Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (2): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652

Effect of Aeromonas Hydrofila on Interleukin 10 Gene Expression of Liver, Spleen and Muscle Tissue in Common Carp Fish

Abeer M.J.[1] **Muthana S. Al-Azawi[2]** **Bashar Abdul-Hussain Al-Sa'adi[3]**

1. Al-furat Al-awsat Technical University ,Technical College of Al-Mussaib com.bash2@atu.edu.iq
2. Al-furat Al-awsat Technical University ,Technical College of Al-Mussaib com.bash2@atu.edu.iq
3. Al-furat Al-awsat Technical University ,Technical College of Al-Mussaib, ellewialsaadi@yahoo.co.uk

Article Information
Submission date: 4/11 / 2019
Acceptance date: 17 /2/ 2020
Publication date: 31/ 6 / 2020

Abstract

The study was conducted in the laboratory of fish belonging to the Department of Animal Production at the Technical College of Musayyib for the period from February 23 to March 16/2019 , the experiment included four treatments, namely control treatment (t1) and salt group (t2) and live bacteria group (t3) and killed bacteria group (t4), by 20 A common carp *Caprinus Carpio* fish per treatment.the aim of the study was to identify the effect of bacterial infection in the gene expression of the gene IL-10 and compare this expression between three tissues, namely liver, spleen and muscle tissue .Regarding the gene expression of the IL-10 gene, the treatment of live bacteria (t3) showed the highest gene expression compared to the rest of the liver, but it But it made little difference with the B-actin gene (23.71). In the spleen, the gene expression of the IL-10 gene was highest in the fourth treatment (t4) (23.29), but it was lower than the comparison gene B-actin (25.76) for the same treatment. In muscular tissue, the gene expression of IL-10 was higher in the control treatment (t1) compared to the rest of the treatments, but Gene expression was the least in the comparison gene β-actin compared to the rest of the treatments. Regarding the relative expression of the IL-10 gene (relative to the comparison gene and control treatment) in the liver, the live bacterial treatment (t3) recorded the highest relative expression of the IL-10 gene (728.6) followed by the treatment of the killed bacteria (t4) (22.86) by a highly difference from Salt (t2) (1.16) . in the spleen, the treatment of the bacteria killed (t4) was the highest relative expression (2112.8) by a highly difference with the second and third treatments (15.5,3.09 respectively). In muscle tissue, the relative expression of the IL-10 gene in second, third and fourth treatments were lowest than in the control treatment relative to the β-actin gene. We conclude that the highest expression of the IL-10 gene appeared in the liver when bacterial infection occurred and was not the case in the spleen and muscle tissue.

Keyword : common carp fish *Caprinus Carpio* ,IL-10 gene ,β-actin gene

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (2): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652

تأثير الأصابة ببكتريا Aeromonas Hydrofila في أختلاف تعبير الجين انترلوكين 10 لأنسجة الكبد والطحال والنسيج العضلي لدى اسماك الكارب الأعتيادي

عبير محسن جاسم مثنى صباح العزاوي بشار عبد الحسين السعدي

قسم تقنيات الانتاج الحيواني – كلية التقنية المسيب – جامعة الفرات الاوسط التقنية

الخلاصة

أجريت الدراسة في مختبر الأسماك العائد لقسم الأنتاج الحيواني في الكلية التقنية المسيب للمدة من 23 شباط الى 16 اذار 2019 , تضمنت التجربة أربع معاملات وهي كل من معاملة السيطرة (t1) والملح (t2) والبكتريا الحية (t3) والبكتريا المقتولة (t4) , بواقع عشرين سمكة من نوع الكارب الاعتيادي *Caprinus Carpio* لكل معاملة. كان الهدف من الدراسة معرفة أثر الأصابة البكتيرية في التعبير الجيني لجين IL-10 ومقارنة هذا التعبير بين ثلاث انسجة وهي الكبد والطحال والنسيج العضلي, فقد سجلت معاملة البكتريا الحية(t3) أعلى تعبير جيني مقارنة ببقية المعاملات في الكبد الا ان الفارق كان قليلا مع جين المقارنه بيتا اكتين بمقدار (β-actin) (23.71) . أما في الطحال فكان التعبير الجيني لجين IL-10 الاعلى في المعاملة الرابعة (t4) بمقدار (23.29) ألا انها كانت أقل من جين المقارنة β-actin (25.76) لنفس المعاملة. أما في النسيج العضلي فقد كان التعبير الجيني لجين IL-10 فكان الاعلى في معاملة السيطرة (t1) مقارنة ببقية المعاملات فيما كان التعبير الجيني هو الأقل لجين المقارنة β-actin مقارنة ببقية المعاملات . أما فيما يخص التعبير النسبي لجين IL-10 (نسبه الى جين المقارنة ومعاملة السيطرة) في الكبد سجلت معامله البكتريا الحية (t3) أعلى تعبير نسبي للجين IL-10 (728.6) تلتها معاملة البكتريا المقتولة (t4) وبواقع (22.86) وبفارق كبير عن معاملة الملح (t2) (1.16) أما في الطحال فقد سجلت معاملة البكتريا المقتولة (t4) أعلى تعبير نسبي (2112.8) وبفارق كبير عن المعاملتين الثانية والثالثة (155,3.09 على التوالي) .اما في النسيج العضلي فقد كان التعبير النسبي لجين IL-10 في المعاملات الثانية والثالثة والرابعة أقل مما هي عليه في معاملة السيطرة نسبة الي جين المقارنة بيتا اكتين. نستنتج ان اعلى تعبير للجين IL-10 قد ظهر في الكبد عند حدوث الاصابة البكتيرية ولم يكن كذلك في الطحال والنسيج العضلي .

الكلمات الدالة: أسماك الكارب الاعتيادي, جين أنترلوكين10, جين بيتا اكتين

المقدمة

أصبحت الثروة السمكية ذات مردود اقتصادي كبير في تطور البلدان اذ تمثل مصدرا من مصادر البروتين الحيواني الذي تحتاجه الشعوب في استهلاكها الغذائي (1)، وتتميز لحوم الأسماك بقيمتها الغذائية العالية لارتفاع محتواها من الاحماض الامينية والعديد من المعادن المهمة لبناء العضلات والأنسجة كالكالسيوم والفسفور، فضلا عن الفيتامينات ونسبة عالية من الأحماض الدهنية غير المشبعة إذ تتركز الأخيرة في دهون الاسماك وتؤدي دورا مهما في خفض نسبة الكولسترول

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (2): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652

في الدم ومن ثم الوقاية من أمراض القلب (2). تعد امراض الاسماك من اهم الاسباب التي تقيد التطور في الانتاج السمكي لذا كانت هناك حاجة لايجاد محاولة تعديل النظام المناعي في الاسماك. واجريت لذلك دراسات عدة لمعرفة تأثير الاصابات البكتيرية في مناعة الاسماك(3) . تعد بكتريا Aeromonas Hydrofila من بين اكثر انواع البكتريا شيوعاً في المياه العذبة و المياه المستخدمة للانسان وتسبب تسمم الدم النزفي في المضيف و ترتبط زيادة المرض في المقام الاول مع المواد العضوية الزائدة في المياه و الاجهاد و الالتهابات (4). ان الامراض البكتيريا في بحيرات الاسماك تأتي من البيئة الملوثة و مستوى الصحة العامة للاسماك و يمكن ان تكون البيئة نظيفة و صحة الاسماك طبيعية عندها يعود الاتزان دون الحاجة الى مضادات حيوية (5) . ولدراسة مناعة الأسماك لابد من دراسة الاجسام المناعية المسؤولة عن ذلك ومنها الانترلوكينات وهي سيتوكينات وظيفتها التواصل بين الخلايا المناعية فيما بينها بحيث يكون عملها المشترك موجهاً نحومقاومة مسبب المرض (6) . ولابد ان هذه الاجسام المناعية تقع تحت سيطرة جينات مسؤولة عنها ومن هذه الجينات المناعية جين انترلوكين10 وهو سايتوكين متعدد التنظيم تنتجه الخلايا البيض و CD4+ T cells والبلاعم و الخلايا الاحادية و هناك مصادر اخرى غير مناعية تنتج IL-10 و هي الخلايا الطلائية. انتاج IL-10 يعتمد على عوامل متعددة منها النسيج و مرحلة الاستجابة المناعية (7) ، ان فعالية هذا السايتوكين تحدد و تنهي الاستجابة المناعية وتحددها كي تمنع الضرر الناجم عن استجابة المضيف للالتهاب و هو قادر على خفض تنظيم الاستجابة المناعية مما يجعله ذا قيمة لدى المسبب المرضي و العديد من جينات الفايروسات تعمل على استغلال جين IL-10 في تراكيبهما الوراثية لتنظيم الاستجابة المناعية. عند حصول الاستجابة المناعية لدى المضيف تمارس الوظيفة البايلوجية الرئيسية لـIL-10 على الخلايا الجذعية و البلاعم و الخلايا الحبيبية المتعادلة و التمايز في احادية الخلية عند الالتهاب و تنشيط تعبير MHCII(8). ان فعالية IL-10 المضادة للالتهاب ليس فقط محددة في النظام المناعي انما كذلك تنشيط $CD4^+$ T cells, IL2 (9)، و تصنيع IFN بواسطة الخلايا Th1 cells، و تصنيع IL4 و IL5 بواسطة الخلايا المساعدة Th2(10) . ولأهمية هذا الجين فأن هدف الدراسة هو معرفة تأثير الاصابة البكتيرية على التعبير الجيني للجين المناعي IL-10 ومدى اختلاف انسجة الكبد والطحال والنسيج العضلي في مستوى هذا التعبير .

المواد وطرائق العمل

1- اسماك التجربة

أخذت الاسماك المستخدمة في البحث اخذت من بحيرات الشرق الاوسط في ناحية الاسكندرية قضاء المسيب / محافظة بابل ، قبل الحقن ب 7 ايام للاقلمة وتعود هذه الاسماك الى اسماك الكارب الاعتيادي وكانت اوزانها تتراوح (151-123) غم وعددها 80 سمكة نقلت باكياس من النايلون وضع فيها ماء من ماء البحيرات التي اخذت منها الاسماك لمستوى النصف ووضع الهواء داخل كيس بواسطه مضخة هواء واحكم غلق الاكياس بخيوط من الجلفاص خلال ساعات الصباح الاولى وفي اثناء بيع وجبة من الاسماك لكي تكون على وفق التحضيرات لايقاف التعليف قبل يوم لكي تتحمل الاسماك النقل ونقلت الى مختبر امراض الاسماك في الكلية التقنية/المسيب فوضعت في الاحواض التي تم تحضيرها قبل ايام من جلب الاسماك لكل حوض 20 سمكة تركت اسماك الحوض الاول للسيطره بدون حقن بينما حقنت اسماك الحوض الثاني

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (2): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652

بالملح وبتركيز $1*10^7$ واسماك الحوض الثالث بكتريا حية وبتركيز $1*10^7$ و اسماك الحوض الرابع بكتريا مقتولة وبتركيز $1*10^7$, بعدها شرحت الاسماك و أخذت العينات (الطحال , الكبد , النسيج العضلي) لغرض دراسة التعبير الجيني بعد الحقن ب 24 ساعة .

2-الخطوات المتبعة لدراسة التعبير الجيني

أستخلاص RNA

أستخدم كت GENEzol™ TriRNA Pure

- تم أخذ 50-10غم من قطعة الأنسجة و وضعها في (tube 1.5ml)
- طحن قطعة النسيج بأخذ كمية من مادة (Genezol700ml) وتوضع فوق النسيج وتهرس بأستخدام micropestle
- ننتظر خمس دقائق بدرجة حرارة الغرفة
- توضع العينات بجهاز الطرد المركزي على سرعة 14000 دورة لمدة دقيقة
- نقل الرائق الى أنبوب بحجم (1.5ml)(eppendrof 1.5ml)
- أضافة 1ml ايثانول الى الرائق بنسبة 1:1
- عمل خلط للمزيج بجهاز vortex
- نقل مكونات الخليط الى أنبوب RB column
- يوضع الأنبوب بجهاز الطرد المركزي لمده دقيقة واحدة على سرعة 14000 vpm
- يتم أستبدال الأنبوب ويوضع الخليط بأنبوب جمع 2ml collection tube
- تم غسل الأنبوب بااضافة 400ml من مادة pre-wash Buffer ثم يوضع الأنبوب بجهاز الطرد المركزي لمدة 30 ثانية على سرعة 14000 vpm
- سكب المحلول المتجمع في أنبوب الجمع وأضافة 600ml من مادة wash buffer ثم وضع الأنبوب بجهاز الطرد المركزي لمدة 30 ثانية على سرعة 14000 vpm
- أخيرا أهمال أنبوب الجمع ووضع RB column في eppendrof 1.5ml وضع فوقها 50ml من مادة RNase-Free water ننتظر لمدة ثلاث دقائق ثم توضع بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة بسرعة 14000 vpm
- أستخدمت البادئات ادناه للحصول على جين IL-10 وجين β-actin

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (2): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652

الجين	تتابع البادئات	حجم الحزمة الناتجة
IL-10 FW	TGA TGA CAT GCA ACC ATT ACT GGA	284
IL-10 RV	CAC CTT TTT CCT TCA TCT TTT CAT	
β-actin FW	TCG TAC CAC TGG TAT CGT GA	313
β-actin RV	AAT GGT GAT GAC CTG TCC G	

خطوات تحضير CDNA

أستخدم كت AccuPowerR® RoketScript™ RT Premix

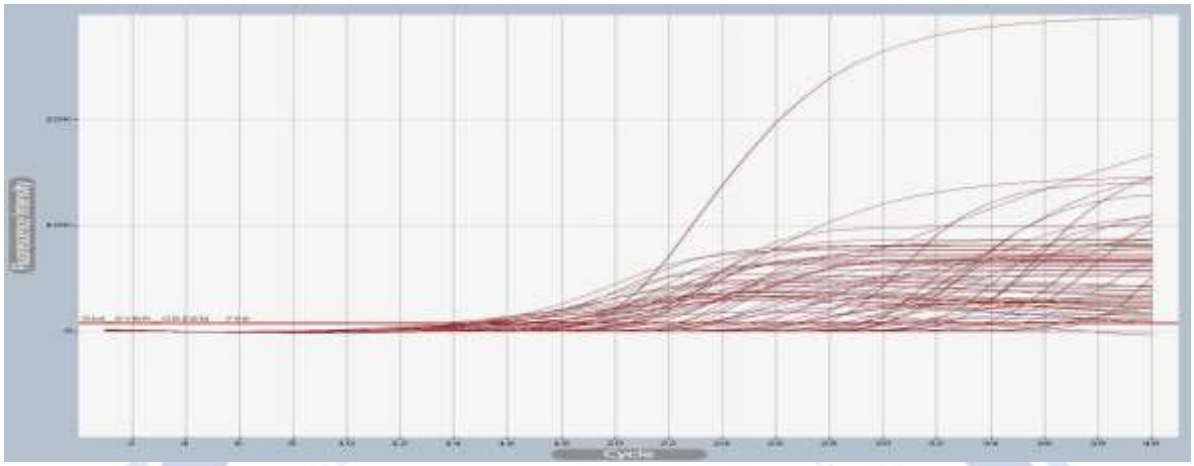
- أخذ 10 مايكروليتر من total RNA يوضع في أنبوب بحجم 0.2ml
- تم أضافة 2 مايكروليتر من مادة oligo dT بتركيز 50pmoles
- يكمل الحجم الى 20 مايكروليتر بأضافة مادة DEPC-water الى أنبوب RT premix
- يوضع الانبوب في جهاز Exispin
- نخلط المزيج ثم يوضع في جهاز Thremal cycler على برنامج تصنيع CDNA لمدة 60 دقيقة

خطوات تحضير RT

- تم أستخدام AccuPower® Greenstar™ qPCR PreMix
- نأخذ الأنبوب الخاص بالكت ونضع 2ml PCR-F primer
- نأخذ االأنبوب الخاص بالكت ونضع 2ml PCR-R primer
- نقوم بأضافة 5ml Template (CDNA) لجميع الأنابيب
- نقوم بأضافة 11ml DEPC-distilled water لجميع الأنابيب
- بعدها توضع بجهاز RT
- الحصول على قيم الدورة الحرجة C_T (شكل 1)

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (2): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652



شكل (1) منحنيات تمثل الدورة الحرجة بواسطة جهاز Real time PCR (C_T,threshold cycly)

النتائج والمناقشة

التعبير الجيني للجين IL-10

يظهر في الجدول (1) إن المعاملة الثالثة (بكتريا حية) في الكبد قد سجلت أقل دورة حرجة C_T (62-25) مقارنة ببقية المعاملات في جين IL-10 الانها كانت مقاربة لما هو عليه في جين المقارنة β_actin (71-23) لنفس المعاملة , في حين إن الفرق كبير بين الجين المستهدف وجين المقارنة لبقية المعاملات ألا إن التعبير النسبي للجين IL-10 نسبة الى جين β_actin كان عاليا اذ بلغ 6-728 مقارنة بالمعاملتين الثالثة والرابعة (الجدول 2) . أما في الطحال فقد سجلت المعاملة الرابعة أقل دوره حرجة (29-23) مقارنة ببقية المعاملات لجين IL-10 الا انها أيضا كانت مقاربة لما هو عليه في جين المقارنة β_actin لنفس المعاملة , اذ لوحظ ان التعبير النسبي للجين في المعاملة الرابعة كان مرتفعا (2105.5) مقارنة ببقية المعاملات .أما في النسيج العضلي فقد كانت المعاملات الثانية والثالثة والرابعة أعلى في قيمة الدورة الحرجة مما هي عليه في معاملة السيطرة للجين IL-10 على الرغم من الفارق الكبير بين الجينين IL-10 و β-actin للمعاملات الثلاث , كما أن التعبير النسبي لجين IL-10 المنخفض في النسيج العضلي للمعاملات الثلاث مقارنة بمعاملة السيطرة يشير بوضوح الى عدم وجود تاثير كبير للمعاملات في تعبير الجين IL-10 (الجدول 2) إن التعبير النسبي المبين في جدول (2) يشير بوضوح الى إن التعبير الجيني للجين IL-10 في الكبد كان أكثر تأثرا بالمعاملة الثالثة وتلتها الرابعة, كما إن التعبير النسبي في الطحال كان عالي لمعاملة البكتريا المقتولة مقارنة ببقية المعاملات . إن الاتجاه العام يشير الى تأثر الكبد أولا ثم الطحال وعدم تأثر النسيج العضلي بالأصابة البكتيرية وهو المتوقع كون الكبد والطحال يلعبان دورا كبيرا في مواجهه الاصابة البكتيرية من خلال تعزيز الدور المناعي وان وجود هذه البكتريا قد حفز الجينات المسؤولة عن انتاج

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (2): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652

الاجسام المناعية في هذه الانسجة لمواجهة الاصابة, او لتخفيف الاثر الالتهابي الناتج عن الاصابة كون الانترلوكين10 يلعب دورا عاما مناعيا تأقليميا اكثر مما هو دورا محددا بالاصابة, لى الرغم من النشاط الرئيسي لهذا الجين يكون في خلايا الجذعية والبلاعم والخلايا الحيية والمتعادلة والتمايز في احادية الخلية وتثبيط تعبير MHCII . إن الدور التأقلمي للجين وقلة عدد العينات قد تكون سببا في قلة وضوح تأثير الاصابة البكتيرية في جين IL-10 لدى الطحال .

الجدول 1. تأثير المعاملات المدروسة في التعبير الجيني(C_T) في كل من الكبد والطحال والنسيج العضلي لكل من جين IL-10 وجين المقارنة β_actin

المعاملة	المتوسط					
	الكبد (C_T)		الطحال (C_T)		النسيج العضلي (C_T)	
	IL10	β_actin	IL10	β_actin	IL10	β_actin
السيطرة (Control)	27.905	16.48	25.915	17.34	22.566	24.2
Normal saline	28.36	17.15	26.71	15.04	27.436	18.44
بكتريا حية	25.626	23.71	24.837	16.9	27.886	16.64
بكتريا مقتولة	31.84	24.93	23.29	25.76	30.355	19.64

الجدول 2. التعبير النسبي للجين IL10 في كل من الكبد والطحال والنسيج العضلي (طريقة ليفاك)

المعاملة	المتوسط		
	الكبد	الطحال	النسيج العضلي
السيطرة (Control)	–	–	–
Normal saline	1.16	3.09	0.0006
بكتريا حية	728.6	1.55	0.00015
بكتريا مقتولة	22.86	2112.8	0.00019

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)

Conflict of Interests.
There are non-conflicts of interest .

References

1- **Prein, M. and M. Ahmed(2000).**Integration of aquaculture into small holder faming systems for improved food security and hoyse hold nutrition food and nutrition bulletin,21(4):466- 47.

2- **A H A. (American heart association). (2002).** Fish oil lower your bad Cholesterol, diabetic care, 25: 1704 – 1708.

3- Pavaraj, M.; Balasubramanian, V.; Baskaran, S. and Ramasamy, P. (2011). Development of immunity by extract of medicinal plant Ocimum sanctum on common carp Cyprinus carpio (L), J. Immunol., 4(1): 12-18.

4- **Abdel_Tawwab M., et al .(2008)** (Evaluation of commevcial Live Baker's yeast, saccharomyces cerevisiae as a Growth and Immunity promoter for fry Nile Tilapia, oreo chromis Niloticus (L.) Challenged in situ with Aeromonas hydrophila". Aquacul ture 280.1-4 :185-189.

5- **Inglis, V. (2014).** Antibacterial chemotherapy in aquaculture: Review of practice, associated risks and need for action, Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland: pp 7-22.

6- **Eskdale J,kube D, Tesch H, Gall agher G (1997)** "Mapping of the human1IL-101gene and further characterization of the 5'flanking sequence".

7- **Mosser DM, Zhang X. (2008)** .Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine. Immunol Rev., 226(1): 205–218.

8- **Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J.(2010)** . Biology of interleukin-10. Cytokine Growth Factor Rev., 21(5): 331–344.

9- **Brooks DG, Walsh KB, Elsaesser H, Oldstone MBA.(2010)** . IL-10 directly suppresses CD4 but not CD8 T cell effector and memory responses following acute viral infection. Proc Natl Acad Sci U S A., 107(7): 3018–3023.

10- **Groux H, Bigler M, De Vries JE, Roncarolo M-G.(1996)** . Interleukin-10 induces along-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. J Exp Med., 184(1): 19–29.

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.