



بررسی ارتباط چندشکلی ژن عامل نکروزکننده بافتی با نمره سلول‌های بدنی شیر در گاوهای شیری

وحید همتی دوست^۱، قدرت رحیمی میانجی^۲ و ایوب فرهادی^۳

۱ و ۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (نویسنده مسوول: ayoub_farhadi@ymail.com)
تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۶

چکیده

ورم پستان یکی از شایع‌ترین و پرهزینه‌ترین بیماری‌های مؤثر بر تولید گاوهای شیری است. در پژوهش حاضر، اثرات چند شکلی ژن عامل نکروزکننده بافتی (ایزومر آلفا) ($TNF-\alpha$) بر نمره سلول‌های بدنی شیر (SCS) و ورم پستان تحت بالینی در ۱۲۱ رأس گاو شیری هلشتاین مورد بررسی قرار گرفت. چندشکلی‌های موجود در یک قطعه ۳۰۳ جفت بازی برای ژن $TNF-\alpha$ با تکنیک‌های PBR و PCR-SSCP مورد بررسی قرار گرفتند. آنزیم EcoRI قطعه تکثیر یافته را هضم نکرده و تمامی نمونه‌های حاصل از هضم آنزیمی یک شکل بودند. بنابراین محصولات تکثیر شده مورد آزمون SSCP قرار گرفته و سه الگوی باندی (۱، ۲ و ۳) به ترتیب با فراوانی‌های ۳/۳، ۲۷/۱ و ۶۹/۵ درصد مشاهده شدند. تجزیه و تحلیل نشانگر- صفت نشان داد که در ۷۰ روز ابتدایی دوره شیردهی، اثر ژنوتیپ‌های مختلف ژن $TNF-\alpha$ بر SCS معنی‌دار بوده و گاوهای دارای الگوهای باندی ۲ کمترین حساسیت را نسبت به افزایش SCS داشته‌اند. هم‌چنین در انتهای دوره شیردهی (از ۲۱۰ تا ۴۲۰ روزگی) ژنوتیپ‌های ژن $TNF-\alpha$ به طور معنی‌داری با SSC در ارتباط بودند و الگوی باندی یک کمترین حساسیت را به SCS نشان داد. در دوره میانی شیردهی (از ۷۰ تا ۲۱۰ روزگی) اثر ژنوتیپ‌های مختلف ژن $TNF-\alpha$ بر SCS معنی‌دار نبود. در پژوهش حاضر هم‌چنین شکم زایش، ماه شیردهی و کنش متقابل بین آن‌ها با نمره سلول‌های بدنی شیر ارتباط معنی‌داری داشت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که انتخاب به نفع الگوهای باندی دو و یک ممکن است باعث کاهش SCS در گله گاوهای هلشتاین شود.

واژه‌های کلیدی: $TNF-\alpha$ ، نمره سلول‌های بدنی شیر، چندشکلی

مقدمه

در بین بیماری‌هایی که نشخوارکنندگان را تهدید می‌کند، ورم پستان نقش مهمی را به خود اختصاص می‌دهد. اگر چه ممکن است تعداد موارد ابتلا به ورم پستان در بین حیوانات کم باشد ولی این بیماری می‌تواند برای حیوانات مبتلا شده کشنده و سبب زیان اقتصادی شدیدی از لحاظ کاهش تولید شیر، کاهش کیفیت شیر و لزوم مصرف آنتی‌بیوتیک شود. از طرف دیگر با وجود پژوهش‌های بسیار هنوز هیچ واکنش مؤثری علیه ورم پستان وجود ندارد. بنابراین یکی از راه‌های مقرون به صرفه برای کنترل ورم پستان انتخاب حیوانات مقاوم به این بیماری است. این در حالی است که انتخاب ژنتیکی به منظور تولید شیر بیشتر به افزایش حساسیت به ورم پستان منجر می‌شود (۶،۴).

روش بهبود ژنتیکی از طریق انتخاب برای ورم پستان، در ابتدا برای گاو شیری، سپس برای گوسفند و بز شیری اجرا شده است (۱۰). هدف انتخاب علیه بیماری‌های عفونی تقویت ایمنی مادرزادی است. تنوع فراوان موجود در ساز و کار ایمنی، ظرفیت‌های زیادی را برای انتخاب فراهم می‌آورد. به منظور تحت کنترل درآوردن سامانه ایمنی، باید پیچیدگی‌ها و مسیرهای متنوع این سامانه را شناخته و دانش خود را در این

رابطه افزایش دهیم. سامانه ایمنی مادرزادی شامل ساز و کارهای دفاعی است که منحصرأ آنتی ژنی نیستند. با وجود این سامانه ایمنی طبیعی نباید با سامانه ایمنی غیراختصاصی تنظیم شود زیرا سامانه ایمنی مادرزادی اختصاصاً مولکولی است (۱۴). یکی از اجزای مهم دفاع میزبان در مقابل آلودگی‌های باکتریایی، نوتروفیل‌ها هستند. این سلول‌ها توانایی حذف باکتری‌ها را به کمک فاگوسیتوز، محتویات گرانول‌های باکتریایی، تولید اکسیژن‌های واکنش‌پذیر و فعال‌سازی ثانویه پروتئازها دارند (۷).

فاکتور نکروزکننده بافتی که نکروزین نیز نامیده می‌شود، یک پاراکراین قوی و واسطه اندوکراین در عملکرد ایمنی التهابی شناخته شده است. این سایتوکین از طریق ماکروفاژ و سلول‌های T تولید می‌شود و در پاسخ ایمنی چندین عملکرد مختلف دارد. سایتوکین-های پیش التهابی مانند فاکتور نکروزکننده بافتی آلفا برای آغاز پاسخ التهابی ضروری هستند. در مکان التهاب، این سایتوکین می‌تواند سلول‌های بافتی از قبیل فیبروبلاست‌ها و اندوتلیال‌ها را به منظور آغاز ترشح سایتوکین‌های ثانویه التهابی فعال کند. ترشحات ثانویه آغاز کننده پاسخ التهابی در بدن هستند. فاکتور نکروزکننده بافتی آلفا در مقابله با ورم پستان ناشی از

سیکل‌های حرارتی PCR نیز به صورت زیر اجرا شد: واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه)، اتصال آغازگرها (۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه)، بسط آغازگرها (۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) و یک مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه. برای اطمینان از صحت تکثیر، محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند.

آزمون RFLP برای محصولات PCR ژن TNF-

محصولات PCR ژن TNF- با استفاده از آنزیم برشی EcoRI مورد هضم قرار گرفتند. مخلوط واکنش هضم در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۷ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر هضم، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم EcoRI و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دی یونیزه تهیه شده و به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بن ماری نگهداری شد. برای شمارش باندها و تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها، محصولات هضم روی ژل آگارز دو درصد و در کنار نشان‌گر وزن مولکولی الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند.

آزمون SSCP برای محصولات PCR ژن TNF-

محصولات PCR ژن TNF- بعد از واسرشته‌سازی در دستگاه PCR روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰ درصد به مدت ۶ ساعت و با ولتاژ ۲۰۰ ولت الکتروفورز شدند. برای شمارش باندها و تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها از رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

محاسبه داده‌های مربوط به سلول‌های بدنی شیر برای هر دام

به منظور محاسبه عدد مورد نظر برای نمره سلول‌های بدنی شیر برای هر گاو، ابتدا لگاریتم پایه ۲ تعداد سلول‌های بدنی شیر را محاسبه و با استفاده از فرمول زیر نمره سلول‌های بدنی برآورد شد:

$$SCS = 3 + \log_2(n)$$

در این فرمول، ۳ عدد ثابت، n تعداد سلول‌های بدنی شیر و از لگاریتم در پایه ۲ برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد (۱۳).

تجزیه و تحلیل نشانگر- صفت

اثر هر یک از ژنوتیپ‌های مشاهده شده روی نمره سلول‌های بدنی شیر با استفاده از مدل آماری زیر و با کمک نسخه ۹/۱ نرم افزار SAS (۱۱) برآورد شد.

$$Y_{ijklm} = \mu + A_i + B_j + C_k + D_l + E_{ac} + G_{bc} + H_{ijklm}$$

به طوری که در آن Y: نمره سلول‌های بدنی شیر (در پایه \log_2)، μ : میانگین نمره سلول‌های بدنی شیر در گله، A_i : اثر i امین ژنوتیپ، B_j : اثر j امین شکم زایش، C_k : اثر k امین ماه شیر دهی، D_l : اثر l امین فصل زایش، E_{ac} : اثر متقابل ژنوتیپ و ماه شیردهی، G_{bc} : اثر

اشرشیاکلی نقش مهمی دارد. ماکروفاژهای غده پستانی گاو در حضور اندوتوکسین پاتوژن‌ها، فاکتور نکروزکننده بافتی آلفا را ترشح می‌کنند. علاوه بر این، نشان داده شد که غلظت فاکتور نکروزکننده بافتی آلفا با شدت ورم پستان، هم‌بستگی دارد. به نظر می‌رسد که فاکتور نکروزکننده بافتی نقش مهمی در بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، ایدز، پس زدن بافت پیوندی، دیابت، مالاریا و عفونت‌های ناشی از ورود باکتری به بدن دارد (۸). فاکتور نکروزکننده بافتی آلفا اولین بار در سال ۱۹۷۵ از سوی کارسول و همکاران جداسازی شد (۲). بنابراین با توجه به مهاجرت نوتروفیل‌ها به مکان التهاب و نقش اصلی آن‌ها در از بین بردن آلودگی باکتری‌ها، ژن‌هایی که با عملکرد نوتروفیل‌ها در ارتباط هستند می‌توانند به عنوان مارکرهای ژنتیکی قوی برای مقاومت در برابر بیماری‌ها، مورد توجه قرار گیرند. در پژوهش حاضر اثر چندشکلی‌های ژن فاکتور نکروزکننده بافتی آلفا بر نمره سلول‌های بدنی شیر گاو هلشتاین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA

در این پژوهش خون‌گیری از گاوهای نژاد هلشتاین مزرعه شماره ۲ نمونه آستان قدس رضوی در مشهد انجام گرفت. برای خون‌گیری، از لوله خلأ آغشته به اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید نیم مولار، با pH برابر ۷/۵ تا ۸ استفاده شد. خون‌گیری از طریق ورید زیر دمی گاو انجام گرفت. نمونه‌های خون جمع‌آوری شده (۵ تا ۱۰ سی‌سی) از طریق فلاسک حاوی یخ به آزمایشگاه ژنتیک ملکولی منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به طور کلی تعداد ۱۲۱ عدد نمونه خون به صورت کاملاً تصادفی و از زایش‌های مختلف تهیه شد. در این پژوهش از روش بهینه یافته نمکی برای استخراج DNA استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده نیز با روش‌های طیف‌سنجی و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد.

تکثیر قطعه DNA مورد نظر با استفاده از واکنش

زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

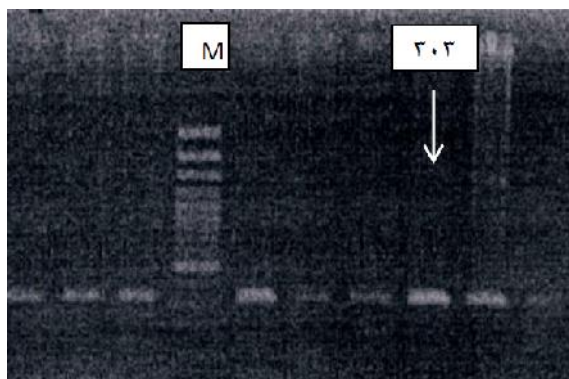
با استفاده از آغازگرهای اختصاصی F- 5'-GGGTGACTTGCTCTAACACTCATC-3' و R- 5'-AGGCCTCACTTCCCTACATCCCTA-3' و یک قطعه ۳۰۳ جفت بازی در اگزون ۳ و اینترون ۴ ژن فاکتور نکروزکننده بافتی آلفا تکثیر شد. مخلوط واکنش به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۰۰ نانوگرم DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر یک برابر PCR، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۱۰ پیکومیل بر میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۲۰۰ میکرومول dNTP و یک واحد آنزیم Taq- پلیمرز و آب دی یونیزه بود.

محصولات هضم روی ژل آگارز دو درصد الکتروفورز و مشاهده شد که تمامی نمونه‌ها برای این جایگاه ژنی یک شکل بوده و هیچ گونه تنوعی را نشان ندادند (نگاره ۱). عدم مشاهده تنوع در قطعه مطالعه شده برای ژن TNF- می‌تواند به دلیل اندازه کوچک نمونه‌ها و یا عدم وجود جهش در جایگاه برش آنزیمی برای آنزیم EcoRI (جهش مورد نظر) در قطعه تکثیر شده باشد. بنابراین برای حصول اطمینان از عدم وجود جهش در سایر نقاط قطعه تکثیر شده، پس از یک شکل شدن نمونه‌ها بعد از آزمون PBR، چندشکلی موجود در فاکتور نکرزکننده بافتی (ایزومر آلفا) با روش PCR-SSCP نیز مورد بررسی قرار گرفته و سه الگوی مختلف بانندی (۱، ۲ و ۳) به ترتیب با فراوانی‌های ۳/۳، ۲۷/۱ و ۶۹/۵ درصد مشاهده شدند (نگاره ۲).

متقابل شکم زایش و ماه شیردهی و Hijklm: اثر خطا در نظر گرفته شدند. از آزمون چند دامنه‌ای دانکن نیز برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

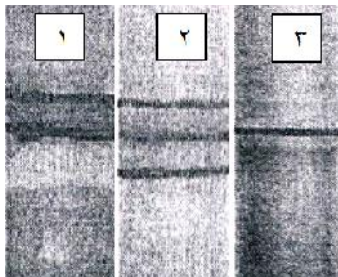
فاکتور نکرزکننده بافتی یکی از سیتوکین‌های اصلی در فرآیند پیش التهابی است که با توجه به ویژگی پلیوتروپیک سبب فعال شدن کل سامانه ایمنی می‌شود (۹). بنابراین با توجه به نقش مهم این سیتوکین در سامانه ایمنی بدن دام، چندشکلی‌های ژن کنترل‌کننده آن به عنوان یک ژن کاندید در ارتباط با بیماری ورم پستان در گاو هلشتاین مورد بررسی قرار گرفت. قطعه تکثیر یافته از ژن TNF- با استفاده از آنزیم EcoRI مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. پس از هضم آنزیمی،



شکل ۱- محصولات حاصل از هضم قطعه ۳۰۳ جفت بازی از ژن TNF-: نشان گر وزن مولکولی (SM0321, Fermentas).

و ۲). در دوره میانی شیردهی الگوهای مختلف بانندی تفاوت معنی‌داری را از نظر آماری نشان ندادند. علی‌رغم اثر معنی‌دار الگوهای بانندی مختلف ژن TNF- بر SCS در دوره اول و سوم شیردهی، عدم وجود تفاوت معنی‌دار آماری بین ژنوتیپ‌های مختلف در دوره میانی شیردهی اتفاقی نامعمول است که می‌تواند به دلیل اندازه کوچک نمونه‌های مورد مطالعه باشد و جداک و همکاران (۱۷) ارتباط بین چندشکلی‌های ژن TNF- و ورم پستان بالینی را در ۵۸۸ رأس هلشتاین فریزین لهستانی مورد بررسی قرار دادند. نتایج پژوهش ایشان ارتباط آماری معنی‌داری را بین ژن TNF- و نرخ بیماری، طول و دوره بیماری و همچنین اثر متقابل بین ژن و شکم زایش نشان می‌دهد.

به منظور بررسی دقیق تر اثر الگوهای مختلف بانندی مشاهده شده بر SCS، دوره شیردهی به سه قسمت از ابتدای دوره شیردهی تا هفتاد روزگی، از هفتاد روزگی تا ۲۱۰ روزگی و از ۲۱۰ روزگی تا انتهای دوره شیردهی (۴۲۰ روزگی) تقسیم شدند. با توجه به متفاوت بودن تعداد سلول‌های بدنی شیر در دوره‌های مختلف شیردهی، دوره شیردهی را با توجه به میزان تولید به سه دوره تقسیم کردیم. در مطالعات گذشته نیز (۱۵) نیز این گونه تقسیم‌بندی در آنالیزها لحاظ شده بود. نتایج نشان دادند که اثر الگوهای بانندی مختلف ژن TNF- بر SCS در دوره اول و سوم شیردهی معنی‌دار بود به طوری که به ترتیب الگوهای باند دو و یک کمترین حساسیت را به افزایش SCS در هفتاد روز آغازین و در دوره سوم شیردهی نشان دادند (جداول ۱)



شکل ۲- الگوهای باندهای (SSCP) حاصل از الکتروفورز قطعه ۳۰۳ جفت بازی از ژن TNF- α روی ژل پلی‌اکریل‌آمید.

هم‌چنین گزارش شد که ژن TNF- α دارای اثر معنی‌دار افزایشی در شکم زایش اول و دوم می‌باشد به طوری که آلل A با تعداد کم SCS در ارتباط است. اثر مطلوب آلل A هم‌چنین در شکم زایش سوم و دوره پایانی شیردهی نیز دیده شد. در پژوهش حاضر نیز ارتباط الگوهای باندهای ژن TNF- α با شکم‌های زایش و نیز با ماه‌های شیردهی و برهم‌کنش ماه و شکم زایش نیز معنی‌دار بود (جدول ۳ و ۴). اثر ماه شیردهی روی نمره سلول‌های بدنی شیر، در هر سه دوره چرخه شیردهی معنی‌دار بود. به طوری‌که بیشترین SCS در ماه‌های نهم و دهم و کمترین مقدار آن در ماه‌های دوم و سوم مشاهده شدند.

در پژوهش حاضر نیز اثر شکم زایش بر SCS معنی‌دار بود، به طوری‌که گاوهای مسن تر تعداد SCS بیشتری را نشان دادند که دلیل آن می‌تواند افزایش سن گاوها باشد. در انسان نشان داده شد که افزایش سن با تغییرات معنی‌داری در سامانه ایمنی ذاتی افراد همراه است (۵).

وجداک و همکاران (۱۶) اثر چندشکلی‌های ژن TNF- α ، mLYZ و LTF را روی SCS در ۱۷۱ گاو نژاد جرسی با استفاده از روش PCR-RFLP مورد مطالعه قرار دادند. نتایج پژوهش ایشان نشان داد که یک برهم‌کنش پیچیده عملکردی بین این سه ژن در ارتباط با ورم پستان وجود دارد. در این پژوهش

جدول ۱- درصد حساسیت الگوهای باندهای مشاهده شده در نمونه‌های مورد مطالعه به افزایش SCS برای ژن TNF- α دوره اول شیردهی (صفر تا هفتاد روزگی)

دوره شیردهی	منابع تغییرات	F ² محاسبه شده	سطح معنی‌داری
۱	ژنوتیپ	۴/۶۸	*
	شکم زایش	۴/۶۸	*
	فصل	۰/۳۰	ns
	ماه شیردهی	۲/۴۱	*
	ماه شیردهی × شکم زایش	۲/۰۷	*
۲	ژنوتیپ	۰/۰۱	ns
	شکم زایش	۳/۲۴	*
	فصل	۰/۸۲	ns
	ماه شیردهی	۲/۰۳	*
	ماه شیردهی × شکم زایش	۲/۱۷	*
۳	ژنوتیپ	۴/۸۲	*
	شکم زایش	۸/۳۲	*
	فصل	۰/۱۰	ns
	ماه شیردهی	۱/۶۴	*
	ماه شیردهی × شکم زایش	۱/۹۸	*

a: آماره فیشر

*: در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است.

ns: عدم معنی‌داری.

جدول ۲- نتایج آزمون دانکن برای مقایسه میانگین SCS برای الگوهای باندهای مختلف ژن TNF- α

میانگین	صفر تا ۷۰ روزگی		۲۱۰ تا ۷۰ روزگی		میانگین
	الگوی باندهای	میانگین	الگوی باندهای	میانگین	
۱	۲۲/۱۳۶±۳/۲۴ ^a	۱	۲۱/۳۹۹±۰/۱۰ ^a	۱	۲۰/۵۸۴±۵/۸۷ ^a
۲	۱۵/۶۵۷±۳/۲۴ ^b	۲	۲۱/۱۴۸±۰/۱۰ ^a	۲	۱۰/۰±۵/۸۷ ^b
۳	۱۹/۳۴۸±۳/۲۴ ^b	۳	۲۱/۱۹۲±۰/۱۰ ^a	۳	۱۹/۷۰۵±۵/۸۷ ^b

*: حروف لاتین یکسان نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار آماری است.

تغییرات ایمونولوژیک زیادی در غدد پستانی شروع می‌شوند. یافته‌هایشان احتمالاً می‌تواند اثرات متنوع ژن TNF- در مراحل مختلف شیردهی را- که در پژوهش حاضر مشاهده شد- شرح دهد (۱). با توجه به نتایج به دست آمده، می‌توان اظهار داشت که اثر فصل روی فاکتور نمره سلول‌های بدنی شیر، در هیچ یک از سه دوره مختلف یک چرخه شیردهی، معنی‌دار نیست (جدول ۱) که این موضوع در نتایج وجداک و همکاران (۱۵) نیز مشاهده شد.

در پژوهش دیگری نشان داده شد که نیم‌رخ بیان TNF- به طور معنی‌داری در دوره‌های میانی و پایانی شیردهی متفاوت است که نشان‌دهنده تغییرات عمده‌ای است که در غدد پستانی رخ می‌دهد. این تغییرات می‌توانند به دلیل طیف وسیع پاسخ‌های ایمنی مورد نیاز در مراحل مختلف دوره شیردهی باشند؛ برای مثال در مراحل نهایی دوره شیردهی چون غدد پستانی متحمل تغییرات آناتومیک و فیزیولوژیک می‌شوند، لذا حساسیت بیشتری نسبت به آلودگی‌های باکتریایی پیدا می‌کنند و بنابراین برای غلبه به این حساسیت ایجاد شده،

جدول ۳- مقایسه میانگین SCS برای شکم‌های زایش گوناگون در ژن TNF-

صفر تا ۷۰ روزگی		۷۰ تا ۲۱۰ روزگی		۲۱۰ روزگی به بعد	
شکم زایش	میانگین	شکم زایش	میانگین	شکم زایش	میانگین
۱	۱۸/۲۲۴±۲/۹۸ ^a	۱	۲۱/۳۷۰±۱/۹۵ ^b	۱	۱۸/۵۰۸±۲/۲۵ ^a
۲	۱۴/۹۶۴±۲/۹۸ ^d	۲	۱۷/۸۵۹±۱/۹۵ ^{bc}	۲	۱۶/۹۷۳±۲/۲۵ ^d
۳	۱۴/۰۷۵±۲/۹۸ ^d	۳	۱۹/۹۴۸±۱/۹۵ ^d	۳	۱۷/۷۶۹±۲/۲۵ ^d
۴	۱۹/۷۸۶±۲/۹۸ ^a	۴	۲۱/۹۹۶±۱/۹۵ ^a	۴	۲۰/۸۵۶±۲/۲۵ ^a
۵	۲۱/۲۲۹±۲/۹۸ ^d	۵	۲۲/۷۴۷±۱/۹۵ ^a	۵	۲۰/۹۱۹±۲/۲۵ ^a
۶	۲۱/۴۴۸±۲/۹۸ ^d	۶	۲۳/۳۱۶±۱/۹۵ ^a	۶	۲۲/۴۲۳±۲/۲۵ ^a
۷	۲۱/۸۶۹±۲/۹۸ ^d	۷	۲۱/۹۴۸±۱/۹۵ ^a	۷	۲۲/۸۵۶±۲/۲۵ ^a

*: حروف لاتین یکسان نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار آماری است.

بیشتر از فصل پاییز- زمستان بود که با یافته‌های پژوهش‌های پیشین در توافق بود (۱۲،۳).

اگرچه در پژوهش حاضر اثر فصل روی نمره سلول‌های بدنی شیر معنی‌دار نبود ولی به طور عددی در فصل بهار- تابستان نمره سلول‌های بدنی شیر

جدول ۴- مقایسه میانگین SCS برای ماه‌های شیردهی مختلف در ژن TNF-

صفر تا هفتاد روزگی		۷۰ تا ۲۱۰ روزگی		۲۱۰ روزگی به بعد	
ماه شیردهی	میانگین‌ها	ماه شیردهی	میانگین‌ها	ماه شیردهی	میانگین‌ها
۱۰	۲۱/۸۴۶±۳/۳۴ ^a	۹	۲۲/۳۴۴±۲/۳۹ ^a	۱۰	۲۲/۱۶۵±۲/۲۱ ^a
۷	۲۰/۹۳۶±۳/۳۴ ^a	۱۰	۲۲/۱۵۳±۲/۳۹ ^a	۹	۲۱/۹۱۷±۲/۲۱ ^a
۶	۲۰/۶۳۰±۳/۳۴ ^a	۶	۲۲/۰۷۳±۲/۳۹ ^a	۸	۲۱/۳۷۵±۲/۲۱ ^a
۹	۱۹/۴۰۴±۳/۳۴ ^{ab}	۸	۲۱/۵۵۸±۲/۳۹ ^a	۶	۲۱/۳۲۷±۲/۲۱ ^a
۴	۱۸/۶۶۱±۳/۳۴ ^{ab}	۷	۲۰/۶۷۱±۲/۳۹ ^{ab}	۷	۲۱/۱۳۶±۲/۲۱ ^a
۱	۱۸/۰۰۵±۳/۳۴ ^{ab}	۱	۲۰/۴۶۹±۲/۳۹ ^{ab}	۴	۲۰/۷۸۲±۲/۲۱ ^a
۵	۱۵/۶۶۹±۳/۳۴ ^{ab}	۵	۲۰/۲۶۰±۲/۳۹ ^{ab}	۱	۲۰/۷۸۲±۲/۲۱ ^a
۸	۱۵/۲۳۵±۳/۳۴ ^{ab}	۲	۲۰/۱۷۱±۲/۳۹ ^{ab}	۳	۱۸/۸۰۹±۲/۲۱ ^{ab}
۳	۱۵/۰۸۹±۳/۳۴ ^{ab}	۴	۱۹/۹۵۴±۲/۳۹ ^{ab}	۵	۱۸/۲۶۷±۲/۲۱ ^{ab}
۲	۱۱/۵۳۷±۳/۳۴ ^{bc}	۳	۱۳/۹۲۸±۲/۳۹ ^{bc}	۲	۱۷/۲۳۹±۲/۲۱ ^{ab}
					۱۶/۴۸۱±۲/۲۱ ^b

*: حروف لاتین یکسان نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار آماری است.

درگیر در سلامت پستان پیشنهاد می‌دهد، بنابراین بهتر است که برای بررسی بیشتر اثرات این جایگاه بر ورم پستان در مطالعات بعدی از تعداد نمونه‌های بیشتر استفاده شود.

به طور کلی SCS در طول زمستان در کمترین مقدار و در طول تابستان به بیشترین مقدار خود می‌رسد که دلیل آن می‌تواند وجود آلودگی‌های بیشتر میکروبی محیط در فصول گرم باشد (۱۲). نتایج پژوهش حاضر جایگاه ژنی TNF- را یک ژن کاندید احتمالی

منابع

1. Alluwaimi, A.M. and J.S. Cullor. 2002. Cytokines gene expression patterns of bovine milk during middle and late stages of lactation. *Journal of Veterinary Medicine, B, Infection Disease Veterinary Public Health*, 49: 105-110.
2. Carswell, E., L. Old, R. Kassel, N. Green, N. Fiore and B. Williamson. 1975. An endotoxin induced serum factor that cause necrosis of tumor. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 72: 3666-3670.
3. Dohoo, I.R. and A.H. Meek. 1982. Somatic cell counts in bovine milk. *Canadian Veterinary Journal*, 23: 119-125.
4. Fleischer, P., M. Metzner, M. Beyerbach, M. Hoedemaker and W. Klee. 2001. The relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84: 2025-2035.
5. Gomez, C.R., E.D. Boehmer and E.J. Kovacs. 2005. The aging innate immune system. *Current Opinion in Immunology*, 17: 457-462.
6. Heringstad, B., G. Klemetsdal and T. Steine. 2003. Selection responses for clinical mastitis and protein yield in two Norwegian dairy cattle selection experiments. *Journal of Dairy Science*, 86: 2990-2999.
7. Jain, N.C. and J. Lasmanis. 1978. Phagocytosis of serum-resistant and serum-sensitive coliform bacteria (*Klebsiella*) by bovine neutrophils from blood and mastitic milk. *American Journal of Veterinary Research*, 39: 425-427.
8. Moller, D.E. 2000. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11: 212-217.
9. Parameswaran, N. and S. Patial. 2010. Tumor Necrosis Factor- Signaling in Macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20: 87-103.
10. Rupp, R.M. and D. Boichard. 2003. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Veterinary Research*, 34: 671-688.
11. SAS Institute. 1989. *SAS User's Guide*. Version 6, Volume 2, 4th edition SAS Institute Inc. Cary, NC.
12. Smith, K.L., D.A. Todhunter and P.S. Schoenberger. 1985. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *Journal of Dairy Science*, 68: 1531-1553.
13. Shook, G.E. 1993. Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, 9: 563-581.
14. Vivier, E. and B. Malissen. 2005. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nature Immunology*, 6: 17-21.
15. Wojdak, M.K., M. Kmic and J. Ziemak. 2006. Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk. *Veterinary Medicine*, 51: 14-20.
16. Wojdak, M.K. and K. Mikolajczyk. 2012. Interactions between *TNF- α* , *LTF* and *mLYZ* gene variants in determining somatic cell count in Jersey cows. *Pakistan Veterinary Journal*, 32: 477-482.
17. Wojdak, M.K., J. Szyda and T. Strabel. 2013. Parity-dependent association between *TNF- α* and *LTF* gene polymorphisms and clinical mastitis in dairy cattle. *BMC Veterinary Research*, 9: 114-121.

Association of Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphisms with Milk Somatic Cell Score in Dairy Cattle

Vahid Hemati Doust¹, Ghodrat Rahimi Mianji² and Ayoub Farhadi³

1 and 2- Graduated M.Sc. and Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

3- Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

(Corresponding author: ayoub_farhadi@ymail.com)

Received: February 24, 2014 Accepted: July 7, 2014

Abstract

Mastitis is one of the most prevalent and costly diseases affecting dairy cattle production. In the present study, effects of tumor necrosis factor (alpha isomer) gene (TNF- α) polymorphisms on milk somatic cell count (SCS) and subclinical mastitis was investigated in 121 Holstein dairy cattle. The polymorphisms of a 303 bp fragment of TNF- α gene were investigated by PBR and PCR-SSCP techniques. The EcoRI did not digest the amplified segment and all the samples were monomorph. Therefore, the SSCP test was done on amplification products and three banding pattern (1, 2 and 3) were observed with frequencies of 3.3, 27.1 and 69.5%, respectively. Marker-trait analysis showed that, the first 70 days of milking period, different genotypes of TNF- α gene had significant effects on SCS and cows carrying banding pattern 2 had minimum sensitivity to SCS increment. Also, genotypes of TNF- α gene were significantly associated with SCS and banding pattern 1 showed minimum sensitivity to SCS increment at the end of milking period (from day 210 to 420). Association between different genotypes of TNF- α gene and SCS was not significant in the middle of milking period (from day 70 to 210). Also, in the present study, parity, milking months and their interaction had significant association with somatic cell score. The obtained results of the present study indicated that selection in favor of the banding patterns 1 and 2 might contribute to a reduction of SCS in Holstein dairy cattle.

Keywords: Polymorphism, Somatic Cell Score, TNF-