

Research Article

Vol. 18, No.1, 2026, p. 137-149



Transcriptomic Analysis of Broiler Chicken Liver in Response to LPS with Emphasis on Endogenous Anti-inflammatory Peptides

Maryam Moshiri¹, Mojtaba Tahmoores pour^{1*}, Mohammad Hadi Sekhavati¹

1- Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

*Corresponding Author's Email: tahmoores@um.ac.ir**How to cite this article:**

Received: 18-08-2025

Revised: 05-10-2025

Accepted: 11-10-2025

Available Online: 04-04-2026

Moshiri, M. Tahmoores pour, M. & Sekhavati, M. H (2026). Transcriptomic analysis of broiler chicken liver in response to LPS with emphasis on endogenous anti-inflammatory peptides. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 18(1), 137-149. (in Persian with English abstract).<http://doi.org/10.22067/IJASR.2025.94631.1264>

Introduction: The growing prevalence of antibiotic resistance in the poultry industry has created a critical demand for safe, effective, and natural alternatives to conventional antimicrobials. Antimicrobial peptides (AMPs) are key components of the innate immune system, functioning as the first line of defense against invading pathogens. These molecules possess broad-spectrum activity against bacteria, viruses, and fungi, while also modulating immune responses. Consequently, they are considered promising alternatives to antibiotics in poultry production. Understanding the transcriptional regulation of AMPs in response to immune challenges is essential for evaluating their potential application. Lipopolysaccharide (LPS), a component of Gram-negative bacterial cell walls, is widely used as an immune stimulant because it activates inflammatory pathways via pattern recognition receptors (PRRs). Studying LPS-induced immune responses provides valuable insights into host defense mechanisms even in the absence of active infection. This study aimed to investigate the transcriptomic response of the liver of broiler chickens (*Gallus gallus*) to LPS stimulation, with a particular focus on the expression of AMP-related genes. By identifying differentially expressed genes (DEGs), enriched pathways, and regulatory factors, we sought to provide a comprehensive overview of how AMPs are transcriptionally and post-transcriptionally modulated under inflammatory stress.

Materials and Methods: RNA-seq data were obtained from an experiment in which broiler chickens were injected intraperitoneally with 1 mg/kg of LPS derived from *Escherichia coli*. Control animals received no treatment. Liver samples were collected 24 h post-injection to capture acute immune responses. Total RNA was extracted and sequenced using Illumina sequencing platform, producing high-quality paired-end reads. The raw reads underwent quality control (QC) steps to remove low-quality bases and adapters. Clean reads were then aligned to the *Gallus gallus* reference genome (version Galgal7) to ensure accurate transcript alignment. Gene expression levels were quantified, and differential expression analysis was performed between LPS-treated and control groups. DEGs were identified using adjusted p-values and |log2 fold change| thresholds. Functional enrichment analysis was conducted using Gene Ontology (GO) categories and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways. Additionally, transcription factors (TFs) and microRNAs (miRNAs) predicted to regulate DEGs were analyzed to reveal upstream and post-transcriptional regulatory mechanisms.



Authors retain the copyright. This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0)

 <http://doi.org/10.22067/IJASR.2025.94631.1264>

Results and Discussion: Transcriptomic profiling revealed a total of 2,949 DEGs in broiler chicken liver following LPS stimulation, including 1,552 upregulated and 1,397 downregulated genes. This extensive transcriptional reprogramming highlights the strong impact of LPS on the hepatic immune landscape. Among the most notable findings was the upregulation of AMP-related genes such as *AvBD13*, *AvBD9*, *AvBD8*, and *CATH3*. These peptides, belonging to the avian β -defensin and cathelicidin families, are crucial for direct antimicrobial defense and immune modulation. Their induction demonstrates that LPS alone, without the presence of live pathogens, is sufficient to trigger innate host defense responses. Enrichment analyses identified several innate immune signaling pathways as significantly enriched, including the Toll-like receptor (TLR), NOD-like receptor (NLR), and MAPK signaling cascades. These pathways are central to pathogen recognition and cytokine-mediated immune responses. Activation of the TLR4 pathway reflects canonical LPS sensing by hepatocytes and immune cells in the liver. Further investigation revealed that transcription factors such as *IRF1*, *NF- κ B*, and *ICSBP* play central roles in orchestrating this immune response. These TFs regulate downstream AMP expression and cytokine production, thereby bridging pathogen recognition with effector functions. In parallel, miRNAs, including *gga-miR-130a-3p* and *gga-miR-16-5p*, were predicted to modulate post-transcriptional regulation of immune-related genes. This highlights the layered regulatory mechanisms by which chickens fine-tune their immune responses. The observed transcriptomic signature of LPS-stimulated livers closely resembles the immune activation patterns associated with necrotic enteritis, a major poultry disease caused by *Clostridium perfringens*. This suggests that the LPS model is a valuable experimental system to study inflammatory responses relevant to disease conditions, even in the absence of infection. Importantly, the activation of AMPs under these conditions reinforces their potential as natural alternatives to antibiotics for maintaining poultry health and reducing reliance on conventional antimicrobials.

Conclusion: This study demonstrates that intraperitoneal LPS challenge induces extensive transcriptional reprogramming in the liver of broiler chickens. AMP-related genes, including *AvBD13*, *AvBD9*, *AvBD8*, and *CATH3*, were significantly upregulated, reflecting their role in innate immune defense. Key signaling pathways such as TLR, NLR, and MAPK were activated, with transcription factors *IRF1*, *NF- κ B*, and *ICSBP* identified as master regulators. Moreover, miRNAs such as *gga-miR-130a-3p* and *gga-miR-16-5p* were implicated in fine-tuning these immune responses. Together, these results underscore the importance of AMPs in poultry immunity and highlight LPS stimulation as an effective experimental model for studying host defense mechanisms. The findings provide valuable insights for the development of AMP-based strategies as sustainable alternatives to antibiotics in the poultry industry.

Keywords: Differentially expressed genes, Endogenous antimicrobial peptides, Innate immune response in poultry, LPS-induced immune stimulation, Transcriptomic gene expression analysis

تحلیل ترنسکرپتومی کبد مرغ گوشتی در پاسخ به LPS با تأکید بر پتیدهای ضدالتهابی درون تنی

مریم مشیری^۱، مجتبی طهمورث پور^{۱*}، محمدهادی سخاوتی^۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۱۹

چکیده

با توجه به گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در صنعت طیور، شناسایی راهکارهای ایمن، مؤثر و طبیعی برای مقابله با بیماری‌های عفونی ضروری است. پتیدهای ضد میکروبی (AMPs) از مهم‌ترین اجزای ایمنی ذاتی محسوب می‌شوند که می‌توانند جایگزین بالقوه‌ای برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند. درک نحوه تنظیم بیان این پتیدها در مواجهه با عوامل التهابی در سطح ترنسکرپتومی اهمیت بالایی دارد. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر تحریک ایمنی القا شده توسط لیپوپلی‌ساکارید (LPS) بر بیان ژن‌های مرتبط با پتیدهای دفاعی درون تنی در بافت کبد مرغ گوشتی انجام شد. داده‌های RNA-seq از مطالعه‌ای استخراج شد که در آن جوجه‌ها با دوز یک میلی‌گرم در کیلوگرم LPS گرفته شده از *E. coli* به صورت درون صفاقی تیمار و ۲۴ ساعت بعد نمونه‌گیری شدند. پس از توالی‌یابی با پلتفرم Illumina و نگاشت به ژنوم مرجع *Gallus gallus* نسخه (Galgal6)، ۲۹۴۹ ژن با بیان متمایز (۱۵۵۲ افزایش و ۱۳۹۷ کاهش) شناسایی گردید. ژن‌های کلیدی مانند *AvBD8*، *AvBD9*، *AvBD13* و *CATH3* افزایش بیان داشتند. مسیرهای ایمنی ذاتی شامل TLR، NOD-like و MAPK فعال شدند. فاکتورهای رونویسی *IRF1*، *NF-κB* و *ICSBP* تنظیم‌کننده‌های اصلی این پاسخ بودند. همچنین miRNAهای *gga-miR-16-5p* و *gga-miR-130a-3p* در تنظیم پسارونویسی این ژن‌ها نقش داشتند. نتایج نشان می‌دهند که LPS بدون حضور بیمارگر خاص موجب فعال‌سازی پاسخ ایمنی مشابه نکروتیک انتریت شده و مدلی کاربردی برای غربالگری راهکارهای جایگزین آنتی‌بیوتیکی در صنعت طیور فراهم می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: پاسخ ایمنی ذاتی طیور، پتیدهای ضد میکروبی درون تنی، تحریک ایمنی توسط LPS، تحلیل بیان ژن ترنسکرپتومی، ژن‌های با بیان متمایز

مقدمه

(Moore, 2024). سیستم ایمنی پرندگان متشکل از دو بخش ذاتی و اکتسابی است. ایمنی ذاتی به‌عنوان نخستین سد دفاعی بدن عمل کرده و با پاسخ سریع و غیراختصاصی خود، نقش مهمی در کنترل اولیه عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کند. (Kaiser, 2010; Sarson et al., 2008) پتیدهای ضد میکروبی درون تنی (AMPs) از جمله β دفنسین‌های پرندگان (AvBDs) و کاتلیسیدین‌ها از اجزای کلیدی این پاسخ هستند که علاوه بر فعالیت گسترده علیه باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها، در تنظیم پاسخ‌های ایمنی میزبان نیز نقش دارند (Cuperus et al., 2013). با این حال، انتخاب ژنتیکی برای صفات رشد سریع در نژادهای تجاری مرغ گوشتی، اغلب به کاهش توان ایمنی و افزایش حساسیت به بیماری‌ها منجر شده است (Van Immerseel et al., 2004). یکی از بیماری‌های مهم و پرهزینه این

مرغ (*Gallus gallus domesticus*) نه تنها یکی از منابع اصلی تأمین پروتئین حیوانی در جهان به شمار می‌رود، بلکه به‌عنوان ارگانیزم مدل در مطالعات ایمنی‌شناسی پرندگان و زیست‌شناسی تکوینی نیز کاربرد گسترده‌ای دارد (Buncic et al., 2016). با رشد روزافزون جمعیت و افزایش تقاضا برای فرآورده‌های پروتئینی طیوری، صنعت مرغداری با چالش‌هایی جدی جهت افزایش بهره‌وری در عین حفظ سلامت طیور و رعایت اصول ایمنی زیستی مواجه است.

۱- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*) نویسنده مسئول: Email: tahmoores@um.ac.ir

کبدی جوجه‌های گوشتی در هفته دوم پس از جوجه در آوری در دو گروه شاهد و تیمار با LPS تزریق درون صفاقی لیپوپلی ساکارید مشتق از *E. coli* (دوز یک میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) از پایگاه GEO با کد GSE189591 دانلود شدند (Guo et al., 2022). توالی‌یابی با پلتفرم Illumina NovaSeq 6000 و استراتژی PE150 انجام شده است.

کنترل کیفیت و پیش‌پردازش داده‌ها: ابتدا کیفیت فایل‌های FASTQ با نرم‌افزار FastQC (نسخه ۰/۱۲/۰) بررسی شد. سپس داده‌ها به وسیله Trimmomatic (نسخه ۰/۳۹) و پارامترهای مناسب از جمله حذف آداپتورها و بازهای با کیفیت پایین، پالایش شدند. کیفیت مجدد داده‌های پالایش شده بررسی و تأیید شد.

نگاشت و شمارش خوانش‌ها: خوانش‌های تریب شده با استفاده از HISAT2 (نسخه ۲/۲/۱) به ژنوم مرجع *Gallus gallus* نسخه (bGalGal1.mat.broiler.GRCg7b v109) نگاشت شدند. فایل‌های BAM حاصل با Samtools مرتب شده و شمارش خوانش‌ها با HTSeq انجام گرفت.

تحلیل آماری و شناسایی ژن‌های با بیان متمایز: پس از حذف ژن‌های کم‌بیان، نرمال‌سازی با روش TMM (Trimmed Mean of M-values) در بسته edgeR صورت گرفت تا اثر عمق توالی‌یابی و ترکیب نمونه‌ها حذف گردد. تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) برای ارزیابی واریانس، نمونه‌های پرت و اثرات دسته‌ای انجام شد. ژن‌های با $|\log_2FC| > 1$ و مقدار $FDR < 0.05$ به عنوان ژن‌های با بیان متمایز (DEGs) شناسایی شدند.

تحلیل عملکردی و مسیرها: تحلیل غنی‌سازی واژگان Gene Ontology و مسیرهای KEGG با استفاده از WebGestalt (<http://www.webgestalt.org/>) انجام شد. برای درک بهتر ارتباط‌های زیستی میان ژن‌های دارای بیان متمایز، اهداف غنی‌شده microRNA (miRNA) و سایت‌های اتصال فاکتورهای رونویسی (TFs) با استفاده از ابزار WebGestalt شناسایی گردید. اصطلاحات معنادار با $FDR < 0.05$ گزارش شدند.

شبکه تعاملات پروتئینی: برای تحلیل تعاملات عملکردی میان ژن‌های ایمنی و AMPs، شبکه PPI با استفاده از پایگاه STRING نسخه ۱۲/۰ و با گونه *Gallus gallus* ساخته شد. تعاملات با $confidence \geq 0.4$ در نظر گرفته شدند و تحلیل شبکه برای شناسایی ژن‌های مرکزی و مسیرهای کلیدی به کار رفت.

نتایج و بحث

کنترل کیفیت و نگاشت داده‌های RNA-Seq: در مرحله اول، توالی‌های آداپتوری حذف شدند و در ادامه کمتر از هشت درصد

صنعت، انتريت نكروتيك (NE) است كه عمدتاً توسط *Clostridium perfringens* ايجاد می‌شود و با آسیب به مخاط روده، اختلال در جذب مواد مغذی و افزایش نرخ مرگ‌ومیر همراه است (Shojadoost et al., 2012). استفاده طولانی‌مدت از آنتی‌بیوتیک‌ها برای مهار این بیماری، با بروز مقاومت‌های دارویی و نگرانی‌های مصرف‌کنندگان، ضرورت یافتن جایگزین‌های ایمن و مؤثر را برجسته کرده است (McDevitt et al., 2006). پپتیدهای ضد میکروبی به دلیل قابلیت دوگانه در نابودی مستقیم ریزجانداران و تنظیم ایمنی، به عنوان گزینه‌هایی نویدبخش برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح شده‌اند (Park & Lee, 2013). درک نحوه تنظیم بیان این پپتیدها در شرایط التهاب سیستمیک از اهمیت بالایی برخوردار است. لیپوپلی ساکارید، یکی از اجزای دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی، محرک شناخته‌شده‌ای برای فعال‌سازی سیستم ایمنی در مدل‌های طیوری است که با اتصال به گیرنده TLR4، مسیرهای پیام‌رسانی کلیدی از جمله NF-κB، MAPK و IRFs را فعال می‌سازد (Akira & Takeda, 2004). شواهد نشان داده‌اند که مسیرهای ایمنی فعال شده توسط LPS به‌ویژه در زمینه فعال‌سازی پپتیدهای ضد میکروبی تا حد زیادی با پاسخ‌های ناشی از *C. perfringens* هم‌پوشانی دارند (Szkopek et al., 2024). پیشرفت‌های اخیر در فناوری RNA-seq امکان تحلیل جامع تعاملات میزبان-بیمارگر، مسیرهای سیگنالینگ ایمنی و شبکه‌های تنظیم ژنی را فراهم کرده‌اند. مطالعات ترنسکریپتومی در طیور مسیرهایی چون گیرنده‌های Toll-like، گیرنده‌های NOD-like و MAPK را به عنوان محورهای اصلی پاسخ ایمنی شناسایی کرده‌اند (Lu et al., 2009; Medzhitov, 2007). در مطالعه حاضر، از داده‌های RNA-Seq استخراج شده از بافت کبد مرغ‌های گوشتی تیمار شده با LPS برای بررسی تغییرات بیان ژن ناشی از تحریک سیستم ایمنی سیستمیک استفاده شد. تمرکز اصلی روی ژن‌های کدکننده پپتیدهای ضد میکروبی درون تنی و تنظیم‌کننده‌های رونویسی و پسارونویسی آن‌ها بود. نتایج نشان داد که چندین ژن مرتبط با AMPs در پاسخ به تحریک LPS به‌طور معنی داری افزایش بیان داشتند. اگرچه این مطالعه در شرایط چالش مستقیم با بیماری NE انجام نشده است، با توجه به هم‌پوشانی مسیرهای ایمنی فعال شده توسط LPS و *C. perfringens*، یافته‌ها می‌توانند به عنوان یک مدل معتبر برای تبیین سازوکارهای مولکولی NE در نظر گرفته شوند و کاربرد بالقوه پپتیدهای ضد میکروبی را به عنوان جایگزینی پایدار برای آنتی‌بیوتیک‌ها در مدیریت سلامت طیور تقویت نمایند.

مواد و روش‌ها

استخراج داده‌ها: داده‌های توالی‌یابی RNA از ۴ نمونه بافت

نرخ نگاشت موفق در تمامی نمونه‌ها از ۹۱ درصد فراتر بود، که نشان‌دهنده کیفیت مطلوب داده‌ها و کفایت مراحل پالایش و آماده‌سازی است. نتایج مربوط به تعداد توالی‌های خام، خوانش‌های پالایش‌شده و درصد نگاشت موفق به ژنوم در **جدول ۱** ارائه شده است.

از کل خوانش‌ها به دلیل کیفیت پایین یا وجود بازهای مبهم فیلتر شدند. در مجموع، بیش از ۹۲ درصد از توالی‌های خام حفظ شد. همچنین نرخ نگهداری پس از پیش‌پردازش نهایی بیش از ۹۹/۹ درصد بود که بیانگر کیفیت مناسب داده‌ها است. خوانش‌های پالایش‌شده با اجازه حداکثر دو عدم تطابق در هر خوانش ۱۵۰ نوکلئوتیدی به ژنوم مرجع *Gallus gallus* نگاشت شدند. میانگین

جدول ۱- مشخصات پایه‌ای توالی‌یابی RNA-Seq شامل تعداد خوانش‌ها و درصد نگاشت موفق برای نمونه‌های شاهد و تیمار شده با LPS
Table1- Summary of RNA-Seq data quality metrics including raw reads, filtered reads, and overall mapping rate for Control and LPS-treated samples

نام نمونه Sample name	LPS 2 (GSM5704244)	LPS 1 (GSM5704243)	Control 2 (GSM5704242)	Control 1 (GSM5704241)
توالی‌های خام Raw reads	26467868	26785572	26377422	26364536
خوانش‌های پالایش‌شده Filtered reads	26446418	26756334	26356254	26342974
درصد نگاشت موفق (%) Overall mapping rate (%)	91.17	91.21	91.14	91.09

تحلیل افتراقی بیان با استفاده از معیارهای $FDR < 0.05$ و $|\log_2 FC| \geq 1$ منجر به شناسایی ۲،۹۴۹ ژن با بیان متفاوت (DEGs) گردید که از این میان، بیان ۱،۵۵۲ ژن افزایش و بیان ۱،۳۹۷ ژن کاهش یافته بود (**جدول ۲**).

در تحلیل نتایج مشاهده می‌شود که تفاوت محسوسی بین گروه‌های تیمار (LPS) و شاهد در نرخ نگاشت وجود ندارد که نشان می‌دهد کیفیت داده‌ها در بین نمونه‌ها یکنواخت بوده و خطاهای سیستماتیک در مرحله توالی‌یابی رخ نداده است.
تحلیل بیان ژنی: در مجموع، ۱۱،۹۵۲ ژن شناسایی شد.

جدول ۲- خلاصه ژن‌های دارای بیان افتراقی بین گروه‌های تیمار و شاهد
Table 2- Summary of Differentially Expressed Genes (DEGs) between LPS-treated and control groups

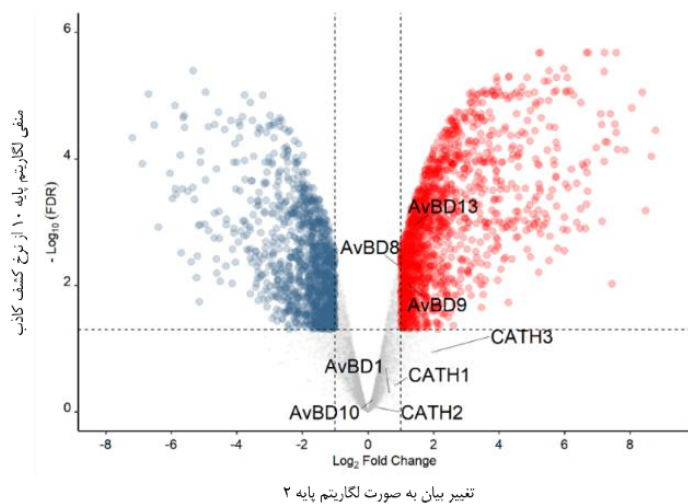
گروه‌های مقایسه Comparison group	کل ژن‌های ورودی Total input genes	ژن‌های افزایش بیان یافته Upregulated genes	ژن‌های کاهش بیان یافته Downregulated genes	معیار آستانه Threshold criteria
LPS vs. control	11952	1552	1397	Limma + EdegeR $FDR < 0.05$ $ \log_2 \text{FoldChange} \geq 1$

است.

در سطح ژنی، تعدادی از ژن‌های کدکننده پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) از جمله *AvBD13*، *AvBD9* و *CATH3* به‌طور معناداری افزایش بیان و ژن *Leap2* کاهش بیان نشان داد. الگوی بیانی مشاهده‌شده حاکی از آن است که ژن‌های با افزایش بیان، عمدتاً در مسیرهای مرتبط با ایمنی ذاتی و دفاع مخاطی فعال هستند، درحالی‌که ژن‌های با کاهش بیان بیشتر در مسیرهای تنظیمی و متابولیسم مشارکت دارند که احتمالاً تحت تأثیر سرکوب ناشی از LPS قرار گرفته‌اند. این بازآرایی ترنسکرپتومی مؤید آن است که تحریک LPS می‌تواند مسیرهای بیولوژیکی خاصی را به‌منظور مقابله با التهاب فعال‌سازی کند. این نتایج با مطالعات پیشین در زمینه نقش AMPs در تقویت دفاع میزبان و کاهش التهاب هم‌راستا است (Lee

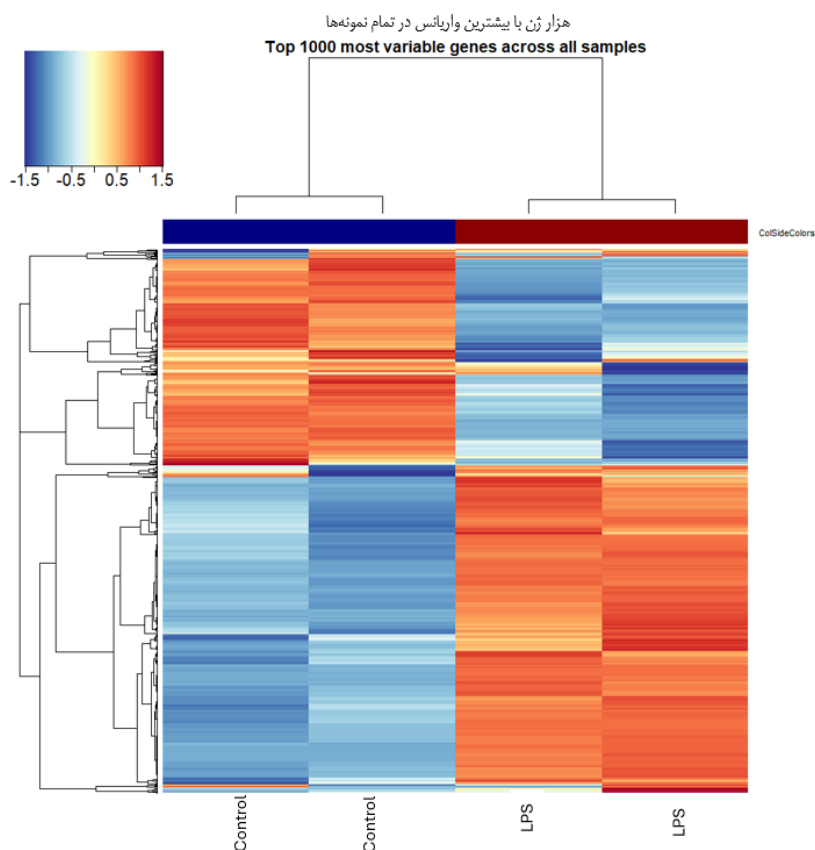
نمودار آتشفشانی (**شکل ۱**) تغییرات لگاریتمی دو برابری بیان ژن‌ها ($\log_2 \text{Fold Change}$) را در مقابل مقدار معناداری آماری ($-\log_{10} FDR$) نشان می‌دهد. نقاط قرمز نشان‌دهنده ژن‌های با بیان افزایشی و نقاط آبی نمایانگر ژن‌های با بیان کاهشی با آستانه‌های $FDR \leq 0.05$ و $|\log_2 FC| \geq 1$ هستند. ژن‌های متمایز مانند *AvBD13*، *AvBD9* و *CATH3* به‌وضوح در پاسخ به القای LPS تغییر بیان معنادار داشته‌اند.

همچنین (**شکل ۲**) نقشه حرارتی براساس الگوی بیان ۱۰۰۰ ژن با بیشترین تغییرات در نمونه‌های تیمار شده با LPS و شاهد تنظیم شده است. رنگ قرمز نشان‌دهنده بیان بالا و رنگ آبی بیان پایین‌تر را نشان می‌دهد. این تصویر خوشه‌بندی واضح بین دو گروه را نشان می‌دهد و گویای تغییرات بیان گسترده در پاسخ به لیپوپلی ساکارید



شکل ۱- تحلیل بیان تفاضلی ژن‌ها بین گروه تیمار شده با LPS و شاهد با استفاده از نمودار آتشفشانی

Figure 1- Differential gene expression analysis between LPS-treated and control groups using volcano plot



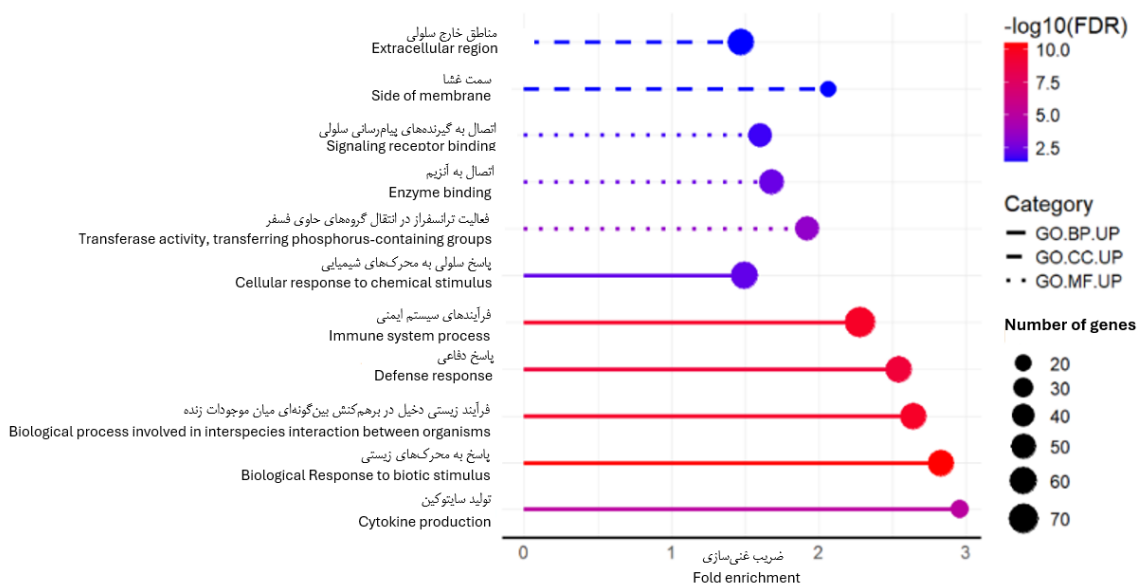
شکل ۲- نقشه حرارتی بیان ۱۰۰۰ ژن با بیشترین واریانس در نمونه‌های بافت کبدی مرغ گوشتی

Figure 2- Heatmap of the 1,000 most variable genes in broiler chicken liver samples

اندام ایمنی محور در تنظیم التهاب اشاره دارند. شکل‌های ۳ و ۴ این نتایج را به صورت طبقه‌بندی شده در سه حیطه اصلی هستی‌شناسی ژن شامل فرآیند زیستی (BP)، مؤلفه سلولی (CC) و عملکرد مولکولی (MF) نمایش می‌دهند. این طبقه‌بندی کمک می‌کند تا نمایی ساختاری از نقش غالب ژن‌های با بیان افزایش و کاهش یافته در پاسخ ایمنی ایجاد شود. به عنوان نمونه، حضور اصطلاحاتی مانند cytokine production در دسته BP و همچنین receptor binding در MF حاکی از درگیری مستقیم این ژن‌ها در تنظیم پاسخ‌های دفاعی است. در مجموع، این نتایج نشان می‌دهند که تیمار LPS موجب بازآرایی عملکردی عمده در بیان ژن‌های ایمنی در بافت کبد می‌شود. این بازآرایی احتمالاً بخشی از پاسخ تطبیقی میزبان به شرایط التهابی حاد است که از طریق فعال‌سازی مسیرهای کلیدی ایمنی صورت می‌گیرد. درک دقیق‌تر این مسیرها می‌تواند در توسعه راهکارهای تقویتی غیرآنتی‌بیوتیکی از جمله مکمل‌های ایمنی‌زا و اصلاح نژادی هدفمند، مؤثر واقع شود.

توضیح عملکردی ژن‌های دارای بیان متفاوت: به منظور

درک بهتر نقش عملکردی ژن‌های با بیان افتراقی در شرایط شبه‌التهابی، تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی (GSEA) بر روی داده‌های ترنسکریپتومی حاصل از بافت کبد جوجه‌های گوشتی تیمار شده با LPS انجام شد. نتایج این تحلیل نشان داد که ۷۸ اصطلاح زیستی به طور معناداری در میان ژن‌های با بیان افزایش یافته غنی شده‌اند (اصلاح شده $p < 0.05$). این اصطلاحات غالباً به پاسخ ایمنی ذاتی، فعال‌سازی سایتوکاین‌ها، مهاجرت لکوسیت‌ها و پاسخ‌های التهابی مربوط بودند. یافته‌های این مطالعه با مطالعات پیشین در طیور که پاسخ ایمنی کبد به تحریک LPS یا عفونت با *Clostridium perfringens* بررسی کرده‌اند، هم‌راستا است. به طور مثال، مطالعات انجام شده توسط گاتام و همکاران (Gautam et al., 2024) نیز فعال‌سازی مسیرهای مرتبط با TLR و مهاجرت لکوسیتی را در شرایط مشابه گزارش کرده‌اند. همچنین، فعال‌سازی مسیرهای مرتبط با سایتوکاین‌ها و پاسخ التهابی در مطالعات اسکوپکو همکاران (Szkopek et al., 2024) تأیید شده‌اند که به نقش کبد به عنوان یک



شکل ۳- طبقه‌بندی هستی‌شناسی ژن (GO) برای ژن‌های با بیان افتراقی افزایشی
Figure 3- Gene Ontology (GO) classification of upregulated differentially expressed genes

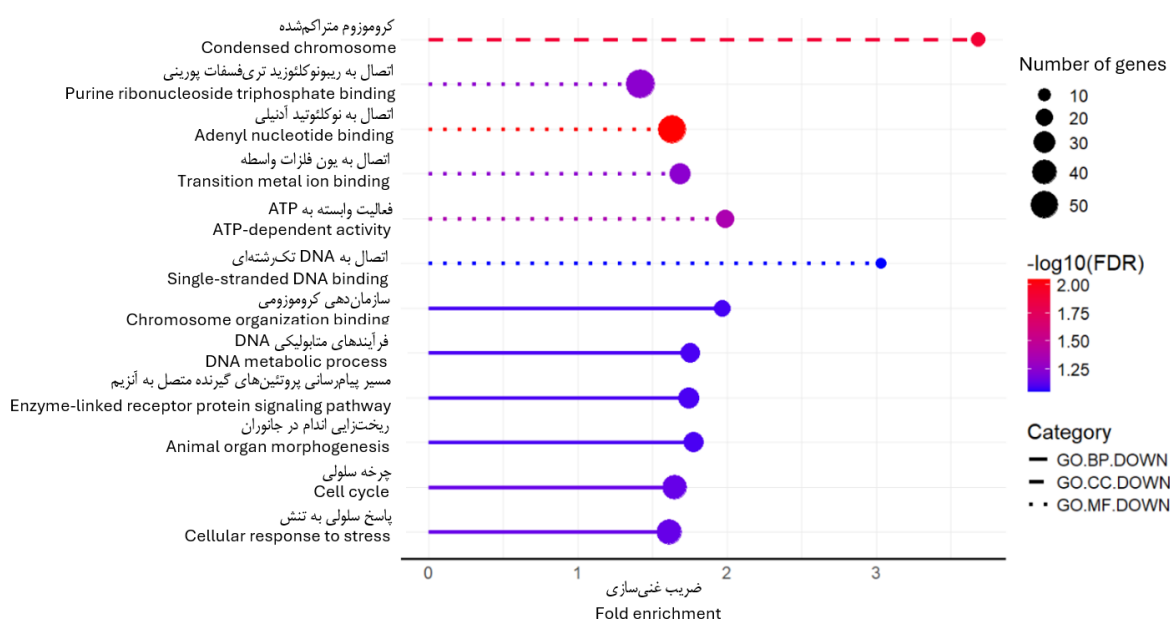
توجهی غنی شده‌اند. این مسیرها نقش کلیدی در تشخیص بیمارگرها و آغاز پاسخ‌های ایمنی التهابی در برابر باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی ایفا می‌کنند. فعال شدن این مسیرها در مطالعه حاضر، همسو با نتایج مطالعات پیشین در طیور و سایر مدل‌های جانوری است که LPS را به عنوان یک محرک قوی ایمنی ذاتی معرفی

تحلیل غنی‌سازی مسیرهای زیستی با استفاده از پایگاه KEGG نشان داد که تیمار با LPS منجر به فعال‌سازی معنادار ۱۲ مسیر مرتبط با ایمنی ذاتی در بافت کبد جوجه‌های گوشتی شده است. در میان این مسیرها، سیگنالینگ گیرنده Toll-like، گیرنده NOD-like، MAPK و NF-κB از برجسته‌ترین مسیرهایی بودند که به طور قابل

(Gautam et al., 2024) نیز گزارش شده است.

به طور کلی، نتایج تحلیل مسیرها بیانگر آن است که تحریک سیستم ایمنی با LPS، علاوه بر فعال سازی مسیرهای التهابی باعث تغییرات گسترده در بیان ژن های متابولیکی و تنظیمی نیز می شود. این بازآرایی بیان ژن ها نشان دهنده پیچیدگی پاسخ میزبان به شرایط شبه عفونی است و می تواند در طراحی راهبردهای تقویت ایمنی ذاتی در صنعت پرورش طیور مورد استفاده قرار گیرد. شکل ۵، نتایج تحلیل عملکردی ژن های با افزایش یا کاهش بیان را در مسیرهای زیستی KEGG نشان می دهد.

کرده اند. به طور مثال، مطالعات لو و همکاران (Lu et al., 2009) نیز نشان داده اند که مسیرهای TLR و NF- κ B به عنوان پاسخ اولیه میزبان به LPS، فعال شده و ترشح سایتوکاین ها و کیمی کاین ها را تنظیم می کنند. در مقابل، ژن های با کاهش بیان عمدتاً در مسیرهای متابولیکی، آنتی اکسیدانی و حفظ تعادل سلولی دخیل بودند. به ویژه، مسیر پاسخ به تنش اکسیداتیو وابسته به NRF2 یکی از مسیرهای مهم سرکوب شده در شرایط التهابی بود. کاهش فعالیت این مسیرها احتمالاً نشان دهنده تخصیص مجدد منابع سلولی به سمت پاسخ های ایمنی در شرایط التهاب است، که این الگو در مطالعات Gautam



شکل ۴- طبقه بندی هستی شناسی ژن (GO) برای ژن های با بیان افتراقی کاهشی

Figure 4- Gene Ontology (GO) classification of downregulated differentially expressed genes

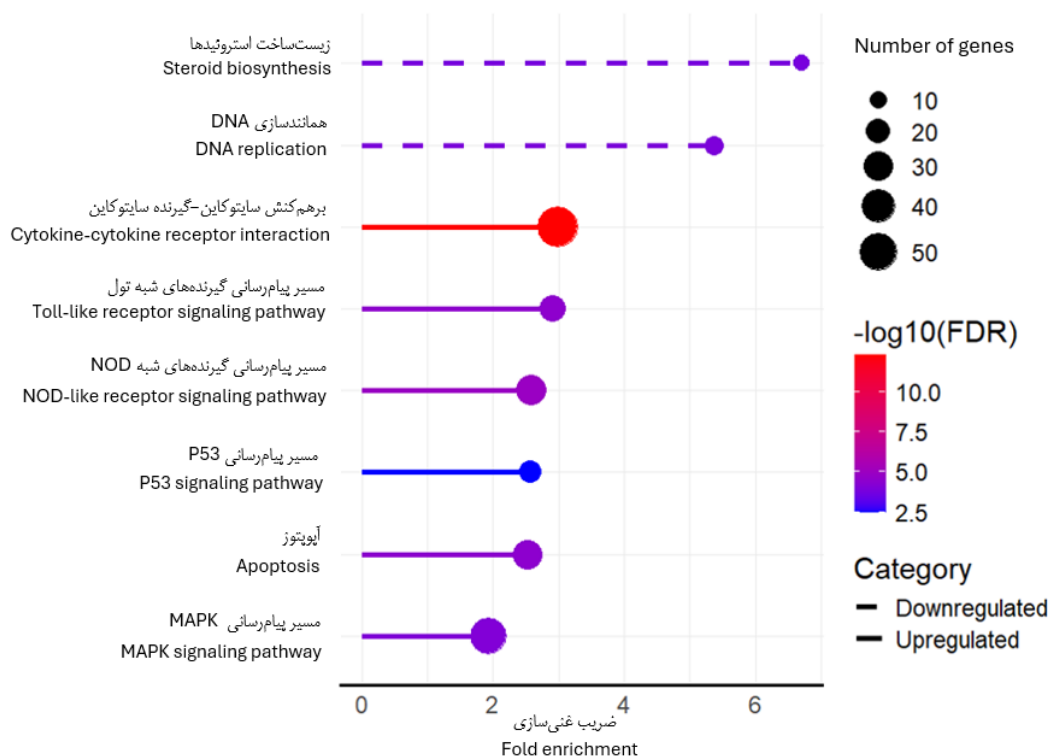
به بیان طیف وسیعی از ژن های سایتوکاینی، گیرنده های ایمنی و عوامل ضدپاتوژنی می شود. نقش NF- κ B در بسیاری از مطالعات، از جمله بررسی های انجام شده در طیور تحت تنش های میکروبی، به خوبی مستند شده و به عنوان یک واسطه مرکزی در تنظیم التهاب شناخته می شود (Zhang et al., 2019). در همین راستا، IRF-8 (ICSBP) که عمدتاً در ماکروفاژها و سلول های دندریتیک بیان می شود، با تنظیم تمایز سلول های ایمنی و تولید پاسخ های ضد میکروبی مؤثر شناخته شده است. این فاکتور در پاسخ به عفونت های باکتریایی نیز نقشی کلیدی دارد و کاهش عملکرد آن می تواند به اختلال در پاک سازی بیمارگرها منجر شود. این نتایج، در کنار بیان افزایش یافته ژن های دخیل در مسیرهای ایمنی، نشان می دهند که تنظیم ترنسکرپتیومی پاسخ التهابی در کبد طیور به طور هدفمند و هماهنگ توسط این فاکتورهای رونویسی صورت می گیرد. هم راستایی این نتایج با مطالعات پیشین، از جمله تحقیقات هان و

در تحلیل غنی سازی فاکتورهای رونویسی (TFs) در گونه *Gallus gallus*، چهار فاکتور رونویسی اصلی IRF-1، IRF-2، NF- κ B و ICSBP (IRF-8) با مقادیر آماری معنی دار شناسایی شدند. این فاکتورها از عناصر کلیدی تنظیمی در مسیرهای ایمنی ذاتی و التهابی محسوب می شوند. IRF-1 به عنوان یکی از اعضای خانواده فاکتورهای تنظیمی اینترفرون، در القای بیان ژن های ضد ویروسی و تقویت پاسخ ایمنی اولیه نقش مهمی دارد. این موضوع پیش تر نیز در مطالعات انجام شده روی پرندگان و پستانداران تأیید شده است (Han et al., 2016). در مقابل، IRF-2 به عنوان تنظیم کننده منفی IRF-1 عمل کرده و با کنترل بیش فعالی مسیرهای ایمنی، تعادل در بیان ژن های پاسخ دهنده را برقرار می سازد.

NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) نیز یکی از فاکتورهای رونویسی کلیدی در تنظیم پاسخ های التهابی و بقای سلولی است که فعال سازی آن منجر

IRF-1 و *NF-κB*، اهداف کلیدی بالقوه برای تنظیم ژن‌های ایمنی در شرایط التهابی بوده و می‌توانند در توسعه رویکردهای ژنتیکی یا دارویی برای ارتقای سلامت طیور مورد توجه قرار گیرند.

همکاران و زایتسوف و همکاران (Han et al., 2016; Zaytsoff et al., 2022) اعتبار یافته‌ها را تقویت می‌کند و نقش بنیادین این فاکتورها در سازوکار دفاعی میزبان را برجسته می‌سازد. در نتیجه، می‌توان چنین برداشت کرد که فاکتورهای شناسایی‌شده، به‌ویژه



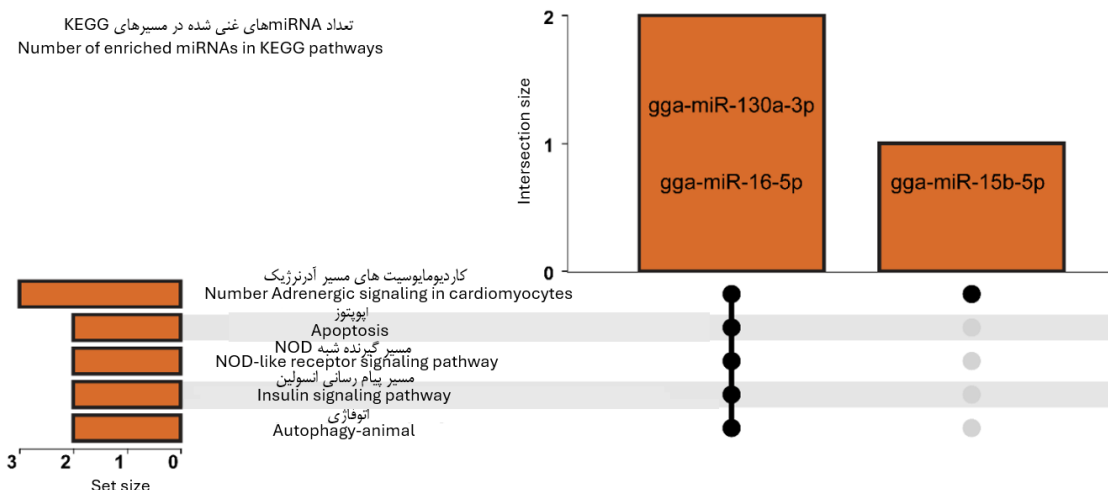
شکل ۵- نمودار غنی‌سازی مسیرهای زیستی (KEGG)
Figure 5- KEGG pathway enrichment analysis chart

مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌ها و کنترل مسیرهای مرتبط با التهاب در طیور اشاره کرده‌اند (Han et al., 2016). همچنین *gga-miR-16-5p* پیش‌تر به‌عنوان یک miRNA سرکوب‌گر در شرایط التهابی با توانایی مهار مسیر PI3K/Akt/NF-κB و القای آپوپتوز معرفی شده است (Zhang et al., 2019). هم‌پوشانی یافته‌های حاضر با مطالعات مذکور، نه‌تنها اعتبار نتایج را تقویت می‌کند، بلکه نقش مهم این miRNAها را به‌عنوان اهداف مولکولی قابل مداخله برجسته می‌سازد. با توجه به ارتباط این miRNAها با مسیرهای مرتبط با تنظیم ایمنی، مرگ سلولی و فرآیندهای خودتنظیمی اتوفاجی (autophagy)، به نظر می‌رسد که آن‌ها می‌توانند نقش مهمی در تعدیل پاسخ‌های التهابی و حفظ تعادل سلولی در شرایط شبه‌پاتولوژیک ایفا کنند. یافته‌های این بخش نشان می‌دهد که miRNAهای شناسایی‌شده نه‌تنها نشانگرهای زیستی بالقوه‌ای برای ارزیابی وضعیت ایمنی هستند، بلکه می‌توانند به‌عنوان اهداف مولکولی جهت مداخلات درمانی جدید مورد استفاده قرار گیرند. اعتبارسنجی

در این مطالعه، تحلیل عملکردی miRNAهای معنی‌دار نشان داد که مولکول‌هایی نظیر *gga-miR-16-5p* و *gga-miR-130a-3p* می‌توانند نقش تنظیمی کلیدی در مسیرهای مرتبط با ایمنی، التهاب، آپوپتوز و متابولیسم سلولی ایفا کنند. نتایج حاصل از آنالیز غنی‌سازی مسیرهای زیستی KEGG بیانگر آن بود که این miRNAها به‌طور معنی‌داری در پنج مسیر حیاتی شامل سیگنالینگ آدرنژیک در کاردیومیوسیت‌ها، آپوپتوز، سیگنالینگ گیرنده‌های NOD-like، مسیر انسولینی و اتوفاجی در حیوانات نقش دارند. یافته‌ها نشان دادند که *gga-miR-16-5p* و *gga-miR-130a-3p* در تمامی مسیرهای فوق مشارکت دارند و به‌عنوان عناصر تنظیمی مرکزی شناسایی شدند. همچنین *gga-miR-15b-5p* به‌طور اختصاصی در مسیر سیگنالینگ آدرنژیک فعال بود (شکل ۶). چنین الگوهایی از بیان و مشارکت در مسیرهای کلیدی زیستی، نقش چندگانه و تنظیمی این miRNAها را در تعادل بین پاسخ ایمنی و فرآیندهای متابولیکی برجسته می‌سازد. مطالعات پیشین نیز به نقش *gga-miR-130a-3p* در تنظیم

مزرعه‌ای می‌تواند گام بعدی در مسیر کاربردی‌سازی آن‌ها باشد.

تجربی عملکرد این miRNAها در مدل‌های حیوانی و شرایط



شکل ۶- تحلیل غنی‌سازی عملکردی miRNAهای معنی‌دار در مسیرهای زیستی KEGG

Figure 6- Functional enrichment plot of significantly associated miRNAs in KEGG biological pathways

التهاب القاشده توسط LPS گزارش شده است.

به‌منظور شناسایی ژن‌های کلیدی در شبکه تعامل پروتئین-پروتئین مرتبط با پاسخ ایمنی و پپتیدهای ضد میکروبی، سه شاخص مرکزیت شامل درجه، بین مرکزی و نزدیکی محاسبه شد. نتایج مربوط به ۱۰ گره دارای بالاترین امتیاز در این شاخص‌ها در جدول ۳ ارائه شده است. ژن *CAMP* با بیشترین میزان تعامل به‌عنوان مهم‌ترین گره مرکزی در شبکه شناخته شد. همچنین *DEFB7* با بالاترین مقدار بین مرکزی، نقش واسطه‌ای مؤثری در انتقال سیگنال‌ها و هماهنگی درون شبکه‌ای ایفا می‌نماید. علاوه بر این دو ژن، ژن‌های دیگری از جمله *CCL5*، *IL18*، *CATH3*، *IL1B*، *CXCL8L1*، *IRF7*، *NFKB1* و *RIPK2* نیز در میان گره‌های برتر قرار گرفتند. این ژن‌ها عمدتاً در مسیرهای تنظیم پاسخ التهابی، فعال‌سازی لکوسیت‌ها و سیگنالینگ ایمنی ذاتی نقش دارند.

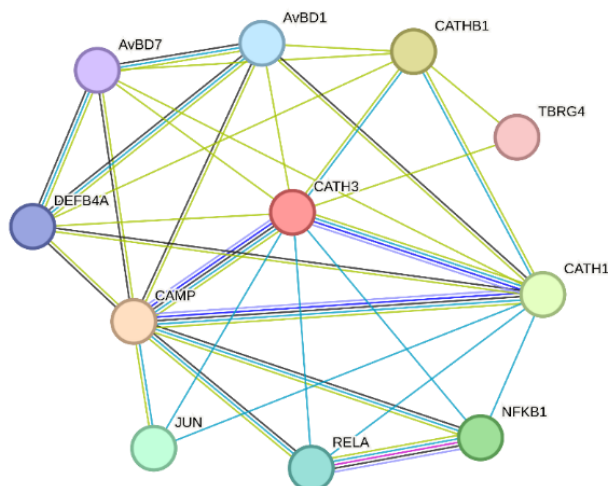
اگرچه استفاده از LPS به‌عنوان یک مدل استاندارد و مفید برای تحریک پاسخ التهابی سیستمیک در طیور شناخته شده است، اما این مدل نمی‌تواند تمامی پیچیدگی‌های بیماری‌های واقعی مانند نکروز انتريت (NE) را بازسازی کند. در NE، عوامل میکروبی به‌ویژه *Clostridium perfringens*، ترشحات توکسینی، آسیب مخاطی و تعامل میزبان-میکروبیوم نقش مهمی ایفا می‌کنند که مدل LPS به‌تنهایی قادر به بازنمایی کامل آن‌ها نیست. همچنین در شرایط طبیعی، اغلب این بیماری همراه با عوامل استرس‌زای تغذیه‌ای یا عفونت‌های ثانویه رخ می‌دهد، درحالی‌که مدل LPS معمولاً بدون این چالش‌های ترکیبی استفاده می‌شود. از سوی دیگر، پاسخ به LPS

شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) ژن‌های مرتبط

با سیستم ایمنی و پپتیدهای ضد میکروبی: به‌منظور شناسایی بازیگران کلیدی در تعاملات مولکولی مرتبط با ایمنی ذاتی و پپتیدهای ضد میکروبی، شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) از طریق پایگاه داده STRING برای ۱۱۲ ژن منتخب بازسازی شد. از این میان، ۹۵ ژن تعامل‌پذیر شناسایی و وارد تحلیل شبکه شدند. نتایج تحلیل توپولوژیکی نشان دادند که گره‌هایی نظیر *CAMP* و *DEFB7* از بالاترین شاخص‌های مرکزیت (Betweenness Degree) برخوردارند و به‌عنوان هاب‌های مرکزی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و دفاع میزبان ایفای نقش می‌کنند. تحلیل غنی‌سازی عملکردی این شبکه، مسیرهایی همچون فعال‌سازی لکوسیت‌ها، پاسخ‌های التهابی، و تنظیم پپتیدهای ضد میکروبی را به‌عنوان مسیرهای غالب برجسته ساخت. حضور ژن‌های *IRF7*، *NFKB1*، *CCL5*، *IL18*، *CATH3*، *IL1B*، *CXCL8L1* و *RIPK2* در میان مؤثرترین گره‌ها، بیانگر فعال‌سازی شبکه‌ای از پاسخ‌های وابسته به سایتوکاین‌ها، مسیرهای NOD-like و سیگنالینگ NF-κB است. یافته‌های این مطالعه با گزارش‌های قبلی هم‌راستا هستند؛ برای مثال زیتسافت و همکاران (Zaytsoff et al., 2022) نیز نقش برجسته *CAMP* و بتا-دفنسین‌ها را در محوریت شبکه‌های ایمنی طیور تأیید کرده‌اند. همچنین عملکرد واسطه‌ای *RIPK2* در انتقال سیگنال‌های مرتبط با شناسایی بیمارگرها و القای پاسخ التهابی، پیش‌تر در مطالعات اسپیر و همکاران و همچنین یانگ و همکاران (Speir et al., 2021; Yang et al., 2024) در زمینه

ترکیبی) برای تأیید عملکرد پپتیدهای ضد میکروبی و سایر یافته‌های این مطالعه توصیه می‌شود.

عمدتاً کوتاه‌مدت و وابسته به دوز و مسیر تزریق است، درحالی‌که بیماری NE می‌تواند چندمرحله‌ای یا مزمن باشد. بنابراین نتایج این پژوهش باید با احتیاط تفسیر شوند و انجام مطالعات تکمیلی با مدل‌های عفونی باکتریایی (مانند *C. perfringens*) یا مدل‌های



شکل ۷- شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی و پپتیدهای ضد میکروبی

Figure 7- Protein-protein interaction (PPI) network of genes associated with the immune system and antimicrobial peptides

جدول ۳- گره‌های کلیدی شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) با بالاترین مقادیر مرکزیت توپولوژیکی شامل Degree، Closeness و Betweenness

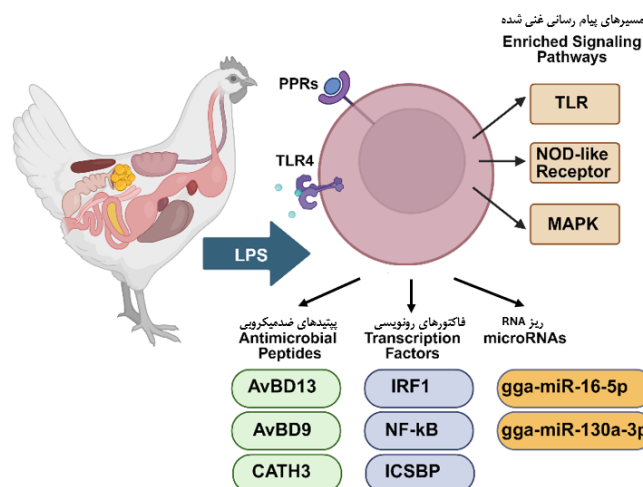
Table 3- Key nodes in the protein-protein interaction (PPI) network with the highest topological centrality values (Degree, Betweenness, and Closeness)

ژن	درجه	مرکزیت میانی	مرکزیت نزدیکی
Gene	Degree	Betweenness centrality	Closeness centrality
CAMP	45	1234.67	0.468
DEFB7	43	1290.22	0.459
CXCL8L1	41	1180.35	0.456
IL1B	39	1123.88	0.447
CATH3	37	1075.94	0.441
IL18	36	1040.71	0.437
CCL5	34	980.13	0.432
NFKB1	33	955.40	0.429
IRF7	32	921.68	0.426
RIPK2	30	875.23	0.421

بیماری‌زا دارند. در مقابل، کاهش بیان Leap2 نشان‌دهنده سرکوب مسیرهای تنظیمی خاص در پاسخ به التهاب بود. تحلیل فاکتورهای رونویسی و miRNAها از جمله *gga-miR-130a-3p* و *gga-miR-16-5p* حاکی از مشارکت آن‌ها در تنظیم مسیرهای کلیدی مانند آپوپتوز، متابولیسم، سیگنالینگ سایتوکاینی و مسیرهای NOD-like بود (شکل ۸).

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر با استفاده از آنالیز ترنسکریپتومیک RNA-Seq، شواهد روشنی از فعال‌سازی مسیرهای ایمنی ذاتی در بافت کبد جوجه‌های گوشتی تحت تحریک لیپوپلی‌ساکارید (LPS) ارائه داد. به‌طور خاص، مسیرهای TLR، NOD-like و MAPK به‌طور معناداری فعال شده و منجر به افزایش بیان ژن‌هایی نظیر *AvBD13* و *AvBD9* شدند که نقشی حیاتی در دفاع اولیه علیه عوامل



شکل ۸- سیگنال دهی ایمنی القا شده توسط LPS و تنظیم ژن های ضد میکروبی در کبد مرغ
Figure 8- LPS-induced immune signaling and antimicrobial gene regulation in chicken liver

طیور معرفی می کند. یافته های این پژوهش از نقش کلیدی پپتیدهای ضد میکروبی و مسیرهای تنظیمی در ایمنی طیور پرده برداشتند. بر این اساس، استفاده از مکمل های ایمنی زا، انتخاب ژنتیکی برای تقویت ایمنی ذاتی، و جایگزینی آنتی بیوتیک ها با راهکارهای زیستی هدفمند می تواند به عنوان رویکردی مؤثر برای ارتقای سلامت و مقاومت طیور در برابر بیماری ها در نظر گرفته شود. انجام مطالعات تجربی در شرایط مزرعه و مدل های تجربی NE گام بعدی برای اعتبارسنجی این نتایج و کاربرد آن ها در صنعت مرغداری خواهد بود.

تحلیل عملکردی و شبکه تعاملات پروتئینی نیز ژن های CAMP و DEF7 را به عنوان گره های مرکزی در دفاع مخاطی و پاسخ سایتوکاینی معرفی کرد که تأکیدی بر نقش برجسته پپتیدهای ضد میکروبی در ایمنی میزبان دارد. این یافته ها در مجموع بر بازآرایی گسترده در الگوی بیان ژن ها در پاسخ به LPS و فعال سازی مسیرهای التهابی مؤثر در مقابله با عفونت های باکتریایی تأکید دارند. هم پوشانی نتایج با مطالعات مرتبط با *Clostridium perfringens*، بر اعتبار استفاده از مدل LPS برای شبیه سازی مراحل اولیه بیماری NE افزوده و آن را به عنوان یک ابزار مناسب برای مطالعه ایمنی ذاتی

References

1. Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4(7), 499–511. <https://doi.org/10.1038/NRI1391>
2. Buncic, S., Antic, D., & Blagojevic, B. (2016). Microbial ecology of poultry and poultry products. *Modeling the Microbial Ecology of Foods: Quantitative Microbiology in Food Processing*, 483–498. <https://doi.org/10.1002/9781118823071.CH24>
3. Cuperus, T., Coorens, M., van Dijk, A., & Haagsman, H. P. (2013). Avian host defense peptides. *Developmental & Comparative Immunology*, 41(3), 352–369. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2013.04.019>
4. Gautam, H., Shaik, N. A., Banaganapalli, B., Popowich, S., Subhasinghe, I., Ayalew, L. E., Mandal, R., Wishart, D. S., Tikoo, S., & Gomis, S. (2024). Elevated levels of butyric acid in the jejunum of an animal model of broiler chickens: From early onset of *Clostridium perfringens* infection to clinical disease of necrotic enteritis. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 15(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S40104-024-01105-5/FIGURES/8>
5. Guo, F., Zhang, Y., Ma, J., Yu, Y., Wang, Q., Gao, P., Wang, L., Xu, Z., Wei, X., & Jing, M. (2022). m6A mRNA methylation was associated with gene expression and lipid metabolism in liver of broilers under lipopolysaccharide stimulation. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2022.818357/PDF>
6. Han, B., Lian, L., Li, X., Zhao, C., Qu, L., Liu, C., Song, J., & Yang, N. (2016). Chicken gga-miR-130a targets HOXA3 and MDFIC and inhibit Marek's disease lymphoma cell proliferation and migration. *Molecular Biology Reports*, 43(7), 667–676. <https://doi.org/10.1007/S11033-016-4002-2>
7. Kaiser, P. (2010). Advances in avian immunology--prospects for disease control: A review. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 39(5), 309–324. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.508777>
8. Lee, C. K., Hu, X., Decker, T., & Platanitis, E. (2018). Regulatory networks involving STATs, IRFs, and NFκB in inflammation. *Frontiers in Immunology*, 9, 2542. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02542>
9. Lu, Y., Sarson, A. J., Gong, J., Zhou, H., Zhu, W., Kang, Z., Yu, H., Sharif, S., & Han, Y. (2009). Expression

- profiles of genes in toll-like receptor-mediated signaling of broilers infected with *Clostridium perfringens*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(11), 1639–1647. <https://doi.org/10.1128/CVI.00254-09/ASSET/0D3F1962-0F9B-4768-A74C-59C522CD30E2/ASSETS/GRAPHIC/ZCD0110936690003.JPEG>
10. McDevitt, R. M., Brooker, J. D., Acamovic, T., & Sparks, N. H. C. (2006). Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. *World's Poultry Science Journal*, 62(2), 221–247. <https://doi.org/10.1079/WPS200593>
11. Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819–826. <https://doi.org/10.1038/NATURE06246>.
12. Moore, R. J. (2024). Necrotic enteritis and antibiotic-free production of broiler chickens: Challenges in testing and using alternative products. *Animal Nutrition*, 16, 288–298. <https://doi.org/10.1016/J.ANINU.2023.08.012>
13. Park, B. S., & Lee, J. O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental and Molecular Medicine*, 45(12), e66–e66. <https://doi.org/10.1038/EMM.2013.97;KWRD=BIOMEDICINE>
14. Sarson, A. J., Parvizi, P., Lepp, D., Quinton, M., & Sharif, S. (2008). Transcriptional analysis of host responses to Marek's disease virus infection in genetically resistant and susceptible chickens. *Animal Genetics*, 39(3), 232–240. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2052.2008.01710.X>
15. Shojadoost, B., Vince, A. R., & Prescott, J. F. (2012). The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: A critical review. *Veterinary Research*, 43(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-74/TABLES/3>
16. Speir, M., Djajawi, T. M., Conos, S. A., Tye, H., & Lawlor, K. E. (2021). Targeting RIP kinases in chronic inflammatory disease. *Biomolecules*, 11(5), 646. <https://doi.org/10.3390/BIOM11050646>
17. Szkopek, D., Mendel, M., Kinsner, M., Fotschki, B., Juśkiewicz, J., Kozłowski, K., Matusevičius, P., & Konieczka, P. (2024). Interaction between peroxisome proliferator-activated receptors and cannabidiol in the gut of chickens applied to different challenge conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(21), 11398. <https://doi.org/10.3390/IJMS252111398>
18. Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F., & Ducatelle, R. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animals and public health. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 33(6), 537–549. <https://doi.org/10.1080/03079450400013162>
19. Yang, C., Machado da Silva, M. C., Howell, J. A., Larochelle, J., Liu, L., Gunraj, R. E., Pinheiro de Oliveira, A. C., & Candelario-Jalil, E. (2024). RIPK2 is crucial for the microglial inflammatory response to bacterial muramyl dipeptide but not to lipopolysaccharide. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*, 25(21), 11754. <https://doi.org/10.3390/ijms252111754>
20. Zaytsoff, S. J. M., Montina, T., Boras, V. F., Brassard, J., Moote, P. E., Uwiera, R. R. E., & Inglis, G. D. (2022). Microbiota transplantation in day-old broiler chickens ameliorates Necrotic Enteritis via modulation of the intestinal microbiota and host immune responses. *Pathogens*, 11(9), 972. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11090972/S1>
21. Zhang, K., Han, Y., Zhao, Y., Sun, Y., Zou, M., Fu, Y., & Peng, X. (2019). Upregulated gga-miR-16-5p inhibits the proliferation cycle and promotes the apoptosis of MG-infected DF-1 cells by repressing PIK3R1-mediated the PI3K/Akt/NF-κB pathway to exert anti-inflammatory effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1036. <https://doi.org/10.3390/IJMS20051036>