Analysis of the regulatory effects of lncRNAs on kidney tissue in Ascites Susceptible broiler

Kasra Ahmadian[1], Mohammadreza Nassiry[2*], Karim Hasanpur[3], Ali Javadmanesh[4]

1-PHD Student, Department Animal Science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2-Associate Professor, Department Animal Science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3-Assistant Professor, Department Animal Science, Faculty of agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
4-Assistant Professor, Department Animal Science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
nassiryr@gmail.com
DOI:10.22067/ijasr.2023.83528.1162

Introduction : Ascites syndrome, as a metabolic disorder, is one of the most non-infectious causes of death in the old age of breeding in the poultry industry, which causes annual losses of over one hundred million dollars and is an important economic concern. The growth rate of broiler and their high need for oxygen causes an increase in pumping, followed by heart failure, and heart failure is often associated with other diseases. Due to the relationship between the heart and the kidney, chronic heart failure leads to a decrease in filtered blood volume and a decrease in kidney function, which over time causes permanent damage to the kidneys. lncRNAs play important roles in a variety of different mechanisms related to cellular homeostasis and in a wide range of pathophysiological processes and pathogenesis of many diseases, including cardiovascular disorders, respiratory and kidney diseases, preliminary studies in human samples show shows that lncRNAs are strongly involved in the development and disease of the kidney. For this reason, the lncRNAs obtained from the RNA-seq data of the kidney tissue were investigated in the occurrence of ascites.

Materials and methods :700 one-day-old chicks from one of the paternal lines of a commercial strain were kept under standard conditions until 21 days old. On the 21st day of the breeding period, cold stress (24 degrees Celsius) began and continued until the age of 48 days. After applying cold stress, the birds with ascites symptoms were grouped in the Ascites group and the rest in the Healthy group. On the 39th day of the breeding period, 70 slaughtered birds and kidney tissue samples from each bird were immediately transferred to the liquid nitrogen tank after separation. 16 ascites birds and 16 healthy birds were used for RNA extraction. Total RNA extraction was done individually using trizol (YTzol) solution, and then an equal amount of RNA from four tissue samples was combined and then cDNA was prepared from 4 ascites tissue samples and 4 healthy tissue samples. All small RNAs, such as rRNAs, tRNAs, etc., were removed by dt oligo beads, and finally, all mRNAs were used to prepare the library. Novagen company was used for sequencing using Illumine hiseq 2500 technology and paired-end reads. Several software such as hisat2, cufflinks, stringtie, cuffmerge and cuffdiff were used for mapping, aligning and analysis of gene expression differences. In order to extract coding and non-coding genes, FEELnc software was used with default settings. Potential target genes of lncRNAs were investigated by searching for protein coding genes located within 100 kb upstream and downstream of each lncRNA. In the following, a positive and negative correlation of 90% was obtained between two groups of coding and non-coding genes based on the degree of expression change. In order to investigate the

metabolic, structural and functional pathways of significant genes, the Enrichr database, which is connected with other databases such as KEGG, was used.
Results and Discussion: In the current research, a total of eight samples produced 187640642 million paired reads with a size of 150 nucleotides and after quality control, 185258819 uncontaminated reads were obtained. The number of 1421 lncRNA transcripts related to 921 gene loci and 154 related target genes were identified in the comparison between ascites and healthy birds. Then, this number of genes were identified (154 genes) in order to check their functional characteristics using the Enrichr database, five functional pathways Glycine, serine and threonine metabolism, Rap1 signaling pathway, Sphingolipid metabolism, Phosphatidylinositolsignaling system, Mucin type O-glycan biosynthesis and related genes were significant. Out of 13 significant lncRNAs in these biological pathways, 12 are located on the antisense direction and one is located on the sense direction. In addition, 9 lncRNAs are exonic, 3 intronic and 1 in downstream position. These pathways are activated as damage modifiers in hypoxic conditions caused by ascites and provide the required energy and maintain kidney homeostasis in response to oxygen tension caused by ascites. On the other hand, they act as cell survival, increase proliferation and anti-apoptosis, which on the one hand reduce kidney damage and on the other hand make it function better, and in this way, reduce complications caused by ascites kidney damage.Therefore, by targeting the important pathways ofbiology obtained and the genes affecting them for the prevention and treatment of ascites disease, it will provide a new insight for breeding.
Keywords : ascites,broiler ,kidney ,lncRNA, RNA-seq

تجزیه و تحلیل اثرات تنظیمی lncRNAها بر بافت کلیه در جوجه های گوشتی مبتلا به سندروم آسیت

کسری احمدیان[۱]، محمدرضا نصیری[۲*]، کریم حسن پور[۳]، علی جوادمنش[۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۴- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
نویسنده مسئول: nassiryr@gmail.com
DOI:10.22067/ijasr.2023.83528.1162

چکیده

آسیت یک اختلال متابولیکی مهم در صنعت طیور تجاری می‌باشد که بافت‌های متفاوتی از جمله کلیه را درگیر می‌کند. در این پژوهش ژن‌های غیررمزکننده‌ی بلند[۱](lncRNA) موثر در بیماری آسیت در جوجه های گوشتی که اثر تنظیمی روی ژن‌های mRNA هدف دارند با استفاده از فناوری RNA-seq مورد بررسی قرار گرفت. در روز ۳۹ آزمایش، از بافت کلیه RNA کل استخراج و از چهار نمونه سالم و چهار نمونه بیمار با استفاده از پلتفرم illumina Hiseq۲۵۰۰ توالی‌یابی

[1]Long noncoding RNA

شدند. بر اساس نتایج آنالیز RNA-seq تعداد 1421 رونوشت lncRNA از ۹۲۱ جایگاه ژنی شناسایی شد که با ۱۵۴ ژن رمزشونده در محدوده ۱۰۰ هزار باز بالا دست و پایین دست ژن‌های مورد نظر ارتباط داشتند. از میان جفت ژن‌های رمزشونده و lncRNA، آنهایی که همبستگی بیانی بیشتر از مثبت ۹۰ درصد و کمتر از منفی ۹۰ درصد داشتند به‌ترتیب به عنوان جفت ژن‌های با بیان هم‌راستا و غیر هم راستا مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی عملکردی این ژن‌ها نشان داد که سیزده ژن به طور معنی‌داری در مسیرهای متعدد زیستی مرتبط با بیماری مشاهده شدند. با هدف قراردادن مسیرهای مهم زیستی بدست آمده و ژن‌های موثر بر آن‌ها شامل C1GALT1C1 ، PLCD4، GCNT4، DGKA، IMPA2، GBA2، CERS5، CDH1، CSF1، CTNND1، LPAR2، DAO، PIPOX و تمرکز بر نقش آن‌ها در پیشگیری و درمان بیماری آسیت، درک بهتری از عملکرد آن‌ها را در تامین انرژی و حفظ هموستاز کلیه، ممکن ساخته تا جهت پیشگیری و درمان بیماری آسیت، بینشی جدید برای اصلاح نژاد و کاهش مشکلات مربوط به این بیماری در گله های تجاری ارائه دهد.

کلمات کلیدی:آسیت، جوجه گوشتی،کلیه،lncRNA،RNA-seq

مقدمه:

سندرم آسیت به عنوان یک اختلال متابولیکی، یکی از قابل توجه‌ترین و غیرعفونی‌ترین علل تلفات در جوجه‌های گوشتی است که با تلفات بین ۵ تا ۷ درصدی بعد از هفته¬ی چهارم پرورش سبب مرگ‌ومیر در گله های پرورش می شود ، علامت مشخص این ناهنجاری تجمع مایع زرد رنگ در حفره بطنی می باشد. پرندگان مبتلا کوچکتر از پرندگان سالم بوده و علائم سیانوز (رنگ آبی پوست) به خصوص در اطراف شانه و بال‌ها و حالت افسرده همراه با پرهای ژولیده را نشان می‌دهند (Gupta, 2011). این اختلال متابولیکی سالانه بالغ بر صد میلیون دلار خسارت اقتصادی را به صنعت طیور وارد می‌سازد به همین دلیل به عنوان یک چالش مهم اقتصادی مطرح می‌باشد (Lee *et al.*, 2022).

افزایش سرعت رشد جوجه های گوشتی و به دنبال آن افزایش مصرف اکسیژن به عنوان سوخت فرآیندهای مختلف متابولیکی، سبب ایجاد فشار خون ریوی و افزایش برون ده قلب می شود ، از آنجایی که حجم ریه‌ها و سیستم قلبی عروقی ثابت است ، پس از مدتی ریه‌ها نمی‌توانند خونی را که از قلب آمده است دریافت کنند و این مساله نقطه شروع نارسایی قلبی است. در چنین شرایطی ممکن است بدن پرنده نتواند به افزایش اکسیژن مورد نیاز خود پاسخ دهد و نسبت به تنش¬های محیطی مستعد ابتلا به آسیت شود. (Cowen *et al.*, 1988). نارسایی قلبی که در بیماری آسیت نیز مشهود است اغلب با سایر بیماری‌ها همراهاست، قلب و کلیه ارتباط تنگاتنگی با یکدیگر دارند، همزیستی بیماری قلبی وکلیوی را امروزه به عنوان سندرم قلبی و عروقی (CRS) تعریف می‌کنند. نارسایی مزمن قلب سبب کاهش حجم خون فیلتر شده توسط کلیه ها می شود، که منجر به کاهش عملکرد کلیه می گردد. از طرفی سبب تغییرات نوروهمورال و فعال شدن سیستم رنین- آنژیوتانسین- آلدوسترون شده که حجم نمک و آب در گردش را کنترل می کنند.این تغییرات منجر به افزایش میزان نمک و آب می شود، که در کوتاه مدت می تواند میزان خون رسانی به ارگان های حیاتی را بهبود بخشد. با این حال، در بلند مدت، این تغییرات نوروهمورال منجر به تورم و حتی کاهش بیشتر در خروجی قلب می شود. بنابراین به طور مداوم، این تغییرات جریان خون را به کلیه ها کاهش می دهد و عملکرد کلیه ضعیف تر می شود. از سوی دیگر نارسایی قلبی، سبب کاهش اکسیژن رسانی به بافت ها از جمله کلیه شده و هیپوکسی بافتی کلیه سبب شروع پاسخ کلیه به آن خواهد شد. (Ronco *et al.*, 2010).

فناوری های توالی‌یابی نسل جدید در حوزه‌ی RNA و بهره گیری از شیوه های مختلف محاسباتی، و تعیین کمیت بیان ژن فرصت قابل توجهی برای هستی‌شناسی و توصیف ژنومی RNAهای طولانی غیررمزکننده (lncRNAs) ارائه داده

است(Xiao *et al.*, 2018). بیش از ۹۸ درصد از ژنوم به RNAهایی رونویسی می‌شود که پتانسیل رمزگذاری پروتئین را ندارند(Chinwalla *et al.*, 2002). این RNAهای غیررمزکننده (ncRNA[1]ها) را می‌توان به RNAهای غیررمزکننده بلند lncRNA که طول آن‌ها بیشتر از ۲۰۰ نوکلئوتید است و RNAهای غیررمزکننده کوچک که طول کمتر از ۲۰۰ نوکلئوتید دارند تقسیم کرد(Lorenzen *et al.*, 2011). داده‌های موجود نشان می‌دهد که lncRNA ها در طیف وسیعی از فرآیندهای پاتوفیزیولوژیک، مانند تنظیم فعالیت‌های سلولی (تکثیر، مهاجرت، مرگ سلولی، رگزایی، سوخت و ساز)، پاسخ‌های التهابی و ایمنی نقش‌های مهمی ایفا می‌کنند. برخلاف بیماری‌های قلبی‌عروقی، مطالعه lncRNAها درکلیه هنوز در مراحل اولیه است. با این حال، مطالعات اولیه در نمونه‌های انسانی نشان می‌دهد که lncRNAها به شدت در توسعه و بیماری کلیه نقش دارند(Lorenzen *et al.*, 2016).

در طی سال‌های اخیر، ژنوم مرغ در زمینه lncRNA به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. از آنجایی که صفت تولید گوشت یکی از مهم‌ترین صفات اقتصادی طیور است، تعداد زیادی از مطالعات مانند مطالعه‌ی بافت ماهیچه (Ren *et al.*, 2018)، بافت چربی (Zhang *et al.*, 2017) و همچنین کیفیت گوشت (D. Li *et al.*, 2019). مربوط به بیان lncRNA بافت‌ها مرتبط با رشد هستند علاوه بر تولید گوشت، می توان به تولید تخم مرغ (Peng *et al.*, 2019)، مقاومت به ویروس لوکوز پرندگان (Hu *et al.*, 2018)، تخمدان (Yin *et al.*, 2020)، (Adetula *et al.*, 2018) برای بافت رحم واژینال، ارزیابی تحرکاسپرم خروس (Liu *et al.*, 2017) اشاره نمود.

شواهد زیادی نشان داده است که lncRNA و miRNA در سازگاری هیپوکسیک جوجه‌های تبتی در ارتفاعات نقش دارند، تجزیه و تحلیل KEGG در این نژاد نشان داد که چندین miRNA، lncRNA و ژن‌های هدف آن‌ها در رگزایی (ازجمله رشد عروق خونی و گردشخون) و متابولیسم انرژی نقش دارند(Zhang *et al.*, 2021).

مطالعات ذکر شده فوق نشان می‌دهد که lncRNA ها نقش مهمی را نه تنها در تنظیم بیان ژن ایفا می‌کنند بلکه در بسیاری از جنبه‌های دیگر فیزیولوژی و همچنین بیماری‌ها نیز نقش مهمی ایفا می‌کنند. در مقایسه با تعداد رونوشت‌های موجوداتی نظیر انسان و موش، دام و طیور دارای تعداد نسبتاً کمی رونوشت‌های ذخیره‌شده در پایگاه‌های اطلاعاتی بیولوژیکی هستند. بنابراین، مسیر اصلی تحقیقات آینده تکمیل هستی‌شناسی[2]بخش غیررمزکننده ژنوم دام است امروزه با بهره برداری کامل از اطلاعات ژنتیکی می توان به بازده اقتصادی مطلوب رسید، به همین دلیل کسب دانش در مورد تمام مکانیسم های کنترل بیان ژن، از جمله مولکول‌هایlncRNA، مهم به نظر می‌رسد(Kosinska-Selbi *et al.*, 2020).

علیرغم پژوهش‌های متعددی که در بررسی مقایسه‌ای بین ژن‌های مسبب آسیت در پرندگان آسیتی و سالم انجام شده است(Hasanpur *et al.*, 2019 ;Taghizadeh *et al* , 2018; Malekshahdehi *et al.*, 2021; Shi *et al.*, 2017) ولی مطالعه‌ای که اثر lncRNAها را در این بیماری طیور بررسی نماید صورت نگرفته و پژوهش حاضر به بررسی lncRNAهای حاصل از داده های RNA-seq در بروز آسیت در بافت کلیه پرداخته است.

مواد و روش

نمونه‌برداری، ساخت کتابخانه و توالی یابی

[1]Noncoding RNA
[2]Annotation

در این پژوهش از داده های حاصل از پژوهش ملکشاهدهی و همکاران (۲۰۲۱) استفاده شده است که به اختصار تشریح می گردد، تعداد ۷۰۰ قطعه جوجه یک روزه از خطوط پدری سویه تجاری آرین تا ۲۱ روزگی در سالن پرورشی مزرعه دانشگاه تبریز در شرایط استاندارد نگهداری شد. در روز ۲۱ دوره پرورش ، تنش سرمایی شروع و در روز ۳۹ دوره پرورش برای نمونه برداری از بافت کلیه، ۷۰ پرنده کشتار شده و بر اساس درصد هماتوکریت و نسبت RV/TV نمونه های با هماتوکریت پایین‌تر از ۳۶٪ و RV/TV کمتر از ۰/۲۷ در گروه سالم و بقیه در گروه بیمار قرار داده شده و نمونه های بافتی کلیه جهت استخراج RNA سریعا به تانک ازت منتقل شدند. استخراج RNAی کل از بافت کلیه ۳۲ پرنده شامل ۱۶ پرنده آسیتی و ۱۶پرنده سالم با استفاده از محلول ترایزول(YTzol) انجام شد. پس از کنترل کمی و کیفی RNA ، مقدار مساوی از RNAی ۴ پرنده در یک نمونه واحد ادغام شد و بدین ترتیب ۸ نمونه ادغام شده به دست آمد که در دو گروه بیمار و سالم هرکدام در چهار تکرار قرار گرفتند. سپس با استفاده از کیت‌های خاص mRNA ها شکسته و تبدیل به قطعات کوچکتر شده و cDNA تهیه گردید و در نهایت با استفاده از فناوری Illumina hiseq 2500 و به صورت جفت خوانش دو طرفه (Paired-end) توسط شرکت Novogene چین توالی یابی شدند (Malekshahdehi *et al*., 2021).

تجزیه و تحلیل RNA-seq

پس از دریافت نتایج توالی‌یابی ایجاد شده هر نمونه در پژوهش یاد شده (Malekshahdehi *et al*., 2021) ، از نرم افزار FastQC و Trimmomatic ، جهت کنترل کیفیت خوانش‌ها استفاده شد. این آنالیز کیفیت میلیون‌ها خوانش را مورد بررسی قرار می‌دهد. خوانش‌ها از نظر بازهای با اطمینان پایین، اریب در ترتیب نوکلئوتیدها، آداپتورها، محتوایGC ،مضاعف شدگی‌ها و ... مورد بررسی قرار گرفتند.برای همترازی خوانش ها از ژنوم مرجع (Gallus_gallus-7.0) و با استفاده از نرم افزار HISAT2 نسخه۲,۲,۰ استفاده شد. سپس به منظورسرهم بندی رو نوشت ها و هویتیابی خوانشهای همتراز شده از نرمافزار Stringtie استفاده شد. پس از پایان سرهمبندی خوانش‌ها و ایجاد رونوشت‌ها، با استفاده از ابزار Stringtie رونوشت‌های تمام نمونه‌ها ادغام شدند تا مجموعه رونوشتی واحدی ایجاد شود. در ادامه به منظور استخراج ژن‌های رمزکننده و غیررمزکننده از نرم افزار FEELnc نسخه0.2.1 با تنظیمات پیش فرض استفاده گردید. با استفاده از این نرم افزار همه‌ی مراحل فیلتراسیون lncRNA شامل رونوشت‌هایی که تعداد اگزون بیش از یک و طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید را ارزیابی نموده و در نهایت رونوشت‌های رمزکننده و غیررمزکننده مشخص شد. آنالیز بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزاری cuffdiff از بسته‌ی نرم‌افزاری cufflinks صورت پذیرفت. پژوهش‌های متعدد نشان دادند که lncRNA ها بیان ژن مجاور خود را تنظیم می‌کنند(Ørom *et al*., 2010). بر این اساس، با استفاده از کد نویسی در محیط لینوکس ژن‌های هدف بالقوه lncRNAها حداکثرتا فاصله ی ۱۰۰ کیلوبازی بالادست و پایین دست lncRNA و نزدیک‌ترین ژن‌ها به عنوان ژن‌های تنظیم‌شده با lncRNA مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه تجزیه و تحلیل همبستگی پیرسون بین دو گروه ژن‌های رمزکننده و غیررمزکننده براساس میزان تغییر بیان به دست آمد. میزان همبستگی میان lncRNA و ژن رمزکننده حداقل مثبت و منفی ۹۰ درصد در نظر گرفته شد. جهت بررسی ویژگی‌های مسیرهای متابولیکی، ساختاری و عملکردی ژن‌های معنی‌دار از پایگاه اطلاعاتی Enrichr که با دیگر پایگاه نظیرKEGG در ارتباط است استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج توالی یابی RNA در مجموع هشت نمونه ۱۸۷۶۴۰۶۴۲ میلیون خوانش جفتی با اندازه ی ۱۵۰ نوکلئوتیدی تولید نمود، که پس از کنترل کیفیت ۱۸۵۲۵۸۸۱۹ خوانش حاصل شد. محتوایGC بین ۵۳ تا ۵۹ درصد بود (جدول ۱) که نشان دهنده کیفیت خیلی خوب خوانش‌ها و مناسب بودن داده‌ها جهت آنالیزهای بعدی می باشد.

جدول ۱- مشخصات مربوط به خوانش های نقشه یابی شده روی ژنوم مرجع نمونه های سالم و بیمار

Table 1- Summary of raw, processed and mapped reads on reference genomein healthy and diseased samples

نمونه Sample	خوانش خام Raw reads	خوانش فیلتر شده Filtered reads	Concordant Pair alignment (%)	محتوای GC (٪) GC content (%)
Healthy1 سالم۱	21486454	21463928(99.9)	87.07	53
Healthy2 سالم۲	22517021	22516047(99.9)	86.14	54
Healthy3 سالم۳	24469651	24160595(98.7)	85.61	55
Healthy4 سالم۴	23710793	23314277(98.3)	79.93	59
Ascites1 آسیتی ۱	23811191	23396401(98.3)	84.48	56
Ascites2 آسیتی ۲	21514258	21152352(98.3)	83.48	57
Ascites3 آسیتی ۳	24546273	24169849(98.5)	82.47	58
Ascites4 آسیتی ۴	25585001	25085370(98)	83.03	57

در پژوهش حاضر تعداد ۱۱۱۷ ژن نسبت به گروه کنترل، دارای بیان افتراقی بودند. تعداد ۱۴۲۱ رونوشت lncRNAمربوط به ۹۲۱ جایگاه ژنی شناسایی شد. نتایج حاصل از بررسی ژن‌های مجاور lncRNA ها منجر به شناسایی ۱۵۴ ژن هدف شد. سپس به منظور بررسی ویژگی‌های عملکردی و ساختاری ژن‌های شناسایی شده با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Enrichr پنج مسیر عملکردی مشخص شد که در جدول ۲ ارائه شده است. در جدول ۳ ارتباط بینlncRNA ها و ژن‌های رمز شونده‌ی مسیرهای بیولوژی ارائه شده است.

جدول ۲-بررسی مسیر معنی‌دار در پایگاه داده‌های KEGG و ژن‌های معنی‌دار شده بین پرندگان آسیتی و سالم

Table 2- Significant terms of biological process in KEGG pathways between ascetic and helthy chickens

دسته Category	مسیر بیولوژیکی Term	تعداد Count	P-Value	ژن ها Genes
KEGG_PATHWAY	Glycine, serine and threonine metabolism	2	0.02438	DAO,PIPOX
KEGG_PATHWAY	Rap1 signaling pathway	4	0.03883	CDH1,CSF1,CTNND1,LPAR2
KEGG_PATHWAY	Sphingolipid metabolism	2	0.03549	GBA2,CERS5
KEGG_PATHWAY	Phosphatidylinositol signaling system	3	0.0211	PLCD4,DGKA,IMPA2
KEGG_PATHWAY	Mucin type O-glycan biosynthesis	2	0.02	C1GALT1C1,GCNT4

جدول ۳-وضعیت lncRNAها و همبستگی بینlncRNA-mRNA

Table 3- Status of lncRNAs and correlation between lncRNA-mRNA

lncRNA	اسم ژن gene name	همبستگی corelation	جهت direction	نوع type	زیر نوع Subtype	موقعیت location	کروموزوم Chr
MSTRG.12941	C1GALT1C1	0.934228268	antisense	genic	overlapping	exonic	4
MSTRG.17741	GCNT4	0.909414888	antisense	genic	overlapping	intronic	z

MSTRG.16007	PLCD4	0.931989197	antisense	genic	nested	exonic	7
MSTRG.12425	DGKA	0.924312038	antisense	genic	overlapping	exonic	33
MSTRG.7463	IMPA2	0.902809902	antisense	intergenic	convergent	downstream	2
MSTRG.17538	GBA2	0.959604116	antisense	genic	convergent	exonic	z
MSTRG.12268	CERS5	0.929736588	antisense	genic	overlapping	intronic	33
MSTRG.3248	CDH1	0.901992181	antisense	genic	overlapping	exonic	11
MSTRG.9654	CSF1	0.93356217	antisense	genic	nested	exonic	26
MSTRG.14318	CTNND1	0.905277254	antisense	genic	nested	exonic	5
MSTRG.11905	LPAR2	0.916022355	sense	genic	nested	intronic	30
MSTRG.4769	DAO	0.963258526	antisense	genic	nested	exonic	15
MSTRG.6066	PIPOX	0.98713175	antisense	genic	overlapping	exonic	19

بر اساس مطالعات گذشته، مشخص شده است که در دمای سرد به طور قابل توجهی قند خون ناشتای سرم پرندگان آسیتی در هفته ۴ و ۶ افزایش و پروتئین سرم در هفته ۶ آزمایش کاهش می‌یابد، لذا می‌توان نتیجه گرفت که بخش اصلی افزایش قند خون ناشتا از پروتئین‌های سرم، توسط گلوکونئوژنز تولید می‌شود ، این مسیر بیولوژی در کلیه‌ها در جهت تامین گلوکز رخ می‌دهد، و از مواد غیرقندی ازجمله اسکلت کربنی اسیدهای آمینه برای این منظور استفاده می‌شود(Malekshahdehi *et al.*, 2021). مسیر متابولیسم گلایسین، سرین، ترئونین در این پژوهش همانند پژوهش ژو و همکاران (Guo *et al.*, 2023) معنی‌دار شده و ژن D-آمینو اسید اکسیداز (DAO[1]) مربوط به این مسیر زیستی، در سطح مولکولی وظیفه اکسید کردن اسیدهای آمینهD و تولید آمونیاک و پراکسید هیدروژن (H2O2) را دارد این ژن همراه با ژن PIPOX در متابولیسم گلاسین، سرین و ترئونین نقش اساسی به عهده دارند. به طوری که از یک سو اسکلت کربنی اسیدهای آمینه را به متابولیت‌های دیگری مانند اسید پیرویک تبدیل و از آن برای تولید گلوکز از طریق مسیرگلوکونئوژنز استفاده می‌نمایند(Zhang, *et al.*, 2012) از سوی دیگر پراکسید هیدروژن یا گونه‌ی اکسیژن فعال (ROS[2]) را در اثر دآمیناسیون اسیدهای آمینه D اکسیداز (DAO) تولید می نمایند. (Nagano *et al.*, 2019). یکی از دلایل اصلی آسیت را می‌توان به آسیب سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) نسبت داد و جوجه‌های دارای آسیت از استرس اکسیداتیو بالایی رنج می‌برند. نشت الکترون میتوکندری و تولید ROS در طول هیپوکسی و آسیت افزایش می‌یابد(Nemati *et al.*, 2017). همچنین هیپوکسی کلیه، استرس اکسیداتیو را تشدید و استرس اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از حد ROS منجر به التهاب کلیه و فیبروز می‌شود(Honda *et al.*,2019). افزایش بیان ژن‌های DAO و PIPOX در پرندگان آسیتی پژوهش حاضر از یک سو سبب تامین گلوکزو تامین انرژی و از سوی دیگر سبب افزایش ROS و التهاب کلیه می‌شوند.

مسیر سیگنال‌دهی RAP1 همراه با ژن‌های CDH1، CSF1، CTNND1 و LPAR2 مسیر دیگری است که معنی‌دار شده و تمامی ژن‌های این مسیر افزایش بیان داشته‌اند. پروتئین-۱ مرتبط با Ras (Rap1[3]) ، یک GTPase کوچک در خانواده پروتئین‌های مرتبط با Ras، تنظیم‌کننده مهم عملکردهای سلولی مانند، تشکیل و کنترل چسبندگی و اتصالات، مهاجرت، قطبیت و تکثیر و بقا سلولی است. سیگنال‌دهی Rap1 چسبندگی سلولی با واسطه اینتگرین یا کادهرین، تنظیم می-کند(Zhang *et al.*, 2017).

[1] D-amino acid oxidase
[2] Reactive oxygen species
[3]Ras-associated protein 1(Rap1)

ژن CDH1، ای-کادهرین[1] را بیان می‌کند، ای-کادهرین نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیک، از جمله مورفوژنز و بهبود زخم و چسبندگی سلولی وابسته به کلسیم ایفا می‌کند(Balzac *et al.*, 2005)، یکپارچگی سلول های اپی‌تلیال، فرآیند آپوپتوزسلولی، التهاب کلیه(Gao *et al.*, 2018)، ای-کادهرین با چندین مسیر انتقال سیگنال‌دهی در تعامل با RAP1 همراه است. از دست دادن ای-کادهرین نشان دهنده نقص در یکپارچگی و قطبیت اپی‌تلیال در هنگام آسیب بافتی و فیبروز است(Balzac *et al.*, 2005). ایسکمی سبب تخریب ای-کادهرین و آسیب جدی در اپی تلیال مجاری کلیوی می‌شود، تغییرات در بیان ای-کادهرین ممکن است با گلومرولونفریت، آسیب ایسکمیک کلیه مرتبط باشد. بیان ای-کادهرین در کلیه موش‌های صحرایی با انسداد حالب یک‌طرفه افزایش یافت(Docherty *et al.*, 2009). همانند پژوهش حاضر سطوح ای-کادهرین در بیماران نفروپاتی ناشی از دیابت افزایش یافت(Ali *et al.*, 2022).

فاکتور محرک کلنی-۱(CSF-1[2]) توسط سلول‌های اپیتلیال لوله‌های نفرون[3] (TEC) آسیب دیده بیان شده(Menke *et al.*, 2009) و بقا، تکثیر و تمایز ماکروفاژها را کنترل می‌کند. CSF-1 نقش مهمی در رشد اندام‌های پس از تولد و ترمیم کلیه ایفا می‌کند. CSF-1 با مکانیسم وابسته به ماکروفاژها ترمیم لوله‌های نفرون را به دنبال آسیب حاد ایسکمیک کلیوی ترویج و باعث بهبود آسیب مجاری کلیوی و عملکرد کلیه، کاهش فیبروز کلیه، و آپوپتوز توبولی را سرکوب می‌کند(Menke *et al.*,, 2009).گسترش و پلاریزاسیون ماکروفاژها با واسطه CSF-1 ساز وکار مهمی است که بازسازی اپی‌تلیال مجاری کلیوی را واسطه می‌کند و پس از آسیب حاد کلیوی ناشی از آسیب ایسکمی و یا خونرسانی مجدد (IRI)، افزایش اولیه در ماکروفاژهای کلیوی حاصل از مونوسیت‌های التهابی (M1) و به دنبال آن تجمع ماکروفاژهای کلیوی با فنوتیپ ترمیم کننده زخم (M2) مشاهده شد.در مقابل، مهار ژنتیکی CSF- ۱ قطبش M2 را کاهش می‌دهد و بهبودی را مهار می‌کند(Zhang *et al.*, 2012). CSF-1 ترمیم کلیه پس از تولد را در موش‌ها پس از آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد، با به کارگیری ماکروفاژها سبب شده و با جایگزینی سلول‌های اپی‌تلیال لوله‌ای و کاهش فیبروز بینابینی سرعت ترمیم کلیه را تسریع می‌کند. روی‌هم‌رفته، نشان داده شده است که CSF-1 در رشد کلیه و ارتقای ترمیم و رفع آسیب‌های التهابی مهم است(Alikhan *et al.*, 2011).

ژن CTNND1[4]، رمزکننده p120-catenin(P120ctn)، است، P120ctn حوزه‌های سیتوپلاسمی کادهرین‌ها با پروتئین‌هایی به نام کاتنین تعامل دارند. P120ctn به دم سیتوپلاسمی کادهرین‌ها متصل می شوند و نقش مهمی در سازماندهی اسکلت سلولی و تنظیم سیگنال‌دهی سلول ایفا می‌کنند. برای چسبندگی مکانیکی قوی در بافت‌های اپیتلیال ضروری هستند. اتصال p120ctn به ای-کادهرین باعث افزایش پایداری پروتئین و کاهش گردش ای-کادهرین در غشای پلاسمایی می‌شود. داده‌ها نشان می‌دهند که عدم وجود p120ctn در مزانشیم متانفریک منجر به کلیه‌های هیپوپلاستیک با مورفوژنز لوله‌ای و گلومرولی معیوب می‌شود. علاوه‌براین، p120ctn برای ایجاد قطر طبیعی لومن و برای جلوگیری از تشکیل کیست در لوله‌های پروگزیمال مورد نیاز است(Marciano *et al.*, 2011).

گیرنده‌های اسیدلیزوفسفاتیدیک(LPAR[5]) گیرنده‌های اختصاصی جفت شده با پروتئینG هستند که با اسیدلیزوفسفاتیدیک (LPA) پیوندمی‌خورند تا انواع فرآیندهای بیولوژیکی مانند تکثیر سلولی، مهاجرت، تهاجم و تمایز را واسطه کنند(Li *et al.*, 2016). در بسیاری از مدل‌های آسیب حاد و مزمن کلیه، افزایش پاتولوژیک در LPA با فعال کردن سیگنال‌دهی آپوپتوتیک،

[1] E-cadherin
[2] Colony Stimulating Factor 1
[3] Tubular epithelial cell
[4] Catenin Delta 1
[5] Lysophosphatidic Acid Receptor 1

تغییرات غیرطبیعی در معماری سلول‌های اپی‌تلیال مجاری کلیوی را افزایش می‌دهد، سلول‌های ایمنی را به محل آسیب جذب می‌کند و سیگنالدهی پروفیبروتیک را تحریک می‌کند(Zhang *et al.*, 2017). تغییرات در بیان و فعال سازیLPAR2 مسیرهای سیگنالینگ را در پایین دست این گیرنده تحریک و سبب فیبروز می‌شود(Reddy *et al.*, 2021).

اسفنگولیپیدها و متابولیت‌های آن‌ها خصوصا سرامیدها و اسفنگوزین در سیگنال‌دهی سلولی، تنظیم بقای سلولی، رشد، تکثیر، تمایز و پاسخ‌های سلولی به التهاب با عمل به عنوان واسطه‌های سیگنال‌دهی سلولی نقش دارند. متابولیسم غیرطبیعی لیپیدها، نقش مهمی در پاتوژنز و پیشرفت اختلالات کلیوی و نفروپاتی دیابتی ایفا می‌کند(Yokota *et al.*, 2021). یکی از مسیرهایی که در بیماری آسیت معنی‌دار شده است مسیر زیستی متابولیسم اسفنگولیپید و ژن‌هایGBA2 و CERS5 مرتبط با آن است که افزایش بیان داشته اند.

سرامید، یک واسطه کلیدی در متابولیسم اسفنگولیپید است که نقش مهمی در تنظیم رفتار سلولی رشد سلولی، تمایز و آپوپتوز ایفا می‌کنند. CERS5 به دلیل توانایی آن در سنتز C16-ceramide، اغلب به عنوان یک سرامید پروآپوپتوز مهم در نظرگرفته می‌شود. سنتزde novo سرامید یک محرک مهم برای فعال شدنBax در شرایط هیپوکسی و یا اکسیژن رسانی مجدد می‌باشد. بیان CERS5 نیز به دنبال هیپوکسی و یا اکسیژن‌رسانی مجدد افزایش یافته و نشان می‌دهد که CerS5 ممکن است در ارتقاء تنظیم سرامید در این شرایط که منجر به آپوپتوز می‌شود، مهم باشد(Jin *et al.*, 2008; Levy and Futerman, 2010).

ژن[1]GBA2 آنزیم بتا–گلوکوزیداز ۲ را کد می‌کند که گلوکوزیل‌سرامید را تجزیه و به گلوکز و سرامید تبدیل می‌کند. گلوکوزیل-سرامید (GlcCer) یک گلیکواسفنگولیپید یوکاریوتی (GSL) است که در سطح سیتوپلاسمی غشای سلولی و روی سطح سلول وجود دارد سطوح کلیوی گلوکوزیل‌سرامید در بیماران مبتلا به نفروپاتی دیابتی، بیماری کلیه پلی‌کیستیک، کارسینوم سلول کلیه، نفریتلوپوس و در کاهش عملکرد کلیه، افزایش می‌یابد. بیانGBA2 منجر به کاهش گلوکوزیل‌سرامید و افزایش سطوح سرامید می‌شود، سطح فعالیت GBA2 یکی از عوامل تعیین‌کننده سطوح سرامید است، و نشان می‌دهد که GBA2 ممکن است برای سیگنال‌دهی آپوپتوز با توجه به تولید سرامید که به عنوان یک ابلاغ کننده مرگ برنامه ریزی شده در سلول است مرتبط باشد(Yokota *et al.*, 2021).

فسفاتیدیل‌اینوزیتول یکی از معدود لیپیدهایی است که به وضوح به عنوان پیش‌ساز مولکول‌های سیگنال‌دهی متعدد عمل می‌کند(Balla *et al.*, 2009). پروتئینG ، PLC[2]ها، Ca^{2+} عوامل موثر مسیر سیگنال‌دهی فسفاتیدیل‌اینوزیتول را تشکیل می‌دهند. هورمون‌ها، انتقال‌دهنده‌های عصبی و سایر مولکول‌های سیگنال،می‌توانند به گیرنده‌های سیستم سیگنال‌دهی فسفاتیدیل‌اینوزیتول متصل شوند و آبشارهای پیام‌رسانی بعدی را تحریک کنند و انواع عملکردهای سلولی از جمله التهاب، متابولیسم، آپوپتوز، و پاسخ ایمنی را کنترل می‌کنند(Zhang 2021). ژن های موثر در این مسیر زیستی عبارتند از PLCD4، DGKA، IMPA2 که افزایش بیان داشته‌اند.

دی‌آسیل‌گلیسرول‌کیناز‌آلفا(DGKα) آنزیمی است که توسط ژن DGKA[3] کدگذاری می‌شود. نقش مهمی در سنتز مجدد فسفاتیدیل‌اینوزیتول‌ها و فسفریله کردن دی‌آسیل‌گلیسرول(DG[4]) به اسیدفسفاتیدیک(PA[5]) دارد.گزارش شده است که

[1] Glucosylceramidase Beta 2
[2] Phosphoinositide-specific phospholipase C
[3] Diacylglycerol Kinase Alpha
[4] Diacylglycerol
[5] Phosphatidic acid

DGKA در پاسخ ایمنی، سیگنال‌دهی لیپید، تولید اگزوزوموم، مهاجرت و همچنین تکثیر سلولی همه فرآیندهایی که به عنوان مراحل حیاتی در فیبروژنز پیشنهاد می‌شوند، شرکت می‌کند. نسبت DG/PA برای حفظ هموستاز سلولی مهم است که توسط این آنزیم فراهم می‌شود، در سلول‌های سرطانی، PA تولید شده توسط DGKα نقش مهمی در آنتی‌آپوپتوز دارد(Sakane *et al.*, 2021). DGKα با فعال کردن سیگنال‌دهی PA، نفروپاتی دیابتی را بهبود می‌بخشد. نفروپاتی دیابتی (DN[1]) در اثر فعال شدن غیرطبیعی پروتئین کیناز C (PKC) در نتیجه افزایش تولید دی‌آسیل‌گلیسرول در هیپرگلیسمی دیابتی ایجاد می‌شود. انتظار می‌رود DGK فعالیت PKC را با کاهش مقداردی‌آسیل‌گلیسرول کاهش دهد و می‌تواند فعالیت غیرطبیعی PKC را در طول هیپرگلیسمی طبیعی کند. DGKα با تنظیم مورفولوژی پودوسیت و با جلوگیری از دست رفتن سلول‌های پودوسیت در بهبود DN نقش دارد (Hayashi *et al.*, 2017).

ژن PLCD4، فسفولیپاز Cدلتا(PLCδ) را کد می‌کند که ممکن است در فرآیندهای تکثیر و تمایز سلولی در ارتباط باشد(Kunrath-Lima *et al.*, 2018). تحت کنترل گیرنده‌های سطح سلولی، این آنزیم فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۴،۵–بیس فسفات(PtdIns(4,5)P2[2]) را هیدرولیز و دو محصول درون سلولی اینوزیتول ۱،۴،۵–تری فسفات (InsP3[3]) که سبب افزایش غلظت پیامبر ثانویه کلسیم(Ca^{2+}) و دی‌آسیل‌گلیسرول (DG) به عنوان فعال کننده پروتئین کیناز C (PKC) تولید می کنند(Rebecchi and Pentyala, 2000). کلیه اندام مهمی برای حفظ هموستاز Ca^{2+} در بدن است. در طول پیشرفت بیماری کلیوی، سیگنالینگ Ca^{2+} نقش کلیدی در فعالیت‌های سلولی مختلف مانند نکروز، آپوپتوز، اریپتوز و اتوفاژی ایفا می‌کند. اختلال در هموستاز Ca^{2+} باعث یکسری بیماری‌های کلیوی، مانند آسیب حاد کلیه (AKI)، بیماری مزمن کلیه (CKD)،آسیب ایسکمی کلیوی و یا خون رسانی مجدد (I/R)، بیماری کلیه پلی‌کیستیک اتوزومال غالب (ADPKD)، پودوسیت و پاتیونفروپاتی دیابتی می‌شود. افزایش سطح سیتوزولی $Ca2^{+}$ ممکن است آپوپتوز را تشدید کند و به آسیب کلیه کمک کند. انتشار پایدار Ca^{2+} ER باعث استرس ER و استرس اکسیداتیومی‌شود و منجر به آپوپتوز در سلول‌های مزانژیال گلومرولی می‌شود که به پیشرفت CKD کمک می‌کند(Ning *et al.*, 2021).

ژن IMPA2[4]، آنزیم میو–اینوزیتول‌مونوفسفاتاز۲[5]را در سلول‌های اپی‌تلیوم لوله‌های پیچیده دیستال کلیه بیان می-کند(Ohnishi *et al.*, 2007). میو-اینوزیتول‌مونوفسفاتاز۲ آنزیمی است که میو-اینوزیتول‌مونوفسفات را دفسفریله می‌کند و میو-اینوزیتول آزاد تولید می‌کند(Lin *et al.*, 2019).این مسیر آنزیمی در عملکردهای سلولی مهم است زیرا میو-اینوزیتول پیش‌ساز فسفولیپید غشایی، فسفاتیدیل‌اینوزیتول (PI[6])است(Arai *et al.*, 2007). یکی از منابع میو-اینوزیتول در سلول، اینوزیتول ۱،۴،۵–تری فسفات (InsP3) است که InsP3 تبدیل به اینوزیتول‌منوفسفات شده و در نهایت با کمک میو-اینوزیتول مونوفسفاتاز۲ تبدیل به میو-اینوزیتول می‌شوند(Ohnishi *et al.*, 2013). InsP3 باعث آزادسازی Ca^{2+} از ذخایر درون سلولی شده (Ohnishi *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2019), سبب تغییرات در هموستازکلسیم می‌شود(Ablimit *et al.*, 2022) همان طور که اشاره شد یون‌های Ca2 می‌توانند آپوپتوز را فعال کنند و با تاثیر آنزیم میو-اینوزیتول مونوفسفاتاز ۲ و تبدیل InsP3 به میو-اینوزیتول سبب کاهش کلسیم درون سلولی و مهار مرگ سلول می‌شود اکثر مطالعات نشان دادندکه مهار

[1]Diabetic nephropathy
[2] Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
[3] Inositol 1,4,5-trisphosphate
[4]Inositol Monophosphatase 2
[5] Myo-inositol Monophosphatase 2
[6]Phosphatidylinositol

IMPA2 ممکن است باعث تجمعInsP3 و یا کاهش میو-اینوزیتول شود که باعث القای آپوپتوز می‌شود(Ning *et al.*, 2021).

O–گلیکوزیلاسیون پروتئین،یک تغییر پس از ترجمه است (Bergstrom and Xia, 2013). O–گلیکان‌ها در تنظیم بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی از جمله چسبندگی، آپوپتوز، سیگنال‌دهی سلول، عملکردهای مشخص در سیستم‌های هموستاتیک نقش دارند (Wandall *et al.*, 2021). نشان داده شده است که اختلال در گلیکوزیلاسیون مرتبط با نوع موسین[1] باعث اختلال در عملکرد کلیه می‌شود(Stotter *et al.*, 2020). در این مسیر زیستی ژن‌هایC1GALT1C1 وGCNT4 معنی‌دار شده‌اند.

آنزیم بتا۱،۳–گالاکتوزیل‌ترانسفراز، منتج از ژن C1GALT1 آنزیمی است که ساختار هسته۱، O–گلیکان را سنتز می‌کند و در عین‌حال C1GALT1 برای فعالیت خود به COSMC محصول ژن C1GALT1C1، به عنوان چپرون مولکولی[2] خاص برای تاخوردگی، پایداری و فعالیت کامل خود نیاز دارد(Suzuki *et al.*, 2022). ناک‌اوتC1GALT1C1 باعث رشد نامنظم و التهاب کلیه می‌شود. موش‌هایی که در آن‌ها COSMC-knockout اتفاق افتاد به دلیل کاهش هسته ۱، O–گلیکان‌ها، اختلال عملکرد کلیوی را نشان دادند (Suzuki *et al.*, 2022). C2GnT3 (GCNT4) گلیکان‌های هسته۱ را به هسته۲ تبدیل می‌کنند (Wandall *et al.*, 2021). سلول‌های لوله های پروگزیمال (PT[3]) دارای یک غشای لبه مسواکی مانند (BBM[4]) هستند که حاوی گلیکوپروتئین‌های متعددی است که به حفظ هموستازی کمک می‌کنند و اغلب در بیماری کلیوی مختل می‌شوند. در مطالعه‌ای، O–گلیکان‌های موجود در BBM موش که دچار بیماری کلیوی بوده ، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که اختلالات PT به اختلال عملکرد بیماری مزمن کلیه کمک می‌کند و بسیاری از عملکردهای گلیکوپروتئین بهN – و O–گلیکان آن‌ها نسبت داده شده است(Yu *et al.*, 2021). O–گلیکان‌ها در حفظ یکپارچگی منافذ شکاف پودوسیت و فیلتراسیون گلومرولی نقش بسیار مهم دارند (Ravidà *et al.*, 2015). با تجزیه و تحلیل اجزای سد فیلتراسیون گلومرولی مشخص شده است که از دست دادن O–گلیکان‌ها منجر به تغییر فرآیندهای پودوسیتی‌شود، موش‌های دارای کمبود O–گلیکان پروتئینوری خودبه‌خود و گلومرولواسکلروز به سرعت در حال پیشرفت را نشان می‌دهند. این نتایج عملکرد جدیدی از O–گلیکان‌ها را در هموستاز گلومرول نشان می‌دهد(Song *et al.* 2017). همچنین مشخص شده است که حیوانات با پودوسیت‌های COSMC-Null دچار آلبومینوری، اسکلروز گلومرولی و نارسایی کلیه می‌شوند که منجر به مرگ زودرس می‌شود (Stotter *et al.*, 2020).

C1GALT1C1 درسلول‌های ترشح‌کننده IgA1 ، سلول‌های خونی، دستگاه گوارش، کلیه‌هاو ریه‌ها بیان می‌شود(Kiryluk et al., 2017). بتا۱،۳–گالاکتوزیل‌ترانسفراز۱ به همراه، COSMC، نقش مهمی درگلیکوزیلاسیون مولکولIgA1 دارند(Li et al., 2007) I gA1 فاقد گالاکتوز (Gd-IgA1) یکی از ویژگی‌های اصلی بیماری نفروپاتی IgA (IgAN[5]) است که شایع‌ترین شکل گلومرولونفریت است و ارتباط بسیار معنی‌داری بین بیان C1GALT1C1 و O-گلیکوزیلاسیون IgAN مشاهده شده است(Xie et al., 2010). کاهش بیانC1GALT1C1 سبب افزایش تولیدGd-I gA1 و ایجاد IgAN می‌شود. در NIgA، پاسخ التهابی مشاهده می‌شوند(Kiryluk et al., 2017). تعادل بین تقاضا و بیوسنتز O– گلیکوزیلاسیون مهم است و از

[1] Mucin type O-glycan biosynthesis
[2]Molecular chaperone
[3] Proximal tubule
[4] Brush border membrane
[5] Immunoglobulin A Nephropathy

آن‌جا که بیوسنتزO-گلیکوزیلاسیون IgA1 به بتا۱،۳–گالاکتوزیل‌ترانسفراز و همراه با آن بیان مناسب C1GALT1C1 نیاز است، لذا به منظور جلوگیری از O–گلیکوزیلاسیون نابجای IgA1 در بیماران مبتلا به IgAN، بیان C1GALT1C1 افزایش می‌یابد و سبب بهبود O-گلیکوزیلاسیون IgA1 شده و از افزایش IgAN جلوگیری نماید (Xie et al., 2010). لذا به منظور حفظ عملکرد، هموستازی، کارکرد فیلتراسیون گلومرولی کلیه، در پرندگان آسیتی افزایش بیان C1GALT1C1 و GCNT4 منطقی به نظر می‌رسد.

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه تعداد 1421 رونوشت lncRNA مربوط به ۹۲۱ جایگاه ژنی و ۱۵۴ ژن هدف مربوط به آن در مقایسه‌ی بین پرندگان آسیتی و سالم شناسایی شد و پنج مسیر زیستی و ۱۳ ژن مربوط به آن‌ها را به طور معنی‌داری درگیر نموده است. این مسیرها در شرایط هیپوکسی که در اثر آسیت عارض می‌شوند به عنوان تعدیل‌کننده آسیب فعال می‌شوند. علاوه برآن انرژی مورد نیاز را تامین و هموستازی کلیه‌ها در پاسخ به تنش اکسیژن ناشی از آسیت را برقرار می‌کنند، از سوی دیگر بقای سلول، افزایش تکثیر و ضدآپوپتوز عمل می‌کنند که این خود از یک سو سبب کاهش آسیب کلیوی و از سوی دیگر سبب عملکرد بهترآن شده و از این طریق در کاهش عوارض ناشی از آسیب آسیتی کلیه و کمبود اکسیژن بافتی عمل می‌نمایند. نتایج ما بینش جدیدی در مورد عملکرد lncRNA ها در آسیت از طریق ژن های هم جوار ارائه کرد که با بررسی بیشتر این ژن‌ها می توان در جهت کنترل این بیماری اقدام نمود و همچنین یافته های این پژوهش می تواند در اصلاح نژاد پرنده های گوشتی با بکار گیریlncRNAها و ژن های مرتبط با آن در تهیه ی مارکرهای ژنتیکی و یا بیومارکرهای تشخیصی استفاده شود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد، گرنت شماره ۳/۴۶۹۴۳ انجام شد.

References

1. Ablimit, T., Tursun, G., Zhang, Y., Abduxkur, G., Abdurexit, G., & Abliz, G. (2022). Inositol monophosphatase 2 promotes epithelial ovarian cancer cell proliferation and migration by regulating the AKT/mTOR signaling pathway. *Experimental and TherapeuticMedicine*, *24*(5), 1-8.
2. Adetula, A. A., Gu, L., Nwafor, C. C., Du, X., Zhao, S., & Li, S. (2018). Transcriptome sequencing reveals key potential long non-coding RNAs related to duration of fertility trait in the uterovaginal junction of egg-laying hens. *Scientific reports*, *8*(1), 13185.
3. Ali, H., Abu-Farha, M., Hammad, M. M., Devarajan, S., Bahbahani, Y., Al-Khairi, I.,Al-Mulla, F. (2022). Potential Role of N-Cadherin in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Nephropathy. *Frontiers in Endocrinology*, *13*.۸۸۲۷۰۰ ,
4. Alikhan, M. A., Jones, C. V., Williams, T. M., Beckhouse, A. G., Fletcher, A. L., Kett, M. M., Deane, J. A. (2011). Colony-stimulating factor-1 promotes kidney growth and repair via alteration of macrophage responses. *The American journalof pathology*, *179*(3), 1243-1256.
5. Arai, R., Ito, K., Ohnishi, T., Ohba, H., Akasaka, R., Bessho, Y.,Yokoyama, S. (2007). Crystal structure of human myo-inositol monophosphatase 2, the product of the putative susceptibility gene for bipolar disorder, schizophrenia, and febrile seizures. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *67*(3), 732-742.

6. Balla, T., Szentpetery, Z., & Kim, Y. J. (2009). Phosphoinositide signaling: new tools and insights. *Physiology*.
7. Balzac, F., Avolio, M., Degani, S,. Kaverina, I., Torti, M., Silengo, L., Retta, S. F. (2005). E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function. *Journal of cell science, 118*(20), 4765-4783.
8. Bergstrom, K. S., & Xia, L. (2013). Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis. *Glycobiology, 23*(9), 1026-1037.
9. Chinwalla, A. T., Cook, L. L., Delehaunty, K. D., Fewell, G. A., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Members of the Mouse GenomeAnalysis, G. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature, 420*(6915), 520-562. doi:10.1038/nature01262
10. Cowen, B., Rothenbacher, H., Schwartz, L., Braune, M., & Owen, R. (1988). A case of acute pulmonary edema, splenomegaly, and ascites in Guinea fowl. *Avian Diseases*, 151-156.
11. Docherty, N. G., Calvo, I. F., Quinlan, M. R., Pérez-Barriocanal, F., McGuire, B. B., Fitzpatrick, J. M., & Watson, R. W. G. (2009). Increased E-cadherin expression in the ligated kidney followingunilateral ureteric obstruction. *Kidney international, 75*(2), 205-213.
12. Gao, L., Liu, M.-M., Zang, H.-m., Ma, Q.-Y., Yang, Q., Jiang, L., Wang, J.-n. (2018). Restoration of E-cadherin by PPBICA protects against cisplatin-induced acute kidney injuryby attenuating inflammation and programmed cell death. *Laboratory Investigation, 98*(7), 911-923.
13. Guo, D., Zhang, J., Han, Y., Cui, L., Wang, H., Wang, K.,Duan, Z. (2023). Transcriptomic Study on the Lungs of Broilers with Ascites Syndrome. *Animals, 13*(1), 175.
14. Gupta, A. (2011). Ascites syndrome in poultry: a review. *World's poultry science journal, 67*(3), 457-468.
15. Hasanpur, K., Nassiri, M., & Hosseini Salekdeh, G. (2019). The comparative analysis of phenotypic and whole transcriptome gene expression data of ascites susceptible versus ascites resistant chickens. *Molecular biology reports, 46*, 793-804.
16. Hayashi, D., Yagi, K., Song, C., Ueda, S., Yamanoue, M., Topham, M., Shirai, Y. (2017). Diacylglycerol kinase alpha is involved in the vitamin E-induced amelioration of diabetic nephropathy in mice. *Scientific reports, 7*(1), 2597.
17. Honda, T., Hirakawa, Y., & Nangaku, M. (2019). The role of oxidative stress and hypoxia in renal disease. *Kidney Research and Clinical Practice, 38*(4), 414.
18. Hu, X., Chen, S., Jia, C., Xue, S., Dou, C., Dai, Z., Cui, H. (2018). Gene expression profile and long non-coding RNA analysis, using RNA-Seq, in chicken embryonic fibroblast cells infected by avian leukosis virus J. *Archives of virology, 163*, 639-647.
19. Jin, J., Hou, Q., Mullen, T. D., Zeidan, Y. H., Bielawski, J., Kraveka, J. M.,Hsu, Y.-T. (2008). Ceramide generated by sphingomyelin hydrolysis and the salvage pathway is involved in hypoxia/reoxygenation-induced Bax redistribution to mitochondriain NT-2 cells. *Journal of Biological Chemistry, 283*(39), 26509-26517.
20. Kiryluk, K., Li, Y., Moldoveanu, Z., Suzuki, H., Reily, C., Hou, P., Fischman, C. (2017). GWAS for serum galactose-deficient IgA1 implicates critical genes of the O-glycosylation pathway. *PLoS genetics, 13*(2), e1006609.
21. Kosinska-Selbi, B., Mielczarek, M., & Szyda, J. (2020). Long non-coding RNA in livestock. *Animal, 14,*2013-2003,(10).

22. Kunrath-Lima, M., de Miranda, M. C., da Fonseca Ferreira, A., Faraco, C. C. F., de Melo, M. I. A., Goes, A. M.,Gomes, D. A. (2018). Phospholipase C delta 4 (PLCδ4) is a nuclear protein involved in cell proliferation and senescence in mesenchymal stromalstem cells. *Cellular signalling, 49*, 59-67.
23. Lee, K. P., Anthony, N. B., Orlowski, S. K., & Rhoads, D. D. (2022). SNP-based breeding for broiler resistance to ascites and evaluation of correlated production traits. *Hereditas, 159*(1), 1-15.
24. Levy, M., & Futerman, A. H. (2010). Mammalian ceramide synthases. *IUBMB life, 62*(5), 347-356.
25. Li, D., Li, F., Jiang, K., Zhang, M., Han, R., Jiang, R.,Kang, X. (2019). Integrative analysis of long noncoding RNA and mRNA reveals candidate lncRNAs responsible formeat quality at different physiological stages in Gushi chicken. *PloS one, 14*(4), e0215006.
26. Li, G.-S., Zhang, H., Lv, J.-C., Shen, Y., & Wang, H.-Y. (2007). Variants of C1GALT1 gene are associated with the genetic susceptibility to IgA nephropathy. *Kidney international, 71*(5), 448-453.
27. Li, M., Xiao, D., Zhang, J., Qu, H., Yang, Y., Yan, Y., Wang, J. (2016). Expression of LPA2 is associated with poor prognosis in human breast cancer and regulates HIF-1α expression and breast cancer cell growth. *Oncology Reports, 36*(6), 3479-3487.
28. Lin, Y.-F., Chou, J.-L., Chang, J.-S., Chiu, I.-J., Chiu, H.-W., & Lin, Y.-F. (2019). Dysregulation of the miR-25-IMPA2 axis promotes metastatic progression in clear cell renal cell carcinoma. *EBioMedicine, 45*, 220-230.
29. Liu, Y., Sun, Y., Li, Y., Bai, H., Xue, F., Xu, S., Chen, J. (2017). Analyses of long non-coding RNA and mRNA profiling using RNA sequencing in chicken testis with extreme sperm motility. *Scientific reports, 7*(1), 1-8.
30. Lorenzen, J. M., Haller, H., & Thum, T. (2011). MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology, 7*(5)286–294doi:10.1038/nrneph.2011.26
31. Lorenzen, J. M., & Thum, T. (2016). Long noncoding RNAs in kidney and cardiovascular diseases. *Nature Reviews Nephrology, 12*(6), 360-373.
32. Malekshahdehi, S., Hafezian, S., Rahimi-Mianji, G., & Hasanpur, K. (2021). Investigation of gender differences in the incidence of ascites and profile of gene expression in kidney tissue of broiler chickens. *Animal Production Research, 10*(3), 33-44.
33. Marciano, D. K., Brakeman, P. R., Lee, C.-Z., Spivak, N., Eastburn, D. J., Bryant, D. M., Reichardt, L. F. (2011). p120 catenin is required for normal renal tubulogenesis and glomerulogenesis. *Development, 138*(10), 2099-2109.
34. Menke, J., Iwata, Y., Rabacal, W. A., Basu, R., Yeung, Y. G., Humphreys, B. D., Kelley, V. R. (20.(٠٩ CSF-1 signals directly to renal tubular epithelial cells to mediate repair in mice. *The Journal of clinical investigation, 119*(8), 2330-2342.
35. Nagano, T., Yamao, S., Terachi, A., Yarimizu, H., Itoh, H., Katasho, R., Kikkawa, U. (2019). D-aminoacid oxidase promotes cellular senescence via the production of reactive oxygen species. *Life Science Alliance, 2*(1).
36. Nemati, M., Shahir, M., Harakinezhad, M., & Lotfalhian, H. (2017). Cold-induced ascites in broilers: effects of vitamin C and coenzyme Q.١٠ *Brazilian Journal of Poultry Science, 19*, 537-544.
37. Ning, B., Guo, C., Kong, A., Li, K., Xie, Y., Shi, H., & Gu, J. (2021). Calcium signaling mediates cell death and crosstalk with autophagy in kidney disease. *Cells, 10*(11), 3204.

38. Ohnishi, T., Ohba, H., Seo, K.-C., Im, J., Sato, Y., Iwayama, Y., Yoshikawa, T. (2007). Spatial expression patterns and biochemical properties distinguish a second myo-inositol monophosphatase IMPA2 from IMPA1. *Journal of Biological Chemistry, 282*(1), 637-646.
39. Ohnishi, T., Tanizawa, Y., Watanabe, A., Nakamura, T., Ohba, H., Hirata, H., Watanabe, K. (2013). Human myo-inositol monophosphatase 2 rescues the nematode thermotaxis mutant ttx-7 more efficiently than IMPA 1: functional and evolutionary considerations of the two mammalian myo-inositol monophosphatase genes. *Journal of Neurochemistry, 124*(5), 685-694.
40. Ørom, U. A., Derrien, T., Beringer, M., Gumireddy, K., Gardini, A., Bussotti, G., Shiekhattar, R. (2010). Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell, 143*(1), 46-58. doi:10.1016/j.cell.2010.09.001
41. Peng, Y., Chang, L., Wang, Y., Wang, R., Hu, L., Zhao, Z., Li, J. (2019). Genome-wide differential expression of long noncoding RNAs and mRNAs in ovarian follicles of two different chicken breeds. *Genomics, 111*(6), 1395-1403.
42. Ravidà, A., Musante, L., Kreivi, M., Miinalainen, I., Byrne, B., Saraswat, M., Holthofer, H. (2015). Glycosylation patterns of kidney proteins differ in rat diabetic nephropathy. *Kidney international, 87*(5), 963-974.
43. Rebecchi, M. J., & Pentyala, S. N. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiological reviews, 80*(4), 1291-1335.
44. Reddy, M. A., & Natarajan, R. (2021). Cooperative activation of divergent pathways by LPAR1 and LPAR2 receptors in fibrotic signaling. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 320(3), F322-f324. doi:10.1152/ajprenal.00685.2020
45. Ren, T., Li, Z., Zhou, Y., Liu, X., Han, R., Wang, Y., Kang, X. (2018). Sequencing and characterization of lncRNAs in the breast muscle of Gushi and Arbor Acres chickens. *Genome, 61*(5), 337-347.
46. Ronco, C., McCullough, P., Anker, S.D., Anand, I., Aspromonte, N., Bagshaw, S.M., Bellomo, R., Berl, T., Bobek, I., Cruz,D.N, (2010). Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative. European heart journal 31(6): 703-711.
47. Sakane, F., Hoshino, F., Ebina, M., Sakai, H., & Takahashi, D. (2021). The roles of diacylglycerol kinase α in cancer cell proliferation and apoptosis. *Cancers, 13*.٥١٩٠ ,(٢٠)
48. Shi, S., Shen, Y., Zhang, S., Zhao, Z., Hou, Z., Zhou, H., Guo, Y. (2017). Combinatory evaluation of transcriptome and metabolome profiles of low temperature-induced resistant ascites syndrome in broiler chickens. *Scientific reports, 7*(1), 1.١٦-
49. Song, K., Fu, J., Song, J., Herzog, B. H., Bergstrom, K., Kondo, Y., Lupu, F. (2017). Loss of mucin-type O-glycans impairs the integrity of the glomerular filtration barrier in the mouse kidney. *Journal of Biological Chemistry, 292*(40), 16491–16497.
50. Stotter, B. R., Talbot, B. E., Capen, D. E., Artelt, N., Zeng, J., Matsumoto, Y., Schlondorff, J. S. (2020). Cosmc-dependent mucin-type O-linked glycosylation is essential for podocyte function. *American Journal of Physiology-Renal Physiology, 318*(2), F518-F530.
51. Suzuki, R., Nakamura, Y., Koiwai, R., Fuseya, S., Murakami, Y., Hagiwara, K., Kudo, T. (2022). global loss of core 1-derived o-glycans in mice leads to high mortality due to acute kidney failure and gastric ulcers. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(3), 1273.
52. Taghizadeh, V., Nassiri, M.R., Tahmoorespur, M., Bakhtiarizadeh, M.R. Javadmanesh,A. (2018). Gene expression network analysis on angiogenesis pathway in low temperature-

induced ascites susceptible chickens in B-line pedigree of Iranian meat-type strain, Arian. *Iranian Journal of Animal Science Research*,10(2),p 249-p262
53. Wandall, H. H., Nielsen, M. A., King-Smith, S., de Haan, N., & Bagdonaite, I. (2021). Global functions of O-glycosylation: promises and challenges in O-glycobiology. *The FEBS Journal, 288*(24), 7183-7212.
54. Xiao, Y., Hu, J., & Yin, W. (2018). Systematic identification of non-coding RNAs. *Non-coding RNAs in Complex Diseases: A Bioinformatics Perspective*, 9-18.
55. Xie, L.-S., Qin, W., Fan, J.-M., Huang, J., Xie, X.-S., & Li, Z. (2010). The role of C1GALT1C1 in lipopolysaccharide-induced IgA1 aberrant O-glycosylation in IgA nephropathy. *Clinical and Investigative Medicine*, E5-E13.
56. Yin, Z., Lian, L., Zhu, F., Zhang, Z. H., Hincke, M., Yang, N., & Hou, Z. C. (2020). The transcriptome landscapes of ovary and three oviduct segments during chicken (Gallus gallus) egg formation. *Genomics, 112*(1), 243-251. doi:10.1016/j.ygeno.2019.02.003
57. Yokota, R., Bhunu, B., Toba, H., & Intapad, S. (2021). Sphingolipids and kidney disease: possible role of preeclampsia and intrauterinegrowth restriction (IUGR). *Kidney360, 2*(3), 534.
58. Yu, A., Zhao, J., Zhong, J., Wang, J., Yadav, S. P. S., Molitoris, B. A., Mechref, Y. (2021). Altered O-glycomes of renal brush-border membrane in model rats with chronic kidney diseases. *Biomolecules, 11*(11), 1560.
59. Zhang, M.-Z, Yao, B., Yang, S., Jiang, L., Wang, S., Fan, X., Chen, J. (2012a). CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury. *The Journal of clinical investigation, 122*(12), 4519-4532.
60. Zhang, T., Zhang, X., Han, K,. Zhang, G., Wang, J., Xie, K., Fan, X. (2017). Analysis of long noncoding RNA and mRNA using RNA sequencing during the differentiation of intramuscular preadipocytes in chicken. *PloS one, 12*(2), e0172389.
61. Zhang , X. (2021). A Brief Note on Phosphatidylinositol (PI) Signal Pathway. *Journal of Cell Signaling, 6*(11), 1.
62. Zhang, Yi.-L., Wang, R.-C., Cheng, K., Ring, B. Z., & Su, L. (2017). Roles of Rap1 signaling in tumor cell migration and invasion. *Cancer biology & medicine, 14*(1), 90.
63. Zhang, Y., Baker, S. S., Baker, R. D., Zhu, R., & Zhu, L. (2012). Systematic analysis of the gene expression in the livers of nonalcoholic steatohepatitis: implications on potential biomarkers and molecular pathological mechanism. *PloS one, 7*(12), e51131.
64. Zhang, Y,. Su, W., Zhang, B., Ling, Y., Kim, W. K., & Zhang, H. (2021). Comprehensive analysis of coding and non-coding RNA transcriptomes related to hypoxic adaptation in Tibetan chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology, 12*, 1-14.