Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2015; 18(96): 93-103

Effects of Lipopolysaccharides from Shigella Strains on Innate Immunity Stimulation *in vitro*

Mohammad Reza Hashemzadeh[1], Mojtaba Saadati[2], Mohammad Reza Baghaban Eslaminejad[1]*, Reza Aflatoonian[3], Mokhtar Zarea[2]

1- Department of Stem Cells and Developmental Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, Academic Center for Education, Culture and Research, Tehran, Iran
2- Department of Biology, Biology Research Center, Institute of Basic Sciences, Imam Hussein Comprehensive University, Tehran Iran
3- Department of Endocrinology and Female Infertility at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, Academic Center for Education, Culture and Research, Tehran, Iran

Received: 6 Dec 2014, Accepted: 28 Jan 2015

Abstract

Background: Shigella is the causative agent of human shigellosis and its lipopolysaccharide is detected by TLR4. TLR4 belongs to Toll-like receptors family and many immunological pathways are triggered when these receptors are stimulated. Many researches showed increasing in TLR4 expression in mesenchymal stem cells through lipopolysaccharide treatment. The main goal of this study is detecting the optimum lipopolysaccharide between shigella strains through stimulation of immune system for vaccine studies.

Materials and Methods: In this experimental study human bone marrow derived mesenchymal stem cells were treated with three distinct concentrations (0.1, 0.01, and 0.001) of shigella (*S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. sonnei*) extract containing lipopolysaccharide. Then TLR4 expression in mRNA level was investigated by RT-PCR and Q-PCR. The cells treated with phosphate buffered saline have been considered as a control group.

Results: Expression of TLR4 was shown in all of case groups except treatment with concentration 0.001 of extracts from sonnei and dysenteriae and also control group. The variations in the expression of TLR4 was dose-dependent in all of case groups. The maximum expression of TLR4 related to treatment with extract from *shigella flexneri* strain and the minimum expression related to treatment with *shigella sonnei* extract. The use of lipopolysaccharide from *E. coli* as a positive control indicated that lipopolysaccharide in shigella extracts is responsible for the increased expression of TLR4.

Conclusion: The TLR4 expression level was increasesed by *S. flexneri* extract, so it could be recommended for increasing vaccine efficiency.

Keywords: Cell extract, In Vitro, Innate immunity, Lipopolysaccharide, Shigella

*Corresponding Author:
Address: P.O. BOX 16635-148, Royan Institute, East Hafez St, Bani Hashem Ave, Resalat Hwy, Tehran, Iran.
Email: eslami@royaninstitute.org

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۸، شماره ۳ (شماره پیاپی۹۶)، خرداد ۱۳۹۴، ۱۰۳-۹۳

تاثیر لیپوپلی ساکارید سویه های باکتری شیگلا بر تحریک ایمنی ذاتی در شرایط آزمایشگاهی

محمدرضا هاشم زاده[۱]، مجتبی سعادتی[۲]، محمدرضا باغبان اسلامی نژاد[۳*]، رضا افلاطونیان[۴]، مختار زارع[۵]

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی علوم سلولی و مولکولی، گروه سلول های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلول های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

۲- استاد، گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

۳- استاد، گروه سلول های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلول های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه اندوکرینولوژی و ناباروری زنان، پژوهشکده پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

۵- کارشناس ارشد زیست شناسی علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۸

چکیده

زمینه و هدف: شیگلا عامل شیگلوز انسان است و لیپوپلی ساکارید آن به کمک TLR4 شناسایی می‌شود. TLR4 از خانواده گیرنده‌های شبه TOLL بوده و بسیاری از مسیرهای ایمنی با تحریک این گیرنده‌ها راه اندازی می‌شوند. تحقیقات بسیاری افزایش بیان TLR4 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تاثیر لیپوپلی ساکارید را نشان می‌دهد. هدف مهم این مطالعه شناسایی لیپوپلی ساکارید مناسب سویه‌های شیگلا از طریق تحریک سیستم ایمنی برای مطالعات واکسن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول بنیادی مزانشیمی انسانی مشتق از مغز استخوان از طریق سه رقت ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ عصاره سویه‌های شیگلا (*فلکسنری*، *دیسانتری* و *سونئی*) که حاوی لیپوپلی ساکارید می‌باشد تیمار شد. سپس بیان TLR4 در سطح RNA با تکنیک‌های RT-PCR و Q-PCR ارزیابی گردید. سلول‌های تیمار شده با فسفات بافر سالین به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها: بیان TLR4 در همه گروه‌های تیمار به جز گروه‌های تیمار با غلظت نسبی ۰/۰۰۱ سونئی و دیسانتری و هم چنین گروه کنترل مشاهده شد. تغییرات بیان TLR4 در همه گروه‌های تیمار وابسته به دوز بود. بیشترین بیان مربوط به تیمار با عصاره *شیگلا فلکسنری* و کم ترین آن مربوط به *شیگلا سونئی* بود. استفاده از لیپوپلی ساکارید خالص باکتری اشرشیاکلی به عنوان کنترل مثبت نشان داد که لیپوپلی ساکارید موجود در عصاره شیگلا مسئول افزایش بیان TLR4 می‌باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به افزایش بیان TLR4 از طریق عصاره شیگلا، این عصاره برای افزایش بازدهی واکسن توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: عصاره سلولی، در شرایط آزمایشگاه، ایمنی ذاتی، لیپوپلی ساکارید، شیگلا

* **نویسنده مسئول:** تهران، بزرگراه رسالت، خیابان بنی هاشم، خیابان حافظ شرقی، پژوهشگاه رویان، صندوق پستی ۱۴۸-۱۶۶۳۵

Email: eslami@royaninstitute.org

مقدمه

یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های باکتری‌ها، خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد که به دلیل شیوع بیشتر آنها در انسان و حیوان، مطالعات وسیع‌تری بر روی آنها صورت گرفته است. تمامی اعضای این خانواده دارای باسیل‌های گرم منفی بوده و اسپور تولید نمی‌کنند. تنوع جنس باکتری در این خانواده زیاد است، از اشریشیا کلی که برخی از آنها فلور طبیعی روده به حساب می‌آیند تا سالمونلا، شیگلا، کلبسیلا، پروتئوس و انتروباکتر که برای انسان بیماری زا به حساب می‌آیند متغیر است(۱، ۲). باکتری شیگلا همانند سایر باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه، دارای باسیل‌های کوتاه و گرم منفی بوده که گاهی به صورت زنجیر در کنار هم دیده می‌شوند. این باکتری‌ها فاقد فلاژل، دارای کپسول و غیر متحرک می‌باشند(۲، ۳) باکتری‌های مهاجم توانایی نفوذ به سلول‌های اپیتلیال در شرایط طبیعی و آزمایشگاهی را دارا می‌باشند. پس از ورود این باکتری‌ها به میزبان، واکنش‌های متعددی شروع می‌شوند که روند بیماری به آنها بستگی دارد(۴). درون فضای اپیتلیالی روده محلی است که شیگلا با سلول‌های ایمنی مثل ماکروفاژها مواجه می‌شود. سلول‌های ماکروفاژ از طریق سه دسته از گیرنده‌های کاربردی خود باکتری را شناسایی کرده و با اتصال به آنها سبب بلعیده شدن باکتری می‌شوند. در این فرآیند سه گیرنده از خانواده گیرنده‌های شبه TOLL موثرند که هر کدام در شناسایی قسمت‌های مجزایی از مولکول‌های سطحی باکتری متمایز شده‌اند. برای مثال TLR5 در شناسایی فلاژلین، TLR2 در شناسایی لیپوپروتئین‌های سطحی باکتری و پپتیدوگلیکان و در نهایت TLR4 در شناسایی لیپو پلی ساکارید نقش دارند. لیپو پلی ساکارید در دیواره باکتری‌های گرم منفی از جمله باکتری شیگلا وجود دارد و با فعال نمودن سیستم ایمنی ذاتی فعالیت زیستی را در میزبان سبب می‌شود. اجزای مختلف آن شامل آنتی ژن O، الیگوساکارید مرکزی حفظ شده و لیپید A می‌باشد. لیپید A یکی از اجزای لیپوپلی ساکارید می‌باشد که به عنوان مسئول فعالیت بیولوژی لیپو پلی ساکارید شناخته می‌شود و عامل اندوتوکسیک نامیده شده است، چرا که تنها بخشی است که طی آلودگی از طریق TLR4 شناسایی می‌گردد(۵). برای اغلب گونه‌های لیپو پلی ساکاریدها، گیرنده TLR به عنوان گیرنده تشخیصی ذره‌ای یا PRR عمل کرده، لیپو پلی ساکارید را می‌شناسد و راه اندازی سیگنالینگ درون سلولی را با یک پاسخ التهابی شروع می‌کند. شروع سیگنال پیش التهابی به وسیله لیپو پلی ساکارید به اندرکنش بین کمپلکس TLR4 (TLR4, MD2, CD14) و لیپید A در لیپو پلی ساکارید مربوط می‌باشد(۶).

گیرنده‌های شبه TOLL یکی از مهم‌ترین گیرنده‌ها در سیستم ایمنی ذاتی محسوب می‌شوند. مهم‌ترین وظیفه این گیرنده‌ها، شناسایی مولکول‌های همراه پاتوژن می‌باشد(۷). گیرنده‌های شبه TOLL پس از فعال شدن، سبب تولید سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های التهابی و از طرفی دیگر سبب پاسخ‌های آنتی ویروسی شده و به عنوان مهم‌ترین گیرنده‌ها در ایمنی ذاتی محسوب می‌شوند(۸). لیپو پلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی لیگاند گیرنده شبه TOLL شماره ۴ (TLR4) می‌باشد(۹). TLR4 در بین اعضای این خانواده وسیع الطیف‌ترین گیرنده است، چون از طرفی تمامی پروتئین‌های آداپتوری درون سلولی دخیل در عملکرد TLR ها را به خدمت گرفته و از طرف دیگر تنها TLR است که هم سبب تولید سایتوکاین‌ها و هم سبب ایجاد پاسخ های‌آنتی ویروسی می‌شود(۷).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از گروه سلول‌های بنیادی بالغ هستند که می‌توان آنها را از منابع مختلف مثل مغز استخوان، بافت چربی، ژل وارتون در بند ناف و ... جداسازی کرد. از این بین، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان تاکنون پر کاربرد ترین نمونه در آزمایشات بوده است(۱۰، ۱۱). زمانی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از

مغز استخوان و مشتق از بافت چربی با لیگاندهای خاصی از TLR های مختلف تحریک می‌شوند، فاکتورهای NF-κB و مسیرهای سیگنالی p13k را فعال کرده و متعاقب آن چندین ژن و سایتوکاین به ویژه CXCL10، IL-6 و IL-8 را القا می‌کنند. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی به وضوح TLR ها را بیان می‌کنند. هر چند اختلافاتی در القاء ژن‌ها در پاسخ به فعالیت TLR ها گزارش شده است. برای مثال چو و همکاران و تامچاک و همکاران گزارش کردند که با تاثیر لیپو پلی ساکارید اشرشیاکلی و Poly IC، TNF-α و IL-β به ترتیب در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی القا می‌شوند(۱۲، ۱۳).

از آن جایی که سویه‌های مختلف باکتری شیگلا سبب بیماری خطرناکی در انسان می‌شوند، تولید واکسن مناسب که به وسیله آن بتوان حداکثر میزان ایمنی را در بدن ایجاد کرد امری ضروری به نظر می‌رسد. از این رو بهینه سازی واکسن علیه بیماری شیگلوز به عنوان ضرورت این تحقیق در نظر گرفته شد. اندازه‌گیری میزان بیان گیرنده‌های شبه Toll با تاکید بر بیان TLR4 در باکتری‌های گرم منفی قبلا بین دو باکتری *اشریشیا کلی* و *شیگلا فلکسنری* مورد بررسی قرار گرفته است(۱۴)، ولی تاکنون مقایسه بین سویه‌های مختلف یک گونه باکتری گرم منفی به خصوص در سلول‌های بنیادی و به منظور تولید واکسن انجام نشده است که این روند مقایسه‌ای به عنوان هدف این مطالعه در نظر گرفته شده است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی، کشت و لیز باکتریایی

در این مطالعه تجربی سویه‌های مختلف باکتری‌های استفاده شده از دانشگاه امام حسین (ع) تهیه شدند و به روش بیوشیمیایی و سرولوژی مورد تأیید قرار گرفتند(۱۷-۱۵). به منظور تولید لیپوپلی ساکارید، هر کدام از سوش‌های باکتری شیگلا به صورت مجزا در محیط کشت ترپیتیک سوی آگار (۴۰ گرم بر لیتر) کشت خطی داده شدند و به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس یک تک کلنی به محیط LB (۲۵ گرم بر لیتر) منتقل شد و به مدت یک شبانه روز تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با ۱۵۰ دور در دقیقه رشد داده شد. پس از این مدت، لوله‌های حاوی باکتری به سانتریفیوژ (با ۸۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه) منتقل گردید. پس از خارج کردن محیط رویی رسوب حاصل توزین و سپس بر اساس میزان رسوب، حجمی از بافر لیز کننده به آن اضافه شد که در نهایت غلظت هر کدام از سویه‌ها به ۰/۱ گرم در میلی‌لیتر رسید. در نهایت عمل لیز باکتری‌ها طی ۶ مرحله ۲۰ ثانیه‌ای و با فواصل زمانی استراحت ۳۰ ثانیه از طریق دستگاه سونیکاسیون انجام شد و نمونه‌های لیز شده به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید.

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مشتق از بافت مغز استخوان

سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مشتق از مغز استخوان که سلول‌های اضافه ی افرادی بودند که برای استئو آرتریت به مرکز سلول درمانی رویان مراجعه کرده بودند، به صورت فریز شده از پژوهشگاه رویان (مرکز زعفرانیه تهران) تهیه گردید. مراحل شناسایی سلول‌های فوق اعم از آنالیزهای تمایزی و مارکرهای سطح سلولی قبل از این انجام شده بود(۱۸) و به محض دریافت در پاساژ دوم کشت داده شدند. سلول‌ها در محیط (Dulbecco's Modified Eagle Medium) DMEM با غلظت بالای گلوکز به همراه ۱۵ درصد سرم جنین گاوی که آنتی‌بیوتیک پنی سیلین/ استرپتومایسین (یک میکروگرم در میلی لیتر) به آن الحاق شده بود، کشت شدند. زمانی که سلول‌ها ۹۰ درصد کف فلاسک را پر کردند تریپسینه شده، شمارش سلولی در غلظت ۶×۱۰^{۵}

سلول در هر سانتی‌متر مربع انجام شد و پاساژ سلولی صورت پذیرفت. سلول‌ها در پاساژ سوم برای مطالعه استفاده شدند.

تیمار سلول‌ها با لیز باکتریایی

سلول‌ها در پاساژ سوم برای انجام تیمارهای مجزا به پلیت ۶ خانه کشت سلول منتقل شدند و پس از گذشت ۴۸ ساعت با غلظت‌های مشخص ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ تیمار شدند. برای تکمیل تیمار سلولی، سلول‌ها به مدت یک شبانه روز همراه با تیمار به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با غلظت ۵ درصد CO_2 منتقل شدند. برای هر غلظت مربوط به هر کدام از سویه‌ها سه خانه در نظر گرفته شد. در نهایت به منظور کاهش خطا، کل فرآیند تیمار دو مرتبه تکرار گردید. سپس، سلول‌ها ترپسینه شده و برای استخراج RNA به میکروتیوب‌ها منتقل شدند.

استخراج RNA، سنتز cDNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

استخراج RNA کل سلول از طریق روش TRI گرفته انجام و برای اطمینان از عدم آلودگی DNA، نمونه‌ها با DNase I تیمار شدند. سپس سنتز cDNA با پرایمر الیگو-dT به همراه آنزیم ترانس کریپتاز معکوس MMuLV انجام شد. پرایمرهای TLR4 با توالی پیشرو: 5' TGA TGT CTG CCT CGC GCC TG 3' و توالی معکوس: 5' AAC CAC CTC CAC GCA GGG CT 3' انتخاب شدند. هم‌چنین به منظور تأیید سنتز cDNA، پرایمرهای بتا-اکتین با توالی پیشرو: 5' CAA GAT CAT TGC TCC TCC TG 3' و توالی معکوس: 5' ATC CAC ATC TGC TGG AAGG 3' طراحی شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به همراه پرایمرهای TLR4 و به وسیله‌ی cDNA که در مرحله‌ی قبل سنتز شد با شرایط زیر انجام گرفت: واسرشته سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۴۰ سیکل به صورت واسرشته سازی به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، هم سرشتگی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در آخر گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. پس از پایان فرآیند فوق، به منظور آگاهی از بیان و یا عدم بیان نمونه‌ها، الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز با غلظت ۱/۲ درصد انجام شد.

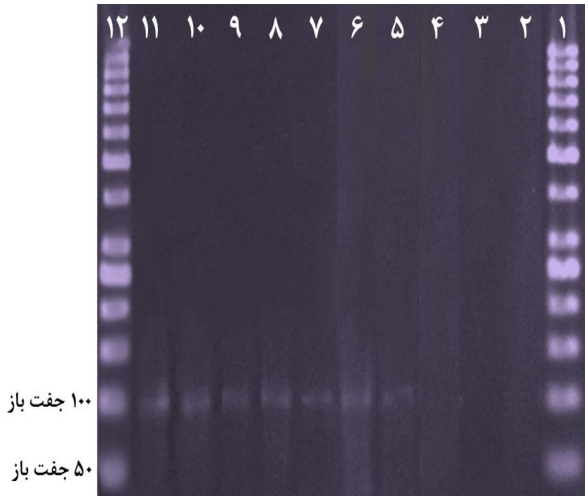
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (Q-PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی با استفاده از cDNA سنتز شده، پرایمر های TLR4 و بتا-اکتین انجام شد. در همه آزمایشات کنترل منفی بدون حضور cDNA لحاظ شد. مخلوط اصلی سایبرگرین جامپ استارت به هر چاهک میکرو پلیت‌های ۹۶ تایی PCR (حاوی ۱۰ میکرولیتر سایبر گرین، ۶ میکرولیتر آب، ۲ میکرولیتر پرایمرهای پیشرو و معکوس و ۲ میکرولیتر cDNA) اضافه شد و فرآیند PCR طی ۵۰ سیکل تحت شرایط دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. در نهایت داده‌ها با استفاده از تست آماری آنووا (تحلیل واریانسی بازه‌های تکرار شده، طرح کرت‌های خرد شده) ارزیابی شدند.

یافته‌ها

بیان کیفی TLR-4 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با لیز سلولی سویه‌های شیگلا

بیان mRNA مربوط به TLR4 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق فرآیند RT-PCR سنجیده شد. تمامی تیمارها به جز تیمار با لیز باکتریایی شیگلا *سونئی* و شیگلا *دیسانتری* در غلظت نسبی ۰/۰۰۱، بیان TLR4 را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مشتق از مغز استخوان نشان دادند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی فاقد تیمار که به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شده بودند، بیان TLR4 را نشان ندادند(شکل ۱).

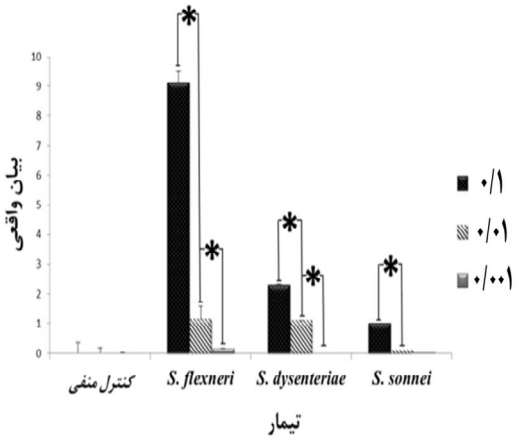


شکل ۱. *بیان کیفی TLR4 در سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی در تیمار با لیز سویه های مختلف باکتری شیگلا.*

چاهک‌های شماره ۱ و ۱۲: نردبان وزن مولکولی ۵۰ جفت بازی؛ چاهک شماره ۲: کنترل منفی (سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون تیمار)؛ چاهک‌های شماره ۳، ۴ و ۵: تیمار با غلظت نسبی ۰/۰۰۱ (به ترتیب تیمارهای سونئی، دیسانتری و فلکسنری)؛ چاهک‌های شماره ۶، ۷ و ۸: تیمار با غلظت نسبی ۰/۰۱ (به ترتیب تیمارهای سونئی، دیسانتری و فلکسنری)؛ چاهک‌های شماره ۹، ۱۰ و ۱۱: تیمار با غلظت نسبی ۰/۱ (به ترتیب تیمارهای سونئی، دیسانتری و فلکسنری). بر اساس نتایج، هیچ گونه باندی در چاهک‌های مربوط به تیمار با لیز باکتریایی شیگلا سونئی و شیگلا دیسانتری در غلظت نسبی ۰/۰۰۱ (به ترتیب چاهک‌های ۳ و ۴) و هم‌چنین کنترل منفی (چاهک ۲) مشاهده نمی‌شود. بر اساس طراحی پرایمر برای TLR4، طول قطعه محصول PCR مورد نظر ۹۸ جفت باز می‌باشد.

مقایسه میزان بیان TLR-4 در گروه های تیمار شده

برای هر گروه آزمایشی تیمارها، سه تکرار مختلف تکنیکی انجام شد. تحلیل داده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی از طریق نرم افزار 7000 Applied biosystem SDS صورت گرفت. محاسبات لازم با روش ΔΔCT انجام شد. ارزیابی داده‌ها با استفاده از تست آماری آنووا (تحلیل واریانسی بازه‌های تکرار شده، طرح کردت‌های خرد شده) گرفت و در نهایت نمودار حاصل از نتایج رسم گردید. بر اساس نتایج به دست آمده در تمامی سویه‌های مورد استفاده، میزان بیان وابسته به دوز تغییر کرد، طوری که در سطح معنی‌دار ۰/۰۱ ($p<۰/۰۱$) در لیز سلولی همه سویه‌ها، بیشترین بیان ژنی مربوط به استفاده از رقت ۰/۱ لیز باکتریایی بر روی سلول و کمترین بیان ژنی مربوط به استفاده از رقت ۰/۰۰۱ بود. طبق نتایج به دست آمده و مقایسه میزان تاثیر سویه‌های مختلف بر بیان TLR4 در سطح معنی‌دار ۰/۰۱، بیشترین میزان بیان در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مشتق از مغز استخوان که ناشی از تاثیر لیز سلولی حاوی لیپوپلی ساکارید سویه‌های مختلف باکتری شیگلا است، مربوط به شیگلا *فلکسنری* و کمترین میزان بیان، مربوط به شیگلا *سونئی* بود. این در حالی بود که بیان قابل ذکری در نمونه کنترل منفی که سلول‌های تیمار شده با PBS بودند، مشاهده نشد(شکل ۲).

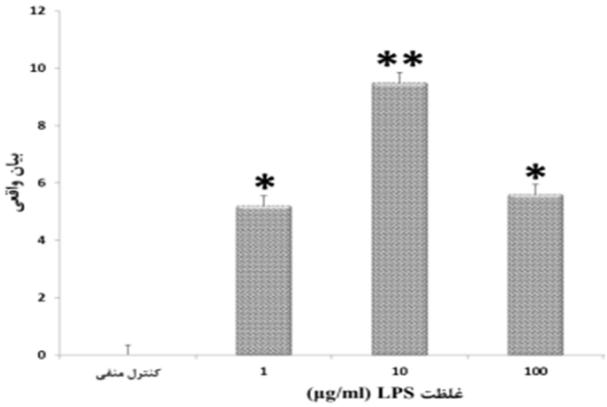


شکل ۲. مقایسه میزان بیان TLR4 در سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی در تیمار با لیز سویه های مختلف باکتری شیگلا.

نتایج نشان دهنده میزان بیان وابسته به دوز می‌باشد. در تمامی تیمارها بیشترین بیان ژنی مربوط به استفاده از رقت ۰/۱ لیز باکتریایی بر روی سلول و کمترین بیان ژنی مربوط به رقت ۰/۰۰۱ می‌باشد($p<۰/۰۱$). هم‌چنین بیشترین میزان بیان TLR4در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مغز استخوان، حاصل از تاثیر لیز سلولی شیگلا فلکسنری و کمترین میزان بیان، مربوط به شیگلا سونئی بود. نمونه کنترل منفی نیز بیان معنی‌داری را نشان نداد.

از آن جایی که در این آزمایش لیز باکتری به عنوان تیمار استفاده شده بود، به منظور حصول اطمینان از این که تنها لیپوپلی ساکارید در عصاره لیز شده سبب بیان ژن مذکور شده است، از لیپوپلی ساکارید خالص باکتری اشرشیاکلی به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نتایج حاصل از تاثیر لیپوپلی ساکارید اشرشیاکلی در غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

نشان داد که در هر سه غلظت میزان بیان ژنی به طور معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل بالا رفته، ضمن این که در غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر میزان بیان ژنی نسبت به دو غلظت دیگر نیز به طور معنی‌داری بالاتر بود($p<۰/۰۱$) (شکل ۳).



شکل ۳. تاثیر LPS خالص باکتری اشرشیاکلی بر بیان TLR4 در سلول های بنیادی مزانشیمی

نمو نه کنترل مثبت شامل LPS خالص باکتری اشرشیاکلی غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد که در هر سه غلظت، میزان بیان ژنی به طور معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل بالا رفته است، ضمن این که در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان بیان ژنی نسبت به دو غلظت دیگر نیز به طور معنی‌داری بالاتر بود ($p<۰/۰۱$).

بحث

تاکنون مطالعات فراوانی توسط محققان برای تولید واکسن علیه باکتری شیگلا صورت گرفته است(۱۹-۱۷) در این مطالعه میزان تحریک سیستم ایمنی با تکیه بر بیان TLR مورد نظر قرار گرفت. از آن جا که لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی مانند شیگلا لیگاند TLR4 به شمار می‌رود، لذا ارزیابی مقایسه‌ای میزان تحریک این گیرنده از طریق لیپوپلی ساکارید سویه‌های مختلف باکتری شیگلا به منظور شناسایی لیپوپلی ساکارید مناسب این گونه در تحریک سیستم ایمنی و تولید واکسن به عنوان مهم‌ترین هدف این مطالعه بررسی شد.

با توجه به این که در این مطالعه لیز سلولی حاوی لیپوپلی ساکارید به عنوان تیمار استفاده شد، بیشترین تحریک به لیز سلولی باکتری *شیگلا فلکسنری* و کمترین تحریک به *شیگلا سونئی* مربوط بود. علاوه بر این در تمامی تیمارها میزان بیان بسته به دوز تغییر می‌کرد. طبق نتایج به دست آمده مشخص شد که نه تنها نوع و منبع لیپوپلی ساکارید، بلکه میزان آن نیز در تحریک و بیان TLR4 بسیار موثر است. قبل از این مطالعاتی در مورد اثر لیپوپلی ساکارید بر میزان بیان TLR4 و مسیر آبشاری متعاقب آن انجام شده بود که در هر کدام از این مطالعات لیپوپلی ساکارید گونه‌های مختلف با هم مقایسه شده بودند(۶، ۱۹)، ولی در این مطالعه برای اولین بار مقایسه بین سویه‌های مختلف یک گونه به منظور تولید واکسن بهینه انجام شد. علاوه بر این در مطالعه فوق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مشتق از مغز استخوان به عنوان پایه مطالعه آزمایشگاهی استفاده شد. علت انتخاب این رده سلولی علاوه بر رشد سریع آنها، این بود که این سلول‌ها در کنام خود جزو نزدیک‌ترین سلول‌ها به سلول‌های ایمنی هستند و شاید به همین دلیل است که در مطالعات مختلف میزان پایه‌ای از بیان TLR ها در این سلول‌ها نشان داده شده است(۲۰، ۲۱). همین امر سبب شده که فعال شدن این گیرنده‌ها در سلول‌های مذکور به عنوان یک عامل مهم در تعیین عملکرد و خصوصیات این سلول‌ها به شمار رود(۲۲، ۲۳).

لیپوپلی ساکارید باکتری ترکیبی بسیار پیچیده است و ترکیب ساختاری آن در گونه‌های مختلف باکتری‌های گرم منفی بسیار متغیر است. گوناگونی‌های ساختاری از قبیل میزان آسیلاسیون، طول زنجیره‌های آسیل و درجه فسفریلاسیون لیپید A که بر روی سیگنالینگ موثر هستند(۲۴، ۲۵) روش بر هم کنش این مولکول‌ها با گیرنده TLR4 را تغییر می‌دهند. تعداد زنجیره اسید چرب، عامل اصلی ایمنی‌زایی اندوتوکسین می‌باشد. فعال‌ترین شکل لیپید A، نوع ۶ تایی زنجیر اسید چرب است که در باکتری اشرشیاکلی و گونه‌های سالمونلا دیده می‌شود. لیپیدهای A دارای آسیل کمتر مثلا چهار و پنج تایی دمین‌های دفاعی میزبان را کمتر القا می‌کنند(۲۶). در

آزمایشی که هر دو لیپوپلی ساکارید مربوط به شیگلا فلکسنری و اشریشاکلی به کار رفتند، فعالیت تحریکی لیپوپلی ساکارید شیگلا فلکسنری در مقایسه با لیپوپلی ساکارید اشرشیاکلی در غلظت‌های مشابه لیپوپلی ساکارید، کمتر بود. این تفاوت‌ها مشاهدات قبلی را تأیید کردند مبنی براین که غالباً لیپو پلی ساکاریدهای حاوی لیپید شش آسیله (مثلا اشرشیاکلی) دارای خاصیت تحریکی بیشتری نسبت به لیپوپلی ساکاریدهایی هستند که در تهیه آنها غالبا لیپید A دارای زنجیر آسیل کمتری مثل پنج یا چهار آسیل به کار رفته است (مثل لیپوپلی ساکارید شیگلا *فلکسنری 2A*) (۲۶، ۲۷). هر چند انتقال یکسان هر دو لیپوپلی ساکارید مربوط به اشرشیاکلی و شیگلا *فلکسنری* فعالیت لوسیفراز مشتق از NF-κB را در سطح معنی‌داری نشان دادند. کیم و همکاران (۲۷) در مطالعه خود تفاوت بین لیپید A هگزا آسیل و پنتا آسیل را میزان کارآیی آنها برای تجمع کمپلکس TLR4/MD2 گزارش کردند. بر اساس مطالعات هاتریل و همکاران شیگلا *فلکسنری* سروتایپ 5A اغلب دارای لیپید A هگزا آسیل است (۹۳ درصد)، بر خلاف شیگلا فلکسنری 2A که در آن میزان پنتا آسیل بیشتر است. با توجه به این که نسبت پنتا آسیل همه‌ی سویه‌های مورد استفاده ما بیشتر بود، از این رو احتمالا علت این نتیجه به دست آمده عامل دیگری غیر از تعداد زنجیره‌های آسیل در لیپید A است و یا این که می‌توان گفت که نسبت لیپید A پنتا آسیل به تترا و تری آسیل در لیپید A شیگلا فلکسنری در مقایسه با دیگر سویه‌ها بیشتر بوده که این مطلب نتایج مطالعات دیگران در این زمینه را تأیید می‌کند.

هوبر و همکاران(۲۸) اخیرا در مطالعه‌ای که به بررسی و مقایسه لیپوپلی ساکارید سالمونلا و اشرشیاکلی می‌پرداخت، گزارش کردند که شکل خشن LPS مشتق از سالمونلا مینه سوتا یا اشرشیاکلی توانا تر از شکل صاف آن می‌باشد که این نشان می‌دهد علاوه بر تغییرات لیپید A، قندهای هسته LPS یا آنتی ژن‌های O تکرار شونده نیز در تحمیل TLR4در پاسخ به لیپوپلی ساکارید دخیل است. ضمن این که آنها در این آزمایش نشان دادند که نه لیپید A و نه لیپوپلی ساکارید خشن برای سیگنالینگ به CD14 و یا LBP نیازی ندارند، در حالی که برای لیپوپلی ساکارید صاف این گونه نیست. این در حالی است که هنریکسون و همکاران (۲۹) نشان دادند که لیپید A یا لیپوپلی ساکارید دارای جهش خشن، خاصیت تحریکی کمتری نسبت به لیپوپلی ساکارید صاف دارد. علت این تناقض مشخص نیست و ممکن است به دلیل گوناگونی حلالیت لیپوپلی ساکارید و یا شرایط آزمایشگاهی باشد(شرایطی مثل حضور و عدم حضور محیط کشت). مطالعات دیگر نشان دادند که MD-2 بسیار زیاد، سیگنالینگ لیپوپلی ساکارید را به وسیله TLR4 افزایش می‌دهد(۳۰). این مطلب نشان دهنده این است که درجات بالای MD-2 انسانی، علاوه بر غلظت‌های بالای لیپید A، برای القای فعالیت این سیستم از طریق لیپید A نیاز است. با توجه به شرایط یکسان محیط کشت برای تمامی نمونه‌ها، علت اختلاف بیان در سطح رونویسی و بیان TLR4 احتمالا به دلیل اختلاف در طول زنجیره‌های آسیل، درجه فسفریلاسیون لیپید A یا حتی میزان قند موجود در ساختمان آنتی ژن O ساختار لیپوپلی ساکارید آنها می‌باشد. نتایج حاصل از این آزمون و این که شیگلا *فلکسنری 2A* بیشترین میزان بیان ژن، THL4 و در نتیجه بیشترین میزان تحریک سیستم ایمنی را داشته است، داده‌های دیگران را در زمینه طراحی واکسن علیه شیگلا به طور قطعی تایید می‌کند.

با توجه به خطر بالای بیماری‌زایی کار کردن با سویه‌های شیگلا و عصاره سلولی آنها که حاوی ایمنوژن‌های فراوانی می‌باشند و خود به عنوان محدودیت این مطالعه به حساب می‌آید، لذا بر اساس نتایج حاصل و مقایسه آنها با نتایج حاصل از گزارشات دیگران پیشنهاد می‌شود که در ادامه این مطالعه لیپوپلی ساکارید سویه‌های فوق، فرآیند تحریک سیستم ایمنی و بیان TLR4 و هم‌چنین تولید و ترشح سایتوکاین‌ها و

کموکاین‌های وابسته به صورت دقیق‌تر بررسی شود. هم‌چنین با توجه به گزارشات گذشته که میزان لیپید A هگزا آسیل را در شیگلا فلکسنری 5A نسبت به 2A بیشتر گزارش کرده بودند، در مطالعه‌ای دیگر مقایسه ایمونوژن بودن لیز این دو تیپ از شیگلا فلکسنری نیز جالب به نظر می‌رسد. از طرفی با توجه به این که در تهیه واکسن‌های Invaplex از IpaC،IpaB و لیپوپلی ساکارید بهینه سویه‌های باکتریایی یک گونه استفاده می‌کنند، پیشنهاد می‌شود برای تولید واکسن Invaplex علیه سویه‌های *سونئی*، *دیسانتری* و *بوئیدی* نیز از لیپوپلی ساکارید سویه *فلکسنری* (به دلیل قدرت بیشتر ایمونوژنی) استفاده شود. علاوه بر این، از آن جا که سیگنالینگ TLR سبب تغییر و تنظیم عملکرد و خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود و با توجه به کاربرد گسترده و مهم این سلول‌ها در سلول درمانی بیماری‌های خود ایمنی، لذا ارزیابی تاثیرات لیپوپلی ساکارید بر روند عملکردی و تغییر خصوصیات این سلول‌ها نیز به عنوان یک پیشنهاد ایده ی جذابی به شمار می‌رود.

نتیجه‌گیری

پاسخ ایمنی ذاتی از طریق لیپوپلی ساکاریدهای باکتری‌های گرم منفی به عنوان آگونیست TLR4 القا می‌شود. ترکیب لیپوپلی ساکارید در گونه‌های مختلف باکتری‌های گرم منفی، بسیار متغیر است. بنابراین بیان سطوح متفاوتی از TLR4 در اثر تحریک با سویه‌های مختلف باکتری شیگلا مورد انتظار است. نتایج این مطالعه علاوه بر تأیید این مطلب نشان داد که مناسب‌ترین لیپوپلی ساکارید سویه‌های شیگلا برای تهیه واکسن، لیپو پلی ساکارید سویه فلکسنری می‌باشد، چرا که سبب بیشترین بیان TLR4 می‌شود. علاوه بر این با توجه به نتایج غلظتی به دست آمده می‌توان غلظت بهینه مورد استفاده از لیز سویه فلکسنری را به عنوان دوز مناسب آن در تهیه واکسن در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر گرفته از پایان نامه‌ای با عنوان "ارزیابی تاثیر لیپوپلی ساکارید سویه‌های مختلف باکتری شیگلا بر میزان تحریک سیستم ایمنی ذاتی در شرایط *in vitro* (کشت سلولی) به منظور تولید بهینه واکسن" می‌باشد. در پایان از تمامی کسانی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. Nhung PH, Ohkusu K, Mishima N, Noda M, Shah MM, Sun X, et al. Phylogeny and species identification of the family Enterobacteriaceae based on dnaJ sequences. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2007; 58(2): 153-61.
2. Key B, Clemens J, Kotloff K. Generic Protocol to Estimate the Burden of Shigella Diarrhoea and Dysenteric Mortal, Tex. Book; 1999.P. 146-51.
3. Brooks G. Mycoplasmas & cell wall-defective bacteria. U: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS. Morsa SA, Mietzner TA, ur. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. New York: McGraw-Hill Companies, Inc; 2010.
4. Man AL, Prieto-Garcia ME, Nicoletti C. Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys? Immunology. 2004;113(1):15-22.
5. Trent MS, Stead CM, Tran AX, Hankins JV. Invited review: diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. Journal of endotoxin research. 2006; 12(4):205-23.
6. Rallabhandi P, Awomoyi A, Thomas KE, Phalipon A, Fujimoto Y, Fukase K, et al. Differential activation of human TLR4 by Escherichia coli and Shigella flexneri 2a lipopolysaccharide: combined effects of lipid A acylation state and TLR4 polymorphisms on signaling. The Journal of Immunology. 2008; 180(2):1139-47.
7. Aboussahoud W, Aflatoonian R, Bruce C, Elliott S, Ward J, Newton S, et al. Expression of Toll-like Receptors in Human Endometrial

Epithelial Cells and Cell Lines. Journal of Reproductive Immunology. 2010; 84(1): 41-51.
8. Aflatoonian R, Tuckerman E, Elliott S, Bruce C, Aflatoonian A, Li T, et al. Menstrual cycle-dependent changes of Toll-like receptors in endometrium. Human Reproduction. 2007; 22(2): 586-93.
9. Miyake K, editor. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. Seminars in immunology; 2007; 19: 3- 10.
10. Hwa Cho H, Bae YC, Jung JS. Role of Toll-Like Receptors on Human Adipose-Derived Stromal Cells. Stem Cells. 2006;24(12):2744-52.
11. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006;124(4):783-801.
12. Tomchuck SL, Zwezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive Their Migration and Immunomodulating Responses. Stem Cells. 2008; 26(1): 99-107.
13. DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. Mediators of inflammation. 2010;2010.p. 865601-2.
14. Bäckhed F, Normark S, Schweda EK, Oscarson S, Richter-Dahlfors A. Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. Microbes and infection. 2003; 5(12):1057-63.
15. Jahantigh D, Saadati M, Ramandi MF, Mousavi M, Zand A. Novel Intranasal Vaccine Delivery System by Chitosan Nanofibrous Membrane Containing N-Terminal Region of Ipad Antigen as a Nasal Shigellosis Vaccine, Studies in Guinea Pigs. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2014;24(1):33-9.
16. Saadati M, Heiat M, Nazarian S, Barati B, Honari H, Doroudian M, et al. Cloning and Expression of N-terminal Region of IpaD from Shigella dysenteriae in E. coli. Journal of Paramedical Sciences. 2010;1(4):12-7.
17. Mallaei F, Saadati M, Honari H, Nazariyan Sh, Eghtedardoust M, Heiat M, et al. Cloning and expression of ipaC gene from Shigella dysenteriae. Kowsar Medical Journal 2011; 16: 1-6.
18. Emadedin M, Aghdami N, Taghiyar L, Fazeli R, Moghadasali R, Jahangir S, et al. Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. Archives of Iranian medicine. 2012(15):422-8.
19. Shi L, Wang J-S, Liu X-M, Hu X-Y, Fang Q. Upregulated functional expression of Toll like receptor 4 in mesenchymal stem cells induced by lipopolysaccharide. Chinese medical journal. 2007;120(19):1685-8.
20. Lin H, Xu R, Zhang Z, Chen L, Shi M, Wang F-S. Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in the treatment of human liver diseases. Cellular & molecular immunology. 2011;8(1):19-22.
21. Tyndall A. Mesenchymal stem cell treatments in rheumatology [mdash] a glass half full? Nature Reviews Rheumatology. 2014;10(2):117-24.
22. DelaRosa O, Dalemans W, Lombardo E. Toll-like receptors as modulators of mesenchymal stem cells. Frontiers in immunology. 2012;3:182.
23. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Rousso-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S, et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. Blood. 2007; 109(4): 1422-32.
24. Loppnow H, Brade H, Dürrbaum I, Dinarello CA, Kusumoto S, Rietschel ET, et al. IL-1 induction-capacity of defined lipopolysaccharide partial structures. The Journal of Immunology. 1989; 142(9): 3229-38.
25. Seydel U, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, Brandenburg K. Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. European Journal of Biochemistry. 2000; 267(10): 3032-9.
26. Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. Nature immunology. 2002;3(4):354-9.

27. Kim HM, Park BS, Kim J-I, Kim SE, Lee J, Oh SC, et al. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. Cell. 2007;130(5):906-17.
28. Huber M, Kalis C, Keck S, Jiang Z, Georgel P, Du X, et al. R-form LPS, the master key to the activation ofTLR4/MD-2-positive cells. European journal of immunology. 2006; 36(3): 701-11.
29. Henricson B, Perera P, Qureshi N, Takayama K, Vogel S. Rhodopseudomonas sphaeroides lipid A derivatives block in vitro induction of tumor necrosis factor and endotoxin tolerance by smooth lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A. Infection and immunity. 1992;60(10):4285-90.
30. Visintin A, Halmen KA, Latz E, Monks BG, Golenbock DT. Pharmacological inhibition of endotoxin responses is achieved by targeting the TLR4 coreceptor, MD-2. The Journal of Immunology. 2005; 175(10): 6465-72.