The Effect of *Lactobacillus Reuteri* Cell Wall and Cytoplasmic Extract on the Stimulation of IL-4 and IFN γ Cytokines Production

Mohammad Hosein Soltani Kordsholi
Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch Islamic Azad University, Shiraz, Iran, mohammadhoseinsoltanik@gmail.com
Elham Moazamian*
Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Agriculture and Modern Technology,Shiraz Branch ,Islamic Azad University, Shiraz, Iran, elhammoazamian@gmail.com
Mehdi Kalani
Department of Immunology, Medical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, mkalani2008@gmail.com

Abstract

Introduction: *Lactobacillus* bacteria are known as living microorganisms in the stomach, biliary secretions, and pancreas. They attach to the epithelial cells and colonize the human intestines. Many probiotics belong to a large group of bacteria called lactic acid bacteria. Due to immunomodulatory effect of probiotics and the impact of these bacteria on the performance of immune responses, the aim of this study was to evaluate the effect of *Lactobacillus reuteri* cell wall and cytoplasmic extract effects on the stimulation of IL-4 and IFN γ cytokines production.

Materials and methods: For this purpose, 20 samples of traditional dairy and pasteurized dairy products were collected. Molecular identification was performed using molecular-specific primers. Bacterial DNA was extracted and the identification of bacterial species was determined by genetic sequencing of PCR product. Human heparin blood was then prepared and peripheral mononuclear blood cells were isolated. To evaluate immune stimulation, IL-4 and IFN γ cytokines production were measured by ELISA method.

Results: The results of this study showed that from 20 dairy samples, 7 isolates of *Lactobacillus* reuteri were identified. The immune system for the production of interleukin-4 and IFN γ in the presence of cell wall and cytoplasmic cell extracts of Lactobacillus reuteri was not stimulated. *Lactobacillus casei* extract compared to other two bacteria has the greatest effect on immune stimulation and increased IL-4 production.

Discussion and conclusion: The level of cytokines produced in human monocular cells did not increase after stimulating the immune system. The Lactobacillus reuteri bacterium will not be used in immunotherapy.

Key words: *Lactobacillus Casei*, Immunotherapy, Cytokines, Mononuclear blood cells.

* Corresponding author
Received: September 8, 2019/ **Accepted:** December 25, 2019

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله: پژوهشی)
سال هشتم، شماره ۳۱، پاییز ۱۳۹۸، صفحه ۷۱-۸۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۱۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۰۴
Doi:10.22108/BJM.2019.118287.1219

تأثیر دیوارهٔ سلولی و عصارهٔ سیتوپلاسمی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* بر تحریک تولید سیتوکین‌های اینترلوکین- ٤ و اینترفرون گاما

محمدحسین سلطانی کردشولی: کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران،
mohammadhoseinsoltanik@gmail.com

الهام معظمیان*: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران،
elhammoazamian@gmail.com

مهدی کلانی: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران،
mkalani2008@gmail.com

چکیده

مقدمه: لاکتوباسیلوس‌ها، ریزموجودات زنده‌ای‌اند که در معده، ترشحات صفراوی و پانکراس وجود دارند، به سلول‌های اپیتلیال متصل و در رودهٔ انسان کلونیزه می‌شوند. بسیاری از پروبیوتیک‌ها به گروه بزرگی از باکتری‌ها به نام باکتری‌های لاکتیک‌اسید تعلق دارند. باتوجه‌به ویژگی‌های تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی پروبیوتیک‌ها و اثر تنظیمی آنها بر عملکردهای سیستم ایمنی، ارزیابی اثر دیوارهٔ سلولی و عصارهٔ سیتوپلاسمی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* بر تحریک تولید سیتوکین‌های اینترلوکین-۴ و اینترفرون گاما هدف مطالعهٔ حاضر است.

مواد و روش‌ها: تعداد ۲۰ نمونه محصول لبنی سنتی و پاستوریزه جمع‌آوری و شناسایی مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. DNA باکتری‌ها جداسازی و شناسایی گونه‌های باکتری‌ها با تعیین توالی ژنتیکی محصول PCR انجام شد؛ سپس خون هپارینهٔ انسانی تهیه شد و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی جداسازی شدند. میزان تحریک سیستم ایمنی، سیتوکین‌های اینترلوکین-۴ و اینترفرون گاما به روش الایزا اندازه‌گیری شدند.

نتایج: از تعداد ۲۰ نمونه محصولات لبنی، ۷ جدایهٔ *لاکتوباسیلوس روتری* جداسازی و شناسایی شد. سیستم ایمنی برای تولید اینترلوکین-۴ و اینترفرون گاما در حضور دیوارهٔ سلولی و عصارهٔ سلولی سیتوپلاسمی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* تحریک نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: سطح سیتوکین‌های تولیدشده در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی انسانی پس‌از تحریک سیستم ایمنی افزایش نیافت و درنتیجه، باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در ایمونوتراپی کاربردی ندارد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس‌ها، ایمونوتراپی، سیتوکین، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها، ریزموجودات زنده‌ای‌اند که در معده، ترشحات صفراوی و پانکراس وجود دارند، به سلول‌های اپی‌تلیال متصل و در رودهٔ انسان کلونیزه می‌شوند. بسیاری از پروبیوتیک‌ها به گروه بزرگی از باکتری‌ها به نام باکتری‌های لاکتیک‌اسید تعلق دارند (۱). از میان ریزموجودات پروبیوتیک، باکتری‌های لاکتیک‌اسید مهم‌ترین گروه به شمار می‌آیند و در این میان، جنس *لاکتوباسیلوس* متداول‌ترین ریزموجود به‌کاررفته در تولید محصولات پروبیوتیکی است (۲). سودآوری پژوهش‌ها در زمینهٔ باکتری‌های لاکتیک‌اسید و نیاز تمام کشورها به این باکتری‌ها سبب شده است کشورهای درحال توسعه از مدت‌ها پیش به‌طور جدی برای شناسایی باکتری‌های لاکتیک‌اسید بومی تلاش کنند (۳).

پروبیوتیک‌ها از طریق تولیدات خود مانند اجزای سلولی، متابولیت‌ها و DNA بر عملکرد سیستم ایمنی میزبان اثر می‌گذارند؛ به عبارتی، اجزای پروبیوتیک‌ها به‌ویژه DNA و پپتیدوگلیکان پاسخ‌هایی را در سیستم ایمنی ذاتی به راه می‌اندازند (۴).

در بین پروبیوتیک‌ها، لاکتوباسیلوس‌ها توجه بیشتری را به خود معطوف کرده‌اند. مهم‌ترین اثر پروبیوتیک‌ها، جایگزینی آنها در رودهٔ کوچک است که سبب تحریک روده و پاک‌سازی آن و به‌این‌ترتیب، مانع چسبیدن بیماری‌زاها و مهار اثر سمی توکسین‌ها می‌شود. مصرف پروبیوتیک‌ها آثار مفیدی بر سلامت افراد دارد که ازجملهٔ آنها عبارتند از: ۱- بهبود هضم لاکتوز در افرادی که تحمل لاکتوز ندارند؛ ۲- کم‌شدن کلسترول؛ ۳- کمک به پیشگیری از سرطان؛ ۴- تحریک سیستم ایمنی؛ ۵- کنترل عفونت ادراری در خانم‌ها؛ ۶- کنترل و پیشگیری عفونت‌های روده‌ای؛ ۷- تعادل باکتری‌های بومی (۵).

لاکتوباسیلوس روتری، باکتری گرم مثبتی است که به‌طور طبیعی در رودهٔ پستانداران و پرندگان زندگی می‌کند. ابتدا در دههٔ ۱۹۸۰ توضیح داده شد برخی گونه‌های این باکتری پروبیوتیک هستند. از قرن نوزدهم، *لاکتوباسیلوس روتری* در طبقه‌بندی علمی باکتری‌های لاکتیک‌اسید ثبت شد (۶). پروبیوتیک‌ها نه‌تنها محرک رشد به شمار می‌آیند، برای تحریک سیستم ایمنی بدن و پیشگیری از ابتلا به بسیاری از بیماری‌های عفونی به کار می‌روند (۷).

پروبیوتیک‌ها در سطوح متعددی ازجمله افزایش سطح سیتوکاین‌ها و ایمونوگلوبولین‌ها، افزایش تکثیر سلول‌های مونونوکلئاز، فعال‌کردن ماکروفاژها، افزایش فعالیت سلول‌های killer Natural، تعدیل خودایمنی و تحریک ایمنی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا و پروتوزوآها روی سیستم ایمنی تأثیر می‌گذارند (۸).

ایمنی‌درمانی یا ایمونوتراپی، روشی درمانی برای برخی بیماری‌ها ازجمله سرطان است که با تحریک یا سرکوب پاسخ سیستم ایمنی عمل می‌کند. برخی اینترلوکین‌ها، سیتوکین‌ها و کموکین‌ها در این روش درمانی به کار می‌روند. تحریک سیستم ایمنی برای درمان سرطان و برخی از انواع نقص‌های سیستم ایمنی به کار رفته و سرکوب سیستم ایمنی در درمان حساسیت ، رد پیوند اعضا و ... آزموده شده است. درمان سرطان یکی از مهم‌ترین زمینه‌های پژوهشی علوم پایه و بالینی در علوم پزشکی است. پس‌از جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی، روش ایمونوتراپی با استفاده از سیستم ایمنی مهم‌ترین روش مکمل و تأثیرگذار در درمان سرطان

است و امروزه، کارآزمایی‌های بالینی وسیعی در انواع مختلف آن درحال انجام است. بررسی پیچیدگی برخورد سیستم ایمنی با تومور لازمهٔ ارائهٔ راهکار درمانی مناسب برای ایمونوتراپی سرطان است (۹ و ۱۰).

هدف مطالعهٔ حاضر، ارزیابی تحریک سیستم ایمنی تیپ ۱ و ۲ در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی انسانی با استفاده از *لاکتوباسیلوس روتری* است.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه: مطالعه به‌طور مقطعی از خرداد ۱۳۹۷ تا اردیبهشت ۱۳۹۸ انجام شد. جمع‌آوری نمونه برای جداسازی باکتری‌ها به‌طور تصادفی از محصولات لبنی انجام، شناسایی باکتری‌ها به روش مولکولی انجام و اثر باکتری‌های جداشده بر سلول‌های منوکلئار و تحریک تولید اینترلوکین ۴ و اینترفرون گاما با استفاده از آزمایش الایزا ارزیابی شد.

جمع‌آوری نمونه: تعداد ۲۰ نمونه از محصولات لبنی سنتی و پاستوریزه شامل شیر، ماست، پنیر، کشک و ... به‌طور تصادفی از استان فارس جمع‌آوری و برای جداسازی باکتری به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل شدند.

جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها از محصولات لبنی: تعلیق باکتریایی از نمونه‌های محصولات لبنی با استفاده از محلول پپتون فیزیولوژیکی استریل (۸/۵ گرم‌برلیتر کلریدسدیم و ۱ گرم‌برلیتر پپتون باکتریولوژیکی) تهیه شد. ابتدا حدود ۱۰ گرم از نمونه‌های لبنی با قاشقک استریل و ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های شیر و دوغ به‌طور جداگانه به ۱۰۰ میلی‌لیتر PPS (Physiological Peptone Solution) استریل منتقل شد. پس‌از یکنواخت‌کردن نمونه‌ها با تکان‌دادن به‌مدت نیم ساعت، ۱۰ میلی‌لیتر از تعلیق‌های تهیه‌شده به‌طور جداگانه به ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت MRS (Man, Rogosa and Sharp) مایع (شرکت سیگما- آلدریچ آمریکا) منتقل شد تا باکتری‌ها به بیشترین مقدار خود برسند و به‌مدت ۲۴ ساعت در شرایط کم‌هوازی (شرایط اتمسفری با فشار اکسیژن کم) و دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد؛ تمام مراحل یادشده زیر هود لامینار و شرایط استریل انجام شدند (۱۱).

شناسایی اولیهٔ باکتری: شناسایی باکتری‌های خالص‌شده بر اساس صفت‌های شکلی کلنی، رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کاتالاز و اکسیداز انجام شد (۱۲).

شناسایی مولکولی: استخراج DNA با استفاده از کیت (یکتاتجهیزآزما- ایران) و بر اساس دستورعمل آن انجام شد. به‌منظور شناسایی دقیق‌تر و تکثیر از آغازگرهای اختصاصی لاکتوباسیلوس و تکثیر ژن *16S rDNA* استفاده شد (۱۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad-USA) انجام شد. تمام اجزای واکنش از شرکت یکتاتجهیزآزما خریداری شدند. مخلوط واکنش شامل ۲۵ ماکرولیتر Master Mix (شامل بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، کلریدمنیزیم dNTP، آنزیم Taq DNAپلیمراز)، ۳ ماکرولیتر DNA، ۲ ماکرولیتر آغازگر رفت FLB190 (5′- AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG -3′)، ۲ ماکرولیتر آغازگر برگشت RLB190 (5′- CGG TAT TAG CATG TTT CC -3′) با غلظت ۱۰ پیکومول و ۱۸ ماکرولیتر آب بود (۱۳). به‌منظور آغاز فرایند پلیمریزاسیون در این روش، دستگاه ترموسایکلر به‌مدت ۱ دقیقه روی دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس تنظیم و متعاقباً ۳۵ چرخهٔ PCR به‌شکل ۱ دقیقه در ۹۴ درجهٔ سلسیوس،

۳۰ ثانیه در ۵۵ درجهٔ سلسیوس و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس اجرا شد؛ درنهایت، عمل طویل‌سازی نهایی به‌مدت ۴ دقیقه در ۷۲ درجهٔ سلسیوس انجام شد و سپس برای اطمینان‌یافتن از تکثیر ژن *16S rDNA*، الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی بافر TBE 1X به‌مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ انجام شد. درنهایت، دستگاه UV Transilluminator-USA برای مشاهدهٔ نتایج ژل استفاده شد (۱۳ و ۱۴).

توالی‌یابی: محصول نهایی واکنش PCR برای تعیین توالی به شرکت First Base مالزی ارسال شد.

تهیهٔ عصارهٔ سیتوپلاسمی و دیوارهٔ سلولی از لاکتوباسیلوس‌ها: مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت MRS به‌مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس کشت شد. پس‌از رشد باکتری‌ها، سانتریفیوژ به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۳۵۰۰ دوردردقیقه و دمای ۴ درجهٔ سلسیوس انجام و رسوب حاصل دوباره با بافر فسفات ۰/۱ مولار (اسیدیتهٔ ۶/۹) شستشو شد. رسوب حاصل به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای منفی ۸۰ درجهٔ سلسیوس نگهداری شد و سپس، باکتری‌ها از حالت انجماد خارج شدند و ۱ میلی‌لیتر بافر لیزکننده به آنها اضافه شد. بافر لیزکننده به شرح زیر تهیه شد:

ابتدا محلولی شامل ۱۴۰ میلی‌مولار NaCl، ۲/۷ میلی‌مولار KCL، ۱۰ میلی‌مولار Na_2HPO_4، ۱/۸ میلی‌مولار KH_2PO_4 با اسیدیتهٔ ۷/۳ تهیه و در اتوکلاو، استریل شد؛ محلول حاصل تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. به‌منظور تهیهٔ بافر، ۱۰ درصد گلیسیرین، ۰/۲ میلی‌مولار لیزوزیم، ۱۰ میلی‌مولار ۲- مرکاپتواتانول و ۰/۱ تا ۲ درصد تریتون ۱۰۰- x به‌طور روزانه به محلول یادشده اضافه شد؛ در مرحلهٔ بعد، عمل خردکردن باکتری‌ها در کنار یخ به‌مدت دو دقیقه و به کمک دستگاه سونیکاتور با دامنهٔ ۶۰ درصد انجام شد. به‌منظور جلوگیری از افزایش دمای محلول و پروب سونیکاتور، دستگاه به‌مدت چهار دقیقه خاموش شد؛ درنهایت، نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس با ۱۵۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شدند، محلول رویی جدا و رسوب حاصل (دیوارهٔ سلولی) جدا شد؛ سپس رسوب حاصل به‌مدت یک شبانه‌روز درون دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار داده شد تا خشک شود. به‌منظور تهیهٔ غلظت‌های مختلف، مقادیر لازم وزن و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند تا استریل شوند. عمل رقیق‌سازی به کمک محیط‌کشت RPMI-1640 انجام شد و در شرایط استریل، رقت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۸۰۰۰ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر از رسوب تهیه شدند (۱۵).

جداسازی و کشت ردهٔ سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی: به‌منظور جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی از خون، ۱۰ میلی‌لیتر خون انسانی حاوی مادهٔ ضدانعقاد هپارین تهیه شد؛ سپس ۵ میلی‌لیتر نرمال‌سالین سرد به خون اضافه و به‌آرامی مخلوط شد تا خون لیز نشود. فایکول در لولهٔ سانتریفیوژ تمیز ریخته و ۸ تا ۱۰ میلی‌لیتر خون رقیق‌شده با نرمال‌سالین سرد به‌آرامی به آن افزوده شد. لولهٔ حاوی فایکول و خون به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شد و لایهٔ حاوی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی با پیپت شارژی که بین فایکول در زیر و نرمال‌سالین در بالا قرار دارد، جدا و به لولهٔ تمیز منتقل شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای دو بار با نرمال‌سالین شسته و پس‌از آخرین شستشو به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شدند؛ سپس یک قطره از آن برای شمارش استفاده شد. در ادامه، سلول‌ها در محیط‌کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰

درصد آلبومین سرم گاوی، ۲ میلی‌مولار ال- گلوتامین، ۱۰۰ میکروگرم‌درمیلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ میکروگرم‌درمیلی‌لیتر پنی‌سیلین کشت شدند (۱۶ و ۱۷).

کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و تیمار آنها با عصارهٔ سیتوپلاسمی و دیوارهٔ سلولی: پلیت‌های ۹۶تایی برای کشت سلول استفاده شدند. برای هر بیمار، ۳ ردیف ۸ تایی چاهک در نظر گرفته و تعداد 1×10^5 سلول در هر چاهک اضافه شد. به‌منظور ارزیابی تحریک سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به‌واسطهٔ دیوارهٔ سلولی و عصارهٔ سیتوپلاسمی باکتری، مقدار ۱۰۰ نانوگرم‌درمیلی‌لیتر دیوارهٔ سلولی باکتریایی و ۵ میکرولیتر عصارهٔ باکتریایی استخراج‌شده به چاهک‌های جداگانه اضافه شد. در آزمایش حاضر، سلول‌های بدون تیمار برای شاهد منفی و لیپوپلی‌ساکارید باکتری برای شاهد مثبت استفاده شد. سلول‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در گرمخانهٔ ۳۷ درجهٔ سلسیوس حاوی ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت نگهداری شدند. پس‌از گذشت ۷۲ ساعت، مایع رویی کشت جمع‌آوری، به تیوب‌های اپندورف منتقل و به‌منظور بررسی سیتوکین IL-4 و IFN-γ به روش الایزا در فریزر منفی ۲۰ درجهٔ سلسیوس ذخیره شد (۱۸).

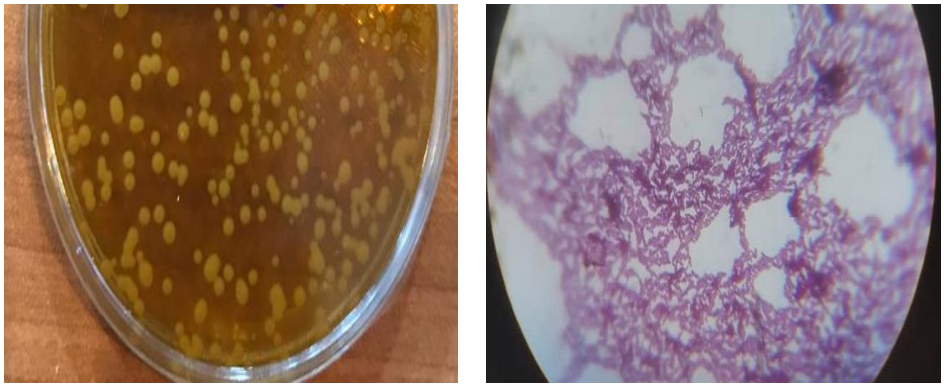
جمع‌آوری محلول رویی و اندازه‌گیری اینترفرون گاما و اینترلوکین-٤: در پژوهش حاضر از کیت الایزا (شرکت کارمانیا پارس ژن، ایران) استفاده شد. پلیت الایزا از کیت خارج و در محیط خشک به دمای اتاق رسانده شد. به‌منظور اندازه‌گیری اینترلوکین-۴، میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شمارهٔ ۵ (استاندارد HI4S-KPG: CN) با غلظت ۸۵۵ پیکوگرم‌برمیلی‌لیتر) به ویال A_1، میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شمارهٔ ۴ (۲۶۶ پیکوگرم‌برمیلی‌لیتر) به ویال B_1، میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شمارهٔ ۳ (۸۸ پیکوگرم‌برمیلی‌لیتر) به ویال C_1، میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شمارهٔ ۲ (۲۹ پیکوگرم‌برمیلی‌لیتر)به ویال D_1، میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شمارهٔ ۱ (۹ پیکوگرم‌برمیلی‌لیتر) به ویال E_1 و میزان ۶۵ میکرولیتر از استاندارد صفر (HI4Sz-KPG: CN) به ویال F_1 اضافه شد. میزان ۶۰ میکرولیتر به باقی ویال‌ها نمونهٔ مدنظر اضافه شد. به‌منظور اندازه‌گیری میزان تولید اینترفرون گاما، میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شمارهٔ ۵ (استاندارد IFNS-KPG: CN)با غلظت ۶۰۰ پیکوگرم‌برمیلی‌لیتر) به ویال A_1، میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شمارهٔ ۴ (۲۰۰ پیکوگرم‌برمیلی‌لیتر) به ویال B_1، میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شمارهٔ ۳ (۶۶/۶ پیکوگرم‌برمیلی‌لیتر) به ویال C_1، میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شمارهٔ ۲(۲۲/۲ پیکوگرم‌برمیلی‌لیتر)به ویال D_1، میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد شمارهٔ ۱ (۷/۴ پیکوگرم‌برمیلی‌لیتر)به ویال E_1 و میزان ۶۰ میکرولیتر از استاندارد صفر (HIFNSz-KPG: CN) به ویال F_1 ضافه شد؛ در ادامه، نمونه‌ها به‌مدت دو ساعت روی شیکر و در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پس‌از گرمخانه‌گذاری مناسب، سه مرتبه شستشوی پلیت‌ها با محلول شستشو انجام شد. میزان ۶۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی کونژوگه به تمام حفره‌ها اضافه و به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق روی شیکر گرمخانه‌گذاری شد. پس‌از گرمخانه‌گذاری مناسب، سه مرتبه شستشوی پلیت‌ها با محلول شستشو انجام شد. میزان ۶۰ میکرولیتر از محلول Avidin-HRP به تمام حفره‌ها اضافه و به‌مدت نیم ساعت در دمای اتاق و روی شیکر گرمخانه‌گذاری شد. پس‌از گرمخانه‌گذاری مناسب، پنج مرتبه شستشوی پلیت‌ها با محلول شستشو انجام شد. میزان ۶۰ میکرولیتر از

پیش‌ماده به تمام حفره‌ها اضافه شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و روی شیکر گرمخانه‌گذاری شدند. میزان ۳۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده به تمام حفره‌ها اضافه شد و میزان جذب نمونه‌ها در دستگاه Elisa reader و طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری: نرم‌افزارهای آماری SPSS (نسخهٔ ۲۵) و Prism V5.01 (GraphPad) برای تجزیه‌وتحلیل آماری استفاده شدند. آزمون شاخصی میانگین برای به‌دست‌آوردن Mean±SD استفاده شد.

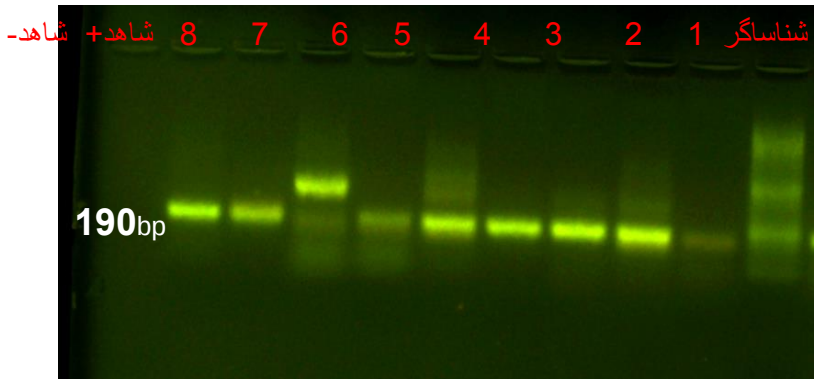
نتایج

جداسازی باکتری: تعداد ۱۶ جدایه با ویژگی‌های لاکتوباسیلوس از ۲۰ محصول لبنی جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف استان فارس جداسازی شد. کلنی‌های لاکتوباسیلوس، کروی‌شکل، سفیدرنگ، نرم، صاف، صیقلی، مات و برخی خشک و ناصاف بودند. در رنگ‌آمیزی گرم، باسیل‌های گرم مثبت، کاتالاز و اکسیداز منفی جداسازی و شناسایی مولکولی شدند (شکل ۱).



شکل ۱- کلنی *لاکتوباسیلوس روتری* (شکل سمت چپ)، رنگ‌آمیزی گرم با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× (سمت راست)

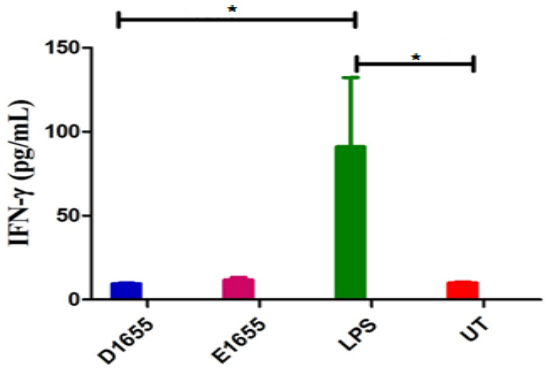
شناسایی مولکولی لاکتوباسیلوس‌های جداسازی‌شده: پس‌از استخراج DNA، دستگاه ژل الکتروفورز برای مشاهدهٔ باندهای حاصل از PCR استفاده شد. از ۱۶ جدایهٔ اکسیداز و کاتالاز منفی، ۸ جدایهٔ لاکتوباسیلوس با اندازهٔ ۱۹۰ جفت باز حاصل شد؛ نتایج در شکل ۲ مشاهده می‌شوند.



شکل ۲- شناسایی مولکولی لاکتوباسیلوس‌های جداسازی‌شده؛ شناساگر ۱۰۰ جفت بازی سیناژن، چاهک ۱ تا ۸ جدایه‌های جداسازی‌شده در پژوهش حاضر، شاهد منفی سویهٔ استاندارد باکتری *لاکتوباسیلوس*، شاهد منفی تمام مواد واکنش PCR به‌جز DNA باکتری

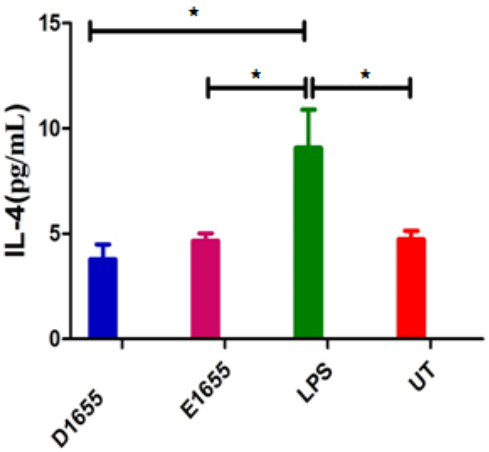
تعیین توالی ژنتیکی محصولات PCR: محصول واکنش PCR تعیین توالی و BLAST شد. نتایج BLAST دارای ۹۹ درصد تشابه با باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* سویهٔ LRS بودند. از ۸ نمونهٔ ارسالی، ۷ جدایهٔ *لاکتوباسیلوس روتری* جداسازی و شناسایی شد. جدایه‌های *لاکتوباسیلوس روتری* از محصولات لبنی پنیر پروبیوتیک رامک، شیر رامک، پنیر پگاه، ماست سنتی روبینا جداسازی شدند.

مقایسه میانگین اثر عصارهٔ سیتوپلاسمی و رسوب باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در تولید اینترفرون گاما و اینترلوکین-٤: باتوجه‌به نمودار، عصارهٔ سیتوپلاسمی و رسوب این باکتری در تولید اینترفرون گاما مؤثر نبود و تفاوت معناداری در سطح ۰/۰۵با شاهد مثبت داشت (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر عصارهٔ سیتوپلاسمی و رسوب باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در تولید اینترفرون گاما؛ D. دیوارهٔ سلولی، E. عصارهٔ سیتوپلاسمی، LPS. شاهد مثبت و UT. شاهد منفی. * نشان‌دهندهٔ سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ است.

نتایج مقایسه میانگین نشان دادند عصارهٔ سیتوپلاسمی و رسوب اثر تقریباً یکسانی در تولید اینترلوکین ۴ و تفاوت معناداری در سطح ۰/۰۵ با شاهد مثبت دارند (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسهٔ اثر عصارهٔ سیتوپلاسمی و رسوب باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* در تولید اینترلوکین۴؛ D. دیواره سلولی، E. عصاره سیتوپلاسمی، LPS. شاهد مثبت و UT. شاهد منفی. * نشان‌دهندهٔ سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ است.

بحث و نتیجه‌گیری

پروبیوتیک‌ها، ریزموجودات زنده‌ای‌اند که در معده، ترشحات صفراوی و پانکراس وجود دارند، به سلول‌های اپی‌تلیال متصل و در رودهٔ انسان کلونیزه می‌شوند. بسیاری از پروبیوتیک‌ها به گروه بزرگی از باکتری‌ها به نام باکتری‌های لاکتیک‌اسید تعلق دارند (۱۹). گونه‌های مختلف باکتری‌های لاکتوباسیلوس از انواع باکتری‌های لاکتیک‌اسید هستند. طبقه‌بندی این باکتری‌ها بر اساس واکنش گرم و تولید لاکتیک‌اسید از کربوهیدات‌های تخمیرشدنی گوناگون است (۱۹). یکی از سازوکارهای لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیک، تحریک فعالیت سیتوکین‌های سیستم ایمنی بدن است؛ همچنین سبب تقویت پاسخ ایمنی می‌شوند. در پژوهش حاضر، اثر عصارهٔ سلولی و دیوارهٔ سلولی باکتری *روتری* بر تحریک تولید سیتوکین‌های اینترلوکین-۴ و اینترفرون گاما از سیستم ایمنی تیپ ۱ و ۲ در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی انسانی بررسی شد.

در پژوهش حاضر، گونهٔ شناسایی‌شده از لبنیات جمع‌آوری‌شده جداسازی شد. Ehsani و همکاران (۲۰۰۴) به بررسی و جداسازی لاکتوباسیلوس‌های جداشده از پنیرهای سنتی آذربایجان غربی پرداختند (۲۰) و گونهٔ *لاکتوباسیلوس کازائی* را به دست آوردند. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند عصارهٔ سیتوپلاسمی و دیوارهٔ سلولی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* توانایی تحریک سیستم ایمنی برای تولید سیتوکین‌های اینترلوکین-۴ و اینترفرون گاما را ندارد. Soltan Dallal و همکاران (۲۰۱۰) اثر تجویز *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر افزایش کارآمدی سیستم ایمنی را بررسی کردند (۲۱). نتایج پژوهش یادشده نشان دادند موش‌های دریافت‌کنندهٔ پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در مقایسه با موش‌های شاهد، میزان IFNγ بیشتری را در کشت سلول‌های طحالی خود دارند ($p<0/005$) و میزان اینترلوکین-۴ که سیتوکین ایمنی هومورال و مربوط به سلول‌های Th_2 است، در موش‌های گیرندهٔ پروبیوتیک کمتر است (۲۱).

Moafi و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی کاربرد اینترفرون گاما در تشخیص بیماران مبتلا به سالک پرداختند و نتایج نشان دادند سطح اینترفرون گامایی که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تحریک‌شده با آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* یا میتوژن فیتوهماگلوتینین تولید می‌کنند، در گروه بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر به‌شکل معناداری ($p<0/001$) بیشتر از بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر است (۲۲).

Soleimany و همکاران (۲۰۱۸) تأثیر پاراسپورال سیتوسیدال باکتری گرم مثبت *باسیلوس تورنجنسیس* را بر تحریک سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و توانایی تولید سیتوکین‌های اینترلوکین-۲ و اینترلوکین-۵ بررسی کردند و نتایج نشان دادند توکسین باکتری گرم مثبت *باسیلوس تورنجنسیس* موجب تحریک سیستم ایمنی، تولید اینترلوکین-۲ و توقف تحریک تولید سیتوکین مهاری اینترلوکین-۵ می‌شود (۱۸).

نتایج پژوهش Zeuthen و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند گونه‌هایی از پروبیوتیک‌ها مانند باکتری‌های لاکتیک‌اسیدی سبب تولید IL10 و درنتیجه، مهار Th_1 و به دنبال آن، مهار سیتوکین‌های التهابی می‌شوند (۲۳).

Galdeano و همکاران (۲۰۰۶) عنوان کردند سازوکارهایی که باکتری‌های پروبیوتیک بر سیستم ایمنی تأثیر می‌گذارند، ناشناخته‌اند؛ باوجوداین، بسیاری از آنها به افزایش پاسخ‌های ایمنی یا ذاتی بدن نسبت داده می‌شوند. به‌منظور بررسی تأثیر باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازائی* در بیان گیرنده‌های دخیل در پاسخ ایمنی ذاتی، این باکتری به‌شکل موازی به موش BALB/c تزریق شد. سیتوکین‌های اینترلوکین- ۵، اینترلوکین- ۶، رسپتورهای CD-206 و TLR-2 باتوجه‌به تیمار شاهد درمان‌نشده افزایش یافتند (۲۴). Del Carmen و همکاران (۲۰۱۴) با جداسازی و انتخاب باکتری‌های لاکتیک‌اسید دارای ویژگی ضدالتهابی از نوعی استارتر ماست نشان دادند این باکتری سبب افزایش IL_{10} نسبت به INF α و IL_{10} نسبت به IL_{17} در بافت روده می‌شود و شدت التهاب را کاهش می‌دهد (۲۵). نتایج پژوهش حاضر نشان دادند عصارهٔ سلولی و دیوارهٔ سلولی *لاکتوباسیلوس روتری* در تولید اینترفرون گاما بسیار ضعیف و برابر با شاهد منفی عمل می‌کنند؛ هرچند در تولید اینترلوکین-۴ تفاوت معناداری در سطح کمتر از ۰/۰۵ ندارند، اما نسبت به شاهد مثبت کاهش معنادار دارند. باتوجه‌به اهمیت لاکتوباسیلوس‌ها در تحریک تولید سیتوکین‌ها، پیشنهاد می‌شود اثر دیگر گونه‌های *لاکتوباسیلوس* بر سیستم ایمنی و تحریک تولید سیتوکین‌ها ارزیابی شود.

References

(1) Herman A. Probiotics supplementation inprophylaxis and treatment of depressive and anxiety disorders- A review of current research. *Psychiatria Polska* 2019; 53(2): 459-473.

(2) Sulijaya B., Takahashi N., Yamazaki K. Host modulation therapy using anti-inflammatory and antioxidant agents in periodontitis: A review to a clinical translation. *Archives of Oral Biology* 2019; 105: 72-80.

(3) Perceval C., Szajewska H., Indrio F., Weizman Z., Vandenplas Y. Prophylactic use of probiotics for gastrointestinal disorders in children. *Lancet Child Adolesc Health* 2019; S2352-4642(19): 30182-30188.

(4) Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions- A review. International Journal of Medical Microbiology 2010; 300(1): 57-62.

(5) Connolly ML., Tuohy KM., Lovegrove JA. Wholegrain oat-based cereals have prebiotic potential and low glycaemic index. *British Journal of Nutrition* 2012; 108(12): 2198-2206.

(6) Wang T., Zheng N., Luo Q., Jiang L., He B., Yuan X., Shen L. Probiotics *Lactobacillus reuteri* abrogates immune checkpoint blockade-associated colitis by inhibiting group 3 innate lymphoid cells. *Frontiers in Immunology* 2019; 4(10): 1235-1244.

(7) Irianto A., Austin B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 2002; 25(6): 333-342.

(8) Pereyra BS., Lemonnier D. Induction of human cytokines by bacteria used in dairy foods. Nutrition Research 1993; 13(10): 1127-1140.

(9) Ma W., Mao Q., Xia W., Dong G., Yu C., Jiang F. Gut microbiota shapes the efficiency of cancer therapy. *Frontiers Microbiology* 2019; 25(10): 1050-1059.

(10) Baloch MN., Siddiqui R., Zafar U., Haider F., Mojgani N., Eijaz S. Persistence and safety assessment of novel probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 1 strain Lp86 and Lp36 in Salmonella typhi infected mice. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2019; 32(3): 1261-1267.

(11) Mallesha M., Manjunatha R., Nethravathi C. Function of dopamine in presence of uric acid and ascorbic acid. *Bioelectrochemistry* 2011; 81: 104-108.

(12) Xie F., Zhang F., Zhou K., Zhao Y., Zhao Q., Sun H. Isolation, identification and fermentation optimization of lactic acid bacteria for aquaculture water purification. Wei Sheng Wu Xue Bao. 2017; 57(2): 304-314.

(13) Yadav R., Puniya AK., Shukla P. Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an Indigenous Fermented Beverage Raabadi. *Frontiers in Microbiology* 2016; 7: 1683-1691.

(14) Moazamian E., Bahador N., Azarpira N., Rasouli M. *Anti-cancer Parasporin Toxins of New Bacillus thuringiensis* Against Human Colon (HCT-116) and Blood (CCRF-CEM) Cancer Cell Lines. *Current Microbiology* 2018; 75(8): 1090-1098.

(15) Riki M., Tukmechi A., Farokhi F. Anticancer effect of probiotics on mutant p53 protein expression in K562 cell line Yafte 2017; 18(4): 87-97.

(16) Lenina NK., Naveenkumar A., Sozhavendan AE., Balakrishnan N., Balasubramani V., Udayasuriyan V. Characterization of parasporin gene harboring Indian isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology* 2014; 4(5): 545-551.

(17) Moazamian E., Bahador N., Rasouli M., Azarpira N., Kalani M. Investigation of Cytocidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Parasporal Toxin on CCRF-CEM Cell Line. *Journal of Fasa University of Medical Sciences* 2012; 2(4): 247-253.

(18) Soleimany M., Moazamian E., Rasouli

M. Effect of *Bacillus thuringiensis* parasporal toxin on stimulating of IL-2 and IL-5 cytokines production. *Biological Journal of Microorganism* 2018; 7(25): 101-108.

(19) Parsaeimehr M., Misaghi A., Afshin Akhondzade A., Zahraei Salehi T., Modaresi MH., Gandomi H., Firuzbakht F., Karkudi S., Assadollah nezhad R. Effect of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* on growth and enterotoxin production of Staphylococcus aureus. *Journal Food Science and Technology* 2011; 8(1); 91-97.

(20) Ehsani A., Mahmoudi R., Hashemi M., Raeisi R. Identification of *Lactobacillus* Species Isolated from Traditional Cheeses of West Azerbaijan. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2014; 8(1): 38-43.

(21) Soltan Dallal MM., Yazdi MH., Hassan ZM., Holakuyee M., Abedi Mohtasab TP., Aminharaty F., Agha Amiri S., Mahdavi M. Effect of oral administration of *Lactobacillus acidophilus* on the immune responses and survival of BALB/c mice bearing human breast cancer. *Tehran University Medical Journal* 2010; 67(11): 753-758.

(22) Moafi M., Rezvan H., Sherkat R., Zarkesh-Esfahani SH., Taleban R., Asilian A. Evaluation of Interferon-gamma Application for Recognition of Patients Afflicted by Non-healing Cutaneous Leishmaniasis. *Biological Journal of Microorganism* 2017; 6(22): 100-111.

(23) Zeuthen LH., Christensen HR., Frøkiær H. Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology* 2006; 13(3): 365-375.

(24) Galdeano CM., Perdigon G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clinical and Vaccine Immunology* 2006; 13(2): 219-226

(25) Del Carmen S., Miyoshi A., Azevedo V., Langella P., Bermudez-Humaran L., de LeBlanc AD., LeBlanc JG. Selection of anti-inflammatory lactic acid bacteria from a pool of yoghurt starter cultures. *Food Science and Technology International* 2014; 1(1): 429-430.