

Investigating the effect of *B. thetaiotaomicron* and its derivatives on the expression of *tlr2* and *tlr4* genes in STC-1 cell line

Somaye Vaezijoze¹, Shiva Irani¹, Seyed Davar Siadat^{2,3}, Mohammadreza Zali⁴

¹Department of Biology, Science, and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

³Microbiology Research Center (MRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

⁴Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background: *B. thetaiotaomicron* is introduced as a candidate for the next generation of probiotics. TLR2, 4 play an important and necessary role in activating and modulating the innate immune system after exposure to bacteria in the intestine. This study aimed to investigate the effect of *B. thetaiotaomicron* and its derivatives on the alteration of the *tlr2* and *tlr4* gene expression.

Materials and methods: The effects of *B. thetaiotaomicron*, OMVs, inactive bacteria and supernatant treatments on the *tlr2* and *tlr4* gene expression in the STC-1 cell line were investigated using the qRT-PCR method.

Results: The treatment of the STC-1 cell line with live and active *B. thetaiotaomicron* did not have significant effect on transcription of *tlr2*, 4. The OMVs of this bacterium at 50 µg/ml significantly increased the gene expression of *tlr2* ($p=0.01$) and *tlr4* ($p=0.02$), but at a concentration of 100 µg/ml, its effect was not significant. Inactive bacteria at MOI 10 ($p=0.03$) and MOI 50($p=0.003$) significantly induce the transcription of both two genes. Supernatant 25% significantly increased *tlr2* ($p=0.038$) and *tlr4* ($p=0.034$) gene expression at the transcription level.

Conclusion: Our results showed that OMVs at a concentration of 50 µg/ml, inactive bacteria, and supernatant *B. thetaiotaomicron* play an important role in modulating immune response and can be used as a next generation postbiotics and paraprobiotic candidates for further studies to be used.

Keywords: *B. thetaiotaomicron*, Microbiota, OMVs, TLR2, TLR4.

Cited as: Vaezijoze S, Irani SH, Siadat SD, Zali MR. Investigating the effect of *B. thetaiotaomicron* and its derivatives on the expression of *tlr2* and *tlr4* genes in STC-1 cell line. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2023; 33(1): 1-10.

Correspondence to: Seyed Davar Siadat

Tel: + 02164112282

E-mail: d.siadat@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-6892-5603

Received: 7 Sep 2022; **Accepted:** 15 Oct 2022

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۳، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲، صفحات ۱ تا ۱۰

Original Article

بررسی اثر باکتری *B. theta iotaomicron* و مشتقات آن بر بیان ژن های STC-1 در رده سلولی tlr2, tlr4

سمیه واعظی جزء^۱، شیوا ایرانی^۱، سید داور سیادت^۲، محمد رضا زالی^۴

^۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

^۲ بخش سل و تحقیقات ریوی، انسیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

^۳ مرکز تحقیقات میکروب شناسی، انسیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

^۴ مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: باکتری *B. theta iotaomicron* به عنوان کاندید نسل جدید پروبیوتیک ها مطرح است. *TLR2, 4* در روده نقش مهم و ضروری در شناسایی و فعالسازی سیستم ایمنی ذاتی، پس از مواجهه با باکتری ها بر عهده دارند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر باکتری *B. theta iotaomicron* و مشتقات آن بر تغییرات بیان ژن های *tlr2, tlr4* بود.

روش بررسی: بررسی تاثیر تیمارهای *OMVs* *B. theta iotaomicron*، باکتری غیرفعال و سوپرناتانت بر بیان ژنهای *tlr2, tlr4* در رده سلولی STC-1 با استفاده از روش *qRT-PCR* انجام شد.

یافته ها: تیمار رده سلولی STC-1 با باکتری زنده و غعال *B. theta iotaomicron* در تغییر بیان دو ژن *tlr2, 4* تاثیر معنی داری نداشتند. اثر *OMVs* این باکتری در افزایش بیان دو ژن *tlr2* و *tlr4* در غلظت $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ معنی دار ($p=0.02$) بود، ولی در غلظت $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ تغییرات معنی دار نبود. باکتری غیرفعال در 10 MOI و 50 MOI تاثیر معنی داری در افزایش دو ژن داشت (به ترتیب $p=0.03$ و $p=0.003$). سوپرناتانت $25\text{ }\mu\text{l}$ درصد به صورت قابل توجهی بیان دو ژن *tlr2* و *tlr4* ($p=0.038$) را در سطح رونویسی افزایش داد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که *OMVs* در غلظت $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ بر میلی لیتر، باکتری غیرفعال و سوپرناتانت *B. theta iotaomicron* نقش مهمی در تقویت سیستم ایمنی ایفا می کنند و می توانند به عنوان کاندید نسل جدید پست بیوتیک و پاراپروبیوتیک جهت مطالعات بعدی مورد استفاده قرار بگیرند.

واژگان کلیدی: باکتری *B. theta iotaomicron*, میکروبیوتا, *OMVs*, *TLR2*, *TLR4*.

مقدمه

انسان همیستی دارند که می توانند نقش مهمی در سلامت و بیماری انسان ایفا کنند. به مجموعه ای از میکروارگانیسم ها که در ارگان های مختلف با محیط خارج از بدن ارتباط دارند میکروبیوتا (microbiota) گفته می شود که در سطوح و لایه های عمقی پوست، دهان، ریه، واژن و روده زندگی می کنند (۱، ۲). بزرگترین و متنوع ترین جمعیت میکروبی همیست با انسان در دستگاه گوارش دیده می شود. جمعیت میکروبی دستگاه گوارش اکوسیستمی پویا و چندلایه ای را تشکیل می دهد؛ به این ترتیب که با یک الگوی استفرار مشخص همراه با گردیان

اکوسیستم های میکروبی پیچیده ای، پوست، سطوح مخاطی و دستگاه گوارش تمام پستانداران از جمله انسان را اشغال کرده اند، که میکروبیوم (microbiom) نامیده می شوند. بیش از 100 تریلیون (هزار میلیارد) میکروارگانیسم درون و روی بدن

آدرس نویسنده مسئول: تهران، بخش سل و تحقیقات ریوی، انسیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران سمهیه

(email: d.siadat@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-6892-5603

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۶/۱۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۷/۲۳

هستند و یا به عبارتی، سلول‌های میکروبی غیرفعال یا شکسته هستند که به طرق مختلف از جمله حرارت، اشعه گاما، امواج فرا بنفش، تیمارهای شیمیایی و... غیر فعال شده‌اند. در بعضی منابع به عنوان باکتری پاستوریزه آورده شده است (۱۰, ۹).

اخیراً اعضای جنس *Bacteroides* به خصوص *Bacteroides thetaiotaomicron* (*B.thetaiotaomicron*) در مطالعات متعدد به عنوان سوبو مناسبی از نسل جدید پروریوتیک‌ها در نظر گرفته شده است (۱۱).

این باکتری، نوعی باکتری میله‌ای، گرم منفی و بی‌هوایی است که در دستگاه گوارشی به عنوان یک باکتری کومنسال مستقر است، حدود ۶٪ از فلور نرمال گات و ۱۰-۱۲٪ از باکتروئیدس‌ها را تشکیل می‌دهد و با توجه به آنزیم‌های فراوانی که جهت هیدرولیز پلی ساکاریدهای غیرقابل هضم دارد، جزو فراوان‌ترین مصرف‌کنندگان کربوپهیدرات‌های گات معروفی می‌شود این باکتری به عنوان مدلی جهت مطالعه برهمکنش‌های میزبان-باکتری به کار می‌رود این باکتری دارای طیف وسیعی از گلیکوزید‌هیدرولازهاست که توانایی شکستن تعداد زیادی از باندهای آلفا گلیکوزیدی را دارند. می‌توان گفت که نقش آنژیماتیک این باکتری در دستگاه گوارش بسیار پررنگ است و این باکتری‌ها بدون شک یک برتری رقابتی در روده خواهند داشت (۱۲).

B.thetaiotaomicron سیگنالینگ کلسمیم داخل سلولی را تقویت و از تخریب آنزیم‌های در برآور پروتئازهای موجود در دستگاه گوارش محافظت می‌کند، به علاوه به ترشح وزیکول‌های خارج سلولی (OMVs) به کار می‌گیرد. این روشی وابسته به سولفاتاز، ماکروفاژهای روده را تعدیل می‌کند (۱۳).

واکنش‌های متقابل بین میزبان و میکروبیوتای روده، شبکه‌ای پیچیده از مولکول‌های فعال بیولوژیکی و مسیرهای متابولیکی است، که طور مشخص توسط میکرووارگانیسم‌های روده ترشح و تنظیم می‌شوند. برخی از این مواد تنظیمی از وزیکول‌های خارج سلولی بسته بندی و آزاد می‌شوند (۱۴). OMVs‌ها انتقال به اندازه‌های مختلف حتی مغز، می‌توانند نقش کلیدی و گسترده‌ای در تعاملات باکتری-باکتری و باکتری-میزبان، پاسخ‌های ایمنی و متابولیکی، هموستاز ایمنی و واکنش‌های التهابی حاد و تعدیل مسیرهای مختلف سیگنالینگ را داشته باشند (۱۵).

OMVs‌ها به عنوان رابط بین سلولی، انتقال ترکیبات فعال بین سلول‌ها را تسهیل می‌کنند. الگوی مولکولی OMVs مرتبط با میکروب (MAMPs) مانند پیتیدوگلیکان، لیپولیپیساکارید (LPS)، لیپوپروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک

افزایشی غلظت، از لومن گاستریک به سمت روده کوچک تا کلیون و رکتوم به بیشترین مقدار خود می‌رسند (۳). میکروبیوتا عملکردیابی متنوع و گسترده از جمله ایمنی‌زایی، کنترل تکثیر و تمایز سلول‌های اپیتلیال روده، رشد و توسعه سد اپیتلیالی، استحکام اتصالات محکم ناحیه اپیکال، محافظت در برابر گونه‌های بیماری‌زا، تخمیر کربوپهیدرات‌های غیرقابل هضم برای تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه (SCFA)، متابولیسم اسیدهای صفراء و تخریب مواد سرطان‌زا در رژیم غذایی در محافظت از ایجاد سرطان دارند (۴). اختلال و به هم خوردن تعادل در چنین سیستم پیچیده‌ای می‌تواند منجر به وضعیتی به نام اختلال درهمزیستی شود که به طور بالقوه میزبان را برای چندین بیماری مهم مستعد می‌کند، بیماری‌های مزموني نفلیک سندروم متابولیک (مانند چاقی و دیابت)، بیماری‌های التهابی شکمی، دیابت ملیتوس، آتروواسکلروزیس، بیماری کبد الکلی ALD کبد چرب غیر الکلی، سیروز و کارسینومای کبدی کند که ارتباط همگی آنها با میکروبیوتای روده اثبات شده است (۵, ۶).

تعديل میکروبیوتای روده برای حفظ تعادل مطلوب و بهبود سلامت انسان از اهمیت بالایی برخوردار است. در این میان مصرف پروریوتیک‌ها (probiotic)، به عنوان مکمل‌های غذایی اثرات مختلف مفیدی بر عملکرد روده دارد و در اکثر موارد با بهبود دیس‌بیوز و تعديل پاسخ ایمنی میزبان سبب بهبود فرایندهای هضم و همچنین کاهش علائم و پیشرفت بیماری‌های مختلف می‌شوند (۷). به طور کلی، اصطلاح بیوتیک به استراتژی‌های تغذیه‌ای گفته می‌شود که می‌تواند برای هدایت میکروبیوتای دستگاه گوارش، به سمت وضعیت مطلوب‌تری درجهت سلامت میزبان مورد استفاده قرار گیرد. جدیدترین عضو خانواده بیوتیک‌ها، پست بیوتیک است، یک ترکیب فعال زیستی، تولید شده توسط میکرو ارگانیسم، طی فرآیند تخمیر می‌باشد. اصطلاح پست بیوتیک را می‌توان به عنوان یک چتر برای تمام مترادف‌ها و اصطلاحات مربوط به اجزای تخمیر میکروبی در نظر گرفت، بنابراین پست بیوتیک‌ها می‌توانند ترکیبات مختلفی از جمله مواد تشکیل‌دهنده سلول و انواع متابولیت‌ها باشند (۸). محیط کشت مایعی که باکتری در آن رشد کرده حاوی انواع متابولیت‌ها، آنزیم‌ها و وزیکول‌هایی است که باکتری ترشح می‌کند. سوپرنا坦ت حاصل از محیط کشت باکتری (cell free supernatante) CFS به عنوان یک پست بیوتیک می‌تواند کارایی داشته باشد از دیگر بیوتیک‌ها می‌توان به پاراپروریوتیک‌ها اشاره کرد که، پروریوتیک‌های غیرزنده

ما در این مطالعه به بررسی برخی از اثرات باکتری B. thetaiotaomicron به عنوان کاندید پروپوپوتیک و OMVs و CFS حاصل آن به عنوان کاندیدپست بیوتیک و نیز باکتری غیر فعال شده با حرارت به عنوان کاندید پاراپوپوتیک بر بیان دو ژن گیرنده های غشا 2 tlr2 و tlr4 به روش qRT-PCR خواهیم پرداخت.

مواد و روشها

مواد مورد استفاده

محیط های کشت BHI-3 QULAB شرکت Agar1 BHI (cat: QB-65-6491) Broth(cat: QB:39-0303)) N0:QB-65-6491) دستگاه پمپ خلا آنوكسومات مدل AN20P کمپانی MART محیط کشت سلول شرکت Gorgen(cat:E0500-190) FBS، غیر FBS, GibcoTM, MA, (cat:10099133) GibcoTM, MA, USA (cat:10099133) bio idea و (cat:2520056) شده تریپسین GibcoTM, MA, USA % 0/25 EDTA (GibcoTM, MA, USA) یکتا تجهیز mRNA (Cat# YT9066) و کیت سنتز cDNA تجهیز، (cat No: YT4500) استفاده شد.

کشت سوش باکتری

در این مطالعه سویه استاندارد ۱۰۷۷۴ (B.thetaiotaomicron) (ATCC) از کلکسیون نگهداری باکتری های اینسیتیوباستور تهیه شد. برای فعال شدن و کشت این باکتری بی هوازی، از محیط های کشت BHI استفاده شد. به منظور فعال سازی، احیاء و شروع استفاده از این سوش استاندارد باکتری، ۱/۵ میلی لیتر از محیط کشت مایع BHI غنی شده با همین، منادیون و ال سیستئین، با استفاده از سرنگ استریل به داخل ویال باکتری تزریق و هموژن گردید. سپس ۲۰۰ ماکرولیتر از سوپرناکانت هموژن شده به چند پلیت از محیط کشت BHI آگار اضافه و با استفاده از سوپاپ استریل کشت داده شد و به درون جاربی هوازی منتقل گشت. سپس با استفاده از دستگاه پمپ خلا آنوكسومات حاوی (N2:80%, H2:10%, CO2:10%)، شرایط بی هوازی برای رشد باکتری فراهم گردید. جهت رشد باکتری، جار به مدت ۳ الی ۵ روز در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل شد.

تایید هویت باکتری با استفاده از PCR با پرایمر مبتنی بر ژن sRNA16s از باکتری B.thetaiotaomicron انجام گرفت (طبق مطالعه انجام شده توسط گروه حاضر در تحقیق) (۲۱).

OMVs (RNA) و OMVs را قادر می سازند که با کمک گیرنده های تشخیص الگو (PRRs) در تعامل با سلول های میزان، مسیرهای سیگنالینگی را فعال می کنند که بیان سایتوکاین ها و کموکاین ها را سبب می شود (۱۶). استفاده از OMVs در برخی موارد که استفاده از باکتری های زنده در افراد با نقص سد روده یا نقص سیستم ایمنی می تواند خطرناک باشد، جایگزین مناسبی برای پروپوپوتیک های زنده در نظر گرفته شده است (۷).

همان طور که ذکر شد، میکروبیوتای دستگاه گوارش در توسعه و تنظیم سیستم ایمنی و بهبود سد گوارشی مشارکت دارد. میکروبیوتای دستگاه گوارش نقش مهمی در مسیرهای سیگنالینگ مخاط روده از طریق domain-containing protein 1 and receptors Nucleotide-binding 2(NOD1and NOD2) oligomerization ایفا می کند (۱۷).

TLR ها یکی از ۱۰ نوع پروتئین های گذرنده از غشا transmembrane proteins (transmembrane proteins) هستند که به عنوان گیرندهای شناسایی الگو (Pattern Recognition Receptors, PRR) شناخته می شوند و در سیستم ایمنی ذاتی نقش بسیار مهمی دارند. این گیرندها در اکثر سلول های اپیتلیال و سلول های ایمنی بیان می شوند (۱۸). این گیرندها داری موتیف های مولکولی حفاظت شده ای هستند که الگوهای مولکولی وابسته به عوامل بیماری زا و مولکول های عفونی را شناسایی می کنند (۱۹). تاکنون ۱۳ نوع TLR شناسایی شده است که از TLR2,4,5,9 از مهم ترین آنها هستند. TLR2 لیپوپلی ساکارید، پیتیدو گلیکان و گلیکولپیپیدها را در دیواره سلولی شناسایی می کند و TLR4 عمل شناسایی لیپوپلی ساکارید باکتری های گرم منفی را بر عهده دارد (۷). میکروبیوتای روده از طریق فعال کردن گیرندهای TLR2,4 و MAPK, NF-kB و PI3k به دنبال آن مسیر های آبشاری و نیز سلول های فعال شدن پاسخ های ایمنی سلول های اپیتلیالی و نیز سلول های ایمنی در روده می شود. بدین ترتیب سبب بهبود عملکرد سد اپیتلیالی و افزایش بیان پروتئین های اتصالات محکم و در پی آن مقاومت روده در برابر نشت عوامل بیماری زا و ایمنی نسبت به بیماری هایی مانند IBD، چاقی، دیابت هیپر گلایسمی و نیز سلطان می شوند (۲۰).

در این مطالعه از یک رده سلولی موشی، مدل سلول های Enteroendocrine cell (EEC) (The STC-1 cell line) به نام (intestinal secretin tumor cell line) به عنوان رده سلولی مناسب برای مطالعات TLR ها استفاده شد (۲۱).

محیط کشت مورد استفاده DMEM high Glucose ۱۲٪ FBS/. باکتری گرم منفی غیرفعال ، به همراه آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین ۱۰۰۰ U/ml می باشد. سلول ها چندین نسل در فلاسک های مخصوص کشت سلولی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO₂ پاساژ داده شد. هر ۲ تا ۳ روز یک بار، محیط کشت سلول ها تعویض شد. قابل ذکر است که شرط اول در کشت سلولی، مهیا کردن شرایط استریل است. بنابراین قبل و بعداز کار، تمام محیط و وسایل کار استریل می شوند.

آماده سازی سوسپانسیون باکتری جهت تیمار با سلول
بدین صورت که ابتدا سوسپانسیون باکتری بوسیله PBS مشابه با مک فارلند اتهیه گردید که حاوی 1×10^8 باکتری در هر ml است، بعد از انجام محاسبات لازم با توجه به تعداد سلول، دو چاهک برای هر ۱۰ MOI و ۵۰ MOI (تعداد باکتری به تعداد سلول) اختصاص داده شد.

آماده سازی سلول های STC1 جهت تیمار با باکتروئیدس تیاتومیکرون و مشتقات آن (باکتری غیرفعال شده باحرارت، OMVs و CFS حاصل از آن)

جهت تیمار سلول ها با باکتروئیدس تیاتومیکرون و مشتقات آن، پس از پرشدن فلاسکها و رسیدن به تراکم ۷۵٪، سلول ها تریپسینه و با دور ۱۱۰ گیگا به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند، پلت حاصله حل شد و سپس توسط لام نوبار مورد شمارش قرار گرفت. پس از شمارش، تعداد ۱۰^۵ سلول به هر چاهک پلیت ۶ خانه منتقل گردید بعد از ۲۴ ساعت و قبل از تیمار سلول ها، نیاز است تا سلول ها همه در یک فاز رشدی یکسان قرار گیرند، به همین خاطر، محیط کشت سلول ها داخل هر چاهک با محیط کشت DMEM ۱% FBS (بدون آنتی بیوتیک و اسیدهای آمینه) جایگزین شد و بعد از ۴ ساعت آمده تیمار شد.

مقدار محاسبه شده هر ۱۰^۵ MOI ۵۰ درجه سانتیگراد در این تیمار باحرارت، بصورت جداگانه، به کشت سلول اضافه شد و به مدت ۲۰ ساعت در انکوباتور CO₂ دار انکوبه شد. همچنین OMVs با غلظت های ۱۰۰ و ۵۰ µg/ml و نمونه CFS به میزان ۲۵٪ حجم محیط کشت سلول، هر کدام بطور جداگانه به محیط کشت سلول ها اضافه شده و به مدت ۲۰ ساعت در انکوباتور CO₂ دار انکوبه شد.

بررسی بیان ژن های مورد مطالعه به روش qRT-PCR
بعد از تیمار رده سلولی STC-1 باکتری و مشتقات آن که بالاتر به آن اشاره شد، استخراج RNA از سلول های مورد تیمار، طبق پروتکل انجام گرفت. کیفیت و کمیت RNA های

در همین راستا وزیکول های غشای خارجی باکتری گرم منفی B.*thetaiotaomicron* بعداز کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط BHI غنی شده با همین و منادیون با استفاده از روش های مبتنی بر اولتراسانتریفیگاسیون و اولترافیلتراسیون استخراج گردید سپس ساختارهای این ماکرومولکول ها مورد ارزیابی فیزیکو شیمیابی قرار گرفتند (۲۲). سپس جهت بررسی سایز و شکل وزیکول های استخراج شده، از هردو میکروسکوپ الکترونی Bradford و SEM استفاده شد. با استفاده از روش غاظت پرونئینی وزیکول های غشا خارجی *B.thetaiotaomicron* بدست آمد (طبق مطالعه انجام شده توسط گروه حاضر در تحقیق) (۲۳).

جهت غیر فعال کردن این باکتری، *B.thetaiotaomicron* بر روی پلیت agar حاوی مکمل های همین، منادیون و L-سیستئین با مقادیری که قبلا ذکر گردید، کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت از کلنی باکتری برداشت نموده و در ۱/۵ میلی لیتر محلول PBS استریل تلقیح شد. پس از کنترل رشد باکتری از طریق خوانش جذب نوری ۱ در ۶۰۰ نانومتر، سوسپانسیون حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در داخل بن ماری ۷۰ درجه سانتیگراد حرارت دهی شد و به صورت تازه بر روی رده سلولی تیمار شد (۲۱).

به منظور به دست آوردن سوپرناتانت عاری از سلول (CFS) از باکتری *B. thetaiotaomicron* ابتدا باکتری در محیط BHI مایع غنی شده با همین و منادیون و ال سیستئین به حجم ۱۰۰ سی سی تلقیح گردید، سوسپانسیون حاصله در شرایط بی هوازی (CO₂:10%, H₂:10%) و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس به مدت ۲۲ ساعت داخل انکوباتور شیکر دار با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا به حداقل میزان رشد خود (فاز لگاریتمی) برسد. جهت اطمینان از میزان رشد باکتری، با استفاده از دستگاه اسپیکتوفوتومتر جذب در ۶۰۰ OD نانومتر خوانده شد. در ادامه، برای جداسازی فاز مایع از سوسپانسیون حاوی باکتری، سوسپانسیون به فالکون منتقل گردید و در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سوسپانسیون حاصل، به جهت عاری شدن از باکتری، توسط فیلتر ۰/۲۲ عبور داده شد و در نهایت pH آن در حدود ۷/۴-۷/۶ تنظیم گردید تا بتوان سلول را با آن تیمار کرد و در فریزر -۷۰ نگهداری شد (۲۱).

کشت رده سلولی STC-1

رده سلولی STC-1 (۲۱)، یک رده سلولی موشی به صورت چسبنده با رشد آهسته و زمان دو برابر شدن ۵ ساعت است که از بانک سلولی بلژیک (ATCC® CRL 3254) تهیه شده است.

که فرم غیرفعال شده این باکتری به واسطه حرارت، در mRNA MOI 50 (p=۰/۰۳) و MOI 10 (p=۰/۰۳) سطح این ژن را به صورت معنی داری افزایش داد. وزیکول های غشای خارجی این باکتری در غلظت ۱۰۰ µg/ml تاثیر معنی داری در تغییر بیان ژن TLR2 در مقایسه با کنترل (تیمار با Sucrose نداشتند، در حالی که بیان این ژن در غلظت OMVs ۵۰ µg/ml به طور معنی داری افزایش یافت (p=۰/۰۱۴). مقدار رونویسی ژن tlr2 در اثر تیمار با *B.thetaiotaomicron* CFS به طور معنی داری فزایش یافت (p=۰/۰۳۸). با در نظر گرفتن RPL19 به عنوان ژن مرجع، در هر تیمار نتایج حاصل از qRT-PCR در مقایسه با نتایج این ژن مورد بررسی قرار گرفت.

اثرات باکتری *B.thetaiotaomicron* زنده و فعال و **CFS** و **OMVs** حاصل از آن و باکتری غیرفعال شده به واسطه حرارت، بر بیان ژن های *tlr4* در سطح رونویسی چنانچه در نمودار ۲ نشان داده شده است، نتایج حاصل از تیمار ۲۴ ساعته سلول های STC-1 با باکتری زنده و فعال *B.thetaiotaomicron* در هر دو MOIs، تغییر معنی داری بر سطح mRNA ژن *tlr4* ایجاد نکرد. این در حالی است که فرم غیرفعال شده این باکتری به واسطه حرارت، در MOI 10 (p=۰/۰۴۲) و MOI 50 (p=۰/۰۱) رونویسی این ژن را افزایش داد. وزیکول های استخراج شده از این باکتری در غلظت ۵۰ µg/ml موجب افزایش معنی دار (p=۰/۰۲۹) رونویسی ژن *tlr4* شدند. سوب سلولی فاقد سلول از باکتری مذکور نیز میزان mRNA این ژن را افزایش داد (p=۰/۰۳۴).

استخراج شده با کمک دستگاه نانودرایپ و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ و مشاهده باندهای RNA ریبوزومی مشخص شد (۲۵). در مرحله بعد cDNA طبق دستورالعمل کیت ساخته شد و جهت بررسی تغییر بیان ژن های *tlr2* و *tlr4* در سطح رونویسی از روش ریل تایم و پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. طبق بررسی های انجام شده ژن *RPL19* که در شرایط مختلف از پایداری بالایی برخوردار است (۲۶) در این مطالعه به عنوان ژن مرجع انتخاب شد.

پرایمرهای مورد نیاز برای ژن های مورد مطالعه پس از انجام BLAST کامل و تایید اختصاصی آن ها، توسط شرکت رویان توکاژن از شرکت متایون آلمان تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. در جدول ۱ مشخصات و توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش qRT-PCR آورده شده است.

تحلیل داده ها

تمامی آزمایش ها به صورت سه بار تکرار انجام گرفت. مقادیر گزارش شده به شکل میانگین \pm انحراف معیار قید شده اند. آنالیز تست qRT-PCR در اکسل به روش delta CT (روش لیوارک) محاسبه شد. همچنین برای محاسبات آماری داده ها از Tukey روش های one way ANOVA و T test و تست تعقیبی استفاده شد. آنالیز آماری داده ها و رسم نمودارها توسط نسخه ۸ نرم افزار Graphpad prism انجام شد. سطح معنی داری داده ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

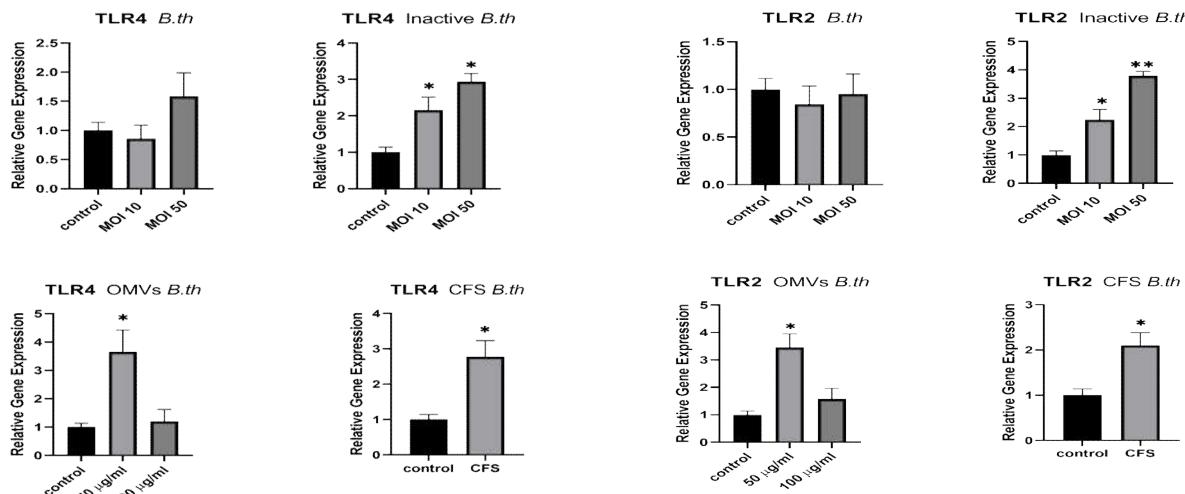
یافته ها

اثرات باکتری *B.thetaiotaomicron* زنده و فعال و **CFS** و **OMVs** بواسطه حرارت، بر بیان ژن های *tlr2* در سطح رونویسی

با بررسی های آماری نتایج مشخص شد که باکتری زنده و فعال *B.thetaiotaomicron* در هر دو MOIs تاثیر معنی داری بر بیان ژن *tlr2* در سطح رونویسی نداشتند، در صورتی

جدول ۱. توالی پرایمرهای بکار رفته در واکنش qRT-PCR

primer Name	Sequence	Product size (bp)	Refrences
m- tlr2-forward	TCCTGCGAACTCCTATCC	151	(26)
m- tlr2 -reverse	CCTGGTGACATTCCAAGAC		
m-tlr4-forward	GCCTTCAGGGAATTAAGCTCC	114	(26)
m-tlr4 -reverse	GATCAACCGATGGACGTGTAAA		
m-RPL19-forward	CCTGAAGGTCAAAGGGAATGTGTT	143	(27)
m-RPL19-reverse	GCTTTCGTGCTTCCTGGTCTTA		



نمودار ۲. تغییر بیان ژن *tlr4* در رده سلولی STC-1 بعد از تیمار ۲۴ ساعته با (الف) باکتری *B.thetaiotaomicron* فعال در ۱۰ MOI و ۵۰ MOI (ب) غیرفعال شده بواسطه حرارت در ۱۰ MOI و ۵۰ MOI (ج) وزیکول های استخراج شده از باکتری (OMVs) در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (د) سوب سلولی فاقد سلول (CFS) ۲۵% (** p<0.01) * (p<0.05) از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. به عنوان کنترل داخلی از ژن *RPL19* استفاده شد. این آزمایش بصورت سه بار تکرار انجام شده است.

در این مطالعه، باکتری *B.thetaiotaomicron* که یکی از اعضای مهم خانواده باکتروئیدت و به عنوان کومنسال مفید شناخته می شود، انتخاب شده است، این باکتری به جهت دارا بودن انواع آنزیم های گلیکوزید هیدرولازی از اهمیت خاصی در بین میکروبیوتاتی روده برخوردار است و امروزه به عنوان کاندیدای نسل جدید پروبیوتیکها مطرح است (۱۱). نتایج مطالعه حاضر نشان داد تیمارهای *B.thetaiotaomicron* فعال و زنده در هر دو ۱۰ MOI و ۵۰ MOI تغییر معنی داری در بیان دو ژن *tlr2,4* در رده سلولی STC-1 در سطح mRNA ایجاد نکردند. تحقیقات نشان داده است که مکانیسم های عمل پروبیوتیک اغلب به ویژگی خاص سویه های باکتری بستگی دارد و پروبیوتیکها و مشتقات آنها می توانند پاسخهای متنوعی را ایجاد کنند (۲۰). باکتری Finamore و همکارانش در مطالعه ای که با استفاده از دو باکتری انتروتوکسیزنیک اشرشیاکلی، لاکتوباسیلوس رامنوس و سوپرناتانت لاکتوباسیلوس رامنوس، بر روی رده سلولی Caco2 انجام شد، نشان دادند که لاکتوباسیلوس رامنوس فعالیت مسیرهای سیگنالینگ TLR4 را سرکوب می کند (۳۱).

نمودار ۱. تغییر بیان ژن *tlr2* در رده سلولی STC-1 بعد از تیمار ۲۴ ساعته با (الف) باکتری *B.thetaiotaomicron* فعال در ۱۰ MOI و ۵۰ MOI (ب) غیرفعال شده بواسطه حرارت در ۱۰ MOI و ۵۰ MOI (ج) وزیکول های استخراج شده از باکتری (OMVs) در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (د) سوب سلولی فاقد سلول (CFS) ۲۵% (** p<0.01) * (p<0.05) از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. به عنوان کنترل داخلی از ژن *RPL19* استفاده شد. این آزمایش بصورت سه بار تکرار انجام گرفته است.

بحث

پروبیوتیکها باکتری هایی هستند که به عنوان مکمل های غذایی مصرف می شوند (۲۹)، پروبیوتیکها از طریق فعال کردن گیرنده های TLR2, 4 و به دنبال آن مسیر های آشیاری MAPK, NF-kB, PI3K و فعال کردن پاسخ های ایمنی سلول های اپیتلیالی و سلول های ایمنی در روده شده و موجب بهبود عملکرد سد اپیتلیالی و افزایش بیان پروتئین های اتصالات محکم و مقاومت روده در برابر نشت عوامل بیماری زا می شوند (۲۰)، تحقیقات نشان داده است که TLR2,4 در روده نقش مهم و ضروری در شناسایی و فعالسازی سیستم ایمنی ذاتی، پس از مواجهه با باکتری ها بر عهده دارند (۳۰). در این پژوهش از باکتری *B.thetaiotaomicron* و OMV های *B.thetaiotaomicron* حاصل از آن و همچنین باکتری غیر فعال شده توسط حرارت، STC-1 و سوپر ناتانت باکتری، به عنوان تیمار رده سلولی STC-1، جهت بررسی تغییرات بیان ژن های *tlr2,4* در سطح رونویسی استفاده شده است. در تحقیق حاضر، رده سلولی STC-1 به عنوان مدل بررسی استاندارد سلول های انتروکرین، جهت بررسی بیان TLR ها به کار رفته است (۲۱).

باکتری غیرفعال به عنوان عوامل پاراپیوتیک بر تغییر بیان ژن tlr2,4 در رده سلولی STC-1 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که دو عامل پاراپیوتیک، باکتری غیر فعال و سوپر ناتانت به صورت قابل توجهی بیان دو ژن tlr2,4 را در رده سلولی STC-1 افزایش می دهند. این معنی دار بودن نشان دهنده ویژگی ایمنی زایی این دو عامل است و نقش مهم عوامل پاراپیوتیک را در تقویت سیستم ایمنی نشان می دهد. همچنین افزایش این دوزن TLR2,4 در اثر مشتقات پروپیوتیک *B.theta iotaomicron* شامل باکتری غیرفعال و سوپر ناتانت حاصل از آن، نشان دهنده ایجاد شرایط سالم و پایدار در روده است.

در مطالعه ای که توسط Bermudez-Brito و همکارانش برای بررسی اثرات بیفیدو باکتریوم بِر رده CNCM-4035 به عنوان پروپیوتیک و سوپر ناتانت آن روی پاسخ سلول های دندربیک روده انسانی انجام گرفت، نشان داده شد که بیان ژن های TLR1,2,5,9 تحت تأثیر سوپر ناتانت نسبت به باکتری زنده به شکل چشمگیری افزایش داشته است (۳۶).

Malago و همکارانش نیز در مطالعه دیگری با استفاده از لاكتوباسیلوس کازبی و لاكتوباسیلوس پلاتنتروم به عنوان پروپیوتیک و سوپر ناتانت در رده سلولی Caco2 دریافتند که سوپر ناتانت باعث کاهش معنی دار در سطح IL8 گردید و خواص ضد التهابی بیشتری از باکتری زنده نشان داد (۳۷).

مکانیسم اثرات پروپیوتیکها برای درمان طیف وسیعی از بیماری های روده از جمله درماتیت آتوپیک، انتروکولیت نکروز، و اولسراتیکولیت، احتمالاً به دلیل تأثیر مستقیم یا غیرمستقیم آنها بر روی سیستم ایمنی روده است و مهم تر آن است که بدانیم پروپیوتیکها برای تعدیل پاسخ های ایمنی بدن انسان نقش بسیار کلیدی و ضروری دارند (۳۸).

استفاده از پروپیوتیکها و مشتقات آنها برای درمان بسیاری از بیماری ها و عفونت های میکروبی به عنوان جایگزینی برای داروهای شیمیایی و آنتی بیوتیکها (به دلیل عوارض جانبی فراوان)، یکی داغ ترین مسائل روز پزشکی محسوب می شود (۲۵).

در مجموع ما در این مطالعه نشان دادیم که سوب سلولی فاقد باکتری و باکتری غیر فعال تأثیر مثبت معنی داری در افزایش بیان دو ژن tlr2,4 و افزایش ایمنی ایجاد کردند. قابل ذکر است که این عوامل به جهت دارا بودن انواع متابولیت ها و MAMP های باکتریایی و همچنین عدم تکثیر این ساختارها که حتی در شرایط Leaky Gut وجود انواع زخم های دستگاه گوارش، اختلال در بدن ایجاد نمی کنند، و با توجه به این تر-

Ganguli سلولی Caco2 تحت تیمار با باکتری لاكتوباسیلوس رامنوس انجام گرفت، دریافتند که بیان ژن های TNFa, IL 1 β , IL8 در سلول های اپیتلیال روده ی جنین انسان به صورت معنی داری کاهش داشته است که موجب افزایش ایمنی گردیده است (۳۱).

یکی از مسیرهای ارتباطی باکتری *B.theta iotaomicron* با میزبان، تولید OMV ها نیز زیر مجموعه پست-پیوتیکها محسوب می شوند وضعیت نانوآندازه و غیر تکثیری، OMs ها همراه با مقاومت در برابر تخریب آنزیم و pH کم، در کنار توانایی آنها در تعامل با میزبان، آنها را به عنوان کاندید آیده آل برای رساندن مواد بیولوژیک به سایت های مخاطی، مانند دستگاه گوارش تبدیل می کند (۳۳, ۳۲, ۲۹). در پژوهش حاضر، نتایج تیمار ۲۴ ساعته سلول های STC-1 با OMs حاصل از باکتری *B.theta iotaomicron* حاکی از افزایش معنی دار بیان دوزن tlr2,4 در غلظت ۵۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ در اثر بودن غلظت $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ بود.

در مطالعه ای نشان داده شده است که OMs های *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* که از باکتری های میکروبیوتای روده هستند، به شکل معنی داری فعالیت TLRs را تغییر می دهند. این عملکرد کننده نقش میکروبیوتای روده در پاسخ های دفاعی میزبان است (۳۴). Carvalho و همکارانش نیز نشان دادند که *B.theta iotaomicron* تولید شده توسط باکتری کومنسال میزبان را از طریق دستگاه گوارش فعال کند (۱۳). در مطالعه اشرفیان و همکارانش، تیمار باکتری اکروماسیا و EVs حاصل از آن بر رده سلولی CACO2 انجام گرفت و مشخص شد که باکتری بیان دو ژن tlr2 و tlr4 را در سطح رونویسی به صورت معنی داری افزایش داده، در صورتی که تیمار با OMs رونویسی این دوزن را کاهش دادند (۲۲) احمدی و همکارانش اثر باکتری *B.fragilis* و OMs حاصل از آن را بر رده سلولی Caco2 بررسی کردند و نشان دادند که این باکتری اثر معنی دار کاهشی بر ژن tlr2 و افزایشی بر ژن tlr4 دارد، در صورتی که تأثیر OMs بسته به غلظت متفاوت گزارش شده است (۳۵).

از آنجا که بر اساس تعاریف جدید سازمان بهداشت جهانی و سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد FAO از پروپیوتیک، سلول های غیرزنده و غیرفعال و متابولیت های سالم آنها و به دلیل اثرات چشمگیری که بر سلامتی دارند پروپیوتیک محسوب می شوند (۲۹). در این مطالعه اثرات سوپر ناتانت و

سد روده و کاهش التهاب استفاده شوند. تحقیقات بیشتر برای تأیید این نتایج بسیار مهم است.

بودن این عوامل نسبت به باکتری زنده، حتی در حالت وجود نشت سد سلولی و نقص سیستم ایمنی میزان می‌تواند در درمان بسیاری از بیماری‌های التهابی برای تنظیم یکپارچگی

REFERENCES

1. Fujimura KE, Slusher NA, Cabana MD, Lynch SV. Role of the gut microbiota in defining human health. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8(4):435-54.
2. Tanagho PA, Shohdy KS. GPR 120: The Potential Target for Obesity Treatment. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2016;16:8-11.
3. Walsh CJ, Guinane CM, O'Toole PW, Cotter PD. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Lett* 2014;588:4120-30.
4. Kho ZY, Lal SK. The human gut microbiome—a potential controller of wellness and disease. *Front Microbiol* 2018;1835.
5. Hooks KB, O'Malley MA. Dysbiosis and its discontents. *MBio* 2017;8:e01492-17.
6. Di Lorenzo F, De Castro C, Silipo A, Molinaro A. Lipopolysaccharide structures of Gram-negative populations in the gut microbiota and effects on host interactions. *FEMS Microbiol Rev* 2019;43:257-72.
7. Behrouzi A, Mazaheri H, Falsafli S, Tavassoli ZH, Moshiri A, Siadat SD. Intestinal effect of the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 and its OMV. *J Diab Metab Disord* 2020;19:597-604.
8. Sharifi L, Aghamohammadi A, Mohsenzadegan M, Rezaei N, Towfighi Zavareh F, Moshiri M, et al. Immunomodulation of TLR2 and TLR4 by G2013 (alfa-L-Guluronic acid) in CVID Patients. *Int J Pediatr* 2017;5:5327-37.
9. Chen C-Y, Kao C-L, Liu C-M. The cancer prevention, anti-inflammatory and anti-oxidation of bioactive phytochemicals targeting the TLR4 signaling pathway. *Int J Mol Sci* 2018;19:2729.
10. Llewellyn A, Foey A. Probiotic modulation of innate cell pathogen sensing and signaling events. *Nutrients* 2017;9:1156.
11. Molina-Tijeras JA, Gálvez J, Rodríguez-Cabezas ME. The immunomodulatory properties of extracellular vesicles derived from probiotics: a novel approach for the management of gastrointestinal diseases. *Nutrients* 2019;11:1038.
12. Wegh CA, Geerlings SY, Knol J, Roeslers G, Belzer C. Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. *Int J Mol Sci* 2019;20:4673.
13. Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EM, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021;18:649-67.
14. Teame T, Wang A, Xie M, Zhang Z, Yang Y, Ding Q, et al. Paraprobiotics and postbiotics of probiotic lactobacilli, their positive effects on the host and action mechanisms: a review. *Front Nutr* 2020;7:570344.
15. Chang C-J, Lin T-L, Tsai Y-L, Wu T-R, Lai W-F, Lu C-C, et al. Next generation probiotics in disease amelioration. *J Food Drug Anal* 2019;27:615-22.
16. Thompson AJ, Spears RJ, Zhu Y, Suits MD, Williams SJ, Gilbert HJ, et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* generates diverse α -mannosidase activities through subtle evolution of a distal substrate-binding motif. *Acta Crystallogr D Struct Biol* 2018;74:394-404.
17. Carvalho AL, Fonseca S, Miquel-Clopés A, Cross K, Kok K-S, Wegmann U, et al. Bioengineering commensal bacteria-derived outer membrane vesicles for delivery of biologics to the gastrointestinal and respiratory tract. *J Extracell Vesicles* 2019;8:1632100.
18. Huang-Doran I, Zhang C-Y, Vidal-Puig A. Extracellular vesicles: novel mediators of cell communication in metabolic disease. *Trends Endocrinol Metab* 2017;28:3-18.
19. Konoshenko MY, Lekhnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. *BioMed Res Int* 2018;2018.
20. Fujita Y, Kadota T, Araya J, Ochiya T, Kuwano K. Extracellular vesicles: new players in lung immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2018;58:560-65.

21. Ashrafi F, Behrouzi A, Badi SA, Davari M, Jamnani FR, Fateh A, et al. Comparative study of effect of Akkermansia muciniphila and its extracellular vesicles on toll-like receptors and tight junction. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2019;12:163.
22. Valguarnera E, Scott NE, Azimzadeh P, Feldman MF. Surface exposure and packing of lipoproteins into outer membrane vesicles are coupled processes in *Bacteroides*. *MSphere* 2018;3:e00559-18.
23. Badi SA, Moshiri A, Marvasti FE, Mojtabahzadeh M, Kazemi V, Siadat SD. Extraction and evaluation of outer membrane vesicles from two important gut microbiota members, *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotomicron*. *Cell J (Yakhteh)* 2020;22:344.
24. Wei S-H, Chen Y-P, Chen M-J. Selecting probiotics with the abilities of enhancing GLP-1 to mitigate the progression of type 1 diabetes in vitro and in vivo. *Journal of Functional Foods* 2015;18:473-86.
25. DW sJaR, eds. Molecular cloning: a laboratory manual. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
26. Ashrafi F, Shahriary A, Behrouzi A, Moradi HR, Keshavarz Azizi Raftar S, Lari A, et al. Akkermansia muciniphila-derived extracellular vesicles as a mucosal delivery vector for amelioration of obesity in mice. *Front Microbiol* 2019;10:2155.
27. Bonomi L, Brown M, Ungerleider N, Muse M, Matzuk MM, Schneyer A. Activin B regulates islet composition and islet mass but not whole body glucose homeostasis or insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303:E587-96.
28. Motta EVS, Powell JE, Leonard SP, Moran NA. Prospects for probiotics in social bees. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2022;377:20210156.
29. Korotky O, Huet A, Dvorshchenko K, Kobyliak N, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Probiotic composition and chondroitin sulfate regulate TLR-2/4-mediated NF-κB inflammatory pathway and cartilage metabolism in experimental osteoarthritis. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2021;13:1018-32.
30. Ganguli K, Collado MC, Rautava J, Lu L, Satokari R, von Ossowski I, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG and its SpaC pilus adhesin modulate inflammatory responsiveness and TLR-related gene expression in the fetal human gut. *Pediatr Res* 2015;77:528-35.
31. Zhang B, Zhao J, Jiang M, Peng D, Dou X, Song Y, et al. The Potential Role of Gut Microbial-Derived Exosomes in Metabolic-Associated Fatty Liver Disease: Implications for Treatment. *Front Immunol* 2022;13.
32. Wegh CAM, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C. Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. *Int J Mol Sci* 2019;20:4673.
33. Van Bergenhenegouwen J, Kraneveld AD, Rutten L, Kettelerij N, Garssen J, Vos AP. Extracellular vesicles modulate host-microbe responses by altering TLR2 activity and phagocytosis. *PLoS One* 2014;9:e89121.
34. Badi SA, Khatami S, Irani S, Siadat SD. Induction effects of *Bacteroides fragilis* derived outer membrane vesicles on toll like receptor 2, toll like receptor 4 genes expression and cytokines concentration in human intestinal epithelial cells. *Cell J (Yakhteh)* 2019;21:57.
35. Bermudez-Brito M, Muñoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Matencio E, Bernal MJ, Romero F, et al. Cell-free culture supernatant of *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 decreases pro-inflammatory cytokines in human dendritic cells challenged with *Salmonella typhi* through TLR activation. *PLoS One* 2013;8:e59370.
36. Malago J, Tooten P, Koninkx JF. Anti-inflammatory properties of probiotic bacteria on *Salmonella*-induced IL-8 synthesis in enterocyte-like Caco-2 cells. *Benef Microbes* 2010;1:121-30.
37. Tursi A, Brandimarte G, Papa A, Giglio A, Elisei W, Giorgiotti GM, et al. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL# 3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* 2010;105:2218.