DOI: 10.22092/vj.2018.123898.1518
شماره ۱۲۴ پاییز ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

شناسایی بیومارکرهای بیان ژن جهت تشخیص مصرف غیر قانونی محرک‌های رشد استروئیدی در کشتارگاه‌ها

• زهرا رودباری
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت
• مرتضی ستائی‌مختاری
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت
• ارسلان برازنده
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت
• حمیدرضاسیدآبادی (نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي. کرج. ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۸-۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۱۰-۰۹
Email: hseyedabady@gmail.com

چکیده

توجه به وجود باقي‌مانده هورمون‌هاي محرک رشد در لاشه حیوانات کشتار شده در کشتارگاه به عنوان يك خطر بالقوه براي سلامت افراد جامعه ضروری می‌باشد. پژوهش حاضر با هدف شناسایی بیومارکرهایی جهت تشخیص استفاده غیرقانونی از محرک‌های رشد استروئیدی در کشتارگاها انجام شد. برای این منظور در ابتدا آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها در یک پروفایل بیان ژنی موجود در پایگاه داده Arrayexpress با شماره دسترسی E-GEOD-12179، شامل مقایسه‌ی بافت ماهیچه گاو گوشتی که هورمون محرک رشد دریافت کرده با گاو گوشتی که هیچ محرک رشدی دریافت نکرده است انجام شد. از بین ژن‌هایی با بیان متفاوت، ژن‌های هدف با استفاده از تجزیه و تحلیل پارامترهای آماری شبکه شناسایی شدند. ژن‌های شناسایی شده شامل: *BMP4*، *TGFB1*، *EDN1*، *MAPK1* و *PPARA* بودند. سپس آنالیز مسیرهاي ژنی، ساخت و آنالیز شبکه بیانی ژن‌ها بر اساس ژن‌های هدف، با استفاده از نرم‌افزارهای Cytoscape، Pathvisio و Pathwaystudio انجام شد. تجزیه و تحلیل مسیرهاي ژنی نشان داد، مسیرهاي فاکتور رشد بتا، گیرنده فاکتور رشد و آزادسازی هورمون گنادوتروپین معنی‌دار می‌باشند. همچنین نتایج این تجزیه و تحلیل نشان داد که این ژن‌ها در تنظیم فعالیت‌های پایه‌ای سلول تکثیر، تمایز و نمو و فرایند هایپرتروفی ماهیچه نقش دارند. بنابراین این ژن‌ها پتانسیل معرفی به عنوان بیومارکر بیان ژنی در رابطه با تشخیص استفاده از محرک‌های رشد استروئیدی را دارند و نشانگرهای جدیدی را برای تشخیص مصرف غیر قانونی محرک‌های رشد استروئیدی در کشتارگاه‌ها فراهم می‌کنند.

کلمات کلیدی: بیومارکر کاندیدا، تشخیص تقلبات، مسیر بیولوژی، واکاوی بیان ژن

Veterinary Researches & Biological Products No 124 pp: 2-8

Identification of gene expression biomarkers to detect illicit use of steroid growth stimulators in slaughterhouses

By: Roudbari. Z., Department of Animal Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran. Sattaei Mokhtari, M., Department of Animal Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran. Barazandeh, A., Department of Animal Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran. and Seyedabadi, H.R., (Corresponding Author) Animal Science Research Institute of IRAN (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Email: hseyedabady@gmail.com

Received: 2018-10-27 Accepted: 2018-12-30

Consideration of the residual growth hormones in the carcass of slaughtered animals in the slaughterhouse is necessary as a potential risk to the health of the community. The present study aimed at identifying biomarkers to detect the illegal use of growth stimulating hormones in slaughter houses. For this purpose, the differential expression analysis of the genes in a gene expression profile in the Arrayexpress database with the accession number E-GEOD-12179 was initially comprised of a comparison of the muscle tissue of the beef cattle receiving the growth stimulating hormone with beef cattle muscle, which did not receive any growth stimulating hormones. Among genes with different expression, target genes were identified by analyzing the statistical parameters of the network. The identified genes were *MAPK1*, *EDN1*, *TGFB1*, *BMP4*, and *PPARA*. Then the pathway analysis of the gene, generating and analyzing the expression network of genes based on target genes were performed using Pathvisio, Cytoscape and Pathway studio software. Analysis of pathways showed that beta-cell growth factor, growth factor receptor, and gonadotropin hormone release were significant. Also, the results of this analysis showed that these genes play a role in the regulation of cellular cell proliferation, differentiation, development, and process of muscle hypertrophy. Therefore, these genes have the potential for introduction as biomarkers of gene expression in relation to the detection of the use of growth promoters and provide new markers for detecting illegal use of growth stimulating hormones in slaughterhouses.

Key words: Candidate biomarker, Fraud detection, Biology pathway, gene expression analysis

مقدمه

افزایش نگرانی در جامعه در مورد سلامت محصولات غذایی، اهمیت توجه و بررسی عوامل موثر مانند تولید غذا، سلامت دام، ایمنی غذا و ردیابی محصولات غذایی را بیش از پیش نشان می‌دهد که امروزه به کمک تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم می‌توان اطلاعات مربوط به سلامت دام را توسط تمامی دست اندرکاران صنایع غذایی دامی ردیابی کرد (۲۱). در بعضی کشورها استفاده از محرک‌های رشد منع مصرف ندارد به عنوان مثال، در حال حاضر تقریبا براي ۹۰ درصد گاوهاي گوشتي در آمریکا هورمون با دوز خاصی تجویز مي‌شود. اما در اتحادیه اروپا استفاده از هورمون‌های طبیعی و مصنوعی به عنوان محرک‌های رشد در دام ممنوع است (۳) و وضعیت ایران از این نظر چندان روشن نیست. با وجود ممنوعیت، استفاده از آن در گاوهای گوشتی همچنان برای افزایش بهره‌وری و کاهش هزینه‌های پرورش استفاده می‌شود (۲). پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که دگزامتازون، یک گلوکوکورتیکوئید مصنوعی است و در صورت مصرف در غلظت‌های مختلف در کبد، ماهیچه و کلیه حیوانات بعد از کشتار قابل تشخیص است (۲۳)، دگزامتازون و دیگر گلوکوکورتیکویدهای مصنوعی برای درمان در شرایطی استفاده می‌شوند که نیاز به مدولاسیون ایمنی یا التهابی وجود دارد، تشخیص این مواد پس از کشتار در نتیجه مصرف بیش از دوز مجاز مصرفی و زمان ناکافی برای دفع آن امکان‌پذیر است (۷). نظر به اینکه باقیمانده هورمون‌های محرک رشد در گوشت، اثرات زیان بخشی در مصرف‌کنندگان ایجاد می‌کند، کنترل کیفی کلیه فرآورده‌های گوشتی از نظر عاری بودن از باقیمانده هورمون‌های محرک رشد امری ضروری است. امروزه از بیومارکرها، تکنیک‌های بافت شناسی و کروماتوگرافی مایع و طیف‌سنجی به عنوان روش‌های غربالگری در پیشگیری از سوء استفاده از هورمون‌های محرک رشد استفاده می‌شود. اکنون ظهور فن‌آوری‌های امیکس (ژنومیکس،

ترانسکریپتومیکس، پروتئومیکس، متابولومیکس) چشم‌انداز مطلوبی را برای کشف بیومارکرهای قابل اعتماد و قابل اندازه‌گیری ارائه می‌دهد (۱ و ۱۳). امروزه تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم با استفاده از فناوری ریزآرایه به عنوان یک روش غربالگری برای تشخیص اثرات زیستی هورمون‌های محرک رشد در نظر گرفته شده است و می‌تواند به عنوان ابزاری قدرتمند برای مبارزه با استفاده از این مواد در پرورش حیوانات مزرعه باشد (۱۳ و ۱۵). فناوری ریزآرایه یک تصویر کلی از بیان ژن را در اندازه بزرگ ژنومی ارائه می‌کند و فرصتی را فراهم آورده است تا پژوهشگران با اندازه‌گیری میزان mRNA تولید شده در هر سلول بتوانند بیان اختصاصی هزاران ژن را بسنجند. از همین رو، این فناوری به کانون پژوهش‌ها در فرایندهای سلولی مرتبط با میزان و نحوه بیان ژن از جمله عملکرد ژن‌ها و ساز و کارهای تمایز سلولی تبدیل شده است. با این روش می‌توان با مطالعه همزمان نحوه بیان کل ژنوم، تصویر دقیق‌تری از عملکرد متقابل ژن‌ها به دست آورد (۱۱). امروزه حجم بالایی از داده‌های بیان ژن در پایگاه اطلاعاتی مانند GEO و ArrayeExpress در دسترس پژوهشگران است که امکان ادغام و پایش این داده‌ها برای تهیه نقشه و بررسی روابط بین ژن‌ها و مولکول‌ها را فراهم کرده است. علاوه بر این، از شبکه‌های تنظیم ژنی می‌توان برای یافتن بیومارکرهای تشخیصی استفاده نمود (۴). ازجمله این پژوهش‌ها پایش داده‌های ریزآرایه مربوط به گاوهای بومی کره جنوبی برای شناسایی بیومارکرهای زیستی مرتبط با صفت تردی گوشت می‌باشد. نتایج بررسی مسیرهای بیولوژیکی در این پژوهش نشاد داد بیان ژن *ADAMTS4* که در فرایندهای کاتابولیسم پروتئین و بیوسنتز کلسترول نقش دارند در گاوهای دارای محتوی چربی بالا به طور معنی داری افزایش یافته است. ژن *ADAMTS4* توسط سه ژن تنظیم‌کننده *TNFa*، *IL-17A* و *TGFB1* فعال می‌شود، لذا این ژن را به عنوان ژن کلیدی برای افزایش مقدار چربی موجود در گوشت و در نتیجه تردی آن در اوایل دوره رشد معرفی کردند (۱۰). همچنین برای شناسایی ژن‌های درگیر در تنظیم هموستازی آهن در ماهیچه اسکلتی گاو، پژوهشی انجام و نتایج این تحقیق نشان داد که ژن‌های *BMP6* و *SMAD1* در هموستازی آهن نقش داشته و مسیر *SMAD3* به عنوان یک مسیر جدید و دارای پتانسیل قوی در تنظیم هموستازی آهن پیشنهاد گردید (۹).

بر این اساس، هدف از پژوهش حاضر شناسایی مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با رشد و توسعه بافت ماهیچه گاوهای نر گوشتی تیمار شده با محرک رشد دگزامتازون با استفاده از پروفایل بیان ژن و تدوین استراتژی برای معرفی، ورود و تلفیق داده‌های بیان ژن و واکاوی‌های بیوانفورماتیکی در فرایند شناسایی بیومارکرهای موثر برای تشخیص استفاده غیرقانونی از محرک‌های رشد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و کنترل کیفیت داده‌ها

داده‌های ریزآرایه مورد استفاده در پژوهش کنونی از پایگاه داده Arrayexpress با شماره دسترسی E-GEOD-12179 و پایگاه داده GEO با شماره دسترسی GSE12179 استخراج شدند. این داده‌ها متعلق به گروه آزمایشی تیمار (گروهی که دگزامتازون به مدت ۴۳ روز دریافت کرده بود) و گروه شاهد بودند. بیان ژن‌ها با استفاده از پلت فرم Agilent-015354 Bovine Oligo Microarray اندازه‌گیری شده بود. قبل از تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های اندازه‌گیری شده توسط تکنیک ریزآرایه در پژوهش کنونی کنترل کیفیت داده‌های خام با بسته نرم‌افزاری limma (Linear Model for Microarray) در نرم‌افزار R و با استفاده از روش تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) و BOX Plot انجام شد و سپس با استفاده از روش استاندارد نرمال‌سازی توسط الگوریتم RMA نرمال‌سازی چارکی و خلاصه‌سازی شدند (۱۶).

بررسی بیان افتراقی ژن‌ها

در پژوهش کنونی از بسته‌های نرم‌افزاری Biobase، limma و GEOquery در نرم‌افزار R، برای تعیین میزان بیان هر ژن و بیان افتراقی ژن‌های مربوط به پروفایل بیان ژن بافت ماهیچه پا در بین دو گروه آزمایشی استفاده شد. معمولاً بعد از این مرحله ژن‌هایی مشخص می‌شوند که در گروه‌های مورد مطالعه به شکل متفاوتی بیان می‌شوند که این ژن‌ها کاندید بررسی بیشتر در مطالعات زیست‌سامانه بوده و برای شناسایی مسیرهای بیولوژی که ژن‌های مربوطه در آن‌ها دخیل هستند، استفاده می‌شوند. در پژوهش حاضر، معیار انتخاب ژن‌ها میزان تفاوت بیان (۲-<foldchange<۲) با سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

ساخت شبکه ژنی

در این مرحله بر اساس ژن‌هایی که بیان افتراقی معنی‌داری را در مرحله قبل نشان داده بودند، شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین با استفاده از افزونه STRING و مجموعه داده‌های Bos Taurus موجود در نرم‌افزار Cytoscape نسخه 3,6,1 (۱۸) ترسیم شد. این برنامه براساس مقدار همبستگی که در میزان بیان ژن‌های مربوطه وجود دارد شبکه ژنی را شناسایی و ترسیم می‌کند و ژن‌هایی که بیشترین ارتباط را با یکدیگر دارند بوسیله تعداد کمان خارج شده از آن‌ها مشخص می‌کند. برای تجزیه و تحلیل شبکه‌های مولکولی پیچیده، مجسم‌سازی اطلاعات و واکاوی پارامترهای آماری شبکه حاصل، از افزونه‌های MCODE و CytoNCA موجود در نرم‌افزار Cytoscape استفاده شد.

آنالیز مسیرهای بیولوژیکی

برای بررسی و درک بهتر ژن‌های شناسایی شده، واکاوی مسیرهای بیولوژیکی بر اساس ژن‌هاي تشکیل دهنده شبکه برهمکنشی بیان ژنی، با استفاده از نرم‌افزار pathvisio انجام شد. این نرم‌افزار برای شناسایی و ترسیم مسیرهای بیولوژیکی به کار می‌رود و در آدرس اینترنتی (http://www.pathvisio.org) قابل دسترسی آزاد است. این مرحله پژوهش براساس سه ویژگی مهم ژن‌ها شامل: آماره Z Score>1.96، P-value≤0.05 حداقل سه عدد از ژن‌های دخیل در مسیر بیولوژیکی که تغییرات بیان‌شان معنی‌دار باشد، انجام شد. نتایج این مرحله مسیرهای بیولوژیکی را نشان می‌دهد که ژن‌های شبکه در کنترل آن‌ها موثر باشد.

ادغام‌سازی شبکه‌های ژنی

برای تایید نتایج رسم شبکه و بررسی بیشتر ارتباط بین ژن‌های درگیر

در فرایندهای رشد و توسعه بافت ماهیچه از نرم‌افزار Pathwaystudio (۲۲) استفاده شد. شناسایی مسیرهای ژنی به دست آمده از برهم کنش داده‌های پروفایل بیانی ژن تأثیرگذار بر یک فرآیند زیستی، می‌تواند گام مهمی در فهم بهتر ساز و کارهای تنظیمی آن فرآیند باشد (۲۴). در این پژوهش، چگونگی ساز و کار مولکولی تحریک رشد و توسعه بافت ماهیچه در پاسخ به محرک‌های رشد با در نظر گرفتن مسیرهای ژنی فعال شده بررسی شد.

نتایج و بحث

در پژوهش کنونی، با آنالیز پروفایل بیانی بافت ماهیچه پای گاو گوشتی نر مشخص شد که تعداد ۴۲۸۹ ژن، بیان افتراقی در دو تیمار مورد بررسی داشتند. تعداد ۳۰۶۴ ژن افزایش بیان معنی‌داری نسبت به گروه عدم مصرف محرک رشد داشتند که نشان می‌دهد استفاده از هورمون محرک رشد، بیان بسیاری از ژن‌ها را افزایش داده است. نتایج آماری حاصل از نرم‌افزار Cytoscape نشان داد که از این مجموعه ژنی تعداد ۲۰۶۷ ژن به عنوان شروع‌کننده کمان در شبکه ژنی می‌باشند. تعداد کمان‌های حاصل شده از این ژن‌ها در این شبکه بین ۱ تا ۳۴ کمان متغیر بود. تعداد کمان‌های حاصل شده یا به عبارتی درجه ارتباط با دیگر ژن‌ها در واقع نشان‌دهنده میزان اتصالات همسایگان یک ژن می‌باشد (۱۸). بالاترین میزان این پارامتر در رابطه با شبکه مورد بررسی ۳۴ بود که نشان می‌دهد ژن‌های مرتبط با یکدیگر، در مجموع با ۳۴ مسیر مرتبط هستند. بنابراین براساس این نتایج می‌توان برخی از ژن‌ها را که بیش ترین کمان از آن‌ها حاصل شده است به عنوان کلیدی‌ترین ژن‌های موثر و دارای اثر تنظیمی بیشتر مطرح نمود. همچنین برخی از پارامترهای حاصل از نتایج آماری کمک می‌کنند تا از میان تمام ژن‌های شبکه، آن ژن‌هایی که عامل اصلی ارتباطات داخل شبکه هستند شناسایی شوند. آماره به مرکزیت میانی در شبکه برای هر گره تعریف می‌شود. این آماره نشان‌دهنده میزان تاثیر گره مورد نظر بر اثرات متقابل سایر گره‌ها است. آماره بعدی که در تشخیص ژن‌های موثر در شبکه به کار می‌رود مرکزیت درونی می‌باشد. این پارامتر به تعداد گره‌هایی اشاره دارد که در نزدیکترین فاصله نسبت به گره مورد نظر قرار دارند و به سرعت می‌توانند با سایر گره‌ها ارتباط برقرار کند (۱۸). با توجه به آماره‌های توضیح داده شده ژن‌هایی با بیشترین اثر بر شبکه در جدول ۱ ذکر شده است.

بررسی مسیرهای بیولوژیکی و ویژگی‌های ساختاری و عملکردی این ژن‌های بیش بیان، توسط نرم‌افزار Pathvisio منجر به شناسایی مسیرهای بیولوژیکی فاکتور رشد بتا، گیرنده فاکتور رشد، آزادسازی هورمون گنادوتروپین، گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی شد که با فرایندهای فعال سلولی مانند رشد و تکثیر سلول ارتباط داشتند (جدول ۲). در واقع نتایج حاکی از این است که ژن‌های دارای بالاترین اثر تنظیم‌کنندگی در این مطالعه به همراه سایر ژن‌های تحت تنظیم آن‌ها، بر روند تحریک رشد سلولی موثر هستند. نتایج براساس روش های آماری مختلف ارزیابی و نتایج براساس سطح معنی‌داری ۵ درصد گزارش شد.

برای بررسی بیشتر ژن‌های دارای اثر تنظیم‌شوندگی بالاتر و معنی‌دار در مسیرهای بیولوژیکی، ویژگی‌های ساختاری و عملکردی و پیش‌بینی برهمکنش پروتئین‌های کدکننده توسط این ژن‌ها به صورت پروتئین کیناز، لیگاند، گیرنده، فاکتور نسخه‌برداری و پیام‌رسان از نرم‌افزار Pathwaystudio استفاده شد. شکل ۱ شبکه برهمکنش پروتئین‌های کدکننده ژن‌های بیش بیان با بالاترین اثر تنظیم‌کنندگی در فرایندهای بیولوژکی و عملکردی را نشان می‌دهد.

نقش اکثر ژن‌های مذکور در تنظیم تکثیر و چرخه سلولی در گزارشات متعددی به اثبات رسیده است که در ادامه به جزئیات عملکردی آن‌ها اشاره شده است. اولین ژن مطرح شبکه ژنی حاصل از نرم‌افزار cytoscape ژن *MAPK1* بود که کدکننده پروتئینی از خانواده پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوزن این ژن ۵۸ درجه ارتباط با گره‌های دیگر در شبکه ژنی را نشان داد و بالاترین آماره میزان مرکزیت میانی و مرکزیت درونی در شبکه را داشت . ژن *MAPK1* به عنوان کیناز در سیگنال‌های خارج سلولی نقش دارد و در طیف گسترده‌ای از فرایندهای سلولی نظیر تکثیر، تمایز، توسعه و تنظیم رونویسی موثر می‌باشد (۱۲). پروتئین‌های خانواده MAP kinase پس از فعال‌شدن (فسفریله شدن) قادرند هم مسیرهای موازی همچون PI3K و TGF-beta را فعال کنند، و هم از

جدول ۱- آماره های توپولوژیکی در رابطه با مهمترین ژن‌های تنظیم کننده شبکه ژنی

ردیف	نام ژن	درجه ارتباط با گره های دیگر	مرکزیت میانی	مرکزیت درونی
۱	*MAPK1*	۳۴	۰/۲۹	۰/۹۱۸
۲	*EDN1*	۲۸	۰/۲۴	۰/۷۰۴
۳	*TGFB1*	۱۸	۰/۱۹	۰/۸۸۱
۴	*BMP4*	۱۲	۰/۱۴	۰/۶۹۳
۵	*PPARA*	۱۱	۰/۱۳	۰/۷۹۱

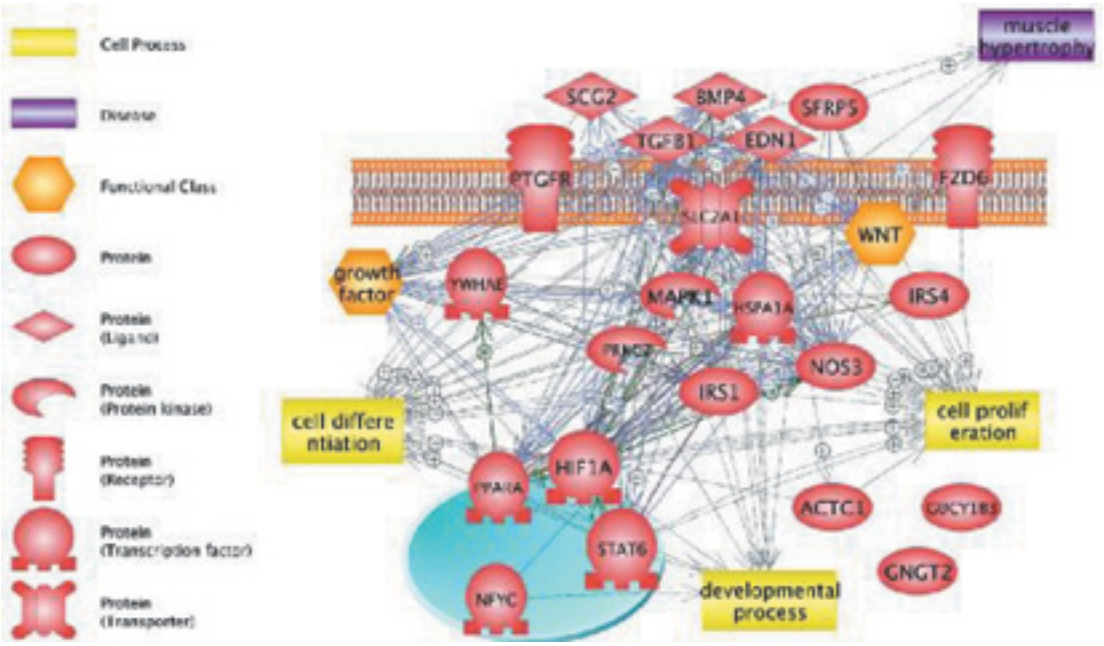
غشای هسته عبور کرده و از طریق فعال‌سازی فاکتورهای نسخه‌برداری همچون c-myc سبب بیان ژن‌های رشد و تقسیم سلولی شوند (۸). این ژن در مسیرهای بیولوژیکی فاکتور رشد بتا، گیرنده فاکتور رشد، آزادسازی هورمون گنادوتروپین، گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی و فاکتور رشد اندوتلیال وجود دارد. بنابراین نتایج تمامی این گزارش‌ها بر افزایش بیان این ژن و اهمیت آن در فرایند هایپرتروفی ماهیچه پا در اثر مصرف محرک‌های رشد تاکید می‌کنند. ژن دیگری که در شبکه بیان ژنی جزء ژن‌های اصلی قرار گرفت، END1 (اندوتلین ۱) بود، پروتئین حاصل از کددهی این ژن، در طول دوره جنینی سبب هایپرتروفی در سلول‌های ماهیچه قلب می‌شود و همچنین مصرف هورمون‌های استروئیدی و اسید نیتریک سبب افزایش عملکرد بیولوژیکی این ژن می‌شود (۱۴). ژن‌های مهم دیگر مورد بررسی در شبکه ژنی در این مطالعه ژن‌های *TGFB1* و *BMP4* بودند. ژن *TGFB1* به خانواده فاکتورهای مبدل رشد متعلق است و در رشد، تمایز، مهاجرت و سایر اعمال سلولی طی تکامل جنینی نقش دارد (۱۷). همچنین پژوهشگران گزارش کرده‌اند که ژن *TGFB1* برای تنظیم رشد ماهیچه اسکلتی در گاو ضروری است و سبب افزایش وزن بدن می‌گردد (۵). ژن *BMP4* (پروتئین مورفوژنیک استخوان ۴) نقش مهمی در طول رشد جنین و توسعه سلول‌های چربی به ویژه چربی سفید ایفا می‌کند (۶). از دیگر ژن‌های کلیدی مشخص شده در شبکه ژنی می‌توان به PPARA اشاره کرد که در مسیرهای مرتبط با برهمکنش گیرنده‌های بیرون سلولی و فرایندهای رشد بافت ماهیچه نقش موثری دارد و افزایش بیان این ژن سبب افزایش ساخت پروتئین و اندازه ماهیچه می‌شود، همچنین این ژن نقش مهمی در تنظیم‌کنندگی فرایند رونویسی سایر ژن‌های هدف برای میوژنز و تمایز سلولی و تنظیم واکنش به رشد دارد (۲۰). بنابراین نتایج پژوهش کنونی حاکی از نقش تنظیم‌کنندگی ژن‌های *BMP4*، *TGFB1*، *EDN1*، *MAPK1* و *PPARA* در رشد سلول‌های ماهیچه گاو گوشتی است که در اثر مصرف هورمون محرک رشد سلول‌های ماهیچه تحریک شده و بیش از حالت طبیعی تکثیر و تمایز سلولی رخ داده است یا به عبارتی فرایند سنتز بیش از حد ماهیچه را می‌توان به عملکرد ناشی از افزایش بیان این ژن‌ها مرتبط دانست.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه با استفاده از آنالیز بیان افتراقی، مسیرهای بیولوژیکی و شبکه‌های تنظیم بیان ژنی که بروی ژن‌هایی که در دو حالت مصرف و عدم مصرف هورمون محرک رشد، بیان متفاوتی داشتند، بیومارکرهای تشخیصی برای شناسایی مصرف غیرقانونی محرک‌های رشد در لاشه حیوانات کشتارشده در کشتارگاه‌ها معرفی شدند. بنابراین نتایج این مطالعه می‌تواند در ارائه استراتژی کنترل سلامت دام همراه با اثر بخشی در تکنولوژی مرتبط با بهبود کیفیت و سلامت غذایی گوشت مصرفی انسان موثر باشد.

جدول ۲- نتایج آنالیز مسیرهای بیولوژیکی مربوط به ژن‌های افزایش بیان گاوهایی که محرک رشد دگزامتازون دریافت کرده‌اند.

نام مسیر بیولوژیکی	نام ژن‌ها	تعداد ژنهای معنی دار در مسیر	Z Score	p-value
Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway	*TGFB1-NFYC-BMP4-SCG2- MAPK1-PPARA- INS-GUCY1B3-NFYC- RFRP-FST-PRKCZ SLC2A1-HSPA1A- PTGFR*	۱۵	۴.۸۹	۰.۰۰۰۱
Wnt signaling pathway	*EDN1- FZD6- ACTC-GNGT2- SFRP5-PRKCZ*	۶	۳.۴۳	۰.۰۰۰۷
VEGF signaling pathway	*MAPK1-HIF1A-NOS3-PRKCZ*	۵	۲.۲۲	۰.۰۰۳
TGF-beta signaling pathway	*LAP –BMP4- MAPK1-*	۳	۲.۰۲	۰.۰۲۱
EGF receptor signaling pathway	*MAPK1-STAT6- YWHAE-PRKCZ*	۴	۲.۵۶	۰.۰۴۶
IGF pathway-mitogen activated protein kinase	*MAPK1-INS-IRS1-IRS4*	۴	۲.۸۴	۰.۰۴



شکل ۱- شبکه برهمکنشی پروتئین‌های کد کننده ژن‌های بیش بیان با بالاترین اثر تنظیم کنندگی در فرایندهای بیولوژکی و عملکردی. تحلیل شبکه نشان می دهد که ژن های معنی دار به صورت پروتئین کیناز ، لیگاند، گیرنده، فاکتور نسخه برداری و پیام رسان در فرایندهای بیولوژیکی، ویژگی‌های ساختاری و عملکردی دخالت دارد.

منابع مورد استفاده

1. Cannizzo, F. T., S. Pegolo, P. Pregel, E. Manuali, S. Salamida, S. Divari, L. Bargelloni. 2016. Morphological Examination and Transcriptomic Profiling To Identify Prednisolone Treatment in Beef Cattle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(44), 8435–8446.

2. Carraro, L., S. Ferraresso, B. Cardazzo, C. Romualdi, C. Montesissa, F. Gottardo, L. Bargelloni. 2009. Expression profiling of skeletal muscle in young bulls treated with steroidal growth promoters. *Physiological Genomics*, 38(2), 138–148.

3. Courtheyn, D., L. Bizec, B. Brambilla, G. D. Brabander, H. F. Cobbaert, E. Wasch. 2002. Recent developments in the use and abuse of growth promoters. *Analytica Chimica Acta*, 473(1–2), 71–82.

4. Dehmer, M., L. A. Mueller and F. Emmert-Streib. 2013. Quantitative network measures as biomarkers for classifying prostate cancer disease states: a systems approach to diagnostic biomarkers. *PloS One*, 8(11), e77602.

5. Dvorak, J., A. Filistowicz, D. Hruska, P. Horal, I. Vrtková, A. Kúbek, S. Pomichal. 2002. The polymorphism of MSTN, PRNP and CSN3 genes in Charolais cattle. *Animal Science Papers and Reports. Supplement*, 1(20).

6. Hoffmann, J. M., J. R. Grünberg, C. Church, I. Elias, V. Palsdottir, J.O. Jansson, U. Smith. 2017. BMP4 gene therapy in mature mice reduces BAT activation but protects from obesity by browning subcutaneous adipose tissue. *Cell Reports*, 20(5), 1038–1049.

7. Jahng, J. W., N. Y. Kim, V. Ryu, S. B. Yoo, B.T. Kim, D.W. Kang and J.H Lee. 2008. Dexamethasone reduces food intake, weight gain and the hypothalamic 5-HT concentration and increases plasma leptin in rats. *European Journal of Pharmacology,*

581(1–2), 64–70.
8. Kim, H. J and D. Bar-Sagi. 2004. Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 441.
9. Koltes, J. E., R. G. Tait Jr, E. R. Fritz, B. P. Mishra, A. L. Van Eenennaam, R. G. Mateescu, G. Duan. 2012. A systems-genetics analysis of bovine skeletal muscle iron content. *J. Anim. Sc*i, 90(Suppl 3), 163.
10. Lee, S. H., C. Gondro, J. van der Werf, N. K. Kim, D. Lim, E. W. Park, J. M. Thompson. 2010. Use of a bovine genome array to identify new biological pathways for beef marbling in Hanwoo (Korean Cattle). *BMC Genomics*, 11(1), 1–11.
11. Nguyen, D. V., A. Bulak Arpat, N. Wang and R. J. Carroll. 2002. DNA microarray experiments: biological and technological aspects. *Biometrics*, 58(4), 701–717.
12. Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*, 22(2), 153–183.
13. Pegolo, S., G. Gallina, C. Montesissa, F. Capolongo, S. Ferraresso, C. Pellizzari, L. Bargelloni. 2012. Transcriptomic markers meet the real world: finding diagnostic signatures of corticosteroid treatment in commercial beef samples. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 205.
14. Piacentini, L., M. Gray, N. Y. Honbo, J. Chentoufi, M. Bergman and J. S. Karliner. 2000. Endothelin-1 Stimulates Cardiac Fibroblast Proliferation Through Activation of Protein Kinase C. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(4), 565–576.
15. Rijk, J. C. W., A. A. C. M. Peijnenburg, P. J. M. Hendriksen, J. M. Van Hende, M. J. Groot and M. W. F. Nielen. 2010. Feasibility of a liver transcriptomics approach to assess bovine treatment with the prohormone dehydroepiandrosterone (DHEA). *BMC Veterinary Research*, 6(1), 44.
16. Ritchie, M. E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C. W. Law, W. Shi and G. K. Smyth. 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47–e47.
17. Sachinidis, A., B. K. Fleischmann, E. Kolossov, M. Wartenberg, H. Sauer and J. Hescheler. 2003.Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovascular Research*, 58(2), 278–291.