13 (1) 47-52, Spring 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Identification of Single Nucleotide Polymorphism in Exon 3 of TLR4 Gene and its Association with Somatic Cell Count in Dairy Cattle

Davod Safari [1], Nemat Hedayat Evrigh*[1], Reza SeyedSharifi [1], Mir Darioush Shakouri [1], Vahid Vahedi [2], Reza Khalkhali Evrigh [1]

[1] *Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran*

[2] *Department of Animal Science, Moghan Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran*

Key Words

Holstein
TLR4 gene
Somatic cells
Mastitis

Abstract

Introduction: Mastitis is a prevalent inflammatory disease, which can impose extra costs on dairy industry worldwide. Genetic and some environmental factors, have fundamental impacts on this this disease and the resistance against that. TLR4 protein is an extracellular receptor that detects pathogens and stimulates the immune system to respond. This study aimed to identify the polymorphism in exon 3 of the TLR4 gene and investigation the association with the somatic cell count in the milk of Holstein cattle of Moghan agro-industry and livestock company.

Materials & Methods: In this study, 200 Holstein cows were used as two groups (number of each = 100) with low (50000 -150000 cell/ml) and high (> 200000 cell/ml) somatic cell count.

Result: The sequencing of exon 3 and mapping it to reference sequence led to the identification of one single nucleotide polymorphism (SNP), the substitution of C nucleotide (frequency equal to 0.145) with T nucleotide (frequency equal to 0.855), that replaced isoleucine with threonine. Statistical analysis revealed that milk of cows with CC genotype had significantly fewer somatic cells than the other two genotypes ($p< 0.05$).

Conclusion: Due to the significant association between identified SNP in exon 3 of the TLR4 gene and somatic cell count in milk, it appears that this gene could be a suitable candidate for breeding programs to increase resistance to mastitis.

* Corresponding Author's email: nhedayat@uma.ac.ir
Received: 2 March 2020; Reviewed: 5 June 2020; Revised: 27 June 2020; Accepted: 8 July 2020
(DOI): 10.22034/aej.2021.132721

مقاله پژوهشی

شناسایی چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی در اگزون ۳ ژن TLR4 و ارتباط آن با تعداد سلول‌های سوماتیک شیر در گاوهای هلشتاین

داود صفری[۱]، نعمت هدایت‌ایوریق[۱]، رضا سیدشریفی[۱]، میرداریوش شکوری[۱]، وحید واحدی[۲]، رضا خلخالی ایوریق[۱]*

[۱] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[۲] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

کلمات کلیدی

هلشتاین
ژن TLR4
سلول‌های سوماتیک
ورم پستان

چکیده

مقدمه: ورم پستان یک بیماری التهابی شایع در صنعت گاو شیری جهان به‌شمار می‌رود که می‌تواند هزینه‌های زیادی را به این صنعت تحمیل کند. عوامل محیطی متعددی به همراه عامل ژنتیک در روند این بیماری و مقاومت در برابر آن نقش کلیدی ایفا می‌کنند. پروتئین TLR4 یک گیرنده خارج سلولی است که باعث شناسایی عوامل بیماری‌زا شده و سیستم ایمنی را تحریک به پاسخ می‌کند. هدف این مطالعه شناسایی چندشکلی موجود در اگزون ۳ ژن TLR4 و بررسی همبستگی آن با تعداد سلول‌های سوماتیک موجود در شیر گاوهای هلشتاین شرکت کشت و صنعت و دامپروری مغان بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۲۰۰ راس گاو در دو گروه ۱۰۰ راسی با تعداد سلول‌های سوماتیک پایین (۵۰۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰۰) و بالا (بیش‌تر از ۲۰۰۰۰۰) استفاده شد.

نتایج: توالی‌یابی اگزون ۳ ژن مذکور و هم‌ترازی آن با توالی مرجع منجر به شناسایی یک چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی از نوع جایگزینی نوکلئوتید C (با فراوانی ۰/۱۴۵) به جای T (با فراوانی ۰/۸۵۵) شد که باعث تغییر اسیدآمینه ایزولوسین به ترئونین می‌شود. آنالیز آماری نشان داد که شیر تولیدی گاوهای با ژنوتیپ CC به‌طور معنی‌داری تعداد سلول‌های سوماتیک کم‌تری نسبت به دو ژنوتیپ دیگر دارد ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری و بحث: با توجه به همبستگی معنی‌دار چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی موجود در اگزون ۳ ژن TLR4 و تعداد سلول‌های سوماتیک در شیر، به‌نظر می‌رسد این ژن یک کاندیدا مناسب برای برنامه‌های اصلاحی در جهت ایجاد مقاومت در برابر ورم پستان باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: nhedayat@uma.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۲ اسفند ۱۳۹۸؛ تاریخ داوری: ۱۶ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۷ تیر ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۸ تیر ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.132721

مقدمه

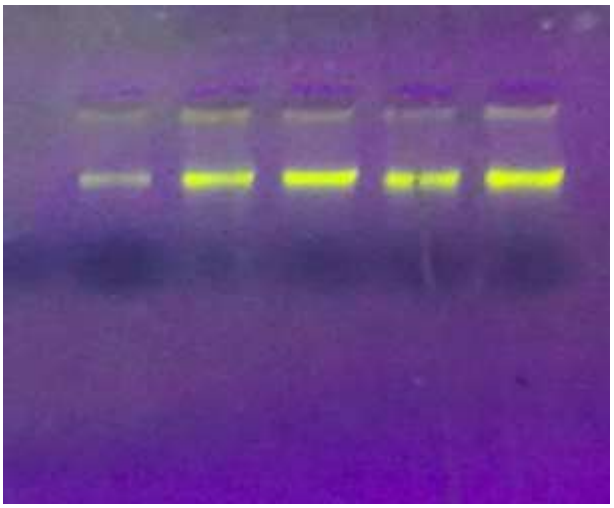
ورم‌پستان یکی از شایع‌ترین و پرهزینه‌ترین بیماری‌ها در صنعت گاوشیری جهان است که به‌عنوان یک عفونت و التهاب در بافت پستان شناخته می‌شود. این بیماری با توجه به عامل ایجادکننده آن، می‌تواند شدت و تاثیرات متفاوتی داشته باشد(DeVliegher و همکاران، ۲۰۱۲). این بیماری سالانه هزینه‌های هنگفتی را بر دامداران و صنعت گاوشیری جهان تحمیل می‌کند. آسیب‌های اقتصادی این بیماری بیش‌تر به‌دلیل کاهش تولید شیر، ایجاد وقفه در تولیدمثل، تحمیل هزینه‌های درمانی، حذف گاوهای باعفونت مزمن، مرگ احتمالی گاوها(Seegers و همکاران، ۲۰۰۳) و یا کاهش میزان ماندگاری گاوها در گله می‌باشد (سیدشریفی و همکاران، ۱۳۹۶). طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا در ایجاد ورم پستان دخیل هستند که این عوامل را می‌توان به‌طورکلی در دو گروه عوامل بیماری‌زای مسری (ازجمله استافیلوکوکوس آرئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه و کورینه باکتریوم بوایس) (Radostits و همکاران، ۲۰۰۷) و محیطی (ازجمله اشیرشیای کلای (*Escherichia coli*)، استرپتوکوک دیسگالاکتیه (*Streptococcus dysgalactiae*) و استرپتوکوک اوبریس (*Streptococcus uberis*)) تقسیم‌بندی کرد (Abebe و همکاران، ۲۰۱۶). هم‌چنین عواملی مانند نمره وضعیت بدنی پایین و افزایش تعداد شیرواری در طول عمر اقتصادی گاوها ازجمله عوامل بالا برنده خطر ابتلا به ورم پستان می‌باشد (کمالی و همکاران، ۱۳۹۹). سلول‌های اپیتلیال پستان، اولین سد دفاعی در برابر تهاجم عوامل بیماری‌زا می‌باشند. این سلول‌ها نقش مهمی در تشخیص عوامل بیگانه ایفا کرده و موجب برانگیختن پاسخ ایمنی ذاتی در زمان ایجاد عفونت‌های داخل پستانی می‌شوند (Swanson و همکاران، ۲۰۰۹). تشخیص عوامل بیماری‌زا، به‌وسیله سیستم ایمنی ذاتی، به‌وسیله گیرنده‌های تشخیص پاتوژنی (PRPs= Pathogen recognition receptor) صورت می‌پذیرد. گیرنده‌های شبه تول (TLR= Toll-like receptors) اولین و شناخته شده‌ترین گیرنده‌های تشخیص پاتوژنی هستند که در غشاهای پلاسمایی سلول‌های اپیتلیال پستان بیان شده در آغاز واکنش ایمنی بدن به عوامل خارجی یا میکروبی نقش محوری ایفا می‌کنند (Sabroe و همکاران، ۲۰۰۳). تعداد سلول‌های سوماتیک موجود در شیر به‌عنوان یک شناسه برای بیماری ورم پستان به‌شمار می‌رود و تحت تاثیر عواملی مانند سن گاو، مرحله شیردوشی، فصل، استرس، مدیریت (Riekerink و همکاران، ۲۰۰۷) و ژنتیک حیوان (Tiezzi و همکاران، ۲۰۱۵) قرار دارد. پروتئین تولید شده توسط ژن TLR4 به‌عنوان عضوی از خانواده TLR در سطح سلول‌ها قرار داشته و باعث تشخیص لیپوپلی ساکاریدهای باکتری‌های گرم منفی به‌عنوان گروهی از عوامل ایجاد کننده ورم پستان شده و بنابراین در افزایش ایمنی غدد پستانی در برابر عفونت‌های داخلی موثر می‌باشد (Akira، ۲۰۰۴؛ Mishra و همکاران، ۲۰۱۸). ژن TLR4 به‌عنوان یک ژن کاندیدای مهم در بهبود واکنش ایمنی بدن جهت انتخاب برای مقاومت در برابر ورم‌پستان در جمعیت گاوهای شیری گزارش شده است (Ogorevc و همکاران، ۲۰۰۸)، هر چند ارتباط چندشکلی‌های موجود در این ژن با بیماری‌هایی مانند یون (Johne's disease) نیز مورد بررسی قرار گرفته و به اثبات رسیده است(Gobi و همکاران، ۲۰۲۰). چندشکلی‌های مختلفی از ژن TLR4 درصنعت گاو شیری گزارش شده است و بیان آن در برخی نژادها در ارتباط با ارزش ارثی، تداوم شیردهی و تعداد سلول‌های بدنی (Sharma و همکاران، ۲۰۰۶) و هم‌چنین عملکرد تولیدمثلی ازجمله فاصله گوساله‌زایی، تعداد تلقیح به‌ازای هر آبستنی و تعداد روزهای باز (El-Domany و همکاران، ۲۰۱۹) موردبررسی قرار گرفته است. برای مثال، در بررسی‌های انجام شده در گاوهای سان‌هی (Sanhe) و سیمنتال و هلشتاین مشخص شده است که چند شکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) موجود در اگزون 3 ژن TLR4 با تعداد سلول‌های سوماتیکی شیر در ارتباط است (Wang و همکاران، ۲۰۰۷). هم‌چنین ارتباط تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی شناسایی شده در اگزون 3 و ناحیه 5'UTR این ژن با تعداد سلول‌های سوماتیکی شیر در گاوهای هلشتاین برزیلی نیز گزارش شده‌است(Mesquita و همکاران، ۲۰۱۲). علی‌رغم مطالعات همبستگی بین تنوع‌های ژنتیکی و عفونت پستانی، مطالعات صورت گرفته روی تغییر الگوی بیانی ژن‌ها در بیماری ورم پستان شاهدی بر تاثیر ژن مذکور در روند کنترل بیماری می‌باشد(Goldammer و همکاران، ۲۰۰۴؛ Zheng و همکاران، ۲۰۰۶). لذا این مطالعه با هدف شناسایی چندشکلی‌های DNA محتمل در اگزون شماره ۳ ژن TLR4 در گاوهای هلشتاین کشت و صنعت مغان و هم‌چنین بررسی ارتباط چندشکلی‌های شناسایی شده با صفت تعداد سلول‌های سوماتیک انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد آزمایشی: این مطالعه با استفاده از ۲۰۰ راس گاو شیری مربوط به گله گاوهای شیری مجتمع کشت و صنعت مغان واقع در شهرستان پارس آباد استان اردبیل اجرا شد. به‌منظور کنترل ورم پستان در این گله، گاوهای شیرده، دو بار در روز دوشیده شده و به‌صورت دوره‌ای آزمایش‌هایی مربوط به اجزای شیر از قبیل تعداد سلول‌های سوماتیک انجام می‌شود. جهت نمونه‌برداری، ابتدا داده‌های مربوطه‌از گاوداری، دریافت شده سپس دامها براساس تعداد سلول‌های سوماتیک به دو دسته طبیعی (تعداد سلول‌های سوماتیک در دامنه ۵۰ هزار تا کم‌تر از ۱۵۰ هزار در هر میلی‌لیتر شیر) و گاوهای حساس وبا احتمال آلودگی باکتریایی (بیش‌تر از ۲۰۰ هزار سلول‌های سوماتیک در هر میلی‌لیتر شیر) دسته‌بندی شدند (Bradley و Green، ۲۰۰۵). سپس از هر دسته به‌صورت تصادفی ۱۰۰ راس گاو انتخاب شده و از

سیاهرگ گردنی هر گاو، ۵ میلی‌لیتر خون در لوله‌های ونوجکت حاوی EDTA اخذ گردید. نمونه‌های خونی، تا زمان استخراج DNA، در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

استخراج DNA، تکثیر و تعیین ژنوتیپ ژن TLR4: استخراج DNA از نمونه‌های خون با استفاده از کیت استخراج DNA خون پستانداران، شرکت Exgene و بر اساس پروتکل ارائه شده انجام گرفت. شکل ۱، کیفیت خوب DNA استخراج شده را نشان می‌دهد که بدون هیچ‌گونه آلودگی در آن مشاهده نمی‌شود. به‌منظور تکثیر قطعه ۴۹۹ جفت بازی اگزون ۳ ژن TLR4 از یک توالی آغازگر اختصاصی ارائه شده در مقاله Zhou و همکاران (۲۰۱۷) شامل پرایمر رفت ′5 -TCAGGTGCTGAATATGAGTCA-′3 و پرایمر برگشت ′5 -CCAGTCTTCATCCTGGCTC-′3 استفاده شد.



شکل ۱: کیفیت DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد

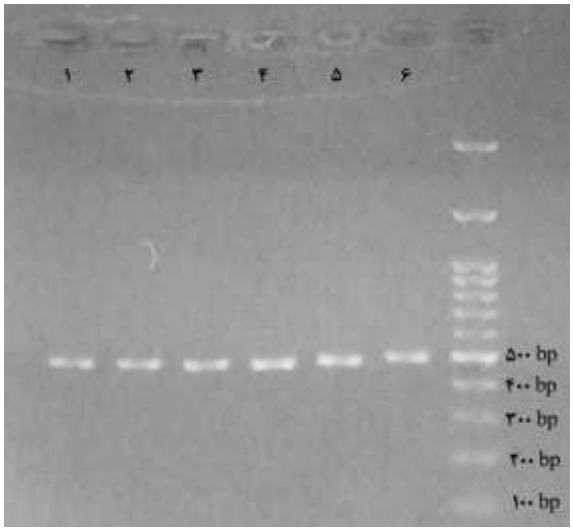
غلظت‌های مورد استفاده از مواد بعد از بهینه سازی برای انجام PCR به‌ترتیب ۲/۵ میکرولیتر DNA ژنومی، ۳ میکرولتر از پرایمر، ۱۲/۵ میکرولیتر از MIX MASTER شرکت سیناکلون، مابقی را تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر از آب مقطر استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از برنامه استاندارد شامل ۱۰ دقیقه واسرشت‌سازی آغازین در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه دمای اتصال در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه بسط اولیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت و در نهایت تکثیر نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. سپس کیفیت محصولات PCR به‌دست آمده با استفاده از ژل آگارز ۱/۵درصد ارزیابی شد و با توجه به کیفیت مناسب، جهت انجام آنالیزهای بعدی از طریق شرکت سیناکلون و به‌روش سنگر توالی‌یابی شدند.

کیفیت‌سنجی و آنالیز توالی‌های استخراجی: کیفیت توالی‌ها با استفاده از نسخه ۲,۳۳ نرم افزار Chromas مورد بررسی قرار گرفت و نواحی دارای کیفیت پایین ویرایش گردید. پس از توالی‌یابی و آماده سازی داده‌ها، هم‌تراز کردن قطعات توالی‌یابی شده با روش پارامتری Clustalw با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 (Tamura و همکاران، ۲۰۱۱) انجام گرفت. براساس هم‌ترازی انجام گرفته، جایگاه چندشکلی شناسایی شد و جایگاه مورد نظر از طریق تصویر کروماتوگرام ارائه شده از توالی‌ها برای هر نمونه تعیین ژنوتیپ شد. اثر SNPهای شناسایی شده بر روی سلول‌های سوماتیک شیر با استفاده از مدل ثابت شامل اثر ثابت دوره زایش (دوره‌های ۲ تا ۷)، زمان رکوردگیری شیر (فصل‌های ۱ تا ۴)، و ژنوتیپ‌های شناسایی شده (CC, TC, TT) از طریق رویه GLM نرم افزار SAS 9.2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت تعیین وضعیت تعادل هاردی واینبرگ نیز از آزمون کای اسکوئر استفاده شد.

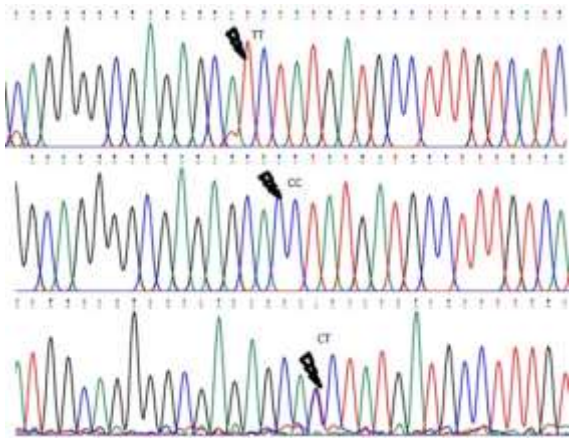
نتایج

نتایج به‌دست آمده نشان دادند که قطعه ۴۹۹ جفت‌بازی ناحیه اگزون ۳ ژن TLR4 به‌خوبی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر و با کیفیت عالی توالی‌یابی گردید (شکل ۲). نتایج مربوط به هم‌ترازی منجر به شناسایی یک نوع جهش از نوع جایگزینی تک‌نوکلئوتیدی در اگزون ۳ ژن TLR4 شد. این جهش منجر به جایگزینی نوکلئوتید T (با فراوانی آللی ۰/۸۵۵) با نوکلئوتید C (با فراوانی آللی ۰/۱۴۵) شد. این نوع جایگزینی از نوع جایگزینی باز دوم در کدون است که منجر به تغییر اسیدآمینه ایزولوسین (ATC) به ترئونین (ACC) می‌شود. فراوانی ژنوتیپ‌های TT، TC، CC (شکل ۳) به‌ترتیب برابر با ۰/۷۸، ۰/۱۵ و ۰/۰۷ بود. انجام آزمون کای اسکوئر نشان داد که جمعیت در تعادل هاردی‌واینبرگ قرار ندارد ($p<0/05$). با توجه به مدیریت گله در انتخاب دام‌های برتر و استفاده گسترده از تلقیح مصنوعی در گله و هم‌چنین نمونه‌گیری غیرتصادفی برای انجام مطالعه حاضر، عدم تعادل هاردی واینبرگ کاملا مورد انتظار و منطقی بود.

نتایج به‌دست آمده از آنالیز ارتباط بین SNP شناسایی شده در اگزون ۳ ژن TLR4 و تعداد سلول‌های سوماتیک شیر در گاوهای مورد مطالعه نشان داد که ژنوتیپ CC با تعداد ۱۳۳۹۰۰ سلول سوماتیک در هر میلی‌لیتر شیر، کم‌ترین میزان سلول‌های سوماتیک را دارا می‌باشد (جدول ۱). این مقدار در مقایسه با ژنوتیپ‌های TT (۵۸۸۸۰۰ سلول سوماتیک در هر میلی‌لیتر شیر) و CT (۵۰۹۷۰۰ سلول سوماتیک در هر میلی‌لیتر شیر) به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود ($p<0/05$).



شکل ۲: محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن TLR4 روی ژل آگارز ۱/۵ درصد



شکل ۳: ژنوتیپ‌های مختلف شناسایی شده به‌دلیل جایگزنی T به C در ژن TLR4 گاوهای هلشتاین

جدول ۱: ارتباط بین ژنوتیپ‌های شناسایی شده و تعداد سلول‌های سوماتیک در گاوهای هلشتاین

ژنوتیپ	تعداد گاو (راس)	فراوانی ژنوتیپی	میانگین سلول‌های سوماتیک (x1000)	ارزش p
TT	۱۵۶	۰/۷۸	۵۸۸/۸a	
TC	۳۰	۰/۱۵	۵۰۹/۷a	۰/۰۲۳
CC	۱۴	۰/۰۷	۱۳۳/۹b	

بحث

طبق دسته‌بندی Usman و همکاران (۲۰۱۷)، گاوهای مورد مطالعه با سه ژنوتیپ مختلف، در دو گروه مجزا قرار گرفتند. به‌طوری که گاوهای با ژنوتیپ CC در دسته گاوهای سالم (تعداد سلول‌های سوماتیک کم‌تر از ۲۰۰۰۰۰ در هر میلی‌لیتر) و گاوهای با ژنوتیپ‌های TT و TC در دسته گاوهای بسیار حساس به عفونت پستانی (تعداد سلول‌های سوماتیک کم‌تر از ۵۰۰۰۰۰ در هر میلی‌لیتر) جای گرفتند. انتخاب آستانه ۲۰۰۰۰۰ سلول سوماتیک در هر میلی‌لیتر شیر، به‌دلیل حساسیت بالای آن در شناسایی گاوهای با عفونت داخل پستانی می‌باشد. حساسیت این عدد برای شناسایی گاوهای آلوده، ۷۳ و اختصاصیت آن ۸۶ درصد می‌باشد (Dohoo و Leslie، ۱۹۹۱؛ Bradley و Green، ۲۰۰۵)، بدین معنی که ۷۳ درصد گاوهای با سلول‌های سوماتیک بالای ۲۰۰۰۰۰، آلوده به عفونت ورم پستان هستند. ایزولوسین اسید آمینه‌ای است که به‌دلیل نداشتن گروه‌های قطبی و باردار، به‌عنوان یک اسیدآمینه آب‌گریز محسوب می‌شود. از طرفی دیگر، ترئونین یک اسید آمینه قطبی و بدون‌بار بوده و به‌دلیل داشتن گروه الکلی، برخلاف ایزولوسین، میل به واکنش هیدروژنی با مولکول‌های آب را دارا می‌باشد. تبدیل اسید آمینه ایزولوسین به ترئونین که در اثر جهش شناسایی شده در ژن TLR4 بروز می‌کند، به‌دلیل تفاوت‌های فیزیکوشیمیایی اسیدآمینه‌های مذکور، احتمالاً باعث تغییر در ساختمان و عملکرد پروتئین نهایی شده و باعث بروز صفات متفاوت در گاوهای تحت مطالعه می‌شود. تعداد سلول‌های سوماتیک در گاوهای با ژنوتیپ TT و CT تفاوت معنی‌داری ندارد درحالی‌که هر دو ژنوتیپ تفاوت معنی‌داری را با ژنوتیپ CC نشان می‌دهند. این تفاوت می‌تواند به‌دلیل غالب بودن آلل T نسبت به آلل C باشد.

شواهد نشان می‌دهد که بخش کدکننده ژن TLR4 دارای SNPهای متعددی می‌باشد و به‌طور متوسط به‌ازای هر ۹۰ جفت‌باز در ناحیه کدکننده ژن، یک SNP وجود دارد (White و همکاران، ۲۰۰۳). نتایج به‌دست آمده در مطالعه کنونی، با نتایج مربوط به چندین مطالعه روی SNP شناسایی شده در اگزون ۳ ژن TLR4 که منجر به تغییر ایزولوسین به ترئونین شده بود، مطابقت داشت. نتایج به‌دست آمده در مطالعه Sharma و همکاران (۲۰۰۶) روی گاوهای نژاد هلشتاین ثابت کرد که گاوهای با ژنوتیپ CC در مقایسه با ژنوتیپ‌هایی TT و CT به‌طور معنی‌داری دارای سلول‌های سوماتیک کم‌تر و تداوم شیردهی بیش‌تر هستند. در مطالعه Beecher و همکاران (۲۰۱۰) نیز شواهد به‌دست آمده نشان داد که گاوهای با ژنوتیپ CC در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر تعداد سلول‌های سوماتیک، درصد پروتئین، درصد چربی و تولید شیر کم‌تری را دارا می‌باشند. در مطالعه‌ای روی گاوهای هلشتاین لیتوانیایی تعداد سه SNP در ژن TLR4 شناسایی شد که فقط یکی از آن‌ها (c.9421 C>T)، ارتباط معنی‌داری را با تعداد سلول‌های سوماتیک و مقدار لاکتوز شیر نشان دادند (Miseikiene و همکاران، ۲۰۲۰). هم‌چنین مطالعه‌ای روی چندین گله از گاوهای هلشتاین استان اصفهان حاکی از همبستگی بین SNP شناسایی شده در اگزون ۳ ژن TLR4

با سلول‌های سوماتیک و صفات مرتبط با شیر بود، به‌طوری‌که گاوهای حامل آلل B تعداد سلول‌های سوماتیک کم‌تری را نشان دادند (Noori و همکاران، ۲۰۱۳). البته برخی از SNPهای شناسایی شده در ژن TLR4 گاوهای هلشتاین نیز هیچ‌گونه همبستگی معنی‌داری با تعداد سلول‌های سوماتیک نشان نمی‌دهند (Wang و همکاران، ۲۰۱۸). در کل، علاوه بر مطالعات انجام گرفته روی گاوها، پستاندارن دیگر مانند گوسفندو بز نیز از نظر ارتباط بین ژن‌های خانواده TLR و بیماری‌های مربوط به پستان‌مورد بررسی قرار گرفته‌و همبستگی‌های در این زمینه گزارش‌شده‌است(Swiderek و همکاران، ۲۰۰۶؛Ogorevc و همکاران، ۲۰۱۹) که از اهمیت این خانواده ژنی در دام‌های اهلی تولید کننده شیر است.

شواهد به‌دست آمده از مطالعه کنونی به‌همراه مطالعات دیگر که پیش‌تر ذکر شد، نشان می‌دهد که تنوعات ژنتیکی موجود در ژن TLR4 نقش مهمی را در ارتباط با پاسخ‌های متفاوت گاوها در مقابل بیماری ورم پستان ایفا می‌کنند. آلل‌های خاصی از این ژن ازجمله آلل شناسایی شده (C) در مطالعه حاضر که به‌طور معنی‌داری باعث کاهش سلول‌های سوماتیک در شیر گاوهای با ژنوتیپ CC می‌شود را می‌توان به‌عنوان کاندیدا مناسبی برای انتخاب بر علیه ورم پستان در صنعت گاو شیری کشور معرفی کرد.

منابع

۱. **سیدشریفی، ر.؛ کراری‌نیری، ک.؛ هدایت‌ایوریق، ن.؛ سیف دواتی، ج. و بهلولی، م.، ۱۳۹۶.** بررسی برخی صفات تیپ، تولید، تولیدمثل و ماندگاری در گاوهای هلشتاین استان اصفهان. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۹، شماره ۳، صفحات ۱۷ تا ۲۶.

۲. **کمالی، س.؛ مکی، م.؛ احمدی، ر. و پورمهدی‌بروجنی، م.، ۱۳۹۹.** بررسی ارتباط میزان کاهش نمره بدنی پس از زایمان، فصل و تعداد شیرواری بر بروز ورم پستان بالینی در گاو شیری. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۱۲، شماره ۲، صفحات ۳۱ تا ۳۶.

3. **Abebe, R.; Hatiya, H.; Abera, M.; Megersa, B. and Asmare, K., 2016.** Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of Staphylococcus aureus in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. BMC Veterinary Research. Vol. 12, pp: 270.

4. **Akira, S. and Takeda, K., 2004.** Toll-like receptor signalling. Nature Reviews Immunology. Vol. 4, pp: 499-511.

5. **Bradley, A. and Green, M., 2005.** Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. In Practice. Vol. 27, pp: 310-315.

6. **De Vliegher, S.; Fox, L.K.; Piepers, S.; McDougall, S. and Barkema, H.W., 2012.** Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. Journal of Dairy Science. Vol. 95, pp: 1025-1040.

7. **Dohoo, I.R. and Leslie, K.E., 1991.** Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. Preventive Veterinary Medicine. Vol. 10, pp: 225-237.

8. **El-Domany, W.B.; Radwan, H.A.; Ateya, A.I.; Ramadan, H.H.; Marghani, B.H. and Nasr, S.M., 2019.** Genetic Polymorphisms in LTF/EcoRI and TLR4/AluI loci as candidates for milk and reproductive performance assessment in Holstein cattle. Reproduction in Domestic Animals. Vol. 54, pp: 678-686.

9. **Gopi, B.; Singh, R.V.; Kumar, S.; Kumar, S.; Chauhan, A.; Kumar, A. and Singh, S.V., 2020.** Single-nucleotide polymorphisms in CLEC7A, CD209 and TLR4 gene and their association with susceptibility to paratuberculosis in Indian cattle. Journal of Genetics. Vol. 99, pp: 14.

10. **Goldammer, T.; Zerbe, H.; Molenaar, A.; Schuberth, H.J.; Brunner, R.M.; Kata, S.R. and Seyfert, H.M., 2004.** Mastitis increases mammary mRNA abundance of β-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Vol. 11, pp: 174-185.

11. **Mesquita, A.Q.D.; Mesquita, A.J.D.; Jardim, E.A.G.D.V. and Kipnis, A.P.J., 2012.** Association of TLR4 polymorphisms with subclinical mastitis in Brazilian holsteins. Brazilian Journal of Microbiology. Vol. 43, pp: 692-697.

12. **Mišeikienė, R.; Švedaitė, A.; Bižienė, R.; Pečiulaitienė, N. and Ugenskienė, R., 2020.** The influence of TLR4 gene polymorphisms on milk quality and composition of Lithuanian Holstein cows. Mljekarstvo. Vol. 70, pp: 112-119.

13. **Mishra, C.; Kumar, S.; Panigrahi, M.; Yathish, H.M.; Chaudhary, R.; Chauhan, A.; Kumar, A. and Sonawane, A.A., 2018.** Single Nucleotide Polymorphisms in 5'Upstream Region of Bovine TLR4 Gene Affecting Expression Profile and Transcription Factor Binding Sites. Animal Biotechnology. Vol. 29, pp: 119-128.

14. **Noori, R.; Mahdavi, A.H.; Edriss, M.A.; Rahmani, H.R.; Talebi, M. and Soltani-Ghombavani, M., 2013.** Association of polymorphism in Exon 3 of toll-like receptor 4 gene with somatic cell score and milk production traits in Holstein dairy cows of Iran. South African Journal of Animal Science. Vol. 43, pp: 493-498.

15. **Ogorevc, J.; Kunej, T. and Dovč, P., 2008.** An integrated map of cattle candidat-e genes for mastitis: a step forward to new genetic markers. Acta Agricultural Slovenica. pp: 85-91.

16. **Ogorevc, J.; Simčič, M.; Zorc, M.; Škrjanc, M. and Dovč, P., 2019.** TLR2 polymorphism (rs650082970) is associated with somatic cell count in goat milk. PeerJ, Vol. 7, pp: e7340.

17. **Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Hinchcliff, K.W. and Constable, P.D., 2007.** A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Veterinary Medicine. Vol. 10, pp: 2045-2050.

18. **Riekerink, R.O.; Barkema, H.W.; Veenstra, W.; Berg, F.E.; Stryhn, H. and Zadoks, R.N., 2007.** Somatic cell count during and between milkings. Journal of Dairy Science. Vol. 90, pp: 3733-3741.

19. **Sabroe, I.; Read, R.C.; Whyte, M.K.; Dockrell, D.H.; Vogel, S.N. and Dower, S.K., 2003.** Toll-like receptors in health and disease: complex questions remain. The Journal of Immunology. Vol. 171, pp: 1630-1635.

20. **Seegers, H.; Fourichon, C. and Beaudeau, F., 2003.** Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Veterinary Research. Vol. 34, pp: 475-491.

21. **Sharma, B.S.; Leyva, I.; Schenkel, F. and Karrow, N.A., 2006.** Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with

somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. Journal of Dairy Science. Vol. 89, pp: 3626-3635.

22. **Swanson, K.M.; Stelwagen, K.; Dobson, J.; Henderson, H.V.; Davis, S.R.; Farr, V.C. and Singh, K., 2009.** Transcriptome profiling of Streptococcus uberis-induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model. Journal of Dairy Science. Vol. 92, pp: 117-129.

23. **Świderek, W.P.; Bhide, M.R.; Gruszczyńska, J.; Soltis, K.; Witkowska, D. and Mikula, I., 2006.** Toll-like receptor gene polymorphism and its relationship with somatic cell concentration and natural bacterial infections of the mammary gland in sheep. Folia Microbiologica. Vol. 51, pp: 647-652.

24. **Tiezzi, F.; Parker-Gaddis, K.L.; Cole, J.B.; Clay, J.S. and Maltecca, C., 2015.** A genome-wide association study for clinical mastitis in first parity US Holstein cows using single step approach and genomic matrix re-weighting procedure. PLoS One. Vol. 10.

25. **Usman, T.; Wang, Y.; Liu, C.; He, Y.; Wang, X.; Dong, Y.; Wu, H.; Liu, A. and Yu, Y., 2017.** Novel SNPs in IL-17F and IL-17A genes associated with somatic cell count in Chinese Holstein and Inner-Mongolia Sanhe cattle. Journal of Animal Science and Biotechnology. Vol. 8, pp: 5.

26. **Wang, X.; Xu, S.; Gao, X.; Ren, H. and Chen, J., 2007.** Genetic polymorphism of TLR4 gene and correlation with mastitis in cattle. Journal of Genetics and Genomics. Vol. 34, pp: 406-412.

27. **Wang, M.; Song, H.; Zhu, X.; Xing, S.; Zhang, M.; Zhang, H.; Wang, X.; Yang, Z.; Ding, X.; Karrow, N.A. and König, S., 2018.** Toll-like receptor 4 gene polymorphisms influence milk production traits in Chinese Holstein cows. Journal of Dairy Research. Vol. 85, pp: 407-411.

28. **White, S.N.; Taylor, K.H.; Abbey, C.A.; Gill, C.A. and Womack, J.E., 2003.** Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 100, pp: 10364-10369.

29. **Zheng, J.; Watson, A.D. and Kerr, D.E., 2006.** Genome wide expression analysis of lipopolysaccharide-induced mastitis in a mouse model. Infection and Immunity. Vol. 74, pp: 1907-1915.

30. **Zhou, H.; Cheng, L.; Gong, H.; Byun, S.O.; Edwards, G.R. and Hickford, J.G., 2017.** Variation in the Toll-like Receptor 4 (TLR4) gene affects milk traits in dairy cows. Journal of Dairy Research. Vol. 84, pp: 426-429.