مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۵ شماره ۶ ، پاییز ۱۳۹۰، صفحات ۵۱- ۴۳

مقایسه تحریک تولید سیتوکین های التهابی به وسیله شیگا توکسین نوترکیب و سویه استاندارد تولید کننده شیگا توکسین

مانا علومی*[۱] ، سعید بوذری[۲] ، فاطمه عابدی جعفری[۳]

۱) دکتری فرآورده های بیولوژیک – استادیار بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران
۲) دکتری میکروبیولوژی- استاد بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران
۳) کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات

نویسنده رابط: مانا علومی، بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستورایران
تلفن تماس: ۲۰ -۰۲۱۶۶۹۵۳۳۱۱، پست الکترونیک: manaoloomi@yahoo.com

چکیده:

زمینه و اهداف: شیگا توکسین (Stx) توسط Shiga Toxicogenic *Escherichia coli* (STEC) تولید شده و می تواند سندرم همولیتیک اورمیک را ایجاد نماید. Stx تکثیرسلولی را مهار ساخته و باعث آسیب به سلول های اندوتلیال و بیان گیرنده Globotriaosylceramid (Gb3-cer) در سلولها می شود. اثر شیگا توکسین بر سلولهای اپی تلیال کاملا شناخته نشده است. هدف این مطالعه بررسی اثر تحریکی شیگا توکسین نوترکیب در بیان سیتوکاین های التهابی در سلول های اپیتلیال ومنوسیتی می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تحریک تولید سیتوکین های التهابی به وسیله شیگا توکسین نوترکیب و عصاره سلولی تولید کننده شیگا توکسین طبیعی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور $۱۰^{۶}$ سلول در پلیت های شش خانه کشت داده شدند و غلظت های متفاوت از عصاره سلولی سویه استاندارد و شیگا توکسین نو ترکیب به هر خانه اضافه شد. ابتدا کل RNA استخراج گردید و سپس به وسیله روش RT-PCR برای شناسایی سایتوکاینهای IL-1α، IL-1β، IL-8 وTNFα استفاده شد.

یافته ها: توانایی القا mRNA ، IL-1αو و IL-8 توسط شیگا توکسین با اثر بر روی دو رده سلولی HeLa و THP-1 نشان داده شد و TNF α با اثر شیگا توکسین نوترکیب تولید شد.

نتیجه گیری: به طور کلی نتایج به دست آمده نشان دهنده تفاوت سلول های مختلف در پاسخ به اثر شیگا توکسین در تحریک تولید سیتوکینها و تولید سیگنال های متفاوت است.

کلید واژه ها: شیگا توکسین، آپوپتوز، سیتوکاین های التهابی، HeLa، THP-1

مقدمه :

شیگا توکسین (stx) به وسیله اشریشیا کلی انترو هموراژیک (EHEC) تولید شده و می تواند سندرم اورمیک همولیتیک (Hemolytic-uremic syndrome (HUS)) را ایجاد کند(۱). stx شامل یک زیر واحد A و ۵ زیر واحد B است که به صورت پنتامرهستند (۲). زیر واحد B مسئولیت اتصال به رسپتور Globotrioasylceramid (Gb3-cer) را داشته (۳) و زیر واحد A فعالیت N-گلیکوزیدازی دارد که از طریق برداشت یک آدنین از 28sRNA در موقعیت ۴۳۲۴ از زیر واحد s ۶۰ ریبوزوم در سلولهای یو کاریوتیک سبب مهار سنتز پروتین می شود و نتیجه آن مرگ سلول ها است(۴). زیرواحد A از نظر Proteolytically به یک پپتید 28KD (A1) و یک پپتید (A2) تقسیم می شود. این پپتید ها به وسیله یک باند دی سولفیدی به هم متصل باقی می مانند. به نظر می رسد شیگا توکسین توکسیسیتی را از طریق مرگ برنامه ریزی شده سلول یا آپوپتوزیس در برخی سلول ها ایجاد می کند.

اثر شیگا توکسین بر رده های سلولی در تولید آپوپتوز بررسی شده است، برای مثال در سلول Vero (۵)و دربورکیت لیمفوما(۶) وسلول های مشتق شده از اپیتلیال توبولارکلیه ACHN(۷)و آستروسیتوما (۸) در تحریک شیگا توکسین آپوپتوز را القا می کنند. در حالی که در سلول های همچون T84، رده سلولی اپیتلیوم روده انسان که فاقد رسپتور های گلیکولیپیدی توکسین هستند، نشان داده شده است که توسط شیگا توکسین در محیط کشت کشته نمی شوند.

گرچه مکانیزم دقیق القا آپوپتوز به وسیله شیگا توکسین هنوز ناشناخته است، اما نشان داده شده است که نوع سیگنال های آپوپتوز در سلول های مختلف متفاوت است. سلول های HeLa که تحت تاثیر زیر واحد B شیگا توکسین قرار گرفته اند آپوپتوز را به وسیله فعال کردن کاسپاز ۱ و ۳ القا کرده اما ژن زیر واحد A شیگا توکسین نکروزیس را القا می نماید (۶). اثر شیگا توکسین ۱و۲ در سلول های Hep-2 منجر به افزایش بیان Bax (واسطه آپوپتوز) می شود، که از خانواده BCL-2/Bax بوده ودر غشای بیرونی میتوکندری قرار دارند (۹).

Stx اثرات مستقیم روی سلول های پلی مورفونوکلئر دارد و شواهدی وجود دارد که اریتروسیت ها و پلاکت ها هم گیرنده هایی برای Stx دارند. سلول هایی مانند مونوسیت خون محیطی انسان و رده های سلولی مونوسیتی انسانی میزان گیرنده Gb_3 کمی دارند و به عمل کشندگی Stx نسبتاً مقاومتر می باشند، اما با ترشح و تولید سایتوکاین های پیش التهابی به تحریک توکسین پاسخ می دهند (۱۰).

اگرچه تا مدت زیادی عمل شیگاتوکسین را در ایجاد بیماری سندروم اورمی همولایتیک تنها اختلال در پروتئین سازی می دانستند، اما امروزه کاملا مشخص شده است که این توکسین ها بسیاری از آبشارهای سیگنالینگ را ایجاد می کنند که باعث ایجاد سایر وظایف سلولی مثل تولید و ترشح سایتوکاین ها و ایجاد فرایند آپاپتوز در سلول ها می شود (۱۱).

هدف این مطالعه بررسی اثر تحریکی شیگا توکسین نوترکیب در تولید سایتوکاین ها درسلولهای اپیتلیال و سلولهای منوسیتی و مقایسه اثر آنها با عصاره سلولی حاصل از باکتری تولید کننده این توکسین می باشد.

روش بررسی:

تخلیص عصاره سلولی سویه استاندارد 0157 *Escherichia coli* تولید کننده شیگاتوکسین

برای این منظور سوش *Escherichia coli* 0157 (تهیه شده از کلکسیون موجود در بخش بیولوژی ملکولی) در۵۰ میلی لیتر LB مایع به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد و با کمک دستگاه سونیکاتور ۵ بار هر بار ۱۰ ثانیه دیواره ی سلولی تخریب شد. سانترفیوژ با دور ۶۰۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه انجام شده و مایع رویی که حاوی توکسین بود جمع آوری شد و به منظور استریزاسیون

از فیلتر (Schleicher&schuell) یکبار مصرف استفاده گردید (۱۲).

تخلیص شیگاتوکسین نوترکیب

تخلیص شیگا توکسین نوترکیب از طریق وکتور pBAD که ژن AB5 در آن کلون شده بود(۱۲) انجام شد بدین منظور تولید پروتئین تحریک شده به این ترتیب که کلون مورد نظر در ۳۷ °C کشت داده شده سپس OD آن در ۶۰۰ nm اندازه گیری شد (OD=۰.۵۰۲). با اضافه کردن ۵۰۰ µl آرابینوز ۲٪ که بهترین غلظت برای بیان ژن AB5 در وکتور pBADمی باشد(۱۲) القا گشته و به مدت ۴ ساعت در شیکر انکوباتور۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از انجام سانترفیوژ و رسوب (pellet) حاصله با ۵ mL PBS 1x(PH=7.4) در ۵۰۰µl پلی میکسین B حل شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰ rpm سانتر فیوژ گشته و سوپ رویی جمع شد و غلظت پروتئین به روش (Bradford) درطول موج ۶۰۰nm تخمین زده شد.

جهت اطمینان از تولید توکسین با روش های الایزا (با استفاده از کیت (r-biopharm) نیز بررسی شدند.

کشت سلولی

رده سلولی HeLa و THP-1 در محیط کشت RPMI غنی شده با ۱۰ تا ۲۰ در صد FBS(Gibco-BRL) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت حاوی ۵٪ دی اکسید کربن کشت داده شدند.

بررسی RNA

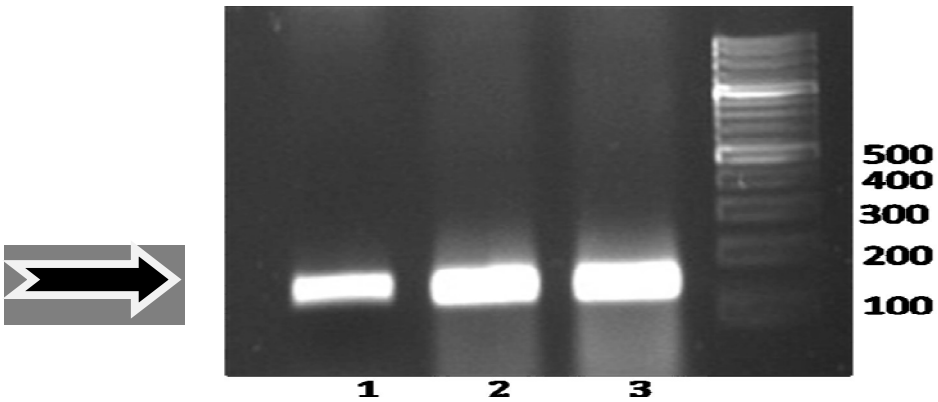
عصاره سلولی به دست آمده از سویه استاندارد و شیگا توکسین نوترکیب بر سلول های HeLaو THP-1 اثر داده شد. برای این هدف $۱۰^{۶}$ سلول در پلیت های شش خانه کشت داده شدند و حجم های متفاوت (بر اساس توکسیسیتی محاسبه شده (LD50)) روی سلولها از عصاره سلولی و شیگا توکسین نو ترکیب به هر خانه اضافه شده و خانه اول به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. سپس سلول ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون ، تریپسینه و جمع آوری شدند. ابتدا کل RNA با استفاده از کیت اختصاصی (TakaRa kit) استخراج شد. RNA بدست آمده بوسیله روش RT-PCR برای شناسایی IL-1α، IL-1β ،IL-8 و TNF-α با استفاده از پرایمر های اختصاصی (جدول ۱) مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱- پرایمر های مورد استفاده در این مطالعه

ردیف	نام سایتوکاین	سکانس پرایمر	اندازه	منبع
۱	GAPDHf	5'-GGT CGG AGT CAA CGG ATT TG-3'	۱۵۰ bp	۱۳
۲	GAPDHr	5'-ATG AGC CCC AGC CTT CTC CAT-3'		
۳	IL-1αf	5'-CAG TGC TGC TGA AGG AGA TG-3'	۱۲۳ bp	۸
۴	IL-1αr	5'-AAG TTT GGA TGG GCA ACT GA-3-		
۵	IL-8f	5'-GTG TGA AGG TGC AGT TTT GC-3'	۱۲۶ bp	۸
۶	IL-8r	5'-GCA GTG TGG TCC ACT CTC AA-3'		
۷	IL-1βf	'5'-CAG TGG CAA TGA GGA TGA CT-3'	۱۱۶ bp	۸
۸	IL-1βr	5'-TCG GAG ATT CGT AGC TGG AT-3'		
۹	TNF-αF	'5'-TCA GAT CAT CTT CTC GAA CC-3'	۳۵۸ bp	۱۴
۱۰	TNF-αr	5'-CAG ATA GAT GGG CTC ATA CC-3'		

یافته ها:

ابتدا بررسی حضور یا عدم حضور و میزان mRNA در نمونه ها با انجام RT-PCR با پرایمر GAPDH صورت گرفت که در شکل ۱ مشاهده می گردد.

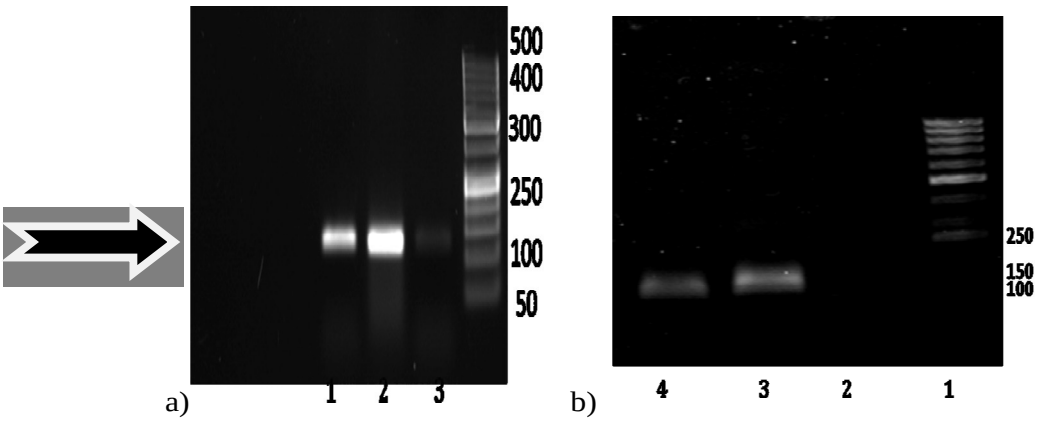


شکل ۱- تکثیر ژن GAPDH

۱) رده ی سلولی تیمار شده با سوش *Escherichia coli* O157 ، ۲)رده ی سلولی تیمار شده با شیگا توکسین نوترکیب (AB5)

۳) رده ی سلولی (کنترل)

همان طور که در شکل۱ مشاهده می شود سایز GAPDHبرابر bp ۱۵۰ است. سپس همسان سازی شدت باند ها، نمونه های کنترل و شیگا توکسین نوترکیب و عصاره سلولی انجام شد. این همسان سازی از طریق برنامه Labwork با اندازه مشخص مارکر، میزان شدت باند ها تعیین گردید. پس از همسان سازی، به کمک پرایمر های سیتو کاین ها حضور یا عدم حضور سیتوکاین ها بررسی شد. RT-PCRجهت شناسایی IL-1 α انجام شد و نتیجه آن در شکل (۲) نشان داده شده است.



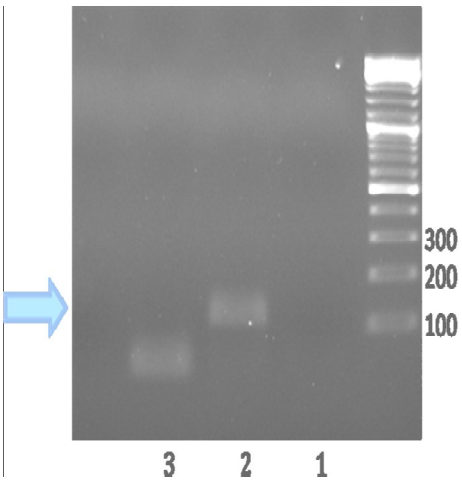
شکل ۲- تکثیر ژن IL-1 α

a) ۱) رده ی سلولی HeLa تیمار شده با سوش *Escherichia coli* O157 ، ۲)رده ی سلولی HeLa تیمار شده با شیگا توکسین نوترکیب (AB5) ۳) رده ی سلولی HeLa (کنترل)

b) ۱) ۵۰ bp مارکر وزن مولکولی، ۲) رده سلولی THP-1 (کنترل)، ۳) رده ی سلولی THP-1 تیمار شده با شیگا توکسین نوترکیب (AB5) ، ۴) رده ی سلولی THP-1 تیمار شده با سوش *Escherichia coli* O157

سایز IL-1 α برابر bp ۱۲۳ است که دررده سلولی و THP-1 در برابرشیگا توکسین AB5 وسوش *Escherichia coli* O157 این سیتوکاین را تولید می کنند .

RT-PCR جهت شناسایی IL-1 β انجام شد و در مورد سلولهای HeLa سیتوکین فوق مشاهده نشد در حالیکه نتایج در سلولهای THP-1در شکل (۳) نشان داده شده است.

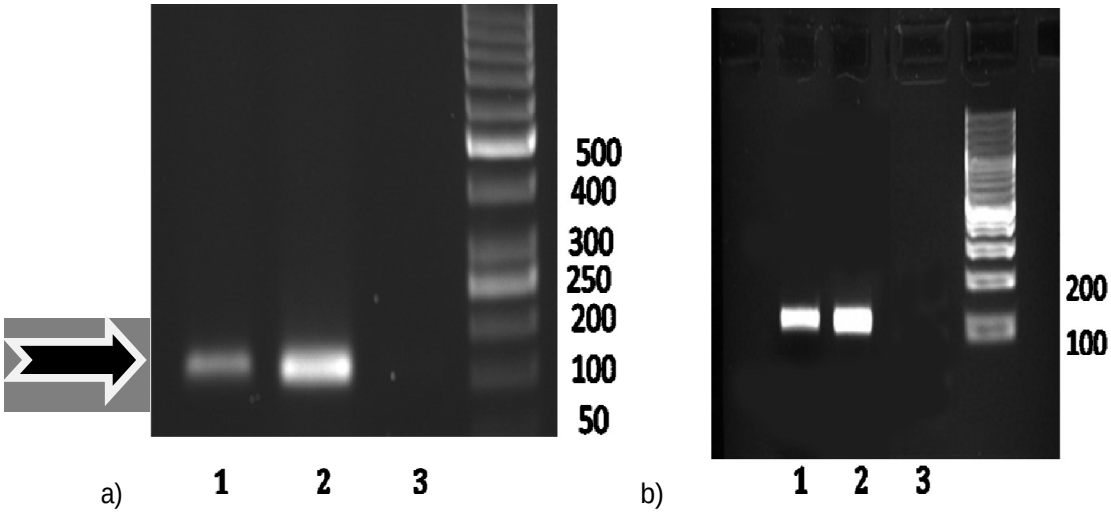


شکل ۳- تکثیر ژن IL-1β

۱۰۰ bp مارکر وزن مولکولی، ۱) رده سلولی THP-1 (کنترل)، ۳) رده ی سلولی THP-1 تیمار شده با شیگا توکسین نوترکیب (AB5) ، ۴) رده ی سلولی THP-1 تیمار شده با سوش *Escherichia coli* O157

همانطور که در شکل مشاهده می شود اندازه IL-1β برابر bp ۱۱۶بوده و در اثر تحریک با شیگا توکسین نوترکیب توانایی تولید این سیتوکین در رده سلولی THP-1 وجود دارد.

RT-PCRجهت شناسایی IL-8 انجام شد و نتیجه آن در شکل (۴) نشان داده شده است.



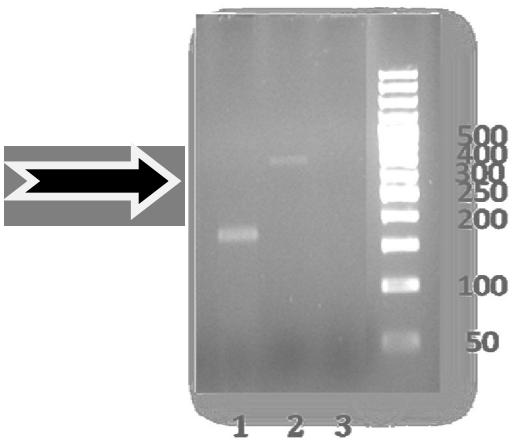
شکل ۴- تکثیر ژن IL-8

a) ۵۰ bp مارکر وزن مولکولی، ۱) رده ی سلولی HeLa تیمار شده با سوش *Escherichia coli* O157، ۲)رده ی سلولی HeLa تیمار شده با شیگا توکسین نوترکیب (AB5) ۳) رده ی سلولی HeLa (کنترل)

b) ۱) رده سلولی THP-1 تیمار شده با سوش *Escherichia coli* O157، ۲) رده ی سلولیTHP-1 تیمار شده با شیگا توکسین نوترکیب (AB5) ،۳) رده ی سلولیTHP-1 (کنترل)

در شکل ۴ مشاهده می شود که تکثیر ژن IL-8 با اندازهbp ۱۲۶در هر دو رده سلولی دیده می شود.

RT-PCR جهت شناسایی TNF-α انجام شد و نتیجه آن در شکل (۵) نشان داده شده است.



شکل۵- تکثیر ژن TNF-α

۱) رده ی سلولی HeLa تیمار شده با سوش *Escherichia coli* O157، ۲)رده ی سلولی HeLa تیمار شده با شیگا توکسین نوترکیب (AB5) ۳) رده ی سلولی HeLa (کنترل)

همان طور که در شکل ۵ مشاهده می شود سایز TNF α برابر bp ۳۵۸ است. که رده سلولی HeLa در برابر شیگاتوکسین AB5 وسوش *Escherichia coli* O157 تنها شیگاتوکسین AB5 توانایی تولید این سیتوکاین را دارد

از طرف دیگر بیان این سیتوکین در سلولهای THP-1 مشاهده نشد.

جهت بررسی دقیق تر نتایج به دست آمده از RT-PCR سیتوکاین ها نتایج به صورت خلاصه در جدول شماره (۲) آورده شده است.

جدول ۲- تولید سیتوکینها **توسط دو سلول HeLa و THP-1**

سیتوکاین	رده ی سلولی	کنترل	AB 5	O157
GAPDH	HeLa	+	+	+
	THP-1	+	+	+
IL-1 α	HeLa	_	+	+
	THP-1	–	+	+
IL-1β	HeLa	_	_	_
	THP-1	–	+	–
TNF α	HeLa	_	+	_
	THP-1	–	–	–
IL-8	HeLa	_	+	+
	THP-1	–	+	+

همانطوریکه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است سیتوکینهای IL-1 α و IL-8 توسط هر دو سلول HeLa و THP-1 تولید می شود در حالیکه در مورد سیتوکین IL-1β توسط سلول THP-1 و سیتوکین TNF α توسط سلول HeLa و تحت اثر شیگاتوکسین نوترکیب ایجاد می شود.

بحث:

اشریشیا کلی تولید کننده شیگا توکسین به عنوان یکی از مشکلات بهداشتی، حتی در کشور های توسعه یافته نیز مطرح می باشد. به همین علت نیز مطالعات گسترده در این زمینه رو به افزایش است. به خصوص این که، این توکسین علاوه بر اسهال، سبب نارسایی کلیه در اطفال نیز می گردد (۴).

در این مطالعه با اثر شیگا توکسین نوترکیب و عصاره سلولی حاصل از سویه استاندارد تولید کننده شیگاتوکسین بر دو رده سلولی اپیتلیالی (HeLa) ومنوسیتی (THP-1)، توانایی القا mRNA، سیتوکینهایی مانند IL-1 , TNF و IL-8 به عنوان سیتوکاین پیش التهابی مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی تولید سیتوکینهای IL-1 α و IL-8 در هر دو رده سلولی مشاهده شد. تولید سیتوکین IL-8 با افزایش بیان mRNA این سیتوکین در رده سلولی اپیتلیالی سرطان کولون با تحریک سوش وحشی EHEC نیز در بررسیهای قبلی نشان داده شده بود (۱۵). در مطالعه فوق تولید این سیتوکین

و همچنین سیتوکین IL-1 α توسط دو رده سلولی اپیتلیالی و منوسیتی نشان داده شد.

در این بررسی سلولهای HeLa تنها تولید سیتوکین TNF-αرا با اثر شیگا توکسین نوترکیب نشان دادند.

از طرف دیگر تولید سیتوکین IL-1 β نیز تنها در سلولهای THP-1و تحت اثر شیگا توکسین نوترکیب تولید شد.

TNF- α و IL-1 β سایتوکاین های مهم القاء Gb3 برای Stx هستند که حساسیت سلول های مختلف را نسبت به این توکسین افزایش می دهند. Dong و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نیز با اثر دادن شیگاتوکسین بیان TNF- α در سطح mRNA را گزارش دادند(۱۶).

به طور کلی به نظر می رسد عملکرد دو سلول اپیتلیالی و منوسیتی در برابر شیگا توکسین نوترکیب و عصاره سلولی سویه تولید کننده این توکسین در رونویسی mRNA سیتوکاین های پیش التهابی مانند IL-1 α و IL-8 مشابه عمل میکند. به عبارتی دیگرعصاره (extract) سلولی *Escherichia coli* O157 اثری روی سلول به جا می گذارد که مشابه اثر stx نوترکیب در تحریک تولید سیتوکین می باشد.

در این بررسی با مقایسه سویه استاندارد تولید کننده شیگا توکسین و شیگا توکسین نوترکیب نشان داده شد که این توکسین به تنهایی قادر به تولید TNF- α در سلولهای اپیتلیال مانند سلول HeLa می باشد در حالیکه عصاره سلولی حاوی شیگا توکسین و سایر اندوتوکسینها، قادر به انجام آن نیست.

تولید سیتوکین IL-1 β نیز تنها در سلولهای THP-1 با منشاء منوسیتی مشاهده گردید. سلولهای اپیتلیالی اولین محل برخورد با توکسین بوده در حالیکه منوسیتها در مرحله بعدی با توکسین تحریک می شوند (۱۷). نحوه بیان سیتوکینها می تواند بر اساس نوع سلول متفاوت بوده و در نتیجه نوع پاسخ متفاوتی ایجاد کند.

به طور کلی نتایج به دست آمده نشان دهنده تفاوت سلول های مختلف در پاسخ به اثر شیگا توکسین در تحریک تولید سیتوکینها و تولید سیگنال های متفاوت است. مسیرهای سیگنالینگ در اثر تحریک با شیگا توکسین در سلول HeLa ، ایجاد می شوند (۱۸) که بررسی بیشتر نوع مسیر سیگنالینگ ایجاد شده درجهت تولید سیتوکینها و مولکولهای آپوپتوز می تواند راه گشای استفاده از این توکسین در درمان و موارد کاربرد دیگر این توکسین باشد. از طرف دیگر سلولهای مختلف در اثر تحریک با شیگاتوکسین قادر به تولید سیتوکینهای متفاوت بوده که نیاز به بررسیهای بیشتر دارد.

نتیجه گیری :

در این بررسی نشان داده شد که اثر شیگاتوکسین نوترکیب بر روی سلولها تنها سیتوتوکسیسیتی و کشندگی نبوده بلکه می تواند سیگنال متفاوتی جهت تولید سیتوکینها ی متفاوت ایجاد نماید. برای مثال سلول با منشاء اپیتلیالی حساس به توکسین می باشد اما با مقادیر کم توکسین می تواند تولید سیتوکین نماید. تفاوت سیگنالها نیز می تواند نسبت به نوع سلول و مقادیر توکسین اثرات متفاوت مانند کشندگی و یا تولید سیتوکینهای التهابی بطور همزمان باشد. مطالعه بیشتر ودقیق تر بر روی سلولها با منشاء و حساسیت متفاوت می تواند به شناسایی دقیقتر عملکرد توکسین و در نهایت کاربرد این توکسین در جهت درمان کمک نما ید.

فهرست مراجع:

1. Karmali MA. Infection by verotoxin – producing *Escherchia coli*. *Clin Microbiol Res*. 1989; **2**(1):15-38
2. Sandvig k, Van DB. Membrane traffic exploited by protein toxins. Annu Rev Cell Dev Biol 2002; **18**: 1-24.

3. Obrig TG. Shiga toxin mode of action in *E. coli* 0157: H7 disease. Front Biosei. 1997; 15;**2**: d635-42
4. Acheson DW, Levine MM, Kaper JB, Keus GT. Protective immunity to shiga – like toxin 1 following oral immunization with shiga – kile toxin 1B – subunit producing vibrio cholerae. Infect Immun. 1996; **64**(1): 355-7.
5. Inward CD, Williams J, Chant I, et al. Verocytotoxin-1 induces apoptosis in Vero cells. J Infect. 1995; **30**(3):213–8
6. Arab S, Lingwood CA. Intracellular targeting of the endoplasmic reticulum/nuclear envelope by retrograde transport may determine cell hypersensitivity to verotoxin via globotriaosyl ceramide fatty acid isoform traffic. J Cell Physiol. 1998; **177**(4):646–60
7. Taguchi T, Uchida H, Kiyokawa N, Mori T, Sato N, Horie H, et al. Verotoxins induce apoptosis in human renal tubular epithelium derived cells. Kidney Int. 1998; **53**(6):1681–8
8. Harrington SM, Strauman MC, Abe CM, Nataro JP. Aggregative adherence fimbrias contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. Cellular microbiology. 2005; **7**(11): 1565 – 78
9. Jones NL, Islur A, Haq M, Mascarenh R, Mohamed A, Karmali P, et al. *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2000; **278**(5): G811-9
10. Meyers KE, Kaplan BS. Many cell Type are shiga toxin targets. Kidney Int. 2000; **57**(6): 2350-9
11. Johannes L, Romer W. Shiga toxins-from cell biology to biomedical applications. Nature reviews microbiology. 2010; **8**(2): 105-16
12. Oloomi M, Bouzari S و Arshadi M. N-terminus leader sequence of Shiga toxin (Stx) 1 is essential for production of active recombinant protein in E. coli. Protein Pept Lett 2006; **13**(5):509–512
13. Fabisiewicz A, Kulik J, Kober P, Brewczynska E, Pienkowski T و Siedlecki AJ. Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by a two-marker reverse trandcriptase polymerase chain reaction assay. Act biochimica polonica. 2004; **51** (3): 747-55
14. Ulloa L, Tracey KJ. The cytokine profile: a code for sepsis. Trends mol med. 2005; **11**(2): 56-63
15. Hauf N, Chakraborty T. Suppression of NF-κB Activation and Proinflammatory Cytokine Expression by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. The Journal of Immunology. 2003; **170** (4): 2074-82
16. Moon DO, Jin CY, Lee JD, Choi YH, Ahn SC, Lee CM, et al. Curcumin Decreases Binding of shiga–like toxin–1B on human Intestinal Epithelial cell line HT 29 Stimulated with, TNF -α and IL–1B: Suppression of p38, JNK and NF – κB P 65 potential Targets. Biol pharm Bull. 2006; **29** (7): 1470 – 5
17. Gyles CL. Shiga toxin–producing *Escherichia coli*: An overview. J Anim Sci. 2007; **85** 13 suppl: 45- 62.
18. Fujii J, Matsui T, Heatherly DP, Schlegel KH, Lobo PI, Yutsudo T, et al. Rapid apoptosis induced by shiga toxin in HeLa cells. Infect Immun. 2003; **71**(5): 2724–35