فعالیت ضد ویروسی تنها عضو انسانی خانواده کاتلیسیدین، یعنی پپتید LL-37 علیه روتاویروس بود. یافته‌های ما نشان داده است پیش تیمار سلول‌های MA-104 با این پپتید، قبل از آلودگی سلول‌ها با روتاویروس، اثر مهارتی بر تکثیر ویروس و تولید ویرون روتاویروس دارد که این امر احتمالاً از طریق مسدود کردن لیگاند‌های سطح ویروس که مسئول اتصال با گیرنده‌های سطح سلولی هستند و به دنبال آن ممانعت از ورود ویروس اعمال می‌شود. از این رو پپتید LL-37 پتانسیل ضد روتاویروسی خوبی در شرایط آزمایشگاهی دارد و می‌تواند به عنوان کاندید بالقوه مناسب در مدیریت و کنترل بیماری گاستروانتریت حاد ناشی از عفونت روتاویروس موضوع مطالعات بیشتری باشد. با این حال عدم استفاده از سوش‌های انسانی روتاویروس و رده سلولی انسانی می‌تواند به عنوان محدودیت‌های مرتبط با این پژوهش باشد. از این رو، تأیید یافته‌های ارائه شده در جهت امکان استفاده پیشگیرانه از این پپتید، منوط به بررسی‌های بیشتر بالینی، به‌ویژه در موجود زنده است.

سلول‌های MA-104 اثر بازدارندگی قابل توجهی نشان داد که با کاهش بروز اثرات سایتوپاتیک ناشی از روتاویروس در کشت سلولی مشخص شد. در این مطالعه مشخص شده است اثر ضد ویروسی پپتید فوق مربوط به زمانی است که سلول‌های MA-104 قبل از عفونت روتاویروس، با پپتید تیمار شده‌اند. در واقع سلول‌های تیمار شده با پپتید، با مکانیسم وابسته به غلظت، کاهش قابل توجهی در تولید ویرون‌های عفونت‌زا نشان دادند. به گونه‌ای که پپتید LL-37 در بالاترین غلظت مورد استفاده یعنی غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، بیشترین فعالیت ضد ویروسی و اثر بازدارندگی را بر تولید ویرون‌های روتاویروسی داشته است.

نکته مهم در این مطالعه، زمان اضافه کردن پپتید و تیمار سلول‌ها با پپتید بود؛ به طوری که نشان داده شده است اضافه شدن پپتید پس از جذب ویروس به سلول‌های آلوده، هیچ‌گونه کاهش در اثرات تخریب سلولی القاشده توسط ویروس به دنبال نداشته و اثر پپتید بر کاهش بروز اثرات تخریب سلولی ناشی از روتاویروس تنها زمانی مشاهده شد که قبل از جذب و ورود ویروس به سلول و ایجاد آلودگی، پپتید مدنظر به سلول‌ها اضافه شد. فرضیه ما بر اساس نتایج مذکور این است که پپتید LL-37 به گیرنده‌های^{۳۴} مربوط به روتاویروس در سطح سلول متصل و متعاقباً به جلوگیری از ورود ویروس به داخل سلول‌های میزبان می‌شود.

گیرنده‌های اسید سیالیک در سطح سلول‌های اپیتلیال هدف (میزبان)، گیرنده‌های مهمی هستند که برای روتاویروس SA-11 شناخته شده‌اند. در مطالعه قبلی نشان داده شده پپتیدهای ضد میکروبی مانند LL-37 می‌توانند با گیرنده‌های حاوی اسید سیالیک در سطح سلول‌هایی مانند اریتروسیت‌ها میان‌کنش کنند [۲۷]. توجه دیگر برای کاهش تکثیر روتاویروس طی پیش تیمار سلول‌ها با پپتید LL-37، ممکن است مربوط به ورود این پپتید به داخل سلول و جذب سلولی فعال آن باشد. در این صورت پپتید می‌تواند در سلول‌های اپیتلیال پیش تیمار شده با پپتید، وضعیت حفاظتی علیه عفونت روتاویروسی ایجاد کند.

اثرات ضد ویروسی پپتید LL-37 علیه پاتوژن‌های ویروسی در برخی از مطالعات بررسی شده است. در یک مطالعه، تریپاتی^{۲۸} و همکاران اثر مهارتی پپتید LL-37 را علیه ویروس آنفلوآنزای A ارزیابی کردند. یافته‌های آنان نشان داد بیشترین اثر ضد ویروسی پپتید زمانی است که ویروس و پپتید قبل از عفونت ویروسی سلول‌های MDCK با هم پیش‌انکوبه شده بودند [۲۸]. طبق فرضیه این محققان، آنچه به غیرفعال شدن ویرون‌های عفونت‌زا می‌شود، واکنش مستقیم پپتید LL-37 با ذره ویروسی است. به طور مشابه در مطالعه دیگری آلاگراسو^{۲۹} و همکارانش گزارش

30. Dengue fever
31. Respiratory syncytial virus (RSV)
32. Enveloped
33. Envelope

27. Receptor
28. Tripathi
29. Alagarasu

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

اصول اخلاق در انجام این پژوهش توسط نویسندگان رعایت شده است. در این پژوهش از نمونه‌های انسانی استفاده نشده است.

حامی مالی

این پژوهش برگرفته از رساله دکتری زهره حسینی به شماره گرنت ۳۹۱۹۹ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد است و با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفته است.

مشارکت نویسندگان

روش‌شناسی، انجام آزمون‌ها و اجرای پژوهش، نگارش، تحلیل داده‌ها و نگارش مقاله: زهره حسینی؛ مفهوم‌سازی اولیه، مدیریت و نظارت پروژه، اعتبارسنجی، تأمین مالی و ویراستاری: محمداقربابیبی نجفی؛ کمک در مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، نظارت بر اجرا، تأمین منابع آزمایشگاهی و ویراستاری: آنژیلا عطایی پیرکوه؛ مشارکت در تحقیقات و مفهوم‌سازی، نظارت و مدیریت پروژه: مسعود یاورمنش.

تعارض منافع

بین نویسندگان این مقاله، هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از گروه ویروس‌شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران به‌ویژه آقای دکتر احمد توکلی و آقای دکتر داوود جوانمرد به دلیل همکاری صمیمانه و راهنمایی‌های مؤثر در اجرای این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

- [1] Harzandi N, Samiee P, Dezfulian M. Molecular detection and genotyping of rotaviruses in children with acute gastroenteritis in Karaj hospital. *J Qazvin Univ Med Sci.* 2014; 18(4):21-7. [In Persian]
- [2] Ataei-Pirkooh A, Shamsi-Shahrabadi M, Haghi-Ashtiani M. Incidence of coinfection between rotavirus and some enteropathogenic agents in children referred to children medical center hospital, Tehran 2009. *Iran J Virol.* 2011; 5(1):23-7. [DOI:10.21859/isv.5.1.23]
- [3] Kargar M, Akbarizadeh A, Yaghobi R. Epidemiological features of rotaviral, bacterial, and parasitic infections among hospitalized children in Jahrom (2006-2007). *J Qazvin Univ Med Sci.* 2011; 14(4):34-41. [In Persian]
- [4] Karampatsas K, Osborne L, Seah ML, Tong CY, Prendergast AJ. Clinical characteristics and complications of rotavirus gastroenteritis in children in east London: A retrospective case-control study. *Pub Libr Sci J.* 2018; 13(3):e0194009. [DOI:10.1371/journal.pone.0194009] [PMID] [PMCID]
- [5] Civra A, Francese R, Sinato D, Donalisio M, Cagno V, Rubiolo P, et al. In vitro screening for antiviral activity of Turkish plants revealing methanolic extract of *Rindera lanata* var. *lanata* active against human rotavirus. *BMC Complement Altern Med.* 2017; 17(74):1-8. [DOI:10.1186/s12906-017-1560-3] [PMID] [PMCID]
- [6] Glass RI, Jiang B, Parashar U. The future control of rotavirus disease: Can live oral vaccines alone solve the rotavirus problem? *Vaccine.* 2018; 36(17):2233-6. [DOI:10.1016/j.vaccine.2018.03.008] [PMID]
- [7] Biswalo LS, Sousa MG, Rezende TM, Dias SC, Franco OL. Antimicrobial peptides and nanotechnology, recent advances and challenges. *Front Microbiol.* 2018; 9(855):1-14. [DOI:10.3389/fmicb.2018.00855] [PMID] [PMCID]
- [8] Gupta S, Bhatia G, Sharma A, Saxena S. Host defense peptides: An insight into the antimicrobial world. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol.* 2018; 22(2):239-44. [DOI:10.4103/jomfp.JOMFP_113_16] [PMID] [PMCID]
- [9] Ghosh SK, Feng Z, Fujioka H, Lux R, McCormick TS, Weinberg A. Conceptual perspectives: Bacterial antimicrobial peptide induction as a novel strategy for symbiosis with the human host. *Front Microbiol.* 2018; 9(302):1-8. [DOI:10.3389/fmicb.2018.00302] [PMID] [PMCID]
- [10] Chanu KV, Thakuria D, Kumar S. Antimicrobial peptides of buffalo and their role in host defenses. *Vet World.* 2018; 11(2):192-200. [DOI:10.14202/vetworld.2018.192-200] [PMID] [PMCID]
- [11] Kuroda K, Okumura K, Isogai H, Isogai E. The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 and mimics are potential anticancer drugs. *Front Oncol.* 2015; 5(144):1-10. [DOI:10.3389/fonc.2015.00144] [PMID] [PMCID]
- [12] Chen X, Zou X, Qi G, Tang Y, Guo Y, Si J, et al. Roles and mechanisms of human cathelicidin LL-37 in cancer. *Cell Pshysiol Biochem.* 2018; 47(3):1060-73. [DOI:10.1159/000490183] [PMID]
- [13] Tsai PW, Yang CY, Chang HT, Lan CY. Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of *Candida albicans* by interacting with yeast cell-wall carbohydrates. *PLOS One.* 2011; 6(3):e17755. [DOI:10.1371/journal.pone.0017755] [PMID] [PMCID]
- [14] Chromek M, Arvidsson I, Karpman D. The antimicrobial peptide cathelicidin protects mice from *Escherichia coli* O157: H7-mediated disease. *PLOS One.* 2012; 7(10):e46476. [DOI:10.1371/journal.pone.0046476] [PMID] [PMCID]
- [15] Kanthawong S, Bolscher JG, Veerman EC, van Marle J, de Soet HJ, Nazmi K, et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of LL-37 and its truncated variants against *Burkholderia pseudomallei*. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 39(1):39-44. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.010] [PMID]
- [16] Wong JH, Ng TB, Legowska A, Rolka K, Hui M, Cho CH. Antifungal action of human cathelicidin fragment (LL13-37) on *Candida albicans*. *Peptides.* 2011; 32(10):1996-2002. [DOI:10.1016/j.peptides.2011.08.018] [PMID]
- [17] Alagarasu K, Patil P, Shil P, Seervi M, Kakade M, Tillu H, et al. In-vitro effect of human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 on dengue virus type 2. *Peptides.* 2017; 92:23-30. [DOI:10.1016/j.peptides.2017.04.002] [PMID]
- [18] Bergman P, Walter-Jallow L, Broliden K, Agerberth B, Soderlund J. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. *Curr HIV Res.* 2007; 5(4):410-5. [DOI:10.2174/157016207781023947] [PMID]
- [19] Vilas Boas LCP, de Lima LMP, Migliolo L, Mendes GdS, de Jesus MG, Franco OL, et al. Linear antimicrobial peptides with activity against herpes simplex virus 1 and Aichi virus. *J Pept Sci.* 2017; 108(2):e22871. [DOI:10.1002/bip.22871] [PMID]
- [20] Howell MD, Jones JF, Kisich KO, Streib JE, Gallo RL, Leung DY. Selective killing of vaccinia virus by LL-37: Implications for eczema vaccinatum. *J Immunol.* 2004; 172(3):1763-7. [DOI:10.4049/jimmunol.172.3.1763] [PMID]
- [21] Uchio E, Inoue H, Kadonosono K. Anti-adenoviral effects of human cationic antimicrobial protein-18/LL-37, an antimicrobial peptide, by quantitative polymerase chain reaction. *Korean J Ophthalmol.* 2013; 27(3):199-203. [DOI:10.3341/kjo.2013.27.3.199] [PMID] [PMCID]
- [22] Gordon YJ, Huang LC, Romanowski EG, Yates KA, Proske RJ, McDermott AM. Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr Eye Res.* 2005; 30(5):385-94. [DOI:10.1080/02713680590934111] [PMID] [PMCID]
- [23] Sousa FH, Casanova V, Findlay F, Stevens C, Svoboda P, Pohl J, et al. Cathelicidins display conserved direct antiviral activity towards rhinovirus. *Peptides.* 2017; 95:76-83. [DOI:10.1016/j.peptides.2017.07.013] [PMID] [PMCID]
- [24] Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol.* 2016; 5(2):85-86. [DOI:10.5501/wjv.v5.i2.85] [PMID] [PMCID]
- [25] van Harten R, van Woudenberg E, van Dijk A, Haagsman H. Cathelicidins: Immunomodulatory antimicrobials. *Vaccines.* 2018; 6(3):63. [DOI:10.3390/vaccines6030063] [PMID] [PMCID]

- [26] Barlow PG, Beaumont PE, Cosseau C, Mackellar A, Wilkinson TS, Hancock RE, et al. The human cathelicidin LL-37 preferentially promotes apoptosis of infected airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 43(6):692-702. [DOI:10.1165/rmb.2009-0250OC] [PMID] [PMCID]
- [27] Hou M, Zhang N, Yang J, Meng X, Yang R, Li J, et al. Antimicrobial peptide LL-37 and IDR-1 ameliorate MRSA pneumonia in vivo. *Cell Physiol Biochem*. 2013; 32(3):614-23. [DOI:10.1159/000354465] [PMID]
- [28] Tripathi S, Teclé T, Verma A, Crouch E, White M, Hartshorn KL. The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza A viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein D or defensins. *J Gen Virol*. 2013; 94(1):40-9. [DOI:10.1099/vir.0.045013-0] [PMID] [PMCID]
- [29] Matsumura T, Sugiyama N, Murayama A, Yamada N, Shiina M, Asabe S, et al. Antimicrobial peptide LL-37 attenuates infection of hepatitis C virus. *Hepatol Res*. 2016; 46(9):924-32. [DOI:10.1111/hepr.12627] [PMID]
- [30] Currie SM, Findlay EG, McHugh BJ, Mackellar A, Man T, Macmillan D, et al. The human cathelicidin LL-37 has antiviral activity against respiratory syncytial virus. *PLOS One*. 2013; 8(8):e73659. [DOI:10.1371/journal.pone.0073659] [PMID] [PMCID]