



بررسی بیان mRNA ژن‌های IL-2 و IL-12 در خوکچه‌های هندی واکسینه شده با واکسن غیر فعال شده تب برفکی تیپ O

ابراهیم هنریخش^۱، علی اصغر اسلمی نژاد^۲، محمدرضا نصیری^۳، سعید زیبایی^۴، رضا پسندیده^{۵*}

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
^۲ به ترتیب دانشیار و استاد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
^۳ استادیار موسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی شعبه مشهد، ایران
^۴ دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، ملاتانی، اهواز، ایران.
^{۵*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۲۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۲۴

چکیده

تب برفکی یک بیماری ویروسی شدت و آگیردار است که عمدتاً دام‌های سم‌شکافته و حیوانات وحشی را متأثر می‌سازد. تب برفکی در ایران یک بیماری بومی محسوب شده که گاهی همه‌گیری‌های آن موجب خسارت‌ها و تلفات سنگین به خصوص در دام‌های جوان می‌شود. در این مطالعه، بیان mRNA ژن‌های سایتوکاینی IL-2 و IL-12 در خوکچه‌های هندی واکسینه شده با واکسن غیر فعال شده تب برفکی تیپ O (بدون استفاده از یاور) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های خون از سیاهرگ سافن ۸ سر خوکچه هندی نر (در دو گروه شاهد و واکسینه) در روزهای ۷ و ۲۸ پس از اولین واکسیناسیون گرفته شد. استخراج RNA کل از نمونه‌های خون با استفاده از کیت استخراج ستونی صورت گرفت و پس از آن طی واکنش نسخه‌برداری معکوس به cDNA تبدیل شد. سپس به منظور بررسی بیان ژن‌های IL-2 و IL-12 از روش Real-time PCR نسبی استفاده شد. نتایج نشان داد بیان ژن IL-2 در حیوانات واکسینه شده نسبت به گروه شاهد در خونگیری‌های اول و دوم تفاوت معنی‌داری نداشت، ولی افزایش معنی‌داری در بیان ژن IL-12 مشاهده شد ($P < 0.05$). از تغییر سطوح بیان ژن‌های سایتوکاینی می‌توان به عنوان شاخص‌هایی جهت ارزیابی اثرات واکسن‌های جدید بر سیستم ایمنی در مطالعات آینده استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: تب برفکی، خوکچه هندی، IL-2، IL-12 Real-time PCR

مقدمه

برنامه‌های کنترل و ریشه‌کنی این بیماری یکی از اولویت‌های بخش دامی محسوب می‌شوند (Rasouli Beyrami *et al.*, 2010). واکسن‌های تولیدی در جهت مقابله با تب برفکی در یک کشور، ممکن است برای مقابله با این بیماری در سایر کشورها نتایج مثبت و مشابه را ایجاد نکنند. بنابراین همواره به تولید واکسن‌های جدید جهت ایمن نمودن دام‌ها نسبت به سویه‌های جهش یافته نیاز است. در سال‌های اخیر تولید نسل سوم و جدیدی از واکسن‌ها تحت عنوان واکسن DNA^۵ برای مقابله با بیماری تب برفکی در جهان آغاز شده است که بررسی عملکرد و اثرات این واکسن‌ها بر سیستم ایمنی بدن امری ضروری است. یکی از راه‌های ارزیابی عملکرد واکسن‌های DNA، اندازه‌گیری سطوح بیان برخی از ژن‌های سیستم ایمنی از جمله سایتوکاین‌ها در پاسخ به این واکسن‌ها در حیوانات آزمایشگاهی می‌باشد. اگر تغییر بیان این ژن‌ها طی تزریق یک واکسن DNA مشابه تزریق واکسن تجاری به حیوان باشد، می‌توان این پاسخ مشابه را دلیلی بر تاثیر واکسن DNA بر سیستم ایمنی و کارایی آن تلقی نمود. سایتوکاین‌ها پروتئین‌های محلولی هستند که از سلول‌های سیستم ایمنی ترشح شده و باعث تحریک، القا و یا مهار پاسخ‌های ایمنی در بدن می‌شوند. با توجه به نحوه تولید، ویژگی، کیفیت تاثیر و نوع سلول‌های هدف، برخی از این مواد را اینترلوکین^۶ (IL)، بعضی را

بیماری تب برفکی (FMD)^۱ یکی از مسری‌ترین بیماری‌های ویروسی دام‌ها است که می‌تواند تمام دام‌های سم شکافته نظیر گاو، گوسفند، بز، خوک و همچنین بیش از ۳۰ گونه از حیوانات وحشی را آلوده کند (Thomson *et al.*, 2003). ویروس این بیماری، عضوی از جنس آفتاویروس^۲ در خانواده پیکورناویریده^۳ است. از نظر ایمونولوژیکی این ویروس دارای سروتایپ‌های A، O و C در اروپا، SAT1^۴، SAT2 و SAT3 در آفریقا و یک سروتایپ کاملاً مشخص در آسیا به نام Asia1 می‌باشد. سروتایپ O رایج‌ترین سروتایپ در سراسر جهان می‌باشد (Brown, 2003). تب برفکی در ایران یک بیماری بومی محسوب شده که گاهی همه‌گیری‌های آن باعث خسارات و تلفات سنگین به خصوص در دام‌های جوان می‌شود. تیپ‌های شایع ویروس تب برفکی در ایران، تیپ‌های A و O می‌باشند. بیماری تب برفکی فشار بزرگی بر صنعت دامپروری وارد می‌کند و خسارات اقتصادی آن عمدتاً در نتیجه کاهش تولید گوشت و شیر در دام‌های آلوده و کاهش صادرات محصولات در هنگام شیوع بیماری به وجود می‌آیند. هزینه‌های پیشگیری و درمان‌های کمکی بیماری تب برفکی زیاد بوده و سالانه میلیاردها تومان برای خرید واکسن هزینه می‌گردد. بنابراین

¹ Food-and-mouth disease² Aphthovirus³ Picornaviridae⁴ Southern African Territories⁵ DNA vaccine⁶ Interleukin

خوکچه هندی حساس‌ترین حیوان آزمایشگاهی به ویروس تب برفکی می‌باشد (Eslampanah *et al.*, 2010) که در این مطالعه به عنوان یک مدل حیوانی، جهت ارزیابی کارکرد واکسن مورد آزمایش، توسط روش Real-PCR و time نسبی^۴ و با اندازه‌گیری بیان ژن‌های IL-2 و IL-12 مورد استفاده قرار گرفت. هدف از این مطالعه، معرفی ژن‌های سایتوکاینی القا شونده در پاسخ به واکسن غیر فعال شده تب برفکی، به منظور استفاده از آن‌ها به عنوان شاخص‌هایی جهت ارزیابی اثرات واکسن‌های نسل جدید در مطالعات آینده بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی، نمونه‌گیری خون و واکسیناسیون

در این مطالعه از ۸ سر خوکچه هندی نر با وزن تقریبی ۵۰۰-۴۰۰ گرم و سن ۳ ماه استفاده شد که ۴ سر از آن‌ها در گروه شاهد (بدون واکسن) و ۴ سر در گروه واکسینه شده طبقه‌بندی شدند. در طی دوره نگهداری، حیوانات با خوراک پلت شده تغذیه شدند. هم‌چنین به دلیل این‌که خوکچه هندی قادر به سنتز ویتامین C در بدن نمی‌باشد، پودر این ویتامین به میزان یک گرم در لیتر به صورت یک روز در میان به آب آشامیدنی اضافه شد. سیستم نوری بر مبنای ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم شد. حیوانات در دو نوبت در روزهای صفر و ۱۴ با

ایترفرون^۱ (IFN)، تعدادی را فاکتور نکروز دهنده‌ی توموری^۲ (TNF) و برخی را کموکاین^۳ می‌نامند (Fong & Lowry, 1990). در مطالعات گذشته میزان بیان سایتوکاین‌ها در شرایط تزریق واکسن تب برفکی یا آلودگی حیوانات به این ویروس مورد بررسی قرار گرفته است. مینگالا و همکاران (Mingala *et al.*, 2009) سطوح بیان سایتوکاین‌های Th2 شامل (IL-4 و IL-10)، Th1 شامل (IL-2، IL-12 و IFN γ) و التهابی شامل (IL-6 و TNF α) را در گاومیش آبی در پاسخ به تزریق واکسن غیر فعال شده تب برفکی مورد بررسی قرار دادند. هم‌چنین مطالعات دیگری بر روی سطوح بیان برخی سایتوکاین‌ها در گونه‌هایی نظیر موش (Ostrowski *et al.*, 2005)، خوک (Barnard *et al.*, 2005؛ Barnett Zhang *et al.*, 2002) و گاو (Zhang *et al.*, 2009؛ Zhang *et al.*, 2006) در پاسخ به واکسن یا ویروس بیماری تب برفکی گزارش شده است. در ایران، پاسخ ایمنی در خوکچه هندی در مواجهه با ویروس تب برفکی تیپ A87/IRN با بررسی سطوح آنتی‌بادی‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است (Motamedi Sedeh *et al.*, 2007). در تحقیقی (Pasandideh *et al.*, 2016) بیان ژن‌های IFN- γ ، IL-10 و TNF- α را در خوکچه‌های هندی واکسینه شده با واکسن غیر فعال شده تب برفکی تیپ O مورد مطالعه قرار دادند.

¹ Interferon

² Tumor necrosis factor

³ Chemokines

⁴ Relative Real-time PCR

از کیت استخراج ستونی RNA^۵ (DENAzist، ایران)، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پس از استخراج RNA، برای اطمینان از صحت کار و غلظت مناسب RNA، غلظت‌های RNA با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر نانودراپ (Thermo-Scientific، امریکا) و در جذب نوری OD₂₆₀/OD₂₈₀ اندازه‌گیری و تا زمان استفاده در دمای -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش RT-PCR

نمونه‌های RNA استخراج شده، برای انجام مرحله‌ی نسخه برداری معکوس و ساخت cDNA توسط کیت RevertAidTM H Minus ساخت شرکت فرمنتاز (آلمان) مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا ۲ میکرولیتر (۹۰ نانوگرم) از RNA کل به همراه ۱ میکرولیتر Oligo-dT (با غلظت ۱۰۰ میکرومولار) و ۹ میکرولیتر DEPC treated water درون یک میکروتیوب استریل عاری از نوکلئاز^۶ بر روی یخ اضافه شد. میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۴ میکرولیتر بافر ۵X، ۱ میکرولیتر RNase Inhibitor (20 U)، ۲ میکرولیتر dNTPs (با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) به همراه ۱ میکرولیتر آنزیم MM-MuLV Reverse Transcriptase (200 U) به مخلوط اضافه شد.

واکسن تجاری غیر فعال شده تب برفکی تیپ O (بدون استفاده از یاور)^۱ به میزان ۰/۵ سی سی به ازای هر حیوان، به صورت زیرجلدی در ناحیه پشت پا واکسینه شدند. این واکسن از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (کرج، ایران) تهیه شد. به حیوانات گروه شاهد ۰/۵ سی سی PBS^۲ تزریق شد. خونگیری از سیاهرگ سافن^۳ حیوانات و در دو نوبت در روزهای ۷ و ۲۸ پس از اولین تزریق واکسن صورت گرفت. در هر مرتبه ۰/۵ تا ۱ سی سی خون درون میکروتیوب‌های حاوی مقدار کمی EDTA نیم مولار جمع‌آوری و تا زمان استفاده در دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

طراحی پرایمر

ابتدا توالی‌های مربوط به ژن‌های IL-2 (با شماره دسترسی: AB010093)، IL-12 (با شماره دسترسی: AB025723) و β-actin (با شماره دسترسی: NM_001172909) به عنوان ژن مرجع، از بانک اطلاعات ژنی (NCBI)^۴ استخراج شد. سپس پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Premier طراحی گردید و سفارش ساخت به شرکت Bioneer (کره جنوبی) داده شد (جدول ۱).

استخراج RNA

استخراج RNA از نمونه‌های خون با استفاده

¹ Adjuvant

² Phosphate-buffered saline

³ Saphenous vein

⁴ National Center for Biotechnology Information

⁵ Column RNA isolation kit

⁶ Nuclease-free

جدول ۱- لیست پرایمرهای مورد استفاده در Real-time PCR.

Table 1- Real-time PCR primers used in this study.

ژن Gene	توالی پرایمر Primer sequence	طول محصول Product length (bp)	دمای اتصال Annealing temperature (°C)
IL-2	F-5'ACGCTACTCTTGTCTTGCCTTG3' R-5'GGGTTGCTAGTAACGCCTTCC3'	146	58
IL-12	F-5'AGCACTCCACATTCCTACTTCTCC3' R-5'CCGCACCTCCACCTTTGAAATC3'	144	58
β-actin	F-5'GCCTCACTCTCCACCTTCCAG3' R-5'AACGCAGCAAAGTAGTAACAGTCC3'	116	58

۹/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر مخلوط شد. پس از تهیه حجم مورد نظر، ابتدا یک مرحله واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. سپس واکنش PCR در ۴۰ چرخه، شامل ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه انجام شد. برنامه دمایی PCR برای تمامی ژن‌ها، مشابه بود. با اتمام واکنش PCR، منحنی ذوب با برنامه دمایی ۰/۵ درجه سانتی گراد در هر چرخه و بین دمای ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی گراد به منظور بررسی اختصاصی بودن واکنش PCR و تعیین وجود یا عدم وجود آلودگی با محصولات غیر اختصاصی و پرایمر دایمر رسم گردید. از هر نمونه سه تکرار گذاشته شد.

میکروتیوب به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت و در نهایت محصول واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به منظور توقف واکنش نسخه برداری معکوس انکوبه گردید. محصول واکنش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

اندازه‌گیری بیان mRNA سایتوکاین‌ها

به منظور اندازه‌گیری بیان mRNA ژن‌های IL-2 و IL-12، از روش Real-time PCR نسبی با استفاده از دستگاه 7300 (Applied Biosystems) و کیت Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix شرکت Thermo Scientific (امریکا) استفاده شد. ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۱ میکرولیتر نمونه حاوی ۵۰ نانوگرم cDNA و

آنالیز داده‌های Real-time PCR

در انتهای واکنش Real-time PCR، نرم افزار دستگاه به طور خودکار خط آستانه را رسم و نتایج را به صورت چرخه آستانه (CT)^۱ گزارش کرد. در اندازه‌گیری نسبی، تغییر در سطوح mRNA یک ژن نسبت به یک ژن مرجع (ژن خانه‌دار)^۲ که به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته می‌شود، اندازه‌گیری می‌شود (Bustin, 2002). در تحقیق حاضر، تغییرات نسبی بیان ژن‌های IL-2 و IL-12 نسبت به ژن β -actin نرمال شد. برای تعیین میزان بیان ژن‌های IL-2 و IL-12 از روش لیواک و فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد (Livak & Schmittgen, 2001). در این روش فرض بر این است که بازدهی ژن مورد نظر و ژن مرجع، برابر و نزدیک به ۱۰۰ درصد است که به منظور تعیین کردن این فرض، از منحنی استاندارد استفاده شد. برای این کار، رقت‌های مختلف از cDNA تهیه و برای آن‌ها تست Real-time PCR انجام شد. بررسی آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS و آزمون t استیودنت^۳ در سطح معنی‌داری ۵٪ ($P < 0.05$) انجام شد.

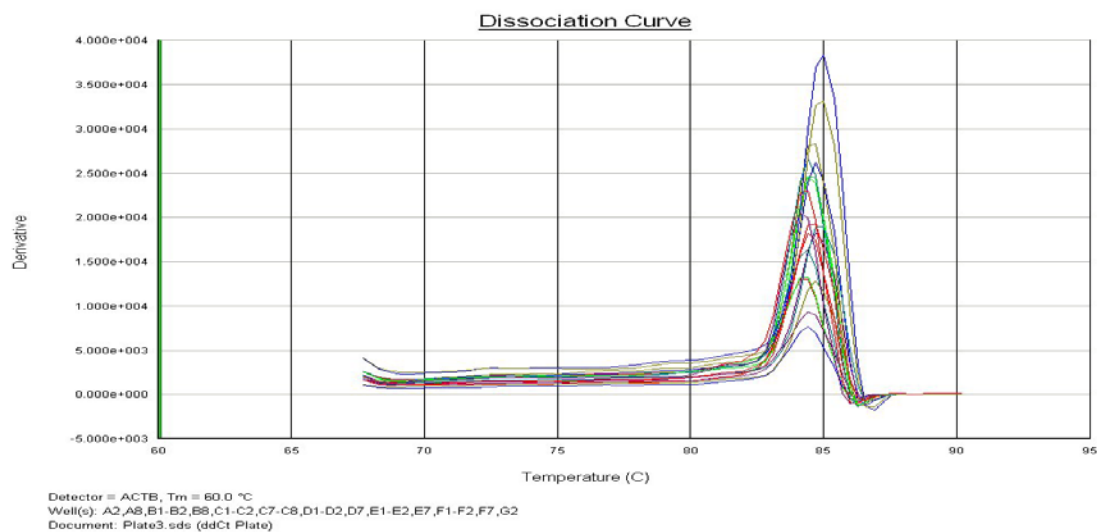
نتایج

منحنی‌های ذوب پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که در این منحنی‌ها دیده می‌شود برای هیچ کدام از پرایمرها، پیک اضافی

قبل از پیک محصولات وجود ندارد که نشانگر عدم ایجاد پرایمر دایمر است. همچنین عدم وجود پیک اضافی بعد از پیک محصولات نشان از عدم تکثیر قطعات غیر اختصاصی می‌باشد. بنابراین پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه به صورت اختصاصی عمل کرده و یک نمونه منفرد از cDNA را تکثیر نموده‌اند. منحنی‌های روند تکثیر ژن‌های β -actin، IL-2 و IL-12 در شکل‌های ۴، ۵ و ۶ نشان داده شده است. در این منحنی‌ها، خط آستانه به صورت خط سبزرنگ افقی نشان داده شده است. محل تلاقی خط آستانه و منحنی تکثیر نشان دهنده چرخه آستانه (CT) است. این منحنی‌ها حاکی از آن می‌باشند که تکثیر ژن‌های مورد نظر به خوبی صورت گرفته است. نتایج سطوح بیان ژن‌های IL-2 و IL-12 در شکل ۷ نشان داده شده است. بیان ژن IL-2 در خوکچه‌های هندی واکسینه شده نسبت به گروه شاهد در خونگیری‌های اول (۷ روز بعد از اولین واکسیناسیون) و دوم (۲۸ روز بعد از اولین واکسیناسیون) تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). با این وجود بیان ژن IL-2 در خونگیری دوم نسبت به اول افزایش داشت ($P < 0.05$). میزان بیان ژن IL-12 در حیوانات واکسینه شده نسبت به گروه شاهد در خونگیری‌های اول و دوم افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). همچنین میزان بیان ژن IL-12 در خونگیری دوم نسبت به خونگیری اول افزایش داشت ($P < 0.05$). میانگین بیان ژن‌های

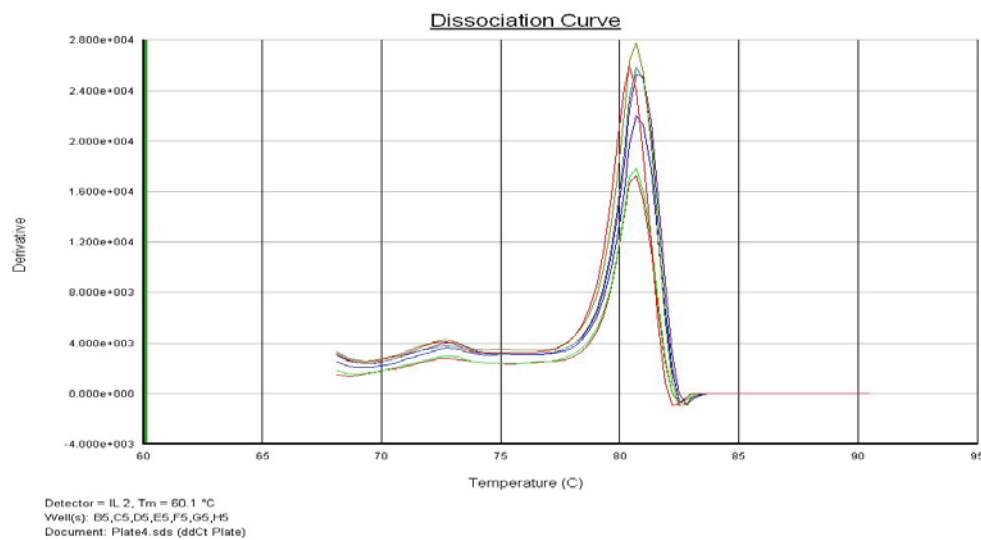
¹ Cycle threshold² House keeping gene³ Student t-test

IL-2 و IL-12 در خونگیری‌های اول و دوم در جدول ۲ نشان داده شده است.



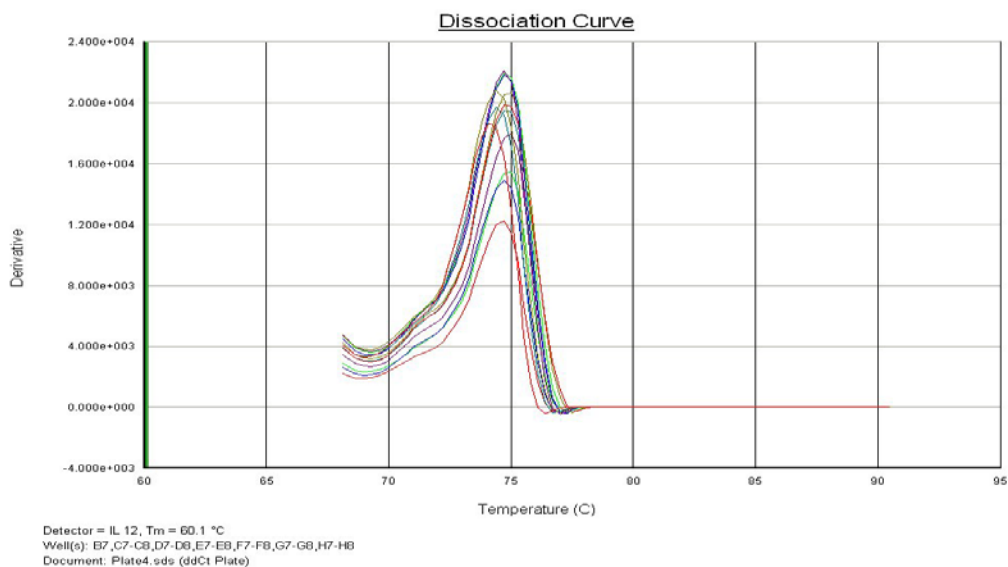
شکل ۱- منحنی ذوب محصولات ژن β -actin.

Figure 1- Melting curve of β -actin gene products.



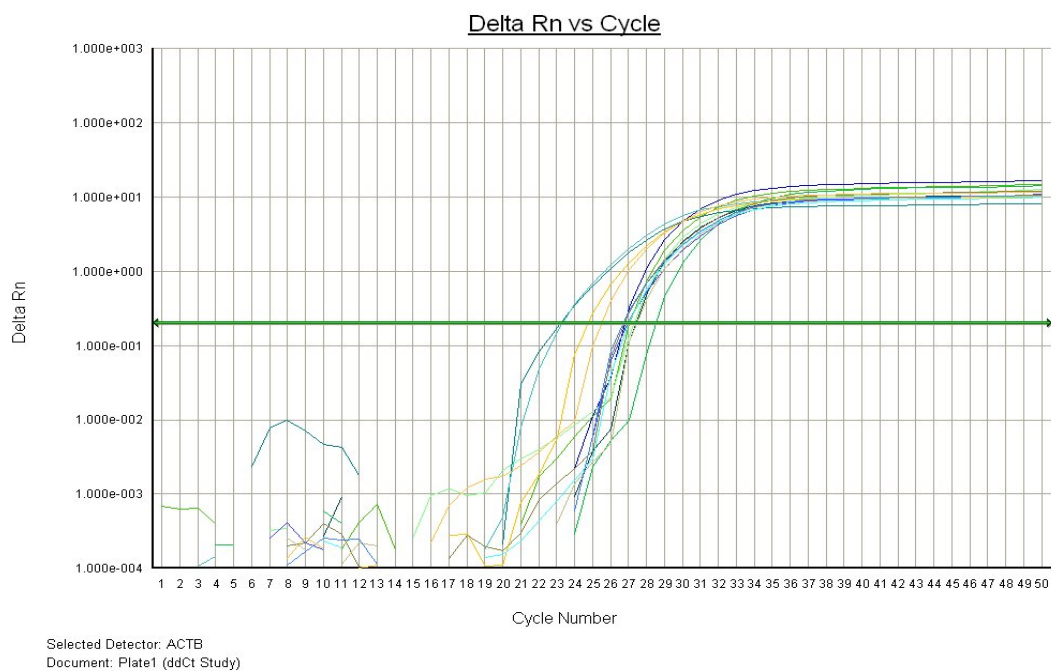
شکل ۲- منحنی ذوب محصولات ژن IL-2.

Figure 2- Melting curve of IL-2 gene products.



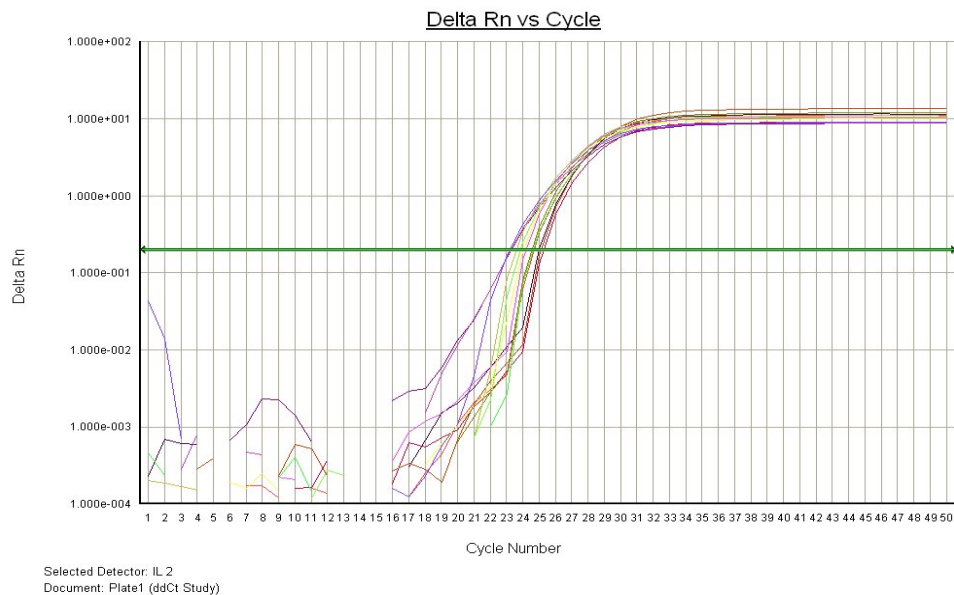
شکل ۳- منحنی ذوب محصولات ژن IL-12.

Figure 3- Melting curve of IL-12 gene products.



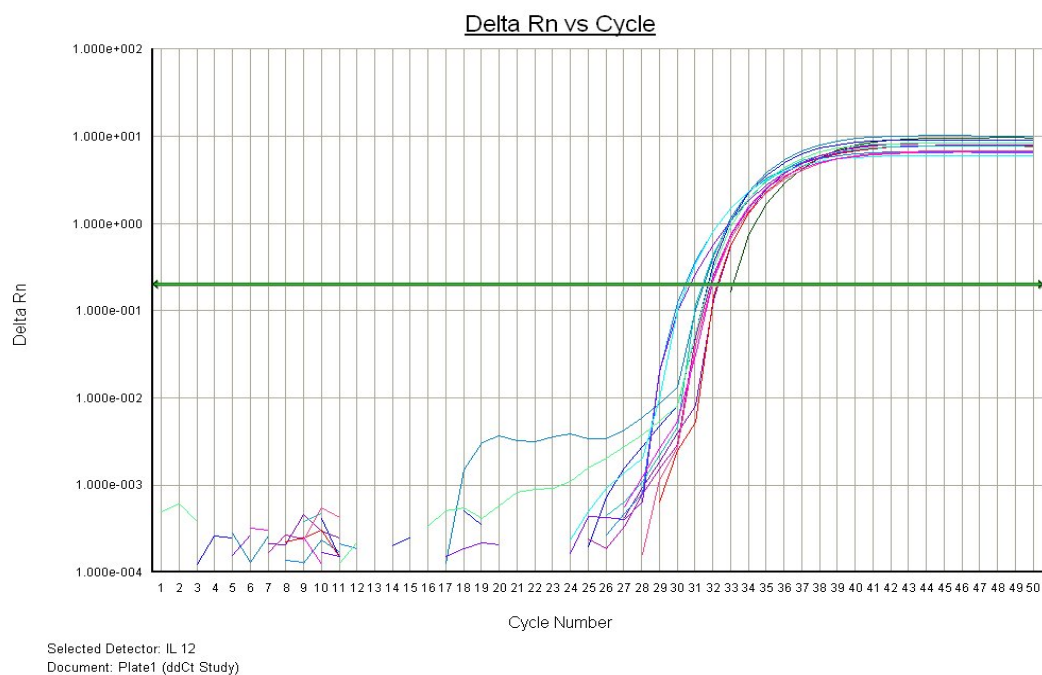
شکل ۴- منحنی تکثیر ژن β -actin. خط سبز رنگ افقی، خط آستانه است.

Figure 4- Amplification curve of β -actin gene. The horizontal green line is threshold line.



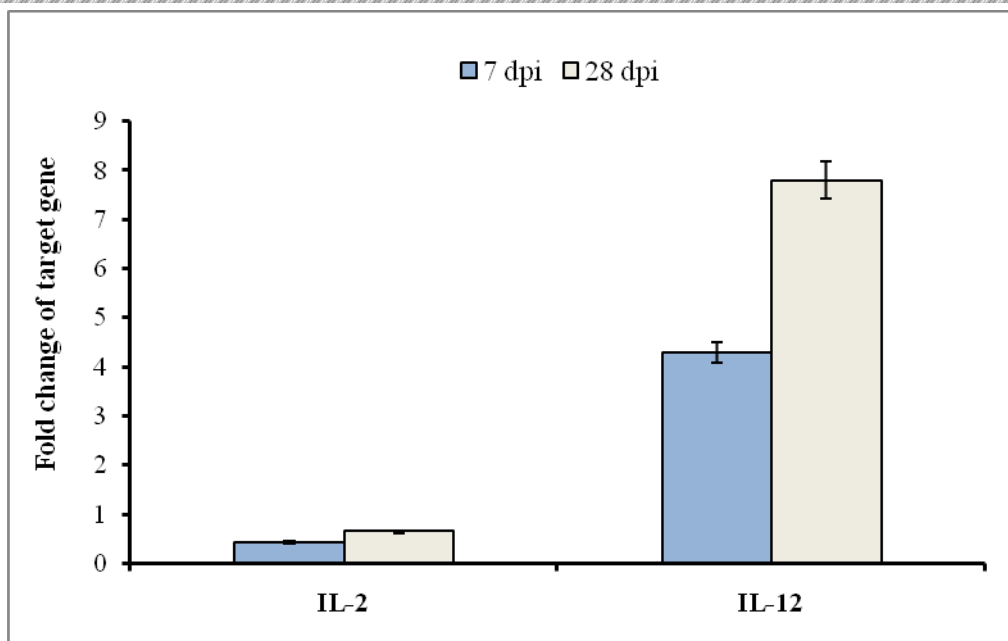
شکل ۵- منحنی تکثیر ژن IL-2. خط سبز رنگ افقی، خط آستانه است.

Figure 5- Amplification curve of IL-2 gene. The horizontal green line is threshold line.



شکل ۶- منحنی تکثیر ژن IL-12. خط سبز رنگ افقی، خط آستانه است.

Figure 6- Amplification curve of IL-12 gene. The horizontal green line is threshold line.



شکل ۷- بیان ژن‌های IL-2 و IL-12 در خوکچه‌های هندی واکسینه شده با واکسن غیر فعال شده تب برفکی. نمونه‌های خون در روزهای ۷ و ۲۸ پس از اولین تزریق واکسن جمع‌آوری شدند. میله‌های عمودی نشان دهنده خطای استاندارد از میانگین می‌باشند. dpi: روز پس از اولین تزریق.

Figure 7- The expression of IL-2 and IL-12 genes in guinea pigs vaccinated to FMD inactivated vaccine. Blood samples were collected in 7 and 28 days post the first vaccination. Bars represent standard error of the mean. dpi: days post the first injection.

جدول ۲- میانگین بیان ژن‌های IL-2 و IL-12 در روزهای ۷ و ۲۸ پس از اولین تزریق واکسن. dpi: روز پس از اولین تزریق.

Table 2- Mean of IL-2 and IL-12 genes expression in 7 and 28 days post the first injection (dpi).

روز Day	میانگین بیان ژن مورد نظر (ارزش P)	
	Mean of expression for interest gene (P value)	
	IL-2	IL-12
7 dpi	0.425 (0.235)	4.291 (0.045)
28 dpi	0.642 (0.499)	7.806 (0.001)

واکسینه شده با واکسن غیر فعال شده تب برفکی تیپ O با روش Real-time PCR نسبی مورد بررسی قرار گرفت. IL-2 عمدتاً توسط

ب‌ح‌ث در این مطالعه سطوح بیان mRNA ژن‌های سایتوکائینی IL-2 و IL-12 در خوکچه‌های هندی

و دوم می‌تواند به این دلیل باشد که عمل برخی از سایتوکین‌ها به شکل گذرا است و معمولاً دامنه کوتاهی دارد. فعالیت نسخه برداری از ژن‌های سایتوکاینی معمولاً موقتی بوده و mRNA کدکننده آن‌ها ناپایدار است (Clements, 1991). برخلاف هورمون‌های اندوکرین، قسمت اعظم سایتوکین‌ها به طور موضعی و به شکل پاراکراین^۱ (اثر بر سلول مجاور) و یا حتی اتوکراین^۲ (اثر بر سلول تولید کننده سایتوکین) عمل می‌کنند. بنابراین سایتوکین‌های مشتق شده از لنفوسیت‌ها نظیر IL-2 بندرت در جریان خون باقی می‌مانند (Robb, 1984; Abbas et al., 2014).

IL-12 یک هتروداایمر متشکل از دو زیر واحد ۳۵ و ۴۰ کیلو دالتونی با یک پیوند دی سولفیدی است. منابع اصلی تولید IL-12 بیگانه خوارهای تک هسته‌ای و سلول‌های دندریتیک هستند. IL-12 واسطه اصلی پاسخ زودرس ایمنی ذاتی به میکروب‌های درون سلولی و القا کننده اصلی ایمنی وابسته به سلول (پاسخ ایمنی اکتسابی در برابر این میکروب‌ها) است (Trinchieri, 1994). در این مطالعه میزان بیان ژن IL-12 در خوکچه‌های هندی واکسینه شده نسبت به گروه شاهد در خونگیری‌های اول و دوم افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). این نتایج با تحقیقات Mingala et al. (2011) در گاومیش آبی و Barnett et al. (2002) و Cox et al. (2003) در خوک مشابه بود. ولی با نتایج Toka et al. (2009) در خوک‌های آلوده به

لنفوسیت‌های T CD4+ و در مقادیر کمتر به وسیله سلول‌های T CD8+ تولید می‌شود. IL-2 گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۱۴ تا ۱۷ کیلو دالتون می‌باشد و از ۱۳۳ آمینو اسید تشکیل شده است که به صورت یک ماریپج α چین خوردگی حاصل کرده است. IL-2 مهم‌ترین سایتوکاینی است که باعث پیشبرد لنفوسیت‌های T از فاز G1 به S و انتقال به فاز رشد سلولی می‌شود (Vojgani, 2002). در این مطالعه میزان بیان IL-2 در خوکچه‌های هندی واکسینه شده نسبت به گروه شاهد در خونگیری‌های اول و دوم اختلاف معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$). در پژوهشی Mingala et al. (2011) افزایش بیان IL-2 در گاومیش آبی واکسینه شده با واکسن غیر فعال شده تب برفکی بلافاصله یک هفته پس از واکسیناسیون و سپس افزایش آن در هفته دوم را گزارش کردند که نتیجه این مطالعه با آن مغایرت داشت. در پژوهشی دیگر Toka et al. (2009) نتوانستند IL-2 را در سرم خون هیچکدام از خوک‌های آلوده به ویروس تب برفکی تشخیص دهند. در پژوهشی Barnett et al. (2002) نشان دادند که سطوح بیان IL-2 در پلاسمای خون خوک‌های واکسینه شده با واکسن تب برفکی برابر با سطوح قبل از واکسیناسیون یا پایین‌تر از آن بود. نتیجه تحقیق حاضر برای بیان ژن IL-2 با نتایج Toka et al. (2009) و Barnett et al. (2002) مطابقت داشت. عدم وجود اختلاف معنی‌دار برای بیان ژن IL-2 بین گروه واکسینه شده نسبت به گروه شاهد در خونگیری‌های اول

¹ Paracrine

² Autocrine

سایتوکاین‌ها در مطالعات آینده می‌باشیم. Real-time PCR روشی دقیق و مناسب برای مطالعه میزان بیان ژن‌های سایتوکاینی بوده که می‌تواند به عنوان ابزاری دقیق برای بررسی برنامه‌های ایمنی‌زایی واکسن‌های جدید استفاده شود. به دلیل این‌که افزایش بیان سایتوکاین‌ها شاخصی از پاسخ سیستم ایمنی می‌باشد، در مطالعات آینده می‌توان از این ژن‌ها به عنوان شاخص‌هایی جهت بررسی اثرات واکسن‌های جدید و تحقیق در رابطه با القای آن‌ها توسط این گونه واکسن‌ها استفاده نمود. همچنین با ارتباط دادن سطوح بیان این ژن‌ها به آزمایشات بالینی، می‌توان اثر بیان آن‌ها بر ایجاد مصونیت در میزبان را بررسی نمود.

ویروس تب برفکی مغایرت داشت. به نظر می‌رسد که واکسن مورد استفاده در این مطالعه موجب القای بیان ژن IL-12 در خوکچه‌های هندی شده باشد. بررسی بیان ژن‌های سایتوکاینی در مطالعات آینده می‌تواند به عنوان یک ابزار ارزشمند برای ارزیابی اثرات واکسن‌های جدید مانند واکسن‌های DNA بر سیستم ایمنی بدن و بررسی ایمنی‌زایی آن‌ها، باشد.

نتیجه‌گیری

به منظور شناسایی پاسخ‌های ایمنی سلولی علیه ویروس تب برفکی و نیز بررسی اثرات متقابل سایتوکاین‌ها، نیازمند بررسی بیان سایر

منابع

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2014). Cellular and Molecular Immunology: with Student Consult Online Access. Eighth Edition. Elsevier Health Sciences.
- Barnard AL, Arriens A, Cox S, Barnett P, Kristensen B, Summerfield A, McCullough KC (2005). Immune response characteristics following emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease. *Vaccine* 23: 1037-1047.
- Barnett P, Cox S, Aggarwal N, Gerber H, McCullough K (2002). Further studies on the early protective responses of pigs following immunization with high potency foot and mouth disease vaccine. *Vaccine* 20: 3197-3208.
- Brown F (2003). The history of research in foot-and-mouth disease. *Virus Research* 91: 3-7.
- Bustin S (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29: 23-39.
- Clements MJ (1991). Cytokines. BIOS Scientific Publishers, 12: 56-67.
- Cox S, Aggarwal N, Statham R, Barnett P (2003). Longevity of antibody and cytokine responses following vaccination with high potency emergency FMD vaccines. *Vaccine* 21: 1336-1347.
- Eslampanah M, Mahravani H, Hablolvarid MH, Isadi H, Sotudeh M, Jirani F, Talebloo F (2010). Organic Circulation and persistence of Foot-and-Mouth disease virus type O in guinea pig. *Archives of Razi Institute* 65: 67-73.
- Fong Y, Lowry SF (1990). Cytokines and the cellular response to injury and infection. *Care of the surgical patient* 1: 1-16.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Mingala CN, Konnai S, Venturina FA, Onuma M, Ohashi K (2009). Quantification of water buffalo (*Bubalus bubalis*) cytokine expression in response to inactivated foot-and-

- mouth disease (FMD) vaccine. *Research in Veterinary Science* 87: 213–217.
- Motamedi Sedeh F, Khorasani A, Shafae K, Salehizadeh M, Fatolahi H, Arbabi K, Daneshvari S, Abhari M (2007). Immune response of foot and mouth disease virus type A87/IRN inactivated vaccine by gamma irradiation on guinea pig in Iran. *Iranian Journal of Science and Technology* 31: 35-41.
- Ostrowski M, Vermeulen M, Zabal O, Geffner JR, Sadir AM, Lopez OJ (2005). Impairment of thymus-dependent responses by murine dendritic cells infected with foot-and-mouth disease virus. *The Journal of Immunology* 175: 3971-3979.
- Pasandideh R, Nassiri MR, Raouf Delgosha M, Aslaminejad AA, Tahmoospour M, Zibaei S, Doosti M, Pasandideh M (2016). Evaluation of cytokine mRNA expression in vaccinated guinea pigs with foot-and-mouth disease type O inactivated vaccine. *Archives of Razi Institute* 71: 15-19.
- Rasouli Beyrami N, Atarod V, Khalaj M, Abdollahi Birun D, Barani SM, Emami J, Ganji A, Zareei Tousi A, Sohrabi M (2010). Control and eradication of foot-and-mouth disease. Nourbakhsh Press, Iran.
- Robb RJ (1984). IL-2: the molecule and its function. *Immunology Today* 5: 203-209.
- Thomson G, Vosloo W, Bastos A (2003). Foot and mouth disease in wildlife. *Virus Research* 91: 145-161.
- Toka FN, Nfon C, Dawson H, Golde WT (2009). Natural killer cell dysfunction during acute infection with foot-and-mouth disease virus. *Clinical and Vaccine Immunology* 16: 1738-1749.
- Trinchieri G (1994). Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 84: 4008-4027.
- Vojgani M (2002). *Immunology*. SID Press, Tehran.
- Zhang Z, Bashiruddin J, Doel C, Horsington J, Durand S, Alexandersen S (2006). Cytokine and Toll-like receptor mRNAs in the nasal-associated lymphoid tissues of cattle during foot-and-mouth disease virus infection. *Journal of Comparative Pathology* 134: 56-62.
- Zhang Z, Ahmed R, Paton D, Bashiruddin JB (2009). Cytokine mRNA responses in bovine epithelia during foot-and-mouth disease virus infection. *The Veterinary Journal* 179: 85-91.

Evaluation of IL-2 and IL-12 mRNA expression in vaccinated guinea pigs with inactivated type O foot-and-mouth disease vaccine

Honarbakhsh E.¹, Aslaminejad A.S.², Nassiri M.R.³, Zibaei S.⁴, Pasandideh R.*⁵

¹ MSc Alumnus of Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

^{2,3} Respectively Associate Professor and Professor of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

⁴ Assistant professor, Razi Vaccine and Serum Research institute, Mashhad, Iran.

⁵ PhD Student of Animal Breeding and Genetics, Khuzestan Ramin Agriculture and Natural Resources University, Mollasani, Ahvaz, Iran.

Abstract

Foot-and-mouth disease (FMD) is a severely contagious viral disease that mainly affects cloven-hoofed livestock and wildlife. Foot-and-mouth disease is an endemic disease in Iran that sometimes caused considerable losses of livestock, especially in young animals. In this study mRNA expression of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-12 (IL-12) cytokines was evaluated in vaccinated guinea pigs with inactivated type O FMD vaccine (without adjuvant). Blood samples were collected from saphenous vein of eight male guinea pigs (at control and vaccinated groups) at 7 and 28 days after the first vaccination. Total mRNAs were extracted using the column RNA isolation kit and subsequently reverse-transcribed into cDNA. Then relative real-time PCR assay was used to analyze of quantification of IL-2 and IL-12 expression. The expression of IL-2 gene had not significant difference in vaccinated animals compared to the control group in the first and second blood samples but IL-12 gene expression significantly increased ($P < 0.05$). Evaluation of cytokines genes expression can be as a valuable adjunct for assessment of effects of new vaccines on immune system in future studies.

Keywords: *Foot-and-mouth disease (FMD), Guinea pig, IL-2, IL-12, Real-time PCR.*

* Corresponding Author: Pasandideh R.

Tel: 09151879804

Email: Rezapasandideh63@gmail.com