

بررسی بیان ژن *CD8B* در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی *CD8B gene expression in different tissues of Kermani sheep*

دیانا شبان جرجندی^۱، احمد آیت اللهی مهرجردی^۱، محمدرضا محمدآبادی^{۲*}، فاطمه ابارقی^۱، افروز گلکار^۳، حمید خیرالدین^۴، محمد سفلائی^۵

- ۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران
- ۲- استاد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران
- ۳- دانش‌آموخته بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- ۴- استادیار، دانشکده کویرشناسی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
- ۵- استادیار مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان، ایران

Shaban Jorjandy D¹, Ayatollahi Mehrjardi A¹, Mohammadabadi M^{*2}, Abaregh F¹,
Golkar A³, Kheyroodin H⁴, Soflaei M⁵

- 1- MSc Student, Associate Professor, MSc Student, Department of Animal Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
- 2- Professor, Department of Animal Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
- 3- Graduated Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
- 4- Assistant Professor, Semnan University, Semnan, Iran
- 5- Assistant Professor, Kerman Agriculture and Natural Resources and Education Center, AREEO, Kerman, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mrm@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۸

چکیده

درک شاخص‌های اساسی ایمنی، به‌ویژه پارامترهای لنفوسیت T، برای تحقیق در مورد بیماری‌ها و واکنش‌های گوسفند و درک بهتر پاسخ ایمنی به باکتری‌ها و ویروس‌ها جهت کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و بهبود آسایش گوسفند ضروری است. ژن *CD8B* (ژن کدکننده زنجیره بتا گلیکوپروتئین سطح سلول T)، یک مولکول گیرنده مشترک و انتقال سیگنال است که عمدتاً بر روی سطح سلول‌های T کشنده بیان می‌شود. لذا، با توجه به نقش و اهمیت این ژن بر سیستم ایمنی، در مطالعه حاضر بیان این ژن در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق از بافت‌های طحال، کبد و قلب سه رأس بزرگ نر نژاد کرمانی در هنگام کشتار نمونه‌گیری شد. RNA کل استخراج و cDNA ساخته شد. برای بررسی میزان نسبی بیان ژن‌ها از واکنش PCR در زمان واقعی به روش Syber Green استفاده شد. در این مطالعه از ژن β -actin به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از PCR در زمان واقعی و محاسبه مقدار تغییرات بیان ژن، از نرم‌افزار Prism، روش $\Delta\Delta CT$ استفاده شد. نتایج نشان داد که *CD8B* در هر سه بافت، با بیان بیشتر در بافت کبد (۱۸/۰۶) و طحال (۱۶/۲۸) و بیان کمتر در بافت قلب (۱/۹۴) بیان شد. اختلاف بین تمام بافت‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$). بیان در بافت کبد و طحال به‌طور قابل توجهی بیشتر از بافت قلب بود ($P < 0.001$). به‌طور کلی، با وجود اینکه بیان *CD8B* در بافت‌های مرتبط با ایمنی بالاتر بود، بیان در تمامی بافت‌ها معنی‌دار شد. بنابراین، می‌توان با انجام آزمایش‌های تکمیلی و درک مکانیسم‌های مربوطه، علت تغییر بیان را یافت و در بهبود عملکرد دام‌ها با استفاده از تغییر بیان این ژن اقدام نمود.

واژه‌های کلیدی

PCR در زمان واقعی

ژن *CD8B*

طحال

قلب

کبد

بهبود صفات فنوتیپی و ژنتیکی آن اثرات مثبتی بر نیازهای این نژاد خواهد داشت.

از طرفی، سیستم ایمنی در تولید و تولید مثل گوسفند نقش حیاتی دارد. درک شاخص‌های اساسی ایمنی، به‌ویژه پارامترهای لنفوسیت T، برای تحقیق در مورد بیماری‌ها و واکسن‌های گوسفند و درک بهتر پاسخ ایمنی به باکتری‌ها و ویروس‌ها جهت کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و بهبود سلامت گوسفند ضروری است. همچنین اگرچه حیوانات کوچک مانند موش‌ها مدل‌های زیست پزشکی استاندارد برای مطالعه بسیاری از بیماری‌های انسان و حیوان هستند، با این وجود نمی‌توان از آن‌ها برای مطالعه بیماری‌های مربوط به نشخوارکنندگان استفاده کرد (Melzi et al. 2018). گوسفند به‌دلیل فراوانی و پراکندگی زیاد، اندازه مناسب، در دسترس بودن و سهولت پرورش، مدل حیوانی مناسبی در نشخوارکنندگان است. این حیوان به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان مدل‌های حیوانی برای درک مکانیسم‌های ایمنی اولیه، با نتایج رضایت‌بخش استفاده شده است (Carrasco et al. 2022; Yang et al. 2018). در مطالعه‌ای (Orbegozo-Medina et al. 2022) شاخص‌های ایمنی مرتبط با سلول را در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی گوسفند تجزیه و تحلیل کردند و دریافتند که لنفوسیت‌های T، نقش اساسی در پاسخ ایمنی در برابر عفونت‌ها، مانند عفونت‌هایی که توسط ویروس‌ها و باکتری‌ها ایجاد می‌شوند، ایفا می‌کنند. همچنین سلول‌های $CD4^+ T$ و $CD8^+ T$ به حذف پاتوژن‌ها در طول عفونت کمک می‌کنند.

ژن *CD8* (cluster of differentiation 8)، گلیکوپروتئین سطح سلول T یک مولکول گیرنده مشترک و انتقال سیگنال است که عمدتاً بر روی سطح سلول‌های $CD8^+ T$ بیان می‌شود (Carlberg and Velleuer 2022; Kioussis and Ellmeier 2002). مولکول‌های مجموعه سازگاری بافتی اصلی (MHC) را با همکاری با گیرنده‌های مشترک سلول T شناسایی می‌کند. با این وجود برای پروتئین MHC کلاس I اختصاص دارد (James et al. 2022). گیرنده مشترک *CD8* عمدتاً در سطح سلول‌های T سیتوتوکسیک بیان می‌شود. همچنین می‌توان آن را روی سلول‌های کشنده طبیعی، تیموسیت‌های قشر مغز و سلول‌های دندریتیک یافت. مولکول *CD8* یک نشانگر برای جمعیت

گوسفند یک‌گونه مهم دامی در سراسر جهان و یک مدل حیاتی از حیوانات بزرگ برای دامداری و تحقیقات دامپزشکی است (Yang et al. 2022). به‌طورکلی گوسفند اهلی یک دام چند منظوره است و به‌خصوص از نظر تولید گوشت، پشم، پوست و شیر مورد توجه است. گوسفند از جمله دام‌هایی است که می‌تواند آب‌وهوای متغیر و خشک را تحمل کند و با فقیرترین علوفه و غذاها به رشد خود ادامه دهد؛ به همین سبب در بیشتر کشورهای دنیا از نقطه نظر اقتصادی در رتبه اول قرار دارد (Amiri Roudbar et al. 2018; Safaei et al. 2022). گوسفندان در مناطق مختلف و زیست‌بوم‌های متفاوت دارای نژادهای گوناگونی هستند. گزارش‌ها حاکی از پرورش بیش از ۵۰ میلیون رأس و حدود ۲۷ نژاد و اکوتیپ گوسفند در ایران است (Mohammadabadi et al. 2022). نژادهای گوناگون گوسفندان دارای خصوصیات مختلفی هستند. این تفاوت خصوصیات می‌تواند شامل ظاهر گوسفندان و یا حتی تولیدات آن‌ها باشد. دامداران معمولاً در هر منطقه‌ای که باشند معمولاً گوسفندانی را پرورش می‌دهند که مختص همان زیستگاه باشند چون شرایط محیطی تأثیر بالایی در رشد و ماندگاری گوسفندان دارد (Mohammadifar and Mohammadabadi 2011). ممکن است نژاد کرمانی بتواند در شرایط آب‌وهوایی مختلف به زیست خود ادامه دهد. با این وجود روند رشد آن در خواستگاه اصلی دام بیشتر است و سریع‌تر رشد می‌کند. لذا، نگهداری هر گوسفند زنده در زیستگاه اصلی در هزینه‌ها صرفه‌جویی می‌کند و باعث می‌شود دام موردنظر زودتر رشد کند و به بهره‌برداری برسد. گوسفند کرمانی یکی از مهم‌ترین و معروف‌ترین گوسفندان ایرانی و یکی از منابع درآمد دامداران این استان است (Arabpour et al. 2021). گوسفندان کرمانی اغلب در شهرهایی مانند جیرفت، شهر بابک، کهنوج، سیرجان و بافت مشاهده می‌شود. درواقع زیست بوم اصلی این گوسفندان در این نواحی هست و پرورش آن‌ها در دشت‌ها و روستاهای این نواحی به‌وفور دیده می‌شود. گوسفند کرمانی جزء نژادهای پشمی و گوشتی می‌باشد و هم پشم و هم گوشتی که از این‌گونه گوسفندان به‌دست می‌آید مرغوبیت بالایی دارد (Shahsavari et al. 2022). بنابراین، توجه به پرورش این گوسفند برای توسعه و

۲۶۰ نانومتر جهت تعیین میزان غلظت RNA و از نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ نیز برای اطمینان از عدم وجود آلودگی (آلودگی پروتئینی، فنلی، الکلی و ...) استفاده شد که در مورد RNA این نسبت‌ها به ترتیب باید بین ۱/۸-۲ باشد.

RNA به علت تک‌رشته‌ای بودن و پایداری نسبی کم جهت تکثیر در واکنش PCR مناسب به نظر نمی‌رسد. بنابراین، باید پس از رونوشت معکوس به DNA مکمل (Complementary DNA/ cDNA) مورد آزمایش قرار گیرد. جهت ساخت DNA مکمل، از کیت شرکت پارس‌توس استفاده شد. آنزیم RT مورد استفاده از نوع H-Minus و استخراج شده از ویروس Moloney Murine Leukemia بود. واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل مواد مندرج در جدول ۱ بود. واکنش‌های PCR برای ساخت cDNA طبق پروفایل حرارتی جدول ۲ انجام شد.

جدول ۱- مقدار و مواد مورد استفاده در هر واکنش PCR در زمان واقعی

نوع ماده	مقدار مورد استفاده
RNA	1µg
Buffer-mix	1µg
Enzyme mix	1µg
Water (ddw)	UP TO 20µg

جدول ۲- مقدار و مواد مورد استفاده در هر واکنش PCR در زمان واقعی

مدت زمان	درجه حرارت	مرحله انجام شده
۱۰ دقیقه	۲۵°C	انکوبه
۶۰ دقیقه	۹۴°C	ساخت cDNA
۵ دقیقه	۵۷°C	توقف ساخت

در این پژوهش استخراج RNA و تولید cDNA در هر نمونه به‌طور جداگانه انجام می‌شود، احتمال بروز خطا و تفاوت مقدار RNA وارد شده به واکنش ساخت cDNA در نمونه‌های مختلف مورد بررسی وجود دارد. جهت حذف خطا و تفاوت‌های احتمالی بین نمونه‌ها از یک کنترل داخلی تحت عنوان ژن مرجع استفاده می‌شود. یعنی هم‌زمان با بررسی کمی ژن مورد نظر، بیان ژن مرجع نیز مورد سنجش قرار می‌گیرد.

از آنجاکه توالی ژن‌های CD8B و β-actin (به عنوان ژن مرجع) در بانک ژن موجود بود، آغازگرهای این دو ژن بر اساس توالی‌های موجود در بانک ژن طراحی شدند (جدول ۳).

سلول‌های سیتوتوکسیک است (McCluggage and Maxwell 1999). سلول‌های T سیتوتوکسیک با پروتئین سطح CD8 به نام سلول‌های CD8⁺ T نامیده می‌شوند. پروتئین CD8 از یک هومودایمر متشکل از زنجیره‌های α/α و یک هتروداایمر متشکل از زنجیره‌های α/β تشکیل شده است (Sakaguchi et al. 2010). زنجیره‌های α و β مولکول CD8 به ترتیب توسط ژن‌های CD8A و CD8B کدگذاری می‌شوند (Wang et al. 2015). گزارش‌های قبلی در مورد ژن CD8B عمدتاً بر روی بافت‌های مرتبط با سیستم ایمنی مانند ریه و لنف متمرکز بوده است. همچنین مطالعات قبلی نشان داد که چندریختی در CD8B عمدتاً با ایمنی مرتبط است (Kayesh et al. 2020). تا کنون بیان ژن CD8B در نشخوارکنندگان کوچک، به‌ویژه گوسفند مورد مطالعه قرار نگرفته است. لذا، هدف از این پژوهش بررسی بیان ژن CD8B در بافت‌های طحال، کبد و قلب گوسفند کرمانی با استفاده از PCR در زمان واقعی بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از بافت‌های طحال، کبد و قلب سه رأس بره نر نژاد کرمانی (برای هر بافت سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد) در هنگام کشتار با رعایت شرایط حفظ RNA نمونه‌گیری شد. RNA کل با استفاده از کیت شرکت دنازیست و طبق پروتکل مندرج در آن با تغییرات جزئی، استخراج و در دمای ۸۰°C- نگهداری شد. از آنجایی که ناخالص بودن RNA می‌تواند ساخت cDNA و در ادامه آن واکنش PCR را با مشکل مواجه کند؛ جهت تعیین کمیت (میزان غلظت) و کیفیت RNA استخراج‌شده، از دو روش الکتروفورز RNA روی ژل آگارز دو درصد و دستگاه نانودراپ استفاده شد.

همچنین جهت رنگ‌آمیزی ژل از staine Safe DNA و جهت افزایش چگالی و رنگ‌آمیزی محصولات از رنگ حاوی بروموفنل بلوگلیسرول استفاده شد. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل در دستگاه UV Gel document قرار گرفت و با تابش اشعه‌ی ماوراءبنفش (U.V) باندهای RNA موجود مشاهده شد. همین‌طور با استفاده از شناساگر استاندارد ۱۰۰ جفت‌بازی، اندازه‌ی محصول بررسی شد. در روش نانودراپ هم از میزان جذب نمونه‌ها در طول موج

جدول ۳- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای ژن‌های CD8B و بتا‌کتین

ژن	توالی آغازگرها	طول قطعه (جفت باز)	شماره دسترسی
CD8B	Fwd: 5' CCAGGCCCTGAGCACTAGCAGTCAC 3' Rev: 5' GCTGAGTTCCCGTCCCAAAGATCAGGT 3'	۲۲۱	XM_004007264.5
β-Actin	Fwd: 5' CTCACGGAGCGTGGCTACA 3' Rev: 5' GCCATCTCCTGCTCGAAGTC 3'	۱۰۲	NM_001009784.3

برای تعیین دقیق مقدار بیان ژن به منحنی استاندارد نیاز است. منحنی استاندارد با استفاده از نمونه‌ی کنترل با غلظت مشخص رسم می‌شود. به این ترتیب که رقت‌های مختلف از نمونه‌ی استاندارد با غلظت مشخص تهیه نموده و پس از انجام PCR، منحنی مقادیر CT برای رقت‌های مختلف در مقابل غلظت رسم می‌شود. در روش سنجش نسبی بیان ژن‌ها تعداد کپی موجود مهم نیست و فقط تغییرات بیان ژن بررسی می‌شود. مبنای مقایسه تفاوت‌های CT در نمونه‌های ژن CD8B و ژن مرجع است. به عبارت دیگر مقادیر CT در نمونه‌هایی که تحت تیمار دارویی یا آزمایش‌های متفاوت بوده‌اند با CT نمونه‌ی نرمال مقایسه می‌شود. همانند روش نیمه کمی در استفاده از PCR معمولی مقادیر CT هم در نمونه‌ی مورد آزمایش و هم در بافت نرمال نسبت به ژن استاندارد (رفرنس) نرمال یا تصحیح می‌شود. چندین روش برای سنجش نسبی بیان ژن‌ها ابداع شده است از جمله مدل Pfaffl (2002).

برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از Real Time-PCR، محاسبه راندمان واکنش PCR و محاسبه سیکل آستانه (Cq) از نرم‌افزار Rotor-Gene Q Series Software و GraphPad Prism 8 استفاده شد. تغییرات بیان ژن بین گروه تیمار و کنترل به روش آنالیز آماری T-test مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین برای ارزیابی تغییرات بیان ژن بین گروه‌های تیمار از روش آنالیز آماری One-way ANOVA استفاده شد و با تعیین p-value سطح معنی‌داری نتایج مشخص شد. معنی‌داری آماری همه آزمایش‌ها در سطح ۵ درصد ($P < 0.05$) بررسی شد. همچنین در این نرم‌افزار رسم نمودارها با میانگین داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{S.E.M}$ برای هر گروه نشان داده شد.

فرمول‌های استفاده شده جهت آنالیز داده‌ها

$$\Delta \text{CT} = \text{CT}(\text{CD8B}) - \text{CT}(\text{B-act})$$

به این منظور توالی ژن CD8B از بانک ژن ensemble (<http://www.ensembl.org>) گرفته شد و آغازگرهایی با استفاده از سایت Primer3 plus طراحی و با استفاده از سایت Nupack و NCBI بررسی شدند. پس از بهینه‌سازی واکنش PCR (به روش گرایان دمایی و آغازگرهای اختصاصی)، با استفاده از الکتروفورز از تولید یک قطعه با سایز مورد نظر (CD8B:221, β-actin:102) طی فرایند PCR اطمینان حاصل شد. سپس آغازگرها برای استفاده در واکنش‌های PCR در زمان واقعی مناسب تشخیص داده شدند و PCR در زمان واقعی با استفاده از دستگاه QIAGEN Hilden انجام شد. برای بررسی میزان نسبی بیان ژن‌ها از واکنش PCR در زمان واقعی استفاده شد. واکنش‌های PCR در زمان واقعی در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل مواد مندرج در جدول ۴ بود.

جدول ۴- مقدار و مواد مورد استفاده در هر واکنش PCR در زمان واقعی

نوع ماده	مقدار مورد استفاده
مخلوط مستر با رنگ سایبرگرین	7.5 μL
آغازگر Forward و Reverse (10 pmol/μ)	1.5 μL
cDNA (20 ng/μ)	1 μL
آب (ddw)	Up to 15 μL

واکنش‌های PCR در زمان واقعی برای تکثیر هر ژن طبق پروتکل حرارتی واکنش جدول ۵ انجام شدند.

جدول ۵- برنامه حرارتی PCR در زمان واقعی

مرحله انجام شده	درجه حرارت	مدت زمان
واسرشت سازی اولیه (جدایی دو رشته DNA)	۹۵°C	۵ دقیقه
واسرشت سازی هر چرخه	۹۵°C	۲۰ دقیقه
اتصال آغازگر به توالی هدف در DNA	۶۳°C	۳۰ دقیقه
بسط و ساخت رشته جدید	۷۲°C	۲۰ دقیقه
تکثیر نهایی	۷۲°C	۸ دقیقه



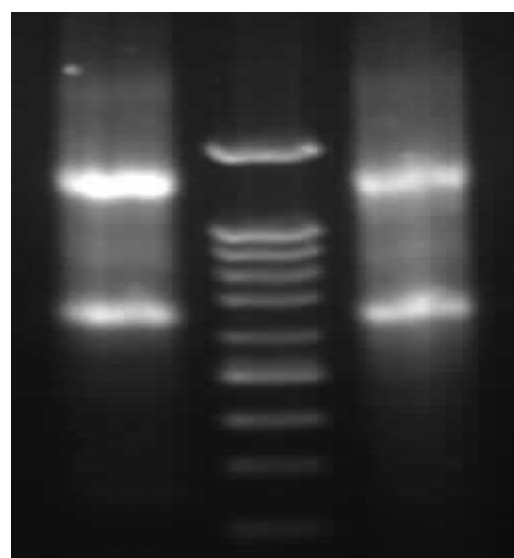
شکل ۳- الکتروفورز PCR با آغازگر بتاآکتین جهت سنجش cDNA ساخت شده بر روی ژل ۱ درصد

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{Treat}) - \Delta CT(\text{Control})$$

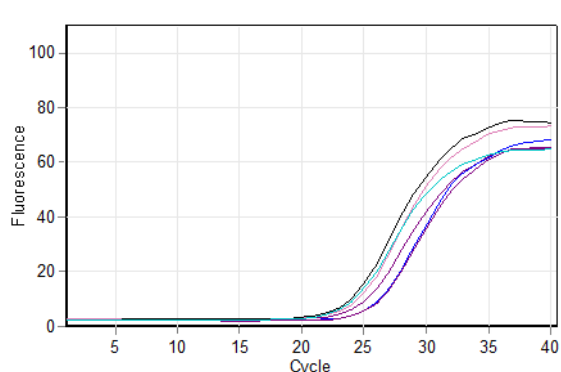
$$= 2^{-\Delta\Delta CT}$$

نتایج و بحث

نتایج الکتروفورز (شکل ۱) نشان داد که RNA کل استخراج شده در نمونه‌های مورد بررسی دارای باندهای rRNA 18S و rRNA 28S واضح و کاملاً سالم است. همچنین نتایج نانودراپ نشان داد نمونه‌ها فاقد آلودگی به پروتئین و فنول بودند (شکل ۲).



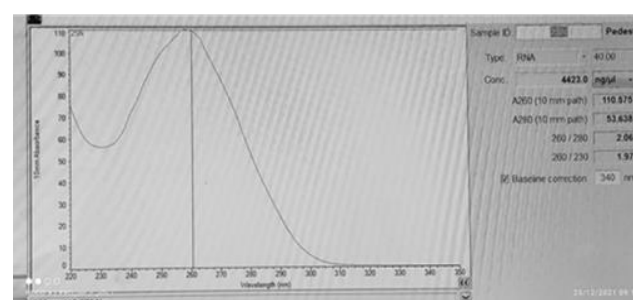
شکل ۱- دو نمونه RNA استخراج شده بر روی ژل



شکل ۴- منحنی تکثیر PCR در زمان واقعی ژن *CD8B* در بافت طحال

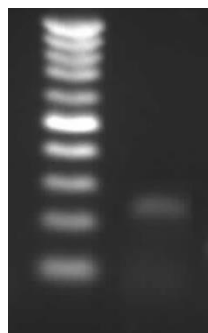
نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که نمونه‌های بافت قلب مربوط به این ژن (شکل ۵) در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد یک پیک تولید کردند که این نشان‌دهنده تولید یک محصول اختصاصی در این واکنش است.

ژن *CD8B* در همه بافت‌های طحال، کبد و قلب گوسفند کرمانی به ترتیب به مقدار ۱۸,۰۶۳، ۱۶,۲۷۶ و ۱,۹۴ بیان شد (شکل ۶). بیشترین افزایش بیان مربوط به بافت کبد و سپس بافت طحال و کمترین مقدار افزایش بیان مربوط به بافت قلب بود. بین هر سه



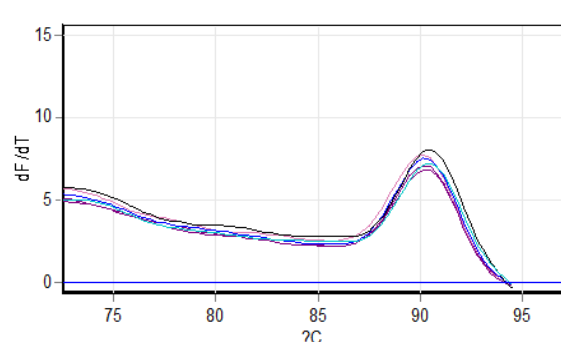
شکل ۲- نمونه‌ای از تعیین غلظت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ

جهت سنجش cDNA ساخته شده، PCR با آغازگر بتاآکتین صورت گرفت. وجود باند اختصاصی با اندازه مورد نظر (۱۰۲bp) تأیید کننده cDNA ساخته شده، بود (شکل ۳).

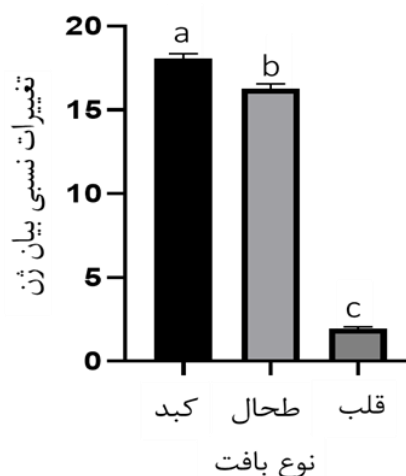


شکل ۷- الکتروفورز محصولات PCR ژن *CD8B* بر روی ژل آگارز ۱ درصد.

بافت اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) مشاهده شد؛ اما بیان در بافت کبد و طحال معنی‌داری ($P < 0.05$) بیشتر از بافت قلب بود.



شکل ۵- منحنی ذوب PCR در زمان واقعی ژن *CD8B* در بافت طحال



شکل ۶- بیان ژن *CD8B* در بافت‌های طحال، کبد و قلب. مقایسه میانگین‌ها (میانگین دو تکرار) با استفاده از آزمون one-way ANOVA. میانگین‌های دارای حروف متفاوت، از نظر آماری اختلاف معنی‌دار دارند. ($P < 0.05$) به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج حاصل از ژل الکتروفورز ژن *CD8B* در تائید با نتایج حاصل از منحنی‌های ذوب این ژن بررسی شدند. وجود تک باند نشان دهنده اختصاصی عمل کردن واکنش‌ها و تائید کننده‌ی نتایج منحنی‌های ذوب بود (شکل ۷).

در سال‌های اخیر، مطالعات زیادی اهمیت کبد را در عملکرد ایمنی و سلامتی برجسته کرده است (Crispe 2009; Racanelli and Rehmann 2006). کبد نمایانگر یک اندام ایمنی خط مقدم است که به‌دلیل موقعیت منحصربه‌فرد و منبع خون، دائماً در معرض انواع آنتی‌ژن‌های مشتق شده از روده است و از آنجایی‌که پاسخ‌های ایمنی بیش از حد یا نامناسب می‌تواند منجر به بیماری‌های خود ایمنی کبد یا عفونت‌های مزمن شود. بنابراین، سیستم ایمنی کبد باید دائماً مکانیسم‌های مطمئنی را برای از بین بردن پاتوژن‌ها و سموم و حفظ ماندگاری آنتی‌ژن‌های بی‌ضرر جیره فراهم کند. کبد از انواع مختلف سلول با عملکردهای متمایز تشکیل شده است (Racanelli and Rehmann 2006). سلول‌های پارانشیمی (هپاتوسیت) که تقریباً ۶۷٪ از کل جمعیت سلولی را تشکیل می‌دهند و سلول‌های غیر پارانشیمی که شامل سلول‌های اندوتلیال سینوسی، سلول‌های کوپفر، لنفوسیت‌ها و سلول‌های میلوئیدی می‌شوند (Kmieć, 2001; Wisse, 1972, 1974). جالب‌توجه است که در میان سلول‌های غیر پارانشیمی کبد، چندین جمعیت سلولی با پتانسیل ارائه آنتی‌ژن وجود دارد که به ماندگاری ایمنی در شرایط غیر التهابی کمک می‌کند (Crispe 2011). به‌عنوان مثال، برهمکنش‌های اختصاصی آنتی‌ژن با سلول‌های $CD8^+ T$ بیان مولکول هم‌زمان مهارکننده‌ی را بر روی سلول‌های اندوتلیال سینوسی کبد افزایش می‌دهد که می‌تواند ماندگاری سلول‌های $CD8^+ T$ را از طریق تعامل با پروتئین MCH1 بیان‌شده در سلول‌های $CD8^+ T$ القا کند (Diehl et al. 2008). کبد همچنین دارای جمعیت متنوع از لنفوسیت‌های ذاتی مانند سلول‌های کشنده طبیعی (NK)، سلول‌های کشنده طبیعی (NKT) و سلول‌های $CD^+ T$ و لنفوسیت‌های سازگار B

پاسخ به عفونت، تعداد زیادی از سلول‌های ایمنی به قلب جذب می‌شوند تا بافت در حال مرگ را حذف کنند، پاتوژن‌ها را از بین ببرند و بهبودی را تسریع کنند (Dal Lin et al. 2019). همچنین، این تصور که قلب حاوی ماکروفاژها است، جدید نیست، زیرا مطالعاتی که حداقل به سال ۱۹۸۰ برمی‌گردد، استدلال کرده‌اند که قلب پستانداران بالغ حاوی جمعیت‌هایی از غیرکاردیومیوسیت‌ها، از جمله سلول‌های اندوتلیال، فیبروبلاست‌ها، پری‌سیت‌ها، سلول‌های ماهیچه صاف و ماکروفاژها است. با این حال، با توسعه ابزارهای پیچیده اضافی برای ردیابی ماکروفاژها، ما اکنون درک می‌کنیم که ماکروفاژهای قلبی متعدد، ناهمگن و از نظر انتوژن متنوع هستند. ثابت شده است که قلب یک موش بالغ سالم شامل تمام کلاس‌های لکوسیت‌های اصلی، از جمله فاگوسیت‌های تک‌هسته‌ای، نوتروفیل‌ها، سلول‌های B و سلول‌های T است (Swirski and Nahrendorf 2018).

گزارش‌ها در مورد ژن *CD8B* عمدتاً بر روی بافت‌های مرتبط با سیستم ایمنی مانند ریه و لنف متمرکز است. برای مثال، در مطالعه‌ای دیگر کایش و همکاران (۲۰۲۰) بیان آلل‌های *CD4*، *CD8b*، *IL-6*، *IL-10* و *IL-17A* در بافت‌های مختلف بدن کوالا مبتلا به رتروویروس کوالا (KoRV) با استفاده از PCR در زمان واقعی را بررسی کردند. رتروویروس کوالا (KoRV) یک تهدید بزرگ برای سلامت و حفاظت از کوالا است و در حال حاضر دارای ۱۰ زیرگروه شناسایی شده است: یک زیرگروه درون‌زا (KoRV-A) و نه زیرگروه برون‌زا (KoRV-B به KoRV-J). در این مطالعه مجموع دو نر و هشت ماده با محدوده سنی ۶ ماه تا ۱۲ سال که در باغ‌وحش ژاپن (پارک جانورشناسی هیراکاوا، کاگوشیما، ژاپن) نگهداری می‌شدند، جمع‌آوری شدند. این مطالعه عمدتاً بر روی بافت‌های مرتبط با سیستم ایمنی مانند ریه و لنف متمرکز بود و در موارد ابتلا سرکوب سیستم ایمنی با کاهش نسبت *CD4:CD8b* و افزایش بیان *IL-10* مشخص شد (Kayesh et al. 2020). همچنین در مطالعه‌ای دیگر برای مشخص کردن پاسخ ایمنی دیر هنگام ماهی قزل‌آلا به بیماری لاکتوکوزیس، بافت‌های کلیه و طحال نمونه‌های دارای علائم بالینی با استفاده از تکنیک ریزآرایه بررسی شدند. یکی از ژن‌های مورد بررسی در

است (Crispe 2011). در انسان تا ۶۵٪ از تمام لنفوسیت‌های کبدی از سلول‌های NK، سلول‌های NKT و سلول‌های *CD T* تشکیل شده است. این جمعیت‌های سلولی می‌توانند تحت شرایط تجربی یا پاتولوژیک خاصی تکثیر شوند. حضور غالب این جمعیت‌ها در کبد و در دفاع اولیه در برابر پاتوژن‌ها، این سلول‌ها را در جایگاه کلیدی در میان لنفوسیت‌های مؤثر در نظارت بر ایمنی کبد قرار می‌دهد (Doherty and O'Farrelly 2000; Peng et al. 2016).

ویژگی‌های طحال آن را یک اندام فوق‌العاده مناسب برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی و شناسایی ژن‌های مربوط به ایمنی می‌کند. به عنوان مثال، ثابت شده است که سلول‌های *CD8⁺ T* در طحال برای شروع پاسخ‌های ایمنی سازنده ضروری است (Valente et al. 2019). فعال‌سازی بهینه سلول T منجر به گسترش کلونال، توزیع مجدد در بافت‌های غیرلنفوئیدی و متعاقب آن تشکیل حافظه می‌شود. بیان بسیاری از عملکردهای مؤثر سلول T، مانند سیتولیز و تولید سیتوکین، نیاز به تماس مستقیم با لیگاند‌های MHC روی سلول‌های میزبان آلوده دارد. از آنجایی که عفونت با پاتوژن‌ها به بافت‌های لنفوئیدی ثانویه محدود نمی‌شود، مکان‌های غیرلنفوئیدی ممکن است مکان‌های مهمی برای عملکرد سلول‌های T فعال و نظارت بر ایمنی بعدی داشته باشند. بافت‌های غیرلنفوئیدی یا ثالثی با ساختارهای لنفوئیدی ثانویه سازمان‌یافته از نظر معماری و همچنین کیفیت و کمیت سیتوکین‌ها، لنفوسیت‌ها، ماتریکس خارج سلولی و سلول‌های جانبی ایمنی متفاوت هستند (Lefrançois and Masopust 2002). اگرچه بیشتر مطالعات اولیه پاسخ‌های سلول T اختصاصی آنتی‌ژن محدود به تجزیه و تحلیل غدد لنفاوی، طحال و خون بود، واضح است که بافت‌های غیرلنفوئیدی یا ثالثی در جنبه‌های مهم عملکردی متفاوت هستند و نیاز به بررسی بیشتر در بافت‌های متفاوت احساس می‌شود.

در چند دهه گذشته عملکرد حیاتی سیستم ایمنی در رشد، ترکیب و عملکرد قلب به رسمیت شناخته شده است. به این صورت که سلول‌های ایمنی در دوران بارداری به قلب نفوذ می‌کنند و در میوکارد باقی می‌مانند، جایی که در طول زندگی در عملکردهای مهم حفاظت شرکت می‌کنند. پس از انفارکتوس میوکارد یا در

این تحقیق ژن *CD8B* بود که کاهش معنی‌داری در هر دو بافت مورد بررسی نشان داد (Castro et al. 2019).

(Jigen et al. 2016) بیان آل‌های *CD8B* در بافت‌های مختلف بدن خوک و اثرات ژنتیکی چندشکلی‌های ژن *CD8B* بر صفات ایمنی خون را بررسی کردند. در این مطالعه مجموع ۳۸۲ خوک سفید بزرگ (۸۴ خوک بومی و ۹۰ خوک سونگلیانو سیاه) انتخاب شدند که شرایط مشابهی داشتند. اما، زیرمجموعه‌های لئوسیت T و صفات هماتولوژیک بیشتر در نمونه‌های سفید بزرگ مورد بررسی قرار گرفت. پروفایل بیان *CD8B* در ۷ بافت مختلف با استفاده از PCR در زمان واقعی بررسی شد. نتایج نشان داد که *mRNA CD8B* ترجیحاً در طحال و به دنبال آن در ریه، معده، کبد، کلیه، قلب و ماهیچه بیان می‌شود. همچنین، بیان *CD8B* در بافت‌های مرتبط با رشد بالابود که نشان می‌دهد بهبود عملکرد ایمنی به عملکرد رشد دام کمک می‌کند. نتایج بررسی حاضر که در گونه‌ای متفاوت یعنی گوسفند انجام شد، نیز به‌طورکلی تأییدکننده نتایج جی گن و همکاران بود. علاوه بر این، چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در توالی کدکننده کامل ژن *CD8B* با روش توالی‌یابی محصول PCR و روش‌های چندشکلی طول قطعه برشی (RFLP) غربالگری شدند. یک جهش (*c.602 G>A*) missense در آگزون ۵ ژن *CD8B* شناسایی شد. سه ژنوتیپ (AA, GG, AG) همگی در جمعیت‌های بزرگ سفید، بومی و سونگلیانو سیاه شناسایی شدند و GG ژنوتیپ غالب در ۳ نژاد خوک بود. آنالیز حداقل مربعات نشان داد که افراد با ۳ ژنوتیپ *CD8B* دارای شاخص‌های خونی متفاوتی بودند. شاخص $CD4^+CD8^-$ خوک‌های دارای ژنوتیپ GG به‌طور معنی‌داری بالاتر از ژنوتیپ AG بود. شاخص $CD4^+CD8^+$ در افراد دارای ژنوتیپ AG به‌طور معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ‌های GG و AA بود. شاخص‌های $CD4^+/CD8^+$ ، HGB و HCT در افراد دارای ژنوتیپ‌های GG و AA به‌طور معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ AG بود ($P < 0.05$). تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که چندشکلی ژن *CD8B* به‌طور معنی‌داری با چندین پارامتر ایمنی خون از جمله $CD4^+CD8^-$ ، $CD4^+CD8^+$ ، $CD4^+/CD8^+$ ، هموگلوبین (HGB) و هماتوکریت (HCT) در خوک‌های سفید بزرگ مرتبط بود ($P < 0.05$). بنابراین، ژن *CD8B* ممکن است

در تنظیم شاخص‌های فیزیولوژیکی خون نقش داشته باشد که می‌تواند به‌عنوان یک ژن کاندیدای عملکردی کلیدی برای تأثیرگذاری بر ویژگی‌های ایمنی خوک‌ها در نظر گرفته شود. (JinGen et al. 2016).

Lin et al. (2021) بیان آل‌های *CD8B* در بافت‌های مختلف بدن گوسفند و همچنین اثرات و ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف آن بر صفات وزن و اندازه بدن در گوسفندان را بررسی کردند. در این مطالعه مجموع ۱۳۰۴ بره نر سالم از ۳ محل با اندازه بستر و شجره خانواده یکسان برای مطالعه به‌طور تصادفی انتخاب شدند. همه گوسفندها واکسیناسیون و تغذیه و شرایط مدیریتی مشابهی را دریافت کردند. در حین پرورش، هر ۲۰ روز یک‌بار، صفات مرتبط با وزن بدن مثل طول بدن (length Body)، ارتفاع بدن (body height) و دور سینه (body chest circumference) اندازه‌گیری و اطلاعات آن‌ها جمع‌آوری شد. پروفایل بیان *CD8B* در اندام‌ها و بافت‌های مختلف (بافت‌های ریه، طحال، لنف، دوازدهه، کبد، کلیه، شکمبه، قلب، چربی دم و عضله شش گوسفندی که به‌طور تصادفی و بر اساس وزن بدن انتخاب شدند با استفاده از PCR در زمان واقعی بررسی شد. نتایج نشان داد که *CD8B* در هر ۱۰ بافت، با بیان کمتر در پنج بافت (عضله، دم، قلب، شکمبه و کلیه) و بیان بالاتر در پنج بافت (کبد، دوازدهه، طحال، لنف و ریه) بیان شد. بیان در بافت ریه به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از هشت بافت و اندام دیگر (به‌جز بافت طحال) بود ($0.05 < P$). تفاوت در بیان بین پنج بافت یا اندام با بیان کم معنی‌دار نبود ($0.05 > P$). در بین کبد، دوازدهه و لنف، تفاوت در بیان *CD8B* معنی‌دار نبود ($0.05 > P$) و تفاوت در بیان *CD8B* در دوازدهه، لنف و طحال نیز معنی‌دار نبود ($0.05 > P$). با این حال، تفاوت در بیان بین کبد و طحال معنی‌دار بود ($0.05 < P$). بیان *CD8B* در کبد به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از پنج بافت یا اندام با بیان کم (*CD8B* کم (عضله، دم، قلب، شکمبه و کلیه) بود ($0.05 < P$). بیان *CD8B* در ریه‌ها و طحال به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از ماهیچه‌ها، دم، قلب، شکمبه، کلیه و کبد بود ($0.01 < P$). بیان *CD8B* در بافت‌های مرتبط با ایمنی بالابود که نشان می‌دهد بهبود عملکرد ایمنی به عملکرد رشد دام کمک می‌کند. نتایج بررسی حاضر که در گوسفند انجام شد نیز به‌طور کامل تأییدکننده

ژنوتیپ‌های غالب وجود داشته باشد: یکی تفاوت در نوع جهش است و دیگری تفاوت در گونه‌های مورد مطالعه است. این مطالعه همچنین نشان داد که جایگاه‌های چندشکلی در *CD8B* می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی برای بهبود بالقوه صفات رشد مورد استفاده قرار گیرند (Lin et al. 2021).

با توجه به نتایج پژوهش حاضر و نتایج سایر محققین می‌توان نتیجه گرفت که ژن *CD8B* بیشتر در بافت‌های مرتبط با سیستم ایمنی بیان می‌شود و احتمالاً برای حفظ سلامت حیوان ضروری است. همچنین به‌نظر می‌رسد ژن *CD8B* برای تحقیق در مورد بیماری‌ها و واکسن‌های گوسفند و درک بهتر سیستم ایمنی این حیوان، مناسب باشد. با این وجود، وجود مطالعات بیشتر برای درک مکانیسم‌هایی که به‌وسیله آن‌ها بیان این ژن کنترل می‌شود ضروری است.

نتایج این پژوهش است. یک جهش nonsense در ایترون دوم ($A > G$ 7313 g) با استفاده از توالی‌یابی مخزن DNA شناسایی شد و متعاقباً، واریانت‌ها (AA, GG, AG) با استفاده از سیستم تعیین ژنوتیپ چندشکلی تک نوکلئوتیدی KASPar® PCR (SNP) تعیین ژنوتیپ شدند. وزن افراد دارای ژنوتیپ GG به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از افراد دارای ژنوتیپ AA بود و وزن افراد دارای ژنوتیپ GA در این بین قرار داشت. نتایج تجزیه و تحلیل مرتبط با صفت وزن و اندازه بدن نشان داد که چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی *CD8B* به‌طور معنی‌داری با وزن بدن و سایر صفات رشد در گوسفند مرتبط است. در مقایسه با مطالعه قبلی که حیوان مورد مطالعه خوک بود؛ ژنوتیپ غالب در ایترون دوم ژن *CD8B* گوسفند AA و حاصل یک جهش nonsense هست. ژنوتیپ غالب در اگزون ژن *CD8B* خوک GG و حاصل یک جهش missense بود. در نتیجه دو احتمال ممکن است برای تفاوت در

منابع

- Amiri Roudbar M, Abdollahi-Arpanahi R, Ayatollahi Mehrgardi A, Mohammadabadi M, Taheri Yeganeh A, Rosa GJM (2018) Estimation of the variance due to parent-of-origin effects for productive and reproductive traits in Lori-Bakhtiari sheep. *Small Ruminant Research* 160:95-102.
- Arabpour Z, Mohammadabadi M, Khezri A (2021) The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. *Agricultural Biotechnology Journal* 13:183-200.
- Carlberg C, Velleuer E (2022) Antigen-Presenting Cells and the Major Histocompatibility Complex. *Molecular Immunology* (pp. 77-88).
- Carrasco E, Gómez de las Heras MM, Gabandé-Rodríguez E, Desdín-Micó G, Aranda JF, Mittelbrunn M (2022) The role of T cells in age-related diseases. *Nature Reviews Immunology* 22:97-111.
- Castro R, Coll J, Blanco MDM, Rodriguez-Bertos A, Jouneau L, Fernández-Garayzábal J F, Gibello A (2019) Spleen and head kidney differential gene expression patterns in trout infected with *Lactococcus garvieae* correlate with spleen granulomas. *Veterinary Research* 50:32.
- Crispe IN (2009) The liver as a lymphoid organ. *Annual Review of Immunology* 27:147-163.
- Crispe IN (2011) Liver antigen-presenting cells. *Journal of Hepatology* 54:357-365.

- Dal Lin C, Tona F, Osto E (2019) The crosstalk between the cardiovascular and the immune system. *Vascular Biology* 1:H83-H88.
- Diehl L, Schurich A, Grochtmann R, Hegenbarth S, Chen L, Knolle PA (2008) Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 47:296-305.
- Doherty DG, O'Farrelly C (2000) Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunological Reviews* 174:5-20.
- James CA, Xu Y, Aguilar MS, Jing L, Layton ED, Gilleron M, Minnaard AJ, Scriba TJ, Day CL, Warren E H, Koelle DM, Seshadri C (2022) CD4 and CD8 co-receptors modulate functional avidity of CD1b-restricted T cells. *Nature Communications* 13:78.
- JinGen X, ChongLong W, ChuanYan C, ZhiHua C, ShengHe L, Qin Z (2016) Expression profile and polymorphism of CD8B gene and its association with blood immune traits in pigs. *Journal of Agricultural Biotechnology* 24:357-365.
- Kayesh MEH, Hashem MA, Maetani F, Eiei T, Mochizuki K, Ochiai S, Ito A, Ito N, Sakurai H, Asai T, Tsukiyama-Kohara K (2020) Cd4, cd8b, and cytokines expression profiles in peripheral blood mononuclear cells infected with different subtypes of korv from koalas (*Phascolarctos cinereus*) in a japanese zoo. In *Viruses* (Vol. 12, Issue 12).

- Kioussis D, Ellmeier W (2002) Decision making in the immune system: Chromatin and CD4, CD8A and CD8B gene expression during thymic differentiation. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 2, Issue 12, pp. 909-919).
- Kmieć Z (2001) Cooperation of liver cells in health and disease. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology* 161, III–XIII 1-151.
- Leahy DJ, Axel R, Hendrickson WA (1992) Crystal structure of a soluble form of the human T cell coreceptor CD8. *resolution. Cell*, 68:1145-1162.
- Lefrançois L, Masopust D (2002) T cell immunity in lymphoid and non-lymphoid tissues. *Current Opinion in Immunology* 14:503-508.
- Lin C, Li F, Zhang X, Zhang D, Li X, Zhang Y, Zhao Y, Song Q, Wang J, Zhou B, Cheng J, Xu D, Li W, Zhao L, Wang W (2021) Expression and polymorphisms of CD8B gene and its associations with body weight and size traits in sheep. *Animal Biotechnology* 1-9.
- McCluggage WG, Maxwell P (1999) Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. *The Journal of Pathology*, 188:338-339.
- Melzi E, Rocchi MS, Entrican G, Caporale M, Palmarini M (2018) Immunophenotyping of Sheep Paraffin-Embedded Peripheral Lymph Nodes. In *Frontiers in Immunology* 9.
- Mohammadabadi M, Kheyroodin H, Latifi A, Babenko O (2022) mRNA expression profile of DNAH1 gene in testis tissue of Raini Cashmere goat. *Agricultural Biotechnology Journal* 14:243-256 (In Farsi).
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011) Application of Microsatellite Markers for a Study of Kermani Sheep Genome. *Iranian Journal of Animal Science* 42:337-344.
- Orbegozo-Medina RA, Martínez-Sernández V, González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Mezo M, Ubeira F. M (2018) Vaccination of sheep with Quil-A® adjuvant expands the antibody repertoire to the Fasciola MF6p/FhHDM-1 antigen and administered together impair the growth and antigen release of flukes. *Vaccine* 36:1949-1957.
- Peng, H, Wisse E, Tian Z (2016) Liver natural killer cells: Subsets and roles in liver immunity. *Cellular and Molecular Immunology* 13:328-336.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in Real Time-PCR. *Nucleic Acids Research* 30:e36.
- Racanelli, V, Reherrmann, B (2006) The liver as an immunological organ. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 43:S54-62.
- Safaei SMH, Dadpasand M, Mohammadabadi M, Atashi H, Stavetska R, Klopenko N, Kalashnyk O (2022) An Origanum majorana Leaf Diet Influences Myogenin Gene Expression, Performance, and Carcass Characteristics in Lambs. *Animals* 13:e14.
- Sakaguchi S, Hombauer M, Bilic I, Naoe Y, Schebesta A, Taniuchi I, Ellmeier W (2010) The zinc-finger protein MAZR is part of the transcription factor network that controls the CD4 versus CD8 lineage fate of double-positive thymocytes. *Nature Immunology* 11:442-448.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, Borshch O, Babenko O, Kalashnyk O, Afanasenko V, Kondratiuk V (2022) Effect of Fennel (Foeniculum Vulgare) Seed Powder Consumption on Insulin-like Growth Factor 1 Gene Expression in the Liver Tissue of Growing Lambs. *Gene Expression* 21:21-26.
- Swirski FK, Nahrendorf M (2018) Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology* 18:733-744.
- Valente M, Dölen Y, van Dinther E, Vimeux L, Fallet M, Feuillet V, Figdor CG (2019) Cross-talk between iNKT cells and CD8 T cells in the spleen requires the IL-4/CCL17 axis for the generation of short-lived effector cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116:25816–25827.
- Wang W, Liu Y, Fu W, Xu J, Liu J, Ding X, Zhang Q (2015) Single-nucleotide polymorphisms in CD8A and their associations with T lymphocyte subpopulations in pig. *Molecular Genetics and Genomics* 290:1447-1456.
- Wisse E (1972) An ultrastructural characterization of the endothelial cell in the rat liver sinusoid under normal and various experimental conditions, as a contribution to the distinction between endothelial and Kupffer cells. *Journal of Ultrastructure Research* 38:528-562.
- Wisse E (1974) Observations on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells. *Journal of Ultrastructure Research* 46:393-426.
- Xu W, Larbi A (2017) Markers of T cell senescence in humans. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 8).
- Yang J, Lv Y, Zhu Y, Li S, Tao J, Chang L, Zhu M, Zhao J, Wang Y, Wu C, Zhao W (2022) Baseline T-lymphocyte and cytokine indices in sheep peripheral blood. *BMC Veterinary Research* 18:165.