

Investigating the effect of probiotic strain *Lactobacillus gasseri* on the induction of apoptosis in AGS cells treated with extracellular vesicles of *Helicobacter pylori*

Zahra Sadeghloo¹, Parvaneh Saffarian¹, Mojdeh Hakemi-Vala², Amir Sadeghi³, Abbas Yadegar^{4*}

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

2. Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

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

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

Abstract

Aim and Background: *Helicobacter pylori* infection is known as the main risk factor associated with chronic gastritis and gastric adenocarcinoma. Extracellular vesicles are among the key virulence factors of this bacterium, which play a role in inducing inflammation and inhibiting the apoptosis process in host cells. Probiotic strains, including *Lactobacillus* species, can play a role in inducing the process of cellular apoptosis. This study aimed to evaluate the effect of *L. gasseri* ATCC 33323 on the apoptosis process in AGS cells treated with extracellular vesicles (EVs) of *H. pylori*.

Materials and Methods: EVs were isolated from two clinical strains of *H. pylori* (BY-1 and OC824). The morphology of EVs was identified by transmission electron microscopy and dynamic light scattering. The viability of AGS cells was examined in the presence of various amounts of *H. pylori* EVs and *L. gasseri* cell-free supernatant (CFS). Based on the MTT assay, 50 µg/mL of *H. pylori* EVs and 10% v/v of *L. gasseri* CFS were used for further experiments. Apoptosis was investigated using RT-qPCR targeting key apoptosis mediators (*BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BCL2*, and *NOD1*).

Results: *H. pylori* EVs were identified in the size range of 50-200 nm. Based on the results of cell viability assays in AGS cells, 50 micrograms per milliliter of *H. pylori* extracellular vesicles and 10% (v/v) of *L. gasseri* culture supernatant were used for cell treatment. *H. Pylori* EVs downregulated the gene expression of *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, and *CASP9* and upregulated *BCL2*, and *NOD1* in AGS cells at 12 and 24 h. In contrast, *L. gasseri* CFS effectively induced cell apoptosis, which was inhibited by EVs.

Conclusion: The present study showed that *L. gasseri* CFS can effectively induce *H. pylori* EV-inhibited apoptosis in AGS cells. Further research is needed to elucidate the precise function of *L. gasseri* CFS and its metabolites in the induction of apoptosis.

Keywords: *Helicobacter pylori*, extracellular vesicles, apoptosis, probiotics, *Lactobacillus gasseri*.

Corresponding author:

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

Email: a.yadegar@sbmu.ac.ir

بررسی اثر سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس گسری بر القای آپوپتوز در سلول‌های AGS تیمار شده با وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری

زهرا صادق لو^۱، پروانه صفاریان^۱، مژده حاکمی والا^۲، امیر صادقی^۲، عباس یادگار^{۳*}

1. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوری های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
2. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
3. مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
4. مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از آب و غذا، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: عفونت هلیکوباکتر پیلوری به عنوان عامل خطر اصلی مرتبط با گاستریت مزمن و آدنوکارسینوم معده شناخته می‌شود. وزیکول‌های خارج‌سلولی از جمله فاکتورهای بیماری‌زایی کلیدی این باکتری هستند که در ایجاد التهاب و مهار فرآیند آپوپتوز در سلول‌های میزبان نقش دارند. سویه‌های پروبیوتیک از جمله گونه‌های لاکتوباسیلوس می‌توانند در القای فرایند آپوپتوز سلولی نقش ایفا کنند. این مطالعه با هدف بررسی اثر لاکتوباسیلوس گسری ATCC 33323 بر فرایند آپوپتوز در سلول‌های AGS تحت تیمار با وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: وزیکول‌های خارج‌سلولی از دو سویه هلیکوباکتر پیلوری بالینی (BY-1 و OC824) جدا شدند. شناسایی مورفولوژی وزیکول‌های خارج‌سلولی به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره و تکنیک پراکندگی نور پویا انجام شد. زنده‌مانی سلول‌های AGS در حضور مقادیر مختلف وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری و مایع رویی بدون سلول حاصل از کشت لاکتوباسیلوس گسری بررسی شد. بر اساس سنجش MTT 50 میکروگرم در میلی‌لیتر وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری و ۱۰ درصد حجمی/حجمی از مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری برای آزمایش‌های بیشتر استفاده شد. آپوپتوز با استفاده از آنالیز RT-qPCR برای واسطه‌های کلیدی آپوپتوز (*bcl-2*، *cas9*، *cas8*، *cas3*، *bax*)، مورد بررسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوریدر محدوده اندازه ۵۰-۲۰۰ نانومتر شناسایی شدند. بر اساس نتایج سنجش زنده‌مانی سلول‌های AGS، برای تیمار سلولی از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری و ۱۰ درصد حجمی/حجمی از مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری استفاده شد. وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری بیان‌ژن‌های *cas9*، *cas8*، *cas3*، *bax* را کاهش دادند و بیان *bcl-2* و گیرنده *nod1* را در سلول‌های AGS در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت افزایش دادند. در مقابل، مایع رویی لاکتوباسیلوس گسری به طور مؤثر آپوپتوز مهار شده ناشی از وزیکول‌های خارج‌سلولی را القا نمود.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که مایع رویی لاکتوباسیلوس گسری می‌تواند به طور مؤثر آپوپتوز مهار شده ناشی از وزیکول‌های هلیکوباکتر پیلوری را در سلول‌های AGS القا کند. تحقیقات بیشتر برای کشف مکانیسم اثر مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری و متابولیت‌های آن بر القای آپوپتوز مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، وزیکول‌های خارج‌سلولی، آپوپتوز، پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس گسری.

۱- مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی و میکرواُتروفیل است که در معده نیمی از جمعیت انسانی ساکن است. عفونت با هلیکوباکتر پیلوری با گاستریت و بیماری‌های شدیدتر مانند زخم معده، سرطان معده و لنفوم مالت مرتبط است. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی، هلیکوباکتر پیلوری در دسته کارسینوژن‌های تیپ ۱ قرار می‌گیرد. سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری با دارا بودن تنوع

نویسنده مسئول:

مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از آب و غذا، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

پست الکترونیکی:

a.yadegar@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳

بالایی از عوامل بیماری‌زا مانند عوامل کلونیزاسیون (*flagella* و *urease*)، پروتئین‌های اتصال (*SabA*, *BabA*) و *OipA* و دو توکسین اصلی (*CagA* و *VacA*)، خطر ابتلا به سرطان معده را در فرد آلوده به این باکتری افزایش می‌دهند (۱).

آپوپتوز یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده، نقش کلیدی در تنظیم تعداد سلول‌های اپیتلیال در بافت‌های مختلف بدن دارد. این فرایند به حفظ تعادل سلولی و جلوگیری از رشد غیرکنترلی سلول‌ها کمک می‌کند. تعادل پویا بین تکثیر سلولی و آپوپتوز برای حفظ هموستاز سلولی در بدن انسان بسیار مهم و سرطان‌زایی معده به این عدم تعادل مرتبط است. باکتری‌های پاتوژن از جمله هلیکوباکتر پیلوری با مهار آپوپتوز می‌توانند بستر مناسبی برای تکثیر و گسترش عفونت فراهم کنند (۲). مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که عوامل متعدد بیماری‌زای هلیکوباکتر پیلوری از جمله *VacA*, *CagA* و *urease* توانایی ایجاد اختلال در فرایند آپوپتوز را دارند (۳). در طی عفونت مزمن هلیکوباکتر پیلوری، علاوه بر باکتری زنده و فعال، اجزای باکتریایی کشته‌شده یا لیزات و محصولات جانبی، مانند مایع رویی عاری از سلول (CFS) و وزیکول‌های خارج سلولی (EVs) می‌توانند با سلول‌های معده میان‌کنش داشته باشند و موجب تحریک مسیرهای سیگنالینگ سلولی از جمله التهاب و تومورزایی شوند (۴). علاوه بر فاکتورهای بیماری‌زای کلاسیک عفونت هلیکوباکتر پیلوری، امروزه وزیکول‌های خارج سلولی مشتق‌شده از هلیکوباکتر پیلوری در بیماری‌زایی این پاتوژن نقش به‌سزایی دارند. وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی، ذراتی با غشای دو لایه‌ای و شکل کروی هستند که در اندازه‌های ۲۰ تا ۳۰۰ نانومتر تولید می‌شوند و در شرایط *in-vitro* و *in-vivo* تشکیل می‌شوند (۵). وزیکول‌های خارج سلولی تولید شده توسط هلیکوباکتر پیلوری، حامل مولکول‌های اتصال و عوامل مهم بیماری‌زایی همچون لیپوپلی‌ساکارید (*LPS*)، *CagA*, *VacA* و *UreA* هستند، که نقش محوری در ارتباط با سلول‌های میزبان دارند و می‌توانند با انتقال مواد فعال فیزیولوژیکی به داخل سلول‌ها در فرایندهای سلولی تداخل ایجاد کنند (۵). باوجود این، اطلاعات محدودی در مورد نقش وزیکول‌های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری در پاتوژن این باکتری و پیشرفت بیماری‌های مرتبط با معده و سرطان آن وجود دارد. ریشه‌کنی عفونت هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند به کاهش

التهاب معده و پیشروی عوارض طولانی‌مدت مرتبط با هلیکوباکتر پیلوری یا بازگشت بیماری کمک کند. با این حال، به دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیک در سراسر جهان، اثربخشی درمان‌های ریشه‌کنی هلیکوباکتر پیلوری کاهش یافته است (۶). مطالعات متاآنالیز متعددی از کارآزمایی‌های بالینی و بررسی‌های سیستماتیک نشان داده‌اند که استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند عوارض جانبی درمان‌های ریشه‌کنی هلیکوباکتر پیلوری را کاهش دهند (۷). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که برخی از پروبیوتیک‌ها، به‌ویژه گونه‌های لاکتوباسیلوس، فعالیت‌های ضد هلیکوباکتر پیلوری را از طریق فعال‌سازی پاسخ‌های ایمنی میزبان و القای آپوپتوز ایجاد می‌کنند (۸). لاکتوباسیلوس گسری به‌طور طبیعی در دستگاه گوارش نوزادان و بزرگسالان یافت می‌شود. بر اساس مطالعات، این سویه می‌تواند اتصال هلیکوباکتر پیلوری به سلول‌های معده را مهار کند و التهاب معده را تعدیل نماید (۸). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که لاکتوباسیلوس گسری، به‌تنهایی یا در ترکیب با سایر سویه‌های پروبیوتیک، اثر مهاری بر روی التهاب ناشی از هلیکوباکتر پیلوری دارند و موجب افزایش اثربخشی درمان ریشه‌کنی هلیکوباکتر پیلوری می‌گردند (۸). از مهم‌ترین عوامل آپوپتوز، پروتئازهای ویژه سیستمین آسپارتیک اسید (*caspases*) و پروتئین‌های پروآپوپتوز هستند که در یک زنجیرهٔ پروتئولیتیک به‌شدت تنظیم‌شده شرکت می‌کنند. ژن‌های مسیر آپوپتوز توسط خانوادهٔ *BCL-2* هدایت می‌شوند که ژن‌های ضدآپوپتوز (*BCL-2*) و ژن‌های آپوپتوز (*BAX*) هستند. هنگامی که محرک‌های سلولی مانند پروبیوتیک‌ها منجر به آپوپتوز می‌شوند، در واقع پروتئین‌های آپوپتوز را فعال می‌کنند، بنابراین سیتوکروم C از میتوکندری آزاد می‌شود، *Caspase-9* و *Caspase-3* و در نهایت DNA قطعه‌قطعه شده و باعث مرگ سلولی می‌شود (۹).

این مطالعه با هدف بررسی اثر وزیکول‌های خارج سلولی مشتق‌شده از دو سویهٔ بالینی هلیکوباکتر پیلوری بر بیان ژن‌های *bax*, *cas3*, *cas8*, *cas9* و *bcl-2* و گیرندهٔ سیتوزولی *nod1* به‌عنوان نشانگرهای مرتبط با آپوپتوز در ردهٔ سلولی AGS انجام شد. علاوه بر این، اثر القایی سویهٔ بالقوهٔ پروبیوتیک لاکتوباسیلوس گسری ATCC 33323 بر آپوپتوز مهارشده، توسط وزیکول‌های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری در ردهٔ سلولی AGS مورد بررسی قرار گرفته است.

2- مواد و روش‌ها

1-2- شرایط رشد سویه‌های باکتری

1-1-2- کشت هلیکوباکتر پیلوری

دو سویه بالینی هلیکوباکتر پیلوری BY-1 و OC824، که به ترتیب از بیماران مبتلا به گاستریت و زخم معده جمع‌آوری شده بودند، از بانک میکروبی ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری آزمایشگاه تحقیقات هلیکوباکتر واقع در پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند (۱۰، ۱۱). سویه‌ها در پلیت‌های حاوی محیط بروسلا آگار (Merck, Darmstadt, Germany) با ۷ درصد (حجمی/حجمی) خون گوسفند دِفیرینه، ۱۰ درصد سرم گوساله (FCS) و مکمل انتخابی (وانکومايسين ۲ میلی گرم در لیتر، پلی میکسین ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر و تری متوپریم ۱ میلی گرم در لیتر)، و آمفوتریسین B 5/2 میلی گرم در لیتر کشت داده شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محیط میکروآئروفیل (۵ درصد O_2 ، ۱۰ درصد CO_2 و ۸۵ درصد N_2) به مدت ۳-۵ روز انکوبه شدند. تعیین هویت و شناسایی هلیکوباکتر پیلوری با تست‌های بیوشیمیایی و روش‌های مولکولی انجام شد (۱۲).

2-2- تعیین ژنوتیپ سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری

ژنوتیپ سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از روش PCR برای ژن‌های *vacA*، *cagA*، آل‌های *s* و *m*، *babA2*، *sabA*، *iceA1* و *iceA2* تعیین شدند. همچنین توالی‌های الیگونوکلوئیدی و اندازه محصولات PCR مورد استفاده

برای تکثیر ژن‌های بیماری‌زای هلیکوباکتر پیلوری در جدول ۱ ارائه شده است (۱۲).

3-2- ارزیابی ایمنی و تهیه مایع رویی کشت

لاکتوباسیلوس گسری

سویه لاکتوباسیلوس گسری (IBRC- ATCC 33323 M-10944) از مجموعه کشت‌های مرکز منابع زیستی ایران (IBRC، تهران، ایران) خریداری شد. به منظور بررسی سلامت این سویه، فعالیت همولیتیک و ژلاتیناز و همچنین توانایی تولید DNase مورد بررسی قرار گرفت (۸). باکتری‌ها روی محیط کشت Man-Rogosa-Sharpe (MRS) broth (Merck, Darmstadt, Germany) که حاوی ۰/۱ درصد (w/v) هیدروکلرید L-سیستئین (Sigma, USA) است، در شرایط بی‌هوازی (۱۰ درصد CO_2 ، ۵ درصد H_2 و ۸۵ درصد N_2) توسط جار و سیستم Anoxomat® Gas Exchange (Mart Microbiology BV, Lichtenvoorde, Netherlands) رشد داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس ۲۵۰ میلی لیتر از کشت باکتری لاکتوباسیلوس گسری با تنظیم چگالی نوری OD600 به مقدار ۱، که معادل 10^9 CFU/mL است، با سرعت 16000 g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا مایع رویی کشت استخراج شود. pH مایع رویی با استفاده از NaOH 1 نرمال به 7.5 ± 0.5 افزایش یافت. پس از عبور از فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتر (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)، مایع رویی کشت جمع‌آوری شده و در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

جدول ۱- توالی‌های الیگونوکلوئیدی مورد استفاده در سنجش PCR.

ژن‌های هدف	توالی (۵'→۳')	دمای اتصال ($^{\circ}C$)	محصولات PCR (جفت باز)
<i>16S rRNA</i>	GGCTATGACGGGTATCCGGC GCCGTGCAGCACCTGTTTTC	58	764
<i>cagA</i>	AATACACCAACGCCTCCAAG TTGTTGCCGCTTTTGCTCTC	57	400
<i>vacA</i> s1/s2	ATGGAAATACAACAAACACAC CTGCTTGAATGCGCCAAAC	57	286/259
<i>vacA</i> m1/m2	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG GCGTCAAAAATAATTCCAAGG	57	645/570
<i>babA2</i>	CCAAACGAAACAAAAAGCGT GCTTGTGTAAAAGCCGTCGT	52	271
<i>sabA</i>	TTTTTGTCTCAGCTACGCGTTC ACCGAAGTGATAACGGCTTG	55	581
<i>iceA1</i>	TATTTCTGGAAGTTGCGCAACCTGAT GGCCTACAACCGCATGGATAT	58	696
<i>iceA2</i>	CGGCTGTAGGCACTAAAGCTA TCAATCCTATGTGAAACAATGATCGTT	58	608

4-2- جداسازی و شناسایی وزیکول‌های خارج سلولی

هلیکوباکتر پیلوری

کلنی‌های تازه کشت‌شده هلیکوباکتر پیلوری بر روی محیط کشت بروسلا، به ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط پایه (BHI broth) حاوی ۱۰ درصد سرم گوساله انتقال داده و در شرایط میکروآتروپیل انکوبه شدند. برای کاهش احتمال وجود آگزوزوم‌ها در سرم گوساله، پیش از استفاده، سرم با سرعت 120000 g به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد و سپس با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری فیلتر شد (۱۳، ۱۴). پس از ۷۲ ساعت از رشد باکتری‌ها، سویه‌ها با سرعت 10000 g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس در ۳-۴ مرحله سانتریفیوژ شدند تا زمانی که رسوب سلولی قابل مشاهده نباشد. برای حذف باکتری‌های باقی‌مانده، مایع رویی کشت به‌دست آمده با استفاده از غشای ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. مایع رویی کشت به مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت 200000 g اولتراسانتریفیوژ شد (۱۵). در نهایت رسوب به‌دست آمده با اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر از محلول (PBS pH=7) حل شد. وزیکول‌های خارج سلولی جداشده در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. غلظت پروتئین وزیکول‌های خارج سلولی استخراج‌شده با استفاده از کیت سنجش پروتئین با بیسینکونینیک اسید (DNABiotec, Tehran, Iran) (BCA) تعیین شد. برای ارزیابی محتوای پروتئین وزیکول‌های خارج سلولی از الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات-پلی‌آکریل‌آمید (SDS-PAGE) که با رنگ آبی کوماسی رنگ‌آمیزی شده است استفاده شد.

5-2- میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

به‌منظور تعیین مورفولوژی وزیکول‌های خارج سلولی، ۱۰ میکرولیتر از وزیکول‌ها بر روی یک شبکه مسی ۴۰۰ مش که با فیلم فرموار پوشیده‌شده با کربن پوشانده شده بود، قرار گرفت. پس از ۲ دقیقه انکوباسیون و بلات کردن برای حذف مایع اضافی، شبکه مسی در ۱۰ میکرولیتر اورانیل استات ۲ درصد (w/v) قرار داده شد. پس از لکه‌گیری و تکرار مراحل قبل، شبکه مسی در هوا خشک شد. در نهایت، تصاویر با استفاده از میکروسکوپ TEM (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) گرفته شد.

6-2- پراکندگی دینامیک نور (DLS)

از روش پراکندگی دینامیک نور برای تعیین اندازه

وزیکول‌های خارج سلولی (Cordouan Technologies, NanoQ V2.5.9.0, France) استفاده شد. وزیکول‌های خارج سلولی مشتق‌شده از هلیکوباکتر پیلوری با PBS تا غلظت ۴-۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقیق شدند و سپس با استفاده از غشای ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شدند.

7-2- شرایط کشت و رشد سلول‌های AGS

سلول‌های AGS، رده سلولی آدنوکارسینوم معده انسان، از مجموعه‌های کشت مرکز منابع زیستی ایران (IBRC, accession cell no. C10071، تهران، ایران) به‌دست آمد. سلول‌ها در محیط Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) همراه با ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۰ درصد (حجمی/حجمی) سرم جنین گاوی غیرفعال‌شده با حرارت (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (FBS)، و ۲ میلی‌مولار L-گلوتامین در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند.

8-2- سنجش زنده‌مانی سلول‌های AGS

غلظت بهینه وزیکول‌های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری و مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری برای تیمار سلولی با استفاده از روش MTT تعیین گردید. سلول‌های AGS در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) وزیکول‌های خارج سلولی و مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری (۲/۵، ۵٪، ۱۰٪ و ۲۰٪ حجمی/حجمی) قرار گرفتند. برای اطمینان از صحت نتایج، گروه‌های کنترل شامل سلول‌های تیمارنشده (کنترل منفی)، سلول‌های تیمارشده با PBS (محلول حامل وزیکول‌های خارج سلولی) و سلول‌های تیمارشده با محیط کشت MRS (محیط کشت لاکتوباسیلوس گسری) در نظر گرفته شدند. پس از انکوباسیون، ۱۰ میکرولیتر معرف (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس آزمایش با افزودن دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) متوقف شد و جذب نوری در ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌خوان (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA) اندازه‌گیری شد.

9-2- تیمار سلول‌های AGS

سلول‌های AGS با تراکم 5×10^4 سلول در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند و در انکوباتور CO_2 به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سلول‌ها قبل از تیمار سه مرتبه با PBS (pH=7.2) شست‌وشو داده شدند. بر اساس نتایج حاصل از آزمون MTT، غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از وزیکول‌های خارج‌سلولی مشتق‌شده از هلیکوباکتر پیلوری (سویه‌های BY-1 و OC824) و ۱۰ درصد حجمی/حجمی از مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری جهت تیمار سلول‌های AGS برای مدت زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت قرار گرفتند. علاوه بر این، سلول‌های AGS با ترکیبی از وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری و مایع رویی لاکتوباسیلوس گسری تحت تیمار قرار گرفتند. همچنین آزمایش‌ها در سه تکرار و حداقل سه بار انجام شدند.

10-2- استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA توتال از سلول‌های AGS در ۱۲ و ۲۴ ساعت با استفاده از کیت استخراج RNA (Parstous, Mashhad, Iran) بر اساس دستورالعمل سازنده تخلیص شد. غلظت و

کیفیت RNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتر (ND-1000, Thermo Scientific, USA) ارزیابی شد. کیت سنتز cDNA (Parstous, Mashhad, Iran) برای رونویسی RNA به cDNA طبق دستورالعمل سازنده استفاده شد. نمونه‌های cDNA سنتز شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

11-2- بررسی بیان ژن با روش RT-qPCR

تجزیه و تحلیل کمی (RT-qPCR) با سیستم Rotor-مسترمیکس BioFACT™ 2X Real-Time PCR (QIAGEN, Germany) با استفاده از (Gene® Q) انجام شد. سطح بیان ژن‌های *bax*، *cas3*، *cas8*، *cas9*، *bcl-2* و *nod1* با استفاده از توالی‌های الیگونوکلوئیدی فهرست‌شده در جدول ۲ تعیین شدند. ژن *ACTB* به عنوان ژن مرجع برای کنترل داخلی سطح بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای سنجش تغییرهای نسبی در بیان ژن استفاده شد.

جدول ۲- توالی‌های الیگونوکلوئیدی مورد استفاده در سنجش RT-qPCR.

منابع	توالی (۵'→۳')	پرایمرها	ژن‌های هدف
(۱۶)	GAGCTGGTGGTTGACTTTCTC TCCATCTCCGATTCAGTCCCT	BCL2L1F BCL2L1R	<i>bcl-2</i>
(۱۷)	CTTCTGCTTCCAGACCAAGG TCAGCGTGTCTTCCTGTTG	BAX-F BAX-R	<i>bax</i>
(۱۸)	CCAGAGACTCCAGGAAAAGAGA GATAGAGCATGACCCTGTAGGC	CAS8-F CAS8-R	<i>cas8</i>
(۱۷)	GAAGTGGATCCGATGTGGAC TTCCGTCCGTCCATAAATC	CAS9-F CAS9-R	<i>cas9</i>
(۱۷)	CGGGTACGGATGTAGATGCT GGGGCCATCTGTACCATAGA	CAS3-F CAS3-R	<i>cas3</i>
(۱۹)	TCCAAAGCCAAACAGAACTC CAGCATCCAGATGAACGTG	NOD1-F NOD1-R	<i>nod1</i>
(۱۶)	ATGTGGCCGAGGACTTTGATT AGTGGGGTGGCTTTTAGGATG	ACTB-F ACTB-R	<i>ACTB</i>

نظر آماری معنادار در نظر گرفته شدند.

4- تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، بیان ژن و رسم گراف‌ها از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۹/۵ استفاده شد (GraphPad Software Inc, CA, USA). برای بررسی معناداری تفاوت‌های بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده شد. نتایج به عنوان میانگین حداقل سه آزمایش مستقل نمایش داده شد و نیز $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ و $p < 0.0001$ ، همچنین $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ و $p < 0.0001$ از

5- نتایج

1-5- ژنوتیپ سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری

ژنوتیپ سویه‌های BY-1 و OC824 هلیکوباکتر پیلوری به صورت *cagA⁺/vacA s1m1/sabA⁺/babA2⁺/iceA1* و *cagA⁺/vacA s1m2/sabA⁺/babA2⁺/iceA1* شناسایی شدند.

2-5- ایمنی لاکتوباسیلوس گسری ATCC 33323

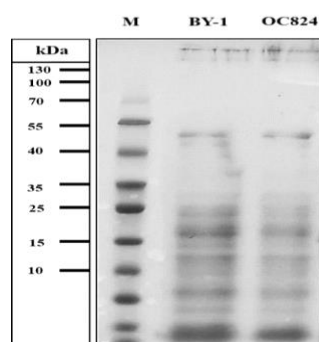
سویه لاکتوباسیلوس گسری ATCC 33323 از نظر آزمون‌های تولید همولیزین، ژلاتیناز و DNase منفی بود.

3-5- خصوصیات وزیکول‌های خارج سلولی جداشده

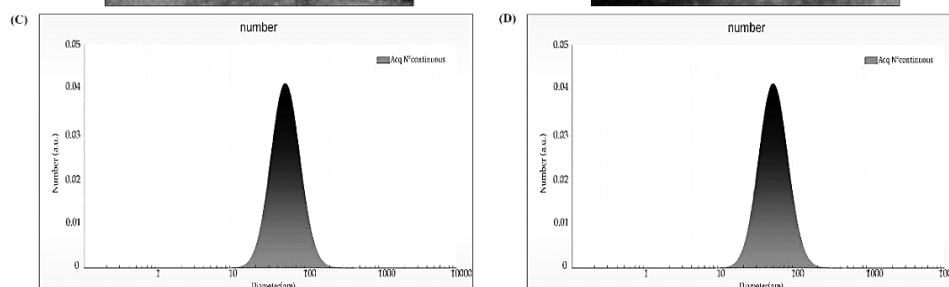
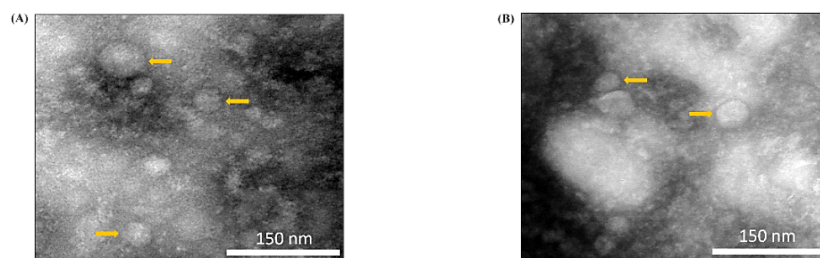
از هلیکوباکتر پیلوری

تحلیل ژل SDS-PAGE نشان داد که طیف متنوعی از پروتئین‌ها با وزن مولکولی مختلف در وزیکول‌های خارج سلولی سویه‌های BY-1 و OC824 وجود دارند. این تنوع باندها نشان‌دهنده محتوای غنی و متنوع پروتئینی در وزیکول‌های خارج سلولی هستند و می‌تواند حاکی از وجود

پروتئین‌های ساختاری، آنزیمی و عوامل دخیل در ارتباط‌های سلولی در این وزیکول‌ها باشند (شکل ۱). تجزیه و تحلیل نتایج آزمون‌های TEM و DLS، وزیکول‌های خارج سلولی را به عنوان ذرات کروی با قطر حدود ۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر نشان دادند. نمودار توزیع اندازه ذرات نشان می‌دهد که متوسط اندازه وزیکول‌های خارج سلولی برای سویه‌های BY-1 و OC824 به ترتیب ۵۵/۶۷ نانومتر و ۶۲/۵۷ نانومتر است. همچنین، بیشترین تعداد وزیکول‌های شناسایی شده در این سویه‌ها به ترتیب در اندازه‌های ۴۹/۰۶ نانومتر و ۵۶/۳۶ نانومتر مشاهده شد (شکل ۲، A-D).



شکل ۱- نتایج SDS-PAGE وزیکول‌های خارج سلولی استخراج شده از هلیکوباکتر پیلوری. پروتئین‌های موجود در وزیکول‌های مشتق شده از سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری با ۱۲ درصد SDS-PAGE و سپس تجسم با استفاده از رنگ آمیزی blue Coomassie. خطوط سمت چپ (M) جرم مولکولی استانداردهای پروتئین را بر حسب کیلو دالتون نشان می‌دهد.



شکل ۲- خصوصیات وزیکول‌های جداشده از سویه‌های BY-1 و OC824 هلیکوباکتر پیلوری. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (A-B) و توزیع اندازه ذرات (C-D) (DLS) وزیکول‌های جداشده از سویه‌های BY-1 و OC824 که با رنگ آمیزی منفی گرفته شده‌اند، نشان‌دهنده وزیکول‌های کروی و دو لایه با اندازه‌های مختلف هستند که به ترتیب از سویه‌های BY-1 و OC824 جدا شده‌اند. تجزیه و تحلیل پراکندگی نور پویا (DLS) وزیکول‌های جداشده از سویه‌های BY-1 و OC824

گسری بر زنده‌مانی سلول‌های AGS

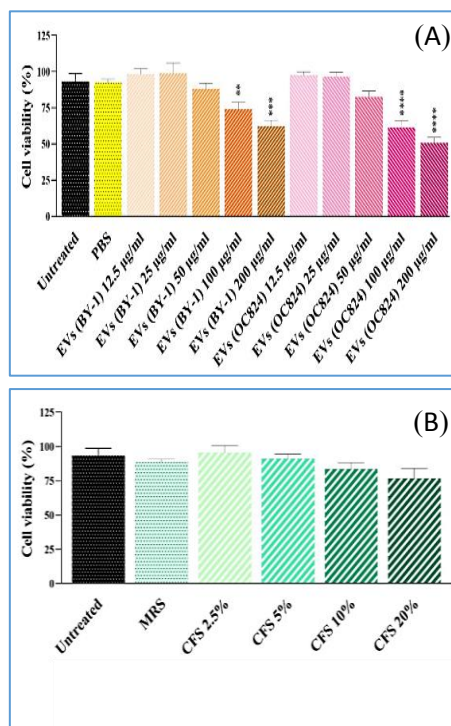
برای تعیین اثر افزایش غلظت وزیکول‌های خارج سلولی

4-5- اثرهای وزیکول‌های خارج سلولی مشتق شده از

هلیکوباکتر پیلوری و مایع رویی لاکتوباسیلوس

سلول‌های شاهد به‌طور قابل‌توجهی کاهش دادند. همچنین، غلظت‌های مختلف مایع رویی استخراج‌شده از کشت لاکتوباسیلوس گسری تأثیر قابل‌توجهی بر قابلیت زنده‌مانی سلول‌های AGS نداشتند. بر اساس نتایج زنده‌مانی سلولی، وزیکول‌های خارج‌سلولی مشتق‌شده از هلیکوباکتر پیلوری در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و مایع رویی کشت ۱۰ درصد (حجمی/حجمی) لاکتوباسیلوس گسری برای آزمایش‌های بعدی در این مطالعه انتخاب شدند.

مشتق‌شده از هلیکوباکتر پیلوری (BY-1 و OC824) و درصد‌های مختلف مایع رویی به‌دست‌آمده از کشت لاکتوباسیلوس گسری بر قابلیت زنده‌مانی سلول‌های AGS، آزمون MTT استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، وزیکول‌های خارج‌سلولی جداشده از هر دو سویه هلیکوباکتر پیلوری پس از ۲۴ ساعت تیمار به‌جز غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، منجر به تغییر قابل‌توجهی در تعداد سلول‌های زنده نشدند و تنها در دو غلظت بیان‌شده، تعداد سلول‌های زنده را نسبت به



آپتوز، سلول‌های AGS با وزیکول‌های خارج‌سلولی سویه‌های BY-1 و OC824 به‌تنهایی یا در ترکیب با مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری به‌مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شدند. وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری از هر دو سویه (BY-1 و OC824) باعث کاهش قابل‌توجهی در سطح بیان ژن *Bax* (به‌ترتیب $P=0.008$ و $P=0.001$) در ۱۲ ساعت ($p=0.039$ و $p=0.028$ ، OC824 و BY-1) و ۲۴ ساعت ($p=0.001$ و $p=0.008$ ، OC824 و BY-1) در سلول‌های AGS شد. در مقابل، تیمار هم‌زمان وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری و مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری به‌طور قابل‌توجهی سطح بیان *Bax* را در زمان ۱۲ (BY-1 + مایع رویی $p=0.026$ و OC824 + مایع رویی $p=0.010$) و ۲۴ ساعت (BY-1 + مایع رویی $p=0.007$ و OC824 + مایع رویی $p=0.008$) افزایش داد (شکل ۴-۵).

شکل ۳- زنده‌مانی سلول‌های AGS با استفاده از آزمون MTT. سلول‌های AGS تحت تیمار (A): غلظت‌های مختلف وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و (B): مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری (۱۰٪، ۲۰٪، ۵٪، ۱۰٪، ۲۰٪، ۵۰٪) برای مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شدند؛ $p<0.05$ ، $p<0.01$ ، $p<0.001$ و $p<0.0001$.

5-5- تأثیر وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری و مایع رویی لاکتوباسیلوس گسری بر بیان ژن *Bax* در سلول‌های AGS

برای ارزیابی اثرهای وزیکول‌های خارج‌سلولی مشتق‌شده از هلیکوباکتر پیلوری (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری (۱۰ درصد حجمی/حجمی) بر سطح بیان ژن‌های مرتبط با

5-6- تحلیل بیان ژن‌های *cas3*، *cas8* و *cas9* در سلول‌های AGS تیمار شده با مایع رویی لاکتوباسیلوس گسری و وزیکول‌های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری

همان‌طور که در شکل B-4 مشاهده می‌شود، وزیکول‌های خارج سلولی از هر دو سویه هلیکوباکتر پیلوری BY-1 و OC824 به‌طور چشمگیری سطح بیان *cas3* را در ۱۲ ساعت ($P=0.038$ ، BY-1 و $P=0.020$ ، OC824) و ۲۴ ساعت ($P=0.018$ ، OC824 و $P=0.014$ ، BY-1) در مقایسه با سلول کنترل تیمار نشده کاهش دادند. این فرایند به‌طور قابل توجهی در سلول‌های AGS تحت تیمار با ترکیب وزیکول‌های خارج سلولی و مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری در ۱۲ ساعت (BY-1 + مایع رویی با $p=0.001$ و OC824 + مایع رویی با $p=0.004$)، و ۲۴ ساعت (BY-1 + مایع رویی با $p=0.019$ و OC824 + مایع رویی با $p=0.013$) افزایش یافت. علاوه بر این، وزیکول‌های خارج سلولی از هر دو سویه بیان *cas8* را در هر دو نقطه زمانی ۱۲ ساعت (BY-1 با $p=0.022$ و OC824 با $p=0.019$) و ۲۴ ساعت (BY-1 با $p=0.011$ و OC824 با $p=0.016$) کاهش داد، در حالی که ترکیب وزیکول‌های خارج سلولی و مایع رویی لاکتوباسیلوس گسری بیان *cas8* را در ۱۲ ساعت (BY-1 + مایع رویی با $p=0.001$ و OC824 + مایع رویی با $p=0.007$) و ۲۴ ساعت (BY-1 + مایع رویی با $p=0.002$ و OC824 + مایع رویی با $p=0.006$) افزایش داد (شکل C-4). به‌طور مشابه، وزیکول‌های خارج سلولی مشتق شده از هر دو سویه قادر به کاهش قابل توجه سطح بیان *cas9* در ۱۲ ساعت (BY-1 با $p=0.023$ و OC824 با $p=0.010$) و ۲۴ ساعت (BY-1 با $p=0.013$ و OC824 با $p=0.010$) نسبت به کنترل بدون تیمار شدند. ترکیب وزیکول‌های خارج سلولی و مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری منجر به افزایش بیان *cas9* در ۱۲ ساعت (BY-1 + مایع رویی با $p=0.017$ و OC824 + مایع رویی با $p=0.018$) و ۲۴ ساعت (BY-1 + مایع رویی با $p=0.012$ و OC824 + مایع رویی با $p=0.022$) شد (شکل D-4).

5-7- ارزیابی تغییرات بیان ژن آنتی آپوپتوز *bcl-2* در سلول‌های AGS تحت تیمار با وزیکول‌های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری و مایع رویی لاکتوباسیلوس گسری

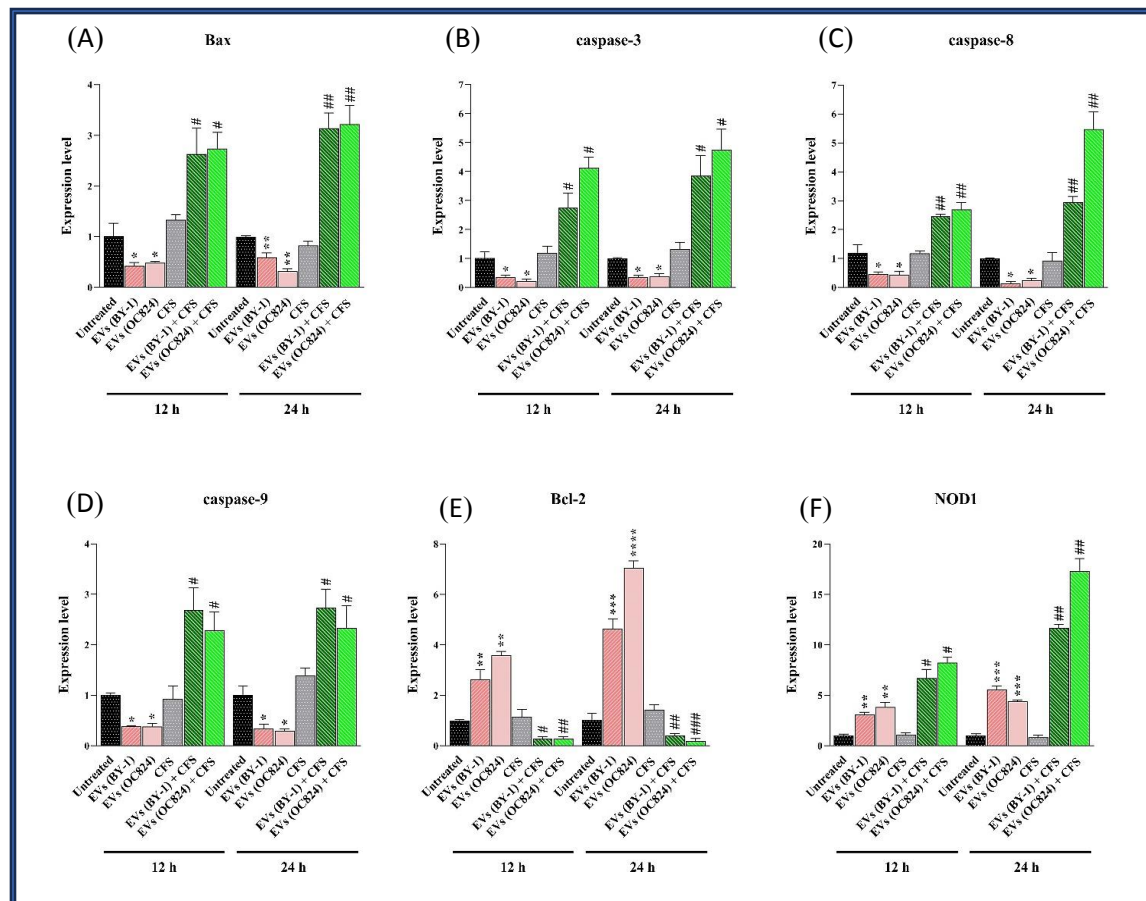
همان‌طور که در شکل E-4 نشان داده شده است هر

دو وزیکول خارج سلولی مشتق شده از هلیکوباکتر پیلوری بیان ژن *bcl2* را در سلول‌های AGS در هر دو زمان ۱۲ ساعت (BY-1 با $p=0.001$ و OC824 با $p=0.006$) و ۲۴ ساعت (BY-1 با $p=0.006$ و OC824 با $p=0.0001$) افزایش دادند.

افزایش بیان در نقطه زمانی ۲۴ ساعت نسبت به ۱۲ ساعت بارزتر بود. نتایج این پژوهش نشان دادند که مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری می‌تواند به‌طور قابل توجهی بیان ژن *bcl2* را در سلول‌های AGS معده در ۱۲ ساعت (BY-1 + مایع رویی با $p=0.013$ و OC824 + مایع رویی با $p=0.001$) و ۲۴ ساعت (BY-1 + مایع رویی با $p=0.004$ و OC824 + مایع رویی با $p=0.0009$) کاهش دهد.

5-8- بررسی تأثیر وزیکول‌های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری و مایع رویی لاکتوباسیلوس گسری بر بیان ژن گیرنده *nod1* در سلول‌های AGS

تیمار سلول‌های AGS با وزیکول‌های خارج سلولی از هر دو سویه هلیکوباکتر پیلوری (BY-1 و OC824) سطح بیان *nod1* را به‌طور قابل توجهی در ۱۲ ساعت (BY-1 با $p=0.005$ و OC824 با $p=0.001$) و ۲۴ ساعت (BY-1 با $p=0.001$ و OC824 با $p=0.003$) نسبت به گروه کنترل افزایش داد. در مقابل، سطح بیان *nod1* به‌طور قابل توجهی در سلول‌های AGS تحت تیمار با ترکیب وزیکول‌های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری و مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری پس از ۱۲ ساعت (BY-1 + مایع رویی با $p=0.030$ و OC824 + مایع رویی با $p=0.013$) و ۲۴ ساعت (BY-1 + مایع رویی با $p=0.003$ و OC824 + مایع رویی با $p=0.004$) نسبت به تیمار وزیکول‌های خارج سلولی به تنهایی افزایش یافت (شکل F-4).



شکل ۴- تجزیه و تحلیل RT-qPCR بیان نشانگرهای واسطه‌های آپوپتوز در سلول‌های AGS. بیان ژن (A) Bax، (B) caspase-3، (C) caspase-8، (D) caspase-9، (E) Bcl-2، (F) NOD1 در سلول‌های AGS پس از تیمار با وزیکول‌های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری (سویه‌های BY-1 و OC824، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ترکیبی از وزیکول‌ها و مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری (۱۰ درصد حجمی/حجمی) در ۱۲ و ۲۴ ساعت با روش RT-qPCR تعیین شد. داده‌های بیان ژن با β -اکتین (ACTB) به عنوان ژن مرجع، نرمال شد. *مقادیر p با استفاده از آنالیز آماری ANOVA یک طرفه در مقایسه با شاهد تیمار نشده معنادار و مقادیر p در مقایسه با وزیکول‌های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری معنادار در نظر گرفته شد.

۶- بحث

که برخی از فاکتورهای بیماری‌زای هلیکوباکتر پیلوری، مانند VacA، urease، CagA و LPS که وجود آن‌ها در وزیکول‌های خارج سلولی نیز تأیید شده است (۵)، می‌توانند در فرایند سلولی آپوپتوز اختلال ایجاد کنند. تجزیه و تحلیل محتوای پروتئینی وزیکول‌های خارج سلولی جدا شده از سویه‌های بالینی هلیکوباکتر پیلوری BY-1 و OC824 با استفاده از تکنیک SDS-PAGE نشان داد که این وزیکول‌ها شامل مجموعه‌ای از پروتئین‌ها هستند که بیانگر نقش مهم وزیکول‌ها در پاتوژن بیماری‌های معده باشد. آنالیزهای پروتئومیکس در مطالعه‌ای که توسط Yujie و همکاران انجام شد، نشان داد که پروتئین شوک حرارتی ۶۰ (HSP60) موجود در وزیکول‌های هلیکوباکتر پیلوری در تنظیم پاسخ ایمنی و آپوپتوز در سلول‌های میزبان نقش

آپوپتوز یک فرایند سلولی حیاتی است که نقش مهمی در پاتوژن انواع بیماری‌های عفونی ایفا می‌کند (۲۰). در این مطالعه، نشان داده شد که وزیکول‌های خارج سلولی جدا شده از دو سویه بالینی هلیکوباکتر پیلوری می‌توانند بر واسطه‌گرهای آپوپتوز تأثیر بگذارند و منجر به مهار آپوپتوز در سلول‌های AGS در شرایط *in-vitro* شوند. مطالعه‌های متعددی نشان داده‌اند که عفونت هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند منجر به مهار آپوپتوز در سلول‌های اپیتلیال معده شود (۲۱، ۲۲). اگرچه نقش دقیق عفونت هلیکوباکتر پیلوری در فرایند آپوپتوز سلول‌های میزبان هنوز به‌طور کامل شناسایی نشده است، مطالعه‌های متعدد نشان داده‌اند

دارد (۲۳). علاوه بر این، فاکتورهای بیماری‌زای CagA و VacA در وزیکول‌های هلیکوباکتر پیلوری، به تغییرهای مورفولوژیکی سلولی و التهاب از طریق القای سایتوکین‌های التهاب‌زا مانند $IL-6$ ، $IL-1\beta$ و $IL-8$ کمک می‌کنند و بر نقش کلیدی این وزیکول‌ها در پیشرفت بیماری تأکید می‌کنند (۲۴، ۵). در این مطالعه، نشان داده شد که تیمار سلول‌های AGS با وزیکول‌های خارج‌سلولی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند با کاهش بیان نشانگرهای *bax*، *cas3*، *cas8*، *cas9* و افزایش بیان *bcl2* و گیرنده *nod1* آپوپتوز را مهار کند. در مطالعه مشابه با نتایج مطالعه حاضر توسط Yarmohammadi و همکاران نیز نشان داده شد (۸) که سویه‌های بالینی مختلف هلیکوباکتر پیلوری توانسته‌اند سطوح *bcl-2* را در سلول‌های AGS افزایش دهند و آپوپتوز را مهار کنند. El-Shahat و همکاران نیز (۲۵) نشان داده‌اند که عفونت هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی سطوح *bcl-2* را در بافت‌های معده بیماران مبتلا به سرطان معده افزایش دهد. در مطالعه دیگری که توسط Kim و همکارانش انجام شد، مشخص گردید که عفونت هلیکوباکتر پیلوری باعث افزایش بیان سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2) در سلول‌های اپیتلیال معده می‌شود. افزایش COX-2 با سرکوب فعال‌سازی caspase‌هایی همچون *cas3*، که برای فرآیند آپوپتوز ضروری است، مانع از وقوع آپوپتوز می‌شود و به تداوم بقای هلیکوباکتر پیلوری کمک کرده و می‌تواند به التهاب مزمن و افزایش خطر بیماری‌های معده منجر شود (۲۶).

نتایج مطالعه حاضر افزایش قابل‌توجهی در بیان *nod1* در سلول‌های AGS تیمار شده با هلیکوباکتر پیلوری در هر دو زمان تیمار (۱۲ و ۲۴ ساعت) را نشان داد. این یافته اهمیت PRR سیتوزولی میزبان (NOD1) را در مهار آپوپتوز توسط وزیکول‌های خارج‌سلولی مشتق‌شده از هلیکوباکتر پیلوری در سلول‌های AGS نشان می‌دهد. به‌علاوه، این گیرنده‌ها می‌توانند در فرایندهای تهاجم، اتوفازی و تومورزایی نقش داشته باشند (۲۷). در مطالعه‌ای که توسط Yang و همکاران انجام شد (۴)، نشان داده شد که مواجهه مداوم با لیفات هلیکوباکتر پیلوری سبب مهار آپوپتوز در رده سلولی GES-1 می‌شود. این محققان پیشنهاد کردند که احتمالاً این فرایند سلولی از طریق گیرنده Nod1 و مسیر سیگنالینگ NF-kB/MAPK-ERK/FOXO4 مهار می‌شود و سبب تسهیل بقا و استقرار باکتری می‌شود. امروزه کارایی آنتی‌بیوتیک‌ها به‌دلیل افزایش شیوع

مقاومت هلیکوباکتر پیلوری به‌طور نگران‌کننده‌ای کاهش پیدا کرده است. لذا، ضرورت به‌کارگیری راهبردهای درمانی نوین و مکمل همچون استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند به ریشه‌کنی و درمان عفونت هلیکوباکتر پیلوری کمک نماید (۶). تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که استفاده از مکمل‌های پروبیوتیک برای درمان عفونت هلیکوباکتر پیلوری، چشم‌انداز بسیار امیدبخشی دارد. از آنجاکه پروبیوتیک‌ها گونه‌های میکروبی زنده هستند و توانایی ایجاد تأثیرهای محافظتی در برابر عفونت هلیکوباکتر پیلوری را دارند (۸، ۲۸). گونه‌ها و سویه‌های خاصی از پروبیوتیک‌ها از طریق مکانیسم‌های گوناگون، از جمله تقویت یکپارچگی لایه مخاطی، تنظیم عملکرد پاسخ ایمنی میزبان، ترشح متابولیت‌هایی با خواص ضد میکروبی، تحریک ترشح سایتوکاین‌های ضدالتهابی و کاهش استقرار هلیکوباکتر پیلوری، فعالیت ضد هلیکوباکتر پیلوری خود را اعمال می‌کنند (۲۹). لاکتوباسیلوس گسری یک کاندید پروبیوتیک و فلور نرمال دستگاه گوارش است که می‌تواند موجب فعالیت ضدالتهابی، مهار اتصال و رشد هلیکوباکتر پیلوری و کاهش بیان ژن‌های ویروالانس هلیکوباکتر پیلوری شود (۳۰). در مطالعاتی که در شرایط *in-vivo* انجام شده است نشان داده‌اند که مصرف ماست حاوی سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس گسری می‌تواند علائم سوءهاضمه را بهبود بخشد، التهاب مخاط معده را کاهش دهد و اثربخشی درمان سه‌گانه استاندارد را در بیماران مبتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری افزایش دهد (۳۱). علاوه بر این پروبیوتیک‌ها می‌توانند با تعدیل فرایند آپوپتوز در سلول‌های میزبان، فعالیت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را مختل کنند (۸). در پژوهش حاضر اثر محافظتی مایع رویی کشت به‌دست آمده از کشت سویه لاکتوباسیلوس گسری ATCC 33323 بر آپوپتوز مهار شده ناشی از وزیکول‌های خارج‌سلولی مشتق‌شده از هلیکوباکتر پیلوری در سلول AGS بررسی شد. نتایج تجزیه و تحلیل ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در سلول‌های AGS، القا شدن آپوپتوز به‌واسطه پروبیوتیک‌ها از طریق افزایش بیان نشانگرهای *bax*، *cas3*، *cas8* و *cas9* و کاهش بیان *bcl2* و گیرنده *nod1* را نشان داد. اخیراً در مطالعه‌ای که در شرایط *in-vitro* انجام شد، نشان داده شد که سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس گسری ATCC 33323 پتانسیل تعدیل بیان $IL-8$ ، β -catenin و *bcl-2* و زیرواحدهای اینترگرین $\alpha5\beta1$ را در سلول‌های AGS تیمار شده با سویه بالینی هلیکوباکتر پیلوری دارد که منجر

می‌تواند با اثرگذاری و تعدیل فرایند آپوپتوز مزایای درمانی بالقوه‌ای را فراهم نماید.

7- نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر دخالت بالقوه و زیکول‌های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری در مهار فرایند آپوپتوز در شرایط *in-vitro* را نشان داد. علاوه بر این، نتایج این مطالعه اثرهای تحریک‌کنندگی و محافظتی مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس گسری را بر تعدیل آپوپتوز در سلول‌های AGS نشان داد و بر پتانسیل پروبیوتیک‌ها در تنظیم آپوپتوز در زمینه عفونت هلیکوباکتر پیلوری تأکید می‌کند. باوجود این، تحقیق‌های بیشتر با استفاده از مدل‌های حیوانی مناسب برای بررسی عفونت هلیکوباکتر پیلوری و تأثیر وزیکول‌های خارج سلولی و همچنین تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس گسری بر فرایند آپوپتوز ضروری است. همچنین جهت شناسایی و بررسی نقش دقیق مواد فعال زیستی موجود در مایع رویی حاصل از کشت لاکتوباسیلوس گسری نیاز به انجام مطالعه‌های بیشتری دارد.

8- ملاحظات اخلاقی

ندارد

9- تشکر و قدردانی

نویسندگان از مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از غذا و آب واقع در پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تشکر می‌کنند. همچنین از گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران صمیمانه تشکر می‌نماید.

10- تعارض منافع

ندارد.

به القای آپوپتوز و مهار التهاب در معده می‌گردد (۸). Russo و همکاران (۳۲)، نشان دادند که لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG باعث افزایش قابل‌توجهی در نسبت *bax/bcl-2* mRNA در سلول‌های سرطان معده انسان HGC-27 می‌شود که نشان‌دهنده فعالیت پروآپوپتوتیک این پروبیوتیک است و می‌تواند متعاقباً منجر به القای آپوپتوز گردد. در مطالعه دیگری که در شرایط *in-vivo* انجام گرفت، نشان داده شد که تیمار خوک‌ها با لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG در طی گاستروانتریت ویروسی، سبب القای آپوپتوز شده و تا حدی از بافت روده در برابر آسیب‌های ناشی از ویروس محافظت کرده است (۳۳). مشابه نتایج ما در مطالعه Lai و همکارانش که نشان دادند دو نوع پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG و بیفیدوباکتریوم لانگوم ATCC 15697، با افزایش بیان ژن *nod2* می‌توانند باعث حذف باکتری پاتوژن سالمونلا تیفی موریوم از سلول‌های Caco-2 شوند. علاوه بر این، این پروبیوتیک‌ها موجب کاهش بیان ژن *IL-1β* ناشی از سالمونلا می‌شوند و از التهاب جلوگیری می‌کنند (۳۴).

مکانیسم احتمالی اثرگذاری پروبیوتیک‌ها، از جمله گونه‌های لاکتوباسیلوس را می‌توان به ترکیبات فعال زیستی موجود در مایع رویی کشت آن‌ها نسبت داد. این ترکیبات، که می‌توانند شامل اسیدهای آلی، باکتریوسین‌ها و سایر متابولیت‌های ثانویه باشند، قادرند با تعدیل فرآیندهای سلولی مانند آپوپتوز و پاسخ‌های التهابی، اثرهای محافظتی و درمانی خود را اعمال کنند (۳۵). از جمله این ترکیبات فعال زیستی می‌توان اسید لاکتیک، اسید استیک و اسید فنیل-لاکتیک، همراه با باکتریوسین‌هایی مانند لاکتاسین B و اسیدوفیلین، اشاره کرد که خواص ضد میکروبی را در برابر باکتری‌های مسبب بیماری نشان می‌دهند (۳۵). وجود چنین مواد فعال عملکردی در مایع رویی کشت باکتری

۱۱- منابع

1. Huang Y, Wang Q-l, Cheng D-d, Xu W-t, Lu N-h. Adhesion and invasion of gastric mucosa epithelial cells by *Helicobacter pylori*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2016;6:159.
2. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *Journal of cell science*. 1994;107(12):3569-77.
3. Praszkie J, Sutton P, Ferrero RL. Virulence mechanisms of *Helicobacter pylori*: an overview. *Helicobacter pylori research: from bench to bedside*. 2016:57-87.
4. He Y, Wang C, Zhang X, Lu X, Xing J, Lv J, et al. Sustained Exposure to *Helicobacter pylori* Lysate Inhibits Apoptosis and Autophagy of Gastric Epithelial Cells. *Front Oncol*. 2020;10:581364.
5. González MF, Diaz P, Sandoval-Bórquez A, Herrera D, Quest AF. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles and extracellular vesicles from *Helicobacter pylori*-infected cells in gastric disease development. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):4823.
6. Malfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, Gisbert JP, Liou J-M, Schulz C, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*. 2022;71(9):1724-62.
7. Zhou BG, Chen LX, Li B, Wan LY, Ai YW. *Saccharomyces boulardii* as an adjuvant therapy for *Helicobacter pylori* eradication: A systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis. *Helicobacter*. 2019;24(5):e12651.
8. Yarmohammadi M, Yadegar A, Ebrahimi MT, Zali MR. Effects of a Potential Probiotic Strain *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 on *Helicobacter pylori*-Induced Inflammatory Response and Gene Expression in Coinfected Gastric Epithelial Cells. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2021;13(3):751-64.
9. Chobdar N, Ahmadizadeh C. The effect of *Lactobacillus brevis* on Apoptosis and casp (casp8, casp3) gene Expression in HeLa Cancer Cells. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2020;14(1):84-100.
10. Nabavi-Rad A, Jamshidizadeh S, Azizi M, Yadegar A, Robinson K, Monaghan TM, Zali MR. The synergistic effect of *Levilactobacillus brevis* IBRC-M10790 and vitamin D3 on *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1171469.
11. Yadegar A, Mohabati Mobarez A, Zali MR. Genetic diversity and amino acid sequence polymorphism in *Helicobacter pylori* CagL hypervariable motif and its association with virulence markers and gastroduodenal diseases. *Cancer Med*. 2019;8(4):1619-32.
12. Yadegar A, Mobarez AM, Alebouyeh M, Mirzaei T, Kwok T, Zali MR. Clinical relevance of cagL gene and virulence genotypes with disease outcomes in a *Helicobacter pylori* infected population from Iran. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014;30(9):2481-90.
13. Shelke GV, Lässer C, Gho YS, Lötval J. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *Journal of extracellular vesicles*. 2014;3(1):24783.
14. Chhoy P, Brown CW, Amante JJ, Mercurio AM. Protocol for the separation of extracellular vesicles by ultracentrifugation from in vitro cell culture models. *STAR protocols*. 2021;2(1):100303.
15. Bolori S, Shegefti S, Baghaei K, Yadegar A, Moon KM, Foster LJ, et al. The Effects of *Helicobacter pylori*-Derived Outer Membrane Vesicles on Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis In Vitro. *Biomed Res Int*. 2023;2023:4848643.
16. Yarmohammadi M, Yadegar A, Ebrahimi MT, Zali MR. Effects of a potential probiotic strain *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 on *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response and gene expression in coinfected gastric epithelial cells. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2021;13(3):751-64.
17. Ouyang Z, Yang B, Yi J, Zhu S, Lu S, Liu Y, et al. Exposure to Fluoride induces apoptosis in liver of ducks by regulating Cyt-C/Caspase 3/9 signaling pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021;224:112662.
18. Aghababazadeh M, Dorrahi N, Javan FA, Fattahi AS, Gharib M, Pasdar A. Downregulation of Caspase 8 in a group of Iranian breast cancer patients—A pilot study. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 2017;29(4):191-5.
19. Kim JG, Lee SJ, Kagnoff MF. Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infection and immunity*. 2004;72(3):1487-95.
20. Gao L-Y, Kwaik YA. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends in microbiology*. 2000;8(7):306-13.
21. Posselt G, Wiesauer M, Chichirau BE, Engler D, Krisch LM, Gadermaier G, et al. *Helicobacter pylori*-controlled c-Abl localization promotes cell migration and limits apoptosis. *Cell Communication and Signaling*. 2019;17:1-15.
22. Wan X-K, Yuan S-L, Wang Y-C, Tao H-X, Jiang W, Guan Z-Y, et al. *Helicobacter pylori* inhibits the cleavage of TRAF1 via a CagA-dependent mechanism. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(48):10566.
23. Li Y, Cao H, Qiu D, Wang N, Wang Y, Wen T, et al. The proteomics analysis of extracellular vesicles revealed the possible function of heat shock protein 60 in *Helicobacter pylori* infection. *Cancer Cell International*. 2023;23(1):272.

24. Choi H-I, Choi J-P, Seo J, Kim BJ, Rho M, Han JK, Kim JG. Helicobacter pylori-derived extracellular vesicles increased in the gastric juices of gastric adenocarcinoma patients and induced inflammation mainly via specific targeting of gastric epithelial cells. *Experimental & Molecular Medicine*. 2017;49(5):e330-e.
25. El-Shahat M, El-Masry S, Lotfy M, El-Meghawry El-Kenawy A, Nasif WA. Relationship of Helicobacter pylori to Bcl-2 family expression, DNA content, and pathological characteristics of gastric cancer. *International Journal of Gastrointestinal Cancer*. 2005;36:61-8.
26. Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY. Upregulated cyclooxygenase-2 inhibits apoptosis of human gastric epithelial cells infected with Helicobacter pylori. *Digestive diseases and sciences*. 2000;45:2436-43.
27. Sadeghloo Z, Saffarian P, Hakemi-Vala M, Sadeghi A, Yadegar A. The modulatory effect of Lactobacillus gasseri ATCC 33323 on autophagy induced by extracellular vesicles of Helicobacter pylori in gastric epithelial cells in vitro. *Microbial Pathogenesis*. 2024;188:106559.
28. Nabavi-Rad A, Sadeghi A, Asadzadeh Aghdaei H, Yadegar A, Smith SM, Zali MR. The double-edged sword of probiotic supplementation on gut microbiota structure in Helicobacter pylori management. *Gut Microbes*. 2022;14(1):2108655.
29. Wang Y, Wang X, Cao X-Y, Zhu H-L, Miao L. Comparative effectiveness of different probiotics supplements for triple helicobacter pylori eradication: a network meta-analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023;13:530.
30. Chen Y-H, Tsai W-H, Wu H-Y, Chen C-Y, Yeh W-L, Chen Y-H, et al. Probiotic Lactobacillus spp. act against Helicobacter pylori-induced inflammation. *Journal of clinical medicine*. 2019;8(1):90.
31. Takagi A, Yanagi H, Ozawa H, Uemura N, Nakajima S, Inoue K, et al. Effects of Lactobacillus gasseri OLL2716 on Helicobacter pylori-associated dyspepsia: a multicenter randomized double-blind controlled trial. *Gastroenterology Research and Practice*. 2016;2016.
32. Russo F, Orlando A, Linsalata M, Cavallini A, Messa C. Effects of Lactobacillus rhamnosus GG on the cell growth and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric cancer cells. *Nutrition and cancer*. 2007;59(1):106-14.
33. Wu S, Yuan L, Zhang Y, Liu F, Li G, Wen K, et al. Probiotic Lactobacillus rhamnosus GG mono-association suppresses human rotavirus-induced autophagy in the gnotobiotic piglet intestine. *Gut pathogens*. 2013;5(1):1-8.
34. Lai W-T, Huang F-C. Probiotics exert reciprocal effects on autophagy and interleukin-1 β expression in Salmonella-infected intestinal epithelial cells via autophagy-related 16L1 protein. *Beneficial microbes*. 2019;10(8):913-22.
35. Sornsenee P, Chatatikun M, Mitsuwan W, Kongpol K, Kooltheat N, Sohbenalee S, et al. Lyophilized cell-free supernatants of Lactobacillus isolates exhibited antibiofilm, antioxidant, and reduces nitric oxide activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *PeerJ*. 2021;9:e12586.