

# Utjecaj polimorfizma TLR4 gena na sastav i kvalitetu mlijeka u mliječnim krava

---

**Oštrić, Bruno**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:025490>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-24**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
STUDIJ *VETERINARSKA MEDICINA*

DIPLOMSKI RAD

Bruno Oštrić

Utjecaj polimorfizma *TLR4* gena na sastav i kvalitetu mlijeka u mliječnim krava

Zagreb, 2024.

Bruno Oštrić

Odjel za animalnu proizvodnju i biotehnologiju  
Zavod za uzgoj životinja i stočarsku proizvodnju

Predstojnica zavoda: prof. dr. sc. Anamaria Ekert Kabalin, redovita profesorica u trajnom zvanju

Mentori:

1. izv. prof. dr. sc. Maja Maurić Maljković, izvanredna profesorica
2. dr. sc. Ivan Vlahek, poslijedoktorand

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Velimir Sušić, redoviti profesor u trajnom zvanju
2. izv. prof. dr. sc. Sven Menčik, izvanredni profesor
3. izv. prof. dr. sc. Maja Maurić Maljković, izvanredna profesorica
4. dr. sc. Ivan Vlahek, poslijedoktorand (zamjena)

Rad sadržava 25 stranica, 3 slike, 6 tablica, 27 literaturnih navoda.

## *Zahvala*

*Zahvaljujem mentorima izv. prof. dr. sc. Maji Maurić Maljković i dr. sc. Ivanu Vlaheku na strpljenju koje su pokazali prema meni i velikom trudu koji su uložili u ovaj diplomski rad. Bilo mi je izuzetno zadovoljstvo raditi s vama.*

*Također bi zahvalio i svim djelatnicima Zavoda za uzgoj životinja i stočarsku proizvodnju na svemu što su me naučili tijekom školovanja i ugodnoj radnoj atmosferi.*

*Hvala obitelji na podršci i uzdržavanju tijekom školovanja te omogućavanju bezbrižnog života.*

*Hvala prijateljima na pomoći tijekom studiranja i smijanju tijekom predavanja.*

## KRATICE

TLR – toll like receptori

PAMP – patogenima pridruženi molekularni sljedovi (engl. *pathogen associated molecular patterns*)

RH – Republika Hrvatska

EU – Europska Unija

HF – Holštajn frizijska pasmina (engl. *Holstein Friesian*)

BSS – broj somatskih stanica

HAPIH – Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

pb – parovi baza

RFLP – metoda cijepanja umnoženog specifičnog odsječka DNK (engl. *restriction fragment length polymorphism*)

## POPIS PRILOGA

### Popis slika

Slika 1. Kretanje brojnog stanja goveda u RH i EU u razdoblju od 2014. do 2023. godine

Slika 2. Usporedba brojnosti i količine mlijeka (kg) u standardnoj laktaciji (HF) krava u razdoblju od 2019. do 2023. godine

Slika 3. Razdvajanje dobivenih DNK produkata nakon cijepanja restriktivnim enzimom *Alu* I na agaroznom gelu (2%) za *TLR4* SNP c.9421 C>T. U slučaju genotipa TT prisutan je odsječak od 260 pb, genotipa TC 260, 142 i 118 pb, a genotipa CC 142 i 118 pb. Odsječci 77, 32 i 13 pb prisutni su u svih genotipova.

### Popis tablica

Tablica 1. Usporedba sastava mlijeka kod krave, ovce i koze (WILLIAMS, 2019.)

Tablica 2. Veličina PCR produkta i restriktivnih odsječaka po genotipovima

Tablica 3. Učestalosti alela i genotipova za SNP c.9421 C>T *TLR4* gena u istraživanoj skupini HF krava

Tablica 4. Učestalosti alela i genotipova za SNP c.9421 C>T *TLR4* gena u 17 HF krava za koje su bili dostupni proizvodni podatci

Tablica 5. Količina mlijeka, mliječne masti i bjelančevina te udjeli mliječne masti i bjelančevina u standardnoj laktaciji za SNP c.9421 C>T *TLR4* gena u HF krava za koje su bili dostupni proizvodni podatci. Rezultati su prikazani kao medijan (minimum – maksimum).

Tablica 6. Genotip SNP-a c.9421 C>T *TLR4* gena, količina mlijeka, mliječne masti i bjelančevina te udjeli mliječne masti i bjelančevina u standardnoj laktaciji za svaku HF kravu pojedinačno.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>3</b>
2.1. Mliječno govedarstvo i proizvodnja kravljeg mlijeka.....	3
2.2. Mliječna žlijezda .....	5
2.2.1. Sastav mlijeka .....	5
2.3. Mastitis .....	6
2.4. Toll like receptori .....	7
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>9</b>
3.1. Životinje obuhvaćene istraživanjem.....	9
3.2. Prikupljanje podataka o fenotipu.....	9
3.3. Izolacija genomske DNK .....	9
3.4. Umnažanje ciljanog odsječka lančanom reakcijom polimeraze.....	10
3.5. Metode cijepanja umnoženog specifičnog odsječka DNK i analiza restrikcijskog odsječka .....	10
3.6. Statistička obrada podataka .....	11
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>12</b>
4.1. Analize duljine restrikcijskih odsječaka.....	12
4.2. Učestalosti alela i genotipova.....	13
4.3. Povezanost SNP-a c.9421 C>T TLR4 gena i proizvodnih svojstava krava u standardnoj laktaciji .....	14
<b>6. RASPRAVA</b> .....	<b>17</b>
<b>7. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>19</b>
<b>8. LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
<b>9. SAŽETAK</b> .....	<b>23</b>
<b>10. SUMMARY</b> .....	<b>24</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>25</b>

## 1. UVOD

Govedarstvo predstavlja jednu od najvažnijih grana stočarske proizvodnje i često se koristi kao pokazatelj stanja u poljoprivredi jedne zemlje. Proizvodnja mlijeka kao najznačajniji dio govedarske proizvodnje od strateškog je značenja za razvoj poljoprivrede.

Mlijeko je tekući proizvod mliječne žlijezde sisavaca koji se luči nakon poroda te ima ulogu prehrane mladunčadi. Zbog svog sastava bogatog kalcijem, bjelančevinama, vitaminima i mineralima naišlo je na široku upotrebu u ljudskoj prehrani (WANG i sur., 2018.). Koristi se kozje, kravlje, ovčje i rjeđe još neka mlijeka. Međutim zbog velike količine i njegove kvalitete, najčešće je korišteno kravlje mlijeko. Čak se i vrijednost krave procjenjuje količinom i kvalitetom mlijeka koje proizvodi (više mlijeka-veća vrijednost). Krave koje nisu zdrave daju manje mlijeka pa je u mljekarskoj industriji prepoznata važnost održavanja kvalitete života i zdravlja krava.

Najčešća bolest na mliječnim farmama je mastitis. Mastitis je upala mliječne žlijezde koja može biti zarazne i nezarazne etiologije. Dovodi do smanjenog lučenja mlijeka i njegove lošije kvalitete što, posljedično, dovodi do velikih financijskih gubitaka. Dijagnostički najbitnija promjena u sastavu mlijeka je povećan broj somatskih stanica (BSS). Njihov se broj u mlijeku mijenja, osobito u prisutnosti bakterija. Stoga su somatske stanice pokazatelj zdravlja vimena krava, ali i higijenske prihvatljivosti mlijeka. Subklinički mastitis je mastitis bez vidljivih promjena na vimenu i u mlijeku, ali s povećanim brojem somatskih stanica i ujedno lošijom kvalitetom mlijeka. To je glavni razlog financijskih gubitaka jer se teško dijagnosticira. Najčešći uzrok mastitisa su bakterije, ali to mogu biti i gljivice, virusi, loš menadžment mužnje i loš menadžment na farmi (CHEN i sur., 2021.). Također, bitnu ulogu u nastanku mastitisa ima i genetika.

Kod mliječnih krava je mastitis vrlo čest pa je proučavanje obrane organizma i liječenje od ove bolesti zauzelo značajno mjesto u znanstvenim istraživanjima i radovima. Otkriveno je da veliku ulogu u obrani organizma od mastitisa imaju toll like receptori (TLR). To su transmembranske bjelančevine koje su uključene u stečeni i prirodni imunosni odgovor domaćina. Oni omogućuju organizmu da prepozna patogene pridružene molekularne sljedove, PAMP (engl. *pathogen associated molecular patterns*). PAMP čine brojne molekularne strukture raznih mikroba kao što su bakterije, virusi, gljivice i protozoe. Osim PAMP-a prepoznaju i kemijske molekule koje se otpuštaju u organizmu prilikom upalnih procesa ili nekroze nekog tkiva (MAURIĆ MALJKOVIĆ i sur., 2023.). TLR4 je receptor koji prepoznaje strukturalne molekule prvenstveno Gram-pozitivnih bakterija, ali i nekih Gram-



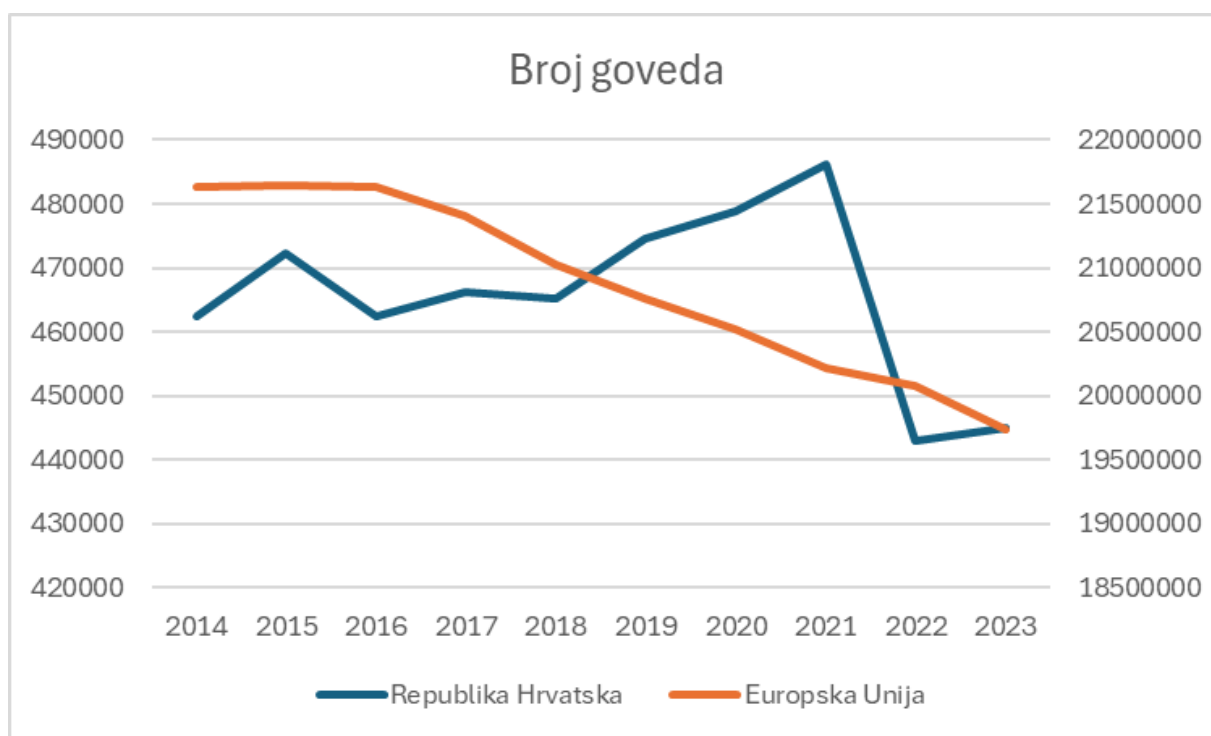
negativnih bakterija. Otkriven je porast TLR4 bjelančevina u vimenu krava tijekom mastitisa što ukazuje na mogućnost povezanosti TLR4 bjelančevine s mastitisom. *TLR4* gen je sklon mutacijama, što otvara mogućnost da je neka mutacija povoljnija u obrani domaćina od mastitisa.

Cilj ovog rada je utvrditi polimorfizam c.9421 C>T *TLR4* gena, njegovu učestalost i utjecaj na sastav mlijeka i BSS.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Mliječno govedarstvo i proizvodnja kravljeg mlijeka

Govedarska proizvodnja je najjača grana stočarstva u Republici Hrvatskoj (RH) koja ima dugu tradiciju. Ukupan broj goveda u Republici Hrvatskoj na kraju 2023. godine bio je 445015, a ukupan broj krava 136585. U odnosu na 2022. godinu ukupan broj krava smanjen je za 2,8 % (3981 krava). Broj mliječnih i kombiniranih pasmina je 113865 krava, što je za 6465 manje u odnosu na 2022. godinu. Navedeno smanjenje broja goveda prati općeniti trend smanjenja broja goveda u RH, kao i općenito u Europskoj Uniji (EU) u zadnjih 10 godina (Slika 1) (HAPIH, 2024.; AHDB, 2024.).

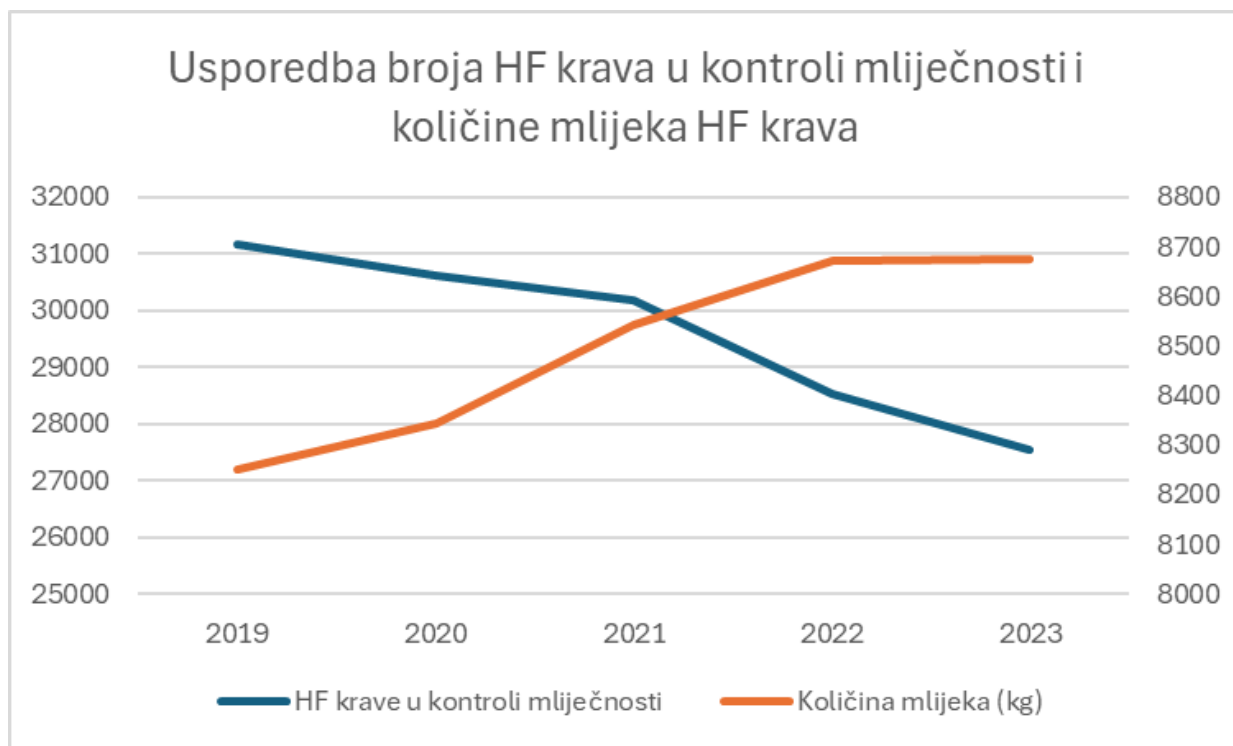


Slika 1. Kretanje brojnog stanja goveda u RH i EU u razdoblju od 2014. do 2023. godine

Najčešće pasmine u Republici Hrvatskoj su simentalaska pasmina i holštajn frizijska pasmina, koje zajedno čine 74,12% ukupne populacije krava RH. Potom slijede križanci (11,42%), buša (2,95%) te ostatak koji čini 11,51% (HAPIH, 2024.).

Holštajn frizijska pasmina (engl. *Holstein Friesian*, HF) je druga najzastupljenija pasmina u RH s 21,41% (29240 jedinki) ukupne populacije krava. HF je najproduktivnija pasmina na svijetu po pitanju mliječnosti te se stoga prvenstveno drži za proizvodnju mlijeka.

Križanjem crnog goveda s Batavskog otoka i frizijske bijele krave dobivena je životinja koja je proizvodila najviše mlijeka uz ograničene izvore hrane. Ove su životinje genetski evoluirale u učinkovitu, visokoproizvodnu crno-bijelu mliječnu kravu, danas poznatu kao Holstein-Friesian (HOLSTEIN ASSOCIATION USA, 2024.). U RH prosječna krava ove pasmine daje 8674 kg mlijeka u standardnoj laktaciji (305 dana) s 4,2% mliječne masti i 3,5% bjelančevina (HAPIH, 2024.). Prosječna HF krava u SAD-u proizvede oko 10400 kg mlijeka u svakoj laktaciji, što iznosi 34 litre mlijeka po kravi dnevno (HOLSTEIN ASSOCIATION USA, 2024.). Iako je broj mliječnih i HF goveda zadnjih godina u padu, proizvodnja mlijeka po kravi je u blagom porastu (Slika 2) (HAPIH, 2020.; HAPIH, 2021.; HAPIH, 2022.; HAPIH, 2023.; HAPIH, 2024.).



Slika 2. Usporedba brojnosti i količine mlijeka (kg) u standardnoj laktaciji (HF) krava u razdoblju od 2019. do 2023. godine

## 2.2. Mliječna žlijezda

Mliječna žlijezda ili vime je tubuloalveolarna kožna žlijezda koja služi za izlučivanje mlijeka. Vime krave je veliko te je zbog toga vezano uz trup čvrstim suspenzornim ligamentom. Sastoji se od četiri četvrti koje su međusobno nezavisne i odvojene vezivnim tkivom. Vezivno tkivo prodire u četvrti te ih dijeli na režnjeve i režnjiće. Svaka četvrt je građena od sise, mliječne cisterne (sisne i žljezdane cisterne), mliječnih kanalića i žljezdanog parenhima. Žljezdani parenhim se sastoji od sitnih razgranatih kanalića koji se proširuju u sekrecijske mjehuriće ili alveole (DYCE i sur., 2010.).

Lučenje mlijeka započinje sintezom u epitelu alveola nakon čega se luči u lumen alveola. Iz alveola pasivno ističe u mliječne kanale pa aktivno, uz pomoć mioepitelnih stanica, odlazi u mliječne kanaliće (BRAUN i FORSTER, 2012.). Osnovni preduvjet lučenja mlijeka je redovito pražnjenje vimena. Za početak lučenja mlijeka potrebni su taktilni i termički podražaji kao što su sisanje i mužnja.

### 2.2.1. Sastav mlijeka

Mlijeko je jedini oblik prehrane za mladunčad prvih par mjeseci njihova života, stoga mora biti bogato hranjivim tvarima poput masti, bjelančevina, šećera (laktoze), vitamina i minerala. Sastav mlijeka razlikuje se od vrste do vrste (Tablica 1). U većini slučajeva, mlijeko i mliječni proizvodi koje ljudi proizvode i konzumiraju su kravljeg podrijetla (JENSEN, 1995.; PATTON, 2005.; HAUG i sur., 2007.).

Tablica 1. Usporedba sastava mlijeka kod krave, ovce i koze (WILLIAMS, 2019.)

	<b>Krava</b>	<b>Koza</b>	<b>Ovca</b>
<b>Kazein (g/100g)</b>	3,0	2,4	4,7
<b>Mliječna mast (g/100g)</b>	3,7	4,3	6,1
<b>Laktoza (g/100g)</b>	4,7	4,1	4,8
<b>Bjelančevine (g/100g)</b>	3,4	3,7	5,5

Najpromjenjiviji sastojak mlijeka je mliječna mast (lipidi) koja može činiti 2,5-6% mlijeka. Daje ugodan okus, aromu, konzistenciju i teksturu mliječnim proizvodima. Također, ima najveću energetska vrijednost (37 kJ/g). Većina lipida u mlijeku su triacilgliceroli (oko 95%), dok ostatak čine diacilgliceroli, monoacilgliceroli, steroli (kolesterol) i fosfolipidi (lecitin) (JENSEN, 1995.; PATTON, 2005.; HAUG i sur., 2007.).

Bjelančevine čine 3,2-3,8% mlijeka. Energetska vrijednost bjelančevina iznosi oko 17 kJ/g. Mliječne bjelančevine se dijele na bjelančevine sirutke i kazein. Kazein čini oko 80% mliječnih bjelančevina i u mlijeku se nalazi u obliku micela. Micele kazeina su nakupina određenog broja manjih globularnih jedinica "submicela" koje nastaju povezivanjem kazeinskih frakcija. Proteini sirutke čine oko 20% mliječnih bjelančevina i puno su stabilniji od kazeina. Tu spadaju i imunoglobulini koji su nam bitni kod prijenosa imuniteta s krave na tele.

Svježe kravlje mlijeko sadrži oko 4,7% laktoze. To je disaharid kojeg čine glukoza i galaktoza. Jedini je izvor galaktoze u ljudskoj prehrani i proizvodi se iz glukoze u krvi.

Mlijeko još sadrži puno minerala (kalcij, selen, željezo, magnezij, fosfor, kalij, natrij, cink, jod), vitamina (A, D, E, C, B1, B2, B6, B12, pantotenska kiselina, niacin, biotin i folna kiselina) i enzima, kojih ima preko 60 (lipaze, fosfataze, peroksidaze, katalaze, reduktaze).

### 2.3. Mastitis

Mastitis je upala mliječne žlijezde koja može biti zarazne i nezarazne etiologije. Većinom je uzrokovan bakterijama koje otpuštaju toksine i oštećuju mliječnu žlijezdu. To dovodi do smanjene produkcije i promijene u sastavu mlijeka. Uzrokuje izlučivanje i zamjenu oboljelih krava te posljedično velike ekonomske gubitke u proizvodnji. S obzirom na kliničku sliku, dijelimo ga na subklinički i klinički mastitis. Kod subkliničkog mastitisa nema vidljivih promjena na vimenu ili mlijeku, ali postoji mikrobna kultura u mlijeku. To uzrokuje upalni proces i povećan BSS. Klinički oblik nastaje naglo (temperatura, smanjen apetit, smanjene ruminacije, ubrzan puls, dehidracija, slabost i depresija), vime je crveno, otečeno i bolno, a mlijeko se slabije luči i promijenjenog je sastava. Promijene u sastavu mlijeka su: povećan BSS, povišeni natrij, kloridi, serumski albumini, imunoglobulini i transferini, sniženi kalij, kalcij, laktoza, mast i kazein te povišeni pH mlijeka (SHARMA i sur., 2015.; WANG i sur., 2018.; MIŠEIKIENĖ i sur., 2020.; CHEN i sur., 2021.; YANG i sur., 2022.).

Bakterije koje uzrokuju mastitis se mogu podijeliti na zarazne bakterije i bakterije iz okoliša. Zarazne bakterije se šire između inficiranih četvrti, dobro su adaptirane na život u vimenu i često uzrokuju blage, kronične infekcije. Najčešće zarazne bakterije vimena su *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*, dok su *Corynebacterium bovis* i

*Mycoplasma bovis* nešto rjeđi. Bakterije iz okoliša uzrokuju infekcije ulaskom kroz sisni kanal najčešće u suhostaju ili u razdoblju oko teljenja. Nalaze se u tlu i stelji te ih se nemoguće riješiti. Najčešći uzročnici koji ovim načinom inficiraju vime su *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.* i druge bakterije koje se fiziološki nalaze u probavnom sustavu goveda (SHARMA i sur., 2015.; CHEN i sur., 2021.; YANG i sur., 2022.).

Na zdravlje mliječne žlijezde utječu lokalni obrambeni mehanizmi, genetika, menadžment i okoliš u kojem se krava nalazi (CHEN i sur., 2021.). Lokalni obrambeni mehanizmi podrazumijevaju leukocite, specifična protutijela, nespecifične čimbenike imunosti i sisni kanal. Sisni kanal sadrži sfinkter koji zatvara kanal te predstavlja mehaničku barijeru za bakterije iz okoliša. Od genetskih preduvjeta koji utječu na razvitak mastitisa mogu se izdvojiti oblik vimena i sisa te razni kandidatni geni za otkrivanje genetske varijacije ekonomski bitnih svojstava farmskih životinja. Određeni oblici vimena i krajeva sisa su predodređeni nastanku mastitisa kao na primjer viseće vime ili uvrnuti kraj sise. Što se tiče menadžmenta, najbitnija je higijena sisa. Muzna oprema i ruke mužača moraju biti čisti, a sise se moraju dezinficirati prije i nakon mužnje da bi se spriječio prodor mikroorganizama u sisu. Okoliš krave bi trebao biti što suši jer vlaga i visoka temperatura potiču rast bakterija. Staja bi trebala imati odgovarajuću ventilaciju i ne bi smjela biti prenapučena. Sama staja i prostor oko staje bi trebali biti što čišći kako bi smanjili mogućnost nastanka infekcije.

Rana prevencija kliničkih i subkliničkih mastitisa treba biti prioritet svake farme mliječnih goveda. U dijagnostici mastitisa je najbitniji BSS. Somatske stanice u mlijeku su brojne upalne stanice (najčešće leukociti), stanice mikroba i stanice sekretornog epitela vimena. Neki autori smatraju da je prihvatljiv BSS 100 000 stanica/ml mlijeka (CHEN i sur., 2021.). U RH je dozvoljen broj somatskih stanica 400.000 stanica/ml mlijeka (NN 136/2020.).

U istraživanjima se daje veliki naglasak na mutacije u kandidatnim genima koji su kroz različite puteve potencijalno uključeni u sprječavanje mastitisa. Danas postoji već mnogo gena za čije polimorfizme se pretpostavlja da mogu utjecati na pojavnost mastitisa u krava (NOORI i sur., 2014.; SHARMA i sur., 2015.; ZHOU i sur., 2017.; WANG i sur., 2018.; MIŠEIKIENĖ i sur., 2020.; CHEN i sur., 2021.; YANG i sur., 2022.). U navedenu skupinu spadaju i toll like receptori.

#### 2.4. Toll like receptori

Toll like receptori (TLR) su sastavni dio imunskog sustava svakog domaćina. To su transmembranske bjelančevine koje prepoznaju sastavne dijelove raznih mikroba. Na temelju različitih uloga, strukture i položaja dijele se na više skupina. U sisavaca postoji 13 skupina

TLR-ova (TLR1-13), dok se u ljudi i goveda može pronaći 10 različitih receptora (TLR1-10) (NOORI i sur., 2014.; SHARMA i sur., 2015.; ZHOU i sur., 2017.; WANG i sur., 2018.; MIŠEIKIENĖ i sur., 2020.; CHEN i sur., 2021.; YANG i sur., 2022.).

Uloga TLR-a je prepoznavanje patogenima pridruženih molekularnih sljedova, (engl. *pathogen associated molecular patterns*, PAMP). U PAMP-e spadaju strukture bakterija, virusa, gljivica i protozoa. Osim toga, reagiraju i na molekule koje se otpuštaju tijekom upalnih procesa, nekroze stanica ili su proizvod tumorskih stanica. TLR-ovi koji se nalaze na površini stanice reagiraju na PAMP-e koji se nalaze izvan stanice i potiču nastajanje pro-upalnih čimbenika. Unutarstanični TLR-ovi se nalaze na endoplazmatskom retikulumu i reagiraju na virusne i bakterijske nukleinske kiseline te potiču nastajanje interferona 1 (MAURIĆ MALJKOVIĆ i sur., 2023.).

Građeni su od vanstanične N- terminalne ektodomene, transmembranske domene i unutarstanične C-terminalne domene. Ektodomena ima oblik potkove za koju se vežu PAMP-i, a unutarnja C-terminalna domena TLR-a služi za prijenos signala s TLR-a na unutarstanične bjelančevine i kinaze (MAURIĆ MALJKOVIĆ i sur., 2023.). TLR-ovi mogu pokrenuti urođeni i stečeni imunski odgovor, a to ovisi o skupini TLR-a koji je prepoznao PAMP. Dijele se na temelju prepoznavanja liganada na one koji prepoznaju bakterije (TLR1,2,4-6) i one koji prepoznaju viruse (TLR3,7-9) (KAWAI i AKIRA, 2010.; KAWASAKI i KAWAI, 2014.).

TLR4 je prvi otkriveni receptor iz skupine TLR-a i prepoznaje lipopolisaharide koji su sastavni dio mnogih Gram-negativnih bakterija, a i nekih Gram-pozitivnih bakterija. Polimorfizmi *TLR4* su povezani s otpornošću na bolesti, BSS, mliječnosti, trajanjem laktacije, infektivnim keratokonjunktivitisom goveda i distocijama (MAURIĆ MALJKOVIĆ i sur., 2023.). Goveđi *TLR4* je otkriven 2003. godine i mapiran na kromosom 8. Njegova struktura je vrlo složena, a kodira 841 amino kiselinu razvrstanu u osam regija. Među tim regijama nalazi se i navodna regija vezivanja koreceptora 2 (engl. *putative coreceptor-binding region 2*) nazvana T4CRBR2 koja se smatra bitnom u prepoznavanju patogena (WANG i sur., 2007.). U navedenoj regiji se nalazi točkasta mutacija c.9421 C>T za koju postoje indikacije da je povezana sa proizvodnjom mlijeka i BSS-om (WANG i sur., 2007.; NOORI i sur., 2014.; MIŠEIKIENĖ i sur., 2020.).

S obzirom na sve navedeno, cilj ovog rada je utvrditi prisutnost polimorfizma c.9421 C>T *TLR4* gena u populaciji HF krava, njegovu učestalost te utjecaj na sastav mlijeka i BSS.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Životinje obuhvaćene istraživanjem

Istraživanje je provedeno na 28 mliječnih krava pasmine HF sa farme koja se nalazi u Bjelovarsko-bilogorskoj županiji. Mliječno stado čine krave pasmine HF. Sve mliječne krave u laktaciji obuhvaćene su redovnim kontrolama od strane Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu (HAPIH) te postoji sveobuhvatna evidencija proizvodnih i zdravstvenih pokazatelja za svaku životinju. Životinje na farmi držane su u staji sa slobodnim držanjem, na punom podu. Sve životinje su hranjene uobičajenim obrokom za mliječne krave, koji se sastoji od kukuruzne silaže, livadnog sijena i koncentrata. Voda je životinjama bila dostupna *ad libitum*, a kao mineralni dodatak ponuđena im je sol za lizanje u obliku bloka.

#### 3.2. Prikupljanje podataka o fenotipu

Podatci o količinama proizvedenog mlijeka, masti i bjelančevina, udjelima mliječne masti i bjelančevina te BSS-a u standardnoj laktaciji (305 dana) iz prve laktacije preuzeti su iz službene baze podataka Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i ribarstva. Od 28 uzorkovanih krava, 11 je još uvijek bilo u tijeku prve laktacije te za njih nije bilo moguće dobiti podatke. Stoga je u drugi dio istraživanja, povezivanje genotipa i fenotipa, uključeno 17 krava.

#### 3.3. Izolacija genomske DNK

Od 28 krava HF pasmine prikupljeni su uzorci pune krvi venepunkcijom repne vene. Izolacija genomske DNK provedena je pomoću kita GenElute™ (Sigma-Aldrich, Njemačka) prema uputama proizvođača. Iz prikupljenih uzoraka, u 200 µL pune krvi dodana je proteinaza K, a zatim i lizirajući pufer (Lysis Solution C) te je smjesa inkubirana na 55°C tijekom 10min. Slijedeće je dodano je 200 µL etanola te je lizat prenesen na silika-membranu kolone. Zatim je reakcijska smjesa centrifugirana 1 minutu na 11000 x g. Nakon centrifugiranja je kolona prenesena u novu sterilnu mikro tubu. Serijom uzastopnog nanošenja pufera za postupak ispiranja na membrani kolone na kojoj se nalazi vezana DNK te uzastopnog centrifugiranja DNK se isprala od zaostalih bjelančevina. Nakon toga DNK je s kolone spuštenu puferskom otopinom za otpuštanje. Otopljena DNK centrifugiranjem je prošla silika-membranu i skupila se u sterilnu mikro tubu. Koncentracija i čistoća dobivene DNK očitana je na spektrofotometru BioDrop µLITE (BioDrop, Cambridge, UK). Čistoća izdvojene DNK određena je pomoću



omjera apsorbancija valnih duljina 260/280 nm, a očitane vrijednosti bile su u preporučenom rasponu 1,8-2,0. Nakon toga izolirana DNK pohranjena je u zamrzivaču na -20 °C.

#### 3.4. Umnažanje ciljanog odsječka lančanom reakcijom polimeraze

Umnažanje ciljanog odsječaka gena *TLR4* obuhvaćenog ovim istraživanjem provedeno je lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Za njegovo umnažanje korištene su uzvodna početnica 5'- AGA CAG CAT TTC ACT CCC TC -3' i nizvodna početnica 5'- ACC ACC GAC ACA CTG ATG AT-3' (MIŠEIKIENĚ i sur., 2020.). Reakcijska smjesa za PCR umnažanje pripravljena je pomoću EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (Takara Bio Inc., Japan) u kojem se nalazi Hot Start Taq polimeraza (HS PCR enzim), optimizirani pufer, smjesa dinukleotida (dNTP), boja za nanošenje uzoraka na gel za elektroforezu (Emerald green, zelena boja). Umnožavanje ciljnog odsječka genomske DNK molekule odvijalo se u volumenu od 20 µL u uređaju za PCR (MastercyclerR Personal 5332, Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka). Uz uzorke korištena je i negativna kontrola. Uvjeti provođenja reakcije za umnažanje željnog odsječka bili su slijedeći: početno grijanje uzoraka na 95°C tijekom 5 minuta radi aktivacije polimeraze, zatim 35 ciklusa umnažanja (94°C/30 sek, 62°C/30 sek, 72°C/40 sek) te konačno produljenje umnoženih slijedova DNK na 72°C tijekom 10 minuta. Uspješnost PCR reakcije potvrđena je prisutnošću produkata na agaroznom gelu elektroforezom. Uzorci su razdvojeni elektroforezom u TAE puferu na 1% agaroznom gelu u koji je dodana boja Midori Green Advance DNA Stain (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Njemačka) prema uputama proizvođača. Umnoženi odsječak je veličine 382 parova baza (pb).

#### 3.5. Metode cijepanja umnoženog specifičnog odsječka DNK i analiza restrikcijskog odsječka

Za otkivanje točkaste mutacije c.9421 C>T u istraživanom odsječku *TLR4* gena korištena je metoda cijepanja umnoženog specifičnog odsječka DNK (RFLP, engl. *restriction fragment length polymorphism*). Reakcija cijepanja odsječaka DNK provedena je u restrikcijskoj smjesi volumena 20 µL koja se sastojala od 10 µL PCR produkta, *Alu* I endonukleaze, BSA, i pripadajućeg pufera (Promega Corporation, SAD) prema uputama proizvođača. Restrikcijska smjesa je zatim inkubirana na temperaturi od 37 °C u vodenoj kupelji (VK1EN, Inko, Hrvatska) tijekom 4 sata. Restrikcijski odsječci razdvojeni su elektroforezom (90 min/140V) na 2% agaroznom gelu s Midori Green Advance DNA Stain bojom (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Njemačka), a veličina im se odredila primjenom DNK standarda od 50 pb (Tablica 2).

Tablica 2. Veličina PCR produkta i restrikcijskih odsječaka po genotipovima

Gen	SNP	PCR odsječak (pb)	Restrikcijska endonukleaza	Genotip	Restrikcijski odsječci (pb)
				TT	260*
<i>TLR4</i>	c.9421 C>T	382	<i>Alu</i> I	CT	260, 142, 118*
				CC	142, 118*

\* odsječci 77, 32 i 13 pb su bili prisutni u svih genotipova

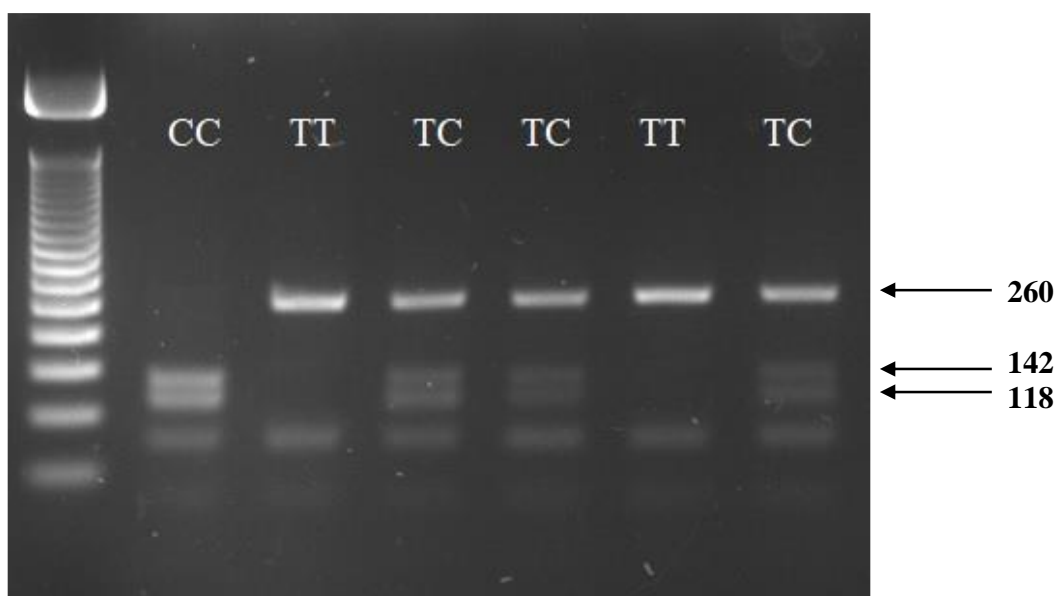
### 3.6. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je program Statistica v.14 (TIBCO Software Inc., 2020.). Broj i učestalost alela i genotipova prikazana je u cijelim brojevima i udjelima. Povezanost genotipa i količina proizvedenog mlijeka, masti i bjelančevina, udjela mliječne masti i bjelančevina te BSS-a iz prve laktacije analizirana je Kruskall Wallisovom analizom varijance. Statistička značajnost je određena na razini  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Analize duljine restrikcijskih odsječaka

Genotipizacija SNP-a c.9421 C>T *TLR4* gena napravljena je pomoću metode PCR-RFLP (Slika 3). Uzorci su razdvojeni na 2%-tnom agaroznom gelu. Za određivanje veličine fragmenata korišten je DNK standard od 50 pb. U slučaju prisutnosti alela T vidljiv je odsječak veličine 260 pb, a u slučaju alela C odsječci od 142 i 118 pb. Odsječci 77, 32 i 13 pb bili su prisutni u svih genotipova.



Slika 3. Razdvajanje dobivenih DNK produkata nakon cijepanja restrikcijskim enzimom *Alu I* na agaroznom gelu (2%) za *TLR4* SNP c.9421 C>T. U slučaju genotipa TT prisutan je odsječak od 260 pb, genotipa TC 260, 142 i 118 pb, a genotipa CC 142 i 118 pb. Odsječci 77, 32 i 13 pb prisutni su u svih genotipova.

#### 4.2. Učestalosti alela i genotipova

Iz utvrđenih genotipova za *TLR4* SNP c.9421 C>T izračunate su učestalosti alela i genotipova za sve uzorkovane krave (N=28, Tablica 3.) kao i samo za krave za koje su bili dostupni proizvodni podatci (N=17, Tablica 4). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je u svih uzorkovanih krava kao i samo u krava za koje su bili dostupno proizvodni podatci učestalost oba alela bila jednaka (0,5). Najčešći genotip u obje skupine bio je heterozigot TC sa malom razlikom u učestalosti (0,714 i 0,764).

Tablica 3. Učestalosti alela i genotipova za SNP c.9421 C>T *TLR4* gena u istraživanoj skupini HF krava

Alel	Učestalost alela	Genotip	Broj krava	Učestalost genotipa
C	0,5	CC	4	0,143
T	0,5	TC	20	0,714
		TT	4	0,143

Tablica 4. Učestalosti alela i genotipova za SNP c.9421 C>T *TLR4* gena u 17 HF krava za koje su bili dostupni proizvodni podatci

Alel	Učestalost alela	Genotip	Broj krava	Učestalost genotipa
C	0,5	CC	2	0,118
T	0,5	TC	13	0,764
		TT	2	0,118

#### 4.3. Povezanost SNP-a c.9421 C>T *TLR4* gena i proizvodnih svojstava krava u standardnoj laktaciji

Analizirajući utjecaj genotipova SNP-a c.9421 *TLR4* gena na količinu mlijeka, mliječne masti i bjelančevina te udio mliječne masti i bjelančevina kao i BSS u prvoj laktaciji HF krava nisu pronađene statistički značajne razlike (Tablica 5). Nedostatak statistički značajne razlike za proizvodne podatke između genotipova može biti uzrokovan malim brojem krava u konačnoj analizi. Iako razlika nije bila statistički značajna, promatrajući sve krave zasebno bilo je moguće uočiti da su samo heterozigotne TC krave imale BSS preko 400 000 stanica/ml mlijeka (Tablica 6).

Tablica 5. Količina mlijeka, mliječne masti i bjelančevina te udjeli mliječne masti i bjelančevina u standardnoj laktaciji za SNP c.9421 C>T *TLR4* gena u HF krava za koje su bili dostupno proizvodni podatci. Rezultati su prikazani kao medijan (minimum – maksimum).

	Genotip						Ukupno (N=17)	
	TT (N=2)		TC (N=13)		CC (N=2)		Medijan	Min - Max
	Medijan	Min - Max	Medijan	Min - Max	Medijan	Min - Max		
Mlijeko (kg)	8084,9	7225,6-8944,2	8670	4593,9-9485,8	8820,7	8049,5-9591,8	8670	4593,9-9591,8
Mliječna mast (kg)	345,9	286,6-405,2	324,4	213,8-474,5	359,4	306,1-412,7	324,4	213,8-474,5
Mliječna mast (%)	4,24	3,95-4,53	4,34	3,55-5,00	4,16	3,19-5,13	4,34	3,19-5,13
Bjelančevine (kg)	278,5	251,9-305	286,4	176,1-342,1	290,6	251,6-329,5	286,4	176,1-342,1
Bjelančevine (%)	3,44	3,41-3,47	3,51	3,16-3,83	3,29	3,13-3,44	3,47	3,13-3,83
BSS	105	76-134	163	26-1147	263	227-299	163	26-1147

Tablica 6. Genotip SNP-a c.9421 C>T *TLR4* gena, količina mlijeka, mliječne masti i bjelančevina te udjeli mliječne masti i bjelančevina u standardnoj laktaciji za svaku HF kravu pojedinačno.

Uzorak	Genotip	Količina mlijeka (kg)	Mliječna mast (kg)	Mliječna mast (%)	Bjelančevine (kg)	Bjelančevine (%)	BSS
1	TC	8770,6	413	4,71	312,5	3,56	26
2	TC	7400,8	320,9	4,34	262	3,54	479
3	TC	7870,2	319,4	4,06	263,4	3,35	163
4	TC	9485,8	474,5	5	342,1	3,61	643
7	CC	9591,8	306,1	3,19	329,5	3,44	299
8	TC	8770,6	413	4,71	312,5	3,56	26
11	TC	4593,9	213,8	4,65	176,1	3,83	128
12	TT	8944,2	405,2	4,53	305	3,41	76
13	TC	6951,3	324,4	4,67	243,9	3,51	586
14	TC	8832,5	351	3,97	293,7	3,33	195
15	TC	8670	307,5	3,55	302,7	3,49	330
17	TC	8754,2	318	3,63	301,7	3,45	88
18	TC	7229,6	291,9	4,04	260,9	3,61	1147
24	CC	8049,5	412,7	5,13	251,6	3,13	227
25	TC	9054,5	368,7	4,07	286,4	3,16	128
29	TT	7225,6	286,6	3,95	251,9	3,47	134
30	TC	7945,9	356,1	4,48	257,8	3,24	47

## 6. RASPRAVA

Toll like receptori pripadaju skupini transmembranskih bjelančevina koji imaju bitnu ulogu u aktivaciji prirodnih obrambenih mehanizama kao i u stečenom imunom odgovoru. U goveda je prisutno 10 različitih receptora (TLR1-10), a svaki prepoznaje specifične ligande (MIŠEIKIENĖ i sur., 2020.). Goveđi TLR4 prepoznaje lipopolisaharide mnogih Gram-negativnih bakterija, a i nekih Gram-pozitivnih bakterija (WANG i sur., 2007.; NOORI i sur., 2014.; CHEN i sur., 2021.). Prisutnost SNP-ova unutar TLR sisavca može prouzročiti smanjenu sposobnost prepoznavanja PAMP-a, otežanu aktivaciju urođenog imunskog odgovora (MUCHA i sur., 2009.), a time predispoziciju osjetljivosti na brojne upalne bolesti, između kojih je u mliječnih goveda značajno zastupljen mastitis.

U goveđem *TLR4* genu pronađeno je dosta polimorfnih lokusa (SHARMA i sur., 2006.; WANG i sur., 2007.; MUCHA i sur., 2009.; NOORI i sur., 2014.; ZHOU i sur., 2017.; MIŠEIKIENĖ i sur., 2020.; CHEN i sur., 2021.), a mnoga istraživanja su povezala različite mutacije u tom genu sa sastavom mlijeka, BSS-om i osjetljivošću na mastitis (SHARMA i sur., 2006.; WANG i sur., 2007.; NOORI i sur., 2014.; MIŠEIKIENĖ i sur., 2020.; CHEN i sur., 2021.). U ovom istraživanju analizirali smo učestalost polimorfizma c.9421 C>T *TLR4* gena i njegovu potencijalnu povezanost sa sastavom mlijeka i BSS-om u HF krava. Za navedeni polimorfizam pronađeno je da su oba alela jednako učestala (0,50) u cijeloj istraživanoj skupini krava. S obzirom da je dio krava bio u tijeku prve laktacije, zasebno su analizirane i učestalosti samo krava za koje je bilo moguće dobiti proizvodne podatke u kojoj su također oba alela bila jednako učestala (0,50). Učestalosti alela iz ovog istraživanja sukladna su onima koje su MIŠEIKIENĖ i sur. (2020.) pronašli u svojem istraživanju (C = 0,536, T = 0,464). NOORI i sur. (2014.) su u svom radu istraživali pet različitih stada HF krava u Iranu. Navedeni autori su pronašli varijacije u učestalosti od stada do stada, no u svih pet stada učestaliji je bio alel C (0,547 – 0,676 ) sa prosječnom učestalosti od 0,637. Slične rezultate su pronašli i WANG i sur. (2007.) koji su u kineskih HF krava, kineskih simentalских krava i sanhe krava pronašli za alel C frekvencije od 0,5833, 0,5521 i 0,5578. Promatrajući genotipove pronađeno je da je genotip TC, heterozigot, najučestaliji u svih istraživanih krava (0,714) kao i samo u podskupini krava za koje su bili dostupno proizvodni podatci (0,764). Navedeno je u skladu sa istraživanjima od MIŠEIKIENĖ i sur. (2020.) (0,507), WANG i sur. (2007.) (0,4167-0,5126) i četiri od pet stada u istraživanju od NOORI i sur. (2014.) (0,494–0,677) dok je samo u jednom stadu bio najučestaliji genotip CC (0,470).



U istraživanju provedenom na 152 HF krave iz Litve (MIŠEIKIENĖ i sur., 2020.) nije pronađena povezanost između proizvodnih parametara mlijeka (udio mliječne masti, udio bjelančevina i udio laktoze) i SNP-a c.9421 C>T, ali je pronađena povezanost s BSS-om gdje je heterozigot (TC) imao najveći BSS, statistički značajno više od homozigota TT. U ovom istraživanju nisu pronađene statistički značajne razlike između proizvodnih parametara mlijeka te BSS-a i različitih genotipova. Navedeni nedostatak statistički značajne može biti uzrokovan malim brojem krava u konačnoj analizi. Međutim, promatrajući podatke svake krave zasebno, bilo je moguće uočiti da su samo krave TC genotipa imale BSS preko 400 000 stanica/ml mlijeka što je u skladu sa prethodno navedenim istraživanjem. Suprotne tome, NOORI i sur. (2014.) da genotip CC ima značajno niži BSS od ostala dva genotipa dok WANG i sur. (2007.) nisu pronašli nikakve statistički značajne razlike između genotipova. Također, NOORI i sur. (2014.) su pronašli da istraživani polimorfizam utječe na količinu mlijeka, udio mliječne masti i uzgojnu vrijednost za količinu mlijeka.

Rezultati ovog istraživanja nisu ukazali na statistički značajne razlike među genotipovima SNP-a c.9421 C>T što je vjerojatno uzrokovano ograničenim uzorkom krava za koje je bilo moguće dobiti proizvodne podatke. Unatoč tome, uzimajući u obzir rezultate drugih istraživanja (WANG i sur., 2007.; NOORI i sur., 2014.; MIŠEIKIENĖ i sur., 2020.), kao i ostalih istraživanja na drugim SNP-ovima provedenih na *TLR4* genu (SHARMA i sur., 2006.; MUCHA i sur., 2009.; ZHOU i sur., 2017; CHEN i sur., 2021.), može se zaključiti da goveđi *TLR4* gen može imati važnu ulogu u otpornosti na mastitis. Da bi se razjasnio konkretniji mehanizam djelovanja kao i povoljniji genotip za dani okoliš potrebna su dodatna obuhvatnija istraživanja na većem uzorku s različitih područja.

## 7. ZAKLJUČCI

- U mliječnih krava pasmine HF utvrđen je polimorfizam c.9421 C>T *TLR4* gena. Polimorfizam se očitovao s dva alela i tri genotipa.
- Oba alela su bila jednako učestala (0,5), a najučestaliji genotip je heterozigot TC u svih uzorkovanih krava kao i samo u krava za koje je bilo moguće dobiti proizvodne podatke.
- Nisu pronađene statistički značajne razlike za količinu mlijeka, mliječne masti i bjelančevina, udio mliječne masti i bjelančevina te BSS među genotipovima istraživanog polimorfizma u primiparnih krava za koje je bilo moguće dobiti proizvodne podatke.

## 8. LITERATURA

- AHDB (2024): UK and EU cow numbers. Agriculture and Horticulture Development Board. Coventry, UK. <https://ahdb.org.uk/dairy/uk-and-eu-cow-numbers> (29.8.2024.)
- BRAUN, U., E. FORSTER (2012): B-mode and colour Doppler sonographic examination of the milk vein and musculophrenic vein in fry cows and cows with a milk yield of 10 and 20 kg. *Acta Vet. Scand.* 54, 15-20.
- CHEN, H., C. LIU, M. XIANG, J. YU, Y. XIA, X. HU, D. WANG, B. TAO, Y. ZHANG, L. CHENG (2021): Contribution of the mutation rs8193069 in TLR4 to mastitis resistance and performance in Holstein cows in southern China. *Vet. Med. Sci.* 8, 357–366.
- DYCE, K. M., W. O. SACK, C. J. G. WENSING (2010): *Textbook of Veterinary Anatomy*. 4. izd., Saunders Elsevier, Philadelphia, str. 698-727.
- HAPIH (2020): *Govedarstvo - godišnje izvješće za 2019. godinu*. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Osijek, 2020.
- HAPIH (2021): *Govedarstvo - godišnje izvješće za 2020. godinu*. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Osijek, 2021.
- HAPIH (2022): *Govedarstvo - godišnje izvješće za 2021. godinu*. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Osijek, 2022.
- HAPIH (2023): *Govedarstvo - godišnje izvješće za 2022. godinu*. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Osijek, 2023.
- HAPIH (2024): *Govedarstvo - godišnje izvješće za 2023. godinu*. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Osijek, 2024.
- HAUG, A., A. T. HØSTMARK, O. M. HARSTAD (2007): Bovine milk in human nutrition—a review. *Lipids Health Dis.* 6, 1–16.
- HOLSTEIN ASSOCIATION USA (2024): *Holstein Breed Characteristics*. Holstein Association USA, Brattleboro, USA. [https://www.holsteinusa.com/holstein\\_breed/breedhistory.html](https://www.holsteinusa.com/holstein_breed/breedhistory.html) (18.7.2024.)

- JENSEN, R. G. (1995): Handbook of milk composition. Academic Press, San Diego, str. 464-590.
- KAWAI, T., S. AKIRA (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384.
- KAWASAKI, T., T. KAWAI (2014): Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* 5.
- MAURIĆ MALJKOVIĆ, M., I. VLAHEK, A. PIPLICA, A. EKERT KABALIN, V. SUŠIĆ, V. STEVANOVIĆ (2023): Prospects of toll-like receptors in dairy cattle breeding. *Anim. Genet.* 54, 425–434.
- MIŠEIKIENĖ, R., R. UGENSKIENĖ, N. PEČIULAITIENĖ, R. BIŽIENĖ, A. ŠVEDAITĖ (2020): The influence of TLR4 gene polymorphisms on milk quality and composition of Lithuanian Holstein cows. *Mljekarstvo* 70, 112–119.
- MUCHA, R., M. R. BHIDE, E. B. CHAKURKAR, M. NOVAK, I. MIKULA SR (2009): Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 381–388.
- NOORI, R., A. H. MAHDAVI, M. A. EDRISS, H. R. RAHMANI, M. TALEBI, M. SOLTANI-GHOMBAVANI (2014): 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. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 43, 493.
- PATTON, S. (2005): *Milk: Its Remarkable Contribution to Human Health and Well-Being.* Transaction Publishers, New Brunswick, New Jersey, pp. 33-55.
- Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (Narodne novine, br. 136/20.).
- SHARMA, B. S., I. LEYVA, F. SCHENKEL, N. A. KARROW (2006): Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 89, 3626–3635.
- SHARMA, B. S., M. K. ABO-ISMAIL, F. S. SCHENKEL, Q. YOU, C. P. VERSCHOOR, S. D. PANT, N. A. KARROW (2015): Association of TLR4 polymorphisms with

- Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection status in Canadian Holsteins. *Anim. Genet.* 46, 560–565.
- WANG, X., S. XU, X. GAO, H. REN, J. CHEN (2007): Genetic polymorphism of TLR4 gene and correlation with mastitis in cattle. *J. Genet Genomics.* 34, 406–412.
- WANG, M., H. SONG, X. ZHU, S. XING, M. ZHANG, H. ZHANG, X. WANG, Z. YANG, X. DING, N. A. KARROW, S. KÖNIG, Y. MAO (2018): Toll-like receptor 4 gene polymorphisms influence milk production traits in Chinese Holstein cows. *J. Dairy Res.* 85, 407–411.
- WILLIAMS, C. (2019): Nutritional qualities and opportunities for non-bovine milk in the UK. Farming Connect.
- YANG, J., Y. LIU, C. LIN, R. YAN, Z. LI, Q. CHEN, H. ZHANG, H. XU, X. CHEN, Y. CHEN, A. GUO, C. HU (2022): Regularity of Toll-Like Receptors in Bovine Mammary Epithelial Cells Induced by *Mycoplasma bovis*. *Front. Vet. Sci.* 9.
- ZHOU, H., L. CHENG, H. GONG, S. O. BYUN, G. R. EDWARDS, J. G. H. HICKFORD (2017): Variation in the Toll-like Receptor 4 (TLR4) gene affects milk traits in dairy cows. *J. Dairy Res.* 84, 426–429.

## 9. SAŽETAK

Utjecaj polimorfizma *TLR4* gena na sastav i kvalitetu mlijeka u mliječnim krava

Bruno Oštrić

Mastitis je vrlo važniji problem koji dovodi do velikih ekonomskih gubitaka u mliječnoj industriji diljem svijeta. Liječenje mastitisa je teško i skupo te se, stoga, selektivnim uzgojem nastoji poboljšati otpornost na mastitis. Toll like receptori (TLR) su sastavni dio imunskog sustava, to su transmembranske bjelančevine koje prepoznaju sastavne dijelove raznih patogena i aktiviraju imunološki odgovor. Toll like receptor 4 (TLR4) prepoznaje lipopolisaharide koji su sastavni dio mnogih Gram-negativnih bakterija, a i nekih Gram-pozitivnih bakterija. Iako postoje mnoga istraživanja, njegovi temeljni molekularni mehanizmi i uloga u pojavi mastitisa nisu jasni. U ovom radu istraživana je prisutnost, učestalost i utjecaj polimorfizma c.9421 C>T *TLR4* gena na sastav mlijeka i BSS u prvoj laktaciji holštajn frizijskih krava. Polimorfizam je prisutan u istraživanih krava s jednakom učestalosti oba alela (0,5) i najučestalijim TC genotipom. Nisu pronađene statistički značajne razlike za količinu mlijeka, mliječne masti i bjelančevina, udio mliječne masti i bjelančevina te BSS među genotipovima istraživanog polimorfizma. Navedeni nedostatak statistički značajne razlike može biti uzrokovan malim brojem krava u konačnoj analizi.

Ključne riječi: mlijeko, mastitis, TLR4, BSS, proizvodnja

## 10. SUMMARY

Influence of TLR4 gene polymorphism on the composition and quality of milk in dairy cows

Bruno Oštrić

Mastitis is a very serious problem that leads to large economic losses in the dairy industry worldwide. Treatment of mastitis is difficult and expensive, therefore selective breeding is used to improve the resistance to mastitis. Toll-like receptors (TLR) are an integral part of the immune system, they are transmembrane proteins that recognize components of various pathogens and activate the immune response. Toll like receptor 4 (TLR4) recognizes lipopolysaccharides, which are an integral part of many Gram-negative bacteria and some Gram-positive bacteria. Although there are many studies, its underlying molecular mechanisms and role in the occurrence of mastitis are still unclear. In this study, we investigated the presence, frequency and influence of the c.9421 C>T *TLR4* gene polymorphism on milk composition and somatic cell count (SCC) in the first lactation of Holstein Friesian cows. The studied polymorphism had an equal frequency of both alleles (0.5). The most frequent genotype was TC. Statistically significant differences were not found for milk, fat and protein quantities, fat and protein shares, and SCC between the genotypes. This lack of statistically significant difference may be caused due to the small number of cows in the final analysis.

Key words: milk, mastitis, TLR4, SCC, production

## **11. ŽIVOTOPIS**

Rođen sam 14.9.1999. u Zagrebu. Pohađao sam Osnovnu školu Voltino i II. gimnaziju u Zagrebu. 2018. godine sam se upisao na Veterinarski fakultet u Zagrebu. Na petoj sam se godini opredijelio za smjer Farmske životinje i konji. Tijekom studiranja bio sam član SPORTVEF-a i volontirao sam 2 godine na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju. Stručnu sam praksu odradio u Veterinarskoj stanici Zadar.