NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.13/50 , 2023

Scan online to view this article

The *Lactobacillus acidophilus* probiotic effect on the *il10* gene expression in Zebrafish infected with *E. coli O157:H7*

Seyedeh Shaghayegh Mirabdollah Elahi[1], Reza Mirnejad [2]*, Reza Kazempoor [3], Fattah Sotoodehnejadnematalahi[1]

1.Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2.Molecular Biology Research Center, Systems biology and poisonings institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3.Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

Abstract

Aim and Background: Defensive barrier is important in preventing infection and disease progression caused by *E.coli O157:H7*. Among beneficial effects of probiotics, immune system modulation by producing cytokines is one of the most common reported benefits. The aim of this study was to investigate the *Lactobacillus acidophilus* probiotic effect on *il10* cytokine gene expression in Zebrafish infected with *E. coli O157:H7* as a laboratory model.

Materials and Methods: The 300 pieces of fish were grouped equally; control group (C1A1) received basic diet, group (B1A1) received basic diet and faced *E.coli O157:H7*, treatment 1 group (T1A1) received basic diet containing *L. acidophilus* and no exposure to *E. coli O157:H7*, treatment 2 group (T2A2) received basic diet containing *L. acidophilus* and exposed to *E. coli O157:H7*. During the 30-day period of testing, intestinal tissue samples were taken on days 15, 27 and 30 for *il10* gene expression and bacterial colonization studies.

Results: The findings indicated bacterial colonization in fish intestines. Also, the expression of *il10* gene in the experimental groups decreased after exposure to *E. coli O157:H7* ($P<0.01$). This decrement was less with the regulation of *il10* in the groups fed with *L. acidophilus* compared to the control group. In Zebrafish fed with *L. acidophilus*, the expression of the *il10* gene increased gradually (day15, day27 and 30; $P<0.01$).

Conclusion: Overall, the results showed that the *L. acidophilus* was able to increase *il10* gene expression, boost the immune system in Zebrafish as a laboratory model. Therefore, L. acidophilus La5 probiotic can be used as a possible useful candidate against *E. coli O157:H7*.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus* La5, Zebrafish, Interleukin-10, *Escherichia coli O157:H7*, Iau Science.

Corresponding author:
Molecular Biology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: rmirnejad@bmsu.ac.ir

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-07]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.1.1]

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۳ - شماره ۵۰ - بهار ۱۴۰۲
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بررسی تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر بیان ژن سیتوکین IL-10 در ماهی زبرا آلوده به *E. coli O157:H7*

سیده شقایق میرعبداله الهی[۱]، رضا میرنژاد*[۲]، رضا کاظم پور[۳]، فتاح ستوده نژاد نعمت الهی[۱]

۱. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشگاه سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج). تهران، ایران
۳. گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سد دفاعی سیستم ایمنی ذاتی و هومورال در پیشگیری از ایجاد عفونت و جلوگیری از پیشرفت بیماری ناشی از *E.coli O157:H7* در میزبان بسیار مهم هستند. در میان اثرهای متعدد و مفید پروبیوتیک‌ها، تعدیل سیستم ایمنی با تولید سیتوکین‌ها یکی از رایج‌ترین مزیت‌های گزارش شده در مورد آن‌ها است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدفیلوس بر بیان ژن سیتوکین IL-10 در ماهی زبرا آلوده به *E. coli O157:H7* به‌عنوان مدل آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها: در این پروژه ۳۰۰ قطعه ماهی به تعداد مساوی و تصادفی در۱۲ آکواریوم به‌صورت؛ گروه شاهد (*C1A1*) با دریافت جیره پایه، گروه (*B1A1*) با دریافت جیره گروه شاهد و مواجهه با *E.coli O157:H7*، تیمار۱ (*T1A1*) با دریافت جیره پایه حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و عدم مواجهه با *E.coli O157:H7* و تیمار۲ (*T2A2*) با دریافت جیره پایه حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و مواجهه با *E.coli O157:H7*، به‌مدت ۳۰ روز، گروه‌بندی شدند. در طی دوره سی روزه انجام آزمایش، در روزهای ابتدا، ۱۵، ۲۷ و ۳۰ نمونه‌برداری از بافت روده برای انجام مطالعه‌های بیان ژن IL-10 و کلونیزاسیون باکتری‌ها صورت گرفت.

یافته‌ها: یافته‌های مورد بررسی نشان‌دهنده کلونیزاسیون باکتری‌ها در روده ماهی بوده است. هم‌چنین بیان ژن IL-10 در گروه‌های آزمایش پس از مواجهه با *E. coli O157:H7* کاهش یافته است که همراه با تنظیم مجدد IL-10 در گروه‌های تغذیه شده با *L. acidophilus* در مقایسه با گروه کنترل این کاهش کم‌تر بوده است و در ماهی‌های زبرا تغذیه شده با *L. acidophilus* میزان بیان ژن IL-10 به‌تدریج افزایش یافت($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی نتایج این مطالعه نشان داد که پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* قادر به افزایش بیان ژن IL-10 بوده و در نتیجه منجر به تقویت سیستم ایمنی می‌گردد و بدین ترتیب اثرهای بسیار مفیدی در کاهش آسیب‌های بافتی ناشی از عفونت *E.coli O157:H7* در روده ماهی زبرا به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی به‌وجود خواهد آورد.

واژگان کلیدی: *Lactobacillus acidophilus* La5، ماهی زبرا، Interleukin 10، *E. coli O157:H7*. Iau Science.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها در سال‌های اخیر به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. استفاده از این ترکیب‌ها در درمان و پیشگیری از بیماری‌ها، به‌ویژه بیماری‌های دستگاه گوارش، نتایج مطلوبی را نشان داده است. امروزه استفاده از پروبیوتیک به-

نویسنده مسئول:
مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشگاه سیستم بیولوژی و مسمومیت‌ها
دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج). تهران، ایران
پست الکترونیکی: rmirnejad@bmsu.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۳۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-07]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.1.1]

عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک، برای مقابله و مصونیت در برابر پاتوژن-های روده‌ای رواج بیش‌تری یافته است (۱). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که به‌هنگام مصرف توسط موجودات زنده، قادرند با عملکرد خود اثرهای مفیدی در سلامتی میزبان داشته باشند. این موجودات مفید در دفع رقابتی و جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا در لوله گوارش میزبان با روش‌هایی از قبیل: ترشح ترکیب‌های بازدارنده رشد، رقابت برای کسب غذا و مکان و نیز تحریک سیستم ایمنی میزبان (از جمله کمپلمان و سیستم بیگانه خواری)؛ عمل می‌کنند. از جمله دیگرمزایای استفاده از این عوامل می‌توان به قیمت ارزان، فراوانی، کم خطر بودن (در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها) و در بعضی موارد تحریک سریع‌تر سیستم ایمنی میزبان (در مقایسه با واکسن‌ها) اشاره نمود (۲).

Escherichia coli O157: H7 یک تهدید در سطح جهانی برای سلامت عمومی بوده و در بسیاری از موارد در شیوع کولیت هموراژیک [1]، که در برخی موارد نیز منجر به مرگ و میر ناشی از سندرم همولیتیک اورمیک [2] می‌شود، دخیل است (۳،۴). سد دفاعی سیستم ایمنی ذاتی و هومورال در پیشگیری از ایجاد عفونت و جلوگیری از پیشرفت بیماری ناشی از *E.coli O157:H7* در میزبان بسیار مهم است. در میان اثرهای متعدد و مفید پروبیوتیک-ها، تعدیل سیستم ایمنی از طریق تولید سیتوکین‌های مختلف مانند IL-1، IL-2، , IL-10 و غیره یکی از رایج-ترین مزیت‌های گزارش شده در مورد آن‌ها است. تعدادی از مطالعه‌ها در ارتباط با اثرهای پروبیوتیک بر سیستم ایمنی، پاسخ‌های ایمنی مرتبط با فلور باکتریایی دستگاه گوارش را نشان داده‌اند که شامل افزایش سطح mRNA، TLR روده-ای (۵)، TNF-α (۷-۵)، IL-1β (۷،۵) و IL-8 (۸) در ماهی‌های تغذیه شده با پروبیوتیک است. از جمله اینترلوکین‌هایی که می‌تواند در مواجهه با عفونت‌ها به-خصوص *اشریشیاکلی O157* نقش مهمی داشته باشد IL-10 است IL-10. توسط ماکروفاژها و دندرتیک سل‌ها و برخی سلول‌های غیرلنفوئیدی تولید می‌شود و نقش مهاری دارد. این اینترلوکین یک تنظیم کننده مرکزی پاسخ به LPS در باکتری‌های گرم منفی نیز است (۹). به‌علت هم-ترازی این توالی پروتئینی با دیگر مهره داران، اندازه‌گیری بیان آن در بافت‌های مختلف در سطح mRNA و مطالعه-های اتصال درون سلولی گیرنده پروتئینی IL-10، توالی‌های به‌شدت حفاظت شده‌ای را در IL-10 نشان داده است که در طول تکامل نقش مهم IL-10 در دفاع ایمنی در برابر میکروب‌ها را آشکار می‌سازد (۱۲-۱۰). لذا با توجه‌به اهمیت این سایتوکاین در عفونت‌های باکتریایی گرم منفی (مانند *E.coli O157*) و با توجه‌به این‌که در مطالعه‌ها کمی اثر مصرف باکتری های پروبیوتیک بر بیان ژنهای مرتبط با ایمنی و محافظت در برابر عفونت حاد *E. coli O157: H7* در ماهی زبرا انجام شده است، این مطالعه به بررسی تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدفیلوس(*Lactobacillus acidophilus*) بر بیان ژن سیتوکین IL-10 در ماهی زبرا آلوده به *E. coli O157:H7* پرداخته است.

مواد و روش‌ها

باکتری‌ها و شرایط کشت

Lactobacillus acidophilus La5 متعلق‌به شرکت کریستین هنسن (Chr- Hansen) دانمارک از انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ایران خریداری شده و در محیط MRS مایع (Man Rogosa Sharpe Broth)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط میکروآئروفیل (CO_2 5%) به‌مدت ۴۸ ساعت ۱۵۰ دور در دقیقه کشت داده شد. *Escherichia coli O157: H7* PTCC 12900 از دانشکده دامپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران خریداری شد و در محیط مایع LB (Luria-Bertani) و به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس، ۲۰۰ دور در دقیقه کشت داده شد. برای انجام آزمون‌ها از هر دو باکتری *L.acidophilus La5* و *E. coli O157:H7* غلظت نهایی یکسانی از کدورت رشد ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) برابر با غلظت نیم مک فارلند تهیه گردید (۱۳،۱۴).

مدل حیوانی

در این آزمون در ابتدا تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی زبرای بالغ (*Danio rerio*) با وزن متوسط ۱±۴گرم از مرکز آبزی پروری شهریار ایران خریداری شد. این ماهی‌ها در یک سیستم آبزی پروری چرخشی در دمای ۰/۵ ± ۲۸ درجه سلسیوس، با ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی در مخازن نگهداری می‌شدند. جریان آب ورودی کمابیش ۱ لیتر در دقیقه بود و در آزمایش میکروبی آب آکواریوم‌ها

[1] Haemorrhagic colitis
[2] Haemolytic uraemic syndrome

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-07]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.1.1]

عاری از باکتری‌های کلی فرم بود. ماهی‌ها دو بار در روز با جیره پایه غذایی ماهی زبرا با نام تجاری تترا (ساعت ۸:۳۰ صبح و ۵:۳۰ بعد از ظهر) تغذیه شدند. تمام شرایط فیزیکوشیمیائی آب آکواریوم‌ها قبیل دمای آب و pH و هوادهی در طول آزمایش ۳۰ روزه ثابت نگه داشته شد (۱۵).

طراحی آزمون

برای انجام این آزمون در ابتدا ماهی‌ها به‌صورت تصادفی و مساوی در ۱۲ تانک تقسیم شدند. در این آزمون ماهی‌ها به ۴ گروه (یک گروه کنترل و ۳ گروه آزمایش) تقسیم شدند، که به‌صورت زیر نامگذاری شد:

۱- گروه کنترل (C1A1): در این گروه از جیره غذایی پایه استفاده شد. ۲- گروه آزمایشی (T1A1): در این گروه جیره غذایی پایه مخلوط شده با سوسپانسیون *L. acidiphilus* در غلظت (CFU/ml $۱/۵\times ۱۰^{۸}$) تغذیه شدند. ۳- گروه آزمایشی (T2A2): در این گروه جیره غذایی پایه مخلوط شده با *L. acidiphilus* تغذیه شد و با *E. coli O157 :H7* در روز ۲۷ به بعد به چالش کشیده شدند. ۴- گروه آزمایش (B1A1): در این گروه با رژیم غذایی پایه تغذیه شدند و با *E. coli H7: O157* در روز ۲۷ به بعد به چالش کشیده شدند.

تعیین کلونیزاسیون لاکتوباسیل های روده

برای تعیین میزان کلونیزاسیون باکتری‌ها در روده، یکبار در روز ابتدا (صفر) قبل از تیمار با پروبیوتیک به‌عنوان شاهد و سپس پس از تیمار با *L. acidiphilus* در دو گروه دریافت کننده پروبیوتیک (T1A1,T2A2) پس از روز بیست و هفتم و در پایان روز سی ام پس از مواجهه با باکتری بیماری‌زا در گروه مورد نظر (T2A2)، از هر گروه ۴ ماهی قربانی شد و در مجموع ۴۸ قطعه از روده آن‌ها نمونه‌برداری شد. هر نمونه روده با PBS همگن شد و از مخلوط هموژن رقت‌های سریالی با PBS تهیه شد. رقت سریالی تهیه شده در پلیت MRS agar در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت در شرایط میکروآئروفیل (CO_2 5%) کشت داده شد. میانگین تعداد باکتری‌های زنده (CFU) شمارش شده در پلیت MRS agar در نمونه‌ها به عنوان تعداد لاکتوباسیلوس محاسبه شد و شناسایی میکروسکوپی و ماکروسکوپی و تستهای تائید کننده بیوشیمیایی مطابق دستورالعمل استاندارد شناسایی لاکتوباسیلوس‌ها (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) انجام گرفت (۱۶).

برای شناسائی *E. coli O157:H7* رقت سریالی تهیه شده روی محیط کشت مک‌کانکی آگار و EMB آگار کشت داده شدند و بعداز انکوباسیون در ۳۷درجه سلسیوس با استفاده از رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیائی مطابق دستورالعمل استاندارد شناسایی *E.coli O157:H7* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)تأیید شدند (۱۶).

بررسی بیان ژن IL-10

بافت‌های روده‌ای در روزهای صفر، ۱۵، ۲۷ و ۳۰ از هر ۴ گروه آزمایش، نمونه‌برداری شد و بلافاصله در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. در مرحله بعد با استفاده از پروتکل Wizol ((Cinnagen)، ایران) RNA استخراج گردید. برای تأیید RNA استخراج شده از ژل الکتروفورز و نانودراپ استفاده گردید.

برای تهیه cDNA از پروتکل تجاری شرکت فرمنتاز استفاده گردید. بدین صورت‌که ۵ میکرولیترRNA (۵۰ng/µl) را با ۱ میکرولیتر پرایمر Random hexamer ترکیب نموده و با آب مقطر به حجم ۱۲ رسانده شد، ۵ ثانیه Spim نموده و به‌مدت ۵ دقیقه محلول را در ۷۰ درجه‌سلسیوس انکوبه شد. سپس نمونه را روی یخ قرارداده و ۴ میکرولیتر بافرRT ($MgCl_2$ and DTT) با ۱میکرولیتر محلول dNTP (۱۰ میلی‌مولار) و ۱میکرولیتر محلول Ribolock به آن اضافه گردید. سپس به‌مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید، دوباره ۱ میکرولیتر Reverse Transcriptase RNase-H اضافه نموده و به‌ترتیب در ۴۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ ساعت، ۱۰دقیقه در ۲۵ درجه و ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت cDNA به‌دست آمده در داخل فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. لازم به‌ذکر است که از ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن مرجع و از ژن IL-10 ماهی زبرا به‌عنوان ژن هدف استفاده شد که توالی پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده اند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-07]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.1.1]

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای بررسی بیان ژن بتا اکتین و IL-10

	سکانس	طول قطعه (bp)
F (actb2)	CCTTCTTGGGTATGGA ATCT	۱۹۴
R (actb2)	GATCTTGATCTTCATTGTGCTA	
F(IL-10)	CATTTGTGGAGGGCTTTC	۱۳۷
R(IL-10)	ATAGGGACTGTTTATGTTATGTT	

واکنش Real time PCR با استفاده از SYBR Green PCR Master Mix (WisPure) با حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر(جدول ۲) در دو تکرار با برنامه زمانی و دمایی به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ °C و به‌دنبال آن ۳۵ چرخه به‌مدت ۳۰ ثانیه در ۹۵ ° C، ۳۰ ثانیه در ۶۰ ° C و ۳۰ ثانیه در ۷۲ ° C انجام گردید. در نهایت منحنی استاندارد با ترسیم مقادیر cDNA ورودی به مقادیر CT حاصل از دامنه رقیق سازی نمونه‌های cDNA (۱۰۰پیکوگرم، ۱ نانوگرم، ۱۰ نانوگرم، ۱۰۰ نانوگرم، ۱ میکروگرم،۱۰ میکروگرم) طبق برنامه زمانی و دمایی Real time PCR فوق جهت بررسی کارایی پرایمر با شیب خط R^2= ۰/۹۷۴۶ برای IL-10 و R^2= ۰/۹۶۷۷ برای بتا اکتین به‌عنوان Reaction Efficiency با نرم‌افزار MS-Excel به‌دست آمد (۱۷).

جدول ۲. مواد مورد استفاده برای واکنش Real time-PCR

مواد واکنش	برای یک واکنش بر حسب میکرولیتر
RealQ Plus 2X Master MIX Green	۱۰
Primer F (10 pmol/µl)	۱
Primer R (10 pmol/µl)	۱
PCR-grade H2O (DEPC Water)	۶
cDNA (20 ng/µl)	۲
TOTAL volume	۲۰

تجزیه و تحلیل آماری

بیان نسبی ژن IL-10 با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ پس از نرمال سازی نسبت‌به ژن مرجع بتا اکتین با نرم‌افزار آنالیز REST (۲۰۰۹ V2.0.13) (P< ۰/۰۵) محاسبه شد و نمودار تغییرهای بیان ژن (Fold change) در گروه‌های مورد آزمایش رسم گردید.

یافته‌ها

شناسایی *L. acidophilus* در نمونه‌های روده ماهی زبرا

نتایج کشت نمونه روده‌ها جهت برسی کلونیزاسیون نشان داد که هیچ‌گونه *L. acidophilus La5* در روده‌های ماهی (شاهد C1A1) و در نمونه‌برداری از سه گروه آزمایش (B1A1، T2A2،T1A1) در روز صفر وجود ندارد. با این حال در روز ۲۷ پس از تغذیه با پروبیوتیک، تعداد میانگین *L. acidophilus* شمارش شده در رقت‌های سریالی تهیه شده از بافت هموژن شده روده ماهیان زبرا در گروه آزمایش

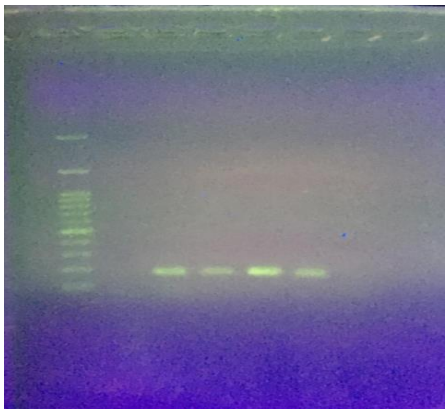
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-07]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.1.1]

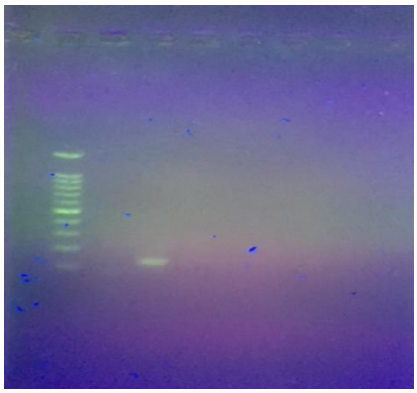
T1A1 (۹/۷×۱۰^۷ CFU/fish) و در گروه T2A2 (۸/۹×۱۰^۷ CFU/fish) و در روز ۳۰ در گروه آزمایش T1A1(۷/۶×۱۰^۷CFU/fish) و در گروه آزمایش T2A2 پس از سه روز مواجهه با عامل بیماری‌زا (CFU/fish ۱/۶×۱۰^۷) بود که نشان دهنده کلونیزاسیون باکتری‌ها در روده ماهی زبرا است.

نتایج سنتز cDNA

نتایج PCR برروی ژل الکترفورز و مشاهده قطعه‌ای با وزن مولکولی 194bp (نشان‌دهنده سنتز DNA ژن بتااکتین) و مشاهده قطعه‌ای با وزن مولکولی 137 bp(نشان‌دهنده سنتز DNA اینترلوکین۱۰) سنتز cDNA را تأیید می-نماید.



شکل ۱. نتیجه الکترفورز ژن بتااکتین و مشاهده قطعه به‌طول ۱۹۷ bp در ژل آگارز بر مبنای الگوی Ladder DNA electrophoresis، SINACOLON. چاهک اول لدر (bp۱۰۰) ، چاهک دوم کنترل منفی، چاهک سوم تا پنجم نمونه‌های مثبت حاوی ژن بتااکتین.



شکل ۲. نتیجه الکترفورز ژن اینترلوکین ۱۰ و مشاهده قطعه به طول ۱۳۷ bpدر ژل آگارز بر مبنای الگوی Ladder DNA electrophoresis، SINACOLON. چاهک اول لدر (bp۱۰۰) ، چاهک دوم کنترل منفی، چاهک سوم حاوی ژن اینترلوکین ۱۰.

تأثیر سویه *L. acidophilus* بر بیان ژن IL-10

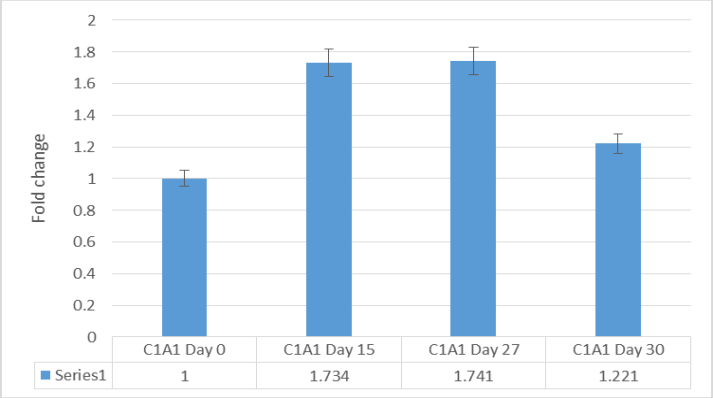
به‌منظور ارزیابی بیان ژن IL-10 در ماهی زبرا، در این مطالعه در ۴ گروه آزمایش شامل C1A1، T1A1، T2A2 و B1A1 تغییرهای بیان ژن را در روز ۱۵، ۲۷ و ۳۰ نسبت-

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-07]

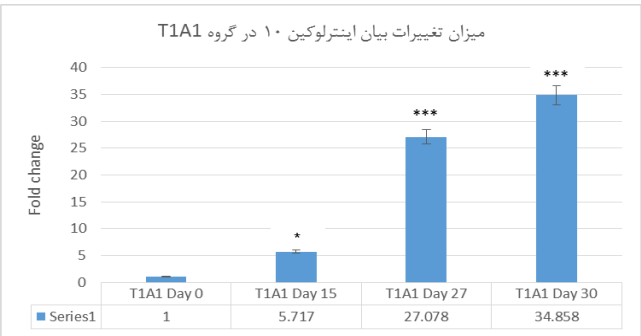
[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.1.1]

به روز صفر همان گروه به‌عنوان شاهد مورد بررسی قرار گرفت که آن نشان می‌دهد که در گروه کنترل C1A1 نسبت‌به شاهد (روز صفر) در سطح رونویسی IL-10 تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (شکل ۳).

علاوه‌بر این، سطح بیان ژن IL-10 در روزهای ۱۵ (p ۰/۰۵ >)، ۲۷ (p <۰/۰۰۱) و ۳۰ (p <۰/۰۰۱) نسبت‌به شاهد (روز صفر) در گروه T1A1 به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۴). بیان ژن IL-10 در گروه B1A1 تا روز ۲۷ قبل از مواجهه با عامل بیماری‌زا نسبت‌به شاهد (روز صفر) تغییر معنی‌داری نداشت ولی پس از سه روز چالش با *E. coli H7* *O157* در روز ۳۰ به‌طور معنی‌داری (p < ۰/۰۰۱) کاهش یافت (شکل ۵). علاوه بر این ، در گروه T2A2 (شکل ۶) و T1A1 (شکل ۴) پس از دریافت *L. acidophilus*، سطح بیان IL-10 به تدریج در روزهای ۱۵ (p <۰/۰۵)، ۲۷ و ۳۰ (p <۰/۰۰۱) افزایش معنی‌داری را در مقایسه با شاهد (روز صفر) نشان داد و در گروه T2A2 بیان ژن IL-10 پس از چالش سه روزه با *E. coli O157:H7* در روز ۳۰ کاهش یافت؛ ولی در مقایسه با شاهد (روز صفر) معنی‌دار نبود (شکل ۶). لذا مشاهده شد که این کاهش بیان ژن IL-10 در روز ۳۰ در گروه T2A2 (شکل ۶) در مقایسه با B1A1 (شکل ۳) کم‌تر بود.



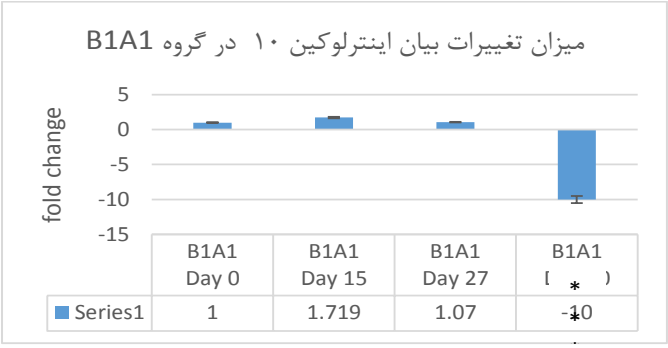
شکل ۳. مقایسه میزان تغییرهای بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در گروه C1A1 (کنترل): دریاقت کننده جیره پایه، در روزهای صفر (شاهد) ۲۷،۱۵ و ۳۰ با روش Real time PCR با دو تکرار، آنالیز REST، Series1: میزان بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در مقایسه با کنترل



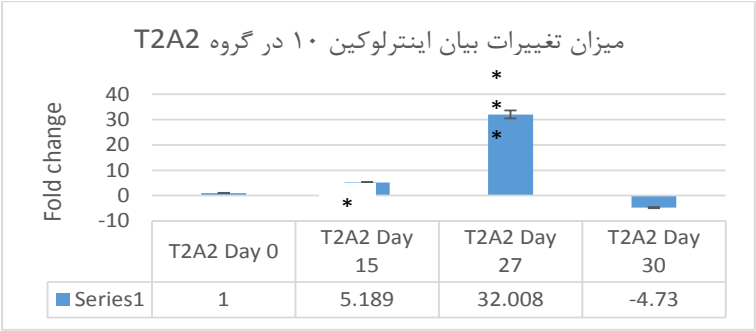
شکل ۴. مقایسه میزان تغییرهای بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در گروه تیمار T1A1: دریاقت کننده جیره پایه همراه با پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5*، در روزهای صفر (شاهد: بدون دریافت پروبیوتیک) ۲۷،۱۵ و ۳۰ : (دریافت کننده جیره پایه همراه با پروبیوتیک) با روش Real time PCR با دو تکرار، آنالیز REST، Series1. (0.05 : میزان بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در مقایسه با کنترل، $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-07]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.1.1]



شکل ۵. مقایسه میزان تغییرات بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در گروه B1A1: دریاقت کننده جیره پایه همراه با ارائه به E.coli O157 از روز ۲۷ به بعد، در روزهای صفر(شاهد: دریافت کننده جیره پایه)، روز۱۵ (دریافت کننده جیره پایه)، روز۲۷ (دریافت کننده جیره پایه) و روز ۳۰ : (دریافت کننده جیره پایه و ارائه به *E.coli O157:H7*، با روش Real time PCR با دو تکرار، آنالیز REST،Series1 : میزان بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در مقایسه با کنترل،(***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05).



شکل۶. مقایسه میزان تغییرات بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در گروهT2A2 :دریاقت کننده جیره پایه و پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5* همراه با ارائه به *E.coli O157:H7* از روز ۲۷ به بعد، در روزهای صفر(شاهد: دریافت کننده جیره پایه)، روز۱۵ (دریافت کننده جیره پایه و پروبیوتیک)، روز۲۷ (دریافت کننده جیره پایه و پروبیوتیک) وروز ۳۰ : (دریافت کننده جیره پایه و پروبیوتیک همراه با ارائه به *E.coli O157:H7*، با روش Real time PCR با دو تکرار، آنالیزز REST: Series1: میزان بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در مقایسه با کنترل،(***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05)

بحث

پروبیوتیک‌ها باکتری‌های زنده‌ای هستند که با تعدیل فلور میکروبی روده باعث بهبود سلامت میزبان می‌شوند، با این وجود مکانیسم دقیق تقویت رشد و تنظیم پاسخ ایمنی آن ها به خوبی درک نشده است (۱۸). از طرفی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز منجر به توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ضرر زیست محیطی می‌گردد. بنابراین، امروزه پروبیوتیک‌ها به‌طور گسترده برای کنترل بیماری و بهبود پاسخ ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۹).

در مطالعه حاضر، ماهیان زبرا با سویه‌های *Lactobacillus acidophilus La5* به‌عنوان پروبیوتیک آلوده شدند و تأثیر *L. acidophilus* در محافظت در برابر *Ecoli.O157: H7* از نظر ایمنولوژیکی با تأثیر بربیان ژن IL-10 به‌عنوان یکی از مهم‌ترین سایتوکاین‌های ضد التهاب در مواجهه با باکتری‌های گرم منفی بررسی گردید. در این مطالعه مشخص گردید که باکتری *L. acidophilus La5* می‌تواند در روده ماهی زبرا کلونیزه شود و ماهی‌های زبرا که به *E. coli O157:H7* آلوده شده بودند نسبت‌به سایر گروه‌هایی که پروبیوتیک دریافت نکرده بودند به‌خوبی علیه عفونت از نظر ایمنی محافظت شدند که این مشابه مطالعه Helwig و همکارانش است که بیان نمودند سویه‌های منتخب پروبیوتیک‌ها می‌توانند عملکرد ایمنی مخاطی و سیستمیک را در بسیاری از سطوح از جمله تحریک تولید IL-10 مخاطی را تحت تأثیر قراردهند و مانع کلونیزاسیون سایر ارگانیسم‌ها شوند (۲۰). هم‌چنین Wang و همکاران در مطالعه‌ای ایمنی مخاطی ماهی زبرا را بعد از تغذیه با دو باکتری اسید لاکتیک ارزیابی کردند. نتایج مطالعه آن‌ها

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-07]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.1.1]

نشان داد که باکتری‌های اسید لاکتیک ضمن کلونیزاسیون مناسب در روده ماهی، باعث تنظیم IL-10 و TNF-α در ماهی زبرا می‌شوند و گزارش نمودند که باکتری‌های اسید لاکتیک، در حفاظت، افزایش سطح ایمنی، تحریک پاسخ ضدالتهابی و بازسازی مخاط روده برای محافظت از ماهی زبرا در برابر عفونت نقش دارند (۲۱). Sherman و همکاران در مطالعه‌ای دریافتند که پروبیوتیک‌ها با کلونیزاسیون در غشای مخاطی روده با کاهش اثر القا شده توسط پاتوژن و افزایش مقاومت الکتریکی اتصالات محکم سلول‌های اپیتلیال روده، از آسیب های ناشی از :*Escherichia coli* O157 H7 و H6 :*E. coli O127* به سلول‌های اپیتلیال روده جلوگیری می‌کنند که نشان می‌دهد کلونیزاسیون پروبیوتیک‌ها در روده باعث کاهش اثر بیماری‌زایی پاتوژن می‌گردد (۲۲).

مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها (مانند باکتری‌های اسید لاکتیک) می‌توانند به‌طور مؤثری بیان سیتوکین‌های التهابی مانند IL-1، IL-6، IL-12، TNF-α ، گاما اینترفرون (IFN-γ) را تنظیم کنند (۲۴،۲۳). سیتوکین‌های ضد التهابی مانند IL-10 را افزایش دهند که نتایج این مطالعه هم این موضوع را تأیید می‌نماید. در مطالعه حاضر، بیان ژن‌های IL-10 به‌طور قابل توجهی در روده ماهی زبرا که با *L. acidophilus* تحت درمان قرار گرفتند، افزایش یافت و از آنجا که IL-10 به‌عنوان ضد التهاب عمل می‌کند، لذا می‌توان گفت *L. acidophilus* La5 باعث بهبود سیستم ایمنی شده است، اما میزان بیان سیتوکین ضد التهاب IL-10 در گروه T2A2 و B1A1 پس از مواجهه با *E.coli O157:H7* نسبت‌به گروه‌های دیگر نسبت‌به گروه کنترل کاهش یافت که این امر ناشی از اثرهای باکتری پاتوژن بر بیان IL-10 است، ولی از آنجا که این کاهش بیان ژن در گروه T2A2 کم‌تر بود پس بیانگر این است که بیان ژن IL-10 به‌عنوان یک ضد التهاب در گروه دریافت کننده پروبیوتیک تحت تأثیر کم‌تری در مواجهه با پاتوژن در مقایسه با B1A1 که هیچ‌گونه تیمار پروبیوتیکی نداشته است قرار گرفته است، لذا *L. acidophilus La5* موجب تقویت سیستم ایمنی در ماهی زبرا و محافظت علیه عفونت *E.coli O157:H7* شده است.

همانند مطالعه Sanchez و همکاران (۲۰۱۱) نتایج این مطالعه نشان داد که در گروه‌های تحت درمان با پروبیوتیک افزایش میزان بیان ژن‌های IL-10 در بافت روده ماهی مشاهده می‌گردد که این می‌تواند به‌دلیل مکانیسم کاهش تنظیم روند التهاب ناشی از تأثیر افزایش IL-10 باشد، پس می‌توان گفت مصرف پروبیوتیک با تأثیر بر سایتوکاین IL10 می‌تواند باعث کاهش التهاب گردد. هم‌چنین در مطالعه مشابه با تحقیق حاضر بیان ژن های اینترلوکین‌های مختلف ازجمله IL-10 در بافت کلیه ماهی قزل آلای رنگین کمان تیمار شده توسط چند پروبیوتیک‌های لاکتیکی با روش مشابه روش Real time PCR افزایش بیان ژن قابل توجهی را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. این محققان دریافتند L. garvieae بهتر از دیگر پروبیوتیک‌ها می‌تواند با تحریک پاسخ ایمنی مقاومت را در برابر بیماری‌ها ایجاد کند، لذا نتیجه گرفتند افزایش بیان ژن‌های سایتوکاین‌های نامبرده توسط پروبیوتیک با تقویت سیستم ایمنی در ارتباط است (۸).

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج این مطالعه نشان داد که پروبیوتیک *L. acidophilus La5* قادر به افزایش بیان ژن IL-10 بوده و در نتیجه منجر به تقویت سیستم ایمنی می‌گردد و بدین ترتیب اثرهای بسیار مفیدی در کاهش آسیب‌های بافتی ناشی از عفونت *E.coli O157:H7* در روده ماهی زبرا به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی به‌وجود خواهد آورد. لذا پروبیوتیک *L. acidophilus La5* می‌تواند یک کاندید احتمالی مناسب علیه *E. coli O157: H7* به‌کار رود که در کنترل بیماری به‌خصوص در آبزیان مؤثر است، با این وجود ، مطالعه‌های بیش‌تری لازم است.

سپاسگزاری

ما از همه کسانی که در این مقاله مشارکت داشته اند تشکر می‌کنیم.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-07]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.1.1]

منابع

1. Culligan EP, Hill C, Sleator RD. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. Gut Pathog. 2009;1(1):1-12.

2. fazeli s, ghasmian h, mirnzhad r. Reduction of colonization of Enterotoxigenic Escherichia Coli (ETEC (in mice by Probiotic (Lactobacillus casei. J Shahrekord Univ Med Sci. 2004;6(1):26-33

3. Reinisch KM, Nibert ML, Harrison SC. Structure of the reovirus core at 3.6? Å resolution. Nature. 2000;404(6781):960-7.

4. Grimes JM, Burroughs JN, Gouet P, Diprose JM, Malby R, Ziéntara S, et al. The atomic structure of the bluetongue virus core. Nature. 1998;395(6701):470-8.

5. Standen B, Peggs D, Rawling M, Foey A, Davies S, Santos G, et al. Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, Oreochromis niloticus. Fish Shellfish Immunol. 2016;49:427-35.

6. Standen B, Rawling M, Davies S, Castex M, Foey A, Gioacchini G, et al. Probiotic Pediococcus acidilactici modulates both localised intestinal-and peripheral-immunity in tilapia (Oreochromis niloticus). Fish Shellfish Immunol. 2013;35(4):1097-104.

7. Liu W, Ren P, He S, Xu L, Yang Y, Gu Z, et al. Comparison of adhesive gut bacteria composition, immunity, and disease resistance in juvenile hybrid tilapia fed two different Lactobacillus strains. Fish Shellfish Immunol. 2013;35(1):54-62.

8. Pérez-Sánchez T, Balcázar JL, Merrifield DL, Carnevali O, Gioacchini G, de Blas I, et al. Expression of immune-related genes in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) induced by probiotic bacteria during Lactococcus garvieae infection. Fish Shellfish Immunol. 2011;31(2):196-201.

9. Berg DJ, Kühn R, Rajewsky K, Müller W, Menon S, Davidson N, et al .Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. J Clin Invest. 1995;96(5):2339-47.

10. Grayfer L, Belosevic M. Identification and molecular characterization of the interleukin-10 receptor 1 of the zebrafish (Danio rerio) and the goldfish (Carassius auratus L.). Dev Comp Immunol. 2012;36(2):408-17.

11. Piazzon MC, Wentzel AS, Tijhaar EJ, Rakus K, Vanderplasschen A, Wiegertjes GF, et al. Cyprinid herpesvirus 3 Il10 inhibits inflammatory activities of carp macrophages and promotes proliferation of Igm+ B cells and memory T cells in a manner similar to carp Il10. The Journal of Immunology. 2015;195(8):3694-7.۰۴

12. Zhang D-C, Shao Y-Q, Huang Y-Q, Jiang S-G. Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the zebrafish (Danio rerion). BMB Reports. 2005;38(5):571-6.

13. Wood AW, Duan G, Bern HA. Insulin-like growth factor signaling in fish. International review of cytology. 2005;243(1):215-85.

14. Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. New York. 2004.

15. Roosta Z, Hajimoradloo A, Hoseinifar SH, Vakili F. Effect of different levels of Lactobacillus acidofilus as a probiotic on the anti-bacterial activity of mucus and non-specific immune of mucus in Tiger Barb (Puntius tetrazona). Journal of Aquatic Ecology. 2013;3(2):20-13.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-07]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.1.1]

16. DeVos P. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2-nd ed. London, NewYork: Springer. 2009;3:144-257.

17. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome biology. 2002;3(7):1-12.

18. Yadav M, Mandeep, Shukla P. Probiotics of diverse origin and their therapeutic applications: a review. Journal of the American College of Nutrition. 2020;39(5):469-79.

19. Zang L, Ma Y, Huang W, Ling Y, Sun L, Wang X, et al. Dietary Lactobacillus plantarum ST-III alleviates the toxic effects of triclosan on zebrafish (Danio rerio) via gut microbiota modulation. Fish & shellfish immunology. 2019;84:1157-69.

20. Helwig U, Rizzello F, Cifone G, Venturi A ,D'Ab S, Peruzzo S, et al. Elevated IL-10 levels in pouch-tissue after probiotic therapy. Immunol Lett. 1999;69:159.

21. Wang Y, Bu L, Yang L, Li H, Zhang S. Identification and functional characterization of fish-egg lectin in zebrafish. Fish & Shellfish Immunology. 2016;52:23-30.

22. Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, Ngo PS, Goulet J, Tompkins TA. Probiotics reduce enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7-and enteropathogenic E. coli O127: H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. Infect Immun. 2005;73(8):5183-8.

23. Falalyeyeva T, Leschenko I, Beregova T, Lazarenko L, Savchuk O, Sichel L, et al. Probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria alter pro-and anti-inflammatory cytokines production in rats with monosodium glutamate-induced obesity. receptor. 2017;4:2.

24. Reyes-Becerril M, Salinas I, Cuesta A, Meseguer J, Tovar-Ramirez D, Ascencio-Valle F, et al. Oral delivery of live yeast Debaryomyces hansenii modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (Sparus aurata L.). Fish Shellfish Immunol. 2008;25(6):731-9.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-07]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.1.1]

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-07]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.1.1]