ژنتیک نوین
دوره نوزدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳
صفحه ۳۳ – ۲۵

بررسی بیان ژن‌های IRAK1 و TRAF6 در بافت پستان گاوهای هلشتاین مبتلا به ورم پستان بالینی

Investigating the expression of IRAK1 and TRAF6 genes in the mammary tissue of Holstein cows with clinical mastitis

نرگس قاسمی جویباری[۱]، عالم آرا غلامی[۲]، ایوب فرهادی*[۳]، الهام یونسی ملردی[٤]

۱- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه علوم وفناوری‌های زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، ساری، ایران

۲- استادیار، گروه علوم وفناوری‌های زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، ساری، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم دامی، آزمایشگاه ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی دام، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

٤- فارغ‌التحصیل دکتری تخصصی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

Ghasemi Jouybari N[1], Gholami A[1], Farhadi A[*3], Younesi-Melerdi E[4]

1- MSc Graduate of Cellular and Molecular Biology, Department of Biological Sciences and Technologies, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Sari Branch, Sari, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biological Sciences and Technologies, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Saeri Branch, Sari, Iran
3- Associate Professor, Laboratory for Molecular Genetics and Animal Biotechnology, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Ntural Resources University, Sari, Iran
4- PhD Graduated of Agricultural Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Ntural Resources University, Sari, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ayoubfarhadi60@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۹ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱٦)

چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی مقایسه‌ای میزان بیان نسبی ژن‌های IRAK1 و TRAF6 در بافت پستان گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و گاوهای سالم با استفاده از تکنیک Real-time PCR بوده است. نمونه‌های مورد مطالعه ۱۵ نمونه بافت پستان که شامل ۵ نمونه سالم و ۱۰ نمونه مبتلا به ورم پستان بالینی بود. پس از بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده، از آن برای سنتز cDNA استفاده شد. سپس از دو جفت آغازگر اختصاصی برای اندازه‌گیری میزان بیان نسبی ژن‌های مورد نظر نسبت به ژن I8SrRNA به‌عنوان ژن کنترل داخلی با تکنیک qPCR استفاده شد. میزان بیان نسبی ژن‌ها با روش 2-ΔΔct تعیین و تفاوت آماری بین گروه بیمار و سالم با آزمون t-student و در نرم‌افزار آماری SAS ویرایش ۹/۱ بررسی شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که میزان بیان ژن‌های TRAF6 و IRAK1 در نمونه‌های بیمار نسبت به نمونه‌های سالم به‌ترتیب ۲/۵۳ (P<024) و ۳/۰٤ (P<0.0012) برابر بیشتر بوده است. شناسایی راه حل‌هایی برای توسعه راهبردهای کنترلی بیماری ورم پستان، از اهمیت زیادی برخوردار بوده و درمان آن توجیه اقتصادی قابل توجهی برای صنعت پرورش گاو شیری جهان دارد. از نتایج این پژوهش می‌توان برای فهم بهتر نقش ژن‌های TRAF6 وIRAK1 در سیستم دفاعی غدد پستان و طراحی آزمایش‌های جدید برای شناسایی چندشکلی‌های موجود در این ژن‌ها جهت استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاح نژادی برای شناسایی دام‌های مقاوم در برابر ورم پستان استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
گاو هلشتاین
ورم پستان بالینی
qPCR

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-21]

مقدمه

پرورش گاو شیری یکی از مهم‌ترین فعالیت‌ها در صنعت کشاورزی ایران می‌باشد. با پیشرفت همه جانبه و افزایش کیفیت زندگی در جوامع کنونی، نیاز بیشتری به تولید شیر با کیفیت و با بار میکروبی کمتر و عاری از هرگونه آنتی بیوتیک و یا مواد شیمیایی احساس می‌شود. لذا توجه به سلامت دام به‌خصوص بیماری‌های واگیردار مانند ورم پستان که اصلی‌ترین تلفات اقتصادی را در صنعت لبنیات در پی دارد نیازمند توجه ویژه‌ای است. ورم پستان یکی از شایع ترین بیماری‌ها وچالش‌های اصلی برای پرورش دهندگان و متخصصان اصلاح نژاد گاوشیری است (Coelho et al. 2007). شناسایی راه حل‌هایی برای توسعه راهبردهای کنترلی این بیماری شایع، از اهمیت زیادی برخوردار بوده و درمان آن توجیه اقتصادی قابل توجهی برای صنعت پرورش گاو شیری جهان دارد (Lewandowska-Sabat et al. 2012).

ورم پستان یکی از شایع‌ترین و پیچیده‌ترین بیماری‌های غدد پستانی در گاوهای شیری است که تحت تاثیر ژن‌های متعددی قرار می‌گیرد. این بیماری با بروز یک پاسخ التهابی در غده پستانی مشخص می‌شود که به‌وسیله تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی، صدمات و یا میکرو ارگانیسم‌های بیماری‌زای مسری ایجاد می‌شود (Fonseca et al. 2009). ورم پستان حاد بالینی یکی از بیماری‌های مهم و اقتصادی در گله‌های گاو شیری محسوب می-شود. در این نوع ورم پستان تغییرات قابل توجهی در کیفیت فیزیکی و شیمیایی شیر از قبیل تغییر رنگ، وجود لخته یا چرک، شور شدن و غیره اتفاق می‌افتد که همراه با تغییر در بافت پستان (سفتی، تورم، گرم و دردناک شدن) و تغییر در وضعیت عمومی گاو مبتلا (تب، افزایش تعداد تنفس، افزایش ضربان قلب، کاهش حرکات شکمبه، بی اشتهایی و ...) همراه است (Radostits et al. 2007).

نشان داده شده است که بیماری ورم پستان توسط مجموعه‌ای از عوامل مختلف شامل باکتری‌ها، ژنتیک و اپی‌ژنتیک تحت تأثیرقرار می‌گیرد (Lopez-Villalobos et al. 2012). تولید واکسن مؤثر بر علیه این بیماری به‌علت تنوع زیاد میکروارگانیسم های به وجود آورنده آن و ویژگی چند فاکتوری آن دشوار است. بنابراین مطالعات برای درک بهتر فرایندهای بیولوژیکی درگیر در تعیین مقاومت به بیماری برای حل مشکلات و توسعه راه‌حل‌های جدید آن ضروری است (Bradley 2002; Petrovski et al. 2006).

همتی دوست و همکاران (۱۳۹۵) اثرات چندشکلی ژن TNF-α بر نمره سلول‌های بدنی شیر (SCS)[1] و ورم پستان تحت بالینی در ۱۲۱ رأس گاو شیری هلشتاین را با تکنیک‌های PBR و PCR-SSCP مورد بررسی قرار دادند. تجزیه و تحلیل نشانگر- صفت نشان داد که در ۷۰ روز ابتدایی دوره شیردهی، اثر ژنوتیپ‌های مختلف ژن TNF-α 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 ٤۲۰ روزگی) ژنوتیپ‌های ژن TNF-α به‌طور 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-α بر SCS معنی‌دار نبود. در این پژوهش 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.

سیتوکین‌ها نقش کلیدی در مکانیسم اصلی ایمنی سلولی که پاسخ به پاتوژن‌های عفونی است بازی می‌کنند. بنابراین پژوهش‌ها در نشخوارکنندگان بر تعادل سیتوکین و پاسخ ایمنی تمرکز دارد (Puech et al. 2015). سیتوکین‌ها خانواده بزرگی از مولکول‌های ترشحی هستند که شامل بیش از۱۰۰پپتید یا گلیکوپروتئین بوده وتوسط سلول‌های ایمنی آزاد شده و قادرند در تمامی سدهای دفاعی به‌صورت فعال عمل کنند (Hartog et al. 2011).

اهمیت سیتوکاین‌های التهابی برای توسعه پاسخ ایمنی مؤثر در برابر ورم پستان در تحقیقات متعددی ثابت شده است (Burvenich et al. 2003; Bannerman 2009). هر دو ژن IRAK1 و TRAF6 مورد پژوهش حاضر، از ژن‌های درگیر در مسیر ایمنی می‌باشند که به‌طور اختصاصی در مسیر سیگنالینگ

[1]. Somatic cell score

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-21]

NF-KB در بیماری‌های التهابی، بدخیم و متابولیکی نقش ایفا می‌کنند (Lawrence 2009; Gilmor 2006).

ژن TRAF6 روی کروموزوم ۱۵ در گاو قرار گرفته و دارای ۸ اگزون می‌باشد (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/539124). فاکتور مرتبط باگیرنده‌ی TNF شماره ٦ (TRAF6) پروتئینی است که به‌طور گسترده در قلب و مایوسیت‌ها بیان می‌شود و نقش مهمی در فرایندهای التهابی و مسیرپیام رسانی NF-κB دارد. TRAF6 ایزوفرمی است که در مسیر پیام‌رسانی گیرنده شبه تول (TLR) و NF-κB شرکت داشته و به این وسیله، نقش مهمی در طیفی از بیماری‌های قلبی عروقی ایفا می‌کند (Yamamoto et al. 2018). عوامل TRAFs شامل خانواده پروتئین‌های آداپتور حفاظت شدهٔ درگیر در فعال شدن آبشارهای پیام رسانی مختلف هستند که در دامنهٔ وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیکی شامل ایمنی ذاتی نقش دارند. در میان پروتئین‌های شناخته شدهٔ این خانواده، پروتئین TRAF6 چندین ویژگی مجزا دارد که با سایر اعضای خانوادهٔ TRAF به اشتراک گذاشته نشده‌اند (Walsh et al. 2015). TRAF6 در مرکز فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی مختلف از جمله NF-κB، MAPK و فسفاتیدیل اینوزیتول3-کیناز/AKT در پاسخ به سایتوکاین‌ها و محصولات میکروبی قرار دارد. مشخص شده است که TRAF6 تنظیم‌کنندهٔ اصلی در آتروفی عضلهٔ اسکلتی در هر تحریک‌های فیزیولوژیکی (بدون عصب شدن) و پاتولوژیکی (کاچکسی سرطان) است (Xia et al. 2018; Li et al. 2020). ازاین‌رو، نشان داده شده است که کاهش بیان TRAF6 در عضلهٔ متمایز شده سازوکاری برای جلوگیری از فعال شدن مسیرهای کاتابولیکی مختلف در وضعیت‌های طبیعی است. آتروفی عضلهٔ اسکلتی، دروضعیت های کاتابولیکی مختلف، شامل فعال شدن سیستم پایین دستی یوبی کوئیتین پروتئازوم وابسته به ATP است. نشان داده شده است که تخریب MyHC به‌طور چشمگیری در عضلات بدون عصب شدهٔ موش‌های فاقد ژن TRAF6، متوقف می‌شود (Paul et al. 2010). علاوه بر نشان داده شد که در شرایط آتروفی ناشی از گرسنگی نیز TRAF6 با افزایش بیان لیگازهای یوبی کوئیتینی در کاهش تودهٔ عضلانی نقش دارد (Paul et al. 2010).

ژن IRAK1 روی کروموزوم X در گاو قرار گرفته و دارای ۱۳ اگزون می‌باشد (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/533953). این ژن نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های التهابی توسط سلول‌های ایمنی مانند مونوسیت‌ها و ماکروفاژها دارد که به نوبه خود به سیستم ایمنی در از بین بردن باکتری‌ها، ویروس‌ها و سایر عوامل بیماری‌زا کمک می‌کند.

IRAK-1 بخشی از خانواده IRAK متشکل از IRAK-1،IRAK-2،IRAK-۳ وIRAK-4 است و توسط مولکول‌های التهابی آزاد شده توسط مسیرهای سیگنالینگ در طول حمله بیماری‌زا فعال می‌شود. پروتئین کد شونده توسط IRAK یک پروتئین کیناز سرین ترئونین است که با تحریک گیرنده اینترلوکین۱ (IL1R) مرتبط بوده و برای تولید سیتوکین‌های پیش التهابی در پایین دست مسیرهای سیگنالینگ TLR و IL-1R مورد نیاز است (Kawai, 2007 و Akira). علاوه بر این، IRAK-1 مسئول افزایش بیان فاکتور رونویسی NF-kB ناشی از IL1 است. با اتصال به گیرنده آن، IRAK-1 فعال شده و سپس از مجموعه گیرنده خود جدا می‌شود. IRAK-1 و TRAF-6 با اتصال به TAK-1 متصل شده و کمپلکس جدیدی را تشکیل می‌دهند. سپس فعال شدن TAK-1 و فسفوریلاسیون مهارکننده کمپلکس κB کیناز (IKK) متشکل از IKKα، IKKβ و IKKγ رخ می‌دهد. MAPK ها نیز در این فرآیند فعال می‌شوند و در نهایت، NF-kB برای تنظیم رونویسی ژن‌های پیش التهابی در هسته فعال می‌شود (Hayden et al. 2006).

Fonesca و همکاران در سال ۲۰۰۹ به بررسی نیمرخ بیان ژن‌های درگیر در ورم پستان گاو شیری و تعیین بیان نسبی ژن‌های اینترلوکین2-، اینترلوکین4-، اینترلوکین6-، ا اینترلوکین8-، اینترلوکین10-، اینترفرون گاما و **TNF-α** در سلول‌های شیر گاوهای سالم و گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی با روش Real-time PCR پرداختند. بیان ژن اینترلوکین10-در هر دو گروه مبتلا به ورم پستان در مقایسه با حیوانات فاقد عفونت بالا بود ($P<0.05$).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-21]

هدف از پژوهش حاضر اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های IRAK1 و TRAF6 به‌طور مقایسه‌ای بین گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و گاوهای سالم با استفاده از روش Real-time PCR بوده است.

مواد و روش‌ها

دام‌های مورد استفاده در این آزمایش از نژاد گاوهای شیری هلشتاین در دو گروه سالم و دارای بیماری ورم پستان بالینی و در شکم‌های دوم یا سوم زایش قرار داشتند. تشخیص گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی با بررسی سابقه حذف آن‌ها از گله و معاینه کارتیه‌های پستان توسط دامپزشک مجرب انجام شد. سپس نمونه‌های بافت پستان توسط دامپزشک و از کشتارگاه صنعتی جمع‌آوری شده و در تانک ازت مایع قرار داده شده و در کمتر از یک ساعت به فریزر منفی ۸۰ – درجه سانتی‌گراد در آزمایشگاه انتقال یافت. برای استخراج RNA از بافت پستان از کیت استخراج RNA شرکت یکتا تجهز آزما استفاده شد. بیان ژن‌های مورد نظر در ۱۵ نمونه بافت پستان که شامل ۵ نمونه سالم و ۱۰ نمونه بیمار ورم پستانی بود مورد بررسی قرارگرفت.

تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده و تبدیل RNA به cDNA

به‌منظور تعیین کمیت RNA از روش اسپکتروفتومتری و از دستگاه نانودراپ (مدل UV-1800/SHIMMADZU) استفاده شد. برای ساخت cDNA از cDNA Synthesis Kit مربوط به شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده شد.

انتخاب آغازگرها و واکنش Real-time PCR

آغازگرهای مربوط به ژن‌های IRAK1 و TRAF6 از Moyes و همکاران (۲۰۰۹) و آغازگر ژن 18sRNA از Hillreiner و همکاران (۲۰۱۷) انتخاب و اختصاصیت آن‌ها توسط برنامه آنلاین پرایمر بلاست مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

واکنش Real-time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و کیت SYBR Green qPCR master Mix از شرکت یکتا تجهیز آزما در دستگاه PCR شرکت کوربت (Corbett, Rotor gene 3000) انجام و از ژن 18S rRNA به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. واکنش تکثیر در حجم ۱۵ میکرولیتر حاوی ۷/۵ میکرولیتر مستر میکس سایبرگرین، ۱ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت و ٤/٥ میکرولیتر آب عاری RNAase در تیوب‌های ۰/۲ میکرولیتر روی رک سرد تهیه شد. در این پژوهش برای رسم منحنی استاندارد شش رقت مختلف از cDNA تهیه شد رقیق‌سازی به صورت سریالی با ضریب ۰/۱ انجام شد به‌طوری که غلظت استاندارد شماره شش یک میلیونیوم ($۱۰^{-٦}$) استاندارد شماره یک بود. چرخه‌های حرارتی Real-time PCR به‌صورت واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ٤۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد در ۱۵ ثانیه، ٦۰ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ٤٥ ثانیه تنظیم شد. جهت رسم منحنی ذوب افزایش تدریجی دما از ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

جدول ۱– مشخصات آغازگرها استفاده شده در پژوهش حاضر

ژن	توالی (′۳...′۵)	دمای اتصال (°C)	شماره دسترسی NCBI
IRAK1	F- CCTCAGCGACTGGACATCCT R- GGACGTTGGAACTCTTGACATCT	٦۰	DQ319075
TRAF6	F- AGAACAGATGCCCAATCACTATGAT R- GTGATTCCTCTGCATCTTTTCATG	٦۰	DQ319074
I8SrRNA	F- CGGGGAGGTAGTGACGAAA R- CCGCTCCCAAGATCCAACTA	٦۰	AF176811.1

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-21]

تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از به‌دست آوردن اطلاعات Ct نمونه‌ها از دستگاه Real-time PCR مقادیر عددی Ct به نرم‌افزار Microsoft excel Worksheet منتقل شده و میزان بیان نسبی با روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ (Livak and Schmittgen 2001) اندازه‌گیری شد. تفاوت آماری بین میزان بیان ژن در دو گروه مورد مطالعه با استفاده از آزمون t–استیودنت و نرم‌افزار آماری SAS ویرایش ۹/۱ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

در بیماری ورم پستان اثرات عفونی کاملاً وابسته به پاسخ‌های التهابی میزبان از جمله ترشح سیتوکین‌ها می‌باشد (Vitenberga-Verza et al. 2022). در پژوهش حاضر بیان ژن‌های TRAF6 و IRAK1در ۱۵ نمونه گاوهای شیری هلشتاین در دو گروه سالم (۵نمونه) و بیمار (۱۰ نمونه) با استفاده از روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. روش qPCR دقیق‌ترین و حساس‌ترین روش در اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌هاست. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه به‌طور معنی‌داری بین گروه سالم و بیمار متفاوت است (جدول ۲).

ورم پستان زمانی ایجاد می‌شود که میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از طریق غده پستانی عمدتاً با ایجاد اختلال در موانع فیزیکی مانند کانال کارتیه نفوذ کنند (Goldammer et al. 2004). پس از نفوذ عوامل بیماری‌زا، در بدن حیوان نیاز به یک سیستم دفاعی سریع و توانمند برای جلوگیری از گسترش ارگانیسم‌های بیماری‌زا احساس می‌شود (Aitken et al. 2011). پاسخ سیستم ایمنی به پاتوژن مهاجم یک عامل حیاتی برای جلوگیری از ایجاد عفونت مزمن و حاد است (Bannerman 2009). بنابراین، سلول‌های اپیتلیال و اندوتلیال به‌عنوان اولین خط مقاومت در برابر عفونت‌ها، با فعال کردن واسطه‌های التهابی از جمله سیتوکین‌ها، نقش مهمی ایفا می‌کنند (Corl et al. 2008; Griesbeck-Zilch et al. 2008). Moyes و همکاران (۲۰۰۹) مطالعه‌ای را برای شناسایی مهم‌ترین مسیرها و شبکه‌های ژنی تحت تاثیر قرار گرفته در بافت پستان در پاسخ به عفونت با استرپتوکوکوس یوبریس انجام داده و نشان دادند که میزان بیان ژن‌های IRAK1 و TRAF6 که با روش qPCR اندازه‌گیری شده بود به‌طور معنی‌داری در پاسخ به آلودگی افزایش یافته است و بنابراین از ژن های اصلی ایجاد پاسخ ایمنی و متابولیک در مقابل ورم پستان القا شده توس میکروارگانیسم استرپتوکوکوس یوبریس به شمار می‌روند.

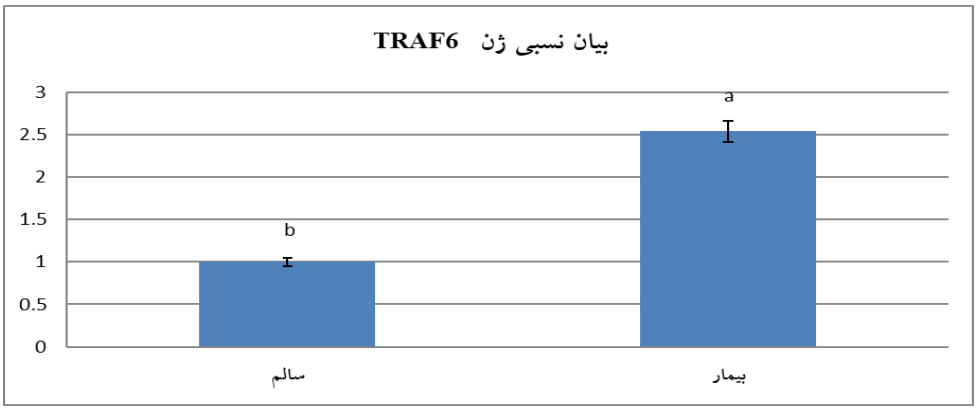
نتایج به‌دست آمده نشان داد که میزان بیان ژن TRAF6 در نمونه‌های مبتلا به ورم پستان بالینی نسبت به نمونه‌های سالم حدود ۲/۵۳ برابر بیشتر است. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بیان این ژن به‌صورت معنی‌داری (P < ۰/۰۲٤) نسبت به گروه سالم افزایش یافته است (شکل ۱، جدول ۲).

جدول ۲- نتیجه تجزیه و تحلیل آماری میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه بین دو گروه بیمار و سالم

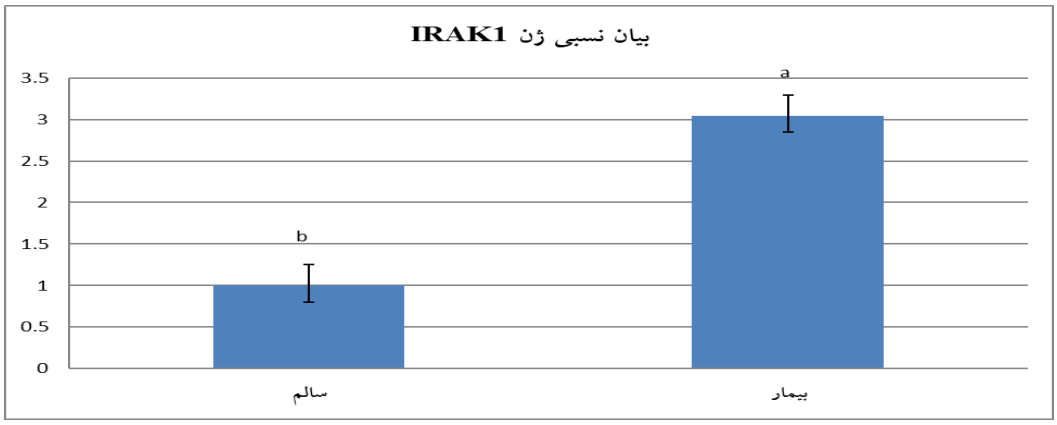
گروه	میانگین بیان ژن	
	TRAF6	IRAK1
بیمار	۲/۵۳[a*]	۳/۰٤[a]
سالم	۱[b]	۱[b]
P-value	۰/۰۲٤	۰/۰۰۱۲

*میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ستون دارای تفاوت آماری معنی‌داری هستند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-21]



شکل ۱- مقایسه میزان بیان ژن TRAF6 بین دو گروه سالم و بیمار. میزان بیان ژن TRAF6 در گروه گاوهای مبتلا به ورم پستان ۲/۵۳ برابر بیشتر از گاوهای سالم می‌باشد (P < ۰/۰۲٤).



شکل ۲- مقایسه میزان بیان ژن IRAK1 بین دو گروه سالم و بیمار. میزان بیان ژن IRAK1 در گروه گاوهای مبتلا به ورم پستان ۳/۰٤ برابر بیشتر از گاوهای سالم می‌باشد (P < ۰/۰۰۱۲).

نشان داده شده است که افزایش فعالیت و میزان بیان TRAF6 نقش مهمی در شروع و ادامه پاسخ التهابی بازی می‌کند. به‌طوری که TRAF6 به‌عنوان یک مولکول آداپتور در مسیر NF-kB عمل کرده از طریق فسفوریلاسیون Ikk منجر به القا پاسخ ایمنی شده که در نتیجه آن NF-kB فعال می‌شود. NF-kB یک فاکتور رونویسی مهم است که بیان و ترشح سایتوکاین‌های التهابی را تنظیم می‌کند (Zhang and Ghosh 2001; Griesbeck-Zilch et al. 2008).

وجود تفاوت معنی‌دار در میزان بیان ژن‌ها در پاسخ به بیماری‌های مختلف می‌تواند نتیجه‌ای از تفاوت در چندشکلی‌های ژنتیکی اتفاق افتاده در این ژن‌ها باشد. از این تفاوت‌ها می‌توان در انتخاب افراد برتر و مقاوم برای تولید نسل‌های بعدی استفاده نمود. Hemati Doust و همکاران (۲۰۱٤) ارتباط بین چندشکلی‌های ژن لاکتوفرین را با اسکور سلول‌های سوماتیک و ورم پستان تحت کلینیکی در ۱۲۱ رأس گاو هلشتاین مورد مطالع قرار داده و نشان دادند که افراد دارای ژنوتیپ AB در جایگاه مورد مطالعه دارای کمترین میزان اسکور سلول‌های سوماتیک بوده و لذا می‌تواند به‌عنوان والد نسل بعد برای ایجاد یک جمعیت مقاوم در برابر ورم پستان مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میزان بیان ژن IRAK1 در نمونه‌های بیمار نسبت به نمونه‌های سالم ۳/۰٤ برابر بیشتر شده و تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بیان این ژن به‌صورت معنی‌داری (P < ۰/۰۰۱۲) افزایش یافته است (جدول ۲ و شکل ۲).

نشان داده شده است که ژن‌های TRAF6 و IRAK1 انسانی، توسط miRNAهای hsa-miR-146a و hsa-miR-146b مورد هدف قرار گرفته و لذا مسیرهای NF-kB را مهار می‌کند (Taganov et al. 2006; Curtale et al. 2013). به‌طوری که miR-

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-21]

146a بیان IRAK1 و TRAF6 را در انسان و موش با هدف قرار دادن مستقیم UTR ۳' مهار می‌کند (Taganov et al. 2006; Dai et al. 2016). علاوه بر این، داده‌های Xing و همکاران (۲۰۱۷)، نشان داد که سرکوب بیان TRAF6 با واسطهbta-miR-146a، فعالیت NF-kB را مهار می‌کند. این یافته با مطالعات قبلی روی انسان و موش مطابقت دارد (Taganov et al. 2006; Sha et al. 2013؛ Gao et al. 2015; Park et al. 2015).

در مطالعه Trigo و همکاران (۲۰۰۹)، افزایش قابل توجهی در سطوح سیتوکین‌های پیش التهابی IL-2، IL-6، TNF-a و IL-1b در گاوهای شیرده مبتلا به ورم پستان بالینی مشاهده شد. تغییرات در غلظت این پیش التهابی با ایجاد علائم بالینی بیماری همزمان بود. در مطالعه ما افزایش قابل توجهی در نشانگرهای TRAF6 و IRAK1 در گاوهای مبتلا به ورم پستان نشان داد که با مطالعه قبلی همسو است. همچنین در پژوهش Bannerman (۲۰۰۹) تغییر غیر قابل توجه TGF-b در گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی ممکن است به‌دلیل عملکرد مهم آن در تعدیل پاسخ التهابی باشد.

در توافق با یافته‌های پژوهش حاضر، در مطالعه Tabasum و همکاران(۲۰۲۰) سیتوکین‌های پیش التهابی و ضد التهابی (IL-2، IL-1b، IL-6، TGF-b، IL-10، TNF-a)، لاکتوفرین و آلبومین و ترکیب شیر را در لبنیات معمولی مورد بررسی قرار گرفت. گاوهای شیرده مبتلا به ورم پستان بالینی افزایش قابل توجهی در IL-2، IL-6، IL-1b، TNF-a و کاهش سطوح ضد التهابی TGF-b و IL-10، پارامترهای شیر چربی، پروتئین، SNF، لاکتوز نشان دادند.

نتیجه‌گیری کلی

امروزه با پیشرفت همه جانبه زندگی، نیاز بیشتری به تولید شیر با کیفیت و با بار میکروبی کمتر و عاری از هرگونه آنتی بیوتیک و یا مواد شیمیایی احساس می‌شود. به‌همین علت، واحدهای دامپروری به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع تأمین محصولات لبنی و پروتئینی نقش به‌سزایی در امنیت غذایی جامعه ایفا می‌کنند. از این‌رو به‌منظور تولید پایدار در عرصه تامین محصولات لبنی، حفظ سلامت دام از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مشکلات سلامت دام به‌خصوص بیماری‌های واگیردار مانند ورم پستان که اصلی‌ترین تلفات اقتصادی را در پی دارد نیازمند توجه ویژه می‌باشد. شناسایی راه‌حل‌هایی برای توسعه راهبردهای کنترلی این بیماری شایع، از اهمیت زیادی برخوردار بوده و درمان آن توجیه اقتصادی قابل توجهی برای صنعت پرورش گاو شیری جهان دارد. در پژوهش حاضر بیان نسبتاً بالای ژن‌های TRAF6 وIRAK1 در گروه مبتلا به ورم پستان بالینی نسبت به دام‌های سالم مشاهده شد که از آن می‌توان به فهم بهتر نقش ژن‌های TRAF6 وIRAK1 در سیستم دفاعی غدد پستان و طراحی آزمایش‌های جدید برای شناسایی چندشکلی‌های وجود در این ژن‌ها جهت استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاح نژادی جهت شناسایی دام‌های مقاوم در برابر ورم پستان استفاده نمود.

منابع

همتی دوست وحید، رحیمی میانجی قدرت، فرهادی ایوب (۱۳۹۵) بررسی ارتباط چندشکلی ژن عامل نکروزکننده بافتی با نمره سلول های بدنی شیر در گاوهای شیری. پژوهش‌های تولیدات دامی ۱۳ :۱۷۷-۱۷۱.

Aitken SL, Corl CM, Sordillo LM (2011) Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. Journal of mammary gland biology and neoplasia 16:291-304.

Bannerman DD (2009) Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intra-mammary infection of dairy cows. Journal of Animal Science 87:10-12.

Bradley A (2002) Bovine mastitis: an evolving disease. Veterinary Journal 164:116-128.

Burvenich C, Van Merris VMehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau A (2003) Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors. Veterinary Research 34:521-564.

Coelho MLV, dos Santos Nascimento J. Fagundes PC, Madureira DJ, de Oliveira SS, de Paiva Brito MAV, de Freire Bastos MDC (2007) Activity of staphylococcal bacteriocins against Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae involved in bovine mastitis. Research in microbiology 158:625-630.

Curtale G. Mirolo M. Renzi TA. Rossato M. Bazzoni F. Locati M (2013) Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10–dependent microRNA-146b.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-21]

Proceedings of the National Academy of Sciences 110:11499-11504.
Dai Y, Jia P, Fang Y, Liu H, Jiao X, He JC, Ding X (2016) miR-146a is essential for lipopolysaccharide (LPS)-induced cross-tolerance against kidney ischemia/reperfusion injury in mice. Scientific reports 6: 27091.
Fonseca I, Silva PV, Lange CC, Guimarães MF (2009). Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. Genetics and molecular biology 32:776-781.
Gao M, Wang X, Zhang X, Ha T, Ma H, Liu L, Kalbfleisch JH, Gao X, Kao RL, Williams DL, Li C (2015) Attenuation of cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis by microRNA-146a is mediated via targeting of IRAK1 and TRAF6 expression. The Journal of Immunology, 195:672-682.
Gilmore TD (2006). Introduction to NF-κ B: players, pathways, perspectives. Oncogene 25:6680-6684.
Goldammer TH, Zerbe H, Molenaar A, Schuberth HJ, Brunner RM, Kata SR, Seyfert HM (2004) Mastitis increases mammary mRNA abundance of –defensin 5, Toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but Not TLR9 in cattle. Clinical and Vaccine Immunology 11:174-185
Griesbeck-Zilch B, Meyer HHD, Kühn CH, Schwerin M, Wellnitz O (2008) Staphylococcus aureus and Escherichia coli cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells. Journal of dairy science 91:2215-2224.
Hartog, G, Savelkoul HF, Schoemaker R, Tijhaar E, Westphal AH, de Ruiter T, ... & van Neerven RJ (2011) Modulation of human immune responses by bovine interleukin-10. *PloS one 6*: e18188.
Hayden, M.S. et al. (2006) NF-kB and the immune response. Oncogene 25:6758-6780.
Hemati Doust V, Rahimi G, Farhafi A (2014) Association between bovine lactoferrin gene variants and somatic cell count in milk based on EcoRI restriction site. Iranian Journal of Veterinary Research 15:62-65.
Hillreiner, M., Schmautz, C., Ballweg, I., Korenkova, V., Pfaffl MW, Kliem H (2017) Gene expression profiling in pbMEC–in search of molecular biomarkers to predict immunoglobulin production in bovine milk. BMC veterinary research 13: 1-14.
Kawai T, Akira S (2007) Signaling to NF-κB by Toll-like receptors. Trends in molecular medicine 13: 460-469.
Lawrence T (2009) The nuclear factor NF-κB pathway in inflammation. Cold Spring Harbor perspectives in biology 1:a001651.
Lewandowska-Sabat AM, Günther J, Seyfert HM, Olsaker I (2012) Combining quantitative trait loci and heterogeneous microarray data analyses reveals putative candidate pathways affecting mastitis in cattle. Animal Genetics 43:793-799.
Li J, Liu N, Tang L, Yan B, Chen X, Zhang J, Peng C (2020) The relationship between TRAF6 and tumors. Cancer Cell International 20:1-12.
Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods 25:402-408.
Lopez-Villalobos U, Begley N, McCoy F, Brien BO, Grady LO, Shalloo L (2012) Estimating the effect of mastitis on the profitability of Irish dairy farms. Dairy Science 7:3662-3673.
Moyes KM, Drackley JK, Morin DE (2009) Gene network and pathway analysis of bovine mammary tissue challenged with Streptococcus uberis reveals induction of cell proliferation and inhibition of PPARγ signaling as potential mechanism for the negative relationships between immune response and lipid metabolism. BMC Genomics 10:542
Park H, Huang X, Lu C, Cairo MS, Zhou X (2015) MicroRNA-146a and MicroRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins Journal of Biological Chemistry 290:2831-2841.
Paul PK, Bhatnagar S, Mishra V, Srivastava S, Darnay BG, Choi Y (2012) The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. Molecular and cellular biology 32:1248-59.
Paul PK, Gupta SK, Bhatnagar S, Panguluri SK, Darnay BG, Choi Y, Kumar A (2010) Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. Journal of Cell Biology 191:1395-1411.
Petrovski KR, Trajcev M, Buneski G (2006) A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. Journal of the South African Veterinary Association 77:52-60.
Puech C, Dedieu L, Chantal I, Rodrigues V (2015) Design and evaluation of a unique SYBR Green real-time RT-PCR assay for quantification of five major cytokines in cattle, sheep and goats. BMC Veterinary Research 1:65-75.
Radostitis OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (2007) Veterinary Medicine, Saunders co., Spain prin., 673-749.
Sha M, Ye J, Zhang L, Luan Z, Chen Y (2013) Celastrol induces apoptosis of gastric cancer cells by miR-146a inhibition of NF-κB activity .Cancer Cell International 13:50
Tabasum S, Sheikh Bilal A, Muneeb U (2020) Rehman, Showkeen Muzamil, Rahil Razak Bhat, Ishraq Hussain, Nazirah Bashir, Manzoor Ur Rahman Mir, Bilal Ahamad Paray, Mahmoud A.O. Dawood.(2020). Investigations on cytokines and proteins in lactating cows with and without naturally occurring mastitis. Journal of King Saud University – Science 32:2863-2867
Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:12481-12486.
Trigo G, Ma´ rciaDinis M, Angela FA, Andrade E, Costa R, Paula FP, Tavares D (2009) Leukocyte populations and cytokine expression in the mammary gland in a mouse model of Streptococcus agalactiae mastitis. Journal of Medical Microbiology 58:951-958.
Vitenberga-Verza Z, Pilmane M, Šerstņova K, Melderis I, Gontar Ł, Kochański M, ... Prieto-Simón B (2022) Identification of inflammatory and regulatory cytokines

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-21]

IL-1α-, IL-4-, IL-6-, IL-12-, IL-13-, IL-17A-, TNF-α-, and IFN-γ-producing cells in the milk of dairy cows with subclinical and clinical mastitis. Pathogens 11:372.

Walsh MC, Lee J, Choi Y (2015) Tumor necrosis factor receptor- associated factor 6 (TRAF 6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. Immunological reviews 266:72-92.

Xia L, Tan S, Zhou Y, Lin J, Wang H, Oyang L, ... & Liao Q (2018) Role of the NFκB-signaling pathway in cancer. OncoTargets and therapy 2063-2073.

Xing-Ping W, Zhuo-Ma L, Lin-Sen Z, Feng L, Na L (2017) Bovine miR-146a regulates inflammatory cytokines of bovine mammary epithelial cells via targeting the TRAF6 gene, Journal of Dairy Science 100:7648-7658.

Yamamoto M, Gohda J, Akiyama T, Inoue JI (2021) TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) plays crucial roles in multiple biological systems through polyubiquitination-mediated NF-κB activation. Proceedings of the Japan Academy, Series B 97:145-160.

Zhang G, Ghos S (2001) Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: A phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. Journal of Clinical Investigation 107:13-19.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-21]