

## بررسی میزان بیان ژن‌های IFN- $\gamma$ و TGF $\beta$ <sub>1</sub> در خوکچه‌های هندی واکسینه شده با واکسن غیرفعال

### شده تب برفکی تیپ O

رضا پسندیده<sup>۱</sup> - محمدرضا نصیری<sup>۲\*</sup> - علی اصغر اسلمی نژاد<sup>۳</sup> - مجتبی طهمورث پور<sup>۴</sup> - سعید زیبایی<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۲۹

### چکیده

تب برفکی یک بیماری ویروسی به شدت واگیردار در زوج سمان بوده که خسارات اقتصادی قابل توجهی را به تولیدات دامی وارد می‌سازد. یکی از موثرترین راهکارهای کنترل بیماری تب برفکی، پیشگیری توسط واکسن است. یکی از عملکردهای واکسن‌ها، تحریک بیان برخی از ژن‌های سیستم ایمنی موسوم به سایتوکاین می‌باشد. در این مطالعه، تغییرات بیان ژن‌های IFN- $\gamma$  و TGF $\beta$ <sub>1</sub> در خوکچه‌های هندی واکسینه شده با واکسن غیرفعال شده تب برفکی تیپ O مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های خون از دو گروه خوکچه هندی واکسینه شده و شاهد در سه زمان متفاوت و مشخص گرفته شد. پس از خونگیری، RNA از نمونه‌های خون استخراج و به cDNA تبدیل شد. سپس الگوی بیان ژن‌های IFN- $\gamma$  و TGF $\beta$ <sub>1</sub> با روش Real-time PCR نسبی بررسی شد. نتایج نشان داد بیان ژن‌های IFN- $\gamma$  و TGF $\beta$ <sub>1</sub> در خونگیری‌های دوم و سوم نسبت به خونگیری اول، به طور معنی‌داری افزایش یافت. به علت این که افزایش بیان سایتوکاین‌ها شاخصی از پاسخ سیستم ایمنی می‌باشد، از این ژن‌ها می‌توان به عنوان شاخص‌هایی جهت آزمون اثرات واکسن‌های نو ترکیب نیز استفاده کرد.

### واژه‌های کلیدی: تب برفکی، خوکچه هندی، IFN- $\gamma$ ، TGF $\beta$ <sub>1</sub>، Real-time PCR

### مقدمه

یک بیماری مهم ویروسی 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 (۱).

یکی از موثرترین اقدامات جهت کنترل بیماری تب برفکی، پیشگیری توسط واکسن می‌باشد. یکی از پاسخ‌های فیزیولوژیک بدن در مواجهه با واکسن، تغییر بیان ژن‌هایی است که با سیستم ایمنی در ارتباط می‌باشند. از جمله این ژن‌ها می‌توان ژن‌های کدکننده سایتوکاین‌ها را نام برد. سایتوکاین‌ها پروتئین‌هایی هستند که توسط سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی ترشح شده و بسیاری از اعمال این سلول‌ها را تحت کنترل خویش دارند (۸ و ۹). با توجه به نوع سلول تولیدکننده، اثرگذاری و نوع سلول‌های هدف، برخی از این مواد را اینترلوکین<sup>۱۰</sup> (IL)، بعضی را اینترفرون<sup>۱۱</sup> (IFN)، تعدادی را فاکتور نکروز دهنده‌ی توموری<sup>۱۲</sup> (TNF) و برخی را کموکاین<sup>۱۳</sup> می‌نامند.

بیماری تب برفکی (FMD)<sup>۱</sup> شایع‌ترین و مسری‌ترین بیماری ویروسی حیوانات زوج سم در تمام دنیا است. ویروس این بیماری، عضوی از جنس آفتاویروس<sup>۲</sup> در خانواده پیکورناویریده<sup>۳</sup> می‌باشد. از نظر ایمنولوژیکی این ویروس دارای سروتایپ‌های A، O و C در اروپا، SAT<sub>1</sub><sup>۴</sup>، SAT<sub>2</sub> و SAT<sub>3</sub> در آفریقا و یک سروتایپ کاملاً مشخص در آسیا به نام Asia<sub>1</sub> می‌باشد. سروتایپ O رایج‌ترین سروتایپ در سراسر جهان می‌باشد (۵ و ۷). تب برفکی در ایران نیز

۱، ۳ و ۴- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و دانشیاران گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشیار گروه پژوهشی بیوتکنولوژی کشاورزی و دامی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد

(\*) نویسنده مسئول: Email: nassiry@um.ac.ir

۵- استادیار موسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی شعبه مشهد، ایران

- 10- Interleukin
- 11- Interferon
- 12- Tumor necrosis factor
- 13- Chemokines

- 6- Food-and-mouth disease
- 7-Aphtovirus
- 8-Picornaviridae
- 9- Southern African Territories

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.

### نمونه‌گیری خون و واکنش‌های

برای این مطالعه، خونگیری از سایه‌گرگ سافن<sup>۴</sup> حیوانات صورت گرفت. خونگیری در روزهای صفر (پیش از واکنش‌های)، ۷ و ۲۸ پس از تزریق اولین واکنش صورت گرفت. در هر مرتبه ۰/۵ تا ۱ سی‌سی خون درون میکروتیوپ‌های حاوی مقدار کمی EDTA نیم مولار، به عنوان ماده ضد انعقاد خون، جمع‌آوری شد. حیوانات در دو نوبت با واکنش تجاری غیرفعال شده تب برفکی تیپ O (بدون استفاده از یاور<sup>۵</sup>) به میزان ۰/۵ سی‌سی به ازای هر حیوان، به صورت زیرجلدی در ناحیه پشت پا واکنش شدند. اولین تزریق واکنش بلافاصله پس از اولین خونگیری در روز صفر انجام گرفت و دو هفته بعد، یادآور آن تزریق شد.

### طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های IFN- $\gamma$ ، TGF $\beta_1$ و $\beta$ -actin

ابتدا توالی‌های مربوط به ژن‌های IFN- $\gamma$ ، TGF $\beta_1$  و  $\beta$ -actin به عنوان ژن مرجع، به طور جداگانه از بانک اطلاعات ژنی (NCBI)<sup>۶</sup> جمع‌آوری شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier نسبت به طراحی آغازگرهای اختصاصی اقدام شد. سنتز آغازگرها توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) صورت گرفت (جدول ۲).

### استخراج RNA

به منظور استخراج RNA از نمونه‌های خون، از کیت استخراج ستونی RNA<sup>۷</sup> (DENAZist, Iran)، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. پس از استخراج RNA، برای اطمینان از صحت کار و غلظت مناسب RNA، غلظت‌های RNA با دستگاه اسپکتوفتومتر نانودراپ MD-1000 اندازه‌گیری شدند.

### تبدیل RNA به cDNA

نمونه‌های RNA استخراج شده از خون کوچک‌های هندی، برای انجام مرحله‌ی نسخه برداری معکوس و ساخت cDNA توسط کیت RevertAid<sup>TM</sup> H Minus ساخت شرکت فرمنتاز (آلمان) مورد استفاده قرار گرفت.

IFN- $\gamma$  یک مولکول ضروری جهت فعال کردن سیستم ایمنی در مقابل بیماری‌های عفونی می‌باشد (۱۲ و ۲۱). برخی از تحقیقات گذشته اثبات کرده‌اند واکنش‌های IFN- $\gamma$  در مقابل تب برفکی، تولید هر دو نوع سایتوکاین‌های Th<sub>1</sub> و Th<sub>2</sub> را القا می‌کند. در گوسفند پس از تزریق واکنش تب برفکی، بیان ژن IFN- $\gamma$  در پلاسما خون افزایش معنی‌داری داشت (۴). مینگالا و همکاران (۱۷) افزایش معنی‌داری را در بیان ژن‌های IFN- $\gamma$ ، IL-2، IL-10 و TNF $\alpha$  در پاسخ به تزریق واکنش غیرفعال شده تب برفکی در بوفالوی آبی گزارش نمودند. همچنین افزایش بیان برخی سایتوکاین‌ها در گونه‌هایی نظیر موش (۱۹)، خوک (۲)، گاو (۲۴) در پاسخ به واکنش یا ویروس بیماری تب برفکی گزارش شده است. در ایران، پاسخ ایمنی در کوچک هندی در مقابل ویروس تب برفکی تیپ A87/IRN با بررسی سطوح آنتی‌بادی‌ها مورد مطالعه قرار گرفت (۱۸). یکی از راه‌های آزمودن اثرات واکنش‌های نوترکیب، بررسی تغییر بیان ژن‌های سایتوکاینی در شرایط تزریق واکنش می‌باشد. اگر تغییر بیان این ژن‌ها طی تزریق واکنش نوترکیب مشابه تزریق واکنش تجاری به حیوان باشد، می‌توان این پاسخ مشابه را دلیلی بر تاثیر واکنش نوترکیب بر سیستم ایمنی تلقی نمود.

کوچک‌های هندی<sup>۱</sup> حساس‌ترین حیوان آزمایشگاهی به ویروس تب برفکی می‌باشد (۱۱) که در این مطالعه به عنوان یک مدل حیوانی، جهت ارزیابی کارکرد واکنش مورد آزمایش، توسط روش Real-time PCR نسبی<sup>۲</sup> و با اندازه‌گیری بیان ژن‌های IFN- $\gamma$  و TGF $\beta_1$ <sup>۳</sup> مورد استفاده قرار گرفت. امروزه روش Real-time PCR کاربردهای زیادی در اکثر زمینه‌های علوم زیستی از جمله اندازه‌گیری کمی بیان ژن‌های مختلف دارد (۱۳). از این رو هدف از این مطالعه، معرفی ژن‌های سایتوکاینی القا شونده در پاسخ به واکنش تب برفکی به منظور استفاده از آن‌ها به عنوان شاخص‌هایی جهت بررسی پاسخ‌های ایمنی در نتیجه واکنش‌های نوترکیب در مطالعات آینده بود.

### مواد و روش‌ها

#### حیوانات آزمایشگاهی

حیوانات مورد مطالعه در این تحقیق متشکل از ۸ سر کوچک هندی نر با وزن تقریبی ۴۰۰-۵۰۰ گرم و سن ۳ ماه بودند که ۴ سر از آن‌ها در گروه شاهد (بدون واکنش) و ۴ سر در گروه واکنش شده طبقه‌بندی شدند. در طی دوره نگهداری، حیوانات با خوراک پلت شده تغذیه شدند (جدول ۱). همچنین به دلیل این‌که کوچک هندی قادر

4- Saphenous vein

5- Adjuvant

6- National Center for Biotechnology Information

7- Column RNA isolation kit

1- Guinea pig

2- Relative Real-time PCR

3- Transforming growth factor  $\beta_1$

جدول ۱- ترکیب شیمیایی جیره پلت مورد استفاده (بر حسب درصد جیره یا واحد ذکر شده)

ترکیب شیمیایی	درصد
ماده خشک (بر حسب درصد وزن تر)	۹۵
پروتئین خام	۱۸/۴
فیبر خام	۱۲
چربی خام	۳
نمک	۰/۵
نسبت کلسیم به فسفر	۱/۵
انرژی قابل متابولیسم (بر حسب کیلو کالری در کیلوگرم ماده خشک)	۲۵۵۰

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های Real-time PCR

Target gene	Primer	Primer length (bp)	Product length (bp)	Melting temperature (°C)	GC%
IFN- $\gamma$	F-5' AAGACAACAGCAGCAACAAGGTG 3'	23	137	60	47.8
	R-5' TCGTTTCTCTGGTTCGGTGAC 3'	22		59.9	54.5
TGF $\beta$ <sub>1</sub>	F-5' TGAGCCAAGGAGAGGAATTAGAGG 3'	24	134	59.3	50
	R-5' GCCATGAATAGCAGCCAGGTC 3'	21		58.7	57.1
$\beta$ -actin	F-5' GCCTCACTCTCCACCTTCCAG 3'	21	116	59.3	61.9
	R-5' AACGCAGCAAAGTAGTAACAGTCC 3'	24		59.5	45.8

ABI (Applied) 7300 با استفاده از دستگاه Real-time PCR Biosystems و کیت Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix استفاده شد. درون هر چاهک ۱۲ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، ۳ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۱۴ پیکومول از هر آغازگر، ۸۰ نانوگرم cDNA و ۸/۸ میکرولیتر آب دو بار تقطیر ریخته شد. پس از تهیه حجم مورد نظر، ابتدا یک مرحله واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد. سپس واکنش PCR در ۴۵ چرخه، شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برنامه دمایی PCR برای تمامی ژن‌ها، مشابه بود. با اتمام واکنش PCR، منحنی ذوب با برنامه دمایی ۰/۵ درجه سانتی‌گراد در هر چرخه و بین دمای ۹۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد به منظور بررسی اختصاصی بودن واکنش PCR رسم گردید. از هر نمونه سه تکرار گذاشته شد.

#### آنالیز آماری بیان ژن‌های IFN- $\gamma$ و TGF $\beta$ <sub>1</sub>

با پایان واکنش Real-time PCR، نرم افزار دستگاه، به طور خودکار خط آستانه را رسم کرد. بررسی اطلاعات با استفاده از نرم‌افزارهای ABI 7300 sequence Detection system و SDS Ver 1/4 (Applied Biosystems, USA) انجام شد. در اندازه‌گیری نسبی، تغییر در سطوح mRNA یک ژن نسبت به یک ژن مرجع (ژن خانه‌دار)<sup>۲</sup> که به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته می‌شود،

ابتدا 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<sup>۱</sup> 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 (20 U) Inhibitor، ۲ میکرولیتر dNTPs (با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) به همراه ۱ میکرولیتر آنزیم 200 MM-MuLV Reverse Transcriptase (۲۰۰ U) به مخلوط اضافه شد. میکروتیوب به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و واکنش نسخه برداری معکوس با قرار دادن میکروتیوب در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه خاتمه یافت. محصول واکنش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

#### واکنش Real-time PCR

با استفاده از قابلیت دستگاه (Applied Biosystems 7300) در حضور مخلوط اصلی اقدام به رسم یک شیب دمایی Real-time PCR شد. این آزمون برای ژن‌های IFN- $\gamma$ ، TGF $\beta$ <sub>1</sub> و  $\beta$ -actin در طیف حرارتی ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. بالاترین  $\Delta Rn$  و کمترین C<sub>T</sub> ملاک انتخاب دمای بهینه اتصال آغازگرها بود. بر این اساس، دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای هر یک از ژن‌ها انتخاب شد.

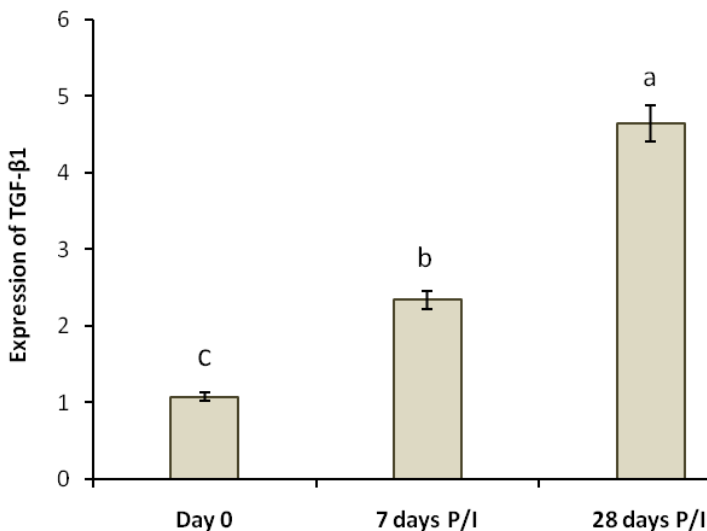
به منظور اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌ها، از رویه نسبی روش

2-House keeping gene

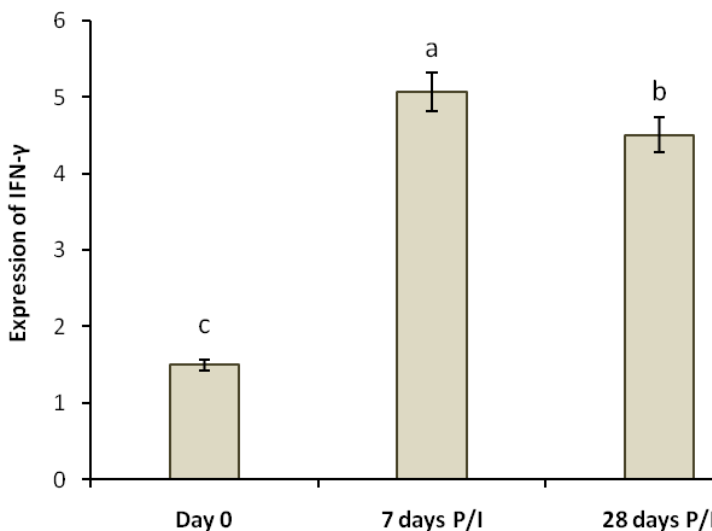
1 -Nuclease-free

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. نتایج، بازدهی مناسبی را برای ژن‌ها نشان داد. بررسی آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS و آزمون t استیودنت<sup>۱</sup> در سطح معنی‌داری ۵٪ ( $P < 0.05$ ) انجام شد.

اندازه‌گیری می‌شود. در این روش، از رنگ‌های فلورسانس و یا شاخص‌های الیگونوکلوئیدی استفاده می‌گردد (۶). در تحقیق حاضر، تغییرات نسبی بیان ژن‌های IFN- $\gamma$  و TGF $\beta_1$  نسبت به ژن  $\beta$ -actin نرمال شد. برای تعیین میزان بیان ژن‌های IFN- $\gamma$  و TGF $\beta_1$  از روش لیواک و فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  استفاده شد (۱۶). در این روش فرض بر این است که بازدهی ژن مورد نظر و ژن مرجع، برابر و نزدیک به ۱۰۰

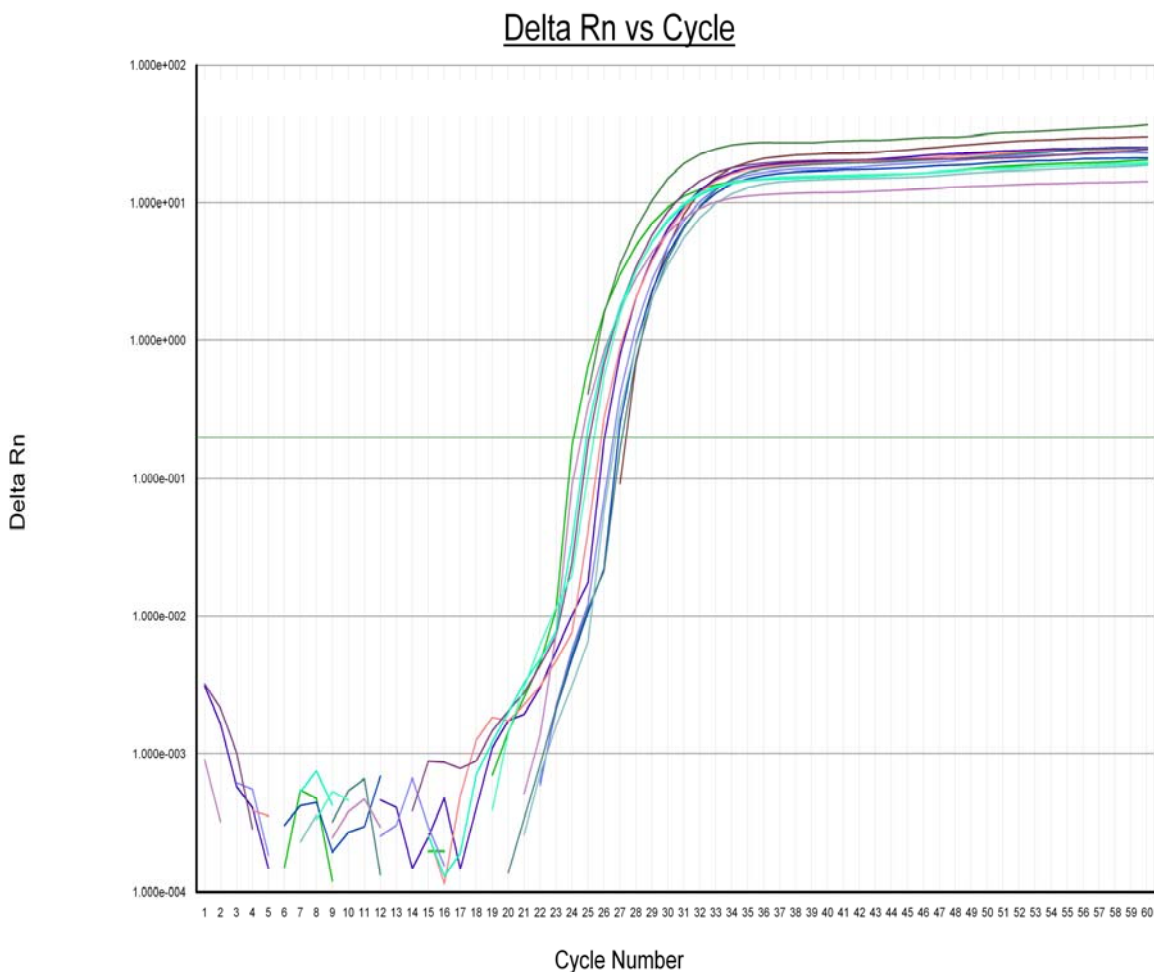


شکل ۱- نتایج بیان ژن TGF $\beta_1$  در خونگیری‌های اول، دوم و سوم. ستون‌های با حروف متفاوت، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند ( $P < 0.05$ ). PI: پس از تزریق (Post injection).



شکل ۲- نتایج بیان ژن IFN- $\gamma$  در خونگیری‌های اول، دوم و سوم. ستون‌های با حروف متفاوت، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند ( $P < 0.05$ ). PI: پس از تزریق (Post injection).

1- Student t-test



Selected Detector: ACTB  
Document: Plate1 (ddCt Study)

شکل ۳- منحنی تکثیر ژن  $\beta$ -Actin. خط آستانه، با خط سبز رنگ افقی نشان داده شده است.

طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۰، ۲۰ و ۲۲) اما در مورد عملکرد و تعادل سایتوکاین‌های القا شده و نیز چگونگی همکاری آن‌ها در واکنش‌های ایمنی، شناخت اندکی وجود دارد. نتایج این مطالعه نشان داد تزریق واکسن تب برفکی تیپ ۰ به خوکچه‌ی هندی باعث تحریک سیستم ایمنی حیوان شده و بیان ژن‌های  $\text{IFN-}\gamma$  و  $\text{TGF}\beta_1$  در خونگیری‌های دوم و سوم نسبت به خونگیری اول افزایش یافت. آزمایشات مشابهی که برای تعیین بیان ژن  $\text{IFN-}\gamma$  توسط مینگالا و همکاران (۱۷) روی بوفالوی آبی، بارت و همکاران (۴) روی گوسفند، لی و همکاران (۱۵)، بارنارد و همکاران (۲) و وانگ و همکاران (۲۳) همگی روی خوک انجام شده بود، افزایش بیان این ژن را پس از تزریق واکسن یا ویروس تب برفکی نشان داد. بیان ژن  $\text{IFN-}\gamma$  در این مطالعه با این نتایج مطابقت داشت. به طور کلی سایتوکاین‌ها به صورت مولکول‌های از پیش ساخته

## نتایج

نتایج نشان داد بیان ژن‌های  $\text{TGF}\beta_1$  و  $\text{IFN-}\gamma$  در خونگیری‌های دوم و سوم نسبت به خونگیری اول، به طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) افزایش یافت. بیان ژن  $\text{TGF}\beta_1$  در خونگیری سوم نسبت به خونگیری دوم، به طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) افزایش داشت ولی برای ژن  $\text{IFN-}\gamma$  کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) مشاهده شد (شکل‌های ۱ و ۲). منحنی‌های روند تکثیر ژن‌های  $\beta$ -actin،  $\text{IFN-}\gamma$  و  $\text{TGF}\beta_1$  در شکل‌های ۳، ۴ و ۵ نشان داده شده است.

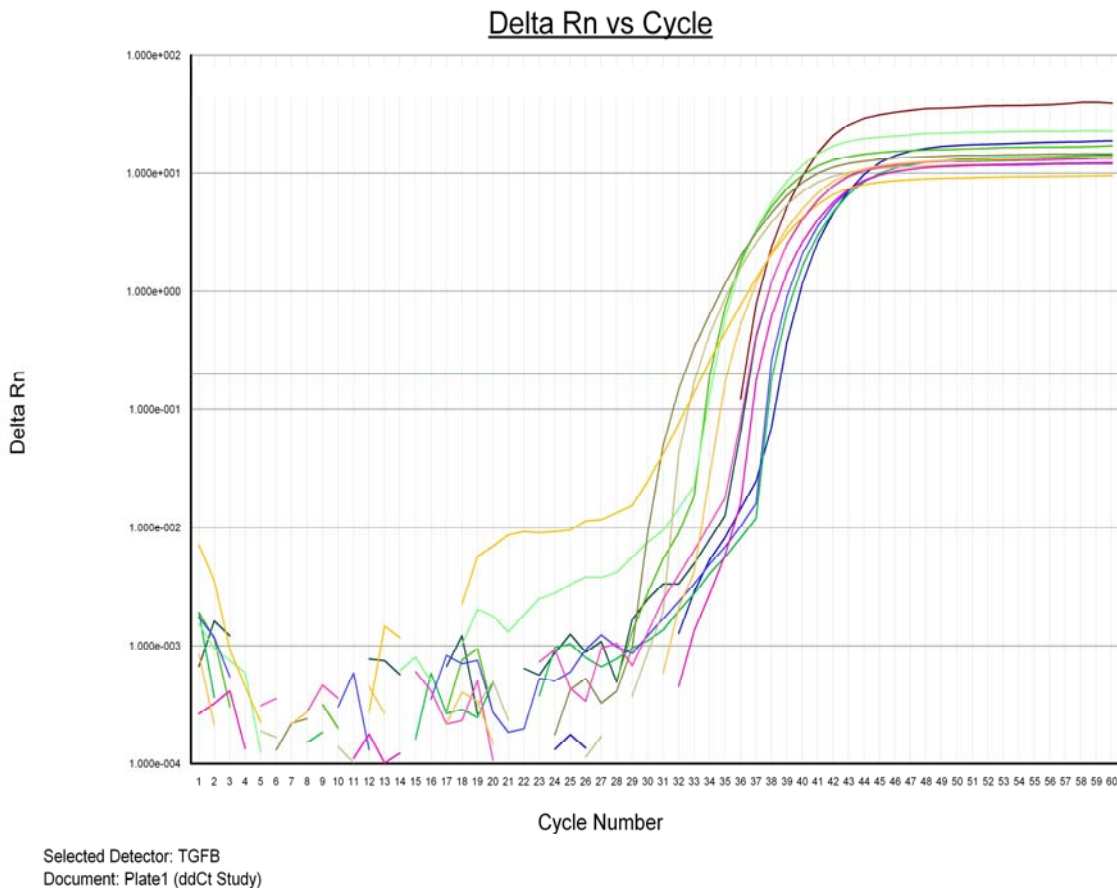
## بحث

اگرچه در سال‌های اخیر پاسخ‌های ایمنی با میانجی‌گری سلول به

نتیجه موثر باشند. بارنت و همکاران (۳) سطوح  $IFN-\gamma$  و  $TGF\beta_1$  را نزدیک و یا حتی پایین‌تر از مقادیر اولیه در پیش از واکنش‌های ایمنی واکسن تب برفکی تشخیص دادند. بیان ژن‌های  $IFN-\gamma$  و  $TGF\beta_1$  در خوکچه هندی با این نتیجه مغایرت داشت. به منظور تعیین یک روش سریع برای شناسایی پاسخ‌های ایمنی سلولی به ویروس تب برفکی، مطالعات مختلفی صورت گرفته است. Real-time PCR روشی دقیق و مناسب برای مطالعه میزان بیان ژن‌های سایتوکاینی بوده و به عنوان ابزاری دقیق برای بررسی برنامه‌های ایمنی‌زایی واکسن‌های جدید می‌باشد. به علت این‌که افزایش بیان سایتوکاین‌ها شاخصی از پاسخ سیستم ایمنی می‌باشد، در مطالعات آینده می‌توان از این ژن‌ها به عنوان شاخص‌هایی جهت بررسی اثرات واکسن‌های نو ترکیب و تحقیق در رابطه با القای آن‌ها توسط این گونه واکسن‌ها استفاده نمود.

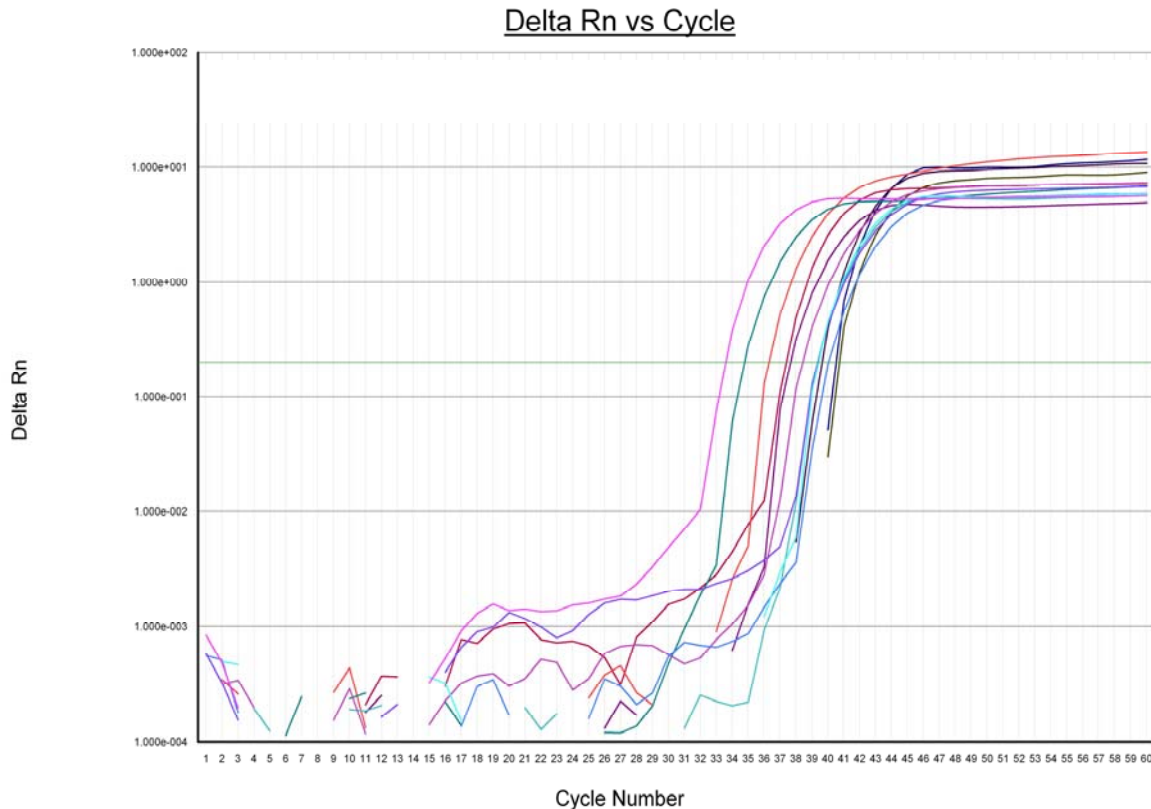
وجود ندارند و تولیدشان با آغاز نسخه برداری از ژن‌ها انجام می‌گیرد. این فعالیت نسخه برداری معمولاً موقتی بوده و mRNA کدکننده سایتوکاین‌ها ناپایدارند (۸). همچنین سایتوکاین‌ها اثرات هم‌افزایی<sup>۱</sup> و یا ناسازگار<sup>۲</sup> بر هم داشته و معمولاً روی تولید و عمل بیولوژیک یکدیگر تاثیر می‌گذارند (۱۷). بنابراین کاهش بیان ژن  $IFN-\gamma$  در خونگیری سوم نسبت به خونگیری دوم، ممکن است به دلیل اثرات متقابل سایتوکاین‌ها بر یکدیگر و تولید موقتی آن باشد (۱۴).

با توجه به این‌که خونگیری سوم دو هفته پس از تزریق واکسن یادآور صورت گرفت، افزایش بیان ژن  $TGF\beta_1$  در خونگیری سوم نسبت به دوم را می‌توان به مقدار<sup>۳</sup> واکسن تزریقی نسبت داد به طوری که با تزریق واکسن یادآور، میزان بیان این ژن نیز افزایش می‌یابد. بنابراین بیان ژن  $TGF\beta_1$  نسبت به ژن  $IFN-\gamma$  بیشتر تحت تاثیر مقدار واکسن تزریقی (Dose dependent) قرار می‌گیرد. اثرات متقابل سایتوکاین‌ها بر یکدیگر نیز ممکن است در بدست آمدن این



شکل ۴- منحنی تکثیر ژن  $TGF\beta_1$ . خط آستانه، با خط سبز رنگ افقی نشان داده شده است.

- 1- Synergism
- 2 -Antagonism
- 3- Dose



Selected Detector: IFNG  
Document: Plate1 (ddCt Study)

شکل ۵- منحنی تکثیر ژن IFN- $\gamma$ . خط آستانه، با خط سبز رنگ افقی نشان داده شده است.

بررسی بیان سایر سایتوکاین‌ها، در مطالعات آینده می‌باشد. همچنین در صورت فراهم بودن شرایط ایمنی زیستی، می‌توان در مطالعات آینده در کنار دو گروه شاهد و واکسینه، از گروه تیمار شده با ویروس تب برفکی و نیز یک گروه تیمار شده با واکسن نو ترکیب 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.

به منظور روشن تر شدن اهمیت پاسخ‌های ایمنی سلولی به ویروس تب برفکی و نیز بررسی اثرات متقابل سایتوکاین‌ها، نیازمند

## منابع

- ۱- رسولی بیرامی، ن.، و. عطارد، م.، خلیج، د.، عبدالهی بیرون، س. م.، بارنی، ج.، امامی، ع.، گنجی، ع.، زارعی طوسی، م.، سهرابی. ۱۳۸۹. کنترل و ریشه‌کنی بیماری تب برفکی. صفحات ۱۱۲. چاپ اول، انتشارات نوربخش، تهران.
- 2- Barnard, A. L., A. Arriens, S. Cox., P. Barnett, B. Kristensen, A. Summerfield, and K. C. McCullough. 2005. Immune response characteristics following emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease. *Vaccine*. 23: 1037-1047.
- 3- Barnett, P.V., S. J. Cox, N. Aggarwal, H. Gerber, and K. C. McCullough. 2002. Further studies on the early protective responses of pigs following immunisation with high potency foot and mouth disease vaccine. *Vaccine*. 20: 3197-3208.
- 4- Barnett, P., P. Keel, S. Reid, R. Armstrong, R. Statham, and C. Voyce. 2004. Evidence that high potency foot-and-mouth disease vaccine inhibits local virus replication and prevents the "carrier" state in sheep. *Vaccine*. 22: 1221-1232.
- 5- Brown, F. 2003. The history of research in foot-and-mouth disease. *Virus Res*. 91: 3-7.

- 6- Bustin, S. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *J. Mol Endocrinol.* 29: 23-39.
- 7- Callis, J. J., P. D. Mckercher, and J. H. Graves. 1968. Foot-and-mouth disease - a review. *J. Am. Vet Med Assoc.* 153:1798-1802.
- 8- Clements, M. J. 1991. Cytokines. *Bios Sci. Publication.* 12: 56-67.
- 9- Cox, S. J., N. Aggarwal, R. J. Statham, and P.V. Barnett. 2003. Longevity of antibody and cytokine responses following vaccination with high potency emergency FMD vaccines. *Vaccine.* 21: 254:1336-1347.
- 10- Domingo, E., E. Baranowski, C. Escarmis, and F. Sobrino. 2002. Foot-and-mouth disease virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 25: 297-308.
- 11- Eslampanah, M., H. Mahravani, M. H. Hablolvarid, H. Isadi, M. Sotudeh, F. Jirani, and F. Talebloo. 2010. Organic Circulation and persistence of Foot-and-Mouth disease virus type O in guinea pig. *Archives of Razi Institute.* 65: 67-73.
- 12- Fong, Y. 1990. Cytokines and the cellular response to injury and infection. *Trauma.* 5: 54-63.
- 13- Giulietti, A., L. Overbergh, D. Valckx, B. Decallonne, R. Bouillon, and C. Mathieu. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 25: 386-401.
- 14- Joseph, L., L. M. Fink, and M. H. Jensen. 2002. Cytokines in coagulation and thrombosis: a pre-clinical and clinical review. *Blood, Coagul Fibrinolysis.* 13: 105-116.
- 15- Li, Y., N. Aggarwal, H. Takamatsu, C. M. Sterling, C. Voyce, and P. V. Barnett. 2006. Enhancing immune responses against a plasmid DNA vaccine encoding a FMDV empty capsid from serotype O. *Vaccine.* 24: 4602-4606.
- 16- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25:402-408.
- 17- Mingala, C. N., S. Konnai, F. A. Venturina, M. Onuma, and K. Ohashi. 2009. Quantification of water buffalo (*Bubalus bubalis*) cytokine expression in response to inactivated foot-and-mouth disease (FMD) vaccine. *Res. Vet. Sci.* 87: 213-217.
- 18- Motamedi Sedeh, F., A. Khorasani, K. Shafae, M. Salehizadeh, H. Fatolahi, K. Arbabi, S. Daneshvari, and M. Abhari. 2007. Immune response of foot and mouth disease virus type a87/IRN inactivated vaccine by gamma irradiation on guinea pig in Iran. *Iran. J. Sci. Technol.* 31: 35-41.
- 19- Ostrowski, M., M. Vermeulen, O. Zabal, J. R. Geffner, A. M. Sadir, and O. J. Lopez. 2005. Impairment of Thymus-Dependent Responses by Murine Dendritic Cells Infected with Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Immunol.* 175:3971-3979.
- 20- Saiz, M., J. I. Nunez, M. A. Jimenez-Clavero, E. Baranowski, and F. Sobrino. 2002. Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control. *Microbes and Infection.* 4: 1183-1192.
- 21- Sarah, J. C., and P. V. Barnett. 2009. Experimental evaluation of foot-and-mouth disease vaccines for emergency use in ruminants and pigs: a review. *EDP Sci.* 40: 1-30.
- 22- Sobrino, F., and E. Domingo. 2001. Foot-and-mouth disease in Europe. FMD is economically the most important disease of farm animals. Its re-emergence in Europe is likely to have consequences that go beyond severe alterations of livestock production and trade. *EMBO Rep.* 2: 459-461.
- 23- Wang, C. Y., S. Lynn, M. H. Jong, Y. L. Lin, T. Y. Chang, A. M. Walfield, A. Wang, J. Wang, and C. Sia. 2004. Full Protection in Pigs against FMDV Challenge following Single Dose of Synthetic Emergency FMD Vaccine. Report of the Session of the FAO Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Crete, Greece. 12-15 October.
- 24- Zhang, Z., R. Ahmed, D. Paton, and J. B. Bashiruddin. 2009. Cytokine mRNA responses in bovine epithelia during foot-and-mouth disease virus infection. *Vet. J.* 179: 85-91.