



Bioinformatic evaluation of the impact of miRNAs on the expression of detoxification-related genes in Zebrafish (*Danio rerio*)

Mahdi Banaee^{1*} and Ahmad Ali Badr²

1. Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources, Khatam Al-Anbia University of Technology, Behbahan, Iran.
2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran.

Article Info

Article type: Research

Article history:

Received: 28 January 2024

Accepted: 2 May 2024

ePublished: 26 May 2024

* Corresponding Author:
mahdibanaee2@gmail.com

Keywords:

Reef evolution,
MicroRNAs,
Xenobiotic,
Biotransformation,
Target Scan,
DIANA databases.

ABSTRACT

Zebrafish (*Danio rerio*) stands as a valuable model organism for delving into molecular mechanisms, notably detoxification. MicroRNAs (miRNAs), small non-coding RNA molecules, serve as post-transcriptional regulators of gene expression, potentially shaping the complex network of genes engaged in detoxification pathways. This study employs bioinformatic analysis, utilizing Target Scan and DIANA databases, to explore the potential of miRNAs in modulating the expression of detoxification-associated genes in zebrafish. By meticulously scrutinizing miRNA and mRNA datasets in zebrafish, we pinpoint candidate miRNAs predicted to target established detoxification genes. Leveraging bioinformatic algorithms, we dissect the plausible interactions between these miRNAs and their target detoxification genes, which include *pgp*, *gpx1a*, *gpx3*, *aldh3b1*, *gstm3*, *cyp3c1*, *gstp1*, *gpx1b*, *cyp17a1*, *sod1*, *sod2*, *gsto2*, *gstz1*, *akr7a3*, *gsr*, *ahr1b*, *cat*, *ahr2*, and *abcb4*. Moreover, we assess the conservation of miRNA-target interactions across species and scrutinize potential miRNA binding sites within the 3' untranslated regions (UTRs) of target mRNAs. Our findings unveil the intricate regulatory interplay between miRNAs and genes involved in detoxification in zebrafish, providing a cornerstone for future experimental validations. This study significantly contributes to our evolving understanding of miRNA-mediated gene regulation within the context of detoxification pathways in zebrafish.



Publisher: University of Hormozgan.



ارزیابی بیوانفورماتیک تأثیر miRNAها بر بیان ژن‌های دخیل در فرآیند سم‌زدایی در گورخر ماهی (*Danio rerio*)

مه‌دی بنایی*^۱ و احمد علی بدر^۲

۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیا، بهبهان، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیا بهبهان، بهبهان، ایران

چکیده

گورخر ماهی (*Danio rerio*) یک مدل ارزشمند برای مطالعه مکانیسم‌های مولکولی از جمله سم‌زدایی است. MicroRNAها (miRNA)، مولکول‌های RNA غیر کد کننده کوچکی هستند که پس از رونویسی بیان ژن را تنظیم می‌کنند و به طور بالقوه بر شبکه پیچیده ژن‌های درگیر در مسیرهای سم‌زدایی تأثیر می‌گذارند. در این مطالعه، از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک (Target Scan و پایگاه داده DIANA) برای بررسی نقش بالقوه miRNAها در تعدیل و تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با فرآیند سم‌زدایی در گورخر ماهی استفاده شد. از طریق بررسی کامل مجموعه داده‌های miRNA و mRNA در گورخر ماهی، miRNAهای کاندید پیش‌بینی شده برای هدف قرار دادن ژن‌های سم‌زدایی شناخته شده شناسایی شد. سپس با استفاده از الگوریتم‌های بیوانفورماتیک، تعاملات بالقوه بین این miRNAها و ژن‌های سم‌زدایی هدف آن‌ها (*pgp*, *gpx1a*, *gpx3*, *aldh3b1*, *gstm3*, *cyp3c1*, *gstp1*, *gpx1b*, *cyp17a1*, *sod1*, *sod2*, *gstp2*, *gstz1*, *akr7a3*, *gsr*, *ahr1b*, *cat*, *ahr2*, *abcb4*, *cyp11a1*) مورد ارزیابی قرار گرفت. علاوه بر این، میزان حفاظت از تعاملات miRNA-هدف در بین گونه‌ها ارزیابی شد و مکان‌های بالقوه اتصال miRNA در مناطق ترجمه نشده mRNA (UTRs) گونه‌ها هدف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. یافته‌های ما روابط تنظیمی پیچیده بین miRNAها و ژن‌های دخیل در سم‌زدایی در گورخر ماهی را نشان داد. این نتایج می‌تواند به عنوان پایه‌ای برای اعتبارسنجی‌های تجربی آینده باشد و به دانش رو به رشد، تنظیم ژن با واسطه miRNA در زمینه مسیریهای سم‌زدایی در گورخر ماهی کمک کند.

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۳

تاریخ چاپ الکترونیک: ۱۴۰۳/۰۳/۰۶

* نویسنده مسئول:

mahdibanaee2@gmail.com

کلیدواژه‌ها:

MicroRNAها،

بیگانه‌بیوتیک‌ها،

تغییر شکل زیستی،

Target Scan،

پایگاه داده DIANA.



مقدمه

گورخرماهی (*Danio rerio*) به دلیل شباهت ژنتیکی با انسان و توانایی آن در بازسازی بافت‌ها، یک ارگانیسم نمونه پرکاربرد در تحقیقات علمی است. سم زدایی، یکی از فرآیندهای کلیدی که گورخرماهی در معرض آلاینده‌های محیطی برای حفظ هموستاز سلولی و محافظت در برابر مواد مضر ضروری است. سم‌زدایی یک فرآیند زیستی پیچیده است که شامل تبدیل ترکیبات سمی به اشکال کمتر خطرناک یا متابولیت‌هایی که به راحتی قابل دفع است (Banaee et al., 2023e). فرآیند سم‌زدایی در گورخرماهی عمدتاً در کبد، که عضو اصلی مسئول متابولیسم و دفع سموم است، انجام می‌شود. این ماهی، مانند سایر مهره داران، دارای یک سیستم سم‌زدایی پیچیده است که از آنزیم‌ها و ناقلان مختلف تشکیل شده است. هپاتوسیت‌ها طیف وسیعی از ژن‌های سم‌زدایی را بیان می‌کنند که آنزیم‌های دخیل در تبدیل زیستی ترکیبات سمی را رمزگذاری می‌کنند (Gaaied et al., 2019; Derikvandy et al., 2020; Banaee et al., 2023d). فرآیند سم‌زدایی در گورخرماهی شامل سه فاز اصلی، فاز I، فاز II و فاز III است.

در فاز I، آنزیم‌هایی مانند سیتوکروم P450s (CYPs) و مونواکسیژنازهای حاوی فلاوین اکسیداسیون (FMOs)، کاهش و هیدرولیز ترکیبات سمی را کاتالیز می‌کنند. این فاز گروه‌های عاملی را به مولکول‌ها وارد می‌کند و آنها را مستعد اصلاح بیشتر در فاز دوم می‌کند. فاز II شامل ترکیب گروه‌های عاملی معرفی شده در فاز I با مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌زا مانند گلوکوتایون، سولفات یا اسید گلوکورونیک است. این فرآیند کونژوگاسیون توسط آنزیم‌هایی مانند گلوکوتایون اس ترانسفراز (GSTs)، سولفو ترانسفراز (SULTs) و UDP-گلوکوروکونوزیل ترانسفراز (UGTs) کاتالیز می‌شود. واکنش‌های کونژوگاسیون منجر به تشکیل متابولیت‌های محلول در آب می‌شود که می‌توانند به راحتی از بدن دفع شوند (Wu et al., 2014; Jia et al., 2020). در فاز III، متابولیت‌های محلول در آب تشکیل شده در فاز II از سلول‌های کبدی به داخل کانال‌های صفراوی منتقل می‌شوند. این انتقال توسط ناقل‌های کاست متصل شونده به ATP (ABC) مانند پروتئین‌های مقاومت چند دارویی (MRPs) و پمپ صادرات نمک صفراوی (BSEP) تسهیل می‌شود. متابولیت‌ها سپس به صفرا دفع می‌شوند و در نهایت از بدن دفع می‌شوند. فرآیند سم‌زدایی در گورخرماهی به شدت در سطوح مختلف تنظیم می‌شود تا از حذف موثر سموم اطمینان حاصل شود (Wu et al., 2014; Jia et al., 2020).

یکی از مکانیسم‌های تنظیمی کلیدی که در بیان ژن سم‌زدایی دخیل است، تنظیم پس از رونویسی با واسطه‌ی microRNA-miRNAs است. miRNAsها مولکول‌های کوچک RNA غیر کدکننده هستند که می‌توانند به ناحیه ترجمه نشده 3' (UTR) mRNAهای پیام‌رسان هدف متصل شوند و منجر به تخریب یا سرکوب ترجمه آنها شوند (Banaee and Sagvand, 2019; Tai and Freeman, 2020; Badr et al., 2022). miRNAsها از ژن‌های خاصی در ژنوم رونویسی می‌شوند و در نتیجه رونوشت‌های miRNA اولیه یا (pri-miRNA) به وجود می‌آیند. سپس این pri-miRNAها توسط آنزیم دروشا (Drosha) به miRNAهای پیش‌ساز یا (pre-miRNA) پردازش می‌شوند و به سیتوپلاسم فرستاده می‌شوند. در سیتوپلاسم، pre-miRNAها توسط آنزیم دیگری به نام دایسر (Dicer) پردازش به miRNAهای بالغ تبدیل می‌شوند. در مرحله بعد، miRNAهای بالغ در مجتمع خاموشی القا شده با RNA (RISC) گنجانده می‌شوند، جایی که مجموعه را از طریق تعاملات جفت شدن پایه، به سمت هدف قرار دادن mRNAs هدایت می‌کنند. در نهایت اتصال miRNAها به mRNAهای هدف منجر به سرکوب ترجمه یا تخریب mRNA هدف می‌شود و از این طریق بیان ژن را تنظیم می‌کنند. miRNAsها نقش مهمی در تنظیم دقیق بیان ژن ایفا می‌کنند و در فرآیندهای زیستی مختلف از جمله توسعه، تکثیر سلولی و متابولیسم نقش دارند (Kloosterman et al., 2006; Wienholds et al., 2003; Badr et al., 2022; Banaee et al., 2024).

سیستم سم‌زدایی در گورخرماهی شامل شبکه‌ای از ژن‌ها است که آنزیم‌های مسئول متابولیسم و حذف بیگانه‌بیوتیک‌ها مانند داروها، آلاینده‌ها و سموم محیطی را رمزگذاری می‌کنند (Yao et al., 2023). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که miRNAها می‌توانند بیان ژن‌های سم‌زدایی را در گورخرماهی تنظیم کنند و در نتیجه فرآیند سم‌زدایی را تحت تأثیر قرار دهند. از این رو، miRNAها می‌توانند با هدف قرار دادن mRNA ژن‌های سم‌زدایی، سطح بیان آنها را تنظیم کنند و کارایی مسیرهای سم‌زدایی را تغییر دهند

(Chen *et al.*, 2016; Ku *et al.*, 2018). این مکانیسم تنظیمی به گورخرماهی اجازه می‌دهد تا با شرایط محیطی در حال تغییر سازگار شود و به سمیت سلولی آلاینده‌ها پاسخ دهند. لذا، درک تعامل بین miRNAها و ژن‌های سم‌زدایی در گورخرماهی برای کشف مکانیسم‌های مولکولی نهفته در فرآیندهای سم‌زدایی ضروری است. با شناسایی miRNAهای خاصی که ژن‌های سم‌زدایی را هدف قرار می‌دهند و مشخص کردن اثرات تنظیمی آن‌ها، می‌توانیم بینشی در مورد شبکه‌های نظارتی پیچیده‌ای که سم‌زدایی در گورخرماهی را کنترل می‌کنند به دست آوریم.

در حال حاضر از تکنیک‌های تجربی مانند توالی‌یابی RNA (RNA-seq) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (qRT-PCR) برای ارزیابی بیان miRNAها و ژن‌های سم‌زدایی در بافت‌های مختلف یا تحت شرایط خاص استفاده می‌شوند. علاوه بر این، روش‌های غربالگری با کارایی بالا، مانند تجزیه و تحلیل ریزآرایه، می‌تواند برای شناسایی miRNAهایی که به طور متفاوت در پاسخ به سموم یا در طول مراحل رشد بیان می‌شوند، استفاده شود. با این تکنیک‌ها می‌توان تنظیم دینامیکی miRNAها و ژن‌های هدف آنها در زمینه فرآیندهای سم‌زدایی را مورد ارزیابی مطالعه قرار داد. همچنین، به موازات رویکردهای تجربی، می‌توان از ابزارها و الگوریتم‌های بیوانفورماتیک برای پیش‌بینی و تحلیل تعاملات ژن miRNA استفاده کرد. در حال حاضر، از چندین روش محاسباتی برای شناسایی ژن‌های هدف بالقوه miRNAها بر اساس مکمل بودن توالی و حفاظت در بین گونه‌ها می‌توان بهره گرفت. در این روش‌ها، الگوریتم‌های پیش‌بینی هدف، مانند TargetScan، miRanda، PicTar، از اطلاعات توالی برای پیش‌بینی سایت‌های هدف miRNA در مناطق ترجمه‌نشده mRNA (UTRs) استفاده می‌کنند. این الگوریتم‌ها برای اولویت‌بندی ژن‌های هدف بالقوه، عواملی مانند مکمل بودن توالی mRNA، دسترسی به سایت هدف و حفاظت در بین گونه‌ها را در نظر می‌گیرند (Riffo-Campos *et al.*, 2016; Banaee and Sagvand, 2019).

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه بیوانفورماتیک و تنوری جهت ارزیابی miRNAهای تنظیم‌کننده بیان ژن‌های دخیل در سیستم سم‌زدایی سلول‌های کبدی گورخرماهی (*D. rerio*) است. برای حصول به این مهم، نخست پروفیل ژن‌های دخیل در سیستم سم‌زدایی سلول‌های کبدی گورخرماهی (*D. rerio*) از پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) استخراج گردید. سپس پروفیل miRNAهای دخیل در تنظیم بیان ژن‌های مدنظر با استفاده از نرم‌افزار Target Scan (http://www.targetscan.org/fish_62) تعیین شد. در این نرم‌افزار تحت وب نواحی ۷ یا ۸ نوکلئوتیدی که مکمل ناحیه هسته از miRNA است، شناسایی شد و سطح پایداری ترمودینامیکی آنها نیز بررسی شد. در این پایگاه اطلاعاتی تحت وب، اهداف پیش‌بینی شده بر اساس شاخصی به نام احتمال هدف‌گیری محافظت شده، رتبه‌بندی شدند. مقدار عددی و رتبه این شاخص بیانگر احتمال هدف‌گیری یک ناحیه محافظت شده توسط یک miRNA خاص است. هر چقدر امتیاز و رتبه کسب شده بیشتر باشد، شاخص بهتری از اتصال اختصاصی و درست miRNA به ژن هدف خواهد بود (Banaee and Sagvand, 2019).

در مرحله بعد، تجزیه و تحلیل miRNAها در وب‌گاه DIANA (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/dianatools>) براساس حد‌آستانه ۰/۱ انجام شد. در این پایگاه اطلاعاتی، الگوریتم شناسایی اهداف miRNA بر مبنای چندین شاخص محاسبه و برای هر miRNA به طور جداگانه امتیازبندی صورت گرفت. سپس امتیاز نواحی محافظت شده و غیرمحافظت شده با هم ترکیب شد و یک امتیاز کلی که حاکی از تغییر بیان mRNA هدف است، تعیین شد. هر چه مقدار Score miTG به عدد ۱ نزدیک‌تر باشد، پیش‌بینی دقیق‌تر و به واقعیت نزدیک‌تر خواهد بود. در تجزیه و تحلیل miRNAها بر اساس متغیرهایی همچون قدرت اتصال ناحیه هسته مربوط به miRNAهای مختلف و تعداد تکرار ناحیه هدف در قسمت ۳ UTR فاکتور رونویسی، به فاکتورهای رونویسی امتیاز داده شد و در نهایت فاکتورهای رونویسی که دارای بیشترین امتیاز بود، به عنوان ژن کاندیدا برای انجام آزمون‌های عملی معرفی گردید (Riffo-Campos *et al.*, 2016; Banaee and Sagvand, 2019).

نتایج

تجزیه و تحلیل داده‌های بیوانفورماتیک نشان داد که dre-miR-429 نقش مهمی در تنظیم بیان ژن *pgp* دارد (جدول ۱). مجموعه ژن‌های *gpx1a*، *Gpx3* و *gpx1b* کد کننده ایزومرهای مختلف آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز می‌باشند. تجزیه و تحلیل داده‌های بیوانفورماتیک نشان داد که به ترتیب dre-miR-740، dre-miR-723 و dre-miR-93 نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های *gpx1a*، *Gpx3* و *gpx1b* دارد (جدول ۱).

ژن‌های *cp2x* کد کننده سیتوکروم P450 2X (CYP2X) یا سیتوکروم P450 2K6 (CYP2K6)، زیرخانواده‌ای از ابرخانواده آنزیم سیتوکروم P450 است. این آنزیم‌ها نقش مهمی در متابولیسم ترکیبات درون‌زا و برون‌زا مختلف از جمله داروها، سموم و آلاینده‌های محیطی دارند. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک نشان داد که به ترتیب dre-miR-137 و dre-miR-740 نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های *cp2x* و *Cyp3c1* دارد (جدول ۱).

در حالی که ژن *cyp17a1* کد کننده آنزیم‌های فعال در سنتز زیستی گلوکوکورتیکوئیدها (کورتیزول) و استروئیدهای است. آنزیم CYP17A1 پراگنولون و پروژسترون را به مشتقات α - 17 هیدروکسی آنها تبدیل می‌کند که واسطه‌های بیوسنتز گلوکوکورتیکوئیدها هستند. آنزیم CYP17A1 تبدیل α - 17 هیدروکسی پروژسترون و α - 17 هیدروکسی پراگنولون را به ترتیب به دهیدرواپی آندروسترون (DHEA) و آندروستندین که به ترتیب پیش‌سازهای اصلی در بیوسنتز آندروژن‌ها و استروژن‌ها هستند، را کاتالیز می‌کند. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک نشان داد که به ترتیب dre-miR-740 و dre-miR-722 نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های *cyp17a1* و *cyp11a1* دارد (جدول ۱).

ژن *Aldh3b1* با تولید آنزیم آلدئید دهیدروژناز 3B1 مرتبط است. آلدئید دهیدروژنازها (ALDHs) خانواده‌ای از آنزیم‌ها هستند که در اکسیداسیون آلدئیدها به اسیدهای کربوکسیلیک نقش دارند و نقش مهمی در سم‌زدایی انواع واسطه‌های آلدئید فعال دارند. داده‌های بیوانفورماتیک نشان داد که dre-miR-194a نقش مهمی در تنظیم بیان ژن *Aldh3b1* دارد (جدول ۱).

داده‌های بیوانفورماتیک نشان داد که dre-miR-223، dre-miR-1388 و dre-miR-20a نقش مهمی در تنظیم بیان ژن *Gstm3*، *Gsto2* و *GstZ1* دارد (جدول ۱).

جدول ۱: پروفایل ژن‌های دخیل در فرآیند سم‌زدایی ماهی گورخری و مشخصات miRNA های تنظیم کننده بیان آن‌ها

کد شناسایی	miRNA	ژن هدف	امتیاز (درصد)
MIMAT0011291	dre-miR-429	<i>pgp</i>	99
MIMAT0003771	dre-miR-740	<i>gpx1a</i>	99
MIMAT0003751	dre-miR-723	<i>Gpx3</i>	99
MIMAT0001834	dre-miR-137	<i>cyp2x</i>	99
MIMAT0001858	dre-miR-194a	<i>Aldh3b1</i>	99
MIMAT0001290	dre-miR-223	<i>Gstm3</i>	98
MIMAT0003771	dre-miR-740	<i>Cyp3c1</i>	97
MIMAT0032013	dre-miR-737	<i>Gstp1</i>	97
MIMAT0001810	dre-miR-93	<i>gpx1b</i>	96
MIMAT0003771	dre-miR-740	<i>cyp17a1</i>	94
MIMAT0032003	dre-miR-430i	<i>Sod1</i>	94
MIMAT0001846	dre-miR-150	<i>Sod2</i>	94
MIMAT0011293	dre-miR-1388	<i>Gsto2</i>	91
MIMAT0003400	dre-miR-20a	<i>GSTZ1</i>	91
MIMAT0031922	dre-miR-199	<i>akr7a3</i>	89
MIMAT0018177	dre-miR-3906	<i>gsr</i>	86
MIMAT0001285	dre-miR-217	<i>ahr1b</i>	84
MIMAT0001844	dre-miR-146b	<i>cat</i>	80
MIMAT0003771	dre-miR-740	<i>ahr2</i>	79
MIMAT0003751	dre-miR-723	<i>Abcb4</i>	72
MIMAT0003748	dre-miR-722	<i>cyp11a1</i>	70

ژن‌های *Sod1* و *Sod2* به ترتیب کد کننده سوپراکسید دیسموتاز ۱ و ۲ هستند. براساس اطلاعات بدست آمده در این مطالعه، dre-miR-150 و dre-miR-430i نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های *Sod1* و *Sod2* دارد (جدول ۱).

ژن *akr7a3* عضوی از ابرخانواده آلدو کتو ردوکتاز (AKR) به ویژه پروتئین AKR7A3 را کد می‌کند. آلدو کتو ردوکتازها آنزیم‌هایی هستند که در سم زدایی از ترکیبات مختلف درون‌زا و برون‌زا از جمله آلدئیدها و کتون‌ها نقش دارند. براساس نتایج بدست آمده dre-miR-199 نقش مهمی در تنظیم بیان ژن *akr7a3* دارد (جدول ۱).

ژن *gsr* کد کننده آنزیم گلوکاتیون ردوکتاز است. براساس نتایج بدست آمده dre-miR-3906 نقش مهمی در تنظیم بیان ژن *gsr* دارد (جدول ۱).

مجموعه ژن‌های *ahr1b* و *ahr2* کد کننده پروتئین‌های متعلق به خانواده گیرنده هیدروکربنی آریل (AHR) است. داده‌های بیوانفورماتیک نشان داد که dre-miR-217 و dre-miR-740 به ترتیب بیان ژن‌های *ahr1b* و *ahr2* تنظیم می‌کند (جدول ۱).

ژن *cat* کد کننده آنزیم کاتالاز می‌باشد. تجزیه و تحلیل داده‌های بیوانفورماتیک نشان داد که dre-miR-146b نقش مهمی در تنظیم ژن کد کننده آنزیم کاتالاز ایفا می‌کند (جدول ۱).

ژن *Abcb4* نقش مهمی در کد کردن پروتئین‌های ABCB4 (ATP Binding Cassette Subfamily B Member 4) دارد که برای سنتز زیستی پروتئین ۳ مقاومت چند دارویی (MDR3) حائز اهمیت است. تجزیه و تحلیل داده‌های بیوانفورماتیک نشان داد که dre-miR-723 در تنظیم بیان ژن *Abcb4* دخیل است (جدول ۱).

جدول ۲: آنالیز miRNA ها در پایگاه اطلاعاتی DIANA با حد آستانه ۰/۷

امتیاز miTG	miRNA	نام ژن و کد شناسایی	کد نسخه برداری
0.99	dre-miR-723	ENSDARG00000043342 (gpx3)	ENSDART00000063625
0.96	dre-miR-740	ENSDARG00000033566 (cyp17a1)	ENSDART00000043156
0.96	dre-miR-737	ENSDARG00000005039 (gstp1)	ENSDART000000159326
0.94	dre-miR-740	ENSDARG00000021833 (ahr2)	ENSDART000000105762
0.92	dre-miR-137-	ENSDARG00000079653 (cyp2x6)	ENSDART00000064591
0.92	dre-miR-194a	3p (aldh3b1) ENSDARG00000013839	ENSDART00000020017
0.89	dre-miR-146b	ENSDARG00000004909 (cat)	ENSDART000000165005
0.87	dre-miR-2193	ENSDARG000000088116 (Gstm3)	ENSDART00000046182
0.85	dre-miR-429	ENSDARG000000029695 (pgp)	ENSDART00000039693
0.84	dre-miR-430i	ENSDARG00000042644 (Sod2)	ENSDART00000062556
0.84	dre-miR-199-	5p ENSDARG00000016649 (akr7a3)	ENSDART00000014871
0.81	dre-miR-722	ENSDARG00000092696 (cyp11a1)	ENSDART000000138887
0.81	dre-miR-3906	ENSDARG00000019236 (gsr)	ENSDART00000047050
0.81	dre-miR-740	ENSDARG00000018146 (gpx1a)	ENSDART00000025033
0.78	dre-miR-217	ENSDARG00000023537 (ahr1b)	ENSDART00000028787
0.78	dre-miR-93	ENSDARG00000006207 (gpx1b)	ENSDART00000015277
0.78	dre-miR-1388	ENSDARG00000033285 (gst02)	ENSDART00000041257
0.75	dre-miR-20a	ENSDARG00000027984 (gstz1)	ENSDART000000155104
0.73	dre-miR-740	ENSDARG00000015575 (cyp3c1)	ENSDART00000018676
0.73	dre-miR-723	ENSDARG00000010936 (abcb4)	ENSDART000000148456

شناسایی miRNAهای دخیل در تنظیم ژن‌های دخیل در فرایند سم‌زدایی پس از رونویسی نخستین گام در تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک است. براین اساس اطلاعات مربوط به miRNAها از پایگاه داده DIANA (پایگاه داده برای تجزیه و تحلیل یکپارچه تابع miRNA است استنتاج گردید. پایگاه DIANA یک منبع جامع برای داده‌های مرتبط با miRNA، از جمله تعاملات هدف miRNA، نمایه‌های بیان، و حاشیه نویسی‌های عملکردی است. در تحلیل‌های بیوانفورماتیک، الگوریتم‌های مختلف امتیازها یا سطوح اطمینان را برای نشان دادن قابلیت اطمینان پیش‌بینی‌ها ایجاد می‌کنند. سپس یک حد آستانه اعمال

می‌شود تا پیش‌بینی‌های زیر یک امتیاز معین را فیلتر کند و روی آنهایی که اعتماد بیشتری دارند تمرکز کند. در پایگاه داده DIANA، این امتیاز معمولاً نشان دهنده اطمینان پیش‌بینی تعامل بین miRNA و mRNA هدف آن است. در این مطالعه، حد آستانه ۰/۷ در نظر گرفته شده است که ممکن به این معنی باشد که فقط تعاملات با نمره ۰/۷ یا بالاتر قابل توجه در نظر گرفته می‌شوند. در زمینه پیش‌بینی هدف miRNA، اغلب بین دقت پیش‌بینی‌های مثبت و توانایی یافتن همه موارد مثبت بایستی تعادل برقرار شود. لذا تنظیم آستانه می‌تواند بر این تعادل تأثیر بگذارد. هرچقدر آستانه بالاتر باشد ممکن است دقت را افزایش دهد اما توانایی یافتن همه موارد مثبت کاهش یابد و بالعکس (جدول ۲). تعاملات با نمرات زیر حد آستانه ۰/۷ حذف گردید تا بر تعاملات با اطمینان بالا تمرکز شود.

تجزیه و تحلیل تعامل بین dre-miR-723 و ژن هدف آن *gpx3* (ENSDARG00000043342) با استفاده از امتیاز miTG برابر با ۰/۹۹ در پایگاه داده DIANA حاکی از نقش احتمالی dre-miR-723 در تنظیم بیان ژن *gpx3* از طریق اتصال به ناحیه ترجمه نشده ۳' mRNA (UTR) هدف است، که احتمالاً منجر به تخریب mRNA یا سرکوب ترجمه می‌شود (جدول ۲).

بر اساس تجزیه و تحلیل امتیاز miTG برابر با ۰/۹۶ در پایگاه داده DIANA، dre-miR-740 به طور بالقوه می‌تواند ژن ENSDARG00000033566، مربوط به *cyp17a1* در ژنوم گورخرماهی شناسایی و مورد هدف قرار دهد. این نتایج نشان می‌دهد که یک تعامل با اطمینان بالا بین dre-miR-740 و *cyp17a1* است که نقش تنظیمی این miRNA را در بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز هورمون استروئیدی در گورخرماهی وجود دارد (جدول ۲).

نتایج همچنین نشان دهنده وجود یک تعامل با امتیاز miTG برابر با ۰/۹۶، بین dre-miR-737 و mRNA ژن هدف ENSDARG00000005039 است که گلوکاتیون اس ترانسفراز را در گورخر ماهی کد می‌کند (جدول ۲). بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل اطلاعات بدست آمده از پایگاه DIANA مقدار امتیاز miTG برابر با ۰/۹۴، برای dre-miR-740 برای هدف قرار دادن mRNA ژن ENSDARG00000021833، که مربوط به گیرنده هیدروکربنی آریل ۲ (*ahr2*) در ژنوم گورخرماهی است، پیش‌بینی شده است (جدول ۲).

تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده از پایگاه DIANA بیانگر تعامل بین dre-miR-137-3p و dre-miR-194a به ترتیب با mRNA ژن‌های *aldh3b1* و *cyp2x6* با یک امتیاز miTG برابر با ۰/۹۲ است (جدول ۲). به همین ترتیب امتیاز miTG برای dre-miR-146b، dre-miR-2193 و dre-miR-429 به ترتیب در تنظیم بیان ژن‌های *cat*، *Gstm3* و *pgp* برابر با ۰/۸۹، ۰/۸۷ و ۰/۸۵ برآورد شده است (جدول ۲).

نتایج نشان دهنده وجود امتیاز miTG برابر با ۰/۸۴ برای dre-miR-430i و dre-miR-199-5p در تنظیم ترجمه mRNA مربوط به ژن‌های *sod2* و *akr7a3* است (جدول ۲).

امتیاز miTG برای dre-miR-722، dre-miR-3906 و dre-miR-740 در تنظیم بیان ژن‌های *gpr*، *cyp11a1* و *gsr* و *gpx1a* در حدود ۰/۸۱ پیش‌بینی شد (جدول ۲). در حالی که مقدار حد آستانه dre-miR-217، dre-miR-93 و dre-miR-1388 برای کنترل و تنظیم بیان ژن‌های *ahr1b*، *gpx1b* و *gst02* برآورد شده است (جدول ۲).

امتیاز miTG برای dre-miR-20a جهت تنظیم بیان ژن *gstz1*، ۰/۷۵ و حد آستانه dre-miR-740 و dre-miR-723 دخیل در تنظیم mRNA مربوط به ژن‌های *cyp3c1* و *abcb4* در حدود ۰/۷۳ برآورد شده است (جدول ۲). نتایج بدست آمده براساس کاهش امتیاز miTG تنظیم شده است. با کاهش امتیاز miTG، احتمال تعامل بین miRNA با mRNA ژن هدف کاهش می‌یابد.

بحث

در زمینه سم‌زدایی، miRNAها می‌توانند بیان ژن‌های دخیل در سم‌زدایی را با هدف قرار دادن رونوشت‌های mRNA تنظیم کنند. این فرآیند می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر ظرفیت سم‌زدایی گورخرماهی و توانایی آنها در مقابله با سموم محیطی داشته باشد.

مطالعات متعددی نقش miRNAها را در تنظیم ژن‌های سم‌زدایی در گونه‌های مختلف جانوری از جمله گورخرماهی و دیگر ماهی‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. تحقیقات انجام شده پیرامون نقش miRNAها در تنظیم بیان برخی از ژن‌های سیستم سم‌زدایی در سلول‌های کبدی، منجر به شناسایی چندین miRNA گردید که به طور متفاوتی در پاسخ به قرار گرفتن در معرض مواد شیمیایی بیان می‌شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که این miRNAها می‌توانند ژن‌های دخیل در مسیرهای سم‌زدایی را هدف قرار دهند (Chen, and Verfaillie, 2014). بررسی تأثیر miRNAها بر بیان ژن‌های سم‌زدایی در جنین گورخرماهی، نیز نشان داد که miRNAها می‌توانند ژن‌های دخیل در متابولیسم و سم‌زدایی بیگانه‌بیوتیک را مورد هدف قرار دهند (Nam et al., 2016). شناسایی برخی از miRNAهای کبدی نیز بر اهمیت این miRNAها در تنظیم ژن‌ها دخیل در عملکرد سیستم سم‌زدایی ماهی مداکا تأکید دارند (Li et al., 2016).

ژن *pgp* کد کننده P- گلیکوپروتئین است که یک پروتئین غشایی محسوب می‌شود و نقش مهمی در انتقال مواد مختلف از جمله داروها و بیگانه‌بیوتیک‌ها از طریق غشای سلولی دارد. این پروتئین یکی از اعضای خانواده حمل و نقل کاست اتصال ATP (ABC) است. P- گلیکوپروتئین به ویژه برای نقش خود در ایجاد مقاومت چند دارویی (MDR) در سلول‌های سرطانی شناخته شده است. در ماهی‌ها، P- گلیکوپروتئین می‌تواند با پمپاژ این مواد از سلول‌ها در دفاع در برابر سموم و بیگانه‌بیوتیک‌ها (مواد خارجی) نقش داشته باشد و به ارگان‌ها برای تحمل چالش‌های محیطی کمک کند. این پروتئین با ایجاد یک پمپ خروجی به سلول‌ها کمک می‌کند تا از قرار گرفتن در معرض بیگانه‌بیوتیک‌های مختلف، که مواد خارجی برای بدن هستند، از جمله داروها و سموم محیطی زنده بمانند. وجود P- گلیکوپروتئین در بافت‌های مختلف نیز با حذف فعال مواد مضر از سلول‌ها، به فرآیند طبیعی سم‌زدایی کمک می‌کند. از این‌رو، فعال شدن این پروتئین غشایی به عنوان یک مکانیسم دفاعی با جلوگیری از تجمع ترکیبات سمی در سلول‌ها عمل می‌کند و به حفظ هموستاز سلولی کمک می‌کند. بیان P- گلیکوپروتئین را می‌توان تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله قرار گرفتن در معرض آلاینده‌ها و مواد شیمیایی قرار داد. نتایج این مطالعه نشان داد که اگر *dre-miR-429* ژن P-glycoprotein را هدف قرار دهد، به طور بالقوه می‌تواند بیان آن را تنظیم کند.

dre-miR-740، *dre-miR-723* و *dre-miR-93* می‌تواند به ترتیب ژن‌های *gpx1a*، *Gpx3* و *gpx1b* را هدف قرار دهد، به طور بالقوه می‌تواند بیان ایزومرهای مختلف آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز را تنظیم کند. آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز می‌تواند با کاهش پراکسید هیدروژن و هیدروپراکسیدهای آلی، نقش مهمی در محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو ایفا می‌کند. این آنزیم‌ها در حفظ سلامت سلولی مهم هستند و در موجودات مختلف از جمله ماهی یافت می‌شوند. این تعامل می‌تواند پیامدهایی برای فرآیندهای سلولی شامل استرس اکسیداتیو و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی داشته باشد.

آنزیم‌های سیتوکروم P450 خانواده ای از آنزیم‌ها هستند که در متابولیسم ترکیبات مختلف درون‌زا و برون‌زا از جمله داروها و سموم نقش دارند (Blanco et al., 2016; Tian et al., 2021). در ماهی‌ها، ژن‌های *cp2x* یا *cyp2k6* در سم‌زدایی و دفع مواد خارجی از بدن نقش دارند. این آنزیم‌ها در تبدیل زیستی بیگانه‌بیوتیک‌ها (مواد شیمیایی خارجی) به مواد کم‌ضررتر کمک می‌کنند و می‌توانند بر پاسخ ماهی به آلاینده‌های محیطی تأثیر بگذارند. ژن‌های *Cyp3c1* کد کننده آنزیم‌های سیتوکروم P450 دخیل در سم‌زدایی و متابولیسم آلاینده‌های محیطی است. عملکردهای خاص و تنظیم *CYP17A1* در ماهی می‌تواند در بین گونه‌های مختلف، متفاوت باشد و فعالیت آن ممکن است تحت تأثیر عواملی مانند وضعیت تولید مثل، شرایط محیطی و ترکیبات مختل کننده غدد ترشحی درون‌ریز باشد. همچنین، ژن *cyp11a1* کد کننده سیتوکروم *P450 11A1 (CYP11A1)*، است که نقش مهمی در سنتز هورمون‌های استروئیدی ایفا می‌کند. این آنزیم در درجه اول در تبدیل کلسترول به پرگنولون، یک مرحله

کلیدی در بیوسنتز همه هورمون‌های استروئیدی، نقش دارد. در ماهی‌ها، مانند سایر مهره‌داران، CYP11A1 احتمالاً نقش مشابهی در استروئیدزایی دارد و به تولید هورمون‌های استروئیدی لازم برای فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف، از جمله تولید مثل و پاسخ به استرس کمک می‌کند. تنظیم و بیان ژن *cyp11a1* می‌تواند تحت تأثیر عواملی مانند سیگنال‌های هورمونی و شرایط محیطی، به ویژه ترکیبات مختل کننده غدد ترشحی درون‌ریز قرار گیرد. نتایج این مطالعه نشان داد که dre-miR-137، dre-miR-137 و dre-miR-740 می‌توانند ژن‌های *cyp2x*، *cp2x* و *Cyp3c1* را هدف قرار دهد، به طور بالقوه بیان این آنزیم سیتوکروم P450 را تنظیم کند.

آلدئید دهیدروژنازها (ALDHs) خانواده‌ای از آنزیم‌های دخیل در متابولیسم آلدئیدها هستند که محصولات واسطه‌ای از فرآیندهای مختلف سلولی هستند. این آنزیم‌ها در سم زدایی نقش دارند و در متابولیسم الکل و سایر ترکیبات درون‌زا و برون‌زا نقش دارند (Tran et al., 2015). داده‌های بیوانفورماتیک نشان داد که dre-miR-194a می‌تواند بیان ژن *Aldh3b1* را تنظیم کند.

ژن *Gstm3* (Glutathione S-Transferase Mu 3)، ژن *GstP1* (Glutathione S-Transferase Pi 1) و ژن *Gsto2* (Glutathione S-transferase omega-2) متعلق به خانواده گلوپروتئین (GST) است که آنزیم‌های دخیل در سم زدایی بیگانه بیوتیک‌ها و متابولیسم ترکیبات مختلف از جمله داروها و سموم محیطی را رمزگذاری می‌کند. گلوپروتئین‌ها اس ترانسفرازها (GSTs) در ترکیب گلوپروتئین به سوبستراهای خاص نیز نقش دارند (Tierbach et al., 2018; Banaee et al., 2023d). به ترتیب، آنزیم GSTP1 نقش مهمی در سم‌زدایی انواع مواد از جمله سرطان‌زا، آلاینده‌های محیطی و بیگانه بیوتیک‌ها ایفا می‌کند. این آنزیم با خنثی کردن ترکیبات بالقوه مضر که ممکن است به DNA، پروتئین‌ها یا لیپیدها آسیب برساند، به مکانیسم‌های دفاعی سلولی کمک می‌کند. آنزیم GSTO2 با کاتالیز کردن ترکیبات الکتروفیلیک با گلوپروتئین (GSH) در سم زدایی ترکیبات الکتروفیل نقش دارد. این ترکیب باعث می‌شود که این ترکیبات محلول‌تر در آب باشند و دفع آن‌ها از بدن را تسهیل می‌کند. GSTO2 در مکانیسم‌های دفاعی سلولی در برابر استرس اکسیداتیو نقش دارد. این آنزیم به محافظت از سلول‌ها در برابر اثرات مضر ترکیبات واکنشی کمک می‌کند. در حالی که ژن *GstZ1* (Glutathione S-transferase zeta 1) آنزیم اختصاصی گلوپروتئین اس ترانسفراز که به عنوان مالیل استواستات ایزومراز (MAAI) شناخته می‌شود و در متابولیسم تیروزین و فنیل آلانین نقش دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که dre-miR-223، dre-miR-1388 و dre-miR-20a می‌توانند با هدف قرار دادن ژن‌های *Gstm3*، *Gsto2* و *GstZ1*، بر سطح بیان آنها تأثیر معنی‌داری بگذارد.

ژن‌های Sod1 و Sod2 به ترتیب کد کننده سوپراکسید دیسموتاز ۱ و ۲ هستند که نقش مهمی در مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی سلولی، به ویژه در حذف رادیکال‌های سوپراکسید دارند. سه ایزوفرم اصلی SOD وجود دارد که شامل Cu/Zn-SOD (SOD1)، Mn-SOD (SOD2) و EC-SOD (SOD3) بر اساس کوفاکتور فلزی آنها طبقه بندی می‌شوند. سوپراکسید دیسموتاز ۱ (SOD1) در سیتوپلاسم، هسته و پراکسی زوم سلول‌ها یافت می‌شوند. آنزیم SOD1 واجد مس و روی به عنوان کوفاکتورهای ضروری هستند و در تغییر شکل رادیکال‌های سوپراکسید (-O₂) را به پراکسید هیدروژن (H₂O₂) و اکسیژن مولکولی (O₂) ایفای نقش می‌کنند. در حالی که سوپراکسید دیسموتاز ۲ (SOD2) در عمدتاً در میتوکندری، اندامک‌های سلولی مسئول تولید انرژی سلولی، یافت می‌شود. SOD2 حاوی منگنز به عنوان کوفاکتور است که برای عملکرد آنزیمی آن بسیار مهم است. SOD2 به طور خاص رادیکال‌های سوپراکسید تولید شده در میتوکندری را در طول فسفوریلاسیون اکسیداتیو هدف قرار می‌دهد. این آنزیم، رادیکال‌های سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی تبدیل می‌کند و استرس اکسیداتیو را در میتوکندری کاهش می‌دهد (Banaee et al., 2023a, b). در حالی که، SOD3 در فضای خارج سلولی یافت می‌شود و به پروتئوگلیکان‌های سولفات هپارین روی سطح سلول متصل می‌شود. این آنزیم به محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب سوپراکسید کمک می‌کند (Choi et al., 2020). نتایج این مطالعه نشان داد که dre-miR-430i و dre-miR-150 می‌توانند ژن‌های *Sod1* و *Sod2* را مورد هدف قرار دهد و سطح بیان این ژن‌ها را تغییر دهد.

ابرخانواده آلدو-کتو ردوکتاز شامل آنزیم‌هایی است که احیای گروه‌های کربونیل را در بسترهای مختلف از جمله آلدئیدها و کتون‌ها کاتالیز می‌کنند. این آنزیم‌ها اغلب از نیکوتین آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات (NADPH) به عنوان کوفاکتور در این واکنش‌ها استفاده می‌کنند. زیرخانواده AKR7، که AKR7A3 به آن تعلق دارد، به دلیل مشارکت در فرآیندهای سم‌زدایی، از جمله متابولیسم برخی بیگانه‌بیوتیک‌ها و ترکیب ترکیبات درون‌زا و برون‌زا با گلوکوتایون شناخته شده است. کونژوگاسیون گلوکوتایون یک مکانیسم رایج در بدن برای سم‌زدایی از ترکیبات الکتروفیل است. AKR7A3 ممکن است با کاتالیز کردن تبدیل بیگانه‌بیوتیک‌ها به اشکال کمتر سمی، در محافظت از سلول‌ها در برابر اثرات مضر واسطه‌های فعال و بیگانه‌بیوتیک‌ها نقش داشته باشد. این بخشی از دفاع سلولی گسترده‌تر در برابر استرس اکسیداتیو و حفظ هموستاز سلولی است (Qi et al., 2021). براساس نتایج بدست آمده dre-miR-199 می‌تواند با هدق قرار دادند ژن *akr7a3*، بیان آنزیم‌های مربوطه را تنظیم کند.

ژن *gsr* کد کننده آنزیم گلوکوتایون ردوکتاز است که نقش مهمی در حفظ تعادل ردوکس سلولی دارد. گلوکوتایون یک تیول تری پپتیدی ضروری متشکل از گلوکاتامات، سیستئین و گلیسین است که به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها عمل می‌کند. گلوکوتایون با خنثی کردن گونه‌های فعال اکسیژنی محافظت از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو کمک می‌کند. گلوکوتایون ردوکتاز (GSR) در بازسازی و نوسازی گلوکوتایون اکسید شده (GSSG) به شکل احیا شده آن (GSH) نقش دارد و به آن اجازه می‌دهد تا عملکردهای آنتی‌اکسیدانی خود را ادامه دهد. گلوکوتایون به عنوان یک عامل کاهش‌دهنده عمل می‌کند و در فرآیندهای سلولی مختلف از جمله سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، محافظت در برابر استرس اکسیداتیو و حفظ تعادل ردوکس سلولی شرکت می‌کند (Derikvandy et al., 2020; Banaee et al., 2023d). براساس نتایج بدست آمده dre-miR-3906 می‌تواند بر سطح بیان ژن *gsr* تاثیر گذارد.

گیرنده هیدروکربنی آریل (AHR) نقش کلیدی در پاسخ سلولی به سموم خاص محیطی و بیگانه‌بیوتیک‌ها، از جمله هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) و دارد. ژن‌های *ahr1b* و *ahr2* مسئول کد کردن پروتئین‌های موسوم به گیرنده هیدروکربنی آریل (AHR) است. گیرنده هیدروکربنی آریل (AhR) یک فاکتور رونویسی فعال شده با لیگاند است که نقش کلیدی در میانجی‌گری اثرات برخی از سموم محیطی و بیگانه‌بیوتیک‌ها، از جمله هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs)، هیدروکربن‌های آروماتیک هالوژنه و دیوکسین‌ها دارد. با این حال، نقش اصلی AHR سم‌زدایی مستقیم نیست، اما یک تنظیم کننده حیاتی فرآیند سم‌زدایی از طریق القای آنزیم‌های دخیل در متابولیسم بیگانه‌بیگانه است. پروتئین AhR بخشی از یک مسیر سیگنال دهی است که در متابولیسم این آلاینده‌های محیطی نقش دارد. هنگامی که با اتصال به لیگاندهای خاص فعال می‌شود، AhR به هسته منتقل می‌شود، جایی که با سایر پروتئین‌ها کمپلکس می‌شود و به عنوان یک فاکتور رونویسی عمل می‌کند. سپس این کمپلکس بیان ژن‌های هدف درگیر در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف از جمله سم‌زدایی و متابولیسم بیگانه بیگانه را تنظیم می‌کند. مسیر AhR برای پاسخ بدن به استرس‌های محیطی ضروری است و در تنظیم پاسخ‌های ایمنی، رشد سلولی و تمایز نقش دارد (Segner et al., 2021). با این حال، فعال شدن مداوم یا قرار گرفتن در معرض لیگاندهای خاص می‌تواند اثرات نامطلوبی داشته باشد و با مسائل مختلف سلامتی مرتبط است. فعال‌سازی AHR منجر به القای آنزیم‌های متابولیزه کننده بیگانه‌بیوتیک فاز یک، مانند آنزیم‌های سیتوکروم P450 می‌شود. علاوه بر این، فعال‌سازی AHR می‌تواند موجب فعال شدن گلوکوتایون اس ترانسفراز و UDP-گلوکوزیل ترانسفراز می‌شود. این آنزیم‌ها محصولات متابولیسم فاز یک را با مولکول‌های درون‌زا مانند گلوکوتایون یا گلوکوروبیک اسید ترکیب می‌کنند و حلالیت آنها را بیشتر می‌کنند و دفع را تسهیل می‌کنند (Segner et al., 2021). نتایج نشان داد که dre-miR-217 و dre-miR-740 به ترتیب بیان ژن‌های *ahr1b* و *ahr2* تنظیم می‌کند.

ژن *cat* کد کننده آنزیم کاتالاز است که نقش مهمی در محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از ترکیبات فعال اکسیژنی (ROS) ایفا می‌کند. این آنزیم در پراکسی زوم سلول‌ها وجود دارد و مسئول تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن است و از تجمع این ترکیب بالقوه مضر جلوگیری می‌کند (Derikvandy et al., 2020; Banaee et al., 2023b, c, d). dre-miR-146b می‌تواند با هدف قرار دادن ژن *cat* سطح بیان آن را تغییر دهد.

ژن *Abcb4* (ATP Binding Cassette Subfamily B Member 4) ژنی است که پروتئینی را که در ابرخانواده انتقال دهنده کاست اتصال (ABC) ATP را کد می‌کند. ژن *Abcb4* به عنوان ژن مقاومت چند دارویی ۳ (MDR3) نیز شناخته می‌شود. محصول پروتئینی *Abcb4* یک انتقال دهنده فسفولیپید است که عمدتاً در کبد یافت می‌شود و در انتقال فسفولیپیدها، به ویژه فسفاتیدیل کولین، از طریق غشای سلولی نقش دارد. پروتئین ABCB4 در غشای کانالی سلول‌های کبدی قرار دارد و برای ترشح فسفولیپیدها در صفرا ضروری است. این فرآیند برای تشکیل صفرا، که نقش کلیدی در هضم و جذب چربی‌های رژیم غذایی دارد، ضروری است (Yin et al., 2016).

در زمینه سم زدایی، ABCB4 در حذف مواد سمی بالقوه از کبد به صفرا نقش دارد. پروتئین ABCB4 با انتقال فسفولیپیدها به ترکیب صفرا کمک می‌کند که برای امولسیون سازی و دفع اسیدهای صفراوی و سایر ترکیبات چربی دوست ضروری است. حذف موثر مواد سمی از طریق صفرا یک جنبه ضروری از مکانیسم‌های سم زدایی بدن است. علاوه بر این، ABCB4 با محافظت از کبد در برابر اثرات مضر نمک‌های صفراوی مرتبط است. عملکرد مناسب ABCB4 برای جلوگیری از تجمع اجزای سمی صفرا در سلول‌های کبدی، که می‌تواند منجر به آسیب کبدی شود، حیاتی است (Yin et al., 2016). براساس نتایج بدست آمده، dre-miR-723 می‌تواند نقش معنی‌داری در تنظیم بیان ژن *Abcb4* ایفا کند.

مطالعه فعل و انفعالات miTG برای درک شبکه‌های نظارتی درگیر در فرآیندهای بیولوژیکی مختلف، از جمله توسعه، تمایز و بیماری بسیار مهم است. شناسایی فعل و انفعالات miTG می‌تواند بینش‌هایی را در مورد نقش‌های عملکردی microRNA ها و تأثیر آنها بر تنظیم بیان ژن ارائه دهد. براساس نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌های پایگاه DIANA، مقدار عددی یا امتیاز miTG برای dre-miR-723، dre-miR-740، dre-miR-737، dre-miR-740، dre-miR-137-3p، dre-miR-199-5p و dre-miR-194a به منظور تعیین نرخ تعامل با mRNA ژن‌های هدف بین ۰/۹۹-۰/۹۲ برآورد شده است. به همین ترتیب، مقدار عددی یا امتیاز miTG برای dre-miR-146b، dre-miR-2193، dre-miR-429، dre-miR-430i، dre-miR-3906 و dre-miR-722 جهت تعیین سطح تعامل با mRNA ژن‌های هدف بین ۰/۸۹-۰/۸۱ تخمین زده شد. در حالی که، مقدار عددی یا امتیاز miTG برای dre-miR-217، dre-miR-93، dre-miR-1388، dre-miR-20a، dre-miR-740 و dre-miR-723 برای تعامل با mRNA ژن‌های هدف بین ۰/۷۸-۰/۷۳ است.

اگر سطح یک miRNA خاص افزایش یابد، ممکن است منجر به افزایش هدف‌گیری اهداف mRNA آن شود و در نتیجه برهمکنش‌های miTG بیشتر شود. این پدیده می‌تواند به دلیل تغییر رونویسی ژن miRNA یا کاهش تخریب مولکول miRNA رخ دهد. علاوه بر این، افزایش برهم‌کنش‌های miTG همچنین می‌تواند نشان‌دهنده افزایش میل پیوند بین mRNA و miRNA هدف آن باشد. این امر می‌تواند ناشی از تغییر در مکمل بودن توالی بین miRNA و mRNA هدف، تغییرات در ساختار ثانویه RNA یا وجود کوفاکتورهایی باشد که تعامل miRNA-mRNA را تثبیت می‌کنند، باشد. در شرایط فیزیولوژیکی طبیعی، تغییرات در فعل و انفعالات miTG می‌تواند به عنوان بخشی از مکانیسم‌های تنظیمی در پاسخ به محرک‌های مختلف یا در طی مراحل مختلف رشد رخ دهد. در حالی که در برخی موارد، افزایش تعاملات miTG ممکن است با بروز برخی از بیماری‌های ناشی از قرار گرفتن در معرض آلاینده‌های شیمیایی و زیستی همراه باشد. از این رو، بیان نامنظم miRNA یا هدف‌گیری تغییر یافته miRNA می‌تواند با ایجاد اختلال در الگوهای بیان ژن طبیعی به فرآیندهای پاتولوژیک کمک کند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه از رویکرد بیوانفورماتیک برای شناسایی و اعتبار سنجی تعاملات miRNA-هدف و بررسی تأثیر آنها بر بیان ژن استفاده شده است. یکی از یافته‌های کلیدی این مطالعه شناسایی برهمکنش‌های جدید miRNA-هدف است که قبلاً در گورخرماهی گزارش نشده بود. نتایج این مطالعه نشان داد که با ادغام پروفایل بیان miRNA و تجزیه و تحلیل بیان ژن، miRNA‌هایی شناسایی شد که به طور متفاوت در پاسخ به قرار گرفتن در معرض مواد شیمیایی بیان می‌شوند و ژن‌های هدف

مربوطه آن‌ها که در مسیرهای سم‌زدایی دخیل هستند، را تنظیم کنند. این اطلاعات می‌تواند بینش‌های ارزشمندی را در مورد شبکه نظارتی زیربنایی فرآیند سم‌زدایی در گورخرماهی ارائه دهد. علاوه بر این، این مطالعه، همپوشانی قابل توجهی را بین miRNA های شناسایی شده در تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک و موارد گزارش شده در مطالعات قبلی نشان داد. این همپوشانی یک مکانیسم تنظیمی حفاظت شده را در شرایط مختلف تجربی نشان می‌دهد و اهمیت miRNAها را در تعدیل و تنظیم بیان ژن دخیل در سم‌زدایی در گورخرماهی را برجسته می‌کند.

References:

- Badr, A.A., Banaee, M. and Heidarieh, M., 2022. Bioinformatics study of microRNAs effect on the expression of genes involved in the process of tissue repair and regeneration of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Sciences*, 10(2), pp.126-133. Dor: 20.1001.1.23225351.1401.10.19.11.1
- Banaee, M. and Sagvand, S., 2019. Bioinformatics evaluation of the miRNAs effect on expression of genes involved in neurogenesis process in zebrafish (*Danio rerio*). 7(3), pp. 73-88. doi: 10.22124/japb.2018.10814.1258
- Banaee, M., Badr, A.A. and Vazirzadeh, A., 2024. Bioinformatics study of the role of miRNAs in regulating the expression of genes involved in sexual maturity and reproduction in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquaculture Sciences*, 12(1), pp. 23-28.
- Banaee, M., Badr, A.A., Multisanti, C.R., Haghi, B.N. and Faggio, C., 2023. The toxicity effects of the individual and combined exposure of methyl tert-butyl ether (MTBE) and tire rubber powder (RP) on Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 274, pp.109759. doi: 10.1016/j.cbpc.2023.109759.
- Banaee, M., Faraji, J., Amini, M., Multisanti, C.R. and Faggio, C., 2023. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) physiological response to microplastics and enrofloxacin: Novel pathways to investigate microplastic synergistic effects on pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 261, pp.106627. doi: 10.1016/j.aquatox.2023.106627.
- Banaee, M., Impellitteri, F., Multisanti, C.R., Sureda, A., Arfuso, F., Piccione, G. and Faggio, C., 2023. Evaluating silymarin extract as a potent antioxidant supplement in diazinon-exposed rainbow trout: oxidative stress and biochemical parameter analysis. *Toxics*, 11(9), pp.737. doi: 10.3390/toxics11090737.
- Banaee, M., Sagvand, S., Sureda, A., Amini, M., Haghi, B.N., Sopjani, M. and Faggio, C., 2023. Evaluation of single and combined effects of mancozeb and metalaxyl on the transcriptional and biochemical response of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 268, pp.109597. doi: 10.1016/j.cbpc.2023.109597.
- Banaee, M., Zeidi, A., Sinha, R. and Faggio, C., 2023. Individual and combined toxic effects of Nano-ZnO and polyethylene microplastics on mosquito fish (*Gambusia holbrooki*). *Water*, 15(9), pp.1660. doi: 10.3390/w15091660
- Blanco, M., Fernandes, D., Medina, P., Blázquez, M. and Porte, C., 2016. Drosiprenone intake alters plasmatic steroid levels and cyp17a1 expression in gonads of juvenile sea bass. *Environmental pollution*, 213, pp.541-548. doi: 10.1016/j.envpol.2016.03.007
- Chen, Y. and Verfaillie, C.M., 2014. Micro RNA s: the fine modulators of liver development and function. *Liver International*, 34(7), pp.976-990. doi: 10.1111/liv.12496.
- Chen, Y., Xiao, J., Zhang, X. and Bian, X., 2016. MicroRNAs as key mediators of hepatic detoxification. *Toxicology*, 368, pp.80-90. doi: 10.1016/j.tox.2016.08.005
- Choi, B.S., Park, J.C., Kim, M.S., Han, J., Kim, D.H., Hagiwara, A., Sakakura, Y., Hwang, U.K., Lee, B.Y. and Lee, J.S., 2020. The reference genome of the selfing fish *Kryptolebias hermaphroditus*: Identification of phases I and II detoxification genes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 35, pp.100684. doi: 10.1016/j.cbd.2020.100684.
- Derikvandy, A., Pourkhabbaz, H.R., Banaee, M., Sureda, A., Haghi, N. and Pourkhabbaz, A.R., 2020. Genotoxicity and oxidative damage in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to effluent from ethyl alcohol industry. *Chemosphere*, 251, pp.126609. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126609.
- Gaaied, S., Oliveira, M., Le Bihanic, F., Cachot, J. and Banni, M., 2019. Gene expression patterns and related enzymatic activities of detoxification and oxidative stress systems in zebrafish larvae exposed to the 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide. *Chemosphere*, 224, pp.289-297. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.02.125.
- Jia, Z.Q., Zhang, Y.C., Huang, Q.T., Jones, A.K., Han, Z.J. and Zhao, C.Q., 2020. Acute toxicity, bioconcentration, elimination, action mode and detoxification metabolism of broflanilide in zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of hazardous materials*, 394, pp.122521. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122521

- Kloosterman, W.P., Steiner, F.A., Berezikov, E., de Bruijn, E., van de Belt, J., Verheul, M., Cuppen, E. and Plasterk, R.H., 2006. Cloning and expression of new microRNAs from zebrafish. *Nucleic Acids Research*, 34(9), pp.2558-2569. doi: 10.1093/nar/gkl278.
- Ku, P., Wang, C., Nie, X., Ou, R. and Li, K., 2018. Regulation of pregnane-X-receptor and microRNAs on detoxification-related genes expressions in *Mugilogobius abei* under the exposure to diclofenac. *Environmental pollution*, 233, pp.395-406. doi: 10.1016/j.envpol.2017.10.080.
- Li, J.W., Lin, X., Tse, A., Cheung, A., Chan, T.F., Kong, R.Y.C., Lai, K.P. and Wu, R.S.S., 2016. Discovery and functional characterization of novel miRNAs in the marine medaka *Oryzias melastigma*. *Aquatic Toxicology*, 175, pp.106-116. doi: 10.1016/j.aquatox.2016.03.013.
- Nam, H.S., Hwang, K.S., Jeong, Y.M., Ryu, J.I., Choi, T.Y., Bae, M., Son, W.C., You, K.H., Son, H.Y. and Kim, C.H., 2016. Expression of miRNA-122 induced by liver toxicants in zebrafish. *BioMed Research International*, 2016. doi: 10.1155/2016/1473578.
- Qi, H., Schmöhl, F., Li, X., Qian, X., Tabler, C.T., Bennewitz, K., Sticht, C., Morgenstern, J., Fleming, T., Volk, N. and Hausser, I., 2021. Reduced acrolein detoxification in akr1a1a zebrafish mutants causes impaired insulin receptor signaling and microvascular alterations. *Advanced Science*, 8(18), pp.2101281. doi: 10.1002/advs.202101281.
- Riffo-Campos, Á.L., Riquelme, I. and Brebi- Mievile, P., 2016. Tools for sequence-based miRNA target prediction: what to choose? *International journal of molecular sciences*, 17(12), pp.1987. doi: 10.3390/ijms17121987.
- Segner, H., Bailey, C., Tafalla, C. and Bo, J., 2021. Immunotoxicity of xenobiotics in fish: a role for the aryl hydrocarbon receptor (AhR)? *International journal of molecular sciences*, 22(17), pp.9460. doi: 10.3390/ijms22179460.
- Tai, J.K.A.C. and Freeman, J.L., 2020. Zebrafish as an integrative vertebrate model to identify miRNA mechanisms regulating toxicity. *Toxicology Reports*, 7, pp.559-570. doi: 10.1016/j.toxrep.2020.03.010.
- Tian, J., Li, Y., Fu, H., Ren, L., He, Y., Zhai, S., Yang, B., Li, Q., Liu, N. and Liu, S., 2021. Physiological role of CYP17A1-like in cadmium detoxification and its transcriptional regulation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Science of The Total Environment*, 796, pp.149039. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149039.
- Tierbach, A., Groh, K.J., Schönenberger, R., Schirmer, K. and Suter, M.J.F., 2018. Glutathione S-transferase protein expression in different life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicological Sciences*, 162(2), pp.702-712. doi: 10.1093/toxsci/kfx293.
- Tran, S., Nowicki, M., Chatterjee, D. and Gerlai, R., 2015. Acute and chronic ethanol exposure differentially alters alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activity in the zebrafish liver. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 56, pp.221-226. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.09.011
- Wienholds, E., Koudijs, M.J., van Eeden, F.J., Cuppen, E. and Plasterk, R.H., 2003. The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development. *Nature genetics*, 35(3), pp.217-218. doi: 10.1038/ng1251.
- Wu, H., Gao, C., Guo, Y., Zhang, Y., Zhang, J. and Ma, E., 2014. Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Pesticide biochemistry and physiology*, 115, pp.9-14. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.07.010.
- Yao, F., Zhao, M., Du, Y., Chang, G., Li, C., Zhu, R., Cai, C. and Shao, S., 2023. Transcriptome Analysis of Deoxynivalenol (DON)-Induced Hepatic and Intestinal Toxicity in Zebrafish: Insights into Gene Expression and Potential Detoxification Pathways. *Toxins*, 15(10), pp.594. doi: 10.3390/toxins15100594
- Yin, H., Bai, P., Miao, P., Chen, M., Hu, J., Deng, X. and Yin, J., 2016. Functional expressions of adenosine triphosphate-binding cassette transporters during the development of zebrafish embryos and their effects on the detoxification of cadmium chloride and β -naphthoflavone. *Journal of Applied Toxicology*, 36(7), pp.925-935. doi: 10.1002/jat.3225.