



## Original Research Paper

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

Saeed Dadkhah Tehrani<sup>1</sup>, Seyed Shapoor Reza Shojaei<sup>1\*</sup>, Seyed Reza Hosseini<sup>2</sup>, Parviz Shayan<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Parasitology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

<sup>2</sup> Department of Parasitology, Shahr-e-kord Branch, Islamic Azad University, Shahr-e-kord, Iran

<sup>3</sup> 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 Enterotoxigenic 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@kiaui.ac.ir](mailto:sshojaei@kiaui.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](https://doi.org/10.22034/AEJ.2022.316508.2799)

## مقاله پژوهشی

## بررسی پروفایل بیانی سلول‌های روده آلوده به کریپتوسپوریدیوم پارووم با استفاده از بیوانفورماتیک

سعید دادخواه‌تهرانی<sup>۱</sup>، سید شاپور رضا شجاعی<sup>۱\*</sup>، سیدرضا حسینی<sup>۲</sup>، پرویز شایان<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه انگل‌شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

<sup>۲</sup> گروه انگل‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

<sup>۳</sup> گروه انگل‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

## چکیده

## کلمات کلیدی

کریپتوسپوریدیوم پارووم  
کریپتوسپوریدیوزیس  
ابی تلایوم روده  
رده سلولی HCT-8  
عفونت انگلی

**مقدمه:** پاتوژن‌ها مکانیسم‌های سلولی میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهند تا بتوانند توانایی‌های سلول میزبان را در مسیر عفونت قرار دهند. کریپتوسپوریدیوم پارووم 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 اش‌رشاکلی قرار می‌گیرد. باید توجه داشت که سلول‌های روده انسان در اثر آلودگی و عفونت با کریپتوسپوریدیوم پارووم 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 پارووم بر واکنش متقابل میزبان- انگل بود. در این تحقیق تخمینی از میزان ژن‌های درگیر در فرایندهای بیولوژیکی و در روند آلودگی سلول‌های روده به کریپتوسپوریدیوم پارووم 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 تگزاس آمریکا قرار داده شده بود استفاده شد. اطلاعات خام با نرم‌افزارهای مختلف 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 پارووم تحت تأثیر 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 می‌باشند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** بررسی نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که ژن‌های مختلفی تحت تأثیر عفونت دچار تغییر در بیان می‌شوند که هر کدام می‌توانند موجب فعال شدن عوامل مختلف و مسیرهای متفاوتی در راستای عفونت شوند و به‌عنوان اهداف دارویی و واکسن در آینده مورد توجه قرار گیرند.

## 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 پارووم برای تمام پستانداران عفونت‌زا می‌باشد. به دلیل زئونوتیک بودن، این انگل برای جوامع انسانی بسیار خطرناک می‌باشد. کریپتوسپوریدیوزیس بیماری انگلی است که در اثر تک‌یاخته کریپتوسپوریدیوم ایجاد می‌شود و یک گاستروانتریت حاد یا مزمن را ایجاد می‌کند. این انگل در پرزهای دیواره روده ساکن شده و موجب بروز علائم بالینی می‌شود. این علائم در افراد با ایمنی کامل با یک اسهال حاد خود محدود شونده شروع می‌شود و تا گاستروانتریت 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 ارگانیزم 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. به دنبال 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، متابولیسم و پروتئین-پروتئین واکنش‌های متقابل میزبان-پاتوژن به‌منظور شناسایی و روشن شدن مکانیسم‌های عفونت به لطف در دسترس بودن داده‌های Omics تقاضای روبه‌افزایشی 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، متابولیسم و پروتئین-پروتئین انجام می‌دهند. یکی از مهم‌ترین و معتبرترین پایگاه‌های ذخیره داده‌های ترنسکریپتوم پایگاه GEO است که داده‌های حاصل از تکنولوژی‌های میکروآرای و NGS (توالی‌یابی نسل بعد) بیش از ۱۶۰۰ ارگانیزم (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 کارایی پروتئین‌های 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 تأثیر 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 جدا شد و به دلیل 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 پارووم 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 تأثیرگذار در بیماری‌زایی انگل‌ها و واکنش‌های التهابی میزبان ایفا می‌کند و هدف از انجام این مطالعه، شناسایی این تغییرات در مورد کریپتوسپوریدیوم پارووم است.

## مواد و روش‌ها

در ابتدا مطالعات آمیک انجام شده مرتبط با تک‌یاخته کریپتوسپوریدیوم پارووم در پایگاه‌های داده جستجو شد. از یک‌سری کلمات کلیدی مانند HCT-8 و کریپتوسپوریدیوم پارووم 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

انجام شده، داده‌های مناسب انتخاب شوند. در این جستجو از مطالعاتی که به بررسی رده سلولی HCT-8 و آلودگی انسان به کریپتوسپورییدیوم پارووم پرداخته بودند استفاده گردید و مطالعات نامربوط حذف شدند. در نهایت اطلاعات مربوط به تک یاخته کریپتوسپورییدیوم پارووم بر اساس معیارهای ورود و خروج در نظر گرفته شده 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 کریپتوسپورییدیوم پارووم 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: Limma, Biobase, GEOQuery 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 به کار 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 بالا بردن 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 DEGs‌های به‌دست آمده در گروه کنترل در مقابل گروه عفونی با نتایج تحلیل ژنومیک، به‌صورت عمودی ادغام شدند. در این مرحله سطح معنی‌دار بودن  $0.05$  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. بعد از ادغام عمودی ژن‌های تغییر بیان داده شده جهت پیدا کردن اشتراک بین آن‌ها، ژن‌هایی که در گروه کنترل در مقابل عفونی بعد از ادغام عمودی به‌دست آمدند، به‌عنوان DEGs برای رسم شبکه مادر به کار 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 پیش فرض 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 به ترتیب 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 به ترتیب 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. هر چه درجه نود بالاتر باشد تعداد ارجاع به آن نود بیش‌تر می‌شود. درجه به دو زیرشاخه زیر تقسیم می‌شود: In degree, Out degree که به ترتیب عبارتند از تعداد ارجایی که به گروه شده و یا تعداد ارجایی 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 در شبکه 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 به علت ضعیف بودن ارتباط از مطالعه خارج گشت. ژن‌های به‌دست آمده براساس شاخص مرکزیت هاب نامیده شدند. سپس در این مطالعه بعد از ادغام عمودی DEGs ها 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، زیر شبکه نام گرفت که حاوی ژن پروتئین‌هایی است که بیش‌ترین و قوی‌ترین ارتباط را با هم دارند. زیر شبکه 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

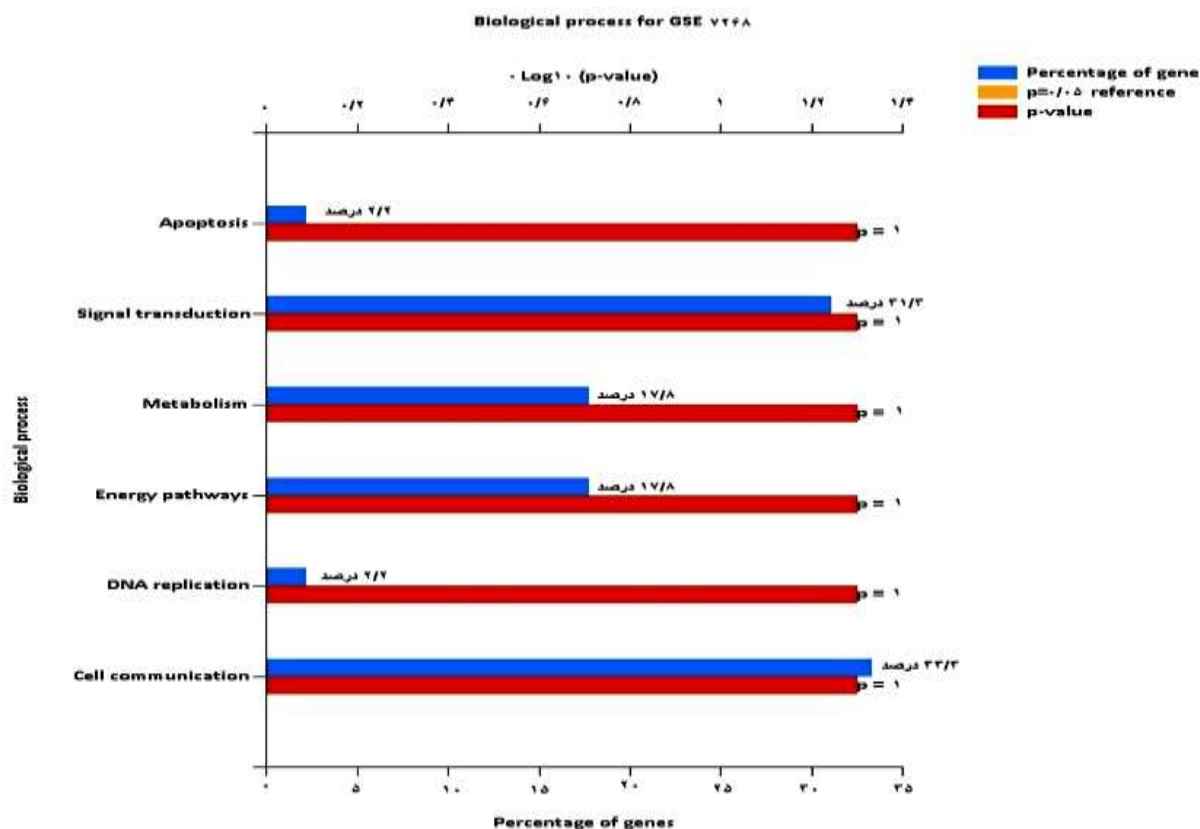
از ۰/۰۵ کمتر است ( $p < 0.05$ ) معنی‌دار و تغییرات بیان ژن‌هایی که در آن‌ها p.value از ۰/۰۵ بیش‌تر است ( $p > 0.05$ ) معنی‌دار نیستند. منظور از percentage of gene این است که چه درصدی از ژن‌هایی که بیش‌ترین معنی‌داری (چه از نظر کاهش بیان و چه از نظر افزایش بیان) را دارند، مسئول کدام‌یک از فرایندهای بیولوژیکی مختلف مانند ارتباط سلول و یا جلوگیری از مرگ سلولی هستند و در کدام مورد نقش دارند. در مورد  $p = 0.05$ ، مواردی که  $p < 0.05$  است دارای ارتباط معنی‌دار و مواردی که در آن‌ها  $p > 0.05$  است ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ۲/۲ درصد از ژن‌هایی که بیش‌ترین 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.

تقسیم‌شد که بهترین مازول 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 غنی‌گزارمان 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 مازول معرفی شد و گروه مورد بررسی تحت فرایند غنی‌سازی ژن-پروتئین با استفاده از سایت Enrichr قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، آنالیز مرکزیت شبکه 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،  $-\log_{10}$  برای p.value را محاسبه می‌کنیم. تغییرات بیان ژن‌هایی که در آن‌ها p.value



شکل ۱: نمودار فرایندهای بیولوژیکی برای میزان ژن‌های درگیر

جدول ۱: نتایج Log FC (fold change) و P.value به همراه تغییرات بیانی ژن ها

| Significant* | P.Value      | logFC        | Gene.symbol | ID           |
|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| +            | ۰.۲۱۱۷۸۲۸۹/۰ | ۳۶۲۲۹۳۱۹۸/۱  | VA۲۶SLC     | _at۲۲۹۰۰۶    |
| +            | ۰.۰۸۰۲۴۳۲۳/۰ | ۳۰۶۹۸۶۲۷۸/۱  | POLB        | _x_at۲۳۴۳۵۲  |
| +            | ۰.۲۳۸۴۸۷۴۴/۰ | ۲۵۰۰۸۸۰۷۷/۱  | ۱LSD        | _at۱۵۶۲۷۸۰   |
| +            | ۰.۰۲۰۷۰۶۴/۰  | ۲۳۳۲۹۳۸۹۶/۱  | ۱SAMSN      | _at۱۵۶۹۵۹۹   |
| +            | ۰.۰۱۵۲۵۹۴۵/۰ | ۲۱۱۸۱۱۶۵۷/۱  | ۶MPHOSPH    | _a_at۱۵۵۴۹۰۶ |
| +            | ۰.۰۲۹۹۱۰۲/۰  | ۱۸۹۸۱۰۶۶/۱   | ۲GAL۶ST     | _at۲۲۸۸۲۱    |
| -            | ۱۷۴۹۶۳۰۰۲/۰  | ۱۳۶۲۶۰۸۴۴/۱  | ۱۹DUSP      | _at۱۵۵۲۷۰۵   |
| +            | ۰.۰۷۲۸۹۰۴۷/۰ | ۱۰۲۹۴۷۳۳۹/۱  | ۴۱YZNF      | _at۱۵۵۲۷۸۳   |
| +            | ۰.۰۱۰۲۶۲۹۲/۰ | ۱۰۱۳۶۱۳۶۸/۱  | SIAE        | _at۱۵۵۴۳۵۴   |
| +            | ۰.۲۰۸۶۱۳۸۴/۰ | ۰۹۶۵۲۸۱/۱    | ۱ASZ        | _a_at۱۵۶۹۷۲۹ |
| -            | ۱۳۲۳۱۰۲۴/۰   | ۶۰۴۶۷۲۲۲۸/۰  | ۱DKK        | _at۲۰۴۶۰۲    |
| +            | ۰.۰۲۸۰۸۳۵۳/۰ | ۳۶۸۲۲۹۵۳۲/۱- | ۰۱۵۰۰LINC   | _at۲۴۱۲۸۳    |
| +            | ۰.۰۳۰۶۶۹۹۵/۰ | ۴۲۲۳۸۸۴۹۹/۱- | ۱-AS۱GRTP   | _at۱۵۵۹۶۵۳   |
| +            | ۰.۱۶۵۸۵۲۳۷/۰ | ۴۳۰۳۵۱۴۷۲/۱- | ۰۰۶۶۴LINC   | _at۲۲۱۵۸۱    |
| +            | ۰.۲۴۳۴۱۳۱۹/۰ | ۴۵۳۶۰۶۴۷۵/۱- | CFTR        | _x_at۲۳۴۷۰۶  |
| +            | ۰.۰۱۰۱۵۷۲۳/۰ | ۴۸۳۳۸۹۱۰۶/۱- | ۲NAALAD     | _x_at۱۵۵۴۵۰۶ |
| +            | ۰.۱۶۶۷۷۴۱۱/۰ | ۴۸۵۱۶۰۵۸۲/۱- | ۳۴۰۰۱VLOC   | _at۱۵۶۰۸۲۳   |
| +            | ۰.۲۵۴۱۹۸۰۴/۰ | ۵۲۴۳۱۹۰۳۶/۱- | ۱CPXCR      | _a_at۱۵۶۰۴۹۴ |
| +            | ۰.۱۶۰۰۵۹۷/۰  | ۵۴۷۸۸۹۹۹۸/۱- | ۲۸۴۸۲۵LOC   | _at۲۴۱۷۶۴    |
| +            | ۰.۰۴۲۹۶۱۱/۰  | ۵۸۹۰۲۷۰۰۹/۱- | ۴B۲UGT      | _at۲۰۶۵۰۵    |
| +            | ۰.۵E-۳۰/۵    | ۵۹۵۷۷۹۶۲۳/۱- | DCC         | _at۲۳۸۹۱۴    |

\*تغییرات معنی دار است: +، \*تغییرات معنی دار نیست: -

## بحث

بعد از نزدیک به چهاردهه تحقیقات انجام شده روی تک یاخته کریپتوسپوریدیوم پارووم، ابعاد مختلفی از جمله جنبه های انگل شناسی، ایمنی شناسی، واکنش متقابل انگل با میزبان و درگیری های بالینی از آن شناخته شده است. اما هنوز در مورد جنبه های بسیاری از آن سوالات زیادی بدون جواب مانده است که لزوم مطالعات بیش تر را در زمینه انگل شناسی، فرایندهای بیولوژیکی انگل-میزبان، ژنتیک میزبان و ایمنولوژی بیماری پر رنگ تر می کند. در سال های اخیر، پیشرفت های حاصل در زمینه ژنومیکس، اپی ژنتیکس و ترانسکریپتومیکس باعث پدید آمدن تجزیه و تحلیل های جامع در مورد مکانیسم های مولکولی دخیل در پیشرفت بیماری های مختلف گردیده است. در کنار این پیشرفت های حاصله، تعداد زیادی پایگاه داده به وجود آمده اند که داده های زیستی متنوعی را در خود جای داده اند. اکثر این پایگاه های داده مثل GEO (Gene Expression Omnibus)، داده های خود را به صورت رایگان در اختیار محققین زیستی قرار می دهند. تعداد حجیمی از این داده ها می توانند توسط ابزارهای بیوانفورماتیکی و سایر تجزیه و تحلیلگرهای شبکه ای مورد پردازش قرار گرفته و مکانیسم های مولکولی و زیستی دخیل در پیشرفت بیماری های متعدد را بررسی کنند. علم و تکنولوژی میکروارای برای تجزیه و تحلیل و اندازه گیری تغییرات امیک از جمله ژنومیک، پروتئومیک و بیان ژن به صورت پربازده و گسترده مورد استفاده قرار می گیرد. داده های حاصل از میکروارای می توانند نتایج دقیقی را برای تجزیه و تحلیل های آزمایشگاهی در

اختیار محققین قرار دهد. علی رغم مزایای زیاد استفاده از این داده های پربازده به صورت انفرادی نقص هایی مانند آنالیز یا اعتباربخشی ناکافی، عدم کنترل کافی موارد مثبت کاذب وجود دارد (۶). هم چنین در صورت رعایت تمام این موارد نتیجه حاصل از یک جمعیت را نمی توان به جمعیت دیگری تعمیم داد. بنابراین ادغام داده ها به صورت سرتاسری و تهیه یک متا آنالیز از داده های موجود باعث بالاتر رفتن اعتبار و پایایی نتایج به دست آمده می شود. بنابراین داده های ژنومیکس، ترانسکریپتومیکس و پروتئومیکس می توانند با یکدیگر تلفیق شوند تا یک نتیجه معنی دار و مناسب از این داده ها به دست آید. در حال حاضر این توافق بوجود آمده است که یک فهم دقیق از سیستم های بیولوژیک فقط در صورتی حاصل می شود که لایه های امیک با یکدیگر ادغام گردند (۶). لذا شناخت و درک شبکه پیچیده دخیل در فرایند بیماری زایی این تک یاخته و مشخص نمودن مهم ترین عوامل دخیل در این فرایند امکان بالقوه ای برای طراحی روش های نوین تشخیصی، طراحی داروهای مناسب برای هدف قرار دادن مهم ترین فاکتورهایی که تک یاخته از آن ها به منظور تغییر فرایندهای سلولی و پیشبرد تولید و تکثیر خود بهره می برد و هم چنین طراحی واکنش مناسب را ایجاد می کند. در بررسی های انجام شده مشخص شد که بیان ژن های دخیل در آلودگی رده سلولی HCT-8 به وسیله کریپتوسپوریدیوم پارووم تحت تاثیر قرار می گیرد و به طبع آن برخی از ژن ها بیش از حد و برخی از ژن ها کم تر از حد بیان می شوند. در روند ایجاد بیماری افزایش و یا کاهش بیان ژن ها تحت تاثیر عفونت باعث ایجاد تغییر در فرایندهای بیولوژیکی سلول، ترکیبات سلولی و فعال شدن مسیرهای بیولوژیک سلولی می شود که

## منابع

- 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)
- 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.
- 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.
- Foot, S., Speed, T. and Handman, E., 1998. What can bioinformatics do for parasitology research? *Parasitology today*. 14(9): 346-347.
- 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 osteopontin: a novel mechanism for evasion of host defenses. *The Journal of infectious diseases*. 197(6): 916-923.
- 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.
- Hu, G., Feng, Y., O'Hara, S.P. and Chen, X.M., 2014. *Immunology of cryptosporidiosis*. *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer. 423-454.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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* Ild subtype. *Frontiers in Microbiology*. 9: 1409. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01409>.
- 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.
- Bahrani, T. and Maleki, B., 1393. Sequencing of the smallest eukaryotic genome. *Pajouha Journal*. 30(8):16-24. (In Persian)
- Eftekharianavi, 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)
- Salehzadeh S, Tabatabaei M, Derakhshandeh A, Karbalaee 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)

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 کریپتوسپوریوم پارووم 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 کریپتوسپوریوم پارووم 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 گلوبول‌های سفید ساکن طحال گردد (۸). هم‌چنین مطالعات نشان می‌دهند که این اگزوزوم‌ها حاوی پپتیدهای ضد میکروبی نظیر cathelicidin-37 و  $\beta$ -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 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 مطالعاتی که Pawlowic و همکاران انجام دادند، 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 کریپتوسپوریوزیس باشد (۱۳). با توجه به موارد مورد بحث، هر یک از ژن‌های دخیل در فرآیندهای بیولوژیکی سلول‌های روده که تحت تاثیر آلودگی با کریپتوسپوریوم پارووم 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.