



Analytical Investigation of Identified miRNAs and Their Target Genes Related to Mastitis in Dairy Cows

Mostafa Ghaderi-Zefrehei 

Corresponding author, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran. Email: mghaderi@yu.ac.ir , mosmos741@gmail.com

| Article Info | ABSTRACT |
|---|--|
| <p>Article type: Research Article</p> <p>Article history: Received: 6 August 2025 Received in revised form: 6 November 2025 Accepted: 30 November 2025 Published online: Summer 2026</p> <p>Keywords: <i>Gene regulation, microRNAs, bovine genome, mastitis, In silico.</i></p> | <p>Given the importance of early detection and effective management of mastitis, the present study adopts an in silico approach to investigate the role of several microRNAs (miRNAs) in the pathogenesis of mastitis in the bovine genome. Candidate miRNAs were selected based on a multi-step criterion. Initially, a systematic review of previous studies that experimentally (via RNA-Seq, qPCR, or DNA microarray) reported the specific expression of miRNAs in inflammatory or infectious mastitis samples in cattle was conducted. Subsequently, miRNAs identified in at least two independent studies or in more than one reliable database (miRBase, NCBI GEO, miRTarBase) as being involved in inflammatory or immune responses were considered. Using bioinformatics analyses and reputable databases such as MirtarBase, TargetScan, DAVID, and NCBI, candidate genes associated with mastitis were identified, and their target signaling pathways were examined. This multi-step selection process was employed to ensure the accuracy and reliability of the selected miRNAs. The results of these analyses identified five key miRNAs, including bta-mir-146a, bta-mir-16a, bta-mir-181, bta-mir-21-5p, and bta-mir-223, each of which plays a role in critical biological pathways such as TLR4/NF-κB, MAPK, PI3K-AKT, TGFβ, and estrogen and progesterone hormone signaling. Furthermore, the findings—based on a context++ score ≤ -0.2 and conservation ≥ 0.7—revealed that bta-mir-146a, bta-mir-21-5p, and bta-mir-223 influence 7, 9, and 11 key proteins, respectively, within these biological pathways. These pathways are involved in regulating immune response, inflammation, cell growth, differentiation, and apoptosis, disruptions of which may lead to the onset or exacerbation of mastitis. Each of these miRNAs, by targeting multiple key proteins, could serve as sensitive and specific biomarkers for the early detection of mastitis in dairy cattle. Since these miRNAs can also be detected in milk and blood serum, non-invasive tests can be designed for screening and monitoring livestock health. These findings may assist veterinary specialists in utilizing miRNA-based assays to identify and treat mastitis at early stages, thereby preventing disease progression and reducing economic losses.</p> |

Cite this article: Ghaderi-Zefrehei, M. (2026). Analytical Investigation of Identified miRNAs and Their Target Genes Related to Mastitis in Dairy Cows. *Iranian Journal of Animal Science*, 57 (2), 213-232. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2025.398979.654091>



© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2025.398979.654091>

Extended Abstract

Introduction

Mastitis is one of the most prevalent and economically significant diseases affecting dairy cattle worldwide. It is characterized by inflammation of the mammary gland, which adversely impacts milk production and quality, compromises animal health, and leads to substantial financial losses within the dairy industry. The disease is primarily caused by bacterial infections; however, its pathogenesis is complex and involves intricate immune and inflammatory responses. Early diagnosis and timely management of mastitis are crucial for controlling disease spread, minimizing tissue damage, and improving recovery rates. Traditional diagnostic methods, such as somatic cell count and microbial culture, although useful, have limitations including time lags and variable sensitivity. Therefore, the exploration of molecular biomarkers that can enable rapid and sensitive detection of mastitis is essential. MicroRNAs (miRNAs), a class of small non-coding RNA molecules approximately 20-22 nucleotides in length, have emerged as pivotal post-transcriptional regulators of gene expression. By binding to complementary sequences on target messenger RNAs (mRNAs), miRNAs can inhibit translation or promote mRNA degradation, thereby finely tuning various biological processes, including immune responses and inflammation. This study employed an *in silico* bioinformatics approach aimed at investigating the regulatory roles of specific miRNAs in the pathogenesis of bovine mastitis. The objective was to identify key miRNAs associated with mastitis and their corresponding target genes, and to explore the biological pathways they influence using reliable public databases and computational tools such as miRTarBase, TargetScan, DAVID, and NCBI.

Method

The study leveraged a comprehensive bioinformatics pipeline to identify and analyze miRNAs and their target genes associated with bovine mastitis. Candidate miRNAs were initially selected based on literature reports and database screening for their known involvement in inflammatory and immune-related pathways pertinent to mastitis. Five key miRNAs—*bta-mir-146a*, *bta-mir-16a*, *bta-mir-181*, *bta-mir-21-5p*, and *bta-mir-223*—were prioritized due to their strong association with immune regulation and prior evidence of differential expression in mastitis-affected tissues. Target genes for these miRNAs were extracted using experimentally validated interactions in miRTarBase and predicted targets from TargetScan. Subsequent functional annotation and pathway enrichment analyses of these target genes were conducted using DAVID and related bioinformatics tools to reveal their involvement in signaling cascades critical to mastitis pathology. Special emphasis was placed on pathways such as Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor kappa B (NF- κ B), mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K-AKT), transforming growth factor beta (TGF β), and hormonal signaling pathways involving estrogen and progesterone. Additionally, the study assessed the potential application of these miRNAs as non-invasive biomarkers by reviewing their detectability and stability in milk and blood serum samples.

Results

The results of these analyses identified five key miRNAs, including *bta-mir-146a*, *bta-mir-16a*, *bta-mir-181*, *bta-mir-21-5p*, and *bta-mir-223*, each of which plays a role in critical biological pathways such as TLR4/NF- κ B, MAPK, PI3K-AKT, TGF β , and estrogen and progesterone hormone signaling. Furthermore, the findings—based on a context++ score ≤ -0.2 and conservation ≥ 0.7 —revealed that *bta-mir-146a*, *bta-mir-21-5p*, and *bta-mir-223* influence 7, 9, and 11 key proteins, respectively, within these biological pathways. For instance, *bta-mir-146a*, *bta-mir-21-5p*, and *bta-mir-223* were found to regulate a substantial number of key proteins—7, 9, and 11 respectively—that play essential roles in TLR4/NF- κ B and MAPK signaling, pivotal pathways that mediate innate immune activation and inflammatory responses during mastitis. The PI3K-AKT pathway, implicated in cell survival and proliferation, along with the TGF β signaling pathway, which modulates immune tolerance and tissue repair, were also influenced by these miRNAs. Moreover, hormonal pathways involving estrogen and progesterone, known for their immunomodulatory effects in the mammary gland, were shown to be modulated by these miRNAs, suggesting their broader involvement in mastitis pathogenesis. The multifunctional roles of these miRNAs underline their importance as molecular switches orchestrating responses to pathogenic challenge. Importantly, their stability and presence in easily accessible biological fluids such as milk and serum make them attractive candidates for development as sensitive and specific biomarkers. Early detection through miRNA profiling could enable timely interventions, reducing the severity of infection and associated economic losses. These findings also open avenues for therapeutic strategies targeting miRNA expression to modulate inflammatory and immune responses in mastitis.

Conclusion

The present study underscores the pivotal role of miRNAs in the complex pathophysiology of bovine mastitis. The identification of five key miRNAs—*bta-mir-146a*, *bta-mir-16a*, *bta-mir-181*, *bta-mir-21-5p*, and *bta-mir-223*—and their involvement in crucial signaling pathways provides valuable insights into the molecular mechanisms driving mastitis development. Their detectability in milk and blood serum supports their potential utility as non-invasive biomarkers for early disease diagnosis and health monitoring in dairy cattle. Furthermore, understanding miRNA-mediated regulation offers promising perspectives for the design of targeted therapeutic interventions aimed

at mitigating inflammatory damage and enhancing host defense mechanisms. Ultimately, applying these findings in clinical settings could improve animal welfare, sustain milk production, and alleviate the economic burdens posed by mastitis in dairy farming.

Author Contributions

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Acknowledgements

I would like to extend my heartfelt appreciation to Zahra Beiranvand for her invaluable contributions to our research efforts. Her expertise and dedication have significantly enhanced our work.

Ethical Considerations

In this study, we did not utilize any biological samples, as we relied solely on data deposited in biological databases.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

بررسی تحلیلی نقش miRNA های شناسایی شده بر ژن های هدف مرتبط با ورم پستان در گاوهای شیری

مصطفی قادری زفره‌ئی ✉

نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران. رایانامه: mghaderi@vu.ac.ir

| اطلاعات مقاله | چکیده |
|--|--|
| نوع مقاله: مقاله پژوهشی | با توجه به اهمیت شناسایی زودهنگام و مدیریت مؤثر ورم پستان، پژوهش حاضر با رویکرد In silico به کنکاش نقش تعدادی از ریزRNAها یا miRNAها در بیماری زایی ورم پستان در ژنوم گاو می پردازد. در این پژوهش، انتخاب miRNA های کاندید بر اساس یک سری معیار های چند مرحله ای انجام شد. در ابتدا، یک مرور نظام مند از پژوهش های پیشین که به طور تجربی (از طریق RNA-Seq، qPCR یا ریز آرایه DNA) بیان اختصاصی miRNA ها را در نمونه های التهابی یا عفونی ورم پستان گاو گزارش کرده بودند، صورت گرفت. سپس، miRNA هایی که در حداقل دو پژوهش مستقل و یا در بیش از یک پایگاه داده معتبر (miRBase، miRTarBase، NCBI GEO، TargetScan، DAVID و NCBI) ژن های کاندید مرتبط با ورم پستان شناسایی و مسیرهای پیام دهی هدف آن ها مورد بررسی قرار گرفتند. این فرآیند انتخاب چند مرحله ای به منظور اطمینان از دقت و اعتبار miRNA های انتخاب شده به کار گرفته شد. نتایج این تحلیل ها منجر به شناسایی پنج miRNA کلیدی شامل <i>bta-mir-146a</i> ، <i>bta-mir-16a</i> ، <i>bta-mir-181</i> ، <i>bta-mir-21-5p</i> و <i>bta-mir-223</i> گردید که هر یک در مسیرهای زیستی مهمی مانند κ B-TLR4/NF، MAPK، AKT-PI3K، TGF β و پیام دهی هورمونی استروژن و پروژسترون نقش دارند. همچنین، نتایج - بر اساس نمره $\text{context}^{++} \text{score} \leq -0.2$ و $\text{conservation} \geq 0.7$ نشان دادند که <i>bta-mir-146a</i> ، <i>bta-mir-21-5p</i> و <i>bta-mir-223</i> به ترتیب بر 7، 9 و 11 پروتئین مهم در این مسیرهای زیستی تأثیر می گذارند. این مسیرها در تنظیم ژنی پاسخ ایمنی، التهاب، رشد، تمایز و مرگ سلولی مؤثر بودند که احتمالاً اختلال در آنها می تواند منجر به بروز یا تشدید ورم پستان گردد. هر یک از این miRNAها با هدف قرار دادن چندین پروتئین کلیدی، می توانند به عنوان زیست نشانگرهای حساس و اختصاصی برای تشخیص زودهنگام ورم پستان گاو شیری مورد استفاده قرار گیرند. از آنجایی که این miRNAها در شیر و سرم خون نیز قابل شناسایی هستند، امکان طراحی آزمایش های غیر تهاجمی برای غربالگری و پایش سلامت دام فراهم می شود. این یافته ها شاید بتوانند به متخصصان دامپزشکی کمک کند تا با استفاده از آزمون های مبتنی بر miRNA، ورم پستان را در مراحل اولیه شناسایی و درمان کنند و از گسترش بیماری و خسارات اقتصادی جلوگیری نمایند. |
| تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۱۵ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۰۹ تاریخ انتشار: تابستان ۱۴۰۵ | |
| کلیدواژه ها: تنظیم ژنی، ریزRNAها، ژنوم گاو، ورم پستان. | |

استناد: قادری زفره‌ئی، مصطفی (۱۴۰۵). بررسی تحلیلی نقش miRNA های شناسایی شده بر ژن های هدف مرتبط با ورم پستان در گاوهای شیری. نشریه علوم دامی ایران، ۵۲ (۲)، ۲۳۲-۲۱۳. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2025.398979.654091>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2025.398979.654091>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

ورم پستان یکی از هزینه برترین بیماری ها در گاوهای شیری است، به طوری که هزینه های ناشی از کاهش تولید شیر بین 150 تا 300 دلار و هزینه های حذف دام بین 100 تا 250 دلار برای هر گاو تخمین زده می شود (Halasa et al., 2007). هزینه های درمانی مرتبط با بیماری های گاوهای هلشتاین در 30 روز اول شیردهی به اوج خود می رسد (Drackley, 1999; Goff & Horst, 1997; LeBlanc, 2010; McArt et al., 2012; Overton & Fetrow, 2008; Rollin et al., 2015) و با افزایش دوره شیردهی، از 23.38 دلار در دوره اول به 122.29 دلار در دوره پنجم می رسد (Donnelly et al., 2023). ورم پستان تحت بالینی در گاو به دلیل فقدان علائم ظاهری، اغلب دیر تشخیص داده شده و باعث کاهش طولانی مدت تولید شیر می شود (سجادی et al., 2021). در پژوهشی، سجادی و همکاران (2021) نشان دادند که نوارهای تشخیصی لاکتات دهیدروژناز (LDH) برای شناسایی ورم پستان تحت بالینی در گاوهای شیری دقت قابل قبولی دارند، با حساسیت 68.9% و ویژگی 54% همچنین، همبستگی بالایی بین میزان LDH و شمارش سلول های بدنی (SCC) وجود دارد و با افزایش شدت ورم پستان، نوار LDH نیز پاسخ بهتری نشان می دهد. افزایش تعداد زایش ها به طور معنی داری LDH، SCC و آزمون ورم پستان کالیفرنایی (CMT) را افزایش می دهد و شانس ابتلا به ورم پستان تحت بالینی در گاوهای با نتیجه مثبت نوار LDH، 5.9 برابر بیشتر است. سرمایه گذاری در پیشگیری و کنترل ورم پستان، برخلاف هزینه های اولیه، در بلندمدت باعث کاهش موارد ابتلا و افزایش بهره وری اقتصادی خواهد شد (van Soest et al., 2016).

ریز RNA ها (miRNA) مولکول های غیر کدکننده ای هستند که نقش کلیدی در تنظیم بیان ژن دارند. تولید آن ها از طریق یک مسیر چند مرحله ای شامل رونویسی، پردازش و فعالیت تنظیمی انجام می شود. این فرآیند با رونویسی ژن های miRNA توسط RNA پلیمراز II آغاز می شود و منجر به تولید pri-miRNA می گردد. سپس، pri-miRNA توسط آنزیم Drosha و پروتئین DGCR8 برش داده می شود تا pre-miRNA تشکیل شود. این مولکول به سیتوپلاسم منتقل و توسط آنزیم Dicer به miRNA های بالغ تبدیل می شود. در نهایت، miRNA ها به کمپلکس RISC متصل می شوند و می توانند ترجمه mRNA های هدف را مهار کنند یا آن ها را تخریب نمایند. درک این مسیر برای فهم عملکرد miRNA ها در بیماری های التهابی مانند ورم پستان گاو شیری ضروری است (Bartel, 2018; Ha & Kim, 2014; Krol et al., 2010; O'Brien et al., 2018; Oriá et al., 2020; Van Soest et al., 2016). در واقع miRNA ها یک رشته تقریباً 17-24 نوکلئوتیدی هستند که از نظر تکاملی حفظ شده اند و در تنظیم پس از رونویسی اکثر mRNA های کدکننده پروتئین، از جمله تخریب و سرکوب ترجمه، دخیل هستند (O'Brien et al., 2018). تغییرات در بیان miRNA هایی مانند miR-33، miR-34a و miR-122 با بیماری های متابولیکی نظیر چاقی، دیابت نوع 2 و کبد چرب غیرالکلی مرتبط است. این miRNA ها از طریق هدف گیری ژن های کلیدی مانند *PDK1*، *SIRT1*، *ABCA1*، *SREBP* بر مسیرهای متابولیکی و تولید هورمون های مرتبط با متابولیسم انسولین و لیپید تأثیر می گذارند (Rottiers & Näär, 2012). بنابراین می توان گفت از آنجا که miRNA ها در تقریباً همه مسیرهای متابولیکی، از جمله متابولیسم انرژی، متابولیسم چربی، حساسیت به انسولین و هموستاز گلوکز دخیل هستند، جای تعجب نیست که عملکرد آن ها در دوره های مختلف پرورش گاو شیری مثل دوره انتقال حیاتی است. miRNA های خاص بافت می توانند وارد سامانه گردش خون شوند (Rottiers & Näär, 2012) که این مورد در مرحله شیردهی و دوره انتقال در گاو شیری دیده شده است (Veshkini et al., 2022). در دوره خشک گاوهای شیری، تغییرات زیستی و متابولیکی گسترده ای رخ می دهد. در پژوهشی که توسط Putz (2019) انجام شد، نشان داده شد که در ترشحات خشک گاوهای شیری طی سه هفته اول دوره خشک، miRNA های گوناگونی به طور متفاوت بیان می شوند که هر کدام با عملکردهای خاصی مرتبط هستند. به طور مشخص، miRNA هایی مانند *bta-miR-106a* و *bta-miR-130b* که با تولید مثل و توسعه جنین مرتبطند، در این دوره فعال می شوند (Putz et al., 2019). از سوی دیگر، miRNA های مرتبط با شیردهی مانند *bta-miR-29a*، *bta-miR-21-3p* و *bta-miR-130a* نیز در این دوره بیان می شوند که احتمالاً در آماده سازی بافت پستان برای شروع شیردهی نقش دارند (Putz et al., 2019). در جدول 1 miRNA هایی که به صورت زیست-نشانگر در ارتباط با ورم پستان مطرح شده اند، آورده شده اند. این جدول نشان می دهد که miRNA ها می توانند به عنوان نشانگرهای زیستی برای شناسایی و تشخیص زودهنگام ورم پستان، حتی در مراحل

زیر بالینی، مورد استفاده قرار گیرند. به عنوان مثال، miR-146a و miR-383 به تازگی در شیر خام گاوها به عنوان زیست نشانگرهای حساس و خاص برای ورم پستان شناسایی شده‌اند.

جدول ۱. نگاهی بر miRNAهایی که به صورت زیست- نشانگر در ارتباط با ورم پستان اخیراً مطرح شده‌اند

| پژوهش | AUC | ویژگی | حساسیت | مقایسه | پلتفرم شناسایی | پایه شناسایی | miRNA(s) ارزیابی شده |
|---------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------|---|
| Tzelos 2022 T | "دقت بالا" | >81% | 100% | CMT 0 در مقابل CMT 1 | SYBR-qPCR, ddPCR | شیر خام کامل | <i>bta-miR-223, bta-miR-142-5p</i> |
| Jadhav 2024 | گزارش نشده | 100% | 100% | نرمال در مقابل زیر بالینی | qPCR | شیر خام کامل (گاو) | <i>miR-146a, miR-383</i> |
| Lai YC 2017 | ذکر نشده | >80% | >80% | CMT- در مقابل CMT+ | qPCR, PCR دیجیتال | شیر خام کامل | <i>miR-21, miR-146a, miR-155</i> |
| Srikok S 2020 | برای طبقه‌بند استفاده شده | "بالا" | "بالا" | سالم در مقابل بالینی/بالینی | TaqMan qPCR | شیر خام کامل | <i>miR-29b-2, miR-146a, miR-148a, miR-155</i> |
| Lai YC i 2021 | گزارش نشده | "پایین‌تر" از شیر | "پایین‌تر" از شیر | سالم در مقابل ماستیست | qPCR, ddPCR | سرم | <i>miR-21</i> |

با توجه به اهمیت miRNAها در تنظیم بیان ژن و تأثیر آنها بر فرآیندهای زیستی مرتبط با ورم پستان، انجام پژوهش‌های In Silico برای شناسایی و تحلیل miRNAهای مرتبط با این بیماری در گاو شیری کم هزینه و ضروری است. هدف این پژوهش، تحلیل مسیرهای متابولیک miRNAها و بررسی مسیرهای پیام‌دهی آنها در ارتباط با بیماری ورم پستان گاو بود. در این راستا، تلاش شده تا ژن‌های هدف miRNAهای مورد بررسی به‌طور نظام‌مند شناسایی شوند که می‌توانند در برنامه‌های اصلاح نژادی مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، غنی‌سازی زیستی miRNAهای مورد بررسی می‌تواند به دامپزشکان و پژوهشگران زیستی کمک کند تا با استفاده از آزمون‌های مبتنی بر miRNA ورم پستان را در مراحل اولیه شناسایی و درمان کنند و در نهایت به بهبود سلامت دام‌ها و افزایش بهره‌وری اقتصادی در صنعت دامپروری منجر شود. این پژوهش همچنین به بررسی تأثیر miRNAها بر مسیرهای پیام‌دهی مرتبط با التهاب و پاسخ ایمنی می‌پردازد که در بروز ورم پستان نقش دارند و درک این فرآیندها می‌تواند به توسعه درمان‌های هدفمند و مؤثرتر کمک کند.

روش شناسی پژوهش

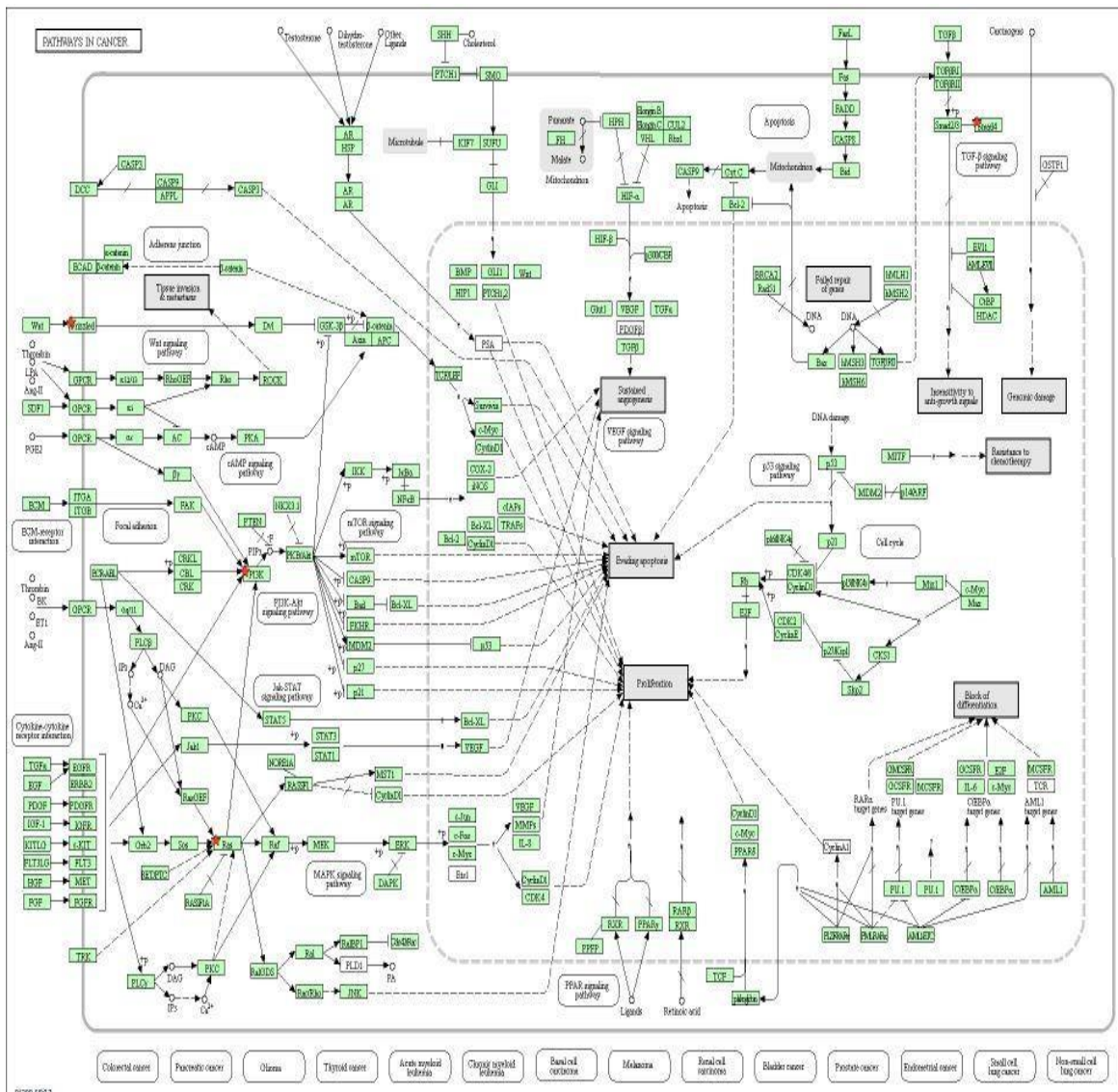
در این پژوهش، یک رویکرد نوآورانه^۱ و منطقی جهت بررسی نقش بالقوه miRNAهای شناخته‌شده در بیماری‌زایی ورم پستان در گاو شیری با بهره‌گیری از داده‌های موجود در پایگاه‌های زیست‌اطلاعاتی توسعه داده شد. در روش‌های متداول پژوهشی، معمولاً پژوهشگران ابتدا با استفاده از داده‌های ترانسکریپتومی (مانند RNA-seq یا ریزآرایه DNA) و مقاله‌های منتشر شده، ژن‌های کلیدی و مهمی را که بیان آنها در شرایط خاص بیماری‌زایی تغییر می‌کند، شناسایی می‌کنند؛ سپس در پی یافتن miRNAهایی هستند که ممکن است این ژن‌ها را تنظیم کنند. در این پژوهش، بر خلاف رویکردهای سنتی، محوریت کار بر اساس miRNAها قرار گرفت. به این صورت که ابتدا با مرور منابع موجود در پایگاه‌های داده‌ای مربوط به miRNAها، miRNAهای کاندیدای شناخته شده در ارتباط با پاسخ‌های التهابی، پاسخ ایمنی و سایر فرآیندهای مرتبط با ورم پستان شیری در گاو شناسایی شدند. سپس ژن‌های هدف این miRNAها استخراج و با توجه به نقش زیستی آنها در مسیرهای پیام‌دهی مرتبط با ورم پستان، تحلیل‌های دقیقی از دیدگاه عملکرد مولکولی و نقش زیست-بیماری صورت گرفت. این رویکرد غیرمعمول، امکان شناسایی زود هنگام miRNAهای کلیدی و ژن‌های هدف آنها را فراهم کرده و می‌تواند زمینه ساز استفاده از این مولکول‌ها به عنوان زیست نشانگرهای تشخیصی یا هدف‌های درمانی در مدیریت بیماری ورم پستان در گاو شیری باشد. پس از بررسی انجام شده، تعداد پنج miRNA مهم: *bta-mir-146a*, *bta-mir-16a*, *bta-mir-181*, *bta-mir-21-5p* و *bta-mier223* در ارتباط با ورم پستان گاو شیری انتخاب شدند. انتخاب miRNAهای کاندید بر اساس یک فرآیند چندمرحله‌ای انجام شد که شامل:

۱. مرور نظامند پژوهش های قبلی در زمینه ورم پستان گاو بود. در این مرحله، پژوهش های تجربی که به طور خاص بیان miRNA ها را در نمونه های التهابی یا عفونی پستان گزارش کرده اند، مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین، miRNA های که در حداقل دو پژوهش مستقل یا در بیش از یک پایگاه داده معتبر مانند miRBase، miRTarBase و NCBI GEO به عنوان عوامل مؤثر در پاسخ های التهابی و ایمنی شناسایی شده بودند، در نظر گرفته شدند. علاوه بر این، miRNA های که نقش آن ها در مسیرهای پیام دهی PI3K-AKT، MAPK، TLR/NF-κB و پاسخ نوتروفیل/ماکروفاژ در گاو یا گونه های نزدیک مانند گوسفند و موش مستند شده بود، انتخاب شدند. این رویکرد جامع به شناسایی miRNA های کلیدی کمک می کند که می توانند به عنوان زیست نشانگرهای مؤثر در تشخیص و مدیریت ورم پستان گاو مورد استفاده قرار گیرند. جزئیات بیشتر در مراحل زیر آمده است.
۲. پایگاه داده از پایگاه داده (http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw) mirtarbase نسخه 9.0 (آخرین دسترسی: 15 ژوئن 2025) برای به دست آوردن ژن های هدف معتبر miRNA های بالا استفاده شد. فرآیند اعتبارسنجی از طریق الگوریتم های مختلف انجام شد و نتایج هر miRNA به صورت فایل اکسل استخراج شد. در واقع از این پایگاه برای استخراج ژن های هدفی که اعتبار آن ها به طور زیستی - آزمایشگاهی تایید شده بودند، استفاده شد.
۳. پس از استخراج ژن های هدف پیش بینی شده از پایگاه داده TargetScan (http://www.targetscan.org) نسخه 8.0 (آخرین دسترسی: 12 ژوئن 2025) داده های مربوطه به صورت ساختارمند در قالب فایل Excel ثبت شدند. این پایگاه داده بیشتر برای شناسایی ژن های هدفی که کار رفت که تاکنون از نظر زیستی و آزمایشگاهی اعتبارسنجی نشده اند. لازم به ذکر است که در این پایگاه، ژن های هدف توسط الگوریتم های محاسباتی و بدون تأیید آزمایشگاهی پیش بینی می شوند؛ با این حال، این اطلاعات می توانند در مراحل اولیه شناسایی ژن های کاندید مرتبط با miRNA ها مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، در این راستا همچنین امکان استفاده از پایگاه زیستی داده (https://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/) miRWalk نیز وجود داشت، ولی این پایگاه داده به دلیل تمرکز عمده بر روی ژنوم انسانی و عدم پوشش کافی اطلاعات ژنومی دامی، از برنامه کاری حذف شد.
۴. در این پژوهش، پس از شناسایی فهرست ژن های هدف مرتبط با miRNA های مورد بررسی، اهمیت داشت که سطح بیان این ژن ها در دو گروه گاو سالم (کنترل) و گاو مبتلا به ورم پستان (بیمار) ارزیابی شود. با توجه به اینکه داده های تجربی مربوط به الگوی بیان ژنی در اختیار ما قرار نداشت، برای تکمیل این بخش از تحقیق، مجبور به استفاده از داده های موجود در پایگاه های عمومی داده های بیان ژنی بودیم. بنابراین، اطلاعات مربوط به سطح بیان ژن های هدف اعتبارسنجی شده و پیش بینی شده از طریق پایگاه داده NCBI جمع آوری شد. بخش UniGene این پایگاه، به ویژه زیرمجموعه EST PROFILE (آخرین دسترسی: 18 ژوئن 2025) به عنوان یک منبع معتبر برای یافتن الگوهای بیان ژنی در بافت های مختلف، مورد استفاده قرار گرفت. این داده ها شامل اطلاعات بیان ژنی در بافت های سالم و بافت های غده پستانی مبتلا به ورم پستان بودند. پس از استخراج اطلاعات، داده های مربوط به هر گروه بافتی در قالب فایل های Excel جداگانه ذخیره شدند. ژن هایی که دارای سطح بیان مشخص و قابل استناد نبودند، از آنالیزهای بعدی حذف شدند. تنها ژن هایی که دارای داده های بیان قابل شناسایی و قابل اعتماد بودند، در قالب استاندارد NCBI Gene ID ثبت و در تحلیل های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. این رویکرد امکان مقایسه الگوهای بیانی ژن های هدف بین دو وضعیت زیستی (سالم و بیمار) را فراهم کرد و زمینه را برای شناسایی ژن های دارای تغییر معنی دار در بیماری فراهم نمود.
۵. پس از وارد کردن تمامی توالی های ژن های شناخته شده به پایگاه داده DAVID (https://david.ncifcrf.gov) نسخه 2023 q4 (آخرین دسترسی: 18 ژوئن 2025)، مسیرهای پیام دهی مرتبط با ورم پستان در گاو شیری برای هر miRNA تحت طبقه بندی KEGG شناسایی شدند. این تحلیل به ما کمک کرد تا نقش زیستی و فرآیندهای اهمیت عملکردی هر miRNA در مسیرهای پیام دهی مرتبط با التهاب، پاسخ ایمنی و سایر مولکولی مربوط به ورم پستان را درک کنیم. در تمامی این پژوهش، بسته به نیاز مقادیر P-value یا FDR به صورت $0.05 <$ در نظر گرفته شد.

بحث و یافته های پژوهش

در دهه های اخیر، پیشرفت های حوزه ژنومیکس و ترانسکریپتومیکس منجر به کشف یک سری از RNA های غیرکدکننده^۱ شده است که نقش های مهمی در تنظیم بیان ژن دارند. این RNA ها به جای تبدیل شدن به پروتئین، مستقیماً در فرآیندهای سلولی عمل می کنند. از جمله مهمترین این RNA ها می توان به miRNA ها، siRNA ها، lncRNA ها^۲ و circRNA ها^۳ اشاره کرد. در زیستی، علوم دامی و دامپزشکی، این RNA ها به عنوان زیست نشانگرهای بالقوه در تشخیص و مدیریت بیماری های مهم دامی مورد توجه قرار گرفته اند (Bartel, 2018; Esteller, 2011; Mercer et al., 2009; Wang & Chang, 2011; Zhang et al., 2013) برای درک بهتر نقش miRNA ها در علوم دامی، ابتدا لازم است انواع RNA ها را به صورت نظام مند و قابل فهم تقسیم بندی کنیم. miRNA در تنظیم فرآیندهای زیستی دام ها مانند تمایز سلولی و رشد بافتی، سیستم ایمنی و واکنش به عوامل عفونی، متابولیسم انرژی و تولیدمثل و سازگاری به تنش محیطی دارای اهمیت زیادی هستند و به عنوان زیست نشانگر برای تشخیص زود هنگام بیماری ها، پیش بینی پاسخ به درمان و بهبود صفات تولیدی مورد استفاده قرار گرفته اند. در گاوهای شیری، miRNA ها در پاسخ ایمنی و التهاب در ورم پستان نقش دارند. *miR-155* یکی از miRNA های کلیدی در پاسخ ایمنی است که در لنفوسیت ها و ماکروفاژها بیان می شود و افزایش بیان آن در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان مشاهده شده است. *miR-146a* و *miR-21* در تنظیم پاسخ التهابی و کنترل فعالیت NF- κ B دخیل هستند و می توانند به عنوان تعدیل کننده های التهاب عمل کنند. همچنین نشان داده شده است که *miR-223* نیز در تنظیم تکامل گرانولوسیت ها و سلول های ایمنی نقش دارد و در شرایط التهابی مانند ورم پستان افزایش می یابد. با توجه به وجود miRNA در شیر و سرم خون، این RNA ها به عنوان نشانگرهای غیرتهاجمی برای تشخیص زود هنگام ورم پستان مطرح شده اند و بیان بالای *miR-200c* و *miR-205* در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان دیده شده است. همانطور که ذکر شد، هدف اصلی این پژوهش شناسایی نقش کلیدی هر miRNA در مسیرهای پیام رسانی مهم و همچنین ژن های هدف آن ها در این مسیرها بوده است. در ادامه، به تفصیل به نتایج به دست آمده از این تحلیل ها پرداخته خواهد شد.

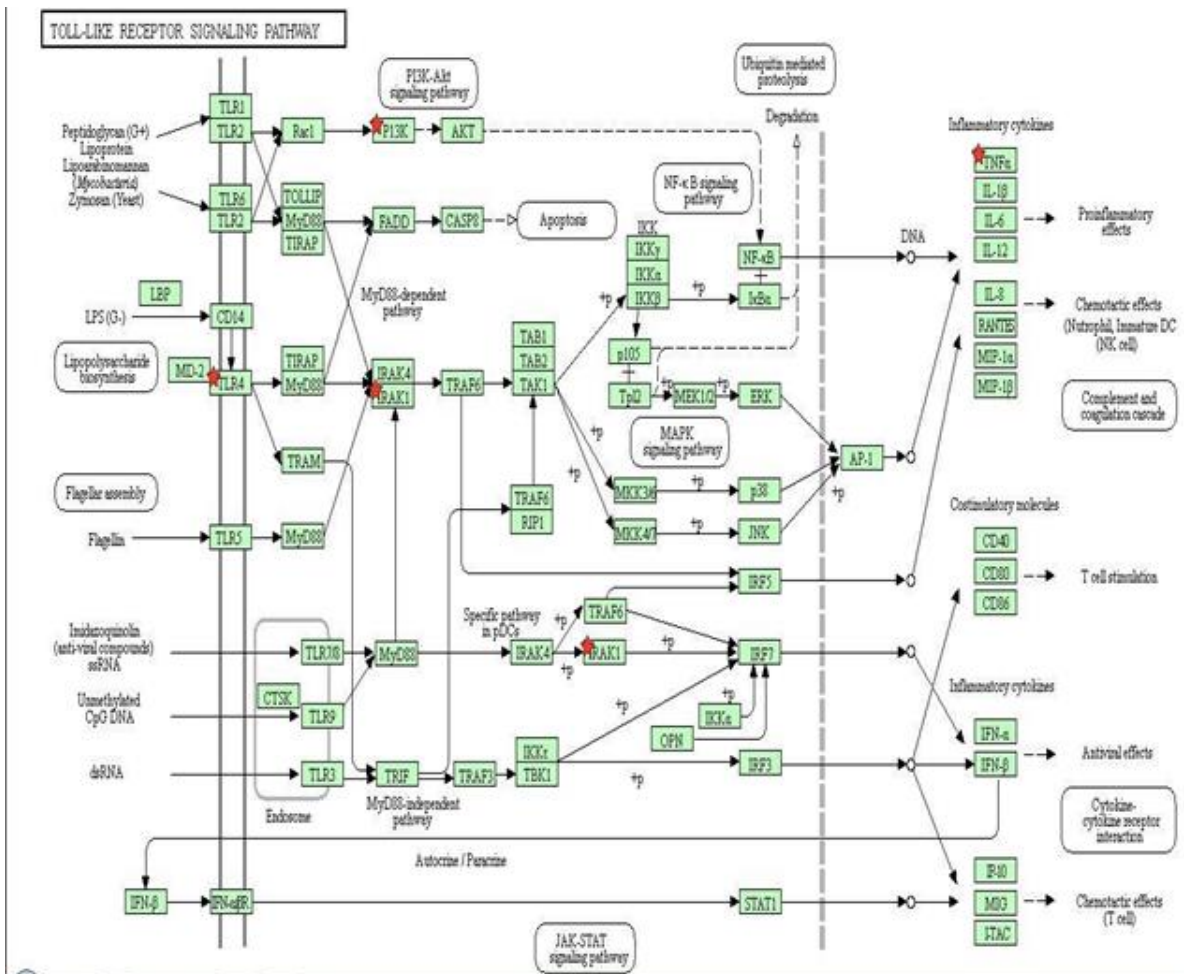
همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است *bta-mir-146a* ژن های گوناگونی را هدف قرار می دهد که در مسیرهای پیام دهی مهم سلولی دخیل هستند. این ریز RNA علاوه بر نقش خود در تنظیم پاسخ های التهابی، در مسیر سرطان نیز عمل می کند؛ به گونه ای که ژن هایی مانند *SMAD4* (عامل رونویسی و سرکوب کننده تومور)، *PI3K* (فسفاتاز و تنظیم کننده کلیدی مسیرهای بقا و رشد سلولی)، *RAS* (پروتئین تنظیم کننده تقسیم و تمایز سلولی) و *Frizzled* (گیرنده مسیر Wnt و دخیل در توسعه و هموستاز سلولی) تحت تأثیر قرار می گیرند. علاوه بر این، *bta-mir-146a* در مسیر پیام دهی گیرنده های *Toll-like (TLR)* نیز دخیل است و ژن هایی مانند *PI3K*، *TLR4*، *IRAK1* و *TNF α* را به عنوان اهداف خود هدف گیری می کند. این ژن ها نقش های کلیدی در آغاز و تعدیل واکنش های التهابی و پاسخ ایمنی ذاتی را بر عهده دارند. همچنین، در مسیر گیرنده سلول T (TCR) نیز ژن های *CD3D* (مولکول ساختاری در پیام دهی لنفوسیت T)، *SLP76* (پروتئین مرکزی در فعال سازی TCR) و *RAS* (درگیر در فرآیندهای پیام دهی و تکثیر سلولی) به عنوان اهداف این ریز RNA شناسایی شدند. این یافته ها نشان می دهند که *bta-mir-146a* از طریق تعامل با ژن های مختلف در مسیرهای پیام دهی مرتبط با التهاب، ایمنی و سرطان، می تواند نقش تنظیمی عمیقی در بیماری زایی ورم پستان در گاو شیری ایفا کند. شکل 1 نشان می دهد که *bta-mir-146a* از طریق تعامل با ژن های *Frizzled*، *RAS* و مسیرهای پیام دهی *PI3K*، نقش مهمی در تعدیل فرآیندهای سلولی ایفا می کند. این تعاملات منجر به تأخیر در آغاز فرآیند مرگ برنامه ریزی شده سلول می شوند. همچنین، در مسیر آنژیوژنز (تشکیل عروق خونی جدید)، ژن *RAS* به عنوان یکی از اهداف اصلی این miRNA شناسایی شده است و تحت تأثیر تنظیمی *bta-mir-146a* قرار می گیرد. در مسیر پیام دهی *TGF β* نیز مشخص شد که ژن *SMAD4* هدف قرار گرفته است.



شکل 1. نقش *bta-mir-146a* در تنظیم مسیرهای پیام‌دهی پاسخ ایمنی پستان در گاو شیری

Figure 1. The role of *bta-mir-146a* in regulating the signaling pathways of the mammary immune response in dairy cattle.

ژن‌های شناسایی شده *PI3K*، *JAK1* و *TNFα* در فرآیندهای التهابی، فعال‌سازی سامانه ایمنی ذاتی و همچنین آبشارهای انعقادی و مکمل خونی نقش دارند. به‌طور خاص، ژن *TLR4* به‌عنوان یکی از کلیدی‌ترین نقاط تنظیمی در این مسیر، نقش اصلی در القاء و کنترل مرگ سلولی دارد و تحت تأثیر تنظیمی *bta-mir-146a* قرار می‌گیرد (شکل 1).

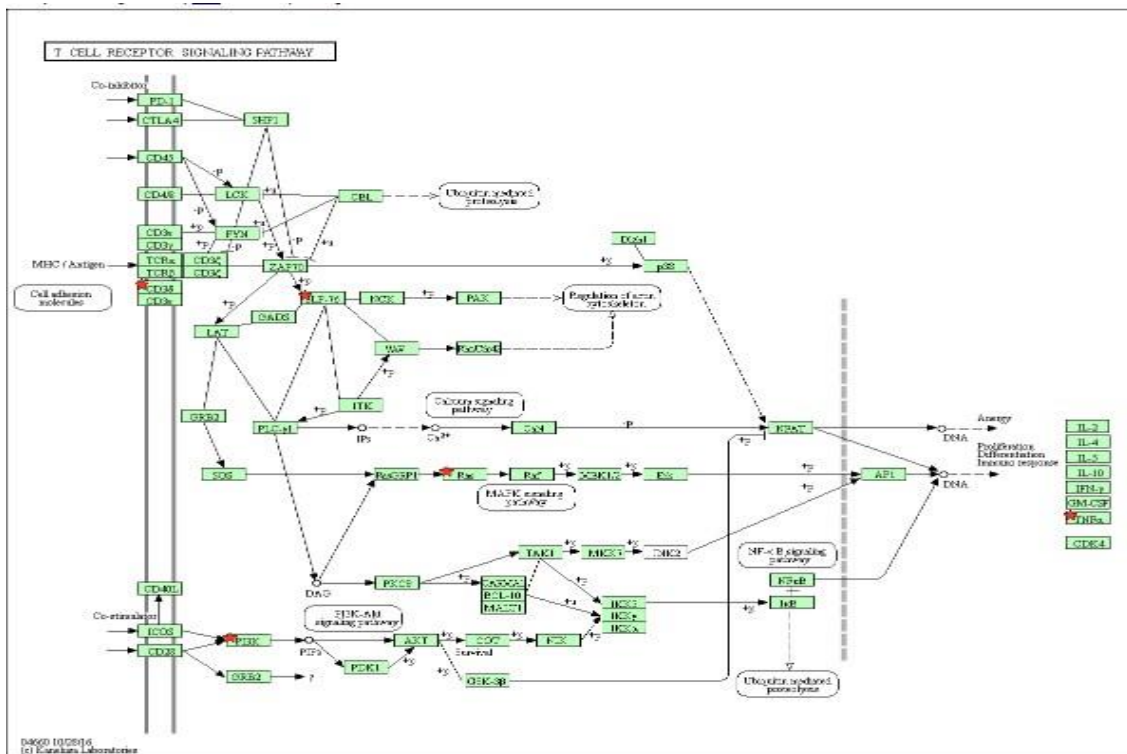


شکل 2. نقش *bta-miR-223* در تنظیم مسیریهای پیامدهی پاسخ ایمنی پستان در گاو شیری

Figure 2. The role of *bta-miR-223* in regulating the signaling pathways of the mammary immune response in dairy cattle

همان‌طور که در شکل 2 نشان داده شده است نقش تنظیمی *bta-miR-223* در مسیر پیامدهی گیرنده TLR و ارتباط آن با ورم پستان گاو شیری به‌طور قابل توجهی در کنترل پاسخ‌های ایمنی و التهابی مؤثر است. گیرنده‌های TLR به عنوان اجزای کلیدی سامانه ایمنی ذاتی، با شناسایی الگوهای مولکولی وابسته به پاتوژن‌ها (PAMPs) فعال می‌شوند و مسیریهای پیامدهی پیچیده‌ای را برای تولید سایتوکاین‌های التهابی آغاز می‌کنند. در این میان، *bta-miR-223* با هدف قرار دادن mRNA ژن‌های کلیدی مانند *STAT3* و *NF-κB* *IKKα* می‌تواند بیان این پروتئین‌ها را کاهش دهد و به این ترتیب از فعال‌سازی بیش از حد مسیر *NF-κB* جلوگیری کند. این عمل منجر به کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی مانند *TNF-α*، *IL-1β* و *IL-6* می‌شود. همچنین، *bta-miR-223* با تنظیم بیان ژن‌هایی مانند *STAT3* و *SOCS1*، به تعادل بین پاسخ‌های التهابی و ضدالتهابی کمک می‌کند که برای جلوگیری از آسیب بافتی ثانویه و حفظ عملکرد طبیعی پستان حیاتی است. علاوه بر این، این ریز RNA نقش مهمی در کنترل تمایز، مهاجرت و فعالیت نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها دارد که در ورم پستان، اولین خط دفاعی را تشکیل می‌دهند. به‌طور کلی، *bta-miR-223* با مهار اجزای کلیدی مسیر TLR و کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی، از ایجاد پاسخ ایمنی بیش از حد و آسیب به بافت پستان جلوگیری می‌کند و می‌تواند به عنوان یک زیست‌نشانه‌گر و هدف درمانی برای مدیریت ورم پستان گاو شیری مورد استفاده قرار گیرد (Bennett et al., 2010; Bohlin et al., 2014; Haneklaus et al., 2013; Johnnidis et al., 2008; Zhang et al., 2013; Zhuang et al., 2012)

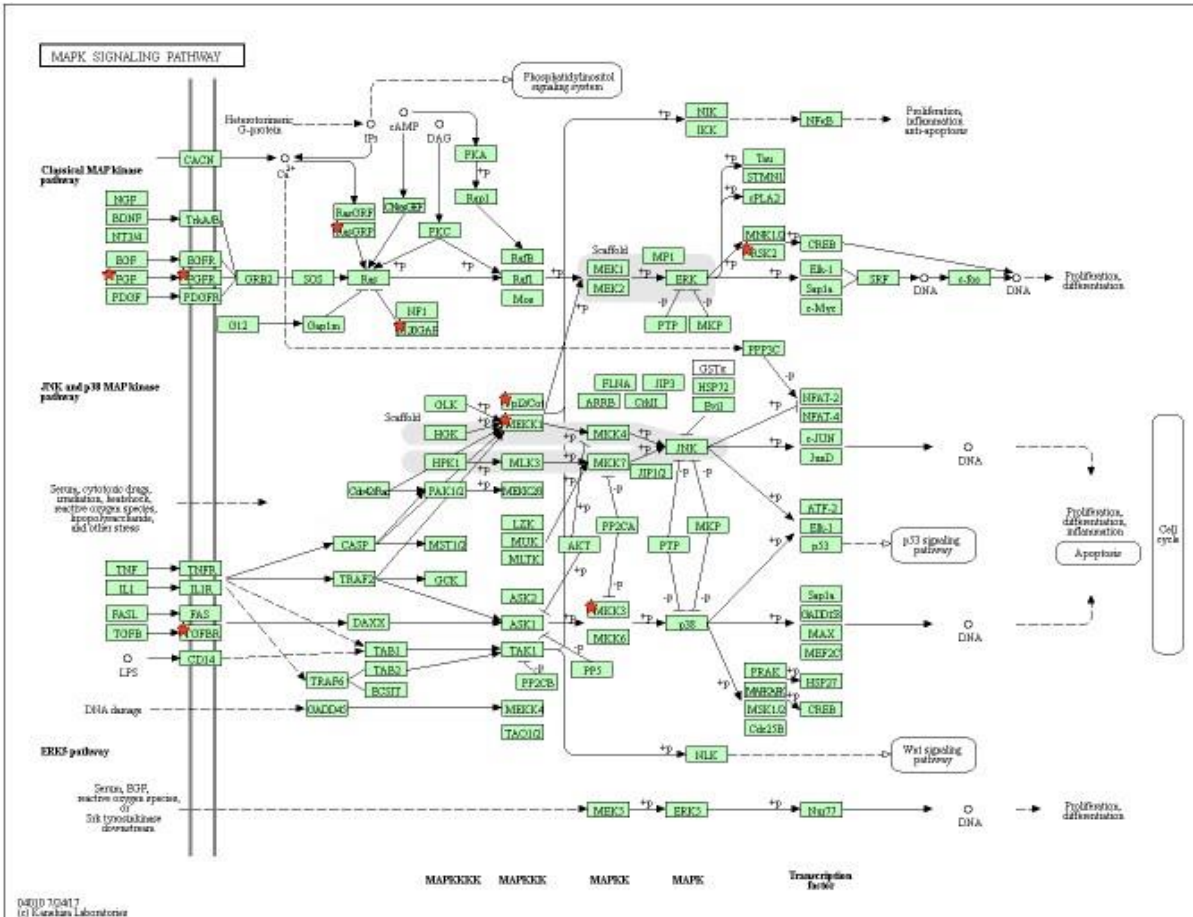
(شکل 2) (Kawai & Akira, 2010; Oriá et al., 2020; Zhang et al., 2013; Zhuang et al., 2012)



شکل 3. نقش *bta-mir-21-5p* در تنظیم مسیرهای پیامدهی پاسخ ایمنی پستان در گاو شیری

Figure 3. The role of *bta-miR-21-5p* in regulating the signaling pathways of the mammary immune response in dairy cattle.

همان طور که در شکل 3 نشان داده شده است مسیر پیامدهی گیرنده سلول T (TCR) یکی از مسیرهای کلیدی ایمنی تطبیقی است که فعال سازی و تمایز لنفوسیت های T را برای مقابله با پاتوژن ها هدایت می کند. در این مسیر، شناسایی آنتی ژن توسط TCR و دریافت پیام های کمکی از طریق مولکول هایی مانند CD28 منجر به فعال سازی کینازها (مانند Lck و ZAP-70) و سپس فعال سازی شاخه های پیام رسانی متعددی از جمله مسیر PI3K-AKT، NF-κB، Ras-MAPK می شود که نهایتاً به تولید سایتوکاین ها و تکثیر سلول های T منجر می گردد. در این میان، ریز RNAها، به ویژه *bta-miR-21-5p* در گاو نقش مهمی در تنظیم پاسخ های ایمنی و التهابی دارند. *bta-miR-21-5p* که در بافت پستان، شیر و سلول های خونی گاوهای مبتلا به ورم پستان به طور معناداری افزایش می یابد، با هدف قرار دادن ژن PTEN موجب فعال سازی بیشتر مسیر PI3K-AKT می شود که این مسیر در بقا و تکثیر سلول های T نقش حیاتی دارد. افزایش بیان *bta-miR-21-5p* در ورم پستان می تواند باعث تقویت پاسخ ایمنی سلول های T، افزایش تولید سایتوکاین ها و بقای بیشتر سلول های ایمنی در بافت پستان شود و از این طریق هم به پاک سازی پاتوژن ها کمک کند و هم در صورت عدم تنظیم صحیح، به تشدید التهاب و آسیب بافتی منجر گردد. همچنین *bta-miR-21-5p* می تواند بر تمایز سلول های T مانند Th17 و Treg تأثیرگذار باشد و از این طریق نوع و شدت پاسخ ایمنی را تعیین کند. این miRNA نه تنها به عنوان یک تنظیم کننده کلیدی در التهاب و ایمنی نقش دارد، بلکه به عنوان یک زیست نشانگر بالقوه برای تشخیص و پایش شدت ورم پستان نیز مطرح شده است (Bohlin et al., 2014; Lawless et al., 2014; Liu et al., 2010; Zheng et al., 2009) (شکل 3)



شکل ۴. نقش *bta-miR-181* در تنظیم مسیرهای پیامدهی پاسخ ایمنی پستان در گاو شیری

Figure 4. The role of *bta-miR-181* in regulating the signaling pathways of the mammary immune response in dairy cattle.

همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است مسیر پیامدهی MAPK (کیناز فعال شونده با میتوزن) یکی از مهم‌ترین مسیرهای پیامدهی سلولی است که نقش کلیدی در تنظیم فرآیندهایی مانند تکثیر، تمایز، آپوپتوز، التهاب و بقای سلول ایفا می‌کند. خانواده *miR-181* به ویژه *bta-miR-181*، به عنوان تنظیم‌کننده‌های مهمی در سامانه ایمنی و پاسخ‌های التهابی شناخته می‌شوند و پژوهش‌ها نشان داده‌اند که این miRNA ها با هدف قرار دادن فسفاتازها و کینازهای خاص، می‌توانند شدت و مدت پیامدهی MAPK را در سلول‌های ایمنی و سایر سلول‌ها تغییر دهند (Henao-Mejia et al., 2013; Knutson et al., 2014; Li et al., 2007). به طور خاص، *miR-181* با تأثیر بر بیان ژن‌هایی که در فعال‌سازی مسیرهای ERK، JNK و p38 نقش دارند، می‌تواند بر حساسیت سلول‌های T به آنتی‌ژن و همچنین شدت پاسخ التهابی اثرگذار باشد. از طرف دیگر، *miR-16a* نیز با هدف قرار دادن ژن‌هایی مانند *MAPK1* و *Bcl-2*، در تنظیم چرخه سلولی و مرگ خود خواسته سلولی نقش دارد و از این طریق می‌تواند به طور غیرمستقیم بر فعالیت مسیر MAPK تأثیر بگذارد (Hou et al., 2015; Tang et al., 2016). بنابراین، اگرچه مسیر MAPK به طور مستقیم در نقشه‌های عمومی پیامدهی به عنوان هدف miRNA ها نمایش داده نمی‌شود، اما شواهد علمی متعدد نشان می‌دهد که *bta-miR-16a* و *bta-miR-181* از طریق تنظیم اجزای مختلف این مسیر، نقش مهمی در کنترل پاسخ‌های ایمنی، التهابی و بقای سلولی در گاو و سایر گونه‌ها دارند (Henao-Mejia et al., 2013; Hou et al., 2015; Knutson et al., 2014; Li et al., 2007; Tang et al., 2016) (شکل ۴)

جدول ۲. مسیرهای پیام‌دهی تحت تأثیر *bta-mir-181*Table 2. Signaling pathways influenced by *bta-mir-181*.

| مسیرهای پیام‌دهی | P Value | ژن‌های مؤثر در هر مسیر پیام‌دهی |
|--|---------|--|
| <u>GnRH signaling pathway</u> | 8.9E-3 | CAMK, CAM, MEKK, MEK1/2, RAS |
| <u>Estrogen signaling pathway</u> | 1.6E-2 | PI3K, RAS, MEK, HSP90, TF, MAPK1/3, CAM |
| <u>Progesterone-mediated oocyte maturation</u> | 3.6E-2 | MEK1, PI3K, CPEB, Rsk1/2, APC/C, MAPK3 |
| Oxytocin Signaling Pathway | 4.0E-2 | RAS, MEK1/2, CALM, CaMK, MLCK, MLCP, PI3K, MAPK1/3 |
| <u>Oocyte meiosis</u> | 1.1E-4 | CPEB, MAPK3, MEK1, RSK1/2, PP1, APC/C, Calm, B56, KAMKII, 14-3-3 |
| PI3K-AKT Signaling pathway | 3.0E-4 | REDD1, RAS, RTK, HSP90, ITGA, TLR2/4, ERK, MEK, S6K1/2, PTEN, PI3K, ECM, ITGB, Mcl-1, 14-3-3, PP2A |
| MAPK Signaling Pathway | 7.3E-3 | RSK2, ERK, MEK1, MEKK1, MKP, PDGFR, RAS, RAP1, MEKK2/3, CNasGEF, MAPK38, TGFR |
| GAP junction | 3.8E-2 | RAS, RTK, TUBB, MEKK2, MAPK1/3, MEKK1/2 |

جدول ۲. نتایج یک تحلیل بیوانفورماتیکی بر روی مسیرهای پیام‌دهی تحت تأثیر *bta-mir-181* در رابطه با ورم پستان در گاو شیری است. این miRNA از طریق سرکوب بیان ژن‌های هدف، نقش کلیدی در تنظیم فرآیندهای التهابی، استرس اکسیداتیو و عملکرد سامانه ایمنی دارد. مسیرهای سیگنال‌دهی شناسایی شده شامل GnRH signaling pathway (P=0.0089)، Oxytocin، Progesterone-mediated oocyte maturation (P=0.036)، Estrogen signaling pathway (P=0.016)، signaling pathway (P=0.04)، Oocyte meiosis (P=0.0001)، PI3K-AKT signaling pathway (P=0.0003)، MAPK signaling pathway (P=0.0073) و Gap junction (P=0.038) هستند. تمام این مسیرها از نظر آماری معنی‌دار بوده‌اند (P<0.05)، که نشان‌دهنده این است که احتمال دخالت تصادفی ژن‌های تحت تأثیر *bta-mir-181* در این مسیرها بسیار کم است. این مسیرها به طور عمده در تنظیم پاسخ‌های التهابی، تعادل هورمونی، ارتباط بین سلول‌ها و فرآیندهای سلولی مرتبط با تش و مرگ سلولی نقش دارند. ژن‌های مهمی مانند *RAS, MEK, PI3K, MAPK, TLR2/4, HSP90, CAM, APC/C, RSK2, ERK, MEK1, MEKK1, MKP, PDGFR, RAS, RAP1, MEKK2/3, CNasGEF, MAPK38, TGFR* و بسیاری دیگر در این مسیرها شناسایی شده‌اند. به عنوان مثال، مسیر *PI3K-AKT* و *MAPK* از مسیرهای مرکزی در القاء التهاب و مقاومت به تنش هستند و *TLR, ECM, Mcl-1* پروتئین ضد مرگ خود خواسته سلولی اشاره به نقش این مسیرها در التهاب و تخریب بافت پستان دارد. همچنین، مسیرهای هورمونی مانند *GnRH*، استروژن و پروژسترون نیز نشان‌دهنده ارتباط بین تعادل هورمونی و بروز ورم پستان هستند. در مجموع، این یافته‌ها نشان می‌دهند که *bta-mir-181* می‌تواند از طریق تنظیم این مسیرهای پیام‌دهی، نقش مهمی در بروز و توسعه ورم پستان در گاو شیری ایفا کند و می‌تواند به عنوان یک زیست‌نشانگر بالقوه برای تشخیص زود هنگام یا هدف‌های درمانی در نظر گرفته شود.

جدول ۳. مسیرهای پیام‌دهی تحت تأثیر *bta-mir-16a*Table 3. Signaling pathways influenced by *bta-mir-16a*.

| مسیرهای پیام‌دهی | P Value | ژن‌های مؤثر در هر مسیر پیام‌دهی |
|-----------------------------|---------|---|
| MAPK Signaling Pathway | 1.8E-3 | FGF, FGFR, NF1, Raf1, c-fos, RSK2, MNK1/2, MP1, MEK1, HSP72, PAK1/2, CrkII, NFAT-4, PP2CA, MKK3 |
| Esterogrn Signaling Pathway | 3.5E-2 | HSP70, Raf, MEK, TF, FKBP52, Gi/o, CAM |
| Oxytocin Signaling Pathway | 3.7E-2 | MEK1/2, Raf-1, NFAT, c-fos, CALM, GIRK, ROCK, MLCK, Gi/o |
| cGAMP-PKG Signaling Pathway | 2.4E-2 | NFAT, GPCR, Cam, MLCK, ROCK, MPT, Gi, MEK, Raf-1, β AR |

جدول ۳ نتایج یک تحلیل بیوانفورماتیکی از مسیرهای پیام‌دهی تحت تأثیر *bta-mir-16a* در گاو شیری را نشان می‌دهد. این miRNA با سرکوب بیان ژن‌های هدف، در تنظیم فرآیندهای مهم سلولی مانند التهاب، استرس اکسیداتیو و پاسخ ایمنی نقش دارد. مسیرهای شناسایی شده شامل MAPK signaling pathway (P=0.0018)، Estrogen signaling pathway

($P=0.035$)، ($P=0.037$) Oxytocin signaling pathway و ($P=0.024$) cGAMP-PKG signaling pathway هستند که تمام آنها از نظر آماری معنی‌دار بوده‌اند ($P<0.05$). این مسیرها به طور عمده در پاسخ‌های التهابی، تنظیم تعادل هورمونی، انقباض عضلانی و سیگنال‌دهی عروقی نقش دارند. ژن‌های کلیدی مانند *MEK, Raf, c-fos, NFAT, HSP70, MLCK, ROCK, GPCR, CAM, FGF/FGFR, Gi/o* در این مسیرها شناسایی شده‌اند. به عنوان مثال، مسیر MAPK یکی از مسیرهای مرکزی در القاء التهاب و تنش سلولی است که می‌تواند در توسعه ورم پستان نقش داشته باشد. مسیر استروژن نیز با تنظیم تعادل هورمونی، و اکسی توسین با کنترل تخلیه شیر و انقباض عضلات صاف پستان، در خطر ابتلا به ورم پستان مؤثرند. مسیر cGAMP-PKG نیز در تنظیم فشار خون و پاسخ ایمنی نقش داشته و می‌تواند بر وضعیت عروقی و التهاب غدد پستان تأثیر بگذارد. بنابراین، *bta-mir-16a* می‌تواند از طریق تنظیم این مسیرهای پیام‌دهی، در بروز و پیشرفت بیماری‌های التهابی مانند ورم پستان در گاو شیری دخالت داشته باشد و به عنوان یک زیست‌نشانگر بالقوه برای تشخیص زودهنگام یا هدف‌های درمانی مطرح شود. نقش *miRNA* ها در علوم دامی و به ویژه در مدیریت سلامت گاوهای شیری تنها محدود به بیماری‌های عفونی مانند ورم پستان نمی‌شود. تعیین الگوی تغییرات زمانی *miRNA* های گردشی در گاوهای شیری در طول دوره انتقال، به ویژه با استفاده از توالی‌یابی نسل بعدی امروزه به یکی از اولویت‌های تحقیقاتی در این حوزه تبدیل شده است (Veshkini et al., 2022). به عبارتی دیگر: *miRNA* ها به دلیل قابلیت اندازه‌گیری در مایعات زیستی مانند شیر، سرم و پلاسما، ثبات بالا در شرایط مختلف نمونه‌برداری، بیان اختصاصی برای یک وضعیت زیستی یا بیماری، ارتباط مستقیم با مسیرهای زیستی مهم و پاسخ‌دهی سریع به تغییرات محیطی یا بیماری، تمام معیارهای لازم را برآورده می‌کنند و بنابراین به عنوان زیست‌نشانگرهای بالقوه در صنعت اصلاح نژاد مطرح هستند. *miRNA* های شناخته شده به عنوان زیست‌نشانگر در دام‌ها را شاید بتوان به عنوان نشانگرهای ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح نژادی استفاده کرد. این رویکرد می‌تواند منجر به تولید نسل‌هایی از دام‌های مقاوم‌تر به بیماری‌های شایع، از جمله ورم پستان شود. در این باره در پایگاه‌های داده، نتایج تجربی و پژوهش‌های *In silico* *miRNA* های با نقش‌های زیستی مختلف مشخص شده‌اند: *miR-155* به عنوان تنظیم‌کننده پاسخ ایمنی و التهاب شناخته شده و در ورم پستان التهابی نقش دارد؛ *miR-21* به عنوان تعدیل‌کننده NF- κ B و التهاب در شرایط عمومی و ورم پستان عمل می‌کند. *miR-146a* نیز در تنظیم پیام‌دهی TLR4 و التهاب مؤثر است و در واکنش‌های ایمنی در عفونت‌ها نقش دارد. *miR-223* به تنظیم گرانولوسیت‌ها پرداخته و در تنش التهابی در شیر مؤثر است. همچنین، *miR-200c* و *miR-205* در عفونت‌های باکتریایی افزایش می‌یابند و به ورم پستان باکتریایی مرتبط هستند. *miR-34* در تنظیم سلول‌های B و پاسخ به تنش نقش دارد و به تنش اکسیداتیو و سلامت عمومی مرتبط است. *miR-122* با متابولیسم چربی و سلامت کبد ارتباط دارد، در حالی که *miR-16* به تنظیم مرگ سلولی و سلامت عمومی سلولی کمک می‌کند. *miR-27b* در تنظیم تمایز آدیپوسیت‌ها و رشد عضله و چربی مؤثر است، و *miR-133a* به مهار تشکیل چربی پرداخته و در صفات تولید گوشت نقش دارد. در نهایت، خانواده *miR-200* در تنظیم تمایز سلول‌های پستان و تولید شیر و رشد غده پستان مؤثر است. اما اصلاح نژاد برپایه *miRNA* ها شاید به سختی قابل اجرا باشد چراکه در نهایت این ژن‌های عملکردی هستند که در بروز صفات نقش دارند نه *miRNA* ها ک طبق تعریف، غیر عملکردی هستند. با این وجود *miRNA* ها، می‌توانند آن دسته از ژن‌های هدف را مشخص کنند که انتظار می‌رود بلافاصله در بروز صفت یا صفات مورد بررسی در ارتباط باشند. در مقایسه با پژوهش‌های پیشین، از جمله Lawless et al. (2014) و Veshkini et al. (2022)، نتایج این پژوهش نشان‌دهنده همپوشانی قابل توجهی در اهداف ژنی و مسیرهای پیام‌دهی مرتبط با ورم پستان گاوی است. به طور خاص، *bta-miR-223* که در این پژوهش 11 پروتئین کلیدی در مسیر TLR/NF- κ B را هدف قرار می‌دهد، در پژوهش Lawless et al. (2014) به عنوان یک زیست‌نشانگر مهم در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان معرفی شده است. همچنین، *bta-miR-21-5p* که در این پژوهش با مسیر PI3K-AKT مرتبط شناخته شد، در Veshkini et al. (2022) به عنوان تنظیم‌کننده سازگاری ایمنی-متابولیک در دوره انتقال گاوها گزارش شده است. این تحلیل نشان داد که *bta-miR-146a* با تطابق 75 درصدی در اهداف ژنی و مسیرهای التهابی اصلی مانند TLR/NF- κ B و MAPK، نقش برجسته‌ای در تنظیم پاسخ‌های ایمنی دارد. جدول 4 و 5، نگاه توأمان و عمیق‌تری از نقش کلیدی *miRNA* ها در تنظیم مسیرهای مولکولی مرتبط با بیماری ورم پستان در گاوهای شیری را نشان می‌دهد. به طور خاص، *bta-miR-21-5p* با پایین‌ترین مقدار P-Value و بالاترین نمره غنی‌سازی (6.5) در مسیر پیام‌دهی

دخیل هستند، در حالی که فرآیندهایی مانند تقسیم سلولی، تکثیر سلولی و سرطان تحت تأثیر بیشتر جمعیت گسترده‌ای از miRNAها قرار می‌گیرند. نتایج پژوهش ما پیشنهاد می‌کنند که به جای تمرکز بر تعداد زیادی از ژن‌ها، می‌توان از تعداد محدودی miRNA خاص و یا توالی‌های قابل اندازه‌گیری در شیر برای تشخیص زودهنگام ورم پستان استفاده کرد. با این حال، طراحی پرایمر اختصاصی برای شناسایی miRNAها نسبت به ژنهای کُدکننده معمولی دشوارتر است، زیرا طول کوتاه این مولکول‌ها (معمولاً 20 تا 24 نوکلئوتید)، ویژگی‌های ساختاری آن‌ها و وجود خانواده‌های مشابه از miRNAها، دقت در طراحی پرایمر را کاهش می‌دهد. پژوهش‌های قبلی در زمینه مسیرهای پیام‌دهی در گاو شیری بیشتر بر روی ژنهای کُدکننده و پروتئین‌های ساختاری متمرکز شده‌اند و اطلاعات کمی درباره نقش miRNAها در این مسیرها در دسترس است. مسیرهای مربوط به سمیت سلولی میانجی‌گری شده توسط سلول‌های کشنده طبیعی^۱ و مسیر پیام‌دهی گیرنده‌های RIG-I^۲ که نقش مهمی در تشخیص عوامل عفونی و القاء واکنش ایمنی ذاتی دارند. در پژوهش حاضر از پایگاه‌های اطلاعاتی معتبری مانند DAVID، miRWalk، NCBI و TargetScan برای شناسایی ژنهای هدف و پروتئین‌های مرتبط با miRNAهایی که در مسیرهای سلولی مرتبط با ورم پستان دخالت دارند، استفاده شد. نشانگرهای *bta-mir-146a*، *bta-mir-223*، *bta-mir-21-5p*، *bta-mir-181* و *bta-mir-16a* بر اساس پژوهش‌های قبلی به عنوان نشانگرهای بالقوه و مؤثر در تشخیص ورم پستان شناخته شده‌اند. به ویژه، استفاده توأم از *bta-mir-223* و *bta-mir-21-5p* به عنوان شاخص‌های قوی برای تشخیص بیماری معرفی شده است. در گزارش‌های موجود، نقش این miRNAها در توسعه ورم پستان گاوی به خوبی مستند شده است. این پژوهش با هدف شناسایی miRNAهای کلیدی مرتبط با ورم پستان و مسیرهای پیام‌دهی تحت تأثیر آن‌ها، شاید گامی در جهت توسعه روش‌های تشخیصی نوین و کاهش بار اقتصادی این بیماری به شمار آید.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر با استفاده از یک رویکرد جامع بیوانفورماتیکی، پنج miRNA مهم شامل *bta-mir-146a*، *bta-mir-16a*، *bta-mir-181*، *bta-mir-21-5p* را به عنوان عوامل تنظیمی محوری در بیماری‌زایی ورم پستان گاوی شناسایی کرد. این miRNAها با هدف قرار دادن ژن‌های حیاتی در مسیرهای پیام‌دهی اصلی مانند TGF β ، PI3K-AKT، MAPK، TLR4/NF- κ B نقش تعیین‌کننده‌ای در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و التهابی غده پستانی ایفا می‌کنند. مهم‌ترین دستاورد این پژوهش، معرفی این miRNAها به عنوان زیست‌نشانگرهای غیرتهاجمی با حساسیت و ویژگی بالا است که با توجه به پایداری آن‌ها در شیر و سرم، امکان توسعه تراشه‌های تشخیصی سریع برای شناسایی زودهنگام ورم پستان حتی در مراحل تحت بالینی فراهم می‌شود. این تراشه‌ها می‌توانند در غربالگری دوره‌ای گله‌ها، پایش پاسخ به درمان و پیش‌بینی خطر ابتلا به بیماری مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، یافته‌های این تحقیق زمینه را برای توسعه راهبردهای درمانی هدفمند، طراحی برنامه‌های اصلاح نژادی برای تولید گله‌های مقاوم، کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و بهبود کیفیت شیر و افزایش بهره‌وری اقتصادی فراهم می‌کند. پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های آینده بر روی اعتبارسنجی تجربی این نشانگرها در جمعیت‌های مختلف گاوی و توسعه فناوری‌های عملیاتی برای استفاده میدانی متمرکز شوند.

"هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد."

منابع

سجادی، سعیدرضا، س.، خرمیان، عزیززاده، & فرزانه. (۲۰۲۱). ارزیابی دقت تشخیص ورم پستان تحت بالینی با استفاده از نوارهای تشخیص سجادی، سعیدرضا، س.، خرمیان، عزیززاده، & فرزانه. (۲۰۲۱). ارزیابی دقت تشخیص ورم پستان تحت بالینی با استفاده از نوارهای تشخیصی (Journal of Veterinary Research), 76(2), 260-267 . مجله تحقیقات دامپزشکی

REFERENCES

- Bartel, D. P. (2018). Metazoan micromRNAs. *Cell*, 173(1), 20-51 . <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Bennett, H., Fleming, J., O'prey, J., Ryan, K., & Leung, H. (2010). Androgens modulate autophagy and cell death via regulation of the endoplasmic reticulum chaperone glucose-regulated protein/78 BiP in prostate cancer cells. *Cell death & disease*, 1(9), e72-e72 . <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.50>
- Bohlin, J., Brynildsrud, O. B., Sekse, C., & Snipen, L. (2014). An evolutionary analysis of genome expansion and pathogenicity in Escherichia coli. *BMC genomics*, 15(1), 882 . <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-882>
- Campbell, B., Kendall, N., & Baird, D. (2009). Effect of direct ovarian infusion of bone morphogenetic protein 6 (BMP6) on ovarian function in sheep. *Biology of Reproduction*, 81(5), 1016-1023 . <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076653>
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M.,...Dono, M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 13944-13949 . <https://doi.org/10.1073/pnas.0506654102>
- Donnelly, M. R., Hazel, A. R., Hansen, L. B., & Heins, B. J. (2023). Health treatment cost of Holsteins in eight high-performance herds. *Animals*, 13(13), 2061 . <https://doi.org/10.3390/ani13132061>
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews genetics*, 12(12), 861-874 . <https://doi.org/10.1038/nrg3074>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(8), 509-524 . <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., & Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary quarterly*, 29(1), 18-31 . <https://doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224>
- Haneklaus, M., Gerlic, M., O'Neill, L. A., & Masters, S. (۲۰۱۳). miR-223: infection, inflammation and cancer. *Journal of internal medicine*, 274(3), 215-226 . <https://doi.org/10.1111/joim.12099>
- Henao-Mejia, J., Williams, A., Goff, L. A., Staron, M., Licona-Limón, P., Kaech, S. M.,...Flavell, R. A. (2013). The microRNA miR-181 is a critical cellular metabolic rheostat essential for NKT cell ontogenesis and lymphocyte development and homeostasis. *Immunity*, 38(5), 984-997 . <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.021>
- Hou, J., Cui, A., Song, P., Hua, H., Luo, T., & Jiang, Y. (2015). Reactive oxygen species-mediated activation of the Src-epidermal growth factor receptor-Akt signaling cascade prevents bortezomib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Molecular medicine reports*, 11(1), 712-718 .
- Johnnidis, J. B., Harris, M. H., Wheeler, R. T., Stehling-Sun, S., Lam, M. H., Kirak, O.,...Camargo, F. D. (2008). Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*, 451(7182), 1125-1129 . <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2736>
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), 373-384 . <https://doi.org/10.1038/nature06607>
- Knutson, S. K., Warholic, N. M., Johnston, L. D., Klaus, C. R., Wigle, T. J., Iwanowicz, D.,...Moyer, M. P. (2014). Synergistic anti-tumor activity of EZH2 inhibitors and glucocorticoid receptor

- agonists in models of germinal center non-Hodgkin lymphomas. *PloS one*, 9(12), e111840 .
<https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews genetics*, 11(9), 597-610 <https://doi.org/10.1038/nrg2843>
- Lawless, N., Vegh, P., O'Farrelly, C., & Lynn, D. J. (2014). The role of microRNAs in bovine infection and immunity. *Frontiers in immunology*, 5, 611 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00611>
- Li, Q.-J., Chau, J., Ebert, P. J., Sylvester, G., Min, H., Liu, G.,...Skare, P. (2007). miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*, 129(1), 147-161 .
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.008>
- Liu, G., Friggeri, A., Yang, Y., Milosevic, J., Ding, Q., Thannickal, V. J.,...Abraham, E. (2010). miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *Journal of Experimental Medicine*, 207(8), 1589-1597 <https://doi.org/10.1084/jem.20100035>
- Lo Presti, E., Pizzolato, G., Corsale, A. M., Caccamo, N., Sireci, G., Dieli, F., & Meraviglia, S. (2018). $\gamma\delta$ T cells and tumor microenvironment: from immunosurveillance to tumor evasion. *Frontiers in immunology*, 9, 1395 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01395>
- Mercer, T. R., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature reviews genetics*, 10(3), 155-159 <https://doi.org/10.1038/nrg2521>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402 .
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- O'connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., & Baltimore, D. (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(2), 111-122 .
<https://doi.org/10.1038/nri2708>
- Oriá, A. P., Lacerda, A. d. J., Raposo, A. C. S., Araújo, N. L., Portela, R., Mendonça, M. A., & Masmali, A. M. (2020). Comparison of electrolyte composition and crystallization patterns in bird and reptile tears. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 505983 <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00574>
- Putz, E. J., Putz, A. M., Jeon, H., Lippolis, J. D., Ma, H., Reinhardt, T. A., & Casas, E. (2019). MicroRNA profiles of dry secretions through the first three weeks of the dry period from Holstein cows. *Scientific Reports*, 9(1), 19658 . <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56193-5>
- Rottiers, V., & Näär, A. M. (2012). MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(4), 239-250 <https://doi.org/10.1038/nrm3313>
- Tang, Y.-J., Wang, J.-L., Xie, K.-G., & Lan, C.-G. (2016). Association of interleukin 16 gene polymorphisms and plasma IL16 level with osteosarcoma risk. *Scientific Reports*, 6(1), 34607 .
<https://doi.org/10.1038/srep34607>
- Van Soest, F. J., Santman-Berends, I. M., Lam, T. J., & Hogeveen, H. (2016). Failure and preventive costs of mastitis on Dutch dairy farms. *Journal of dairy science*, 99(10), 8365-8374 .
<https://doi.org/10.3168/jds.2015-10561>
- Veshkini, A., Hammon, H. M., Lazzari, B., Vogel, L., Gnott, M., Tröscher, A.,...Cecilian, F. (2022). Investigating circulating miRNA in transition dairy cows: What miRNAomics tells about metabolic adaptation. *Frontiers in Genetics*, 13, 946211 .
<https://doi.org/10.3389/fgene.2022.946211>
- Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular cell*, 43(6), 904-914 <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.018>
- Zhang, Y., Zhang, X.-O., Chen, T., Xiang, J.-F., Yin, Q.-F., Xing, Y.-H.,...Chen, L.-L. (2013). Circular intronic long noncoding RNAs. *Molecular cell*, 51(6), 792-806 .
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.017> <https://doi.org/10.1136/ard.2008.098293>
- Zheng, W., Zhang, X., Wang, Q., Xu, D., Zeng, X., & Zhang, F. (2009). Refractory severe connective tissue disease thrombocytopenia: is rituximab treatment effective and safe? *Annals of the*

rheumatic diseases, 68(6), 1077-1078 .<https://doi.org/10.1136/ard.2008.098293>

Zhuang, G., Meng, C., Guo, X., Cheruku, P .S., Shi, L., Xu, H.,...Safe, S. (2012). A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. *Circulation*, 125(23), 2892-2903 .<https://doi.org/10.1161/circulationaha.111.087817>