

Research Paper

Integrative Analysis of an miRNA-Gene Regulatory Network in Chickens' Brain and Lung Tissues During H5N3 Avian Influenza Infection

Mostafa Ghaderi-Zefrehei¹ , Farhad Samadian², Salar Sabouri³, Soheil Sabouri³, and Sholeh Ghorbani⁴

1- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran,
(Corresponding author: mghaderi@yu.ac.ir)

2- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

3- Department of Biology, Life Sciences and Biotechnology Research Center, University of Tabriz, Tabriz, Iran

4- Department of Biotechnology, Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 10 September, 2025

Revised: 05 January, 2026

Accepted: 28 February, 2026

Extended Abstract

Background: Despite the extensive focus on HPAI strains, such as H5N1 and H5N8, the H5N3 subtype represents a compelling research priority owing to its rapid adaptability, moderate-to-severe pathogenicity in avian species, and zoonotic threat. A thorough understanding of its pathogenesis is therefore contingent upon a comprehensive examination of key target organs, specifically the lungs (the primary replication site) and the brain (the site of neurotropic involvement). The lungs and the brain are two critical tissues in influenza pathogenesis. The lungs serve as the main site of viral entry and the activation of innate immunity, while the virus's spread to the brain indicates systemic dissemination and neurotropism, leading to severe outcomes such as neurological disorders, paralysis, and sudden death in poultry. While extensive research has been conducted on the pathogenesis of avian influenza at the histopathological and immunological levels, investigations based on high-throughput molecular data, such as transcriptomics, are relatively limited in poultry, particularly in Iranian research contexts. Identifying key hub genes and non-coding regulatory elements, such as microRNAs (miRNAs), provides important insight into how the host reorganizes its molecular landscape when challenged by a pathogen. In this context, the present study was undertaken to construct gene regulatory networks based on differential gene expression profiles from the brain and lung tissues of chickens infected with two strains of the recombinant H5N3 virus, namely rH5N3 Ori and rH5N3 P6. By applying advanced bioinformatics approaches, we sought to identify key genes, regulatory miRNAs, and biological pathways that play central roles in host defense mechanisms and the progression of disease.

Methods: Data retrieval and analysis began with obtaining DNA microarray data from the publicly available GEO database (accession number: GSE96837), which included transcriptional profiles from the brain and lung tissues of chickens experimentally infected with the H5N3 virus, along with control samples from uninfected birds used as baselines. Preprocessing and normalization of the data were conducted in R using the limma package, and differential gene expression was determined through a moderated t-test, considering genes with an adjusted p-value less than 0.05 and an absolute log2 fold change greater than 1 as significant. Global transcriptional changes were visualized using volcano plots and heatmaps. To explore protein-protein interaction (PPI) networks, the differentially expressed genes (DEGs) were uploaded into the STRING database (version 11.5) with a high-confidence threshold of 0.7, and the resulting networks were exported into Cytoscape (version 3.9) for visualization. Hub genes were then identified based on network topology and metrics such as degree centrality and betweenness centrality. For functional interpretation, enrichment analyses were performed using g: Profiler and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), with an emphasis on pathways associated with immunity, protein synthesis, and RNA quality control.

Results: It was observed that infection with both rH5N3 Ori and rH5N3 P6 strains caused a substantial reprogramming of host gene expression in the examined tissues. The lungs mounted a more pronounced immune-related response, whereas the brain displayed broader alterations in metabolic pathways and neuronal stress networks.



In total, 1480 differentially expressed genes (DEGs) were identified in the lungs compared to 936 in the brain, underscoring significant tissue-specific differences in the host response. Further network analysis identified 18 hub genes with high connectivity within the PPI networks. Remarkably, the majority of these hub genes were ribosomal proteins, including RPL21, RPL31, and RPS28, suggesting that influenza infection strongly impacts host translation machinery. Additional hub components, such as EEF1A1 and EIF3F, key players in translation elongation and initiation, reinforced the idea that the disruption of protein synthesis pathways is central to viral survival and replication. Enrichment analysis using KEGG pathways highlighted five major molecular routes influenced by infection: ribosome biogenesis and GTP hydrolysis, protein targeting to membranes, nonsense-mediated mRNA decay (NMD), innate immune signaling (particularly interferon response), and apoptosis regulation. In lung tissues, enrichment was dominated by immune-related processes, such as RIG-I-like receptor signaling and cytokine-mediated interactions, while the brain showed stronger alterations in RNA quality control, mitochondrial activity, and apoptosis regulation, indicating neurodegenerative stress responses. At the tissue level, lung DEGs (such as IFIT5 and MX1) demonstrated strong upregulation consistent with interferon-stimulated antiviral defense, whereas the brain showed reduced ribosomal gene expression, implying a translational arrest that may act as a protective mechanism to limit viral protein production.

Conclusion: Network analysis pointed to ribosomal protein genes as central regulators, underscoring the role of host translational machinery as a key target of viral interference and manipulation during infection. Moreover, the identification of novel miRNAs associated with H5N3 infection opens promising opportunities for the development of diagnostic biomarkers and potential antiviral therapies. These findings emphasize the necessity of examining multiple tissues in infection studies, as focusing solely on one organ may provide an incomplete understanding of disease progression and host-pathogen interactions. By employing integrated bioinformatics platforms, such as STRING, Cytoscape, and KEGG pathway analysis, this research establishes a framework that can be extended to other viral infections in poultry. Importantly, the insights derived here hold practical value for the poultry sector, particularly in guiding genetic improvement strategies aimed at producing birds with enhanced disease resistance. Future directions should include experimental validation of the identified hub genes and miRNAs through techniques such as qRT-PCR and functional gene silencing, as well as integrating proteomic and metabolomic analyses with transcriptomics to achieve a more comprehensive understanding of host-virus dynamics. Ultimately, this study contributes valuable knowledge toward protecting poultry health and strengthening food security in the face of ongoing avian influenza threats.

Keywords: Gene networks, Gene expression, H5N3 influenza, miRNA, Ribosomal proteins, Host-pathogen interactions

How to Cite This Article: Ghaderi-Zefrehei, M., Samadian, F., Sabouri, S., Sabouri, S., & Ghorbani, Sh. (2026). Integrative Analysis of miRNA-Gene Regulatory Network in Chicken Brain and Lung Tissues During H5N3 Avian Influenza Infection. *Res Anim Prod*, 17(2), 178-196. DOI: 10.61882/rap.2026.1569



مقاله پژوهشی

تحلیل یکپارچه شبکه‌ی تنظیمی miRNA-ژن در بافت‌های مغز و ریه مرغ در طول عفونت آنفلوآنزای پرندگان H5N3

مصطفی قادری زفره‌ای^۱، فرهاد صمدیان^۲، سالار صبوری^۳، سهیل صبوری^۳ و شعله قربانی^۴

۱- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران، (نویسنده مسوول: mgghaderi@yu.ac.ir)

۲- گروه علوم دامی، دانشگاه یاسوج، دانشکده کشاورزی، یاسوج، ایران

۳- گروه زیست‌شناسی، مرکز تحقیقات علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۴- مؤسسه تحقیقات علوم دامی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۱۹

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۱۰/۱۵
صفحه: ۱۷۸ تا ۱۹۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۰۹

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: برخلاف تمرکز عمده پژوهش‌ها بر سویه‌های پاتوژن بالای آنفلوآنزای پرندگان نظیر H5N1 و H5N8، زیرگروه H5N3 به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد، از جمله پتانسیل بالای سازگاری، پاتوژنیسیته متوسط تا شدید در میزبان‌های پرند و خطر بالقوه عبور از سد گونه‌ای، یک اولویت پژوهشی محسوب می‌شود. از این رو، تحلیل بیماری‌زایی این ویروس بدون بررسی جامع بافت‌های حیاتی چون ریه (محل تکثیر اولیه) و مغز (هدف تهاجم نوروتروپیک) ناقص خواهد بود. ریه‌ها و مغز دو بافت حیاتی در بررسی پاتوژن آنفلوآنزا هستند. ریه‌ها به عنوان محل اصلی ورود ویروس و فعال شدن ایمنی ذاتی عمل می‌کنند، در حالی که گسترش ویروس به مغز نشان دهنده انتشار سیستمیک و نوروتروپیسیم است که منجر به پیامدهای شدیدی مانند اختلالات عصبی، فلج و مرگ ناگهانی در طیور می‌شود. در حالی که تحقیقات گسترده‌ای در مورد پاتوژن آنفلوآنزای مرغی در سطوح هیستوپاتولوژیک و ایمونولوژیک انجام شده‌اند، تحقیقات مبتنی بر داده‌های مولکولی با توان عملیاتی بالا، مانند ترانسکرپتومیکس، در طیور، به ویژه در زمینه‌های تحقیقاتی ایران، نسبتاً محدود هستند. شناسایی ژن‌های کلیدی مرکزی و عناصر تنظیمی غیر کدکننده، مانند میکرو RNAها (miRNA)، بینش مهمی را در مورد چگونگی سازماندهی مجدد چشم‌انداز مولکولی میزبان هنگام مواجهه با یک عامل بیماری‌زا ارائه می‌دهد. در این زمینه، مطالعه حاضر با هدف ساخت شبکه‌ی تنظیمی ژن بر اساس پروفایل‌های بیان ژن افتراقی از بافت‌های مغز و ریه جوجه‌های آلوده به دو سویه ویروس نوترکیب H5N3، یعنی H5N3 Ori و H5N3 P6، انجام شد. با به کارگیری رویکردهای پیشرفته بیوانفورماتیک، ما به دنبال شناسایی ژن‌های کلیدی، miRNAهای تنظیمی و مسیرهای بیولوژیکی بودیم که نقش‌های محوری در مکانیسم‌های دفاعی میزبان و پیشرفت بیماری ایفا می‌کنند.

مواد و روش‌ها: بازیابی و تجزیه و تحلیل داده‌ها با دریافت داده‌های ریزآرایه DNA از پایگاه داده عمومی (GEO) و با شماره دسترسی GSE96837 آغاز شد، که شامل پروفایل‌های رونویسی از بافت‌های مغز و ریه مرغ‌هایی بود که به صورت تجربی با ویروس H5N3 آلوده شده بودند و به همراه آن، نمونه‌های شاهد از پرندگان غیر آلوده به عنوان پایه استفاده شدند. پیش‌پردازش و نرمال‌سازی داده‌ها در R با استفاده از بسته limma انجام شد و بیان افتراقی ژن از طریق آزمون t تعدیل شده تعیین شد و ژن‌هایی با مقدار p تعدیل شده کمتر از ۰/۰۵ - و تغییر مطلق لگاریتمی ۲ بزرگ‌تر از ۱ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شدند. تغییرات رونویسی سراسری با استفاده از نمودارهای آتشفشانی و نقشه‌های حرارتی تجسم شدند. برای بررسی شبکه‌های برهمکنش پروتئین-پروتئین (PPI)، ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) با آستانه اطمینان بالای ۰/۷ در پایگاه داده‌ای SRTING (نسخه ۱۱/۵) بارگذاری شدند و شبکه‌های حاصل برای تجسم به Cytoscape (نسخه ۳/۹) منتقل شدند. سپس ژن‌های هاب براساس توپولوژی شبکه و معیارهایی مانند مرکزیت درجه و مرکزیت بینایی شناسایی شدند. برای تفسیر عملکردی، آنالیزهای غنی‌سازی با استفاده از g:Profiler و KEGG، با تأکید بر مسیرهای مرتبط با ایمنی، سنتز پروتئین و کنترل کیفیت RNA انجام شدند.

یافته‌ها: مشاهده شد که بیماری با هر دو سویه H5N3 Ori و H5N3 P6 باعث برنامه‌ریزی مجدد قابل توجهی در بیان ژن میزبان در بافت‌های مورد بررسی شد. ریه‌ها پاسخ ایمنی شدیدتری نشان دادند، در حالی که مغز تغییرات گسترده‌تری را در مسیرهای متابولیکی و شبکه‌های تنش عصبی نشان داد. در مجموع، ۱۴۸۰ DEGs در ریه‌ها در مقایسه با ۹۳۶ ژن در مغز شناسایی شدند که تفاوت‌های مختص بافتی قابل توجه در پاسخ میزبان را برجسته می‌کند. تجزیه و تحلیل بیشتر شبکه، ۱۸ ژن هاب با اتصال بالا در شبکه‌های برهمکنش پروتئین-پروتئین (PPI) را شناسایی کرد. نکته قابل توجه این است که اکثر این ژن‌های هاب، پروتئین‌های ریبوزومی، از جمله RPL31، RPL21 و RPS28 بودند که نشان می‌دهد بیماری آنفلوآنزا به شدت بر دستگاه ترجمه میزبان تأثیر می‌گذارد. اجزای هاب اضافی مانند EIF3F و EEF1A1، که بازیگران کلیدی در طویل شدن و شروع ترجمه هستند، این ایده را تقویت کردند که اختلال در مسیرهای سنتز پروتئین برای بقا و تکثیر ویروس ضروری است. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی با استفاده از مسیرهای KEGG، پنج مسیر مولکولی اصلی تحت تأثیر بیماری را برجسته کرد: بیوتنزی ریبوزوم و هیدرولیز GTP، هدف قرار دادن پروتئین موجود بر غشاهای تجزیه mRNA به واسطه جهش بی‌معنی (NMD)، پیام‌رسانی ایمنی ذاتی (به ویژه پاسخ اینترفرون) و تنظیم آپوپتوز. در بافت‌های ریه، در طی غنی‌سازی فرآیندهای مرتبط با ایمنی مانند پیام‌رسانی گیرنده شبه RIG-I و تعاملات واسطه‌گری شده با سیتوکین غالب بود، در حالی که مغز تغییرات قوی‌تری را در سطوح کنترل کیفی rRNA، فعالیت میتوکندری و تنظیم مرگ خود خواسته سلول نشان داد که نشان دهنده پاسخ‌های تنش نورودژنراتیو در مغز است. در سطح بافت، ریه مانند MX1 و IFIT5 مطابق با دفاع ضد ویروسی تحریک شده با اینترفرون، افزایش بیان زیادی را نشان دادند، در حالی که کاهش بیان ژن ریبوزومی در بافت مغزی نشان داده شد که خود ممکن است به عنوان یک ساز و کار محافظتی برای محدود کردن تولید پروتئین ویروسی عمل کند.

نتیجه‌گیری: تحلیل شبکه، ژن‌های پروتئین ریبوزومی را به عنوان تنظیم‌کننده‌های مرکزی نشان داد و نقش دستگاه ترجمه میزبان، به عنوان هدف کلیدی تداخل و دستکاری ویروسی در طول بیماری را برجسته کرد. علاوه بر این، شناسایی miRNAهای جدید مرتبط با عفونت H5N3 فرصت‌های امیدوار کننده‌ای را برای توسعه نشانگرهای زیستی تشخیصی و درمان‌های ضد ویروسی بالقوه فراهم می‌کند. این یافته‌ها بر ضرورت بررسی بافت‌های گوناگون در پژوهش‌های مربوط به بیماری تأکید می‌کنند، زیرا تمرکز صرف بر یک اندام ممکن است درک ناقصی از پیشرفت بیماری و تعاملات میزبان-پاتوژن ارائه دهد. این پژوهش با به کارگیری پلتفرم‌های بیوانفورماتیک یکپارچه مانند STRING، Cytoscape و تجزیه و تحلیل مسیر KEGG، چارچوبی را ایجاد نمود که می‌تواند به سایر عفونت‌های ویروسی در طیور تعمیم داده شود. نکته مهم این است که بینش‌های به دست آمده در اینجا می‌تواند به طور ویژه‌ای در هدایت راهبردهای بهبود ژنتیکی، با هدف تولید پرندگانی با مقاومت بیشتر در برابر بیماری، ارزش عملی داشته باشند. مسیرهای آینده باید شامل اعتبارسنجی تجربی ژن‌های هاب شناسایی شده و miRNAها از طریق تکنیک‌هایی مانند qRT-PCR و خاموش‌سازی ژن عملکردی، و همچنین ادغام تجزیه و تحلیل‌های پروتئومیکس و متابولومیکس با ترانسکرپتومیکس برای دستیابی به درک جامع‌تری از دینامیک میزبان-ویروس باشند. در نهایت، این مطالعه دانش ارزشمندی را در جهت محافظت از سلامت طیور و تقویت امنیت غذایی در مواجهه با تهدیدات مداوم آنفلوآنزای مرغی ارائه می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آنفلوآنزای H5N3، بیان ژنی، پروتئین‌های ریبوزومی، تعاملات میزبان-پاتوژن، شبکه‌های ژنی، miRNA

مقدمه

شاید به جرأت بتوان آنفلوآنزای ماکیان با قدرت بیماری‌زایی بالا را جدیدترین بیماری عفونی نو پدید در عرصه‌ی کره‌ی خاکی دانست (McFee, 2007). ویروس آنفلوآنزای مرغی (AIV) متعلق به جنس آنفلوآنزای A از خانواده ارتومیکسوویریده^۱ است. این ویروس می‌تواند انواع گونه‌های پرندگان و گاهی پستانداران را آلوده کند (Urbanik & Markowska-Daniel, 2014). در طیور، عفونت با AIV ممکن است باعث سطوح مختلف بیماری، از حالت تحت بالینی تا کشنده، شود.

همچنین، ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان (AIVs) را می‌توان براساس خواص آنتی‌ژنی دو گلیکوپروتئین بیان شده در سطح ذرات ویروس یعنی همگلوتنین (HA) و نورآمینیداز (NA) طبقه‌بندی کرد (Webster et al., 1992). پژوهش‌های ژنتیکی نشان داده‌اند که بر اساس ژن همگلوتنین سویه H9N2، می‌توان پرندگان را به پرندگان اوراسیایی و آمریکایی تقسیم کرد (Song et al., 2011). زیرگروه‌های متعددی از این ویروس وجود دارند که با ترکیبی از HA و NA (مثل H5N1) مشخص می‌شوند. در پرندگان وحشی در سراسر جهان، ویروس آنفلوآنزای پرندگان با بیماری‌زایی کم (LPAI)، که نمایانگر ۱۶ زیرگروه آنتی‌ژنی HA (H1 تا H16) و نه زیرگروه آنتی‌ژنی NA (N1 تا N9) است، شناسایی شده است و این ویروس‌ها در اکثر بازآرایی‌های احتمالی یافت می‌شوند (Ren et al., 2016). بنا بر این، ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان (AIV) را می‌توان براساس میزان بیماری‌زایی‌شان برای طیور به سویه‌های با بیماری‌زایی بالا (HPAI) و سویه‌های با بیماری‌زایی پایین (LPAI) تقسیم کرد (Ren et al., 2016).

ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان (AIV) از زیرگروه H5 در طیور اهلی و پرندگان وحشی در سراسر جهان شناسایی شده‌اند. شیوع‌های متعددی از آنفلوآنزای فوق حاد H5 در سراسر جهان رخ دادند که منجر به مرگ تعداد زیادی از طیور اهلی و پرندگان وحشی و خسارات اقتصادی هنگفتی در صنعت طیور شدند. در پرندگان، ویروس‌های H5 با قدرت بیماری‌زایی کم (LPAI) می‌توانند متعاقباً از طریق وارد کردن محل برش چندپایه‌ای^۲ در همگلوتنین (HA) ویروسی، به ویروس آنفلوآنزا با قدرت بیماری‌زایی بالا (HPAI) تبدیل شوند (Tian et al., 2021). ژن‌های ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان از طریق پرندگان وحشی به طیور اهلی وارد می‌شوند و متعاقباً در طی بازآرایی ژنی به ظهور ویروس‌های جدیدی از آنفلوآنزا منجر می‌شوند که تهدیدات اقتصادی فراوانی را برای صنعت طیور ایجاد می‌کنند (Brody, 2019). به‌عنوان مثال، ویروس H7N9 شناسایی شده در چین، حاصل بازآرایی بین گونه‌ای در سال ۲۰۱۳ بود که ژن‌های HA این سویه ویروسی از ویروس‌های H7N3 اردک‌ها مشتق شده بود؛ ژن‌های NA آن از پرندگان وحشی منشأ گرفته‌اند و شش ژن داخلی آن نیز از ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان H9N2 مرغ‌ها و پرندگان کچلی^۳ گرفته شده بودند (Shi et al., 2018).

ویروس آنفلوآنزای مرغی H9N2 یک آنفلوآنزای مرغی با بیماری‌زایی کم است که توسط ویروس‌های آنفلوآنزای نوع A ایجاد می‌شود و باعث عفونت طبیعی در پرندگان می‌شود (Eladl et al., 2019). در طیور آلوده به H9N2، علائم بالینی عموماً از ۰ تا ۹۷ درصد مرگ و میر متغیر هستند و در موارد شدید با خسارات اقتصادی زیاد همراه است (Eladl et al., 2019). تشدید H9N2 به تجزیه توسط پروتئازها نسبت داده می‌شود که تکثیر ویروس را در مرغ‌ها افزایش می‌دهد. بنا بر این، احتمالاً دلیل افزایش بیماری‌زایی H9 تحریک سلول‌های میزبان برای ترشح پروتئازهای بیشتر باشد (Chaharacain et al., 2009).

استخراج شبکه‌های ژنی برای درک بیماری‌ها، به‌ویژه بیماری‌هایی مانند آنفلوآنزا، از اهمیت بالایی برخوردار است. این شبکه‌ها به ما کمک می‌کنند تا تعاملات پیچیده بین ژن‌ها، پروتئین‌ها و مسیرهای زیستی را شناسایی کنیم که در پاسخ به عفونت‌ها نقش دارند. با تحلیل شبکه‌های ژنی، می‌توان به شناسایی مسیرهای تنظیمی و ژن‌های کلیدی که در پاسخ ایمنی به عفونت‌های ویروسی فعال می‌شوند، پرداخت. این اطلاعات نه تنها به درک عمیق‌تری از سازوکارهای بیماری‌زایی کمک می‌کند، بلکه می‌تواند به شناسایی اهداف جدید برای توسعه داروهای مؤثر و راهبردهای پیشگیرانه منجر شود. همچنین، شبکه‌های ژنی به ما این امکان را می‌دهند که پاسخ‌های ایمنی مختلف را در بافت‌های مختلف بررسی کنیم و بفهمیم که چگونه این پاسخ‌ها تحت تأثیر عفونت قرار می‌گیرند. جدول ۱ تعدادی از شبکه‌های ژنی انجام‌شده در ژنوم ماکیان را نشان می‌دهد. جدول ۱ شامل اطلاعاتی درباره چندین پژوهش علمی است که به بررسی جنبه‌های مختلف ژنتیک و بیوانفورماتیک در زمینه مرغ و سایر پرندگان می‌پردازد. به‌عنوان مثال، در پژوهشی به بررسی ساختار ژنتیکی و شبکه‌های هم‌بیانی ژنی در مرغ پرداخته شد و ۱۵ ماژول هم‌بیانی ژنی شناسایی شدند که به پیش‌بینی عملکرد ژن‌ها و شناسایی سازه‌های رونویسی جدید کمک می‌کنند (Stanley et al., 2013). همچنین، در پژوهشی تأثیر اختلال در ژن DMRT1 در مرغ‌ها، و تغییرات فیزیولوژی و هورمونی ناشی از این اختلال مورد بررسی قرار گرفت (Lee et al., 2021). در پژوهشی دیگر، به بررسی تأثیر ژن‌های مرتبط با هیپوکسی بر آسیب‌های مغزی و تومورزایی با استفاده از مدل مرغ پرداخته شد و نشان داده شد که این ژن‌ها در بیماری‌های مختلفی مانند پارکینسون و آلزایمر نقش دارند (Kharrati-Koopae et al., 2021). همچنین، به تازگی پژوهشگران با تحلیل RNA-seq و ChIP-seq به بررسی نقش P53 در پاسخ‌های ضد ویروسی در مرغ‌ها پرداخته‌اند و نشان داده‌اند که این پروتئین می‌تواند به تنظیم متابولیسم سلولی در طول عفونت‌های ویروسی کمک کند (Cui et al., 2024).

³ Bramblings¹ Orthomyxoviridae² Multi-basic cleavage site

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، با بهره‌گیری از کلمات کلیدی مرتبط با بیماری آنفلوآنزای ماکیان، از جمله آنفلوآنزای طیور، مغز، ریه و انواع ویروس‌های آنفلوآنزا (مانند H1N1، H2N3، H5N1، H5N2، H5N3 و H9N2)، داده‌های ریز آرایه‌های DNA مرتبط با عفونت ویروس آنفلوآنزای طیور از پایگاه داده GEO مورد بررسی قرار گرفتند. در این راستا، داده GSE96837 که در پلتفرم Agilent با کد شناسایی GPL13790 قرار داشت، انتخاب شد. این مجموعه داده شامل بافت‌های مغز و ریه بود که برای این پژوهش اهمیت ویژه‌ای داشتند، و همچنین شامل تعداد قابل توجهی آرایه DNA بود که برای ایجاد شبکه ژنی و کاهش خطاهای مثبت کاذب^۲ ضروری است. این مجموعه شامل ۳۶ نمونه از بافت‌های ریه و مغز جوجه‌های سالم و آلوده به دو سویه ویروس rH5N3 (Ori و P6) در زمان‌های ۱ و ۳ روز پس از عفونت (dpi) بود. برای پیاده‌سازی داده‌ها از نرم‌افزار GEOquery استفاده شد.

استخراج شبکه ژنی و تحلیل پایین دستی ژنومی

برای شناسایی ژن‌های DEGs، از بسته نرم‌افزاری R به نام limma استفاده شد. این بسته یکی از ابزارهای معتبر و کارآمد در تحلیل داده‌های ریزآرایه DNA و RNA-seq است که با به‌کارگیری مدل‌های خطی و روش‌های بیزی تجربی، امکان شناسایی DEGs را در طراحی‌های آزمایشی پیچیده فراهم می‌آورد. مراحل تحلیل به‌صورت زیر انجام شد. ابتدا داده‌های خام با استفاده از تابع read.maimages بارگذاری شدند و کنترل کیفیت اولیه داده‌ها با بررسی توزیع شدت بیان ژن‌ها از طریق ترسیم نمودارهای جعبه‌ای (boxplot) و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) انجام گرفت. سپس، نرمال‌سازی بین آرایه‌ای با استفاده از تابع normalizeBetweenArrays و روش quantile normalization صورت گرفت تا توزیع بیان در تمامی نمونه‌ها یکسان شود و اثرات فنی (Technical Effects) حذف گردد. در مرحله بعد، ماتریس طرح آزمایش^۳ با استفاده از تابع model.matrix ساخته شد که تنها شامل نوع بافت (مغز و ریه) بود. سایر متغیرها به‌دلیل عدم ارتباط با هدف پژوهش در نظر گرفته نشدند. سپس برای هر ژن، یک مدل خطی با تابع lmFit برازش داده شد تا اثرات مد نظر در طرح آزمایشی بر بیان ژن‌ها برآورد شود. به‌منظور بهبود دقت برآوردها، از روش بیزی تجربی با استفاده از تابع eBayes بهره گرفته شد.

این پژوهش‌ها در زمینه‌های مختلف، از جمله تأثیرات متیلاسیون DNA، تحلیل‌های ترنسکریپتومی و بررسی‌های ژنتیکی، به درک بهتر سازوکارهای زیستی و بهبود تولید و سلامت در صنعت طیور کمک می‌کنند. انجام و ایجاد شبکه‌های ژنی در پژوهش حاضر به‌عنوان یک ابزار کلیدی برای درک بهتر بیماری آنفلوآنزای H5N3 به‌شمار می‌رود (Cui *et al.*, 2024).

با استخراج و تحلیل این شبکه‌ها، می‌توان به شناسایی مسیرهای تنظیمی و ژن‌های کلیدی که در پاسخ ایمنی به عفونت نقش دارند، پرداخت. این اطلاعات نه‌تنها به درک عمیق‌تری از سازوکارهای مولکولی بیماری‌زایی H5N3 کمک می‌کند، بلکه می‌تواند به شناسایی اهداف جدید برای توسعه داروهای مؤثر و راهبردهای پیشگیرانه منجر شود.

ایجاد شبکه‌های ژنی در پژوهش حاضر به‌عنوان یک ابزار کلیدی برای درک بهتر بیماری آنفلوآنزای H5N3 به‌شمار می‌رود. روشن‌سازی این سازوکارهای مولکولی پیچیده، مسیری مستقیم و منطقی را برای دستیابی به نتایج کاربردی و ملموس فراهم می‌آورد. به‌طور مشخص، شناسایی ژن‌های هاب مرکزی مانند پروتئین‌های ریبوزومی و فاکتورهای کلیدی آغازین ترجمه و مسیرهای تنظیمی حیاتی، شامل پاسخ اینترفرونی و تجزیه mRNA، سازه‌های میزبانی را آشکار می‌سازد که یا توسط ویروس برای تکثیر به‌کار گرفته می‌شوند یا برای برپایی یک دفاع مؤثر ضروری هستند. این سازه‌های شناسایی شده اهداف جدید و قابل دارودهی^۱ را برای طراحی منطقی ضد ویروس‌های هدف‌گیرنده میزبان فراهم می‌کنند؛ راهبردی که می‌تواند از ظهور سریع مقاومت ویروسی، پیشگیری کند. علاوه بر این، کشف miRNAهای با بیان افتراقی، کاندیداهای امیدوار کننده‌ای را برای توسعه زیست‌شناسی حساس و اختصاصی جهت تشخیص زود هنگام بیماری در گله‌ها ارائه می‌دهد. همزمان، ژن‌های کلیدی میزبان که در معماری شبکه مرکزیت دارند، می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی برای هدایت برنامه‌های اصلاح نژاد گزینشی عمل کنند و امکان پرورش خطوط طیوری با مقاومت رمزگذاری شده ژنتیکی و بهبود یافته در برابر H5N3 را فراهم سازند. بنا بر این، این پژوهش با بهره‌گیری از داده‌های با توالی و بیوانفورماتیک، چارچوبی کلیدی را پایه‌ریزی می‌کند که پلی میان بینش‌های بنیادین مولکولی و راهبردهای عملی و قابل اجرا را برای نوآوری درمانی و بهبود ژنتیکی در صنعت طیور ایجاد می‌کند.

³ Design Matrix

¹ Druggable Targets

² False Positive

جدول ۱- تعدادی از شبکه‌های ژنی انجام شده در ژنوم ماکیان

Table 1. A number of gene networks performed in the poultry genome

منبع Reference	نتایج Results	پلتفرم مورد استفاده Platform used	نوع شبکه ژنی Gene network type
(Stanley <i>et al.</i> , 2013)	شناسایی ۱۵ ماژول هم‌بیانی ژنی با غنای عملکردی قوی در دسته‌های مختلف هستی‌شناسی ژنی. این شبکه ابزاری را برای پیش‌بینی عملکرد ژن‌ها و شناسایی فاکتورهای رونویسی جدید فراهم می‌کند. Identification of 15 gene co-expression modules with strong functional richness in different gene ontology categories. This network provides a tool for gene function prediction and the identification of novel transcription factors	Affymetrix GeneChip	شبکه هم‌بیانی ژنی Gene co-expression network
(Zhang <i>et al.</i> , 2017)	شناسایی ژن‌های کاندیدای مهم برای رشد بیضه و توسعه Identification of candidate genes important for testicular growth and development	NA	تفاعلات SNP-SNP SNP-SNP interactions
(Kharrati-Koopae <i>et al.</i> , 2021)	شناسایی شبکه‌های ژنی مرتبط با اختلالات ناشی از هیپوکسی، شامل بیماری‌های پارکینسون و آلزایمر Identification of gene networks associated with hypoxia-induced disorders, including Parkinson's and Alzheimer's diseases	NA	تحلیل شبکه ژنی Gene network analysis
(Marchesi <i>et al.</i> , 2021)	شناسایی ۱۱۹ SNP مرتبط با ویژگی‌های کارایی خوراک و شناسایی ژن‌های کاندیدای جدید Identification of 119 SNPs associated with feed efficiency traits and new candidate genes	Affymetrix 600K SNP array	تحلیل ارتباطات ژنی Gene association analysis
(Cui <i>et al.</i> , 2024)	شناسایی غنای ژن‌های هدف p53 در مسیرهای متابولیکی و پیشنهاد راهبردهای درمانی ضد ویروسی Identifying the richness of p53 target genes in metabolic pathways and suggesting antiviral therapeutic strategies	ChIP-seq, RNA-seq	تحلیل شبکه ژنی Gene network analysis
(Zhang <i>et al.</i> , 2018)	شناسایی تغییرات بیان ژن در پاسخ به عفونت ویروس آنفلوانزا H5N1 و تأثیر آن بر پاسخ ایمنی ماکروفاژها Identification of gene expression changes in response to H5N1 influenza virus infection and its impact on the immune response of macrophages	RNA-Seq	تحلیل ترنسکرپتوم Transcriptome analysis
(Ranaware <i>et al.</i> , 2016)	شناسایی ژن‌های کلیدی در پاسخ به عفونت ویروس آنفلوانزا و ارتباط آن با شدت بیماری Identification of key genes in response to influenza virus infection and their relationship with disease severity	Microarray	تحلیل بیان ژن Gene expression analysis
(Sun <i>et al.</i> , 2020)	شناسایی تنوع در بیان ژن‌های ویروسی و پاسخ‌های ضد ویروسی در سطح سلولی Identifying diversity in viral gene expression and antiviral responses at the cellular level	RNA-Seq	تحلیل شبکه ژنی Gene network analysis
(Pizzorno <i>et al.</i> , 2019)	شناسایی داروهای جدید با خواص ضد ویروسی از طریق تحلیل امضاهای بیان ژن بالینی Identification of new drugs with antiviral properties through the analysis of clinical gene expression signatures	Transcriptomic analysis	تحلیل شبکه ژنی Gene network analysis
(Calderon <i>et al.</i> , 2019)	شناسایی نقش بخش M ویروس آنفلوانزا در محدودیت میزبان و تأثیر آن بر بیان ژن Identifying the role of the M segment of the influenza virus in host restriction and its impact on gene expression	NA	تحلیل بیان ژن Gene expression analysis

گرفته شدند تا از ورود ژن‌های کم‌اهمیت جلوگیری شود و دقت تحلیل افزایش یابد.

جهت ساخت شبکه میان‌کنشی ژنی، از پایگاه داده STRING بهره گرفته شد و تعاملات پروتئینی بین ژن‌های منتخب با سطح اطمینان بالا (confidence score > 0/7) استخراج شدند. سپس، این تعاملات در نرم‌افزار Cytoscape نسخه ۳.۹.۱ بارگذاری شدند تا شبکه میان‌کنشی پروتئینی (PPI) ترسیم شود. این شبکه شامل گره‌ها (ژن‌ها) و یال‌ها (تعاملات عملکردی) بود که ساختار ارتباطی بین ژن‌های منتخب را به تصویر می‌کشید. برای تحلیل توپولوژیکی شبکه، از افزونه NetworkAnalyzer در Cytoscape استفاده شد و شاخص‌های Degree، Betweenness Centrality و Closeness Centrality برای هر گره محاسبه شدند. این شاخص‌ها به ما امکان دادند تا ژن‌های مرکزی و تأثیرگذار در شبکه شناسایی شوند. در ادامه، به منظور شناسایی خوشه‌های عملکردی در شبکه، از افزونه MCODE بهره گرفته شد.

این روش با ترکیب اطلاعات بین ژن‌ها، برآوردهای پایداری را از واریانس ارائه می‌دهد و توان تشخیص DEGs را حتی در پژوهش‌های با تعداد نمونه محدود افزایش می‌دهد. برای مقایسه گروه‌های مختلف (مغز و ریه) و شناسایی ژن‌های DEGs، کنتراست‌های مناسب با تابع makeContrasts تعریف و نتایج با تابع topTable استخراج شدند. معیارهای انتخاب DEGs شامل مقدار مطلق logFC برابر یا بزرگ‌تر از ۱ (تغییر حداقل دو برابری بیان ژن) و P -value تصحیح شده کمتر از ۰/۰۵ با روش Benjamini-Hochberg جهت کنترل نرخ کشف کاذب (FDR) بودند. توزیع P -value‌های تصحیح متناظر با هر ژن نیز با رسم هیستوگرام بررسی شد تا از صحت و کیفیت نتایج اطمینان حاصل شود. در ادامه، فهرست ژن‌های DEGs استخراج و وارد الگوریتم‌های ایجادکننده شبکه ژنی شدند. برای انتخاب ژن‌های ورودی به شبکه، معیارهایی از جمله مقدار مطلق تغییر بیان ($\log FC \geq 1$) و مقدار P تصحیح شده کمتر از ۰/۰۵ با استفاده از روش Benjamini-Hochberg در نظر

از H5N3 است که از طریق مهندسی معکوس یا بازآرایی ژنتیکی در آزمایشگاه تولید شده است (Webster *et al.*, 1992). سپس، rH5N3 P6 با انجام شش پاساژ متوالی در محیط کشت (مانند تخم مرغ یا سلول) از rH5N3 Ori به دست آمده است و ممکن است دارای جهش‌های انطباقی باشد که به بهینه‌سازی ویژگی‌های ویروس کمک می‌کند (Webster *et al.*, 1992).

هر سه سویه دارای زیرگونه H5N3 هستند و ساختار پایه ژن‌های HA و NA در آن‌ها یکسان است، اما سویه‌های مهندسی شده می‌توانند ژن‌های اضافی یا جهش‌های هدفمند در ژن‌هایی مانند HA یا NS1 داشته باشند تا ویژگی‌هایی مانند ایمنی‌زایی یا کاهش بیماری‌زایی را بهبود بخشند. به طور خلاصه، این رابطه سلسله‌مراتبی نشان می‌دهد که سویه‌های rH5N3 Ori و rH5N3 P6 مستقیماً از H5N3 طبیعی مشتق شده‌اند و هر کدام با هدف خاصی در آزمایشگاه بهینه‌سازی شده‌اند (Lee *et al.*, 2003; Neumann *et al.*, 2009). ویروس H5N3 به عنوان یک زیرگونه طبیعی از آنفلوآنزای طیور شناخته می‌شود که دارای هم‌گلوتینین نوع ۵ (H5) و نورآمینیداز نوع ۳^۱ است.

خوشه‌هایی با امتیاز بالا ($\text{score} > 3$) به عنوان ماژول‌های زیستی مهم در نظر گرفته شدند و ژن‌های موجود در آن‌ها برای تحلیل عملکردی بیشتر انتخاب شدند. همچنین، تحلیل‌های زیستی تکمیلی شامل آنالیز غنی‌سازی مسیرهای زیستی (KEGG) با بسته clusterProfiler و تحلیل شبکه‌های برهمکنش پروتئینی با STRINGdb انجام شدند. برای درک بهتر خواننده، کدهای R به کار رفته در این پژوهش همراه با توضیحات آنها در جدول ۲ ارائه شده‌اند.

نتایج و بحث

همان‌طور که گفته شد، در این پژوهش از داده‌های آزمایش بیان ژنی با شماره دسترسی GSE96837 استفاده شد. در اینجا به تحلیل دقیق این آزمایش می‌پردازیم. آزمایش یاد شده از سویه‌های rH5N3 Ori و rH5N3 P6 که به عنوان زیر مجموعه‌های مهندسی شده از ویروس طبیعی H5N3 شناخته می‌شوند، استفاده کرده است. در این رابطه، H5N3 به عنوان سویه والد و طبیعی با ژنتیک دست نخورده در طبیعت وجود دارد، در حالی که rH5N3 Ori نسخه‌ای نوترکیب و اصلاح شده

جدول ۲- فهرست کدهای R به کار رفته در این پژوهش

Table 2. The list of R codes used in this study

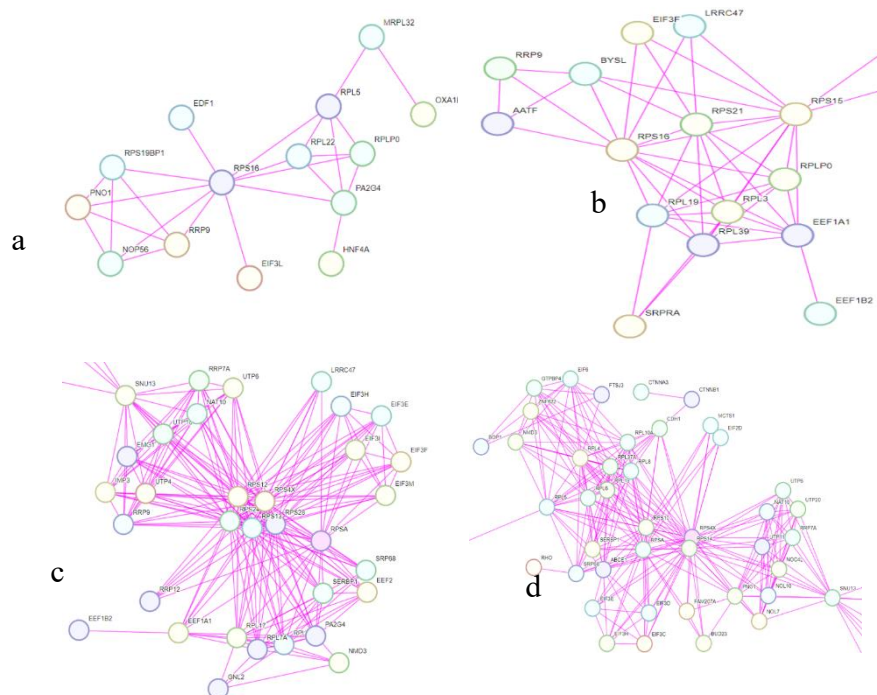
R کدهای R Codes	توضیح Explanation
library(GEOquery)	بارگذاری بسته GEOquery برای دانلود داده‌ها از پایگاه GEO Loading the GEOquery package to download data from the GEO database
library(limma)	بارگذاری بسته limma برای تحلیل بیان ژنی و یافتن DEGs Loading the limma package for gene expression analysis and finding differential genes
gse <- getGEO("GSE249434", GSEMatrix = TRUE)	دانلود داده‌های بیان ژنی مجموعه GSE249434 از GEO Downloading gene expression data set GSE249434 from GEO
eset <- gse[[1]]	استخراج اولین مجموعه داده از لیست دانلود شده Extract the first data set (Expression Set) from the downloaded list
expr_matrix <- exprs(eset)	استخراج ماتریس بیان ژن‌ها از مجموعه داده Extracting gene expression matrices from the dataset
pdata <- pData(eset)	استخراج اطلاعات متادیتا (اطلاعات نمونه‌ها) Extract metadata information (sample information)
tissue <- factor(pdata\$characteristics_ch1.1)	تعریف متغیر گروه‌بندی بر اساس نوع بافت (مغز یا ریه) Definition of a grouping variable based on the tissue type (brain or lung)
design <- model.matrix(~0 + tissue)	ایجاد ماتریس طرح برای مدل خطی بدون در نظر گرفتن مقدار پایه Creating a design matrix for a linear model without considering the basis value
colnames(design) <- levels(tissue)	نام‌گذاری ستون‌های ماتریس طرح با نام گروه‌ها Naming the columns of the design matrix with the names of the groups
fit <- lmFit(expr_matrix, design)	برازش مدل خطی به داده‌های بیان ژن با استفاده از ماتریس طرح Fitting a linear model to gene expression data using the design matrix
contrast.matrix <- makeContrasts(BrainvsLung = brain - lung, levels = design)	تعریف ماتریس کنتراست برای مقایسه بیان ژن بین مغز و ریه Definition of a contrast matrix for comparing gene expression between the brain and lung
fit2 <- contrasts.fit(fit, contrast.matrix)	اعمال ماتریس کنتراست به مدل برازش شده Applying the contrast matrix to the fitted model
fit2 <- eBayes(fit2)	به کارگیری روش eBayes برای بهبود تخمین‌های آماری و افزایش قدرت آزمون Applying eBayes' method to improve statistical estimates and increase test power
results <- topTable(fit2, coef="BrainvsLung", number=Inf)	استخراج نتایج کامل آزمون تفاوت بیان ژن‌ها بین مغز و ریه Extracting the complete results of the gene expression difference test between the brain and lung
results\$adj.P.Val <- p.adjust(results\$P.Value, method = "BH")	تصحیح مقادیر p-value با روش چندآزمونی بنجامینی-هچبرگ (BH) Correcting p-values with the Benjamini-Hochberg (BH) multiple testing method
significant_genes <- results[results\$adj.P.Val < 0.05,]	فیلتر کردن ژن‌های متفاوت بیان‌شده‌ی معنی‌دار (p-value کمتر از ۰/۰۵) Filtering genes with significant differential expression (p-value < 0.05)
write.csv(significant_genes, file = "significant_genes_brain_vs_lung.csv")	ذخیره نتایج ژن‌های معنی‌دار در فایل CSV Saving the results of significant genes in a CSV file
cat("Number of significantly differentially expressed genes:", nrow(significant_genes), "\n")	نمایش تعداد ژن‌های معنی‌دار یافته‌شده Displaying the number of significant genes found
cat("Results saved to", to = "significant_genes_brain_vs_lung.csv\n")	اطلاع‌رسانی در مورد ذخیره شدن نتایج در فایل Notification that results are being saved to a file

^۱ Neuraminidase type 3

به‌عنوان نقطه اتصال مشترک بین دو خوشه‌بندی (a) و (b) احتمالاً نقش کلیدی را در شبکه برهم‌کنشی ایفا می‌کند و نشان‌دهنده همبستگی قوی این ژن‌ها در پاسخ سلولی است. خوشه (c) از ژن‌های *RPL7A*, *RPS12*, *RPS13*, *RPL21* تشکیل شده است که همگی زیرمجموعه‌های ریبوزوم هستند و بیان هماهنگ آن‌ها حاکی از درگیری گسترده فرآیند ترجمه در پاسخ به استرس بیماری است. در نهایت، خوشه (d) بزرگ‌ترین شبکه را شامل می‌شود که از ژن‌های ریبوزومی متعددی مانند *RPL14*, *RPL8*, *RPL27A*, *RPL6*, *RPS14*, *RPS28*, *RPS8*, *RPL18A* و *RPL31* تشکیل شده است و این تجمع گسترده بیان ژنی، اهمیت همزمان چندین جزء ریبوزومی را در تنظیم پاسخ سلولی به عفونت آنفلوآنزا نشان می‌دهد. به‌طور کلی، تمرکز عمده این خوشه‌ها روی ژن‌های مرتبط با ریبوزوم و سازوکارهای ترجمه پروتئین، بیانگر تغییرات بنیادین در فعالیت‌های سلولی طی عفونت و تأکید بر اهمیت تنظیم پروتئین‌سازی در پاسخ به بیماری است. همچنین، نقش محوری ژن‌هایی مانند *RPS16*، که در چند خوشه حضور دارند، به عنوان هاب‌های شبکه نشان دهنده اهمیت تنظیم چندجانبه و هماهنگ در مسیرهای زیستی کلیدی است. این نتایج می‌توانند چارچوبی موثر را برای پژوهش‌های بعدی در جهت شناسایی اهداف درمانی و زیست‌نشانه‌های مرتبط با واکنش سلولی به آنفلوآنزا در طیور فراهم آورند.

سویه‌های مهندسی‌شده *rH5N3 Ori* و *rH5N3 P6* از طریق روش‌های آزمایشگاهی مانند مهندسی باژگون^۱ یا بازآرایی ژنتیکی^۲ ایجاد شده‌اند (Neumann *et al.*, 2009). *rH5N3 Ori* به‌عنوان پایه اولیه ویروس نوترکیب، عمدتاً برای اهداف تحقیقاتی یا تولید واکسن‌های غیر فعال شده طراحی می‌شود (Swayne *et al.*, 2011)، در حالی که *rH5N3 P6* نتیجه سازگاری ویروس پس از شش پاساژ متوالی در محیط‌های کشت سلولی یا تخم‌مرغ جنین‌دار است که منجر به انتخاب سویه‌های با رشد بهینه و کارایی بالاتر در تولید صنعتی می‌گردد (Lee *et al.*, 2003). این سویه‌های اصلاح شده به‌طور گسترده در پژوهش‌های ایمنی‌شناسی، توسعه واکسن‌های نوترکیب و تحقیقات مرتبط با بیماری‌زایی ویروس مورد استفاده قرار می‌گیرند (Krammer *et al.*, 2018).

شکل ۱ شامل چهار خوشه متمایز از ژن‌ها است که در تحلیل شبکه برهم‌کنش‌های ژنی مربوط به داده‌های بیان ژنی GSE96837 حاصل از بافت‌های مغز و ریه طیور مبتلا به آنفلوآنزا شناسایی شده‌اند. خوشه (a) در بردارنده ژن‌های *RPL5* و *RPS16* است که هر دو اجزای اصلی ریبوزوم هستند و نقش مهمی در فرآیند ترجمه پروتئین دارند. حضور این ژن‌ها نشان‌دهنده تغییرات تنظیمی در مسیرهای زیستی مرتبط با تولید پروتئین طی عفونت ویروسی است. خوشه (b) شامل ژن‌های *RPS16*، *RPL19* و *RPS15* است که



شکل ۱- شبکه ژنی ایجاد شده در قالب چهار خوشه ژنی

Figure 1. The gene network created in the form of four gene clusters

۷۰٪، بیانگر یک ماژول هماهنگ و به‌شدت مرتبط شامل ۱۸ ژن است که با استفاده از الگوریتم MCODE شناسایی شده‌اند.

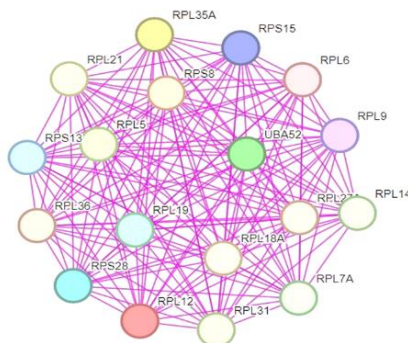
شبکه ژنی نمایش داده‌شده در شکل ۲ حاصل از تحلیل با استفاده از برنامه STRING و فیلتر با مقدار اعتماد برابر با

² Re-assortment

¹ Reverse Genetics

جدول ۳ به هستی‌شناسی عملکردی خوشه‌های مختلف شبکه ژنی اشاره دارد که با استفاده از تحلیل‌های غنی‌سازی تعیین شده‌اند. این جدول شامل سه بخش اصلی A، B و C است که هر کدام مربوط به گروهی از ویژگی‌ها یا مولکول‌های سلولی مشخص در خوشه‌های جداگانه است. در بخش A، عنوان شده است که خوشه مربوط به ساخت و ساز پروتئین‌ها است و مولکول‌های زیستی در این خوشه عمدتاً در فرآیندهای مربوط به ترجمه پروتئین دخیل هستند. اصطلاحاتی مانند PeptideBiosynthetic، Cytoplasmic Translation و Gene Expression نشان می‌دهند که فعالیت‌های عمده این خوشه بر محور تولید پروتئین و تکثیر اطلاعات ژنتیکی است. همچنین Ribosome Biogenesis و فرایندهای مرتبط با rRNA نشان دهنده نقش این گروه در سنتز و عملکرد ریبوزوم‌ها است که سازوکار اصلی تولید پروتئین در سلول است. شدت رنگ بنفش نمایانگر میزان معنی‌داری (بر اساس *P-Value*) فرآیندهای ذکر شده است که اهمیت آن‌ها را تأکید می‌کند.

این ژن‌ها که عمدتاً از اجزای پروتئین‌های ریبوزومی تشکیل شده‌اند (مانند *RPL14*، *RPL9*، *RPL6*، *RPS15*، *RPL35A* و غیره)، نشان‌دهنده یک زیرشبکه عملکردی قوی با ارتباطات بیان معنی‌دار و تنگاتنگ هستند. میزان بالای اعتماد در ارتباطات این شبکه به معنی آن است که تعاملات بین این ژن‌ها از نظر زیستی معتبر و چشم‌گیر هستند، و این شبکه احتمالاً نقش کلیدی در فرآیندهای زیستی مرتبط با بیوسنتز پروتئین و تنظیم ترجمه دارد. وجود ژن‌هایی مانند UBA52 که دارای نقش‌های تکمیلی در ترکیب ریبوزوم و فرآیندهای پساترجمه‌ای است، اهمیت عملکرد هماهنگ این ماژول را در پاسخ سلولی به شرایط استرس یا بیماری برجسته می‌سازد. بنابراین، این شبکه نشان‌دهنده یک هسته مهم کاری در سلول است که تنظیم همزمان و بیان هماهنگ این ژن‌ها می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر کارایی دستگاه ترجمه و پاسخ به عوامل بیماری‌زا داشته باشد و بررسی بیشتر این ماژول ظرفیت بالایی را در شناخت مسیرهای مولکولی مرتبط با بیماری و معرفی اهداف درمانی فراهم می‌کند.



شکل ۲- شبکه ژنی به‌دست آمده از خوشه شامل ۱۸ ژن با برنامه STRING
Figure 2. The gene network obtained from the cluster, including 18 genes with the STRING program

Asymmetric Synapse و Cell-Substrate Junction بیانگر نقش این ژن‌ها در اتصالات سلولی و ساختارهای سیناپسی هستند که می‌تواند حاکی از نقش‌های بین عضوی در بافت‌های مورد بررسی باشد. شدت رنگ سبز نشان دهنده اهمیت آماری آن‌ها است. در مجموع، جدول ۳ نشان می‌دهد که خوشه‌های تحلیل شده در این پژوهش عمدتاً مربوط به فرآیندهای زیستی پایه‌ای مانند سنتز و اصلاح پروتئین از طریق ریبوزوم، تعاملات RNA و تنظیم‌های پساترجمه‌ای هستند. همچنین اجزای سلولی مرتبط با ریبوزوم و اتصالات سلولی در خوشه‌های مختلف نقش‌آفرینی می‌کنند. شدت رنگ‌ها که نشان‌دهنده *P-Value* است بیانگر معنی‌داری بسیار بالای این عملکردها در هر خوشه است و بر تأثیر حیاتی این مسیرها و مولکول‌ها در زمینه بیان ژنی و پاسخ سلولی در شرایط مطالعه شده تأکید دارد. این یافته‌ها می‌توانند مبنایی را برای درک بهتر سازوکارهای مولکولی در بیماری یا وضعیت مورد بررسی فراهم آورند.

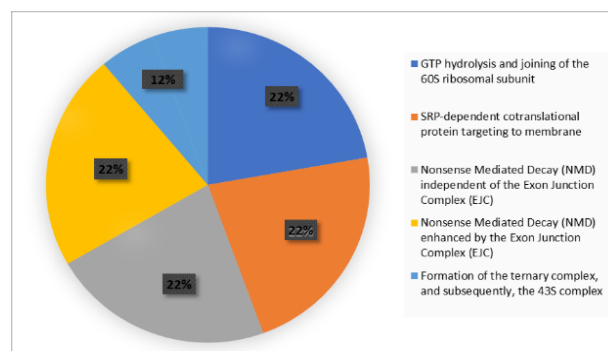
در بخش B، تمرکز بر اجزای سلولی و عملکردهای مولکولی مانند RNA Binding و rRNA Binding است. علاوه بر این، فعالیت‌های تنظیمی مانند Ubiquitin Ligase و Inhibitor Activity و Ubiquitin-Protein Transferase به نقش‌های مرتبط با تنظیم و مهار فرآیندهای پساترجمه‌ای^۱ پروتئین از طریق مسیر یوبیکوتینی اشاره دارند؛ همچنین، حضور Cadherin Binding و اجزای ریبوزومی بزرگ و کوچک نشان‌دهنده نقش‌های ترکیبی در تعاملات سلولی و عملکرد ریبوزومی است. شدت رنگ آبی نشان دهنده درجه اهمیت این فعالیت‌ها در خوشه است. در بخش C، ویژگی‌ها بیشتر به ساختارهای زیستی اختصاص یافته‌اند که در فرآیندهای سلولی نقش دارند. عناوینی مانند Large، Cytosolic Large Ribosomal Subunit و Ribosomal Subunit و Small Ribosomal Subunit بر اهمیت زیرواحدهای ریبوزومی در این خوشه تأکید دارند. علاوه بر این، عبارات Polysomal Ribosome، Focal Adhesion،

^۱ Posttranslational

جدول ۳- هستی‌شناسی ژنی برای نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش

Table 3. Gene ontology for the results obtained in this study

A: Biological Process	ترجمه سیتوپلاسمی Cytoplasmic Translation	GO:0002181	B: Molecular Function	اتصال RNA RNA Binding	GO:0003723
	ترجمه Translation	GO:0006412		اتصال rRNA rRNA Binding	GO:0019843
	فرایند بیوسنتز پپتید Peptide Biosynthetic Process	GO:0043043		فعالیت مهارکننده یوبیکوئیتین لیگاز Ubiquitin Ligase Inhibitor Activity	GO:1990948
	فرایند بیوسنتز ماکرومولکول Macromolecule Biosynthetic Process	GO:0009059		فعالیت مهارکننده یوبیکوئیتین-پروتئین توانسفراز Ubiquitin-Protein Transferase Inhibitor Activity	GO:0055105
	بیان ژن Gene Expression	GO:0010467		اتصال mRNA 5'-UTR mRNA 5'-UTR Binding	GO:0048027
	بیوزنر کمپلکس ریونوکلئوپروتئین Ribonucleoprotein Complex Biogenesis	GO:002613		اتصال کادهرین Cadherin Binding	GO:0045296
	بیوزنر ریوزوم Ribosome Biogenesis	GO:0042254		اتصال rRNA زیرواحد بزرگ ریوزومی Large Ribosomal Subunit rRNA Binding	GO:0070180
	فرایند متابولیسمی RNA ریوزومی rRNA Metabolic Process	GO:0016072		اتصال 5S rRNA 5S rRNA Binding	GO:0008097
	پردازش ncRNA ncRNA Processing	GO:0034470		اتصال rRNA زیرواحد کوچک ریوزومی Small Ribosomal Subunit rRNA Binding	GO:0070181
	پردازش rRNA rRNA Processing	GO:0006364		اتصال لیگاز پروتئین یوبیکوئیتین Ubiquitin Protein Ligase Binding	GO:0031625
C: Cellular Component	زیرواحد سیتوزولی بزرگ ریوزومی Cytosolic Large Ribosomal Subunit	GO:0022625			
	زیرواحد ریوزومی بزرگ Large Ribosomal Subunit	GO:0015934			
	ریوزوم Ribosome	GO:0005840			
	ریوزومی پلی‌زومی Polysomal Ribosome	GO:0042788			
	چسبندگی کانونی Focal Adhesion	GO:0005925			
	اتصال سلول-سوبسترا Cell-Substrate Junction	GO:0030055			
	زیرواحد ریوزومی کوچک سیتوزولی Cytosolic Small Ribosomal Subunit	GO:0022627			
	زیرواحد کوچک ریوزومی Small Ribosomal Subunit	GO:0015935			
	فرایند زیر واحد کوچک Small-Subunit Processome	GO:0032040			
	سیناپس غیرمقارن Asymmetric Synapse	GO:0032279			



شکل ۳- مسیرهای KEGG در ارتباط با نتایج حاصل از این پژوهش
Figure 3. KEGG pathways associated with the results of this study

حیاتی در مونتاژ ریوزوم و سنتز پروتئین است. ۲) هدف‌گیری پروتئین وابسته به SRP در غشا (۲۲ درصد، رنگ نارنجی): این بخش فرایندی را نشان می‌دهد که در آن ذره تشخیص فرسته (SRP) پروتئین‌های نوپدید را در طول ترجمه به غشا هدف‌گیری می‌کند. این برای محلی سازی (Localization) و درج صحیح پروتئین‌ها در غشاهای سلولی ضروری است. واپاشی ناشی از مسیر پیام‌دهی نادرست^۱ (NMD) مستقل از

نمودار دایره‌ای مربوط به شکل ۳ توزیع فرایندهای زیستی مختلف را نشان می‌دهد که هر کدام با رنگ و درصد متفاوتی نمایش داده شده است. در ادامه، تفسیر دقیقی از این شکل ارائه می‌شود: ۱) هیدرولیز GTP و پیوستن زیر واحد ریوزومی ۶۰S (۲۲ درصد، رنگ آبی): این بخش فرایندی را نشان می‌دهد که در آن GTP (گوانوزین تری فسفات) هیدرولیز می‌شود و به پیوستن زیر واحد ریوزومی ۶۰S کمک می‌کند. این مرحله‌ای

¹ Nonsense-Mediated Decay

می‌پردازد و نشان می‌دهد که زیرواحدهای بزرگ ریبوزومی و ریبوزوم‌ها در این زمینه نقش مهمی دارند. با P -value های مشابه و پایین $10^{-34} \times 2/86$ برای زیر واحد بزرگ ریبوزومی)، این نتایج تأکید می‌کنند که ساختارهای سلولی مانند ریبوزوم‌ها و اجزای مرتبط با آن‌ها در فرآیندهای بیوسنتزی و ترجمه‌ای حیاتی هستند. جدول ۶ به عملکردهای مولکولی می‌پردازد و نشان می‌دهد که فعالیت‌های مرتبط با اتصال RNA و فعالیت‌های مهار کننده لیگازهای یوبی‌کوئین در این زمینه اهمیت دارند. P -value های پایین ($10^{-19} \times 4/08$ برای اتصال RNA) نشان دهنده تأثیر این عملکردها بر فرآیندهای زیستی و سلولی هستند. به‌طور کلی، این تحلیل‌ها نشان می‌دهند که پروتئین‌ها و ژن‌های شناسایی شده در این جداول نه تنها در فرآیندهای زیستی و سلولی نقش دارند، بلکه می‌توانند به‌عنوان اهداف بالقوه برای درمان‌های زیستی و دارویی در بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرند. این یافته‌ها می‌توانند به درک بهتر از سازوکارهای مولکولی و زیستی مرتبط با بیماری‌ها کمک کنند و زمینه‌ساز پژوهش‌های بیشتر در این حوزه باشند. شکل ۴ شبکه تعاملی miRNA-mRNA و روابط پیچیده miRNA و ژن‌های هاب را با مقایسه بیان ژنی در مغز و ریه طیور مبتلا به آنفلونزا نشان می‌دهد که بر اساس داده‌های بیان ژنی از مجموعه GSE96837 ساخته شده است. سه ژن مرکزی *RPL21*، *RPL31* و *RPS28* به‌عنوان گره‌های هاب شناسایی شده‌اند که در شبکه توسط مثلث‌های قرمز نشان داده شده‌اند. این ژن‌ها عضوی از ریبوزم بزرگ (RPL) و کوچک (RPS) هستند و نقش حیاتی در ترجمه پروتئینی دارند، که در پاسخ ایمنی و استرس سلولی مهم است. miRNA های متعددی از جمله *gga-mir-7460-5p*، *gga-mir-1592*، *gga-mir-6578-3p* و *gga-mir-1724* با *RPL21* تعامل دارند، در حالی که *RPL31* تحت تنظیم miRNA های مانند *gga-mir-6686-3p* و *gga-mir-1774* قرار دارد. همچنین، *RPS28* با miRNA های از جمله *gga-mir-6579-5p*، *gga-mir-6642-3p* و *gga-mir-214* مرتبط است. این miRNA ها احتمالاً نقش حیاتی را در تعدیل پاسخ ایمنی ذاتی ایفا می‌کنند، به‌ویژه از طریق تنظیم مسیرهای پیام‌دهی اینترفرون و هدف‌گیری ژن‌های التهابی مانند *gga-mir-1739* و *gga-mir-1790*. همچنین، گروه دیگری از miRNA ها، از جمله *gga-mir-7456-5p*، *gga-mir-7442-3p* و *gga-mir-449c-5p*، با تمرکز بر محورهای مرکزی شبکه، نشان‌دهنده نقش فعال در مهار تکثیر ویروس هستند؛ احتمالاً از طریق تنظیم منفی بیان ژن‌های میزبان ضروری برای چرخه زیستی ویروس، مانند *gga-mir-7734*. الگوی توزیع miRNA های مانند *gga-mir-6556-5p* و *gga-mir-6578-3p* در محورهای افقی شبکه، نشان دهنده تغییرات دینامیکی وابسته به زمان پس از عفونت و همچنین تمایز عملکردی بین بافت‌های ریه و مغز است. این یافته‌ها به‌طور کلی نشان می‌دهند که عفونت ویروسی موجب فعال‌سازی یک شبکه مولکولی هماهنگ از miRNA ها می‌شود که از طریق سازوکارهای گوناگون، از جمله تنظیم مسیرهای التهابی (مانند NF-κB)، محدود کردن تکثیر ویروس

کمپلکس اتصال اگزون EJC (۲۲ درصد، رنگ خاکستری)؛ NMD یک سازوکار نظارتی است که mRNA های حاوی کدون‌های توقف زودرس را تخریب می‌کند و کنترل کیفیت بیان ژن را تضمین می‌کند. (۴) NMD تقویت شده توسط کمپلکس اتصال اگزون EJC (۲۲ درصد، رنگ زرد)؛ این بخش فرآیند تجزیه واسطه‌شده توسط ناهنجاری را نشان می‌دهد که توسط کمپلکس اتصال اگزون (EJC) تقویت می‌شود. EJC در علامت‌گذاری mRNA ها برای تخریب در صورت وجود کدون‌های توقف زودرس نقش دارد و در نتیجه وفاداری سنتز پروتئین را حفظ می‌کند. (۵) تشکیل کمپلکس سه‌گانه و در نتیجه کمپلکس S۴۳ (۶ درصد، رنگ سبز)؛ این بخش تشکیل کمپلکس سه‌گانه را نشان می‌دهد که شامل tRNA آغازگر، GTP و یک فاکتور آغازگر است. این کمپلکس برای تشکیل کمپلکس پیش‌ابتدایی S۴۳ ضروری است که مرحله‌ای کلیدی در آغاز ترجمه است. (۶) فرآیندهای دیگر (۶ درصد، آبی روشن)؛ این بخش احتمالاً شامل فرآیندهای زیستی دیگری است که به‌طور خاص در نمودار مشخص نشده‌اند اما به عملکردهای کلی سلولی کمک می‌کنند.

نتایج تحلیل مسیرهای عملکردی (شکل ۳) مرتبط با عفونت ویروس آنفلوانزای طیور نشان می‌دهند که پنج مسیر اصلی به‌طور معنی‌داری در پاسخ به عفونت ویروس آنفلوانزای طیور تغییر بیان داشته‌اند. این مسیرها شامل: (۱) هیدرولیز GTP و اتصال زیر واحد S۶۰ ریبوزومی (۲۲ درصد)، (۲) هدف‌گیری وابسته به SRP پروتئین‌ها به غشا به‌صورت هم‌زمان با ترجمه (۲۲ درصد)، (۳) NMD مستقل از کمپلکس اتصال اگزونی (۲۲ درصد)، (۴) NMD تقویت‌شده توسط کمپلکس اتصال اگزونی (۲۲ درصد)، و (۵) تشکیل کمپلکس سه‌گانه و متعاقباً کمپلکس (12) 43S درصد هستند. این یافته‌ها حاکی از آن هستند که عفونت ویروسی به‌طور قابل توجهی فرآیندهای ترجمه و کنترل کیفیت mRNA را در سلول‌های میزبان تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. به‌ویژه، فعال‌سازی مسیرهای وابسته به NMD نشان دهنده مکانیسم دفاعی سلول برای حذف mRNA های معیوب ناشی از عفونت ویروسی است. همچنین، تغییرات مشاهده‌شده در مسیرهای مرتبط با آغاز ترجمه (تشکیل کمپلکس S۴۳) و هدف‌گیری پروتئین‌ها به غشا، احتمالاً بازتابی از اختلال در فرآیندهای سنتز پروتئین میزبان در پاسخ به عفونت ویروسی هستند. این نتایج بینش جدیدی را در مورد سازوکارهای مولکولی دخیل در پاتوژن ویروس آنفلوانزای طیور ارائه می‌دهند. جداول ۴، ۵ و ۶ هستی‌شناسی خوشه‌نهایی که شامل فرآیندهای زیستی، اجزای سلولی و عملکردهای مولکولی است به‌وضوح اهمیت و نقش کلیدی پروتئین‌ها و ژن‌های مختلف را در فرآیندهای سلولی و زیستی نشان می‌دهند. جدول ۴ به بررسی فرآیندهای زیستی می‌پردازد که شامل ترجمه سیتوپلاسمی، زیست-تولید پپتید، و بیان ژن هستند. نتایج نشان می‌دهند که ژن‌های مرتبط با این فرآیندها، مانند *RPL5* و *RPL21*، به‌طور بسیار معنی‌داری در این فعالیت‌ها دخیل هستند و P -value های بسیار پایین (به‌عنوان مثال، $10^{-43} \times 1/78$) برای ترجمه سیتوپلاسمی اهمیت بالایی این ژن‌ها را در فرآیندهای زیستی نشان می‌دهند. جدول ۵ به اجزای سلولی

و تعدیل پاسخ‌های ایمنی بافت-ویژه، نقش اساسی را در بیماری‌زایی ایفا می‌کنند. شناسایی این گره‌های مرکزی می‌تواند به‌عنوان یک مجموعه اهداف بالقوه برای توسعه راهکارهای تشخیصی، پیش‌بینی‌کننده یا درمانی علیه آنفلوآنزای طیور مورد استفاده قرار گیرد.

این روابط نقش تنظیمی گسترده miRNAها را در کنترل بیان ژن‌های مرتبط با ترجمه پروتئین در فرآیندهای پاسخ به عفونت آنفلوآنزا نشان می‌دهند. افزایش تعاملات miRNA-ژن هاب می‌تواند نشان‌دهنده اختلال در مسیرهای ترجمه و تنظیم پروتئینی در حالت بیماری باشد، که احتمالاً منجر به تغییرات عملکردی در سلول‌های ایمنی و مغزی می‌شود. این شبکه به‌عنوان ابزاری برای شناسایی مولفه‌های کلیدی در پاسخ ژنومی به عفونت آنفلوآنزا و توسعه مدل‌های تشخیصی یا درمانی پتانسیل بالایی دارد. پس از شناسایی ماژول‌های بیولوژیکی مؤثر در پاسخ به عفونت ویروسی، ۱۸ ژن کلیدی به‌عنوان ژن‌های هاب انتخاب شدند. از میان این ژن‌ها، سه عضو از خانواده پروتئین‌های ریبوزومی یعنی *RPL21*، *RPL31* و *RPS28* به‌عنوان گره‌های مرکزی با بیشترین درجه ارتباط در شبکه تعاملی miRNA-mRNA شناسایی شدند و مورد تحلیل دقیق‌تر قرار گرفتند.

بر اساس تحلیل تعاملات پیش‌بینی‌شده، این ژن‌ها به‌ترتیب با طیفی از ۱۲، ۵ و ۱۰ miRNA مرتبط هستند (جدول ۷). در مجموع، ۲۷ miRNA با این ژن‌های ریبوزومی تعامل داشتند که از این تعداد، چهار مورد قبلاً شناخته شدند و ۲۳ مورد جدید و ویژه عفونت H5N3 در جوجه‌های طیور بودند. تحلیل عملکردی اهداف پیش‌بینی شده این miRNAها نشان داد که به‌طور معنی‌داری در مسیرهای زیستی مرتبط با ترجمه پروتئین، تشکیل کمپلکس‌های ریبوزومی و کنترل کیفیت mRNA غنی شده‌اند (جدول ۷).

این یافته‌ها اهمیت تنظیم پویای دستگاه ترجمه در پاسخ به عفونت ویروسی را برجسته می‌سازند. در کل، نتایج این پژوهش نشان می‌دهند که عفونت با ویروس H5N3 منجر به اختلال چشم‌گیر در فرآیندهای سلولی اساسی، به‌ویژه در مسیرهای مرتبط با ترجمه پروتئین و تخریب mRNA از طریق NMD می‌شود، به‌طوری که این مسیرها حدود ۴۴ درصد از مسیرهای تغییر یافته را شامل می‌شوند.

جدول ۴- فرآیندهای زیستی هستی‌شناسی ژنی

Table 4. Gene Ontology Biological Processes

Term	P-value	Adjusted P-value	Genes
Cytoplasmic Translation (GO:0002181)	1.78E-43	9.81E-42	RPL5;RPL21;RPL31;RPS8;RPL12;RPL35A;RPL9;RPL6;RPS15;RPL7A;RPS28;RPL18A;RPL27A;RPL36;RPL14;UBA52;RPS13;RPL19
Translation (GO:0006412)	8.67E-36	2.38E-34	RPL5;RPL21;RPL31;RPS8;RPL12;RPL35A;RPL9;RPL6;RPS15;RPL7A;RPS28;RPL18A;RPL27A;RPL36;RPL14;UBA52;RPS13;RPL19
Peptide Biosynthetic Process (GO:0043043)	1.34E-35	2.45E-34	RPL5;RPL21;RPL31;RPS8;RPL12;RPL35A;RPL9;RPL6;RPS15;RPL7A;RPS28;RPL18A;RPL27A;RPL36;RPL14;RPS13;RPL19
Macromolecule Biosynthetic Process (GO:0009059)	1.84E-34	2.53E-33	RPL5;RPL21;RPL31;RPS8;RPL12;RPL35A;RPL9;RPL6;RPS15;RPL7A;RPS28;RPL18A;RPL27A;RPL36;RPL14;RPS13;RPL19
Gene Expression (GO:0010467)	8.76E-31	9.64E-30	RPL5;RPL21;RPL31;RPS8;RPL12;RPL35A;RPL9;RPL6;RPS15;RPL7A;RPS28;RPL18A;RPL27A;RPL36;RPL14;RPS13;RPL19
Ribonucleoprotein Complex Biogenesis (GO:0022613)	6.27E-12	5.74E-11	RPS15;RPL5;RPS28;RPS8;RPL14;RPL35A;RPS13
Ribosome Biogenesis (GO:0042254)	4.34E-11	3.41E-10	RPS15;RPL5;RPS28;RPS8;RPL14;RPL35A;RPS13
rRNA Metabolic Process (GO:0016072)	1.43E-08	9.81E-08	RPS15;RPL5;RPS28;RPL14;RPL35A
ncRNA Processing (GO:0034470)	2.30E-08	1.33E-07	RPS15;RPL5;RPS28;RPL14;RPL35A
rRNA Processing (GO:0006364)	2.42E-08	1.33E-07	RPS15;RPL5;RPS28;RPL14;RPL35A
Ribosome Assembly (GO:0042255)	1.03E-07	5.15E-07	RPS15;RPL5;RPS28;RPL6
Ribosomal Large Subunit Biogenesis (GO:0042273)	1.41E-07	6.47E-07	RPL5;RPL14;RPL35A;RPL6
Ribosomal Small Subunit Biogenesis (GO:0042274)	8.47E-07	3.58E-06	RPS15;RPS28;RPS8;RPS13
protein-RNA Complex Assembly (GO:0022618)	8.57E-06	3.37E-05	RPS15;RPL5;RPS28;RPL6
Ribosomal Small Subunit Assembly (GO:0000028)	1.03E-04	3.78E-04	RPS15;RPS28
Ribosomal Large Subunit Assembly (GO:0000027)	1.75E-04	6.01E-04	RPL5;RPL6
Maturation Of SSU-rRNA (GO:0030490)	5.28E-04	0.001707	RPS28;RPS8
Regulation Of Signal Transduction By P53 Class Mediator (GO:1901796)	8.07E-04	0.002467	RPS15;RPL5
Ribosomal Small Subunit Export From Nucleus (GO:0000056)	0.005388	0.015598	RPS15
Modification-Dependent Macromolecule Catabolic Process (GO:0043632)	0.007179	0.018801	UBA52
Negative Regulation Of Ubiquitin Protein Ligase Activity (GO:1904667)	0.007179	0.018801	RPL5
Negative Regulation Of RNA Metabolic Process (GO:0051253)	0.009858	0.024645	RPS13
Regulation Of Ubiquitin Protein Ligase Activity (GO:1904666)	0.015196	0.034825	RPL5
Negative Regulation Of Ubiquitin-Protein Transferase Activity (GO:0051444)	0.015196	0.034825	RPL5
Regulation Of Protein Neddylolation (GO:2000434)	0.016083	0.035383	RPL5
Negative Regulation Of RNA Splicing (GO:0033119)	0.01697	0.035897	RPS13
Positive Regulation Of Signal Transduction By P53 Class Mediator (GO:1901798)	0.01874	0.038174	RPS15
Negative Regulation Of Proteolysis Involved In Protein Catabolic Process (GO:1903051)	0.022272	0.043748	RPL5
Maturation Of SSU-rRNA From Tricistronic rRNA Transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA) (GO:0000462)	0.02667	0.05058	RPS8
Negative Regulation Of Ubiquitin-Dependent Protein Catabolic Process (GO:2000059)	0.034538	0.063321	RPL5
Regulation Of Ubiquitin-Dependent Protein Catabolic Process (GO:2000058)	0.037148	0.065908	RPL5
Negative Regulation Of Protein Modification By Small Protein Conjugation Or Removal (GO:1903321)	0.04752	0.081675	RPL5
Negative Regulation Of Catabolic Process (GO:0009895)	0.06288	0.104801	RPL5
Proteolysis Involved In Protein Catabolic Process (GO:0051603)	0.067948	0.109916	UBA52
Macromolecule Modification (GO:0043412)	0.070472	0.110742	UBA52
Positive Regulation Of Amide Metabolic Process (GO:0034250)	0.073828	0.112793	RPL5
Regulation Of RNA Splicing (GO:0043484)	0.087962	0.130755	RPS13
Positive Regulation Of Translation (GO:0045727)	0.092902	0.134463	RPL5
Positive Regulation Of Macromolecule Biosynthetic Process (GO:0010557)	0.10433	0.147132	RPL5
Positive Regulation Of Cellular Biosynthetic Process (GO:0031328)	0.145597	0.200195	RPL5
Modification-Dependent Protein Catabolic Process (GO:0019941)	0.159458	0.21281	UBA52
Positive Regulation Of Protein Metabolic Process (GO:0051247)	0.162509	0.21281	RPL5
Regulation Of Translation (GO:0006417)	0.167067	0.21369	RPL5
Protein Stabilization (GO:0050821)	0.171601	0.214501	RPL5
Regulation Of Intracellular Signal Transduction (GO:1902531)	0.236177	0.288661	RPL5
Negative Regulation Of Gene Expression (GO:0010629)	0.26295	0.314396	RPS13
Positive Regulation Of Macromolecule Metabolic Process (GO:0010604)	0.281622	0.316106	RPL5
Protein Modification By Small Protein Conjugation (GO:0032446)	0.281622	0.316106	UBA52
Protein Ubiquitination (GO:0016567)	0.326367	0.359003	UBA52
Regulation Of Nucleic Acid-Templated Transcription (GO:1903506)	0.33744	0.363905	RPL6
Positive Regulation Of Gene Expression (GO:0010628)	0.354323	0.374765	RPL5

جدول ۵- اجزای سلولی هستی‌شناسی ژنی

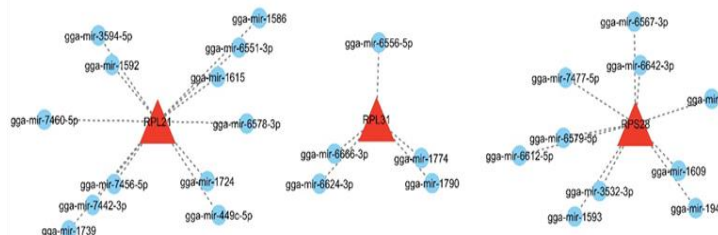
Table 5. Cellular components of the gene ontology

ژن‌ها (Genes)	ارزش P تصحیح‌شده (Adjusted P -value)	P -value	عنوان (Term)
<i>RPL4;RPL5;RPL21;RPL31;RPL12;RPL35A;RPL9;RPL6;RPL7A;RPL18A;RPL27A;RPL36;UBA52;RPL19</i>	4.583579270402217E-33	2.864737044001386E-34	زیرواحد ریبوزومی بزرگ سیتوزولی Cytosolic Large Ribosomal Subunit (GO:0022625)
<i>RPL4;RPL5;RPL21;RPL31;RPL12;RPL35A;RPL9;RPL6;RPL7A;RPL18A;RPL27A;RPL36;UBA52;RPL19</i>	4.583579270402217E-33	2.864737044001386E-34	زیرواحد بزرگ ریبوزومی (Large Ribosomal Subunit (GO:0015934))
<i>RPL7A;RPS28;RPL18A;RPL31;RPL36;RPL9;RPL6;RPS13;RPL19</i>	6.2471895417628524E-18	5.856740195402675E-19	ریبوزوم (Ribosome (GO:0005840))
<i>RPL7A;RPS28;RPL18A;RPL31;RPL36;RPL6;RPL19</i>	1.1754902789692736E-15	1.469362848711592E-16	ریبوزوم پلی‌زومی (Polysomal Ribosome (GO:0042788))
<i>RPL4;RPS15;RPL5;RPL7A;RPL31;RPS8;RPL12;RPL9;RPL6;RPS13;RPL19</i>	2.2296573022950118E-14	3.4838395348359555E-15	چسبندگی کانونی (Focal Adhesion (GO:0005925))
<i>RPL4;RPS15;RPL5;RPL7A;RPL31;RPS8;RPL12;RPL9;RPL6;RPS13;RPL19</i>	2.327801339555073E-14	4.364627511665762E-15	اتصال سلول-سوبسترا (Cell-Substrate Junction (GO:0030055))
<i>RPS15;RPS28;RPS8;UBA52;RPS13</i>	1.0718507200007255E-9	2.361898295810774E-10	زیرواحد زیبوزومی کوچک سیتوزولی Cytosolic Small Ribosomal Subunit (GO:0022627)
<i>RPS15;RPS28;RPS8;UBA52;RPS13</i>	1.0718507200007255E-9	2.679626800001814E-10	زیرواحد ریبوزومی کوچک Small Ribosomal Subunit (GO:0015935)
<i>RPS28;RPS8;RPS13</i>	1.2461337572591222E-4	3.6597211534267284E-5	پروسزوم زیرواحد کوچک (یک کمپلکس ریبونوکلئوپروتئینی) Small-Subunit Processome (GO:0032040)
<i>RPL4;RPL5;RPL7A;RPL36;RPS13;RPL19</i>	1.2461337572591222E-4	4.0135651125617204E-5	هسته (Nucleolus (GO:0005730))
<i>RPL4;RPL5;RPL7A;RPL36;RPS13;RPL19</i>	1.2461337572591222E-4	4.283584790578233E-5	لومن هسته‌ای (Nuclear Lumen (GO:0031981))
<i>RPL4;RPL5;RPL7A;RPL36;RPL9;RPS13;RPL19</i>	1.2645002424067653E-4	4.741875909025371E-5	اندامک درون سلولی بدون غشاء Intracellular Non-membrane-bound Organelle (GO:0043232)
<i>RPS28</i>	0.011057951282198079	0.0044922927083929694	غشای شبکه اندوپلاسمی زیر Rough Endoplasmic Reticulum Membrane (GO:0030867)
<i>RPL12;RPS13</i>	0.014315288776483564	0.00626293883971156	سیناپس نامتقارن (Asymmetric Synapse (GO:0032279))
<i>RPL12;RPS13</i>	0.01707367079146071	0.008003283183497207	تراکم پس سیناپسی (Postsynaptic Density (GO:0014069))
<i>RPL4;RPS15;RPL5;RPL7A;RPS8;RPL9;UBA52;RPL6;RPS13</i>	0.018803120476575258	0.009401560238287629	هسته (Nucleus (GO:0005634))
<i>RPS28</i>	0.02191132100994081	0.011640389286531055	سمت سیتوپلاسمی غشای شبکه اندوپلاسمی Cytoplasmic Side of Endoplasmic Reticulum Membrane (GO:0098554)
<i>RPL4;RPS15;RPL5;RPL7A;RPS8;RPL9;UBA52;RPL6;RPS13</i>	0.042807019093825296	0.024078948240276732	اندامک داخل سلولی محصور در غشا Intracellular Membrane-Bounded Organelle (GO:0043231)
<i>RPL4</i>	0.044917060379988105	0.02666950460061794	شبکه اندوپلاسمی زیر (Rough Endoplasmic Reticulum (GO:0005791))
<i>UBA52</i>	0.20400889573480194	0.1275705121508778	غشای بیرونی میتوکندریایی (Mitochondrial Outer Membrane (GO:0005741))
<i>UBA52</i>	0.20400889573480194	0.13388083782596377	غشای وزیکول درون سلولی (Endocytic Vesicle Membrane (GO:0030666))
<i>UBA52</i>	0.20725407747569383	0.1424871782645395	غشای خارجی اندامک (Organelle Outer Membrane (GO:0031968))
<i>UBA52</i>	0.22610015172833403	0.16250948405474008	وزیکول اندوسیتوزی (Endocytic Vesicle (GO:0030139))
<i>UBA52</i>	0.2556224964384024	0.19171687232880183	وزیکول (Vesicle (GO:0031982))
<i>UBA52</i>	0.2933233300083467	0.2291658851569021	غشای واکوئولی لیز شده (Lytic Vacuole Membrane (GO:0098852))
<i>UBA52</i>	0.3314284497567407	0.2763329756633174	غشای لیزوزومی (Lysosomal Membrane (GO:0005765))
<i>UBA52</i>	0.3314284497567407	0.27964275448224996	غشای اندوزومی (Endosome Membrane (GO:0010008))
<i>UBA52</i>	0.3404741579631739	0.2979148882177772	غشای وزیکول سیتوپلاسمی (Cytoplasmic Vesicle Membrane (GO:0030659))
<i>UBA52</i>	0.40594391196745655	0.36788667022050753	لیزوزوم (Lysosome (GO:0005764))
<i>UBA52</i>	0.41508626926186837	0.3891433774330016	غشای میتوکندریایی (Mitochondrial Membrane (GO:0031966))
<i>UBA52</i>	0.5290213824907237	0.5209984024088474	غشای شبکه اندوپلاسمی (Endoplasmic Reticulum Membrane (GO:0005789))

جدول ۶- عملکردهای مولکولی هستی‌شناسی ژنی

Table 6. Molecular functions of gene ontology

عنوان (Term)	P-value	Adjusted P-value	ژن‌ها (Genes)
اتصال RNA RNA Binding (GO:0003723)	4.0801968826701926E-19	5.7122756357382695E-18	<i>RPL4;RPL5;RPL21;RPL31;RPS8;RPL12;RPL35A;RPL9;RPL6;RPS15;RPL7A;RPS28;RPL18A;RPL27A;RPL36;RPS13;RPL19</i>
اتصال rRNA rRNA Binding (GO:0019843)	9.06881635847199E-6	6.348171450930392E-5	<i>RPL5;RPL12;RPS13</i>
فعالیت مهار کننده لیگاز یوبیکوئیتین Ubiquitin Ligase Inhibitor Activity (GO:1990948)	1.602207143126473E-5	7.473001298002882E-5	<i>RPS15;RPL5</i>
فعالیت مهار کننده یوبیکوئیتین-پروتئین ترانسفراز Ubiquitin-Protein Transferase Inhibitor Activity (GO:0055105)	2.1351432280008236E-5	7.473001298002882E-5	<i>RPS15;RPL5</i>
اتصال mRNA 5'-UTR mRNA 5'-UTR Binding (GO:0048027)	2.0868016842799032E-4	5.843044715983729E-4	<i>RPL5;RPS13</i>
اتصال rRNA زیر واحد بزرگ ریبوزومی Large Ribosomal Subunit rRNA Binding (GO:0070180)	0.0044922927083929694	0.010482016319583596	<i>RPL12</i>
اتصال 5S rRNA 5S rRNA Binding (GO:0008097)	0.007178528720410204	0.014126733792587765	<i>RPL5</i>
اتصال rRNA زیر واحد کوچک ریبوزومی Small Ribosomal Subunit rRNA Binding (GO:0070181)	0.008072419310050151	0.014126733792587765	<i>RPS13</i>
اتصال لیگاز پروتئین یوبیکوئیتین Ubiquitin Protein Ligase Binding (GO:0031625)	0.024261034520524583	0.03479107013129298	<i>RPL5;UBA52</i>
اتصال mRNA mRNA Binding (GO:0003729)	0.026121911997104307	0.03479107013129298	<i>RPL5;RPS13</i>
اتصال لیگاز پروتئینی شبه یوبیکوئیتین Ubiquitin-Like Protein Ligase Binding (GO:0044389)	0.02733584081744448	0.03479107013129298	<i>RPL5;UBA52</i>
اتصال کادهرین Cadherin Binding (GO:0045296)	0.03279255731941801	0.03825798353932102	<i>RPL7A;RPL6</i>
اتصال mRNA 3'-UTR mRNA 3'-UTR Binding (GO:0003730)	0.08050497738089572	0.08669766794865692	<i>RPL5</i>
اتصال DNA DNA Binding (GO:0003677)	0.1754315505957843	0.1754315505957843	<i>RPS15;RPL6</i>



شکل ۴- شبکه تعاملی miRNA-ژن هاب در پاسخ ژنومی طیور مبتلا به آنفلونزا: نقش کلیدی *RPL21*، *RPL31* و *RPS28* در تنظیم بیان ژنی

Figure 4. The miRNA-gene hub interaction network in the genomic response of poultry infected with influenza: the key role of *RPL21*, *RPL31*, and *RPS28* in regulating gene expression

پایه‌ای برای توسعه نشانگرهای زیستی تشخیصی و راهبردهای درمانی هدفمند در برابر آنفلوآنزای پرندگان مورد استفاده قرار گیرند. در تحلیل داده‌های ترانسکریپتومی، انتخاب مدل آماری مناسب به‌طور مستقیم بر اعتبار نتایج تأثیر می‌گذارد. در این پژوهش، از یک مدل خطی با اثرات ثابت برای شناسایی DEGs استفاده شد. این مدل شامل اثرات ثابت سویه ویروس (کنترل، α H5N3 Ori، α H5N3 P6)، زمان پس از عفونت (۱ و ۳ روز)، بافت (مغز و ریه) و برهم‌کنش‌های مربوطه بود. با این حال، با بررسی دقیق طرح آزمایشی (جدول ۱ پیوست)، آشکار می‌شود که این رویکرد ممکن است برخی از ویژگی‌های کلیدی داده را نادیده بگیرد. داده‌های GSE96837 دارای ساختاری هستند که در آن هر جوجه (Chicken ID) دو نمونه دارد: یکی از مغز و دیگری از ریه. این یعنی نمونه‌های مغز و ریه از یک فرد، ناهمتاساز^۱ و دارای همبستگی درون فردی هستند. این ساختار، طبق اصول طراحی آزمایش، معادل یک طرح کرت-مربک (خرد شده)^۲ است: جوجه به‌عنوان کرت اصلی^۳ و بافت به‌عنوان کرت فرعی^۴ در نظر گرفته می‌شوند. در چنین طرحی، تغییرپذیری بین جوجه‌ها (بین افراد) و درون جوجه‌ها (بین بافت‌ها) باید به‌صورت جداگانه مدل‌سازی شود.

این یافته‌ها با شواهد موجود در مورد نقش NMD به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی ذاتی علیه ویروس‌های RNA-دار همسو است. علاوه بر این، تحلیل‌های ما تمایز بافت ویژه در پاسخ به عفونت را آشکار کردند: در بافت ریه، فعال‌سازی مسیرهای التهابی از جمله NF- κ B و پیام‌رسانی اینترفرونی غالب بود، در حالی که در مغز، تغییرات بیان ژن عمدتاً در ژن‌های دخیل در متابولیسم سلولی و آپوپتوز مشاهده شدند. شبکه‌سازی تعاملات miRNA-ژن منجر به شناسایی miRNAهای جدیدی مانند gga-miR-6567-3p و gga-miR-1615 شد که به‌ترتیب *RPS28* و *RPL31* را هدف می‌گیرند و احتمالاً از طریق مهار ترجمه پروتئین‌های میزبان، نقش محافظتی را در محدود کردن تکثیر ویروس ایفا می‌کنند. اگرچه استفاده از داده‌های ریزارایه DNA به‌جای روش‌های حساس‌تر مانند RNA-seq ممکن است حساسیت شناسایی ژن‌های کم‌بیان را کاهش دهد و تأیید آزمایشگاهی تعاملات پیش‌بینی شده (مثلاً از طریق آزمون luciferase reporter) ضروری به‌نظر می‌رسد، اما این پژوهش، نقش پروتئین‌های ریبوزومی و miRNAهای تنظیم‌کننده در پاسخ ژنومی طیور به عفونت H5N3 را کمی آشکار می‌کند. یافته‌های این پژوهش احتمالاً می‌توانند به‌عنوان

جدول ۷- فهرست miRNAهای تعامل‌کننده با ژن‌های کلیدی در خوشه شامل ژن‌های هاب

miRNA	ژن‌های هاب (Hub genes)	اسامی توصیفی ژن‌های هدف (Descriptive names of target genes)
gga-mir-1592 gga-mir-1615 gga-mir-449c-5p gga-mir-1724 gga-mir-1739 gga-mir-6551-3p gga-mir-3594-5p gga-mir-6578-3p gga-mir-7442-3p gga-mir-7456-5p gga-mir-7460-5p gga-mir-1586 gga-mir-1774 gga-mir-1790 gga-mir-6556-5p gga-mir-6624-3p gga-mir-6666-3p gga-mir-1593 gga-mir-1609 gga-mir-214 gga-mir-3532-3p gga-mir-6567-3p gga-mir-6579-5p gga-mir-6612-5p gga-mir-6642-5p gga-mir-194 gga-mir-7477-5p	<i>RPL21</i>	پروتئین ریبوزومی L21 (Ribosomal protein L21)
	<i>RPL31</i>	پروتئین ریبوزومی L31 (Ribosomal protein L31)
	<i>RPS28</i>	پروتئین ریبوزومی S28 (Ribosomal protein S28)

³ Main plot

⁴ Subplot

¹ Non-independent

² Split-plot Design

(statistical power) را برای شناسایی برهم‌کنش‌های پیچیده و زیستی، به‌ویژه برهم‌کنش‌های بافت‌ویژه مانند سویه $\times$ بافت یا زمان $\times$ بافت، به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌دهد. بنا بر این، ادغام مدل‌های آماری پیشرفته‌تر در تحلیل‌های ترانسکریپتومی آینده، برای درک عمیق‌تر و دقیق‌تر دینامیک‌های پیچیده میزبان-بیماری‌زایی در عفونت آنفلوآنزای پرندگان، امری ضروری است. ما در نظر داریم در پژوهش‌های آینده این مهم را انجام دهیم چرا که استفاده از مدل خطی مخلوط می‌تواند بر نتایج به دو شکل اصلی تأثیر بگذارد:

۱- کاهش کاذب مثبت‌ها: با کنترل همبستگی درون‌فردی، واریانس تخمین زده شده دقیق‌تر می‌شود و بنا بر این آزمون‌های آماری محافظه‌کارانه‌تر می‌شوند. این امر منجر به کاهش تعداد DEGs کاذب می‌شود؛

۲- افزایش توان برای برهم‌کنش‌ها: مدل مخلوط به‌ویژه در شناسایی برهم‌کنش‌های بافت-ویژه (مثل سویه $\times$ بافت یا زمان $\times$ بافت) دقیق‌تر عمل می‌کند، زیرا تغییرپذیری بین جوجه‌ها به‌درستی کنترل می‌شود.

شناسایی پروتئین‌های ریوزومی (مانند *RPL21*, *RPL31*, *RPS28*) به‌عنوان گره‌های مرکزی (هاب) شبکه، نشان دهنده تداخل مستقیم ویروس H5N3 با دستگاه ترجمه میزبان است؛ یافته‌ای که با نتایج پژوهش‌های پیشین مبنی بر ربوده شدن فرایند ترجمه توسط ویروس‌های RNA برای تکثیر خود کاملاً همخوانی دارد (Kuyumcu-Martinez et al., 2004; Fodor & Te Velthuis, 2020). فعال‌سازی مسیر تجزیه mRNA واسطه بی‌معنی (NMD) به‌عنوان یک سازوکار دفاعی ذاتی میزبان که می‌تواند مولکول‌های RNA ویروسی را هدف قرار دهد، یک یافته کلیدی است (Balistreri et al., 2014; Ahmed & Du, 2023). این تمایز در پاسخ‌های بافت ویژه نیز مشهود است؛ پاسخ قوی التهابی در ریه با نقش این عضو به‌عنوان دروازه ورودی ویروس مطابقت دارد (Krammer et al., 2025)، در حالی که پاسخ غالب متابولیک و آپوپتوتیک در مغز، نشان‌دهنده ماهیت نوروتروپیک ویروس و استرس سلولی ناشی از عفونت سامانه عصبی مرکزی است، موضوعی که در پژوهش‌های دیگر نیز گزارش شده است (Radžišauskienė et al., 2021). در نهایت، افزودن لایه‌ای دیگر از پیچیدگی، شناسایی ۲۳ miRNA جدید مرتبط با عفونت است. اگرچه این‌ها برای اولین بار در چارچوب این پژوهش شناسایی شده‌اند، پیش‌بینی اهداف ژنی آن‌ها سرخ‌های مهمی را در مورد عملکرد بالقوه‌شان به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های پاسخ‌های التهابی و مرگ خود خواسته سلول ارائه می‌دهد، نقشی دوگانه که برای miRNAها در پاسخ به عفونت آنفلوآنزا به‌خوبی مشخص شده است (Wang et al., 2021; Wu et al., 2022). بنا بر این، این یافته‌ها به‌طور جمعی، تصویری یکپارچه و چندلایه را از بیماری‌زایی H5N3 ارائه می‌دهند که از تداخل در فرآیندهای بنیادین سلولی مانند ترجمه گرفته تا پاسخ‌های ایمنی متفاوت در سطح اندام و تنظیم‌های پیچیده پس از رونویسی را در بر می‌گیرد و چارچوبی قوی را برای پژوهش‌های آینده فراهم می‌کند.

در مدل خطی ثابت، تمام عوامل به‌عنوان اثرات ثابت در نظر گرفته می‌شوند و فرض استقلال کامل بین نمونه‌ها صورت می‌گیرد. اما در این پژوهش، فرض استقلال بین نمونه‌های مغز و ریه یک جوجه می‌تواند نادرست باشد. نادیده گرفتن این همبستگی می‌تواند منجر به تحریف غیر معقول واریانس، افزایش خطای نوع I (کاذب مثبت) و در نتیجه شناسایی نادرست DEGs شود. نرم‌افزار limma که به‌طور گسترده برای تحلیل داده‌های ریزآرایه DNA و RNA-seq استفاده می‌شود، به‌طور خاص برای چنین طرح‌هایی طراحی شده است. این بسته از طریق تابع duplicateCorrelation امکان مدل‌سازی همبستگی درون‌فردی را فراهم می‌کند. این تابع یک ضریب همبستگی درون‌کلاس^۱ را بین نمونه‌های جفتی (مغز و ریه از یک جوجه) برآورد و آن را در مدل خطی lmFit لحاظ می‌کند. این رویکرد به مدل خطی مخلوط نزدیک است و از نظر آماری معتبرتر از مدل اثرات ثابت است. تمام مدل‌سازی استخراج DEGs بر یک ژن انجام می‌شود و سپس نسبت به کل ژن‌ها در آزمایش تکرار می‌شود. در اینجا، فرمول کلی مدل مختلط پیشنهادی، با توجه به طرح اجراشده در جدول ۱ پیوست، می‌تواند به صورت زیر باشد:

$$y_{ijkl} = \mu + S_i + D_j + T_k + b_{\ell} + SD_{ij} + ST_{ik} + DT_{jk} + SDT_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

که در آن: $b_{\ell} \sim \mathcal{N}(0, \sigma_b^2)$ اثر تصادفی جوجه (یا همبستگی درون فردی) و $\varepsilon_{ijkl} \sim \mathcal{N}(0, \sigma^2)$ خطای باقیمانده مستقل است. اثرات ثابت میانگین کلی بیان یک ژن: μ ، اثر سویه ویروس: S_i که اثر روز پس از عفونت: D_j ، اثر بافت: T_k ، اثر متقابل سویه $\times$ دوز: SD_{ij} ، اثر متقابل سویه $\times$ بافت: ST_{ik} ، اثر متقابل روز $\times$ بافت: DT_{jk} و اثر متقابل سه‌گانه: SDT_{ijk} است. این مدل همان‌طور که گفته شد با استفاده از duplicate correlation در بسته limma قابل اجرا است و امکان تعریف کنترلهای پیچیده (مانند تفاوت پاسخ عفونت در ریه در مقابل مغز) را فراهم می‌کند. یکی از محدودیت‌های پژوهش حاضر، استفاده از مدل‌های آماری است که به‌طور کامل پیچیدگی ساختار داده‌های ما را، به‌ویژه همبستگی درون فردی بین نمونه‌های جفتی (مغز و ریه از یک جوجه واحد)، در نظر نمی‌گیرند. اگرچه تحلیل ما براساس روش‌های استاندارد و معتبر انجام شده است، اما این رویکرد ممکن است منجر به برآورد دقیق‌تر واریانس نشود و پتانسیل شناسایی برخی برهم‌کنش‌های ظریف را محدود کند. برای غلبه بر این محدودیت، پژوهش‌های آتی باید از مدل‌های خطی مختلط استفاده کنند. این رویکرد پیشرفته، با تعریف هر جوجه به‌عنوان یک اثر تصادفی، به‌طور صریح همبستگی بین نمونه‌های مشتق از یک فرد را مدل‌سازی می‌کند. این مدل که به‌راحتی با استفاده از تابع duplicateCorrelation در بسته limma در نرم‌افزار R قابل اجرا است، دو مزیت کلیدی برای پژوهش‌های آتی خواهد داشت: نخست، با کنترل دقیق‌تر واریانس ناشی از تفاوت‌های بین فردی، از وقوع کاذب مثبت‌ها (False Positives) می‌کاهد و فهرست DEGs معتبرتری حاصل می‌شود. دوم و مهم‌تر، این مدل توان آماری

¹ Intraclass Correlation

نتیجه‌گیری کلی

کلیدی در پاسخ میزبان دارند. تمایز پاسخ بافت ویژه (التهابی در ریه و در مغز) نشان‌دهنده پیچیدگی بیماری‌زایی ویروس است. شناسایی ۲۳ miRNA جدید مرتبط با عفونت، اهمیت تنظیم پس از رونویسی را برجسته کرده، افقی جدید را برای توسعه نشانگرهای تشخیصی و درمان‌های هدفمند فراهم می‌کند. این یافته‌ها چارچوبی موثر را برای پژوهش‌های آینده در جهت درک بهتر پاتوژن H5N3 و توسعه راهبردهای کنترل بیماری در صنعت طیور ارائه می‌دهند.

این پژوهش با ایجاد شبکه‌های ژنی از داده‌های بیان ژنی GSE96837، نقش محوری ژن‌های ریبوزومی *RPL21*، *RPL31* و *RPS28* miRNA های تنظیم کننده آن‌ها در پاسخ به عفونت ویروسی H5N3 در طیور را آشکار کرد. تحلیل‌های عملکردی نشان داد که مسیرهای مرتبط با ترجمه پروتئین و کنترل کیفیت mRNA، به‌ویژه مسیر NMD، نقش

References

- Ahmed, M. R., & Du, Z. (2023). Molecular interaction of nonsense-mediated mRNA decay with viruses. *Viruses*, 15(4), 816. <https://doi.org/10.3390/v15040816>
- Balistreri, G., Horvath, P., Schweingruber, C., Zünd, D., McInerney, G., Merits, A., ... & Helenius, A. (2014). The host nonsense-mediated mRNA decay pathway restricts mammalian RNA virus replication. *Cell Host & Microbe*, 16(3), 403-411. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.08.007>
- Calderon, B. M., Danzy, S., Delima, G. K., Jacobs, N. T., Ganti, K., Hockman, M. R., ... & Steel, J. (2019). Dysregulation of M segment gene expression contributes to influenza A virus host restriction. *PLoS Pathogens*, 15(8), e1007892. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007892>
- Chaharacain, B., Omar, A., Aini, I., Yusoff, K., & Hassan, S. (2009). Detection of H5, H7 and H9 subtypes of avian influenza viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Microbiological Research*, 164(2), 174-179. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.01.001>
- Cui, L., Li, X., Chen, Z., Liu, Z., Zhang, Y., Han, Z., ... & Li, H. (2024). Integrative RNA-seq and ChIP-seq analysis unveils metabolic regulation as a conserved antiviral mechanism of chicken p53. *Microbiology Spectrum*, 12(8), e00309-00324. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00309-24>
- Eladl, A. H., Alzayat, A. A., Ali, H. S., Fahmy, H. A., & Ellakany, H. F. (2019). Comparative molecular characterization, pathogenicity and seroprevalence of avian influenza virus H9N2 in commercial and backyard poultry flocks. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 64, 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.02.011>
- Fodor, E., & Te Velhuis, A. J. (2020). Structure and function of the influenza virus transcription and replication machinery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(9), a038398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038398>
- Kharrati-Koopae, H., Ebrahimi, E., Dadpasand, M., Niazi, A., Tian, R., & Esmailzadeh, A. (2021). Gene network analysis to determine the effect of hypoxia-associated genes on brain damages and tumorigenesis using an avian model. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00184-5>
- Krammer, F., Smith, G., Fouchier, R., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P., ... Webster, R. García-Sastre. (2018). Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(3). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>
- Krammer, F., Hermann, E., & Rasmussen, A. L. (2025). Highly pathogenic avian influenza H5N1: history, current situation, and outlook. *Journal of Virology*, 99(4), e02209-24. <https://doi.org/10.1128/jvi.02209-24>
- Kuyumcu-Martinez, N. M., Van Eden, M. E., Younan, P., & Lloyd, R. E. (2004). Cleavage of poly (A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Molecular and Cellular Biology*, 24(4), 1779-1790. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.4.1779-1790.2004>
- Lee, C., Senne, D., & Suarez, D. (2003). Development of Hemagglutinin Subtype-Specific Reference Antisera by DNA Vaccination of Chickens. *Avian Diseases*, 47(s3), 1051-1056. <https://doi.org/10.1637/0005-2086-47.s3.1051>
- Lee, H. J., Seo, M., Choi, H. J., Rengaraj, D., Jung, K. M., Park, J. S., ... & Han, J. Y. (2021). DMRT1 gene disruption alone induces incomplete gonad feminization in chicken. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(9), e21876.
- Marchesi, J. A. P., Ono, R. K., Cantão, M. E., Ibelli, A. M. G., Peixoto, J. d. O., Moreira, G. C. M., ... & Ledur, M. C. (2021). Exploring the genetic architecture of feed efficiency traits in chickens. *Scientific Reports*, 11(1), 4622. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84125-9>
- McFee, R. B. (2007). Global infections—Avian influenza and other significant emerging pathogens: An overview. *Disease-a-Month*, 53(7), 343. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2007.05.005>
- Neumann, G., Noda, T., & Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 459(7249), 931-939. <https://doi.org/10.1038/nature08157>
- Pizzorno, A., Padey, B., Terrier, O., & Rosa-Calatrava, M. (2019). Drug repurposing approaches for the treatment of influenza viral infection: reviving old drugs to fight against a long-lived enemy. *Frontiers in Immunology*, 10, 531. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00531>

- Radzišauskienė, D., Vitkauskaitė, M., Žvinytė, K., & Mameniškienė, R. (2021). Neurological complications of pandemic A (H1N1) 2009pdm, postpandemic A (H1N1) v, and seasonal influenza A. *Brain and Behavior*, 11(1), e01916. <https://doi.org/10.1002/brb3.1916/v1/review1>
- Ranaware, P. B., Mishra, A., Vijayakumar, P., Gandhale, P. N., Kumar, H., Kulkarni, D. D., & Raut, A. A. (2016). Genome wide host gene expression analysis in chicken lungs infected with avian influenza viruses. *PLoS One*, 11(4), e0153671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153671>
- Ren, H., Jin, Y., Hu, M., Zhou, J., Song, T., Huang, Z., ... & Dai, H. (2016). Ecological dynamics of influenza A viruses: cross-species transmission and global migration. *Scientific Reports*, 6(1), 36839. <https://doi.org/10.1038/srep36839>
- Shi, J., Deng, G., Ma, S., Zeng, X., Yin, X., Li, M., ... & Yang, H. (2018). Rapid evolution of H7N9 highly pathogenic viruses that emerged in China in 2017. *Cell Host & Microbe*, 24(4), 558-568. e557. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.08.006>
- Stanley, D., Watson-Haigh, N. S., Cowled, C. J., & Moore, R. J. (2013). Genetic architecture of gene expression in the chicken. *BMC Genomics*, 14(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-13>
- Sun, J., Vera, J. C., Drnevich, J., Lin, Y. T., Ke, R., & Brooke, C. B. (2020). Single cell heterogeneity in influenza A virus gene expression shapes the innate antiviral response to infection. *PLoS Pathogens*, 16(7), e1008671. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008671>
- Swayne, D., Pavade, G., Hamilton, K., Vallat, B., & Miyagishima, K. (2011). Assessment of national strategies for control of high-pathogenicity avian influenza and low-pathogenicity notifiable avian influenza in poultry, with emphasis on vaccines and vaccination. *Revue Scientifique et Technique-OIE*, 30(3), 839. <https://doi.org/10.20506/rst.30.3.2081>
- Tian, J., Li, M., Bai, X., Li, Y., Wang, X., Wang, F., ... & Li, Y. (2021). H5 low pathogenic avian influenza viruses maintained in wild birds in China. *Veterinary Microbiology*, 263, 109268. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109268>
- Urbaniak, K., & Markowska-Daniel, I. (2014). In vivo reassortment of influenza viruses. *Acta Biochimica Polonica*, 61(3), 427-431. https://doi.org/10.18388/abp.2014_1860
- Wang, Y., Zhang, X., Bi, K., & Diao, H. (2021). Critical role of microRNAs in host and influenza A (H1N1) virus interactions. *Life Sciences*, 277, 119484. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119484>
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, 56(1), 152-179. <https://doi.org/10.1128/mr.56.1.152-179.1992>
- Wu, W., Wang, C., Xia, C., Liu, S., & Mei, Q. (2022). Microrna let-7 suppresses influenza A virus infection by targeting rps16 and enhancing type I interferon response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 904775. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.904775>
- Zhang, H., Yu, J.-Q., Yang, L.-L., Kramer, L. M., Zhang, X.-Y., Na, W., ... & Li, H. (2017). Identification of genome-wide SNP-SNP interactions associated with important traits in chicken. *BMC Genomics*, 18(1), 892. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4252-y>
- Zhang, N., Bao, Y.-J., Tong, A. H.-Y., Zuyderduyn, S., Bader, G. D., Malik Peiris, J., ... & Lee, S. M.-Y. (2018). Whole transcriptome analysis reveals differential gene expression profile reflecting macrophage polarization in response to influenza A H5N1 virus infection. *BMC Medical Genomics*, 11(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0335-0>