

بررسی تأثیر تابش رامان بر بازتنظیم شبکه‌های تنظیمی lncRNA-mRNA و مسیرهای سیتوکائینی در جنین

جوجه

مریم شریعت^۱، جمال فیاضی^{۲*}، محمود نظری^۳ و فاطمه ثعلبی^۴^{۱، ۲} گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.^۴ استادیار بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، ایران.نویسنده مسئول: j_fayazi@asnrukh.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۲۵

چکیده

در این پژوهش، اثرات مولکولی تابش رامان ۷۸۵ نانومتر به‌عنوان یک محرک فیزیکی بر تنظیم سیستم ایمنی در مراحل اولیه رشد جنین جوجه بررسی شد. تمرکز بر بازآرایی ترنسکرپتومی، شامل RNAهای کدکننده و غیرکدکننده، درک عمیق‌تری از پاسخ‌های ایمنی جنینی به استرس‌های فیزیکی فراهم می‌آورد. جنین‌های سه‌روزه جوجه به دو گروه شامل تیمار (سه تکرار زیستی) و گروه کنترل (سه تکرار زیستی) تقسیم شدند. جنین‌های گروه تیمار به مدت ۲۴ ساعت در معرض تابش رامان با طول موج ۷۸۵ نانومتر قرار گرفتند، در حالی که گروه کنترل تحت شرایط مشابه و بدون دریافت تابش نگهداری شد. پس از استخراج RNA کل از نمونه‌ها، توالی‌یابی با پلتفرم Illumina انجام شد و داده‌ها با استفاده از فرایندهای استاندارد شامل کنترل کیفیت توسط FastQC، پیرایش خوانش‌ها با Trimmomatic، هم‌ترازی با HISAT2 و مونتاژ ترنسکرپت‌ها با StringTie پردازش شدند. تحلیل بیان تفاضلی با DESeq انجام گرفت و شناسایی lncRNA با بهره‌گیری از الگوریتم‌های CPC2، CNCI و Pfam صورت پذیرفت. همچنین، شبکه‌های هم‌بیانی، تعاملات cis و trans، شبکه‌های ceRNA و غنی‌سازی مسیرهای KEGG ارزیابی شدند. نتایج تحلیل بیان تفاضلی نشان داد چهار ژن کلیدی سیستم ایمنی شامل IL10RA ($\text{Log2FC} = -4.4$)، IL1B ($\text{Log2FC} = -4.1$)، IL7 ($\text{Log2FC} = -3.9$) و IL15 ($\text{Log2FC} = -3.3$) به‌طور معنی‌داری در گروه تابش‌دیده نسبت به گروه کنترل سرکوب شده‌اند. این ژن‌ها در مسیرهای حیاتی ایمنی، از جمله تعامل سیتوکائین-گیرنده، تنظیم التهاب، تکوین لنفوسیت‌ها و ایمنی سلولی، نقش بنیادی دارند. تحلیل KEGG نیز مشارکت این ژن‌ها در شبکه‌های سیگنال‌دهی ایمنی ذاتی و تطبیقی را تأیید کرد. در سطح RNAهای غیرکدکننده نیز چندین lncRNA با بیان تفاضلی شناسایی شد که الگوهای هم‌بیانی قوی با ژن‌های ایمنی داشتند. شبکه lncRNA-mRNA نشان داد سرکوب ژن‌های IL1B، IL7 و IL15 با تغییرات هماهنگ در lncRNAهای مرتبط همراه است و این ژن‌ها احتمالاً از طریق مکانیسم‌های cis، trans و مسیرهای رقابتی ceRNA تنظیم می‌شوند. غنی‌سازی KEGG نشان داد ژن‌های سرکوب‌شده عمدتاً در مسیر «تعامل سیتوکائین-گیرنده» متمرکز هستند. کاهش هم‌زمان IL1B به‌عنوان میانجی اصلی التهاب ذاتی، IL7 در بقا و تمایز لنفوسیت‌ها، IL15 در تکثیر سلول‌های T و NK و IL10RA به‌عنوان گیرنده تنظیم‌کننده ضدالتهابی، بیانگر اختلال هم‌زمان در محورهای کلیدی ایمنی شامل التهاب، هموستاز لنفوسیتی و تنظیم بازخوردی است. در مجموع، تابش رامان ۷۸۵ نانومتر در اوایل تکوین جنینی موجب بازآرایی گسترده ترنسکرپتوم ایمنی می‌شود؛ فرایندی که با سرکوب ژن‌های مهم سیتوکائینی و تغییر در شبکه‌های تنظیمی lncRNA-mRNA همراه است و دیدگاهی تازه درباره اثرات مولکولی استرس‌های فیزیکی بر تنظیم ایمنی جنین طیور ارائه می‌دهد.

کلمات کلیدی: تابش رامان ۷۸۵ نانومتر؛ تحلیل ترنسکرپتوم؛ آران‌ای‌های بلند غیرکدکننده؛ شبکه‌های تنظیمی آران‌ای؛ مسیر سیگنال‌دهی سیتوکائین و پاسخ ایمنی.

مقدمه

در سال‌های اخیر، ترنسکریپتوم سلول به‌عنوان یک لایه پویا و حساس از تنظیم زیستی، توجه گسترده‌ای را در مطالعات مولکولی به خود جلب کرده است. پیشرفت فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید، به‌ویژه RNA sequencing¹ (RNA-Seq)، امکان شناسایی هم‌زمان و با قدرت تفکیک بالا برای RNAهای کدکننده و غیرکدکننده را فراهم کرده و درک ما را از شبکه‌های پیچیده تنظیم بیان ژن به‌طور چشمگیری گسترش داده است (Wang *et al.*, 2009; Stark *et al.*, 2019). برخلاف روش‌های مبتنی بر ژن‌های از پیش شناخته‌شده، RNA-Seq این امکان را فراهم می‌کند که تغییرات ترنسکریپتومی در سطح کل ژنوم، از جمله رونویسی‌های جدید، ایزوفرم‌ها و RNAهای غیرکدکننده بلند (lncRNAs)² شناسایی شوند؛ مولکول‌هایی که امروزه به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی در رشد، تمایز، پاسخ به استرس و تنظیم ایمنی شناخته می‌شوند (Kopp and Mendell, 2018; Statello *et al.*, 2021). lncRNAها گروهی از رونوشت‌های RNA با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که فاقد ظرفیت کدکنندگی مؤثر برای پروتئین‌اند؛ بااین‌حال، از طریق مکانیسم‌های متنوعی همچون تنظیم کروماتین، کنترل رونویسی، تعدیل پایداری mRNA، برهم‌کنش با miRNA و تنظیم ترجمه می‌توانند نقش اساسی در سازمان‌دهی برنامه‌های بیان ژن ایفا کنند (Quinn and Chang, 2016; Statello *et al.*, 2021). در دستگاه ایمنی، lncRNAها به‌عنوان اجزای مهم تنظیمی در پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی شناخته شده‌اند و در کنترل بیان سایتوکاین‌ها، گیرنده‌های ایمنی، مسیرهای NF- κ B³، JAK⁴/STAT⁵ و تمایز سلول‌های ایمنی دخالت دارند (Atianand and Fitzgerald, 2014; Atianand *et al.*, 2017). از این‌رو، تغییر در الگوی بیان lncRNAها می‌تواند اثرات قابل‌توجهی بر هموستاز ایمنی و شدت پاسخ‌های التهابی داشته باشد. در طیور، به‌ویژه در جوجه‌های تازه هچ‌شده، تنظیم دقیق پاسخ‌های ایمنی برای بقا، رشد و سازگاری با محیط بیرونی اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد. جوجه‌های ۳ روزه در مرحله‌ای از رشد قرار دارند که سیستم ایمنی آن‌ها هنوز به بلوغ کامل نرسیده است و توسعه اندام‌های لنفوئیدی، استقرار جمعیت‌های سلول‌های ایمنی و تنظیم مسیرهای سایتوکاینی همچنان در حال شکل‌گیری است. در این دوره بحرانی، هرگونه تغییر در تنظیم رونویسی ژن‌های ایمنی می‌تواند بر کیفیت پاسخ ایمنی، حساسیت به التهاب و مقاومت در برابر استرس‌های محیطی اثرگذار باشد (Kaiser *et al.*, 2009; Wigley and Kaiser, 2003). به همین دلیل، تحلیل ترنسکریپتومی در این مرحله سنی می‌تواند اطلاعات ارزشمندی درباره سازوکارهای اولیه تنظیم ایمنی در پرندگان فراهم آورد. استفاده از RNA-Seq برای تحلیل هم‌زمان lncRNAها و mRNAها رویکردی قدرتمند برای شناسایی شبکه‌های تنظیمی مرتبط با ایمنی به‌شمار می‌رود؛ به‌ویژه زمانی که هدف، درک تعامل میان lncRNAهای افتراقی و ژن‌های کلیدی ایمنی

¹ توالی‌یابی RNAlong non-coding RNAs²Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells³Janus Kinase⁴Signal Transducer and Activator of Transcription⁵

در یک وضعیت زیستی خاص باشد. از سوی دیگر، محرک‌های فیزیکی و تغییرات محیطی می‌توانند موجب بازآرایی در الگوهای بیان ژن و ایجاد پاسخ‌های سلولی چندلایه شوند. این پاسخ‌ها نه تنها شامل تغییر در ژن‌های کدکننده پروتئین، بلکه شامل تغییر در بیان RNAهای تنظیمی نیز هستند. در چنین شرایطی، تحلیل ترنسکرپتومی مبتنی بر RNA-Seq ابزار بسیار مناسبی برای آشکارسازی اثرات مولکولی این مداخلات در مقیاس وسیع فراهم می‌کند و امکان شناسایی ژن‌ها و lncRNAهای کلیدی درگیر در پاسخ سلولی را فراهم می‌آورد (Stark *et al.*, 2019). با وجود اهمیت پاسخ‌های ایمنی در مراحل اولیه تکوین جنین طیور، هنوز اطلاعات محدودی درباره اثر تابش رمان ۷۸۵ نانومتر بر ترنسکرپتوم ایمنی جنین جوجه وجود دارد. به‌ویژه، مشخص نیست که این محرک فیزیکی چگونه بیان ژن‌های کلیدی سیتوکاینی و RNAهای بلند غیرکدکننده را تغییر می‌دهد و آیا lncRNAها از طریق شبکه‌های تنظیمی، از جمله تعاملات *trans* و *cis* و RNAهای رقابتی درون‌زا، در تعدیل پاسخ‌های التهابی و ایمنی نقش دارند یا خیر. بنابراین، خلأ اصلی پژوهش حاضر نبود شناخت جامع از بازآرایی هم‌زمان RNAهای کدکننده و غیرکدکننده و روابط تنظیمی بالقوه میان lncRNAها و ژن‌های ایمنی در جنین‌های جوجه در پاسخ به تابش رمان است. بر این اساس، فرضیه پژوهش حاضر آن است که تابش رمان با طول موج ۷۸۵ نانومتر در جنین‌های سه‌روزه جوجه، موجب تغییر معنی‌دار در الگوی بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای سیتوکاینی و ایمنی می‌شود و این تغییرات با بیان تفاضلی lncRNAهای تنظیم‌کننده همراه است. همچنین فرض می‌شود که lncRNAهای تغییریافته از طریق شبکه‌های هم‌بیانی و تعاملات تنظیمی بالقوه با ژن‌های سیتوکاینی منتخب، از جمله ژن‌های مرتبط با التهاب، تکامل لنفوسیت‌ها و ایمنی سلولی، در بازتنظیم پاسخ ایمنی جنینی نقش داشته باشند. از این‌رو، مطالعه حاضر با بهره‌گیری از تحلیل ترنسکرپتوم مبتنی بر توالی‌یابی آرانی و تمرکز بر تعاملات بالقوه میان lncRNAهای تنظیم‌کننده و ژن‌های سیتوکاینی منتخب، در پی شناسایی رونوشت‌ها، مسیرهای مولکولی و شبکه‌های تنظیمی مؤثر در پاسخ ایمنی جنین جوجه به تابش رمان است. نتایج این پژوهش می‌تواند مبنایی برای معرفی نشانگرهای زیستی مرتبط با پاسخ به محرک‌های فیزیکی و طراحی راهبردهای نوین برای بهبود سلامت و مقاومت طیور فراهم آورد.

مواد و روش

در این تحقیق چهار تخم مرغ نطفه‌دار سالم انتخاب شد. پس از ضدعفونی سطح پوسته، تخم‌ها در دستگاه تخم‌ها به مدت ۳ روز در دستگاه جوجه کشی در دمای ۳۷/۸ و رطوبت ۵۳ درصد در حالت عمودی با قطب صاف به سمت بالا درون دستگاه قرار گرفتند تا اینکه یک سیستم عروقی خارج جنینی ایجاد شود. (در این مرحله، جنین جوجه هنوز در فاز بسیار اولیه و حساس تکوینی قرار دارد، اما در عین حال شبکه عروقی خارج جنینی اولیه فعال شده و جنین از نظر زیستی برای دریافت و پاسخ به محرک‌ها آماده‌تر است. تا حدود روز سوم، عروق کیسه زرده و گردش ویتلین شکل گرفته‌اند و آلتوتوئیس نیز در حال آغاز رشد است؛ بنابراین شرایطی فراهم می‌شود که اثر تابش بر یک سیستم در حال سازمان‌یابی بررسی شود، نه روی یک بافت کاملاً تمایز

یافته. این زمان برای مطالعه پاسخ‌های اولیه ترنسکریپتومی، قبل از بلوغ اندام‌های لنفاوی، مناسب است.) پس از طی این مدت، جهت تعیین جنسیت جنین‌ها، نمونه‌ها در معرض اشعه رامان با طول موج تحریک ۷۸۵ قرار گرفتند. پس از ایجاد منفذ در انتهای نوک پهن تخم‌مرغ، ناحیه عروقی جنین در بالای زرده شناور شده و روی سطح باقی میماند. هنگامی که تخم‌مرغ به‌حالت عمودی قرار داده می‌شود، ناحیه عروقی شده در بالا حرکت میکند و پس از باز شدن پنجره پوسته، روی سطح باقی میماند، به‌طوری که از رگ -ها میتوان از مسیر پنجره پوسته نمونه‌برداری نوری کرد. موقعیت اندازه‌گیری همیشه روی یک رگ بزرگ (قطر بزرگتر از ۱۰۰ میکرومتر) ترجیحاً در رگ‌های اصلی جانبی یا قدامی/ خلفی انتخاب میشود. به‌منظور نمایش رگ‌های جنینی، یک سیستم دوربین ایجاد شده که به‌طور خودکار، یک رگ مناسب را در دیافراگم انتخاب کرده و تمرکز پرتو لیزر را روی آن قرار میدهد. لیزر با استفاده از یک میکروسکوپ همکانون روی نمونه‌ها متمرکز شده و از هر نمونه، چندین طیف رامان در نقاط مختلف (رگ‌های خونی) اندازه‌گیری شد. استفاده از طیفسنجی رامان با میکروسکوپ همکانون این امکان را فراهم میسازد تا با حذف کردن نورهای خارج از محل تمرکز که از نقاط بالا و پایین میدان دید میکروسکوپ ساطع میشوند، واریانس به‌طرز چشم‌یری افزایش یابد. در میکروسکوپی همکانون در هر لحظه فقط یک نقطه از نمونه قابل مشاهده است و تصویر حاصل، مجموع تجزیه تمام نقاط است. این دقت در میکروسکوپی همکانون با کمک دیافراگم پین هول صورت میگیرد که به عنوان فیلتر، دیافراگم‌هایی با قطر فضایی را در مقابل آشکارساز قرار میدهد که در میکروسکوپی نوری معمولی وجود ندارد (Xu et al., 2018). این ویژگی باعث تمرکز دقیق لیزر تحریک روی رگ خونی میشود که برای دقت بالای طیفسنجی در مطالعه روی تخم مرغ، ضروری است. طیف سنجی رامان در پژوهش حاضر با کمک سیستم طیفسنج رامان UniRAM مستقر در مرکز تحقیقات مهندسی سطح پیشرفته و نانومواد دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز صورت گرفت. این سیستم مجهز به لیزر حالت جامد (laser state-Solid) جهت تحریک نمونه با طول موج ۷۸۵ nm و میکروسکوپ همکانون Olympus با لنز ۵۰x است که سطح نمونه با کمک آن، روبش شده و نقطه/ نقاط مناسب جهت تجزیه انتخاب میشوند. همچنین، این سیستم دارای طیفسنج از نوع CCD جهت (InGaAs, iDus, Andor, Oxford Instruments) (ثبت طیف رامان است. پس از انجام تیمار، تخم‌ها مجدداً به دستگاه جوجه‌کشی منتقل شدند و انکوباسیون برای ۲۴ ساعت دیگر ادامه یافت. در پایان این دوره، جنین‌ها با دقت برداشت شده و برای انجام تحلیل‌های مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند. RNA کل از بافت‌های جنینی استخراج شد و کیفیت و غلظت آن با استفاده از دستگاه NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) و همچنین الکتروفورز ژل آگارز بررسی گردید. برای تهیه کتابخانه‌های RNA-Seq ابتدا mRNAها جداسازی شده و سپس سنتز cDNA انجام گرفت. پس از اتصال آداپتورها و تکثیر قطعات، کیفیت کتابخانه‌ها ارزیابی شد و توالی‌یابی با استفاده از پلتفرم Illumina NovaSeq مطابق دستورالعمل‌های شرکت سازنده انجام گردید (Illumina, 2023). کیفیت داده‌های خام حاصل از توالی‌یابی با نرم‌افزار FastQC (v0.11.9) ارزیابی شد تا شاخص‌هایی مانند کیفیت بازها، توزیع طول خوانش‌ها و احتمال وجود آلودگی‌های توالی بررسی گردد (Andrews, 2010).

سپس برای حذف توالی‌های آداپتوری، خوانش‌های کم‌کیفیت و بازهای انتهایی با کیفیت پایین از نرم‌افزار Trimmomatic (v0.39) استفاده شد تا مجموعه‌ای از داده‌های پالایش‌شده برای مراحل تحلیلی بعدی فراهم شود (Bolger *et al.*, 2014). خوانش‌های پالایش‌شده به ژنوم مرجع Gallus gallus (GRCg7b; Gallus_gallus.bGalGal1.mat.broiler.GRCg7b.dna.toplevel.fa.gz) با استفاده از نرم‌افزار HISAT2 (v2.2.1) هم‌تراز شدند. این نرم‌افزار با بهره‌گیری از ساختار شاخص‌گذاری مبتنی بر FM-index امکان نگاشت سریع و دقیق خوانش‌های RNA-Seq را فراهم می‌کند (Kim *et al.*, 2015). پس از هم‌ترازی، مونتاژ ترنسکرپت‌ها و برآورد سطح بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار StringTie (v2.2.1) انجام شد و مقادیر بیان بر اساس شاخص‌هایی نظیر FPKM یا TPM محاسبه گردید (Pertea *et al.*, 2015). برای شناسایی ژن‌های با بیان تفاضلی بین گروه کنترل و تیمار از بسته آماری DESeq2 (v1.38.0) در محیط نرم‌افزار R (v4.2.2) استفاده شد. این روش بر پایه مدل توزیع منفی دوجمله‌ای طراحی شده و یکی از رویکردهای استاندارد برای تحلیل داده‌های RNA-Seq محسوب می‌شود (Love *et al.*, 2014). به منظور شناسایی RNAهای غیرکدکننده بلند، ترنسکرپت‌های مونتاژشده فیلتر شدند. ابتدا توالی‌هایی با طول کمتر از ۲۵۰ نوکلئوتید حذف شدند، زیرا lncRNAها معمولاً طولی بیش از این مقدار دارند (Kang *et al.*, 2013). همچنین ترنسکرپت‌هایی که دارای چارچوب خوانش باز طولانی بودند کنار گذاشته شدند تا احتمال حضور RNAهای کدکننده کاهش یابد. در ادامه پتانسیل کدکنندگی ترنسکرپت‌ها با استفاده از ابزار CPC2 (v0.1) و CNCI (v2.0) ارزیابی شد که بر اساس ویژگی‌های توالی قادر به تمایز RNAهای کدکننده از غیرکدکننده هستند (Sun *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2017). علاوه بر این، برای حذف توالی‌هایی که ممکن است دارای دامنه‌های پروتئینی محافظت‌شده باشند، جستجو در پایگاه داده Pfam (v35.0) با استفاده از ابزار HMMER (v3.3.2) انجام گرفت (Mistry *et al.*, 2021). ترنسکرپت‌هایی که در هیچ‌یک از این تحلیل‌ها نشانه‌ای از قابلیت کدکنندگی نشان ندادند به عنوان lncRNAهای احتمالی در نظر گرفته شدند. چنین رویکردی در پروژه‌های ژنومی گسترده نظیر GENCODE نیز برای شناسایی RNAهای غیرکدکننده مورد استفاده قرار گرفته است (Derrien *et al.*, 2012). پس از شناسایی lncRNAها، این مولکول‌ها بر اساس موقعیت ژنومی و نحوه قرارگیری نسبت به ژن‌های کدکننده طبقه‌بندی شدند. این گروه‌ها شامل lncRNAهای بین‌ژنی (lincRNA)، درون‌ژنی، همپوشان با ژن‌های کدکننده، ضدحس و درون‌اینترونی بودند. چنین طبقه‌بندی‌هایی در مطالعات ژنومی برای درک بهتر عملکردهای تنظیمی lncRNAها اهمیت دارند، زیرا جایگاه ژنومی آن‌ها اغلب با نوع مکانیسم تنظیمی مرتبط است (Statello *et al.*, 2021). برای بررسی نقش تنظیمی lncRNAها در کنترل بیان ژن‌ها، تحلیل هم‌بیانی میان lncRNAها و mRNAها انجام شد و ضرایب همبستگی بیان با استفاده از بسته WGCNA (v1.72) (در محیط R محاسبه گردید و Langfelder and Horvath, 2008). همبستگی مثبت می‌تواند نشان‌دهنده اثر فعال‌کننده lncRNA بر بیان ژن هدف باشد، در حالی که همبستگی منفی ممکن است بیانگر نقش مهارتی در کاهش بیان ژن‌ها باشد. به منظور بررسی شبکه‌های تنظیمی

پیچیده‌تر، تعاملات احتمالی میان lncRNA، miRNA و mRNA در قالب مدل شبکه‌های رقابتی (ceRNA) RNA پیش‌بینی شد (Salmena *et al.*, 2011). همچنین تعاملات بالقوه میان lncRNA ها و پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA مورد ارزیابی قرار گرفت، زیرا بسیاری از lncRNA ها از طریق تشکیل کمپلکس‌های RNA-protein در تنظیم رونویسی و مسیرهای سیگنال‌دهی نقش دارند (Kopp and Mendell, 2018). در نهایت، برای شناسایی پیامدهای زیستی ژن‌های تحت تأثیر، تحلیل غنی‌سازی عملکردی با استفاده از پایگاه‌های Gene Ontology و KEGG از طریق بسته clusterProfiler (v4.6.2) در محیط R انجام شد تا مسیرهای بیولوژیکی مرتبط مشخص شوند (Kanehisa *et al.*, 2021). در این تحلیل، ژن‌های با بیان تفاضلی به همراه lncRNA های شناسایی‌شده مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین مسیر سیگنالینگ MAPK به طور ویژه مورد توجه قرار گرفت تا اثرات احتمالی تابش رامان بر بیان ژن‌های کلیدی این مسیر و تعاملات تنظیمی میان mRNA ها و lncRNA های مرتبط ارزیابی شود.

نتایج و بحث

داده‌های ارائه‌شده در جدول ۱ نشان می‌دهد که مواجهه با تابش رامان در جوجه‌های سه‌روزه منجر به کاهش معنی‌دار بیان چهار ژن کلیدی ایمنی شامل IL10RA، IL15، IL1B و IL7 شده است. مقادیر منفی Log2FC همراه با مقادیر P-value کمتر از ۰.۰۵ بیانگر سرکوب قابل توجه پاسخ ایمنی در این پرندگان جوان است. این یافته از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا جوجه‌های سه‌روزه در مرحله‌ای از رشد قرار دارند که سیستم ایمنی آن‌ها هنوز به بلوغ کامل نرسیده و در حال تکامل ساختاری و عملکردی است. بنابراین، هرگونه اختلال در تنظیم بیان ژن‌های ایمنی در این بازه زمانی حساس می‌تواند پیامدهای طولانی‌مدتی بر کارایی پاسخ‌های ایمنی، مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و هموستاز ایمنی در مراحل بعدی زندگی داشته باشد.

جدول ۱- بیان افتراقی شامل نماد ژنی، نام کامل، شناسه‌های Entrez و Ensembl، مقدار log2FC و مقدار FDR.

Table 1-Differential expression, including gene symbols, full names, Entrez and Ensembl IDs, log2FC values, and FDR.

Gene	Description	Log2FC	P_value
IL10RA	Interleukin 10 receptor subunit alpha	-4.4	0.040723
IL15	Interleukin 15	-3.3	0.035019
IL1B	Interleukin 1 beta	-4.1	0.025039
IL7	Interleukin 7	-3.9	0.005077

ژن IL1B که یک سیتوکین پیش‌التهابی کلیدی و یکی از اجزای اصلی پاسخ ایمنی ذاتی محسوب می‌شود، در این مطالعه کاهش بیان چشمگیری را نشان داد. اینترلوکین-۱ بتا به‌عنوان یکی از نخستین مولکول‌هایی که در پاسخ به ورود عوامل بیماری‌زا تولید

Interleukin-10 Receptor Subunit Alpha¹

Interleukin-15^v

Interleukin-1 beta[^]

Interleukin-7[^]

می‌شود، نقش اساسی در آغاز و تقویت پاسخ‌های التهابی دارد. این سیتوکین با فعال‌سازی سلول‌های ایمنی ذاتی مانند ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های دندریتیک، موجب افزایش تولید سایر سیتوکاین‌های پیش‌التهابی و کموتاکتیک شده و از طریق القای تب و افزایش نفوذپذیری عروقی به بسیج سریع سیستم ایمنی کمک می‌کند. نتایج تحلیل بیان تفاضلی نشان داد که تابش رامان ۷۸۵ نانومتر موجب کاهش معنی‌دار بیان چهار ژن کلیدی مرتبط با پاسخ ایمنی در جنین‌های سه‌روزه جوجه شد (جدول ۱). ژن‌های IL7، IL1B، IL10RA و IL15 به‌ترتیب دارای مقادیر Log2FC برابر با ۴/۴-، ۴/۱-، ۳/۹- و ۳/۳- بودند. ژن IL1B به‌عنوان یکی از سیتوکاین‌های پیش‌التهابی اصلی و مرتبط با ایمنی ذاتی، کاهش بیان قابل‌توجهی نشان داد. همچنین، بیان IL7 که در رشد، بقا و تمایز لنفوسیت‌های T و B نقش دارد، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. ژن IL15 نیز که با فعالیت و بقای سلول‌های کشنده طبیعی و لنفوسیت‌های T مرتبط است، در گروه تیمار سرکوب شد. علاوه بر این، کاهش بیان IL10RA، زیرواحد آلفای گیرنده اینترلوکین ۱۰، نشان‌دهنده تغییر در بخش تنظیمی و ضدالتهابی پاسخ ایمنی بود. تحلیل غنی‌سازی KEGG نشان داد که ژن‌های دارای کاهش بیان عمدتاً در مسیر **برهم‌کنش سیتوکاین-گیرنده سیتوکاین** متمرکز بودند. در نقشه این مسیر، ژن‌های IL7، IL1B و IL15 و IL10RA به‌صورت کادرهای قرمز مشخص شدند. این ژن‌ها در سه محور اصلی ایمنی قرار داشتند: **التهاب ذاتی (IL1B)**، **تکامل و هموستاز لنفوسیتی (IL7 و IL15)** و **تنظیم ضدالتهابی پاسخ ایمنی (IL10RA)**. کاهش هم‌زمان بیان این ژن‌ها بیانگر بازآرایی پاسخ‌های ایمنی و مسیرهای سیتوکاینی در جنین‌های تحت تابش رامان است. در مجموع، این چهار ژن در سه محور اصلی از مسیر **برهم‌کنش سیتوکاین-گیرنده سیتوکاین** مشارکت دارند: محور التهاب ذاتی، محور تکامل و هموستاز لنفوسیتی و محور تنظیم ضدالتهابی پاسخ ایمنی. کاهش هم‌زمان بیان این ژن‌ها نشان می‌دهد که تابش رامان ممکن است چندین لایه از شبکه تنظیمی سیستم ایمنی را به‌طور هم‌زمان تحت تأثیر قرار داده و موجب ایجاد یک وضعیت سرکوب ایمنی چندبعدی در جوجه‌های جوان شود.

جدول ۲- نقشه مسیر KEGG برهم‌کنش سیتوکاین-گیرنده سیتوکاین (Kanehisa & Goto, 2000) ژن‌های کاهش‌یافته (IL1B، IL10RA، IL15، IL7)

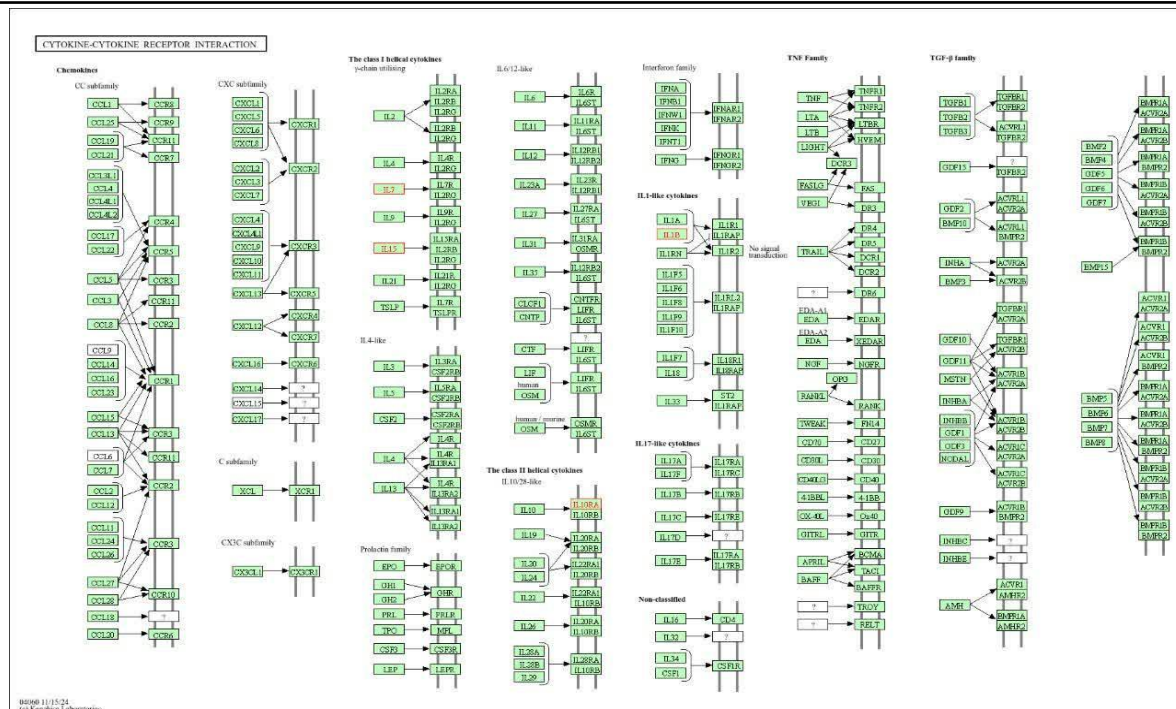
Table 2. KEGG pathway map of the cytokine-cytokine receptor interaction pathway highlighting the downregulated genes (IL1B, IL7, IL15, and IL10RA) (Kanehisa & Goto, 2000).

ژن	شاخه عملکردی	پیامد کاهش بیان
IL1B	التهاب ذاتی	کاهش پاسخ به عفونت حاد
IL7	تکامل لنفوسیت‌های T/B	اختلال در تولید سلول‌های ایمنی جدید
IL15	تکثیر سلول‌های NK و CD8 +T	تضعیف ایمنی ضدویروسی و ضدتوموری
IL10RA	تنظیم منفی التهاب	عدم توانایی در خاموش کردن التهاب

به عبارت دیگر، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تابش رامان ممکن است چندین سطح کلیدی از دفاع ایمنی را به‌طور هم‌زمان تحت تأثیر قرار داده باشد. سطح نخست مربوط به ایمنی ذاتی است؛ به‌طوری‌که کاهش بیان ژن‌های IL1B و IL15 می‌تواند نشان‌دهنده کاهش بالقوه در ظرفیت اولیه سیستم ایمنی برای شناسایی، فعال‌سازی و پاسخ به محرک‌های التهابی یا

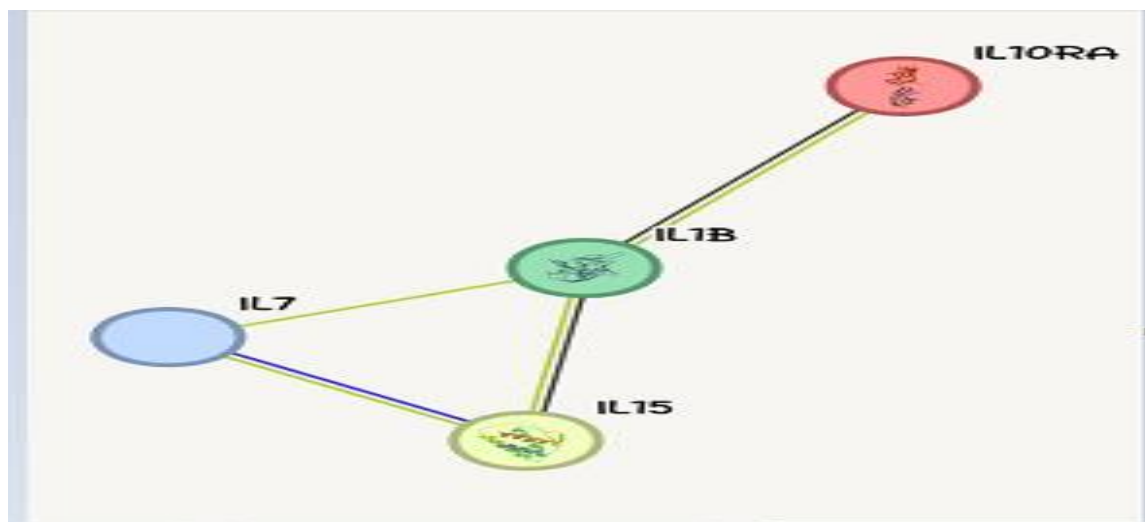
عوامل بیماری‌زا باشد. سطح دوم به تولید، بقا و تکامل سلول‌های ایمنی جدید مربوط می‌شود که با کاهش بیان IL7 قابل ارتباط است؛ ژنی که نقش مهمی در بقای پیش‌سازهای لنفوسیتی و توسعه لنفوسیت‌های T و B ایفا می‌کند. سطح سوم نیز به تنظیم و تعدیل پاسخ‌های ایمنی مرتبط است؛ به‌گونه‌ای که کاهش بیان گیرنده IL10RA می‌تواند نشان‌دهنده اختلال احتمالی در مسیرهای مهار و کنترل‌کننده التهاب باشد. با این حال، باید توجه داشت که این یافته‌ها عمدتاً بر اساس تغییرات بیان ژن تفسیر می‌شوند و لزوماً به‌تنهایی بیانگر وقوع قطعی تغییرات عملکردی در سطح پروتئین، فعالیت سلولی یا پاسخ ایمنی فیزیولوژیک نیستند. بنابراین، اگرچه کاهش هم‌زمان بیان ژن‌های مرتبط با مسیر برهم‌کنش سیتوکاین-گیرنده سیتوکاین می‌تواند حاکی از یک الگوی مولکولی سازگار با تضعیف یا بازتنظیم پاسخ‌های ایمنی در جوجه‌های سه‌روزه باشد، اما تأیید اثرات عملکردی آن نیازمند بررسی‌های تکمیلی، از جمله سنجش سطح پروتئین‌های سیتوکاینی، ارزیابی جمعیت‌های سلول‌های ایمنی، آزمون‌های عملکردی ایمنی و بررسی پاسخ به چالش‌های عفونی است. در مجموع، داده‌های حاضر نشان می‌دهند که تابش رامان ممکن است با تغییر بیان ژن‌های کلیدی در مسیر cytokine-cytokine receptor interaction، تعادل میان پاسخ‌های التهابی و تنظیمی را تحت تأثیر قرار دهد. این تغییرات می‌توانند به‌طور بالقوه با کاهش کارایی پاسخ‌های ایمنی، تغییر در هموستاز ایمنی و افزایش حساسیت به عوامل عفونی در مراحل اولیه زندگی مرتبط باشند؛ با این وجود، چنین پیامدهایی باید با احتیاط تفسیر شوند و به‌عنوان فرضیه‌هایی زیستی در نظر گرفته شوند که نیازمند اعتبارسنجی عملکردی بیشتر هستند (Skarda *et al.*, 2008).

جدول ۲. چهار ژنی که در این مطالعه کاهش بیان نشان داده‌اند، به‌صورت مستقل عمل نمی‌کنند، بلکه بخشی از یک شبکه پیچیده و به‌شدت درهم‌تنیده از برهم‌کنش‌های مولکولی هستند که در آن سیتوکاین‌ها از طریق گیرنده‌های اختصاصی خود با یکدیگر ارتباط برقرار کرده و پاسخ ایمنی را به‌صورت هماهنگ تنظیم می‌کنند. در این شبکه، هر سیتوکاین می‌تواند به‌عنوان یک گره تنظیمی عمل کرده و از طریق فعال‌سازی یا مهار مسیرهای سیگنالینگ مختلف، بر فعالیت سایر مولکول‌های ایمنی تأثیر بگذارد. مطالعات تحلیل شبکه‌ای نشان داده‌اند که سیتوکاین‌ها دارای درجه اتصال بسیار بالایی هستند و به‌طور میانگین بیش از ۲۲ برهم‌کنش عملکردی با سایر سیتوکاین‌ها دارند؛ ویژگی‌ای که نشان‌دهنده ماهیت به‌شدت یکپارچه و وابسته‌به‌هم این شبکه تنظیمی است (Rzepka *et al.*, 2015). در میان این مولکول‌ها، سیتوکاین‌های متعلق به خانواده IL-2 (از جمله IL7 و IL15) و خانواده IL-1 (از جمله IL1B) در مرکز این شبکه قرار گرفته و به‌عنوان گره‌های کلیدی در تنظیم تکامل لنفوسیت‌ها، فعال‌سازی سلول‌های ایمنی و هماهنگی پاسخ‌های التهابی عمل می‌کنند (Rzepka *et al.*, 2015). بنابراین، کاهش بیان این ژن‌ها احتمالاً تنها به تغییر در عملکرد یک مسیر منفرد محدود نمی‌شود، بلکه می‌تواند باعث ایجاد اختلال گسترده در شبکه سیگنالینگ سیتوکاین‌ها شده و در نهایت هماهنگی میان اجزای مختلف سیستم ایمنی را مختل کند.



شکل ۱ - نقشه مسیر برهمکنش سیتوکاین-گیرنده سیتوکاین (KEGG). ژن‌های کاهش یافته در جوجه‌های تیمار شده با اشعه رامان (IL1B, IL7, IL15 و IL10RA) با کادر قرمز مشخص شده‌اند.

Figure 1 - KEGG pathway of cytokine-cytokine receptor interaction. Downregulated genes in Raman-irradiated chicks (IL1B, IL7, IL15, and IL10RA) are marked with red boxes



شکل ۲ - نقشه مسیر KEGG برای برهمکنش سیتوکاین-گیرنده سیتوکاین. (Kanehisa & Goto, 2000) ژن‌های کاهش‌یافته در جوجه‌های تیمار شده با اشعه رامن (IL1B)، IL7، IL15 و IL10RA. این چهار ژن از طریق شبکه پیچیده‌ای از برهمکنش‌های مستقیم و غیرمستقیم با یکدیگر در ارتباط هستند.

Figure 2 - KEGG pathway map of cytokine-cytokine receptor interaction (Kanehisa & Goto, 2000). Downregulated genes in Raman-irradiated chicks (IL1B, IL7, IL15, and IL10RA). These four genes are interconnected through a complex network of direct and indirect interactions.

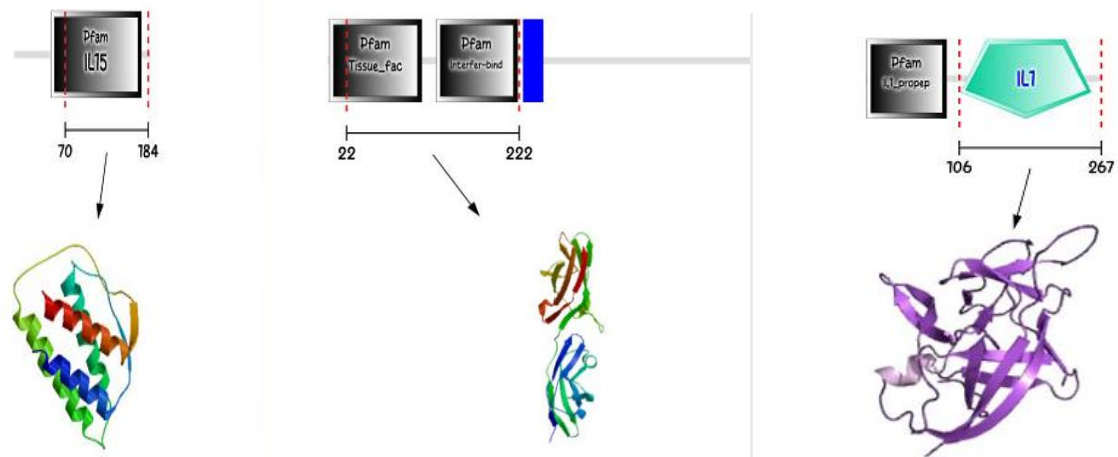
شکل ۲ ساختار سه بعدی سه پروتئین کلیدی IL1B، IL7 و IL15 را نشان می دهد که در جنین های سه روزه جوجه پس از تابش رامن، کاهش بیان معنی داری داشتند. ساختارهای پروتئینی بر اساس اطلاعات موجود در پایگاه های دامنه های پروتئینی

و ابزارهای مدل‌سازی ساختار سه‌بعدی بررسی شدند. تحلیل ساختاری نشان داد که این سه سیتوکاین، با وجود تفاوت در معماری پروتئینی، در شبکه‌های تنظیمی مرتبط با پاسخ ایمنی و مسیر برهم‌کنش سیتوکاین-گیرنده سیتوکاین نقش دارند. پروتئین IL1B دارای ساختار غالب بتا و آرایش بتا-تری‌فویل است که از ۱۲ رشته بتا تشکیل شده است. حلقه‌های میان رشته‌های بتا، نواحی مهمی برای برهم‌کنش این پروتئین با گیرنده اختصاصی آن، یعنی IL1R1، فراهم می‌کنند. IL1B پس از اتصال به گیرنده خود، در فعال‌سازی مسیرهای التهابی از جمله NF- κ B و MAPK نقش دارد. کاهش بیان IL1B در گروه تابش‌دیده، با کاهش یکی از اجزای اصلی محور التهاب ذاتی همراه بود. در مقابل، پروتئین‌های IL7 و IL15 دارای ساختار متشکل از چهار مارپیچ آلفا هستند. در IL7، این آرایش ساختاری امکان اتصال به گیرنده IL7R و فعال‌سازی مسیر JAK-STAT را فراهم می‌کند. IL7 در بقا، تکثیر و تمایز لنفوسیت‌ها، به‌ویژه سلول‌های T و B، نقش اساسی دارد. کاهش بیان IL7 در نمونه‌های تیمار شده نشان‌دهنده تغییر در مسیرهای مرتبط با تکامل و هموستاز لنفوسیتی است. پروتئین IL15 نیز دارای ساختار چهار مارپیچ آلفا و مشابه سایر اعضای خانواده سیتوکاین‌های وابسته به زیرواحد گیرنده گاما مشترک است. این پروتئین از طریق گیرنده IL15R، مسیر JAK-STAT را فعال می‌کند و در بقا و تکثیر سلول‌های کشنده طبیعی و لنفوسیت‌های CD8⁺T نقش دارد. کاهش بیان IL15 در گروه تابش رامان، با تغییر در محور ایمنی سلولی و سازوکارهای مرتبط با فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی همراه بود. تحلیل هم‌زمان ژن‌های مورد بررسی نشان داد که IL7 و IL15 از نظر عملکردی در گروه سیتوکاین‌های وابسته به زیرواحد گیرنده گاما مشترک قرار می‌گیرند و در تنظیم جمعیت‌های مختلف لنفوسیتی نقش مکمل دارند. در کنار آن‌ها، IL1B به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مهم التهاب ذاتی و IL10RA به‌عنوان گیرنده کلیدی تنظیم ضدالتهابی، اجزای دیگری از این شبکه سیتوکاینی را تشکیل می‌دهند. در مجموع، کاهش هم‌زمان بیان IL1B، IL7، IL15 و IL10RA نشان داد که تابش رامان چندین محور عملکردی سیستم ایمنی را به‌طور هم‌زمان تحت تأثیر قرار داده است. این محورها شامل آغاز التهاب ذاتی، تکامل و بقای لنفوسیت‌ها، ایمنی سلولی وابسته به سلول‌های کشنده طبیعی و تنظیم بازخوردی ضدالتهابی بودند.

جدول ۳ - مقایسه ساختار سه پروتئین کاهش‌یافته IL1B، IL7 و IL15 (Finn et al., 2016).

Table 3 - Structural comparison of three downregulated proteins IL1B, IL7, and IL15 (Finn et al., 2016).

ویژگی کلیدی	نوع ساختار	پروتئین
۱۲ رشته بتا در بشکه بتا	(تمام بتا) β -trefoil	IL1B
چهار مارپیچ آلفا	4- α -helix bundle	IL7
با ۵۷٪ همولوژی IL2 مشابه	4- α -helix bundle	IL15



شکل ۲ - ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های IL1B (β -trefoil)، IL7 و IL15 (چهار مارپیچ آلفا) بر اساس پایگاه داده Pfam (Finn et al., 2016).

Figure 2 - Three-dimensional structures of IL1B (β -trefoil), IL7 and IL15 (four- α -helix bundle) based on the Pfam database (Finn et al., 2016).

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که تابش رامان ۷۸۵ نانومتر در جنین‌های سه‌روزه جوجه با کاهش بیان ژن‌های کلیدی ایمنی شامل IL1B، IL7، IL15 و IL10RA همراه است. تمرکز این ژن‌ها در مسیر «برهم‌کنش سیتوکاین-گیرنده سیتوکاین» نشان می‌دهد که تابش رامان ممکن است بر چند محور مهم ایمنی، شامل التهاب ذاتی، تکامل لنفوسیت‌ها، ایمنی سلولی و تنظیم ضدالتهابی، اثر بگذارد. با این حال، از آنجا که نتایج حاضر بر داده‌های بیان ژن استوار هستند، تفسیر آن‌ها باید با احتیاط انجام شود و تغییرات رونویختی لزوماً به معنای تغییر قطعی در سطح پروتئین یا عملکرد سیستم ایمنی نیستند. کاهش بیان IL1B می‌تواند بیانگر تغییر در ظرفیت آغاز پاسخ‌های التهابی و ایمنی ذاتی باشد؛ زیرا این سیتوکاین در فعال‌سازی مسیرهای NF- κ B و MAPK و القای ژن‌های التهابی نقش دارد. همچنین، کاهش بیان IL7 و IL15 ممکن است با بازتنظیم مسیرهای مرتبط با بقا، تکثیر و تمایز لنفوسیت‌ها، سلول‌های کشنده طبیعی و لنفوسیت‌های T مرتبط باشد. کاهش بیان IL10RA نیز می‌تواند ظرفیت پاسخ‌دهی به پیام‌های ضدالتهابی وابسته به IL10 را تحت تأثیر قرار دهد. کاهش هم‌زمان IL1B و IL10RA احتمالاً نشان‌دهنده تغییر در تعادل میان آغاز التهاب و تنظیم بازخوردی آن است. یکی از یافته‌های مهم مطالعه، شناسایی lncRNAهای دارای بیان تفاضلی و هم‌بیانی آن‌ها با ژن‌های ایمنی بود. lncRNAها می‌توانند از طریق تنظیم رونویسی، پایداری mRNA، ساختار کروماتین و برهم‌کنش با miRNAها، بیان ژن‌های هدف را تغییر دهند. هم‌زمانی تغییر بیان lncRNAهای مرتبط با ژن‌های IL1B، IL7 و IL15 نشان می‌دهد که پاسخ جنینی به تابش رامان احتمالاً تنها محدود به ژن‌های کدکننده نیست و RNAهای غیرکدکننده نیز در بازتنظیم شبکه ایمنی نقش دارند. تعاملات پیش‌بینی‌شده lncRNA-mRNA می‌توانند از طریق سازوکارهای cis و trans رخ دهند. همچنین، مدل شبکه RNAهای رقابتی درون‌زا بیان می‌کند

که lncRNAها ممکن است با رقابت برای اتصال به miRNAهای مشترک، پایداری یا ترجمه mRNAهای ایمنی را تنظیم کنند. با وجود این، شبکه‌های هم‌بیانی و ceRNA در این مطالعه ماهیت پیش‌بینی شده دارند و برای اثبات روابط مستقیم تنظیمی، به اعتبارسنجی تجربی نیاز است. در مجموع، تابش رامان ۷۸۵ نانومتر با بازآرایی ترنسکرپتومی ژن‌های سیتوکاینی و lncRNAهای مرتبط در جنین جوجه همراه بود. کاهش بیان هماهنگ IL1B, IL7, IL15 و IL10RA می‌تواند نشان‌دهنده تغییر در شبکه‌های التهاب، هموستاز لنفوسیتی و تنظیم ایمنی باشد. انجام مطالعات تکمیلی با تعداد نمونه بیشتر، RT-qPCR، سنجش پروتئین‌های سیتوکاینی و ارزیابی عملکرد سلول‌های ایمنی برای تأیید پیامدهای زیستی این تغییرات ضروری است.

نتیجه‌گیری

بر اساس مطالعات موجود و با احتیاط در تعمیم نتایج، اندام‌های لنفاوی اولیه جوجه‌ها نسبت به پرتوهای گاما حساس‌اند و این حساسیت با القای آپوپتوز و کاهش بیان IL7 گزارش شده است؛ با این حال، این شواهد عمدتاً در شرایط آزمایشگاهی و دوزهای مشخص به دست آمده‌اند. همچنین، تغییر سیتوکاین‌هایی مانند افزایش IL-1 β و کاهش IL-10 در مواجهه با امواج مایکروویو گزارش شده است، اما این یافته‌ها عمدتاً به بافت بیضه محدود هستند و قابل تعمیم مستقیم به بافت‌های ایمنی نیستند. مطالعه حاضر برای نخستین بار تغییر بیان ژن‌های ایمنی در جنین‌های سه‌روزه جوجه در پاسخ به تابش رامان را نشان می‌دهد؛ با وجود این، تأیید مکانیسم‌های احتمالی سرکوب ایمنی به مطالعات مستقل با حجم نمونه، دوز و شرایط مواجهه متفاوت نیاز دارد. تفاوت در انرژی، نفوذپذیری و سازوکار اثر انواع تشعشعات نیز مقایسه مستقیم نتایج مطالعات مختلف را محدود می‌کند.

منابع

- Andrews, S. (2010). *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data* [Software]. Babraham Institute. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Atianand, M. K., Caffrey, D. R., & Fitzgerald, K. A. (2017). Immunobiology of long noncoding RNAs. *Annual Review of Immunology*, 35, 177–198.
- Atianand, M. K., & Fitzgerald, K. A. (2014). Long non-coding RNAs and control of gene expression in the immune system. *Trends in Molecular Medicine*, 20(11), 623–631.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
- Carpenter, S., & Fitzgerald, K. A. (2018). Cytokines and long noncoding RNAs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(6), a028589.
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., et al. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs. *Genome Research*, 22(9), 1775–1789.
- Dent, C., & Smith, L. (2019). Laser safety for Raman spectroscopy: Preventing thermal damage and ensuring safe operating conditions.

- Dinareello, C. A. (2018).** Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews*, 281(1), 8–27.
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., et al. (2016).** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D279–D285.
- Finn, R. D., Chuguransky, S., Williams, L., et al. (2021).** Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D412–D419.
- Fry, T. J., & Mackall, C. L. (2005).** The many faces of IL-7. *The Journal of Immunology*, 174(11), 6571–6576.
- Griffith, K., Ahmed, R., & Hinrichs, C. S. (2018).** NT-I7 promotes immune reconstitution. *Cancer Immunology Research*, 6(9), 1082–1094.
- Gupta, P., & Srivastava, N. (2022).** Effect of microwave radiation on inflammatory response in immature chicks. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 41(2), 181–192.
- Hiam-Galvez, K. J., Allen, B. M., & Spitzer, M. H. (2021).** Systemic immunity in tissue protection and disease. *Cell*, 184(23), 5598–5609.
- Illumina, Inc. (2023).** *Illumina sequencing platforms: User guide and technical documentation*. <https://www.illumina.com/>
- Kaiser, P., Rothwell, L., Galyov, E. E., et al. (2000).** Differential cytokine expression in avian cells. *Microbiology*, 146, 321–331.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000).** KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., et al. (2021).** KEGG: Integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D545–D551.
- Kang, Y. J., Yang, D. C., Kong, L., et al. (2017).** CPC2: Coding potential calculator. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W12–W16.
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., et al. (2019).** HISAT2 genome alignment. *Nature Biotechnology*, 37(8), 907–915.
- Kopp, F., & Mendell, J. T. (2018).** Functional classification of long noncoding RNAs. *Cell*, 172(3), 393–407.
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2008).** WGCNA: Weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9, 559.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014).** DESeq2. *Genome Biology*, 15, 550.
- Lorenzen, I., Dingley, A. J., Jacques, Y., & Grötzinger, J. (2008).** Structure of IL-15 alpha receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 30091–30098.
- Mazzucchelli, R., & Durum, S. K. (2007).** Interleukin-7 receptor expression. *Nature Reviews Immunology*, 7(2), 144–154.
- McElroy, C. A., Dohm, J. A., & Walsh, S. T. R. (2009).** IL-7/IL-7R α complex structure. *Structure*, 17(1), 54–65.

- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and its receptor. *Annual Review of Immunology*, 19, 683–765.
- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., et al. (2015). StringTie transcriptome reconstruction. *Nature Biotechnology*, 33(3), 290–295.
- Priestle, J. P., Schär, H. P., & Grütter, M. G. (1989). Structure of human IL-1 β . *PNAS*, 86(24), 9667–9671.
- Rochman, Y., Spolski, R., & Leonard, W. J. (2009). γ c family cytokines and T cell regulation. *Nature Reviews Immunology*, 9(7), 480–490.
- Rzepka, M., Zyzynska-Granica, B., & Buczkowska, M. (2015). Cytokine network in chickens. *Developmental & Comparative Immunology*, 52(2), 189–200.
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., et al. (2011). ceRNA hypothesis. *Cell*, 146(3), 353–358.
- Shouval, D. S., Ouahed, J., Biswas, A., et al. (2020). IL-10 receptor signaling. *Advances in Immunology*, 146, 1–33.
- Skarda, J., Bilek, R., & Skardova, I. (2008). Radiation-induced apoptosis in chickens. *Radioprotection*, 43(5), 123–130.
- Stark, R., Grzelak, M., & Hadfield, J. (2019). RNA sequencing: The teenage years. *Nature Reviews Genetics*, 20, 631–656.
- Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., & Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 96–118.
- Sun, L., Luo, H., Bu, D., et al. (2013). Classifying coding vs noncoding transcripts. *Nucleic Acids Research*, 41(17), e166.
- Waldmann, T. A. (2006). Biology of IL-2 and IL-15. *Nature Reviews Immunology*, 6(8), 595–601.
- Waldmann, T. A., Dubois, S., Miljkovic, M. D., & Conlon, K. C. (2020). IL-15 in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 11, 868.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63.
- Wigley, P., & Kaiser, P. (2003). Avian cytokines in health and disease. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 5(1), 1–14.
- Zaki, H. F., Abdel-Rahman, E. M., & Nabil, A. (2023). Immune modulation by low-dose radiation. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 37, 03946320231172080.
- Zheng, Y., Wang, X., & Chen, L. (2020). Integrated analysis of IL10RA and IL1B. *Frontiers in Immunology*, 11, 578.