DOI: 10.22092/VJ.2020.343080.1725
شماره ۱۳۳ زمستان ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی بیان ژن‌های اینترلوکین 10 و TNF-α در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در پاسخ به عفونت ویروسی سپتی سمی خونریزی دهنده (VHS)

• **مجتبی افضلی (نویسنده مسئول)**
رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
• **قدرت رحیمی میانجی**
رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
• **محسن قلی زاده**
رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۳-۰۷ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹-۰۹-۱۵
Email: mojtabaafzaly@yahoo.com

چکیده

در میان عملکردهای متابولیکی ضروری کبد، نقش این بافت به عنوان یک میانجی‌گر در سیستم ایمنی نیز مورد توجه قرار گرفته است. اگرچه حضور و نقش سیتوکین‌ها و کموکین‌ها در سیستم ایمنی پستانداران به خوبی مورد ارزیابی قرار گرفته ولی مطالعات اندکی در این زمینه در ماهیان انجام شده است. ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی مانند اینترلوکین 10 و *TNF-α* نقش مهمی در سیستم ایمنی سلول‌های مختلف دارند. در پژوهش حاضر، میزان بیان ژن‌های اینترلوکین 10 و *TNF-α* در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در روز هشتم پس از چالش با ویروس VHS مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد شش نمونه از هر کدام از دو گروه کنترل و آلوده شده به ویروس VHS انتخاب و سپس استخراج RNA از بافت کبد نمونه‌ها انجام گرفت. بیان افتراقی ژن‌های اینترلوکین 10 وTNF-α بین دو گروه آلوده شده به ویروس و گروه کنترل با استفاده از Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. مقایسه تغییرات نسبی بیان ژن‌ها با استفاده از روش‌های آماری در سه تکرار از هر نمونه انجام شد. آنالیز داده‌ها نشان داد که بیان ژن‌های اینترلوکین 10 و *TNF-α* در پاسخ به عفونت ویروسی سپتی سمی خونریزی‌دهنده افزایش یافت. در این مطالعه اگر چه بیان هر دو ژن اینترلوکین 10 و *TNF-α*، افزایش معنی‌داری داشته است، اما میزان بیان ژن اینترلوکین 10 در گروه تیمار ۲۵ برابر بیشتر از گروه کنترل بوده است. افزایش بیان این دو سایتوکین، خصوصا القاء بیش از حد بیان اینترلوکین 10 توسط ویروس ممکن است منجر به تضعیف عملکرد سیستم ایمنی شود. به طور کلی بررسی تغییرات بیان نسبی ژن‌های سیتوکینی می‌تواند دانش ما در فهم مکانیسم مولکولی عملکرد سیستم ایمنی در مقابل پاتوژن‌ها را افزایش دهد. در این صورت می‌توان با توسعه نشانگرهای مولکولی به منظور افزایش مقاومت به بیماری‌های ویروسی در برنامه‌های به‌نژادی در صنعت پرورش ماهی بهره گرفت.

کلمات کلیدی: بیان ژن، اینترلوکین 10، *TNF-α*، سیستم ایمنی، ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، ویروس VHS

Veterinary Researches & Biological Products No 133 pp: 194-201

TNF-α and interleukin 10 genes expression in rainbow trout in response to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection

By: Afzali, M., (Corresponding Author) Genetics and Animal Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran. Rahimi mianji, Gh., Genetics and Animal Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran. and Gholizadeh, M., Genetics and Animal Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.

Received: 2020-05-27 **Accepted: 2020-12-05**

Email: mojtabaafzaly@yahoo.com

Among the essential metabolic functions of the liver, the role of this tissue as a mediator in the immune system has also been considered. Although the role of cytokines and chemokines in mammalian immune systems has been well evaluated, few studies have been performed in fish. Genes involved in the immune system, such as interleukin 10 and TNF-α, play an important role in the immune system of various cells. In the present study, the expression of interleukin 10 and TNF-α genes in rainbow trout was assessed following VHS virus treatment. Six samples from each of two control group and infected group with VHS virus were selected and then total RNA was extracted from liver tissue. The differential expression of interleukin 10 and TNF-α genes between the two studied groups (infected with the virus vs control) was assessed using Real-Time PCR. Comparison of relative changes in gene expression were assessed by statistical methods in three replications of each sample. Analysis of data showed that the expression of interleukin 10 and TNF-α genes increased in response to VHS virus. In this study, although the expression of both interleukin 10 and TNF-α genes were significantly increased, but the rate of interleukin 10 expression in the treatment group was 25 times higher than the control group. Increased expression of these two cytokines, in particular over induction of interleukin 10 expression by the virus may lead to impaired of immune function. As a final conclusion, studying the relative changes of cytokine genes expression can increase our knowledge on molecular mechanism of immune function against pathogens. In this case, it is possible to develop molecular markers in order to increase resistance to viral disease in breeding programs of industrial fish farming.

Key words: Gene Expression, interleukin 10, TNF-α, Immune system, Rainbow trout, VHS virus

مقدمه

پرورش و تکثیر ماهی قزل‌آلا در سال‌های اخیر به سرعت توسعه یافته است و در مزارع پرورشی میزان تولید در واحد سطح هم رشد چشمگیری داشته است. هم زمان با چنین توسعه‌ای که افزایش تراکم ماهی در واحد سطح را به همراه دارد، انواع بیماری‌های عفونی در ماهیان پرورشی نیز بروز و گسترش می‌یابند. برای مثال ویروس سپتی سمی خونریزی‌دهنده (viral haemorrhagic septicemia virus : VHSV) به عنوان عامل اصلی و از بیماری‌های جدی در ماهیان پرورشی صنعتی و ماهیان حیات وحش در نیم کره شمالی گزارش شده است (۱۱). این بیماری بسیار مسری می‌باشد و عامل بیماری از خانواده رابدوویریده و جنس نووی‌رابدوویروس است. چهار ژنوتیپ (I-IV) ویروس VHS و زیرگروه‌های (a-e) از لحاظ جغرافیایی توزیع متفاوتی دارند. به طوری که ژنوتیپ I, II و III در اروپا در حالی‌که ژنوتیپ IV در آمریکای شمالی و آبهای اقیانوس آرام شمالی یافت می‌شوند. زیرگروه Ia باعث ایجاد بیماری بسیار کشنده برای قزل‌آلای رنگین کمان شده که در مزارع آب‌های آزاد آلوده شده با ویروس VHS در قاره اروپا پیدا می‌شود. زیرگروه Ib نیز باعث بروز و شیوع بیماری VHS در قزل‌آلای رنگین کمان در سوئد شده است. همچنین، زیرگروه Ic و Id در نمونه‌های از ماهی در دانمارک و نروژ جدا شده است (۱). دوساند و همکاران (۲۰۱۰) برای اولین بار ژنوتیپ III ویروس VHS از ساحل غربی نروژ را شناسایی نمودند. این ویروس دارای چهار ژنوتیپ است (GI-GIV). آنالیز توالی ژن‌های پروتیئن‌های G و N نشان داد که این ژنوتیپ متمایز از سایر ژنوتیپ‌های شناخته شده قبلی است و ژنوتیپ III بر خلاف دیگر ژنوتیپ‌ها کمتر باعث بیماری‌زایی در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان می‌شود (۸). چوهرتز و همکاران (۲۰۱۳) القای عفونت ویروسی را به عنوان مکانیسم فعل و انفعالات میزبان و پاتوژن در روند بیماری‌زایی ویروس

مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق دو گونه سپر ماهی و قزل‌آلای رنگین کمان از طریق تزریق داخل صفاقی به ویروس سازش‌یافته به گونه‌های دریایی و همچنین ویروس سازش‌یافته به قزل‌آلا آلوده شدند. در سپر ماهی هر دو مورد تکثیر و باعث بیماری‌زایی شدند اما قزل‌آلای رنگین کمان فقط با ویروس سازش‌یافته به قزل‌آلا واکنش نشان دادند. نتایج همچنین نشان داد که گونه‌های دریایی می‌توانند به عنوان مخزن و ناقل برای ویروس باشند (۱۹). کوییلت و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی لاین‌های هم خون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به بررسی میزان حساسیت نسبت به ویروس پرداختند. این محققین با استفاده از دست‌ورزی کروموزومی، نه کلون از ماهی قزل‌آلا ایجاد کرده و سپس مقاومت آن‌ها به ویروس را سنجیدند. ایجاد عفونت ویروسی با تزریق داخل صفاقی و آلودگی آب بررسی شد. پس از تزریق داخل صفاقی هیچ گونه بقا ثبت نشد در حالی که کلون‌هایی که از طریق آب دچار چالش شده بودند دامنه متنوعی از بقا را نشان دادند (۱۸). داله و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی ژنوتیپ III ویروس در ماهیان دریا و ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی موفق به یافته‌های جدیدی شدند. بائروال و همکاران (۲۰۱۳)، در تحقیقی حساسیت و مقاومت ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در پاسخ به چالش Myxobolus cerebralis را مورد ارزیابی قرار دادند که در این پژوهش بیان ژن‌های اینترلوکین1B *KLF2*, *STAT3*, *STAT5*, *IFN-y*, *IRF1* و *iNOS* با استفاده از روش RealTime-PCR بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که سطوح بیان ژن‌های اینترلوکین1B , *IFN-y*, *IRF1* و *iNOS* پس از چالش افزایش چشمگیری داشته است (۳). کاسترو و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهشی پاسخ سیستم ایمنی ماهیان قزل‌آلا پس از چالش با ویروس VHS را مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه این محققین نشان داد که تزریق داخل صفاقی ویروس VHS روی ایمنی کبدی و بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی در روزهای اول، دوم و پنجم پس از تزریق ارتباط دارد. نتایج بدست آمده نشان داد که لنفوسیت‌های T یک نقش کلیدی در پاسخ اولیه سیستم ایمنی به VHSV در کبد داشته و افزایش معنی‌داری در سطوح mRNA ژن‌های *Mx*، *CD4*، *Perforin*، *Cxcl8*، *TLR3*، *TLR2*، *IFN* اینترلوکین 6، اینترلوکین10 و TNF-α در پاسخ به VHSV گزارش شده است که نشان‌دهنده نقش مهم این فاکتورها در پاسخ کبد به عفونت ویروسی می‌باشد (۵). امروزه بررسی پروفایل بیان ژن یک تکنیک رایج در زمینه شناسایی مارکرهای تشخیصی بیماری‌های مختلف می‌باشد. از دیگر کاربردهای این تکنیک بررسی وجود پاتوژن‌ها حتی به میزان اندک در بدن میزبان می‌باشد. از سوی دیگر بسیاری از محققان برای فهم بیشتر در مورد مکانیسم سیستم ایمنی بدن در برابر پاتوژن‌ها، پروفایل ژنی را مورد بررسی قرار می‌دهند تا از این طریق، ژن‌ها، پروتئین‌ها و مسیرهای بیولوژیک ژنی را شناسایی کنند. با توجه به اهمیت این موضوع و نقش ژن‌های کاندید و هم‌چنین عدم وجود گزارش در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در ایران، بررسی میزان بیان ژن‌های اینترلوکین 10 و *TNF-α* دخیل در سیستم ایمنی در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش

مراحل کلی پرورش ماهیان مورد استفاده در این پژوهش، در پژوهش آقای قادرزاده و همکاران آمده است (۱۰). فلذا در این قسمت به اختصار راجع به آن توضیح داده می‌شود. در این پژوهش ۳۱۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگی کمان‌نژاد تروتلاج آمریکایی تهیه شد که پس از سپری شدن دوره عادت‌دهی و کسر تلفات، تعداد کل ماهیان باقیمانده ۲۸۱ قطعه بود. کل ۲۸۱ قطعه ماهی در مجموع در ۱۸ عدد تانک پرورش ماهی فایبرگلاس با ابعاد (عرض ۴۵ cm، طول ۶۰ cm و ارتفاع ۷۰ cm) و در هر تانک ۱۵ قطعه ماهی نگهداری شد ولی گروه کنترل در دو عدد تانک (با ۲۱ و ۲۰ قطعه) نگهداری شدند. این تعداد ماهی با متوسط وزن ۸۸±۳٫۳۸ gr، به مدت پنج هفته نگهداری شدند. مقدار توده‌ی پرورش مورد استفاده در هر تانک ۱/۷ kg بود. دوره‌ی سازگاری ماهیان ۱۸ روز بود و غذادهی ماهیان بر اساس وزن توده‌ی زنده ماهیان و دمای آب بر اساس استانداردهای موجود و راهنمای غذادهی انجام شد. غذادهی ماهیان سه نوبت در شبانه‌روز (صبح، ظهر و غروب) و تعویض آب مخازن پرورشی دو بار (صبح و شب) انجام شد. واحدهای آزمایش بصورت سیستم مداربسته بود و تعویض و جایگزینی آب هر سه ساعت یک بار بصورت خودکار انجام می‌گرفت. هوادهی ماهیان در داخل هر تانک به وسیله‌ی سنگ هوا (تغذیه شده با پمپ) و بیوفیلتر (شرکت ماهیران) انجام شد. این پژوهش در بخش پرورش آبزیان، مرکز رشد و کارآفرینی دانشگاه آزاد واحد رودهن واقع در شهرستان رودهن از توابع استان تهران انجام شد.

چالش ویروسی

در این پژوهش، ۲۴ ساعت قبل از تزریق ویروس، غذادهی به ماهیان قطع شد و در روز ۱۸ پرورش، ماهیان تحت چالش ویروس قرار گرفتند. در این مرحله ماهیان به پنج گروه عبارتند از گروه اول تیمار با ۰/۰۶ ml ویروس VHS، گروه دوم تیمار با ۰/۰۳ ml ویروس VHS، گروه سوم تیمار با ۰/۰۶ ml سرم فیزیولوژی، گروه چهارم تیمار با ۰/۰۳ ml سرم فیزیولوژی، گروه پنجم تیمار کنترل بدون تزریق دسته‌بندی و در داخل تانک قرار داده شدند. تزریق صفاقی ویروس (5×10^5 PFU/ml)، توسط سرنگ ۱ ml مخصوص انسولین انجام شد. ویروس VHS سویه Ia از مرکز ملی تشخیص، آزمایشگاه‌های مرجع و مطالعات کاربردی وابسته به سازمان دامپزشکی کل کشور واقع در استان البرز تهیه شد. کلیه ماهیان مورد استفاده در این پژوهش با توجه به دستورالعمل، راهنمای حقوق و آسایش آبزیان مطابق منشور سازمان دامپزشکی کشور پرورش یافتند. چالش ویروسی در این پژوهش با توجه به نظارت مستقیم و موارد ایمنی زیستی زیر نظر متخصصان بیماری‌های آبزیان سازمان دامپزشکی کشور انجام شد.

نمونه‌برداری

در این پژوهش در روز هشتم بعد از تزریق ویروس، نمونه بافت کبد ماهیان تنها از دو گروه ماهیان تلف‌شده گروه بیمار (تزریق ۰/۰۳ سی‌سی ویروس)، و گروه کنترل (تزریق ۰/۰۳ سی‌سی سرم فیزیولوژی)، جداسازی و به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. از هر کدام

از این دو گروه (تزریق ۰/۰۳ سی‌سی ویروس و تزریق ۰/۰۳ سی‌سی سرم فیزیولوژی) تعداد شش نمونه (هر کدام از پنج تا ۱۰ نمونه پولد شده)، تهیه شدند. دلیل انتخاب گروه ۰/۰۳ سی‌سی ویروس این بود که ماهیان در این غلظت بیمار شده و نیازی به غلظت بالاتر نبود.

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA کل، از ۱۰۰ mg بافت کبد با استفاده از محلول بیوزول طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. کیفیت RNA کل با روش الکتروفورز، روي ژل آگارز ۱٪ انجام شد. جهت حذف هر گونه باقیمانده DNA ژنومی در نمونه های RNA، از آنزیم DNase I، استفاده شد. در ادامه با استفاده از آنزیم نسخه بردار معکوس کیت سنتز cDNA شرکت یکتاتجهیز و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، RNA کل به cDNA تبدیل شد و cDNAهای سنتز شده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

شناسایی ویروس

شناسایی ویروس با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی (جدول ۱)، جهت تکثیر یک قطعه ۵۰۵ جفت بازی مربوط به ناحیه N-gene و تکنیک RT-PCR انجام شد. در این تست از نمونه‌های بافت کبد از ماهیان گروه تزریق شده با ویروس و گروه تزریق شده با سرم فیزیولوژی استفاده شد.

تکثیر قطعات ژنی مورد مطالعه

تکثیر قطعات ژنی با کمک واکنش qPCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای هر ژن و ژن کنترل EF1-α (جدول ۲) انجام گرفت. طبق دستورالعمل استاندارد واسرشته‌سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، واسرشته‌سازی ثانویه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، دمای اتصال پرایمرها در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در ۴۰ سیکل انجام گرفت. لازم به ذکر است که با استفاده از منحنی‌های ذوب اختصاصی بودن قطعات تکثیری و هم چنین وجود پرایمر دایمرها مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این کارایی تکثیر قطعات مورد نظر نیز با استفاده از منحنی استاندارد مورد بررسی قرار گرفت و از فرمول ΔΔCT-۲ جهت برآورد میزان بیان ژن استفاده شد. جهت حصول اطمینان بیشتر از صحت طول قطعات تکثیری، محصولات PCR با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۲٪ مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیز آماري

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹,۱ انجام شد. برای مقایسه میانگین از روش توکی استفاده شد و سطح ۵٪ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

استخراج RNA کل از نمونه‌های گروه کنترل و آلوده به ویروس VHS به خوبی انجام گرفت و کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ مورد تایید قرار گرفت. بعد از انجام استخراج و سنتز cDNA تمامی نمونه‌ها در سه تکرار با استفاده از روش Real time PCR تکثیر شدند. با توجه به نتیجه تست RT-PCR حضور ویروس در نمونه‌های گروه تزریق شده با ویروس مورد تائید قرار گرفت اما در هیچ یک از گروه‌های تزریق شده با سرم فیزیولوژی و گروه کنترل (بدون تزریق) اثری از ویروس مشاهد نشد. اختصاصی بودن قطعات تکثیری نیز با استفاده از دو روش آنالیز منحنی ذوب (شکل ۱) و روش الکتروفورز ژل آگارز (شکل ۳) بررسی و مورد تایید قرار گرفت که در آنالیز منحنی ذوب هر نمونه دارای یک پیک بود و هم چنین در ژل آگارز یک باند شارپ داشته و باندهای غیراختصاصی مشاهده نشد. لازم به ذکر است که صحت انجام آزمون Real time PCR نیز با استفاده از منحنی استاندارد (شکل ۲) مورد بررسی قرار گرفت و پس از تایید نتایج، داده‌های حاصله جهت آنالیز مورد استفاده قرار گرفتند. پس از ارزیابی نتایج به دست آمده، داده‌های حاصله با استفاده از روش آماری ΔΔCT-۲ آنالیز شدند و نتایج نهایی در شکل ۵ آمده است. با انجام RT-PCR و بررسی CT (چرخه آستانه) افزایش بیان دو ژن اینترلوکین ۱۰ و TNF-α در نمونه‌های cDNA آلوده به ویروس VHS نسبت به نمونه‌های سالم دیده شد (شکل ۴) که این امر بیانگر پاسخ سیستم ایمنی و واکنش آن را نسبت به آلودگی ویروسی نشان می‌دهد. در این پژوهش نشان داده شد که بیان ژن‌های مورد مطالعه در گروه تیمار شده با ویروس نسبت به گروه سالم افزایش معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵).

بحث

جدول ۱- توالی و مشخصات پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی ویروس.

منبع	توالی	پرایمر	ژن
قادرزاده و همکاران (۱۰)	5-ATGGAAGGAGGAATTCGTGAAGCG-3 5-GCGGTGAAGTGCTGCAGTTCCC-3	Forward Reverse	VHSV N

ویروس سپتی سمی خونریزی‌دهنده، از شناخته‌شده‌ترین بیماری‌های ویروسی در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان محسوب می‌شود که خسارات زیادی را به مزارع پرورش ماهی وارد می‌کند (۲۱). مطالعات بسیاری در جهت یافتن و درک مکانیسم‌های آلوده شدن بدن ماهی به این ویروس، ارزیابی سیستم ایمنی بدن ماهیان در برابر آن و هم‌چنین مبارزه و پیشگیری بر علیه آن انجام گرفته است از جمله: لورنزن و همکاران در سال ۲۰۰۱ ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان با وزن متوسط ۰/۵ gr را با تزریق واکسن حاوی پلاسمید دارای ژن گلیکوپروتئین VHSV در دو مرحله واکسینه کردند. واکسیناسیون مرحله‌ی دوم نشان داد که سیستم ایمنی ماهی در مرحله‌ی دوم بسیار فعال و ایمن در برابر ویروس می شود (۱۴). مطالعه‌ی آونوج و همکاران در سال ۲۰۱۱، ثابت کرد که تزریق VHSV در Olive flounder باعث تغییر بیان ژن اینترلوکین ۶ می‌شود؛ گرچه در مطالعه آونوج بیان ژن اینترلوکین ۶ در دوزهای با غلظت پایین ویروس VHS کم بوده و با افزایش دوز تزریقی افزایش بیان در این ژن مشاهده شده است (۲). پوئنت مارین و همکاران در سال ۲۰۱۸ ثابت کردند که گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در هنگام تزریق واکسن VHSV، گلیکوپروتئین G این ویروس را بیان می‌کنند. همچنین این سلول‌ها می‌توانند پاسخ‌های ایمنی در برابر این ویروس را در بدن ماهی فعال کنند (۱۷). هلوپاینن و همکاران در سال ۲۰۰۷، آنالیز بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی در سلول‌های اپی‌تلیال پس از چالش با Ranavirus سبب افزایش بیان ژن اینترلوکین 1B و TNF-α شده بود و محققان بیان کردند که سلول‌های اپی‌تلیال می‌توانند به عنوان یک مدل در شیشه (In vitro) برای بررسی مکانیسم‌های سیستم ایمنی در پاسخ به چالش‌های ویروسی به کار گرفته شوند (۱۲) که با نتایج مطالعه حاضر کاملا مطابقت دارد. دورسون و همکاران (۱۹۹۵) میزان وراثت‌پذیری مقاومت به بیماری VHS را مورد بررسی قرار دادند که به میزان ۰/۶۳±۰,۲۶ گزارش شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت قابل‌ملاحظه‌ایی در میزان رشد باله در گروه سالم و عفونی دیده شد (۷). در این مطالعه برای اولین بار تغییرات بیان دوژن TNF-α و اینترلوکین10 در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تروتلاچ در ایران در تیمار با ویروس VHS مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بیان ژن‌های *TNF-α* و اینترلوکین 10 پس از تزریق VHSV در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافته است (P<۰/۰۰۱). پروتئین TNF-α جز سایتوکاین‌های پیش‌التهابی می‌باشد که توسط سلول‌های سیستم ایمنی و عمدتا ماکروفاژهای فعال شده تولید می‌شود و در شروع و تقویت فرایندهای التهابی در ماهی و تنظیم سیستم ایمنی در مقابل عوامل عفونی نقش دارد (۹). افزایش بیان در سطح ژن می‌تواند باعث افزایش بیان در سطح پروتئین این ژن شده و در نتیجه سیستم ایمنی ماهی را علیه ویروس VHSV فعال کند. اینترلوکین6 نیز سایتوکاین پیش‌التهابی دیگری است که توسط چندین گروه سلولی شامل سلول‌های T، B، ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های عصبی، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های گلیال تولید می‌شود (۱۳). این سایتوکاین باعث رهایی پروتئین‌های مرحله‌ی حاد همانند C-reactive protein (CRP) از سلول‌های کبدی می‌شود و هم‌چنین در بیان ژن TNF-α نقش دارد و باعث افزایش بیان آن می‌شود (۲۱). به طور کلی مبنای درمان‌های ضد ویروسی اثر مستقیم روی تعداد سلول‌های T اختصاصی ویروس دارد. این روش گرچه برای ریشه‌کنی تعدادی از عفونت‌ها موثر بوده اما در اکثر موارد برای ریشه‌کنی عفونت‌های ویروسی مزمن موثر نبوده است. ویروس‌ها با استفاده از راهکارهای مختلف از جمله سرکوب سیستم ایمنی به واسطه ایجاد نقصان در عملکرد سلول T، مانع از شناسایي خود توسط سیستم ایمنی مي‌شوند. علاوه بر این با انحراف سیستم ایمني به سمت تولید سیتوکین‌هایي چون اینترلوکین 10 منجر به تضعیف عملکرد سلول T می‌شوند (۶). مشخص شده است که القاء تولید اینترلوکین10 یک راهکاری است که توسط ویروس‌های مختلف جهت سرکوب و فرار از سیستم ایمنی ضدویروسی اعمال می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که خنثی کردن اثر اینترلوکین10 موجب بهبود عفونت مزمن ویروسی شده است، بنابراین درمان سایر عفونت‌های مزمن که با تیتر بالای اینترلوکین

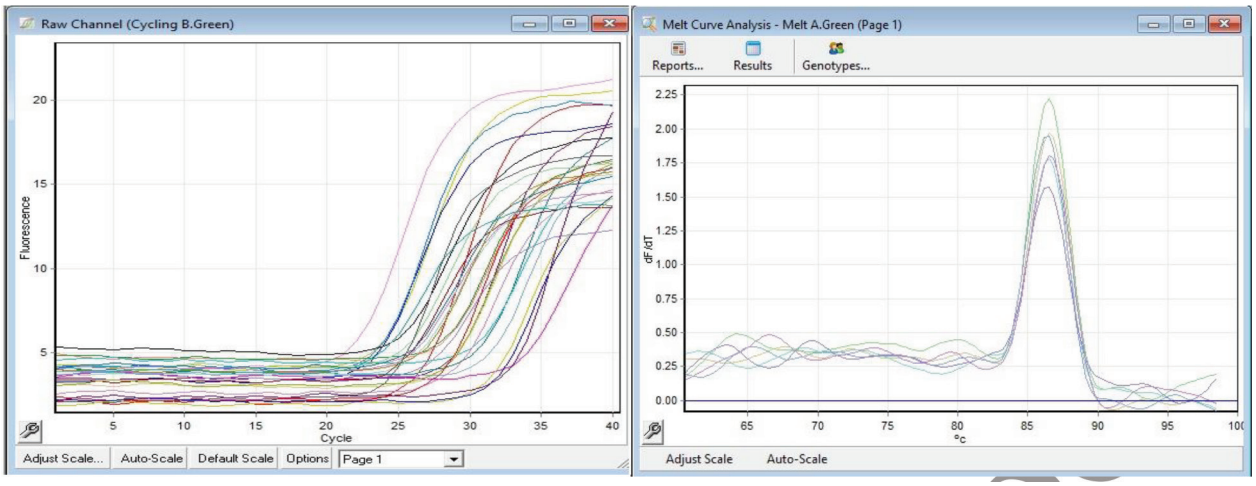
جدول ۲- توالی و مشخصات پرایمرهای اختصاصی.

ژن	پرایمر	توالی	دمای اتصال	منبع
TNF-a	Forward	TCTTACCGCTGACACAGTGC	۶۰	کاسترو و همکاران، ۲۰۱۴ (۵)
	Reverse	AGAAGCCTGGCTGTAAACGA		
اینترلوکین 10	Forward	CTGCTGGACGAAGGGATTCTAC	۶۰	
	Reverse	GGCCTTTATCCTGCATCTTCTC		
*EF1-a	Forward	GATCCAGAAGGAGGTCACCA	۶۰	
	Reverse	TTACGTTCGACCTTCCATCC		

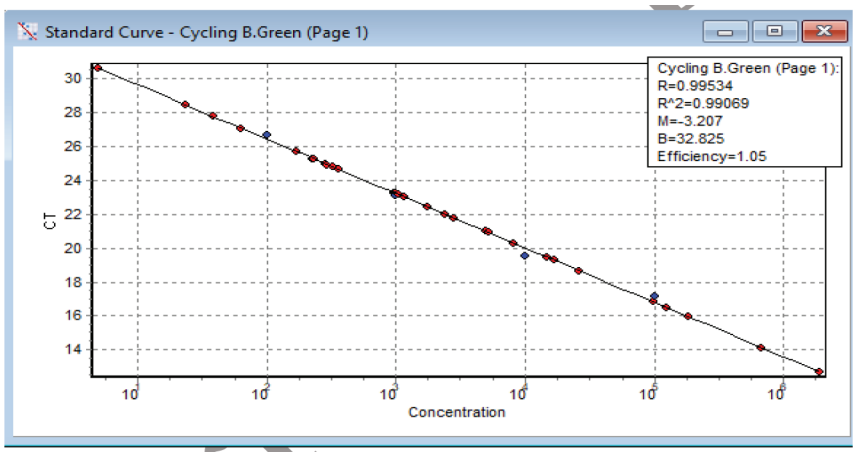
* از این ژن به عنوان ژن رفرنس استفاده شد.

۱۰ مرتبط است مي‌تواند با خنثي‌كردن موقتي عملكرد اينترلوكين۱۰ ممكن شود كه در اين صورت چون افت فعاليت سيستم ايمني ميزبان به صورت گذرا اتفاق می‌افتد، بيماري‌هاي خود ايمنی (اتوايميون) در ميزبان بروز نمي‌كند (۲۰). در مطالعهراي نشان داده شده است عفونت ليشمانيا در موش‌هايی كه اينترلوكين۱۰ را توليد نمی‌كردند يا در موش‌هايي كه اينترلوكين۱۰ در آنها بلوكه شده، ريشه كن شده است (۱۵). در مطالعه حاضر، افزايش بيان ژن اينترلوكين۱۰ در گروه تيمار در اثر تزريق VHSV نسبت به نمونه‌ی تيمار نشده مشاهده شد (P<۰/۰۱) كه ممكن است باعث تضعيف و سركوب سيستم ايمنی توسط ويروس شده باشد.

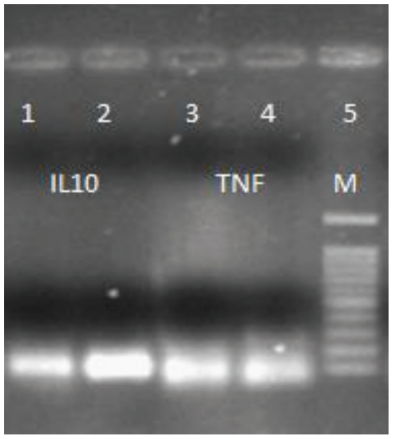
TNF-α به صورت عمده توسط ماكرفاژهاي فعال شده توليد مي‌شود و بر تكامل و تبديل لنفوسيت‌هاي T به زير گروه Th1 تاثير ويژه‌اي دارد. اين زيرگروه از لنفوسيت‌هاي T هم در تنظيم تكثير سلول‌هاي ايمني و پاسخ ضد ويروسي نقش دارند (۴). مهم‌ترين عمل فيزيولوژيكی TNF-α مربوط به سيستم ايمنی می‌شود بطوري‌كه با بودن عوامل ميكروبی مثل ليپوپلی-ساكاريدها، توليد شده و باعث می‌شود سلول‌هاي اندوتليال عروق در محل عفونت، مولكول‌هاي چسبان مانند سلكتين‌ها را بيان كنند. بنابراين لكوسيت‌هايی مانند نوتروفيل‌ها و مونوسيت‌ها می‌توانند به سطح عروق چسبيده و به محل عفونت وارد شوند و



شكل ۱- نمونه ای از تكثير قطعات مورد نظر با استفاده از Real time PCR و بررسی صحت تكثير (ژن اينترلوكين ۱۰): سمت راست نشان دهنده منحنی ذوب و سمت چپ منحنی تكثير را نشان می دهد.



شكل ۲- منحنی استاندارد جهت ارزيابی صحت انجام آزمون RT-PCR .



شکل ۳- الکتروفورز برخی از نمونه های تکثیر شده در پژوهش حاضر: چاهک های اول و دوم متعلق به قطعات تکثیری ژن اینترلوکین ۱۰ (۱۱۰ جفت باز) و چاهک سوم و چهارم مرتبط با قطعات تکثیری ژن TNF α (۱۰۳ جفت باز) و چاهک پنجم مربوط به خط کش مولکولی است.

باعث افزایش فعالیت فاگوسیتوزي نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها شوند. این فرایند سلول‌هاي اندوتلیال و ماکروفاژها را تحریک می‌کنند تا کموکاین ترشح نمایند. کموکاین‌های تولیدی باعث افزایش میل پیوندي اینتگرین‌هاي لکوسیتی براي لیگاند خود و کموتاکسی لکوسیت‌ها می‌شوند و روي فاگوسیت‌هاي تک‌هسته‌اي نیز اثر گذاشته و باعث تحریک ترشح اینترلوکین ۱ می‌شود که اعمالی مشابه TNF-α دارد (۱۶).

نتیجه گیری کلی

طبق نتایج بدست آمده در این مطالعه تزریق VHSV به ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تروتلاچ آمریکایی منجر به افزایش معنی‌دار در بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی TNF-α و اینترلوکین ۱۰ شده است. افزایش میزان بیان این ژن‌ها خصوصا القاء بیش از حد بیان اینترلوکین ۱۰ ممکن است باعث تضعیف و سرکوب سیستم ایمنی توسط ویروس شده باشد. فلذا پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آتی به منظور کسب اطلاعات جامع‌تر از سری ژن‌های سایتوکاینی در پاسخ‌های ناشی از عفونت‌های ویروسی با استفاده از آنالیز شبکه‌ایی اقدام شود.

تشکر و قدردانی

از گروه مبارک‌اندیش که در تامین ماهیان پرورشی رنگین‌کمان تروتلاچ و تقبل تمامی هزینه‌های دوره پرورش و همچنین از جناب آقای مهندس قادرزاده که نمونه‌های مورد آزمون در این پژوهش را در اختیار ما قرار داده‌اند کمال قدردانی و سپاسگزاری را داریم.

پاورقی

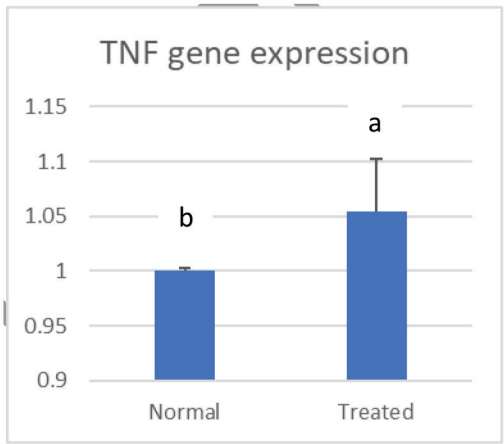
1 - Subtype.

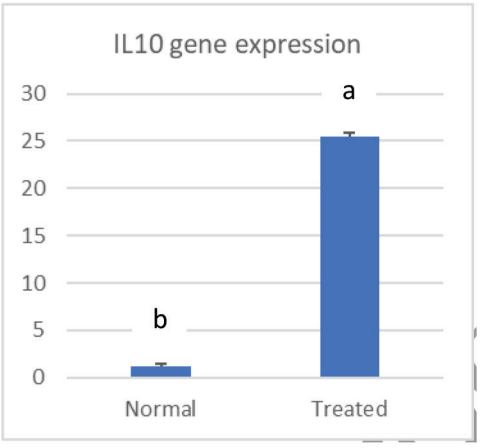
منابع مورد استفاده

1- Akhlaghi, M. and A. Hosseini. 2007. First report on the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by RT-PCR in rainbow trout fry cultured in Iran. *Bulletin-european association of fish pathologists* 27: 205-210.

2- Avunje, S., W.S. Kim, C.S. Park, M.J. Oh and S. J. Jung. 2011. Toll-like receptors and interferon associated immune factors in viral haemorrhagic septicaemia virus-infected olive flounder (Paralichthys olivaceus). *Fish & shellfish immunology* 31: 407-414.

3- Baerwald, M.R. 2013. Temporal expression patterns of rainbow trout immune-related genes in response to Myxobolus cerebralis ex-





شکل ۴- بررسی میزان بیان ژن های αTNF- و اینترلوکین ۱۰ در دو گروه کنترل و آلوده به ویروس VHS.

posure. *Fish & shellfish immunology* 35: 965-971.

4- Beutler, B., D. Greenwald, J. Hulmes, M. Chang, Y.C. Pan, J. Mathison, R. Ulevitch and A. Cerami. 1985. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316: 552-554.

5- Castro, R., B. Abós, J. Pignatelli, L. von Gersdorff Jørgensen, A.G. Granja, K. Buchmann and C. Tafalla. 2014. Early immune responses in rainbow trout liver upon viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. *Plos one*.9:e111084.

6- Chen, L. 2004. Co-inhibitory molecules of the B7–CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature Reviews Immunology* 4: 336-347.

7- Dorson, M., E. Quillet, M. Hollebecq, C. Torhy and B. Chevassus. 1995. Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. *Veterinary Research* 26:361-368.

8- Duesund, H., S. Nylund, K. Watanabe, K.F. Ottem and A. Nylund. 2010. Characterization of a VHS virus genotype III isolated from rainbow trout (Oncorhychus mykiss) at a marine site on the west coast of Norway. *Virology journal* .7-19.

9- Feng. L., W. Li., Y. Liu., W.D. Jiang., S.Y. Kuang., J. Jiang., L. Tang., P. Wu., W.N. Tang., Y.A. Zhang., X.Q. Zhou. 2015. Dietary phenylalanine-improved intestinal barrier health in young grass carp (Ctenopharyngodon idella) is associated with increased immune status and regulated gene expression of cytokines, tight junction proteins, antioxidant enzymes and related signalling molecules. *Fish Shellfish Immunology* 45:495-509.

10- Ghaderzadeh. M., G. Rahimi Mianji, A. Nejati Javaremi. and N.Shahbazian . 2020. Effect of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) disease on the biometric parameters in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Veterinary researches and biological products*. 1-18.

11- Hill, B. 1992. Impact of Viral Diseases of Salmonid Fish in the European Community. pp. 48-59. Proceedings of the OJI International Symposium on Salmonid Diseases. Hokkaido University Press. Sapparo.

12- Holopainen, R., H. Tapiovaara and J. Honkanen. 2012. Expression analysis of immune response genes in fish epithelial cells following ranavirus infection. *Fish & shellfish immunology* 32: 1095-1105.

13- Iliev, D.B., B. Castellana, S. MacKenzie, J.V. Planas and F.W. Goetz. 2007. Cloning and expression analysis of an IL-6 homolog in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Molecular immunology* 44: 1803-1807.

14- Lorenzen, N., E. Lorenzen and K. Einer-Jensen. 2001. Immunity to viral haemorrhagic septicaemia (VHS) following DNA vaccination of rainbow trout at an early life-stage. *Fish & shellfish immunology* 11: 585-591.

15- Nelson, D.R., Z. Tu, C. Soldevila-Pico, M. Abdelmalek, H. Zhu, Y.L. Xu, R. Cabrera, C. Liu and G. L. Davis. 2003. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. *Hepatology* 38: 859-868.

16- Pfeffer, K. 2003. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & growth factor reviews* 14: 185-191.

17- Puente-Marin, S., I. Nombela, V. Chico, S. Ciordia, M.C. Mena, J. Coll, L. Mercado and M.D.M. Ortega-Villaizan. 2018. Rainbow trout erythrocytes ex vivo transfection with a DNA vaccine encoding VHSV glycoprotein G induces an antiviral immune response. *Frontiers in immunology* 9: 2477.1-14.

18- Quillet, E., M. Dorson, S. Le Guillou, A. Benmansour and P. Boudinot. 2007. Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish & shellfish immunology* 22: 510-519.

19- Schönherz, A.A., N. Lorenzen and K. Einer-Jensen. 2013. Interspecies transmission of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from turbot (Scophthalmus maximus) to rainbow trout (Onchorhynchus mykiss). *Journal of General Virology* 94: 869-875.

20- Sharpe, A.H. and G.J. Freeman. 2002. The B7–CD28 superfamily. *Nature Reviews Immunology* 2: 116-126.

21- Starkie, R., S.R. Ostrowski, S. Jauffred, M. Febbraio and B.K. Pedersen. 2003. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-α production in humans. *The Federation of American Societies for Experimental Biology* 17: 1-10.

22- Walker, P. J., A. Benmansour, R. Dietzgen, R.X. Fang, A.O. Jackson, G. Kurath, J.C. Leong, S. Nadin-Davies, R.B. Tesh and N. Tordo .2000. Family Rhabdoviridae In: Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. Academic Press, San Diego, CA 563:583.

23- Wolf, K. 2019. Fish viruses and fish viral diseases . Cornell University Press. NY 14850 USA, ISBN: 0801412595. pp. 1-6.