

## بازسازی و آنالیز توپولوژی شبکه متابولیکی دخیل در تولید شیر گاو

### • شعله قربانی

دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد (ژنتیک مولکولی)، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

### • مجتبی طهمورث پور (نویسنده مسئول)

استاد دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

### • علی مسعودی نژاد

دانشیار موسسه تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران.

### • محمد رضا نصیری

استاد دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

### • یزدان عسگری

استادیار بخش بیولوژی، پژوهشگاه دانش‌های بنیادی، تهران.

### • احسان معتمدیان

استادیار دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس.

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۴

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۱۱۵۹۹۱۱

Email: m\_tahmoorespur@yahoo.com

### چکیده

مدل سازی متابولیسم تولید شیر مبتنی بر بازسازی شبکه متابولیکی دخیل در تولید شیر، احتمالا می تواند منجر به دیدگاهی سیستمی به این فرآیند پیچیده و درک بهتر آن گردد. این بازسازی با استفاده از اطلاعات ژنومی قابل دسترس گاو امکان پذیر است. در این پژوهش، شبکه متابولیکی درگیر در تولید شیر در گاو، بازسازی و آنالیز شده است. بدین منظور، ابتدا اطلاعات موجود در پایگاه داده‌های NCBI، Uniprot، KEGG و Brenda مورد استفاده قرار گرفته‌اند. شبکه حاصل، شامل ۳۶۰۵ واکنش بوده که توسط ۶۴۶ آنزیم کاتالیز شده و از پایگاه داده KEGG تهیه گردیده‌اند. براساس تئوری گراف، تمامی ویژگی‌های ساختاری شبکه متابولیکی جهت دار و بدون جهت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میانگین طول مشخصه مسیر برابر با مقادیر ۵/۵۱ و ۵/۵۳ به ترتیب برای شبکه متابولیکی جهت دار و بدون جهت به دست آمد. ۲۳ متابولیت هاب تعیین گردید. زیرا هرگونه تغییر در این متابولیت‌ها ممکن است موجب کاهش تولید شیر بوده و یا برای سلامتی دام مضر باشد. بنابراین هدف از ساخت شبکه متابولیت محور، مقایسه تطابق ویژگی‌های این شبکه با سایر شبکه‌های بیولوژیکی و تعیین متابولیت‌های کلیدی در تولید شیر می باشد. تحقیق حاضر، می تواند اطلاعات مفیدی برای بهبود و درک بهتر فرآیند تولید شیر در گاو از دیدگاه متابولیکی ارائه دهد و منجر به ارائه پیشنهاداتی در جهت ایجاد ویا بهبود استراتژی‌های اصلاح نژادی گردد.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 110 pp: 167-180

### Reconstruction and topology analysis of metabolic network involved in Bos Taurus milk production

1- sholeh ghorbani: Ph.D. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Khorasan, Iran.

2\*- Mojtaba tahmoores pur: Professor, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Khorasan, Iran,  
Email: m\_tahmoorespur@yahoo.com

3- Ali masoudi-nejad: Associate Professor, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran

4-Mohmmadreza nasiri : Professor Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Khorasan, Iran.

5- Yazdan asgari: School of Biological Sciences, Institute for Research in Fundamental Sciences (IPM), Tehran, Iran

6- Ehsan Motamedian: Assistant professor, Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: February 2015

Accepted: June 2015

The modeling of metabolism of milk production through the reconstruction of metabolic networks involved in the milk production in cow (bos taurus) from the available genomics information is possible now and may be uncover a comprehensive view on this complex process. Computation of topological indices and quantitative characterizations, are some of the principle computations based on graph theory applied in biological data. In the present study, the metabolic network involved in milk production in cow was reconstructed and analyzed based on the available bovine genome information using several public databases (NCBI, Uniprot, KEGG, and Brenda). The reconstructed network was consisted of 3605 reactions named by KEGG compound numbers and 646 enzymes that catalyzed the corresponding reactions. The characteristics of the directed and undirected network have been analyzed using Graph Theory. The mean path length was identified equal to 5.51 and 5.53 for directed and undirected networks, respectively. The top 23 hub metabolites have been determined, that the abnormality among these metabolites may have some dangers for bovine health and reduce milk production. Therefore, the aim of constructing the metabolites centric network is to see if the network follows the same network properties of the biological networks. Key metabolites have been determined. The results include information that might improve the better understanding and more knowledge about milk production in cow and could be beneficial to cow breeding.

**Key words:** Cow, Milk production, metabolic network, Graph theory, Metabolism.

#### مقدمه

داشتن چنین دیدگاه سیستمی محقق شده است. از آنجایی که روابط میان اجزاء سلول در پاسخ به محرک های درونی و بیرونی سلول شکل می گیرند و یا از بین می روند از این رو شبکه های ارتباطی گفته شده ماهیتی پویا<sup>۵</sup> دارند (Morowitz, 2004) و آن ها را به صورت پویا مدل سازی کنیم، درک بهتر مفاهیم موجود و ارائه پاسخ بهتر و جامع تر به سوالات متفاوت امکان پذیر خواهد شد (Christopher و همکاران، 2011). سوخت و ساز در یک سلول، شامل واکنش های بسیاری است که در بخش هایی با هم مرتبط هستند.

یک سیستم از ارتباط بین اجزاء تشکیل دهنده آن به وجود می آید. زیست شناسی سامانه ها<sup>۱</sup> شاخه ای بین رشته ای از علم است که سعی دارد به هر موجود زنده یا حداقل کوچک ترین واحد سازنده آن یعنی سلول، یک نگاه جامع و سیستمی داشته باشد. در سال های اخیر، پیشرفت های فنی و ارتقاء امکانات محاسباتی امکان تولید ارزان و دقیق داده های پربرون داد<sup>۲</sup> در سطوح مختلف زیستی موسوم به اومیکس<sup>۳</sup> از قبیل ژن، رونوشت، پروتئین و متابولیت، ایجاد و یا بازسازی شبکه های<sup>۴</sup> ارتباطی بین اجزاء هر یک از این سطوح و شبکه های برهم کنشی بین سطحی و نیز تلفیق همه نتایج حاصله را فراهم نموده است. به این ترتیب در حال حاضر

توالی یابی کامل ژنوم گاو و موجود بودن اطلاعات حاشیه گذاری شده ژنوم گاو و وجود داده‌های مربوط به بیان ژن‌ها در بافت‌های مختلف گاو، بازسازی مدل شبکه متابولیکی در گاو شیری امکان پذیر بوده لذا در این پژوهش، به بازسازی و مدل سازی شبکه متابولیکی در سلول‌های درگیر در تولید شیر در گاو پرداخته شد. نتایج این تحقیق می‌تواند منجر به درک بهتر فرآیند تولید شیر در گاو شده و پیشنهادهای را در جهت ایجاد ویا بهبود استراتژی‌های اصلاح نژادی ارائه نماید.

### مواد و روش‌ها

#### آماده سازی و تهیه اطلاعات

اطلاعات پایه بافت غده پستانی گاو از طریق سرویس ftp از بانک اطلاعاتی UniGene دانلود شد. در کل، در حدود ۶۸۷۵ ژن که در بافت غدد پستانی بیان می‌شوند و در تولید شیر موثر هستند، از این سایت انتخاب شدند. این تعداد به‌طور تقریبی با ۶۴۶۹ ژن گزارش شده توسط Lemay و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت داشت. سپس هر ژن در بانک اطلاعاتی Uniprot<sup>v</sup> و Brenda<sup>^</sup> به منظور اثبات و تکمیل اطلاعات ژن مورد نظر و شناسایی محصول آنزیمی آن مورد جستجو قرار گرفت (Goto and Kanehisa, 2000; Kanehisa and همکاران, 2006). در این مرحله، ۷۹۱ ژن که فرآورده آنزیمی آن‌ها در تولید شیر در بافت غدد پستانی دخالت داشتند، شناسایی گردیدند. عملکرد کاتالیتیک هر آنزیم به‌صورت کلی، از طریق شماره‌های EC<sup>۹</sup> اختصاصی آن‌ها یافته و تعیین گردید (Smith and Morowitz, 2004). اطلاعات مربوط به واکنش‌ها و متابولیت‌های مرتبط با این آنزیم‌ها و ژن‌های مرتبط، از بانک اطلاعاتی KEGG<sup>۱۰</sup> تهیه شدند. در نهایت ۷۹۱ ژن با عملکرد متابولیکی دخیل در تولید شیر شامل ۲۰۵۰ واکنش و ۶۴۶ آنزیم در نظر گرفته شدند.

#### بازسازی و آنالیز شبکه متابولیکی

به منظور آماده سازی اطلاعات تهیه شده در فرمت خاص برای آنالیز، برنامه‌ای به زبان C<sup>++</sup> نوشته شد که این اطلاعات را برای

فرآورده‌های هر واکنش به عنوان واکنش دهنده‌های واکنش بعدی مورد استفاده قرار می‌گیرند و بدین ترتیب یک شبکه متابولیکی تشکیل می‌شود.

همین واقعیت در مورد روابط و شبکه‌های تنظیمی بین ژن‌ها و فرآورده‌های آن‌ها نیز وجود دارد. همه این شبکه‌ها نیز به نوعی با یکدیگر ارتباط تنگاتنگ دارند (Durek and Walther, 2008). تئوری گراف<sup>۱۱</sup> مبنای تشکیل و بازسازی شبکه‌های ارتباطی گردیده است. این شبکه‌ها در تمامی حوزه‌های علم از جمله علوم اجتماعی، فنی و زیستی کاربرد دارند (Badu, Janga and 2008). امروزه به‌طور مداوم به تعداد موجودات زنده‌ای که مدل متابولیسم شان بازسازی می‌شوند افزوده می‌شود، اگر چه کیفیت بازسازی شبکه متابولیکی در موجودات مختلف، متفاوت است که این تفاوت به مقدار اطلاعات موجود برای موجود زنده مورد نظر و روش‌های عملیاتی مناسب برای روند بازسازی بستگی دارد (Amit و همکاران, 2009; Forster و همکاران, 2003; Pfeiffer و همکاران, 2005). ساخت مدل‌ها و شبکه‌های متابولیکی بر اساس اطلاعات ژنومی، از سال ۱۹۹۹ شروع گردیده و ابتدا در مورد باکتری هموفیلوس آنفلوانزا انجام شد (Edwards and Palsson, 1999). این کار نتایج جالب توجهی در پیش بینی رفتار میکروارگانیسم‌ها و به انجام رساندن اهداف بیوتکنولوژیکی و مهندسی متابولیکی در پی داشته است. این دستاوردها به ساخت شبکه‌های بزرگ‌تر، دقیق‌تر و ابداع روش‌های مختلف برای آنالیز این شبکه‌ها به خصوص در سلول‌های پستانداران انجامیده است (Durot و همکاران, 2009; Edwards و همکاران, 2001; Feist و همکاران, 2009; Kuffner و همکاران, 2000). با داشتن مدلی از یک سامانه زیستی، می‌توان راجع به ایجاد تغییرات بهینه در آن فرضیاتی را مطرح نمود و در مراحل بعدی، این تغییرات را به منظور مهندسی سامانه زیستی مورد نظر اعمال کرد (Christopher و همکاران, 2011).

از آن جایی که مطالعه مدل‌های متابولیکی به درک بهتر و عمیق‌تر فرآیند تولید شیر کمک موثری می‌نماید و همچنین با توجه به

## نتایج و بحث

### ویژگی‌های شبکه‌های متابولیک

پیشرفت‌های حاصل در علوم زیستی و تولید حجم انبوه اطلاعات مستخرج از فرآیندهای زیستی، دانش ما را در مورد واحدهای تشکیل دهنده حیات از جمله ژن‌ها و پروتئین‌ها افزایش داده است. اما داشتن همه اطلاعات مربوط به ژن‌ها یا همه پروتئین‌ها به تنهایی کافی نیست، بلکه می‌بایست با نگاهی سیستمی به موضوع نگریست (Kitano, 2000).

با توجه به این که بازسازی شبکه‌های متابولیک و شبیه‌سازی آن به ما این اجازه را می‌دهند تا یک بینش عمیق به مکانیزم‌های مولکولی ارگانسیم خاص پیدا کنیم لذا در تحقیق حاضر، بازسازی شبکه بافت خاص غده پستانی گاو که در تولید شیر موثر است، با الهام از بازسازی شبکه مخصوص بافت‌های انسان، انجام شد. روند بازسازی و آنالیز شبکه متابولیکی با استفاده از نرم افزار Cytoscape منجر به تولید یک شبکه کلی از ژن‌های درگیر در متابولیسم تولید شیر در غده پستانی گاو شد. در سیستم‌های زیستی، شبکه‌ها به عنوان یک گراف پایا تعریف می‌شوند. از منظر ریاضی، یک گراف، زوج مرتبی از گره‌ها و یال‌ها می‌باشد که گره‌ها توسط یال‌ها به یکدیگر متصل می‌شوند (Barabasi و Albert, 1999). در شبکه متابولیکی مورد بررسی در این تحقیق، متابولیت‌ها به عنوان گره، و آنزیم‌های کاتالیز کننده واکنش‌ها، به عنوان یال در نظر گرفته شدند. پارامترهای گره‌ای محاسبه شده و برخی از ویژگی‌های کلی شبکه در جدول ۱ نشان داده شده است.

مطالعات محققین نشان داده است که روش‌های مبتنی بر نظریه گراف، در تجزیه و تحلیل ساختار شبکه‌های بیولوژیکی می‌توانند مفید باشند (Albert و همکاران, 2000a; Jeong و همکاران, 2000). با توجه به این که یکی از کاربردهای زیست‌شناسی سامانه‌ها ارائه مدلی است که شبکه و کارکرد آن را توجیه کند، مدل شبکه‌های این تحقیق نیز مطابق با مدل ارائه شده توسط Barabasi و Albert (1999) و Albert و همکاران (2000b) و (2000a) مورد بررسی قرار گرفت.

تبدیل به فرمت SBML (Hucka و همکاران, 2003) آماده نمود و سپس توسط COBRA-Toolbox (Becker و همکاران, 2007; Schellenberger و همکاران, 2011) که در نرم افزار MATLAB اجرا می‌شود این تبدیل انجام شد. با در نظر گرفتن تعداد ۱۰ اندامک سلولی (سیتوزول، هسته، میتوکندری، غشاء سلولی، سیتوپلاسم، شبکه اندوپلاسمی، لیزوزوم، پروکسیزوم، دستگاه گلژی، و واکوئول)، تعداد ۳۰۶۵ واکنش و ۵۸۳۷ متابولیت به فرمت SBML آماده شد. در این فرمت، هر فایل حاوی اطلاعات شبکه‌های متابولیکی به صورت دوبخشی (متابولیت-آنزیم) می‌باشد. این ویژگی سبب می‌شود تا آنالیز با روش‌های توپولوژیک با سختی روبرو شود. برای ساخت شبکه‌های متابولیت-متابولیت و آنزیم-آنزیم از گراف دوبخشی، نیاز بود تا از برنامه‌ای استفاده شود که ورودی آن یک فایل SBML باشد و از روی آن و با در نظر گرفتن واکنش‌های برگشت پذیر و غیر برگشت پذیر، شبکه‌های متابولیت-متابولیت و آنزیم-آنزیم به صورت خروجی ساخته شوند. همچنین خروجی باید دارای فرمتی باشد که قابل استفاده در برنامه‌های آنالیز شبکه باشد. لذا از ابزاری به نام SCAN-toolbox (Asgari و همکاران, 2013) که در نرم افزار MATLAB اجرا می‌شود، برای تهیه شبکه متابولیتی جهت دار و بدون جهت استفاده شد. همچنین، متابولیت‌های اخلاکگر<sup>۱۱</sup> (Ma and Zeng, 2003; Jing و همکاران, 2006) که در شبکه مورد بررسی در این تحقیق دارای گره‌هایی با بیشترین درجه هستند نیز حذف گردیدند. متابولیت‌های اخلاکگر در شبکه مورد نظر ما شامل: ATP, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sup>+</sup>, NAD, ADP, NH<sub>4</sub> بودند. شبکه متابولیتی ساخته شده توسط نرم افزار Cytoscape (Cline و همکاران, 2007) تجزیه و تحلیل شد. ویژگی‌های توپولوژیکی شبکه و پارامترهایی از جمله توزیع درجه، متوسط طول مسیر، قطر شبکه، و غیره توسط پلاگین‌هایی از این نرم افزار مثل Network Analysis و cytoHubba (Lin و همکاران, 2008) تجزیه و تحلیل شدند.

## توزیع درجه

کوچک تر باشد، نشان دهنده مهم تر بودن نقش هابها در شبکه می باشد (Barabasi and Oltvai، 2004). ضریب همبستگی (R) در شبکه بدون جهت 0.75، در حالی که در شبکه جهت دار ضریب همبستگی در درجه ورودی 0.78 و در درجه خروجی 0.74 به دست آمد. نتایج به دست آمده نشان می دهند که شبکه های ساخته شده، به طور کامل مشخصات یک شبکه واقعی را دارند و یک شبکه تصادفی نمی باشند. قابل ذکر است که ویژگی مقیاس آزاد بودن، سبب افزایش سطح پایداری و سازماندهی در شبکه های زیستی نیز می شود (Janga Badu، 2008، and).

### طول مشخصه مسیر و قطر شبکه

طول مشخصه مسیر<sup>۱۴</sup> و قطر شبکه<sup>۱۵</sup> از ویژگی های مهم دیگر در یک شبکه هستند که می بایست مورد بررسی قرار گیرند. زیرا اشاره به قابلیت پیگیری در کل شبکه دارند و در نتیجه، بالا یا پایین بودن درجه گره ها را وقتی که تنها تعداد کل گره ها در یک گراف مورد نظر است، بهتر توضیح می دهند (Jing و همکاران، 2006؛ Lin و همکاران، 2008). طول مشخصه مسیر عبارت از میانگین تعداد مراحل در بین کوتاه ترین مسیرها برای همه جفت گره های شبکه می باشد (Barabasi and Oltvai، 2004). میانگین طول مسیر محاسبه شده، نشان می دهد که آیا این شبکه های ایجاد شده، خاصیت جهان کوچک<sup>۱۶</sup> را دارا می باشند؟ خاصیت جهان کوچک که از مطالعات اجتماعی نشأت گرفته است و یکی از ویژگی های جالب اکثر شبکه های تجربی است، نشان دهنده این است که شبکه ها علی رغم اندازه بزرگشان که تا میلیون ها گره هم می رسد، دارای متوسط طول مسیر پایین می باشند (یعنی معمولاً از هر راس، از تعداد مسیر کم و نیز کوتاه می توان به راس دیگر رسید). شبکه های زیستی با مقیاس آزاد، دارای طول مشخصه مسیر کوچک تر از شبکه های تصادفی هستند. برای مثال در شبکه متابولیکی (مستقل از نوع موجود زنده)، فاصله متابولیتها (گره ها) تقریباً سه می باشد ( $d \approx 3$ ). البته مشاهداتی نیز در نقض این ویژگی تحت شرایط خاص ارائه شده

توزیع درجه گره در شبکه در شکل های ۱ و ۲ نشان داده شده است. از آنجایی که شبکه های متابولیکی می بایست از خاصیت مقیاس آزاد<sup>۱۲</sup> و از توزیع درجه نمایی<sup>۱۳</sup> پیروی کنند، این مساله در شبکه های ساخته شده این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. یک گره در یک شبکه با مقیاس آزاد که دارای k ارتباط با دیگر گره ها می باشد، از توزیع درجه نمایی با رابطه زیر پیروی می کند. که در آن  $\gamma$  یک پارامتر نمایی می باشد (Erdos و Renyi، 1959):

$$p(k) \sim k^{-\gamma}$$

با توجه به کوچک بودن مقدار پارامتر  $\gamma$  (۱/۳۱) برای شبکه بدون جهت و ۱/۴۸ و ۱/۳۹ به ترتیب برای درجه ورودی و خروجی شبکه جهت دار) و گراف توزیع درجه (شکل های ۱ و ۲)، طبیعت مقیاس آزاد شبکه های مورد بررسی این طرح معنی دار بود و شبکه متابولیکی غده پستانی گاو از توزیع قانون نمایی تبعیت می کرد. یعنی در این شبکه ها، تعداد راس های با درجه بالا، کم و راس های با درجه پایین، زیاد است (این بدین معنی است که اکثر سوبستراها، در تعداد کمی از واکنش ها شرکت دارند و تعداد کمی از متابولیتها هستند که در تعداد زیادی از واکنش ها شرکت می نمایند). بنابراین در این حالت، فقط راس های با درجه بالا و پایین را نگاه می کنیم و لذا اگر راس هایی را به شکل تصادفی خارج کنیم، تغییر اساسی در شبکه ایجاد نمی شود. ولی از طرفی شبکه به حذف راس های با درجات بالا (یعنی هابها) حساس هستند و حذف آنها به مرگ سلولی می انجامد (به گره های با تعداد اتصال بالا، در اصطلاح هاب گفته می شود) (Barabasi and Albert، 1999). طبق مطالعه محققان، هابها در سیستم های بیولوژیکی، عموماً کوفاکتورهایی مثل ATP، ADP و NAD در اشکال مختلف می باشند و حد واسطه های گلیکولیز و چرخه TCA نیز جزو این دسته قرار می گیرند (Wagner and Fell، 2001). به طور کلی، ویژگی های شبکه های دارای خاصیت مقیاس آزاد فقط در حالتی معتبر هستند که پارامتر توزیع نمایی، کوچک تر از ۳ باشد ( $\gamma < 3$ ). هر چه مقدار  $\gamma$

تقریباً به مقادیر به دست آمده در مورد باکتری‌ها (۷/۲۳ و ۲۰/۶) در نتایج به دست آمده توسط آن‌ها نزدیک بوده، ولی کمتر از یوکاریوت‌ها (۹/۵۷ و ۳۳/۱) بود. همچنین نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که اگرچه ساختار پایه شبکه‌های متابولیکی برای همه موجودات زنده مورد بررسی آن‌ها مشابه است، اما در پارامترهایی مانند ویژگی‌های قطر و میانگین طول مسیر شبکه، تفاوت‌های کمی نشان دادند. وجود این تفاوت‌ها در ساختار شبکه‌های متابولیکی موجودات مختلف، منعکس کننده تاریخچه تکاملی متفاوت آن‌ها است. مقایسه دقیق تر واکنش‌ها و مسیرهای خاص موجودات زنده، می‌تواند به فهم معنای بیولوژیکی تفاوت‌های ساختاری کمک کرده و نکات مفیدی برای کارهای تحقیقاتی آینده مانند توسعه داروها علیه باکتری‌های پاتوژنیک ارائه دهند (Ma and Zeng, 2003). نتایج به دست آمده در میانگین طول مسیر و قطر شبکه متابولیکی برای شبکه غده پستانی گاو در مطالعه حاضر، تا حدی با نتایج به دست آمده توسط Ma و Zeng (2003) منطبق است، اما مطالعات بیشتری نیاز می‌باشد تا این تفاوت‌ها روشن‌تر شوند.

### ضریب خوشه بندی و تمرکز شبکه

ضریب خوشه بندی<sup>۱۷</sup> که با یکپارچگی موضعی یک شبکه مرتبط است و احتمال ارتباط دو گره با یک همسایه مشترک را محاسبه می‌کند نیز یکی دیگر از ویژگی‌های مهم مورد بررسی در شبکه‌های زیستی است.

مقدار آن در شبکه بدون جهت ۰/۸۲ و در شبکه جهت دار ۰/۰۶ به دست آمد. مقدار ضریب خوشه بندی در شبکه‌های زیستی دارای مقدار بزرگتری از شبکه‌های تصادفی می‌باشد (Bonabeau and Barabasi, 2003). تمرکز شبکه<sup>۱۸</sup> دیگر ویژگی مورد بررسی در شبکه‌ها می‌باشد که در شبکه‌هایی که توپولوژی ستاره گونه دارند، معمولاً عدد تمرکز شبکه نزدیک به یک است و هرچه از این توپولوژی دورتر شوند، عدد به صفر نزدیک میشود (Koschutski 2001; Wagner and Fell) و همکاران، 2010). در شبکه بدون جهت مورد بررسی ما، مقدار آن ۰/۰۹ به دست آمد.

است (Koschutski و همکاران، 2010). البته باید گفت اصطلاح جهان کوچک، یک ویژگی اصلی شبکه نیست، یعنی هیچ نوع اندازه گیری و تست آماری، جهان کوچک بودن شبکه‌ها را توضیح نمی‌دهد. شکل ۳ و ۴ توزیع کوتاه‌ترین طول مسیر شبکه‌های بدون جهت و جهت دار را به ترتیب نشان می‌دهد. میانگین طول مشخصه مسیر به ترتیب ۵/۵۳ و ۴/۱۷ برای شبکه‌های بدون جهت و جهت دار به دست آمد. این مقدار بسیار بزرگ‌تر از مقدار آن در یک شبکه تصادفی است (Lu and Chung, 2003). یکی دیگر از ویژگی‌های مورد بررسی ما، قطر شبکه بود که طولانی‌ترین مسیر میان دو گره است. مقدار این ویژگی برای شبکه‌های بدون جهت و جهت دار مورد بررسی ما، یکسان و برابر با ۱۷ به دست آمد. بررسی این پارامترها در شبکه‌های بیولوژیکی می‌تواند برای تفسیر عملکرد پروتئین‌هایی که مرتبط با هم هستند و یا عملکردشان بر هم تاثیر متقابل دارند، به کار گرفته شود. بنابراین، در یک شبکه بیولوژیکی با اندازه بزرگ (یعنی تعداد گره‌های بالای ۳۰ عدد)، کوچک بودن این پارامترها نشان دهنده تمایل گره‌ها به تولید کمپلکس‌های کاربردی و عملکردی (ماژول‌ها) با یکدیگر می‌باشد. یکی از مزایای بررسی این ماژول‌ها را می‌توان شناسایی بعضی از پروتئین‌هایی که عملکرد آن‌ها را نمی‌شناسیم (ولی در ماژول بندی در کنار پروتئینی که عملکرد آن را می‌شناسیم قرار گرفته‌اند) برشمرد و استنباط کرد که چون هر دو پروتئین در یک ماژول قرار گرفته‌اند، پس احتمالاً دارای عملکرد مشابه می‌باشند (Jing و همکاران، 2006). تحقیقات Jeong و همکاران (2000) نشان داد که بسیاری از شبکه‌های متابولیتی، میانگین طول مسیر تقریباً مشابه دارند که مقدار آن حدود ۳/۲ گزارش شده است و این می‌تواند نشان دهنده این باشد که اغلب متابولیت‌ها در طی مراحل کوچکی می‌توانند به یکدیگر تبدیل شوند، اگرچه در یافته‌های Ma و Zeng (۲۰۰۳) این موضوع از نظر بیوشیمیایی معنی دار نبود. همچنین آن‌ها (Ma and Zeng, 2003) نشان دادند که یوکاریوت‌ها میانگین طول مسیر طولانی تری در مقایسه با باکتری‌ها دارند. میانگین طول مسیر و قطر شبکه در این تحقیق،

## پارامترهای مرکزیت و مشخصات متابولیت‌های هاب

پارامترهای مرکزیت از جمله خواص کلی یک شبکه به شمار می‌آیند که گره‌ها را بر اساس اهمیت شان در شبکه رتبه بندی می‌کنند. هر چه این رتبه بالاتر باشد، گره‌ها در شبکه از اهمیت بیشتری برخوردار خواهند بود و این مساله نشان می‌دهد که ممکن است این گره در کنترل کردن عملکردهای سلولی نقش مهمی ایفا کند (Koschutski و همکاران، 2010). در این تحقیق، تعداد ۲۳ متابولیت اولیه با بالاترین درجه از اتصال به عنوان هاب (به متابولیت‌هایی که در تعداد زیادی از واکنش‌ها شرکت می‌جویند، اصطلاحاً هاب گفته می‌شود) شناسایی شدند (جدول ۲ و ۳). البته متابولیت‌های اخلاص‌گر که معمولاً دارای بیشترین درجه در شبکه‌های متابولیسمی هستند، در این تحقیق لحاظ نشدند. متابولیت‌های اصلی<sup>۱۹</sup> تاثیر اساسی بر ساختار شبکه دارند. بررسی ژن‌ها، واکنش‌ها، و مسیرهای مرتبط با این متابولیت‌ها می‌تواند در ارائه استراتژی‌های اصلاح نژادی و پرورشی در گاو شیری بسیار مفید باشد. طبق نتایج ارائه شده در جدول‌های ۲ و ۳، متابولیت‌های Oxidized, Reduced flavoprotein, dTDP UDP, flavoprotein, GDP و AMP همگی در گیر در متابولیسم اسیدهای نوکلئیک مثل پورین و پیریمیدین و همچنین در متابولیسم کربوهیدرات‌ها هستند. متابولیت‌های Acetyl-, CoA, Acyl-carrier-, Acyl-CoA, Malonyl-CoA, CoA, Isopentenyl diphosphate, protein و Pyruvate همگی تقریباً در متابولیسم، سنتز و تخریب اسیدهای چرب، استروئیدها، متابولیسم ویتامین‌ها، و همچنین در مسیرهای متابولیسمی مثل اسید سیتریک، پنتوز فسفات، و گلیکولیز درگیر هستند. دیگر متابولیت‌ها مثل S-,S-Adenosyl-L-methionine, L-,Glutathione, Adenosyl-L-homocysteine, Propanoyl-CoA و 2-Oxoglutarate, Glutamate در سنتز و متابولیسم اسیدهای آمینه مثل متیونین، سیستئین، پرولین، آرژنین، لایزین، و غیره دخالت دارند. متابولیت FAD در متابولیسم ریوفلاوین و هضم و جذب ویتامین‌ها و در نهایت متابولیت‌های CMP-N-,N-Acetylneuraminate

UDP-D-, GDP-L-fucose.acetylneuraminate و UDP-glucose و galactos در متابولیسم کربوهیدرات‌ها مثل نشاسته و ساکارز و قند آمینه و قند نوکلئوتید درگیر هستند. در مجموع، همان‌طوری که از نتایج استنباط می‌شود، تغییرات در این متابولیت‌ها که ناشی از تغییر در بیان ژن‌هایی است که در تولید آن‌ها دخالت دارند یا تغییرات محیطی که بر روی مقدار این متابولیت‌ها در هر جهت موثر هستند، می‌توانند اثر مستقیم روی تولید شیر و کیفیت آن داشته باشند.

لذا تغییرات غیر عادی در ژن‌های مربوطه می‌تواند در سلامت شیر گاو و یا کاهش تولید آن موثر باشد. Jeong و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که متابولیت‌های هاب، تقریباً در میان شبکه‌های متابولیسمی مورد بررسی همه موجودات مشابه هستند، به گونه‌ای که اغلب آن‌ها شامل متابولیت‌های اخلاص‌گر می‌باشند.

Ma و Zeng (2003)، ۲۰ متابولیت هاب را برای ۸۰ موجود زنده مختلف، بدون در نظر گرفتن متابولیت‌های اخلاص‌گر گزارش کردند. نتایج آن‌ها تفاوت‌های زیادی را بین موجودات مختلف نشان داد. L-Glutamate, Acetyl-CoA, Pyruvate و Propanoyl-CoA تنها متابولیت‌های هاب مشترک در این تحقیق در مقایسه با نتایج آن‌ها بودند (جدول ۲ و ۳).

متابولیت‌های هاب، نقش کلیدی در مسیرهایی که منجر به تولید شیر در گاو می‌شود دارند و می‌بایست از جنبه‌های مختلف و در مطالعات آینده، بیشتر مورد توجه قرار بگیرند. بیش از ۲۲۳ متابولیت مختلف که در تولید شیر گاو دخالت دارند (شامل ۳۰ اسید آمینه، ۳۷ لیپید، ۲۱ کربوهیدرات، ۱۲ نوکلئوتید، ۸ متابولیت انرژی‌زا، ۹ ویتامین و کوفاکتور و ۳ پپتید کوچک) توسط boudonck و همکاران (2009) گزارش شدند. شناسایی متابولیت‌های موجود در شیر می‌تواند از جنبه‌های مفید باشد، چرا که این متابولیت‌ها بیومارکرهای مفیدی برای بیماری‌هایی مثل ورم پستان و کتوز هستند و در نتیجه بررسی آن‌ها می‌تواند در شناخت و مدیریت بهتر بیماری‌های متابولیسمی به کار رود. همچنین متابولیت‌های شیر از جنبه فیزیولوژیکی، تغذیه‌ای و شیرواری،

متابولیت‌های شیر وجود دارد. علاوه بر این، متابولیت‌های شیر نقش مهم و عمده‌ای در کیفیت شیر دارند. اگر چه داده‌های متابولیک این تحقیق، از منابع و پایگاه‌های اطلاعاتی مختلف قابل دسترس جمع آوری شده، ولی هنوز بسیاری از اطلاعات و فاکتورهای ناشناخته ممکن است بر نتایج به دست آمده تاثیر داشته باشند. این تحقیق می‌تواند یک دیدگاه شبکه‌ای وسیع تری از پتانسیل متابولیک غده‌های پستانی گاو به دست دهد که می‌توان انتظار داشت به فهم بهتر از مدل سازی بافتی مرتبط با تولید شیر کمک نماید. همچنین این پژوهش می‌تواند قدم مفیدی در ارائه استراتژی پرورش و اصلاح نژاد گاو به همراه اثربخشی در تکنولوژی‌های مرتبط با کیفیت غذایی شیر داشته باشد. در نهایت، آنالیز توپولوژیک شبکه‌های به دست آمده در این مطالعه به بهبود درک تولید شیر با نگاه شبکه‌ای کمک کرده و تلفیق آن با نتایج آنالیز داده‌های اومیکس در سایر سطوح برای این بافت، یک دیدگاه جامع و سیستمیک از عملکرد این بافت برای تولید شیر ارائه می‌دهد.

منعکس کننده فعالیت متابولیکی غده‌های پستانی هستند. مطالعه ارتباط بین متابولیت‌های سرم خون با شیر نیز می‌تواند دیدگاه بهتری در این زمینه ارائه دهد (Sundekilde و همکاران، 2013). مطالعات نشان داده‌اند که منشاء تولید متابولیت‌های شیر به شکل طبیعی در سلول‌های اپی‌تلیال غده‌های پستانی که تولید کننده اجزاء سازنده شیر هستند، می‌باشند. متابولیت‌های شیر به دو دسته متابولیت‌های اصلی حاضر در شیر (که برای نوزاد مناسب هستند) و متابولیت‌های ناشی از فعالیت‌های متابولیک غده‌های پستانی (که از طریق مسیرهای خارج سلولی از خون یا مایع میان بافتی ناشی می‌شود) تقسیم می‌شوند که در حالت اخیر، تغذیه و رژیم غذایی می‌تواند در تغییرات آن تاثیر عمده داشته باشد (McGuire, Jenkins and Sundekilde; 2006 و همکاران، 2013). Buitenhuis و همکاران (2013) پروفایل متابولیت‌های شیر که تحت تاثیر ژنتیک قرار دارند را مورد بررسی قرار دادند و ۲۱ جایگاه QTL را برای متابولیت‌های شیر تعیین کردند و نتیجه گرفتند که امکان انتخاب ژنومی به منظور تغییرات در ترکیب

### جدول ۱- ویژگی‌های توپولوژیکی شبکه‌های جهت دار و بدون جهت ساخته شده

پارامترها	شبکه جهت دار	شبکه بدون جهت
گره‌ها	۵۸۲۴	۵۸۲۲
یال‌ها	۱۲۳۸۴	۱۹۷۶۴
طول مشخصه مسیر	۴/۱۷	۵/۵۳
قطر شبکه	۱۷	۱۷
ضریب خوشه بندی	۰/۰۶	۰/۸۲
مرکزیت شبکه	—	۰/۰۹

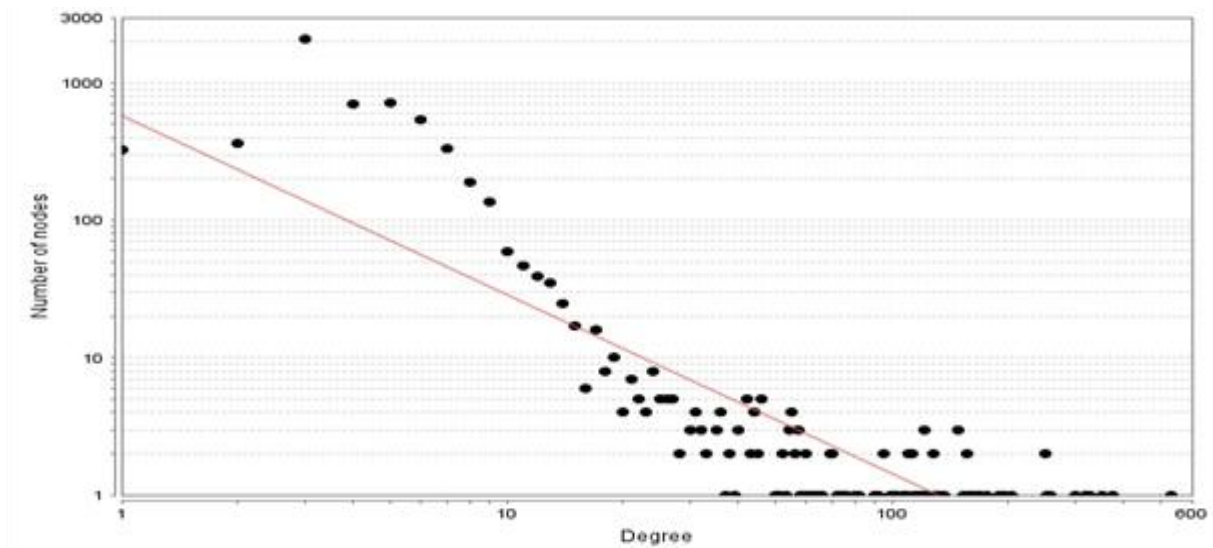


جدول ۲- تعداد ۲۳ متابولیت هاب در شبکه جهت دار که براساس بالاترین درجه گره‌ها مرتب شده‌اند

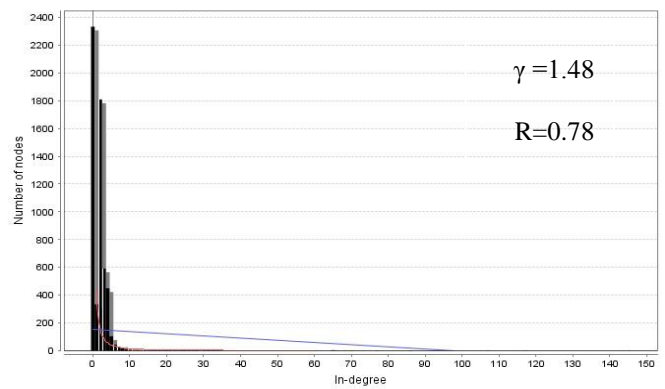
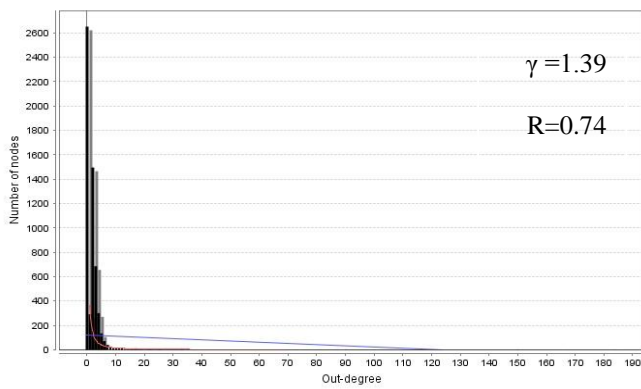
درجه	نام متابولیتها
۵۶	UDP (یوریدین ۵' دی فسفات)
۵۵	CoA (کوآنزیم آ)
۵۴	S-Adenosyl-L-methionine (اس -آدنوزیل-ال-متیونین)
۴۷	S-Adenosyl-L-homocysteine (اس -آدنوزیل-ال-هوموسیستین)
۴۰	dTDP (دی اکسی تیمیدین -۵' دی فسفات)
۳۴	Glutathione (گلو تاتیون)
۳۴	Reduced flavoprotein (فلاووپروتئین کاهش یافته)
۲۸	GDP (گوانوزین -۵' دی فسفات)
۲۶	Acetyl-CoA (استیل کوآنزیم آ)
۲۵	Oxidized flavoprotein (فلاووپروتئین اکسید شده)
۲۴	AMP (آدنوزین -۵' مونوفسفات)
۲۳	N-Acetylneuraminate (ان-استیل نئورامینانت)
۲۲	CMP (سیتیدین -۵' مونوفسفات)
۲۲	CMP-N-acetylneuraminate (سیتیدین -۵' مونوفسفات-ان استیل نئورامینانت)
۲۱	Pyruvate (پیرووات)
۱۹	Isopentenyl diphosphate (ایزوپنتنیل دی فسفات)
۱۹	GDP-L-fucose (گوانوزین دی فسفات-ال-فروکتوز)
۱۸	L-Glutamate (ال-گلو تامات)
۱۸	2-Oxoglutarate (گلو تامیک اسید)
۱۷	Propanoyl-CoA (پروپانویل کوآنزیم آ)
۱۷	UDP-glucose (یوریدین دی فسفات-گلوکز)
۱۷	UDP-D-galactose (یوریدین دی فسفات-دی-گالاکتوز)
۱۶	Acyl-CoA (اسیل کوآنزیم آ)

## جدول ۳- تعداد ۲۳ متابولیت هاب در شبکه بدون جهت که براساس بالاترین درجه گره‌ها مرتب شده‌اند

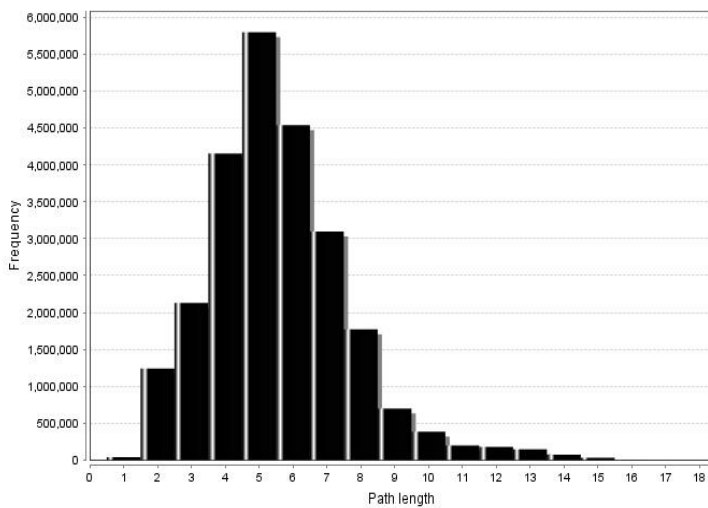
درجه	نام متابولیتها
۱۱۹	UDP (یوریدین ۵' دی فسفات)
۱۱۸	CoA (کوآنزیم آ)
۱۱۷	S-Adenosyl-L-methionine (اس -آدنوزیل-ال-متیونین)
۱۰۹	S-Adenosyl-L-homocysteine (اس -آدنوزیل-ال-هوموسیستین)
۵۷	Glutathione (گلو تاتیون)
۵۷	dTDP (دی اکسی تیمیدین - ۵' دی فسفات)
۵۶	AMP (آدنوزین - ۵' مونوفسفات)
۵۲	CMP (سیتدین - ۵' مونوفسفات)
۴۷	GDP (گوانوزین - ۵' دی فسفات)
۴۶	Oxidized flavoprotein (فلاوو پروتئین اکسید شده)
۴۶	Reduced flavoprotein (فلاوو پروتئین کاهش یافته)
۴۶	Acetyl-CoA (استیل کوآنزیم آ)
۴۳	L-Glutamate (ال-گلو تامات)
۴۲	2-Oxoglutarate (گلو تامیک اسید)
۴۰	CMP-N-acetylneuraminate (سیتدین - ۵' مونوفسفات - ان استیل نئورامینات)
۳۶	Acyl-carrier-protein (آسیل حامل پروتئین)
۳۵	Pyruvate (پیرووات)
۳۳	GDP-L-fucose (گوانوزین دی فسفات - ال - فروکتوز)
۳۲	Malonyl-CoA (مالونیل کوآنزیم آ)
۳۲	UDP-D-galactose (یوریدین دی فسفات - دی گالاکتوز)
۳۱	FAD (فلاووین آدنین دی نوکلوتید)
۳۰	Acyl-CoA (اسیل کوآنزیم آ)
۲۹	UDP-glucose (یوریدین دی فسفات - گلوکز)



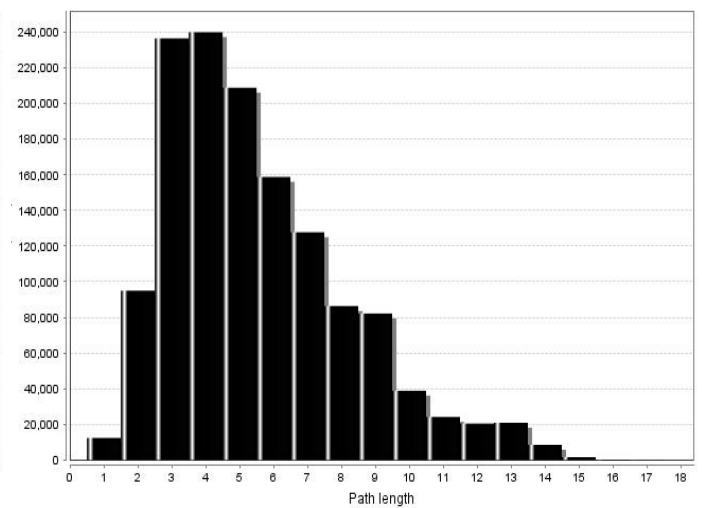
شکل ۱- توزیع درجه شبکه بدون جهت



شکل ۲- توزیع درجه شبکه جهت دار (درجه ورودی سمت راست و درجه خروجی سمت چپ)



شکل ۴- توزیع کوتاه ترین طول مسیر در شبکه بدون جهت



شکل ۳- توزیع کوتاه ترین طول مسیر در شبکه جهت دار

## پاورقی

- Asgari, Y., Salehzadeh-Yazdi, Ali., Schreiber, F. and Masoudi-Nejad, A. (2013). Controllability in Cancer Metabolic Networks According to Drug Targets as Driver Nodes.. *PLoS ONE*. 8(11): e79397.
- Barabasi, AL., Bonabeau, E. (2003). Scale-free networks. *Scientific American*. 288: 60-69.
- Barabasi, AL., Oltvai, ZN. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics*. 5:101-113.
- Barabasi, AL., Albert, R. (1999). Emergence of scaling in random networks. *Science*. 286:509-512.
- Becker S, Feist A, Mo M, Hannum G, Palsson B, and Herrgard M. (2007). Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox. *Nature Protocols*. 2:727-738
- Buitenhuis, A.J., Sundekilde, U.K., Poulsen, N., Bertram, H.C., Larsen, L.B., and Sørensen, P. (2013). Estimation of Genetic Parameters and Detection of QTL for Metabolites in Danish Holstein Milk. *Journal of Dairy Science*. 14(79):1-10.
- Boudonck, K. J., Mitchell, M. W., Wulff, J. and Ryals, J. A. (2009). Characterization of the biochemical variability of bovine milk using metabolomics. *Metabolomics*. 5(4):375-386.
- Christopher, K., Tuggle, F.T., and Vasant G., H. (2011). Introduction to Systems Biology for Animal Scientists. John Wiley & Sons, Ltd, UK. Chapter, 1, pp:1-30
- Cline, MS., Smoot, M., Cerami, E., Kuchinsky, A., Landys, N. and Workman, C. (2007). Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nature Protocols*. 2:2366-2382.
- Chung, F., Lu, L. (2003). The average distances in random graphs with given expected degrees. *Internet Mathematics*. 1:91-114.

- ۱- Systems Biology
- ۲-High Throughput Data
- ۳- Omics
- ۴- Network Reconstruction
- ۵- Dynamic
- ۶-Graph Theory
- ۷- (<http://www.ebi.uniprot.org/index.shtml>)
- ۸- (<http://www.brenda-enzymes.org/>)

۹- یک ترتیب طبقه بندی و دسته بندی شده عددی برای یک آنزیم براساس واکنش‌های شیمیایی کاتالیز شده توسط آن آنزیم است.

- ۱۰- (<http://www.genome.jp/kegg/kegg1.html>)
- ۱۱- Currency Metabolites
- ۱۲- Scale-free
- ۱۳- Power-law
- ۱۴-Characteristic Length Path
- ۱۵- Network diameter
- ۱۶-Small World
- ۱۷- Clustering Coefficient
- ۱۸- Network centralization
- ۱۹-Hub

## منابع

- Albert, R., Barabasi, A.L. and Jeong, H. (2000a). Power-law distribution of the World Wide Web. *Science*. 287:2115.
- Albert, R., Jeong, H. and Barabasi, A.L. (2000b). Error and attack tolerance of complex networks. *Nature*. 406:378-382.
- Amit, I., Garber, M., Chevrièr, N., Leite, AP., Donner, Y., Eisenhaure, T. et al. (2009). Unbiased reconstruction of a mammalian transcriptional network mediating pathogen responses. *Science*. 326:257-263.

- Durot, M., Bourguignon, P.Y. and Schachter, V. (2009). Genome-scale models of bacterial metabolism: reconstruction and applications. *FEMS Microbiology Reviews*. 33: 164–190.
- Durek, P., Walther, D. (2008). The integrated analysis of metabolic and protein interaction networks reveals novel molecular organizing principles. *BMC Systems Biology*. 2:100.
- Edwards, J.S., Palsson, B.O. (1999). Systems properties of the *Haemophilus influenzae* Rd metabolic genotype. *Journal of Biological Chemistry*. 274:17410–17416.
- Edwards, J.S., Ibarra, R.U., and Palsson, B.O. (2001). In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nature Biotechnology*. 19(2):125-130.
- Erdos, P., Renyi, A. (1959). On the evolution of random graphs. *Publications Mathematiques*. 6:290–297.
- Feist, A.M., Herrgard, M.J., Thiele, I., Reed, J.L. and Palsson, B.O. (2009). Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*. 7: 129–143.
- Forster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B.O. and Nielsen, J. (2003). Genome scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Research*. 13:244–253.
- Hucka, M., Finney, A., Sauro, H.M., Bolouri, H., Doyle, J.C., Kitano, H., et al. (2003). The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. *Bioinformatics*. 19(4):524-531.
- Jing, Z., Hong, Y., Jianhua, L., Cao, z.w. and Xue, L.Y. (2006). Complex networks theory for analyzing metabolic networks. *Chinese Science Bulletin*. 51:1529-1537.
- Janga, S.C., Badu, M.M. (2008). Network-based approaches for linking metabolism with environment. *Genome Biology*. 9:239.
- Jeong, H., Tombor, B., Albert, R., Oltvai, Z.N. and Barabasi, A.L. (2000). The large-scale organization of metabolic networks. *Nature*. 407:651–654.
- Jenkins, T.C., McGuire, M.A. (2006). Major advances in nutrition: Impact on milk composition. *Journal of Dairy Science*. 89:1302–1310.
- Kanehisa, M., Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*. 28:27-30.
- Kuffner, R., Zimmer, R. and Lengauer, T. (2000). Pathway analysis in metabolic databases via differential metabolic display (DMD). *Bioinformatics*. 16:825–836.
- Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K.F., Itoh, M., Kawashima, S. et al. (2006). From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research*. 34:D354–D357.
- Kitano, H. (2000). Perspectives on systems biology. *New Generation Computing* 18:199–216.
- Koschutski, D., Junker, B.H., Schwender, J. and Schreiber, F. (2010). Structural analysis of metabolic networks based on flux centrality. *Journal of Theoretical Biology*. 265:261-269.
- Lin, C.Y., Chin, C.H., Wu, H.H., Chen, S.H., Ho, C.W. and Ko, M.T. (2008). Hubba: hub objects analyzer a framework of interactome hubs identification for network biology. *Nucleic Acids Research*. 36: W438-W443.
- Lemay, D.G., Lynn, D.J., Martin, W.F., Neville, M.C., Casey, T.M. and Rincon, G. (2009). The bovine lactation genome: insights into the evolution of mammalian milk. *Genome Biology*. 10:R43.
- Ma, H.W., Zeng, A.P. (2003). Reconstruction of metabolic networks from genome data and analysis of their global structure for various organisms. *Bioinformatics*. 19:270–277.

- Pfeiffer, T., Soyer, OS. and Bonhoeffer, S. (2005). The evolution of connectivity in metabolic networks. *PLoS Biology*. 3: 228.
- Smith, E., Morowitz, H.J. (2004). Universality in intermediary metabolism. *PNAS*. 101(36) 13168–13173.
- Sundekilde, U.K., Larsen, L.B., and Bertram, H.C. (2013). NMR-Based Milk Metabolomics. *Metabolites*. 3:204-222.
- Schellenberger, J., Que, R., Fleming, RM., Thiele, I., Orth, JD., Feist, A., et al. (2011). Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature Protocols*. 6: 1290-1307.
- Wagner, A., Fell, D.A. (2001). The small world inside large metabolic networks. *Proceeding of the Royal Society of London B Biological Science*. 268: 1803-1810.

■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■