دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

مطالعه مقایسه‌ای پروفایل ترانسکریپتوم و شبکه ژن‌های اختصاصی عملکرد سیستم ایمنی مرتبط با بافت اپتلیال روده مبتنی بر داده‌های ریزآرایه‌ای در طیور مبتلا به کوکسیدیوز

رضا سیدشریفی[1]، رضا خلخالی ایوریق[2] و نعمت هدایت[3]

۱- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، (نویسنده مسوول: reza_seyedsharifi@yahoo.com)
۲- پژوهشگر گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۱۶
صفحه: ۱۵۴ تا ۱۶۲

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: بیماری کوکسیدیوز که توسط انگل‌های ایمریایی بروز می‌کند، یکی از پرهزینه‌ترین بیماری‌های صنعت طیور به شمار می‌رود. در این راستا، شناخت نحوه پاسخ سیستم ایمنی بدن به کوکسیدیوز، می‌تواند در طراحی روش‌های مولکولی پیشگیرانه و درمانی در مقابل آن، کمک کننده باشد. هدف پژوهش حاضر، شناسایی ژن‌های مهم دخیل در پاسخ سیستم ایمنی طیور مرتبط با آلودگی انگل‌های ایمریا با استفاده از داده‌های ریزآرایه‌ای موجود در پایگاه‌های داده با دسترسی آزاد بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، پس از جستجوی پایگاه اطلاعاتی GEO، دو مجموعه داده ریزآریه‌ای مرتبط با کوکسیدیوز در طیور انتخاب شد. پس از اعمال کنترل کیفی و حذف داده‌های نامناسب، با استفاده از بسته نرم‌افزاری LIMMA در برنامه R به شناسایی ژن‌های با بیان بالا و پایین معنادار در پاسخ به آلودگی با ایمریاها پرداخته شد. همچنین، آنالیز ژن آنتولوژی و مسیرهای KEGG با استفاده از برنامه DAVID اجرا شد. متعاقباً، شبکه ارتباط متقابل پروتئین-پروتئین مربوط به ژن‌های با تغییر سطح بیان معنادار شده، با استفاده از برنامه Cytoscape ترسیم شد.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان دادند که اغلب ژن‌هایی که دچار افزایش بیان معنادار شده بودند، در دسته ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی ذاتی قرار داشتند. ژن‌های با کاهش بیان معنادار نیز در فرآیندهای متابولیکی دخیل بودند. با توجه به خروجی‌های این مطالعه، به‌نظر می‌رسد بیماری کوکسیدیوز احتمالاً، به دلیل آسیب به روده طیور، بیشترین اثر منفی خود را بر فرآیندهای متابولیکی از جمله متابولیسم چربی می‌گذارد. مدارک علمی موجود درباره افزایش بیان معنادار ژن‌های MMP1، MMP7 و MMP9 نشان داد که کاتابولیسم کلاژن در بیماری کوکسیدیوز یکی از موارد افزایش یافته می‌باشد که می‌تواند ناشی از آسیب به بافت روده باشد. به نظر می‌رسد تغییر سطح بیان ژن‌های موثر در متابولیسم برخی از مواد مغذی از جمله چربی‌ها، یکی از تأثیرات مهم بیماری کوکسیدیوز باشد.

نتیجه‌گیری: در نهایت، نتایج به‌دست آمده در مطالعه کنونی می‌تواند در درک بهتر نحوه پاسخ سیستم ایمنی طیور به بیماری کوکسیدیوز مفید باشد و این تغییرات مشاهده شده در الگوی بیان برخی از ژن‌ها می‌تواند به طراحی روش‌های درمانی این بیماری کمک کند.

واژه‌های کلیدی: ایمریا، بیان ژن، زیان اقتصادی، سلامت عمومی، صنعت مرغداری، کوکسیدیوز

مقدمه

علیرغم ظرفیت بالای صنعت طیور در زمینه تامین پروتئین، پرورش صنعتی این حیوان باعث شد تا تراکم نگهداری آنها در واحد سطح افزایش پیدا کرده و چالش‌های جدیدی را پیش‌روی پرورش‌دهندگان قرار دهد.

یکی از مهم‌ترین چالش‌های صنعت پرورش طیور که از پیامدهای اجتناب‌ناپذیر افزایش تراکم به شمار می‌رود، آسیب‌پذیری این صنعت در مقابل بیماری‌ها می‌باشد. در بین بیماری‌های کشنده مربوط به طیور، کوکسیدیوز یکی از شناخته‌ترین بیماری‌ها به شمار می‌رود که رشد را دچار نقصان کرده و سیستم ایمنی بدن را سرکوب می‌کند. این بیماری روده‌ای توسط یک انگل پروتوزوآیی با نام ایمریا ایجاد شده و سالانه هزینه‌ای بالغ بر سه میلیارد دلار را بر صنعت پرورش طیور تحمیل می‌کند (۲). بیماری از طریق اووسیت‌های انگل و از طریق دهان وارد بدن طیور شده و در تمامی سنین، باعث آلودگی و ایجاد بیماری در پرندگان و تلفات در گله می‌شود (۳۳). در واقع این بیماری با مدیریت ضعیف مزارع پرورش طیور رابطه مستقیم دارد. نتایج برخی از مطالعات، از وجود تنوع ژنتیکی طیور آلوده به انواع انگل‌های ایمریایی پرده برداشته‌اند به طوریکه طیور آلوده به یک نوع انگل خاص، می‌توانند پاسخ‌های متفاوتی (حساس یا مقاوم) را نشان دهند. در دو مطالعه مرتبط با یکدیگر، هامزیک و همکاران (۱۷،۱۶) مناطقی از ژنوم مرغ را شناسایی کردند که در نحوه پاسخ متفاوت فنوتیپی به ایمریا ماکسیما[1] دخیل بودند. نتایج نشان داد که این ژن‌ها در ترمیم بافت‌ها و پاسخ ایمنی اولیه در مراحل آغازین آلودگی با انگل ایمریا ماکسیما نقش دارند. یکی دیگر از مطالعات انجام شده در این زمینه نشان داد که برخی از نواحی ژنومی نقش مهمی در مقاومت به کوکسیدیوز را ایفا می‌کنند. وجود چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی در ژن‌هایی مانند LONRF2، CHST10، PDCL3، TBC1D8، FAM69C و IPCEF1 احتمالا نقش مهمی در مقاومت به عفونت ایمریایی بازی می‌کند (۳).

اخیراً، با پیشرفت فناوری‌های نوین سلولی و مولکولی در حوزه زیست‌شناسی، امکان اندازه‌گیری سطوح بیان هزاران ژن به صورت هم زمان فراهم شده است. فناوری ریز آرایه DNA، قادر به آشکارسازی سطوح بیانی ژن‌ها در شرایط و زمان‌های متفاوت و همچنین قادر به شناسایی ارتباط بین سطوح بیان ژن و فنوتیپ می‌باشد. این تکنیک عمدتاً، به منظور بررسی بیان ژن در بافت‌های متفاوت، تحت شرایط طبیعی و غیرطبیعی و نیز مطالعه و بررسی جهش‌ها و چندشکلی ژن‌ها به کار می‌رود. امروزه پایگاه‌های عمومی داده مانند معادنی از طلا، حاوی داده‌ها و اطلاعات ارزشمندی

1- Eimeria Maxima

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.16.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.154]

هستند که ترکیب و بازآنالیز آنها می‌تواند به استخراج اطلاعات مفیدتری نسبت به آنالیز منفرد آنها منجر شود. اینگونه مطالعات به‌عنوان یک ابزار قدرتمند برای بازآنالیز داده، با ترکیب نتایج پژوهش‌های انتخاب شده و مقایسه‌ی آنها با یکدیگر امکان ارزیابی بهتری نسبت به پژوهش‌های منفرد را ایجاد می‌کند. یک راه مهم برای مبارزه با بیماری‌ها، شناسایی زیست نشانگرها در مراحل اولیه بیماری است (۳۰) و ترکیب مطالعات منفرد با بالا بردن تعداد نمونه‌ها و قدرت آماری، برای این امر بسیار کارآمد می‌باشد. به‌طور مثال، در یک مطالعه نشان داده شد که استفاده از ترکیب مجموعه داده‌های ریزآریه‌ای مختلف، نتایج بهتری نسبت مطالعات منفرد درباره پیش‌بینی سرطان سینه در انسان ارائه می‌دهد (۳۹).

هدف تحقیق حاضر، ترکیب و بازآنالیز داده‌های ریزآرایه‌ای (بیان ژن) موجود در پایگاه‌های عمومی داده مانند Gene Express Omnibus (GEO) به‌منظور شناسایی ژن‌های مهم درگیر در پاسخ بدن طیور به بیماری کوکسیدیوز (بیماری انگلی) می‌باشد. شناسایی ژن‌های تغییر بیان یافته در این بیماری جزء اهداف اصلی به شمار می‌رفت. همچنین شبکه ژنی مرتبط با ژن‌های با بیان متفاوت[1] ترسیم شده و مسیرهای بیولوژیکی فعال در پاسخ به عامل بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه داده‌های اولیه

در مطالعه حاضر، به منظور جستجوی داده‌های ریزآرایه‌ای مرتبط با بیماری کوکسیدیوز در طیور از پایگاه اطلاعاتی GEO در سایت NCBI استفاده شد. کلید واژه Coccidiosis مورد جستجو قرار گرفته و نتایج به‌دست آمده براساس گونه موردنظر (Gallus gallus)، نوع مطالعه (expression profiling by array)، نوع ورودی (Dataset/Series) و پلتفرم (Affymetrix Chicken Genome Array, GPL3213) مورد فیلتر قرار گرفت. براساس معیارهای ذکر شده، دو مجموعه داده ریزآرایه‌ای برای بیماری کوکسیدیوز، شناسایی شده و داده‌های مورد نظر به‌صورت فایل‌های CEL دانلود شدند (جدول ۱). استفاده از پلتفرم مشابه در این دو مطالعه از یک‌سو و غنی بودن اطلاعات مربوط به حاشیه‌نویسی در پلتفرم مذکور از سویی دیگر دلیل انتخاب این دو مجموعه داده بود. مجموعه داده GSE25588 حاوی اطلاعات بیان ژن مقایسه‌ای بافت روده بین نمونه طیور آلوده و غیره‌آلوده با ایمریا ماکسیما در دو لاین تجاری مورد مطالعه بود. مجموعه داده GSE39602 نیز حاوی نتایج بیان ژن بافت اپیتلیال روده طیور آلوده به ایمریا تنلا[2] (نمونه‌برداری ۴/۵ روز پس از آلودگی با اووسیت انگل) در مقایسه با طیور سالم بود. طیور استفاده شده در این مجموعه داده از نژاد ISA brown بودند که نژادی دورگه به شمار می‌رود.

آنالیز داده‌ها

داده‌های دانلود شده با استفاده از بسته Affy (۱۲) در برنامه R فراخوانی شده و سپس با استفاده از بسته arrayQualityMetrics (۲۱) مورد ارزیابی کیفی قرار گرفتند. براساس ارزیابی صورت گرفته، نمونه GSM972791 از مجموعه داده GSE39602 به‌دلیل عدم کسب معیارهای مدنظر کیفی، از ادامه آنالیزها حذف شدند. پس از این مرحله، روند نرمال‌سازی داده‌ها با استفاده از الگوریتم RMA در بسته Affy اجرا شد. الگوریتم RMA یکی از روش‌های پر کاربرد برای اصلاح پس‌زمینه[3] و نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن است. فرض این الگوریتم این است که توزیع سیگنال‌های نویز پس‌زمینه‌ای، نرمال و توزیع سیگنال‌های واقعی، به صورت نمایی است (۶). منظور از سیگنال‌ها، نور فلئوروسنتی می‌باشد که از ریزآرایه حاوی پروب‌های نشان‌دار شده ساطع می‌شود. داده‌های نرمال شده با استفاده از بسته chicken.db در برنامه R که حاوی اطلاعات مربوط به پروب‌های شرکت Affymetrix بود، مورد حاشیه‌نویسی قرار گرفت. در فرآیند حاشیه‌نویسی، به ازای هر پروب، ژن متناظر آن پروب نیز به فایل‌های اصلی افزوده شد. پس از انجام این مرحله، هر دو مجموعه ریزآرایه‌ای با هم ترکیب شده و یک فایل اصلی برای ادامه آنالیزها ایجاد شد.

یکی از عواملی که می‌تواند در نتایج پایانی تأثیرگذار باشد، اثر دسته می‌باشد. در واقع اثر دسته عبارت است از تفاوت‌های غیرزیستی که در نتیجه تفاوت‌های تکنیکی (آماده‌سازی نمونه‌ها، زمان، مکان و شرایط انجام آزمایش) در حین انجام آزمایشات به‌وجود می‌آید (۲۳). برای حذف این اثر و یکسان‌سازی وضعیت داده‌ها، از تابع ComBat در بسته sva استفاده شد. برای نشان دادن تأثیر حذف اثر دسته بر روی داده‌ها قبل و بعد از این عملیات، از آنالیز PCA با استفاده از بسته ggplot2 (۳۶) استفاده شد (شکل ۱). در نهایت، برای شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت از بسته نرم‌افزاری LIMMA (۲۹) استفاده شده و ژن‌هایی که دارای p-value تصحیح شده (بر اساس FDR) کمتر از ۰/۰۵ و Fold change بالاتر یا مساوی ۱/۵ ($|\log2 \text{ fold change}| \geq 0.58$) بودند، به‌عنوان نتایج نهایی مورد انتخاب قرارگرفته و بقیه آنالیزها بر روی این ژن‌ها اجرا شد. بسته LIMMA با ادغام تعدادی از اصول آماری، در مطالعات بیان ژنی در سطح گسترده کاربرد دارد. این بسته بر روی یک ماتریس حاوی اطلاعات بیان ژن عمل کرده و به منظور شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت، به‌ازای هر ردیف از ماتریس مذکور، یک مدل خطی را اجرا می‌کند (۲۹).

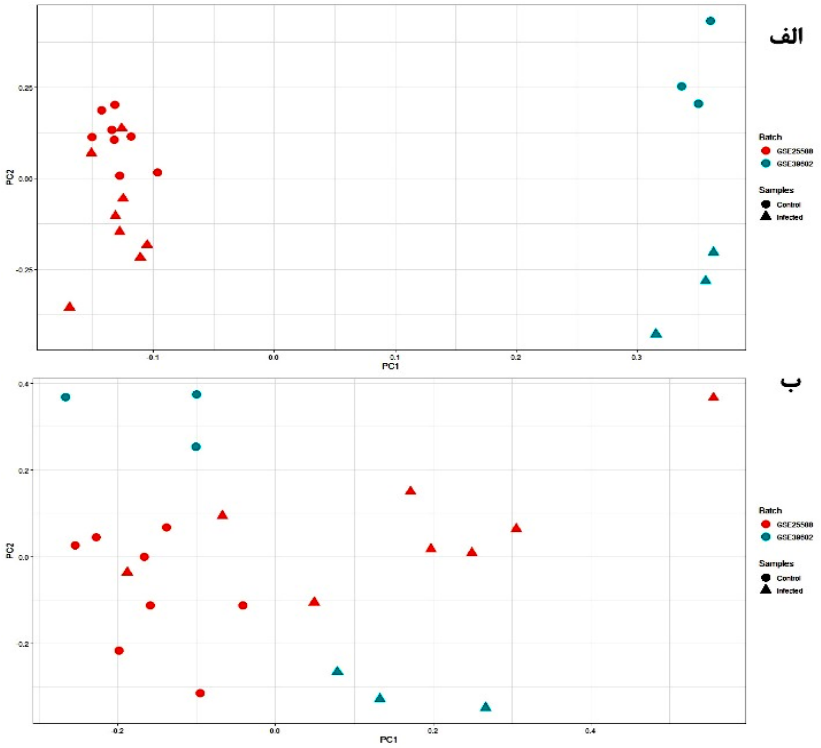
جدول ۱- خلاصه اطلاعات داده‌های ریزآرایه‌ای استفاده شده در این مطالعه

Table 1. Summary information of used data in the present study

شماره داده	بیماری	ریزآرایه‌ها بعد از پالایش	نمونه‌های آلوده	نمونه‌های کنترل	منبع
GSE25588	کوکسیدیوز	۱۶	۸	۸	(۵)
GSE39602	کوکسیدیوز	۶	۳	۳	(۱۵)

1- Differentially Expressed Genes 2- Eimeria tenella 3- Background correction

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.16.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.154]



شکل ۱- نتایج آنالیز PCA قبل (الف) و بعد (ب) از حذف اثر دسته
Figure1. Results of PCA analysis before (a) and after (b) of batch effect removal

آنالیز ژن آنتولوژی و مسیرهای بیولوژیکی

در بیماری مورد مطالعه، ژن‌هایی که در بیان آنها، افزایش و کاهش معناداری مشاهده شد، با استفاده از برنامه تحت وب DAVID (۳۲) در گروه‌های ژن آنتولوژی مختلف شامل روند زیستی، اجزای سلولی و عملکرد مولکولی طبقه‌بندی کردیم. این نوع از آنالیز به ما این امکان را می‌دهد تا تأثیر تغییر بیان ژن‌ها در مواجهه با عواملی بیماری‌زا را بهتر درک کنیم. همچنین با استفاده از لیست ژن‌های مذکور، به آنالیز مسیرهای KEGG پرداخته شد که در واقع در مورد فعال‌سازی برخی از چرخه‌های آبشاری در روند مقابله با بیماری‌ها اطلاعات ارزشمندی را در اختیار ما قرار می‌دهد. از نظر آماری عبارات ژن آنتولوژی و مسیرهای KEGG که دارای p-value تصحیح شده (با روش Benjamini-Hochberg) کمتر از ۰/۰۵ باشند، به‌عنوان عبارات معنادار انتخاب شدند. همچنین برای نمایش حاصل از برنامه DAVID با نتایج به‌دست آمده از LIMMA، از ترسیم نمودار حبابی با استفاده از بسته GOplot (۳۵) در برنامه R استفاده شد.

ترسیم شبکه اثر متقابل پروتئین-پروتئین (PPI)

از ابزارهای STRING و cytoHubba (۷) موجود در برنامه Cytoscape (۳۱) به ترتیب برای ترسیم شبکه اثر متقابل پروتیئن-پروتئین برای ژن‌های با بیان متفاوت و همچنین شناسایی ژن‌های هاب استفاده شد. ژن‌های هاب (Hub genes) در واقع ژن‌های مهم با بیشترین تقابل با ژن‌های دیگر در یک شبکه ژنی هستند. در مطالعه کنونی، پنج ژن با خصوصیات یاد شده، برای بیماری کوکسیدیوز، به عنوان ژن‌های هاب انتخاب شدند. در شبکه ترسیم شده، هر دایره نمایانگر یک پروتئین و هر خط مابین دو پروتئین نشان‌دهنده وجود رابطه متقابل مابین آن دو پروتئین است. همچنین نمادهای نوشته شده در هر دایره، نماد مربوط به ژن‌های متناظر هر پروتئین می‌باشد. برای استخراج زیرمجموعه‌های موجود در شبکه ژنی هر یک از بیماری‌های مورد مطالعه، از برنامه MCODE در Cytoscape استفاده کرده و سپس از CluGO (۱) برای اجرای ژن آنتولوژی بر روی اعضای این زیرمجموعه‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

ژن‌های با بیان متفاوت معنادار

در مطالعه حاضر، از روش یکپارچه‌سازی[1] داده‌های ریزآریه‌ای برای بررسی پاسخ سیستم ایمنی بدن طیور به بیماری انگلی کوکسیدیوز استفاده شد. براساس نتایج به‌دست آمده، ۴۴۶ (۱۶۴ ژن با بیان بالا و ۲۸۲ ژن با بیان پایین) ژن با بیان متفاوت برای بیماری کوکسیدیوز شناسایی شد (شکل ۲). در بین ژن‌هایی که دچار افزایش بیان معناداری شده بودند، افزایش مقدار بیان ژن‌ها در محدوده ۱/۵ (LOC419429) تا ۵/۶۸ (SLC1A4) قرار داشتند. همچنین بیشترین کاهش در بیان، مربوط به ژن PCK1 با ۴/۳۸ برابر کاهش بود.

یکی از نتایجی که با یافته‌های مطالعه‌ای دیگر (۵) مطابقت داشت، افزایش بیان ژن‌هایی از خانواده کراتین‌ها بود. در مطالعه حاضر، سه ژن KRT13، KRT23 و KRT24 در دسته ژن‌های با افزایش بیان معنادار قرار گرفتند. کراتین‌ها

1- Integrated

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.16.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.154]

که نقش مهمی در ریخت‌زایی و توسعه اندام‌ها دارند، به همراه ژن HSP25 (افزایش بیان معنادار در مطالعه حاضر و مطالعه مورد مقایسه) احتمالا به منظور سرعت بخشی به ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده از انگل‌های پروتوزوائی دچار افزایش بیان می‌شوند (۵).

ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی

از میان ژن‌هایی که دچار افزایش بیان معناداری شده بودند، چند ژن به طور ویژه در فعالیت سیستم ایمنی و کنترل عوامل بیماری‌زای مختلف دخیل بودند. ژن IRF1 دارای یک عملکرد شناخته شده در پاسخ ایمنی بدن طیور به عوامل بیماری‌زا می‌باشد. این ژن از طریق ایفای نقش واسط IFN-β، در سرکوب عفونت‌های ویروسی درگیر می‌باشد (۲۵). همچنین شواهدی از دخالت ژن GVINP1 در پاسخ ایمنی طیور به عوامل بیماری‌زا وجود دارد. به طوریکه در دو مطالعه مجزا، پس از تزریق واکسن آنفولانزا به طیور (۲۰) و همچنین پس از آلودگی طیور با ایمریا ماکسیما (۴)، یک افزایش معناداری در مقدار بیان ژن GVINP1 مشاهده شد. ژن LOC417536 نیز به‌عنوان یک پروتئین شیموکین با وضعیت مرور نشده (نام ورودی: F1P147_CHICK) در پایگاه UniProt به ثبت رسیده است. در واقع، شیموکین‌ها سیتوکین‌هایی هستند که نقش‌های متنوع حیاتی در سیستم ایمنی بازی می‌کنند (۱۴). محصول پروتئینی ژن CH25H به عنوان کاتالیزور واکنش تشکیل ۲۵-هیدروکسی کلسترول عمل کرده و از این طریق، در ساخت اسیدهای صفراوی و اکسی‌استرول دخیل می‌باشد (۲۴). این ژن به‌عنوان یک ضد ALV-J (زیر گروه J ویروس لوکوز طیور) قوی شناخته می‌شود که این عمل را با سرکوب همانندسازی ALV-J انجام می‌دهد (۸،۳۷). همچنین شواهد نشان می‌دهند که بیان ژن CH25H به هنگام پاسخ سیستم ایمنی طیور به انواع باکتریهای سالمونلا به طور چشمگیری افزایش پیدا می‌کند (۱۹). ژن مهم دیگری که در مطالعه کنونی به‌عنوان یکی از ژن‌های با افزایش بیان معنادار شناخته شد، IFNG می‌باشد. این نتیجه با یافته‌های ختلاب و همکاران (۲۲) در مورد طیور آلوده با ایمریاها و همچنین با نتایج ژانگ و همکاران (۳۸) در مورد طیور آلوده با ایمریا ماکسیما و کلوستریدیوم پرفرژنس[1] مطابقت داشت. این ژن از طریق فعال‌سازی نتیتریک اکسید سنتاز که مسئول تولید اکسید نیتریک است، در مهار تکثیر درون سلولی ایمریاها نقش دارد (۲۸). افزایش بیان معنادار ژن نیتریک اکسید سنتاز ۲ (NOS2) در این مطالعه، موید نحوه تأثیر IFNG در مهار ایمریاها می‌باشد.

ژن CG-1B که با نماد LGALS1 نیز نمایش داده می‌شود یکی از فاکتورهای تنظیمی در سیستم ایمنی به شمار می‌رود. شواهد مطالعات نشان می‌دهد که در بیماری نیوکاسل، این ژن به طور معناداری دچار افزایش بیان می‌شود (۳۴). در واقع، محصول این ژن (پروتئین گالکتین-b1) با اتصال به گلیکوپروتئین هماگلوتینین-نورآمینیداز ویروس نیوکاسل، خاصیت ضد ویروسی خود را نشان می‌دهد. با شناسایی این ژن به‌عنوان یک ژن با افزایش بیان در پاسخ به آلودگی با ایمریاها، به‌نظر می‌رسد مطالعه نحوه تعامل آن با ایمریاها می‌تواند در شناخت بهتر پاسخ ایمنی بدن طیور نسبت به بیماری کوکسیدیوز کمک کننده باشد.

ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی لزوما همیشه در پاسخ به عوامل بیماری‌زا دچار افزایش بیان نمی‌شوند. ژن LEAP2 که در مطالعه حاضر به‌عنوان یک ژن با کاهش بیان معنادار شناخته شد، یکی از پپتیدهای مرتبط با سیستم ایمنی ذاتی می‌باشد. این پپتید به دلیل خاصیت کاتیونیک و آب‌گریزی خود، می‌تواند به داخل میکرواورگانیسم‌ها نفوذ کرده و باعث نابودی آنها شود. این یافته، با نتایج کسترلو و همکاران (۵) مطابقت داشت. آنها در مطالعه خود دریافتند که بیان ژن LEAP2 در طیور حساس به ایمریا ماکسیما، افت بیان بیشتری داشته است و همبستگی مثبتی بین کاهش بیان این ژن با میزان شدت بیماری وجود دارد.

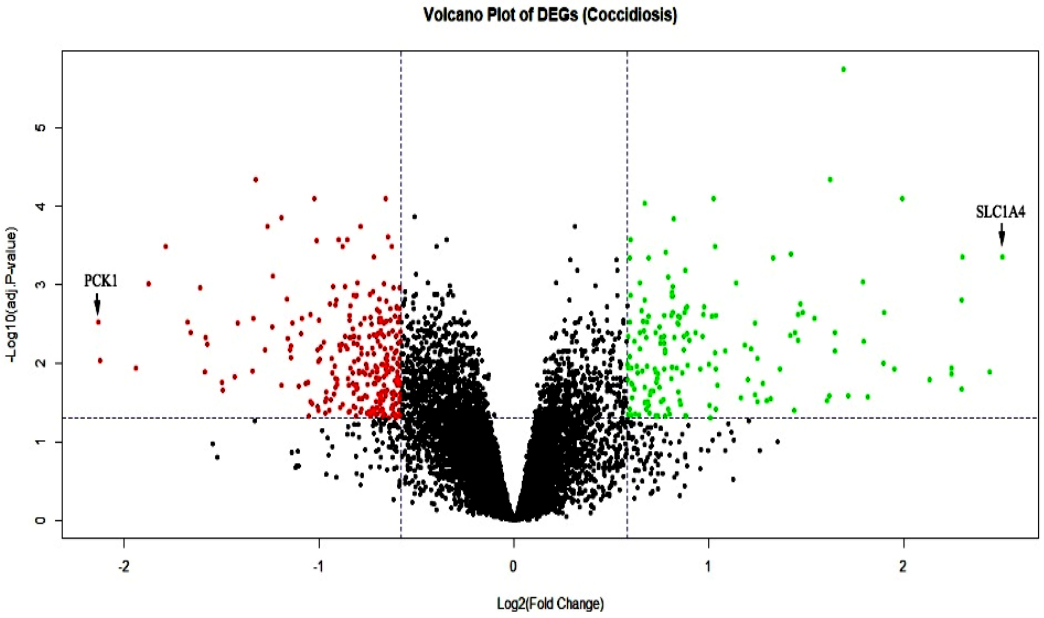
مسیرهای بیولوژیکی مبتنی بر آنالیز KEGG

آنالیز مسیر KEGG در مورد ژن‌های با بیان متفاوت در کوکسیدیوز نشان داد که بیشتر ژن‌های با کاهش بیان در این بیماری، در مسیرهای متابولیکی از جمله متابولیسم پیروات، پنتوز فسفات و همچنین سنتز آنتی‌بیوتیک‌ها دخیل هستند (جدول ۲). هیچ عبارت معنادار KEGG برای ژن‌های با افزایش بیان در کوکسیدیوز یافت نشد.

پیروات به عنوان محصول نهایی فرآیند گلیکولیز، یکی از مولکول‌های حیاتی در متابولیسم یوکاریوت‌ها به شمار می‌رود. مقصد نهایی این مولکول، میتوکندری بوده و در تولید ATP نقش اساسی ایفا می‌کند. هرگونه آسیب به روند متابولیسم پیروات، با ایجاد اختلال در روند تولید ATP، می‌تواند آسیب‌های شدیدی را به بدن موجودات وارد کند (۱۳). به نظر می‌رسد انواع مختلف انگل‌های ایمریا با تأثیر بر ساختمان روده به خصوص پرزها و همچنین جمعیت میکروبی روده، بر فرآیندهای متابولیکی میزبان خود اثر می‌گذارند (۱۱،۱۸،۲۶). علاوه بر این، تعداد ۶ عبارت از ۱۵ عبارت معنادار شده (برای ژن‌های با کاهش بیان) در فرآیندهای زیستی مربوط به کوکسیدیوز در ارتباط با متابولیسم چربی‌ها بودند. این شواهد نشان می‌دهد که متابولیسم طبیعی چربی، یکی از قربانیان اصلی تهاجم ایمریاها به روده طیور می‌باشد. این نتایج با نتایج به‌دست آمده توسط فریتاس و همکاران (۱۰) مطابقت داشت. آنها نشان داده بودند که سطح چربی سرم و گلوکز پلاسمای خون در پرندگان آلوده به ایمریاها دچار افت شده و تمایل چربی برای ذخیره در کبد افزایش یافته است.

1- Clostridium perfringens

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.16.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.154]



شکل ۲- نمودار آتشفشانی مربوط به ژن‌های با بیان متفاوت؛ محور عمودی مربوط به سطح معناداری و محور افقی مربوط به سطح بیان می‌باشد؛ نقاط سبز نمایانگر ژن‌های با بیان بالای معنادار، نقاط قرمز نمایانگر ژن‌های با بیان پایین معنادار، نقاط سیاه نمایانگر ژن‌های با تغییر بیان غیر معنادار

Figure 2. Volcanic plot of differentially expressed genes; The vertical axis is related to the level of significance and the horizontal axis is related to the level of gene expression; Green dots represent up-regulated genes, red dots represent down-regulated genes, black dots represent genes with non-significant expression change

جدول ۲- مسیرهای KEGG معنادار شده برای ژن‌های با کاهش بیان در کوکسیدیوز

Table 2. Significantly enriched KEGG pathways for down-regulated genes in the coccidiosis

عبارت	تعداد ژن	کلاس	p-value تصحیح شده
Metabolic pathways	۵۲	کاهش بیان	$۲/۴۱ \times ۱۰^{-۷}$
Peroxisome	۹	کاهش بیان	۰/۰۱۴
Pyruvate metabolism	۶	کاهش بیان	۰/۰۲۷
Pentose phosphate pathway	۵	کاهش بیان	۰/۰۳۰
Biosynthesis of antibiotics	۱۲	کاهش بیان	۰/۰۴۵

ژن آنتولوژی

آنالیز ژن آنتولوژی روی ژن‌هایی که دچار افزایش و کاهش بیان شده بودند، منجر به شناسایی ۵۰ عبارت برای فرآیند زیستی، ۱۴ عبارت برای اجزای سلولی در ژن‌های با افزایش بیان و همچنین ۱۵ عبارت برای فرآیند زیستی و ۲ عبارت برای عملکرد مولکولی در ژن‌های با کاهش بیان شد (جدول ۳).

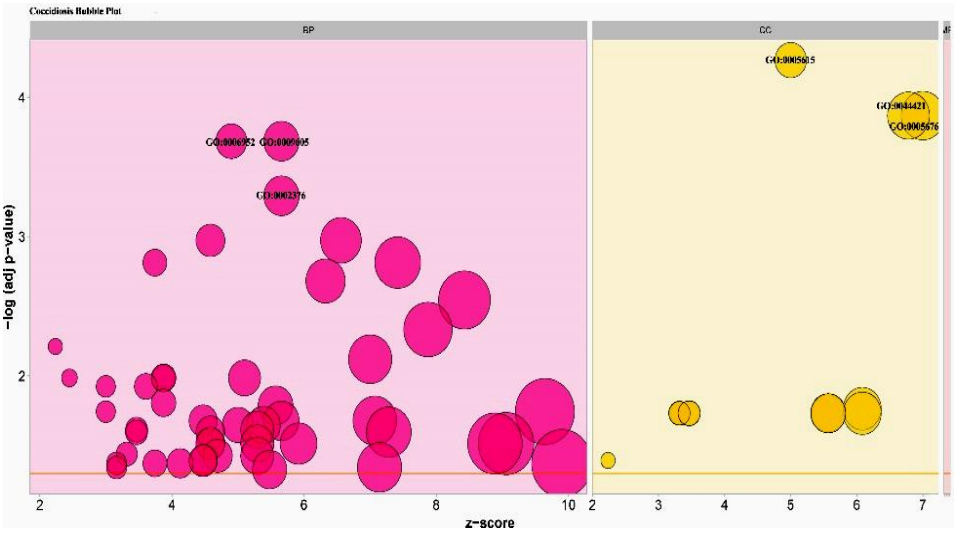
جدول ۳- پنج عبارت اول ژن آنتولوژی معنادار شده در کلاس‌های مختلف برای ژن‌های با افزایش بیان

Table 3. The top five significantly enriched gene ontology terms in different category for up-regulated genes

کلاس	عبارت	تعداد ژن	p-value تصحیح شده
فرآیند زیستی	GO:0009605	۳۲	$۲/۰۷ \times ۱۰^{-۴}$
فرآیند زیستی	GO:0006952	۲۴	$۲/۰۷ \times ۱۰^{-۴}$
فرآیند زیستی	GO:0002376	۳۲	$۵/۱۱ \times ۱۰^{-۴}$
فرآیند زیستی	GO:0006955	۲۱	$۱/۰۷ \times ۱۰^{-۲}$
فرآیند زیستی	GO:0048583	۴۳	$۱/۰۷ \times ۱۰^{-۲}$
اجزای سلولی	GO:0005615	۲۵	$۵/۴۳ \times ۱۰^{-۵}$
اجزای سلولی	GO:0005576	۴۹	$۱/۳۶ \times ۱۰^{-۴}$
اجزای سلولی	GO:0044421	۴۶	$۱/۳۶ \times ۱۰^{-۴}$
اجزای سلولی	GO:0031988	۳۷	۰/۰۱۷
اجزای سلولی	GO:0031982	۳۷	۰/۰۱۸

از میان عبارات ژن آنتولوژی معنادار شده برای ژن‌های با افزایش بیان در دسته فرآیند زیستی، "پاسخ به محرک‌های خارجی" (GO0009605)، "پاسخ دفاعی" (GO0006952) و "فرآیند سیستم ایمنی" (GO0002376) برای بیماری کوکسیدیوز، به‌عنوان عبارات با کمترین p-value تصحیح شده قرار داشتند. این عبارات در مورد ژن‌های با کاهش بیان، شامل بود (شکل ۳).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.16.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.154]

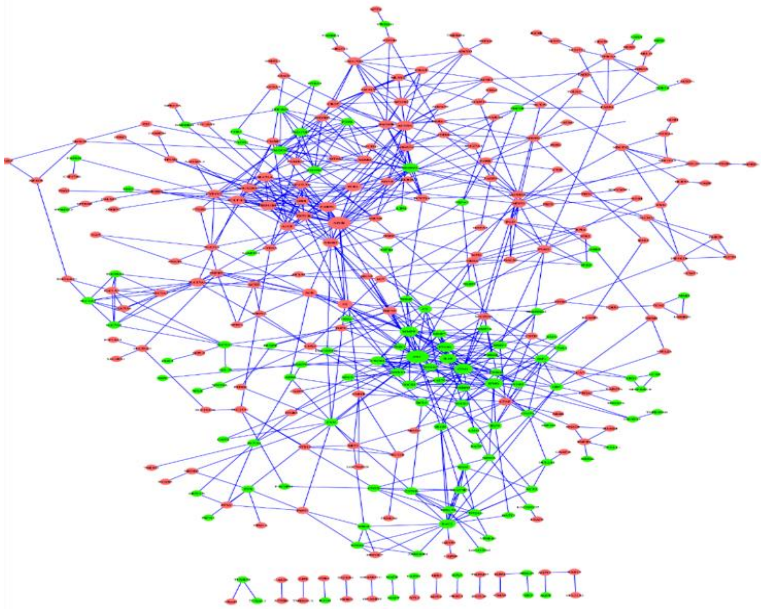


شکل ۳- نمودار حبابی عبارات معنادار ژن آنتولوژی در بیماری کوکسیدیوز؛ هر دایره نمایانگر یک عبارت ژن آنتولوژی معنادار و اندازه هر دایره نشان‌دهنده تعداد ژن‌های دخیل در هر عبارت می‌باشد

Figure 3. Bubble plot of significantly enriched gene ontology (GO) terms in coccidiosis; Each circle represents a significant GO term and the size of each circle represents the number of genes involved in each term

شبکه اثر متقابل پروتنین پروتنین PPI

شبکه PPI ترسیم شده برای ژن‌های با افزایش و کاهش معنادار مربوط به بیماری کوکسیدیوز منجر به ایجاد یک شبکه PPI شامل ۳۲۴ پروتئین (شامل ۲۰۲ ژن با کاهش بیان و ۱۲۲ ژن با افزایش بیان) با ۷۶۲ اثر متقابل شد. لازم به ذکر است که فقط پروتئین‌هایی در داخل شبکه قرار گرفتند که حداقل دارای یک ارتباط متقابل بودند و پروتئین‌های بدون ارتباط متقابل، از شبکه ترسیم شده حذف شدند (شکل ۴).



شکل ۴- شبکه PPI ترسیمی برای ژن‌های با افزایش (سبز) و کاهش بیان (قرمز) معنادار در کوکسیدیوز

Figure 4. Constructed PPI network for up- (green) and down-regulated (red) genes in coccidiosis

اجرای برنامه MCODE روی شبکه ترسیم شده مذکور، منجر به استخراج ۱۲ زیر مجموعه شد. زیر مجموعه با بیشترین تعداد پروتئین انتخاب شده و آنالیز ژن آنتولوژی بر روی آن اجرا شد. براساس دسته‌بندی صورت گرفته بوسیله برنامه ClueGO، ژن‌های مرتبط با پروتئین‌های موجود در زیر مجموعه انتخابی در قالب دو گروه شامل "تیروزین فسفریلاسیون پروتئین STAT" و "فرآیند کاتابولیک کلاژن" دسته‌بندی شدند.

سویه‌های مختلف ایمریاها انگل‌های پروتوزوائی هستند که به روده میزبان‌های خود حمله کرده و از این طریق، آسیب‌های جدی به آنها وارد می‌کنند. بررسی زیر مجموعه انتخابی از شبکه PPI مربوط به بیماری کوکسیدیوز نشان داد

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.16.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.154]

که یکی از گروه‌های مهم از عبارات معنادار ژن آنتولوژی، "فرآیندهای کاتابولیکی کلاژن" می‌باشد. افزایش بیان ژن‌های MMP[1] (MMP1، MMP7 و MMP9 در زیر مجموعه یاد شده) احتمالا نقش بسیار مهمی را در فعال کردن فرآیند کاتابولیسم کلاژن در روده مرغ‌های مبتلا به کوکسیدیوز، بازی می‌کنند. از آنجایی که کلاژن یکی از اجزای اصلی بافت‌های پیوندی و همچنین ماتریکس خارج‌سلولی روده (۹) به شمار می‌آید، لذا آسیب به آن، می‌تواند سلامتی حیوان را به مخاطره بیاندازد. در واقع، افزایش بیان ژن‌های MMP را می‌توان به‌عنوان یک شمشیر دولبه در نظر گرفت که هم می‌تواند به سلامتی حیوان کمک کند هم باعث آسیب‌های جدی به آن شود (۲۷).

نتایج آنالیز انجام گرفته در مطالعه حاضر روی داده‌های قابل دسترسی ریزآرایه‌های Affymetrix مربوط به بیماری کوکسیدیوز منجر به شناسایی ژن‌هایی شد که تعداد زیادی از آن‌ها در فرآیندهای دفاعی در مقابل عوامل بیماری‌زا دخیل هستند. یکی از نتایج قابل توجه این مطالعه، شناسایی ژن‌های با کاهش بیان معنادار در طیور آلوده به ایمریاها بود که همبستگی بالایی با فرآیندهای متابولیکی داشتند. در واقع، دانستن این موضوع که بیماری کوکسیدیوز به بیان نرمال کدام ژن‌ها آسیب وارد می‌کند، به محققان در طراحی روش‌های درمانی و به مرغداران در طراحی روش‌های مدیریتی کمک شایانی می‌کند. به طور مثال، بالانس کردن جیره مناسب در دوران شیوع کوکسیدیوز در گله به منظور کاهش آثار منفی ناشی از کاهش بیان ژن‌های مرتبط با متابولیسم انرژی و چربی می‌تواند راه‌گشا باشد. به نظر می‌رسد تلفیق داده‌های ریزآرایه‌ای با داده‌های مطالعات کل ترانسکریپتوم در مورد بیماری‌های مختلف طیور، می‌تواند اطلاعاتی دقیق‌تر و کارآمدتر در اختیار محققان قرار دهد.

منابع

1. Bindea, G., B. Mlecnik, H. Hackl, P. Charoentong, M. Tosolini, A. Kirilovsky, W.H. Fridman, F. Pagès, Z. Trajanoski and J. Galon. 2009. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. Bioinformatics, 25: 1091-1093.
2. Blake, D.P. and F.M. Tomley. 2014. Securing poultry production from the ever-present Eimeria challenge. Trends in parasitology, 30: 12-19.
3. Boulton, K., M.J. Nolan, Z. Wu, V. Riggio, O. Matika, K. Harman, P.M. Hocking, N. Bumstead, P. Hesketh, A. Archer and S.C. Bishop. 2018. Dissecting the genomic architecture of resistance to Eimeria maxima parasitism in the chicken. Frontiers in genetics, 9: 528.
4. Bremner, A., S. Kim, K. Morris, M.J. Nolan, D. Borowska, Z. Wu, F. Tomley, D.P. Blake, R. Hawken, P. Kaiser and L. Vervelde. 2019. Kinetics of the immune response to Eimeria maxima in relatively resistant and susceptible chicken lines. BioRxiv, p.757567.
5. Casterlow, S., H. Li, E.R. Gilbert, R.A. Dalloul, A.P. McElroy, D.A. Emmerson and E.A. Wong. 2011. An antimicrobial peptide is downregulated in the small intestine of Eimeria maxima-infected chickens. Poultry Science, 90: 1212-1219.
6. Chen, Z., M. McGee, Q. Liu, M. Kong, Y. Deng and R.H. Scheuermann. 2009. A distribution-free convolution model for background correction of oligonucleotide microarray data. BMC genomics, 10: 1-13.
7. Chin, C.H., S.H. Chen, H.H. Wu, C.W. Ho, M.T. Ko and C.Y. Lin. 2014. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. BMC Systems Biology, 8: 1-7.
8. Feng, M., T. Xie, Y. Li, N. Zhang, Q. Lu, Y. Zhou, M. Shi, J. Sun and X. Zhang. 2019. A balanced game: chicken macrophage response to ALV-J infection. Veterinary Research, 50: 1-14.
9. Frantz, C., K.M. Stewart and V.M. Weaver. 2010. The extracellular matrix at a glance. Journal of Cell Science, 123: 4195-4200.
10. Freitas, F.L.C., K.S. Almeida, R.Z. Machado and C.R. Machado. 2008. Lipid and glucose metabolism of broilers (Gallus gallus domesticus) experimentally infected with Eimeria acervulina Tyzzer, 1929 oocysts. Brazilian Journal of Poultry Science, 10: 157-162.
11. Freitas, F.L.D.C. 2014. Metabolic alterations in broiler chickens experimentally infected with sporulated oocysts of Eimeria maxima. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 23: 309-314.
12. Gautier, L., L. Cope, B.M. Bolstad and R.A. Irizarry. 2004. Affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. Bioinformatics, 20: 307-315.
13. Gray, L.R., S.C. Tompkins and E.B. Taylor. 2014. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. Cellular and Molecular Life Sciences, 71: 2577-2604.
14. Griffith, J.W., C.L. Sokol and A.D. Luster. 2014. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. Annual Review of Immunology, 32: 659-702.
15. Guo, A., J. Cai, W. Gong, H. Yan, X. Luo, G. Tian, S. Zhang, H. Zhang, G. Zhu and X. Cai. 2013. Transcriptome analysis in chicken cecal epithelia upon infection by Eimeria tenella in vivo. PLoS One, 8: e64236.
16. Hamzic, E., B. Bed'Hom, H. Juin, R. Hawken, M.S. Abrahamsen, J.M. Elsen, B. Servin, M.H. Pinard-van der Laan and O. Demeure. 2015. Large-scale investigation of the parameters in response to Eimeria maxima challenge in broilers. Journal of Animal Science, 93: 1830-1840.

1- Matrix Metalloproteinase

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.16.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.154]

17. Hamzić, E., B. Buitenhuis, F. Hérault, R. Hawken, M.S. Abrahamsen, B. Servin, J.M. Elsen, M.H. Pinard-van der Laan and B. Bed'Hom. 2015. Genome-wide association study and biological pathway analysis of the Eimeria maxima response in broilers. Genetics Selection Evolution, 47: 1-17.
18. Huang, G., S. Zhang, C. Zhou, X. Tang, C. Li, C. Wang, X. Tang, J. Suo, Y. Jia, S. El-Ashram and Z. Yu. 2018. Influence of Eimeria falciformis infection on gut microbiota and metabolic pathways in mice. Infection and Immunity, 86: e00073-18.
19. Huang, K., A. Herrero-Fresno, I. Thøfner, S. Skov and J.E. Olsen. 2019. Interaction differences of the avian host-specific Salmonella enterica serovar gallinarum, the host-generalist S. Typhimurium, and the cattle host-adapted S. Dublin with chicken primary macrophage. Infection and Immunity, 87: e00552-19.
20. Kalenik, B.M., A. Góra-Sochacka, A. Stachyra, M. Olszewska-Tomczyk, A. Fogtman, R. Sawicka, K. Śmietanka and A. Sirko. 2020. Response to a DNA vaccine against the H5N1 virus depending on the chicken line and number of doses. Virology Journal, 17: 1-10
21. Kauffmann, A., R. Gentleman and W. Huber. 2009. arrayQualityMetrics-a bioconductor package for quality assessment of microarray data. Bioinformatics, 25: 415-416.
22. Khatlab, A.D.S., A.P. Del Vesco, A. Rodrigues Oliveira Neto, F.L.A. Almeida and E. Gasparino. 2019. Dietary supplementation with free methionine or methionine dipeptide improves environment intestinal of broilers challenged with Eimeria spp. Journal of Animal Science, 97: 4746-4760.
23. Lazar, C., S. Meganck, J. Taminau, D. Steenhoff, A. Coletta, C. Molter, D.Y. Weiss-Solís, R. Duque, H. Bersini and A. Nowé. 2013. Batch effect removal methods for microarray gene expression data integration: a survey. Briefings in Bioinformatics, 14: 469-490.
24. Li, Z., M. Martin, J. Zhang, H.Y. Huang, L. Bai, J. Zhang, J. Kang, M. He, J. Li, M.R. Maurya and S. Gupta. 2017. KLF4 regulation of Ch25h and LXR mitigates atherosclerosis susceptibility. Circulation, 136: 1315.
25. Liu, Y., Y. Cheng, W. Shan, J. Ma, H. Wang, J. Sun and Y. Yan. 2018. Chicken interferon regulatory factor 1 (IRF1) involved in antiviral innate immunity via regulating IFN-β production. Developmental & Comparative Immunology, 88: 77-82.
26. Macdonald, S.E., M.J. Nolan, K. Harman, K. Boulton, D.A. Hume, F. M. Tomley, R.A. Stabler and D.P. Blake. 2017. Effects of Eimeria tenella infection on chicken caecal microbiome diversity, exploring variation associated with severity of pathology. PLoS One, 12: p.e0184890.
27. Manicone, A.M. and J.K. McGuire. 2008. February. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. Seminars in Cell & Developmental Biology, 19: 34-41.
28. Ovington, K.S. and N.C. Smith. 1992. Cytokines, free radicals and resistance to Eimeria. Parasitology Today, 8: 422-426.
29. Ritchie, M.E., B. Phipson, D.I. Wu, Y. Hu, C.W. Law, W. Shi and G.K. Smyth. 2015. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic acids Research, 43: e47-e47.
30. Schulenborg, T., O. Schmidt, A. Van Hall, H.E. Meyer, M. Hamacher and K. Marcus. 2006. Proteomics in neurodegeneration–disease driven approaches. Journal of neural transmission, 113: 1055-1073.
31. Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski and T. Ideker. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Research, 13: 2498-2504.
32. Sherman, B.T. and R.A. Lempicki. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature Protocols, 4: 44.
33. Shivaramaiah, C., J.R. Barta, X. Hernandez-Velasco, G. Téllez and B.M. Hargis. 2014. Coccidiosis: recent advancements in the immunobiology of Eimeria species, preventive measures, and the importance of vaccination as a control tool against these Apicomplexan parasites. Veterinary Medicine: Research and Reports, 5: 23.
34. Sun, J., Z. Han, T. Qi, R. Zhao and S. Liu. 2017. Chicken galectin-1B inhibits Newcastle disease virus adsorption and replication through binding to hemagglutinin–neuraminidase (HN) glycoprotein. Journal of Biological Chemistry, 292: 20141-20161.
35. Walter, W., F. Sánchez-Cabo and M. Ricote. 2015. GOplot: An R package for visually combining expression data with functional analysis. Bioinformatics, 31: 2912-2914.
36. Wickham, H. 2011. Ggplot2. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics, 3: 180-185.
37. Xie, T., M. Feng, M. Dai, G. Mo, Z. Ruan, G. Wang, M. Shi and X. Zhang. 2019. Cholesterol-25-hydroxylase is a chicken ISG that restricts ALV-J infection by producing 25-hydroxycholesterol. Viruses, 11: 498.
38. Zhang, B., Z. Lv, H. Li, S. Guo, D. Liu and Y. Guo. 2017. Dietary l-arginine inhibits intestinal Clostridium perfringens colonisation and attenuates intestinal mucosal injury in broiler chickens. British Journal of Nutrition, 118: 321-332.
39. Zhang, Z., D. Chen and D.A. Fenstermacher. 2007. Integrated analysis of independent gene expression microarray datasets improves the predictability of breast cancer outcome. BMC genomics, 8: 1-13.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.16.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.154]

Comparative Study of Transcriptome Profile and Immune-Related Genes Network Associated with Intestinal Epithelial Tissue based on Microarray Data in Poultry Infected with Coccidiosis

Reza Seyed Sharifi[1], Reza Khalkhali Ayuriq[2] and Nemat Hedayat[3]

1- Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Mohaghegh Ardabili University, (Corresponding author: reza_seyedsharifi@yahoo.com)
2- Researcher, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Mohaghegh Ardabili University
3- Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Mohaghegh Ardabili University
Received: 10 November, 2021 Accepted: 7 December, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: Coccidiosis caused by Eimeria parasites is one of the most costly diseases in the poultry industry. Understanding how the immune system responds to coccidiosis can be helpful in designing molecular prevention and treatment methods against it. The aim of this study was to identify the important genes involved in the response of chicken's immune system to infection with Eimeria parasites using microarray data available in public databases.

Material and Methods: In the present study, after searching the GEO database, two microarray datasets related to coccidiosis in poultry were selected. After quality control and removal of inappropriate data, significantly up- and down-regulated genes in response to infection with Eimeria were identified using the LIMMA package in the R program. Gene ontology and KEGG pathways analysis were performed using the DAVID program. Subsequently, the protein-protein interaction network of the genes with significant expression level changes was constructed using the Cytoscape program.

Results: The obtained results in this study showed that most of the genes that had a significant increase in expression level were associated with the innate immune system. Significantly down-regulated genes were also involved in metabolic processes. According to the outputs of present study, it seems coccidiosis has the greatest negative effect on metabolic processes, including fat metabolism, due to damage to the poultry intestine. Existing scientific evidences about a significant increase in the expression of MMP1, MMP7 and MMP9 genes revealed that collagen catabolism in coccidiosis is one of the increased cases that can be caused by damage to intestinal tissue. It seems that changing the expression level of genes affecting the metabolism of some nutrients, including fats, is one of the important effects of coccidiosis.

Conclusion: The obtained results of the present study can be useful in better understanding how the poultry's immune system responds to coccidiosis and the observed changes in the expression of some genes can help designing treatment methods for this disease.

Keywords: Coccidiosis, Eimeria, Economic loss, Gene expression, Poultry industry, Public health

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.16.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.154]