



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

Unraveling the H5N1 influenza infection response: A comparative gene expression networks and functionally enriched pathways analysis in chickens and ducks

S. Golpasand¹, Sh. Ghovvati^{2*}, Z. Pezeshkian³

1. MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran

3. Ph.D., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: 28-06-2023 – Revised: 30-07-2023 – Accepted: 16-08-2023)

Introduction: In recent years, highly pathogenicity avian influenza (HPAI), especially H5N1, has emerged as a major global health concern due to its potential as a zoonotic disease and its devastating impact on poultry populations. Identifying the molecular mechanisms of response to HPAI infection is critical to control, treat, and prevent the risk of a potential pandemic. Microarray technology is becoming a standard technology used in research laboratories all across the world and it is considered as one of the centers of research in cellular processes related to the level and manner of gene expression, including gene function and cell differentiation mechanisms. By using microarray technology, it is possible to obtain a detailed view of the interaction function of genes while simultaneously studying how the genome is expressed. Using microarrays provides the analysis of gene expression in response to viral infections such as influenza, etc., the study of host-pathogen interactions, and also the identification of the effectiveness of drugs and vaccines. This study aimed to analyze the microarray data of H5N1 avian influenza to compare the gene network and analyze the functional pathway in chickens and ducks.

Materials and methods: Data mining and searching of microarray data related to Highly Pathogenic Avian Influenza infection was done in the GEO gene expression database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). The microarray data set with accession number GSE33389 based on the GPL3213 platform was selected which contained lung tissue samples challenged with H5N1 virus in chickens and ducks. Normalization of selected microarray data was done using R software, and samples were grouped to compare between infected and control samples. Limma, Biobase, and GEOquery software packages in R software were used to determine the expression level of genes and to investigate the differentially expressed genes (DEGs) between healthy and H5N1 influenza virus-infected lung tissue samples in chickens and ducks. The criterion for selecting significant DEGs was considered as $|\log FC| > 2$ and $P < 0.05$. DAVID online tool (<https://david.ncifcrf.gov>) was used to investigate biological pathways, structural and functional characteristics of genes with different expressions, and functional interpretation of upregulated and downregulated DEGs. It was evaluated and visualized separately based on biological processes (BP), molecular functions (MF), and cellular components (CC). KEGG tool (<http://www.genome.jp/kegg>) was used to evaluate and study metabolic pathway enrichment. To reveal interactions between proteins and analyze them, STRING database and Cytoscape software were used. While using the Cytohubba plugin to identify and display key genes, the main modules affecting the interaction of genes and proteins were also identified by the MCODE plugin.

Results and discussion: Gene expression analysis revealed 2062 and 565 differentially expressed genes between normal and infected tissue in chickens and ducks, respectively ($P < 0.05$ and $|\log FC| > 2$). The results of bioinformatics analysis and protein-protein interaction network analysis showed BUB1, NDC80, CDC20, PLK1, PRC1, KIF11, and AURKA genes as hub genes in chicken and also COL6A3, COL3A1, COL4A3, COL18A1,

* Corresponding author: ghovvati@guilan.ac.ir



PLOD2, PLOD1, and P4HA2 as highly effective genes in duck ($P < 0.05$). The results of the ontology comparison of DEGs proved that most of these genes in chickens are involved in the innate immune response and inflammatory resistance of the host, and the most effective genes in ducks play a role in lipid metabolism and energy production to meet the host's resistance to disease. The results of comparative gene network analysis between chickens and ducks are promising to increase our understanding of the host response to H5N1 influenza infection and the factors affecting virus pathogenesis in different avian species. Differentially expressed genes in response to H5N1 infection in chickens and ducks play critical roles in various biological processes, including immune response, inflammation, viral replication, and host-pathogen interactions. In general, gene network analysis showed that chickens and ducks use different genetic strategies to respond to avian influenza virus infection.

Conclusions: The present research was conducted to discover the response to H5N1 HPAI infection in chickens and ducks through comparative gene network analysis. It is important to note that the gene network analysis presented in this research is an initial step towards discovering the response mode of HPAI (H5N1) infection in chickens and ducks, and further functional studies, validation experiments, and integration with other omics data are needed to confirm the role of genes, pathways and hub genes in the host response to H5N1 virus. Therefore, the results of comparative gene network analysis in chickens and ducks obtained from this research can provide valuable insight into the underlying molecular mechanisms of host response to H5N1 influenza infection. Thus, by identifying differentially expressed genes, functional modules, and hub genes in this research, it can be stated that potential targets for future research have been highlighted to some extent. Undoubtedly, further studies in this field will improve our knowledge about the pathogenesis of avian influenza and will help to develop strategies for effective control and prevention of H5N1 influenza outbreaks.

Keywords: High Pathogenicity Avian influenza H5N1, Bioinformatics, Microarray, Gene interaction network, Gene ontology

Ethics statement: This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are openly available in the GEO gene expression database in NCBI database at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, reference number GSE33389.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

How to cite this article:

Golpasand, S., Ghovvati, S., & Pezeshkian, Z. (2023). Unraveling the H5N1 influenza infection response: A comparative gene expression networks and functionally enriched pathways analysis in chickens and ducks. *Animal Production Research*, 12(4), 1-22. doi: 10.22124/AR.2023.24839.1773



مقاله پژوهشی

آشکارسازی پاسخ به عفونت آنفلوآنزای H5N1: تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای شبکه‌های بیان ژن و مسیرهای غنی شده عملکردی در جوجه‌ها و اردک‌ها

ساره گل‌پسند^۱، شاهرخ قوتی^{۲*}، زهرا پزشکیان^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۷ - تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۵/۰۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۵)

چکیده

درک ساز و کارهای مولکولی پاسخ میزبان به عفونت H5N1 برای گسترش اقدامات کنترل موثر و کاهش خطر یک بیماری همه‌گیر بالقوه بسیار مهم است. هدف مطالعه حاضر، تجزیه داده‌های ریزآرایه آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان H5N1 جهت مقایسه شبکه ژنی در جوجه‌ها و اردک‌ها بود. مجموعه داده ریزآرایه GSE33389 مشتمل بر نمونه شاهد و زیر چالش H5N1 بافت ریه جوجه و اردک با بسته GEOquery نرم‌افزار R دانلود شد. ژن‌های با بیان متفاوت با استفاده از بسته limma در نرم‌افزار R شناسایی شدند و سپس، ترسیم شبکه‌های ژنی با نرم‌افزار Cytoscape انجام شد. ژن‌های اصلی با تعاملات زیاد با افزونه Cytohubba شناسایی شدند و در نهایت، ماژول‌های اثرگذار با افزونه MCODE شناسایی شدند. تعداد ۲۰۶۲ و ۵۶۵ ژن با بیان متفاوت بین بافت سالم و زیر چالش به ترتیب در جوجه‌ها و اردک‌ها شناسایی شدند ($P < 0.05$ و $|\log FC| > 2$). نتایج تجزیه شبکه با استفاده از افزونه Cytohubba، ژن‌های BUB1، NDC80، CDC20 را به عنوان ژن‌های هاب در جوجه و همچنین ژن‌های کلیدی COL6A3 و COL3A1 و PLOD2 را در اردک شناسایی نمود ($P < 0.05$). مقایسه هستی‌شناسی ژن‌های متفاوت بیان شده در جوجه و اردک نشان داد که بیشتر آن‌ها در جوجه‌ها در پاسخ ایمنی ذاتی و مقاومت‌های التهابی میزبان نقش دارند، ولی در اردک بیشتر در سوخت و ساز چربی و تولید انرژی برای تامین نیازمندی مقاومت میزبان در برابر بیماری نقش ایفا می‌کنند. یافته‌های این مطالعه ضمن افزایش آگاهی نسبت به چگونگی پاسخ میزبان به عفونت آنفلوآنزای H5N1، ممکن است دستاوردهایی برای توسعه درمان هدفمند و راهبردهای نظارتی برای مبارزه موثر با شیوع H5N1 داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان H5N1، بیوانفورماتیک، ریزآرایه، شبکه تعامل ژن، هستی‌شناسی ژن

* نویسنده مسئول: ghovvati@guilan.ac.ir

مقدمه

طی سال‌های اخیر، فناوری ریزآرایه به یکی از کانون‌های پژوهش در فرآیندهای سلولی مرتبط با میزان و نحوه بیان ژن از جمله عملکرد ژن‌ها و ساز و کارهای تمایز سلولی تبدیل شده است. با فناوری ریزآرایه می‌توان ضمن مطالعه همزمان نحوه بیان ژنوم، تصویر دقیقی از عملکرد متقابل ژن‌ها به دست آورد (Takahashi and Yamanaka, 2016). استفاده از ریزآرایه‌ها امکان تجزیه و تحلیل بیان ژن در پاسخ به عفونت‌های ویروسی مانند آنفلوآنزا، مطالعه برهم‌کنش‌های میزبان-پاتوژن و همچنین شناسایی اثربخشی دارو و واکسن‌ها را نیز فراهم می‌کند (Zhai et al., 2015). تحلیل شبکه، روشی برای مطالعه ساختار و عملکرد سیستم‌های پیچیده از جمله سیستم‌های زیستی است. یکی از مزایای کلیدی تجزیه و تحلیل شبکه، توانایی آن در شناسایی ویژگی‌های نوظهور سیستم‌های پیچیده است که با مطالعه اجزای منفرد به صورت مجزا قابل درک نیست. محققان از تجزیه و تحلیل شبکه برای شناسایی تنظیم‌کننده‌های کلیدی مسیرهای بیماری، پیش‌بینی اهداف دارویی و درک ساختار و عملکرد جوامع اکولوژیکی استفاده کرده‌اند (Arrell and Terzic, 2010). ویروس آنفلوآنزای نوع A باعث ابتلای گونه‌های مختلف پستانداران و پرندگان به بیماری آنفلوآنزا می‌شود و بیماری‌زایی بیشتری نسبت به آنفلوآنزای نوع B و C دارد و تقریباً همه ساله باعث اپیدمی با شدت‌های مختلف می‌شود (Beigel, 2005). در پژوهشی مشخص شد که مجموع هزینه‌ها و تلفات ناشی از بیماری‌های تنفسی (نظیر برونشیت، آنفلوآنزای طیور و نیوکاسل) معادل ۹/۴۷ میلیون دلار آمریکا در سال‌های ۲۰۱۶-۲۰۱۷ بوده است (Mehrabadi et al., 2022). ویروس آنفلوآنزای نوع A، عامل بیماری‌زای مهم در طیف وسیعی از میزبانان مانند پستانداران و پرندگان است و بر اساس گلیکوپروتئین‌های ویروسی سطحی هم‌گلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) به زیرگروه‌های مختلفی تقسیم می‌شود. در حال حاضر، تعداد ۱۸ زیرگروه HA و ۱۱ زیرگروه NA شناخته شده

گزارش شده است. آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان نوعی عفونت ویروسی است و پرندگان مختلف مانند جوجه‌ها و اردک‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. شدت بیماری در بین گونه‌های مختلف پرندگان متفاوت است (Dhama, 2013). جوجه‌ها مستعد عفونت با تعداد محدودی از زیرگروه‌های ویروس آنفلوآنزای نوع A هستند و منبع بالقوه یک بیماری همه‌گیر آنفلوآنزای انسانی نیز محسوب می‌شوند. به‌طور خاص، زیرگروه‌های هم‌گلوتینین H5 و H7 می‌توانند از سویه‌های کم تا بسیار بیماری‌زا تکامل یابند. ویروس H5N1 آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان (HPAI) با بیماری‌زایی بالا باعث عفونت شدید در جوجه‌ها با مرگ و میر سریع می‌شود، اما عفونت مربوط در اردک معمولاً خفیف یا بدون علامت است. گسترش آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان H5N1 بسیار بیماری‌زا به آسیا، اروپا و آفریقا، آثار عظیمی بر صنعت طیور داشته است و تهدیدی مهم برای سلامت انسان نیز محسوب می‌شود (Kilpatrick et al., 2006).

بیشتر سویه‌های ویروس H5N1 بیماری‌های بسیار شدیدی را در جوجه‌ها، بوقلمون‌ها و بلدرچین‌ها به وجود می‌آورند که اغلب طی دو تا سه روز منجر به مرگ و میر ۱۰۰ درصدی می‌شوند (Cagle et al., 2012). اردک‌ها یک مخزن طبیعی برای این ویروس بوده و به نظر می‌رسد به‌طور ژنتیکی قادر به مقاومت در برابر بیشتر گونه‌های آنفلوآنزای پرندگان هستند (Cornelissen et al., 2013). هدف از این پژوهش، بررسی پاسخ زیستی جوجه و اردک در مواجهه با عامل بیماری‌زای آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان H5N1 جهت شناسایی بهتر مسیرها و فرآیندهای کلیدی درگیر در پیشرفت بیماری است تا بتوان بینش عمیق‌تری از چگونگی پاسخ میزبان به این عامل بیماری‌زا بدست آورد و رویکرد مناسب‌تری در آینده جهت توسعه درمان، طراحی واکسن و مبارزه با ویروس عامل بیماری اتخاذ نمود.

مواد و روش‌ها

داده‌کاوی و جستجوی داده‌های ریزآرایه: داده‌کاوی و جستجوی داده‌های ریزآرایه مرتبط با آلودگی آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان در پایگاه داده بیان ژن GEO

1. Hemagglutinin
2. Neuraminidase
3. Highly Pathogenic Avian Influenza

تحلیل آن‌ها، از پایگاه داده STRING و نرم افزار Cytoscape استفاده شد (Kohl *et al.*, 2011). ضمن استفاده از افزونه Cytohubba برای شناسایی و نمایش ژن‌های کلیدی، ماژول‌های اصلی موثر بر تعامل ژن‌ها و پروتئین‌ها نیز به وسیله افزونه MCODE شناسایی شدند (Bader and Hogue, 2003; Chin *et al.*, 2014). پس از شناسایی ماژول‌ها، جهت انجام تجزیه غنی‌سازی عملکردی از افزونه ClueGO/CluePedia در نرم‌افزار Cytoscape استفاده شد (Bindea *et al.*, 2009; Bindea *et al.*, 2013).

نتایج و بحث

کنترل و نرمال‌سازی داده‌ها: بررسی اولیه داده‌های ریزآرایه GSE33389 جهت واکاوی کیفیت داده‌های خام نشان داد که داده‌های جمع‌آوری شده همگن نبوده و نیازمند نرمال‌سازی (همگن‌سازی) هستند. نرمال‌سازی داده‌ها با استفاده از نرم افزار R انجام شد و نتایج این تجزیه نشان دادند که همگن‌سازی داده‌ها به درستی انجام شده و میانه‌های مربوط به نمونه‌های زیر چالش و شاهد در اردک (شکل ۱-الف) و نمونه‌های زیر چالش و شاهد در جوجه (شکل ۱-ب) در یک راستا قرار گرفته‌اند. بدین ترتیب نتایج تجزیه و تحلیل همگن‌سازی داده‌ها بیان می‌دارند که داده‌های خام همگن شده از کیفیت مناسب برای بررسی بیشتر و تجزیه و تحلیل علمی برخوردار هستند. نرمال‌سازی داده‌ها گامی مهم در تجزیه و تحلیل بیان ژن است. هدف از نرمال‌سازی داده‌های ریزآرایه، حذف تغییرات سیستماتیک در یک آزمایش ریزآرایه است که بر سطوح بیان ژن تأثیر می‌گذارد و اعتبار تجزیه و تحلیل‌های پایین دستی آن را تضمین می‌کنند تا بتوان مقایسه‌های زیستی معنی‌داری بین نمونه‌ها انجام داد (Lovén *et al.*, 2012).

تجزیه و تحلیل بیان افتراقی ژن‌ها (DEGs): تجزیه و تحلیل ژن‌های متفاوت بیان شده با هدف بررسی و شناسایی ژن‌ها و مسیرهای عملکردی مرتبط با پاسخ میزبان به ویروس در نمونه‌های بافت ریه جوجه‌ها و اردک‌هایی که با ویروس آنفلوآنزای H5N1 زیر چالش بودند، با استفاده از نرم افزار R انجام شد. نتایج بررسی پروفایل بیان ژن در دو

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) صورت گرفت و با توجه به هدف پژوهش، برای شناسایی ژن‌های مؤثر در مسیرهای زیستی، مجموعه داده ریزآرایه با شماره دسترسی GSE33389 مبتنی بر پلتفرم GPL3213 و شامل نمونه‌های بافت ریه زیر چالش با ویروس H5N1 در جوجه و اردک انتخاب شد (جدول ۱).

شناسایی و تفکیک ژن‌های با بیان متفاوت (افتراقی) (DEGs): نرمال‌سازی داده‌های ریزآرایه منتخب با استفاده از نرم‌افزار R و بسته limma با روش RMA انجام شد (R Core Team, 2023) و همچنین گروه‌بندی نمونه‌ها به منظور مقایسه بین نمونه‌های شاهد و بیمار در اردک و جوجه صورت گرفت، به‌طوری که در جوجه و اردک، نمونه‌های شاهد و بیمار برای هر جاندار، جداگانه در نظر گرفته شدند. از بسته‌های نرم افزاری limma، Biobase و GEOquery در نرم افزار R، جهت تعیین میزان بیان ژن‌ها و بررسی بیان افتراقی ژن‌ها بین نمونه‌های بافت ریه سالم (شاهد) و آلوده به ویروس آنفلوآنزا H5N1 در جوجه و اردک استفاده شد (Davis and Meltzer, 2007; Huber *et al.*, 2015; Ritchie *et al.*, 2015). از ماتریس بیان ژن تولید شده برای انتخاب ژن‌های با بیان افتراقی، تجزیه‌های غنی‌سازی و ارزیابی ویژگی‌های عملکردی ژن‌ها استفاده شد. همچنین معیار انتخاب ژن‌های با بیان افتراقی معنی‌دار $|\log FC| > 2$ و $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

هستی‌شناسی و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیرها: از ابزار بر خط DAVID^۵ (<https://david.ncifcrf.gov>) به منظور بررسی مسیرهای زیستی، ویژگی‌های ساختاری و عملکردی ژن‌های با بیان متفاوت، استفاده شد. تفسیر عملکردی ژن‌های بیش‌بیان و کم‌بیان به‌صورت جداگانه بر اساس فرآیندهای زیستی (BP)^۶، عملکردهای مولکولی (MF)^۷ و اجزای سلولی (CC)^۸ ارزیابی و تجسم شد. برای ارزیابی و مطالعه غنی‌سازی مسیر متابولیک از پایگاه KEGG^۹ (<http://www.genome.jp/kegg>) استفاده شد (Huang *et al.*, 2002; Kanehisa *et al.*, 2007).

ساخت شبکه پروتئین-پروتئین (PPI) و شناسایی ژن‌های هاب: جهت آشکارسازی تعاملات بین پروتئین‌ها و تجزیه و

8. Cellular Component
6. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

4. Differential expression genes
5. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
6. Biological Process
7. Molecular Function

تجزیه یکپارچه ژن‌های بیش‌بیان و کم‌بیان با هم می‌تواند منجر به عدم تعادل بین ژن‌های بیش‌بیان و کم‌بیان در مسیرهای خاص شود و این عدم تعادل نیز می‌تواند تا حد زیادی قدرت آماری برای یافتن مسیرهای مرتبط با بیماری یا هدف خاص را کاهش دهد (Hong et al., 2014). به‌علاوه، پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تجزیه و تحلیل ژن‌های بیش‌بیان و کم‌بیان به‌طور جداگانه، قدرتمندتر از تجزیه و تحلیل همه ژن‌های با بیان افتراقی است (Hong et al., 2014; Pezeshkian et al., 2022). از طرفی با توجه به اینکه مزیت ترکیب تمام ژن‌های متفاوت بیان شده در تجزیه هستی-شناسی ژن و مسیرهای متابولیکی صرفاً به منظور تجزیه و تحلیل از دیدگاه و مقیاس بزرگتر است و تجزیه و تحلیل ژن‌های با بیان متفاوت به‌طور جداگانه نشان می‌دهد که کدام مسیر فعال یا سرکوب شده است و دستاورد دقیق‌تر و مناسب‌تری را در اختیار قرار می‌دهد، محققان تجزیه و تحلیل جداگانه ژن‌های با بیان متفاوت (بیش‌بیان و کم-بیان) برای تفسیر و تحلیل مسیرهای زیستی و فرآیندهای غنی‌سازی مسیرهای تنظیمی ژن‌ها را مناسب‌تر دانسته‌اند (Guo et al., 2019).

عفونت ویروسی باعث اختلال در محیط داخل سلول می‌شود و بعد از ایجاد عفونت، برخی از سلول‌ها، واکنش اتوفازی انجام می‌دهند. اتوفازی یک ساز و کار خود محافظتی سلولی است که اجزای سلولی را از راه مکانیسم‌های لیزوزومی تجزیه می‌کند و طی اتوفازی، برخی از اندامک‌های آسیب دیده و عوامل بیماری‌زای مهاجم به وسیله ساختار غشایی دوگانه اتوفاگوزوم‌ها فراگرفته شده، به لیزوزوم‌ها منتقل و سپس تجزیه می‌شوند و مجدداً به وسیله سلول‌ها استفاده می‌شوند (Wang et al., 2020). نتایج یک پژوهش نشان داد که عفونت ویروس آنتریت در اردک باعث اتوفازی در سلول‌های آلوده می‌شود (Yin et al., 2017). ساخت کارنیتین از دو اسید آمینه مهم لیزین و متیونین انجام می‌شود. کارنیتین سبب افزایش سوخت و ساز انرژی سلول شده و غلظت کوآنزیم A در سیتوزول و میتوکندری که در سوخت و ساز گلوکز و لیپید مهم هستند را نیز تنظیم می‌کند. بنابراین، ساخت کارنیتین باعث افزایش تولید انرژی، سوخت و ساز چربی و بهبود وضعیت ایمنی در پرندگان طی درگیری با آنفلوآنزا می‌شود که نیاز به انرژی دارند (Rehman et al., 2017).

جاندار نشان داد که به ترتیب تعداد ۲۰۶۲ و ۵۶۵ ژن دارای بیان متفاوت ($P < 0.05$) در بافت ریه جوجه و اردک وجود دارد که در خروجی نمودار آتشفشانی با رنگ‌های آبی (کاهش بیان) و قرمز (افزایش بیان) از هم متمایز شده‌اند (شکل ۲).

به‌طور کلی بیان ژن فرآیندی است که در آن از اطلاعات درون ژن استفاده می‌شود تا یک محصول کاربردی مانند پروتئین از آن به‌دست آید. در علم ژنتیک، بیان ژن یکی از مهم‌ترین مسائل بنیادی است که کمک می‌کند تا ژنوتیپ به‌صورت فنوتیپ ظاهر شود (Lockhart and Winzeler, 2000). محققان در پژوهشی با تجزیه بیان ژن داده‌های ریزآرایه‌های DNA سلول‌های آلوده به ویروس آنفلوآنزای H5N1 اردک و جوجه نشان دادند که در سلول‌های جوجه-های زیر چالش با ویروس آنفلوآنزای H5N1 در مقایسه با گروه شاهد، ۴۸/۷۴ درصد رونوشت‌ها به‌طور متفاوت بیان می‌شوند، در حالی که در سلول‌های اردک، فقط ۲۳/۳۶ درصد رونوشت‌ها به‌طور متفاوت بیان شده‌اند. همچنین مشخص شد که زیست‌تراشه حاوی آرایه ژنی جوجه‌ها می‌تواند برای تجزیه ترانسکریپتوم اردک و نیز تجزیه بیان ژن در سایر گونه‌های پرندگان نیز به کار گرفته شود (Kuchipudi et al., 2015).

تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی و غنی‌سازی مسیرهای تنظیمی ژن‌های متفاوت بیان شده: تجزیه و تحلیل هستی-شناسی و غنی‌سازی ژن‌های با بیان افتراقی برای ژن‌های بیش‌بیان و کم‌بیان، به‌صورت مجزا انجام شد و نتایج این تجزیه و تحلیل نشان دادند که ژن‌های متفاوت بیان شده در شرایط مواجهه با ویروس H5N1 در جوجه و اردک با هم متفاوت هستند. نتایج بررسی فرآیندهای زیستی این پژوهش نشان داد که ژن‌های بیش‌بیان در اردک عمدتاً بر تنظیم اتوفازی و سوخت و ساز کارنیتین متمرکز هستند که در پاسخ به مواجهه میزبان با عفونت ویروس H5N1 نسبت به میزبان شاهد دچار تغییر می‌شوند (جدول ۲). این نتایج نشان می‌دهند که اردک در مواجهه با ویروس آنفلوآنزای فوق‌حاد H5N1، فرآیندهای زیستی مرتبط با افزایش مقاومت و همچنین افزایش تولید انرژی و سوخت و ساز چربی را فعال می‌نماید.

محققان اثبات نموده‌اند که میزان بیان ژن‌ها با پیوندهای عملکردی در مسیرهای مرتبط، همبستگی مثبت دارند و

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های بافت ریه مرتبط با آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان H5N1. اطلاعات مربوط به شماره دسترسی، نوع پلتفرم و موجود میزبان نشان داده شده است

Table 1. The specifications of the lung tissue samples related to HPAI H5N1. Information about accession number, platform type, and host organisms is displayed

Samples	Accession Number	Host Organism	Platform	GEO accession
Chicken H5N1	GSM825786	Gallus gallus	Affymetrix Chicken Genome Array	GSE33389
Chicken H5N1	GSM825787			
Chicken H5N1	GSM825788			
Chicken H5N1	GSM825789			
Chicken control	GSM825790			
Chicken control	GSM825791	Anas platyrhynchos		
Duck H5N1	GSM825794			
Duck H5N1	GSM825795			
Duck H5N1	GSM825796			
Duck H5N1	GSM825797			
Duck control	GSM825798			
Duck control	GSM825799			

جدول ۲- هستی‌شناسی و غنی‌سازی مسیرهای ژنی موثر در اردک با استفاده از ژن‌های متفاوت بیان شده

Table 2. Gene ontology pathways enriched by differentially expressed genes in duck

Genes	Count	P-value	Terms	Category	DEGs
					Up-regulated
DRAM1, TP53INP1, MTMR8, RAB8A	4	6.41E-03	Regulation of autophagy	Biological process	
CPT1A, CROT	2	4.29E-02	Carnitine metabolic process		
GPSM2, DYRK3,RABGAP1, XRCC4, FMR1, GPS1, PLA2G4A, ...	24	1.06E-03	Cytosol	Cellular component	
SETD3, USP10, GPS1, IREB2, CITED4, PARN, FNBP1L, HIF1A, FOXO1, ...	33	1.21E-02	Cytoplasm		
CPT1A, CPT2, FASN, CROT	4	1.45E-02	Transferase activity,transferring acyl groups	Molecular function	
IREB2, ACO1	2	4.12E-02	Iron-responsive element binding		
					Down-regulated
SLC13A1, ATP1B4, BMI1, ATP1B1	4	2.31E-04	Sodium ion transport	Biological process	
ATP1B4, ATP1B1	2	3.60E-02	Sodium:potassium-exchanging ATPase complex		
SLC34A2, OSBPL6, SULF1, BEST3, ADCY7, PRKCZ, PPP2CA, ...	13	3.84E-02	Plasma membrane	Cellular component	
ARMT1, HDC, HSD17B4, ADCY7	4	8.10E-02	Lyase activity		

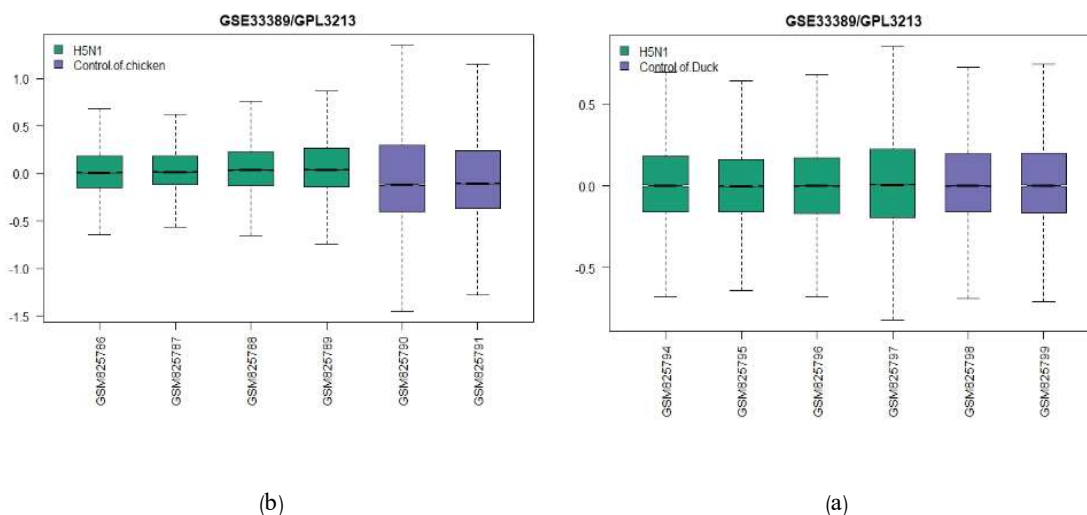


Fig. 1. Box plot related to duck (a) and chicken (b) samples after normalization. Blue color represents the control samples and green color represents the challenged samples
 شکل ۱- نمودار جعبه‌ای پس از نرمال‌سازی نمونه‌های اردک (الف) و جوجه (ب). رنگ آبی نمایانگر نمونه‌های شاهد و رنگ سبز نمایانگر نمونه‌های زیر چالش در اردک و مرغ است

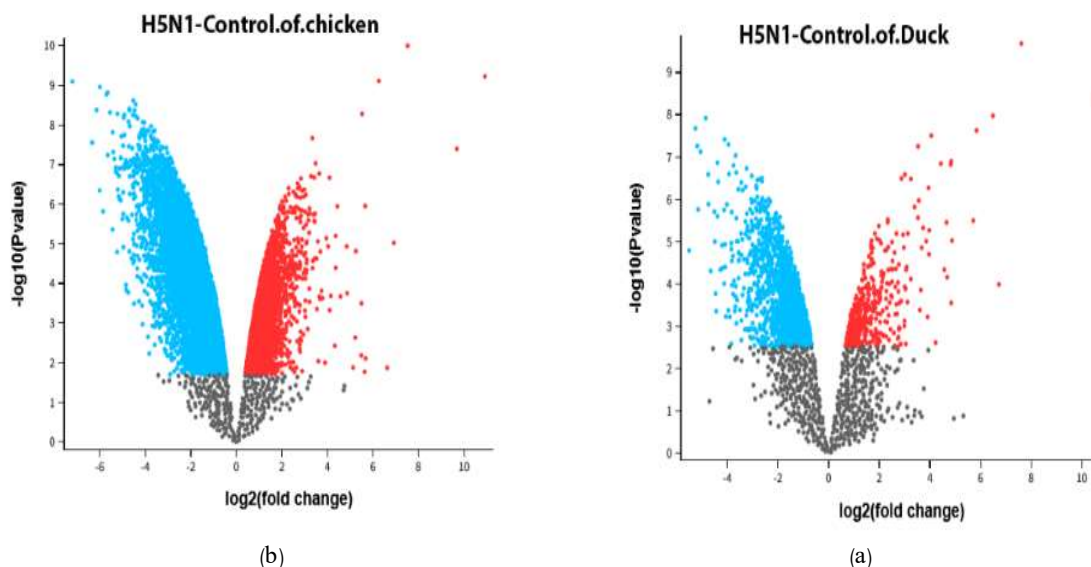


Fig. 2. Volcano plot of differential expression genes in duck (a) and chicken (b). Red points indicate up-regulated DEGs and blue points indicate down-regulated DEGs. The distribution of genes and the examination of their multiple changes show that in both organisms, the sum of genes with decreased expression is more than the sum of genes with increased expression

شکل ۲- نمودار آتش‌فشانی ژن‌های دارای بیان متفاوت در اردک (الف) و جوجه (ب). نقاط قرمز رنگ، ژن‌های با افزایش بیان و نقاط آبی رنگ، ژن‌های با کاهش بیان ژن را نشان می‌دهند. پراکنش ژن‌ها و بررسی تغییرات چند برابری آن‌ها نشان می‌دهد که در هر دو جاندار، مجموع ژن‌های دارای کاهش بیان از مجموع ژن‌های دارای افزایش بیان بیشتر است

که امکان جذب سلول‌های ایمنی به محل عفونت یا آسیب و شروع یک پاسخ ایمنی موثر را فراهم می‌کند (Stecher *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2019).

نتایج غنی‌سازی عملکردی ژن‌های با بیان متفاوت بر اساس هستی‌شناسی ژن نشان داد که مهم‌ترین مسیرهای اجزای سلولی شناسایی شده در اردک شامل سیتوزول و سیتوپلاسم (جدول ۲) و در جوجه شامل فضای خارج سلولی و هسته (جدول ۳) هستند. هنگامی که یک اردک به ویروس آنفلوانزا آلوده می‌شود، ویروس وارد سلول‌های میزبان می‌شود و شروع به تکثیر در داخل سیتوزول می‌کند که اجزای ویروسی در سیتوزول به وسیله سیستم ایمنی ذاتی میزبان تشخیص داده می‌شود. علاوه بر این، سیتوزول سلول‌های آلوده می‌تواند فرآیندی به نام پیرپتوز را ایجاد کند که نوعی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است که به محدود کردن گسترش ویروس کمک می‌کند (Lee *et al.*, 2018).

نتایج غنی‌سازی بررسی عملکرد مولکولی ژن‌های بیش‌بیا در اردک، فعالیت ترانسفراز و انتقال گروه‌های آسیل را نشان داد (جدول ۲). آسیل ترانسفرازها نقش مهمی در طیف وسیعی از فرآیندهای زیستی از جمله سوخت و ساز لیپیدها و انتقال سیگنال دارند. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد فعالیت آسیل ترانسفراز ممکن است طی عفونت تغییر کند، به‌طوری که افزایش فعالیت^۱ LPCAT ممکن است یک ساز و کار دفاعی میزبان برای مقابله با تغییرات در ترکیب غشایی ناشی از ویروس باشد که می‌تواند بر تکثیر ویروس تأثیر بگذارد (Lorizate and Kräusslich, 2011; Cañadas *et al.*, 2020).

مطالعه انجام شده در ارتباط با بیان متفاوت ژن‌های دخیل در عملکردهای زیستی کلیدی بین جوجه و اردک زیر چالش با ویروس فوق حاد پرندگان H5NA، افزایش بیان ژن ACO1 را در اردک نشان داد که سبب تجمع رادیکال‌های آزاد^۱ (ROS) شده و منجر به فعال شدن فرآیندهای زیستی می‌شود که نقش مهمی در مرگ سلولی از جمله آپوپتوز، نکروزیس، اتوفاژی و فروپتوز دارند (Kuchipudi *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2023).

نتایج تجزیه و تحلیل مسیرهای هستی‌شناسی ژن‌های بیش‌بیا در جوجه نشان داد که تنظیم مهاجرت سلولی، بازسازی عروق خونی و کموتاکسی لنفوسیت و مونوسیت از بخش‌های مهم فرآیندهای زیستی هستند که در پاسخ به مواجهه میزبان با عفونت ویروس H5N1 نسبت به میزبان شاهد دچار تغییر می‌شوند (جدول ۳). فاکتورهای رشد گروهی از مولکول‌های ارسال پیام هستند که نقش مهمی در تکثیر سلولی، تمایز، مهاجرت و بقا دارند. آن‌ها در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف از جمله رشد، ترمیم بافت و بازسازی نقش دارند. در جوجه، چندین خانواده از فاکتورهای رشد، از جمله فاکتورهای رشد فیبروبلاست (FGFs)، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد تغییردهنده بتا ($TGF-\beta$) و فاکتورهای رشد شبه انسولین (IGFs) شناسایی شده است. $TGF-\beta$ یک فاکتور رشد است که در فرآیندهای سلولی مختلف از جمله تکثیر سلولی، تمایز، مهاجرت و همچنین در تنظیم عملکرد سیستم ایمنی و التهاب نقش دارد (Eierhoff *et al.*, 2010; Eswarakumar *et al.*, 2005; Lax *et al.*, 1988).

در مراحل اولیه بازسازی رگ‌های خونی، رگ‌های خونی آسیب‌دیده، پیام‌های شیمیایی آزاد می‌کنند که گلبول‌های سفید خون را جذب می‌کنند، که این امر به حذف سلول‌های مرده از ناحیه آسیب‌دیده کمک می‌کند. رگ‌های خونی آسیب‌دیده همچنین فاکتورهای رشدی را آزاد می‌کنند که تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال را تحریک می‌کنند (Alberts *et al.*, 2002; Carmeliet and Jain, 2011). فرآیند بازسازی رگ‌های خونی بسیار کارآمد و سریع است و تصور می‌شود که به وسیله شبکه پیچیده‌ای از مسیرهای پیام‌دهی شامل فاکتورهای رشد مختلف، سیتوکین‌ها و سایر مولکول‌های پیام‌دهی تنظیم شود (Johnson and Wilgus, 2014).

در جوجه‌ها، نقش کموتاکسی لکوسیت در زمینه بیماری‌ها و عفونت‌های مختلف مانند آنفلوانزای پرندگان، عفونت سالمونلا و کوکسیدیوز مورد مطالعه قرار گرفته است. این ژن نقش مهمی برای دفاع در برابر عفونت‌های باکتریایی و ویروسی در پرندگان دارد. به‌طور کلی، کموتاکسی لکوسیتی یک فرآیند پیچیده و ضروری در پاسخ التهابی جوجه است

1 . Lysophosphatidylcholine acyl transferase

1 . Reactive oxygen species

چرب را تنظیم می‌کند (Grygiel-Górniak, 2014). PPAR α به‌عنوان بخشی از سیستم تنظیم‌کننده سوخت و ساز انرژی در اردک می‌تواند ساز و کار موثر جهت تولید انرژی مورد نیاز برای مبارزه با ویروس باشد (Navidshad and Royan, 2016).

در پژوهش حاضر، تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیرهای متابولیک در اردک مشخص نمود که مسیر پیام‌دهی گیرنده‌های NOD جزء مسیرهای معنی‌دار در اردک است. در مطالعه‌ای جهت بررسی و درک نقش NLRC5 در سیستم ایمنی پرندگان از داده‌های ریزآرایه سوبه‌های مختلف ویروس‌های کم و بسیار بیماری‌زای مرتبط با آنفلوآنزای پرندگان استفاده شد و نتایج پژوهش مشخص نمود که گیرنده NOD5 به وسیله طیف وسیعی از ویروس‌های آنفلوآنزای کم و بسیار بیماری‌زا در سلول‌های اولیه ریه و رده سلولی ماکروفاژ جوجه فعال می‌شود. همچنین، خاموش کردن ژن NLRC5 به واسطه siRNA در جوجه نشان داد که توقف فعالیت این ژن منجر به کاهش قابل توجه همانندسازی ویروس می‌شود و این امر از راه افزایش بیان ژن‌های مرتبط با مسیر سیگنالینگ NF κ B میسر می‌شود (Chothe *et al.*, 2020). به‌طور کلی، گیرنده‌های NOD نیز در سیتوزول یافت می‌شوند و طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا (باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها) را شناسایی می‌کنند و منجر به تشکیل التهاب‌های کمپلکس چند پروتئینی می‌شوند که سیتوکین‌های پیش التهابی را ایجاد می‌نمایند و بدین ترتیب افزایش پاسخ پیش التهابی می‌تواند عاملی بیماری‌زا پس از مواجهه با ویروس آنفلوآنزای فوق حاد باشد (Campbell and Magor, 2020).

عفونت ویروس آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان (H5N1) می‌تواند باعث واکنش‌های ایمنی بیش از حد و انتشار گسترده پاسخ‌های التهابی شود که به آن، طوفان سیتوکین می‌گویند (Us, 2008). برهمکنش‌های گیرنده سیتوکین-سیتوکین نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیماری‌زایی مانند پاسخ‌های ایمنی، التهاب و پاتوژن بیماری در جوجه ایفا می‌کنند. سیتوکین‌ها پروتئین‌های پیام‌دهنده کوچکی هستند که به وسیله سلول‌های ایمنی و انواع دیگر سلول‌ها ترشح می‌شوند و با اتصال به گیرنده‌های سیتوکین خاصی در سطح سلول، روی سلول‌های هدف عمل می‌کنند. این تعامل منجر به فعال شدن مسیرهای پیام‌دهی درون سلولی و تنظیم فرآیندهای مختلف سلولی می‌شود. چندین

نتایج غنی‌سازی بررسی عملکرد مولکولی ژن‌های بیش‌بیاں در جوجه نشان داد که ژن‌های بیش‌بیاں با فعالیت فاکتور رشد و فعالیت سیتوکین و کموکاین ارتباط بیشتری دارند (جدول ۳). نتایج پژوهش حاضر در بخش فرآیندهای زیستی، اجزای سلولی و عملکرد مولکولی، افزایش بیان اینترلوکین‌ها و سیتوکین‌ها در جوجه‌های زیر چالش با ویروس آنفلوآنزای فوق حاد H5N1 را نشان می‌دهد. محققان طی مطالعه‌ای ضمن تجزیه و تحلیل بیان داده‌های ریزآرایه به بررسی تفاوت‌های اساسی در ساز و کارهای ایمنی ذاتی جوجه و اردک در پاسخ به عفونت فوق حاد آنفلوآنزا پرداختند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که ژن‌های سیتوکین پیش التهابی، اینترلوکین IL-6، IL-8 (CXCL1) و IL-10، در سلول‌های جوجه زیر چالش با ویروس فوق حاد آنفلوآنزا H5N1 افزایش بیان داشته است (Kuchipudi *et al.*, 2014).

تولید بیش از حد سیتوکین‌ها و کموکاین‌ها می‌تواند منجر به التهاب شدید، از جمله جذب بیش از حد نوتروفیل‌ها و سلول‌های تک هسته‌ای در محل عفونت شود که این تجمع می‌تواند به بافت ریه آسیب برساند، ظرفیت تنفسی را کاهش دهد و باعث بیماری شدید و همچنین مرگ و میر شود. بررسی داده‌های مربوط به سیتوکین‌ها و کموکاین‌های القا شده در سرم بیماران آلوده به ویروس‌های آنفلوآنزای انسانی (H1N1 و H3N2) و آنفلوآنزای پرندگان (H5N1 و H7N9) نقش احتمالی آن‌ها در بیماری‌زایی را مشخص کرده است. در پژوهش‌های پیشین نشان داده است که سیتوکین‌ها می‌توانند به‌عنوان اهدافی برای درمان جدید و پیچیده‌تر در کاهش آثار نامطلوب پاسخ التهابی استفاده شوند (Betakova *et al.*, 2017).

بررسی و تجزیه و تحلیل مسیرهای زیستی ژن‌های بیش- بیان به وسیله KEGG منجر به شناسایی سوخت و ساز چربی، مسیر پیام‌دهی گیرنده NOD و مسیر پیام‌دهی PPAR در اردک (شکل ۳-الف) و برهمکنش گیرنده سیتوکین-سیتوکین و مسیر پیام‌دهی TLR در جوجه شد (شکل ۳-ب). سوخت و ساز لیپید برای حفظ هموستاز انرژی در موجودات چندسلولی ضروری است. تاکنون سه زیرخانواده از ژن PPAR به‌طور جداگانه شناسایی شده‌اند که با عنوان α ، δ و γ شناخته می‌شوند. گیرنده فعال شده با تکثیرکننده پراکسی‌زوم (PPAR)، بیان بسیاری از ژن‌های دخیل در فرآیندهای سوخت و ساز گلوکز و ذخیره اسید

TLRها که در سطح سلولهای ایمنی بیان می‌شوند، الگوهای مولکولی مرتبط با عوامل بیماری‌زایی که معمولاً روی عوامل بیماری‌زای میکروبی یافت می‌شوند را شناسایی کنند (Lee *et al.*, 2019).

هم‌چنین نتایج غنی‌سازی ژن‌ها نشان دادند که ژن‌های کم- بیان در اردک در مسیرهای مختلف شامل انتقال یون سدیم، غشای پلاسمایی کمپلکس ATPase تبادل‌کننده سدیم-پتاسیم، فعالیت لیز و پیام‌دهی آدرنرژیک در کاردیومیوسیت‌ها فعالیت دارند، در حالی که در جوجه، ژن-های کم‌بیان در فرآیندهای تقسیم سلولی، چرخه سلولی، سیتوزول، سانتروزوم، اتصال ATP، فعالیت ATPase و مسیر پیام‌دهی FoxO فعال هستند.

خانواده از سیتوکین‌ها و گیرنده‌های سیتوکین در جوجه مانند اینترلوکین‌ها، اینترفرون‌ها، خانواده فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF) و کموکاین‌ها وجود دارد. برهمکنش گیرنده سیتوکین-سیتوکین در جوجه یک فرآیند پیچیده و پویا است که نقش مهمی در عملکرد ایمنی و بیماری‌زایی بیماری ایفا می‌کند. با هدف قرار دادن سیتوکین‌های خاص یا گیرنده‌های آن‌ها، ممکن است بتوان پاسخ‌های ایمنی را تعدیل کرد، التهاب را کاهش داد و نتایج درمان بیماری‌های مختلف در جوجه را بهبود بخشید (Turner *et al.*, 2014; Metcalfe *et al.*, 2020; Vu *et al.*, 2022). مسیر پیام‌دهی (TLR) یک جزء حیاتی از سیستم ایمنی ذاتی در جوجه و سایر موجودات است. این مسیر زمانی فعال می‌شود که

جدول ۳- هستی‌شناسی و غنی‌سازی مسیرهای ژنی موثر در جوجه با استفاده از ژن‌های متفاوت بیان شده

Table 3. Gene ontology pathways enriched by differentially expressed genes in chicken

Table 3: Gene ontology pathways enriched by differentially expressed genes in chicken					
Genes	Count	P-value	Terms	Category	DEGs
					Up-regulated
FGF8, KIF2A, FGF18, THY1	4	5.42E-03	Regulation of cell migration	Biological process	
FGF8, CHD7, MDM2	3	6.47E-03	Blood vessel remodeling		
IL8L2, CCL4	2	1.01E-02	lymphocyte chemotaxis		
IL8L2, CCL4	2	1.29E-02	Monocyte chemotaxis		
FGF8, CCL4, FGF18	4	3.64E-02	Positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade		
GREM1, OLFM1, IL6, IL8L2, CCL4, ...	12	2.22E-02	Extracellular space	Cellular component	
NARF, KIF2A, CHD7, FGF18,...	7	2.95E-02	Nucleolus		
IL6, IL8L2, FGF8, FGF18, PDGFB, ...	7	3.80E-04	Growth factor activity	Molecular function	
GREM1, IL6, IL8L2, INHBB, INHBA	5	1.12E-02	Cytokine activity		
IL8L2, CCL4	3	2.07E-02	Chemokine activity		
Down-regulated					
TOP2A, EPB41,NCAPG SMC2, CCNB3, ...	33	4.51E-07	Cell division	Biological process	
EPB41, SMC5, BRCA1, SMC4, GNAI1, ...	28	8.96E-07	Cell cycle		
CBLB, EPRS, ACTB, NUBP2, LONP1, ...	205	6.60E-11	Cytosol	Cellular component	
GPSM2, PCNA, VPS4B, SSNA1, SLC1A4, ...	41	2.42E-07	Centrosome		
UBE2D3, EIF4A3, SMC5, SMC3, ...	142	2.46E-11	ATP binding	Molecular function	
RNF20, HACE1, WDSUB1, CUL1, ...	48	4.26E-10	ATPase activity		

دفاع در برابر ویروس در اردک و جوجه را نشان دادند (Klees *et al.*, 2022).

ترسیم شبکه پروتئین-پروتئین (PPI) و شناسایی ژن‌های هاب: ترسیم شبکه پروتئین-پروتئین و شناسایی ژن‌های هاب، یکی از روش‌های درک بهتر فرآیندهای زیستی است که به محققین این امکان را می‌دهد تا مطالعه همه ژن‌ها در کنار یکدیگر را با نگاهی کلی‌تر انجام دهند. به‌طور کلی، ترسیم شبکه بیان ژن در نرم افزار Cytoscape بر اساس میزان همبستگی که در ژن‌های مربوط وجود دارد صورت می‌گیرد (Hasin *et al.*, 2017). نتایج تجزیه و تحلیل شبکه‌های پروتئینی ترسیم شده به وسیله افزونه CytoHubba نرم افزار Cytoscape نشان داد که ژن‌های PLOD2, COL18A1, COL4A3, COL3A1, COL6A3, PLOD1 و P4HA2 به‌عنوان ژن‌های هاب در اردک (شکل ۴-الف) و همچنین ژن‌های بسیار تاثیرگذار BUB1, AURKA و KIF11, PRC1, PLK1, CDC20, NDC80

به‌عنوان ژن‌های هاب در جوجه (شکل ۴-ب) هستند. کلاژن نوع ۱۸ آلفا ۱ (COL18A1)، کلاژن نوع ۴ آلفا ۳ (COL4A3) و کلاژن نوع ۳ آلفا ۱ (COL3A1) جزء فراوان‌ترین پروتئین‌ها در ماتریکس خارج سلولی بسیاری از بافت‌ها از جمله بافت ریه هستند. در اردک‌های آلوده به آنفلوآنزای H5N1، مطالعات نشان داده است که بیان برخی از ژن‌های خانواده کلاژن در ریه‌ها تنظیم می‌شود که اهمیت این ژن را در مواجهه با ویروس آنفلوآنزا بیان می‌دارد و نشان می‌دهد که ژن‌های خانواده کلاژن ممکن است در پاسخ میزبان به ویروس نقش داشته باشند. پیشنهاد شده است که افزایش بیان ژن‌ها ممکن است به ایجاد فیبروز ریوی، که یک عارضه شایع عفونت‌های تنفسی شدید است، کمک کند. علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که پاسخ به عفونت H5N1 به وسیله مسیر پیام‌دهی TGF- β /Smad انجام می‌شود که یک مسیر کلیدی درگیر در فیبروز بافتی است (Kuivaniemi and Tromp, 2019; Kuek and Lee, 2020). محققان در بررسی‌های پیشین بیان داشته‌اند که ویروس‌های آنفلوآنزا در هنگام عفونت با اجزای ماتریکس خارج سلولی از جمله کلاژن تعامل دارند. همچنین، محققان نشان داده‌اند که به‌طور خاص، پروتئین سطح ویروسی هم‌گلوٲینین که به کلاژن متصل می‌شود، ممکن است ورود ویروس به سلول‌های میزبان را تسهیل کند (Paquette *et al.*, 2015; Pociask *et al.*, 2017).

نتایج پژوهش حاضر بیان می‌دارد که در جوجه‌ها با توجه به تمرکز بر پاسخ التهابی و افزایش ایمنی ذاتی در مواجهه با ویروس آنفلوآنزا، بیان ژن‌های مرتبط با فرآیندهای رشد و تولید انرژی کاهش می‌یابد. نقش محافظتی ایمنی ذاتی به وضوح طی عفونت HPAI در پرندگان نشان داده شده است. محققان نشان داده‌اند که اردک‌ها عموماً بیماری بدون علامت یا خفیف را نشان می‌دهند، در حالی که جوجه‌ها علائم شدید بیماری را نشان می‌دهند و همچنین، به دنبال عفونت H5N1، سلول‌های اولیه جدا شده از ریه جوجه‌ها در مقایسه با سلول‌های اردک، پاسخ‌های ایمنی و پیش التهابی بسیار قوی‌تری را نشان می‌دهند و به نظر می‌رسد که این پاسخ شدید از راه مهار STAT-3 ایجاد می‌شود (Kuchipudi *et al.*, 2014).

در مطالعه‌ای که روی سلول‌های اندوتلیال جوجه و اردک انجام شد، تفاوت پاسخ به عفونت با ویروس H5N1 مشاهده شد. به‌طور کلی، این ویروس موجب القای یک طوفان سیتوکینی و بیماری شدید در جوجه‌ها می‌شود؛ اما در اردک، این طوفان سیتوکین مشاهده نمی‌شود (Tong *et al.*, 2021). بررسی تفاوت پاسخ التهابی و عفونت‌زایی ویروس آنفلوآنزای H5N6 در اردک‌ها و جوجه‌ها نشان داد که بیماری‌زایی و پاسخ التهابی این ویروس در جوجه‌ها نسبت به اردک‌ها بسیار بالاتر است و مشخص شد که سطوح اینترفرون و اینترلوکین‌ها در ریه جوجه‌های آلوده به این ویروس در مقایسه با اردک‌ها به‌طور قابل توجهی بالاتر بود (Wang *et al.*, 2021). نتایج بررسی پاسخ سیستم ایمنی ذاتی به ویروس آنفلوآنزای پرندگان در اردک‌ها و جوجه‌ها حاکی از مقاومت بالاتر اردک‌ها به سویه بسیار بیماری‌زای آنفلوآنزای پرندگان نسبت به جوجه‌ها بود و این مقاومت بالاتر به دلیل کنترل دقیق پیام‌های پیش التهابی و سابقه طولانی سازگاری این گونه از راه تنظیم دقیق تکاملی است (Evseev and Magor, 2019).

در مطالعه‌ای به بررسی مقایسه‌ای فرآیند تنظیم ژن در پاسخ به ویروس آنفلوآنزای پرندگان در جوجه و اردک پرداختند، به‌طوری که تنظیم‌کننده‌های بالادستی مانند فاکتورهای رونویسی (TFها) و تعامل پیچیده آن‌ها بررسی شد. نتایج مطالعه از تفاوت عمده در نواحی پروموتور ژن‌های ارتولوگ در دو گونه حکایت داشت. همچنین، محققان اهمیت پیام‌دهی TGF- β و مسیرهای JAK/STAT برای

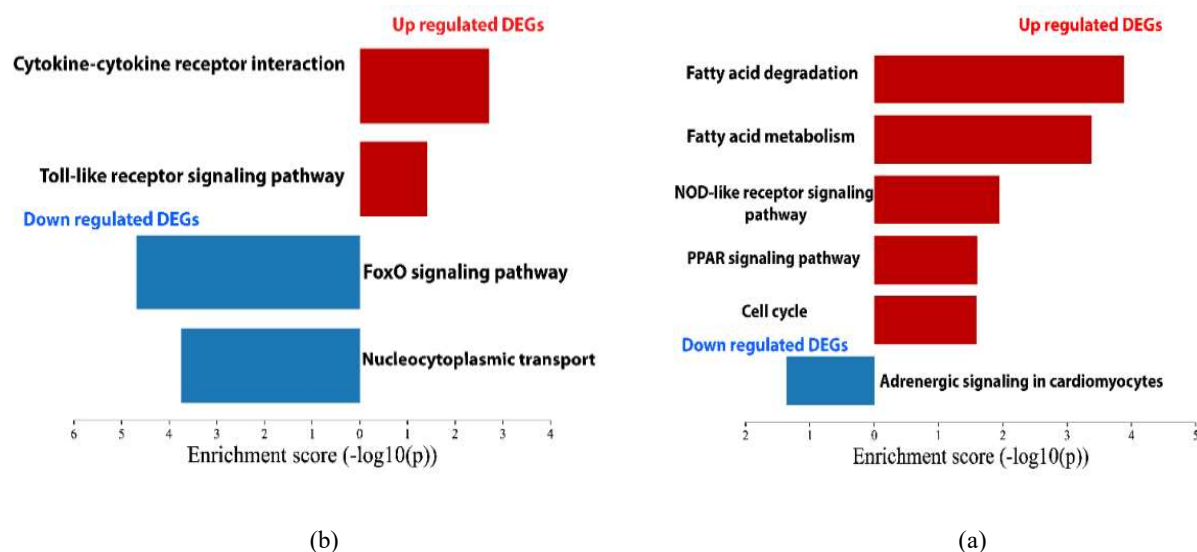


Fig. 3. Enrichment of metabolic pathways in duck (a) and chicken (b). The red color represents the terms related to the up-regulated DEGs and the blue color represents the terms related to the down-regulated DEGs

شکل ۳- تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیرهای متابولیک در اردک (الف) و جوجه (ب). رنگ قرمز نمایانگر مسیرهای مربوط به ژن‌های بیش- بیان و رنگ آبی نمایانگر مسیرهای مربوط به ژن‌های کم‌بیان است

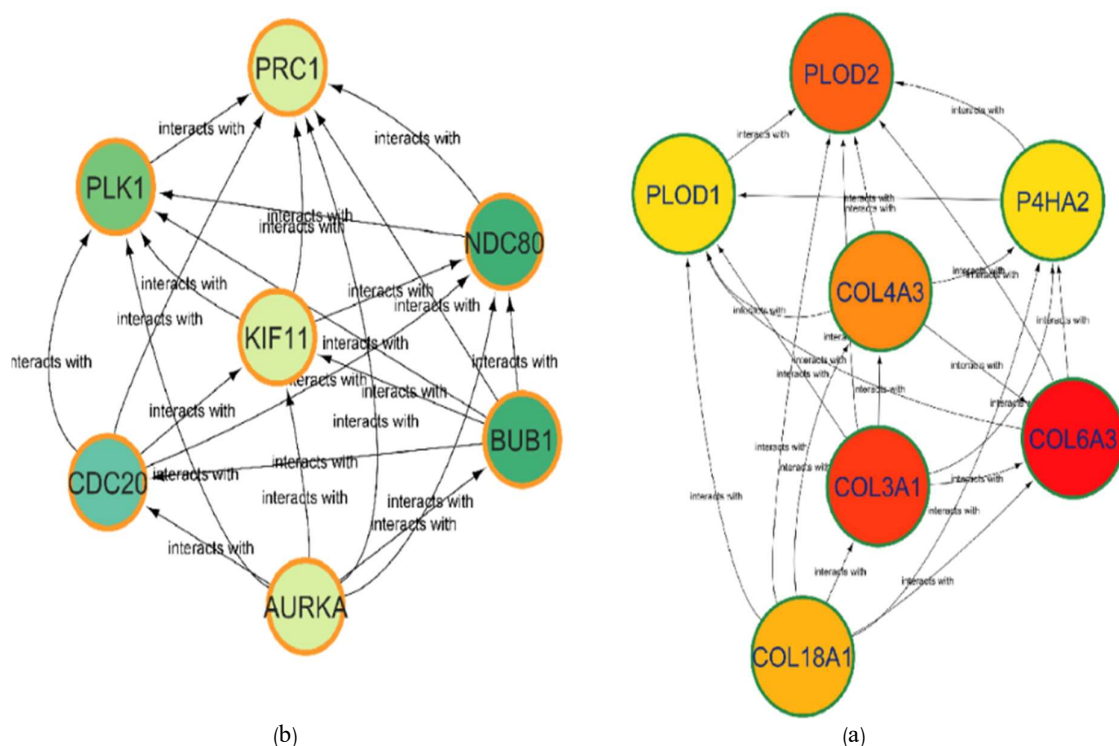


Fig. 4. Results of protein-protein network (PPI) analysis and identification of related key genes in duck (a) and chicken (b). The relationship and effects of key genes are shown with arrows

شکل ۴- نتایج تجزیه و تحلیل شبکه پروتئین-پروتئین (PPI) و شناسایی ژن‌های کلیدی مرتبط در اردک (الف) و جوجه (ب). نحوه ارتباط و اثرگذاری ژن‌های کلیدی با فلش نمایش داده شده است

سلول‌های سرطانی ریه تأثیر می‌گذارد (Yu *et al.*, 2023). ژن AURKA، آپوپتوز و مرگ سلولی را در بیماری‌های مختلف تنظیم کرده و آثار بالینی مطلوبی از خود نشان داده است (Wang *et al.*, 2021).

ژن KIF11 که با نام‌های کینزین-۵ و Eg5 نیز شناخته می‌شود برای تنظیم تشکیل دوک میتوزی و گسترش میکروتوبول ضروری است. از آنجا که انواع مختلف KIF با چرخه حیات ویروسی مرتبط هستند، در یک پژوهش، نقش KIF11 در تکثیر ویروس آنفلوآنزای نوع A و سیتوپاتوژنز برای مشخص کردن نقش KIF11 به‌عنوان یک هدف درمانی در برابر آنفلوآنزای نوع A بررسی شد و نتایج تحقیقی نشان داد که مهار فعالیت KIF11 به‌طور موثری اثر سیتوپاتیک ناشی از ویروس را کاهش داده و تکثیر ویروس را سرکوب می‌کند. از این رو، KIF11 یک هدف درمانی بالقوه برای مقابله با ویروس آنفلوآنزا است (Kim *et al.*, 2021).

افزونه MCODE نرم افزار Cytoscape، شناسایی ماژول‌های کلیدی در شبکه PPI را با دقت زیاد صورت داد و نتایج این تجزیه حضور تعداد سه ماژول کلیدی را در شبکه PPI اردک (شکل ۵) و پنج ماژول کلیدی را در شبکه PPI جوجه نشان داد (شکل ۶).

PLD2 یک آنزیم درون سلولی است که برای بیوژنز کلاژن مورد نیاز بوده و بیان آن می‌تواند به وسیله هیپوکسی و TGF- β 1 القا شود. افزایش بیان PLD2، محتوای کلاژن را افزایش می‌دهد و با افزایش چسبندگی، ازدیاد طول و تحرک سلول، ماتریکس خارج سلولی را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. آثار PLD2 بر مهاجرت یا تهاجم سلولی و ارزیابی بیشتر نقش آن در افزایش تحرک سلولی ناشی از هیپوکسی بررسی شده است (Mutryn *et al.*, 2015). ژن NDC80 جزئی از کمپلکس کینتوکور است که نقطه تماس مستقیم بین کینتوکورها و میکروتوبول‌ها است. این ژن نقش مهمی در اتصال و جداسازی صحیح کروموزوم‌ها در طول تقسیم سلولی نیز ایفا می‌کند و بیان بیش از حد آن باعث افزایش اندازه سلول و ایجاد شکل غیرطبیعی در هسته می‌شود (McClelland *et al.*, 2003).

AURKA به‌عنوان یکی از ژن‌های هاب شناسایی شده در شبکه PPI جوجه است و سطح پروتئین ضد آپوپتوز BIRC5 را با سرکوب بیان آدپتور سوپسترای لیگاز یوبیکوئیتین-پروتئین لیگاز E3 FBXL7 SCF(FBXL7) از راه فسفوریلاسیون فاکتور رونویسی FoxO تنظیم می‌کند (Obexer *et al.*, 2009). در مطالعه‌ای نشان داده شده که تغییرات در بیان ژن AURKA ضمن ایجاد اختلال در چرخه سلولی به‌طور قابل توجهی بر تکثیر و مهاجرت

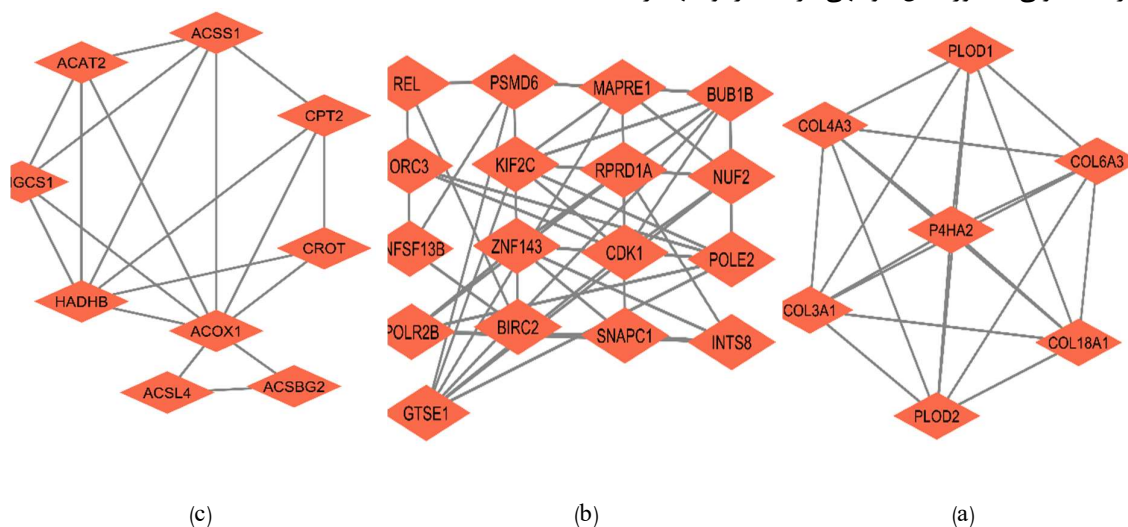


Fig. 5. Identification of key modules of host response to infection in duck. The scores of modules 1, 2 and 3 were estimated as 7, 5.25 and 4.75, respectively, using MCODE plugin of Cytoscape software

شکل ۵- شناسایی ماژول‌های کلیدی پاسخ میزبان به عفونت در اردک. الف: ماژول ۱، ب: ماژول ۲ و ج: ماژول ۳ است.

امتیاز ماژول ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۷، ۵/۲۵ و ۴/۷۵ با استفاده از افزونه MCODE نرم افزار Cytoscape برآورد شد

اسپالیسوزوم کمپلکس بزرگ ریبونوکلوپروتئینی است و عمدتاً در هسته سلول‌های یوکاریوتی یافت می‌شود. ویروس‌های آنفلوانزا در مرحله تکثیر هسته‌ای خود، ماشین پیرایش میزبان را زیر کنترل خود درآورده تا برخی از بخش‌های RNA خود (مانند: M و NS) را پردازش کنند.

نتایج یک پژوهش در ارتباط با تعامل بین ویروس‌های آنفلوانزا و اسپالیسوزوم سلولی با تمرکز ویژه بر ویروس‌های آنفلوانزای نوع A نشان داد که ویروس‌ها ساز و کارهای تنظیمی دقیقی را برای تخصیص مجدد اسپالیسوزوم میزبان برای تغییر بیان سلولی میزبان ایجاد کرده‌اند (Dubois *et al.*, 2014).

تغییرات بیان و فعالیت سرکوبگر تومور p53، که در درجه اول به‌عنوان یک فاکتور رونویسی عمل می‌کند، می‌تواند عملکرد عفونت‌های ویروسی مختلف را در جوجه‌ها تحت تأثیر قرار دهد. تا به امروز، عملکرد ضد ویروسی chp53 در بسیاری از ویروس‌ها، مانند ویروس بیماری مارک، زیرگروه J ویروس لوکوز پرندگان و ویروس لارنگوتراکیت عفونی پرندگان (Li) تأیید شده است (Chen *et al.*, 2022).

بنابراین شناسایی حضور مسیر پیام‌رسانی p53 به‌عنوان یکی از ماژول‌های عملکردی در جوجه طی پژوهش حاضر می‌تواند به بهبود درک ساز و کارهای تنظیم‌کننده رونویسی p53 و عملکردهای ضدویروسی آن در جوجه‌ها در مواجهه با آنفلوانزا کمک کند. به‌طور کلی، تفاوت در بیماری‌زایی بین اردک و جوجه را می‌توان بدین صورت تفسیر نمود که القای سریع آپوپتوز در سلول‌های اردک‌های آلوده به آنفلوانزای فوق حاد پرندگان (HPAI)، ممکن است برای میزبان مفید باشد، در حالی که آپوپتوز تاخیری در سلول‌های جوجه‌ها ممکن است یک مزیت برای ویروس محسوب شود (Kuchipudi *et al.*, 2012). به‌طور کلی و با توجه به نتایج حاصله از این پژوهش، تجزیه و تحلیل شبکه ژنی مقایسه‌ای، بین جوجه‌ها و اردک‌ها می‌تواند به درک ساز و کارهای مولکولی پاسخ میزبان به عفونت آنفلوانزای H5N1 در گونه‌های مختلف پرندگان کمک کند. این اطلاعات می‌تواند برای توسعه اقدامات کنترلی موثرتر و کاهش خطرات در بیماری‌های همه‌گیر بالقوه نیز مورد استفاده قرار گیرد. به‌عنوان مثال، درک تفاوت‌های بیان ژن بین جوجه‌ها و اردک‌ها می‌تواند به ایجاد واکسن‌ها و درمان‌هایی که مختص هر گونه است کمک کند و احتمال شیوع بیماری بین جمعیت‌های مختلف پرندگان را کاهش

نتایج تجزیه و تحلیل غنی‌سازی ماژول‌های کلیدی به وسیله افزونه clueGO نرم‌افزار Cytoscape مشخص کرد که این ماژول‌ها در اردک در مسیرهای مربوط به تعامل گیرنده ماتریکس خارج سلولی، تجزیه اسیدهای چرب، مسیر پیام-دهی PPAR، پراکسی‌زوم و تجزیه والین، لوسین و ایزولوسین فعال هستند (شکل ۷).

والین، ایزولوسین و لوسین اسیدهای آمینه ضروری هستند و به‌عنوان اسیدهای آمینه شاخه‌دار (BCAAs) شناخته می‌شوند. کاتابولیسم هر سه اسید آمینه از ماهیچه شروع می‌شود و NADH و FADH2 تولید می‌کند که می‌تواند برای تولید ATP استفاده شود (Campos-Ferraz *et al.*, 2013).

نتایج یک پژوهش، آثار اسیدهای آمینه شاخه‌دار بر رشد، عملکرد تولید، ایمنی و سلامت روده طیور را ارائه داد و BCAA را به‌عنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی ساخت پروتئین معرفی نمود و نقش مهم آن‌ها را در حفظ پاسخ ایمنی در طیور برجسته کرد (Kim *et al.*, 2022). بدین ترتیب با توجه به نتایج پژوهش حاضر این‌گونه می‌توان تفسیر نمود که اردک در مواجهه با ویروس آنفلوانزا با فعال-سازی مسیر تجزیه اسیدهای آمینه شاخه‌دار می‌تواند با تولید انرژی بیشتر و افزایش پاسخ ایمنی در برابر ویروس، مقاومت نماید.

نتایج تجزیه و تحلیل غنی‌سازی ماژول‌های کلیدی به وسیله افزونه clueGO نرم‌افزار Cytoscape مشخص کرد که این ماژول‌های عملکردی در جوجه نیز در مسیرهای متفاوتی مانند: بیوژنز ریبوزوم، انتقال RNA، اسپالیسوزوم، سیکل سلولی، پیام‌رسانی p53 و غیره فعال هستند (شکل ۸). بیوژنز ریبوزوم فرآیندی است که ریبوزوم‌ها را تولید می‌کند و نقش اساسی در تمایز، آپوپتوز، رشد و غیره ایفا می‌کند (Jiao *et al.*, 2023). بیوژنز ریبوزوم و ساخت پروتئین در تکثیر ویروسی اهمیت دارد و مطالعات گزارش شده اخیر نشان داده‌اند که عوامل بیوژنز ریبوزوم (RBFs) و پروتئین‌های ریبوزومی (RPs) به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های چندوجهی در ترجمه انتخابی رونوشت‌های ویروسی عمل می‌کنند (Dong *et al.*, 2021). این تحقیقات منجر به شناسایی اهداف ضد ویروسی و طراحی نهایی داروهای ضد ویروسی شده و توسعه راهبردهای درمانی را برای تولید عوامل ضد ویروسی بهینه جهت کنترل موثر بیماری‌های ویروسی پیش می‌برد (Dong *et al.*, 2021).

را هدف قرار می‌دهند، کمک کند و از شدت و طول مدت بیماری بکاهد.

دهد. علاوه بر این، شناسایی ژن‌های دخیل در مهاجرت و مرگ سلولی می‌تواند به توسعه درمان‌هایی که این فرآیندها

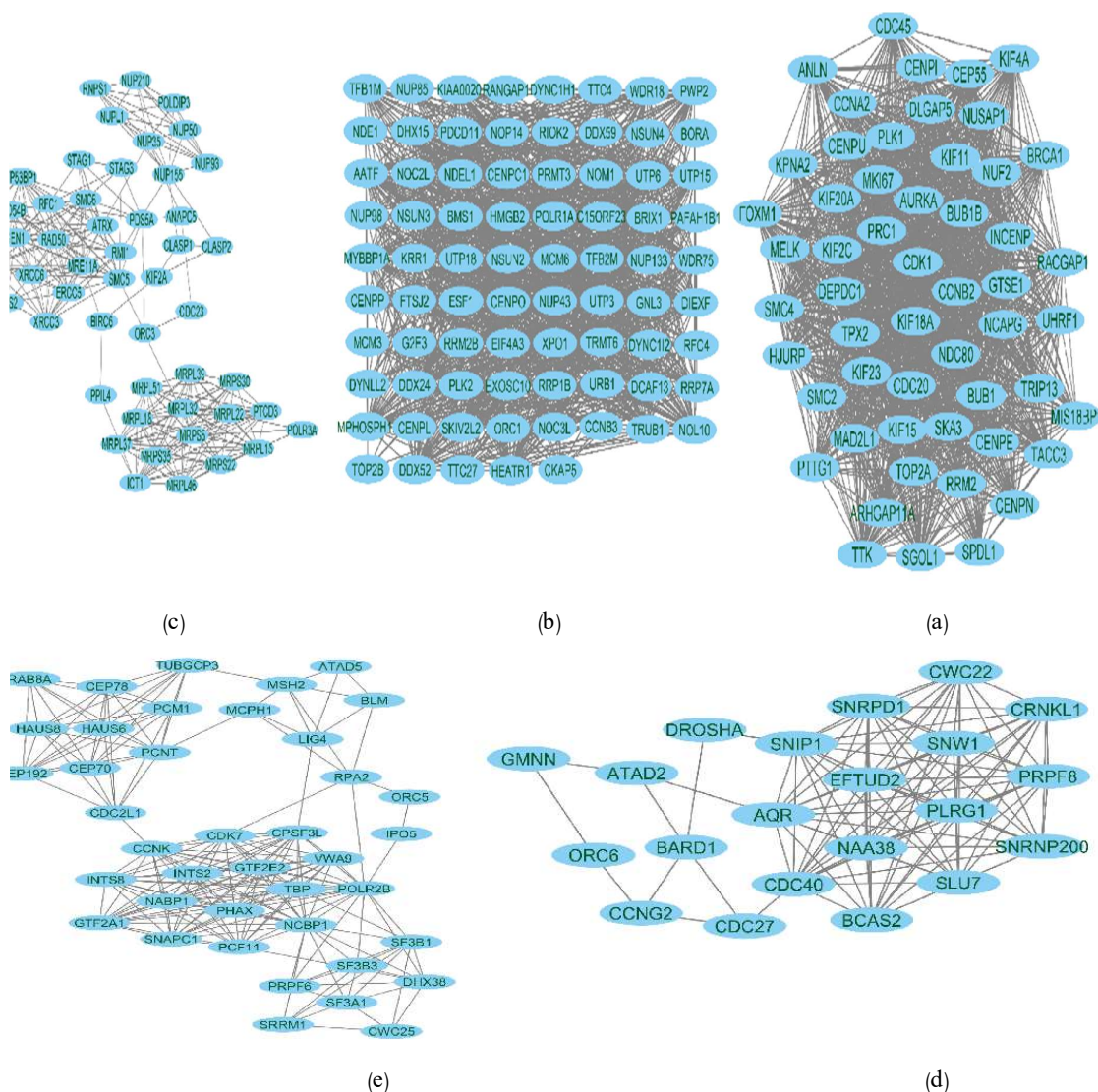


Fig. 6. Identification of key modules of host response to infection in chicken. a: Module 1, b: Module 2, c: Module 3, d: Module 4 and e: Module 5. The score of module 1 to 5 was estimated as 49.8, 10.2, 10.36, 10.2 and 10 respectively using the MCODE plugin of Cytoscape software

شکل ۶- شناسایی ماژول‌های کلیدی پاسخ میزبان به عفونت در جوجه. الف: ماژول ۱، ب: ماژول ۲، ج: ماژول ۳، د: ماژول ۴ و ح: ماژول ۵ است. امتیاز ماژول ۱ تا ۵ با استفاده از افزونه MCODE نرم افزار Cytoscape به ترتیب ۴۹/۸، ۱۰/۲، ۱۰/۳۶، ۱۰/۲ و ۱۰ برآورد شد

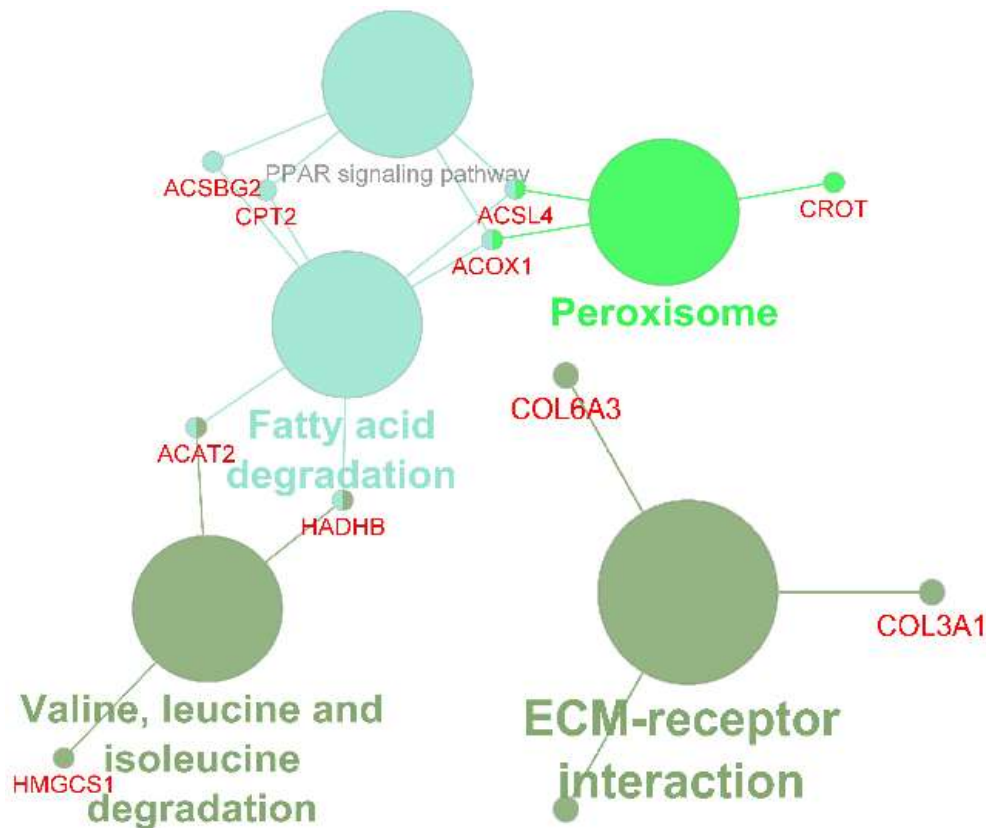


Fig. 7. DEGs enrichment terms related to key modules identified in duck. The Cytoscape plugin ClueGO/CluePedia was used to study the functional enrichment of key modules ($P < 0.05$). The bold fonts indicate the most important pathway of each group and the names of the DEGs involved in each group are displayed in red font

شکل ۷- مسیرهای غنی‌سازی مربوط به ماژول‌های کلیدی شناسایی شده در اردک. از افزونه ClueGO/CluePedia نرم افزار Cytoscape برای مطالعه غنی‌سازی عملکردی ماژول‌های کلیدی استفاده شد ($P < 0.05$). فونت‌های پررنگ نشان‌دهنده مهم‌ترین مسیر هر گروه هستند و نام DEG‌های مرتبط در هر گروه با فونت قرمز نمایش داده شده است

نتیجه‌گیری کلی

می‌کنند، در حالی که اردک‌ها بر تولید انرژی و تنظیم پاسخ ایمنی تمرکز می‌نمایند. توجه به این نکته مهم است که تجزیه و تحلیل شبکه ژنی ارائه شده در این مطالعه گامی اولیه به سمت کشف نحوه پاسخ عفونت آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان (H5N1) در جوجه و اردک است و مطالعات عملکردی بیشتر، آزمایش‌های اعتبارسنجی و ادغام با سایر داده‌های Omics برای تایید نقش ژن‌ها، مسیرها و ژن‌های هاب در پاسخ میزبان به ویروس H5N1 مورد نیاز است. از این رو، نتایج تجزیه و تحلیل شبکه ژنی مقایسه‌ای در جوجه‌ها و اردک‌ها که از این پژوهش به‌دست آمده است می‌تواند بینش ارزشمندی در مورد ساز و کارهای مولکولی زیربنایی پاسخ میزبان به عفونت آنفلوآنزای H5N1 ارائه دهد. بدین ترتیب با شناسایی ژن‌های متفاوت بیان شده،

مطالعه حاضر با هدف کشف پاسخ عفونت آنفلوآنزای H5N1 در جوجه‌ها و اردک‌ها از راه تجزیه و تحلیل شبکه ژنی مقایسه‌ای انجام شد. ژن‌های متفاوت بیان شده در پاسخ به عفونت H5N1 در جوجه و اردک در فرآیندهای زیستی مختلف، از جمله پاسخ ایمنی، التهاب، تکثیر ویروس و برهم‌کنش‌های میزبان و عامل بیماری‌زا نقش حیاتی دارند. به‌طور کلی، تجزیه و تحلیل شبکه ژنی نشان داد که جوجه‌ها و اردک‌ها، راهبردهای ژنتیکی مختلفی را پس از مواجهه با عفونت ویروسی آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان H5N1 جهت پاسخ به عفونت پی‌ریزی می‌نمایند. نتایج غنی‌سازی ژن‌ها و بررسی‌های زیستی نشان داد که جوجه‌ها به‌طور عمده، ژن‌های دخیل در مبارزه با ویروس و التهاب را فعال

ماژول‌های عملکردی و ژن‌های هاب در این پژوهش، می‌توان بیان نمود که اهداف بالقوه برای تحقیقات آینده تا حدودی برجسته شده است. بدون شک مطالعات بیشتر در

این زمینه، دانش در مورد بیماری‌زایی آنفلوآنزای پرندگان را ارتقا خواهد داد و به توسعه راهبردهایی برای کنترل و پیشگیری موثر از شیوع آنفلوآنزا H5N1 کمک خواهد نمود.

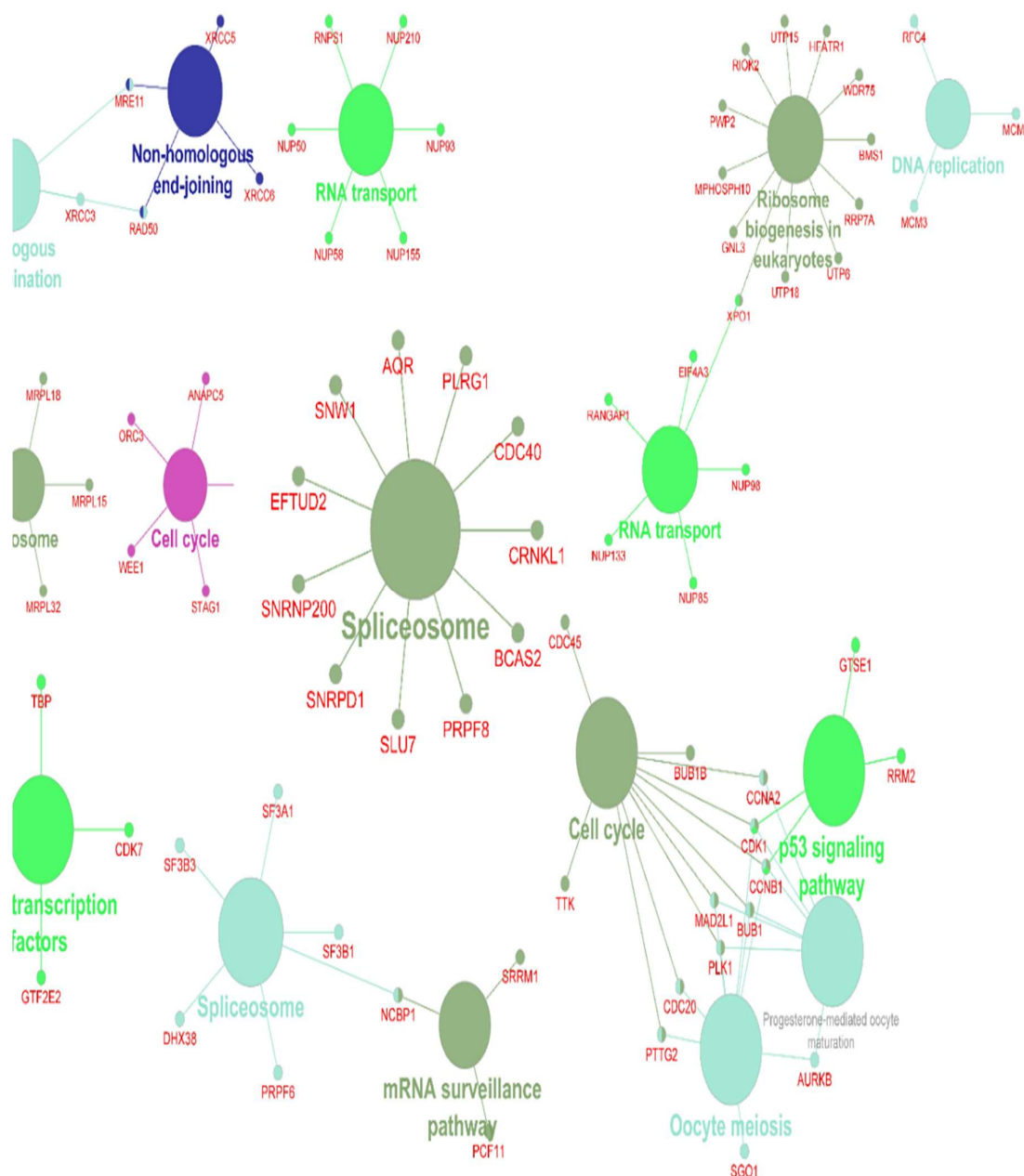


Fig. 8. DEGs enrichment terms related to key modules identified in chicken. The Cytoscape plugin ClueGO/CluePedia was used to study the functional enrichment of key modules ($P < 0.05$). The bold fonts indicate the most important pathway of each group and the names of the DEGs involved in each group are displayed in red font

شکل ۸- مسیرهای غنی‌سازی مربوط به ماژول‌های کلیدی شناسایی شده در جوجه. از افزونه ClueGO/CluePedia نرم افزار Cytoscape برای مطالعه غنی‌سازی عملکردی ماژول‌های کلیدی استفاده شد ($P < 0.05$). فونت‌های پررنگ نشان‌دهنده مهم‌ترین مسیر هر گروه هستند و نام DEG‌های مرتبط در هر گروه با فونت قرمز نمایش داده شده است.

فهرست منابع

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Blood vessels and endothelial cells. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science.
- Arrell, D., & Terzic, A. (2010). Network systems biology for drug discovery. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 88(1), 120-125. doi: 10.1038/clpt.2010.91
- Bader, G. D., & Hogue, C. W. (2003). An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 4, 2. doi: 10.1186/1471-2105-4-2
- Beigel, J. (2005). Writing Committee of the World Health Organization Consultation on human influenza a/H5: avian influenza a (H5N1) infection in humans. *New England Journal of Medicine*, 353, 1374-1385.
- Betakova, T., Kostrabova, A., Lachova, V., & Turianova, L. (2017). Cytokines induced during influenza virus infection. *Current Pharmaceutical Design*, 23(18), 2616-2622.
- Bindea, G., Galon, J., & Mlecnik, B. (2013). CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics*, 29(5), 663-661. doi: 10.1093/bioinformatics/btt019
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W. H., Pagès, F., Trajanoski, Z., & Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, 25(8), 1091-1093. doi: 10.1093/bioinformatics/btp101
- Cagle, C., Wasilenko, J., Adams, S. C., Cardona, C. J., To, T. L., Nguyen, T., Spackman, E., Suarez, D. L., Smith, D., & Shepherd, E. (2012). Differences in pathogenicity, response to vaccination, and innate immune responses in different types of ducks infected with a virulent H5N1 highly pathogenic avian influenza virus from Vietnam. *Avian Diseases*, 56(3), 479-487. doi: 10.1637/10030-120511-Reg.1
- Campbell, L. K., & Magor, K. E. (2020). Pattern recognition receptor signaling and innate responses to influenza A viruses in the mallard duck, compared to humans and chickens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 209. doi: 10.3389/fcimb.2020.00209
- Campos-Ferraz, P. L., Bozza, T., Nicastro, H., & Lancha Jr, A. H. (2013). Distinct effects of leucine or a mixture of the branched-chain amino acids (leucine, isoleucine, and valine) supplementation on resistance to fatigue, and muscle and liver-glycogen degradation, in trained rats. *Nutrition*, 29(11-12), 1388-1394. doi: 10.1016/j.nut.2013.05.003
- Cañadas, O., Olmeda, B., Alonso, A., & Pérez-Gil, J. (2020). Lipid-protein and protein-protein interactions in the pulmonary surfactant system and their role in lung homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3708. doi: 10.3390/ijms21103708
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298-307. doi: 10.1038/nature10144
- Chen, Z., Cui, L., Xu, L., Liu, Z., Liang, Y., Li, X., Zhang, Y., Li, Y., Liu, S., & Li, H. (2022). Characterization of chicken p53 transcriptional function via parallel genome-wide chromatin occupancy and gene expression analysis. *Poultry Science*, 101(11), 102164. doi: 10.1016/j.psj.2022.102164
- Chin, C. H., Chen, S. H., Wu, H. H., Ho, C. W., Ko, M. T., & Lin, C. Y. (2014). cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC System Biology*, 8(Suppl. 4), S11. doi: 10.1186/1752-0509-8-s4-s11
- Chothe, S. K., Nissly, R. H., Lim, L., Bhushan, G., Bird, I., Radzio-Basu, J., Jayarao, B. M., & Kuchipudi, S. V. (2020). NLRC5 serves as a pro-viral factor during influenza virus infection in chicken macrophages. *Frontiers in Cell Infection Microbiology*, 10, 230. doi: 10.3389/fcimb.2020.00230
- Cornelissen, J. B., Vervelde, L., Post, J., & Rebel, J. M. (2013). Differences in highly pathogenic avian influenza viral pathogenesis and associated early inflammatory response in chickens and ducks. *Avian Pathology*, 42(4), 347-364. doi: 10.1080/03079457.2013.807325
- Davis, S., & Meltzer, P. S. (2007). GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics*, 23(14), 1846-1847. doi: 10.1093/bioinformatics/btm254
- Dhama, K. (2013). Avian/Bird Flu virus: poultry pathogen having. *Journal of Medical Science*, 13(5), 301-315. doi: 10.3923/jms.2013.301.315
- Dong, H.-J., Zhang, R., Kuang, Y., & Wang, X.-J. (2021). Selective regulation in ribosome biogenesis and protein production for efficient viral translation. *Archives of Microbiology*, 203, 1021-1032. doi: 10.1007/s00203-020-02094-5
- Dubois, J., Terrier, O., & Rosa-Calatrava, M. (2014). Influenza viruses and mRNA splicing: doing more with less. *MBio*, 5(3), e00070-00014. doi: 10.1128/mbio.00070-14
- Eierhoff, T., Hrncius, E. R., Rescher, U., Ludwig, S., & Ehrhardt, C. (2010). The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001099. doi: 10.1371/journal.ppat.1001099
- Eswarakumar, V., Lax, I., & Schlessinger, J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(2), 139-149. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.001

- Evseev, D., & Magor, K. E. (2019). Innate immune responses to avian influenza viruses in ducks and chickens. *Veterinary Sciences*, 6(1), 5. doi: 10.3390/vetsci6010005
- Grygiel-Górniak, B. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutrition Journal*, 13, 17. doi: 10.1186/1475-2891-13-17.
- Guo, T., Hou, D., & Yu, D. (2019). Bioinformatics analysis of gene expression profile data to screen key genes involved in intracranial aneurysms. *Molecular Medicine Reports*, 20(5), 4415-4424. doi: 10.3892/mmr.2019.10696
- Hasin, Y., Seldin, M., & Lusis, A. (2017) Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology*, 18(1), 1-15. doi: 10.1186/s13059-017-1215-1
- Hong, G., Zhang, W., Li, H., Shen, X., & Guo, Z. (2014). Separate enrichment analysis of pathways for up-and downregulated genes. *Journal of the Royal Society Interface*, 11(92), 20130950. doi: 10.1098/rsif.2013.0950
- Huang, D. W., Sherman, B. T., Tan, Q., Kir, J., Liu, D., Bryant, D., Guo, Y., Stephens, R., Baseler, M. W., & Lane, H. C. (2007). DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W169-W175. doi: 10.1093/nar/gkm415
- Huber, W., Carey, V. J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B. S., Bravo, H. C., Davis, S., Gatto, L., & Girke, T. (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods*, 12(2), 115-121. doi: 10.1038/nmeth.3252
- Jiao, L., Liu, Y., Yu, X.-Y., Pan, X., Zhang, Y., Tu, J., Song, Y.-H., & Li, Y. (2023). Ribosome biogenesis in disease: new players and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 15. doi: 10.1038/s41392-022-01285-4
- Johnson, K. E., & Wilgus, T. A. (2014). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Advances in Wound Care (New Rochelle)*, 3(10), 647-661. doi: 10.1089/wound.2013.0517
- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., & Nakaya, A. (2002). The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 42-46. doi: 10.1093/nar/30.1.42
- Kilpatrick, A. M., Chmura, A. A., Gibbons, D. W., Fleischer, R. C., Marra, P. P., & Daszak, P. (2006). Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(51), 19368-19373. doi: 10.1073/pnas.0609227103
- Kim, D.-I., Kang, J.-H., Kim, E.-H., & Seo, Y.-J. (2021). KIF11 inhibition decreases cytopathogenesis and replication of influenza A virus. *Molecular & Cellular Toxicology*, 17, 201-212. doi: 10.1007/s13273-021-00126-9
- Kim, W. H., Chaudhari, A. A., & Lillehoj, H. S. (2019). Involvement of T cell immunity in avian coccidiosis. *Frontiers in Immunology*, 10, 2732. doi: 10.3389/fimmu.2019.02732
- Kim, W. K., Singh, A. K., Wang, J., & Applegate, T. (2022). Functional role of branched chain amino acids in poultry: a review. *Poultry Science*, 101(5), 101715. doi: 10.1016/j.psj.2022.101715
- Klees, S., Schlüter, J.-S., Schellhorn, J., Bertram, H., Kurzweg, A. C., Ramzan, F., Schmitt, A. O., & Gültas, M. (2022). Comparative Investigation of Gene Regulatory Processes Underlying Avian Influenza Viruses in Chicken and Duck. *Biology*, 11(2), 219. doi: 10.3390/biology11020219
- Kohl, M., Wiese, S., & Warscheid, B. (2011). Cytoscape: software for visualization and analysis of biological networks. *Data mining in proteomics: from standards to applications*, 291-303. doi: 10.1007/978-1-60761-987-1_18
- Kuchipudi, S. V., Dunham, S. P., & Chang, K.-C. (2015). DNA microarray global gene expression analysis of influenza virus-infected chicken and duck cells. *Genomics Data*, 4, 60-64. doi: 10.1016/j.gdata.2015.03.004
- Kuchipudi, S. V., Dunham, S. P., Nelli, R., White, G. A., Coward, V. J., Slomka, M. J., Brown, I. H., & Chang, K. C. (2012). Rapid death of duck cells infected with influenza: a potential mechanism for host resistance to H5N1. *Immunology and Cell Biology*, 90(1), 116-123. doi: 10.1038/icb.2011.17
- Kuchipudi, S. V., Tellabati, M., Sebastian, S., Londt, B. Z., Jansen, C., Vervelde, L., Brookes, S. M., Brown, I. H., Dunham, S. P., & Chang, K.-C. (2014). Highly pathogenic avian influenza virus infection in chickens but not ducks is associated with elevated host immune and pro-inflammatory responses. *Veterinary Research*, 45(1), 1-18. doi: 10.1186/s13567-014-0118-3
- Kuek, L. E., & Lee, R. J. (2020). First contact: the role of respiratory cilia in host-pathogen interactions in the airways. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 319(4), L603-L619. doi: 10.1152/ajplung.00283.2020
- Kuivaniemi, H., & Tromp, G. (2019). Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene*, 707, 151-171. doi: 10.1016/j.gene.2019.05.003
- Lax, I., Johnson, A., Howk, R., Sap, J., Bellot, F., Winkler, M., Ullrich, A., Vennstrom, B., Schlessinger, J., & Givol, D. (1988). Chicken epidermal growth factor (EGF) receptor: cDNA cloning, expression in mouse

- cells, and differential binding of EGF and transforming growth factor alpha. *Molecular and Cellular Biology*, 8(5), 1970-1978. doi: 10.1128/mcb.8.5.1970-1978.1988
- Lee, S., Hirohama, M., Noguchi, M., Nagata, K., & Kawaguchi, A. (2018). Influenza A virus infection triggers pyroptosis and apoptosis of respiratory epithelial cells through the type I interferon signaling pathway in a mutually exclusive manner. *Journal of Virology*, 92(14), e00396-00318. doi: 10.1128/JVI.00396-18
- Lee, S., Hwang, N., Seok, B. G., Lee, S., Lee, S.-J., & Chung, S. W. (2023). Autophagy mediates an amplification loop during ferroptosis. *Cell Death & Disease*, 14(7), 464. doi: 10.1038/s41419-023-05978-8
- Lee, S., Lee, R. H., Kim, S. J., Lee, H. K., Na, C. S., & Song, K. D. (2019). Transcriptional regulation of chicken leukocyte cell-derived chemotaxin 2 in response to toll-like receptor 3 stimulation. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 32(12), 1942-1949. doi: 10.5713/ajas.19.0192
- Lockhart, D. J., & Winzeler, E. A. (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405(6788), 827-836. doi: 10.1038/35015701
- Lorizate, M., & Kräusslich, H. G. (2011). Role of lipids in virus replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), a004820. doi: 10.1101/cshperspect.a004820
- Lovén, J., Orlando, D. A., Sigova, A. A., Lin, C. Y., Rahl, P. B., Burge, C. B., Levens, D. L., Lee, T. I., & Young, R. A. (2012). Revisiting global gene expression analysis. *Cell*, 151(3), 476-482. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.012
- McClelland, M. L., Gardner, R. D., Kallio, M. J., Daum, J. R., Gorbosky, G. J., Burke, D. J., & Stukenberg, P. T. (2003). The highly conserved Ndc80 complex is required for kinetochore assembly, chromosome congression, and spindle checkpoint activity. *Genes and Development*, 17(1), 101-114. doi: 10.1101/gad.1040903
- Mehrabadi, M. F., Ghalyanchilangeroudi, A., Tehrani, F., Hajloo, S. A., Bashashati, M., Bamonar, A., Pourjafar, H., & Ansari, F. (2022). Assessing the economic burden of multi-causal respiratory diseases in broiler farms in Iran. *Tropical Animal Health and Production*, 54(2), 117. doi: 10.1007/s11250-022-03110-0
- Metcalfe, R. D., Putoczki, T. L., & Griffin, M. D. (2020). Structural understanding of interleukin 6 family cytokine signaling and targeted therapies: focus on interleukin 11. *Frontiers in Immunology*, 11, 1424. doi: 10.3389/fimmu.2020.01424
- Mutryn, M. F., Brannick, E. M., Fu, W., Lee, W. R., & Abasht, B. (2015). Characterization of a novel chicken muscle disorder through differential gene expression and pathway analysis using RNA-sequencing. *BMC Genomics*, 16(1), 1-19. doi: 10.1186/s12864-015-1623-0
- Navidshad, B., & Royan, M. (2016). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α), a key regulator of lipid metabolism in Avians. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 26(4), 303-308. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2016016665
- Obexer, P., Hagenbuchner, J., Unterkircher, T., Sachsenmaier, N., Seifarth, C., Böck, G., Porto, V., Geiger, K., & Ausserlechner, M. (2009). Repression of BIRC5/survivin by FOXO3/FKHRL1 sensitizes human neuroblastoma cells to DNA damage-induced apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), 2041-2048. doi: 10.1091/mbc.e08-07-0699
- Paquette, S. G., Banner, D., Huang, S. S., Almansa, R., Leon, A., Xu, L., Bartoszko, J., Kelvin, D. J., & Kelvin, A. A. (2015). Influenza transmission in the mother-infant dyad leads to severe disease, mammary gland infection, and pathogenesis by regulating host responses. *PLoS Pathogens*, 11(10), e1005173. doi: 10.1371/journal.ppat.1005173
- Pezeshkian, Z., Mirhoseini, S. Z., & Ghovvati, S. (2022). Identification of hub genes involved in apparent metabolizable energy of chickens. *Animal Biotechnology*, 33(2), 242-249. doi: 10.1080/10495398.2020.1784187
- Pociask, D. A., Robinson, K. M., Chen, K., McHugh, K. J., Clay, M. E., Huang, G. T., Benos, P. V., Janssen-Heininger, Y. M., Kolls, J. K., & Anathy, V. (2017). Epigenetic and transcriptomic regulation of lung repair during recovery from influenza infection. *The American Journal of Pathology*, 187(4), 851-863. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.12.012
- R Core Team (2023). R Foundation for Statistical Computing, version 4.2.3, Vienna, Austria.
- Rehman, Z., Naz, S., Khan, R., & Tahir, M. (2017). An update on potential applications of L-carnitine in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 73(4), 823-830. doi: 10.1017/S0043933917000733
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47-e47. doi: 10.1093/nar/gkv007
- Stecher, B. R., Hapfelmeier, S., Müller, C., Kremer, M., Stallmach, T., & Hardt, W.-D. (2004). Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infection and Immunity*, 72(7), 4138-4150. doi: 10.1128/IAI.72.7.4138-4150.2004
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(3), 183-193. doi: 10.1038/nrm.2016.8

- Tong, Z. W. M., Karawita, A. C., Kern, C., Zhou, H., Sinclair, J. E., Yan, L., Chew, K. Y., Lowther, S., Trinidad, L., & Challagulla, A. (2021). Primary chicken and duck endothelial cells display a differential response to infection with highly pathogenic avian influenza virus. *Genes*, 12(6), 901. doi: 10.3390/genes12060901
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(11), 2563-2582. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014
- Us, D. (2008). Cytokine storm in avian influenza. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 42(2), 365-380.
- Vu, T. H., Hong, Y., Truong, A. D., Lee, J., Lee, S., Song, K.-D., Cha, J., Dang, H. V., Tran, H. T. T., & Lillehoj, H. S. (2022). Cytokine-cytokine receptor interactions in the highly pathogenic avian influenza H5N1 virus-infected lungs of genetically disparate Ri chicken lines. *Animal Bioscience*, 35(3), 367. doi: 10.5713/ab.21.0163
- Wang, B., Su, Q., Luo, J., Li, M., Wu, Q., Chang, H., Du, J., Huang, C., Ma, J., & Han, S. (2021). Differences in highly pathogenic H5N6 avian influenza viral pathogenicity and inflammatory response in chickens and ducks. *Frontiers in Microbiology*, 12, 593202. doi: 10.3389/fmicb.2021.593202
- Wang, C., Nie, G., Zhuang, Y., Hu, R., Wu, H., Xing, C., Li, G., Hu, G., Yang, F., & Zhang, C. (2020). Inhibition of autophagy enhances cadmium-induced apoptosis in duck renal tubular epithelial cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205, 111188. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111188
- Wang, J., Hu, T., Wang, Q., Chen, R., Xie, Y., Chang, H., & Cheng, J. (2021). Repression of the AURKA-CXCL5 axis induces autophagic cell death and promotes radiosensitivity in non-small-cell lung cancer. *Cancer Letters*, 509, 89-104. doi: 10.1016/j.canlet.2021.03.028
- Yin, H.-C., Zhao, L.-L., Li, S.-Q., Niu, Y.-J., Jiang, X.-J., Xu, L.-J., Lu, T.-F., Han, L.-X., Liu, S.-W., & Chen, H.-Y. (2017). Autophagy activated by duck enteritis virus infection positively affects its replication. *Journal of General Virology*, 98(3), 486-495. doi: 10.1099/jgv.0.000696
- Yu, W., Shi, S., Qiu, Y., Jin, Z., Zhou, J., & Zhang, H. (2023). AURKA identified as potential lung cancer marker through comprehensive bioinformatic analysis and experimental verification. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 33(5), 39-59. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2023046830
- Zhai, Y., Franco, L. M., Atmar, R. L., Quarles, J. M., Arden, N., Bucacas, K. L., Wells, J. M., Nino, D., Wang, X., & Zapata, G. E. (2015). Host transcriptional response to influenza and other acute respiratory viral infections—a prospective cohort study. *PLoS Pathogens*, 11(6), e1004869. doi: 10.1371/journal.ppat.1004869
- Zhou, J., Law, H. K., Cheung, C. Y., Ng, I. H., Peiris, J. S., & Lau, Y. L. (2006). Differential expression of chemokines and their receptors in adult and neonatal macrophages infected with human or avian influenza viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 194(1), 61-70. doi: 10.1086/504690