15(1) 87-92, Spring 2023

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Evaluation of expression profile of intestinal cells infected with *Cryptosporidium parvum* using bioinformatics

Saeed Dadkhah Tehrani [1], ***Seyed Shapoor Reza Shojaei*** [1*], ***Seyed Reza Hosseini*** [2], ***Parviz Shayan*** [3]

[1] *Department of Parasitology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran*
[2] *Department of Parasitology, Shahr-e-kord Branch, Islamic Azad University, Shahr-e-kord, Iran*
[3] *Department of Parasitology, Tehran University, Tehran, Iran*

Key Words

Cryptosporidium parvum
Cryptosporidiosis
Intestinal epithelium
HCT-8 cell line
Parasite infection

Abstract

Introduction: Pathogens affect host cellular mechanisms in order to impair the capabilities of the host cell in the path of infection. *Cryptosporidium parvum* in people with AIDS and people with weakness of the immune system creates severe bile and acute diarrhea, and is known as an important intestinal pathogen in humans and some of the mammals and rows with *Salmonella*, *Shigella* and Enterotoxic genetic strains of *Escherichia coli* It takes. From the point of view of cellular genetics, it should be noted that human intestinal cells due to infection with *Cryptosporidium parvum* undergo major changes in host-parasite interactions, especially changes in the expression of relevant genes. The aim of this study was to identify the effects of altering the expression profile of genes in HCT-8 cells infected with *Cryptosporidium parvum* on host-parasite interaction. In this study, an estimate of the amount of genes involved in biological processes and in the process of intestinal cell infection with *Cryptosporidium parvum* was obtained.

Materials & Methods: In order to carry out the studies, the data recorded in the GEO database on the NCBI website, which was placed by researchers at the University of Houston, Texas, USA, were used. Raw data were read, pre-processed and processed using various software and online databases.

Results: Studies have shown that the expression of genes involved in HCT-8 cell line infection is affected by *Cryptosporidium parvum*, and that some genes are over-expressed and some are under-expressed. The results of this study show that the most genes involved in biological processes are related to cell-parasite communication and the least genes are involved in cell death (apoptosis) and DNA replication.

Conclusion: The results of this study show that different genes under the influence of infection change in expression, each of which can activate different factors and different pathways in the direction of infection and be considered as future drug and vaccine targets.

* Corresponding Author's email: sshojaei@kiau.ac.ir
Received: 21 January 2022; Reviewed: 24 February 2022; Revised: 28 April 2022; Accepted: 31 May 2022
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.316508.2799

مقاله پژوهشی

بررسی پروفایل بیانی سلول‌های روده آلوده به *کریپتوسپوریدیوم پاروم* با استفاده از بیوانفورماتیک

سعید دادخواه‌تهرانی[۱]، سید شاپوررضا شجاعی[۱]، سیدرضا حسینی[۲]، پرویز شایان[۳]*

[۱] گروه انگل‌شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

[۲] گروه انگل‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

[۳] گروه انگل‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

کلمات کلیدی

کریپتوسپوریدیوم‌پاروم
کریپتوسپوریدیوزیس
اپی تلیوم روده
رده سلولی HCT-8
عفونت انگلی

چکیده

مقدمه: پاتوژن‌ها مکانیسم‌های سلولی میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهند تا بتوانند توانایی‌های سلول میزبان را در مسیر عفونت قرار دهند. کریپتوسپوریدیوم پاروم در افراد مبتلا به ایدز و افراد دارای ضعف سیستم ایمنی ایجاد مشکلات صفراوی شدید و اسهال حاد و کشنده می‌نماید و به‌عنوان پاتوژن روده‌ای مهم در انسان و برخی پستانداران شناخته شده و هم‌ردیف با سالمونلا، شیگلا و سویه‌های انتروتوکسی ژنیک اشرشیاکلی قرار می‌گیرد. باید توجه داشت که سلول‌های روده انسان در اثر آلودگی و عفونت با کریپتوسپوریدیوم پاروم دچار تغییرات عمده در فعل و انفعالات میزبان- انگل به‌خصوص تغییر در بیان ژن‌های مربوطه می‌گردد. هدف از انجام این تحقیق شناسایی اثرات تغییر پروفایل بیانی ژن‌ها در سلول‌های HCT-8 آلوده به کریپتوسپوریدیوم پاروم بر واکنش متقابل میزبان-انگل بود. در این تحقیق تخمینی از میزان ژن‌های درگیر در فرایندهای بیولوژیکی و در روند آلودگی سلول‌های‌روده به کریپتوسپوریدیوم پاروم به‌دست آمد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور انجام مطالعات مورد نظر از اطلاعات ثبت شده در پایگاه داده‌های GEO در وب سایت NCBI که توسط محققین دانشگاه هوستن تگزاس‌آمریکا قرار داده شده بود استفاده شد. اطلاعات خام با نرم‌افزارهای‌مختلف و با استفاده از پایگاه‌های اینترنتی مورد خوانش، پیش پردازش و پردازش قرار گرفتند.

نتایج: در بررسی‌های انجام‌شده مشخص شد که بیان ژن‌های دخیل در آلودگی رده سلولی HCT-8 به‌وسیله کریپتوسپوریدیوم پاروم تحت تاثیر قرار می‌گیرند و به طبع آن برخی از ژن‌ها بیش از حد و برخی از ژن‌ها کم‌تر از حد بیان می‌شوند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که بیش‌ترین ژن‌های درگیر در فرایندهای بیولوژیکی مربوط به ارتباطات سلول - انگل و کم‌ترین ژن‌های درگیر در ارتباط با مرگ سلولی(آپوپتوز) و تکثیر DNA می باشند.

بحث و نتیجه‌گیری: بررسی نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که ژن‌های‌مختلفی تحت تاثیر عفونت دچار تغییردر بیان می‌شوند که هر کدام می‌توانند موجب فعال‌شدن عوامل مختلف و مسیرهای متفاوتی در راستای عفونت شوند و به‌عنوان اهداف دارویی و واکسن در آینده مورد توجه قرار گیرند.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: sshojaei@kiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱ بهمن ۱۴۰۰؛ تاریخ داوری: ۵ اسفند ۱۴۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۸ اردیبهشت ۱۴۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۰ خرداد ۱۴۰۱
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.316508.2799

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم یکی از مهم‌ترین عوامل انگلی-روده‌ای در پستانداران به‌ویژه حیوانات اهلی و انسان است. *کریپتوسپوریدیوم* به‌عنوان یک انگل زئونوز، به چند دلیل از نظر همه‌گیرشناسی اهمیت قابل توجهی دارد: دارای طیف میزبانی گسترده است. برخی گونه‌های *کریپتوسپوریدیوم* برای میزبان اختصاصی است اما گونه پاروم برای تمام پستانداران عفونت‌زا می‌باشد. به‌دلیل زئونوتیک بودن، این انگل برای جوامع انسانی بسیارخطرناک می‌باشد. کریپتوسپوریدیوزیس بیماری انگلی است که در اثر تک یاخته *کریپتوسپوریدیوم* ایجاد می‌شود و یک گاستروآنتریت حاد یا مزمن را ایجاد می‌کند. این انگل در پرزهای دیواره روده ساکن شده و موجب بروز علایم بالینی می‌شود. این علایم در افراد با ایمنی کامل با یک اسهال حاد خود محدود شونده شروع می‌شود و تا گاستروآنتریت شدید مزمن در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی که می‌تواند به مرگ منجر شود متغیر است (۱). در آغاز دهه ۱۹۸۰ و با کشف بیماری ایدز این انگل اهمیت بیش‌تری پیدا کرد زیرا مشخص شد این ارگانیسم یکی از عوامل مهم مولد اسهال شدید، طولانی مدت و تهدیدکننده حیات در این بیماران است. آلودگی به این انگل می‌تواند از طریق آب و غذای آلوده یا از طریق تماس فردی یا حیوان به انسان صورت گیرد (۲). پاتوژن‌ها مکانیسم‌های سلولی میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهند تا بتوانند توانایی‌های سلول میزبان را در مسیر عفونت قرار دهند. نقش حیاتی این واکنش‌های مولکولی بین گونه‌ها در ایجاد و حفظ عفونت نیاز به درک کاملی از مکانیسم‌های مربوطه دارد. واکنش‌های تعاملی بین میزبان و پاتوژن به‌عنوان یک رویکرد در سطح سیستم جهت شناسایی مکانیسم‌های ایجاد عفونت ضروری است. به‌دنبال پیشرفت‌های فن‌آوری در یک دهه گذشته داده‌های واکنش‌های پاتوژن- میزبان در مقیاس وسیع تولید شده است. روش‌های مبتنی بر سیستم بیولوژی برای استنباط و تجزیه و تحلیل شبکه‌های تنظیمی، ایمنی، متابولیکی و پروتئین- پروتئین واکنش‌های متقابل میزبان- پاتوژن به‌منظور شناسایی و روشن شدن مکانیسم‌های عفونت به لطف در دسترس بودن داده‌های Omics تقاضای رو به افزایشی پیدا کرده است. سطوح مختلف داده‌های Omics جمع‌آوری شده از عوامل بیماری‌زا یا سلول‌های آلوده مؤلفه‌های مهمی هستند که تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک را جهت تسهیل ساخت و آنالیز شبکه‌های تنظیمی، ایمنی، متابولیکی و پروتئین- پروتئین انجام می‌دهند. یکی از مهم‌ترین و معتبرترین پایگاه‌های ذخیره داده‌های ترنسکریپتوم پایگاه GEO است که داده‌های حاصل از تکنولوژی‌های میکروواری و NGS (توالی‌یابی نسل بعد) بیش از ۱۶۰۰ ارگانیسم (میزبان یا پاتوژن) را به‌صورت رایگان در دسترس محققین قرار می‌دهد و دائم بروزرسانی می‌شود (۳). بیوانفورماتیک دانش جامعی متشکل از علوم مختلف مانند علوم کامپیوتر و مهندسی است هدف آن گردآوری اطلاعات و پردازش آن‌ها در زمینه علوم زیستی است که می‌توان به وسیله آن مشخصات و خصوصیات فیزیکی، ساختاری و کارآیی پروتئین الحاقی طراحی شده را قبل از انجام آزمایش و بیان آن مورد ارزیابی قرارداد (۱۶). در حوزه بیوانفورماتیک، برنامه‌های محاسبه‌ای و سرورهای آنلاین از ابزارهای رایج در آنالیز و شناسایی توالی پروتئین می‌باشند (۱۵). تا همین اواخر بیوانفورماتیک در بحث مطالعات انگل‌شناسی دنیای پر رمز و راز برای آن تلقی می‌شد. ابزارهای بیوانفورماتیک و علوم محاسباتی به‌طور فزاینده‌ای توسط انگل‌شناسان مورد استفاده قرار می‌گیرد تا داده‌های مربوط به عملکرد یا تکامل انگل‌های حیوانات خانگی و سایر حیوانات را استخراج کنند. طبق پیش‌بینی‌ها توانایی دانشمندان در بهره‌برداری از منابع وسیع موجود در انواع مختلف گونه‌ها و ژنوم آن‌ها و هم‌چنین ارتباطی که بین آن‌ها و میزبان برقرار است به‌واسطه علم بیوانفورماتیک تاثیر عمده‌ای بر پیشرفت آن خواهد داشت (۴). رده سلولی HCT-8 متعلق به انسان و جایگاه آن کولون می‌باشد. این رده سلولی در بافت پوششی تقسیم‌بندی می‌شود و بیماری ایجاد شده در آن سرطان بدخیم کولورکتال می‌باشد. این رده سلولی برای اولین بار از فردی در آمریکا جداشد و به‌دلیل انعطاف بسیار بالا در رشد به‌جای نمونه‌های حیوانی برای کشت سلولی، رشد و تکثیر مورد استفاده قرار گرفت. این رده سلولی خاصیت تومورژنیک دارد و اثرات آن در موش به اثبات رسیده است. تومورها بعد از گذشت ۲۱ روز به ۱۰۰ درصد رشد خود می‌رسند. این سلول‌ها نسبت به رنگ آمیزی ایمونو پراوکسیداز و کراتین مثبت هستند. باید توجه داشت که سلول‌های روده در اثر آلودگی و عفونت با *کریپتوسپوریدیوم پاروم* دچار تغییرات عمده در فعل و انفعالات میزبان- انگل به‌خصوص تغییر در بیان ژن‌های مربوطه می‌گردد (۱۴). تغییرات پروفایل بیانی و نقش آن‌ها بر روی پاسخ‌های میزبانی دارای اهمیت قابل ملاحظه‌ای در شناسایی عوامل تاثیرگذار در بیماری‌زایی انگل‌ها و واکنش‌های التهابی میزبان ایفا می‌کند و هدف از انجام این مطالعه، شناسایی این تغییرات در مورد *کریپتوسپوریدیوم پاروم* است.

مواد و روش‌ها

در ابتدا مطالعات اُمیک انجام شده مرتبط با تک یاخته *کریپتوسپوریدیوم پاروم* در پایگاه‌های داده جستجو شد. از یک‌سری کلمات کلیدی مانند HCT-8 و *کریپتوسپوریدیوم پاروم* در قسمت مربوط به جستجوی سایت NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) استفاده شد. در این مرحله لازم است با تعریف شرایط انتخاب و حذف برای مطالعات

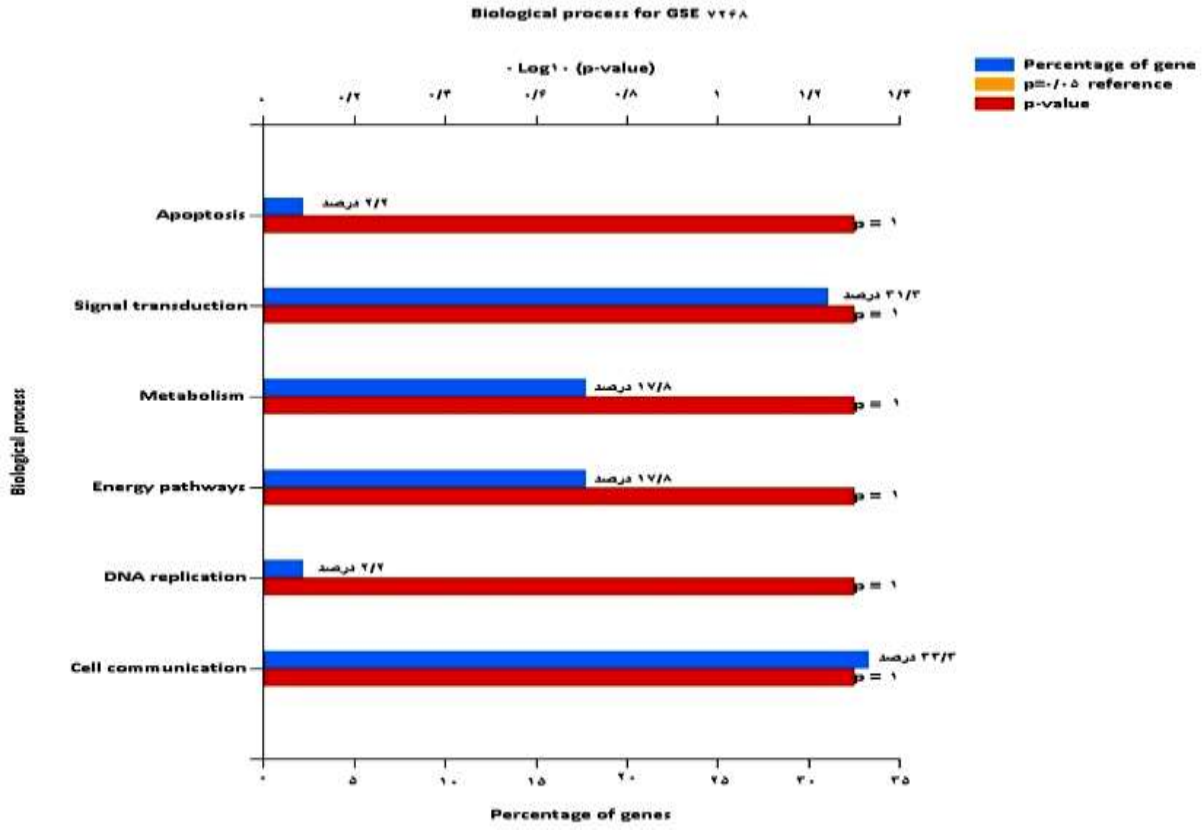
انجام‌شده، داده‌های مناسب انتخاب شوند. در این جستجو از مطالعاتی که به بررسی رده سلولی HCT-8 و آلودگی انسان به *کریپتوسپوریدیوم پاروم* پرداخته بودند استفاده گردید و مطالعات نامربوط حذف شدند. درنهایت اطلاعات مربوط به تک یاخته *کریپتوسپوریدیوم پاروم* بر اساس معیارهای ورود و خروج درنظر گرفته‌شده در سطوح ژنومیک، ترانسکریپتومیک، میکروآرنا و پروتئومیک جمع‌آوری و طبقه‌بندی گردید. بعد از انتخاب مطالعه مناسب از سایت GEO (سری GSE 7268) که در آن به بررسی آلودگی رده سلولی HCT-8 انسان با *کریپتوسپوریدیوم پاروم* در ۳ نمونه پرداخته شده بود، نمونه‌های کنترل و عفونی آنالیز شدند. برای آنالیز و تحلیل ژن‌هایی که در این مطالعه تغییر بیان داشتند، نمونه‌های عفونی در مقابل نمونه‌های کنترل طبقه‌بندی شدند (۵). بعد از طبقه‌بندی نمونه‌های درگیر و قرار دادن نمونه‌های مورد مطالعه در آن‌ها باید تبدیل به مجموعه بیانی یا Expression Set گردند. برای این کار از زبان برنامه‌نویسی R و پکیج‌های: GEOquery، Biobase، Limma استفاده شد. در خلال این فرآیند تمام عددهای بیان قبل از تبدیل به مجموعه بیانی باید همگن شوند که این عمل با استفاده از الگوریتم کوانتایل صورت پذیرفت. پکیج باکس پلات در زبان برنامه‌نویسی R برای کنترل کیفیت مجموعه‌های بیانی به‌کار برده می‌شود که توسط آن داده‌ها با فرمان Normalize between arrays نرمال‌سازی شدند. این پکیج با انجام تحلیل مولفه‌های اصلی نشان می‌دهد که آیا امکان تلفیق داده‌های مطالعه با یکدیگر وجود دارد. این روش براساس ساختن مدل‌های چندمتغیره خطی است، به‌طوری‌که واریانس داده به‌وسیله تعداد فاکتورهای کم‌تر (اجزای اصلی) توصیف می‌شود. با کشیدن مولفه‌های اصلی نسبت به یکدیگر، داده‌های ناهمگن در فضای متفاوتی از بقیه داده‌ها قرار می‌گیرند. بنابراین، داده‌های نامطلوب باید برای بالابردن کیفیت ادغام از روند مطالعه حذف شوند. در این مرحله ژن پروتئین‌های تغییر بیان داده شده در گروه کنترل در مقابل گروه عفونی با اهداف پروتئین‌های به‌دست آمده و DEGهای به‌دست آمده در گروه کنترل در مقابل گروه عفونی با نتایج تحلیل ژنومیک، به‌صورت عمودی ادغام شدند. در این مرحله سطح معنی‌دار بودن ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای شناسایی ژن‌های تغییر بیان شده، چند آزمون متا آنالیز مختلف انجام شد که چون مطالعه انتخاب شده نسبتاً هتروژن بود (براساس نمودار مولفه‌های اصلی)، از نتایج حاصل از روش اندازه اثر تصادفی برای آنالیزهای بعدی استفاده شد. بعداز ادغام عمودی ژن‌های تغییر بیان داده شده جهت پیدا کردن اشتراک بین آن‌ها، ژن‌هایی که در گروه کنترل در مقابل عفونی بعداز ادغام عمودی به‌دست آمدند، به‌عنوان DEGs برای رسم شبکه مادر به‌کار گرفته شدند. برای رسم این شبکه از سایت استرینگ (https://string-db.org) استفاده گردید. به این صورت که ژن‌های به‌دست آمده را در موتور سرچ سایت استرینگ وارد کرده و بعد از انتخاب مدل پیش‌فرض انسانی از نرم‌افزار خواسته می‌شود که براساس اطلاعات موجود در شبکه و براساس ملاک‌های ارزیابی شبکه مورد نظر کشیده شود. در این شبکه ۷ ملاک ارزیابی وجود دارد که به‌ترتیب عبارتند از: Text mining، Experiments، Databases، Co expression، Neighborhood، Gene Fusion، Co-occurrence. در این مطالعه برای به‌دست آوردن ماکزیمم ارتباط برای رسم شبکه مادر از تمام این ۷ ملاک استفاده شد و شبکه مادر برای گروه‌های سه گانه رسم شد. شبکه مادر رسم شده با استفاده از نرم‌افزار سایتواسکیپ و اپلیکیشن مربوط به Network analyzer تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفت و ملاک‌های مرکزیت برای هر گروه مشخص شد. سه شاخص اصلی مرکزیت برای تحلیل شبکه وجود دارد که به‌ترتیب عبارتند از: Degree، Closeness، Betweenness.

Degree یا درجه در علم شبکه یکی از ساده‌ترین و مهم‌ترین معیارهای مرکزیت است که مشخص‌کننده تعداد ارجایی است که به یک گره یا نود در شبکه می‌شود. هرچه درجه نود بالاتر باشد تعداد ارجاع به آن نود بیش‌تر می‌شود. درجه به دو زیرشاخه زیر تقسیم می‌شود: In degree، Out degree که به‌ترتیب عبارتند از تعداد ارجاعی که به گروه شده و یا تعداد ارجاعی که خود گروه می‌کند. Closeness یا مرکزیت نزدیکی معکوس میانگین فاصله هندسی هر نود نسبت به سایر نودها در شبکه است. Betweenness یا مرکزیت بینابینی تعداد کوتاه‌ترین مسیر بین هر دو نود درشبکه است که از یک نود عبور می‌کند. براساس سه ملاک مرکزیت اصلی فوق شبکه مادر بیش‌تر از پنجاه نود داشت که پنجاه نود حاصل از اشتراک سه ملاک فوق انتخاب و مابقی به‌علت ضعیف بودن ارتباط از مطالعه خارج گشت. ژن‌های به‌دست آمده براساس شاخص مرکزیت هاب نامیده شدند. سپس در این مطالعه بعد از ادغام عمودی DEGها و رسم شبکه مادر، شبکه مادر تحت فرایند آنالیز مرکزیت قرار گرفت و هاب‌های اولیه انتخاب شدند. این هاب‌های به‌دست آمده مجدد وارد سایت استرینگ شدند تا شبکه انسانی مورد نظر آن رسم شود. شبکه رسم شده که برگرفته از هاب‌های به‌دست آمده است، زیرشبکه نام گرفت که حاوی ژن پروتئین‌هایی است که بیش‌ترین و قوی‌ترین ارتباط را با هم دارند. زیرشبکه به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار گفی نمایان گشت. برای یافتن فرایندها و عملکردهای مهم و اصلی، از روش‌های مختلف یافتن ماژول در شبکه استفاده شد. در هر یک از این آنالیزها، الگوریتم‌های مختلفی که حاوی پارامترهای متفاوت هستند استفاده شد که بهینه‌سازی این پارامترها از مهم‌ترین نکات این فاز است. برای این امر از نرم‌افزار گفی استفاده شد. بعد از تبدیل شبکه به‌دست آمده از گروه‌های مورد مطالعه، شبکه به‌دست آمده به چند ماژول منطقی

تقسیم‌شد که بهترین ماژول براساس آنالیز غنی‌سازی ژن - پروتئین انتخاب و معرفی گردید. در این مرحله به‌منظور یافتن عملکرد ژن/پروتئین‌های ناشناخته و یا یافتن عملکرد مشخص ژن/پروتئین‌های شناخته شده دارای چند عملکرد، از روش‌های آنالیز غنی‌سازی ژنی استفاده شد. اساس تمامی این روش‌ها، استفاده از داده‌های غنی گزارمان نویسی شده موجود در داده پایگاه هستی‌شناسی ژنی و مسیرهای انتقال پیام KEGG است. به‌این‌منظور مسیرهای بیولوژیک و شبکه‌های درگیر در مسیرهای پیام‌رسانی سلولی ژن‌های به‌دست آمده در ماژول معرفی‌شد و گروه موردبررسی تحت فرایند غنی‌سازی ژن-پروتئین با استفاده از سایت Enrichr قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، آنالیز مرکزیت‌شبکه و هاب‌های به‌دست آمده، ژن‌های مشترک و دارای بالاترین شاخص‌های مرکزیت انتخاب شده و برای ارزیابی جهت ساخت احتمالی دارو یا واکسن معرفی می‌شوند.

نتایج

نمودار فرآیندهای بیولوژیکی: در برنامه R مقدار p.value محاسبه شده و برای دقت و حصول اطمینان بیش‌تر، ۱۰ log- برای p.value را محاسبه می‌کنیم. تغییرات بیان ژن‌هایی که در آن‌ها p.value از ۰/۰۵ کم‌تر است (p<۰/۰۵) معنی‌دار و تغییرات بیان ژن‌هایی که در آن‌ها p.value از ۰/۰۵ بیش‌تر است (p>۰/۰۵) معنی‌دار نیستند. منظور از percentage of gene این است که چه درصدی از ژن‌هایی که بیش‌ترین معنی‌داری (چه از نظر کاهش بیان و چه از نظر افزایش بیان) را دارند، مسئول کدام‌یک از فرایندهای بیولوژیکی مختلف مانند ارتباط سلول و یا جلوگیری از مرگ سلولی هستند و در کدام مورد نقش دارند. در مورد p=۰/۰۵، مواردی که p<۰/۰۵ است دارای ارتباط معنی‌دار و مواردی که در آن‌ها p>۰/۰۵ است ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ۲/۲ درصد از ژن‌هایی که بیش ترین تغییر در بیان را داشتند در رابطه با مرگ سلولی یا apoptosis، ۳۱/۱ درصد در هدایت سیگنال‌های سلولی، ۱۷/۸ درصد در متابولیسم، ۱۷/۸ درصد در مسیرهای مرتبط با انرژی، ۲/۲ درصد در تکثیر DNA و ۳۳/۳ درصد در ارتباط سلولی نقش داشتند. ژن‌های دخیل در هریک از این فرایندهای سلولی می‌توانند به‌عنوان ژن‌های هدف برای مطالعات آزمایشگاهی، حیوانی و انسانی در توسعه درمان و یا پیشگیری از طریق ساخت واکسن بر علیه این بیماری معرفی شوند.



شکل۱: نمودار فرایندهای بیولوژیکی برای میزان ژن‌های درگیر

جدول۱: نتایج P.value و Log FC (fold change) به همراه تغییرات بیانی ژن‌ها

ID	Gene.symbol	logFC	P.Value	Significant*
_at۲۳۹۰۰۶	۷A۲۶SLC	۳۶۲۲۹۳۱۹۸/۱	۰۲۱۱۷۸۲۸۹/۰	+
_x_at۲۳۴۳۵۲	POLB	۳۰۶۹۸۶۲۷۸/۱	۰۰۸۰۲۴۳۲۳/۰	+
_at۱۵۶۲۷۸۰	۱LSD	۲۵۰۰۸۸۰۷۷/۱	۰۲۳۸۴۸۷۴۴/۰	+
_at۱۵۶۹۵۹۹	۱SAMSN	۲۳۳۲۹۳۸۹۶/۱	۰۰۲۰۰۷۰۶۴/۰	+
_a_at۱۵۵۴۹۰۶	۶MPHOSPH	۲۱۱۸۱۱۶۵۷/۱	۰۰۱۵۲۵۹۴۵/۰	+
_at۲۲۸۸۲۱	۲GAL۶ST	۱۸۹۸۱۰۶۶/۱	۰۰۲۹۹۱۰۲/۰	+
_at۱۵۵۲۷۰۵	۱۹DUSP	۱۳۶۲۶۰۸۴۴/۱	۱۷۴۹۶۳۰۰۲/۰	−
_at۱۵۵۲۷۸۳	۴۱۷ZNF	۱۰۲۹۴۷۳۳۹/۱	۰۰۷۲۸۹۰۴۷/۰	+
_at۱۵۵۴۳۵۴	SIAE	۱۰۱۳۶۱۳۶۸/۱	۰۰۱۰۲۶۲۹۲/۰	+
_a_at۱۵۶۹۷۲۹	۱ASZ	۰۹۶۵۲۸۱/۱	۰۲۰۸۶۱۳۸۴/۰	+
_at۲۰۴۶۰۲	۱DKK	۶۰۴۶۷۲۲۲۸/۰	۱۳۲۳۱۰۲۴/۰	−
_at۲۴۱۲۸۳	۰۱۵۰۰LINC	۳۶۸۲۲۹۵۳۲/۱-	۰۰۲۸۰۸۳۵۳/۰	+
_at۱۵۵۹۶۵۳	۱-AS۱GRTP	۴۲۲۳۸۸۴۹۹/۱-	۰۰۳۰۶۶۹۹۵/۰	+
_at۲۳۱۵۸۱	۰۰۶۶۴LINC	۴۳۰۳۵۱۴۷۲/۱-	۰۱۶۵۸۵۲۳۷/۰	+
_x_at۲۳۴۷۰۶	CFTR	۴۵۳۶۰۶۴۷۵/۱-	۰۲۴۳۴۱۳۱۹/۰	+
_x_at۱۵۵۴۵۰۶	۲NAALAD	۴۸۳۳۸۹۱۰۶/۱-	۰۰۱۰۱۵۷۲۳/۰	+
_at۱۵۶۰۸۲۳	۳۴۰۰۱۷LOC	۴۸۵۱۶۰۵۸۲/۱-	۰۱۶۶۷۷۴۱۱/۰	+
_a_at۱۵۶۰۴۹۴	۱CPXCR	۵۲۴۳۱۹۰۳۶/۱-	۰۲۵۴۱۹۸۰۴/۰	+
_at۲۴۱۷۶۴	۲۸۴۸۲۵LOC	۵۴۷۸۸۹۹۹۸/۱-	۰۱۶۰۰۵۹۷/۰	+
_at۲۰۶۵۰۵	۴B۲UGT	۵۸۹۰۲۷۰۰۹/۱-	۰۰۴۲۹۶۱۱/۰	+
_at۲۳۸۹۱۴	DCC	۵۹۵۷۷۹۶۲۳/۱-	۰۵E-۳۰/۵	+

*تغییرات معنی‌دار است: + ، *تغییرات معنی‌دار نیست: −

بحث

بعد از نزدیک به چهار دهه تحقیقات انجام شده روی تک‌یاخته *کریپتوسپوریدیوم‌پاروم*، ابعاد مختلفی از جمله جنبه‌های انگل‌شناسی، ایمنی شناسی، واکنش متقابل انگل با میزبان و درگیری‌های بالینی از آن شناخته شده است. اما هنوز در مورد جنبه‌های بسیاری از آن سؤالات زیادی بدون جواب مانده است که لزوم مطالعات بیش‌تر را در زمینه انگل‌شناسی، فرایندهای بیولوژیکی انگل-میزبان، ژنتیک میزبان و ایمنولوژی بیماری پر رنگ‌تر می‌کند. در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های حاصل در زمینه ژنومیکس، اپی‌ژنتیکس و ترانسکریپتومیکس باعث پدید آمدن تجزیه و تحلیل‌های جامع در مورد مکانیسم‌های مولکولی دخیل در پیشرفت بیماری‌های مختلف گردیده است. در کنار این پیشرفت‌های حاصله، تعداد زیای پایگاه داده به‌وجود آمده‌اند که داده‌های زیستی متنوعی را در خود جای داده‌اند. اکثر این پایگاه‌های داده مثل GEO (GeneExpression Omnibus)، داده‌های خود را به صورت رایگان در اختیار محققین زیستی قرار می‌دهند. تعداد حجیمی از این داده‌ها می‌توانند توسط ابزارهای بیوانفورماتیکی و سایر تجزیه و تحلیلگرهای شبکه‌ای مورد پردازش قرار گرفته و مکانیسم‌های مولکولی و زیستی دخیل در پیشرفت بیماری‌های متعدد را بررسی کنند. علم و تکنولوژی میکرواری برای تجزیه و تحلیل و اندازه‌گیری تغییرات امیک از جمله ژنومیک، پروتئومیک و بیان ژن به‌صورت پربازده و گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. داده‌های حاصل از میکرواری می‌توانند نتایج دقیقی را برای تجزیه و تحلیل‌های آزمایشگاهی در اختیار محققین قرار دهد. علی‌رغم مزایای زیاد استفاده از این داده‌های پربازده به‌صورت انفرادی نقص‌هایی مانند آنالیز یا اعتباربخشی ناکافی، عدم کنترل کافی موارد مثبت کاذب وجود دارد (۶). هم‌چنین در صورت رعایت تمام این موارد نتیجه حاصل از یک جمعیت را نمی‌توان به جمعیت دیگری تعمیم داد. بنابراین ادغام داده‌ها به‌صورت سرتاسری و تهیه یک متاآنالیز از داده‌های موجود باعث بالاتر رفتن اعتبار و پایایی نتایج به‌دست آمده می‌شود. بنابراین داده‌های ژنومیکس، ترانسکریپتومیکس و پروتئومیکس می‌توانند با یکدیگر تلفیق شوند تا یک نتیجه معنی‌دار و مناسب از این داده‌ها به‌دست آید. درحال حاضر این توافق بوجود آمده است که یک فهم دقیق از سیستم‌های بیولوژیک فقط درصورتی حاصل می‌شود که لایه‌های امیک با یکدیگر ادغام گردند (۶). لذا شناخت و درک شبکه پیچیده دخیل در فرایند بیماری‌زایی این تک‌یاخته و مشخص نمودن مهم‌ترین عوامل دخیل در این فرایند امکان بالقوه‌ای برای طراحی روش‌های نوین تشخیصی، طراحی داروهای مناسب برای هدف قرار دادن مهم‌ترین فاکتورهایی که تک‌یاخته از آن‌ها به‌منظور تغییر فرایندهای سلولی و پیشبرد تولید و تکثیر خود بهره می‌برد و هم‌چنین طراحی واکسن مناسب را ایجاد می‌کند. در بررسی‌های انجام شده مشخص شد که بیان ژن‌های دخیل در آلودگی رده سلولی HCT-8 به‌وسیله *کریپتوسپوریدیوم پاروم* تحت تاثیر قرار می‌گیرد و به طبع آن برخی از ژن‌ها بیش از حد و برخی از ژن‌ها کم‌تر از حد بیان می‌شوند. در روند ایجاد بیماری افزایش و یا کاهش بیان ژن‌ها تحت تاثیر عفونت باعث ایجاد تغییر در فرآیندهای بیولوژیکی سلول، ترکیبات سلولی و فعال شدن مسیرهای بیولوژیک سلولی می‌شود که

هر کدام از این مسیرهای بیولوژیک سلولی به تنهایی و یا در همکاری با مسیرها و یا عوامل دیگر موجب فعال شدن بیماری‌ها و یا عملکردهای دیگر که الزاماً بیماری‌زا نیستند می‌شود. با توجه به اهمیت مسیر ارتباطات سلولی در این مطالعه، Hu و همکاران با بررسی سلول‌های اپیتلیال آلوده به *کریپتوسپوریدیوم پاروم* نشان دادند که این انگل می‌تواند باعث افزایش تولید اگزوزوم از این سلول‌ها گردد (۷). مطالعات آن‌ها هم‌چنین حاکی از آن است که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های اپیتلیال آلوده به *کریپتوسپوریدیوم پاروم* می‌تواند باعث القای التهاب از طریق مسیر TLR-4 بر علیه این انگل گردد. اضافه بر این، یافته‌های حاصل از مطالعه Wang و همکاران نشان‌دهنده این موضوع است که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های اپیتلیال آلوده می‌تواند باعث افزایش بیان ژن‌های پیش التهابی از گلبول‌های سفید ساکن طحال گردد (۸). هم‌چنین مطالعات نشان می‌دهند که این اگزوزوم‌ها حاوی پپتیدهای ضدمیکروبی نظیر cathelicidin-37 و β-defensin-2 می‌باشند. به‌خاطر قرارگیری انگل در اطراف سلول میزبان، نتایج حاصله از این مطالعه به‌خاطر غنی سازی اغلب ژن‌ها در فعالیت‌های خارج سلولی و ترافیکی قابل اعتمادتر می‌گردد. مطالعه حاصل از آنالیز داده توسط O'Connor نشان‌دهنده نتیجه یکسان می‌باشد (۹). در مطالعه‌ای که توسط Singh و همکاران برای تعیین پروتئین‌های مورد نیاز برای تهاجم این انگل انجام شده است، نشان داده شده است که احتمالاً ناقلین ABC* برای تامین نیازهای غذایی انگل در سلول‌های میزبان ضروری هستند (۱۰). براساس مطالعه‌ای که Pawlowic و همکاران انجام‌دادند، نشان داده شد که این انگل با استفاده از ناقلین پورین، متابولیسم نوکلئوتید سلول‌های میزبان را تغییر داده و با وارد کردن و استفاده از پورین سلول میزبان، متابولیسم پورین موجود در این سلول‌ها را تغییر می‌دهد (۱۱).ژن PHLDA1 نیز توسط Liu و همکاران به‌عنوان یکی از ژن‌های افزایش بیان یافته دخیل در ضد مرگ سلولی و آپوپتوزیس معرفی شده‌اند (۱۲). Ming و همکاران نشان داده‌اند که ژن Dkk1 می‌تواند از ژن‌های ضروری برای چرخه سلولی انگل در داخل سلول‌های روده میزبان می‌باشد. مضاف بر این، این ژن می‌تواند به‌عنوان یکی از ژن‌های مورد هدف در درمان کریپتوسپوریدیوزیس باشد (۱۳). با توجه به موارد مورد بحث، هر یک از ژن‌های دخیل در فرآیندهای بیولوژیکی سلول‌های روده که تحت تاثیر آلودگی با *کریپتوسپوریدیوم پاروم* واقع شده‌اند می‌توانند پایه و اساس تحقیقات آینده برای تولید دارو و واکسن باشند.

* ناقل ABC در سیستم‌های غشایی واکوئل و غشای پلاسمایی تشخیص داده شده‌اند. این ناقلین به‌علت قابلیت‌شان برای مقاومت به استرس‌های غیرزیستی در مخمر، جانوران و گیاهان شناخته شده‌اند.

منابع

1. **Vahedi, N., Asl, A.D. and Saadat, M., 2009.** Primary research on gastro-intestinal Cryptosporidium incidence rate in lambs and calves in Amol city, Iran. Journal of Veterinary Research. 64(2): 101-102. (In Persian)
2. **Ghafari, R., Rafiei, A., Tavalla, M., Choghakabodi, P.M., Nashibi, R. and Rafiei, R., 2018.** Prevalence of Cryptosporidium species isolated from HIV/AIDS patients in southwest of Iran. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 56: 39-44.
3. **Durmuş, S., Çakır, T., Özgür, A. and Guthke, R., 2015.** A review on computational systems biology of pathogen-host interactions. Frontiers in microbiology. 6: 235.
4. **Foote, S., Speed, T. and Handman, E., 1998.** What can bioinformatics do for parasitology research? Parasitology today. 14(9): 346-347.
5. **Castellanos-Gonzalez, A., Yancey, L.S., Wang, H.C., Pantenburg, B., Liscum, K.R. and Lewis, D.E., 2008.** Cryptosporidium infection of human intestinal epithelial cells increases expression of osteoprotegerin: a novel mechanism for evasion of host defenses. The Journal of infectious diseases. 197(6): 916-923.
6. **Ramasamy, A., Mondry, A., Holmes, C.C. and Altman, D.G., 2008.** Key issues in conducting a meta-analysis of gene expression microarray datasets. PLoS medicine. 5(9): e184.
7. **Hu, G., Feng, Y., O'Hara, S.P. and Chen, X.M., 2014.** Immunology of cryptosporidiosis. Cryptosporidium: parasite and disease. Springer. 423-454.
8. **Wang, Y., Shen, Y., Liu, H., Yin, J., Zhang, X.T. and Gong, A.Y., 2019.** Induction of inflammatory responses in splenocytes by exosomes released from intestinal epithelial cells following cryptosporidium parvum infection. Infection and immunity. 87(4):e00705-718.
9. **O'connor, R.M., Burns, P.B., Ha-Ngoc, T., Scarpato, K., Khan, W. and Kang, G., 2009.** Polymorphic mucin antigens CpMuc4 and CpMuc5 are integral to Cryptosporidium parvum infection in vitro. Am Soc Microbiol. 8(4): 461-469.
10. **Singh, P., Mirdha, B.R., Srinivasan, A., Rukmangadachar, L.A., Singh, S. and Sharma, P., 2015.** Identification of invasion proteins of Cryptosporidium parvum. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 31(12):1923-1934.
11. **Pawlowic, M.C., Somepalli, M., Sateriale, A., Herbert, G.T., Gibson, A.R. and Cuny, G.D., 2019.** Genetic ablation of purine salvage in Cryptosporidium parvum reveals nucleotide uptake from the host cell. Proceedings of the National Academy of Sciences. 116(42): 21160-21165.
12. **Liu, T.L., Fan, X.C., Li, Y.H., Yuan, Y.J., Yin, Y.L. and Wang, X.T., 2018.** Expression profiles of mRNA and lncRNA in HCT-8 cells infected with Cryptosporidium parvum IId subtype. Frontiers in Microbiology. 9: 1409. https://doi.org/10.3389/fmicb. 2018.01409.
13. **Ming, Z., Wang, Y., Gong, A.Y., Zhang, X.T., Li, M. and Chen, T., 2018.** Attenuation of intestinal epithelial cell migration during Cryptosporidium parvum infection involves parasite Cdg7_FLc_1030 RNA-mediated induction and release of Dickkopf-1. The Journal of infectious diseases. 218(8): 1336-1347.
14. **Bahrami, T. and Maleki, B., 1393.** Sequencing of the smallest eukaryotic genome. Pajouda Journal.;30(8):16-24. (In Persian)
15. **Eftekharmanavi, S., Peyghan, R., Soltani, M. and Ghorbanpor, M., 2016.** Ghalyanchi Langrodi A. Multi-aspect molecular and structural bioinformatic study of outer membrane protein (OmpTS) of Aeromonas hydrophila common cause of infectious septicemia in fish for immunization goals. Animal Environment Journal. 8(1): 165-174. (In Persian)
16. Salehzadeh S, Tabatabaei M, Derakhshandeh A, **Karbalaei Heidary, H.R., 2021.** Design of a fusion gene construct for production of recombinant laterosporulin bacteriocin and bioinformatic analysis for assessing the role of the amino-terminal SH2 domain. Animal Environment Journal. 12(4): 603-610. (In Persian)