

Original Article

Key Genes and Metabolic Pathways in *Brucella ovis*-Infected Sheep: Impact on Sperm Quality, *In Vitro* Fertilization, and Freeze-Thaw Cycles

Behnam Aghajan^{1*}, Abas Bahari²

1, Department of Mathematics, Faculty of science, Zanjan University, Iran

2, Department of Biotechnology, Research Institute of Modern Biological Techniques (RIMBT), Zanjan University,

Received: 2025.03.18

Accepted: 2025.07.02

Revised: 2025.06.11

Published: 2025.12.22

* E-mail: behnam.ben@znu.ac.ir

Abstract

Introduction: *Brucella ovis* is a widespread infectious agent in sheep, presenting in both clinical and subclinical forms. It induces reproductive tract lesions, reduced fertility, abortions, and increased perinatal mortality in lambs. Epididymitis caused by *B. ovis* leads to pathological changes in the epididymis, testes, and accessory sex glands, resulting in impaired ram fertility. Such alterations may compromise the quality of ram sperm for in vitro fertilization (IVF), thereby reducing fertilization rates. Additionally, decreased sperm quality can impair survival during freeze-thaw procedures. **Objective:** This study aimed to investigate gene expression profiles in *Brucella ovis*-infected sheep to identify key genes and associated biological pathways involved in the infection. **Methods:** The dataset for this study was obtained from the GEO database (Accession Number: GSE35615). Samples were collected from six tissues: epididymis, vas deferens ampullae, vesicular glands, bulbourethral glands, testes, and a composite of inguinal and scrotal lymph nodes, at three stages of infection—acute phase (60 dpi), chronic phase I (120 dpi), and chronic phase II (240 dpi)—alongside healthy controls (0 dpi). Gene expression profiling was conducted using the Affymetrix Bovine Genome Array, and comparative analyses of expression levels across the six tissues at different infection stages were performed. **Findings:** Bioinformatic and statistical analyses identified 45 genes with significant differential expression and high regulatory importance. These genes are involved in key molecular and protein binding functions, as well as critical pathways related to molecular activity and cellular components. **Conclusion:** This study offers insights into the molecular mechanisms underlying *Brucella ovis* infection and its effects on in vitro fertilization. The identified genes and pathways provide potential targets for future research in veterinary biotechnology and reproductive health management.

Keywords: *Brucella ovis*, Gene expression, Protein network, In vitro fertilization (IVF), Reproductive health



Authors retain the copyright and full publishing rights.

Published by [Razi Vaccine & Serum Research Institute](#) This article is an open access article licensed under the [Creative Commons Attribution 4.0 International \(CC BY 4.0\)](#)

ژن‌های اصلی و مسیرهای متابولیکی در گوسفندان آلوده به بروسلا اوویس: تأثیر بر کیفیت اسپرم، لقاح آزمایشگاهی و چرخه‌های ذوب و انجماد

بهنام آقاجان^{۱*}، عباس بهاری^۲

۱. گروه ریاضی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زنجان، ایران

۲. گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه زنجان، ایران



تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۸

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۰/۰۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۳/۲۱

* E-mail: behnam.ben@znu.ac.ir

چکیده

مقدمه: بروسلا اوویس یک بیماری عفونی شایع در گوسفندان است که به صورت بالینی و تحت بالینی ظاهر می‌شود. این پاتوژن با ایجاد ضایعات در دستگاه تناسلی، کاهش باروری، سقط جنین و افزایش مرگ‌ومیر پرناتال در بره‌ها همراه است. اپیدیمی ناشی از بروسلا اوویس باعث ایجاد تغییرات پاتولوژیک در اپیدیدیم، بیضه‌ها و غدد جنسی جانبی می‌شود که به اختلال در باروری قوچ‌ها می‌انجامد. این تغییرات می‌تواند بر استفاده از اسپرم قوچ‌ها در لقاح آزمایشگاهی تأثیر بگذارند و به کاهش نرخ لقاح منجر شوند. علاوه بر این، کیفیت پایین اسپرم ممکن است بقای اسپرم را در فرایندهای انجماد و ذوب مختل کند. هدف: هدف این مطالعه، تحلیل پروفایل‌های بیان ژن در گوسفندان آلوده به بروسلا اوویس به منظور شناسایی ژن‌های اصلی و مسیرهای زیستی مرتبط با این عفونت است. روش کار: مجموعه داده‌های استفاده‌شده در این مطالعه از پایگاه داده GEO با شماره دسترسی GSE35615 استخراج شد. نمونه‌ها از شش غده مختلف (اپیدیدیم، آمپول‌های دفران، غدد وزیکولار، غدد بولبویورترال، بیضه‌ها و مجموعه‌ای از غدد لنفاوی شامل اینگوینال و اسکروتال) در سه مرحله مختلف عفونت: فاز حاد (۶۰dpi)، فاز مزمن I (۱۲۰dpi) و فاز مزمن II (۲۴۰dpi)، و همچنین از گوسفندان سالم (۰dpi) جمع‌آوری شده‌اند. پروفایل‌های بیان ژن با استفاده از آرایه ژنومی Affymetrix Bovine انجام شده است و سطوح بیان ژن‌ها در این شش غده در مراحل مختلف عفونت مقایسه شد. یافته‌ها: از طریق تحلیل‌های بیوانفورماتیکی و آماری دقیق، ۴۵ ژن با اهمیت تنظیمی بالا شناسایی شدند که بیان افتراقی معناداری نشان دادند. این ژن‌ها نقش‌های محوری در مسیرهای اتصال مولکولی، اتصال پروتئینی، عملکرد مولکولی و مؤلفه سلولی دارند. نتیجه‌گیری: ارائه بینش‌های ارزشمند درباره مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با عفونت بروسلا اوویس و تأثیر آن بر لقاح آزمایشگاهی. یافته‌های این پژوهش اهداف بالقوه‌ای را برای پژوهش‌های بیشتر در زمینه زیست‌فناوری دامپزشکی و مدیریت سلامت تولیدمثل فراهم می‌کند.

واژگان کلیدی: شبکه پروتئینی، ژن‌ها، لقاح آزمایشگاهی، غنی‌سازی، روش‌های آماری

مقدمه

و کیفیت اولیه منی قبل از انجماد را ارزیابی می‌کنند. گالیندو و همکاران (۹) تفاوت بیان ژن‌ها در گوسفندان مبتلا را تحلیل کردند که معناداری در بیان ژن‌های مرتبط با عفونت پاتوژن و پاسخ ایمنی را نشان داد. پژوهش‌های بعدی مانند مطالعه ژو و همکاران (۱۰) ژن‌هایی با تفاوت بیان معنادار در ماکروفاژها را شناسایی کرده و پایه‌های آن را برای درک مکانیسم‌های مولکولی بقای درون سلول‌ها ذخیره‌سازی کرده‌اند. روش‌های بیوانفورماتیکی، شبکه‌های زیستی (۱۱) و زیست‌شناسی سامانه‌ای (۱۲، ۱۳) برای تحلیل جامع این بیماری استفاده می‌شود. مدل‌سازی شبکه‌های پروتئینی نیز برای تحلیل رفتار سلولی و مولکولی به کار می‌رود (۱۴، ۱۵). هدف این مطالعه، ژن‌ها و مسیرهای زیستی متأثر از بروسلا اوویس و بررسی تأثیر این بیماری بر کیفیت منی در فرایندهای لقاح آزمایشگاهی و ذوب و انجماد اسپرم گوسفندان است.

مواد و روش‌ها

مجموعه داده SuperSeries GSE35615 که در این مطالعه بررسی شد، شامل سه زیرمجموعه GSE35612 (فاز حاد)، GSE35613 (مزمین I) و GSE35614 (مزمین II) بود و از پایگاه GEO به نشانی <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> دانلود شد. این داده‌ها طی سه فاز عفونت در مطالعه (۱۶) تولید شده‌اند که در آن ۱۲ قوچ یک‌ساله نژاد Santa Inês، پس از تأیید عدم آلودگی به بروسلاز از طریق تست AGID روی نمونه‌های سرمی (براساس روش مارین و همکاران (۱۷))، در محیط ایزوله نگهداری شدند. شش قوچ با سویه PA *Brucella ovis* (ATCC25840) که روی پلیت‌های آگار خون‌دار کشت داده شده بود (شرایط انکوباسیون: ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت در اتمسفر ۱۰% CO₂) و پس از شست‌وشو با بافر PBS (10mM, PH 6.8) و تنظیم غلظت با اسپکتروفتومتر (550 nm) به دوز CFU در ۶۰ میکرولیتر (۳۰ میکرولیتر به صورت ملتحمة ای + ۳۰ میکرولیتر داخل پره‌پوتیالی) آلوده شدند. شش قوچ شاهد با آب مقطر استریل و به همان روش تلقیح شدند. تأیید عفونت در قوچ‌ها در ۱۵ روز پس از عفونت با روش AGID (کیت مؤسسه IPVDF، برزیل) انجام شده است. قوچ‌ها به چهار گروه زمانی تقسیم شدند: شاهد (۰ dpi)، حاد (۶۰ dpi)، مزمین I (۱۲۰ dpi) و مزمین II (۲۴۰ dpi). پس از کشتار، نمونه‌هایی از اپیدیدیم، آمپول‌های دفران، غدد وزیکولار،

بروسلا اوویس یک عفونت باکتریایی است که گوسفندان اهلی را آلوده می‌کند و به صورت بالینی یا تحت بالینی مزمین ظاهر می‌شود. این بیماری به عنوان یک بیماری مقاربتی شناخته می‌شود که در قوچ‌ها باعث ضایعات تناسلی و اپیدیدیمیت در قوچ، جفت و سقط نادر در میش و مرگ و میر نوزادان در بره می‌شود. این بیماری ابتدا در استرالیا و نیوزیلند گزارش شد، اما در دیگر کشورهای اصلی تولیدکننده گوسفند نیز مشاهده شده است (۱). انتقال عمده بیماری از طریق ارتباط جنسی در فصل تولیدمثل و همچنین انتقال مستقیم بین قوچ‌ها از راه دهانی و مخاطی صورت می‌گیرد. قوچ‌ها ناقل اولیه این بیماری هستند و حتی می‌توانند چندین سال پس از عفونت، باکتری بروسلا اوویس را از طریق منی خود دفع کنند. میش‌ها نیز می‌توانند ناقل این بیماری باکتریایی باشند، اما معمولاً خود محدودشونده هستند و برای مدت طولانی باقی نمی‌ماند (۱)، این تغییر ابتدا بر اپیدیدیم تأثیر می‌گذارد و می‌تواند به انسداد کامل، تجمع اسپرم و ناباروری تبدیل شود که با تغییر دادن کیسه بیضه قابل تشخیص است. در برخی قوچ‌ها انسداد دائمی است، اما در مواردی، تورم ممکن است کاهش یابد و کیسه بیضه ظاهری طبیعی داشته باشد، اما قوچ همچنان آلوده باشد (۳). با این حال، تشخیص بالینی فاقد حساسیت و اختصاصیت است و ضایعات تناسلی می‌توانند به واسطه باکتری‌های دیگری نیز ایجاد شوند (۴). پژوهش‌های بسیاری درباره اهمیت بروسلا اوویس در گوسفندان اهلی و در مناطق اصلی تولید گوسفند انجام شده است (۳، ۵). پژوهش‌های پیکارد-هیگن و همکاران (۴) به وضوح نشان می‌دهد که بروسلا اوویس به ضایعات تناسلی و تغییرات در کیفیت منی منجر می‌شود که عملکرد قوچ‌ها را مختل می‌کند. همچنین، نتایج مطالعه ژوزه ماریا و همکاران (۶) نشان‌دهنده کاهش کیفیت منی، کاهش غلظت اسپرم و افزایش ناهنجاری‌های اسپرم در بیماری بروسلا اوویس است. با اینکه بروسلا اوویس مستقیماً با لقاح آزمایشگاهی مرتبط نیست، اما یافته‌های برانسکام و همکاران (۷) و پیکارد-هیگمن و همکاران (۴) نشان می‌دهند که این آسیب می‌تواند باروری و کیفیت مایع منی را به طور چشمگیری کاهش دهد و بر نتایج لقاح آزمایشگاهی تأثیر منفی بگذارد. مطالعات یانز-اورتیز و همکاران (۸) نیز ارتباط مستقیم بین موفقیت در ذوب اسپرم

در هر گروه با معیارهای و (پس از تعدیل p-Value با روش BH) استخراج شدند (۲۰، ۲۱). به دلیل استفاده از تراشه ژنومی گاو (Affymetrix Bovine Genome Array)، معادل‌های ژنی گوسفند (*Ovis aries*) برای ژن‌های با تفاوت بیان معنادار با استفاده از ابزار g:Ortho پایگاه g:Profiler به نشانی <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost> تطبیق داده شدند. تحلیل غنی‌سازی عملکردی ژن‌های با تفاوت بیان معنادار با دو ابزار زیر انجام شد: (a) ShinyGO 0.80: شناسایی مسیرهای بیولوژیک معنادار (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go>) (۲۲). (b) g:Profiler: تعیین دسته‌های بیولوژیک غنی‌شده مبتنی بر پایگاه داده Ensemble. فهرست ژن‌های با تفاوت بیان معنادار هر گروه جداگانه در دو ابزار (a) و (b) بارگذاری و یک پالایش از مسیرهای زیستی موجود در پایگاه‌های ShinyGO 0.80 و g:Profiler انجام شد. در این روند، مسیرهایی که از نظر آماری معنادار بودند (با سطح FDR کمتر از 0.05) بررسی شدند.

۳. تحلیل شبکه تعاملات پروتئین-پروتئین

برای ساخت شبکه‌های تعاملات پروتئین-پروتئین (PPINs) هر گروه، فهرست ژن‌های با تفاوت بیان معنادار مربوطه (به هر گروه) جداگانه از نرم‌افزار Cytoscape ورژن ۳.۱۰.۳ با تنظیم ارگانیسم *Ovis aries* (گوسفند) و حداقل نمره اطمینان ۰.۶ استفاده شد. ماژول‌های اصلی با افزونه MCODE (پارامترها: Degree cutoff=2, Node score cutoff=0.2, k-core=2, Max depth=100, MCODE score>5) استخراج و دو ماژول برتر از هر شبکه انتخاب شدند.

در ادامه، فهرست ژن‌های هاب هر شبکه تعاملی پروتئین-پروتئین استخراج (پنج ژن هاب برای شبکه AmpVesi و ۱۰ ژن هاب برای دیگر شبکه‌ها) و دنباله درجات و سنجه‌های مرکزیت، نزدیکی و بینابینی برای هر گره از هر شبکه اندازه‌گیری شد.

۴. تحلیل عملکردی ژن‌های اصلی

برای بررسی عملکرد ژن‌های اصلی شناسایی‌شده، پایگاه‌های اطلاعاتی معتبر UniProtKB به نشانی <https://www.uniprot.org>

غدد بولبویورترال، بیضه‌ها و مجموعه‌ای از غدد لنفاوی (اینگوئینال و اسکروتال) جمع‌آوری و همه بافت‌ها با روش PCR برای بروسلا اوویس (براساس پروتکل (۱۸)) آزمایش شدند. در تمامی جداول، شکل‌ها و تحلیل‌های بعدی از نشانه‌های اختصاری زیر استفاده شد: اپیدیدیم (Epid)، آمپول‌های دفران (Amp)، غدد وزیکولار (Vesi)، غدد بولبویورترال (Bulb)، بیضه‌ها (Test)، غدد لنفاوی (Lymph)، ترکیب آمپول‌های دفران و غدد وزیکولار به‌عنوان یک گروه (AmpVesi) و نمونه‌های شاهد (CO). مراحل تشخیص مولکولی شامل استخراج DNA از بافت‌ها (با کیت تجاری، ذکر نام و شرکت در منبع (۱۸))، طراحی پرایمر برای ژن‌های هدف خاص بروسلا اوویس (ذکر ژن دقیق در منبع (۱۸))، انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (با مواد مصرفی و دستگاه‌های استاندارد، مطابق (۱۸)).

۱. استخراج و پردازش داده‌های بیان ژنی

سپس RNA کل از نمونه‌ها با کیت Invisorb® Spin Tissue RNA Mini Kit (Invitex GmbH، آلمان) استخراج، با کیت RNeasy Mini (Qiagen، کانادا) خالص‌سازی و کیفیت‌سنجی آن با بیوانالایزر اگیلنت (Agilent Technologies، آمریکا) انجام شده است. بیان ۲۴,۴۲۸ پروب با استفاده از تراشه Affymetrix GeneChip® Bovine Genome Array (Affymetrix، آمریکا) به‌عنوان یک پلتفرم تجاری میکروآرایه الیگونوکلوئوتیدی با توان عملیاتی بالا برای پروفایل‌سازی ژنومی گاو (*Bos taurus*) اندازه‌گیری شده است. داده‌های خام پس از کنترل کیفیت (با نرم‌افزار GCOS)، تصحیح اثرات دسته‌ای (ComBat) و پیش‌پردازش (RMA در R/Bioconductor) در GEO با کد دسترسی GSE35615 بارگذاری شده‌اند. تمامی تحلیل‌ها با نرم‌افزار R نسخه ۳.۲.۴ و پکیج‌های Bioconductor و CRAN انجام شد. ابتدا داده‌های مجموعه GSE35615 نرمال‌سازی و مقادیر بیان ژن‌ها به مقیاس لگاریتمی ($\log_2$) تبدیل شدند. برای کیفیت‌سنجی داده‌ها و کاهش ابعاد، از تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) استفاده شد (۱۹).

۲. شناسایی ژن‌های با تفاوت بیان معنادار و تحلیل غنی‌سازی

عملکردی و مسیرهای زیستی

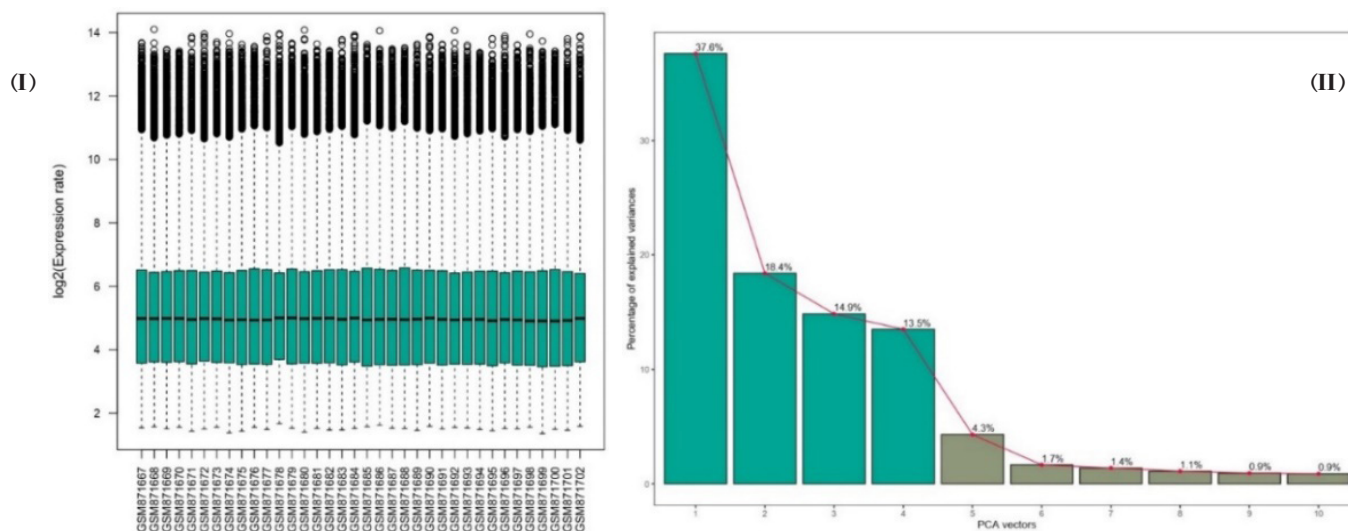
با استفاده از بسته limma در R، ژن‌های با تفاوت بیان معنادار

همبستگی (شکل ۲) الگوهای متمایز ارتباطی بین گروه‌های بافتی را آشکار ساخت: همبستگی مثبت قوی درون‌گروهی (مقادیر قرمز) و همبستگی منفی بین‌گروهی (مقادیر آبی). شباهت رفتاری (همبستگی مثبت) آمپول‌های دفران (Amp) و غدد وزیکولار (Vesi) به تصمیم برای ادغام در گروه AmpVesi منجر شد. نمایش ماتریسی مؤلفه‌های اصلی متعامد (شکل ۳) الگوی تفکیک‌پذیری را در تمامی صفحات مختصات (PC1-PC4) تأیید کرد. نزدیکی نقاط هم‌بافت (رنگ مشابه) و هم‌فاز (شکل مشابه) در هر زیرنمودار، همسویی تغییرات بیان ژن‌ها با عوامل بافتی و زمانی را آشکار می‌سازد. یافته‌ها قابلیت داده‌ها در شناسایی ژن‌های با تفات بیان معنادار متمایزکننده پنج گروه بافتی از یکدیگر و وجود تنوع عملکردی ذاتی در بافت‌های هدف بروسلا / اوویس را تأیید می‌کند. جدول ۱ نشان‌دهنده تعداد ژن‌های با تفاوت بیان معنادار استخراج‌شده هر گروه پس از یافتن معادل گوسفندی آن‌هاست. براساس جدول ۱، بیشترین تعداد ژن‌های افزایش‌یافته بیان منحصربه‌فرد مربوط به گروه (Test; 1049) و بیشترین ژن‌های کاهش‌یافته بیان در (Test; 406) بود. با استفاده از دو ابزار (a) و (b)، فرایندهای زیستی، مسیرهای متابولیکی، عملکردهای مولکولی و عوامل رونویسی مرتبط با ژن‌های با تفاوت بیان معنادار در هر پنج گروه جدول ۱ جداگانه بررسی شد.

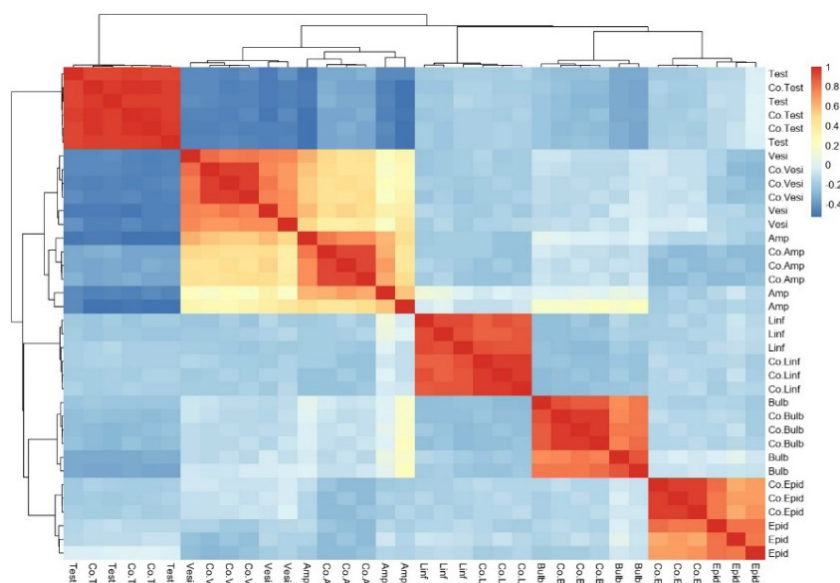
NCBI Gene /org به نشانی <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> و MedlinePlus Genetics به نشانی <https://medlineplus.gov/genetics> استفاده شد. در مواردی که اطلاعات عملکردی ژن‌ها به‌صورت مستقیم برای گونه *Ovis aries* در پایگاه UniProtKB موجود بود، همان داده‌ها مبنای تحلیل قرار گرفت. با این حال، برای بسیاری از ژن‌ها، به‌ویژه در پایگاه‌های NCBI Gene و MedlinePlus، اطلاعات عملکردی عمدتاً براساس گونه انسانی (*Homo sapiens*) یا سایر پستانداران مدل (همچون *Mus musculus* یا *Bos taurus*) ارائه شده بود. در این موارد، با اتکا به اصل حفظ عملکرد ژن‌ها در میان گونه‌های همولوگ، کارکردهای گزارش‌شده برای ژن‌های هم‌ارز در گونه انسان به *Ovis aries* تعمیم داده شد.

نتایج

داده‌های ریزآرایه (GSE35615) پس از نرمال‌سازی لگاریتمی در نرم‌افزار R بررسی شد. نمودار جعبه‌ای (شکل ۱-I) همگنی توزیع داده‌ها در تمامی نمونه‌ها را تأیید کرد. تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) با تبیین ۸۴,۴٪ واریانس کل توسط چهار مؤلفه اول (شکل ۱-II)، پایه‌ای برای کاهش ابعاد داده‌ها فراهم کرد. نقشه گرمایی



شکل ۱. (I) نمودار جعبه‌ای توزیع داده‌های نرمال‌سازی‌شده مجموعه GSE35615 با تبدیل لگاریتمی مقادیر بیان ژن‌ها. همپوشانی گسترده توزیع‌ها، همگنی نمونه‌ها و قابلیت مقایسه‌پذیری آن‌ها را تأیید می‌کند. (II) نمودار سنگ‌ریزی تحلیل مؤلفه‌های اصلی نشان‌دهنده سهم واریانس مؤلفه‌ها. چهار مؤلفه اول (جمعاً ۸۴,۴٪ واریانس داده‌ها) برای تحلیل‌های بعدی انتخاب شدند.



شکل ۲- نمایش ماتریس همبستگی بین نمونه‌های بافتی با استفاده از نقشه گرمایی و خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی. رنگ‌ها نشان‌دهنده شدت همبستگی (محدوده: +۱ تا -۱) هستند: قرمز = مثبت، آبی = منفی. اختصارات بافتی مطابق بخش مواد و روش‌ها تعریف شده‌اند.

را نشان می‌دهند. بررسی ماژول‌های شکل ۵ نشان می‌دهد که برخی از ژن‌های هاب معرفی‌شده در جدول ۳ نیز در این ماژول‌ها حضور دارند. هاب‌های ژنی اصلی در جدول ۳ نشان‌دهنده نقش محوری ژن‌هایی مانند VCL در شبکه AmpVesi هستند. هاب‌های مشترک (۳۵ مورد) که در ماژول‌های شبکه‌های تعاملی حضور دارند،

می‌توانند کاندیدای مطالعات اعتبارسنجی تجربی^۶ باشند.

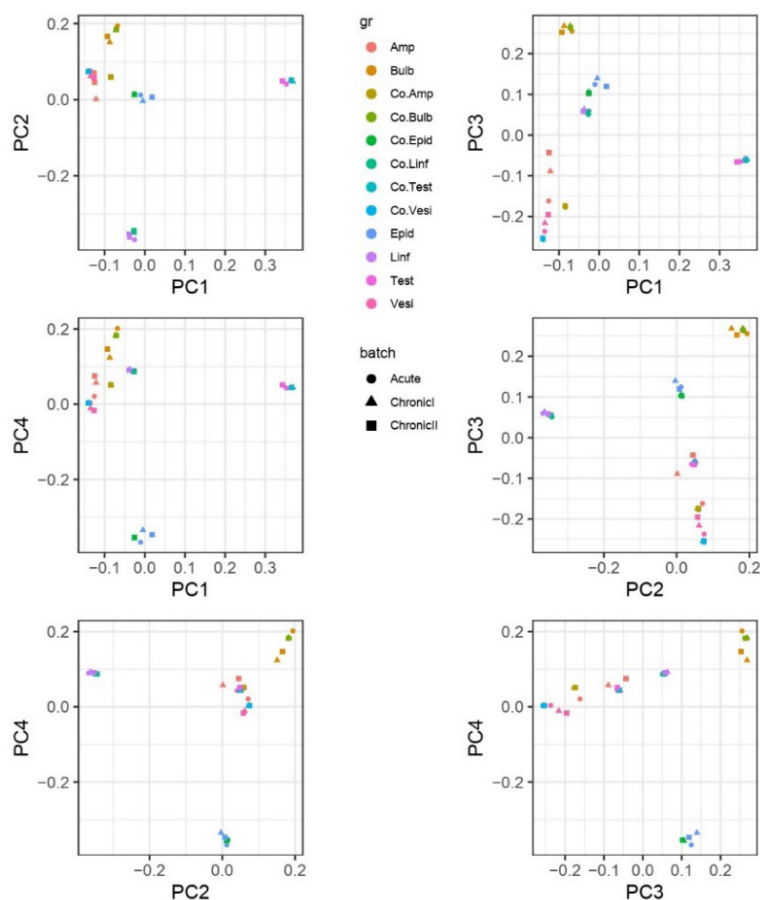
عملکردها و مسیرهای زیستی که بیشترین تعداد ژن‌های هاب را در خود جای داده بودند، در جدول ۴ فهرست شدند. این جدول شامل عملکردها و مسیرهایی است که حداقل ۷ ژن هاب از هر شبکه پروتئینی در آن‌ها مشارکت دارند. با توجه به اینکه این ژن‌ها دارای بالاترین درجه کنترل‌کنندگی در شبکه‌های مربوطه هستند، تغییرات در بیان آن‌ها می‌تواند تأثیر چشمگیری بر این عملکردها و مسیرهای زیستی داشته باشد. در جدول ۴، مسیرها و عملکردهای مشترک بین شبکه‌ها نیز به‌وضوح مشخص شده‌اند. این یافته‌ها نشان می‌دهند که ژن‌های هاب شناسایی‌شده نقشی اساسی در تنظیم فرایندهای زیستی مرتبط با هر شبکه دارند.

این تحلیل‌ها به درک بهتر نقش ژن‌های شناسایی‌شده در پاسخ به عفونت بروسلا/اوویس و تأثیر آن‌ها بر سیستم تولیدمثل گوسفندان کمک می‌کند. نتایج حاصل از این تحلیل، مربوط به فهرست ژن‌های با تفاوت بیان معنادار هر پنج گروه مطالعه‌شده، در جدول ۲ ارائه شده است.

بررسی شاخص‌های آماری و مرکزیت‌های شبکه‌های زیستی، مانند ضریب خوشه‌بندی^۱، مرکزیت نزدیکی^۲، مرکزیت بینابینی^۳ و اتصال‌پذیری همسایگی^۴، به درک بهتر ساختار و عملکرد شبکه‌ها کمک می‌کند. این شاخص‌ها اهمیت گره‌ها را در شبکه نشان داده و به شناسایی ژن‌های اصلی، بیومارکرها و اهداف درمانی کمک می‌کنند (۲۳، ۲۴). پس از حذف رئوس منفرد و مسیرهای کوتاه (طول ۲ و ۳)، تمرکز بر بزرگ‌ترین زیرشبکه همبند^۵ برای هر گروه قرار گرفت. ژن‌های هاب همراه با دنباله درجات و سنجه‌های مرکزیت، نزدیکی و بینابینی برای هر ژن هاب در جدول ۳ ارائه شد. سنجه‌های مرکزیت و نزدیکی، میزان کنترل‌کنندگی هر ژن در شبکه

1. Clustering Coefficient
2. Closeness Centrality
3. Betweenness Centrality
4. Neighborhood Connectivity
5. Connected Subnetwork

6. Experimental



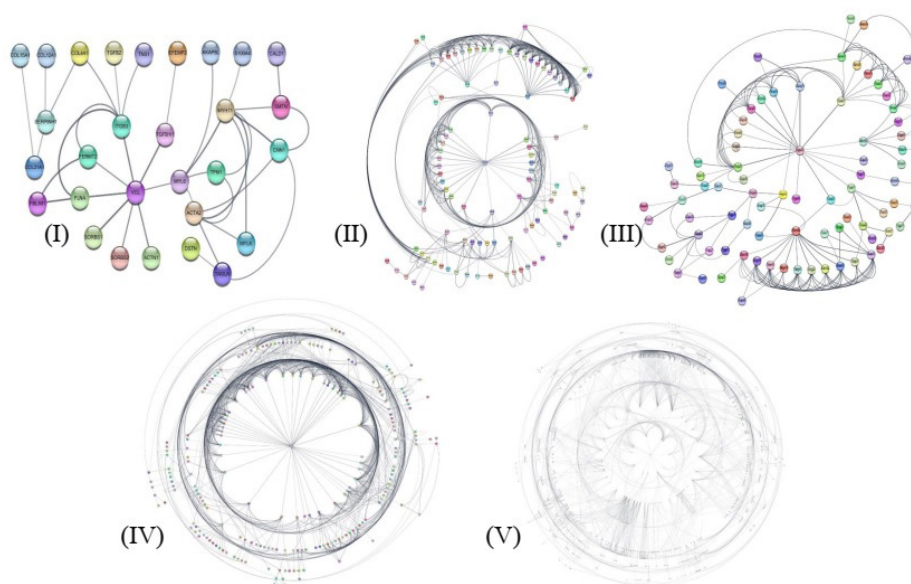
شکل ۳- ماتریس نمودارهای پراکندگی دویعدی نمونه‌ها در فضای مؤلفه‌های اصلی متعامد (PC1-PC4). هر زیرنمودار، توزیع داده‌ها را در صفحه حاصل از دو مؤلفه عمود بر هم نمایش می‌دهد. کدگذاری دوگانه: ● فاز حاد، ▲ فاز مزمن I و ■ فاز مزمن II.

جدول ۱- تعداد ژن‌های با تفاوت بیان معنادار در گروه‌های بافتی و اشتراک‌های بین‌گروهی. سطرها و ستون‌ها: گروه‌های بافتی (Epid, AmpVesi, Bulb, Test, Lymph). اعداد آبی در ستون سمت راست: تعداد ژن‌های مشترک افزایش بیان‌یافته معنادار منحصر به فرد هر گروه (در سطر متناظر) نسبت به تمام گروه‌های دیگر. اعداد آبی در سطر پایین: تعداد ژن‌های مشترک کاهش بیان‌یافته معنادار منحصر به فرد هر گروه (در ستون متناظر) نسبت به تمام گروه‌های دیگر. مقادیر روی قطر اصلی جدول (اشتراک درون‌گروهی) «-» است، زیرا هر گروه نسبت به خود ژن‌های با کاهش یا افزایش بیان ندارد.

vs	AmpVesi	Bulb	Epid	Lymph	Test	common genes up regulated (Converted)
AmpVesi	-	559	699	706	1362	154
Bulb	776	-	773	894	1387	289
Epid	1061	889	-	1000	1464	321
Lymph	1077	118	1033	-	1532	429
Test	2012	1883	1700	1744	-	1049
common genes down regulated (Converted)	38	42	44	75	406	-

جدول ۲- فهرست مسیرهای زیستی غنی‌شده معنادار (با $FDR \leq 0.05$) شناسایی‌شده با دو رویکرد مکمل (a) و (b) برای هر یک از پنج گروه بافتی. هر ردیف شامل (۱) نام مسیر، (۲) شناسه مسیر مرجع، (۳) مقدار P-Value تعدیل‌شده، (۴) پایگاه داده و (۵) منبع غنی‌سازی.

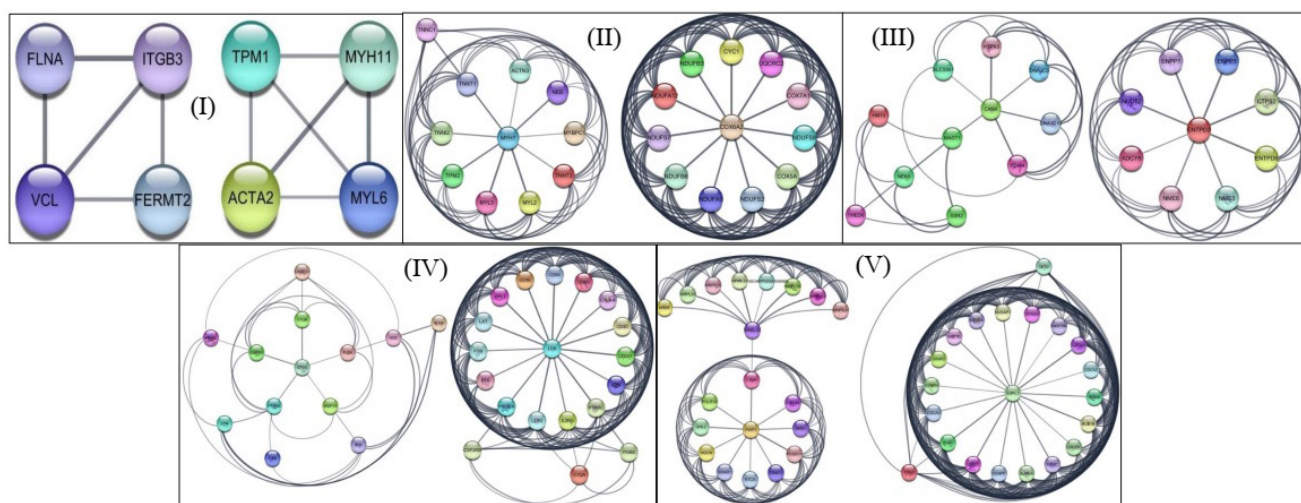
Pathway	ID	FDR(BH)	Database	Enrichment Source
Molecular function	GO:0003674	1.402×10^{-22}	GO:MF	g:profiler AmpVesi
binding	GO:0005488	4.015×10^{-22}	GO:MF	g:profiler AmpVesi
protein binding	GO:0005515	3.800×10^{-19}	GO:MF	g:profiler AmpVesi
Actin cytoskeleton	GO:0015629	1.2×10^{-9}	GO:CC	ShinyGO AmpVesi
Molecular function	GO:0003674	7.905×10^{-24}	GO:MF	g:profiler Bulb
binding	GO:0005488	5.262×10^{-21}	GO:MF	g:profiler Bulb
biological process	GO:0008150	3.488×10^{-24}	GO:BP	g:profiler Bulb
Contractile fiber	GO:0043292	3.9×10^{-24}	GO:CC	ShinyGO Bulb
Muscle system process	GO:0003012	1.6×10^{-19}	GO:BP	ShinyGO Bulb
Molecular function	GO:0003674	6.675×10^{-25}	GO:MF	g:profiler Epid
catalytic activity	GO:0003824	2.111×10^{-16}	GO:MF	g:profiler Epid
biological process	GO:0008150	1.416×10^{-15}	GO:BP	g:profiler Epid
Endomembrane system	GO:0012505	4.3×10^{-10}	GO:CC	ShinyGO Epid
Molecular function	GO:0003674	9.106×10^{-41}	GO:MF	g:profiler Lymph
binding	GO:0005488	4.639×10^{-37}	GO:MF	g:profiler Lymph
protein binding	GO:0005515	2.840×10^{-35}	GO:MF	g:profiler Lymph
immune system process	GO:0002376	1.754×10^{-87}	GO:BP	g:profiler Lymph
cellular component	GO:0005575	1.658×10^{-37}	GO:CC	g:profiler Lymph
Immune system process	GO:0002376	1.7×10^{-35}	GO:BP	ShinyGO Lymph
Immune response	GO:0006955	3.1×10^{-29}	GO:BP	ShinyGO Lymph
Molecular function	GO:0003674	1.981×10^{-71}	GO:MF	g:profiler Test
binding	GO:0005488	5.643×10^{-55}	GO:MF	g:profiler Test
protein binding	GO:0005515	2.114×10^{-50}	GO:MF	g:profiler Test
biological process	GO:0008150	1.891×10^{-60}	GO:BP	g:profiler Test
cellular process	GO:0009987	8.287×10^{-47}	GO:BP	g:profiler Test
cellular component	GO:0005575	2.422×10^{-82}	GO:CC	g:profiler Test
Microtubule cytoskeleton	GO:0015630	2.6×10^{-10}	GO:CC	ShinyGO Test
Non-membrane-bounded organelle	GO:0043228	1.3×10^{-9}	GO:CC	ShinyGO Test



شکل ۴- شبکه تعاملی پروتئین-پروتئین (PPIN) برای (I) گروه AmpVesi، (II) گروه Bulb، (III) گروه Epid، (IV) گروه Lymph و (V) گروه Test.

جدول ۳- فهرست ۵۴ ژن هاب برتر شناسایی شده در پنج شبکه تعاملی پروتئین-پروتئین (PPIN) گروه‌های بافتی با استفاده از معیارهای توپولوژیک شبکه. شبکه‌ها: (I) گروه AmpVesi (۵ ژن هاب)، (II) گروه Bulb (۱۰ ژن هاب)، (III) گروه Epid (۱۰ ژن هاب)، (IV) گروه Lymph (۱۰ ژن هاب) و (V) گروه Test (۱۰ ژن هاب). ژن‌های هاب مشخص شده در جدول با رئوس (ژن‌های) ماژول‌های استخراج شده از شبکه‌های گروه بافتی متناظر خود مشترک هستند.

Gene Hubs	Network	Degree	Clustering coefficient	Closeness centrality	Betweenness centrality	Neighborhood connectivity
VCL	AmpVesi	8	0.07143	0.43077	0.67813	2.75
MYH11	AmpVesi	7	0.28571	0.33735	0.23942	3.42857
ACTA2	AmpVesi	6	0.4	0.33333	0.17063	4.0
ITGB3	AmpVesi	6	0.13333	0.37333	0.41887	3.0
MYL6	AmpVesi	5	0.3	0.4	0.52116	5.0
CS	Bulb	20	0.33684	0.32450	0.08909	10.45
TNNI2	Bulb	20	0.45789	0.38281	0.16461	11.5
TNNT3	Bulb	19	0.46198	0.37404	0.18405	11.68421
NDUFS2	Bulb	18	0.54901	0.33447	0.05235	13.0
CYC1	Bulb	17	0.60294	0.32026	0.01887	13.17647
ACTN3	Bulb	17	0.47794	0.35636	0.08032	11.82352
TNNT1	Bulb	17	0.54411	0.35	0.02791	12.11764
UQCRC2	Bulb	16	0.59166	0.32026	0.02358	12.9375
COX5A	Bulb	16	0.58334	0.32026	0.03538	12.9375
MDH2	Bulb	16	0.45	0.31715	0.03490	12.125
HSPA5	Epid	16	0.158333	0.352422	0.58872	4.875
CANX	Epid	12	0.212121	0.310077	0.15995	5.41666
ENPP1	Epid	12	0.454545	0.216802	0.05269	6.58333
ENTPD3	Epid	11	0.545454	0.258064	0.28105	7.45454
ENPP3	Epid	11	0.545454	0.216216	0.02769	7.18181
MANF	Epid	10	0.377777	0.305343	0.14213	7.6
PDIA4	Epid	10	0.377777	0.304182	0.04013	6.5
NME6	Epid	9	0.75	0.212765	0.00138	8.44444
NEK9	Epid	9	0.305555	0.252365	0.02761	5.22222
NME3	Epid	9	0.75	0.212765	0.00138	8.44444
PTPRC	Lymph	52	0.22247	0.44467	0.09876	17.84615
LCP2	Lymph	41	0.28658	0.42549	0.07206	19.12195
PIK3CA	Lymph	41	0.25243	0.43574	0.10012	18.53658
LCK	Lymph	40	0.33205	0.43227	0.05813	20.15
FYN	Lymph	36	0.33968	0.41333	0.04427	19.94444
ITGB2	Lymph	35	0.19663	0.41491	0.07038	14.85714
CD8A	Lymph	34	0.34046	0.41412	0.03189	20.55882
VAV1	Lymph	32	0.36491	0.41412	0.02873	21.875
IL2RG	Lymph	29	0.34482	0.41811	0.04126	21.58620
PTPN6	Lymph	28	0.41534	0.39889	0.01358	23.53571
CDC20	Test	44	0.31606	0.29773	0.03919	19.18181
AURKA	Test	42	0.30778	0.29494	0.06605	18.0
BUB1B	Test	41	0.32560	0.27950	0.03767	17.46341
PLK1	Test	39	0.33333	0.29329	0.04481	18.87179
UBC	Test	37	0.09759	0.30085	0.10630	10.54054
UBE2C	Test	32	0.47983	0.28416	0.01510	22.375
PDCD11	Test	28	0.32539	0.27015	0.01920	13.96428
SDAD1	Test	28	0.33597	0.25893	0.01332	13.53571
ESPL1	Test	27	0.56125	0.26694	0.00240	21.96296
KIF20A	Test	27	0.61253	0.27050	0.00759	22.48148



شکل ۵- دو ماژول برتر شناسایی شده از هریک از پنج شبکه تعاملی پروتئین - پروتئین (I) AmpVesi، (II) Bulb، (III) Epid، (IV) Lymph و (V) Test با استفاده از افزونه MCODE. ماژول‌ها I تا V شماره‌گذاری شده‌اند که نشان‌دهنده شبکه‌های مربوطه آن‌ها در شکل ۴ است. ماژول‌های (I) تا (V)، به ترتیب، شامل ۵، ۸، ۹ و ۷ رأس مشترک با ژن‌های هاب شبکه تعاملی (I) AmpVesi، (II) Bulb، (III) Epid، (IV) Lymph و (V) Test هستند.

جدول ۴- مسیرهای زیستی غنی شده حاوی ژن‌های هاب اصلی (۴۵ ژن هاب) در پنج شبکه تعاملی پروتئین- پروتئین (PPIN) منتج از پنج گروه بافتی. (الف) معیار انتخاب: حضور حداقل ۷ ژن هاب از هر شبکه در مسیر (برای شبکه تعاملی AmpVesi حداقل ۴ ژن هاب) و غنی‌سازی معنادار ($FDR \leq 0.05$). (ب) مسیرهای مشخص شده: مسیرهای مشترک بین حداقل دو شبکه تعاملی.

Common pathways	ID	Number of Hub genes in pathway	database	Group
binding	GO:0005488	5 genes	GO:MF	AmpVesi (5 hub genes)
protein binding	GO:0005515	4 genes	GO:MF	AmpVesi (5 hub genes)
Actin cytoskeleton	GO:0015629	4 genes	GO:CC	AmpVesi (5 hub genes)
Molecular function	GO:0003674	9 genes	GO:MF	Bulb (10 hub genes)
cytoplasm	GO:0005737	10 genes	GO:CC	Bulb (10 hub genes)
Molecular function	GO:0003674	10 genes	GO:MF	Epid (10 hub genes)
catalytic activity	GO:0003824	8 genes	GO:MF	Epid (10 hub genes)
Molecular function	GO:0003674	9 genes	GO:MF	Lymph (10 hub genes)
binding	GO:0005488	9 genes	GO:MF	Lymph (10 hub genes)
protein binding	GO:0005515	8 genes	GO:MF	Lymph (10 hub genes)
lymphocyte activation	GO:0046649	7 genes	GO:BP	Lymph (10 hub genes)
cellular component	GO:0005575	10 genes	GO:CC	Lymph (10 hub genes)
membrane	GO:0016020	9 genes	GO:CC	Lymph (10 hub genes)
Immune system process	GO:0002376	7 genes	GO:BP	Lymph (10 hub genes)
Cell activation	GO:0001775	7 genes	GO:BP	Lymph (10 hub genes)
Molecular function	GO:0003674	9 genes	GO:MF	Test (10 hub genes)
binding	GO:0005488	8 genes	GO:MF	Test (10 hub genes)
protein binding	GO:0005515	7 genes	GO:MF	Test (10 hub genes)
intracellular organelle	GO:0043229	9 genes	GO:CC	Test (10 hub genes)
cellular component	GO:0005575	9 genes	GO:CC	Test (10 hub genes)
membrane-bounded organelle	GO:0043227	9 genes	GO:CC	Test (10 hub genes)

بحث

در این مطالعه با تکیه بر رویکردهای بیوانفورماتیکی و تحلیل داده‌های بیان ژنی (GSE35615)، پس از انجام مراحل پیش‌پردازش، شناسایی ژن‌های با تفاوت بیان معنادار، استخراج شبکه‌های تعاملی پروتئین-پروتئین و تحلیل ماژول‌های عملکردی، موفق به شناسایی ۴۵ ژن هاب در پنج گروه بافتی (Lymph, Epid, Bulb, AmpVesi, Test) شدیم. از میان این ژن‌ها، ۳۷ ژن با رئوس ماژول‌های اصلی شبکه هم‌پوشانی داشتند و در آنالیز GO نیز در مسیرهای زیستی پرتکراری همچون اتصال مولکولی^۷، اتصال پروتئینی^۸، عملکرد مولکولی^۹ و مؤلفه سلولی^{۱۰} مشارکت داشتند (FDR<0.05). بررسی عملکرد مسیر اتصال مولکولی به برهم‌کنش‌های غیرکووالانسی و انتخابی میان ماکرومولکول‌ها اشاره دارد که در فرایندهای مهمی همچون سیگنال‌دهی، تاخوردگی پروتئین و پایداری کمپلکس‌های زیستی نقش ایفا می‌کند (۲۵). مسیر اتصال پروتئینی به توانایی تعامل بین پروتئین‌ها می‌پردازد که برای فعالیت‌هایی چون تنظیم چرخه سلولی، پاسخ به استرس، تحرک سلولی و کنترل آپوپتوز ضروری است (۲۶). همچنین مسیر عملکرد مولکولی فعالیت‌های مستقیم یک پروتئین را در سطح مولکولی توصیف می‌کند (۲۷). این فرایند بر چگونگی فرایندهای زیستی که توسط ماشین‌های ماکرومولکولی از طریق تعامل مستقیم با مولکول‌های دیگر اجرا می‌شوند و نیز بر نقش‌های عملکردی محصولات ژنی تأکید می‌کند. درک این فرایندهای مولکولی می‌تواند کاربردهای عملی در زیست‌فناوری داشته باشد، مانند شناسایی چگونگی تأثیر جهش در ژن‌ها بر عملکرد محصولات آن‌ها و منجر شدن به بیماری‌ها. مسیر مؤلفه سلولی نیز به مکان‌هایی درون سلول اشاره دارد که این عملکردها در آن‌ها رخ می‌دهد، از جمله میتوکندری، غشای سلولی و اسکلت سلولی (۲۷). این مسیرها با توجه به تحلیل GO در بین تمامی گروه‌های بافتی پرتکرار و مشترک بودند که نشان‌دهنده نقش بنیادی آن‌ها در سازوکارهای زیستی مرتبط با تولید مثل و عملکرد اسپرم است. در ادامه، بررسی ژن‌های اصلی در پایگاه‌های معتبر NCBI Gene، UniProtKB و MedlinePlus Genetics نشان داد که در گروه AmpVesi، ژن‌هایی مانند ACTA2، VCL و ITGB3

7. binding
8. protein binding
9. molecular function
10. cellular component

فرایندهای اتصال سلولی و انقباض عضله نقش دارند. این عملکردها می‌توانند در تحرک اسپرم و تثبیت آن در محیط دستگاه تناسلی مؤثر باشند، به‌ویژه در شرایط انجماد و انتقال مصنوعی. در گروه Bulb، ژن‌های TNNT3، TNNT2، COX5A، UQCRC2 و CYC1 با تنظیم متابولیسم انرژی و فسفوریلاسیون اکسیداتیو مرتبطند که برای تأمین انرژی حرکتی اسپرم و مقابله با استرس انجماد اهمیت دارند. در گروه Epid، ژن‌هایی مانند HSPA5، CANX و PDIA4 در پاسخ به استرس، تاخوردگی پروتئین و عملکرد چاپرون‌ها فعالیت دارند. این ژن‌ها نقشی حیاتی در حفظ ساختار و عملکرد اسپرم پس از فرایندهای انجماد و ذوب دارند و می‌توانند کیفیت اسپرم پس از ذوب را بهبود بخشند. در گروه Lymph، حضور ژن‌هایی همچون IL2RG، FYN، PIK3CA، PTPRC نشان‌دهنده مشارکت سیستم ایمنی در تنظیم شرایط التهابی مرتبط با بیماری بروسلا/وویس است. این وضعیت می‌تواند بر غلظت اسپرم، تخریب DNA اسپرم و افت قدرت باروری تأثیرگذار باشد. در گروه Test، ژن‌های CDC20، BUB1B، PLK1 و AURKA در تنظیم تقسیم سلولی، چرخه میتوز و اسپرماتوزن نقش دارند. هرگونه اختلال در این مسیرها می‌تواند مستقیماً بر غلظت، مورفولوژی و کیفیت اسپرم اثر بگذارد. پس از بررسی عملکرد ۴۵ ژن شناسایی شده که نقش کنترل‌کنندگی بیشتری نسبت به سایر ژن‌ها دارند و در برخی پژوهش‌ها نشان داده شده که چندین ژن از این ژن‌ها با ویژگی‌های مهم مایع منی مرتبط‌اند، مانند (الف) حجم: ژن‌های دخیل در رشد و عملکرد بیضه می‌توانند بر حجم کلی منی تولیدشده تأثیر بگذارند؛ (ب) تحرک: ژن‌های مربوط به انقباض عضلانی و متابولیسم انرژی برای تحرک اسپرم، که عامل مهم تعیین‌کننده کیفیت مایع منی است، بسیار مهم‌اند؛ (پ) غلظت: ژن‌های دخیل در اسپرم‌زایی مستقیماً بر غلظت اسپرم در انزال تأثیر می‌گذارند؛ (ت) تحرک پس از ذوب: ژن‌های مربوط به پاسخ استرس و عملکردهای چاپرون برای حفظ زنده ماندن اسپرم پس از فرایندهای انجماد و ذوب، که در شیوه‌های لقاح آزمایشگاهی رایج‌اند، حیاتی هستند (۲۸-۳۰). بنابراین، اگرچه تحلیل داده‌های این تحقیق براساس مدل محاسباتی و فاقد اعتبارسنجی آزمایشگاهی هستند، نتایج به‌دست‌آمده پتانسیل بالقوه‌ای برای پژوهش‌های بیشتر در زمینه تأثیر بیماری بروسلا/وویس بر لقاح آزمایشگاهی و کیفیت اسپرم در گوسفندان فراهم می‌کنند و به‌صورت بالقوه می‌توان از

2. Galluzzo P, Migliore S, Cascio S, Barreca S, Alfano M, Tagliarini A, et al. Diagnostic Findings in a Confirmed Outbreak of *Brucella ovis* Infection in a Traditional Sheep Farm in Sicily (South-Italy). *Pathogens*. 2021;10(11):1472.
3. Costa LF, Pessoa MS, Guimarães LB, Faria AKS, Morão RP, Mol JPDs, et al. Serologic and molecular evidence of *Brucella ovis* infection in ovine and caprine flocks in the State of Minas Gerais, Brazil. *BMC Res Notes*. 2016;9(1):190. {10.1186/s13104-016-1998-2}
4. Picard-Hagen N, Berthelot X, Champion JL, Eon L, Lyaz-rhi F, Marois M, et al. Contagious epididymitis due to *Brucella ovis*: relationship between sexual function, serology and bacterial shedding in semen. *BMC Vet Res*. 2015;11(1):125. {10.1186/s12917-015-0440-7}
5. Machado G, Santos D, Kohek I, Stein M, Hein H, Poeta A, et al. Seroprevalence of *Brucella ovis* in rams and associated flock level risk factors in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Prev Vet Med*. 2015;121(1-2):183-7.
6. Carrera-Chávez JM, Quezada-Casasola A, Pérez-Eguia E, Itzá-Ortiz MF, Gutiérrez-Hernández JL, Quintero-Elisea JA, et al. Sperm quality in naturally infected rams with *Brucella ovis*. *Small Rumin Res*. 2016;144:220-4. {https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.09.021}
7. Branscom LA, Cornish TE, Sondgeroth KS. Evaluation of serologic testing of rams in the management of *Brucella ovis* in a domestic sheep flock. *J Vet Diagn Invest*. 2019;31(1):86-9. {10.1177/1040638718814591}
8. Yáñez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil JE, Miró J, Yeste M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Anim Reprod Sci*. 2022;246:106904. {https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904}
9. Galindo RC, Muñoz PM, de Miguel MJ, Marin CM, Blasco JM, Gortazar C, et al. Differential expression of inflammatory and immune response genes in rams experimentally infected with a rough virulent strain of *Brucella ovis*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;127(3):295-303. {https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.326}
10. Zhou Z, Gu G, Luo Y, Li W, Li B, Zhao Y, et al. Immunological pathways of macrophage response to *Brucella ovis* infection. *Innate Immun*. 2020;26(7):635-48. {10.1177/1753425920958179}
11. Braun R. Systems analysis of high-throughput data. *Adv Exp Med Biol*. 2014;844:153-87. {10.1007/978-1-4939-2095-2_8}
12. Molinelli EJ, Korkut A, Wang W, Miller ML, Gauthier NP, Jing X, et al. Perturbation biology: inferring signaling networks in cellular systems. *PLoS comput biol*. 2013;9(12):e1003290.
13. Kitano H. Systems biology: a brief overview. *Science*. 2002;295(5560):1662-4. {10.1126/science.1069492}
14. He Y. Analyses of *Brucella* Pathogenesis, Host Immunity, and Vaccine Targets using Systems Biology and Bioinfor-

آن‌ها به‌عنوان سنگ‌بنای طراحی پژوهش‌های تجربی با اهداف باروری، اصلاح نژاد و بهبود شاخص‌های اقتصادی در دام‌های کوچک استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش حاکی از آن است که برخی ژن‌های اصلی شناسایی‌شده در شبکه‌های تعاملی پروتئینی و مسیرهای عملکردی مشترک می‌توانند در ارتباط با فرایندهای زیستی مرتبط با باروری گوسفندان نقش داشته باشند. اگرچه در این مطالعه هیچ آزمایش ترنسکریپتومیک، اپی‌ژنتیکی یا عملکردی انجام نشده است، اما تحلیل داده‌ها با ابزارهای بیوانفورماتیکی معتبر نشان داد که بیماری بروسلا / اوویس احتمالاً می‌تواند با تأثیر بر بیان ژن‌ها و مسیرهای زیستی اصلی، کیفیت مایع منی و موفقیت لقاح آزمایشگاهی در گوسفند را تغییر دهد. بنابراین، این ژن‌ها و مسیرها، نه تنها به‌عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه در شناسایی آثار بیماری بروسلا / اوویس، بلکه به‌عنوان اهداف مداخله‌ای در بهبود سیستم‌های لقاح آزمایشگاهی و ذوب و انجماد / اسپرم در دامپزشکی قابلیت بررسی بیشتر را دارند. پژوهشگران حوزه تولیدمثل دامی و زیست‌شناسی مولکولی می‌توانند با استفاده از داده‌های این مطالعه، طراحی آزمایش‌های تجربی را در اولویت قرار دهند تا به درک دقیق‌تری از نقش این ژن‌ها در عملکرد اسپرم و موفقیت لقاح آزمایشگاهی در گوسفندان دست یابند.

سپاسگزاری

از پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی (RIMBT) دانشگاه زنجان و همچنین دکتر خسرو خلیفه به پاس راهنمایی‌ها و زحماتشان در تدوین این مقاله، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند در رابطه با این پژوهش هیچگونه تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

1. World Organisation for Animal H. Ovine epididymitis (*Brucella ovis*). 2021.

- maths. Front Cell Infect Microbiol. 2012;Volume 2 - 2012. {10.3389/fcimb.2012.00002}
15. Ma'ayan A. Introduction to network analysis in systems biology. Sci Signal. 2011;4(190):tr5. {10.1126/scisignal.2001965}
16. Azevedo J, Antunes P, Allendorf S, Appolinário C, Peres M, Ferreira Vicente A, et al. Microarray Analysis of Gene Expression in Rams Experimentally-Infected with the Virulent Strain of Brucella ovis. J Biotechnol Biomater. 2015;5. {10.4172/2155-952X.1000203}
17. Marín CM, Jiménez de Bagués MP, Blasco JM, Gamazo C, Moriyón I, Díaz R. Comparison of three serological tests for Brucella ovis infection of rams using different antigenic extracts. Vet Rec. 1989;125(20):504-8. {10.1136/vr.125.20.504}
18. Manterola L, Tejero-Garcés A, Ficapal A, Shopayeva G, Blasco JM, Marin CM, et al. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of Brucella ovis infection in semen samples from rams. Vet Microbiol. 2003;92(1-2):65-72. {10.1016/s0378-1135(02)00310-3}
19. Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. Philos Trans A Math Phys Eng Sci. 2016;374(2065):20150202. {10.1098/rsta.2015.0202}
20. Yang W, Speed TP. Design and Analysis of Comparative Microarray Experiments. Stat Anal Gene Expr Microarray Data. 2003. {10.1201/9780203011232.ch2}
21. Saint-Antoine MM, Singh A. Network inference in systems biology: recent developments, challenges, and applications. Curr Opin Biotechnol. 2020;63:89-98. {10.1016/j.copbio.2019.12.002}
22. Shojaie A. Differential Network Analysis: A Statistical Perspective. Wiley Interdiscip Rev Comput Stat. 2021;13(2). {10.1002/wics.1508}
23. Ignatiadis N, Klaus B, Zaugg JB, Huber W. Data-driven hypothesis weighting increases detection power in genome-scale multiple testing. Nat Methods. 2016;13(7):577-80. {10.1038/nmeth.3885}
24. Erciyes K. Graph-theoretical analysis of biological networks: a survey. Computation. 2023;11(10):188.
25. Khazaal A, Vafae F. From Static to Dynamic: Exploring Temporal Networks in Systems Biology. arXiv preprint arXiv:250510741. 2025.
26. HEY AW, BROWNE CA, THORBURN GD. Fetal Sheep Serum Contains a High Molecular Weight Insulin-Like Growth Factor (IGF) Binding Protein that Is Acid Stable and Specific for IGF-II*. Endocrinology. 1987;121(6):1975-84. {10.1210/endo-121-6-1975}
27. Clark EL, Bush SJ, McCulloch ME, Farquhar IL, Young R, Lefevre L, et al. A high resolution atlas of gene expression in the domestic sheep (Ovis aries). PLoS genet. 2017;13(9):e1006997.
28. Stremming J, White A, Donthi A, Batt DG, Hetrick B, Chang EI, et al. Sheep recombinant IGF-1 promotes organ-specific growth in fetal sheep. Front Physiol. 2022;13:954948. {10.3389/fphys.2022.954948}
29. Fu X, Yang Y, Yan Z, Liu M, Wang X. Transcriptomic Study of Spermatogenesis in the Testis of Hu Sheep and Tibetan Sheep. Genes (Basel). 2022;13(12). {10.3390/genes13122212}
30. Hodge MJ, de Las Heras-Saldana S, Rindfleish SJ, Stephen CP, Pant SD. QTLs and Candidate Genes Associated with Semen Traits in Merino Sheep. Animals (Basel). 2023;13(14). {10.3390/ani13142286}