

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

Somaye Vaezijoze<sup>1</sup>, Shiva Irani<sup>1</sup>, Seyed Davar Siadat<sup>2,3</sup>, Mohammadreza Zali<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Microbiology Research Center (MRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Gastroenterology 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

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

سمیه واعظی جزء<sup>۱</sup>، شیوا ایرانی<sup>۱</sup>، سید داور سیادت<sup>۲</sup>، محمدرضا زالی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> بخش سل و تحقیقات ریوی، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> مرکز تحقیقات میکروب شناسی، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

<sup>۴</sup> 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. thetaiotaomicron* 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 برعهده دارند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر باکتری *B. thetaiotaomicron* و مشتقات آن بر تغییرات بیان ژن های *tlr2, tlr4* بود.

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

**یافته‌ها:** تیمار رده سلولی STC-1 با باکتری زنده و فعال *B. thetaiotaomicron* 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  $50 \mu\text{g/ml}$  معنی دار ( $p=0/01$ ،  $p=0/02$ ) بود، ولی در غلظت  $100 \mu\text{g/ml}$  تغییرات معنی دار نبود. باکتری غیرفعال در *MOI 10* و *MOI 50* تاثیر معنی داری در افزایش دو ژن داشت (به ترتیب  $p=0/03$ ،  $p=0/03$ ). سوپرناتانت ۲۵ درصد به صورت قابل توجهی بیان دو ژن *tlr2* ( $p=0/038$ )، *tlr4* ( $p=0/034$ ) را در سطح رونویسی افزایش داد.

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

**واژگان کلیدی:** باکتری *B. thetaiotaomicron* OMVs، میکروبیوتا، *TLR2*، *TLR4*

### مقدمه

انسان همزیستی 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 همزیست با انسان در دستگاه گوارش دیده می شود. جمعیت میکروبی دستگاه گوارش اکوسیستمی پویا و چندلایه ای را تشکیل می دهند؛ به این ترتیب که با یک الگوی استقرار مشخص همراه با گرادیمان

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 ۱۰۰ تریلیون (هزار میلیارد) میکروارگانیسم درون و روی بدن

آدرس نویسنده مسئول: تهران، بخش سل و تحقیقات ریوی، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران - سیمه

واعظی جزء (email: d.siadat@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-6892-5603

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۶/۱۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۷/۲۳

افزایشی غلظت، از لومن گاستریک به سمت روده کوچک تا کولون و رکتوم به بیشترین مقدار خود می‌رسند (۳). میکروبیوتا عملکردهایی 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 کربوهیدرات‌های غیر قابل هضم برای تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه (SCFA)، متابولیسم اسیدهای صفرای 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 در همزیستی شود که به طور بالقوه میزبان را برای چندین بیماری مهم مستعد می‌کند، بیماری‌های مزمن نظیر سندروم متابولیک (مانند چاقی و دیابت)، بیماری‌های التهابی شکمی، دیابت ملیتوس، آترواسکلروزیس، بیماری کبد الکلی ALD کبد چرب غیر الکلی، سیروز و کارسینوما کبدی کند که ارتباط همگی آنها با میکروبیوتای روده اثبات شده است (۵، ۶).

تعدیل میکروبیوتای روده برای حفظ تعادل مطلوب و بهبود سلامت انسان از اهمیت بالایی برخوردار است. در این میان مصرف پروبیوتیک‌ها (probiotic)، به عنوان مکمل‌های غذایی اثرات مختلف مفیدی بر عملکرد روده دارد و در اکثر موارد با بهبود دیس بیوز و تعدیل 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 در جهت سلامت میزبان مورد استفاده قرار گیرد. جدیدترین عضو خانواده بیوتیک‌ها، پست بیوتیک است، یک ترکیب فعال زیستی، تولید شده توسط میکروارگانیسم، 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. سوپرناتانت حاصل از محیط کشت باکتری (cell free supernatante) CFS به عنوان یک پست بیوتیک می‌تواند کارایی داشته باشد. از دیگر بیوتیک‌ها می‌توان به پاراپروبیوتیک‌ها اشاره کرد که، پروبیوتیک‌های غیرزنده

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 (۹، ۱۰). اخیراً اعضای جنس *Bacteroides* به خصوص باکتری *Bacteroides thetaiotaomicron* (*B.thetaiotaomicron*) در مطالعات متعدد به عنوان سویه مناسبی از نسل جدید پروبیوتیک‌ها در نظر گرفته شده است (۱۱).

این باکتری، نوعی باکتری میله‌ای، گرم منفی و بی‌هوازی است که در دستگاه گوارشی به عنوان یک باکتری کومنسال مستقر است، حدود ۶٪ از فلور نرمال گات و ۱۰-۱۲٪ از باکترئیدس‌ها را تشکیل می‌دهد و با توجه به آنزیم‌های فراوانی که جهت هیدرولیز پلی ساکاریدهای غیرقابل هضم دارد، جزو فراوان‌ترین مصرف‌کنندگان کربوهیدرات‌های گات معرفی می‌شود این باکتری به عنوان مدلی جهت مطالعه برهمکنش‌های میزبان-باکتری به کار می‌رود این باکتری دارای طیف وسیعی از گلیکوزید هیدرولازهاست که توانایی شکستن تعداد زیادی از باندهای آلفا گلیکوزیدی را دارند. می‌توان گفت که نقش آنزیماتیک این باکتری در دستگاه گوارش بسیار پررنگ است و این باکتری‌ها بدون شک یک برتری رقابتی در روده خواهند داشت (۱۲). *B.thetaiotaomicron* سیگنالینگ کلسیم داخل سلولی را تقویت و از تخریب آنزیم‌های در برابر پروتئازهای موجود در دستگاه گوارش محافظت می‌کند، به علاوه به ترشح وزیکول‌های خارج سلولی (OMVs) - Membrane Vesicles Outer به روشی وابسته به سولفاتاز، ماکروفاژهای روده را تعدیل می‌کند (۱۳).

واکنش‌های متقابل بین میزبان و میکروبیوتای روده، شبکه‌ای پیچیده از مولکول‌های فعال بیولوژیکی و مسیره‌های متابولیکی است، که به طور مشخص توسط میکروارگانیسم‌های روده ترشح و تنظیم می‌شوند. برخی از این مواد تنظیمی از وزیکول‌های خارج سلولی بسته بندی و آزاد می‌شوند (۱۴). OMVs‌ها با انتقال به اندام‌های 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 مسیره‌های مختلف سیگنالینگ را داشته باشند (۱۵).

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

OMVs (RNA و DNA) را قادر می‌سازند که با کمک گیرنده‌های تشخیص الگو (PRRs) در تعامل با سلول‌های میزبان، مسیرهای سیگنالیکی را فعال می‌کنند که بیان سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها را سبب می‌شود (۱۶). استفاده از OMVs در برخی موارد که استفاده از باکتری‌های زنده در افراد با نقص سد روده یا نقص سیستم ایمنی می‌تواند خطرناک باشد، جایگزین مناسبی برای پروبیوتیک‌های زنده در نظر گرفته شده است (۷).

همان‌طور 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 سیگنالیکی مخاط روده از طریق Toll-like receptors (TLRs) و domain-containing protein 1 and 2 (NOD1 and NOD2) Nucleotide-binding oligomerization ایفا می‌کند (۱۷).

TLRها یکی از ۱۰ نوع پروتیین‌های گذرنده از غشا (transmembrane proteins) هستند که به عنوان گیرنده‌های شناسایی الگو (Pattern Recognition Receptors, PRR) شناخته می‌شوند و در سیستم ایمنی ذاتی نقش بسیار مهمی دارند. این گیرنده‌ها در اکثر سلول‌های اپیتلیال و سلول‌های ایمنی بیان میشوند (۱۸). این گیرنده‌ها دارای موتیف‌های مولکولی حفاظت شده‌ای هستند که الگوهای مولکولی وابسته به عوامل بیماری‌زا و مولکول‌های عفونی را شناسایی می‌کنند (۱۹). تاکنون ۱۳ نوع TLR شناسایی شده است که TLR2, 4, 5, 9 از مهم‌ترین آنها هستند. TLR2 لیپوپلی ساکارید، پپتیدوگلیکان و گلیکولیپیدها را در دیواره سلولی شناسایی می‌کند و TLR4 عمل شناسایی لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی را بر عهده دارد (۷). میکروبیوتای روده از طریق فعال کردن گیرنده‌های TLR2, 4 به دنبال آن مسیرهای آپشاری PI3k و NF-kB و MAPK موجب فعال شدن پاسخ‌های ایمنی سلول‌های اپیتلیالی و نیز سلول‌های ایمنی در روده می‌شود. بدین ترتیب سبب بهبود عملکرد سد اپیتلیالی و افزایش بیان پروتئین‌های اتصالات محکم و در پی آن مقاومت روده در برابر نشت عوامل بیماری‌زا و ایمنی نسبت به بیماری‌هایی مانند IBD، چاقی، دیابت هیپرگلیسمی و نیز سرطان می‌شوند (۲۰).

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

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

## مواد و روشها

### مواد مورد استفاده

محیط‌های کشت BHI-3 QULAB (شرکت cat: Agar1 BHI (cat: 39-0303) Broth (cat: QB: 65-6491) NO: QB: 65-6491، دستگاه پمپ خلأ آنوکسومات مدل AN20P کمپانی MART، محیط کشت سلول شرکت Gorgen (cat: E0500-190)، FBS غیر فعال Gibco™, MA, USA (cat: 10099133) Gibco™, MA, USA، اسید آمینه‌های غیر ضروری bio idea (cat: 10099133) Gibco™, MA, USA، تریپسین (cat: 2520056) Gibco™, MA, USA، EDTA 0/25 % (Gibco™, MA, USA)، کیت استخراج mRNA یکتا تجهیز (Cat# YT9066) و کیت سنتز cDNA یکتا تجهیز، (cat No: YT4500) استفاده شد.

### کشت سوش باکتری

در این مطالعه سوبه استاندارد (۱۰۷۷۴) *B. thetaiotaomicron* (ATCC) از کلکسیون نگهداری باکتری‌های انیستیتوپاستور تهیه شد. برای فعال شدن و کشت این باکتری بی‌هوازی، از محیط‌های کشت BHI استفاده شد. به منظور فعال‌سازی، احیاء و شروع استفاده از این سوش استاندارد باکتری، ۱/۵ میلی لیتر از محیط کشت مایع BHI غنی شده با همین، منادیون و آل سیستین، با استفاده از سرنگ استریل به داخل ویال باکتری تزریق و هموژن گردید. سپس ۲۰۰ ماکرولیتراز سوپرناتانت هموژن شده به چند پلیت از محیط کشت BHI آگار اضافه و با استفاده از سوآپ استریل کشت داده شد و به درون جار بی‌هوازی منتقل گشت. سپس با استفاده از دستگاه پمپ خلأ آنوکسومات حاوی (CO<sub>2</sub>: 10%, H<sub>2</sub>: 10%, N<sub>2</sub>: 80%)، شرایط بی‌هوازی 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 sRNA۱۶ از باکتری *B. thetaiotaomicron* انجام گرفت (طبق مطالعه انجام شده توسط گروه حاضر در تحقیق) (۲۱).

محیط کشت مورد استفاده DMEM high Glucose، حاوی FBS ۱۲٪/۵ 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٪ CO<sub>2</sub> 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 بعد از 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 تهیه گردید که حاوی  $10^8 \times 3$  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 باکترئوئیدس تتایتومیکرون و مشتقات آن (باکتری غیرفعال شده با حرارت، OMVs و CFS حاصل از آن)

جهت تیمار سلول ها با باکترئوئیدس تتایتومیکرون و مشتقات آن، پس از پر شدن فلاسک ها و رسیدن به تراکم ۷۵٪، سلول ها تریپسینه و با دور ۱۱۰g به مدت ۵ دقیقه سانتیفریوژ شدند، پلت حاصله حل شد و سپس توسط لام نئوبار مورد شمارش قرار گرفت. پس از شمارش، تعداد  $10^5 \times 1/2$  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 1% FBS (بدون آنتی بیوتیک و اسیدهای آمینه) جایگزین شد و بعد از ۴ ساعت آماده تیمار شد.

مقدار محاسبه شده هر ۱۰ MOI و ۵۰ MOI باکتری فعال و غیر فعال شده با حرارت، بصورت جداگانه، به کشت سلول اضافه شد و به مدت ۲۰ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار انکوبه شد. همچنین OMVs با غلظت های ۵۰ μg/ml و ۱۰۰ 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 CO<sub>2</sub> دار انکوبه شد.

#### بررسی بیان ژن های مورد مطالعه به روش qRT-PCR

بعد از تیمار رده سلولی STC-1 با 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 و زیکول های غشای خارجی باکتری گرم منفی *B. thetaiotaomicron* بعد از 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 فیزیکوشیمیایی قرار گرفتند (۲۲). سپس جهت بررسی سایز و شکل وزیکول های استخراج شده، از هردو میکروسکوپ الکترونی TEM و SEM استفاده شد. با استفاده از روش Bradford غلظت پروئینی 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 BHI 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 آل سیستئین به حجم ۱۰۰ سی سی تلقیح گردید، سوسپانسیون حاصله در شرایط بی هوازی (N<sub>2</sub>:80%، H<sub>2</sub>:10%، CO<sub>2</sub>: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 حداکثر میزان رشد خود (فاز لگاریتمی) برسد. جهت اطمینان از میزان رشد باکتری، با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر جذب در OD ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. در ادامه، برای جداسازی فاز مایع از سوسپانسیون حاوی باکتری، سوسپانسیون به فالكون منتقل گردید و در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۲۰۰۰ سانتیفریوژ 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 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 چسبیده با رشد آهسته و زمان دو برابر شدن ۵۴ ساعت است که از بانک سلولی بلژیک (ATCC® CRL 3254) تهیه شده است.

که فرم غیرفعال شده این باکتری به واسطه حرارت، در MOI 10 ( $p=0/0.3$ ) و MOI 50 ( $p=0/0.3$ ) سطح mRNA این ژن را به صورت معنی داری افزایش داد.

وزیکول های غشای خارجی این باکتری در غلظت ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  تاثیر معنی داری در تغییر بیان ژن TLR2 در مقایسه با کنترل (تیمار با Sucrose) نداشتند، در حالی که بیان این ژن در غلظت  $50 \mu\text{g/ml}$  OMVs به طور معنی داری افزایش یافت ( $p=0/0.14$ ).

مقدار رونویسی ژن *tlr2* در اثر تیمار با *B. thetaiotaomicron* CFS به طور معنی داری افزایش یافت ( $p=0/0.38$ ).

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، OMVs و CFS 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 هردو 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 ( $p=0/0.42$ ) و MOI 50 ( $p=0/0.1$ ) رونویسی این ژن را افزایش داد. وزیکول های استخراج شده از این باکتری در غلظت  $50 \mu\text{g/ml}$  موجب افزایش معنی دار ( $p=0/0.29$ ) رونویسی ژن *tlr4* شدند. سوپ سلولی فاقد سلول از باکتری مذکور نیز میزان mRNA این ژن را افزایش داد ( $p=0/0.34$ ).

استخراج شده با کمک دستگاه نانودراپ و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ و مشاهده باندهای RNA ریپوزومی 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<sup>۲</sup> 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 اختصاصیت آن ها، توسط شرکت رویان توکازن از شرکت متابیون 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 delta CT (روش لیوارک) محاسبه شد. همچنین برای محاسبات آماری داده ها از روش های one way ANOVA و T test و تست تعقیبی Tukey 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.

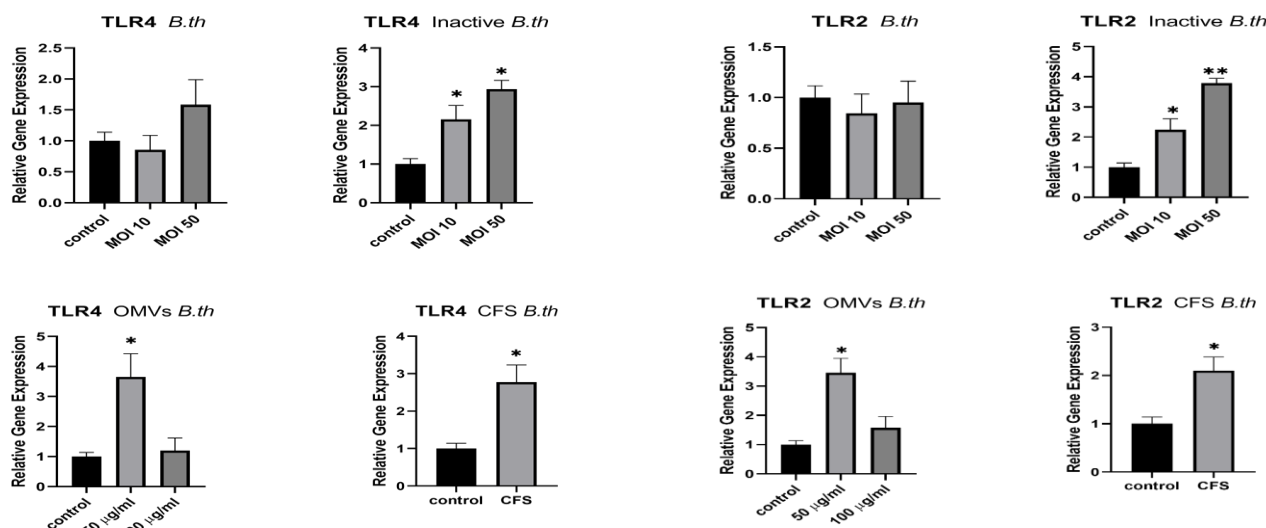
### یافته ها

**اثرات باکتری *B. thetaiotaomicron* زنده و فعال، OMVs و CFS حاصل از آن و باکتری غیرفعال شده 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 نداشته، در صورتی

جدول ۱. توالی پرایمرهای بکاررفته در واکنش qRT-PCR

primer Name	Sequence	Product size (bp)	References
m- tlr2-forward	TCCTGCGAACTCCTATCC	151	(26)
m- tlr2-reverse	CCTGGTGACATTCGAAGAC		
m-tlr4-forward	GCCTTCAGGGAATTAAGCTCC	114	(26)
m-tlr4-reverse	GATCAACCGATGGACGTGTAAG		
m-RPL19-forward	CCTGAAGGTCAAAGGGAATGTGTT	143	(27)
m-RPL19-reverse	GCTTCGTGCTTCCTTGGTCTTA		



**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) و زیکول های استخراج شده از باکتری (OMVs) در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (د) سوپ سلولی فاقد سلول (CFS) 25% \*\* (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.

**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) و زیکول های استخراج شده از باکتری (OMVs) در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (د) سوپ سلولی فاقد سلول (CFS) 25% \*\* (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

در این مطالعه، باکتری *B. thetaiotaomicron* که یکی از اعضای مهم خانواده باکترئیدیت 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 میکروبیوتای 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 سوبه های باکتری بستگی دارد و پروبیوتیکها و مشتقات آنها می توانند پاسخ های متنوعی را ایجاد کنند (۲۰). Finamore و همکارانش در مطالعه ای که با استفاده از دو باکتری انتروتوکسیژنیک 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).

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 آبخاری NF-κB, PI3K, MAPK 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 فعال سازی سیستم ایمنی ذاتی، پس از مواجهه با باکتریها برعهده دارند (۳۰). در این پژوهش از باکتری *B. thetaiotaomicron* و OMV های حاصل از آن و همچنین باکتری غیر فعال شده توسط حرارت 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 انترواندوکرین، جهت بررسی بیان TLRها به کار رفته است (۲۱).

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

در مطالعه‌ای که توسط Bermudez-Brito و همکارانش برای بررسی اثرات بیفیدوباکتریوم بر رده CNCM-4035 به عنوان پروبیوتیک و سوپرناتانت آن روی پاسخ سلول‌های دندریتیک روده انسانی انجام گرفت، نشان داده شد که بیان ژن های *TLR1,2,5,9* تحت تاثیر سوپرناتانت نسبت به باکتری زنده به شکل چشمگیری افزایش داشته است (۳۶)

و همکارانش نیز در مطالعه دیگری با استفاده از لاکتوباسیلوس کازی و لاکتوباسیلوس پلانتروم به عنوان پروبیوتیک و سوپرناتانت در رده سلولی Caco2 دریافتند که سوپرناتانت باعث کاهش معنی‌دار در سطح IL8 گردید و خواص ضد التهابی بیشتری از باکتری زنده نشان داد (۳۷).

مکانیسم اثرات پروبیوتیک‌ها برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌های روده از جمله درماتیت آتوپیک، انتروکولیت نکروز، و اولسراتیوکولیت، احتمالاً به دلیل تأثیر مستقیم یا غیرمستقیم آنها بر روی سیستم ایمنی روده است و مهم‌تر آن است که بدانیم پروبیوتیک‌ها برای تعدیل پاسخ‌های ایمنی بدن انسان نقش بسیار کلیدی و ضروری دارند (۳۸).

استفاده از پروبیوتیک‌ها و مشتقات آنها برای درمان بسیاری از بیماری‌ها و عفونت‌های میکروبی به عنوان جایگزینی برای داروهای شیمیایی و آنتی بیوتیک‌ها (به دلیل عوارض جانبی فراوان)، یکی داغ‌ترین مسایل روز پزشکی محسوب می‌شود (۲۵).

در مجموع ما در این مطالعه نشان دادیم که سوپ سلولی فاقد باکتری و باکتری غیر فعال تاثیر مثبت معنی‌داری در افزایش بیان دو ژن *tlr2,4* و افزایش ایمنی ایجاد کردند. قابل ذکر است که این عوامل به جهت دارا بودن انواع متابولیت‌ها و MAMP‌های باکتریایی و همچنین عدم تکثیر این ساختارها که حتی در شرایط Leaky Gut و وجود انواع زخم‌های دستگاه گوارش، اختلال در بدن ایجاد نمی‌کنند، و با توجه به ایمن‌تر

Ganguli و همکارانش در مطالعه‌ای که با استفاده از رده سلولی Caco2 تحت تیمار با باکتری لاکتوباسیلوس رامنوس انجام گرفت، دریافتند که بیان ژن‌های *TNFa, IL1β, IL8* در سلول‌های اپیتلیال روده ی جنین انسان به صورت معنی‌داری کاهش داشته است که موجب افزایش ایمنی گردیده است (۳۱).

یکی از مسیرهای ارتباطی باکتری *B.thetaiotaomicron* با میزبان، تولید OMV است. OMVها نیز زیر مجموعه پست-بیوتیک‌ها محسوب می‌شوند وضعیت نانواندازه و غیرتکتیری، OMVsها همراه با مقاومت در برابر تخریب آنزیم و pH کم، درکنار توانایی آنها در تعامل با میزبان، آنها را به عنوان کاندید ایده آل برای رساندن مواد بیولوژیک به سایت‌های مخاطی، مانند دستگاه گوارش تبدیل می‌کند (۲۹, ۳۲, ۳۳). در پژوهش حاضر، نتایج تیمار ۲۴ ساعته سلول های STC-1 با OMVs حاصل از باکتری *B.thetaiotaomicron* حاکی از افزایش معنی‌دار بیان دو ژن *tlr2,4* در غلظت  $50 \mu\text{g/ml}$  و بی اثر بودن غلظت  $100 \mu\text{g/ml}$  بود.

در مطالعه‌ای نشان داده شده است که OMV‌های *Bifidobacterium* و *Lactobacillus* که از باکتری‌های میکروبیوتای روده هستند، به شکل معنی‌داری فعالیت TLRs را تغییر می‌دهند. این عملکرد OMVها تایید کننده نقش میکروبیوتای روده در پاسخ‌های دفاعی میزبان است (۳۴). Carvalho و همکارانش نیز نشان دادند که OMV‌های تولید شده توسط باکتری کومنسال *B. thetaiotaomicron* می‌تواند پاسخ‌های ایمنی میزبان را از طریق دستگاه گوارش فعال کند (۱۳). در مطالعه اشرفیان و همکارانش، تیمار باکتری اکرومانسیا 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 معنی‌داری افزایش داده، در صورتی که تیمار با OMVs رونویسی این دو ژن را کاهش دادند (۲۲) احمدی و همکارانش اثر باکتری *B. fragilis* و OMVs حاصل از آن را بر رده سلولی Caco2 بررسی کردند و نشان دادند که این باکتری اثر معنی‌دار کاهشی بر ژن *tlr2* و افزایشی بر ژن *tlr4* دارد، در صورتی که تاثیر OMVs 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 پروبیوتیک، سلول‌های غیرزنده و غیرفعال و متابولیت‌های سالم آنها و به دلیل اثرات چشمگیری که بر سلامتی دارند پروبیوتیک محسوب می‌شوند (۲۹). در این مطالعه اثرات سوپرناتانت و

بودن این عوامل نسبت به باکتری زنده، حتی در حالت وجود نشد سد سلولی و نقص سیستم ایمنی میزبان می‌تواند در درمان بسیاری از بیماری‌های التهابی برای تنظیم یکپارچگی سد روده و کاهش التهاب استفاده شوند. تحقیقات بیشتر برای تأیید این نتایج بسیار مهم است.

## 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, Falsafi S, Tavassol 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 COVID 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, Roeselers 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  $\alpha$ -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, Lekchnov 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. Ashrafiyan 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, Mojtahedzadeh M, Kazemi V, Siadat SD. Extraction and evaluation of outer membrane vesicles from two important gut microbiota members, Bacteroides fragilis and Bacteroides thetaiotaomicron. *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. Ashrafiyan 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. Korotkyi O, Huet A, Dvorshchenko K, Kobylak N, Falalyeyeva T, Ostapchenko L. Probiotic composition and chondroitin sulfate regulate TLR-2/4-mediated NF- $\kappa$ B 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, Kettelarij 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, Giorgetti 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.