Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 15, Issue 2, 2024 p: 1-10

OPEN ACCESS

Research Paper

The Identification and Classification of Some Candidate Genes Associated with Resistance to Infectious Nematodes in Sheep Using Microarray Data

Parisa Habibi[1], Seuda Hosseinzadeh[2], Arash Javanmard[3], Seyed Abbas Raft[4] and Karim Hasanpour[5]

1- M.Sc in Genetics and Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2- Ph.D. student of Genetics and Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3- Associate Professor of Genetics and Animal Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran, (Corresponding author: a.javanmard@tabrizu.ac.ir)
4- Professor of the Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran
5- Associate Professor of Animal Genetics and Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

Received: 24 April, 2023 Accepted: 30 October, 2023

Extended Abstract

Background: To date, one of the main areas of research is the creation of breeds with inherent resistance to digestive nematodes in sheep. In this context, resistance to digestive nematodes has exhibited significant phenotypic differences within and between sheep breeds, suggesting a genetic basis for these differences. According to the list of effective candidate genes and the identified gene network for parasite resistance in sheep, there are genes involved in the immune system, such as the interferon-γ gene (IFN-γ). Cytokinin is involved in biochemical immune system signaling pathways, parasite resistance, and immunological responses. In addition, certain mutations in this gene impair the ability of specialized cells of the immune system to fight off parasite invasion. One of the most popular approaches to generating gene expression data for genome function studies is DNA microarray technology, which allows the simultaneous expression of thousands of genes. Proteomics and genomics are two application areas of microarray technology. This research aims to identify and categorize some of the genes involved in the relative genetic resistance of sheep to nematode infection using microarray data.

Methods: In this context, the GEO-Bank, part of the NCBI, was searched for access to open-access databases. Downloaded microarray data corresponded to infection with parasitic nematodes with the best replication (e.g., data in two resistant and sensitive groups), and the set of genes with differential expression was identified using R -based appropriate software packages (Biobase, GEOquery, limma, affy, Genfilter, Pheatmap, Plyr, Reshape2, and Ggplot2). Raw data were measured on a logarithmic scale, and the P-value fit statistics were used for expression comparisons between gene groups.

Results: The main analysis was performed after precorrection and processing of the raw data because of the high intragroup variance of the data, as evidenced by the observed quality control results of the raw data and the quality control-related results of the integrated data. After pre-processing of the raw data, correlation analysis revealed a strong relationship between genes in the pre-Inf group (Pre-Inf) and the infected group (Inf) compared to the control group. Three heatmap reference charts, a PCA chart, and a volcano plot were used to verify data quality, and by verifying these charts, samples of unfavorable quality were removed from the next stages of analysis. After a bioinformatics analysis, the results showed significantly increased expression patterns (NACA, RPL4, NAGS, CTCF, GBP1, BHLHE, YTHDF3, PDHA1, and MXI1) and diminished expression patterns of PDHA1 and MXI1 genes. According to the results of this study, these genes play a role in the cellular metabolism process, molecular function, the formation of genetic connections, and cell life. Therefore, they were significant (p-value < 0.05) according to the magnitude of the change. The N-acryl glutamate synthetase (NAGS) gene is the cofactor of the first enzyme involved in the urea cycle in mammals. The functional role of this gene has been identified in many neurological diseases. The CTCF gene has a positive effect on the cells of the immune system and plays a special role in defending against viruses and pathogens that invade the host body. The guanylate binding protein 1 (GBP1) gene plays a role in the body's defense against many infectious pathogens. This gene causes oxidative reactions and autophagy of the host immune system as a barrier to invading pathogens. The methyl adenosine RNA binding 3

Copyright ©2024 Habibi et al. 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.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.1]

gene is more effective in antiviral immunity and is closely linked to the GBP1 gene, which plays a role in the body's resistance to many infectious agents. This gene causes oxidative responses and autophagy of the host immune system against invading pathogens. The PDHA1 pyruvate dehydrogenase gene is involved in immune system metabolism. This gene plays a role in allosteric factor-induced regulation, repair of covalent bonds, and relatively rapid changes in the level of expressed proteins, either through altered gene expression or proteolytic degradation. The MXI1 gene helps control the entry of invading pathogens into the host's body and promotes recovery and healing from infections. The results can be explained by several reasons, including the use of different sample breeds and laboratory techniques, the level of parasite contamination, the age of the test material, the variety of tested nematodes, and inconsistent techniques and tools of the current study with those of previous studies. Other reasons include the climatic differences between the test region and its physical location as well as the use of different RNA and microarray methods. However, the results of the study may be helpful under the related circumstances.

Conclusion: The results of microarrays and differential expression patterns can be of great help to molecularly modify livestock to resist internal parasites. Using more advanced tools, such as next-gene sequencing, will provide more accurate and relevant information.

Keywords: Genetic Resistance, Microarray, Nematode Infection, Sheep

How to Cite This Article: Habibi, P., Hosseinzadeh, S., Javanmard, A., Raft, S. A., & Hasanpour, K. (2024). The Identification and Classification of Some Candidate Genes is Associated with Resistance to Infectious Nematodes in Sheep Using Microarray Data. *Res Anim Prod*, 15(2), 1-10. DOI: 10.61186/rap.15.2.1

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.1]

مقاله پژوهشی

شناسایی و دسته‌بندی برخی از ژن‌های مؤثر در مقاومت نسبی ژنتیکی گوسفند به آلودگی نماتد مبتنی بر داده‌های ریزآرایه

پریسا حبیبی[۱]، سئودا حسین‌زاده[۲]، آرش جوانمرد[۳]، سید عباس رافت[۴] و کریم حسنپور[۵]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
۲- دانشجوی دکترای ژنتیک و اصلاح نژاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
۳- دانشیار ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، (نویسنده مسوول: a.javanmard@tabrizu.ac.ir)
۴- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
۵- دانشیار ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۸
صفحه: ۱ تا ۱۰

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: در سرتاسر جهان، آلودگی نماتدهای دستگاه گوارش، جمله جدی‌ترین علل بیماری در نشخوارکنندگان اهلی محسوب می‌شوند. در این راستا، تنوع فنوتیپی قابل‌توجهی در داخل و بین نژادهای گوسفند نسبت به مقاومت به نماتدهای گوارشی گزارش شده است که به‌نظر می‌رسد زمینه ژنتیکی دارد. لیست ژن‌های کاندیدای مؤثر و شبکه ژنی شناسایی شده در خصوص مقاومت انگلی در گوسفند نشان می‌دهد که ژن‌هایی دخیل در سیستم ایمنی همچون، ژن اینترفرون (IFN-γ) interferon γ می‌باشد. در مسیرهای بیوشیمیایی سیتوکنین سیستم ایمنی و ایجاد مقاومت به انگل و واکنش‌های ایمنی نقش دارد. همچنین، بعضی جهش‌های موجود روی این ژن تأثیر منفی روی عملکرد سلول‌های تخصصی سیستم ایمنی در مواجه با انگل‌های مهاجم دارد. فن‌آوری ریز آرایهDNA، یکی از پرکاربردترین روش‌های پربروندا اطلاعات مربوط به بیان‌ژن در پروژه‌های عملکرد ژنوم است که امکان بررسی بیان همزمان هزاران ژن را فراهم می‌کند. فن‌آوری ریزآرایه، ریزآرایه ژنومیکس و ریزآرایه پروتئومیکس را شامل می‌شود. هدف از پژوهش حاضر، شناسایی و دسته‌بندی برخی از ژن‌های مؤثر در مقاومت نسبی ژنتیکی گوسفند به آلودگی نماتد با استفاده از داده‌های ریزآرایه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، جهت دستیابی به پایگاه‌های با دسترسی آزاد، بانک برخط GEO متعلق به NCBI بررسی گردید و داده‌های ریزآرایه مناسب با بهترین تکرار برای آلودگی به نماتدهای انگلی دانلود (پلتفورم GPL4077، GPL4076 و GPL4072 با مجموع ۴۸ داده خام) و با استفاده از بسته‌های نرم‌افزاری مبتنی بر R مورد بررسی قرار گرفت و ژن‌های با بیان افتراقی معنی‌دار شناسایی شدند. این داده‌ها، به سه دسته‌ی شاهد، قبل از عفونت و سلول‌های عفونی تقسیم‌بندی شدند. به‌منظور، بررسی کیفیت داده‌ها از سه نمودار مرجع Heatmap، تجزیه مولفه‌های واریانس (PCA) و نمودار آتشفشانی استفاده گردید. سپس، با بررسی این نمودارها نمونه‌هایی که دارای کیفیت نامطلوب بودند از مراحل بعدی تجزیه و تحلیل حذف گردید. از پکیج نرم‌افزاری تحت مجموعه R/Bioconductor و وابستگی‌های نرم‌افزاری آنها همچون (Biobase، GEOquery، limma، affy، Genfilter، Pheatmap، Plyr، Reshape2، $Ggplot_2$) برای مشخص شدن افزایش و یا کاهش معنی‌دار بیان ژن‌ها و تفکیک آنها از ژن‌های اولیه استفاده شد. داده‌های خام در مقیاس لگاریتمی سنجیده شد و همچنین، از آماره P value تصحیح شده در جهت مقایسات بیان بین گروه‌های ژنی استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج مشاهده شده در خصوص کنترل کیفیت داده‌های خام و خروجی‌های مربوط به کنترل کیفیت داده‌های ادغام شده نشان داد که واریانس درون‌گروهی داده‌های خام بالا بوده فلذا، پیش تصحیح و پردازش داده‌های خام در این خصوص قبل از تجزیه و تحلیل اصلی انجام شد. نتایج آنالیز همبستگی پس از پیش پردازش داده‌های خام بیانگر ارتباط قوی ژن‌ها در گروه‌های آلوده (inf) و پیش‌آلوده (pre-inf) در مقایسه با نمونه‌ی سالم که به‌عنوان کنترل استفاده شد بود که اعتبارسنجی نتایج آتی را بطور قوی تایید کرد. پس از انجام آنالیزهای بیوانفورماتیکی، ژن‌های کاندیدای NACA، RPL4، NAGS، CTCF، GBP1، BHLHE، YTHDF3، $PDHA_1$، MXI1 دچار افزایش بیان معنی‌دار و ژن‌های PDHA1 و MXI1 دچار کاهش بیان معنی‌دار شدند. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، این ژن‌ها از دیدگاه آنتولوژی، در روند متابولیسم سلولی، عملکرد مولکولی، ایجاد ترکیبات ژنتیکی و زندگی سلولی نقش دارند. بنابراین، با مشاهده به سطح p-value <0.05 به‌عنوان ژن‌های معنادار گزارش شدند. ژن NAGS در واقع ژن ان اکریل گلوتامات سنتتاز می‌باشد که کوفاکتور اولین انزیم دخیل در سیکل دفع اوره در پستانداران می‌باشد نقش عملکردی این ژن در بسیاری از بیماری‌های عصبی مشخص شده است. ژن CTCF تاثیر مثبت بر روی سلول‌های سیستم ایمنی می‌گذارد و مخصوصاً در مقابله با ویروس‌ها و عوامل مهاجم به بدن میزبان ایفای نقش می‌کند. ژن گوانیلات بایدنیگ پروتئین GBP1 در مقابله بدن با بسیاری از عوامل عفونی نقش دارد. این ژن باعث پاسخ‌های اکسی داتیو و اتوفاژی سیستم ایمنی میزبان در برابر عوامل مهاجم می‌گردد. ژن متیل آدونوزین ار ان ای بابدینگ ۳ کارایی بیشتری در ایمنی آنتی‌ویرال داشته و همچنین ارتباط نزدیکی با ژن گوانیلات بایدنیگ پروتئین که در مقابله بدن با بسیاری از عوامل عفونی نقش دارد. این ژن باعث پاسخ‌های اکسی داتیو و اتوفاژی سیستم ایمنی میزبان در برابر عوامل مهاجم می‌گردد. ژن پیروات دهیدروژناز PDHA1 در متابولیسم سیستم‌های ایمنی نقش دارد. این ژن در تنظیمات ناشی از فاکتورهای آلوستریک، ترمیم پیوندهای کووالانسی و تغییرات نسبتاً سریع در مقادیر پروتئین‌های بیان‌شده، یا با تغییر بیان ژن یا تخریب پروتئولیتیک نقش آفرینی می‌کند. ژن MXI1 برای کنترل ورود عوامل مهاجم به داخل بدن میزبان کمک می‌کند و باعث بهبود و التیام عفونت‌ها می‌شود. علت توجیهی عدم تطبیق نتایج پژوهش حاضر با مطالعات پیشین را می‌توان به عواملی همچون استفاده از نمونه‌ها (نژادهای متفاوت) و تکنیک‌های آزمایشگاهی متفاوت، میزان آلودگی با انگل متفاوت، سن متفاوت ماده آزمایشی، نوع و تیپ متفاوت نماتد، تکنیک و ابزار متفاوت، تفاوت‌های آب و هوایی منطقه آزمایش و موقعیت جغرافیایی و استفاده از تکنیک‌های متفاوت ار ان سیک و میکروواری را دانست. با این وجود نتایج و خروجی‌های این مطالعه در شرایط حاکم مربوطه می‌تواند کاربردی باشد.

نتیجه‌گیری: استفاده از اطلاعات و خروجی‌های تکنیک میکروواری و بررسی الگوی بیان افتراقی می‌تواند برای اصلاح دام مولکولی گوسفند در جهت مقاومت به انگل‌های داخلی از طریق تلفیق اطلاعات فنوتیپی و ژنوتیپی در مدل‌های حیوانی کمک شایان توجهی نماید.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نماتد، ریز آرایه، گوسفند، مقاومت ژنتیکی

مقدمه

در حال حاضر، عفونت ناشی از آلودگی نماتد دستگاه گوارش ، مهمترین بیماری شایع در سیستم پرورش مرتعی نشخوارکنندگان کوچک محسوب می‌شود (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013). در سرتاسر جهان، کنترل و درمان عفونت‌های ناشی از آلودگی نماتد دستگاه گوارش ده‌ها میلیارد دلار هزینه داشته و کنترل به‌طور سنتی به داروها متکی است (Baker *et al.*, 1998)، اما، استفاده

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.1]

گسترده از داروهای ضد کرم شیمیایی منجر به خسارات اقتصادی شده و نگرانی‌هایی را در مورد سلامت محیط زیست، ایمنی مواد غذایی و توسعه مقاومت در برابر انگل‌ها ایجاد کرده است (Baker *et al.*, 1998). برای تمام گروه‌های اصلی داروهای ضد کرم پایه اصلی درمان فعلی هستند. در صورتیکه، افزایش فزآینده مقاومت دارویی در جمعیت‌های انگل این صنعت را تهدید می‌کند (Boersema and Pandey, 1997). علاوه بر این، اثرات جانبی محیطی باقیمانده‌های داروهای تجویز شده دیگر برای تولید پایدار و افزایش تقاضا برای محصولات ارگانیگ و سبز مطلوب نیست (Boersema and Pandey, 1997). به‌دلیل افزایش مقاومت به داروهای ضدانگلی ، کنترل شیمیایی به‌تنهایی کافی نیست. نماتد دستگاه گوارش، باعث افت صفات تولیدی مانند رشد، کاهش وزن، بروز اسهال، کم خونی و هیپوپروتئینمی می‌شود که گاهی منجر به مرگ نیز می‌شود (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013). همچنین، ضریب تبدیل خوراک ناکارآمد، کاهش اشتها و کاهش ملندگاری بره از نشانه‌های دیگر آلودگی دستگاه گوارش نشخوارکنندگان کوچک می‌باشد. شایان ذکر است آلودگی انگلی زمینه ابتلا به بیماری‌های دیگر را مستعد می‌کند (Fortes *et al.*, 2013). جمع‌بندی راه‌های مقابله با انگل‌های داخلی گوسفند عبارتند از: استفاده از داروهای شیمیایی، افزودن گیاهان با ترکیبات فراسودمند به جیره روزانه، فرمولاسیون جیره (از طریق تعادل مناسب‌تر پروتئین جیره در جهت بهبود عملکرد سیستم ایمنی میزبان)، مدیریت مرتع (برنامه چرای متناوب)، تجویز واکسن، افزودن خوراکی قارچ‌های میکرو شکارگر انگل، و در نهایت مقاومت ماندگار ژنتیکی می‌باشد (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013; Boersema and Pandey, 1997).

روش کلی برای دستیابی به شاخص‌های مقاومت حیوان وجود دارد که عبارتند از : ۱- روش‌های پارازیتولوژی (اندازه‌گیری تعداد تخم و لارو و ابعاد بدنی انگل در مدفوع). ۲- روش‌های ایمنولوژیکی (آنتی‌بادی‌های سرمی همچون، ایمنوگلوبولین‌های A، G، E) اندازه‌گیری میزان ائوزینوفیل‌های سطحی، بافت‌شناسی و تجمع سلولی ائوزینوفیل‌ها، سلول‌های پوششی جام یاخته (Goblet cells). ۳- روش‌های پاتولوژیکی (اندازه‌گیری پیسینوژن پلاسما، البومین پلاسما، میزان هماتوکریت، امتیاز بدنی (Dagscore)، مخصوصاً، در مناطق آب و هوایی مرطوب، آزمون اندازه‌گیری میزان رطوبت مدفوع) (Fortes *et al.*, 2013; McManus *et al.*, 2014). مقاومت ژنتیکی، در برابر آلودگی نماتدها در واقع قابلیت ذاتی میزبان برای ایجاد یک پاسخ ایمنی است که با این مکانیسم استقرار انگل یا توسعه بعدی عفونت را محدود می‌کند (Andronicos *et al.*, 2010). واژه مقاومت، شامل مکانیسم‌های غیرفعال و فعال برای حمایت از سیستم ایمنی میزان است. مقاومت از طریق شبکه‌های ژنی عمدتاً، با سیستم ایمنی ذاتی مرتبط هستند، در واقع با ایجاد سد دستگاه گوارش در برابر انگل‌ها حمایت می‌کنند، همراه با عواملی که پاسخ‌های التهابی سریع را برای تسریع پاکسازی پاتوژن ایجاد می‌کنند.

همچنین، شاخص مقاومت در برابر بیشتر بیماری‌های رایج، ویژگی‌های پیچیده‌ای است که ژن‌های زیادی را درگیر می‌کند (Willoughby *et al.*, 2022). بنابراین، تشخیص تاثیر عوامل انگلی بر بدن میزان امری پیچیده است. در حال حاضر، انتخاب علیه آلودگی دستگاه گوارش بر معیارهای غیرمستقیم مانند شمارش تخمک در مدفوع، حجم سلول‌های هماتوکریت و ائوزینوفیلی خون بستگی دارد (Saddiqi *et al.*, 2011). عیب عمده این روش‌ها این است که حیوانات برای این اقدامات باید به‌صورت طبیعی یا تجربی آلوده شوند. مطالعات انجام شده روی گونه‌های مختلف نماتد در نژادهای مختلف گوسفند نشان داده است که مقاومت به نماتد دستگاه گوارش دارای وراثت‌پذیری متغیر پایین تا متوسط است (Alba-Hurtado and Muñoz-Guzmán, 2013; Sayers and Sweeney, 2005). به‌طور خاص، مطالعه‌ای که روی گوسفند اسکاتلندی صورت سیاه انجام شد، وراثت‌پذیری مقاومت انگلی میزبان علیه گونه‌های مدفوعی Strongyles، Nematodirus spp برآورد گردید (Beraldi *et al.*, 2007; Berton *et al.*, 2017). علاوه بر این، مطالعه‌ای که در نژاد گوسفند Texel، Ile France، گوسفندان نژاد Morada Nova و آمیخته‌های این نژاد انجام شد، گزارش شده که تعداد اووسیست کرم نواری (Moniezia expansa) و کوکسیدین (Eimeria spp) بین حیواناتی که از نظر ژنتیکی دارای تفاوت هستند متفاوت است (Spitsin *et al.*, 2017). صفات شاخص، مانند شمارش تخمک در مدفوع، سنجش آنتی‌بادی، حجم سلول‌های هماتوکریت خون و شاخص فاماچا برای شناسایی حیوانات مقاوم و انعطاف‌پذیر مورد استفاده قرار گرفته است. با توجه به اینکه مقاومت یک صفت فیزیولوژیکی پیچیده است که در طول زمان ایجاد می‌شود و صفات شاخص اندازه‌گیری شده در مقاطع زمانی خاص ممکن است نتوانند همه مسیرهای درگیر را نشان دهند (Andronicos *et al.*, 2010). اغلب، کمی کردن مقاومت از طریق چالش مصنوعی با استفاده از دوزهای متغیر لارو که با آن میزان، زمان و ویژگی آلودگی کنترل می‌شود، صورت گرفته است. با این‌حال، مدیریت چرای مشترک سنتی که در کشاورزی مختلط، سیستم‌های عشایری و دامداری انجام می‌شود، در مناطق استوایی هنوز راهکار پیشنهادی غالب است (Sayers and Sweeney, 2005; Spitsin *et al.*, 2017). راهکار جایگزین دیگر در این خصوص، شناسایی و انتخاب ژن‌هایی است که مسئول مقاومت در برابر عفونت دستگاه گوارش هستند. چندین مطالعه فرآیندهای مولکولی و سلولی مرتبط با مقاومت به عفونت دستگاه گوارش را در بافت‌های مختلف مانند مخاط دوازدهه، شیردان و گره‌های لنفاوی بررسی کردند (Coltman *et al.*, 2001; Crawford *et al.*, 2006). با این‌حال، تنها در چند مطالعه فرآیندهای بیولوژیکی مرتبط با مقاومت به عفونت دستگاه گوارش در نشخوارکنندگان کوچک بررسی شده است. بنابراین، رمزگشایی ژنتیکی این پدیده نیاز به تحقیقات بیشتری دارد

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]
[DOI: 10.61186/rap.15.2.1]

(Venturina *et al.*, 2013). خلاصه تحقیقات اخیر حاکی از اینست که چندین ژنگاه کنترل کننده صفات کمی QTL جایگاه‌های کنترل مقاومت به انگل‌های خارجی مختلف در مناطق مختلف ژنوم روی کروموزوم‌های مختلف (OARs) گوسفند گزارش شده است که شامل کروموزوم‌های شماره۱، ۳، ۶، ۱۴ و ۲۰ می‌باشند. بنابراین، صفت مقاومت تحت تاثیر چندین ژن مستقر در شماره کروموزوم‌های مختلف قراردارد (Baker *et al.*, 1998). همچنین، بررسی لیست ژن‌های کاندیدای مؤثر و شبکه ژنی شناسایی شده در خصوص مقاومت انگلی در گوسفند به‌طور خلاصه نشان می‌دهد که ژن‌هایی همچون، ژن اینترفرون interferon γ (IFN-γ) که محل استقرار آن در کروموزوم ۳ گوسفند می‌باشد (Alvarez Rojas *et al.*, 2015)، در مسیرهای بیوشیمیایی سیتوکنین سیستم ایمنی و ایجاد مقاومت به انگل و واکنش‌های ایمنی نقش دارد. همچنین، بعضی جهش‌های موجود روی این ژن تأثیر منفی روی عملکرد سلول‌های تخصصی سیستم ایمنی در مواجه با انگل‌های مهاجم دارد (Andronicos et al., 2010). فن‌آوری ریز آرایه DNA، یکی از پرکاربردترین روش‌های پر برونداد اطلاعات مربوط به بیان‌ژن در پروژه‌های عملکرد ژنوم است که امکان بررسی بیان همزمان هزاران ژن را فراهم می‌کند. فن‌آوری ریزآرایه، ریزآرایه ژنومیکس و ریزآرایه پروتئومیکس را شامل می‌شود (Alvarez Rojas *et al.*, 2015). ریز آرایه به‌طور کلی، شامل محیط پایه جامد است که روی آن کاوشگرهای متعدد DNA با توالی های نوکلئوتیدی مشخص برای هیبریداسیون مولکولی با نمونه‌های زیستی و بالینی تثبیت می‌شوند (Amarante *et al.*, 1999). در ریزآرایه، علی‌رغم اینکه بررسی منابع خوب و مقالات کلیدی در خصوص ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به انگل در نشخوارکنندگان گزارش شده است (Alvarez Rojas *et al.*, 2015; Amarante *et al.*, 1999) اما، هنوز شناسایی دقیق تر ارتباط و شبکه ژنی معنی‌دار و مسیرهای بیوشیمیایی و شبکه‌های هم بیان ژنی و همچنین ژن‌های Hub به مطالعه بیشتر و جمع‌آوری مستندهای عملی بیشتری دارد.

هدف از پژوهش حاضر، بررسی ترانسکریپتوم گوسفندان مقاوم به انگل‌های داخلی با استفاده از ابزار سنجش بیان ژن ریزآرایه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

انتخاب صفت مورد بررسی

در این مطالعه، دو مجموعه داده‌های خام با شرایط مشابه مربوط به گوسفندان پرورش یافته در دوره یکسان از پایگاه‌های برخط دانلود شده است.

با استفاده از پایگاه داده NCBI و پایگاه داده‌ی Gene Expression Omnibus(GEO) در مجموع اطلاعات ۳۷ حیوان مربوط به پاسخ و عملکرد سیستم ایمنی ناحیه‌ای به مقاومت انگلی انتخاب شد. این داده‌ها، در پایگاه داده GEO با شماره‌های دسترسی (۱۲ حیوان) GSE23863 و GSE23890 (۲۵ حیوان) قابل دسترسی می‌باشند. که این داده‌ها با پلتفرم Ovine Genotypin array به‌دست آمده است. داده‌های مربوطه در سه گروه دسته‌بندی شده بودند که شامل حیوان‌های گروه کنترل، گروه پیش‌آلوده شده و گروه آلوده شده بودند. با استفاده از بسته‌های نرم‌افزاری R و با رسم نمودارهای heatmap همبستگی بین داده‌ها را بررسی کرده و همچنین، با رسم نمودارهای تجزیه به مولفه‌های اصلی PCA می‌توان گروه‌بندی و تصویر کلی ژن‌ها را در سه دسته نشان داد. اطلاعات دریافت شده از GEO جهت بررسی و آنالیز به نرم‌افزار R ورژن 3.2.3 انتقال داده شد و با استفاده از بسته‌های نرم‌افزاری مختلف تجزیه و تحلیل مربوطه انجام شد. برای نرمال‌سازی آماری داده‌ها از روش کونتایل استفاده گردید. از بسته‌های نرم‌افزاری گزارش شده در جدول ۱ در این مطالعه استفاده شده است.

پس از به‌دست آوردن مقادیر لگاریتمی Fold change و p-value نمودار آتشفشانی رسم شده و بیان افتراقی ژن‌ها بین دو گروه جمعیت مقاوم و حساس به آلودگی انگلی بررسی و در نهایت ژن‌های با بیان معنی‌دار مشخص شد. در گام دوم شبکه ژنی برای ژن‌های باتفاوت بیان معنی‌دار (خروجی‌های بخش اول آنالیز حاضر) و رسم شبکه در حالت ادغام خروجی این مطالعه و لیست ژنی مستخرج از بررسی منابع مطالعاتی پیشین جهت تعیین ژن‌های Hub مشترک و ماژول‌های اصلی بررسی گردید و در نهایت با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف برخط ژن انتولوژی و هستی‌شناسی ژن‌های شبکه (DAVID، REVIGO، سایتواسکیپ ClueGO) برای تعیین نقش ژن با بیان افترقی معنی‌دار در چرخه‌های سلولی و عملکرد اختصاصی آن با استفاده از نرم‌افزارهای رایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جدول ۱- پکیج‌های اختصاصی مبتنی بر نرم‌افزار R مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Studied Specific package of R packages

ردیف Row	نام پکیج Package name	ورژن Version
۱	Biobase	2.30.
۲	GEOquery	2.40
۳	Limma	3.26.8
۴	Affy	1.68
۵	Genfilter	1.72.1
۶	Pheatmap	1.0.12
۷	Plyr	1.8.7
۸	Reshape2	1.4.4
۹	Ggplot2	3.3.6
۱۰	Gplots	3.1.3
۱۱	Xlsx	0.6.5

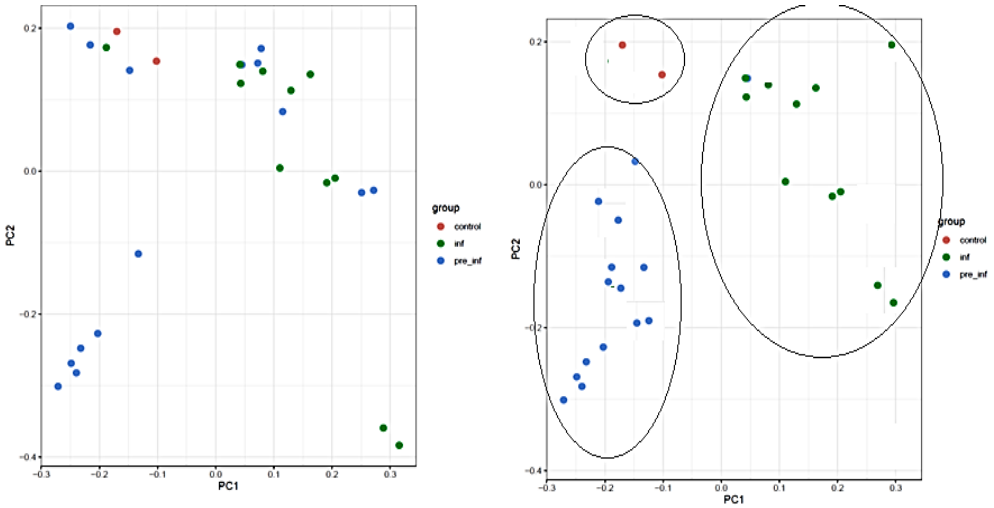
[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.1]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.1] [Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

نتایج و بحث

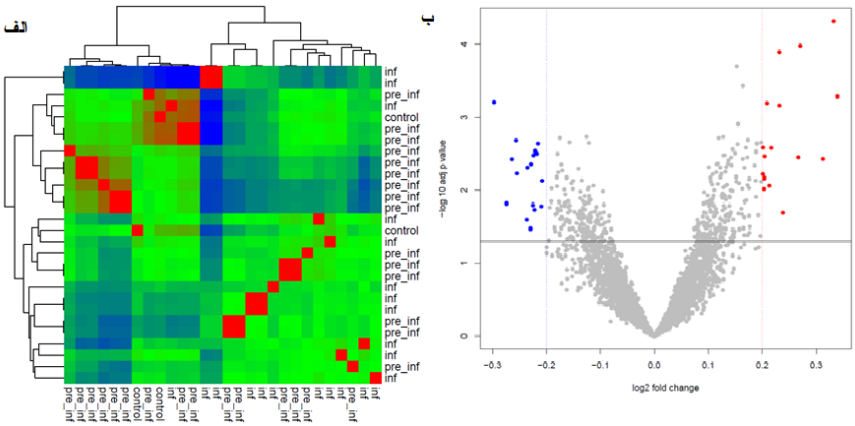
کنترل کیفیت داده‌های خام و خروجی‌های مربوط به کنترل کیفیت داده‌های ادغام شده صورت گرفت و مشخص شد که واریانس درون گروهی داده‌ها بالا بوده فلذا پیش تصحیح داده‌های خام انجام گرفت (شکل ۱). نمودار Heatmap از اهمیت خاصی برخوردار است و گروه‌بندی بین ژن با ژن، فرد با ژن و فرد با فرد قابل روئیت می‌باشد و می‌تواند همبستگی بیومارکر در نمونه‌های سالم و به‌طور جدا در نمونه‌های بیمار و همچنین، هم‌بیانی ژن‌هارا مشخص کند. همانطوری‌که در شکل الف-۲، نمودار heatmap مشاهده می‌شود، پس از ادغام دو مجموعه داده و مرتب‌سازی و پیش‌پردازش آنها، نتیجه آنالیز بیانگر ارتباط قوی ژن‌ها در گروه‌های آلوده (inf) و پیش‌آلوده (pre-inf) در مقایسه با نمونه‌ی سالم که به‌عنوان کنترل استفاده شد، می‌باشد.



شکل ۱- بررسی کنترل کیفیت و واریانس درون و برون گروهی داده‌های خام پیش (سمت راست) و بعد از نرمال‌سازی (سمت چپ) یکی از داده‌ها قبل از ادغام

Figure 1. Assessment of quality control raw data before (right) and after(left) of normalization analysis

پس از انجام آنالیزهای بیوانفورماتیکی، ژن‌های NACA، RPL4، NAGS، CTCF، GBP1، BHLHE، YTHDF3، PDHA1، MXI1 دچار افزایش بیان معنی‌دار و ژن‌های PDHA1 و MXI1 دچار کاهش بیان معنی‌دار بودند (شکل ب-۲). با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، این ژن‌ها از دیدگاه آنتولوژی، در روند متابولیسم سلولی، عملکرد مولکولی، ایجاد ترکیبات ژنتیکی و زندگی سلولی نقش دارند.



شکل ۲- دو نمودار کلیدی هیت مپ برای دسته‌بندی اولیه داده‌های خام (الف) و نمودار آتشفشانی برای ژن‌های با تفاوت بیان معنی‌دار (ب)

Figure 2. Two key heatmap charts for primary classification (A) and volcano plot diagrams (B) of significant identified genes

بنابراین، با توجه به میزان p-value <0.05 معنی‌دار معرفی شدند. خلاصه مرور منابع تحقیقات پیشین حاکی از این است که کمپلکس مجموعه ژن های تطابق‌پذیری بافتی (MHC) و چندین ژن از ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی نقش کلیدی و معنی‌داری در واکنش میزبان بر علیه انگل‌ها دارد (Amarante *et al.*, 1999; Beraldi *et al.*, 2007; Berton *et al.*, 2017; Bishop, 2012). بررسی لیست ژن‌های کاندیدای موثر و شبکه ژنی شناسایی شده در خصوص مقاومت انگلی در گوسفند به‌طور خلاصه نشان می‌دهد که ژن‌هایی همچون، ژن اینترفرون interferon γ

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]
[DOI: 10.61186/rap.15.2.1]

IFN-γ که محل استقرار آن در کروموزوم شماره ۳ گوسفند می‌باشد، در مسیرهای بیوشیمیایی سیتوکنین سیستم ایمنی و ایجاد مقاومت به انگل و واکنش‌های ایمنی نقش دارد (Carracelas *et al.*, 2022). همچنین، بعضی جهش‌های موجود روی این ژن‌ها تاثیر منفی بر عملکرد سلول‌های تخصصی سیستم ایمنی در مواجه با انگل‌های مهاجم دارند. همچنین، جمع‌بندی و بازنگری مقالات ژن‌های کاندید نشان می‌دهد که ژن‌هایی همانند، ژن گیرنده کیموکین، تنظیم‌کننده سینگال‌ها و پیام‌های سلولی جهت مهاجرت لکوسیت‌های سیستم ایمنی به محل آلودگی انگلی در بافت‌های داخلی گوسفند می‌باشد. بررسی بیشتر مقالات نشان می‌دهد که گیرنده ژن اینترلوکین، تنظیم‌کننده تولید آنتی‌یادی‌های ویژه و القا عمل فاگوسیتوز و بیگانه‌خواری سلول‌های سیستم ایمنی و گلبول‌های سفید می‌باشد (Amarante *et al.*, 1999; Beraldi *et al.*, 2007; Berton *et al.*, 2017; Bishop, 2012).

همانطوری‌که، در نتایج اولیه اشاره گردید تعداد مجموع ۹ ژن کاندیدا در آنالیزهای بیوانفورماتیکی ما الگوی بیان معنی‌دار نشان داد که عبارتند از: RPL4، NACA، NAGS، CTCF، GBP1، BHLHE، YTHDF3، PDHA1، MXI1 .

ژن ریبوزومی شماره ۴ (RPL4): در یوکاریوت‌ها، ریبوزوم محل بیوسنتز پروتئین در سلول‌ها است. ریبوزوم بالغ (S۸۰) شامل زیر واحد ریبوزومی بزرگ (۶۰) و زیر واحد ریبوزومی کوچک (۴۰) است. تحقیقات اخیر نشان داده است که برخی از RP ها در فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ NF-kB نقش دارند. پروتئین ریبوزومی به‌طور انتخابی رونویسی سایتوکاین‌های خاص را در پایین‌دست NF-kB سیگنال‌دهی می‌کند. در گوسفند این ژن با کد Gene ID: 780462 معرفی شده و در کروموزوم شماره ۷ مستقر است و دارای ۱۰ اگزون می‌باشد و نقش آن در بهبود عملکرد سیستم ایمنی به‌خوبی بررسی شده است (Anderson *et al.*, 2014; Crawford *et al.*, 2006).

ژن NACA: این ژن با کد شناسایی ۱۰۱۱۰۵۸۹۹ در بانک ژن برای گوسفند مکان‌یابی شده است در کروموزوم شماره ۳ مستقر است و شامل ۱۰ اگزون می‌باشد. این ژن زیرواحد آلفا پیچیده مرتبط با پلی‌پپتید هدف نامگذاری شده است. این ژن پروتئینی را کد می‌کند که با فاکتور رونویسی پایه ۳ (BTF3) ارتباط برقرار می‌کند تا کمپلکس مرتبط با پلی‌پپتید نوپا (NAC) را تشکیل دهد. این کمپلکس به پروتئین‌های نوپایی که فاقد موتیف پپتیدی سیگنال هستند، هنگام خروج از ریبوزوم متصل می‌شود و تعامل با ذرات تشخیص سیگنال (SRP) را مسدود می‌کند و از انتقال اختلالات احتمالی به شبکه آندوپلاسمی جلوگیری می‌کند. پروتئین این ژن با اینترلوکین‌ها و سیستم ایمنی در مبارزه با عفونت‌ها در حال تعامل است (Crawford *et al.*, 2006; Dixon *et al.*, 2023; Sayers *et al.*, 2005).

ژن NAGS: این ژن در واقع ژن ان اکریل گلوتامات سنتتاز می‌باشد که کوفاکتور اولین آنزیم دخیل در سیکل دفع اوره در پستانداران می‌باشد در بانک ژن با کد ۱۰۱۱۱۲۶۵۸ ثبت شده است و در ژنوم گوسفند در کروموزوم شماره ۱۱ مستقر است و دارای ۷ اگزون می‌باشد نقش عملکردی این ژن در بسیاری از بیماری‌های عصبی مشخص شده است (Anderson *et al.*, 2014; Dixon *et al.*, 2023).

ژن CTCF: این ژن در گوسفند با کد ۱۰۱۱۱۴۲۹۷ در پایگاه ژنی ثبت شده است و روی کروموزوم شماره ۱۴ می‌باشد و ۱۶ اگزون دارد و این ژن تاثیر مثبت بر روی سلول‌های سیستم ایمنی می‌گذارد و مخصوصاً در مقابله با ویروس‌ها و عوامل مهاجم به بدن میزبان ایفای نقش می‌کند (Amarante *et al.*, 1999; Beraldi *et al.*, 2007; Berton *et al.*, 2017; Bishop, 2012).

ژن گوانیلات بایدنیگ پروتئین GBP1 با وزن مولکولی ۶۵ کیلودالتون می‌باشد که در مقابله بدن با بسیاری از عوامل عفونی نقش دارد این ژن باعث پاسخ‌های اکسی داتیو و اتوفاژی سیستم ایمنی میزبان در برابر عوامل مهاجم می‌گردد. مقایسه نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات پیشین نتایج ضد و نقیضی را نشان داد.

بررسی منابع بیشتر در رابطه با درک مقاومت ژنتیکی ذاتی بر علیه انگل‌ها و نقش ژن‌ها نشان می‌دهد که خانواده بزرگ از ژن‌های شبیه ایمنوگلوبولین لوکوسیت‌ها شناسایی شده است که معماهای موجود در این زمینه را برای ما آشکار می‌کند (Raschia *et al.*, 2021) بطوری‌که، این ژن‌ها تحریک کننده اتوماتیکی لوکوسیت‌ها و سلول‌های دندریت و فعال‌کننده سلول‌های کشنده طبیعی در سیستم ایمنی می‌باشند. بررسی‌های منابع گسترده‌تر جنبه‌های کشف نشده و جدید بیشتری را آشکار می‌کند. بطوری‌که، ژن NRMP1 پروتئین ماکروفاژی دفاعی طبیعی بدن باعث آزاد شدن نیتریک اسید و تنظیم واکنش‌های کیموسین‌های طبیعی در بدن گوسفند آلوده به انگل می‌شود و یک خودیاری تمام عیار برای مبارزه طبیعی با مهاجمان آغاز می‌شود. ژن کاندید دیگر Toll-like receptor است که پروتیئن‌های سطحی بدن انگل را برای اتصال سربازان دفاعی سیستم ایمنی بدن به آنها را مهیا و به واکنش‌های دفاعی سرعت می‌بخشد و همچنین، یکی دیگر از ژن‌های کلیدی (TNF) می باشد که فاکتور نکروزی توموری نامیده می‌شود که چندین مسیر بیوشیمیایی متعدد را برای اعلام خطر و بسیج نیروهای سیستم ایمنی و روانه آنها به محل عفونت را شروع می‌کند.

ژن BHLHE: این ژن یک ژن مسئول فاکتور نسخه‌برداری است که در مواجه بدن در حمله عوامل باکتریایی نقش آفرینی معنی‌داری را انجام می‌دهد (Amarante *et al.*, 1999; Andronicos *et al.*, 2010; Beraldi *et al.*, 2007; Berton *et al.*, 2017).

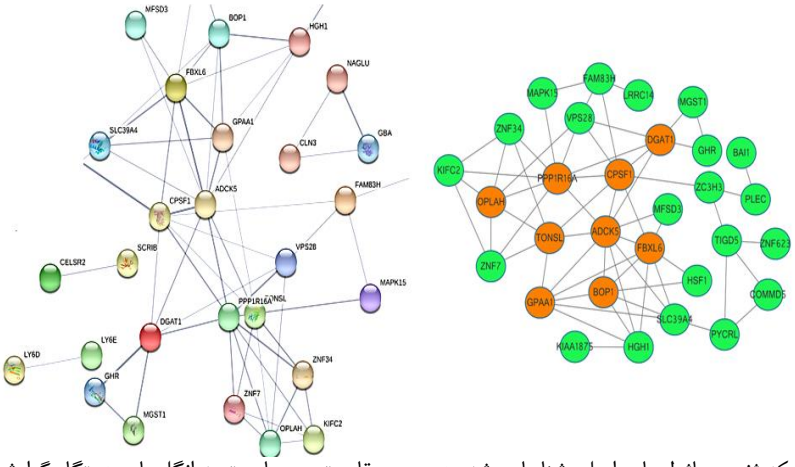
ژن متیل آدنوزین ار ان ای بابدینگ ۳: در بانک ژن با کد شناسایی ۱۰۱۱۱۸۹۶۲ ثبت شده است و در ژنوم گوسفند دارای ۹ اگزون است و روی کروموزوم شماره ۹ نیز مستقر می‌باشد. این ژن کارایی بیشتری در ایمنی آنتی ویرال داشته و همچنین ارتباط نزدیکی با ژن گوانیلات بایدنیگ پروتئین که در مقابله بدن با بسیاری از عوامل عفونی نقش دارد این ژن باعث پاسخ‌های اکسی داتیو و اتوفاژی سیستم ایمنی میزبان در برابر عوامل مهاجم می‌گردد.

ژن پیروات دهیدروژناز PDHA1 در گوسفند با کد ۱۰۱۱۱۰۱۱۸ در پایگاه ژنومی ثبت شده است و در کروموزوم

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]
[DOI: 10.61186/rap.15.2.1]

جنسی ایکس مستقر است و دارای ۱۱ اگزون می‌باشد. این ژن در متابولیسم سیستم‌های ایمنی نقش دارد. این ژن در تنظیمات ناشی از فاکتورهای آلوستریک، ترمیم پیوندهای کووالانسی و تغییرات نسبتاً سریع در مقادیر پروتئین‌های بیان‌شده، یا با تغییر بیان ژن یا تخریب پروتئولیتیک نقش‌آفرینی می‌کند (*Raschia et al., 2021; Sweeney et al.*, 2016).

ژن MXI1 : این ژن در گوسفند با کد شناسایی ۱۰۱۱۱۸۰۶۷ در بانک ژن ثبت شده است و با داشتن ۷ اگزون روی کروموزوم شماره ۲۲ مستقر است. این ژن برای کنترل ورود عوامل مهاجم به داخل بدن میزبان کمک می‌کند و باعث بهبود و التیام عفونت‌ها می‌شود (Amarante *et al.*, 1999; Andronicos *et al.*, 2010; Falzon *et al.*, 2014).



شکل ۳- شبکه ژنی و ماژول‌های اصلی شناسایی شده در مسیر مقاومت و حساسیت به انگل‌های دستگاه گوارش در گوسفند
Figure 3. The gene network and the main modules identified in the path of resistance and susceptibility to gastrointestinal parasites in sheep

مرور منابع و بررسی مقالات پیشین و جدید نشان می‌دهد در مجموع ۱۲۶ منطقه ژنومی در کل کروموزوم‌های گوسفند برای واریانس فنوتیپی صفت مقاومت و حساسیت به انگل وجود دارد که به‌عنوان مثال، اگر بخواهیم ارائه بیشتری از موضوع را داشته باشیم، کروموزوم‌های شماره ۱، ۳، ۶ و ۲۰ بیشترین QTLهای مربوط با صفت مقاومت انگلی را در گوسفند دارد (Berton *et al.*, 2017). مکانیسم‌های مناطق کروموزومی نام برده عبارتند از فعال کردن سلول‌های تخصصی خاص سیستم ایمنی، ائوزینوفیل‌ها، ترشح ایمنوگلوبولین‌ها و همچنین تولید سیتوکنین‌ها که با بررسی سایر مکانیزم‌ها می‌توان اطلاعات بیشتری نیز بدست آورد (Carracelas *et al.*, 2022; Coltman *et al.*, 2001; Crawford *et al.*, 2006) بطوری‌که، بیوستنز موسین لایه مقاوم و محافظ در دستگاه گوارش را پایه‌ریزی می‌کند و یک سد دفاعی طبیعی برای نفوذ اندام‌های خاص انگل را به‌طور طبیعی مهیا می‌کند. مکانیزم سوم و عجیب دیگر ایجاد هموستازی طبیعی و جلوگیری از کاهش هماتوکریت خون و همچنین، ایجاد سدها و موانع طبیعی و ترشح ترکیبات بد مزه و سمی برای کرم‌های تغذیه کننده از منابع بدنی می‌باشد (Alvarez Rojas *et al.*, 2015; Amarante *et al.*, 1999; Andronicos *et al.*, 2010). ژن اینترلوکین ۳ و همچنین، ژن SOCS2 نیز از ژن‌های کاندیدای دیگری برای کنترل و ایجاد مقاومت نسبی ژنتیکی به انگل می‌باشد. ژن اینترلوکین ۳ مسئول فعال شدن ائوزینوفیل‌ها و سلول‌های Mast در زمان وقوع تهاجم انگلی به بدن می‌باشد. ژن‌های PPAP2B، LRP8 در کروموزوم یک عملکرد خوبی برای بهبود محل عفونت و زخم حاصل از تهاجم انگلی را نشان داده است. گیرنده TLR نقش بسیار کلیدی در افزایش بازسازی و تکثیر سلول‌های سیستم ایمنی و اعلام زنگ خطر برای سیستم ایمنی طبیعی در موقع بروز آلودگی انگلی را دارد. از سوی دیگر ژن PDGFRA مشارکت و همکاری خوبی با ژن‌های دیگری همچون، ژن‌های کمپلکس تطابق بافتی و اینترولوکین‌ها برای دفع تهاجم انگل‌ها دارد. ژن‌های MUC7، MUC15، PGA5، CD226 و GALNT1 به‌ترتیب مستقر در کروموزوم‌های شماره‌های ۶، ۱۵، ۲۱ و ۲۳ در تولید موسین دستگاه گوارش و پپسینوژن و بیوستنز گلیکولین و موسین دارد (Saddiqi *et al.*, 2011; Sayers and Sweeney, 2005; Spitsin *et al.*, 2017). ژن GALNT- 1 موسین سبب توقف حرکت لارو شده و تغذیه آن را کاملاً مختل می‌کند و امکان تولید مثل این کرم‌ها و تکثیرشان را بلوکه می‌کند. همچنین، عملکرد ژن‌های (ATP2B1, LRP8 PDGFRA و SPP1) در ایجاد هموستازی و انعقاد خون در محل مواجهه سیستم ایمنی میزبان با مهاجم است و در ایجاد هماتوکریت مناسب و التیام سریع زخم کمک می‌کند (Anderson *et al.*, 2014; Crawford *et al.*, 2006; Dixon *et al.*, 2023). کمپلکس ژن‌های تطابق بافتی هم امکان تشخیص آنتی‌ژن پارازیت را می‌دهد و بلافاصله آنتی‌بادی از نوع E را تولید می‌کنند و این یک پیامی برای مهاجرت سریع سلول‌های سیستم ایمنی مخصوصاً ائوزینوفیل‌ها ارسال می‌کند. از طرفی، سلول‌های Mast cell برای پیشبرد اهداف دفاعی بر علیه انگل‌ها شروع به یک مکانیسم آبشاری از حوادث همانند تولید هیستامین، پروتیناز، پروستاگلندین، Leucotrienes می‌کند

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]
[DOI: 10.61186/rap.15.2.1]

که تمام این عوامل ماندگاری کرم در محیط دستگاه گوارش را به حداقل می‌رساند (Raschia *et al.*, 2021; Seyedsharifi *et al.*, 2022; Sweeney *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019). علت توجیهی عدم تطبیق نتایج پژوهش حاضر با مطالعات پیشین را می‌توان به عواملی همچون استفاده از نمونه‌ها (نژادهای متفاوت) و تکنیک‌های آزمایشگاهی متفاوت، میزان آلودگی با انگل متفاوت، سن متفاوت ماده آزمایشی، نوع و تیپ متفاوت نماتد، تکنیک و ابزار متفاوت، تفاوت‌های آب و هوایی منطقه آزمایش و موقعیت جغرافیایی و استفاده از تکنیک‌های متفاوت از آن سیک و میکروواری را دانست. با این وجود نتایج و خروجی‌های این مطالعه در شرایط حاکم مربوطه می تواند کاربردی باشد. شبکه ژنی مربوط به ژن‌های کاندید مرتبط با مقاومت به نماتدها در شکل ۳ قابل مشاهده می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق بیان افتراقی معنی‌دار لیست ژن‌هایی (NACA، RPL4، NAGS، CTCF، GBP1، BHLHE، YTHDF3، PDHA1، MXI1) با افزایش الگوی بیان و ژن‌هایی (PDHA1، MXI1) با الگوی کاهش بیان را نشان دادند. بنابراین استفاده از اطلاعات و خروجی‌های آنالیز داده‌های ریزآرایه و الگوی بیان افتراقی می‌تواند برای اصلاح دام مولکولی گوسفند در جهت مقاومت به انگل‌های داخلی از طریق مدل‌های حیوانی حاوی اطلاعات ژنوتیپی کمک شایان توجهی نماید. قطعاً، استفاده از ابزارهای پیشرفته‌تر چون توالی‌یابی نسل آینده، اطلاعات دقیق‌تر و مهم‌تری را حاصل خواهد کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز به جهت حمایت برای انجام این تحقیق در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد ابراز می‌دارند.

References

Alba-Hurtado, F., & Muñoz-Guzmán, M. A. (2013). Immune responses associated with resistance to haemonchosis in sheep. BioMed research international, 2013. https://doi.org/10.1155/2013/162158

Alvarez Rojas, C. A., Ansell, B. R., Hall, R. S., Gasser, R. B., Young, N. D., Jex, A. R., & Scheerlinck, J.-P. Y. (2015). Transcriptional analysis identifies key genes involved in metabolism, fibrosis/tissue repair and the immune response against Fasciola hepatica in sheep liver. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-14. https://doi.org/10.1186/s13071-015-0715-7

Amarante, A., Craig, T., Ramsey, W., El-Sayed, N., Desouki, A., & Bazer, F. (1999). Comparison of naturally acquired parasite burdens among Florida Native, Rambouillet and crossbreed ewes. *Veterinary Parasitology*, 85(1), 61-69. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00103-X

Anderson, R., McEwan, J., Brauning, R., Kijas, J., Dalrymple, J., Worley, K., Daetwyler, H., Van Stijn, T., Clarke, S., & Baird, H. (2014). Development of a high density (600K) Illumina Ovine SNP chip and its use to fine map the yellow fat locus. Plant and Animal Genome XXII Conference.

Andronicos, N., Hunt, P., & Windon, R. (2010). Expression of genes in gastrointestinal and lymphatic tissues during parasite infection in sheep genetically resistant or susceptible to Trichostrongylus colubriformis and Haemonchus contortus. *International journal for parasitology*, 40(4), 417-429. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.09.007

Baker, R., Mwamachi, D., Audho, J. O., Aduda, E. O., & Thorpe, W. (1998). Resistance of Galla and Small East African goats in the sub-humid tropics to gastrointestinal nematode infections and the peri-parturient rise in faecal egg counts. *Veterinary Parasitology*, 79(1), 53-64. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00151-4

Beraldi, D., McRae, A. F., Gratten, J., Pilkington, J. G., Slate, J., Visscher, P. M., & Pemberton, J. M. (2007). Quantitative trait loci (QTL) mapping of resistance to strongyles and coccidia in the free-living Soay sheep (Ovis aries). *International journal for parasitology*, 37(1), 121-129. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.09.007

Berton, M. P., de Oliveira Silva, R. M., Peripolli, E., Stafuzza, N. B., Martin, J. F., Álvarez, M. S., Gavinã, B. V., Toro, M. A., Banchero, G., & Oliveira, P. S. (2017). Genomic regions and pathways associated with gastrointestinal parasites resistance in Santa Inês breed adapted to tropical climate. *Journal of animal science and biotechnology*, 8, 1-16. https://doi.org/10.1186/s40104-017-0190-4

Bishop, S. (2012). Possibilities to breed for resistance to nematode parasite infections in small ruminants in tropical production systems. *Animal*, 6(5), 741-747. https://doi.org/10.1017/S1751731111000681

Boersema, J., & Pandey, V. (1997). Anthelmintic resistance of trichostrongylids in sheep in the highveld of Zimbabwe. *Veterinary Parasitology*, 68(4), 383-388. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01089-8

Carracelas, B., Navajas, E. A., Vera, B., & Ciappesoni, G. (2022). Genome-Wide Association Study of Parasite Resistance to Gastrointestinal Nematodes in Corriedale Sheep. *Genes*, 13(9), 1548. https://doi.org/10.3390/genes13091548

Coltman, D., Wilson, K., Pilkington, J., Stear, M., & Pemberton, J. (2001). A microsatellite polymorphism in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a naturally-parasitized population of Soay sheep. *Parasitology*, 122(5), 571-582. https://doi.org/10.1017/S0031182001007570

Crawford, A. M., Paterson, K. A., Dodds, K. G., Diez Tascon, C., Williamson, P. A., Roberts Thomson, M., Bisset, S. A., Beattie, A. E., Greer, G. J., & Green, R. S. (2006). Discovery of quantitative trait loci

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.1]

for resistance to parasitic nematode infection in sheep: I. Analysis of outcross pedigrees. *BMC genomics*, 7, 1-10. https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-178

Dixon, S., Karrow, N. A., Borkowski, E., Suarez-Vega, A., Menzies, P. I., Kennedy, D., Peregrine, A. S., Mallard, B. A., & Cánovas, Á. (2023). Identifying hepatic genes regulating the ovine response to gastrointestinal nematodes using RNA-Sequencing. *Frontiers in Genetics*, 14, 1111426. https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1111426

Falzon, L. C., Menzies, P. I., VanLeeuwen, J., Shakya, K. P., Jones-Bitton, A., Avula, J., Jansen, J. T., & Peregrine, A. S. (2014). Pilot project to investigate over-wintering of free-living gastrointestinal nematode larvae of sheep in Ontario, Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 55(8), 749.

Fortes, F. S., Kloster, F. S., Schafer, A. S., Bier, D., Buzatti, A., Yoshitani, U. Y., & Molento, M. B. (2013). Evaluation of resistance in a selected field strain of Haemonchus contortus to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33, 183-187. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000200008

McManus, C., do Prado Paim, T., de Melo, C. B., Brasil, B. S., & Paiva, S. R. (2014). Selection methods for resistance to and tolerance of helminths in livestock. *Parasite*, 21, 56. https://doi.org/10.1051%2Fparasite%2F2014055

Raschia, M. A., Donzelli, M. V., Medus, P. D., Cetrá, B. M., Maizon, D. O., Suarez, V. H., Pichler, R., Periasamy, K., & Poli, M. A. (2021). Single nucleotide polymorphisms from candidate genes associated with nematode resistance and resilience in Corriedale and Pampinta sheep in Argentina. *Gene*, 770, 145345. https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145345

Saddiqi, H. A., Jabbar, A., Sarwar, M., Iqbal, Z., Muhammad, G., Nisa, M., & Shahzad, A. (2011). Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of Haemonchus contortus. *Parasitology research*, 109, 1483-1500. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2576-0

Sayers, G., Good, B., Hanrahan, J., Ryan, M., Angles, J., & Sweeney, T. (2005). Major histocompatibility complex DRB1 gene: its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds. *Parasitology*, 131(3), 403-409. https://doi.org/10.1017/S0031182005007778

Sayers, G., & Sweeney, T. (2005). Gastrointestinal nematode infection in sheep–a review of the alternatives to anthelmintics in parasite control. *Animal Health Research Reviews*, 6(2), 159-171. https://doi.org/10.1079/AHR2005108

Seyedsharifi, R., Khalkhali-Evrigh, R., & Hedayat, N. (2022). Comparative Study of Transcriptome Profile and Immune-related Genes Network Associated with Intestinal Epithelial Tissue based on Microarray Data in Poultry with Coccidiosis. *Research On Animal Production (Scientific and Research)*, 13(36), 154-162. http://rap.sanru.ac.ir/article-1-1248-en.html

Spitsin, S., Meshki, J., Winters, A., Tuluc, F., Benton, T. D., & Douglas, S. D. (2017). Substance P–mediated chemokine production promotes monocyte migration. *Journal of Leucocyte Biology*, 101(4), 967-973. https://doi.org/10.1189/jlb.1AB0416-188RR

Sweeney, T., Hanrahan, J., Ryan, M., & Good, B. (2016). Immunogenomics of gastrointestinal nematode infection in ruminants–breeding for resistance to produce food sustainably and safely. *Parasite immunology*, 38(9), 569-586. https://doi.org/10.1111/pim.12347

Venturina, V. M., Gossner, A. G., & Hopkins, J. (2013). The immunology and genetics of resistance of sheep to Teladorsagia circumcincta. *Veterinary research communications*, 37, 171-181. https://doi.org/10.1007/s11259-013-9559-9

Willoughby, O. B., Borkowski, E., Dixon, S., Cunha, S. M., Asselstine, V., Perergrine, A. S., Menzies, P. I., Karrow, N. A., & Cánovas, A. (2022). 149 Differences in Gene Expression Following Natural Exposure to Gastrointestinal Parasites between Sheep Selected for High Innate Responses and High Antibody-Mediated Adaptive Immune Responses. *Journal of Animal Science*, 100 (Supplement_3), 70-70. https://doi.org/10.1093/jas/skac247.139

Zhang, R., Liu, F., Hunt, P., Li, C., Zhang, L., Ingham, A., & Li, R. W. (2019). Transcriptome analysis unraveled potential mechanisms of resistance to Haemonchus contortus infection in Merino sheep populations bred for parasite resistance. *Veterinary Research*, 50(1), 1-13. https://doi.org/10.1186/s13567-019-0622-6

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.1]