**Animal Production Research**

Vol. 15, No. 1, 2026 (25-43)
doi: 10.22124/ar.2025.31279.1912
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

**RESEARCH PAPER** **OPEN ACCESS**

# Predictive analysis of miRNA interactions with *RPS28* and *RPL31* ribosomal genes and their role in the immune response of chickens to avian influenza infection

**J. Shirani Shamsabadi[1]*, M. Ghaderi-Zefrehei[2]**

1. Department of Animal Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
2. Department of Animal Science, Agricultural Faculty, Yasouj University, Yasouj, Iran

(Received: 11-05-2025 – Revised: 30-05-2025 – Accepted: 03-06-2025 – Available online: 03-06-2025)

**Abstract**

**Introduction:** MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNA molecules, typically 18–24 nucleotides in length, that regulate gene expression post-transcriptionally by binding to complementary sequences in target mRNAs. This interaction can lead to mRNA degradation or translational repression. miRNAs play essential roles in various biological processes, including cell growth, differentiation, apoptosis, metabolism, and immune responses. In poultry, miRNAs are particularly important in modulating immune responses to viral infections such as avian influenza. These molecules can either enhance host defense mechanisms or be exploited by viruses to facilitate infection. The discovery of miRNAs has revolutionized our understanding of gene regulatory networks and opened new avenues for research in genomics, bioinformatics, and infectious disease biology. This study aimed to identify and analyze key miRNAs involved in the immune response of chickens to avian influenza, focusing on their predicted interactions with two ribosomal genes of *RPS28* and *RPL31*.

**Materials and methods:** Two ribosomal genes (*RPS28* and *RPL31*) were selected based on prior transcriptomic analysis using microarray data (GSE96837) from the GEO/NCBI database. The reference genome *Gallus gallus* GRCg6a (GenBank: GCA_000002315.5) was used for bioinformatic analyses. The tools4miRs platform was employed to predict miRNA–mRNA interactions, integrating 10 algorithms including TargetSpy, miRanda, RNAhybrid, TargetScan, DIANA-microT, MicroTar, miRMap, PITA, RNA22, and Guugle. These tools assess binding potential based on parameters such as free energy, seed sequence complementarity, and evolutionary conservation. Identified miRNAs were cross-referenced with the miRBase database to confirm their annotation status.

**Results and discussion:** Eleven miRNAs (gga-miR-1593, gga-miR-1609, gga-miR-194, gga-miR-214, gga-miR-3532-3p, gga-miR-6567-3p, gga-miR-6579-5p, gga-miR-6612-5p, gga-miR-6642-3p, gga-miR-7477-5p, and gga-miR-708-5p) were analyzed for their interactions with *RPS28* and *RPL31*. For *RPL31*, gga-miR-6642-3p and gga-miR-3532-3p emerged as the strongest candidates, supported by four independent tools and possessing 15 and 12 binding sites, respectively. For *RPS28*, gga-miR-6567-3p, gga-miR-6642-3p, gga-miR-7477-5p, and gga-miR-6579-5p were confirmed by five tools and had 8-10 binding sites, indicating strong regulatory potential. Comparative analysis revealed that gga-miR-6642-3p had high regulatory potential for both genes, although binding patterns varied due to gene-specific sequence and structural differences. These findings suggest specificity and overlap in miRNA function across biological pathways. Experimental validation is essential to confirm these bioinformatic predictions. Ribosomal gene expression changes have been linked to immune responses and stress tolerance in poultry. During viral outbreaks such as avian influenza, ribosomal gene expression patterns shift, influencing inflammatory and immune responses. Understanding these changes can aid in vaccine development

* Corresponding author: jash4343@gmail.com

and disease control strategies. Ribosomal genes are vital for protein synthesis and cellular function, directly impacting poultry growth, development, and health. Located in nucleolus organizer regions (NORs), these genes vary in copy number across poultry lines, correlating with phenotypic traits and breeding responses. For example, white and brown laying hens exhibit different ribosomal gene profiles, affecting protein synthesis capacity and physiological development. *RPL3L* has been identified as a key gene associated with muscle growth and body weight, influencing skeletal muscle proliferation and differentiation. Mutations in this gene may serve as molecular markers for breeding programs. Ribosomal genes also play roles in immune responses. Their expression changes during infections such as avian influenza, offering insights into disease mechanisms and potential therapeutic targets. Microbiota profiling using 16S rRNA sequencing has furthered our understanding of gut health and its impact on poultry nutrition and productivity. Modern technologies like RNA-Seq and bioinformatic network analysis have enhanced our ability to study ribosomal gene function across tissues and developmental stages, contributing to improved breeding and production management.

**Conclusions:** This comprehensive in silico analysis highlights the regulatory potential of specific miRNAs in the immune response of chickens to avian influenza. miRNAs such as gga-miR-214, gga-miR-194, gga-miR-7477-5p, and gga-miR-6642-3p demonstrate strong interactions with *RPS28* and *RPL31* ribosomal genes, suggesting roles in antiviral defense and cellular regulation. These findings provide a foundation for future experimental validation and may contribute to the development of miRNA-based strategies for enhancing disease resistance and improving poultry health. The integration of network analysis and bioinformatics offers a powerful model for studying miRNA roles in other diseases and species, paving the way for innovative approaches in veterinary medicine and bioelectronics. Further functional studies are recommended to evaluate the efficacy of epigenetic interventions targeting these miRNAs in managing avian influenza infections.

**Keywords:** Immune response, miRNAs, Ribosomal genes, Fowl, Avian influenza virus

**Ethics statement:** This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

**Data availability statement:** The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of interest:** The authors declare no conflicts of interest.

**Funding:** The authors received no specific funding for this project.

**How to cite this article:**

Shirani Shamsabadi, J., & Ghaderi-Zefrehei, M. (2026). Predictive analysis of miRNA interactions with *RPS28* and *RPL31* ribosomal genes and their role in the immune response of chickens to avian influenza infection. *Animal Production Research*, *15*(1), 25-43. doi: 10.22124/ar.2025.31279.1912

تحقیقات تولیدات دامی

سال پانزدهم/شماره اول/بهار ۱۴۰۵ (۴۳-۲۵)

مقاله پژوهشی

# تحلیل پیش‌بینی تعاملات miRNA با ژن‌های ریبوزومی *RPS28* و *RPL31* و نقش آن‌ها در پاسخ ایمنی ماکیان به عفونت ویروس آنفلوآنزا

**جواد شیرانی شمس‌آبادی[1*]، مصطفی قادری زفره‌ای[2]**

۱- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۱ – تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۳/۰۹ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۳ – تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۴/۰۳/۱۳)

## چکیده

ریزRNAها (miRNAها) مولکول‌های RNA کوچک نارمزگر هستند که با طول تقریبی برابر با ۱۸ تا ۲۵ نوکلئوتید از راه جفت شدن با توالی‌های مکمل در mRNA هدف، پایداری آن و ترجمه ژن‌ها را در سطح پسارونویسی تنظیم می‌کنند. این مولکول‌ها، نقش مهمی در فرآیندهای زیستی گوناگون از جمله رشد، تمایز سلولی، سوخت و ساز، مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول و همچنین، بیماری‌های گوناگونی همچون سرطان و بیماری‌های عفونی دارند. در ماکیان، miRNAها نه‌تنها در رشد و سوخت و ساز بلکه به‌ویژه در تنظیم پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زایی مانند ویروس آنفلوآنزا تأثیرگذارند، به‌طوری که تغییرات بیان آن‌ها می‌تواند به‌عنوان بخشی از سازوکار دفاعی میزبان عمل کند یا به‌وسیله ویروس برای تسهیل فرآیند عفونت دست‌کاری شود. هدف این تحقیق، شناسایی و تحلیل miRNAهای کلیدی مرتبط با پاسخ ایمنی طیور به عفونت آنفلوآنزا و همچنین، بررسی تعامل آن‌ها با دو ژن اساسی ریبوزومی، *RPS28* و *RPL31*، بود. این دو ژن از یک پژوهش دیگر استخراج شده بودند که داده‌های ریزآرایه DNA مربوط به عفونت آنفلوآنزای ماکیان (GSE96837) را از پایگاه GEO/NCBI به‌دست آورده و با استفاده از تحلیل شبکه هم‌بیانی ژن‌ها، شناسایی کرده بودند. سپس، تعاملات miRNA–mRNA با استفاده از ابزار جامع tools4miRs.org و با چندین الگوریتم مختلف (شامل TargetSpy، Miranda و RNAhybrid) پیش‌بینی شد. نتایج نشان داد miRNAهایی چون *gga-mir-214*، *gga-mir-194*، *gga-mir-7477-5p* و *gga-mir-6642-3p* با توجه به تعداد جایگاه‌های اتصال و تأیید چندین ابزار مستقل، از پتانسیل بالایی در تنظیم مسیرهای مرتبط با آپوپتوز، تنظیم سیتوکاین‌ها و کنترل ایمنی ضدویروسی برخوردار هستند.

**واژه‌های کلیدی:** پاسخ ایمنی، ریزRNAها، ژن‌های ریبوزومی، ماکیان، ویروس آنفلوآنزا

* نویسندهٔ مسئول: jash4343@gmail.com

doi: 10.22124/ar.2025.31279.1912

**مقدمه**

مولکول RNA یکی از مولکول‌های بنیادی در ساختار و عملکرد سلول‌های زنده محسوب می‌شود که نقش‌های متعددی در فرآیندهای زیستی اساسی ایفا می‌کند. این مولکول علاوه بر نقش کلاسیک خود به‌عنوان miRAN، که حاوی اطلاعات ژنتیکی رونویسی‌شده از DNA و مورد استفاده در ساخت پروتئین است (Siekevitz & Zamecnik, 1981; Saka et al., 2009)، دارای انواع مختلفی با عملکردهای غیرکدکننده نیز است. در این زمره، ssRNA به تمام مولکول‌های RNA اطلاق می‌شود که به‌صورت یک رشته واحد وجود دارند و dsRNA که بیشتر در ژنوم ویروس‌ها یا مسیرهای تنظیم ژنی مانند RNA مداخله‌گر مشاهده می‌شود. ssRNA شامل انواع مختلفی است: tRNA، rRNA، siRNA، piRNA و lncRNA. بنابراین، ssRNA یک دسته کلی است و miRNA تنها یکی از انواع آن محسوب می‌شود. از جمله مهم‌ترین RNAهای غیرکدکننده می‌توان به rRNA و tRNA اشاره کرد. rRNA به‌عنوان یکی از اجزای اصلی ریبوزوم‌ها، ساختار سه‌بعدی و فعالیت کاتالیزوری لازم برای ترجمه را فراهم می‌کند (Siekevitz & Zamecnik, 1981). همچنین، tRNA به‌عنوان حمل‌کننده اسیدهای آمینه به محل ترجمه، نقش حیاتی در دقت و کارآیی ساخت پروتئین ایفا می‌کند (Hoagland et al., 1958; Siekevitz & Zamecnik, 1981). در کنار این RNAهای قدیمی، RNAهای غیرکدکننده با طول متغیر نیز در سال‌های اخیر به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی فرآیندهای سلولی شناسایی شده‌اند. به‌عنوان مثال، snRNA در تشکیل کمپلکس اسپلایسوزوم و پردازش پیش‌نویس mRNA در هسته سلول دخیل هستند (Lerner et al., 1980). یکی از تحولات مهم در زمینه RNAهای غیرکدکننده، کشف miRNA بود که در اکتبر سال ۲۰۰۱ به‌وسیله سه پژوهش مستقل در مجله Science گزارش شد (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee & Ambros, 2001). این RNAهای کوتاه (معمولاً ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتیدی) قادرند از مسیر تعامل با mRNAهای هدف، بیان ژن‌ها را در سطح پسارونویسی تنظیم کنند. miRNAها در تنظیم فرآیندهای زیستی متعددی از جمله رشد، تمایز سلولی، مرگ خود خواسته سلول و پاسخ ایمنی نقش دارند و امروزه به‌عنوان عناصر کلیدی در سازوکارهای بیماری‌زایی و همچنین، تنظیم هموستاز سلولی شناخته شده‌اند. این کشف، نقطه عطفی در درک محققان از شبکه‌های تنظیمی ژنی بود و منجر به گسترش چشمگیر پژوهش‌هایی در زمینه RNAهای تنظیمی در سرتاسر جهان شد.

امروزه، شناسایی و بررسی miRNAها و سایر RNAهای غیرکدکننده در موجودات مختلف، از جمله طیور، به یکی از زمینه‌های فعال تحقیقاتی در علوم زیستی تبدیل شده است. miRNAها عمدتاً از راه اتصال جزئی یا کامل به mRNAهای هدف، ترجمه آنها را مهار یا این mRNAها را برای تخریب برنامه‌ریزی می‌کنند (Cullen, 2004). به همین دلیل، miRNAها به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین عناصر تنظیمی در شبکه‌های کنترل ژنی سلول شناخته شده‌اند. شواهد نشان می‌دهند که تحریک زودهنگام میکروبیوم از راه تجویز درون‌تخمکی مواد زیست‌فعال می‌تواند به‌طور معنی‌داری الگوی بیان miRNAها را در بافت‌های ایمنی طیور تحت تأثیر قرار دهد و پویایی تنظیمی آن‌ها را در پاسخ به عوامل محیطی و عفونت‌های ویروسی افزایش دهد (Sikorska et al., 2021; Dunislawska et al., 2023). نشان داده شد که این آثار به‌طور معنی‌داری وابسته به ژنوتیپ بودند، به‌گونه‌ای که در گونه مرغ‌های Green-legged partridgelike، برجسته‌ترین تغییرات در بیان miRNAها در لوزه‌های سکومی مشاهده شد. در مقابل، در مرغ‌های گوشتی نژاد Ross تنها دو miRNA به نام‌های *gga-miR-1598* و *gga-miR-1652* تفاوت معنی‌داری را در هر دو بافت طحال و لوزه سکومی نشان دادند. تحلیل‌های بیشتر نشان داد که ژن‌های هدف *gga-miR-1652* بیشتر با فرآیندهایی مانند تمایز کندروسیت‌ها و تشکیل اندوزوم اولیه مرتبط بودند، در حالی که ژن‌های هدف *gga-miR-1612*، ارتباط معنی‌داری با تنظیم فرآیندهای متابولیک RNA داشتند. به‌طور کلی، فرآیندهای زیستی که تحت تأثیر این miRNAها قرار گرفته‌اند، به‌طور گسترده شامل تنظیم بیان ژن و پروتئین، عملکرد سامانه عصبی و پاسخ‌های ایمنی می‌شوند. این یافته‌ها ضمن تأکید بر نقش اساسی miRNAها در واکنش سلولی به تحریکات محیطی، نشان می‌دهند که مداخلات تغذیه‌ای زودهنگام می‌توانند از مسیر تعدیل الگوی miRNA، بر توسعه سامانه ایمنی و همچنین، عملکرد متابولیک سلولی در طیور تأثیر بگذارند (Dunislawska et al., 2023). با این حال، شواهد فراوانی

از آزمایش‌های miRNA knock-in یا knock-out با خوانش‌های کمّی، بعدی از سطوح mRNA و پروتئین را نشان داده است که تخریب mRNAهای هدف، حالت اصلی miRNA است. این بدان معنا است که تغییرات در سطوح mRNA (که بسیار آسان‌تر از سطوح پروتئین یا آثار کارآیی ترجمه‌ای اندازه‌گیری می‌شوند) یک خوانش کمّی خوب از عمل miRNA، به‌عنوان مثال پس از دستکاری تجربی آن، ارائه می‌دهند. به نظر می‌رسد این اثر، وابسته به بافت سلولی است و تنها به خواص خاص miRN بر نمی‌گردد. در سلول‌هایی با سازوکارهای نظارتی قوی، مانند سلول‌های پس از جنینی، کوتاه شدن دم یک mRNA، پایداری آن را کاهش می‌دهد اما کارآیی ترجمه‌ای آن را تغییر نمی‌دهد، در حالی که در جنین‌های اولیه، کوتاه شدن دم یک mRNA، پایداری آن را تغییر نمی‌دهد، اما کارآیی ترجمه‌ای آن را به‌طور چشمگیری کاهش می‌دهد (Benjamin et al., 2018).

آنفلوآنزای ماکیان، یک بیماری حاد ویروسی ناشی از ویروس‌های آنفلوآنزای نوع A است که علاوه بر خسارات عمده اقتصادی به صنعت دامداری، تهدیدی جدی برای بهداشت عمومی جهانی محسوب می‌شود. این بیماری قادر است در میان گله‌های ماکیان شیوع گسترده‌ای یابد و باعث مرگ و میر بالا و افت شدید عملکرد تولیدی شود. بر اساس گزارشات سازمان بهداشت جهانی و سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد، شیوع آنفلوآنزای طیور می‌تواند منجر به تلفات گسترده‌ای در جمعیت پرندگان شود. به‌عنوان مثال، در سال ۲۰۱۵ در ایالات متحده، بیش از ۵۰ میلیون پرنده در اثر شیوع این بیماری از بین رفتند و خسارات مستقیم و غیرمستقیم آن به بیش از ۳/۳ میلیارد دلار ارزیابی شد. ریبوزوم‌ها که از rRNA و پروتئین‌های ریبوزومی تشکیل شده‌اند، به‌عنوان ماشین‌های ترجمه در سلول‌های زیستی شناخته می‌شوند و این ساختارها وظیفه تبدیل اطلاعات ژنتیکی موجود در mRNA را به پروتئین‌های عملکردی بر عهده دارند. در طیور، ریبوزوم‌ها در دو حالت آزاد در سیتوپلاسم یا متصل به شبکه آندوپلاسمی زبر RER وجود دارند که امکان تولید پروتئین‌های مختلف را فراهم می‌کنند. این پروتئین‌ها برای رشد عضلات، توسعه سامانه ایمنی و پاسخ به تنش‌های زیستی و محیطی، مانند عفونت‌ها و شرایط تنش گرمایی، حیاتی هستند. نقش ژن‌های ریبوزومی در تنظیم و واکنش به چنین شرایطی به‌تازگی در مطالعات ترانسکریپتومیک طیور مورد توجه قرار گرفته است. از نظر تکاملی، ریبوزوم‌ها از کمپلکس‌های خودتکثیر شونده RNA اولیه منشأ گرفته‌اند که به مرور زمان توانایی ساخت پروتئین‌ها را کسب کرده‌اند. این قابلیت، ریبوزوم‌ها را به ساختارهایی حیاتی تبدیل کرده که توانایی ترجمه دقیق و سریع کدهای ژنتیکی را دارند و از راه تشخیص آنتی‌کدون‌های tRNAها، اسیدهای آمینه مرتبط را به زنجیره پروتئینی متصل می‌کنند. این فرایند ساخت پروتئین، اثر مستقیمی بر ویژگی‌های فنوتیپی طیور از جمله رشد، تولیدمثل و مقاومت به بیماری‌ها دارد که در اصلاح نژاد و بهبود عملکرد اقتصادی نیز اهمیت فراوانی دارد. هدف از پژوهش حاضر، شناسایی و تحلیل miRNAهایی بود که در تعامل با ژن‌های ریبوزومی *RPS28* و *RPL31* در طیور تحت عفونت آنفلوآنزا قرار دارند، به‌طوری که نقش زیستی آن‌ها در ارتباط با بیماری آنفلونزا ماکیان بهتر مشخص شود.

در سال‌های اخیر، شواهد فزاینده‌ای نشان داده‌اند که پروتئین‌های ریبوزومی (RPs) علاوه بر نقش سنتی خود در ترجمه، عملکردهای تنظیمی مهمی در پاسخ سلولی به تنش‌های ویروسی ایفا می‌کنند. برخی از این پروتئین‌ها مانند *RPL31* و *RPS28* در شرایط عفونت ویروسی، دستخوش تغییرات بیان می‌شوند و می‌توانند با mRNAهای ویروسی یا عوامل ایمنی سلول میزبان تعامل داشته باشند. این تعاملات ممکن است مسیرهای ترجمه انتخابی، پاسخ‌های التهابی، یا حتی تحمل ایمنی را تحت تأثیر قرار دهند. به‌ویژه در عفونت‌های ویروسی مانند آنفلوآنزا، تغییرات در بیان پروتئین‌های ریبوزومی می‌تواند نشان‌دهنده بازآرایی عملکردی ریبوزوم‌ها در جهت مقابله با ویروس یا تسهیل تکثیر آن است. این عملکردهای غیرکلاسیک، که گاه به‌عنوان "وظایف فراتر از ریبوزوم " شناخته می‌شوند، پروتئین‌های ریبوزومی را به عناصر کلیدی در تنظیم ایمنی ذاتی و سازگار در برابر ویروس‌ها تبدیل کرده‌اند (Li, 2019; Maurya et al., 2023)، بنابراین، نتایج این مطالعه با ماهیت فرضیه‌زا، می‌توانند زمینه‌ساز تحقیقات تجربی آینده در راستای اعتبارسنجی عملکرد miRNAها و ژن‌های ریبوزومی در پاسخ ایمنی طیور به ویروس آنفلوآنزا باشند.

با توجه به ماهیت in silico این مطالعه، نتایج حاصل نیازمند اعتبارسنجی تجربی در شرایط آزمایشگاهی هستند

تا عملکرد واقعی miRNAها و ژن‌های هدف در پاسخ ایمنی طیور به ویروس آنفلوآنزا تأیید شود.

هدف این مطالعه، شناسایی و تحلیل تعاملات پیش‌بینی‌شده بین miRNAها و ژن‌های ریبوزومی *RPS28* و *RPL31* در طیور آلوده به ویروس آنفلوآنزا است، با این فرض که این miRNAها نقش تنظیمی در پاسخ ایمنی دارند. برای این منظور، از روش‌های بیوانفورماتیکی جهت پیش‌بینی اهداف ژنی و مسیرهای عملکردی مرتبط استفاده شد.

## مواد و روش‌ها

برای درک عملکرد یک miRNA خاص، دانستن اینکه کدام mRNAها را هدف قرار می‌دهد، از اهمیت بالایی برخوردار است. چندین روش پیش‌بینی هدف توسعه یافته‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به miRanda، TargetScan، DIANA-microT، PicTar، RNAHybrid و miTarget (Shi et al., 2006) اشاره کرد. در این پژوهش، دو ژن ساختاری ریبوزومی *RPS28* و *RPL31* برای بررسی تعاملات miRNA–mRNA مورد استفاده قرار گرفتند. این دو ژن از یک پژوهش دیگر استخراج شده بودند که داده‌های ریزآرایه DNA مربوط به عفونت آنفلوآنزای ماکیان (GSE96837) را از پایگاه GEO/NCBI به‌دست آورده و با استفاده از تحلیل شبکه هم‌بیانی ژن‌ها، شناسایی کرده بودند. در این مطالعه، نسخه ژنوم مرجع Gallus gallus GRCg6a (GenBank: GCA_000002315.5) به‌عنوان پایه برای تحلیل‌های بیوانفورماتیکی و استخراج داده‌های ژنی مورد استفاده قرار گرفت. سپس، تعاملات miRNA–mRNA با استفاده از ابزار جامع Tools4miRs و با چندین الگوریتم مختلف، از جمله Targe، مورد بررسی قرار گرفت (Pasick et al., 2017). در این مطالعه، به‌منظور بررسی تعاملات میان ریزRNAها (miRNAها) و دو ژن ساختاری ریبوزومی *RPS28* و *RPL31* در پاسخ ایمنی ماکیان به ویروس آنفلوآنزا، از رویکردهای بیوانفورماتیکی چندمرحله‌ای بهره گرفته شد.

برای پیش‌بینی تعاملات miRNA–mRNA، از پلتفرم جامع Tools4miRs استفاده شد. این سامانه بیش از ۱۷۰ ابزار تحلیل مرتبط با miRNA را در قالب یک متا-سرور ارائه می‌دهد و امکان اجرای هم‌زمان چندین الگوریتم پیش‌بینی هدف را فراهم می‌سازد (Lukasik et al., 2016). در این پژوهش، الگوریتم‌های TargetSpy، miRanda، RNAhybrid، TargetScan و DIANA-microT برای پیش‌بینی اهداف احتمالی miRNAها مورد استفاده قرار گرفتند. این الگوریتم‌ها بر اساس ویژگی‌هایی چون انرژی آزاد اتصال، تطابق توالی بذر (seed) و حفاظت تکاملی طراحی شده‌اند و در مطالعات متعدد، اعتبارسنجی شده‌اند (Chen & Wang, 2020; Cui et al., 2025). فلوچارت مراحل تحلیل بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی تعاملات میان miRNAها و mRNAهای هدف، با تمرکز بر ژن‌های ریبوزومی *RPS28* و *RPL31* در مرغ‌های آلوده به ویروس آنفلوآنزای نوع A در شکل ۱ نشان داده شده است.

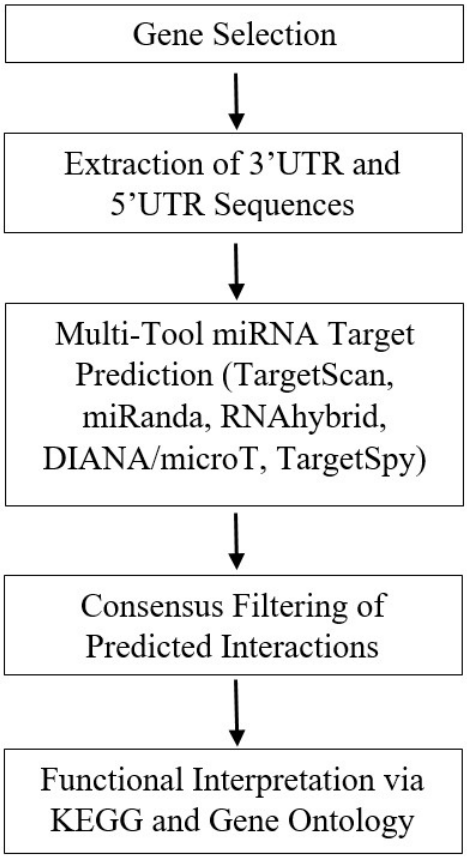


Fig. 1. Workflow of bioinformatic analysis for predicting miRNA–mRNA interactions targeting ribosomal genes *RPS28* and *RPL31* in chickens infected with avian influenza virus type A

شکل ۱- فلوچارت مراحل تحلیل بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی تعاملات میان miRNAها و mRNAهای هدف، با تمرکز بر ژن‌های ریبوزومی *RPS28* و *RPL31* در مرغ‌های آلوده به ویروس آنفلوآنزای نوع A

در این مطالعه، به‌منظور شفاف‌سازی و ارائه چارچوبی منسجم و تکرارپذیر برای تحلیل بیوانفورماتیکی، فلوچارت مراحل تحلیل (شکل ۱) به‌طور دقیق طراحی شده است. این فلوچارت، مسیر منطقی و سیستماتیک پژوهش را از ابتدا تا انتها نشان می‌دهد و شامل پنج مرحله کلیدی است: (۱) انتخاب ژن‌های هدف *RPS28* و *RPL31* بر اساس شواهد تجربی حاصل از داده‌های ریزآرایه GSE96837 و تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی (WGCNA)، که در آن ژن‌ها بر مبنای معیارهای کمّی $|log2FC| > 1.5$ و $kME > 0.95$ انتخاب شدند، (۲) استخراج نواحی UTR'۳ و UTR'۵ از توالی ژنوم مرجع *Gallus gallus* (GRCg6a) به‌عنوان بستر اصلی برای پیش‌بینی اتصال miRNAها، (۳) پیش‌بینی چندابزاری تعاملات با استفاده از پلتفرم جامع Tools4miRs و به‌کارگیری همزمان چندین الگوریتم مستقل مانند TargetScan، miRanda، RNAhybrid و TargetSpy، که هر کدام بر اساس اصول محاسباتی متفاوتی از جمله تطابق seed region، انرژی آزاد پیوند (ΔG) و حفاظت تکاملی عمل می‌کنند تا دقت و اعتبار پیش‌بینی‌ها به حداکثر برسد، (۴) فیلترسازی بر اساس اجماع الگوریتم‌ها، که در آن تنها تعاملاتی حفظ می‌شوند که حداقل به‌وسیله سه ابزار مستقل تأیید شده باشند (این معیار سخت‌گیرانه به‌عنوان دریچه‌ای برای کاهش نتایج کاذب مثبت و افزایش اعتماد به نتایج نهایی عمل می‌کند) و (۵) تفسیر عملکردی با استفاده از پایگاه‌های معتبر KEGG و Gene Ontology، که به شناسایی miRNAهایی می‌پردازد که علاوه بر اعتبار بیوانفورماتیکی، دارای نقش مستند یا بالقوه در مسیرهای زیستی کلیدی مانند پاسخ ایمنی ذاتی، تنظیم آپوپتوز و تعدیل التهاب هستند. این فلوچارت نه‌تنها شفافیت روش‌شناختی مقاله را به‌طور چشمگیری افزایش می‌دهد، بلکه به‌عنوان یک الگوی استاندارد و قابل تعمیم برای مطالعات آینده در حوزه تعاملات miRNA-mRNA در سایر بیماری‌ها یا گونه‌ها نیز قابل استفاده است و به محققان اجازه می‌دهد با دنبال کردن این چارچوب، نتایج قابل مقایسه و معتبری به‌دست آورند.

برای افزایش دقت و اعتبار نتایج، تعاملات پیش‌بینی‌شده با داده‌های تجربی موجود در پایگاه‌های miRTarBase و miRDB مقایسه شدند. برای استخراج اطلاعات مربوط به توالی و نام‌گذاری miRNAها، از پایگاه miRBase نسخه ۲۲ استفاده شد. تاریخ آخرین دسترسی به این پایگاه، ۱۰ سپتامبر ۲۰۲۵ بود (Kozomara et al., 2019). پایگاه miRTarBase شامل بیش از سه میلیون تعامل تجربی تأییدشده میان miRNA و mRNA است و به‌عنوان یکی از منابع اصلی در مطالعات عملکردی miRNA شناخته می‌شود (Cui et al., 2025). همچنین، پایگاه miRDB با بهره‌گیری از الگوریتم‌های یادگیری ماشین، اهداف عملکردی miRNAها را در گونه‌های مختلف از جمله ماکیان پیش‌بینی می‌کند (Chen & Wang, 2020).

در ادامه، برای تحلیل عملکردی miRNAهای منتخب، از پایگاه‌های KEGG و Gene Ontology استفاده شد تا مسیرهای زیستی مرتبط با آن‌ها، از جمله آپوپتوز، تنظیم سیتوکاین‌ها و پاسخ ایمنی ضدویروسی، شناسایی شود. این تحلیل‌ها نشان دادند که miRNAهایی چون *gga-mir-214*، *gga-mir-194*، *gga-mir-7477-5p* و *gga-mir-6642-3p* نقش مهمی در تنظیم مسیرهای ایمنی دارند، که با یافته‌های مطالعات پیشین در زمینه پاسخ ایمنی طیور به ویروس آنفلوآنزا هم‌راستا بود (O'Dowd et al., 2020; Hong et al., 2021). در این مطالعه، مجموعه‌ای از ابزارهای بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی تعاملات miRNA–mRNA و تحلیل عملکردی آن‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. مشخصات این ابزارها شامل نام، نسخه، فراسنجه‌های کلیدی و آدرس اینترنتی در جدول ۱ ارائه شده‌اند.

## نتایج و بحث

ویروس‌ها (مانند ویروس آنفلونزای ماکیان) دارای ژنوم RNA تک‌رشته‌ای هستند که به‌دلیل قابلیت تکامل سریع، کنترل و مدیریت آن‌ها را در محیط‌های پرورش ماکیان و حتی در بین انسان‌ها دشوار کرده است. از این رو، شناسایی سازوکارهای زیستی و تنظیمی مرتبط با پاسخ ایمنی و تعاملات میزبان–ویروس، اهمیت بالایی دارد. در این زمینه، نقش miRNAها، به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های پسارونویسی، برجسته شده است. طی عفونت‌های ویروسی، از جمله آلودگی به ویروس آنفلوآنزای ماکیان، الگوی بیان miRNAها دچار تغییر می‌شود و این تغییرات می‌توانند هم به‌عنوان واکنش دفاعی میزبان و هم به‌عنوان راهکارهایی برای تسهیل تکثیر ویروس عمل کنند. برای مثال، برخی miRNAها می‌توانند با هدف‌گیری ژن‌های ویروسی، تکثیر ویروس را مهار کنند، در حالی که miRNAهای دیگر ممکن

است با سرکوب ژن‌های ایمنی میزبان، به افزایش قابلیت آلودگی کمک کنند. ژن‌های ریبوزومی در طیور، نقش اساسی و بنیادینی در فرایندهای زیستی و عملکردهای سلولی دارند، به‌ویژه در ساخت پروتئین، که برای رشد، توسعه و پاسخ به عوامل محیطی و بیماری‌ها حیاتی است. miRNAها عمدتاً از مسیر مهار ترجمه یا تجزیه mRNA هدف، بیان ژن را تنظیم می‌کنند. این فرآیند معمولاً با جفت شدن ناحیه "دانه" miRNA با ناحیه ۳' غیرترجمه‌شده mRNA هدف انجام می‌شود. در طیور، miRNAها در تنظیم ژن‌های مرتبط با سوخت و ساز لیپید، رشد عضلانی و پاسخ ایمنی نقش دارند. برای مثال، *miR-22-3p* و *miR-146b-5p* در کبد مرغ‌های تخم‌گذار به‌طور قابل توجهی بیان شده و ژن‌های کلیدی سوخت و ساز لیپید مانند *FADS1* و *FADS2* را تنظیم می‌کنند (Li et al., 2015). miRNAها در فرآیندهای رشدی طیور، از جمله رگزایی و تمایز سلولی، نقش دارند. به‌عنوان مثال، *miR-133* در عضله سینه جوجه‌ها در پاسخ به تنش گرمایی تنظیم شده و بر رشد عضلانی تأثیر می‌گذارد. همچنین، *miR-122* به‌طور خاص در کبد طیور بیان شده و سوخت و ساز چربی و کلسترول را تنظیم می‌کند (Li et al., 2015).

در این پژوهش، ابتدا miRNAهای مرتبط با عفونت آنفلوآنزای طیور شناسایی می‌شوند و سپس، تعاملات آنها با ژن‌های ریبوزومی *RPS28* و *RPL31* با استفاده از ابزار tools4miRs تحلیل شدند. همان‌طور که از جدول ۱ مشخص است، برای هر دو ژن ریبوزمی در کل miRNAهای *gga-mir-1593*، *gga-mir-1609*، *gga-mir-214*، *gga-mir-3532-3p*، *gga-mir-6567-3p*، *gga-mir-6579-5p*، *gga-mir-6612-5p*، *gga-mir-6642-3p*، *gga-mir-194* و *gga-mir-7477-5p* شناسایی شدند. در مرحله اول، این مورد بررسی شد که miRNAهای شناسایی شده در پایگاه داده miRBase وجود دارند یا خیر. همان‌طور که از جدول ۲ مشخص است، فقط *gga-mir-1593* در miRBase وجود نداشت. سایر miRNAها شناخته شده بودند و در miRBase (https://www.mirbase.org/) وجود داشتند.

جدول ۱- مشخصات ابزارهای بیوانفورماتیکی مورد استفاده در مطالعه حاضر شامل نام، نسخه، فراسنجه‌های کلیدی و آدرس اینترنتی

Table 1. Specifications of bioinformatics tools used in this study, including name, version, key parameters, and URL

| Including name | Version | Key parameters | URL |
|---|---|---|---|
| TargetScan | Release 8.0 | Seed match, conservation, context++ score | https://www.targetscan.org/vert_80/ |
| miRanda | August 2010 | Alignment score > 140, energy threshold < -20 kcal/mol | http://www.microrna.org/ |
| RNAhybrid | v2.2 | Minimum free energy (MFE), helix constraints | https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid |
| DIANA-microT | v5.0 | miTG score > 0.7, conservation filter | http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index |
| TargetSpy | N/A (Web tool) | Machine learning-based prediction, seed pairing, accessibility | https://www.tools4mirs.org/targetspy |
| Tools4miRs | 2023 release | Meta-server integration of >170 tools, multi-algorithm consensus | https://www.tools4mirs.org |
| miRTarBase | Release 9.0 | Experimentally validated interactions, species-specific filters | https://mirtarbase.cuhk.edu.cn |
| miRDB | v6.0 | SVM-based prediction, functional annotation | https://mirdb.org |
| miRBase | Release 22 | miRNA sequences, nomenclature, genomic coordinates | https://www.mirbase.org |
| KEGG | 2023 version | Pathway mapping, functional enrichment | https://www.genome.jp/kegg/ |
| Gene Ontology | GO Consortium | Biological process, molecular function, cellular component annotations | http://geneontology.org |

جدول ۲- شناسایی miRNAها در پایگاه miRBase

Table 2. Identification of miRNAs in the miRBase database

| miRNA | MIRBASE STATUS |
|---|---|
| *gga-mir-1593* | Not available in miRBase |
| *gga-mir-1609* | Available in miRBase |
| *gga-mir-214* | Available in miRBase |
| *gga-mir-3532-3p* | Available in miRBase |
| *gga-mir-6567-3p* | Available in miRBase |
| *gga-mir-6579-5p* | Available in miRBase |
| *gga-mir-6612-5p* | Available in miRBase |
| *gga-mir-6642-3p* | Available in miRBase |
| *gga-mir-194* | Available in miRBase |
| *gga-mir-7477-5p* | Available in miRBase |

شناسایی و ثبت miRNAها در پایگاه داده miRBase از اهمیت بالایی در زمینه‌های ژنومیک، بیوانفورماتیک و تحقیقات بیماری‌های ژنتیکی و عفونی برخوردار است. نکته مهم این است که باید خاطرنشان شود که دامنه‌ای از miRNAها در ارتباط با ماکیان شناخته شده‌اند که ممکن است برخی از آن‌ها تنها یک برآورد زیستی باشند و اطلاعات زیستی کاملی درباره آن‌ها در پایگاه‌های زیستی مانند miRBase وجود نداشته باشد. با وجود این، پژوهش‌های متکی بر miRNAها نقش ویژه‌ای را در تحقیقات مربوط به ماکیان به خود اختصاص داده‌اند. به‌طور کلی، miRNAها به‌عنوان مولکول‌های کوچک و غیرکدکننده، در تنظیم فرآیندهای زیستی و بیماری‌ها نقش کلیدی دارند و پایگاه داده miRBase به‌عنوان منبع اصلی اطلاعات در این زمینه، به پژوهشگران کمک می‌کند تا به درک بهتری از این مولکول‌ها و عملکرد آن‌ها در موجودات مختلف دست یابند.

در ادامه مراحل تحلیل بیوانفورماتیکی، جدول ۴ نتایج حاصل از پیش‌بینی تعاملات میان miRNAها و ژن *RPS28* با شناسه NM_001302177.2 را نمایش می‌دهد. این پیش‌بینی‌ها با استفاده از هشت ابزار معتبر بیوانفورماتیکی انجام شده‌اند که شامل MicroTar، miRanda، miRMap، PITA، RNAHybrid، TargetSpy، RNA22 و Guugle هستند. این ابزارها از راه پلتفرم جامع Tools4miRs به‌صورت هم‌زمان اجرا شده‌اند و هر یک بر اساس الگوریتم‌های خاص خود، احتمال اتصال miRNAها به توالی هدف را ارزیابی کرده‌اند (Lukasik et al., 2016). مطابق جدول ۴، miRNAهایی مانند gga-miR-6567-3p، gga-miR-6642-3p، gga-miR-6579-5p و gga-miR-7477-5p به‌وسیله پنج ابزار مستقل تأیید شده‌اند و دارای چندین جایگاه اتصال هستند. این ویژگی‌ها، احتمال تعامل واقعی و نقش تنظیمی این miRNAها را افزایش می‌دهد. در مقابل، miRNAهایی مانند *gga-mir-1609* و *gga-mir-214* تنها با یک ابزار (PITA) پیش‌بینی شده‌اند و دارای یک محل اتصال هستند، که نشان‌دهنده احتمال کمتر تعامل واقعی بوده و نیازمند اعتبارسنجی تجربی در مطالعات آینده هستند. به‌طور کلی، افزایش تعداد ابزارهای تأییدکننده و تعداد جایگاه‌های اتصال، به‌عنوان شاخصی برای تقویت احتمال تعامل واقعی miRNA–mRNA در نظر گرفته می‌شود (Chen & Wang, 2020; Hong et al., 2021).

مانند اطلاعات بیان شده در بخش بالا، بررسی جامع تعامل میان ۱۰ miRNA متعلق به ماکیان (*gga-mir-1593*، *gga-mir-1609*، *gga-mir-194*، *gga-mir-214*، *gga-mir-3532-3p*، *gga-mir-6567-3p*، *gga-mir-6579-5p*، *gga-mir-6612-5p*، *gga-mir-6642-3p* و *gga-mir-7477-5p*) و ژن *RPL31* با شناسه NM_001030829.2، با استفاده از نرم‌افزار Tools4miRs.orgو تجمیع خروجی ۱۰ ابزار بیوانفورماتیکی مختلف، نشان داد که میزان پیش‌بینی و پتانسیل تنظیم‌کنندگی این miRNAها نسبت به mRNA مذکور تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد (جدول ۵). نتایج حاکی از آن است که *gga-mir-6642-3p*و *gga-mir-3532-3p* با حمایت چهار ابزار مستقل و با داشتن به ترتیب ۱۵ و ۱۲ جایگاه اتصال، قوی‌ترین و محتمل‌ترین نامزدها برای تنظیم بیان ژن *RPL31* هستند. پس از آن‌ها، *gga-mir-1609*، *gga-mir-194*، *gga-mir-214* و *gga-mir-6612-5p*، هر کدام با تأیید سه ابزار و بین ۷ تا ۱۰ جایگاه اتصال قرار دارند و از پتانسیل متوسطی برای تنظیم این mRNA برخوردارند. سایر miRNAها از جمله *gga-mir-*

*1593*، *gga-mir-6567-3p*، *gga-mir-6579-5p* و *gga-mir-7477-5p* تنها به‌وسیله یک یا دو ابزار پیش‌بینی یا تأیید شده‌اند و تعداد جایگاه‌های اتصال آن‌ها اندک است. به همین دلیل، احتمال تأثیر آن‌ها بر ژن *RPL31* پایین‌تر تلقی می‌شود.

جدول ۳- فهرستی از miRNAهایی که در ماکیان در ارتباط با بیماری‌های مختلف شناخته شده‌اند

Table 3. List of chicken miRNAs identified in association with various diseases

| REFERENCE | BIOLOGICAL FUNCTION | TARGET GENE / VIRAL SEGMENT | ASSOCIATED DISEASE | miRNA |
|---|---|---|---|---|
| Wang et al. (2018) | Inhibits infection progression; enhances IFN-β expression | SOCS1, TANK | Infectious Bursal Disease (IBD) | *gga-miR-155* |
| Fu et al. (2017) | Inhibits infection; promotes IFN-β production | SOCS5, IBDV segment A | Infectious Bursal Disease (IBD) | *gga-miR-130b* |
| Fu et al. (2018) | Inhibits infection; promotes IFN-β production | SOCS6, IBDV segment B | Infectious Bursal Disease (IBD) | *gga-miR-454* |
| Wang et al. (2013a) | Suppresses infection; inhibits viral translation | VP1 of IBDV | Infectious Bursal Disease (IBD) | *gga-miR-21* |
| Ouyang et al. (2015) | Enhances infection; suppresses interferon response | IRF2 | Infectious Bursal Disease (IBD) | *gga-miR-9* |
| Ouyang et al. (2017) | Promotes infection; inhibits immune response | p53 | Infectious Bursal Disease (IBD) | *gga-miR-2127* |
| Ouyang et al. (2018) | Promotes infection; suppresses immune signaling | chMDA5 | Infectious Bursal Disease (IBD) | *gga-miR-142-5p* |
| Tian et al. (2012) | Modulates tumor resistance or susceptibility | ATF2 | Marek's Disease (MD) | *gga-miR-15b* |
| Li et al. (2014b) | Inhibits lymphoma cell growth | NEK6 | Marek's Disease (MD) | *gga-miR-26a* |
| Lian et al. (2015) | Inhibits lymphoma cell proliferation | MYBL1 | Marek's Disease (MD) | *gga-miR-181a* |
| Han et al. (2016) | Suppresses lymphoma cell growth and migration | HOXA3 | Marek's Disease (MD) | *gga-miR-130a* |
| Zhao et al. (2017a) | Inhibits lymphoma cell growth, migration, and metastasis | BCL11B | Marek's Disease (MD) | *gga-miR-219b* |
| Chi et al. (2015); Dang et al. (2017) | Induces c-Myc expression; promotes tumor growth; modulates immune response | LTBP1, hnRNPAB, GPM6B, c-Myb | Marek's Disease (MD) | *MDV1-miR-M4-5p* |
| Wang et al. (2017) | Suppresses viral replication | PB2 of H1N1 and H5N1 | Avian Influenza (AI) | *gga-miR-1249* |
| Ingle et al. (2015) | Inhibits viral replication; modulates interferon response | PB1 of H5N1, host RIG-I | Avian Influenza (AI) | *gga-miR-485* |
| Li et al. (2014c) | Inhibits cell growth; promotes apoptosis | YAP1 | Avian Leukosis Virus (ALV-J) | *gga-miR-375* |
| Dai et al. (2015) | Promotes cell growth; suppresses apoptosis | BMF | Avian Leukosis Virus (ALV-J) | *gga-miR-221/-222* |
| Wang et al. (2013b) | Inhibits viral replication | ALV-J genome | Avian Leukosis Virus (ALV-J) | *gga-miR-1650* |
| Li et al. (2015) | Enhances gp85 expression; promotes viral replication | IRF1 | Avian Leukosis Virus (ALV-J) | *gga-miR-23b* |
| Li et al. (2017) | Promotes viral replication; increases env expression and viral secretion | MDA5 | Avian Leukosis Virus (ALV-J) | *gga-miR-34b-5p* |
| Chen et al. (2015) | Inhibits fibroblast cell growth | EZH2 | Mycoplasma gallisepticum (MG) | *gga-miR-101-3p* |
| Zhao et al. (2017c) | Inhibits fibroblast cell growth | SMARCA5 | Mycoplasma gallisepticum (MG) | *gga-miR-99a* |
| Hu et al. (2016) | Activates NF-κB; promotes cell growth | ZMYND11 | Mycoplasma gallisepticum (MG) | *gga-miR-19a* |
| Yuan et al. (2018) | Enhances fibroblast cell growth | PTEN | Mycoplasma gallisepticum (MG) | *gga-miR-130b-3p* |
| Zhang et al. (2019) | Activates TLR6/MyD88/NF-κB pathway; promotes cell growth | MMP16 | Mycoplasma gallisepticum (MG) | *gga-miR-146c* |
| Lim et al. (2013) | Regulates AvBD-11 expression; potential role in ovarian cancer diagnosis | AvBD-11 | Ovarian Tumor | *gga-miR-1615* |

جدول ۴- نتایج پیش‌بینی هدف‌گیری miRNAها روی mRNA با شناسه NM_001302177.2 (*RPS28*)

Table 4. Predicted targeting results of miRNAs on mRNA with accession number NM_001302177.2 *(RPS28*)

| mRNA | miRNA | MicroTar | miRanda | miRMap | PITA | RNAHybrid | TargetSpy | RNA22 | Guugle | Binding sites | No Tools |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NM_001302177.2 | *gga-miR-6567-3p* | TRUE | TRUE | TRUE | TRUE | TRUE | FALSE | FALSE | FALSE | 8 | 5 |
| NM_001302177.2 | *gga-miR-6642-3p* | TRUE | TRUE | TRUE | TRUE | TRUE | FALSE | FALSE | FALSE | 8 | 5 |
| NM_001302177.2 | *gga-mir-1609* | FALSE | FALSE | FALSE | TRUE | FALSE | FALSE | FALSE | FALSE | 1 | 1 |
| NM_001302177.2 | *gga-mir-214* | FALSE | FALSE | FALSE | TRUE | FALSE | FALSE | FALSE | FALSE | 1 | 1 |
| NM_001302177.2 | *gga-mir-3532-3p* | TRUE | FALSE | FALSE | TRUE | FALSE | FALSE | FALSE | FALSE | 3 | 2 |
| NM_001302177.2 | *gga-mir-6579-5p* | TRUE | TRUE | TRUE | TRUE | TRUE | FALSE | FALSE | FALSE | 4 | 5 |
| NM_001302177.2 | *gga-mir-7477-5p* | TRUE | TRUE | TRUE | TRUE | TRUE | FALSE | FALSE | FALSE | 10 | 5 |

جدول ۵- نتایج پیش‌بینی هدف‌گیری miRNAها روی mRNA با شناسه NM_001030829.2 (*RPL31*)

Table 5. Predicted targeting results of miRNAs on mRNA with accession number NM_001030829.2 (*RPL31*)

| mRNA | miRNA | MicroTar | miRanda | miRMap | PITA | targetspy | RNA Hybrid | RNA22 | Target Align | PsroBot | Guugle | Binding sites | No Tools |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NM_001 030829.2 | *gga-mir-1593* | FA | FA | FA | TR | FA | FA | FA | FA | FA | FA | 2 | 1 |
| NM_001 030829.2 | *gga-mir-1609* | TR | TR | FA | TR | FA | FA | FA | FA | FA | FA | 10 | 3 |
| NM_001 030829.2 | *gga-mir-194* | FA | TR | FA | TR | TR | FA | FA | FA | FA | FA | 10 | 3 |
| NM_001 030829.2 | *gga-mir-214* | FA | FA | TR | TR | TR | FA | FA | FA | FA | FA | 8 | 3 |
| NM_001 030829.2 | *gga-mir-3532-3p* | TR | TR | FA | TR | TR | FA | FA | FA | FA | FA | 12 | 4 |
| NM_001 030829.2 | *gga-mir-6567-3p* | FA | FA | TR | TR | FA | FA | FA | FA | FA | FA | 4 | 2 |
| NM_001 030829.2 | *gga-mir-6579-5p* | FA | FA | TR | TR | FA | FA | FA | FA | FA | FA | 4 | 2 |
| NM_001 030829.2 | *gga-mir-6612-5p* | FA | TR | TR | TR | FA | FA | FA | FA | FA | FA | 7 | 3 |
| NM_001 030829.2 | *gga-mir-6642-3p* | TR | TR | TR | TR | FA | FA | FA | FA | FA | FA | 15 | 4 |
| NM_001 030829.2 | *gga-mir-7477-5p* | FA | FA | TR | TR | FA | FA | FA | FA | FA | FA | 5 | 2 |

TR: TRUE; FA: FALSE

به‌طور کلی، ابزارهای مختلف بیوانفورماتیکی با توجه به رویکردهای الگوریتمی گوناگون، نتایج غیرهمپوشانی را در سطح جایگاه‌های اتصال ارائه می‌کنند، اما همگرایی چند ابزار روی برخیmiRNAها و تعدد جایگاه‌های اتصال، از اعتبار بالایی برای نقش تنظیمی بالقوه این‌miRNAها بر این ژن حکایت دارد. بنابراین، *gga-mir-6642-3p* و-*gga mir-3532-3p* به‌عنوان مهم‌ترین کاندیداهای تأثیرگذار، پیشنهاد مناسبی برای مطالعات عملکردی آزمایشگاهی بعدی محسوب می‌شوند تا نقش واقعی آن‌ها در تنظیم بیان *RPL31* به‌صورت تجربی مورد بررسی قرار گیرد. در ادامه، تلاش شد که نقش زیستی miRNAهای شناسایی‌شده به‌طور انحصاری مشخص شود.

برای بررسی میزان همپوشانی بین ابزارهای بیوانفورماتیکی در پیش‌بینی تعاملات miRNA–mRNA، از نمودار ون استفاده شد. این نمودارها نشان می‌دهند که برخی miRNAها به‌وسیله چند ابزار به‌طور هم‌زمان شناسایی شده‌اند، که می‌تواند اعتبار زیستی تعاملات پیش‌بینی‌شده را افزایش دهد (شکل‌های ۲ و ۳).

فهرستی از miRNAهای مختلف به همراه نقش‌های زیستی و آثار شناخته شده آن‌ها در جدول ۶ نشان داده شده است. برای مثال، *gga-mir-1609* در مدل‌های التهابی و واکنش به تنش شناسایی شده و احتمال دارد در تنظیم پاسخ ایمنی نقش داشته باشد، در حالی که *gga-mir-214* با فرآیندهایی نظیر مرگ خود خواسته سلول، سرطان و تنظیم سیتوکین‌ها مرتبط است و در پاسخ به عفونت‌های ویروسی نیز فعالیت دارد. *gga-mir-3532-3p* احتمالاً در تنظیم مسیرهای متابولیکی و مقابله با تنش اکسیداتیو نقش ایفا می‌کند، و در مقابل، *gga-mir-6567-3p* با وجود اینکه پژوهش‌های محدودی روی آن وجود دارد، در شبکه‌های miRNA-Target طیور مشاهده شده است. -*gga*

*mir-6579-5p* به‌عنوان تنظیم‌کننده مسیرهای سلولی و پاسخ به عوامل محیطی شناخته می‌شود، در حالی که *gga-mir-6612-5p* نیز در مطالعات مربوط به طیور شناسایی شده، اما عملکرد دقیق آن هنوز باید مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. از سوی دیگر، *gga-mir-6642-3p* ممکن است در تنظیم ژن‌های مربوط به ریبوزوم و فرآیند ترانسلاسیون دخیل باشد. *gga-mir-194* نقشی کلیدی در تنظیم تمایز سلولی و مسیرهای متابولیکی دارد و حضور آن در عفونت‌های ویروسی گزارش شده است. نهایتاً، *gga-mir-7477-5p* به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مسیرهای ایمنی و التهابی در پژوهش‌های طیور شناخته شده است. در ادامه تلاش شد که آن‌دسته از miRNAهایی که مستقیم در ارتباط با عفونت آنفلوآنزای ماکیان هستند به‌همراه عملکرد زیستی آن‌ها مشخص شوند.

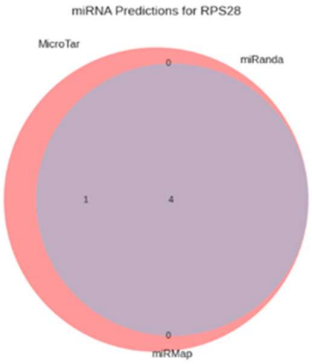


Fig. 2. The Venn diagram illustrates the overlap of predicted interactions among the tools MicroTar, miRanda, and miRMap for the gene *RPS28*. The shared regions in the diagram represent miRNAs identified by multiple independent tools. Such overlaps enhance the credibility of the bioinformatic predictions.

شکل ۲- نمودار ون نشان‌دهنده هم‌پوشانی تعاملات پیش‌بینی‌شده بین ابزارهای MicroTar، miRanda و miRMap برای ژن *RPS28*، نواحی مشترک در نمودار بیانگر miRNAهایی هستند که به‌وسیله چند ابزار مستقل شناسایی شده‌اند. این هم‌پوشانی‌ها، اعتبار تعاملات بیوانفورماتیکی را افزایش می‌دهند.

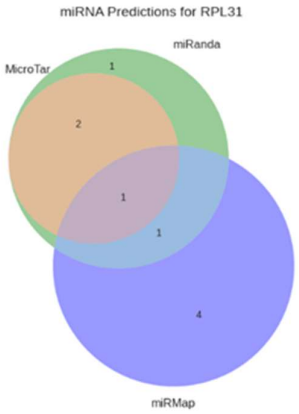


Fig. 3. The Venn diagram shows the overlap of predicted interactions among MicroTar, miRanda, and miRMap for the gene *RPL31*. The intersection between tools reflects algorithmic consensus in predicting miRNA–mRNA interactions and can serve as an indicator for selecting high-potential regulatory miRNAs in experimental studies.

شکل ۳- نمودار ون نشان‌دهنده هم‌پوشانی تعاملات پیش‌بینی‌شده بین ابزارهای MicroTar، miRanda و miRMap برای ژن *RPL31*، هم‌پوشانی بین ابزارها نشان‌دهنده توافق الگوریتمی در پیش‌بینی تعاملات miRNA–mRNA است و می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای انتخاب miRNAهای با پتانسیل تنظیمی بالا در مطالعات تجربی استفاده شود.

جدول ۶- نقش‌های زیستی و عملکردی miRNAهای منتخب در پاسخ ایمنی ماکیان
Table 6. Biological roles and functional insights of selected miRNAs in fowls

| miRNA | Biological role/ Known effects |
|---|---|
| *gga-miR-1609* | Identified in inflammatory models and stress responses; may play a role in immune regulation. |
| *gga-miR-214* | Associated with apoptosis, cancer, and cytokine regulation; involved in viral infections. |
| *gga-miR-3532-3p* | Potentially involved in metabolic pathways and oxidative stress regulation. |
| *gga-mir-6567-3p* | Limited studies available; observed in miRNA–target networks in poultry. |
| *gga-miR-6579-5p* | Linked to regulation of cellular pathways and response to environmental factors. |
| *gga-miR-6612-5p* | Identified in poultry studies; exact biological function remains unclear. |
| *gga-mir-6642-3p* | May be involved in ribosomal gene regulation and translation processes. |
| *gga-mir-194* | Plays a role in cellular differentiation and metabolic regulation; observed in viral infections. |
| *gga-mir-7477-5p* | Regulates immune and inflammatory pathways; reported in poultry-related studies. |

جدول ۷- تفکیک miRNAهای منتخب بر اساس وجود شواهد تجربی قبلی در عفونت آنفلوآنزای طیور (AIV)
Table 7. Classification of selected miRNAs based on prior experimental evidence in avian influenza virus (AIV) infection

| miRNA | Previous experimental evidence | References (if available) | Biological function |
|---|---|---|---|
| *gga-mir-214* | Yes | Hong et al. (2021); Lee et al. (2023) | Documented role in regulating apoptosis and innate immune response in H5N1-infected chickens. |
| *gga-mir-194* | Yes | Hong et al. (2021) | Modulates inflammatory cytokines and antiviral response in the lungs of resistant chickens. |
| *gga-mir-7477-5p* | Yes | Lee et al. (2023) | Upregulated in AIV-resistant poultry; associated with activation of interferon pathways. |
| *gga-mir-6642-3p* | No | — | Strong bioinformatic prediction (supported by 4–5 tools), but no prior experimental studies in AIV. |
| *gga-mir-6579-5p* | No | — | Moderate prediction (supported by 2–3 tools); potential role in immune pathways, but lacks direct evidence in AIV. |
| *gga-mir-3532-3p* | No | — | Predicted by 4 tools for RPL31; no reported role in viral infection in current literature. |
| *gga-mir-6567-3p* | No | — | Strong prediction for RPS28; no prior experimental evidence in poultry or AIV. |
| *gga-mir-1609* | No | — | Predicted by only 1–3 tools; no functional studies reported in the literature. |
| *gga-mir-1593* | No | — | Not listed in miRBase; lacks any experimental evidence and requires initial validation. |

جدول ۷ فهرستی از آن‌دسته از miRNAهایی که در این پژوهش بلافاصله در ارتباط با عفونت آنفلوآنزای ماکیان هستند را نشان می‌دهد. بر اساس شواهد، miRNAهای *gga-mir-214*، *gga-mir-194* و *gga-mir-7477-5p* به‌طور مشخص در پاسخ به عفونت ویروسی آنفلوآنزا تأثیرگذار هستند، به‌طوری که *gga-mir-214* در فرآیندهای مرگ خود خواسته سلول و واکنش سلولی به ویروس مؤثر است، *gga-mir-194* در تنظیم سیتوکین‌ها و پاسخ ایمنی نقش دارد و *gga-mir-7477-5p* با تحریک پاسخ ایمنی ضدویروسی مرتبط است. همچنین، دو miRNA دیگر یعنی *gga-mir-6579-5p* و *gga-mir-6567-3p*، اگرچه شواهد کمتری درباره نقش مستقیم آن‌ها در عفونت آنفلوآنزای طیور وجود دارد، ممکن است در مسیرهای ایمنی نقش داشته باشند (Hong et al., 2021; Lee et al., 2023). این یافته‌ها اهمیت miRNAها را در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و کنترل بیماری‌زایی آنفلوآنزا تأیید می‌کند و پیشنهاد می‌کند که *gga-mir-214* و *gga-mir-194* به‌عنوان اهداف اصلی در مطالعات عملکردی و توسعه روش‌های فراژنتیک در مبارزه با عفونت آنفلوآنزای ماکیان مدنظر قرار گیرند.

ژن‌های *RPS28* و *RPL31* هر دو از پروتئین‌های ریبوزومی به‌شمار می‌روند، اما در زیرواحدهای متفاوت ریبوزوم فعالیت می‌کنند. *RPS28* به‌عنوان عضوی از زیرواحد کوچک (S۴۰) و خانواده S28E، در کروموزوم ۱۹ قرار دارد، در حالی که *RPL31* در زیرواحد بزرگ (S۶۰) و خانواده L31E روی کروموزوم ۲ قرار گرفته است. از منظر بالینی، *RPS28* به‌عنوان یک مهارکننده تومور در ایمنی‌درمانی شناخته شده و نقش مهمی در تقویت پاسخ ایمنی ضدتوموری، به‌ویژه در هدف‌گیری سلول‌های T ایفا می‌کند. همچنین، این ژن با کم‌خونی دایموند-بلکفان مرتبط است (Narla & Ebert, 2010; Lopez-Herrera et al., 2012; Khajuria et al., 2018; Kang et al., 2021) در مقابل، *RPL31* به‌عنوان یک پروموتر تومور شناخته می‌شود که با فعال‌سازی مسیر JAK-STAT در سرطان‌های معده، کولورکتال و پستان نقش دارد (Khanna et al., 2015; Wu et al., 2023; Li & Huang, 2024). شناسایی miRNAهای تنظیم‌کننده این دو ژن، مانند *miR-28-5p* برای *RPS28*، می‌تواند در توسعه درمان‌های نوین مؤثر باشد؛ مهار *RPL31* به‌ویژه در سرطان‌های گوارشی به‌عنوان یک هدف درمانی امیدوارکننده مطرح است. همچنین، بررسی تعامل *RPL31* با پروتئین *BRCA1* ممکن است سازوکارهای ترمیم DNA در سلول‌های سرطانی را روشن کند و ارتباط آن با بیماری‌هایی مانند پولیپ‌های خانوادگی (نوعی اختلال ارثی مرتبط با رشد پولیپ‌های متعدد در روده بزرگ و افزایش خطر سرطان کولورکتال)، اهمیت پژوهشی بالایی دارد. مطالعات آینده بر نقش این ژن‌ها در تنظیم ترجمه غیرکدکننده‌ها، شروع ترجمه غیرآغازین و تأثیر آن‌ها بر سلول‌های سرطانی یا عادی تمرکز خواهند داشت. پروتئین *RPS28* عضو خانواده S28E بوده و در پردازش rRNA و اسمبل شدن ریبوزوم نقش دارد (Smith et al., 2009)، طبق مطالعات پیشین نشان داده شده است که نسخه‌های مختلف این پروتئین می‌توانند بر دقت ترجمه و تنظیم پروتئین‌های خاص تأثیر بگذارند و حتی در تنظیم پروتئوم عضلات و فرآیندهای ضدپیری دخیل باشند (Tiku et al., 2017) . به‌طور خاص، افزایش بیان *RpS28a* در عضلات می‌تواند باعث افزایش ساخت پروتئین‌های با نقش ضدپیری شده و طول عمر را بهبود بخشد، که این نشان‌دهنده وجود ریبوزوم‌های تخصصی با عملکردهای متفاوت است. از سوی دیگر، *RPL31* پروتئینی است که به خانواده L31E تعلق دارد و به‌عنوان بخشی از زیرواحد بزرگ ریبوزوم در سیتوپلاسم قرار دارد. این ژن در بافت‌های مختلف از جمله طیور، پستانداران و سایر گونه‌ها حفظ شده است و بیان بالای آن در برخی شرایط پاتولوژیک مانند پولیپ‌های آدنوماتوز خانوادگی مشاهده شده است (Narla & Ebert, 2010; Lopez-Herrera et al., 2012; Khajuria et al., 2018; Kang et al., 2021). علاوه بر نقش سنتزی، پروتئین‌های ریبوزومی مانند *RPL31* و دیگر اعضای خانواده، عملکردهای خارج از ریبوزوم نیز دارند که شامل تنظیم چرخه سلولی، آپوپتوز و ترمیم DNA می‌شود (Smith et al., 2009)، این عملکردها می‌توانند در توسعه سرطان‌ها نقش داشته باشند. به‌عنوان مثال، برخی پروتئین‌های ریبوزومی می‌توانند مسیرهای سیگنالینگ مانند JAK-STAT را فعال کرده (Malekshahdehi, 2021) و به رشد و تهاجم سلول‌های سرطانی کمک کنند، در حالی که برخی دیگر، نقش مهاری روی تومورها دارند (Yang et al., 2020). بنابراین، *RPS28* و *RPL31* نه تنها در ساخت پروتئین بلکه در تنظیم پاسخ‌های سلولی و بیماری‌ها، به‌ویژه سرطان‌ها، نقش مهمی ایفا می‌کنند و بررسی دقیق‌تر آنها می‌تواند به کشف اهداف درمانی جدید منجر شود. ریبوزوم‌ها به‌عنوان کارخانه‌های سنتز پروتئین، برای تکثیر ویروس‌ها ضروری هستند. ژن‌های ریبوزومی *RPS28* کدکننده پروتئین کوچک S28 و *RPL31* کدکننده پروتئین بزرگ L31 در اسمبل شدن ریبوزوم و آغاز ترجمه نقش حیاتی دارند. پژوهش‌ها نشان می‌دهند miRNAها مانند *miR-28-5p* و *miR-708-5p* به‌طور مستقیم بیان این ژن‌ها را تنظیم می‌کنند: این miRNAها با اتصال به ناحیه 3' UTR ژن *RPS28*، ترجمه آن را مهار کرده و منجر به اختلال در پردازش pre-rRNA و کاهش زیست‌زایی ریبوزوم می‌شوند. پیامدهای این تنظیم عبارتند از: کاهش ساخت پروتئین‌های میزبان مورد نیاز برای تکثیر ویروس، تغییر بیان سیتوکین‌های التهابی و تعدیل آپوپتوز سلول‌های آلوده. برای تحلیل سیستماتیک این تعاملات، پلتفرم Tools4miRs با یکپارچه‌سازی بیش از ۱۷۰ روش تحلیلی و ۱۰ الگوریتم پیش‌بینی هدف، امکان شناسایی miRNAهای تنظیم‌کننده را فراهم می‌کند. این ابزار با پشتیبانی از تحلیل‌های چندسکویی و اعتبارسنجی تجربی با استفاده از پایگاه‌هایی مانند TarBase، انعطاف‌پذیری بالایی در پردازش داده‌های گونه‌های مختلف دارد.

شناسایی miRNAهای مرتبط با این بیماری و بررسی تعاملات آنها با ژن‌های هدف می‌تواند راه‌های جدیدی برای مقابله با این بیماری مهم اقتصادی و بهداشتی فراهم کند. miRNAها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی در سلامت و بیماری‌های ماکیان عمل می‌کنند. در پاسخ ایمنی به عفونت‌های ویروسی مانند ویروس لکوز ماکیان و ویروس بیماری بورس عفونی، miRNAهایی نظیر *miR-34b-5p* و *miR-23b* با سرکوب ژن‌های مسیر اینترفرون مثل MDA5 و IRF1 به فرار ویروس از سامانه ایمنی کمک می‌کنند (Wang, 2020). همچنین، miR-9 در عفونت بورس عفونی با مهار تولید اینترفرون، تکثیر ویروس را تقویت می‌کند (Etebari et al., 2020). تنش‌های محیطی مانند گرما، محدودیت غذایی و تراکم پرورش نیز با تغییر بیان miRNAها (نظیر miR-199a-5p و miR-1915)، سوخت و ساز لیپید و گلیکولیز را مختل کرده و سلامت طیور را تهدید می‌کنند (Beier et al., 2021; Mani et al., 2022). از سوی دیگر، miRNAهای گردشی در پلاسما و بافت‌ها به‌عنوان بیومارکرهای بیماری‌های متابولیک مطرح هستند، مطالعاتی روی گاوها (مانند شناسایی *bta-miR-11982* و *bta-miR-1388-5p* برای اسیدوز شکمبه) پتانسیل مشابهی را برای طیور نشان می‌دهند. این مولکول‌ها با تنظیم ژن‌های مرتبط با ایمنی، سوخت و ساز و پاسخ به تنش، هم به‌عنوان اهداف درمانی و هم ابزارهای تشخیصی امیدبخش در صنعت طیور عمل می‌کنند (Ojo et al., 2023)، هرچند، درک کامل سازوکارهای آن‌ها مستلزم پژوهش‌های بیشتر با بهره‌گیری از فناوری‌های نوین توالی‌یابی و بیوانفورماتیک است. علاوه بر آثار بهداشتی، آنفلوآنزای طیور، تأثیر اقتصادی قابل توجهی نیز دارد. تلفات گسترده پرندگان، کاهش تولید گوشت و تخم‌مرغ و هزینه‌های مربوط به کنترل و پیشگیری از بیماری، همه و همه باعث افزایش هزینه‌های تولید و کاهش درآمد مرغداری‌ها می‌شوند. به‌عنوان مثال، طی شیوع آنفلوآنزای طیور در سال ۲۰۱۵ در ایالات متحده، علاوه بر تلفات مستقیم پرندگان، هزینه‌های مربوط به قرنطینه، واکسیناسیون و ضدعفونی نیز بسیار بالا بود (Paul et al., 2019). این هزینه‌ها می‌توانند باعث افزایش قیمت محصولات طیور در بازار شوند و تأثیر منفی بر اقتصاد محلی و جهانی داشته باشند. آنفولانزای ماکیان، به‌ویژه سویه‌های بیماری‌زای بالا مانند H5N1، تهدیدی جدی برای صنعت طیور و سلامت عمومی جهانی محسوب می‌شود (Sims, 2007; Gizaw et al., 2018; Parvin et al., 2020; Clemmons et al., 2021). این ویروس نه تنها باعث تلفات گسترده در ماکیان می‌شود، بلکه دارای پتانسیل ایجاد پاندمی در انسان نیز است. پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهند miRNAهای به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی پس از رونویسی، نقش محوری در مدولاسیون پاسخ ایمنی میزبان به عفونت‌های ویروسی ایفا می‌کنند. طی عفونت آنفلونزای ماکیان، miRNAها از راه مهار ترجمه mRNA های هدف، مسیرهای پیادهی التهابی و سازوکارهای دفاع ضدویروسی را تنظیم می‌کنند (Wang et al., 2013). نوآوری این پژوهش در کشف سازوکارهای مولکولی ناشناخته پاسخ میزبان به عفونت آنفلونزای ماکیان نهفته است: تنظیم miRNAهای مرتبط با ژن‌های ریبوزومی می‌تواند به‌طور همزمان تکثیر ویروس را مهار کرده و پاسخ ایمنی ذاتی را تقویت نماید. این راهبرد دوگانه، پتانسیل بالایی برای توسعه درمان‌های ضدویروسی نوین در صنعت طیور ایجاد می‌کند.

پلتفرم Tools4miRs یک ابزار جامع و قدرتمند برای تجزیه و تحلیل miRNAها و اهداف آن‌ها است که مجموعه‌ای از ابزارهای مختلف را ارائه می‌دهد. این پلتفرم به پژوهشگران کمک می‌کند تا تعاملات بین miRNAs و اهداف آنها را پیش‌بینی و تجزیه و تحلیل کنند. یکی از ابزارهای اصلی Tools4miRs، ابزار پیش‌بینی اهداف miRNAs است که با استفاده از الگوریتم‌های مختلف، اهداف احتمالی miRNAs را پیش‌بینی می‌کند. علاوه بر این، ابزار تجزیه و تحلیل مسیرهای زیستی به پژوهشگران کمک می‌کند تا مسیرهای زیستی را که miRNAs در آنها نقش دارند، تجزیه و تحلیل کنند. همچنین، ابزار تجزیه و تحلیل شبکه‌های تعاملات به پژوهشگران کمک می‌کند تا شبکه‌های تعاملات بین miRNAs و اهداف آنها را تجزیه و تحلیل کنند. از جمله نقاط قوت Tools4miRs می‌توان به جامعیت آن، کاربری آسان، پشتیبانی از پایگاه‌های داده‌های مختلف و به‌روزرسانی منظم اشاره کرد. این پلتفرم دارای یک رابط کاربری آسان است که استفاده از ابزارهای مختلف را برای پژوهشگران ساده می‌کند و از پایگاه‌های داده‌های مختلفی پشتیبانی می‌کند که اطلاعاتی در مورد miRNAs و اهداف آنها ارائه می‌دهند. این امر، دقت و جامعیت تجزیه و تحلیل‌ها را افزایش می‌دهد. با این حال، Tools4miRs

دارای نقاط ضعف و محدودیت‌هایی نیز هست. برای مثال، دقت و جامعیت تجزیه و تحلیل‌های انجام شده با استفاده از این پلتفرم به داده‌های موجود در پایگاه‌های داده‌های مختلف بستگی دارد و اگر داده‌های موجود ناقص یا نادرست باشند، نتایج تجزیه و تحلیل‌ها نیز ممکن است نادرست باشند. همچنین، برخی از ابزارهای موجود در Tools4miRs ممکن است برای پژوهشگرانی که با تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی آشنا نیستند، پیچیده باشند و نیاز به دانش فنی داشته باشند. علاوه بر این، برخی از ابزارهای موجود در Tools4miRs ممکن است به‌دلیل محدودیت‌های فنی یا مالی برای برخی پژوهشگران قابل دسترسی نباشند. در کل، Tools4miRs یک پلتفرم قدرتمند و جامع برای تجزیه و تحلیل miRNAs و اهداف آنها است که می‌تواند به پژوهشگران در زمینه‌های مختلف کمک کند، اما مانند هر ابزار دیگری، دارای نقاط ضعف و محدودیت‌هایی است که باید در نظر گرفته شوند. در واقع، Tools4miRs یک ابزار دست‌چین شده است که بیش از ۱۷۰ روش برای تحلیل گسترده miRNA را گردآوری کرده است. این ابزارها در چهار دسته کلی و هفت دسته دقیق‌تر طبقه‌بندی شده‌اند و کاربران می‌توانند روش‌های موجود را بر اساس نیازها، قابلیت‌ها و ترجیحات تحقیقاتی خود فیلتر کنند. این سرویس رایگان و با دسترسی آزاد است و به‌طور سیستماتیک به‌روزرسانی خواهد شد. مطالعات نشان می‌دهند که خانواده‌ای از miRNAهای طیور شامل *gga-miR-34a*، *gga-miR-122-1/2*، *gga-miR-146a*، *gga-miR-155*، *gga-miR-206*، *gga-miR-1719*، *gga-miR-1594*، *gga-miR-1599* و *gga-miR-451*، نقش‌های تنظیمی حیاتی در پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی به عفونت ویروس آنفلوانزای پرندگان ایفا می‌کنند. این miRNAها با مدولاسیون بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی، مسیرهای سیگنالینگ التهابی و ضدویروسی را تعدیل می‌نمایند. به‌طور خاص، *gga-miR-34a* و *gga-miR-155* به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی سیتوکین‌های پیش‌التهابی عمل کرده، در حالی که *gga-miR-146a* در فیدبک منفی مسیرهای NF-κB مشارکت دارد. هم‌زمان، *gga-miR-122-1/2* و *gga-miR-451* در تنظیم پاسخ‌های ضدویروسی اینترفرون-محور دخیل هستند. این miRNAها نه‌تنها به‌عنوان بیومارکرهای پویای عفونت AIV عمل می‌کنند، بلکه به‌دلیل توانایی در تعدیل شبکه‌های ژنی ایمنی، اهداف درمانی امیدبخشی برای طراحی راهبردهای نوین ضدویروسی محسوب می‌شوند. یافته‌ها حاکی از آن است که مداخله هدفمند در بیان این miRNAها می‌تواند پاسخ میزبان به AIV را بهینه‌سازی نموده و پتانسیل تبدیل شدن به ابزارهای تراپیوتیک در صنعت طیور را دارا باشد (Wang et al., 2013).

داده‌های حاصل از نرم‌افزار TOOLS4miRs.org روی تعامل miRNAهای ماکیان و دو ژن هدف *RPS28* و *RPL31* نشانگر الگوی پیچیده‌ای از تنظیم ژنی است (جداول ۳ و ۴). در این بررسی، توانایی ۱۱ miRNA ماکیان در هدف قرار دادن این دو ژن با استفاده از چندین ابزار بیوانفورماتیکی پیش‌بینی شد. برای ژن *NUP58*، miRNAهای *gga-mir-6642-3p* و *gga-mir-3532-3p* به‌ترتیب با ۱۵ و ۱۲ جایگاه اتصال و تأیید چهار ابزار، قوی‌ترین نامزدها برای تنظیم بیان این ژن هستند که اهمیت آن‌ها را برای مطالعات عملکردی بعدی برجسته می‌سازد. در مقابل، برای ژن *RPS28*، miRNAهای *gga-miR-6567-3p*، *gga-miR-6642-3p*، *gga-mir-7477-5p* و *gga-mir-6579-5p* هر یک با تأیید پنج ابزار و ۸ تا ۱۰ جایگاه اتصال، به‌عنوان اصلی‌ترین رگولاتورهای بالقوه مطرح شده‌اند. مقایسه بین دو ژن نشان می‌دهد که در حالی که برخی miRNAها مانند *gga-mir-6642-3p* در هر دو ژن دارای پتانسیل تنظیمی قوی هستند، اما شدت و الگوی پیش‌بینی (تعداد ابزارهای تأییدکننده و جایگاه‌های اتصال) می‌تواند بر اساس توالی و ساختار هر ژن هدف متفاوت باشد. این تفاوت‌ها حاکی از اختصاصیت یا هم-پوشانی در نقش miRNAها در تنظیم مسیرهای زیستی مختلف است و ضرورت اعتبارسنجی آزمایشگاهی پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیکی را برای درک دقیق عملکرد miRNAها تأیید می‌کند. مطالعات اظهار دارند که تغییرات بیان ژن‌های ریبوزومی می‌تواند به‌عنوان نشانگری برای پاسخ ایمنی یا تحمل تنش در طیور مورد استفاده قرار گیرد. برای مثال، در شیوع بیماری‌های ویروسی مانند آنفلوآنزای مرغی، الگوهای بیان ژن‌های ریبوزومی مرتبط با پاسخ‌های ایمنی و التهابی تغییر می‌کنند که شناخت این تغییرات می‌تواند به توسعه واکسن‌های موثر و راهبردهای کنترل بیماری کمک نماید. همچنین، در زمینه بهبود تولیدات طیور، شناسایی و استفاده از این ژن‌ها در برنامه‌های اصلاح نژاد به‌منظور افزایش بهره‌وری و مقاومت

در برابر عوامل زیستی و محیطی مؤثر است. در نهایت، ژن‌های ریبوزومی به‌همراه اجزای ژنتیکی و مولکولی دیگر به‌عنوان کلیدهای اصلی در درک سازوکارهای زیستی و بهبود علم اصلاح نژاد طیور شناخته می‌شوند. استفاده از فناوری‌های نوین مانند RNA-seq، تجزیه و تحلیل شبکه زیستی و بیوانفورماتیک به شناسایی جزییات دقیق‌تر این ژن‌ها و نقش آنها در زیست‌شناسی طیور کمک شایانی کرده است. ژن‌های ریبوزومی در طیور به‌عنوان بخش حیاتی از فرآیندهای سلولی، نقش کلیدی در ساخت پروتئین و عملکردهای زیستی مرتبط دارند که مستقیماً بر رشد، توسعه و سلامت طیور تأثیر می‌گذارند. ریبوزوم‌ها، به‌عنوان ماشین‌های ترجمه اطلاعات ژنتیکی، از miRNAها و پروتئین‌های ریبوزومی تشکیل شده‌اند و ژن‌های کدکننده آن‌ها در نواحی خاصی از ژنوم طیور، به‌ویژه در ناحیه سازمان‌دهنده نوکلئولوس یا NOR، قرار دارند. این ژن‌ها تعداد کپی متغیری در خطوط مختلف طیور دارند که این تنوع با ویژگی‌های فنوتیپی و پاسخ به انتخاب در برنامه‌های اصلاح نژاد ارتباط دارد. به‌عنوان مثال، خطوط مرغ سفید تخم و مرغ قهوه‌ای تخم دارای مقادیر متفاوتی از ژن‌های ریبوزومی هستند که نشان‌دهنده تفاوت در ساختار و تنظیم این ریزناحیه ژنومی است. از نظر زیستی، حجم و کپی‌های ژن‌های ریبوزومی، ارتباط نزدیکی با ظرفیت ساخت پروتئین دارند. درنتیجه، این ژن‌ها در کنترل رشد عضلانی و توسعه فیزیولوژیکی طیور نقش مهمی ایفا می‌کنند. یکی از ژن‌های مهم در این زمینه، *RPL3L* است که در مطالعات اخیر به عنوان ژنی مرتبط با رشد عضلانی و وزن بدن در مرغ‌ها شناخته شده است. این ژن، از راه تاثیر بر تکثیر و تمایز ماهیچه‌های اسکلتی، نقش مهمی در افزایش وزن و بهبود صفات اقتصادی دارد و جهش‌های آن می‌تواند به‌عنوان نشانگرهای مولکولی در اصلاح نژاد مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، اهمیت ژن‌های ریبوزومی در واکنش ایمنی طیور نیز مشاهده شده است. تغییرات در بیان این ژن‌ها می‌تواند نشان‌دهنده پاسخ به بیماری‌هایی مانند آنفلوانزای طیور باشد و شناخت دقیق این تغییرات به‌توسعه روش‌های پیشگیری و درمان موثر کمک می‌کند. افزون بر این، مطالعات پروفایلینگ میکروبیوتای طیور با استفاده از توالی‌یابی ژن *S rRNA 16* به‌توسعه دانش درباره تعاملات میکروبی و سلامت دستگاه گوارش طیور کمک شایانی کرده است که جهت بهبود تغذیه و کارآیی تولید اهمیت دارد. در نهایت، کاربرد فناوری‌های مدرن مانند RNA-Seq و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی سبب شده است که شناسایی و درک بهتری از عملکرد و تنظیم ژن‌های ریبوزومی در بافت‌ها و مراحل مختلف رشد طیور حاصل شود. این دانش در اصلاح نژاد و مدیریت تولید نقش مهمی دارد و می‌تواند به ارتقای سلامت و بهره‌وری در صنعت طیور منجر شود.

## نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهند که miRNAها نقشی کلیدی در تنظیم پاسخ ایمنی ماکیان به عفونت ویروس آنفلوآنزا ایفا می‌کنند و می‌توانند از راه هدف‌گیری ژن‌های ساختاری ریبوزومی همچون *RPS28* و *RPL31* در تعدیل ترجمه و تنظیم عملکرد سلولی نقش‌آفرینی کنند. در این میان، miRNAهایی همچون *gga-mir-214*، *gga-mir-194*، *gga-mir-7477-5p* و *gga-mir-6642-3p* نه تنها بر اساس الگوریتم‌های بیوانفورماتیکی، بلکه با شواهد تجربی موجود در پایگاه‌های داده زیستی و مقالات علمی، به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی مسیرهای آپوپتوز، دفاع ضدویروسی و هموستاز ایمنی در ماکیان معرفی می‌شوند. تأیید چندین ابزار مستقل بر پیش‌بینی تعامل این miRNAها با ژن‌های ریبوزومی مورد نظر، استحکام نتایج را افزایش می‌دهد و اهمیت توجه به این مسیرهای تنظیمی را برای پژوهش‌های بعدی برجسته می‌کند. این نتایج نه تنها دانش موجود در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و ایمنی دام‌های پرورشی را غنی می‌سازد، بلکه می‌تواند به تدوین راهکارهای نوین برای تشخیص زودهنگام، پیشگیری و درمان هدفمند عفونت‌های ویروسی کمک نماید. همچنین، رویکرد استفاده از تحلیل شبکه‌ای و بیوانفورماتیک ترکیبی می‌تواند به‌عنوان یک مدل پژوهشی برای بررسی نقش miRNAها در سایر بیماری‌ها و گونه‌های جانوری تعمیم یابد و افق‌های جدیدی در تلفیق داده‌های زیستی با کاربردهای دامپزشکی و بیوالکترونیک بگشاید. در نهایت، پیشنهاد می‌شود که پژوهش‌های عملکردی و تجربی بیشتری جهت ارزیابی دقیق نقش این miRNAها و اثربخشی مداخلات اپی‌ژنتیک مبتنی بر مهار یا تحریک آن‌ها در مدیریت عفونت آنفلوآنزای طیور انجام گیرد.

## فهرست منابع


Beier, R. C., Byrd, J. A., Andrews, K., Caldwell, D., Crippen, T. L., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2021). Disinfectant and antimicrobial susceptibility studies of the foodborne pathogen Campylobacter jejuni isolated from the litter of broiler chicken houses. *Poultry Science*, *100*(2), 1024-1033. doi: 10.1016/j.psj.2020.11.048

Benjamin, E. J., Virani, S. S., Callaway, C. W., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., … & Deo, R. (2018). Heart disease and stroke statistics—2018 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, *137*(12), e67-e492. doi; 10.1161/CIR.0000000000000558

Chen, Y., & Wang, X. (2020). miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D127-D131. doi: 10.1093/nar/gkz757

Clemmons, E. A., Alfson, K. J., & Dutton III, J. W. (2021). Transboundary animal diseases, an overview of 17 diseases with potential for global spread and serious consequences. *Animals*, *11*(7), 2039. doi: 10.3390/ani11072039

Cui, S., Yu, S., Huang, H.-Y., Lin, Y.-C.-D., Huang, Y., Zhang, B., … & Li, Z. (2025). miRTarBase 2025: updates to the collection of experimentally validated microRNA–target interactions. *Nucleic Acids Research*, *53*(D1), D147-D156. doi: 10.1093/nar/gkad875

Cullen, B. R. (2004). Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Research*, *102*(1), 3-9. Doi: 10.1016/j.virusres.2004.01.009

Dunislawska, A., Pietrzak, E., Wishna Kadawarage, R., & Siwek, M. (2023). MicroRNA expression in immune tissues of adult chickens after embryo stimulation with bioactive substances. *Scientific Reports*, *13*(1), 3076. doi: 10.1038/s41598-023-30299-3

Etebari, K., Filipović, I., Rašić, G., Devine, G. J., Tsatsia, H., & Furlong, M. J. (2020). Complete genome sequence of Oryctes rhinoceros nudivirus isolated from the coconut rhinoceros beetle in Solomon Islands. *Virus Research*, *278*, 197864. doi: 10.1016/j.virusres.2020.197864

Gizaw, F., Merera, O., Zeru, F., Bedada, H., Gebru, M.-u., & Abdi, R. (2018). Sero-prevalence and socioeconomic impacts of peste des petits ruminants in small ruminants of selected districts of Afar, Ethiopia. *Journal of Veterinary Science and Technology*, *9*(1), 513. doi: 10.4172/2157-7579.1000513

Hoagland, M. B., Stephenson, M. L., Scott, J. F., Hecht, L. I., & Zamecnik, P. C. (1958). A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *Journal of biological Chemistry*, *231*(1), 241-257. doi: 10.1016/S0021-9258(19)77302-5

Hong, Y., Truong, A. D., Lee, J., Vu, T. H., Lee, S., Song, K.-D., … & Hong, Y. H. (2021). Exosomal miRNA profiling from H5N1 avian influenza virus-infected chickens. *Veterinary Research*, *52*(1), 36. doi: 10.1186/s13567-021-00892-3

Kang, J., Brajanovski, N., Chan, K. T., Xuan, J., Pearson, R. B., & Sanij, E. (2021). Ribosomal proteins and human diseases: molecular mechanisms and targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 323. doi: 10.1038/s41392-021-00728-8

Khajuria, R. K., Munschauer, M., Ulirsch, J. C., Fiorini, C., Ludwig, L. S., McFarland, S. K., … & Mani, D. R. (2018). Ribosome levels selectively regulate translation and lineage commitment in human hematopoiesis. *Cell*, *173*(1), 90-103. e119. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.036

Khanna, P., Chua, P. J., Bay, B. H., & Baeg, G. H. (2015). The JAK/STAT signaling cascade in gastric carcinoma. *International Journal of Oncology*, *47*(5), 1617-1626. doi: 10.3892/ijo.2015.3160

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, *294*(5543), 853-858. doi: 10.1126/science.1064921

Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., & Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. *Science*, *294*(5543), 858-862. doi: 10.1126/science.1065062

Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. *Science*, *294*(5543), 862-864. doi: 10.1126/science.1065329

Lee, S., Kang, S., Heo, J., Hong, Y., Vu, T. H., Truong, A. D., … & Hong, Y. H. (2023). MicroRNA expression profiling in the lungs of genetically different Ri chicken lines against the highly pathogenic avian influenza H5N1 virus. *Journal of Animal Science and Technology*, *65*(4), 838. doi:10.5187/jast.2022.e127

Lerner, M. R., Boyle, J. A., Mount, S. M., Wolin, S. L., & Steitz, J. A. (1980). Are snRNPs involved in splicing? *Nature*, *283*(5743), 220-224. doi: 10.1038/283220a0

Li, P., & Huang, D. (2024). Targeting the JAK-STAT pathway in colorectal cancer: mechanisms, clinical implications, and therapeutic potential. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *12*, 1507621. doi: 10.3389/fcell.2024.1507621

Li, S. (2019). Regulation of ribosomal proteins on viral infection. *Cells*, *8*(5), 508. doi: 10.3390/cells8050508

Li, Z., Chen, B., Feng, M., Ouyang, H., Zheng, M., Ye, Q., … & Zhang, X. (2015). MicroRNA-23b promotes avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) replication by targeting IRF1. *Scientific Reports*, *5*(1), 10294. doi: 10.1038/srep10294

Lopez-Herrera, G., Tampella, G., Pan-Hammarström, Q., Herholz, P., Trujillo-Vargas, C. M., Phadwal, K., … & Mory, A. (2012). Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *The American Journal of Human Genetics*, *90*(6), 986-1001. doi:10.1016/j.ajhg.2012.04.015

Lukasik, A., Wójcikowski, M., & Zielenkiewicz, P. (2016). Tools4miRs–one place to gather all the tools for miRNA analysis. *Bioinformatics*, *32*(17), 2722-2724. doi: 10.1093/bioinformatics/btw189

Malekshahdehi, S., Hafezian, S. H., 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. doi: 10.22124/ar.2021.17794.1563

Mani, A., Kushwaha, K., Khurana, N., & Gupta, J. (2022). p-Coumaric acid attenuates high-fat diet-induced oxidative stress and nephropathy in diabetic rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *106*(4), 872-880. doi: 10.1111/jpn.13645

Maurya, R., Shamim, U., Mishra, P., Swaminathan, A., Raina, A., Tarai, B., … & Pandey, R. (2023). Intertwined dysregulation of ribosomal proteins and immune response delineates SARS-CoV-2 vaccination breakthroughs. *Microbiology Spectrum*, *11*(3), e04292-04222. doi: 10.1128/spectrum.04292-22

Narla, A., & Ebert, B. L. (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *115*(16), 3196-3205. doi: 10.1182/blood-2009-10-178129

O'Dowd, K., Emam, M., El Khili, M. R., Emad, A., Ibeagha-Awemu, E. M., Gagnon, C. A., & Barjesteh, N. (2020). Distinct miRNA profile of cellular and extracellular vesicles released from chicken tracheal cells following avian influenza virus infection. *Vaccines*, *8*(3), 438. doi: 10.3390/vaccines8030438

Ojo, O., Hajek, L., Johanns, S., Pacífico, C., Sener-Aydemir, A., Ricci, S., … & Zebeli, Q. (2023). Evaluation of circulating microRNA profiles in blood as potential candidate biomarkers in a subacute ruminal acidosis cow model-a pilot study. *BMC Genomics*, *24*(1), 333. doi: 10.1186/s12864-023-09433-y

Parvin, R., Nooruzzaman, M., Kabiraj, C. K., Begum, J. A., Chowdhury, E. H., Islam, M. R., & Harder, T. (2020). Controlling avian influenza virus in Bangladesh: challenges and recommendations. *Viruses*, *12*(7), 751. doi: 10.3390/v12070751

Pasick, J., Diederich, S., Berhane, Y., Embury-Hyatt, C., & Xu, W. (2017). Imbalance between innate antiviral and pro-inflammatory immune responses may contribute to different outcomes involving low-and highly pathogenic avian influenza H5N3 infections in chickens. *Journal of General Virology*, *98*(6), 1245-1258. doi: 10.1099/jgv.0.000801

Paul, M. C., Vergne, T., Mulatti, P., Tiensin, T., & Iglesias, I. (2019). Epidemiology of avian influenza viruses. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*, 150. doi: 10.3389/fvets.2019.00150

Saka, Ö., McGuire, A., & Wolfe, C. (2009). Cost of stroke in the United Kingdom. *Age and Ageing*, *38*(1), 27-32. doi: 10.1093/ageing/afn281

Shi, X., Wang, X., Li, Z., Zhu, Q., Tang, W., Ge, S., & Luo, J. (2006). Nucleotide substitution pattern in rice paralogues: implication for negative correlation between the synonymous substitution rate and codon usage bias. *Gene*, *376*(2), 199-206. doi: 10.1016/j.gene.2006.03.003

Siekevitz, P., & Zamecnik, P. C. (1981). Ribosomes and protein synthesis. *The Journal of Cell Biology*, *91*(3), 53. doi: 10.1083/jcb.91.3.53s

Sikorska, M., Siwek, M., Slawinska, A., & Dunislawska, A. (2021). miRNA profiling in the chicken liver under the influence of early microbiota stimulation with probiotic, prebiotic, and synbiotic. *Genes*, *12*(5), 685. doi: 10.3390/genes12050685

Sims, L. D. (2007). Lessons learned from Asian H5N1 outbreak control. *Avian Diseases*, *51*(s1), 174-181. doi: 10.1637/7637-042806R.1

Smith, D. J., Konarska, M. M., & Query, C. C. (2009). Insights into branch nucleophile positioning and activation from an orthogonal pre-mRNA splicing system in yeast. *Molecular Cell*, *34*(3), 333-343. doi: 10.1016/j.molcel.2009.03.012

Tiku, V., Jain, C., Raz, Y., Nakamura, S., Heestand, B., Liu, W., … & Slagboom, P. E. (2017). Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity. *Nature Communications*, *8*(1), 16083. doi: 10.1038/ncomms16083

Wang, Q., Ji, X., Gao, Y., Qi, X., Wang, X., Wang, Y., … & Wang, X. (2013). Overexpression of microRNA gga-miR-1650 decreases the replication of avian leukosis virus subgroup J in infected cells. *Journal of General Virology*, *94*(10), 2287-2296. doi: 10.1099/vir.0.054007-0

Wang, Y. (2020). Research progress on microRNAs involved in the regulation of chicken diseases. *The Journal of Poultry Science*, *57*(1), 7-17.Doi: 10.2141/jpsa.0190073.

Wu, F., Liu, Y., Hu, S., & Lu, C. (2023). Ribosomal protein L31 (RPL31) inhibits the proliferation and migration of gastric cancer cells. *Heliyon*, *9*(2). doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13076

Yang, L., Shi, P., Zhao, G., Xu, J., Peng, W., Zhang, J., … & Chen, F. (2020). Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 8. doi: 10.1038/s41392-020-0110-5