Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 17, Issue 1, 2026 p: 24-32

OPEN ACCESS

Research Paper

Identification of Hub Genes Involved in Mastitis Disease in Holstein Cows by the Analysis of RNA-seq Data

Hamideh NooriSadegh[1] and Gholam Reza Dashab[2]

1. PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran, (Corresponding author: dashab@uoz.ac.ir)

Received: 12 July, 2025 Revised: 20 September, 2025 Accepted: 05 October, 2025

Extended Abstract

Background: Bovine mastitis is one of the most important diseases in dairy herds worldwide, affecting cows during dry and lactation periods and causing significant economic losses. This disease is considered the most costly disease in dairy cows globally. Given the economic importance of this issue, numerous research efforts have focused on developing practical and effective methods for preventing mastitis. Additionally, bovine mastitis caused by infectious agents, such as bacteria, can be transmitted to humans through milk and other dairy products, which is a critical health concern for humans. Traditional approaches, including the diagnosis and treatment of mastitis and improving sanitary conditions, have not achieved satisfactory results in controlling this disease. Consequently, current research priorities emphasize the development of tools for the rapid and accurate diagnosis of mastitis, along with strategies to enhance udder health in cows. These advancements are essential to ensure high milk production, which remains a determining factor in the profitability of dairy farming. The most common causes are bacteria, which are classified into contagious and environmental categories. *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus uberis, Escherichia coli,* and *Klebsiella pneumoniae* are the most common pathogens associated with mastitis. Mastitis resistance is a complex trait influenced by multiple genes. Given the rise in antimicrobial resistance, the development of alternative treatments for bovine mastitis is crucial. Advances in next-generation sequencing technologies provide an opportunity to elucidate the genetic mechanisms underlying mastitis. This study aims to investigate network-based approaches and identify hub genes to gain deeper insights into the genetic control of this disease.

Methods: The samples for gene expression analysis included six biological replicates of milk from healthy cows and six replicates of milk from cows with mastitis in the German Holstein population, which were obtained from the GSE93082 dataset in the GEO database. GEO2R was used for the quality control of sequencing and gene expression analysis. Two criteria (|log2 fold-change (FC)| > 2) and adj p-value < 0.05 were used to identify differentially expressed genes. DAVID was used to identify gene ontology and pathways. Gene Ontology (GO) provides a standard framework for classifying gene functions globally. Moreover, GO was used to understand the roles and functions of genes. Genes were categorized into three groups based on ontology: BP (Biological Processes), MF (Molecular Functions), and CC (Cellular Components). These components respectively include biological processes, molecular functions, and cellular components. Finally, the DEGREE method of the CytoHubba plugin in Cytoscape software was used to identify hub genes.

Results: In total, 707 genes exhibited differential expression, with 271 genes showing low expression and 436 genes showing high expression when comparing healthy and infected samples, which had a close association with mastitis. Among these, 10 genes, including IL1B, TLR4, STAT1, STAT3, ICAM1, TLR2, CD44, MYD88, and PTGS2, were identified as hub genes based on the DEGREE method. Analysis of the identified genes revealed 99 pathways related to mastitis, 20 pathways of which, with a P-Value < 0.05, are highlighted in the chart. The analysis of the identified pathways showed that the TNF signaling pathway, which is activated in response to inflammation and infection, the TLR signaling pathway, where Toll-like receptors (TLR) play a role in recognizing pathogens (such as bacteria), and the IL-17 signaling pathway, which is an inflammatory cytokine and plays a role in response to bacterial and fungal infections, were significant. This pathway can attract neutrophils and other immune cells to the site of infection, and Th17 cells, which play a role in response to bacterial and fungal infections and enhance

Copyright ©2026 NooriSadegh and Dashab. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

inflammation by producing IL-17, have a more significant functional role in bovine mastitis. The GO analysis showed that processes related to inflammation, immune response, and regulation of cell death (apoptosis) were highly active in bovine mastitis. Additionally, cellular components, such as the endoplasmic reticulum and mitochondria, as well as molecular activities (e.g., cytokine binding and antioxidants), play a significant role in the response to infection and inflammation. These findings indicate that cells are working to combat infection and reduce tissue damage in the bovine mammary gland.

Conclusion: The identification of multiple pathways related to mastitis and the ontology of candidate genes has shown that mastitis is a highly complex trait influenced by various factors. These findings highlight the significant importance of the identified genes in understanding the biological mechanisms of bovine mastitis. The highlighted genes in this study can serve as biomarkers for mastitis. In addition, these loci may contain different nucleotide variants that could be used for the genetic improvement and design of breeding strategies against mastitis in dairy cows.

Keywords: Gene expression, Mastitis, Ontology, Pathway analysis

How to Cite This Article: NooriSadegh, H., & Dashab, G.H. (2026). Identification of Hub Genes Involved in Mastitis Disease in Holstein Cows by the Analysis of RNA-seq Data. *Res Anim Prod,* 17(1), 24-32. DOI: 10.61882/rap.2026.1535

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقاله پژوهشی

شناسایی ژن‌های هاب درگیر در بیماری ورم پستان در گاوهای هلشتاین با تجزیه داده‌های Rna-seq

حمیده نوری صادق[۱] و غلامرضا داشاب[۲]

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- دانشیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران، (نویسنده مسوول: dashab@uoz.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۲۱ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۶/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۱۳
صفحه: ۲۴ تا ۳۲

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: ورم پستان گاوی در سطح جهانی یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها در گله‌های شیری است که هم در دوره خشکی و هم در دوره شیردهی دام را درگیر می‌کند و خسارات اقتصادی زیادی را به‌دنبال دارد. این بیماری پرهزینه‌ترین بیماری در گاوهای شیری در سطح جهان محسوب می‌شود. با توجه به اهمیت اقتصادی این موضوع، تلاش‌های متعددی بر توسعه روش‌های عملی و مؤثر برای پیشگیری از ورم پستان متمرکز شده‌اند. همچنین در ورم پستان گاوی ناشی از عوامل عفونی، باکتری‌ها می‌توانند از طریق شیر و سایر محصولات لبنی به انسان منتقل شوند، که این یک مسئله حیاتی برای سلامتی انسان است. رویکردهای سنتی از جمله تشخیص و درمان ورم پستان و بهبود شرایط بهداشتی در کنترل این بیماری به نتایج مطلوبی دست نیافته‌اند. در نتیجه، اولویت‌های تحقیقاتی فعلی بر توسعه ابزارهایی برای تشخیص سریع و دقیق ورم پستان، همراه با استراتژی‌هایی برای افزایش سلامت پستان در گاوها تأکید دارند. این پیشرفت‌ها برای اطمینان از تولید بالای شیر، که از عوامل تعیین‌کننده سودآوری در گاوداری شیری هستند، ضروری به‌نظر می‌رسند. شایع‌ترین علت، باکتری‌ها هستند که به دو دسته مسری و محیطی طبقه‌بندی می‌شوند. استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوک آگالاکتیه، استرپتوکوک اوبریس، اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه شایع‌ترین پاتوژن‌های مرتبط با ورم پستان هستند. مقاومت به ورم پستان یک صفت پیچیده است که تحت تأثیر ژن‌های متعدد قرار دارد. با توجه به افزایش مقاومت ضد میکروبی، توسعه درمان‌های جایگزین برای ورم پستان گاوی ضروری است. پیشرفت‌های فناوری‌های توالی‌یابی نسل بعدی، فرصتی را برای روشن شدن مکانیسم‌های ژنتیکی زمینه‌ساز ورم پستان فراهم می‌کند. هدف از این مطالعه، بررسی رویکرد سیستم‌های مبتنی بر شبکه و شناسایی ژن‌های هاب به‌منظور کشف بینش عمیق‌تر کنترل ژنتیکی این بیماری است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌ها برای تجزیه و تحلیل بیان ژن شامل شش تکرار بیولوژیکی از شیر گاوهای سالم و شش تکرار شیر مربوط به گاوهای مبتلا به ورم پستان در جمعیت هلشتاین آلمانی بودند که از مجموعه داده GSE93082 در پایگاه داده GEO استفاده شد. برای کنترل کیفی توالی و تجزیه بیان ژن‌ها از نرم‌افزار GEO2R استفاده شد. از دو معیار (|log2 fold-change (FC)| > 2) و adj p-value <0.05 برای شناسایی بیان متفاوت ژن‌ها استفاده شد. برای شناسایی هستی‌شناسی ژن و مسیرها از ابزار DAVID استفاده شد. هستی‌شناسی ژن (GO) یک چارچوب استاندارد برای طبقه‌بندی عملکردهای ژن در سطح جهانی ارائه می‌دهد. در این مطالعه، ازGO برای درک نقش‌ها و عملکرد ژن‌ها استفاده شد. ژن‌ها بر اساس هستی‌شناسی به سه دسته تقسیم‌بندی می‌شوند: BP (Biological Processes)، MF (Molecular Functions) و CC (Cellular Components). این اجزا به‌ترتیب شامل فرآیندهای بیولوژیکی، عملکردهای مولکولی و سلولی هستند. در نهایت، برای شناسایی ژن‌های هاب از افزونه CytoHubba نرم‌افزار Cytoscape با روش DEGREE استفاده شد.

یافته‌ها: در مجموع، ۷۰۷ ژن بیان متفاوت داشتند که تعداد ۲۷۱ ژن با بیان پایین و ۴۳۶ ژن با بیان بالا در مقایسه نمونه‌های سالم و مبتلا شناسایی شدند که ارتباط نزدیکی با ورم پستان داشتند. از این میان، تعداد ۱۰ ژن شامل IL1B، TLR4، STAT1، STAT3، ICAM1، TLR2، CD44، MYD88 و PTGS2 بر مبنای روش DEGREE به‌عنوان ژن‌های هاب شناخته شدند. تجزیه و تحلیل ژن‌های شناسایی شده ۹۹ مسیر مرتبط با ورم پستان را نشان داد که در نمودار ۲۰ مسیری که P-Value < 0.05 داشتند مشخص شدند. بررسی مسیرهای شناسایی شده معنی‌دار نشان داد که مسیر سیگنالینگ TNF (TNF signaling pathway) در پاسخ به التهاب و عفونت فعال می‌شود، مسیر سیگنالینگ TLR (Toll-like receptor signaling pathway) که گیرنده‌های Toll-like (TLR) در شناسایی پاتوژن‌ها (مانند باکتری‌ها) نقش دارند و مسیر سیگنالینگ IL-17 (IL-17 signaling pathway) یک سیتوکین التهابی است و در پاسخ به عفونت‌های باکتریایی و قارچی نقش دارد. این مسیر می‌تواند باعث جذب نوتروفیل‌ها و سایر سلول‌های ایمنی به محل عفونت شود و Th17 (Th17 cell differentiation) که در پاسخ به عفونت‌های باکتریایی و قارچی نقش دارد و با تولید IL-17 باعث تقویت التهاب می‌شود، نقش عملکردی مهمتری در بیماری ورم پستان گاوی دارد. بررسی هستی‌شناسی (GO) نشان داد که در ورم پستان گاو، فرآیندهای مرتبط با التهاب، پاسخ ایمنی و تنظیم مرگ سلولی (آپوپتوز) به‌شدت فعال هستند. همچنین، اجزای سلولی مانند شبکه اندوپلاسمی و میتوکندری و فعالیت‌های مولکولی مانند اتصال به سیتوکین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در پاسخ به عفونت و التهاب دارند. این یافته‌ها نشان‌می‌دهند که سلول‌ها برای مبارزه با عفونت و کاهش آسیب بافتی در غده پستانی گاو تلاش می‌کنند.

نتیجه‌گیری: شناسایی مسیرهای متعدد مرتبط با ورم پستان و همچنین هستی‌شناسی ژن‌های کاندیدا نشان می‌دهد که ورم پستان صفتی بسیار پیچیده است که عوامل مختلفی در آن دخیل هستند. این یافته‌ها اهمیت بالای ژن‌های شناسایی‌شده را در درک مکانیزم‌های بیولوژیکی ورم پستان گاوی نشان می‌دهند. ژن‌های برجسته‌شده در این مطالعه می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای زیستی برای ورم پستان عمل کنند. علاوه بر این، ممکن است حاوی واریانت‌های نوکلئوتیدی متفاوتی باشند که می‌توانند برای بهبود ژنتیکی و طراحی استراتژی‌های اصلاح نژادی در گاوهای شیری در برابر ورم پستان مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: آنالیز شبکه، بیان ژن، ورم پستان، هستی‌شناسی

مقدمه

یکی از راهکارهای مؤثر برای ارتقای پتانسیل ژنتیکی، بررسی تأثیر میزان بیان ژن‌های کاندیدا برصفات اقتصادی دام در جمعیت‌های مختلف است. ژن‌های کاندیدا ژن‌هایی هستند که قبلاً شناسایی شده‌اند، نقش زیستی مشخصی در فرآیندهای فیزیولوژیکی دارند و می‌توانند بر صفات مورد نظر تأثیرگذار باشند. این ژن‌ها یا به‌طور مستقیم بر صفت هدف اثر می‌گذارند، یا با ژن‌هایی که به‌طور مستقیم بر آن صفت تأثیر دارند، همبستگی دارند (Hassanine *et al*., 2025). شناسایی و مطالعه ژن‌های کاندیدا همراه با بررسی ارتباط آن‌ها با

صفات تولیدی، می‌تواند دانش ما را درباره مقاومت ژنتیکی به بیماری‌ها افزایش دهد (Bhat *et al*., 2024).

با توجه به افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان برای محصولات سالم، توجه به سلامت حیوانات اهمیت بیشتری یافته است (Takaki *et al*., 2021). ورم پستان التهاب غده پستانی و بافت پستان است که بر اثر ضربه یا عفونت ایجاد می‌شود و به عنوان یک بیماری پستان می‌تواند تولید گاوهای شیری را به طرق مختلفی از جمله تولید شیر، ترکیب شیر و خواص شیر تحت تأثیر قرار دهد. علاوه بر اثر منفی بر تولید و کیفیت شیر، ورم پستان برای حیوان دردناک است، اغلب نیاز به درمان آنتی‌بیوتیکی دارد و در صورت تداوم ممکن است منجر به حذف زود هنگام شود (Cai *et al*., 2024). از این‌رو، پرورش‌دهندگان علاقه‌مند به پیشگیری از ورم پستان و بهبود کیفیت شیر هستند.

به‌طور کلی، عوامل ایجاد کننده ورم پستان به دو دسته عفونی و عوامل محیطی (شامل شرایط نامناسب جایگاه، بستر آلوده و مرطوب، بهداشت ضعیف شیردوشی، آسیب نوک پستان و استرس‌های محیطی) تقسیم می‌شوند که از نظر اپیدمیولوژیک متفاوت هستند. *E. coli* مهم‌ترین پاتوژن محیطی در ورم پستان گاو شیری است که خسارت اقتصادی زیادی به دام وارد می‌کند (Morales-Ubaldo *et al*., 2023). عفونت با *E. coli* می‌تواند دو نوع پاسخ متفاوت را ایجاد کند. پاسخ موضعی: شامل التهاب و فعال شدن پاسخ ایمنی سلولی در محل عفونت است و در حدود یک‌چهارم موارد محدود به بافت آلوده باقی می‌ماند؛ پاسخ سیستمیک: در برخی موارد (تقریباً یک‌چهارم)، عفونت می‌تواند به بافت‌های اطراف و حتی اندام‌های دور مانند کبد گسترش یابد و پاسخ ایمنی سیستمیک را فعال کند (Darang *et al*., 2023).

از طریق تجزیه و تحلیل بیان متفاوت ژن، محققان می‌توانند ژن‌هایی را شناسایی کنند که بیانگر تغییر قابل توجهی در گاوهای در معرض بیماری‌ها هستند. مطالعات نشان داده‌اند که ژن‌های خاصی که در پاسخ ایمنی و فرآیندهای التهابی دخیل هستند، سطوح بیان متفاوتی را بین گاوهای سالم و بیمار نشان می‌دهند. با شناسایی این ژن‌های حیاتی، می‌توان در برنامه‌های اصلاحی مقاومت ژنتیکی جمعیت گاو در برابر بیماری‌های خاص را بهبود بخشید (Scott *et al*., 2020). توضیح مکانیسم‌های زمینه‌ای ممکن است به بهبود مقاومت جمعیت‌های دام به ورم پستان با اصلاح انتخابی کمک کند و راه‌های جدیدی را برای درمان عفونت‌های *E. coli* نشان دهد (Mitterhuemer *et al*., 2010). ژن‌های کلندیدا در تنظیم ترکیب شیر (TECRL, GAB2) و سلامت پستان (GBBR2, MAPK8, NFIA) شناسایی شده‌اند. این ژن‌ها منبع ارزشمندی برای طراحی مطالعات بیشتر در مورد عملکرد این ژن‌های کلندیدا فراهم می‌کند (Cecchinato *et al*., 2019). تعداد ۲۴۴۸ ژن کلندیدا و ۶۶۸ QTL و توزیع جایگاه‌های کلندیدا در تمام کروموزوم‌های گاو پیچیدگی این صفت را نشان می‌دهند. هشت مورد از ژن‌ها (C6, C9, CARD6, CD14, CXCL8, LTF, TLR2, TLR4) با ورم پستان مرتبط بودند (Brajnik & Ogorevc, 2023). در مطالعه‌ای که با هدف پیشنهاد یک استراتژی اصلاح ژن در توالی‌های تنظیمی و امکان‌سنجی آن با ایجاد بزهای GED مقاوم به ورم پستان و با استفاده از سیستم ISDra2-TnpB انجام شد، نتایج قابل‌توجهی به‌دست آمدند. پس از عفونت غدد پستانی با *E. coli*، بزهای GED سطح بیان بالاتری از ژن LYZ را نشان دادند. این افزایش بیان مانع از فعال شدن پانوپتوزیس گردید و در نتیجه، آسیب به سد خونی–شیری (BMB) و شدت ورم پستان کاهش یافت (Feng *et al*., 2024). در نتیجه، این نوع از برنامه‌های اصلاحی نقش مهمی در صنعت لبنیات و بهبود تولید شیر، سلامت پستان و سایر صفات کلیدی که بر سودآوری و پایداری مؤثرند، ایفا می‌نمایند (Gutiérrez-Reinoso *et al*., 2023). در مطالعه‌ای دیگر، تعداد ۳۱ ژن کاندیدا و ۱۴ نوع واریانت احتمالی که بر مقاومت ورم پستان تأثیرگذار بودند، شناسایی شدند (Cai *et al*., 2024).

با تمرکز بر ژن‌ها و مسیرهای بیولوژیکی خاص، در انتخاب صفات ژنتیکی سودمند و اجرای مداخلات به موقع، می‌توان سلامت کلی و بهره‌وری گاو را به طور قابل توجهی بهبود بخشید. هدف از این مطالعه، تجزیه و تحلیل بیان ژن‌ها در نمونه‌های شیر سالم و مبتلا به ورم پستان به‌منظور شناسایی ژن‌های هاب و مسیرهای بیولوژیکی است که در بیماری ورم پستان نقش دارند.

مواد و روش‌ها

داده‌های مورد استفاده در این مطالعه از پایگاه داده GEO با شماره دسترسی GSE93082 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi) استخراج شدند. نمونه‌ها در تجزیه و تحلیل بیان ژن شامل شش تکرار بیولوژیکی از شیر گاوهای سالم و شش تکرار از شیر مربوط به گاوهای مبتلا به ورم پستان در جمعیت هلشتاین آلمانی بودند. بیان ژن با استفاده از پلت‌فرم ریزآرایه GPL2112 Affymetrix Bovine Genome Array گاوی اندازه‌گیری شد. معیارهای شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت معنی‌دار DEG با استفاده از GEO2R بودند (|log2 fold-change (FC)| > 2 و adj p-value < 0.05. Geo2R برای مقایسه بیان ژن‌ها در دو یا چند گروه از نمونه‌ها استفاده می‌شود و اهمیت آن در شناسایی ژن‌هایی است که در گروه‌های مختلف نمونه با یکدیگر بیان متفاوت دارند. در پایان، نتایج به صورت جدولی از ژن‌ها به ترتیب مقدار P-Value و یک مجموعه از نمودارهای گرافیکی برای کمک به بصری‌سازی ژن‌های با بیان متفاوت و ارزیابی کیفیت مجموعه داده‌ها ارائه شدند. این ابزار به عنوان یک ابزار تجزیه و تحلیل داده‌های ژنومیکی، درک بهتری را از فرآیندهای بیولوژیکی و بیولوژی مولکولی فراهم می‌کند و محققان را در تحقیقات بیان ژن و ارتباط آن با ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیولوژیکی کمک می‌کند. همچنین، در مطالعه حاضر دو برنامه GEOquery و Limma استفاده شدند. Limma (مدل‌های خطی برای تجزیه و تحلیل میکروآرایه) یک آزمون آماری برای شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت در داده‌های میکروآرایه است که با گستره‌ای از

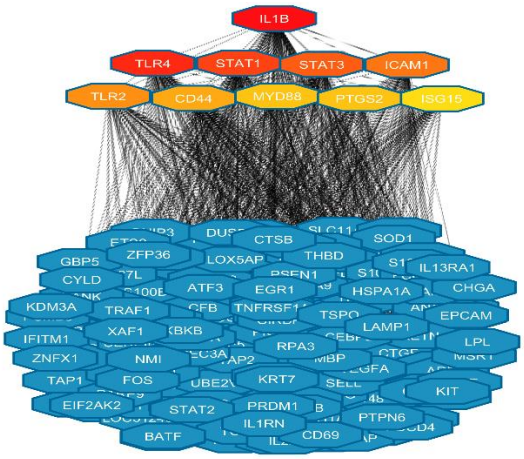
طراحی‌های تجربی و انواع داده‌ها سروکار دارد و اصلاح‌های چندگانه بر اساس مقادیر P-Value اعمال می‌کند. همچنین، از Bioconductor که یک بسته نرم‌افزاری با منبع باز بر اساس زبان برنامه‌نویسی R است و ابزارهایی برای تجزیه و تحلیل داده‌های ژنومی با حجم بالا دارد، استفاده گردید (Huber *et al*., 2015). STRING ابزاری است برای بازیابی اطلاعات ژن‌ها و پروتئین‌ها که بر ساخت شبکه‌های تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) متمرکز است. به‌ویژه در تجسم و تجزیه و تحلیل فعل و انفعالات بین پروتئین‌ها مؤثر است، که می‌تواند مسیرهای کلیدی و فعل و انفعالات مولکولی درگیر در بیماری‌های مختلف را نشان دهد (Bu *et al*., 2020).

Cytoscape تجسم و تجزیه و تحلیل داده‌های پروتئومیکس را بهبود می‌بخشد (Carlin *et al*., 2017). از STRING برای ایجاد یک شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) برای DEGهای شناسایی شده، استفاده شد (Nepusz *et al*., 2012). داده‌های شبکه در قالبی سازگار با Cytoscape خروجی گرفته شدند و ژن‌های هاب شناسایی گردیدند (Chin *et al*., 2014).

DAVID یک پایگاه داده بیوانفورماتیک پرکاربرد برای حاشیه‌نویسی عملکردی، تجزیه و تحلیل غنی‌سازی و تبدیل شناسه برای لیست‌های بزرگی از ژن‌ها/پروتئین‌های تولید شده از سنجش‌های با توان بالا است و به شناسایی فرآیندهای بیولوژیکی، عملکردهای مولکولی و اجزای سلولی مرتبط با DEG کمک کرده، آن را برای درک پیامدهای عملکردی تغییرات بیان ژن ارزشمند می‌کند (Sherman *et al*., 2024). پس از آن، داده‌های ارائه شده با استفاده از یک پلت فرم مبتنی بر وب برای بررسی بیشتر و با ایجاد نمودار نشان داده شده‌اند (http://www.bioinformatics.com.cn/srplot).

نتایج و بحث

در مطالعه حاضر، به‌طور مؤثر مجموعه‌ای جامع از ۷۰۷ ژن شناسایی شدند که تفاوت‌های آماری معنی‌داری را در سطوح بیان بین دام‌های سالم و بیمار دارای ورم پستان نشان دادند که از این تعداد ۲۷۱ ژن بیان پایین و ۴۳۶ ژن بیان بالا داشتند. در مطالعه حاضر، برای شناسایی ژن‌های هاب از روش DEGREE نرم‌افزار Cytoscape_v3.10.2 استفاده شد. این ژن‌ها به ترتیب درجه اهمیت از طیف رنگی قرمز تا زرد مشخص شده‌اند و شامل IL1B، TLR4، STAT1، STAT3، ICAM1، TLR2، CD44، MYD88 و PTGS2 بودند (شکل ۱).



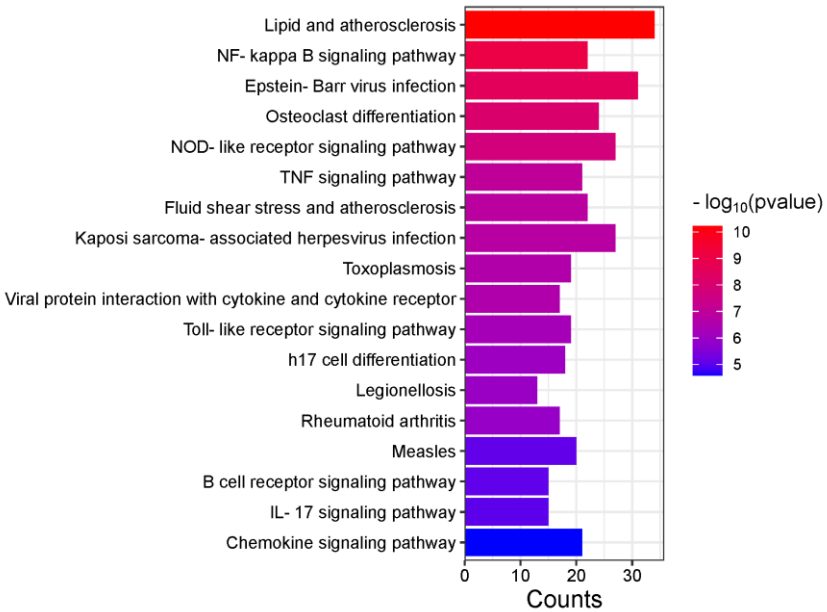
شکل ۱- شبکه ژن‌های با بیان متفاوت در گاوهای سالم و مبتلا به بیماری ورم پستان در گاوهای شیری
Figure 1. The network of genes with different expression in healthy and defective mammary glands in dairy cows

ژن IL1B نقش مهمی در پاسخ التهابی مرتبط با ورم پستان گاوی ایفا می‌کند، به‌طوری‌که بیان آن توسط عوامل مختلفی تعدیل می‌شود و در پاسخ ایمنی به پاتوژن‌های مختلف ایجادکننده ورم پستان نقش دارد. در طی ورم پستان تحت بالینی گاو، بیان سیتوکین‌هایی مانند IL1B، IL1A، IL6 و CXCR1 افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده دخالت آن‌ها در پاسخ ایمنی به پاتوژن باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس است (Wang *et al*., 2023). TLR4 یک گیرنده تشخیص الگو است که نقش کلیدی را در پاسخ ایمنی ذاتی در برابر عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کند که باعث ورم پستان در گاوهای شیری و گاومیش‌ها می‌شوند (Bhat *et al*., 2024). TLR4 للگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن (PAMPs) مانند لیپوپلی‌ساکارید (LPS) را از باکتری‌های گرم‌منفی که یکی از علل شایع ورم پستان هستند، تشخیص می‌دهد. این شناخت مسیر سیگنال‌دهی TLR4 را فعال می‌کند و منجر به تنظیم مثبت سایتوکین‌های پیش‌التهابی (TNF-α، IL-1β و IL-6) می‌شود که در پاتوژنز ماستیت نقش دارند (Islam *et al*., 2020). STAT1 یک جزء کلیدی از مسیر سیگنالینگ JAK-STAT است که نقش حیاتی در پاسخ ایمنی و التهاب در طی ورم پستان گاوی ایفا می‌کند. مسیر سیگنالینگ JAK-STAT1 یک واسطه کلیدی پاسخ ایمنی میزبان در برابر پاتوژن‌های ایجاد کننده ورم پستان، مانند باکتری‌های گرم‌منفی است. فعال شدن این مسیر منجر به تنظیم رونویسی ژن‌های دخیل در پاسخ‌های ایمنی ذاتی و تطبیقی می‌شود (Lan *et al*., 2020). JAK2 از نظر نقش در مقاومت به ورم پستان گاوی در زمره بالاترین رتبه‌بندی ژن‌ها قرار می‌گیرد.

این سیستم به‌گونه‌ای کار می‌کند که سیگنال از طریق (JAK) و مبدل سیگنال و پروتئین‌های فعال‌کننده رونویسی(STAT) به محیط داخل سلولی منتقل می‌شود. این مسیر در تنظیم پاسخ پستان به عفونت مهم است، زیرا تجمع مداوم نوتروفیل‌ها را در غده پستانی گاو کنترل می‌کند، در حالی‌که به نوبه خود JAK همچنین به‌عنوان یک عنصر سیگنال برای هورمون‌ها و گیرنده‌های اینترلوکین عمل می‌کند (Tiezzi *et al.*, 2015).

ICAM1 هدف میکرو RNA bta-miR-151-3p است که در طی ورم پستان گاوی به طور متفاوت بیان می‌شود. این نشان‌دهنده نقش تنظیمی ICAM1 در تشدید التهاب و پاتوژنز ماستیت است (Hasankhani *et al.*, 2023). بیان ICAM1 تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند وضعیت ویتامین D و مکمل‌های غذایی مانند استات سدیم و کولین است که می‌تواند پاسخ ایمنی و وضعیت التهابی را در گاوهای شیری تعدیل کند (Yuan *et al.*, 2023). افزایش بیان ژن TLR2 در بافت‌های غدد پستانی در طی ورم پستان مشاهده شده است که منجر به افزایش بیان سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند TNF-α، IL-1β و IL-6 123579 می‌شود (Tanamati *et al.*, 2019). یک SNP خاص (T385G) در ژن TLR2 با تعداد بالای سلول‌های سوماتیک شیر و افزایش حساسیت به ورم پستان در گاو گزارش شده است (Khan *et al.*, 2023). همچنین، رئوفیان و همکاران (Raufian *et al.*, 2018) ارتباط معنی‌داری را بین چندشکلی‌های ژن TLR2 و TNFα با صفات SCC نشان دادند که می‌توان از آن‌ها برای اصلاح مقاومت به ورم پستان استفاده کرد. کمبود MYD88 در سلول‌های اپیتلیال پستان، پاسخ التهابی به لیپوپلی‌ساکارید (LPS) را در مدل ماستیت در موش کاهش داد. کاهش بیان ژن MYD88، همراه با TLR2، به‌عنوان یک مکانیسم بالقوه برای اثرات ضد التهابی برخی ترکیبات، مانند هدراکوزیدC-، در ورم پستان گاوی گزارش شده است (Akhtar *et al.*, 2020). به‌طور کلی، با انجام یک بررسی سیستماتیک و تجزیه و تحلیل اولویت‌بندی ژن در مطالعات مرتبط با ژنوم، ۴۲۷ ژن مهم برای مقاومت به ورم پستان شناسایی شدند که عمدتاً در کروموزوم های ۱۹ و ۷ گاو قرار داشتند. بین آنها ژن CCR2 رتبه اول را به خود اختصاص داد. این ژن‌ها عمدتاً با پاسخ ایمنی و تکثیر سلولی مرتبط هستند (Narayana *et al.*, 2023).

مسیرهای سیگنال‌دهی: مسیرهای سیگنالینگ حیاتی تنظیم کننده ورم پستان شناسایی شدند (شکل ۲). تغییرات رنگ‌ها نشان‌دهنده P_value هستند، طول میله‌ها نشان‌دهنده تعداد ژن‌های مربوط به هر مسیر است. استفاده از الگوهای بیان ژن دیفرانسیل می‌تواند نقش آنها را در ورم پستان گاو روشن کند.



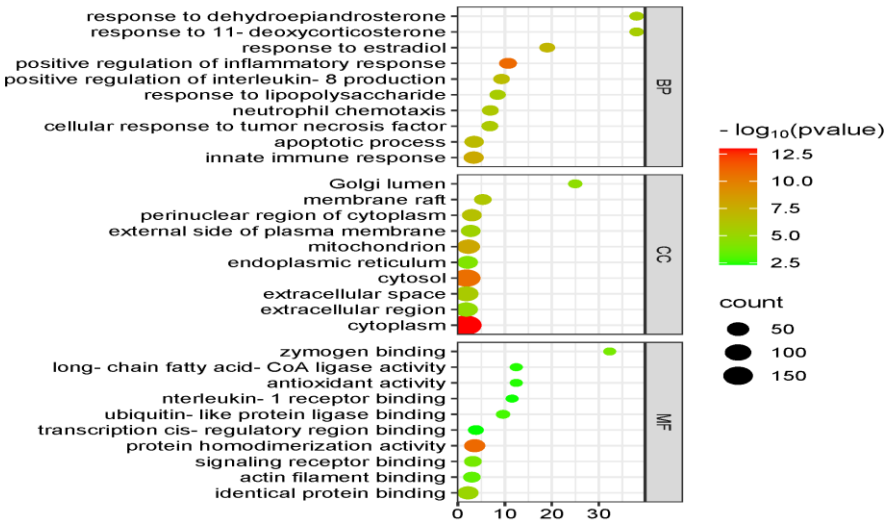
شکل ۲– حاشیه‌نویسی‌های مسیر سیگنالینگ عملکردی برای ژن‌های با بیان متفاوت. قسمت پایین تعداد ژن‌های مربوط به مسیرها را نشان می‌دهد و تغییر رنگ میله‌ها بر اساس مقدار p_value است.

Figure 2. Functional signaling pathway annotations for the differentially expressed genes (DEGs). The lower part shows the number of genes related to the pathways, and the color change of the bars is based on the p-value.

مسیر NF-kappa B signaling pathway نقش کلیدی در پاسخ التهابی و ایمنی ذاتی دارد. در ورم پستان، NFkappa B توسط سلول‌های اپیتلیال پستان و سلول‌های ایمنی در پاسخ به باکتری‌ها فعال می‌شود و منجر به تولید سیتوکین‌های التهابی مانند IL-1 ، IL-6 و TNF-α می‌شود (Gilbert *et al.*, 2013). سیتوکین TNF-α در التهاب و جذب نوتروفیل‌ها به محل عفونت نقش دارد. در ورم پستان، افزایش سطح TNF-α گزارش شده است (Wu *et al.*, 2015). در مطالعه حاضر، حدود ۲۰ ژن در این مسیر درگیر هستند. مسیر Toll-like receptor signaling pathway از

مسیرهای حیاتی تنظیم ایمنی ذاتی هستند. گیرنده‌های Toll-like (TLRs) در تشخیص پاتوژن‌ها مثل LPS باکتری‌های گرم منفی و آغاز التهاب نقش دارند. TLR2 و TLR4 به‌ویژه در ورم پستان فعال هستند (Stevens *et al*., 2011). کموکاین‌ها در جذب سلول‌های ایمنی (نوتروفیل‌ها) به محل التهاب نقش دارند، که در ورم پستان حیاتی است و در مسیر شناسایی شده Chemokine signaling pathway حضور دارند (Khan *et al*., 2020).

تجزیه و تحلیل عملکردی و هستی‌شناسی ژن: در این مطالعه، ما از هستی‌شناسی برای درک نقش و عملکرد ژن‌های با بیان متفاوت در نمونه‌های مورد مطالعه استفاده کردیم و آنها را در سه دسته مورد بررسی قرار دادیم: فرآیندهای بیولوژیکی، مولکولی و سلولی. در این نمودار (شکل ۳) که در آن مقادیر p_value با رنگ‌ها و تعداد ژن‌ها با اندازه حباب نشان داده شدند.



شکل ۳- هستی‌شناسی ژن عملکردی برای ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs).
Figure 3. Gene ontology annotations for the differentially expressed genes (DEGs)

مسیرهای بیولوژیکی، سلولی و مولکولی که در مطالعه ما مورد حاضر شناسایی قرار گرفته‌اند (شکل ۳)، در سایر مطالعات نیز گزارش شده‌اند (Brajnik & Ogorevc, 2023; Darang *et al*., 2023; Hasankhani *et al*., 2023). فرآیندهای زیستی(BP) مرتبط با ورم پستان در گاو شامل پاسخ به استروئیدها نظیر استرادیول، دهیدرواپی‌آندروسترون و ۱۱-دئوکسی‌کورتیکوسترون، تنظیم مثبت پاسخ التهابی، تولید اینترلوکین-۸، پاسخ به لیپوپلی‌ساکارید (LPS) و فعال‌سازی نوتروفیل‌ها و فاکتور نکروز تومور (TNF) است. این فرآیندها تأکید دارند که ورم پستان در گاو یک بیماری التهابی با واسطه سیستم ایمنی است که به‌دنبال عفونت‌های باکتریایی رخ می‌دهد. به‌ویژه، لیپوپلی‌ساکاریدها که از اجزای اصلی دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی محسوب می‌شوند، نقش مهمی در القای پاسخ‌های ایمنی دارند. در سطح اجزای سلولی (CC)، فرآیندهای مرتبط با ورم پستان شامل فضای خارج سلولی، شبکه آندوپلاسمی، غشای پلاسمایی، میتوکندری و سیتوپلاسم هستند. افزایش بیان پروتئین‌ها و فاکتورهای ایمنی در این بخش‌های سلولی می‌تواند نشان‌دهنده نقش کلیدی اجزای خارج سلولی و سیتوپلاسمی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی باشد. علاوه بر این، عملکردهای مولکولی (MF) مرتبط با این بیماری شامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، اتصال به گیرنده‌های سیگنالینگ، اتصال به پروتئین‌های شبه یوبی‌کویتین و تنظیم رونویسی است. افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در پاسخ به عفونت نشان‌دهنده افزایش استرس اکسیداتیو در سلول‌ها، به‌عنوان یکی از ویژگی‌های بارز التهاب در ورم پستان است.

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر، مجموعه‌ای جامع از ۷۰۷ ژن شناسایی شدند که تفاوت‌های معنی‌داری در سطوح بیان میان گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان نشان دادند. از این تعداد، ۲۷۱ ژن کاهش بیان و ۴۳۶ ژن افزایش بیان داشتند. با استفاده از تحلیل شبکه‌ای و شناسایی ژن‌های هاب، مشخص شد که ژن‌های کلیدی مرتبط با پاسخ ایمنی و التهاب شامل IL1B، TLR4، STAT1، STAT3، ICAM1، TLR2، CD44، MYD88 و PTGS2 هستند. این یافته‌ها اهمیت بالای ژن‌های شناسایی‌شده را در درک مکانیزم‌های بیولوژیکی ورم پستان گاوی نشان می‌دهند و می‌توان از آن‌ها برای بهبود سلامت، از طریق توسعه نشانگرهای ژنتیکی و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاح نژادی در گاو شیری بهره گرفت.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر از محل گرنت با کد IR-UOZ-۴۳۹۸ انجام گرفته است. از تمام همکاران آزمایشگاه مرکزی و مرکز بیوانفورماتیک دانشگاه زابل تقدیر و تشکر می‌شود.

References

Akhtar, M., Shaukat, A., Zahoor, A., Chen, Y., Wang, Y., Yang, M., Umar, T., Guo, M., & Deng, G. (2020). Hederacoside-C inhibition of staphylococcus aureus-induced mastitis via TLR2 andTLR4 and their downstream signaling NF-κB and MAPKs pathways in vivo and in vitro. *Inflammation,* 43, 579-594.

Bhat, R. R., Bhat, N. N., Shabir, A., Mir, M. U. R., Ahmad, S. B., Hussain, I., Hussain, S. A., Ali, A., Shamim, K., & Rehman, M. U. (2024). SNP analysis of TLR4 promoter and its transcriptional factor binding profile in relevance to bovine subclinical mastitis. *Biochemical. Genetics,* 62, 3605-3623.

Brajnik, Z., & Ogorevc, J. (2023). Candidate genes for mastitis resistance in dairy cattle: a data integration approach. *Journal of Animal Science and Biotechnology,* 14, 10.

Bu, F., Zhu, X., Zhu, J., Liu, Z., Wu, T., Luo, C., Lin, K., & Huang, J. (2020). Bioinformatics analysis identifies a novel role of GINS1 gene in colorectal cancer. *Cancer Management and Research,* 12, 11677-11687.

Cai, Z., Iso-Touru, T., Sanchez, M. P., Kadri, N., Bouwman, A. C., Chitneedi, P. K., ... & Sahana, G. (2024). Meta-analysis of six dairy cattle breeds reveals biologically relevant candidate genes for mastitis resistance. *Genetics Selection Evolution,* 56(1), 54.

Carlin, D. E., Demchak, B., Pratt, D., Sage, E., & d Ideker, T. J. (2017). Network propagation in the cytoscape cyberinfrastructure. *PLoS Computional Biol*ogy, 13(10), e1005598.

Cecchinato, A., Macciotta, N. P. P., Mele, M., Tagliapietra, F., Schiavon, S., Bittante, G., & Pegolo, S. (2019). Genetic and genomic analyses of latent variables related to the milk fatty acid profile, milk composition, and udder health in dairy cattle. *Journal of Dairy Science,* 102, 5254-5265.

Chin, C. H., Chen, S. H., Wu, H. H., Ho, C. W., Ko, M. T., & Lin, C. Y. (2014). CytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology,* 8, S11.

Darang, E., Pezeshkian, Z., Mirhoseini, S. Z., & Ghovvati, S. (2023). Identification of key genes and potential pathways associated with mastitis induced by *E. coli. Biochemical Genetics,* 61, 202-220.

Feng, R., Zhao, J., Zhang, Q., Zhu, Z., Zhang, J., Liu, C., Zheng, X., Wang, F., Su, J., Ma, X., & *et al.* (2024). Generation of anti-mastitis gene-edited dairy goats with enhancing lysozyme expression by inflammatory regulatory sequence using ISDra2-TnpB system. *Advanced Science,* 11, 2404408.

Gilbert, F. B., Cunha, P., Jensen, K., Glass, E. J., Foucras, G., Robert-Granié, C., Rupp, R., & Rainard, P. (2013). Differential response of bovine mammary epithelial cells to Staphylococcus aureus or Escherichia coli agonists of the innate immune system. *Veterinary Research,* 44, 40.

Gutiérrez-Reinoso, M. A., Aponte, P. M., & García-Herreros, M. (2023). Genomic and phenotypic udder evaluation for dairy cattle selection: *A Review*, 13, 1588.

Hasankhani, A., Bakherad, M., Bahrami, A., Shahrbabak, H. M., Pecho, R. D. C., & Shahrbabak, M. M. (2023). Integrated analysis of inflammatory mRNAs, miRNAs, and lncRNAs elucidates the molecular interactome behind bovine mastitis. *Scientific Reports,* 13, 13826.

Hassanine, N. N., Saleh, A. A., Essa, M. O. A., Adam, S. Y., Din, R. M. U., Rehman, S. U., & Wang, M. (2025). Candidate Genes, Markers, Signatures of Selection, and Quantitative Trait Loci (QTLs) and Their Association with Economic Traits in Livestock: Genomic Insights and Selection. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(16), 7688.

Huber, W., Carey, V. J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B. S., & Morgan, M. (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods*, *12*(2), 115-121.

Islam, M. A., Takagi, M., Fukuyama, K., Komatsu, R., Albarracin, L., Nochi, T., Suda, Y., Ikeda-Ohtsubo, W., Rutten, V., Eden, W. V., & *et al.* (2020). Transcriptome analysis of the inflammatory responses of bovine mammary epithelial cells: exploring immunomodulatory target genes for bovine mastitis. *Pathogens*, *9*(3), 200.

Khan, M. Z., Khan, A., Xiao, J., Ma, J., Ma, Y., Chen, T., Shao, D., & Cao, Z. (2020). Overview of research development on the role of NF-? B signaling in mastitis. *Animals,* 10, 1625.

Khan, M. Z., Wang, J., Ma, Y., Chen, T., Ma, M., Ullah, Q., Khan, I. M., Khan, A., Cao, Z., & Liu, S. (2023). Genetic polymorphisms in immune- and inflammation-associated genes and their association with bovine mastitis resistance/susceptibility. *Frontiers in Immunology,* 14, 1082144.

Lan, W., Wang, Z., Liu, J., & Liu, H. (2020). Methionyl-methionine exerts anti-inflammatory effects through the JAK2-STAT5-NF-κB and MAPK signaling pathways in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 68, 13742-13750.

Mitterhuemer, S., Petzl, W., Krebs, S., Mehne, D., Klanner, A., Wolf, E., Zerbe, H., & Blum, H. (2010). Escherichia coli infection induces distinct local and systemic transcriptome responses in the mammary gland. *BMC Genomics,* 11, 138.

Morales-Ubaldo, A. L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Velázquez-Ordoñez, V., Delgadillo-Ruiz, L., & Zaragoza-Bastida, A. (2023). Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. *Veterinary and Animal Science,* 21, 100306.

Narayana, S. G., de Jong, E., Schenkel, F. S., Fonseca, P. A. S., Chud, T. C. S., Powell, D., Wachoski-Dark, G., Ronksley, P. E., Miglior, F., Orsel, K., & *et al.* (2023). Underlying genetic architecture of resistance to mastitis in dairy cattle: A systematic review and gene prioritization analysis of genome-wide association studies. *Journal of Dairy Science,* 106, 323-351.

Nepusz, T., Yu, H., & Paccanaro, A. (2012). Detecting overlapping protein complexes in protein-protein interaction networks. *Nature Methods,* 9, 471-472.

Raufian, P., Shodja Ghyas, J., Jafari, R., Moghaddam, G., & Javanmard, A. (2018). Identification of genetic variation in two candidate genes of TLR2 and TNFα and its association with mastitis in Holstein cattle. *Research on Animal Production*, 8, 147-154. [In Persian]

Scott, M. A., Woolums, A. R., Swiderski, C. E., Perkins, A. D., Nanduri, B., Smith, D. R., Karisch, B. B., Epperson, W. B., & Blanton, J. R. (2020). Whole blood transcriptomic analysis of beef cattle at arrival identifies potential predictive molecules and mechanisms that indicate animals that naturally resist bovine respiratory disease. *PLoS One,* 15, e0227507.

Sherman B. T., Hao M., Qiu J., Jiao X., Baseler M. W., Lane H. C., & et al. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50, 216–221.

Stevens, M. G. H., Van Poucke, M., Peelman, L. J., Rainard, P., De Spiegeleer, B., Rogiers, C., Van de Walle, G. R., Duchateau, L., & Burvenich, C. (2011). Anaphylatoxin C5a-induced toll-like receptor 4 signaling in bovine neutrophils. *Journal of Dairy Science,* 94, 152-164.

Takaki, K., Nitta, O., & Kusumoto, Y. (2021). Factors influencing the participation of children with disabilities in the community. *Journal of Physical Therapy Science,* 33, 229-235.

Tanamati, F., Stafuzza, N. B., Gimenez, D. F. J., Stella, A. A. S., Santos, D. J. A., Ferro, M. I. T., Albuquerque, L. G., Gasparino, E., & Tonhati, H. (2019). Differential expression of immune response genes associated with subclinical mastitis in dairy buffaloes. *Animal,* 13, 1651-1657.

Tiezzi, F., Parker-Gaddis, K. L., Cole, J. B., Clay, J. S., & Maltecca, C. (2015). A genome-wide association study for clinical mastitis in first parity US Holstein cows using a single-step approach and genomic matrix re-weighting procedure. *PLOS One,* 10, e0114919.

Wang, M., Bissonnette, N., Laterrière, M., Dudemaine, P. L., Gagné, D., Roy, J. P., Sirard, M. A., & Ibeagha-Awemu, E. M. (2023). Gene co-expression in response to Staphylococcus aureus infection reveals networks of genes with specific functions during bovine subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science,* 106, 5517-5536.

Wu, J., Li, L., Sun, Y., Huang, S., Tang, J., Yu, P., & Wang, G. (2015). Altered molecular expression of the TLR4/NF-κB signaling pathway in mammary tissue of Chinese Holstein cattle with mastitis. *PLOS One,* 10, e0118458.

Yuan, C., Tan, D., Meng, Z., Jiang, M., Lin, M., Zhao, G., & Zhan, K. (2023). The effects of sodium acetate on the immune functions of peripheral mononuclear cells and polymorphonuclear granulocytes in postpartum dairy cows. *Animals (Basel),* 13, 2721.