



Transcriptomic Analysis of Molecular Features in *Canine parvoviral* Enteritis Based on Gene Expression Profiling

Nahid Askari¹ , Morteza Hadizadeh² , Dariush Vosough³ , Ali Shafieipour⁴

¹ Department of Biotechnology, Institute of Sciences and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

² Institute of Sciences and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

³ Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

⁴ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Received: 21 Apr 2026, Reciver in revised from: 15 Jun 2026, Accepted: 23 Jun 2026, Available online: 22 Sep 2026

[10.22059/jvr.2025.396797.3521](https://doi.org/10.22059/jvr.2025.396797.3521)

J Vet Res, Volume 81, Number 3, 2026, 201-212

Abstract

BACKGROUND: Chronic inflammatory enteropathy (CIE) in dogs refers to a disorder characterized by chronic intestinal inflammation. It can lead to symptoms such as persistent diarrhea, vomiting, weight loss, and anorexia. Various factors, including food allergies, infections, and immune disorders, typically cause the disease. Accurate diagnosis and appropriate treatment are essential for improving the quality of life and health of affected dogs.

OBJECTIVES: This research investigates the molecular mechanisms and gene expression patterns in CIE using bioinformatics methods and molecular experiments.

METHODS: Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) data from healthy dogs and dogs with CIE were processed and normalized using the Seurat package version 3. After identifying 20 distinct cell clusters, the expression of key genes associated with major signaling pathways was evaluated by RT-qPCR in 35 samples (25 diseased and 10 control).

RESULTS: Comparing gene expression between CIE (4 samples) and healthy samples (3 samples) yielded 385 differentially expressed genes (DEGs). KEGG pathway analysis revealed a key signaling pathway associated with Human T-cell Leukemia Virus type 1 (HTLV-1) infection, involving 217 genes. Among these, 15 genes were of particular importance in this study. These findings, confirmed by bioinformatic methods, provide deeper insight into genetic regulation in CIE and suggest mechanisms that affect cellular function. RT-qPCR results showed that *EGR2* was upregulated in diseased samples, while *CSF2* and *ETS2* were downregulated. *NFKBIA* also showed a significant decrease. Conversely, the overexpression of *SLC2A1* and *NFATC4* indicated their roles in glucose metabolism and immune regulation.

CONCLUSIONS: The present study revealed that dysregulation of signaling pathways associated with viral infection and the immune response, including the *cfa05166* and JAK-STAT pathways, plays a pivotal role in the pathogenesis of this enteropathy, which could pave the way for the development of diagnostic biomarkers and novel therapeutic approaches.

Keywords: Bioinformatics analysis, Biomarkers, Gene expression, Real-time RT-qPCR, Signaling pathway

Copyright © The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Nahid Askari, Tel/Fax: +9834-333776611/ +9834-33776617



How to cite this article:

Askari N, Hadizadeh M, Vosough D, Shafieipour A. Transcriptomic analysis of molecular features in *Canine parvoviral* enteritis based on gene expression profiling. Journal of Veterinary Research. 2026;81(3):201-212 (In Persian). doi: 10.22059/jvr.2025.396797.3521

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The list of primers used in this study.

Table 2. List of target genes and their full names.

Figure 1. Validation of various gene expressions using real-time RT-PCR. The relative mRNA levels of the *EGR2*, *CSF2*, *SLC2A1*, *FOS*, *ETS2*, *ICAM1*, *NFATC4*, *NFKBIA*, *CDC20*, and *CCND1* genes were assessed.



بررسی ترانسکریپتومی ویژگی‌های مولکولی انتریت پاروویروسی در سگ برپایه پروفایل بیان ژنی

ناهید عسکری^۱، مرتضی هادی‌زاده^۲، داریوش وثوق^۳، علی شفیعی‌پور^۴

^۱ گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری‌های پیشرفته، کرمان، ایران

^۲ پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری‌های پیشرفته، کرمان، ایران

^۳ گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

^۴ دانش آموخته، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۱ اردیبهشت ۱۴۰۵، تاریخ بازنگری: ۲۵ خرداد ۱۴۰۵، تاریخ پذیرش: ۲ تیر ۱۴۰۵، تاریخ انتشار: ۳۱ شهریور ۱۴۰۵

doi: [10.22059/jvr.2025.396797.3521](https://doi.org/10.22059/jvr.2025.396797.3521)

دوره ۸۱، شماره ۳، ۱۴۰۵، ۲۰۱-۲۱۲

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری انتروپاتی التهابی مزمن (Chronic Inflammatory Enteropathy) یا CIE در سگ‌ها به اختلالی اشاره دارد که با التهاب مزمن در روده‌ها همراه است و می‌تواند به علائمی مانند اسهال مداوم، استفراغ، کاهش وزن و بی‌اشتهایی منجر شود. این بیماری معمولاً به‌علت عوامل مختلفی، از جمله حساسیت‌های غذایی، عفونت‌ها و اختلالات ایمنی ایجاد می‌شود و تشخیص و درمان مناسب آن برای بهبود کیفیت زندگی و سلامت سگ‌ها ضروری است. **هدف:** مطالعه حاضر به بررسی مکانیسم‌های مولکولی و الگوهای بیان ژن در بیماری CIE با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و آزمایش‌های مولکولی می‌پردازد.

روش کار: در مطالعه حاضر، داده‌های توالی‌یابی RNA تک‌سلولی (scRNA-seq) مربوط به نمونه‌های سگ‌های سالم و مبتلا به انتروپاتی التهابی مزمن (CIE) با استفاده از پکیج Seurat نسخه ۳ پردازش و نرمال‌سازی شدند و پس از شناسایی ۲۰ خوشه سلولی مجزا، بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با مسیرهای سیگنالینگ اصلی با روش RT-qPCR در ۳۵ نمونه (۲۵ نمونه بیمار و ۱۰ نمونه کنترل) مورد ارزیابی قرار گرفت. **نتایج:** نتایج آنالیز بیوانفورماتیک ۳۸۵ ژن با بیان تفاوت‌دار معنی‌دار ($P < 0.05$) را شناسایی کرد که غنی‌سازی Pathway آن‌ها مسیر سیگنالینگ عفونت ویروس لوسمی سلول T انسانی (cfa05166) را نشان داد و validation با RT-qPCR تغییرات معنی‌دار ژن‌های کلیدی این مسیر، از جمله افزایش پنج برابری EGR2 ($P < 0.01$) و کاهش ۳/۳ برابری NFKBIA ($P < 0.05$) را تأیید کرد که نقش آن‌ها متابولیسم گلوکز و تنظیم ایمنی بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** مطالعه حاضر نشان داد اختلال در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با عفونت ویروسی و پاسخ ایمنی، از جمله مسیر cfa05166 و JAK-STAT نقش محوری در پاتوژنز بیماری ایفا می‌کند که می‌تواند زمینه‌ساز توسعه بیومارکرهای تشخیصی و رویکردهای درمانی نوین برای این بیماری باشد.

کلمات کلیدی: آنالیز بیوانفورماتیک، بیان ژن، بیومارکر، مسیر سیگنالینگ، Real-time RT-qPCR

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

کپی‌رایت © نویسندگان.



نویسنده مسئول: ناهید عسکری، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری‌های پیشرفته، کرمان، ایران

مقدمه

بیماری مزمن التهابی روده (Chronic Inflammatory Enteropathy) در سگ‌ها یک وضعیت پیچیده و چندعاملی است که با التهاب مداوم دستگاه گوارش مشخص می‌شود و به علائمی، مانند استفراغ مزمن، اسهال، کاهش وزن و تغییرات اشتها منجر می‌گردد. این بیماری به دلیل پاسخ غیرطبیعی سیستم ایمنی به ترکیبات روده (مانند مواد غذایی و باکتری‌های فلور نرمال) ایجاد شده و تشخیص آن مبتنی بر رد سایر بیماری‌ها و نمونه‌برداری از روده است. درمان معمولاً شامل تغییرات غذایی (مانند رژیم‌های حذفی یا هیدرولیزه) و داروهای سرکوب‌کننده ایمنی است (۱). با وجود اهمیت بالینی آن، علل دقیق CIE هنوز به خوبی مشخص نشده‌است؛ زیرا تحت تأثیر ترکیبی از اختلالات ایمنی، عوامل غذایی، عدم تعادل در میکروبیوم روده و استعداد ژنتیکی قرار دارد (۲، ۳)، این پیچیدگی، تشخیص و مدیریت را

برای دامپزشکان چالش برانگیز می‌کند، درحالی‌که مطالعات برخی جنبه‌های CIE را روشن کرده است، مکانیسم‌های مولکولی و مسیرهای خاصی که باعث پیشرفت بیماری می‌شوند، هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است و درک پاتوژنز آن به‌طور دقیق مشخص نیست (۴، ۵).

در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های علم بیوانفورماتیک و زیست‌شناسی مولکولی راه‌های جدیدی برای بررسی بیماری‌هایی، مانند CIE گشوده است. به‌عنوان مثال، فناوری توالی‌یابی RNA تک‌سلولی (scRNA-seq) توانایی ما را در مطالعه ناهمگونی سلولی در بافت‌ها و اینکه هر بافت شامل جمعیت‌های سلولی متفاوت می‌باشد متحول کرده و بینش‌های جدیدی در مورد نقش سلول‌ها در فرایندهای بیماری ارائه می‌دهد (۶). با تحلیل بیان ژن در سطح تک‌سلولی، محققین می‌توانند ژن‌های متفاوت بیان‌شده (differentially expressed genes) و مسیرهای مولکولی‌ای که ممکن است برای توسعه و پیشرفت شرایط التهابی حیاتی باشند، شناسایی کنند (۷). این رویکرد در بررسی بیماری‌های مزمن انسانی، به‌ویژه ارزشمند بوده و برای کشف تنظیم‌کننده‌های کلیدی التهاب و مسیرهای مرتبط با ایمنی استفاده شده است (۸). با این حال، در زمینه CIE در سگ‌ها، کاربرد چنین تکنیک‌های پیشرفته‌ای هنوز محدود است و نیاز به مطالعات بیشتری برای پر کردن این شکاف وجود دارد (۹).

یکی از زمینه‌های پژوهشی جالب توجه، بررسی ارتباط میان عفونت‌های ویروسی و بروز بیماری‌های التهابی مزمن است. برای نمونه، پاروویروس سگ‌ها که یک عفونت به‌شدت مسری و اغلب خطرناک محسوب می‌شود، عمدتاً به‌عنوان عاملی برای آسیب‌های حاد گوارشی شناخته شده است. با این حال اگرچه عفونت‌های ناشی از این ویروس معمولاً حالت حاد دارند، شواهد فزاینده‌ای نشان می‌دهند این ویروس‌ها قادر به ایجاد اختلالات ایمنی پایدار می‌باشند و می‌توانند در پیدایش بیماری‌های مزمنی، مانند «انتروپاتی التهابی مزمن» نقش داشته باشند (۱۰). اگرچه شواهد مستقیمی درباره ارتباط پاروویروس با انتروپاتی التهابی مزمن (CIE) هنوز در دسترس نیست، این احتمال وجود دارد که عفونت‌های ویروسی در شروع یا تشدید التهاب مزمن نقش داشته باشند که بررسی این موضوع نیازمند مطالعات بیشتر است. درک چنین ارتباطاتی می‌تواند بینش‌های حیاتی در مورد علت‌شناسی بیماری CIE ارائه دهد و مبنای علمی برای توسعه راهبردهای درمانی مؤثرتر فراهم کند (۱۱).

مطالعه حاضر به بررسی مسیرهای مولکولی درگیر در CIE می‌پردازد و تمرکز خاصی بر روی مسیر KEGG مرتبط با عفونت ویروس لوسمی سلول T۱ (cfa05166) دارد. مطالعه حاضر با استفاده از تلفیق آنالیزهای بیوانفورماتیک و آزمایش‌های مولکولی نشان می‌دهد مسیر cfa05166 (عفونت ویروس لوسمی سلول T انسانی) به‌طور معنی‌داری در پاتوژنز انتروپاتی التهابی مزمن (CIE) نقش دارد. این مسیر از طریق تنظیم ۱۵ ژن کلیدی، از جمله *EGR2*، *NFKBIA* و *SLC2A1* که در پاسخ ایمنی و التهاب دخیل می‌باشند، موجب اختلال در عملکرد سد روده‌ای و تشدید پاسخ التهابی می‌شود. شناسایی این مکانیسم‌ها می‌تواند زمینه‌ساز توسعه روش‌های تشخیصی غیرتهاجمی و درمان‌های هدفمند مبتنی بر مهار مسیرهای سیگنالینگ مرتبط باشد. مطالعه حاضر با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک و داده‌های scRNA-seq، به شناسایی و تحلیل ژن‌های معنی‌دار DEGs در این مسیر خواهد پرداخت، از جمله کاندیداهای قابل توجهی مانند نوراپیلین - ۱ (NRP1)، ژن‌های پاسخ رشد زود هنگام *EGR1* و *EGR2* و فاکتور هسته‌ای سلول‌های T فعال (*NFATC4*) (۱۲).

این ژن‌ها که به‌خاطر نقش خود در تنظیم ایمنی و التهاب شناخته می‌شوند، اهداف امیدوارکننده‌ای برای درک مکانیسم‌های دقیق بیماری انتروپاتی التهابی مزمن (CIE) به‌شمار می‌آیند. مطالعه حاضر بیومارکرهای بالقوه‌ای شامل نوراپیلین - ۱ (NRP1)، ژن‌های پاسخ رشد زود هنگام *EGR1* و *EGR2* و فاکتور هسته‌ای سلول‌های T فعال (*NFATC4*) را شناسایی کرده است. انتخاب این فاکتورها براساس مشارکت آن‌ها در مسیرهای سیگنالینگ التهاب و پاسخ ایمنی، نقش آن‌ها در تنظیم فرایندهای سلولی کلیدی، مانند تکثیر و تمایز، پتانسیل بالای هدف درمانی به‌دلیل قابلیت مهار دارویی و همچنین بیان تفاوت معنی‌دار در نمونه‌های بیماران صورت گرفته است. بررسی هم‌زمان این نشانگرها می‌تواند باعث درک بهتر پاتوژنز بیماری و توسعه راهبردهای درمانی نوین شود.

هدف اصلی مطالعه حاضر، کشف مسیرهای سیگنالینگ سلولی و پاسخ‌های ایمنی مختل‌شده در سگ‌های مبتلا به CIE از طریق تلفیق یافته‌های زیست‌شناسی مولکولی و مشاهدات بالینی است. مطالعه حاضر به دنبال تعمیق درک مکانیسم‌های بیماری، شناسایی اهداف درمانی جدید و ارتقای دقت تشخیص و پیش‌آگهی در حیوانات بیمار می‌باشد. دستاوردهای مطالعه حاضر نه‌تنها گزینه‌های درمانی را برای سگ‌های مبتلا بهبود می‌بخشد، بلکه به حوزه‌های گسترده‌تری از دامپزشکی مقایسه‌ای و مطالعه بیماری‌های التهابی کمک خواهد کرد (۱۳، ۱۴).

مواد و روش کار

آنالیز تک سلولی (شناسایی ژن‌های متفاوت بیان شده (DEGs) از تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-Seq تک سلولی): مطالعه حاضر شامل تجزیه و تحلیل یک مجموعه داده از CIE بود که از پایگاه داده GEO-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) به دست آمده است. آنالیزها با استفاده از کلیدواژه‌های تخصصی در پایگاه‌های GEO و KEGG انجام شد که به شناسایی ۳۸۵ ژن معنی‌دار منجر گردید. در ادامه اهداف نهایی مطالعه براساس هم‌گرایی یافته‌های بیوانفورماتیک و تأیید تجربی تعیین شدند. این مجموعه داده، شامل ۳ نمونه از حیوانات سالم و ۴ نمونه از سگ‌های مبتلا به CIE بود. به‌منظور تضمین صحت داده‌ها، ارزیابی کیفیت دقیق و پیش‌پردازش با استفاده از بسته Seurat نسخه ۳ در زبان برنامه‌نویسی R انجام شد. با اعمال معیارهای کنترل کیفیت، سلول‌های با کیفیت پایین فیلتر شدند و تحلیل‌های بعدی بر روی ۷ نمونه (۳ سالم و ۴ مبتلا به CIE) انجام پذیرفت. نمونه‌ها با استفاده از روش مبتنی بر FindAnchor در بسته Seurat ادغام شدند و سلول‌های اصلی با فیلتر کردن داده‌های توألی‌یابی RNA تک سلولی (scRNA-seq) شناسایی شدند. سلول‌هایی که معیارهای کیفیت را نداشتند از تجزیه و تحلیل بیشتر حذف شدند. داده‌های بیان ژن از سلول‌های اصلی با استفاده از یک مدل رگرسیون خطی نرمال‌سازی شدند. از این مجموعه داده نرمال‌شده، ۲۰۰۰ ژن با تنوع بالا با استفاده از تابع `FindVariableFeatures` شناسایی شدند. این ژن‌ها سپس با استفاده از مؤلفه‌های اصلی `Principal Component Analysis (PCA)` تجزیه و تحلیل شدند تا ماتریس داده‌های با ابعاد بالا به یک فرمت با ابعاد پایین‌تر و قابل مدیریت‌تر کاهش یابند. ۲۰ مؤلفه اصلی اول برای تحلیل‌های بعدی حفظ شدند، تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA) بر روی داده‌های بیان نرمال‌شده ۲۰۰۰ ژن با تنوع بالا انجام شد. براساس روش `ElbowPlot`، بیست مؤلفه اول که حاوی بیشترین واریانس بیولوژیکی بودند برای تحلیل‌های بعدی، از جمله خوشه‌بندی سلولی و ترسیم UMAP انتخاب شدند. همان‌طور که با روش `ElbowPlot` تعیین شد، خوشه‌بندی در یک وضوح ۰/۴ انجام شد تا سلول‌هایی با پروفایل‌های بیان مشابه گروه‌بندی شوند.

برای خوشه‌بندی بیشتر از `Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP)` براساس ۲۰ مؤلفه اصلی استفاده شد. این کار امکان نمایش واضح و قابل تفسیر داده‌ها را در دو بعد فراهم کرد. روش UMAP با قرار دادن سلول‌های دارای پروفایل بیان مشابه در خوشه‌های مجاور و نمایش تفاوت‌های بین گروه‌های آزمایشی (سالم در مقابل CIE) به صورت تجمع‌های جداگانه، این امکان را برای محقق فراهم می‌کند تا بتواند الگوهای بیولوژیکی را به صورت بصری شناسایی و تفسیر کند. برای شناسایی DEGs بین نمونه‌های CIE و سالم، از تابع `FindMarkers` در Seurat استفاده شد. ژن‌هایی که تغییر $\text{adjusted } P \text{ value} < 0/05$ و $|\log FC| \geq 1$ طبق آزمون ویلکاکسون، به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شدند. این رویکرد چارچوبی قوی برای کشف تفاوت‌های مولکولی کلیدی بین نمونه‌های سالم و مبتلا به CIE ارائه داد و بینش‌هایی درمورد مکانیسم‌های دخیل در بیماری ارائه کرد.

تحلیل غنی‌سازی مسیر KEGG: برای درک بهتر مسیرهای بیولوژیکی درگیر در CIE، یک تحلیل غنی‌سازی KEGG بر روی ژن‌های معنی‌دار بیان‌شده در مطالعه حاضر انجام شد. این تحلیل با استفاده از ابزار `Functional Annotation` در پلتفرم DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) که یک منبع رایج برای آنالیز عملکردی و مسیرها است، انجام شد. برای اطمینان از قابلیت اطمینان نتایج، نرخ کشف کاذب `False Discovery Rate (FDR)` زیر ۰/۰۵ در نظر گرفته شد که یک رویکرد استاندارد برای در نظر گرفتن مقایسه‌های متعدد و کاهش خطای مثبت‌های کاذب است. این مرحله به شناسایی مرتبط‌ترین مسیرهای مرتبط با CIE کمک کرد و بینش‌های ارزشمندی درمورد مکانیسم‌های مولکولی بیماری فراهم آورد.

آزمایشات *In vivo*: در مطالعه مربوط به CIE در سگ‌ها، مجموعاً ۳۵ نمونه جمع‌آوری شد که شامل ۲۵ سگ مبتلا به CIE و ۱۰ سگ کنترل سالم بود. بعد از دریافت تأییدیه اخلاقی، رضایت آگاهانه از صاحبان حیوانات برای جمع‌آوری نمونه‌ها از حیوانات مبتلا انجام شد و نمونه‌های بافتی، بیوپسی‌های روده، از سگ‌های مورد مطالعه جمع‌آوری شد. سگ‌های مبتلا به CIE با استفاده از آزمایش رپید کیت CPV و معاینات بالینی تأیید شدند، درحالی‌که نمونه‌های سالم براساس عدم سابقه بیماری گوارشی و نتایج منفی آزمایش‌های ویروسی انتخاب گردیدند. نمونه‌های سواب روده با روش‌های استریل جمع‌آوری شدند. برای استخراج RNA از نمونه‌های سواب گرفته‌شده از ناحیه مقعد، از کیت‌های استخراج RNA مبتنی بر ستون (کیت Sinaclon، ایران یا روش‌های فاز مایع (TRIzol)) استفاده شد. به‌منظور استخراج RNA از نمونه‌های سواب مقعد با غلظت کم، از روش فاز مایع (TRIzol) استفاده شد تا با بهره‌گیری از بازدهی بالای این روش

در استخراج از حجم‌های پایین نمونه، حداکثر مقدار RNA حاصل گردد. نمونه‌ها در یک بافر لیز سلولی قرار گرفتند و به‌طور کامل ورتکس شدند تا اطمینان حاصل شود که لیز سلولی به‌طور کامل انجام شده است. در روش مبتنی بر ستون، پس از سانتریفیوژ، مایع فوقانی به ستون منتقل و مراحل شست‌وشو طبق پروتکل کیت انجام شد. RNA نهایی با استفاده از آب RNase-free جدا شد. در روش TRIzol، پس از افزودن کلروفرم و سانتریفیوژ، فاز آبی حاوی RNA جدا و RNA با استفاده از ایزوپروپانول رسوب داده شد. پس از رسوبدهی RNA، پلت حاصل با اتانول ۷۰ درصد شست‌وشو و در آب عاری از RNase حل گردید. خلوص و غلظت RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر NanoDrop (مدل Nano Mahan، ایران) اندازه‌گیری شد و نمونه‌ها با نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر در محدوده ۱/۸ تا ۲/۱ مورد تأیید قرار گرفتند. یکپارچگی RNA نیز با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد و مشاهده نوارهای واضح S۲۸ و S۱۸ بدون حضور آلودگی تأیید گردید. برای انجام واکنش‌های دقیق ریل - تایم PCR، از RNA با غلظت نهایی ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر استفاده شد که براساس پروتکل‌های استاندارد بهینه‌سازی شده است. RNA استخراج‌شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا از تخریب آن جلوگیری شود. سپس DNA مکمل (cDNA) از RNA استخراج‌شده با استفاده از کیت ترانسکریپشن معکوس (پارس توس، ایران) سنتز شد. پرایمرهای مربوط به ژن‌های هدف مرتبط با CIE توسط شرکت پیشگام ایران سنتز شدند (جدول ۱) و بر روی مسیرهای کلیدی التهابی و تنظیمی تمرکز داشتند. پرایمرها پس از طراحی و ارزیابی پارامترهای ضروری (مانند ویژگی، کارایی، دمای ذوب و عدم تشکیل ساختار ثانویه) با نرم‌افزار GeneRunner (Hastings Software, Inc., USA)، بررسی شدند و سپس سطح بیان ژن‌های هدف در نمونه‌های گروه‌های CIE و کنترل با روش Real-time PCR با استفاده از کیت SYBR Green (سیناکلون، ایران) در دستگاه ABI (Applied Biosystems, USA)، مورد سنجش قرار گرفت.

برای تحلیل داده‌ها، روش $\Delta\Delta Ct$ برای ارزیابی سطوح بیان نسبی ژن‌ها به کار رفت. این روش شامل مقایسه مقادیر Ct (آستانه چرخه) ژن‌های هدف در نمونه‌های CIE با نمونه‌های کنترل بود که به یک ژن خانه‌داری بتا‌اکتین نرمال‌سازی شد. این رویکرد به شناسایی بیومارکرهای بالقوه CIE کمک کرده و بررسی ارزشمندی درمورد پاتوفیزیولوژی این بیماری در سگ‌ها ارائه داد.

جدول ۱. لیست پرایمرهای استفاده‌شده در مطالعه حاضر.

نام ژن	توالی پرایمر	دمای آنیلینگ (درجه سانتی‌گراد)	طول قطعه (جفت‌باز)
<i>EGR2</i> (Early Growth Response2)	Forward:5'-TGCTGCTGCTGCTGCTGTT-3' Reverse:5'-CCTCCTCCTCCTCCTCCTC-3'	۵۸	۹۵
<i>CSF2</i> (Colony Stimulating Factor2)	Forward:5'-AGCTGCTGCTGCTGCTGAT-3' Reverse:5'-GCTGCTGCTGCTGCTGCTA-3'	۵۷	۱۰۸
<i>SLC2A1</i> (Solute Carrier Family2 Member1)	Forward:5'-CTGCTGCTGCTGCTGCTGT-3' Reverse:5'-GCTGCTGCTGCTGCTGCTC-3'	۵۹	۱۱۲
<i>FOS</i> (Fos Proto-Oncogene)	Forward:5'-AGGACCAGGAGGACGAGAA-3' Reverse:5'-CAGGAGGAGGAGGACAGTGA-3'	۵۸	۸۹
<i>ETS2</i> (ETS Proto-Oncogene2)	Forward:5'-TGCTGCTGCTGCTGCTGTT-3' Reverse:5'-CCTCCTCCTCCTCCTCCTC-3'	۵۸	۱۰۲
<i>ICAM1</i> (Intercellular Adhesion Molecule1)	Forward:5'-AGGACCAGGAGGAGGAGAGAA-3' Reverse:5'-CAGGAGGAGGAGGACAGTGA-3'	۶۰	۱۲۱
<i>NFATC4</i> (Nuclear Factor of Activated T Cells4)	Forward:5'-CTGCTGCTGCTGCTGCTAT-3' Reverse:5'-GCTGCTGCTGCTGCTGCTA-3'	۵۹	۹۵
<i>NFKBIA</i> (NFKB Inhibitor Alpha)	Forward:5'-CTGCTGCTGCTGCTGCTGT-3' Reverse:5'-GCTGCTGCTGCTGCTGCTC-3'	۵۸	۱۰۸
<i>CDC20</i> (Cell Division Cycle20)	Forward:5'-AGGACCAGGAGGAGGAGAGAA-3' Reverse:5'-CAGGAGGAGGAGGACAGTGA-3'	۶۰	۱۱۸
<i>CCND1</i> (Cyclin D1)	Forward:5'-TGCTGCTGCTGCTGCTGTT-3' Reverse:5'-CCTCCTCCTCCTCCTCCTC-3'	۵۷	۱۳۴
<i>Beta-Actin</i>	Forward Primer:5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3' Reverse Primer:5'-GAGGACCTCTCTTCCAGCCT-3'	۵۷	۱۴۶

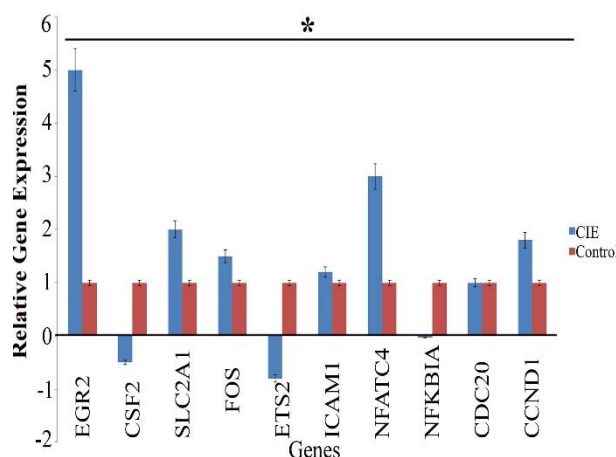
نتایج

آنالیز بیوانفورماتیک: مجموعه داده GSE254005 از پایگاه GEO به دست آمد و به عنوان پایه‌ای برای تحلیل استفاده شد. پس از نرمال‌سازی داده‌ها، جمعیت‌های سلولی با استفاده از بسته Seurat طبقه‌بندی شدند. نتایج نشان داد سلول‌ها می‌توانند به ۲۰ خوشه متمایز گروه‌بندی شوند. برای بررسی تفاوت‌ها بین نمونه‌های CIE و کنترل، ژن‌های معنی‌دار با استفاده از تابع FindMarkers به دست آمدند. در مجموع ۳۸۵ ژن معنی‌دار شناسایی شد که در مقایسه نمونه‌های CIE (n=4) با کنترل‌های سالم (n=3) به دست آمد.

مطالعات بیشتر درمورد آنالیزهای ژن‌های معنی‌دار از طریق تحلیل غنی‌سازی مسیر KEGG انجام شد. این تحلیل یک مسیر سیگنال‌دهی مرتبط با ویروس لوسمی سلول T انسانی نوع ۱ (cfa05166) یا HTLV-1 را مشخص کرد که شامل ۲۱۷ ژن است. از میان این‌ها، ۱۵ ژن به‌طور معنی‌داری در زمینه مطالعه حاضر مرتبط شناخته شدند که در **جدول ۲** خلاصه شده است. این یافته‌ها بینش ارزشمندی درمورد مکانیسم‌های مولکولی زیرین CIE ارائه می‌دهند و مسیرهای بالقوه‌ای را پیشنهاد می‌کنند که ممکن است به توسعه و پیشرفت بیماری کمک کنند.

جدول ۲. فهرست ژن‌های مطالعه حاضر که در مسیر HTLV-1 قرار دارند.

ردیف	نماد	نام کامل
۱	<i>NRP1</i>	neuropilin 1
۲	<i>EGR1</i>	early growth response 1
۳	<i>EGR2</i>	early growth response 2
۴	<i>CSF2</i>	colony stimulating factor 2
۵	<i>SLC2A1</i>	solute carrier family 2 member 1
۶	<i>FOS</i>	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
۷	<i>ETS2</i>	ETS proto-oncogene 2, transcription factor
۸	<i>ICAM1</i>	intercellular adhesion molecule 1
۹	<i>NFATC4</i>	nuclear factor of activated T cells 4
۱۰	<i>NFKBIA</i>	NFKB inhibitor alpha
۱۱	<i>CDC20</i>	cell division cycle 20
۱۲	<i>CD4</i>	cell division cycle 20
۱۳	<i>CCND1</i>	cyclin D1
۱۴	<i>ESPL1</i>	extra spindle pole bodies like 1, separase
۱۵	<i>CREB3L3</i>	cAMP responsive element binding protein 3 like 3
۱۶	<i>TSPO</i>	translocator protein



تصویر ۱. تأیید بیان ژن‌های مختلف با استفاده از RT-PCR. سطوح نسبی mRNA ژن‌های *ICAM1*, *ETS2*, *FOS*, *SLC2A1*, *CSF2*, *EGR2*، *CCND1* و *CDC20* مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج Real-Time PCR: براساس نتایج حاصل از Real-Time PCR، بیان ژن در نمونه‌های بیمار نسبت به کنترل برای ژن *EGR2* در گروه CIE به میزان ۵ برابر کاهش معنی‌دار نشان داد ($P < 0.01$)، درحالی‌که ژن‌های *SLC2A1* و *NFATC4* به‌ترتیب با ۲ و ۳ برابر افزایش معنی‌دار همراه بودند ($P < 0.05$). ژن *CSF2* به میزان ۰/۵ برابر ($P < 0.05$) و *ETS2* به میزان ۰/۸ برابر کاهش معنی‌دار ($P < 0.01$) و ژن‌های *FOS* ۱/۵ برابر ($P < 0.05$) و *ICAM1* به میزان ۱/۲ افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) نشان دادند. از نظر آماری، هیچ تغییر معنی‌داری در بیان دو ژن *NFBIA* و *CDC20* مشاهده نشد. سطح بیان ژن *NFBIA* ۰/۹۷ برابر کنترل و بیان ژن *CDC20* نیز بدون تغییر معنی‌دار بود، اما ژن *CCND1*، به میزان ۱/۸ برابر افزایش بیان داشت (تصویر ۱).

بحث

از جمله ژن‌های قابل توجه می‌توان به *NRP1* (نوراپیلین ۱) اشاره کرد که در تنظیمات عصبی و ایمنی نقش دارد. همچنین *EGR1* و *EGR2* (پاسخ اولیه رشد ۱ و ۲) که فاکتورهای رونویسی حیاتی برای پاسخ‌های سلولی می‌باشند و *CSF2* (فاکتور تحریک‌کننده کلونی ۲) که برای هماتوپوئز و توسعه سلول‌های ایمنی ضروری است. سایر ژن‌های مهم شامل این موارد می‌باشند: *SLC2A1* (عضو خانواده حامل ۲، عضو ۱) که یک ناقل گلوکز است؛ *FOS* که بخشی از کمپلکس فاکتور رونویسی *AP-1* است و *ETS2* و *ICAM1* که برای سیگنال‌دهی سلولی و پاسخ‌های ایمنی حیاتی می‌باشند. همچنین *NFATC4* و *NFKBIA* نقش‌های محوری در تنظیم فرایندهای التهابی ایفا می‌کنند. درحالی‌که *CDC20*، *CCND1* (سیکلین D1) و *ESPL1* (پول‌های اضافی مانند ۱، جداکننده) در تنظیم چرخه سلولی دخیل می‌باشند. درنهایت، *CREB3L3* (پروتئین باندکننده عنصر پاسخ‌دهنده به cAMP مشابه ۳) و *TSPO* (پروتئین ترانسلوکاتور) به پاسخ‌های استرسی، تکثیر سلولی و آپوپتوز کمک می‌کنند و عملکردهای متنوع این ژن‌ها را بیشتر نشان می‌دهند. یافته‌ها نشان‌دهنده تغییرات قابل توجهی در بیان ژن نسبت به β -actin بودند. به‌عنوان مثال، *EGR2* به‌طور قابل توجهی افزایش بیان (۵ برابر) داشت که با نقش شناخته‌شده‌اش در تمایز و تکثیر سلولی همخوانی دارد. در مقابل، *CSF2* و *ETS2* کاهش بیان را نشان دادند که با نقش‌های آن‌ها در پاسخ‌های التهابی سازگار است. کاهش چشمگیر *NFKBIA* نشان‌دهنده افزایش سیگنال‌دهی NF- κ B است که معمولاً با پاتولوژی‌های التهابی مرتبط است. افزایش بیان *SLC2A1* و *NFATC4* نیز نقش‌های آن‌ها را در متابولیسم گلوکز و تنظیم ایمنی تأیید می‌کند. افزایش جزئی *FOS* و *ICAM1* نشان‌دهنده پاسخ‌های تطبیقی سلولی است. درحالی‌که *CDC20* پایدار ماند. ازسوی دیگر، افزایش بیان *CCND1* نیز با نقش آن در تنظیم چرخه سلولی، به‌ویژه در شرایط تکثیر همخوانی دارد. در مطالعه حاضر، با بهره‌گیری از تحلیل‌های توالی‌یابی RNA تک‌سلولی (scRNA-seq) بر روی داده‌های بارگذاری‌شده در پایگاه داده GEO، ژن‌های دارای بیان افتراقی در سگ‌های مبتلا به بیماری التهابی روده (CIE) شناسایی شدند. با استفاده از بسته نرم‌افزاری Seurat برای ادغام داده‌ها، نرمال‌سازی و کاهش ابعاد، مطالعه حاضر کیفیت بالای داده‌ها را تضمین کرده و به بررسی دقیق چشم‌انداز سلولی مرتبط با CIE پرداخته است. ژن‌های کلیدی مانند *NRP1*، *EGR1*، *EGR2* و *NFATC4* شناسایی شدند که به‌ویژه در زمینه مسیر عفونت و پروس لوسمی T انسانی ۱ (cfa05166) اهمیت دارند. این مسیر که شامل ۲۱۷ ژن است، پیچیدگی پاسخ‌های ایمنی و فرآیندهای التهابی را نشان می‌دهد. از میان این ژن‌ها، ۱۵ ژن به‌عنوان ژن‌های مهم شناسایی شدند که نشان‌دهنده نقش بالقوه آن‌ها در پاتوژنز CIE است.

مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعات پیشین نشان داد الگوی بیان ژن‌های التهابی و ایمونولوژیک در سگ‌های مبتلا به CIE از تشابه قابل توجهی با مکانیسم‌های گزارش‌شده در بیماری‌های آلرژیک و التهابی برخوردار است. در ادامه به مهم‌ترین جنبه‌های این مقایسه اشاره می‌شود: یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ اینترفرون - گاما (مانند *CXCL9*، *CXCL10* و *STAT1*) به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. این الگو مشابه یافته‌های مطالعات در بیماران مبتلا به بیماری‌های التهابی روده (IBD) و آلرژی‌های غذایی است (۱۳).

این یافته‌ها به‌ویژه در مورد عفونت پاروویروس، که یک پاتوژن شایع ویروسی در سگ‌ها است و آسیب شدیدی به دستگاه گوارش وارد می‌کند، معنی‌دار می‌باشند. پاروویروس با تحریک پاسخ‌های ایمنی و التهابی شدید، احتمالاً از طریق مسیرهای مولکولی مشترک با CIE، به آسیب بافتی منجر می‌شود (۱۵). برای نمونه، مطالعه Sampath و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان داد که فعال‌شدن مسیرهای وابسته به اینترفرون-گاما در بیماران مبتلا به آلرژی غذایی نیز در ایجاد التهاب موضعی و سیستمیک نقش کلیدی دارد. این اشتراک در مکانیسم‌های التهابی می‌تواند دلیل بروز علائم مشابه در این دو بیماری باشد (۱۰).

مطالعه حاضر نشان داد کاهش بیان ژن *NRP1* ممکن است به اختلال در عملکرد لنفوسیت‌ها و افزایش التهاب منجر شود. این یافته با مطالعات قبلی محققین همسو است که نشان دادند عفونت‌های قارچی و باکتریایی در سگ‌ها می‌تواند با ایجاد اختلال در عملکرد لنفوسیت‌ها و کاهش بیان ژن‌های تنظیم‌کننده تحمل ایمنی، به افزایش حساسیت به آلرژی‌های غذایی و محیطی منجر شوند (۱۶). همچنین، مطالعه Tang و Loh در سال ۲۰۱۸ به نقش محور روده در ایجاد آلرژی‌های غذایی اشاره کرده و نشان داد اختلال در عملکرد لایه موکوس روده می‌تواند به حساسیت غذایی از طریق مسیرهای التهابی منجر شود (۱۷).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد عوامل محیطی می‌توانند از طریق تغییرات اپی‌ژنتیک بر بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی تأثیر بگذارند. این نتایج با مطالعه Sampath و همکاران در سال ۲۰۲۱ همخوانی دارد که گزارش کردند تغییرات اپی‌ژنتیک ناشی از عوامل محیطی (مانند رژیم غذایی، آلاینده‌ها و میکروبیوم روده) می‌تواند به افزایش میزان شیوع آلرژی‌های غذایی منجر شود (۱۰). همچنین، مطالعه Abrams و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان داد تغییرات اپی‌ژنتیک در ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی می‌تواند زمینه‌ساز توسعه بیماری‌های آلرژیک باشد (۱۸).

مطالعه حاضر نشان داد تغییرات در میکروبیوم روده می‌تواند بر بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ ایمنی تأثیر بگذارد. این یافته با مطالعه Brough و همکاران در سال ۲۰۲۰ همسو است که گزارش کردند تغییرات در ترکیب میکروبیوم روده می‌تواند به اختلال در تحمل ایمونولوژیک و افزایش خطر ابتلا به آلرژی‌های غذایی منجر شود (۱۹). همچنین مطالعه Perkin و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داد تغییرات میکروبیوم روده ناشی از مصرف پروبیوتیک‌ها می‌تواند به پیشگیری از آلرژی‌های غذایی کمک کند (۲۰).

یافته‌های مطالعه حاضر می‌تواند در بررسی دقیق پیشگیری و درمان بیماری‌های التهابی و آلرژیک نقش مهمی داشته باشد. به عنوان مثال، شناسایی ژن‌های کلیدی درگیر در پاتوژن بیماری می‌تواند به توسعه راهکارهای درمانی هدفمند (مانند ایمونوتراپی) منجر شود. این نتایج با مطالعه Santos و همکاران در سال ۲۰۲۳ همسو است که نشان دادند ایمونوتراپی مبتنی بر آنالیز ژن‌های خاص می‌تواند به تحمل ایمونولوژیک در بیماران مبتلا به آلرژی‌های غذایی کمک کند (۲۱). همچنین مطالعه Du Toit و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داد مداخلات زودهنگام، مانند معرفی زودهنگام آلرژن‌های غذایی می‌تواند به پیشگیری از توسعه آلرژی‌های غذایی کمک کند (۲۲). اگرچه نتایج مطالعه حاضر شباهت‌های قابل توجهی با مطالعات آلرژی در انسان نشان می‌دهد، اما تفاوت‌های گونه‌ای بین سگ و انسان می‌تواند کاربرد این یافته‌ها را محدود کند. به عنوان مثال، برخی از ژن‌های شناسایی‌شده در سگ ممکن است آنالوگ مستقیمی در انسان نداشته باشند. همچنین مطالعه حاضر بر روی نمونه‌های بافتی متمرکز بود و ارزیابی پاسخ‌های عملکردی سیستم ایمنی نیاز به مطالعات بیشتر دارد. این محدودیت‌ها مشابه محدودیت‌های گزارش‌شده در مطالعات انسانی است.

تفسیر نتایج مطالعه حاضر باید با در نظر گرفتن یک ملاحظه روش‌شناختی مهم صورت گیرد؛ نمونه‌های بافتی موردبررسی در پژوهش حاضر، به طور انحصاری از سگ‌های مبتلا به عفونت حاد پاروویروس (*Infection Canine Parvovirus*) اخذ شده‌اند. پاروویروس سگ، به عنوان یک پاتوژن ویروسی با تروپیسم مشخص برای سلول‌های اپیتلیال روده در حال تکثیر، یک اثر ایمونوپاتولوژیک کاملاً ویژه و مختص به خود را ایجاد می‌کند. در نتیجه الگوی بیان ژن مشاهده‌شده در مطالعه حاضر، عمدتاً و به طور اجتناب‌ناپذیری بازتاب‌دهنده پاسخ ایمنی التهابی میزبان به این ویروس خاص است. اگرچه به طور نظری، اشتراکاتی در برخی از مسیرهای التهابی پایه بین بیماری‌های مختلف روده محتمل است، اما تعمیم مستقیم و بدون قید و شرط این نتایج به مکانیسم‌های بیماری‌زایی سایر اشکال بیماری التهابی روده (IBD) که اتیولوژی‌های کاملاً متفاوت و اغلب چندعاملی دارند (مانند موارد با پایه خودایمنی یا ایدیوپاتیک)، قابل توجه نیست؛ بنابراین تمرکز اصلی و ارزش بنیادی این تحلیل، در شناسایی ژن‌های کاندید کلیدی و تبیین نقش بالقوه‌ی آن‌ها در آشنایی از وقایع ایمونولوژیک است که به طور خاص در طول چرخه عفونت پاروویروس رخ می‌دهد. برای مثال، ژن‌هایی که در مطالعه حاضر تفاوت بیان معنی‌داری نشان دادند، عمدتاً در مسیرهایی، مانند پاسخ به ویروس، آپوپتوز و التهاب نوتروفیلی دخیل می‌باشند که مستقیماً با پاتوژن پاروویروس مرتبط می‌باشند. بدیهی است مطالعات آینده‌نگر گسترده‌تری که شامل نمونه‌هایی از حیوانات مبتلا به انواع مختلف و تعریف‌شده IBD باشند، برای تمایز بین نشانگرهای زیستی کلی در التهاب روده و نشانگرهای اختصاصی مرتبط با اتیولوژی‌های خاص، ضروری خواهد بود.

بررسی‌ها نشان داد التهاب مزمن روده در سگ‌های مبتلا به CIE با تخریب پرزهای روده، کاهش یکپارچگی سد مخاطی و اختلال در پاسخ ایمنی تنظیمی همراه است. به‌ویژه کاهش بیان ژن‌های کلیدی مانند *NRP1* و اختلال در عملکرد لنفوسیت‌ها نقش مهمی در تداوم التهاب دارد.

علاوه‌براین مشخص شده است پاروویروس با اتصال به گیرنده‌های ترانسفرین روی سلول‌های در حال تقسیم سریع (مانند اپیتلیوم روده) باعث تخریب کریپت‌های روده‌ای، آتروفی پرزها و مرگ سلولی می‌شود. این آسیب‌ها به اسهال خونریزی‌دهنده و اختلال در جذب مواد مغذی منجر می‌گردد؛ بنابراین هر دو شرایط CIE و CPV باعث تخریب ساختار روده می‌شوند، اما مکانیسم‌های متفاوتی دارند. CIE یک التهاب ایمونومحور با اختلال در تنظیم ایمنی است، درحالی‌که CPV یک عفونت ویروسی مستقیم با تخریب سلولی است (۲۳).

در مطالعه حاضر مشخص شد افزایش بیان ژن‌های پیش‌التهابی مانند *CXCL9* و *CXCL10* و کاهش عملکرد لنفوسیت‌ها به فعالیت غیرطبیعی سیستم ایمنی و التهاب مزمن منجر می‌شود. Kalli و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند عفونت CPV باعث کاهش لنفوسیت‌ها (لنفوپنی) و تضعیف ایمنی سلولی می‌شود که احتمال عفونت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد (۲۴). درنتیجه در CIE، سیستم ایمنی بیش‌فعال و فاقد تنظیم مناسب است. درحالی‌که در CPV، سیستم ایمنی تضعیف می‌شود.

تغییرات در بیان ژن‌های تنظیم‌کننده ایمنی در CIE مانند *NRP1* و *EGR2* ممکن است تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و اپی‌ژنتیک باشد. Nandi و Kumar در سال ۲۰۱۰ نشان دادند برخی نژادهای سگ (مانند دوبرمن) حساسیت بیشتری به CPV نشان می‌دهند که نشان‌دهنده پایه ژنتیکی برای حساسیت به عفونت است (۲۵). درنتیجه در هر دو حالت ممکن است حیوان بیمار تحت تأثیر عوامل ژنتیکی قرار گرفته باشد، اما در CIE تمرکز بر تنظیم ایمنی است. درحالی‌که در CPV تمرکز بر حساسیت به عفونت ویروسی است.

پاروویروس و CIE ممکن است از مسیرهای التهابی مشترکی عمل کنند، زیرا افزایش بیان *EGR2* و *NFATC4* در CIE نشان می‌دهد که این ژن‌ها در التهاب ناشی از عفونت‌های ویروسی مانند پاروویروس نیز نقش دارند. به‌طور مشابه، کاهش بیان *CSF2* و *ETS2* ممکن است نشان‌دهنده یک پاسخ التهابی کاهش‌یافته باشد که به‌طور بالقوه ارتباط بین اختلال ایمنی ناشی از پاروویروس و التهاب مزمن در CIE را نشان می‌دهد. همچنین درگیری مسیر عفونت ویروس لوسمی T انسانی ۱ به‌طور کلی نشان می‌دهد تعاملات ویروسی، مانند آنچه در عفونت پاروویروس دیده می‌شود، می‌تواند به پاتوژنز CIE با مختل کردن هموستاز ایمنی کمک کند (۲۶). با بررسی پروفایل‌های بیان ژنی در انتروپاتی‌های التهابی مزمن سگ‌ها، مطالعات transcriptomics ژن‌های کلیدی متعددی را شناسایی کرده‌اند که در تنظیم پاسخ ایمنی و التهاب روده نقش محوری ایفا می‌کنند. درزمینه انتریت ناشی از پاروویروس که با التهاب حاد و تخریب گسترده مخاط روده همراه است، تجزیه و تحلیل ژن‌های متفاوت بیان‌شده نشان می‌دهد ژن‌هایی، مانند *NRP1* (Neuropilin-1)، *EGR2* (Early Growth Response 2) و *NFATC4* (Nuclear Factor of Activated T-Cells 4) به‌طور معنی‌داری تنظیم‌شده‌اند.

به نظر می‌رسد *NRP1* با تعدیل سیگنالینگ سیتوکین‌های پیش‌التهابی و فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی (*VEGF*)، موجب افزایش نفوذپذیری عروقی و نشت لوکوسیت‌ها به بافت روده می‌شود که این امر به تشدید آسیب بافتی منجر می‌گردد. هم‌زمان، فاکتور رونویسی *EGR2* که به‌سرعت در پاسخ به استرس و محرک‌های التهابی القا می‌شود، با تنظیم تمایز و فعال‌سازی لنفوسیت‌های T و ماکروفاژها، تولید سیتوکین‌هایی، مانند *TNF-α* و *IL-6* را افزایش داده و پاسخ التهابی را تشدید می‌کند. ازسوی دیگر، *NFATC4* به‌عنوان یک عامل رونویسی وابسته به کلسیم، احتمالاً در هایپرترافی و آپوپتوز سلول‌های اپیتلیال روده و تعدیل پاسخ ایمنی ذاتی نقش دارد. درمجموع، این ژن‌ها در یک شبکه مولکولی هماهنگ عمل می‌کنند که نتیجه آن تقویت آبخار التهابی و آسیب پاتولوژیک به مخاط روده در طی عفونت پاروویروسی است (۲۷-۲۹).

به‌طور مقایسه‌ای، مطالعات قبلی درمورد CIE عمدتاً براساس توالی‌یابی RNA کل یا تحلیل‌های بافت‌شناسی بوده‌اند که فاقد دقت لازم برای ضبط ناهمگونی سلولی می‌باشند. به‌عنوان مثال، Li و همکاران در سال ۲۰۱۲ از توالی‌یابی RNA کل برای مطالعه میکروبیوم روده و پاسخ ایمنی مخاطی در سگ‌های مبتلا به CIE استفاده کردند که در آن‌ها سیتوکین‌های التهابی شناسایی شدند، اما بینش‌های خاص سلولی را ارائه ندادند (۳۰). به‌طور مشابه، Jergens و همکاران در سال ۲۰۱۲ نقش‌های سیتوکین‌ها را در CIE با استفاده از آزمایش‌های چندگانه بررسی کردند، اما در این مطالعه درک تعاملات خاص سلولی محدود بودند (۱۳). در مقابل، رویکرد scRNA-seq

مطالعه حاضر درک دقیقی از بیان ژن در سطح تک‌سلولی ارائه می‌دهد و زیرجمعیت‌های خاص سلولی را که ممکن است نشان‌دهنده وضعیت پاتولوژی CIE باشند، نمایان می‌سازد.

غنی‌سازی ژن متفاوت بیان‌شده در مسیرهای مرتبط با ایمنی با یافته‌های سایر گونه‌ها، مانند انسان‌ها و موش‌ها، همخوانی دارد. به‌طوری‌که مسیرهای مشابهی در بیماری التهابی روده (IBD) Inflammatory bowel disease دخیل می‌باشند. به‌عنوان مثال، *EGR1* و *NFATC4* به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های فعال‌سازی و تمایز سلول‌های T شناخته می‌شوند که به پاسخ‌های التهابی در CIE سگ‌ها و IBD انسانی کمک می‌کنند. این شباهت بین گونه‌ای نشان‌دهنده مکانیسم‌های حفظ‌شده اختلال ایمنی است و پتانسیل مدل‌های مقایسه‌ای را برای پیشبرد درک ما از این بیماری‌ها برجسته می‌کند (۳۱).

نتیجه‌گیری نهایی: مطالعه حاضر با به‌کارگیری تجزیه و تحلیل scRNA-seq، اولین بررسی پروفایل جامع از بیماری التهابی روده (CIE) در سگ‌ها را ارائه می‌دهد. در مطالعه حاضر ۳۸۵ ژن متفاوت بیان‌شده شناسایی شده است که شامل تنظیم‌کننده‌های کلیدی التهاب و پاسخ ایمنی نظیر *EGR2*، *SLC2A1* و *NFATC4* می‌شوند. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیرها، فعال‌شدگی چشمگیر مسیرهای التهابی و ایمنی ذاتی مرتبط با پاتوژن CIE را نشان داد. مطالعات آینده با در نظرگیری نمونه‌های بالینی متنوع‌تر، از جمله مبتلایان به انتروپاتی التهابی ایدیوپاتیک، آلرژی غذایی و بیماری التهابی روده (IBD) می‌تواند به شناسایی نشانگرهای زیستی دقیق‌تر و مکانیسم‌های مشترک پاتوژن بین این اختلالات کمک شایانی کند. یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر بینش دقیق در رابطه با مکانیزم مولکولی CIE ارائه می‌دهد و اهداف امیدوارکننده‌ای برای توسعه بیومارکرهای تشخیصی و درمان‌های هدفمند در آینده شناسایی می‌کند.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر براساس قرارداد اصول اخلاقی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته (شماره: ۷/۰۳/۱۹۰۶) انجام شد. کلیه پروتکل‌های مطالعه مطابق با دستورالعمل‌های بین‌المللی کار با حیوانات تنظیم و اجرا گردید. تأییدیه اخلاقی با شناسه IR.UT.KGUT.REC.1906.03 از کمیته اخلاق در پژوهش‌های دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان دریافت شد.

سپاسگزاری

نویسندگان از کلینیک دامپزشکی مهرگان کرمان برای فراهم‌آوری امکانات تشخیصی، بالینی و همکاری در جمع‌آوری نمونه‌ها صمیمانه تشکر می‌کنند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع در ارتباط با این مطالعه وجود ندارد.

References

1. Jablonski Wennogle SA, Priestnall SL, Suárez Bonnet A, Webb CB. Comparison of clinical, clinicopathologic, and histologic variables in dogs with chronic inflammatory enteropathy and low or normal serum 25 hydroxycholecalciferol concentrations. J Vet Intern Med. 2019;33(5):1995-2004. doi: 10.1111/jvim.15614 PMID: 31496004
2. Cristóbal JI, Duque FJ, Usón-Casaús J, Barrera R, López E, Pérez-Merino EM. Complete blood count-derived inflammatory markers changes in dogs with chronic inflammatory enteropathy treated with adipose-derived mesenchymal stem cells. Animals. 2022;12(20):2798. doi: 10.3390/ani12202798 PMID: 36290184
3. Siel D, Beltrán CJ, Martínez E, Pino M, Vargas N, Salinas A, et al. Elucidating the role of innate and adaptive immune responses in the pathogenesis of Canine chronic inflammatory enteropathy—a search for potential biomarkers. Animals. 2022;12(13):1645. doi: 10.3390/ani12131645 PMID: 35804545

4. Gomes T, Teichmann SA, Talavera-López C. Immunology driven by large-scale single-cell sequencing. *Trends Immunol.* 2019;40(11):1011-21. [doi: 10.1016/j.it.2019.09.004](https://doi.org/10.1016/j.it.2019.09.004) PMID: 31645299
5. Huang K, Xu Y, Feng T, Lan H, Ling F, Xiang H, et al. The advancement and application of the single-cell transcriptome in biological and medical research. *Biology.* 2024;13(6):451. [doi: 10.3390/biology13060451](https://doi.org/10.3390/biology13060451) PMID: 38927331
6. Ramos GP, Papadakis KA, editors. Mechanisms of disease: inflammatory bowel diseases. *Mayo Clin Proc*; 2019: Elsevier. [doi: 10.1016/j.mayocp.2018.09.013](https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.09.013) PMID: 306114427
7. Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA. Age and age-related diseases: role of inflammation triggers and cytokines. *Front Immunol.* 2018;9:586. [doi: 10.3389/fimmu.2018.00586](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00586) PMID: 29686666
8. Davidovici BB, Sattar N, Jörg PC, Puig L, Emery P, Barker JN, et al. Psoriasis and systemic inflammatory diseases: potential mechanistic links between skin disease and co-morbid conditions. *J Invest Dermatol.* 2010;130(7):1785-96. [doi: 10.1038/jid.2010.103](https://doi.org/10.1038/jid.2010.103) PMID: 20445552
9. Suchodolski JS. The Intestinal Microbiome in *Canine* Chronic Enteropathy and Implications for Extraintestinal Disorders. *Adv Small Anim Care* . 2020;1:101-10. [doi: 10.1016/j.yasa.2020.07.008](https://doi.org/10.1016/j.yasa.2020.07.008)
10. Sampath V, Abrams EM, Adlou B, Akdis C, Akdis M, Brough HA, et al. Food allergy across the globe. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;148(6):1347-64. [doi: 10.1016/j.jaci.2021.10.018](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.10.018) PMID: 34872649
11. Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Curr Opin Virol.* 2014;6:40-6. [doi: 10.1016/j.coviro.2014.03.006](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.03.006) PMID: 24713352
12. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):27-30. [doi: 10.1093/nar/28.1.27](https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27) PMID: 9847135
13. Jergens AE, Simpson KW. Inflammatory bowel disease in veterinary medicine. *Front Biosci.* 2012;4(4):1404-19. [doi: 10.2741/e470](https://doi.org/10.2741/e470) PMID: 22201965
14. Pierini A, Lowe R, Granziera V, Marchetti V, Lubas G. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin for treatment of Feline Squamous Cell Carcinoma: Experience in 12 cats. *J Vet Intern Med* . 2016;30(4):14-5.
15. Spinelli M, Fusco S, Grassi C. Nutrient-dependent changes of protein palmitoylation: impact on nuclear enzymes and regulation of gene expression. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12):3820. [doi: 10.3390/ijms19123820](https://doi.org/10.3390/ijms19123820) PMID: 30513609
16. Marsella R, Santoro D, Ahrens K. Early exposure to allergens in the house dust mite and *Canine* atopic dermatitis. *J Vet Intern Med.* 2017;31(3):795-800. [doi: 10.1111/jvim.14689](https://doi.org/10.1111/jvim.14689)
17. Loh W, Tang MLK. The epidemiology of food allergy in the global context. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(9):2043. [doi: 10.3390/ijerph15092043](https://doi.org/10.3390/ijerph15092043) PMID: 30231558
18. Abrams EM, Sicherer SH. Diagnosis and management of food allergy. *CMAJ.* 2020;192(22):E601-E606. [doi: 10.1503/cmaj.191063](https://doi.org/10.1503/cmaj.191063)
19. Brough HA, Nadeau KC, Sindher SB, Alkotob SS, Chan S, Bahnson HT, et al. Epicutaneous sensitization in the development of food allergy: What is the evidence and how can this be prevented? *Allergy.* 2020;75(9):2185-205. [doi: 10.1111/all.14304](https://doi.org/10.1111/all.14304) PMID: 32249942
20. Perkin MR, Logan K, Tseng A, Raji B, Ayis S, Peacock J, et al. Randomized trial of introduction of allergenic foods in breast-fed infants. *N Engl J Med.* 2016;374(18):1733-43. [doi: 10.1056/NEJMoa1514210](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1514210) PMID: 26943128

21. Santos AF, Riggioni C, Agache I, Akdis CA, Akdis M, Alvarez-Perea A, et al. EAACI guidelines on the diagnosis of IgE-mediated food allergy. *Allergy*. 2023;78(12):3057-76. doi: [10.1111/all.15862](https://doi.org/10.1111/all.15862) PMID: [37815205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37815205/)
22. Du Toit G, Roberts G, Sayre PH, Bahnson HT, Radulovic S, Santos AF, et al. Randomized trial of peanut consumption in infants at risk for peanut allergy. *N Engl J Med*. 2015;372(9):803-13. doi: [10.1056/NEJMoa1414850](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414850). prevented? *Allergy*. 2020;75(9):2185-205. doi: [10.1111/all.14304](https://doi.org/10.1111/all.14304) PMID: [25705822](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25705822/)
23. Schoeman JP, Herrtage ME. Serum cortisol and thyroxine concentrations as predictors of death in critically ill puppies with parvoviral diarrhea. *J Am Vet Med Assoc*. 2007;231(10):1534-1539. PMID: [18020996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18020996/)
24. Kalli I, Leontides LS, Mylonakis ME, Adamama-Moraitou K, Rallis T, Koutinas AF. Prognostic value of serum lactate in dogs with parvovirus. *Vet Emerg Crit Care*. 2010;20(2):200-204.
25. Nandi S, Kumar M. *Canine* parvovirus: current perspective. *Indian J Virol*. 2010;21(1):31-44. PMID: [23637476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23637476/)
26. Lalsiamthara J, Lee JH. Immunization of guinea pigs with Salmonella delivered anti-Brucella formulation reduces organs bacterial load and mitigates histopathological consequences of Brucella abortus 544 challenge. *Vet Immunol Immunopathol*. 2018;195:40-5. doi: [10.1016/j.vetimm.2017.11.006](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.11.006) PMID: [29249316](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29249316/)
27. Decaro N, Buonavoglia C. *Canine* parvovirus—a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol*. 2012;155(1):1-12. doi: [10.1016/j.vetmic.2011.09.007](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.007) PMID: [21962408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21962408/)
28. Kauffman ME, Kauffman MK. The transcription factor EGR2: a master regulator of immune cell development and function. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):6721. doi: [10.3390/ijms22136721](https://doi.org/10.3390/ijms22136721) PMID: [34199378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34199378/)
29. Wilkins BJ, Molkentin JD. Calcium-calcieneurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322(4):1178-1191. doi: [10.1016/j.bbrc.2004.07.12](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.12) PMID: [15336966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15336966/)
30. Li H, Brooking A, Cunha CW, Highland MA, O'Toole D, Knowles DP, et al. Experimental induction of malignant catarrhal fever in pigs with ovine herpesvirus 2 by intranasal nebulization. *Vet Microbiol*. 2012;159(3-4):485-9. doi: [10.1016/j.vetmic.2012.04.016](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.016) PMID: [22560763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22560763/)
31. Hong C-W. Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. *Immune Netw*. 2017;17(5):298. doi: [10.4110/in.2017.17.5.298](https://doi.org/10.4110/in.2017.17.5.298) PMID: [29093651](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29093651/)