تأثیر *Akkermansia muciniphila* و وزیکول‌های غشای خارجی حاصل از آن بر بیان microRNA های دخیل در بلوغ سلول‌های دندریتیک انسانی مشتق از مونوسیت

لعیا ذوقی‌مفرد[۱]، ابوالفضل فاتح[۲]، فتاح ستوده‌نژاد نعمت الهی[۱]، داریوش نوروزیان شام‌اسبی[۳]، **سید داور سیادت[۴]***

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوریهای همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲]گروه میکروب شناسی، بخش سل و تحقیقات ریوی، مرکز تحقیقات میکروبشناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۳]بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی، انستیتوپاستور، تهران، ایران
[۴]مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۳

چکیده

باکتری ***Akkermansia muciniphila***، یکی از اعضای مهم میکروبیوتای دستگاه گوارش است که بر عملکرد سیستم ایمنی میزبان نقش دارد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تاثیر *A. muciniphila* و OMVهای آن بر بیان miR-21 و miR-34a دخیل در بلوغ سلول‌های دندرتیک انسانی بود. برای این منظور، باکتری *A.muciniphila* برروی یک محیط حاوی موسین کشت داده شد و OMVs آن توسط اولتراسانتریفیوژ استخراج شد. استخراج سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs)، با استفاده از محلول فایلکول انجام شد. سلول‌های مونوسیت در حضور سایتوکین‌های اینترلوکین۴ و فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت- مونوسیت به سلول‌های دندریتیک، تمایز داده شدند سلول‌های تمایز داده شده، با *A. muciniphila* (MOI۱۰۰، MOI ۵۰)، OMVs (۵۰µg/µl)، دگزامتازون (جهت القای سلول‌های دندریتیک تولرژنیک (Tol-DC)) و LPS اشرشیاکلی (جهت القای سلول‌های دندریتیک بالغ (mature)) تیمار شدند. در نهایت، بیان microRNA-21 و microRNA-34a بروش real-time PCR اندازه گیری شد. خصوصیات مورفولوژیکی OMVs های استخراج شده نشان داد که سایز آنها بین ۲۰۰ nm-۲۰ بود. در تیمار LPS نسبت به گروه‌های دگزامتازون، *A.muciniphila*، OMV ها زوائد سیتوپلاسمی بلندتری وجود داشت. بیان microRNA-21 در گروه LPS نسبت به گروه‌های دگزامتازون، *A.muciniphila* و OMV کاهش داشت. اما این کاهش معنی‌دار نبود($P>0.05$). به علاوه، بیان microRNA-34a نیز در گروه LPS افزایش معنی‌داری داشت که تیمار با دگزامتازون، *A.muciniphila* و OMV این اثر را معکوس کرد($P<0.001$). بر طبق نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، MiR-21 و miR-34a می‌توانند عملکرد ضد التهابی و التهابی از خود بروز دهند. به نظر می رسد *A.muciniphila* و OMVs حاصل از آن گزینه مناسبی برای معرفی به‌عنوان پروبیوتیک نسل جدید می‌باشند.

واژگان کلیدی: سلول‌های دندریتیک انسانی، پروبیوتیک، التهاب، RNA غیرکدکننده کوچک

* Siadat@pasteur.ac.ir

مقدمه

هزاران میکروب در دستگاه گوارش انسان وجود دارد. این جامعه میکروبی از طریق فعالیت‌های متابولیکی جمعی، بر میزبان تأثیرگذار هستند(۱). میکروب‌های موجود در روده که میکروبیوتای روده نامیده می‌شوند، مجموعه‌ای از باکتری ها، آرکی‌ها و یوکاریوت‌ها هستند که عمدتا رابطهٔ متقابل و سودمندی با انسان برقرار کرده اند(۲). علاوه بر روده، دستگاه گوارش انسان حاوی جمعیت پویایی از میکرو ب‌ها است که بیشتر آن‌ها مفید و برخی از آن‌ها خطرناک هستند. میزان میکروارگانیسم‌های ساکن در دستگاه گوارش انسان بیش از ۱۰۱۴ تخمین زده شده است (۳, ۴). میکروبیوتای دستگاه گوارش با سلامت دستگاه گوارش، فعال کردن سیستم ایمنی و تولید مواد مغذی و ویتامین‌ها، تحریک و توسعه ایمنی، پردازش مواد غذایی، کنترل بیماری‌های متابولیک در ارتباط هستند. این میکروبیوتا با افزایش تولید منوساکاریدها، افزایش ظرفیت متابولیک میزبان برای پردازش مواد غذایی و دارو، تنظیم مسیرهای سیگنالینگ مختلف در اندام‌ها و نقش حفاظتی در مقابل پاتوژن‌ها مرتبط هستند(۵) .همچنین، نقش مهمی در تنظیم سلامت انسان و بیماری‌هایی مانند چاقی، سرطان، دیابت و بیماری التهابی روده دارد(۶). میکروبیوتا مزایای زیادی برای انسان دارد و حتی مشخص شده است در پیشگیری بسیاری از بیماری‌های روده‌ای و حتی غیر روده ای نقش دارد. با توجه به وجود گیرنده‌های فراوان و مختلف برای میکروب‌ها در روده، میکروبیوتای روده نقش مهمی در تقویت سیستم ایمنی ایفا می‌کند(۷). امروزه مطالعات حاکی از تاثیر کلیدی میکروبیوتای دستگاه گوارش در تنظیم عملکرد سیستم ایمنی می‌باشد(۸). سیستم ایمنی ذاتی به‌عنوان اولین خط دفاعی میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا، نقش اصلی را ایفا می‌کند و اجزای اصلی پاسخ‌های ایمنی ذاتی گیرنده های تشخیص دهنده الگو (PRRs) و پپتیدهای ضد میکروبی را شامل می‌شود که PRRs[1]ها شامل گیرنده‌های شبه تول (TLRs[2])و گیرنده‌های شبه نود (NLRs[3]) می‌باشند(۹). این گیرنده‌ها لیگاند های حاصل از باکتری‌ها، ویروس‌ها، انگل ها یا لیگاندهای حاصل از سلول‌های خودی را تشخیص می دهند. پس از تشخیص الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن (PAMP[4] ها)، TLR ها آبشارهای سیگنالینگ در پایین دست را فعال می‌کنند(۱۰) که در نهایت باعث ایجاد پاسخ‌های رونویسی و شروع پاسخ ایمنی ذاتی می‌شوند. این پاسخ‌ها فعال‌سازی ماکروفاژها و القاء تولید پپتیدهای ضد میکروبی و همچنین ایمنی اکتسابی که شامل القاء پاسخ‌های سلول‌های T و بلوغ سلول‌های دندرتیک را شامل می‌شوند(۱۱).

ایمنی اکتسابی دومین خط دفاعی در برابر پاتوژن‌ها را تشکیل می‌دهد. این سیستم دفاعی توسط لنفوسیت‌های T و Bاز طریق گیرنده‌های خاص هدایت می‌شود(۱۲). پاسخ‌های ایمنی ذاتی و تطبیقی توسط دندرتیک سل‌ها (DC یا Dendritic Cells) با هم در ارتباط می‌باشند(۱۳). سلول‌های دندریتیک مهم ترین سلول‌های پردازش کننده‌ی آنتی‌ژن می باشند که نقش مهمی در شروع پاسخ‌های ایمنی دارند. سلول‌های دندرتیک دارای انواع گوناگونی می‌باشند و سایتوکاین‌ها و پاسخ‌های ایمنی متنوعی را ایجاد می کنند(۱۴).

در انسان این سلول‌ها شامل سلول‌های دندرتیک میلوئیدی، سلول‌های دندرتیک تولید شده از منوسیت‌ها و سلول‌های دندرتیک پلاسماسیتوئید می‌باشند(۱۵). سلول‌های دنـدریتیک قدرتمندترین سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن به سلول‌های T بکر می‌باشند. این سلول‌ها می‌توانند سبب ایجاد تحمل ایمنی و یا القاء پاسخ‌های ایمنی شوند(۱۶). بسته به زیر رده‌های سلول‌های دندرتیک، میزان بلوغ آنها و محیط سایتوکاینی عرضه آنتی‌ژن، این سلول‌ها می‌توانند سبب ایجاد تحمل ایمنی یا القا پاسخ‌های ایمنی شوند(۱۷). میکروبیوتا به‌عنوان یک فاکتور محیطی نیز نقش کلیدی در تنظیم اپی‌ژنتیک میزبان دارد. کنترل فرایند اپی‌ژنتیک، مربوط به متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی، تغییر وضعیت کروماتینی و microRNA (miRNAs)ها می‌باشد(۱۸). فاکتور مهم که در عملکرد دندرتیک سل‌ها دخالت دارد،

[1] Pattern-recognition receptors
[2] Toll-like receptors
[3] Nod-like receptors
[4] Pathogen-associated molecular patterns

miRNAs می‌باشند. این مولکول‌ها RNA های کوچک ۱۹ تا ۲۳ نوکلئوتید و غیر کد کننده هستند. اختلال در بیان آنها می‌تواند منجر به بیماری‌های جداگانه هر کدام از سیستم‌های ایمنی و اعصاب باشند(۱۹). میکروبیوتای دستگاه گوارش با تنظیم miRNAs های میزبان در حفظ سد دفاعی و جلوگیری از پاسخ‌های التهابی نامناسب نقش دارند و همچنین میکروبیوتا بروی دندرتیک سل‌ها نیز تاثیر می‌گذارند و دندرتیک تولروژن[1] و یا تحمل‌زا را ایجاد می‌کند(۲۰). در طول دو دهه گذشته، miRNA ها به‌عنوان تنظیم کننده‌های کلیدی تمایز سلول‌های ایمنی بدن، حفظ هموستاز و عملکرد طبیعی ایمنی بدن در نظر گرفته شده‌اند(۲۱). یک دهه قبل باکتری *Akkermansia muciniphila* به‌عنوان یک میکروب داخل روده‌ای انسان شناسایی شده است که متعلق به شاخه Verrucomicrobia است و ۵-۳ درصد از جامعه میکروبی دستگاه گوارش را تشکیل می‌دهد(۲۲). باکتری *A. muciniphila*، باکتری گرم منفی، غیر متحرک، بی‌هوازی مطلق و فاقد اسپور است. نقش‌های سلامت بخش متعددی برای این باکتری شناسایی شده است(۲۳). برای مثال مشخص شده که کاهش فراوانی باکتری *A. muciniphila* با افزایش ریسک سندروم متابولیک در ارتباط است(۲۴). اثرضد دیابتی و شبه انسولینی و کاهش سایتوکاین‌های التهابی از دیگر اثرات مفید نسبت داده شده به باکتری *A. muciniphila* است(۲۵). مطالعات اخیر بیانگر این است که یکی از استراتژی‌های مورد استفاده برای این باکتری در تعامل با میزبان تولید وزیکول‌های غشاء خارجی (OMV)[2] است. OMV از غشا خارجی باکتری‌های گرم منفی است و در واقع هر آن چیزی که در غشا خارجی باکتری‌ها است در این وزیکول‌ها هم یافت می‌شود(۲۶). اندازه این وزیکول‌ها ۲۵۰-۲۰ nm است. در نتیجه ساختار نانویی دارند و برای همین قدرت نفوذ به نقاط دورتر را دارند. OMV برای باکتری‌ها نقش‌هایی از جمله تغذیه، بقا، تعامل باکتری‌ها با هم و نیزدر پاتوژنز و سیگنالینگ نقش موثر دارند(۲۷, ۲۸). امروزه به‌عنوان سیستم‌های ترشحی جدید از آنها نام می‌برند.

این وزیکول‌های آزاد شده از غشاء باکتری، غالبا شامل ترکیباتی مانند LPS، پپتیدها، مولکول های چسبنده و توکسین‌ها و عوامل حدت‌زا و حتی اسیدنوکلئیک می‌باشند. این موضوع امکان نقش تنظیمی این نانوذرات را در اپی‌ژنوم میزبان بیان می‌کند(۲۹, ۳۰). با توجه به اهمیت باکتری *A. muciniphila* به‌عنوان عضو موثری از میکروبیوتای دستگاه گوارش و OMV های حاصل از آن در تنظیم عملکرد میزبان از جمله سیستم ایمنی و نقش کلیدی دندرتیک سل‌ها در تنظیم پاسخ التهابی و ضد التهابی، هدف از این مطالعه بررسی تاثیر باکتری مذکور و OMV های حاصل از آن بر بیان miR-21 و miR-34a دخیل در مسیرهای التهابی و ضد التهابی در سلول‌های دندرتیک بالغ جدا شده از سلول‌های Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) انسانی است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی A. muciniphila

سویه باکتری Akkermansia muciniphila MucT (ATCC BAA-835) از موسسه DSMZ (مجموعه میکروارگانیسم‌ها و کشت سلولی آلمان) خریداری شد. این باکتری در محیطی حاوی موسین در شرایط بی‌هوازی (85% N2, 10% CO2, 5% H2) در دمای ۳۷ °C به مدت ۷-۳ روز کشت داده شد. پس از رشد، باکتری در محیط brain heart infusion براث (Quelab، کانادا) حاوی ۰٫۵٪ موسین (Sigma-Aldrich) با تکان دادن ملایم (۱۵۰ rpm) تحت شرایط فوق به مدت ۴۸ h انکوبه شد تا زمانی که OD600، ۱ به دست آمد. برای جداسازی سوپرناتانت از پلت های باکتریایی، سلول‌های باکتریایی با دور ۱۱۰۰۰ g به مدت min ۲۰ در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند و دو بار با سالین بافر فسفات (PBS) شسته شدند. مایع رویی باقی مانده برای استخراج وزیکول های غشای خارجی (Outer membrane vesicles) استفاده شد. سوسپانسیون *A. muciniphila* بلافاصله روی یخ قرار داده شد و سپس برای کشت سلولی استفاده شد.

[1] Tolerogen

[2] Outer Membrane Vesicles

استخراج وزیکول های غشای خارجی (OMVs)

OMV ها همانطور که قبلا توضیح داده شده است استخراج شدند. به طور خلاصه، پس از کشت یک شبانه روز، محیط در دمای ۴ °C و با دور ۶۰۰۰ g به مدت ۲۰ min سانتریفیوژ شد. سپس از اولتراسانتریفیوژ برای استخراج OMVs های سوپرناتانت در دور ۱۳۰۰۰۰ g به مدت ۲ h استفاده شد. در مرحله بعدی، سوپرناتانت خارج شد و پلت باکتریایی دو بار با محلول بافر فسفات (PBS) شسته شدند و مجددا با استفاده از اولتراسانتریفیوژ در دور ۱۳۰۰۰۰ g به مدت ۲ h سانتریفیوژ شدند. در نهایت، OMV ها در دمای ۲۰ °C- ذخیره شدند. با استفاده از نانو دراپ و روش SDS-PAGE به ترتیب غلظت پروتئینی و پروفایل باندهای پروتئینی این وزیکول‌ها بررسی شد. به علاوه، برای بررسی سایز و مورفولوژی این وزیکول‌ها از میکروسکوپ الکترونی TEM استفاده شد که پس از فیکس کردن نمونه‌ها با گلوتارآلدهید ۲٫۵٪ و پارافرمالدهید ۲٪ انجام شد.

جداسازی PBMC

برای استخراج سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs)، بافی کوت ۳ داوطلب بالغ سالم از سازمان انتقال خون ایران (IBTO) (تهران، ایران) تهیه شد. نمونه‌گیری پس از امضای فرم رضایت آگاهانه تایید شده توسط کمیته اخلاق از افراد انجام شد. جهت جداسازی سلول‌های PBMC به cc ۵ خون محیطی مقدار EDTA ۲ µl اضافه شد. سپس، برای رقیق‌سازی خون ۵ ml از PBS اضافه شد. سپس در فالکون ۱۵ ml مقدار ۵ ml از محلول فایکول ریخته شد و خون رقیق شده کم کم به دیواره لوله فالکون حاوی فایکول اضافه شد تا خون در قسمت رویی محیط فایکول قرار بگیرد. پس از آن لوله فالکون حاوی خون در دمای ۲۵ °C با سرعت ۴۰۰ g و به مدت ۳۰ min سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ در لوله ۴ فاز تشکیل شد که از پایین به بالا شامل گلبول‌های قرمز، سلول‌هایی با هسته های چندشکل مانند نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها، سلول‌های PBMC و سرم می‌باشد. سپس، برای برداشتن سلول‌های PBMC که به‌صورت یک لایه سفید رنگ می‌باشد، سرم را با احتیاط از محیط رویی خارج شد. به‌این ترتیب، لایه سفید رنگ را به همراه کمی سرم کشیده و به فالکون ۱۰ ml به همراه ۵ ml از محیط RPMI (Gibco, USA)انتقال دادیم. سپس، فالکون را در دمای ۴ °C با سرعت ۴۰۰ g به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ کرده و پس از سانتریفیوژ محلول دو فاز تشکیل می‌دهد. فاز زیرین شامل سلول‌های PBMC است که به صورت یک لایه رسوب سفید رنگ انتهای لوله ته نشین شده‌اند و فاز رویی حاوی سلول‌ها و فایکول اضافی می‌باشد که لایه رویی را خارج کرده و رسوب سلولی را در ۵ ml از محیط RPMI حل شد. تعداد و میزان زنده بودن سلول‌های تک هسته ای خون محیطی به دست آمده با استفاده از رنگ تریپان بلو تعیین شدند.

تولید و تحریک سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت انسانی

برای تولید سلول‌های دندریتیک مورد نظر، سلول‌های PBMC استفاده شدند. سلول‌های PBMC به تعداد cell/ml ۶×۱۰^{۶} و به مقدار ۵ ml در هر فلاسک کشت T25 در محیط کشت RPM1-1640 حاوی پنی سیلین (U/mL ۱۰۰۰)، استرپتومایسین (g/mL ۱۰۰) و FBS (۱۰ %) به مدت ۲ h در شرایط دمای ۳۷ °C و CO2 (۵٪) و رطوبت (۹۰٪) انکوبه شد. بعد از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌هایی که به فلاسک نچسبیده بودند با دو بار شستشوی آرام توسط محیط کشت RPMI جدا شده و دور ریخته شدند. در مورد PBMC، به سلول‌های چسبنده که اکثریت آنها را منوسیت‌ها تشکیل می دادند، ۴ ml محیط‌کشت جدید به‌علاوه‌ی GM-CSF (IU/mL ۱۰۰۰) و IL-4 (۴۰۰ IU/ml) اضافه شد و به مدت ۵ روز کشت داده شد. هر روز تا پایان روز پنجم، از فلاسک‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس عکس‌برداری شد. در روز سوم و چهارم مجددا مقادیر مشابهی از GM-CSF (IU/mL ۱۰۰۰) و IL-4 (۴۰۰ IU/ml) به فلاسک ها افزوده شد. تمایز سلول‌هایPBMC به سلول‌های دندرتیک با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری بررسی شد. پس از ۵ روز، سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت، در پلیت‌های ۱۲ چاهکی (cell/ml ۱۰۸ × ۸ در حجم µl ۱۰۰۰) کشت داده

شدند و با *A. muciniphila* (MOI۱۰۰، MOI ۵۰) ، OMVs (۵۰µg/µl) ، دگزامتازون (جهت القای سلول‌های دندریتیک تولرژنیک (Tol-DC)) و LPS اشرشیاکلی (جهت القای سلول‌های دندریتیک بالغ (mature)) به مدت ۶ ساعت تیمار شدند.

استخراج RNA کل

برای استخراج RNA از سلول‌های کشت داده شده، کیت شرکت آناسل (ایران. تهران)استفاده شد. به طور خلاصه، به رسوب سلولی ۸۰۰ µl بافر لیزات افزوده شد. پس از ورتکس، ۳۰۰ µl کلوروفرم اضافه شد و ۱۵ s ورتکس انجام شد. پس از انکوباسیون ۵ دقیقه‌ای در دمای اتاق، در دمای ۴ °C با دور ۱۲۰۰۰ rpm نیز به مدت ۵ min سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاصل به میکروتیوب جدید منتقل شد و ۳۰۰ µl محلول رسوب اضافه شد و به مدت ۶۰ s ورتکس انجام شد. محتویات میکروتیوب به ستون‌های مخصوص انتقال داده شد. سپس، ۷۰۰ µl بافر شست وشوی A اضافه شد و در دمای اتاق با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۹۰ s سانتریفیوژ شد. پس از خالی کردن زیرستون، مجددا بافر شست و شوی B به مدت ۳۰ s با همان دور سانتریفیوژ شد. پس از افزودن ۴۰ µl بافر رهاسازی، ستون‌ها به مدت ۳ min در دمای ۶۵ °C قرار گرفتند. سپس به مدت ۲ min در دمای اتاق با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوز شدند. برای بررسی کیفیت RNA های استخراج شده از دستگاه نانودراپ و برای بررسی integrity RNA نیز از الکتروفورز استفاده شد.

سنتز cDNA اختصاصی

برای سنتز cDNA اختصاصی از کیت شرکت اناسل (ایران. تهران) استفاده شد. به طور خلاصه، به ازای هرنمونه مورد بررسی دو میکروتیوب استفاده شد و در هر میکروتیوب ۱ µg از RNA تخلیص شده ریخته شد. به یکی از میکروتیوب‌ها ۱,۵ µl از پرایمر RT-stem loop ۱ pmol miRNA (microRNA-21 و microRNA-34) و به دیگری ۱,۵ µl از پرایمر RT-stem loop house keeping ۱ pmol (U6) اضافه شد. محتوای میکروتیوپ‌ها با استفاده از آب استریل به حجم ۱۴,۵ µl رسانده شد. سپس، به مدت min ۵۰ در دمای ۷۰ °C قرار داده شدند. سپس، ۴ µl 5x RT reaction buffer، ۱ µl dNTP، ۰,۵ µl آنزیم RT افزوده، و به حجم ۲۰ µl رسانده شد و میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکر قرار داده شد (۳۷ °C، ۶۰ min و ۷۰ °C و ۵ min). U6 به‌عنوان housekeeping gene استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رونویسی معکوس کمی (RT-qPCR)

QRT-PCR به‌صورت دوپلیکیت با حجم ۲۰ µl با استفاده از Q-Master Mix SYBR Green I (2X) (Ampliqon، دانمارک) و در دستگاه LightCycler® 96 SW 1.1. انجام شد. به‌طور خلاصه برای microRNA ها حجم واکنش به صورت cDNA ۱ µl، Q-Master Mix SYBR Green I (2X) ۱۰ µl ، microRNA-specific forward primer (10µM) ۱ µl، microRNA-specific Reverse primer ۱ µl ، و ۷ µl آب دیونایز استریل می‌باشد و برای U6 نیز حجم واکنش به همین صورت به‌طور جداگانه با پرایمرهای مختص آن انجام شد. شرایط دمایی واکنش Real-time PCR: ۱ سیکل، ۱۵ min در ۹۵ °C، ۳۵-۴۰ سیکل، ۱۵ s-۳۰ درد مای ۹۵ °C و ۶۰ s در دمای ۵۵ °C-۶۰ ، ۱ سیکل انالیز منحنی ذوب در دمای ۵۵ °C-۹۵ بود.

آزمون آماری

نتایج بیان ژن به صورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است. از آزمون One-way ANOVA برای مقایسه اختلاف بین گروه‌ها استفاده شد. همه محاسبات آماری به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. سطح معناداری نتایج p <0.05 درنظرگرفته شد.

نتایج

خصوصیات OMVs جدا شده از *A. muciniphila*

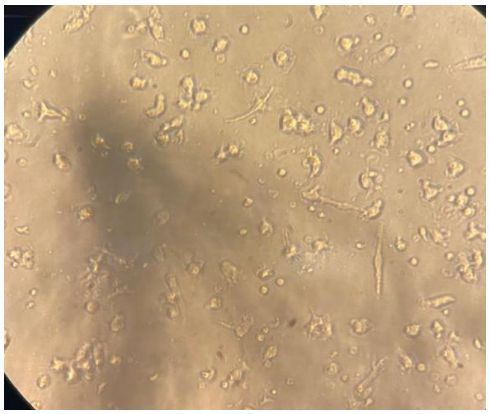
برای بررسی خصوصیات مورفولوژیکی OMVs های استخراج شده از TEM استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که سایز آن‌ها بین ۲۰ nm تا ۲۰۰ می‌باشد.

بررسی SDS-PAGE

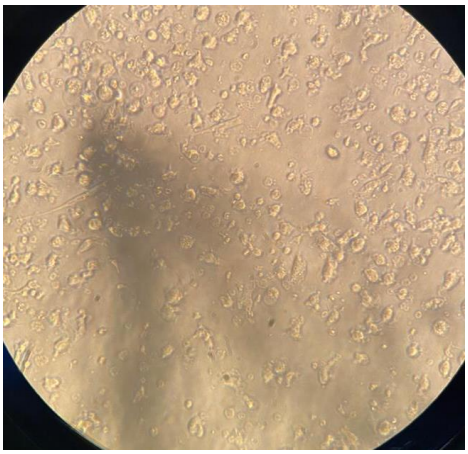
الگوهای پروتئینی با استفاده از تست SDS-PAGE ارزیابی شد. یافته‌ها نشان داد که محتوای پروتئین ۲,۱ mg/ml بود. باندهای پروتئینی OMVs در محدوده ۲۵-۱۸۰ KD بودند.

مورفولوژی سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت و اثر تیمار A. Muciniphila و OMV ها بر آن

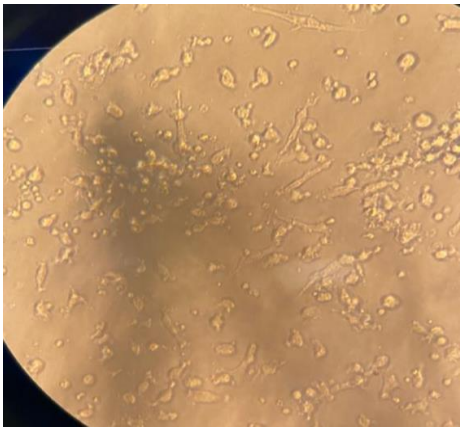
ارزیابی مورفولوژی سلول‌های دندریتیک با میکروسکوپ فاز معکوس (Invert) با بزرگنمایی‌های مختلف انجام شد. بررسی روزانه روند رشد و تمایز سلول های دندریتیک مشخص کرد که سلول‌های دندریتیک ایجاد شده، در تیمار LPS زوائد سیتوپلاسمی بلندتر و بزرگتری نسبت به گروه‌های دگزامتازون، *A. muciniphila*، OMV ها داشت(شکل ۱). عکس‌برداری از سلول‌ها، پس از عفونی کردن سلول‌ها به صورت شبانه روزی طی ۱۸ h تا ۲۰ انجام شد.



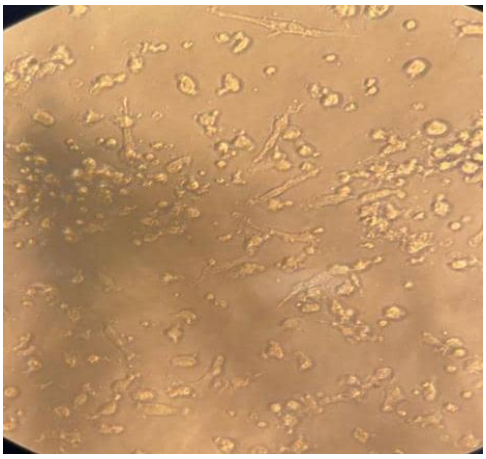
شکل.۱ الف) مورفولوژی سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت تحت تیمار با OMV



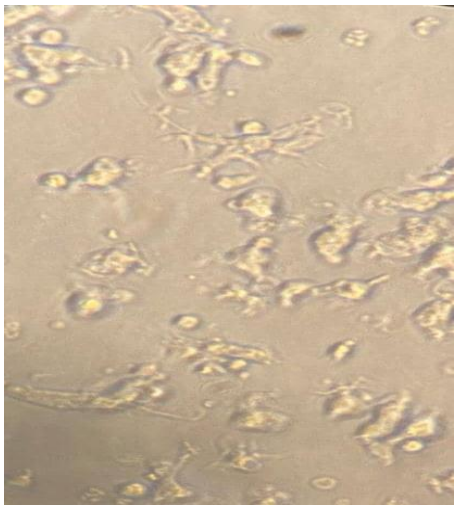
شکل.۱ ب) مورفولوژی سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت تحت تیمار با *A. muciniphila* در دوز MOI ۱۰۰



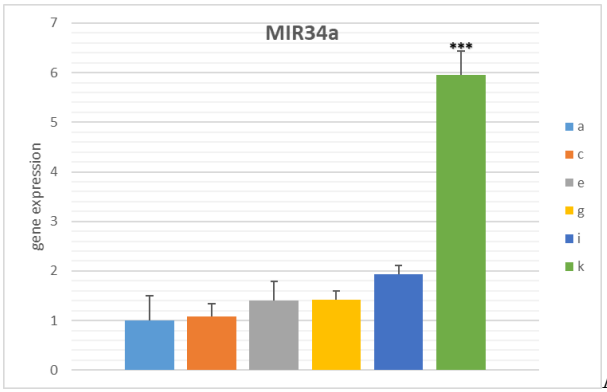
شکل.۱ پ) مورفولوژی سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت تحت تیمار با *A. muciniphila* در دوز MOI ۵۰



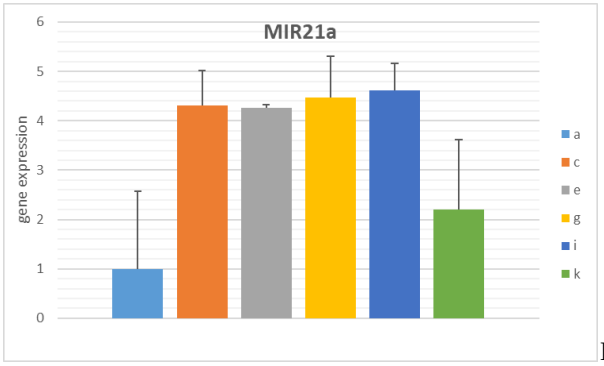
شکل.۱ ت) مورفولوژی سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت تحت تیمار با دگزامتازون



شکل.۱ ث) مورفولوژی سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت تحت تیمار با LPS



A)



B)

شکل۲. بررسی اثر *A. muciniphila* و OMVs آن بر بیان ژن A) microRNA-34a و B) microRNA-21 با استفاده از qRT-PCR. سلول‌های دندریتیک تیمار شده با a) PBS، c) A. muciniphila (MOI ۵۰)، e) *A. muciniphila* (MOI۱۰۰)، g) OMVs ، i) دگزامتازون و k) LPS هستند. داده‌ها (میانگین ± SEM) از سه آزمایش بیولوژیکی مستقل هستند که در سه تکرار انجام شده‌اند. * نشان دهنده معنی‌داری $p<0.001$ می‌باشد.**

اثر *A. muciniphila* و OMV ها بر بیان microRNA-34a و microRNA-21

برای بررسی *A. muciniphila* و OMV های استخراج شده بر بیان این دو microRNA، از تکنیک real-time PCR استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که بیان microRNA-21 در گروه LPS نسبت به گروه‌های دگزامتازون، *A. muciniphila* و OMV کاهش داشت. اما که این کاهش معنی‌دار نبود ($P>0.05$). به علاوه، مشاهده شد که بیان microRNA-34a نیز در گروه LPS افزایش معنی‌داری داشته است که تیمار با دگزامتازون، *A. muciniphila* و OMV این اثر را معکوس کرده بود ($P<0.001$). همچنین، سطح بیان این microRNA در گروه تیمار با *A. muciniphila* در دوز MOI ۵۰ نیز نسبت به دوز MOI ۱۰۰ کاهش بیشتری از خود نشان داد (شکل ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

عملکرد و تاثیر میکروب‌های روده انسان در متابولیسم و فیزیولوژی ارزیابی شده‌اند. میکروب‌های روده‌ای بر تعادل و حفظ واکنش‌های حیاتی و حفظ سلامتی انسان نقش دارند(۳۱). روده انسان مملو از باکتری‌ها است که این مجموعه از باکتری‌ها سلامت انسان را تحت تاثیر قرار می دهند. *A. muciniphila* یک باکتری غالب و مفید است که در سیستم روده‌ای تمامی افراد در سنین نوزادی تا پیری وجود دارد. این باکتری نقش حفاظتی در برابر عوامل مزاحم خارجی دارد و بنابراین تاثیرات مطلوبی بر سلامت بدن انسان می‌گذارد(۳۲). Ottman و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای نشان دادند *A. muciniphila* می‌تواند طیف گسترده‌ای از پاسخ‌های تعدیل‌کننده سیستم ایمنی را در in vitro القا کند. طبق مطالعات آنها، پروتئین خارج غشایی شبیه پیلی باکتری

آکرومانسیا موسینیفیلا[1]، به نام *A. muciniphila MucT* شناسایی شدکه به‌طور مستقیم در تنظیم ایمنی و افزایش مقاومت ترانس اپیتلیالی نقش دارد. همچنین، نشان داند که ترکیب غشاء خارج سلولی و به‌ویژه پروتئین Amuc_1100 در هموستاز ایمونولوژیکی میزبان در سطح موکوس روده و بهبود عملکرد سد روده‌ای درگیر می‌باشد(۳۳). در مطالعه‌ای که Everard و همکاران (۲۰۱۳) بر روی موش‌های چاق و مبتلا به دیابت نوع ۲ انجام دادند ضمن مطالعه نقش *A. muciniphila* در روده، سد روده‌ای و نقش فیزیولوژیک و هموستاتیک این باکتری، به این نتیجه رسیدند که فراوانی باکتری *A. muciniphila* در موش‌های چاق و دیابتی کاهش می‌یابد(۳۴). در مطالعه‌ای که توسط Zhai و همکارانش (۲۰۱۹) انجام شد ویژگی‌های ضد التهابی سویه موشی و سویه ATCC (BAA-835) باکتری *A. muciniphila* در مدل سلولی و مدل التهابی کولیت مزمن القایی توسط سدیم سولفات دکستران در موش، بررسی شد و نتایج این مطالعه نشان داد که این باکتری اثرات سودمندی بر روی بیماری روده التهابی دارد(۳۵). Tian Png و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که فراوانی *A. muciniphila* در افراد مبتلا به بیماری التهابی روده کاهش می‌یابد(۳۶). همچنین، مطالعات نشان دادند که حضور باکتری *A. muciniphila* در لایه‌های موکوسی یک مکانیسم بسیار مهم در کنترل بازسازی سلول‌های موکوسی میزبان است که سبب بهبود عملکرد سد روده‌ای می‌شود(۳۷). در این راستا مطالعات اخیر باکتری *A. muciniphila* دستگاه گوارش را به‌عنوان یکی از شاخص های سلامت معرفی کرده است(۳۸). به تازگی سلول‌های دندریتیک به دلیل مجموعه وسیعی از کاربردهای بالقوه در زمینه تقویت پاسخ‌های ایمنی و یا کنترل آن‌ها، نظر محققین را به خود جلب کرده است(۳۹). تولید و القای بلوغ در این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی، امکان درک بیشترمکانیسم های حاکم بر سیستم ایمنی در شرایط داخل بدن را نیز فراهم می‌کند. رایج‌ترین روش برای به‌دست آوردن سلول‌های دندرتیک در انسان، تولید آن از مونوسیت‌های خون محیطی است(۴۰). به همین دلیل در مطالعه حاضر تولید و تحریک سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت انسانی توسط اضافه کردن GM-CSF و IL-4 به محیط‌کشت حاوی سلول‌های مونوسیت انجام شد و در شرایط آزمایشگاهی سلول‌های دندرتیک سل تولید شدند. در مطالعه حاضر خصوصیات مورفولوژیک سلول‌ها پس از تیمار با گروه‌های مختلف توسط میکروسکوپ فاز معکوس (Invert) با بزرگنمایی‌های مختلف بررسی شد. تمایز سلول‌های PBMC به سلول‌های دندرتیک با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری تایید شد. بررسی روزانه روند رشد و تمایز سلول‌های دندریتیک مشخص کرد که سلول‌های دندریتیک ایجاد شده در تیمار LPS زوائد سیتوپلاسمی بلندتری نسبت به گروه‌های دگزامتازون، *A. muciniphila* و OMV ها داشت. در گروه LPS به علت بلوغ سلول‌های دندریتیک، زواند سیتوپلاسمی بزرگتری نسبت به گروه دگزامتازون، *A. muciniphila* و OMV ها مشاهده شد. به‌عنوان بخشی از تحقیقات در مورد نقش miRNA ها در تعدیل کلونیزاسیون میکروبی و ایمنی روده، در این مطالعه ما اثرات *A.muciniphila* و OMVs آن را، بر روی بیان miR-21 و miR-34a در گروه‌های مختلف تیمار بررسی شد. miRNA ها در بسیاری از انواع سلول‌های ایمنی به صورت متفاوت بیان می شدند و همچنین در سلول‌های ایمنی فعال یا غیر فعال پروفایل بیانی مجزایی دارند(۱۷, ۴۱). در هنگام التهاب سطح بیان miRNA ها در دندرتیک سل به صورت کاهش یا افزایش تغییر می کند(۴۲). بر اساس یافته‌های Hashimi و همکاران (۲۰۰۹)، miR-21 و miR-34a برای تمایز دندرتیک سل‌ها از مونوسیت‌ها در سیستم‌های کشت آزمایشگاهی مورد نیاز هستند(۴۳). MiR-21 به‌عنوان یک تنظیم کننده منفی التهاب عمل می کند. در حقیقت بالا رفتن این miRNA منجر به ترشح کم IL-6 و افزایش تولید IL-10 می‌شود و اثر ضد التهابی آن را تقویت می کند(۴۴). در مطالعه دیگری مشاهد شد که فقدان miR-21با افزایش تولید سیتوکین‌های التهابی توسط ماکروفاژها در بافت قلب همراه است(۴۵). در مطالعه حاضر نتایج حاصل

[1] *Akkermansia muciniphila*

نشان داد که بیان miR -21 در گروه LPS نسبت به گروه‌های دگزامتازون، *A. muciniphila* و OMV کاهش یافته بود. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، miR-21 عملکرد ضد التهابی از خود نشان داد. عملکرد miR-34a در سرطان شناخته شده است، اما در سال‌های اخیر نقش آن در ایمنی ذاتی آشکار شده است. miR-34a یک تنظیم کننده کلسینورین RCAN1را هدف قرار می‌دهد که تنظیم کننده مهم پاسخ‌های التهابی است(۴۵). Roggli و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که miR-34a توسط LPS، Interleukin 1 Beta (IL-1β) و Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α) در سلول‌های بتا پانکراس القا شد و مشاهده کردند که رده سلولی بتا پانکراس با مسدود کردن miR-34a با یک الیگونوکلئوتید ضد miRNA از مرگ سلولی ناشی از تولید سیتوکین التهابی محافظت شد و سلول‌ها زنده ماندند(۴۶). MiR-34a همچنین، در دندرتیک سل‌ها التهابی بیان می‌شود. پس از اینکه دندرتیک سل‌ها توسط لیگاندهای TLR فعال می‌شوند، miR-34a به سرعت کاهش می یابد. این شرایط باعث اختلال در فعال شدن دندرتیک سل‌ها و پایان دادن به پاسخ التهابی می‌شود(۴۷). مطالعات انجام شده بر روی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید نشان داد که miR-34a در دندرتیک سل‌ها افزایش یافته است که موجب التهاب در بیماران شده است(۴۷). در این مطالعه مشاهده شد که بیان miR-34a نیز در گروه LPS افزایش معنی‌داری داشته است که با داده های حاصل از مطالعات قبلی منطبق بود و تیمار با دگزامتازون، *A. muciniphila* و OMV این اثر را معکوس کرده بود. همچنین، سطح بیان miR-34a در گروه تیمار با *A.muciniphila* در دوز MOI ۵۰ نیز نسبت به دوز MOI۱۰۰ کاهش بیشتری از خود نشان داد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که miR-34a می‌تواند اثرات التهابی داشته باشد. در نهایت نتایج این مطالعه بیانگر این موضوع است که *A.muciniphila* و OMVs حاصل از آن می‌توانند اثرات محافظتی و ضد التهابی داشته باشند و گزینه مناسبی برای معرفی به‌عنوان نسل جدید پروبیوتیک‌ها و روش نوینی در مهار پاسخ‌های التهابی و مداخلات هدف‌دار تغذیه‌ای باشد.

منابع

1. Oerlemans MM, Akkerman R, Ferrari M, Walvoort MT, de Vos P. Benefits of bacteria-derived exopolysaccharides on gastrointestinal microbiota, immunity and health. Journal of Functional Foods. 2021;76:104289.
2. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. Nature Reviews Microbiology. 2021;19(1):55-71.
3. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. Genes & nutrition. 2011;6(3):209-40.
4. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature. 2012;489(7415):220-30.
5. Aravind SM, Wichienchot S, Tsao R, Ramakrishnan S, Chakkaravarthi S. Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. Food Research International. 2021;142:110189.
6. Deledda A, Annunziata G, Tenore GC, Palmas V, Manzin A, Velluzzi F. Diet-derived antioxidants and their role in inflammation, obesity and gut microbiota modulation. Antioxidants. 2021;10(5):708.
7. Kogut MH. Impact of the gut microbiota on the immune system. Avian Immunology: Elsevier; 2022. p. 353-64.
8. Rojas C, Gálvez-Jirón F, De Solminihac J, Padilla C, Cárcamo I, Villalón N, et al. Crosstalk between Body Microbiota and the Regulation of Immunity. Journal of Immunology Research. 2022;2022.
9. Carter JH. The immune system as a model for pattern recognition and classification. Journal of the American Medical Informatics Association. 2000;7(1):28-41.
10. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaiss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. Nature Reviews Immunology. 2017;17(4):219-32.
11. Yin X, Chen S, Eisenbarth SC. Dendritic cell regulation of T helper cells. Annual review of immunology. 2021;39:759-90.
12. Teng Y-TA. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 2003;14(4):237-52.
13. Steinman RM. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. Nature medicine. 2007;13(10):1155-9.
14. Súkeníková L, Černý V, Věcek J, Petrásková P, Novotná O, Vobruba Š, et al. The Impact of Escherichia coli Probiotic Strain O83: K24: H31 on the Maturation of Dendritic Cells and

sulfate sodium-induced colitis. PloS one. 2013;8(10):e76520.
28. Muraca M, Putignani L, Fierabracci A, Teti A, Perilongo G. Gut microbiota-derived outer membrane vesicles: under-recognized major players in health and disease? Discovery medicine. 2015;19(106):343-8.
29. Tarashi S, Zamani MS, Omrani MD, Fateh A, Moshiri A, Saedisomeolia A, et al. Commensal and Pathogenic Bacterial-Derived Extracellular Vesicles in Host-Bacterial and Interbacterial Dialogues: Two Sides of the Same Coin. Journal of Immunology Research. 2022;2022.
30. Macia L, Nanan R, Hosseini-Beheshti E, Grau GE. Host-and microbiota-derived extracellular vesicles, immune function, and disease development. International journal of molecular sciences. 2019;21(1):107.
31. Saitoh S, Noda S, Aiba Y, Takagi A, Sakamoto M, Benno Y, et al. Bacteroides ovatus as the predominant commensal intestinal microbe causing a systemic antibody response in inflammatory bowel disease. Clinical and Vaccine Immunology. 2002;9(1):54-9.
32. Jayachandran M, Chung SSM, Xu B. A critical review of the relationship between dietary components, the gut microbe Akkermansia muciniphila, and human health. Critical reviews in food science and nutrition. 2020;60(13):2265-76.
33. Ottman N, Reunanen J, Meijerink M, Pietilä TE, Kainulainen V, Klievink J, et al. Pili-like proteins of Akkermansia muciniphila modulate host immune responses and gut barrier function. PloS one. 2017;12(3):e0173004.
34. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. Proceedings of the national academy of sciences. 2013;110(22):9066-71.
35. Zhai R, Xue X, Zhang L, Yang X, Zhao L, Zhang C. Strain-specific anti-inflammatory properties of two Akkermansia muciniphila strains on chronic colitis in mice. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2019:239.
36. Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augmentin vitroutilization of mucin by other bacteria. Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG. 2010;105(11):2420-8.
37. Zhao F, Zhou G, Liu X, Song S, Xu X, Hooiveld G, et al. Dietary protein sources differentially affect the growth of Akkermansia muciniphila and maintenance of the gut mucus barrier in mice. Molecular Nutrition & Food Research. 2019;63(23):1900589.
38. Cani PD, de Vos WM. Next-generation beneficial microbes: the case of Akkermansia Immunoregulatory Functions In Vitro and In Vivo. Cells. 2022;11(10):1624.
15. Sato K, Fujita S. Dendritic cells-nature and classification. Allergology International. 2007;56(3):183-91.
16. Steinman RM, Hawiger D, Liu K, Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, et al. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. Annals of the New York Academy of Sciences. 2003;987(1):15-25.
17. Stumpfova Z, Hezova R, Meli AC, Slaby O, Michalek J. MicroRNA profiling of activated and tolerogenic human dendritic cells. Mediators of Inflammation. 2014;2014.
18. El-Sayed A, Aleya L, Kamel M. The link among microbiota, epigenetics, and disease development. Environmental Science and Pollution Research. 2021;28(23):28926-64.
19. Chen J-j, Zeng B-h, Li W-w, Zhou C-j, Fan S-h, Cheng K, et al. Effects of gut microbiota on the microRNA and mRNA expression in the hippocampus of mice. Behavioural brain research. 2017;322:34-41.
20. Ness S, Lin S, Gordon JR. Regulatory dendritic cells, T cell tolerance, and dendritic cell therapy for immunologic disease. Frontiers in Immunology. 2021;12:195.
21. Jia Y, Wei Y. Modulators of MicroRNA function in the immune system. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(7):2357.
22. Ottman N, Geerlings SY, Aalvink S, de Vos WM, Belzer C. Action and function of Akkermansia muciniphila in microbiome ecology, health and disease. Best practice & research Clinical gastroenterology. 2017;31(6):637-42.
23. Macchione I, Lopetuso L, Ianiro G, Napoli M, Gibiino G, Rizzatti G, et al. Akkermansia muciniphila: key player in metabolic and gastrointestinal disorders. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019;23(18):8075-83.
24. Ji-Chao Z, Zhang X-W. Akkermansia muciniphila: A promising target for the therapy of metabolic syndrome and related diseases. Chinese journal of natural medicines. 2019;17(11):835-41.
25. Zhang L, Qin Q, Liu M, Zhang X, He F, Wang G. Akkermansia muciniphila can reduce the damage of gluco/lipotoxicity, oxidative stress and inflammation, and normalize intestine microbiota in streptozotocin-induced diabetic rats. Pathogens and disease. 2018;76(4):fty028.
26. Ashrafian F, Behrouzi A. Comparative study of effect of Akkermansia muciniphila and its extracellular vesicles on toll-like receptors and tight junction. Gastroenterology and hepatology from bed to bench. 2019;12(2):163.
27. Kang C-s, Ban M, Choi E-J, Moon H-G, Jeon J-S, Kim D-K, et al. Extracellular vesicles derived from gut microbiota, especially Akkermansia muciniphila, protect the progression of dextran

muciniphila. Frontiers in microbiology. 2017;8:1765.
39. Matsui HM, Hazama S, Nakajima M, Xu M, Matsukuma S, Tokumitsu Y, et al. Novel adjuvant dendritic cell therapy with transfection of heat-shock protein 70 messenger RNA for patients with hepatocellular carcinoma: a phase I/II prospective randomized controlled clinical trial. Cancer Immunology, Immunotherapy. 2021;70(4):945-57.
40. Tang-Huau T-L, Segura E, editors. Human in vivo-differentiated monocyte-derived dendritic cells. Seminars in Cell & Developmental Biology; 2019: Elsevier.
41. O'connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. Nature Reviews Immunology. 2010;10(2):111-22.
42. Park H, Huang X, Lu C, Cairo MS, Zhou X. MicroRNA-146a and microRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins. Journal of Biological Chemistry. 2015;290(5):2831-41.
43. Hashimi ST, Fulcher JA, Chang MH, Gov L, Wang S, Lee B. MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation. Blood, The Journal of the American Society of Hematology. 2009;114(2):404-14.
44. Feng J, Li A, Deng J, Yang Y, Dang L, Ye Y, et al. miR-21 attenuates lipopolysaccharide-induced lipid accumulation and inflammatory response: potential role in cerebrovascular disease. Lipids in health and disease. 2014;13(1):1-9.
45. Yang L, Wang B, Zhou Q, Wang Y, Liu X, Liu Z, et al. MicroRNA-21 prevents excessive inflammation and cardiac dysfunction after myocardial infarction through targeting KBTBD7. Cell death & disease. 2018;9(7):1-14.
46. Roggli E, Britan A, Gattesco S, Lin-Marq N, Abderrahmani A, Meda P, et al. Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic β-cells. Diabetes. 2010;59(4):978-86.
47. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Melchor EG, Elmesmari A, Tolusso B, Tange C, et al. MicroRNA-34a dependent regulation of AXL controls the activation of dendritic cells in inflammatory arthritis. Nature communications. 2017;8(1):1-13.

.

The effect of *Akkermansia muciniphila* and its outer membrane vesicles on the expression of microRNAs involved in the maturation of monocyte-derived human dendritic cells

Laya Zoghi Mofrad[1], Abolfazl Fateh[2], Fattah sotoodehnejadnematalahi[1], Dariush Norouzian Sham Asbi[3], Seyed Davar Siadat[4*]

[1]Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Microbiology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[3]Head of NanoBiotechnology Department Pasteur Institute of Iran
[4]Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Microbiology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Akkermansia muciniphila, an important member of the gastrointestinal microbiota, is involved in the functioning of the host immune system. We aimed to investigate the effect of *A. muciniphila* and its OMVs on the expression of microRNA-21 and microRNA-34a involved in the maturation of human dendritic cells. *A. muciniphila* was cultured on a mucin-containing medium and its OMVs were extracted by ultracentrifugation. Extraction of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was performed using Ficoll's density gradient centrifugation method. Monocytes were differentiated into dendritic cells in the presence of interleukin-4 cytokines and granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. Then, *A. muciniphila* at MOI 50 and 100, OMVs at a dose of 50 µg/µl, dexamethasone (to induce tolerogenic dendritic cells), and the LPS (to induce mature dendritic cells) were incubated. Finally, the expression of microRNA-21 and microRNA-34a was measured by real-time PCR. The morphological characteristics of the extracted OMVs showed that their size was between 20-200 nm. In LPS treatment, there were longer cytoplasmic growths than OMVs of dexamethasone and *A. muciniphila* groups. MicroRNA-21 expression was decreased in the LPS group compared to dexamethasone, *A. muciniphila*, and OMV groups, although this decrease was not significant ($P > 0.05$). In addition, microRNA-34a expression was significantly increased in the LPS group, which was reversed by treatment with dexamethasone, *A. muciniphila*, and OMV ($P < 0.001$). MicroRNA-21 and microRNA-34a can exhibit anti-inflammatory and pro-inflammatory functions. *A. muciniphila* and its OMVs appear to be a viable option for introduction as a new generation probiotic.

Keywords: human dendritic cells, probiotic, inflammation, microRNA

* Siadat@pasteur.ac.ir