

ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET
TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE
WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I HODOWLI ZWIERZĄT

Kaja Prüffer

**Polimorfizm wybranych *miRNA* związanych
z odpornością na *mastitis***

Rozprawa doktorska wykonana

w Katedrze Genetyki

pod kierunkiem dr hab. inż. Katarzyny Wojdak-Maksymiec,

prof. ZUT

Szczecin 2023

*Moim Rodzicom,
za nieustanną wiarę we mnie.*

*Serdeczne podziękowania dla Pani Promotor
dr hab. inż. Katarzyny Wojdak-Maksymiec, prof. ZUT
za nieocenioną pomoc, ofiarowany czas i cenne rady
otrzymane podczas realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.*

STRESZCZENIE

Jednym z ważniejszych i najbardziej rozpowszechnionych problemów, z którym borykają się hodowcy bydła mlecznego, są infekcje wymienia. *Mastitis*, definiowane jako zapalenie gruczołu mlekowego, jest jednostką chorobową, której zróżnicowane podłoże, nasilenie i wpływ na stan fizjologiczny zwierzęcia zależą od środowiska, czynnika chorobotwórczego i organizmu gospodarza. Mleko z zainfekowanych ćwiartek wymienia jest niezdatne do konsumpcji, co niejednokrotnie prowadzi do dużych strat finansowych ponoszonych przez przemysł mleczarski. Jedną z dróg ograniczenia występowania *mastitis* jest wykorzystanie w pracy hodowlanej różnic w genetycznych skłonnościach do tego schorzenia. Cały czas trwają badania nad poszukiwaniem genów markerowych powiązanych z występowaniem *mastitis*. Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) w genach związanych z odpowiedzią immunologiczną, mogą być takim użytecznym markerem we wczesnym wykrywaniu przypadków *mastitis* u bydła mlecznego.

Celem niniejszej pracy było odnalezienie związków pomiędzy odpornością/podatnością na *mastitis* (wyrażoną jako liczba komórek somatycznych SCC w mleku), dobową wydajnością mleczną oraz procentową zawartością białka i tłuszczu w mleku a genetycznymi wariantami genów zaangażowanych w procesy immunologiczne – *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e*.

Badaniami objęto stado liczące 644 krowy rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. W pracy zostały zebrane wyniki z 22 292 próbnych udojów, pochodzące z dokumentacji hodowlanej i dotyczące dobowej wydajności mlecznej, procentowej zawartości białka i tłuszczu oraz liczby komórek somatycznych SCC. Od wszystkich badanych zwierząt została pobrana krew obwodowa, następnie wyizolowano genomowe DNA. Polimorfizm badanych genów *microRNA* – *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e* – identyfikowany był metodą PCR – RFLP. Badane krowy były w laktacji od pierwszej do ósmej. Analizy przeprowadzono osobno dla każdej laktacji, jedynie ze względu na stosunkową małą liczebność w późniejszych laktacjach połączono laktacje 6., 7. i 8. w jedną klasę. Efekty wybranych genów były badane także w trzech kolejnych stadiach laktacji. Ponadto, w badanych próbkach mleka przyjęto trzy klasy wartości poziomu komórek somatycznych: krowy zdrowe $SCC \leq 200$ tys/ml, stan podkliniczny $200 < SCC \leq 400$ tys/ml i krowy chore $SCC > 400$ tys/ml. Podział ten zastosowano ze względu na

możliwość występowania odmiennych efektów badanych genów w różnych stanach fizjologicznych.

Uzyskane wyniki zostały opracowane i poddane analizie statystycznej. Określona została struktura genetyczna badanej populacji, tj. frekwencje alleli i genotypów analizowanych genów. Analiza statystyczna uzyskanych wyników objęła także poszukiwania asocjacji pomiędzy klinicznymi przypadkami infekcji a polimorfizmem wytypowanych genów. Modelowanie cech, przeprowadzone z zastosowaniem efektów dominacyjnych oraz efektów epistazy pomiędzy genami, obejmowało 4 kombinacje interakcji (addytywny – addytywny, addytywny – dominujący, dominujący – addytywny, dominujący – dominujący). Efekty były badane w zależności od czynników takich jak kolejna laktacja, stadium laktacji i liczba komórek somatycznych SCC.

W wyniku przeprowadzonej analizy w badanej grupie krów zidentyfikowano polimorficzne warianty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* oraz stwierdzono monomorfizm w *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e*. W pracy dowiedziono, że istnieją statystycznie istotne związki pomiędzy polimorfizmem wybranych genów *microRNA2313* i *microRNA2467* a odpornością/podatnością na *mastitis* wyrażoną jako liczba komórek somatycznych w mleku. Co ważne, przeprowadzona analiza wykazała istnienie efektów dominacyjnych oraz interakcji pomiędzy genetycznymi wariantami wytypowanych genów w kształtowaniu zmienności liczby komórek somatycznych w mleku w badanej populacji krów oraz wykazała, że efekty dominacyjne i interakcyjne badanych alleli stanowią ważny element pozwalający kompleksowo ocenić całkowity efekt allelu.

Dokonano szczegółowej analizy asocjacji pomiędzy allelami wybranych genów a liczbą komórek somatycznych w mleku w kolejnych laktacjach, w wybranych stadiach laktacji oraz klasach SCC, jednak na tym etapie badań trudno jednoznacznie, na podstawie uzyskanych wyników, wytypować geny markerowe, których polimorfizm mógłby stanowić podstawę do prowadzenia selekcji mającej na celu ograniczenie występowania *mastitis*, nie zmniejszając jednocześnie wydajności mlecznej i koncentracji zawartych w mleku składników takich jak tłuszcz czy białko. Nadzieje budzi jednak dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467*, który w każdej laktacji związany był z niższą zawartością SCC w mleku. Wydaje się więc, że selekcja skoncentrowana na zwiększeniu frekwencji allelu T *microRNA2467* mogłaby przynieść zadawalające rezultaty pod kątem obniżenia zawartości SCC w mleku u krów rasy holsztyńsko- fryzyjskiej.

ABSTRACT

One of the most important and widespread problems faced by dairy cattle breeders is udder infections. *Mastitis*, defined as inflammation of the mammary gland, is a disease whose varied underlying causes, severity, and impact on the animal's physiological state depend on the environment, the pathogenic factor, and the host organism. Milk from infected quarters of the udder is unsuitable for consumption, which often leads to significant financial losses incurred by the dairy industry. One way to reduce the incidence of *mastitis* is to use genetic differences in susceptibility to this condition in breeding work. Research is ongoing to identify marker genes associated with *mastitis*. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes related to the immune response can be a useful marker for early detection of *mastitis* in dairy cattle.

The aim of this study was to find associations between immunity/susceptibility to *mastitis* (expressed as somatic cell count (SCC) in milk), daily milk yield, as well as the percentage of protein and fat in milk, and genetic variants of genes involved in immune processes - *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2*, and *microRNA29e*.

The study involved a herd of 644 Polish Holstein-Friesian cows of the black-and-white variety. Results from 22 292 milk yield samples were collected from breeding records and included daily milk yield, percentage of protein and fat, and SCC. Peripheral blood was taken from all animals studied, and genomic DNA was isolated. Polymorphism of the *microRNA* genes studied - *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2*, and *microRNA29e* - was identified by PCR-RFLP method. The studied cows were in lactation from the first to the eighth. The analyses were conducted separately for each lactation, and only due to the relatively small number of cows in later lactations, lactations 6th, 7th, and 8th were combined into one class. The effects of the selected genes were also studied in three successive lactation stages. In addition, the milk samples studied were divided into three classes of somatic cell count values: healthy cows with $SCC \leq 200$ thousand/ml, subclinical state $200 < SCC \leq 400$ thousand/ml, and sick cows with $SCC > 400$ thousand/ml. This division was made due to the possibility of different effects of the studied genes in different physiological states.

The obtained results were analyzed and subjected to statistical analysis. The genetic structure of the studied population was determined, i.e., the frequencies of alleles and genotypes of the analyzed genes. The statistical analysis of the results also included the search for

associations between clinical cases of infection and the polymorphism of the selected genes. The feature modeling, conducted using dominant effects and epistatic effects between genes, included 4 combinations of interactions (additive-additive, additive-dominant, dominant-additive, dominant-dominant). The effects were investigated depending on factors such as subsequent lactation, lactation stage, and somatic cell count (SCC).

As a result of the analysis carried out on the group of cows, polymorphic variants of *microRNA2313* and *microRNA2467* genes were identified, and monomorphism was found in *microRNA2489*, *microRNA29b-2*, and *microRNA29e*. The study demonstrated statistically significant associations between the polymorphism of the selected *microRNA2313* and *microRNA2467* genes and resistance/susceptibility to *mastitis* expressed as the number of somatic cells in milk. Importantly, the analysis showed the existence of dominant effects and interactions between genetic variants of the selected genes in shaping the variability of the somatic cell count in milk in the studied cow population and showed that the dominant and interactive effects of the studied alleles are an important element that allows for a comprehensive assessment of the overall effect of the allele.

A detailed analysis of the associations between the selected gene alleles and the number of somatic cells in milk in subsequent lactations, selected lactation stages, and SCC classes was carried out. However, at this stage of the research, it is difficult to unambiguously identify marker genes based on the obtained results, whose polymorphism could serve as a basis for conducting selection aimed at reducing the occurrence of *mastitis* without reducing milk yield and the concentration of components such as fat or protein in milk. However, the dominant effect of the T allele of the *microRNA2467* gene, which was associated with lower SCC content in milk in each lactation, presents a promising avenue that selection focused on increasing the frequency of the T allele of *microRNA2467* could yield satisfactory results in terms of reducing SCC content in milk in Holstein-Friesian cows.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE.....	3
ABSTRACT.....	5
WSTĘP	9
1. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA.....	12
1.1. <i>Mastitis</i>	12
1.2. <i>Mastitis</i> a skład mleka	13
1.2.1. Bakterie	17
1.2.2. Inne patogeny	18
1.3. Metody diagnozowania <i>mastitis</i>	19
1.3.1. Liczba komórek somatycznych SCC	19
1.3.2. Analiza bakteriologiczna	23
1.3.2.1. Mikrobiologiczne metody fenotypowe	23
1.3.2.2. Mikrobiologiczne metody genotypowe.....	24
1.3.3. Objawy kliniczne.....	24
1.3.4. Przewodność i zmienność jonowa mleka.....	25
1.3.5. Poziom laktozy w mleku	26
1.4. Fizjologiczne podstawy odpowiedzi immunologicznej w wymieniu	26
1.4.1. Nieswoista odpowiedź immunologiczna.....	27
1.4.2. Swoista odpowiedź immunologiczna.....	29
1.4.2.1. Pierwotna odpowiedź immunologiczna	29
1.4.2.2. Wtórna odpowiedź immunologiczna.....	30
1.5. Czynniki środowiskowe związane z występowaniem <i>mastitis</i>	31
1.6. Czynniki genetyczne związane z występowaniem <i>mastitis</i>	33
1.6.1. Odziedziczalność i dziedziczenie poligeniczne	33
1.6.2. <i>Loci</i> cech ilościowych - <i>Quantitative Trait Loci</i> (QTLs) i geny kandydujące.....	36
1.6.3. Efekty nieaddytywne.....	37
1.6.4. Plejotropowe efekty markerów	39
1.7. MicroRNA	41
1.7.1. Biogeneza microRNA.....	41
1.7.2. Funkcje microRNA a odporność na infekcje	43
1.7.4. <i>MicroRNA2467</i>	44
1.7.5. <i>MicroRNA2313</i>	45
1.7.6. <i>MicroRNA2489</i>	45

1.7.7. <i>MicroRNA29b-2</i>	46
1.7.8. <i>MicroRNA29e</i>	46
2. CEL PRACY	47
3. MATERIAŁ I METODY	48
3.1. Materiał	48
3.2. Metody laboratoryjne	50
3.3. Metody statystyczne	52
3.4. Ocena efektów badanych <i>loci</i>	54
4. WYNIKI	57
4.1. Frekwencje genotypów i alleli badanych genów	57
4.2. Statystyki opisowe	60
4.3. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w zależności od poziomu SCC	62
4.4. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w zależności od kolejnej laktacji	72
4.5. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w zależności od stadium laktacji	83
5. DYSKUSJA	89
5.1. Zaangażowanie <i>microRNA</i> w procesy odpornościowe	89
5.2. Polimorfizm genów <i>microRNA</i> a odporność	93
5.3. Związek <i>microRNA</i> z produkcją mleka, białka i tłuszczu	94
5.4. Znaczenie epistazy i efektów dominacyjnych	97
5.5. Zmienne efekty genów w zależności od czynników środowiskowych i stanu fizjologicznego zwierząt	100
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	103
BIBLIOGRAFIA	106
ANEKS	119
A. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w zależności od poziomu SCC	119
B. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w zależności od kolejnej laktacji	123
C. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w zależności od stadium laktacji	127
SPIS WYKRESÓW	131
SPIS TABEL	132

WSTĘP

Do jednych z najpoważniejszych problemów, z którymi mierzą się hodowcy bydła mlecznego, należą infekcje wymienia. *Mastitis* jest chorobą o dużym znaczeniu ekonomicznym ze względu na wysoką częstość występowania jego klinicznej i podklinicznej formy. Zapalenie wymienia u krów generuje ogromne koszty dla hodowców związane z leczeniem, stratami produkcyjnymi i zmniejszonym dobrostanem zwierząt. Systemy rejestrowania chorób, gromadzące dane z dużej liczby gospodarstw, nie były do tej pory rozpowszechnione na całym świecie, dlatego selekcja pod kątem odporności na zapalenie gruczołu mlekowego często opierała się na genetycznie skorelowanych cechach wskaźnikowych, takich jak liczba komórek somatycznych w mleku (ang. *somatic cells count*, SCC). Korelacje genetyczne między klinicznym zapaleniem wymienia i innymi ważnymi ekonomicznie cechami wskazują, że selekcja kierunku odporności na *mastitis* wpłynęłaby korzystnie na podniesienie odporności na inne choroby bydła, a także zwiększyłaby zarówno płodność jak i długość życia zwierzęcia.

Niemniej jednak, wydajność mleka pozostaje ujemnie skorelowana z klinicznym zapaleniem wymienia, co podkreśla znaczenie uwzględnienia cech zdrowotnych w celach hodowlanych dla osiągnięcia postępu genetycznego w zakresie innych ważnych cech bydła. Dalsze badania, które mają na celu lepsze zrozumienie podłoża genetycznego zapalenia wymienia, powinny doprowadzić do poprawy odporności na zapalenie gruczołu mlekowego, a także do umożliwienia dokładniejszej oceny cech użytkowych i funkcjonalnych, co w konsekwencji przełożyłoby się na dobrostan zwierząt i rentowność przemysłu mleczarskiego (Martin i in., 2018).

Selekcja wspomagana markerami genetycznymi lub selekcja genomowa w kierunku zwiększenia odporności na *mastitis* stanowi cenne narzędzie do zmniejszenia częstości występowania infekcji gruczołu mlecznego, ponieważ prowadzi do wyższego poziomu różnicowania między fenotypami niż w przypadku selekcji konwencjonalnej.

Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) w genach, o których wiadomo, że są zaangażowane w aktywację układu odpornościowego, można powiązać z fenotypami związanymi z zapaleniem wymienia (SCC) i wykorzystać do selekcji odpornych zwierząt. Skuteczna selekcja jest w stanie poprawić zarówno dobrostan zwierząt, jak i jakość i bezpieczeństwo produktów zwierzęcych.

Począwszy od lat 50. badano mechanizmy dziedziczenia genetycznej odporności na zapalenie wymienia (Moretti i in., 2021). Jednakże, cecha zapalenia wymienia i liczba komórek

somatycznych, okazały się mieć niską lub umiarkowaną dziedziczalność. W związku z tym, wymagane są procedury genetyczne w celu znalezienia markerów umożliwiających szybszą i dokładniejszą selekcję. Należy pamiętać, że złożone choroby determinowane są przez wiele *loci* o niewielkim lub prawie znikomym efekcie.

Pod uwagę brane są dwa podejścia. Pierwsze to podejście holistyczne, takie jak skanowanie genomu, wymagające dużej liczby badanych zwierząt w celu wykrycia *loci* związanych z cechami odporności. Ostatnie postępy techniczne dotyczące genomiki bydła, takie jak np. mikromacierze pozwalające na szeroko zakrojone badania asocjacyjne całego genomu, doprowadziły do identyfikacji *loci* cech ilościowych (ang. *quantitative trait loci*, QTL), związanych z cechami zapalenia wymienia. Drugie podejście, wykorzystujące detekcję SNP w genach kandydujących zaangażowanych w procesy odpornościowe, wydaje się bardziej bezpośrednie i niezawodne (Moretti i in., 2021). Za pomocą przesiewowych badań zmian DNA w genach kandydujących, możliwe jest ustalenie wpływu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu oraz interakcji genetycznych na złożone cechy (Mao i in., 2006).

Do genów takich należą między innymi *microRNA*, czyli małe, odkryte ponad dwie dekady temu, niekodujące RNA, które odgrywają wiele kluczowych ról w różnych procesach biologicznych poprzez post transkrypcyjną regulację ekspresji genów (Wang i in., 2019). Specyficzne *microRNA* odgrywają ważną rolę w modelowaniu wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Wykazano także, że deregulacja ich działania przyczynia się do powstania chorób zapalnych. *MicroRNA* zaangażowane są w prawie wszystkie aspekty procesów biologicznych obejmujących rozwój, różnicowanie komórkowe, modulację odporności i stany patogenne. *MicroRNA* zmieniają działanie mRNA poprzez blokadę translacji lub degradację RNA. Będąc kluczowym elementem regulacji genów, *microRNA* wykazują znaczny stopień homologii pomiędzy różnymi gatunkami. Wykazano, że *microRNA* są sprawnymi modulatorami odpowiedzi immunologicznych biorących udział w różnicowaniu i funkcjonowaniu komórek szpiku, a w nabytej odpowiedzi immunologicznej poprzez modulowanie rozwoju limfocytów B i T (Yuan i in., 2018). W niniejszej pracy podjęto się zbadania możliwości wykorzystania polimorfizmów występujących w genach *microRNA* – *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e* w doskonaleniu odporności na *mastitis* krów mlecznych.

Aby zrozumieć mechanizm dziedziczenia podatności/odporności na *mastitis* niezbędne jest uwzględnienie oddziaływania na siebie genów z różnych *loci*, czyli uwzględnienie występowania zjawiska epistazy. Efekty epistazy, czyli interakcje genów, są powszechnie uznawane za ważne czynniki genetyczne leżące u podstaw złożonych cech.

Zjawisko epistazy od dawna interesowało wielu badaczy (Carlborg i Haley, 2004; Moore 2003; Purcell i Sham; 2004). Postawiono hipotezę, że epistaza jest zjawiskiem bardzo powszechnym i nie można jej pominąć w określeniu występowania podatności/odporności organizmu na choroby. Do obserwacji podtrzymujących tę hipotezę należą odchylenia od praw Mendla, interakcje molekularne w regulacji ekspresji genów, a także w układach biochemicznych i metabolicznych, niepowtarzające się i pozytywne skutki polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, oraz efekty interakcji genów, gdy są dobrze zbadane (Mao i in., 2006). W niniejszej pracy rozważane są cztery rodzaje efektów epistazy dwóch genów kandydujących (*microRNA2313* oraz *microRNA2467*): efekt addytywno-addytywny, addytywno-dominujący, dominująco-addytywny oraz dominująco-dominujący.

Niezmiernie ważne dla zrozumienia występowania określonych cech fenotypowych, w tym przypadku odporności/podatności na *mastitis*, są tzw. interakcje genotyp – środowisko. O interakcjach tych mówimy, gdy różne warunki środowiskowe nie mają równego wpływu na fenotypowe efekty działania różnych genotypów. Zdolność żywych organizmów do zmiany fenotypu w odpowiedzi na zmiany środowiskowe znana jest jako plastyczność fenotypowa lub wrażliwość na środowisko. Kiedy te same genotypy rozwijają różne fenotypy w różnych środowiskach, to mówimy wtedy o istnieniu interakcji genotyp – środowisko (Hammami i in., 2009). W niniejszej pracy opisane zostały efekty *microRNA2313* i *microRNA2467* w różnych warunkach środowiskowych uwzględniających czynniki takie jak klasa SCC, kolejna laktacja i stadium laktacji. Wykazano, że stwierdzone efekty obu genów *microRNA* w dużej mierze zależą od warunków środowiskowych, a samą przyczyną interakcji genotyp-środowisko mogą być zmienne profile ekspresji genów *microRNA* w zależności od wielu różnych czynników środowiska zewnętrznego i wewnętrznego (wiek, płeć, ciąża, laktacja, itp.).

1. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

1.1. *Mastitis*

Mastitis, definiowane jako zapalenie gruczołu mlekowego (wyraz *mastitis* pochodzi od greckich słów *mastos* – pierś i *itis* – zapalenie), jest jedną z kosztowniejszych i bardziej rozpowszechnionych jednostek chorobowych, której zróżnicowane podłoże, nasilenie i wpływ na stan fizjologiczny zwierzęcia zależą od środowiska, czynnika chorobotwórczego i organizmu gospodarza. *Mastitis* rozwija się, gdy czynnik chorobotwórczy dostanie się do gruczołu mlekowego, często na skutek przerwania ciągłości tkanki, czyli mechanicznego uszkodzenia fizycznej bariery, jaką jest strzyk lub same kanały strzykowe. Wymaga to natychmiastowej reakcji układu odpornościowego gospodarza, tak by zapobiec kolonizacji patogenu i późniejszemu rozwojowi choroby (Aitken i in., 2011; Sordillo i in., 1997).

Stopień nasilenia reakcji obronnych organizmu, a tym samym stopień nasilenia zapalenia, stanowi kryterium podziału infekcji wymienia. *Mastitis* występuje w dwóch głównych postaciach: klinicznej i podklinicznej (też subklinicznej) (Hashemi i in., 2011; Hortet i in., 1998). Kliniczna postać *mastitis* charakteryzuje się występowaniem fizycznych, chemicznych i mikrobiologicznych zmian w mleku (Lassa i in., 2013). Nieprawidłowości obserwowane w mleku to np.: obecność przezroczystej, surowiczej lub krwistej wydzieliny; występowanie strzępków lub kłaczków w mleku; zmiany zabarwienia mleka. Postać kliniczna objawia się także patologicznymi zmianami w tkance gruczołowej wymienia (Lassa i in., 2013). W przypadku łagodnych lub umiarkowanych przypadków klinicznego *mastitis* obserwowane zmiany mogą dotyczyć opuchlizny, stwardnienia i zaczerwienienia tkanki wymienia, podwyższonej temperatury i bolesności, wrażliwości na dotyk. Ostra odmiana klinicznego *mastitis* ma miejsce, gdy dodatkowo zdiagnozowana jest gorączka lub jadłowstręt (Thompson-Crispi i in., 2014).

Choroba w postaci podklinicznej przebiega bez wyraźnych symptomów, co oznacza, że zmiany organoleptyczne w mleku i wymieniu nie są obserwowane (Hashemi i in., 2011). Wymię jest zainfekowane, lecz stan zapalny nie jest widoczny. Można jedynie obserwować nieprawidłowości w mleku, a utrzymanie takiego stanu przez okres dłuższy niż 2 miesiące określane jest mianem zapalenia chronicznego (Thompson-Crispi i in., 2014). Ze względu na brak widocznych objawów podkliniczna postać *mastitis* jest trudna do rozpoznania, co nasręcza wiele problemów w procesie pozyskiwania mleka, obniżając jego wartość i ilość.

Ponadto patogeny infekujące wymię i prowadzące do podklinicznej formy *mastitis* mogą być przenoszone na inne osobniki podczas zautomatyzowanego procesu udoju (Cervinkova i in., 2013). Z punktu widzenia hodowcy, ta postać zapalenia ma szczególnie ważne znaczenie, ponieważ występuje od 15 do 40 razy częściej, niż zapalenie kliniczne.

Dotychczas stosowane metody profilaktyki i zwalczania *mastitis* wywołanego patogenami środowiskowymi nie powiodły się. Wśród producentów mleka rosną obawy związane ze stosowaniem na szeroką skalę antybiotykoterapii, która wydaje się nieskuteczna. Ponadto istnieje ryzyko zdrowotne związane z pozostałościami antybiotyków w mleku. Mimo to antybiotykoterapia w dalszym ciągu wydaje się jedynym rozwiązaniem. Kontrola zapalenia wymienia powinna opierać się na profilaktyce, niżeli leczeniu i potrzebne są nowe strategie w tym zakresie (Pyörälä, 2002).

1.2. Mastitis a skład mleka

Mastitis niekorzystnie wpływa na właściwości fizykochemiczne, skład i wydajność mleka. Zmiany te przypisuje się zwiększonej przepuszczalności naczyń spowodowanej stanem zapalnym oraz uszkodzeniom komórek nabłonka odpowiedzialnych za syntezę składników mleka. Na właściwości, skład i wydajność mleczną wpływają także zmiany enzymatyczne komórek somatycznych lub mikroorganizmów znajdujących się w zakażonym gruczole mlekowym (Reis i in., 2013).

Reis i in. (2013) zbadali wpływ komórek somatycznych na skład mleka u krów stwierdzając, że podwyższona SCC związana jest ze zmniejszoną zawartością laktozy i beztłuszczowej suchej masy w mleku. Zauważyli oni także, że zwiększony poziom SCC wiąże się z redukcją kazeiny, tłuszczu mlecznego i laktozy w mleku. Badanie wykazało również, że wysoki poziom SCC skorelowany jest także ze zwiększoną aktywnością enzymatyczną oraz obniżoną wydajnością i jakością produktów mlecznych. Co ciekawe, zauważono także, że wysoki poziom SCC związany jest z wyższą zawartością białka (nie są to pożądane kazeiny, a białko pochodzące z komórek somatycznych i zanieczyszczeń mikrobiologicznych) tłuszczu i suchej masy.

Wyniki badań wykazały jednoznacznie, że infekcje gruczołu mlekowego mają negatywny wpływ na skład mleka. Niemniej wykazano także, że zmiany w mleku zależą także od samej odpowiedzi zapalnej, stopnia nasilenia infekcji zajętej chorobą tkanki gruczołu mlekowego, a także patogenności bakteryjnej, wirusowej oraz obecności grzybów

i pierwotniaków. Oprócz wyżej wymienionych czynników, na skład mleka wpływają wiek krowy, okres laktacji i praktyka żywieniowa (Reis i in. 2013).

Badania dotyczące zmienionego składu mleka spowodowanego występowaniem zapalenia gruczołu mlekowego przeprowadzili także Paixão i in. (2017). Naukowcy porównali skład i stan zdrowotny mleka z gruczołów mlecznych zdrowych wymion z jedynie pojedynczą ćwiartką zmienioną klinicznie, z wynikami próbek mleka ze zdrowych gruczołów mlecznych zdrowych krów. Badanie objęło 340 ćwiartek wymienia u 118 krów w wysokoprodukcyjnym stadzie. Odnotowano różnice w składzie mleka i statusie zdrowotnym ćwiartek u krów chorych i zdrowych. Mleko pobrane z ćwiartek zdrowych krów miało więcej białka i laktozy, natomiast mniej tłuszczu, charakteryzowało się też mniejszą zawartością SCC. Badania sugerują, że pojedyncza ćwiartka z klinicznym zapaleniem wymienia wpłynęła na ogólny stan immunologiczny wymienia, zmieniając skład mleka i stan zdrowia sąsiednich ćwiartek (Paixão, 2017).

Badanie Gonçalves'a i in. (2020) również skupiło się na ocenie wpływu przewlekłego subklinicznego zapalenia wymienia i obecności konkretnych szczepów bakteryjnych na produkcję mleka i jego skład u krów mlecznych rasy holsztyńskiej. Wybrano w sumie sześć stad zlokalizowanych w środkowo-zachodniej części stanu São Paulo w Brazylii. Stada były odwiedzane raz na 2 tygodnie w celu pomiaru wydajności mleka i pobrania próbek mleka od krów w okresie laktacji. Skład mleka (w tym całkowite białko, tłuszcz, laktoza i całkowita sucha masa) mierzono za pomocą spektroskopii w średniej podczerwieni. Stwierdzono, że ćwiartki wymienia z subkliniczną postacią *mastitis*, wykazywały utratę mleka na poziomie 1,1 kg na dojoną ćwiartkę w porównaniu do ćwiartek zdrowych.

Naukowcy badali, jak konkretne szczepy bakteryjne wywołujące subkliniczną postać *mastitis* wpływają na skład mleka u badanych krów. Odkryli oni, że ćwiartki wymienia z subkliniczną postacią *mastitis* i zainfekowane *S. aureus*, charakteryzowały się wyższą zawartością SCC (314 tys. kom/ml), niż ćwiartki zdrowe (56 tys. kom/ml). Ponadto mleko pochodzące ze zdrowych ćwiartek zawierało więcej tłuszczu, białka i laktozy, a także suchej masy beztłuszczowej niż mleko pochodzące z zainfekowanych ćwiartek. Stwierdzono też, że zainfekowane patogenami ćwiartki wymienia wykazywały znaczną utratę mleka w porównaniu z ćwiartkami zdrowymi (Gonçalves i in., 2020).

Podobne wyniki otrzymali Kayano i in. (2018), którzy badali związek pomiędzy występowaniem klinicznego *mastitis* w zainfekowanych patogenami wymionach a składem mleka. Naukowcy osobno badali pierworódki (pierwsza laktacja) i wieloródki (druga i kolejna laktacja). Badacze analizowali pięć różnych grup patogenów i ustalili, że obecność każdego

z nich wiązała się ze znaczną utratą mleka u wieloródek. Zauważono także, że wszystkie grupy patogenów związane były z istotnie większą liczbą komórek somatycznych, zmniejszoną zawartością laktozy i zmianami w ilości tłuszczu i białka w mleku.

Ogola i in. (2007) także donieśli, że skład mleka ulega zmianie pod wpływem zapalenia wymienia. Naukowcy zbadali wpływ infekcji *mastitis* na jakość składu mleka w małych stadach bydła mlecznego. Celem tego badania było znalezienie standardu liczby komórek somatycznych (SCC) jakości mleka, który mógłby być wykorzystany jako integralny element programu kontroli. W badaniu przeanalizowano 396 ćwierć próbek mleka pochodzących od krów w okresie laktacji (rasy holsztyńska i zebu). W 56% z tych ćwiartek wystąpiło zakażenie dowymieniowe, przy ogólnej średniej SCC wynoszącej $5,46 \times 10^5 \pm 2,30 \times 10^4$ komórek/ml. Zainfekowane ćwiartki miały istotnie ($p < 0,05$) wyższe średnie wartości SCC ($6,19 \times 10^5 \pm 4,40 \times 10^4$ komórek/ml) w porównaniu do zdrowych ćwiartek ($2,65 \times 10^5 \pm 2,40 \times 10^4$ komórek/ml). W mleku o wysokim stężeniu SCC i zainfekowanych ćwiartkach stężenie frakcji niekazeinowych, sodu, chlorków i wolnych kwasów tłuszczowych było wyższe ($p < 0,05$), podczas gdy zawartość kazeiny, laktozy, białka całkowitego kazeiny, potasu i wapnia były niższe ($p < 0,05$) w porównaniu z ćwiartkami niezainfekowanymi.

Do podobnych wniosków doszli Harjanti i Sambodho (2020), którzy opublikowali wyniki badań nad wpływem *mastitis* na wydajność i skład mleka u krów. Zbadano łącznie 103 krowy w 2-3 miesiącu laktacji. Zawartość białka, tłuszczu i laktozy w mleku oznaczono analizatorem mleka *Lactoscan*. Produkcję mleka rejestrowano codziennie przy doju porannym i wieczornym. Wynik pokazuje statystycznie ujemną korelację ($P < 0,0001$) między stopniem zapalenia wymienia a produkcją mleka ($r = -0,59$) oraz zawartością białka mleka ($r = -0,55$), laktozy ($r = -0,51$) i zawartością tłuszczu ($r = -0,46$).

Ciekawe badania przeprowadzili Nogalska i in. (2020), którzy zajęli się określeniem wpływu miesiąca laktacji i stanu zdrowotnego wymion wysokowydajnych krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (PHF) na dobową produkcję mleka oraz zawartość potasu (K), wapnia (Ca), sodu (Na), magnezu (Mg) i cynku (Zn) w mleku.

Najwyższą średnią dobową wydajność mleka (49,1 kg) odnotowano u krów w drugim miesiącu laktacji, a biorąc pod uwagę stan zdrowotny wymion, u krów, których mleko zawierało średnio od 201 000 do 400 000 komórek somatycznych w ml (co oznacza ryzyko zapalenia wymienia). Zawartość K w mleku wzrastała ($p < 0,05$) w kolejnych miesiącach laktacji, natomiast zawartość Zn w mleku była odwrotna. Średnia zawartość Ca ($842 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), Na ($344,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i Mg ($98,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) w mleku kształtowała się poniżej dolnych granic normy fizjologicznej.

Mleko pochodzące od krów o zdrowych wymionach ($\leq 200\ 000$ komórek somatycznych/ml) miało najwyższe stężenie K, natomiast Na i Zn były najwyższe w mleku krów z klinicznym zapaleniem wymienia (> 1 mln komórek somatycznych/ml). Zapaleniu wymienia towarzyszył wzrost zawartości Na i Zn w mleku. Badacze wywnioskowali, że wysoka zawartość Na i Zn w mleku może być dodatkowym wskaźnikiem *mastitis* u krów.

França i in. (2017) podjęli się oceny wpływu występowania patogenów *mastitis* (*Staphylococcus spp* i *S. aureus*) i liczby komórek somatycznych (SCC) na wydajność i skład mleka krów mlecznych. W badaniu wykorzystano próbki mleka krów rasy holsztyńskiej ($n=1163$), które charakteryzowały się wydajnością mleczną $30,97 \pm 10,22$ kg mleka/dzień. Oceniono wydajność i skład mleka w zależności od badanego patogenu i liczby komórek somatycznych. Wraz ze wzrostem SCC zmniejszała się wydajność mleka i zawartość laktozy, a wzrastała zawartość białka ogólnego. Patogeny nie miały wpływu na SCC i wydajność mleczną. Badanie dowiodło, że *S. aureus* zwiększał, a *Streptococcus spp* zmniejszał zawartość laktozy w mleku.

Gonçalves i in. (2020) zbadali subkliniczną postać zapalenia wymienia wywołanym przez *Corynebacterium spp.* u krów mlecznych. Zbadano, oceniając zdrowe i zakażone ćwiartki wymienia, wydajność mleczną i skład mleka. Selekcję krów z subklinicznym zapaleniem wymienia wywołanym przez *Corynebacterium spp.*, przeprowadzono metodą hodowli mikrobiologicznej próbek pobranych od 1242 krów mlecznych z 21 stad mlecznych. Chociaż infekcja *Corynebacterium spp.* nie miała wpływu na wydajność mleka czy zawartość tłuszczu, białka, kazeiny i suchej masy w mleku, to zaobserwowano zwiększony poziom SCC, obniżoną zawartość laktozy i beztłuszczowej suchej masy mleka.

Głównym czynnikiem etiologicznym *mastitis*, ale nie jedynym, są infekcje bakteryjne, podczas których leukocyty i białka surowicy krwi przemieszczają się do miejsca zakażenia (Thompson-Crispi i in., 2014). Opisano ponad 150 gatunków drobnoustrojów wywołujących *mastitis* u krów, wśród których występują bakterie, wirusy, grzyby i glony. Drobnoustroje te wnikają do wymienia przede wszystkim przez kanał strzykowy, powodując infekcję w warunkach osłabienia mechanizmów obronnych (Smulski, 2014). Stanowi to zagrożenie dla zdrowia wymienia w pierwszej i późniejszych laktacjach, co w konsekwencji wpływa także na produkcję i jakość pozyskiwanego mleka (Vliegheer i in., 2012) oraz spadek odporności w przypadku źle dobranej antybiotykoterapii (Thompson-Crispi i in., 2014).

1.2.1. Bakterie

Bakterie wywołujące stan zapalny gruczołu mlekowego mają różny potencjał chorobotwórczy i w związku z tym dzielone są na dwie grupy. Pierwszą z nich są tzw. główne drobnoustroje bezwzględnie chorobotwórcze (ang. *major pathogens*), do których należą *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Truoperella pyogenes* i bakterie z grupy *coli*. Drugą grupę stanowią drobnoustroje warunkowo chorobotwórcze (ang. *minor pathogens*) np. *Corynebacterium bovis*, grzyby drożdżopodobne, inne gronkowce koagulazo-ujemne, inne paciorkowce i ziarniaki (Duse i in., 2021; Smulski, 2014).

Bakterie wywołujące *mastitis* można też podzielić ze względu na drogę zakażenia. Podział ten wyszczególnia bakterie zakaźne, będące czynnikiem zapalenia i przenoszonych z jednego zwierzęcia na drugie, oraz bakterie środowiskowe. To kryterium zakaźności pozwala na wdrożenie różnych sposobów postępowania podczas zwalczania wymienionych patogenów (Smulski, 2014). Drobnoustroje zakaźne zależne są od organizmu gospodarza i nie mogą przebywać poza nim przez dłuższy czas (Duse i in., 2021).

Głównym siedliskiem patogenów zakaźnych są poszczególne ćwiartki wymienia. Patogeny te transmitowane są na sąsiadujące ćwiartki, infekując kolejno całe wymię, mogą też być przenoszone na inne osobniki zwłaszcza w okresie udoju. Skutkuje to podklinicznym *mastitis* w postaci chronicznej z epizodami zaostrzenia się choroby do stanu klinicznego (Abebe i in., 2016). Objawia się to wzrostem liczby komórek somatycznych w mleku pochodzącym z zakażonych ćwiartek (Lassa i in., 2013).

Do patogenów zakaźnych należą przede wszystkim: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp.* i *Corynebacterium bovis* (Radostits i in., 2007, Smulski, 2014). Podstawowym ich źródłem jest wydzielina zakażonych ćwiartek. Drobnoustroje przenoszone są podczas doju poprzez kubki strzykowe, ręce dojarza oraz ręczniki do czyszczenia wymion, jeśli nie są zmieniane podczas doju. Patogeny z zakażonej krwi mogą być przetransmitowane w ten sposób na sześć do ośmiu niezakażonych krów w trakcie jednego doju (Smulski, 2014).

Drugą gałąź podziału stanowią bakterie środowiskowe. Żyją one poza organizmem zwierzęcia, a ich siedliskiem jest środowisko jego bytowania. Identyfikowane są w ściółce, oborniku czy glebie (Duse i in., 2021). Można je podzielić na dwie grupy: paciorkowce inne niż *Streptococcus agalactiae* oraz bakterie Gram-ujemne (*Coliforms*). Rzadziej izolowane drobnoustroje to *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*, które odznaczają się wysoką

odpornością na antybiotyki. Grupa pałeczek Gram-ujemnych obejmuje: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* i *Serratia spp.* Inne patogeny *mastitis* pochodzenia środowiskowego to: *Truoperella pyogenes* (najczęściej izolowany gatunek w procesie badania mleka), *Nocardia species*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*, drożdżaki, grzyby pleśniowe oraz glony bezchlorofilowe – *Prototheca*.

Streptococcus dysgalactiae i *Streptococcus uberis* mają cechy zarówno patogenu zakaźnego, jak i środowiskowego (Smulski, 2014; Harmon, 1994). Kolejnymi z grupy patogenów środowiskowych są *Enterobacteriaceae* i gronkowce koagulazo-ujemne (ang. *coagulase-negative staphylococci*, CNS). Patogeny te wywołują zakażenie gruczołu mlekowego, ale nie przystosowują się do przetrwania w organizmie gospodarza (Cervinkova i in., 2013), dlatego zakażenia nimi spowodowane zaliczane są do postaci klinicznej *mastitis* o krótkim okresie trwania (Harmon, 1994). Do powstania stanu zapalnego w obrębie gruczołu mlekowego dochodzi podczas przedostania się drobnoustrojów przez kanał strzykowy, namnożenia się ich w tkance mlektwórczej i uwolnienia toksyn bakteryjnych (Duse i in., 2021).

Patogeny środowiskowe są obecne i żyją w otoczeniu krowy (woda, ściółka, kał). Im bardziej warunki sprzyjają rozwojowi drobnoustrojów (ciepło, wilgoć), tym bardziej intensywnie namnażają się one w środowisku. Dzieje się tak zwłaszcza latem, gdy wzrasta ilość zakażeń, a tym samym odsetek *mastitis*. Patogeny przedostają się do wymion między dojami, kiedy strzyki narażone są na kał, brudną ściółkę i inne zanieczyszczenia. Wyróżniamy także drobnoustroje oportunistyczne, które żyją w dużej liczbie na powierzchni wymienia i wykorzystując obniżoną odporność zwierząt, stanowią stałe źródło wewnątrzwymieniowych infekcji. Powodują one przeważnie łagodne postaci zapalenia tkanek wymienia, dlatego uważane są za mniej niebezpieczne patogeny (Smulski, 2014).

1.2.2. Inne patogeny

Czynnikami etiologicznymi wywołującymi *mastitis* są przede wszystkim bakterie, zwłaszcza gronkowce i paciorkowce, ale także inne patogeny, takie jak grzyby, algi, pierwotniaki i wirusy (Jones i Bailey, 2009). Różnorodność występowania patogenów zależy od wielkości stada, warunków jego utrzymania oraz poziomu sanitarnego (Lakew i in. 2009; Smulski, 2014). Grzyby stanowią normalną florę gleby, a także kolonizują skórę rąk, wymion czy strzyków. W roli czynników etiologicznych *mastitis* występują głównie drożdżaki należące do rodzajów: *Candida*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* i *Cryptococcus*. Wśród

rodzaju *Candida* najliczniej występujące w Polsce to: *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* i *Candida famata*.

Grzyby są czynnikiem etiologicznym zarówno podklinicznej, jak i klinicznej formy zapalenia wymienia. Infekcje nimi wywołane są najczęściej efektem antybiotykoterapii (Smulski, 2014).

1.3. Metody diagnozowania *mastitis*

1.3.1. Liczba komórek somatycznych SCC

Jednym z ważniejszych indyktorów pozwalających stwierdzić występowanie *mastitis* jest tzw. liczba komórek somatycznych w mleku. Komórki somatyczne występujące w mleku w większości reprezentują komórki układu odpornościowego. U zdrowej krowy od 66 do 88% z nich to makrofagi. Dodatkowo można wśród nich wyróżnić neutrofile, limfocyty oraz komórki nabłonkowe i wielojądrzaste. Mimo że komórki nabłonkowe stanowią niewielką frakcję (<7%) (Matteis i in., 2020), to właśnie dzięki ich obecności został przyjęty oficjalny termin akceptowany w literaturze - „komórki somatyczne” (Pyörälä, 2002). W zdrowej ćwiartce obserwuje się od 1 do 11% neutrofile, podczas gdy w ćwiartce zainfekowanej ilość ta wzrasta do 90% i więcej (Pyörälä, 2002).

Komórki somatyczne stanowią swoiste odzwierciedlenie odpowiedzi immunologicznej na infekcje (Schukken i in., 2003). Występowanie *mastitis* jest ściśle skorelowane z podwyższoną zawartością komórek somatycznych, co można odczytywać jako objaw samej choroby. Wartość graniczna liczby komórek somatycznych w mleku określająca zapalenie wymienia ustalana była w ostatnich latach wielokrotnie, ostatecznie jednak wartość tę przyjęto na poziomie powyżej 200 000 komórek/ml w mleku pochodzącym z jednej ćwiartki. Mleko pochodzące z ćwiartki zdrowego wymienia zawiera nie więcej niż 200 000 komórek somatycznych/ml (Williamson i in., 2022). Inną wartość podaje Międzynarodowa Federacja Mleczarska (ang. IDF – *International Dairy Federation*), która zakłada 250 000 komórek somatycznych/ml jako wartość graniczną określającą zapalenie wymienia (Middleton i in., 2017).

Na podwyższoną liczbę komórek somatycznych mogą mieć wpływ także takie czynniki jak kolejność czy stadium laktacji, poziom produkcji mleka, stres, sezon czy rasa (Smolenski i in., 2007). Rozpatrując zależność między stadium laktacji a poziomem SCC, zauważono, że wkrótce po porodzie poziom SCC jest wysoki, ale szybko, w przeciągu od czterech do pięciu

dni po wycieleniu, obniża się do normalnego poziomu. Im bliżej końca laktacji, tym poziom komórek somatycznych w mleku nieznacznie się podwyższa (Hogeveen i in., 2001). Podobną tendencję zauważyli Sitkowska i in. (2018), którzy w swoich badaniach potwierdzili, że wyższe wartości SCC obserwuje się częściej bezpośrednio po wycieleniu, we wczesnej laktacji oraz w pierwszych 2–3 tygodniach okresu zasuszenia (Sitkowska i in., 2018). Sytuacja przedstawia się odwrotnie w przypadku ćwiartek zainfekowanych. Poziom komórek somatycznych pozostaje na stałym, wysokim poziomie. Oznacza to, że poziom komórek somatycznych w mleku z ćwiartki wymienia w kilka dni po wycieleniu, może służyć wykryciu nowopowstałej infekcji wymienia (Hogeveen i in., 2001).

Na poziom komórek somatycznych w mleku wpływa także częstotliwość udoju. Zwiększenie częstotliwości udoju z dwóch do trzech razy dziennie obniża ilość komórek somatycznych i tym samym zmniejsza odsetek krów z wysokim poziomem SCC, co spowodowane jest krótszym czasem inkubacji drobnoustrojów zakaźnych w wymieniu pomiędzy poszczególnymi dojami (Hogeveen i in., 2001).

Do podobnych wniosków doszli także Hammer i in. (2012), którzy wykazali, że niska wydajność mleczna i laktacje u wieloródek zwiększają ryzyko wystąpienia *mastitis* u krów (Hammer i in., 2012). Zależność ta została także potwierdzona przez Sitkowską i in. (2018), którzy w swoim badaniu zaobserwowali, że mleko, pochodzące od krów dojonych od trzech do czterech razy dziennie w pierwszym miesiącu po wycieleniu, charakteryzowało się niższą zawartością SCC od mleka pochodzącego od krów dojonych rzadziej (Sitkowska i in., 2018). Bardzo krótkie (do czterech godzin) i bardzo długie przerwy w dojeniu, przyczyniają się do wzrostu SCC w mleku (Pyörälä, 2002). Zauważono też, że średnia liczba komórek somatycznych w mleku zwiększa się wraz z wiekiem krowy i jest odwrotnie proporcjonalna do zmniejszającej się wydajności mlecznej i DIM (ang. *Days In Milk*) (Schukken i in., 2003). Należy jednak pamiętać o istnieniu niekorzystnej korelacji genetycznej polegającej na wprost proporcjonalnej wydajności mlecznej do zawartości SCC (wyższej zawartości SCC, odczytywanej jako niższej odporności) wynikającej ze zbyt wysokiej eksploatacji nabłonka wymienia.

Z liczbą komórek somatycznych w mleku kojarzona jest najczęściej subkliniczna postać *mastitis* – jest ścisły związek pomiędzy SCC a rozległością i wielkością stanu zapalnego. Zazwyczaj tylko jedna ćwiartka wymienia jest zainfekowana, a poziom SCC jest wysoce zmienny podczas stanu zapalnego w zależności od rodzaju patogenu lub osobniczej odpowiedzi immunologicznej. Dlatego też pojedyncze analizy poziomu SCC w mleku są mało informacyjne i mogą być interpretowane jedynie w przypadku, gdy poziom SCC jest stale niski

(u zdrowych krów) lub powtarzalnie wysoki (u krów zainfekowanych). Poprawna interpretacja wyników powinna być przeprowadzana na podstawie powtórzeń analiz. Rejestracja wyników poziomu SCC z powtarzanych badań, jest rutynowo raportowana w miesięcznych odstępach czasowych dla poszczególnych osobników w wielu krajach i przechowywana w bazach danych. Jest wiele czynników, które mogą powodować dysproporcje w liczbie komórek somatycznych. Wartości te są nierównomierne z przewagą tych, które sięgają do 100 000 komórek/ml i niewielkim odsetkiem bardzo wysokich (sięgające kilku milionów). To właśnie, dlatego (w celu normalizacji rozkładu) wartość SCC przedstawia się czasami w jej zlogarytmowanej formie jako SCS i uzyskuje tzw. punktację komórek somatycznych (ang. *Somatic Cell Score*, SCS) (Čítek i in., 2022), którą oblicza się wedle wzoru: $SCS = \log_2 (SCC/100\ 000) + 3$ (Rupp i Boichard, 2003). SCS jest, więc logarytmiczną pochodną SCC w uproszczonej skali.

Liczbę komórek somatycznych można mierzyć za pomocą metod bezpośrednich lub pośrednich. Metody bezpośrednie wykorzystują przenośne automatyczne liczniki komórek, które są praktyczne do użytku w terenie, lub automatyczne liczniki w warunkach laboratoryjnych. Jest wiele dostępnych przenośnych liczników komórek. Niektóre wykorzystują reakcję enzymatyczną katalizowaną esterazą, podczas gdy inne zliczają optycznie komórki somatyczne poprzez barwienie jąder komórkowych specyficznym dla DNA odczynnikiem fluorescencyjnym (jodek propidyny). Do ich głównych zalet zalicza się opłacalność, szybkość użytkowania i łatwość obsługi. Niestety uważa się, że charakteryzują się niską czułością przy niewielkiej liczbie komórek somatycznych (Viguier i in., 2009).

Liczniki laboratoryjne działają na zasadzie fluorescencji optycznej opisanej powyżej, lecz w tym przypadku odczynnikiem fluorescencyjnym jest silny mutagen – bromek etydyny. Wygenerowany sygnał fluorescencyjny służy do oszacowania SCC w mleku. Zaletą automatycznego licznika komórek somatycznych jest to, że jest obiektywny i dokładny. Do wad można zaliczyć czasochłonność pomiaru, gdyż próbki muszą zostać wysłane do laboratorium, co wymaga też dużych nakładów finansowych wynikających z wysokiej ceny sprzętu (Viguier i in., 2009).

Inną metodą bezpośredniej detekcji jest morfologiczna ocena komórek (ang. *Differential Cell Count*, DCC), za pomocą której, ukazywane są zmiany w proporcjach komórek, dzięki czemu może być wykorzystana do różnicowania zdrowych gruczołów mlekowych od zainfekowanych. DCC przeprowadzana jest na odpowiednio przygotowanych preparatach przy użyciu cytometrii (Pilla i in., 2013). Metoda ta została uznana za ważne narzędzie w identyfikacji procesów zapalnych, w przypadku, gdy wartość SCC oszacowana przez inne metody nie pozwala stwierdzić infekcji wymienia (Rivas i in., 2001). Ostatnie

badania pokazują, że DCC może ujawnić procesy zapalne w wymieniu z czułością i swoistością na poziomie odpowiednio 97,3% i 92,3% w mleku, w którym SCC nie przekracza 1000 komórek/ml (Duarte i in., 2015).

Za pomocą metod pośrednich dokonuje się pomiaru ilości komórek układu odpornościowego, enzymów lub innych produktów reakcji zapalnej w mleku, często związanych z występowaniem infekcji bakteryjnej (Duarte i in., 2015).

Do pośrednich metod pomiaru SCC zalicza się m.in. California *Mastitis* Test (CMT). Test przeprowadza się przez dodanie detergentu do próbki mleka, co sprzyja lizie komórek, uwalnianiu kwasu nukleinowego i tworzeniu „żelopodobnej” matrycy.

Gdy liczba komórek jest powyżej pewnego progu, interpretacja lepkości próbki jest subiektywna i może skutkować fałszywymi pozytywnymi lub negatywnymi wynikami (Viguiet i in., 2009). CMT ma stosunkowo wysoką czułość w różnicowaniu ćwiartek zakażonych patogenami od ćwiartek niezainfekowanych (Sargeant i in., 2001). Głównymi zaletami CMT są szybkość pomiaru w czasie rzeczywistym, niski koszt, prosta obsługa, a także możliwość wykonania w miejscu bytowania krowy (Duarte i in., 2015).

Kolejnym testem umożliwiającym pośredni pomiar SCC jest Wisconsin *Mastitis* Test (WMT). Jest to test laboratoryjny przeprowadzany zwykle na próbkach mleka zbiorczego. Wyniki mogą być wykorzystane do predykcji średniej liczby komórek somatycznych. Tutaj również, jak w przypadku metody CMT, wykorzystywany jest detergent. Reakcja mierzona jest wysokością powstałego w próbówce żelu (pomiar w milimetrach), co zapewnia dokładniejszy wynik niż ten uzyskany metodą CMT. WMT jest zwykle wykorzystywany przez producentów mleka jako test przesiewowy na mleku, głównie ze względu na jego prostotę i obiektywność. Stanowi on także wygodną metodę monitorowania zdrowia wymion krow na tle stada (Duarte i in., 2015).

Pomiar komórek somatycznych, ze względu na swoją obiektywną naturę (w przeciwieństwie do samej obserwacji objawów klinicznych) jest niezwykle cenioną i dokładną metodą pozwalającą na ocenę zawartości SCC w mleku. Dzięki pomiarom SCC, hodowcy mleka są w stanie stwierdzić stan podkliniczny *mastitis* bez wyraźnie występujących objawów choroby. Ponadto odziedziczalność SCC jest nieco wyższa niż odziedziczalność objawów klinicznych. Ze względu na wszystkie wymienione wyżej czynniki, w poniższej pracy badawczej, zdecydowano się na wybór podejścia skupiającym się na ocenie zawartości SCC w mleku. Ponadto, w badanych próbkach mleka, przyjęto trzy klasy wartości poziomu komórek somatycznych: krowy zdrowe $SCC \leq 200$ tys/ml, stan podkliniczny $200 < SCC \leq 400$ tys/ml

i krowy chore SCC>400 tys/ml. Podział ten zastosowano ze względu na możliwość występowania odmiennych efektów badanych genów w różnych stanach fizjologicznych.

1.3.2. Analiza bakteriologiczna

Dane fenotypowe będące swoistym miernikiem występowania *mastitis*, klasyfikowane są w dwie grupy: pomiary bezpośrednie informujące o stanie wymienia (bakteriologiczne; obserwacje zmian morfologicznych wymienia) i pomiary pośrednie, które polegają na predykcji mikrobiologicznego stanu wymienia na podstawie parametrów zapalnych jak liczba komórek somatycznych w mleku. Analiza bakteriologiczna mleka wydaje się być najbardziej precyzyjnym pomiarem bezpośrednim, ponieważ dostarcza dokładnych i wyczerpujących informacji o zainfekowanej ćwiartce. Czułość takiej analizy nie dotyczy jednak jednego rodzaju hodowli konkretnego patogenu, tak więc potrzebne są wielokrotne powtórzenia badań, które mogą dostarczyć także informacji na temat czasu trwania infekcji. Badania takie do celów genetycznych są rzadko przeprowadzane, ze względu na ich skomplikowany proces i wysoki koszt w implementacji na dużą skalę (w obrębie stada) (Rupp i Boichard, 2003).

Charakter danych dotyczących klinicznego *mastitis* jest jednoznaczny – stwierdzający obecność lub brak choroby. W wielu krajach dane dotyczące zachorowalności na kliniczne *mastitis* są bardzo ubogie, w związku z czym trwają badania nad standaryzacją i uogólnieniem rejestrowania przypadków klinicznego *mastitis*. Interpretacja takich danych jest jednak ograniczona pytaniami: jak rozróżnić nawrót tej samej infekcji od nowej, czy jak oszacować wiarygodność diagnozy przeprowadzonej podczas dojenia? Co ważniejsze, diagnoza klinicznego *mastitis* nie udziela żadnych informacji na temat całkowicie podklinicznych infekcji gruczołu mlekowego (Rupp i Boichard, 2003).

Identyfikacja patogenów infekujących wymię ma to istotne znaczenie w podjęciu odpowiednich środków kontroli, redukcji ryzyka pojawienia się przewlekłych zakażeń i ukierunkowanym leczeniu przeciwbakteryjnym. Wyróżniamy metody fenotypowe i genotypowe identyfikacji patogenów *mastitis*.

1.3.2.1. Mikrobiologiczne metody fenotypowe

Identyfikacja fenotypowa hodowli komórkowych opiera się na ocenie morfologii, cechach wzrostu, zdolności do metabolizowania substratów, oporności na antybiotyki i innych cechach wynikających z ekspresji DNA. Komercyjni producenci testów diagnostycznych opracowali szereg metod identyfikacji opartych na cechach fenotypowych (Zadoks i Watts, 2009).

Niewątpliwą zaletą takich testów fenotypowych jest fakt, że opierają się one na właściwościach biochemicznych, powszechnych i związanych z wieloma gatunkami bakterii. Są one łatwo dostępne na rynku, proste w obsłudze i o relatywnie niskim koszcie. Nie są jednak doskonałe i jak każda metoda, posiadają pewne wady. Jedną z nich jest przeszkoda dla obiektywnej interpretacji testu wynikająca ze zmienności ekspresji konkretnych izolatów bakterii należących do tego samego gatunku (Gonzalo i in., 2006; Bourry i Poutrel, 1996). Powtarzalność testów jest ograniczona przez zmienność ekspresji, a także przez różną interpretację cech fenotypowych. Także typowanie bakterii jest niedoskonałe na poziomie gatunku lub samego szczepu. Uważa się również, że prowadzenie hodowli mikrobiologicznych jest praco- i czasochłonne (Riffon i in., 2001; Gillespie i Oliver, 2005).

1.3.2.2. Mikrobiologiczne metody genotypowe

Metody genotypowe polegają na identyfikacji gatunków i szczepów bakterii przy wykorzystaniu informacji zakodowanej w DNA (Zadoks i Watts, 2009). Zsekwencjonowane genomy bakterii wywołujących *mastitis* są dostępne w genetycznych bazach danych, aby mogły służyć opracowaniu metod identyfikacji bazujących na nukleotydowej sekwencji kwasów nukleinowych, jak np. PCR (ang. *polymerase chain reaction*). Metoda PCR, czyli łańcuchowa reakcja polimerazy, jest jedną z najpopularniejszych metod identyfikacji bakterii patogennych opartej na analizie sekwencji wyizolowanych z nich kwasów nukleinowych (Smulski, 2014). Wysoka czułość reakcji PCR pozwala na wykrycie bakterii, których wzrost jest już zahamowany, co byłoby niemożliwe przy wykorzystaniu samych hodowli komórkowych – aż do 30% bakterii wywołujących kliniczne *mastitis* nie wykazuje wzrostu w hodowlach komórkowych. Wykorzystanie reakcji PCR prowadzi do zmniejszenia częstości występowania wyników fałszywie ujemnych. Ponadto szybkość reakcji i możliwość obiektywnej analizy jej wyników zdecydowanie przemawiają za jej praktycznym zastosowaniem (Radkowski i Olszewska, 2002).

1.3.3. Objawy kliniczne

Kolejną z metod jest badanie wzrokowe i palpacyjne wymienia przed udojem, które powinno odbywać się rutynowo. Wszystkie objawy *mastitis*, jak obrzęk, zaczerwienienie, twardość i tkliwość wymienia, a także gorączkę, można wykryć dzięki nawet pobieżnemu badaniu. Jednak zmiany te stają się wykrywalne stosunkowo późno od momentu zachorowania, dlatego nie można bezwzględnie polegać na samym badaniu wzrokowo-palpacyjnym chcąc wcześniej rozpoznać stan zapalny. Najczęściej w momencie stwierdzenia wymienionych wyżej objawów, choroba zdąży wyrządzić już konkretne straty dla hodowcy. Późniejsze

zdiagnozowanie choroby oznacza także późniejsze wdrożenie leczenia, które jest zwykle mniej skuteczne niż natychmiastowa kuracja i sprzyja zwiększonemu ryzyku rozprzestrzeniania się choroby (Cheng i Han, 2020).

Także samo odciąganie mleka i badanie go przed rzeczywistym udojem wciąż jest jedną z metod wykrywania wczesnych przypadków klinicznego *mastitis*. Powodem tego jest fakt, że zmiany w mleku są często pierwszą oznaką zapalenia wymienia. Wszystkie nieprawidłowości jak obecność skrzepów, ropy, agregatów bakterii w postaci tzw. „strzępów”, zmiany zabarwienia lub konsystencji (wodnisty wygląd) można zaobserwować po roztrzcieniu na ciemnej powierzchni niewielkiej ilości próbki mleka. Badanie takie jest proste do przeprowadzenia i nie wymaga specjalistycznego sprzętu, więc jest możliwe do wykonania w praktycznie każdych warunkach i przez każdą osobę zajmującą się udojem. Niemniej jednak, procedura taka ma miejsce w prawdopodobnie mniej niż dziesięciu procentach przypadków. Wynika to głównie z faktu, że badanie takie, z punktu widzenia hodowcy, jest czasochłonne (Cheng i Han, 2020).

1.3.4. Przewodność i zmienność jonowa mleka

Inną metodą diagnozowania *mastitis* jest wykorzystanie przewodności mleka i zmienności jonowej (Duarte i in., 2015). Skutkiem zapalenia wymienia jest zmiana koncentracji jonowej w mleku, co zmienia także jego przewodnictwo elektryczne. Zmiany te zachodzą od 24 do 36 godzin zanim pojawią się widoczne symptomy zapalenia. Zmiana w koncentracji jonowej spowodowana jest zwiększoną przepuszczalnością naczyń, co w konsekwencji prowadzi do modyfikacji w przewodności mleka. Pomiar przewodnictwa elektrycznego dokonywany jest w oparciu o dane dotyczące zwiększenia stężenia jonów sodu, potasu, wapnia, magnezu i chloru.

Pomiar przewodności elektrycznej jest szczególnie wykorzystywany i rozpowszechniony w robotach udojowych jako zautomatyzowana metoda wykrywania *mastitis* (Duarte i in., 2015). Metoda ta nie jest jednak tak prosta jak mierzenie liczby komórek somatycznych. W przeciwieństwie do tej drugiej, nie ma ustalonego progu, który ustalałby graniczną wartość przewodności. Każdy osobnik w stadzie ma swoją charakterystyczną wartość przewodności tak, więc diagnoza *mastitis* wymaga kilku powtórzeń testowych w celu wykrycia zmian w przewodności. Niezbędny jest także komputerowy system monitorujący i oprogramowanie do analizy danych. Chociaż zmiana przewodności mleka może być przydatna w wykrywaniu *mastitis*, nie jest ona wiarygodnym i wystarczająco czułym parametrem dla rozstrzygającej diagnozy, głównie ze względu na zbyt wysoką liczbę wyników fałszywie pozytywnych (Hovinen i in., 2006).

1.3.5. Poziom laktozy w mleku

Jednym z kolejnych indykatorów *mastitis* o dość wysokim potencjalnie jest procentowa zawartość laktozy w mleku. Laktoza jest cukrem disacharydowym, który składa się z cząsteczek glukozy i galaktozy i jest głównym składnikiem mleka krowiego (węglowodany stanowią około 40% całkowitej masy i 50% suchej masy beztłuszczowej). Na syntezę i stężenie laktozy w mleku ma wpływ przede wszystkim zdrowie wymion oraz bilans energetyczny i metabolizm krowy (Costa i in., 2019; Antanaitis i in., 2021). Badania wykazały, że stężenie laktozy w mleku spada, a liczba komórek somatycznych (SCC) wzrasta podczas klinicznego i subklinicznego zapalenia wymienia. Monitorowanie stężenia laktozy w mleku mogłoby więc służyć jako indykator *mastitis*, gdyż podczas stanu zapalnego obserwuje się wyraźny spadek laktozy w mleku. Pomiary poziomu laktozy pomagają w kontroli jakości i zarządzaniu gospodarstwami, ułatwiając identyfikację mleka o niskiej jakości (Televičius i in., 2021).

1.4. Fizjologiczne podstawy odpowiedzi immunologicznej w wymieniu

Patogeny infekujące wymię prowokują system immunologiczny zwierzęcia do wytworzenia szeregu reakcji obronnych. W ramach odpowiedzi immunologicznej istnieją mechanizmy swoiste i nieswoiste. Określa się je odpowiednio specyficznymi i niespecyficznymi lub nabytymi i wrodzonymi. Mechanizmy nieswoiste są starsze filogenetycznie i mniej precyzyjne, aczkolwiek szybkie w reakcji, dzięki czemu stanowią pierwszą linię obrony. Komórki zaangażowane w mechanizm odpowiedzi nieswoistej to m.in. komórki żerne (makrofagi i granulocyty obojętnochłonne), układ dopełniacza, lizozym, interferon i komórki zdolne do cytotoksyczności spontanicznej.

Mechanizmy swoiste, rozwinięte później w filogenezie, są precyzyjne w rozpoznaniu określonego intruza, lecz pełen zakres ich działania w odpowiedzi immunologicznej wymaga upływu określonego czasu. W swoistej odpowiedzi immunologicznej biorą udział przeciwciała wytwarzane przez limfocyty B i limfocyty T ze swoimi receptorami wiążącymi antygen. Wolniejsze działanie tego mechanizmu kompensowane jest przez rozwijającą się gwałtownie wtórną odpowiedź swoistą, występującą przy ponownym kontakcie z danym antygenem i długi czas utrzymywania się odporności. Na każdym etapie odpowiedzi immunologicznej zachodzi ścisła kooperacja i uzupełnianie się obydwu mechanizmów (Jakóbisiak, 2017).

1.4.1. Nieswoista odpowiedź immunologiczna

Odporność nieswoista ukierunkowana jest na cząsteczki charakterystyczne dla patogenów, np. dwuniciowy RNA replikujących się wirusów, a w wypadku bakterii na niemetylowane sekwencje DNA (tzw. wyspy CpG), lipopolisacharydy (LPS) czy obecne w ścianach komórek bakterii oligosacharydy zawierające mannozę.

W przypadku przerwania ciągłości zewnętrznych barier ochronnych, środowisko organizmu chronione jest przez wiele mechanizmów ograniczających oraz eliminujących zakażenie, zanim rozwinię się ono do postaci klinicznie objawowej. Mechanizmy te są uwarunkowane genetycznie, charakteryzują się szerokim zakresem działania względem wielu patogenów, a co najważniejsze są do dyspozycji organizmu w każdym momencie. To główna różnica pomiędzy obiema formami obrony organizmu – odporność swoista, mimo że bardziej efektywna, wymaga więcej czasu do osiągnięcia niezbędnej sprawności działania (Rainard i Riollet, 2006).

Odporność wrodzona jest uniwersalnym mechanizmem obrony organizmu przed infekcją. Odpowiedź ta działa w oparciu o istnienie określonej i ograniczonej liczby receptorów PRR (ang. Pattern Recognition Receptors) rozpoznających stałe struktury drobnoustrojów zwane PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns). Dzięki PRR organizm ludzki jest w stanie rozróżnić antygeny obce od własnych. Jednym z przedstawicieli PRR są receptory TLR (ang. Toll-like Receptors), które odgrywają główną rolę w rozpoznaniu zagrożenia i inicjacji odpowiedzi immunologicznej. Wśród komórek rozpoznających patogeny za pomocą receptorów TLR wyróżniamy: komórki układu immunologicznego (makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki tuczne, eozynofile, neutrofile, limfocyty B), komórki nabłonkowe, komórki śródbłonna, kardiomiocyty i adipocyty. Pobudzenie receptorów TLR przez produkty drobnoustrojów stanowi sygnał aktywujący mechanizmy odporności immunologicznej nieswoistej. Powoduje wzmożoną syntezę czynników przeciwbakteryjnych i cytokin prozapalnych, dojrzewanie komórek dendrytycznych (wzrost ekspresji molekuł kostymulujących i MHC), które uzyskują większą zdolność prezentacji antygenów. W niektórych przypadkach odpowiedź nieswoista jest niewystarczająca do zwalczania istniejącego zakażenia, w związku z czym niezbędna jest aktywacja odporności bardziej zaawansowanej, czyli swoistej. Aktywacja komórek APC poprzez TLR powoduje wzrost syntezy cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-1, -6, -8, -12) (Majewska-Szczepanik i Szczepanik, 2006).

Cytokiny wydzielane przez pobudzone makrofagi są, obok aktywacji dopełniacza i fagocytozy, czynnikami skutecznie ograniczającymi rozprzestrzenianie się zakażenia oraz warunkującymi rozwój miejscowej reakcji zapalnej. Reakcję tę można scharakteryzować poprzez:

- zmiany hemodynamiczne (rozszerzenie naczyń włosowatych, zwolnienie przepływu krwi, zwiększona przenikalność naczyń) skutkujące zaczerwienieniem, obrzękiem i podwyższoną temperaturą;
- wydzielanie substancji biologicznie czynnych: interleukin IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, czynnika martwicy nowotworu TNF, czynnika aktywującego płytki PAF, histaminy, prostaglandyn i enzymów (Rainard i Riolllet, 2006).

Ważną rolę w rozwoju miejscowej reakcji zapalnej odgrywają integryny obecne na limfocytach T: VLA i LFA-1, dla ostatniej ligandami są glikoproteiny błonowe obecne na wielu komórkach organizmu. Konsekwencją interakcji międzykomórkowych z udziałem integryn jest stymulacja limfocytów T pomocniczych i rozwój zjawisk cytotoksyczności wobec zakażonych komórek. Pobudzają one ponadto zjawiska koncentracji limfocytów T w miejscu zakażenia i okolicznych węzłach limfatycznych (Rainard i Riolllet, 2006).

TNF (ang. *tumor necrosis factor*, czyli czynnik martwicy nowotworów), IL-1 (interleukina 1) i IL-6 (interleukina 6) działając na hepatocyty wpływają na syntezę białek tzw. ostrej fazy, są to m.in. białka C-reaktywne i wiążące mannozę. Obydwa ułatwiają wiązanie dopełniacza na powierzchni patogenów. Wśród istotnych mediatorów reakcji zapalnej, nie można pominąć chemokin wydzielanych przez leukocyty, limfocyty T, fibroblasty, komórki śródbłonna, nabłonkowe i inne. Ich działanie obejmuje:

- zwiększenie powinowactwa integryn do odpowiednich ligandów, co ułatwia oddziaływanie komórek układu ośrodkowego (UO) ze śródbłonkami naczyń krwionośnych;
- ułatwienie migracji leukocytów do miejsca zakażenia, a także limfocytów T i B do tkanki limfatycznej i w jej obrębie (Rainard i Riolllet, 2006).

Do kolejnych czynników o ważnym mechanizmie działania w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej zaliczamy interferony. Są to grupy białek lub glikoprotein wytwarzanych przez różne typy komórek. Ich główną rolą jest zwiększenie ekspresji cząsteczek MHC klasy I, co ułatwia prezentację obcych antygenów limfocytom CD8 cytotoksycznym. Wpływa to również na podwyższenie ochrony komórek niezakażonych przed niszczącym działaniem komórek NK (Sordillo i in., 2005).

Same komórki NK (ang. *natural killers*) wykazują czynnościowe podobieństwo do limfocytów T cytotoksycznych. Uczestniczą one w obronie przeciwwirusowej. Podczas odpowiedzi przeciwzakaźnej ich odpowiedź cytotoksyczna zostaje zwielokrotniona w wyniku pobudzenia przez INF- α i INF- β . Te same cząsteczki przyczyniają się także do indukcji podziału komórek NK. We wczesnej fazie zakażenia krytyczną rolę odgrywa kooperacja komórek NK i makrofagów. Te drugie pobudzają komórki NK za pośrednictwem IL-12 i TNF, z kolei komórki NK działają zwrotnie na makrofagi pobudzając je poprzez INF- γ (Sordillo i in., 2005).

1.4.2. Swoista odpowiedź immunologiczna

Swoiście ukierunkowany typ odpowiedzi immunologicznej względem czynników zakaźnych uwarunkowany jest funkcją limfocytów B i T. Komórki te rozpoznają i niszczą patogeny, ale ich funkcjonowanie ściśle zależy od cząsteczek MHC klasy I i II, których rolą jest prezentowanie limfocytom obcych antygenów. Przypuszcza się, że występowanie dwóch klas MHC wynika z potrzeby wytworzenia odrębnych linii obrony przeciw dwóm głównym typom patogenów atakujących komórki eukariotyczne: namnażającym się wewnątrzkomórkowo (głównie wirusy) oraz pozakomórkowo (większość bakterii).

Odpowiedź immunologiczna na zakażenie może mieć charakter:

- pierwotny – wcześniej niezakażone komórki T i B podlegają aktywacji;
- wtórny – układ odpornościowy podlega aktywacji poprzez działanie antygenów, z którymi wcześniej miał już kontakt (Jakóbsiak, 2017; Sordillo i Streicher, 2002).

1.4.2.1. Pierwotna odpowiedź immunologiczna

W pierwotnej odpowiedzi immunologicznej schemat zjawisk zachodzących podczas zakażenia ma następujący ciąg: patogen, który wnika przez skórę i błony śluzowe jest wychwytywany przez komórki prezentujące antygen i transportowany do okolicznych węzłów chłonnych. Tam antygeny patogenu prezentowane są dzięki cząsteczkom MHC klasy II limfocytom CD4⁺. Efektorowe limfocyty T oraz komórki pamięci migrują w kierunku miejsca zakażenia, przy czym w procesie tym uczestniczą te same białka (selektyny i integryny), dzięki którym zachodzi migracja leukocytów podczas nieswoistej reakcji zapalnej.

Tak jak w odpowiedzi immunologicznej nieswoistej, także w swoistej odpowiedzi immunologicznej główną rolę odgrywają makrofagi. Indukują różnicowanie się limfocytów T w zależności od napływających do nich sygnałów (Sordillo i Streicher, 2002).

1.4.2.2. Wtórna odpowiedź immunologiczna

Zakażenie zakończone eliminacją konkretnego patogenu pozostawia po nim pamięć immunologiczną, która w przypadku powtórnego kontaktu z patogenem umożliwia szybszą i silniejszą odpowiedź wtórną. Wiąże się to z istnieniem wcześniej swoiście uczulonych klonów limfocytów T i B oraz przeciwciał. W miarę upływu czasu stężenie przeciwciał maleje, co związane jest z brakiem ekspozycji na antygen, ale kolejne zakażenie prowadzi do szybkiej i masywnej odpowiedzi przeciw temu patogenowi. Pamięć immunologiczna trwa do końca życia (Radkowski, 2002).

Proces zapalny ma charakter odpowiedzi nieswoistej, która ma na celu uzdrowienie organizmu poprzez naprawę uszkodzonych tkanek i wyeliminowaniu patogenu. Reakcja zapalna musi być precyzyjnie regulowana, tak by nie była ani zbyt silna, ani zbyt słaba, co mogłoby doprowadzić do śmierci zwierzęcia.

Pierwszą anatomiczną linią obrony przed czynnikiem patogennym jest kanał strzykowy. Jakkolwiek uszkodzenie struktury mięśnia zwieracza strzyka może doprowadzić do stanu zapalnego wymienia. Dodatkową barierę fizyczną stanowi keratynowa wyściółka kanału strzykowego (Duse i in., 2021). Konsekwencjami wytworzenia odpowiedzi immunologicznej są m.in.:

- lokalne rozszerzenie naczyń krwionośnych, obserwowane jako zaczerwienienie,
- podwyższenie temperatury wymienia,
- przesącz osocza przez ściany naczyń, co doprowadza do obrzęku objętych odczynem zapalnym tkanek.

W momencie infekcji uruchamiana jest odpowiedź immunologiczna na poziomie komórkowym. Jest ona przeprowadzana głównie przez dwie grupy leukocytów – limfocyty i fagocyty. Limfocyty B i T biorą udział w odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Fagocyty, w których skład wchodzi neutrofile i makrofagi, biorą udział w trawieniu i zabijaniu patogenów wywołujących *mastitis* oraz wydzielaniu mediatorów zapalnych (np. cytokin) (Burvenich i in., 1994). Po zniszczeniu antygenów bakteryjnych szczątki neutrofile są usuwane w postaci ropy (Duse i in., 2021). Neutrofile, stanowią pierwszą linię obrony. Komórki te mają zdolność do przemieszczania się z krwi obwodowej przez szczeliny śródbłonkowe i nabłonek gruczołu mlekowego do mleka. Podczas ostrej odmiany klinicznego *mastitis*, gwałtowny wzrost komórek somatycznych w mleku spowodowany jest głównie przez napływ neutrofile.

Przez długi czas to właśnie neutrofile uważane były za główny wskaźnik zachorowalności na ostrą odmianę klinicznego *mastitis* (Burvenich i in., 1994).

1.5. Czynniki środowiskowe związane z występowaniem *mastitis*

Pośród czynników wpływających na występowanie *mastitis* można uwzględnić środowisko wewnętrzne, takie jak stadium laktacji czy numer kolejnej laktacji oraz czynniki środowiska zewnętrznego, do których zaliczamy warunki atmosferyczne, takie jak sezon, temperatura i wilgotność, a także higiena pomieszczeń, żywienie zwierząt, technologia i higiena pozyskiwania mleka, sposób utrzymania zwierząt, profilaktyka weterynaryjna itp. (Morse i in., 1988).

Badania wykazały związek pomiędzy klinicznymi przypadkami *mastitis* a miesiącem laktacji i ilością przebytych ciąż (ang. *parity*). Szacuje się, że u pierwiastek czas trwania klinicznej postaci *mastitis* podczas wczesnej laktacji jest krótszy niż podczas laktacji późnej. U krów, które rodziły wielokrotnie nie obserwuje się różnic w długości trwania choroby w zależności od stadium laktacji (Moosavi i in., 2014). Zauważono także znaczące powiązanie między przypadkami klinicznego *mastitis* a wiekiem krów po przynajmniej ośmiu porodach i krowami w przynajmniej czwartym miesiącu laktacji (Mungube i in., 2004). Stwierdza się też częstsze występowanie klinicznego *mastitis* w okresie okołoporodowym (Bradley i Green, 2004) i zwiększoną podatność na zachorowanie podczas dwóch tygodni przed i po wycieleniu. Nie bez znaczenia jest też krytyczny okres zasuszania, w którym krowa, mimo zaprzestanego doju, dalej produkuje mleko. Nierzadko, w okresie tym, konieczne jest ograniczenie pojenia w celu ograniczenia laktacji i wdrożenie antybiotykoterapii. W okresie zasuszania stosuje się w niektórych przypadkach tzw. „zasuszanie pod osłoną antybiotyków”. Nie jest to optymalne rozwiązanie ze względu na wprowadzanie do środowiska zbyt dużej ilości antybiotyków (Oliver i in., 1988).

Także sezonowość ma znaczenie przy rozpatrywaniu występowania przypadków *mastitis*. Podczas okresu wiosennego i zimowego zachorowalność u pierwiastek zwiększa się podczas wczesnego stadium laktacji, natomiast u krów wieloródek podczas późnego stadium. Wysoka wilgotność w obu sezonach przyczynia się do wzmożonego rozwoju patogenów, które mogą infekować wymię i tym samym prowadzić do zapalenia (Moosavi i in., 2014). Ponadto obrzęk wymienia, który najczęściej występuje podczas późnej ciąży i wczesnej laktacji, sprawia, że proces dojenia jest bolesny, a wydajność mleczna niska. Obrzęknięta tkanka sutka

i wymienia jest osłabiona i drobnoustroje łatwiej przenikają do jego wnętrza, co zwiększa podatność na infekcje (Slettbakk i in., 1995).

W sezonie letnim, immunosupresja spowodowana szokiem cieplnym także może mieć wpływ na zwiększone występowanie zachorowalności na *mastitis* u pierwiastek w późnym stadium laktacji. Latem wzrasta ilość patogenów w środowisku, a także ma miejsce gwałtowne wylęganie much przenoszących bakterie. Sprzyjają temu warunki pogodowe, gdyż wysoka temperatura po intensywnych opadach deszczu faworyzuje rozmnażanie się much. W czasie od lipca do września, obserwuje się u krów występowanie tzw. letniego zapalenia wymienia (LZW). Letnie zapalenie wymienia znane jest również pod nazwą ropno-wrzodziejącego zapalenia wymienia. Występuje ono również w innych okresach roku, ale zdecydowanie rzadziej. Choroba ta dotyczy głównie krów zasuszonych i jałówek, i powoduje duże straty, gdyż bardzo rzadko wydajność mleczna w zainfekowanych ćwiartkach wraca w kolejnej laktacji do stanu z okresu przed zachorowaniem. W Polsce zapalenie tego typu odnotowywane jest w 3% przypadków klinicznego *mastitis* (Erdem i Okuyucu, 2019).

Letnie zapalenie wymienia może występować zarówno u zwierząt wypasających się na pastwiskach, jak i u tych, które przebywają w oborze. Czynnikiem decydującym jest wysoka wilgotność i wysoka temperatura powietrza. Rozwój choroby nasila się na terenach wilgotnych, po intensywnych opadach deszczu – są to warunki sprzyjające rozwojowi much. Najniebezpieczniejszym wektorem zakażenia jest gatunek *Hydrotaea irritans*. Owad ten, przyciągany zapachem kwasu mlekowego, propionowego i masłowego, obsiada wymiona bydła i owiec, perforując bezwłosą skórę strzyków (Erdem i Okuyucu, 2019). Najczęściej dochodzi do zakażenia przednich ćwiartek, gdyż z tylnych owady są przepędzane za pomocą ogona.

Choroba na początku ma ostry przebieg – wzrasta temperatura ciała i następuje zahamowanie apetytu. Jednym z charakterystycznych objawów jest również kulawizna powstająca na skutek rozwijającego się obrzęku nogi po stronie zajętej ćwiartki. Wymię jest wyraźnie zaczerwienione, tkliwe i obrzęknięte, a także gorące. Wydostająca się z niego wydzielina jest o nieprzyjemnym zapachu i wyglądem przypomina surowicę z domieszką ropy i krwi.

Do głównych powikłań *mastitis* należą także infekcje dróg rodnych, które mogą prowadzić do trudności z zacieleniem czy poronień. Ponadto brak reakcji hodowcy na powyższe symptomy może prowadzić też do śmierci krowy. Jeśli wystarczająco silny organizm krowy będzie w stanie zwalczyć kliniczne objawy choroby, to przechodzi ona w stan przewlekły. Stwierdzany on jest zazwyczaj po porodzie, a zainfekowana ćwiartka jest dalej

obrzmiała i twarda. Badanie palpacyjne pozwala wyczuć uformowane ropnie, które z czasem wydostają się ponad skórę w postaci guzów. Mogą się one otwierać do światła przewodów mlekonosnych formując ropne przetoki. Dochodzi wtedy do utraty produkcji mleka w zakażonej ćwiartce, co zmusza hodowcę do eliminacji chorych osobników ze stada (Erdem i Okuyucu, 2019).

1.6. Czynniki genetyczne związane z występowaniem *mastitis*

Większość badań genetycznych skupia się na powiązaniach genotypu z fenotypem, którym jest odporność/podatność na *mastitis*, wyrażona jako liczba komórek somatycznych w mleku (SCC) lub przypadki klinicznego *mastitis* jako swoiste indykatory stanu zdrowotnego wymion (Heringstad i in., 2000). Dotychczas przeprowadzone badania nad *loci* cech ilościowych (QTL) pozwoliły na zlokalizowanie regionów odpowiedzialnych za uwarunkowanie tych cech. Odziedziczalność, szacowana głównie w oparciu na zmienności w grupach krewnych, oceniana jest na umiarkowaną lub niską w przypadku SCC i klinicznego *mastitis*.

Zmienność genetyczna odporności na *mastitis* jest tylko niewielkim ułamkiem wszystkich możliwości zapobiegania zapaleniu, ale nie jest nieistotna i może być rozważana jako narzędzie służące selekcji oraz ważne uzupełnienie polepszenia odporności bydła mlecznego. Utrzymywanie warunków sanitarnych na wysokim poziomie jest pierwszą i wysokodajną metodą kontrolowania *mastitis*, jednak w dalszym ciągu nie na tyle skuteczną by w pełni pozbyć się źródeł choroby z wszystkimi jej ekonomicznymi konsekwencjami (Tribout i in., 2020). Wskazują na to wyraźnie statystyki, których analiza pozwala stwierdzić, że zachorowalność na *mastitis* w ostatnich latach w wielu krajach wzrosła, zwłaszcza wśród osobników rasy holsztyńskiej. Trend ten spowodowany jest stosowaniem selekcji opartej na produktywności stada, a także genetycznym antagonizmem pomiędzy wydajnością mleczną a odpornością na *mastitis*, polegającym na osłabieniu stanu zdrowia wymienia w efekcie prowadzenia selekcji na wzrost wydajności mleka (Rupp i Boichard, 2003).

1.6.1. Odziedziczalność i dziedziczenie poligeniczne

Odziedziczalność to miara statystyczna, która opisuje udział wariancji genetycznej w wariancji ogólnej (fenotypowej). W przypadku cech wysoko odziedziczalnych fenotyp zwierzęcia stanowi bardzo dobre źródło informacji na temat jego genów. W przypadku niewielkiego udziału zmienności genetycznej w całkowitej zmienności cechy, nie można wiele

powiedzieć o wartości genów osobnika, które będą przekazywane potomstwu, tylko na podstawie jego fenotypu. Cechy funkcjonalne, które wiążą się z płodnością i zdrowiem zwierząt są z reguły nisko odziedziczalne.

W celu zapobiegania lub przeciwdziałania *mastitis* u krów, bezpośrednio lub pośrednio, została wykorzystana selekcja genetyczna. Metody bezpośrednie polegają na selekcji w oparciu o pojawienie się klinicznego zapalenia wymienia u poszczególnych zwierząt. Jednak metoda ta nie jest powszechnie stosowana, ponieważ pojawienie się klinicznego zapalenia wymienia ma bardzo niską dziedziczność i jest trudne do zmierzenia. Sprawia to, że selekcja krów oparta na fenotypie jest utrudniona (Koeck i in., 2012; Jattawa i in., 2012). Współczynnik odziedziczalności klinicznego *mastitis* wymieniany przez większość badań zawiera się w przedziale od 0,02 do 0,17 (Haugaard i in., 2013), a największy odnotowany wskaźnik to 0,42 (Nash i in., 2000). Wskaźnik odziedziczalności dla podklinicznego *mastitis* odnotowywany jest na poziomie od 0,04 do 0,14 (Haugaard i in., 2013; Windig i in., 2013).

Metody pośrednie wykorzystują selekcję na podstawie cech wskaźnikowych, takich jak liczba komórek somatycznych (SCC), która ma wyższą dziedziczność niż pojawienie się klinicznego zapalenia wymienia (Jattawa i in., 2012). Korelacja genetyczna między pojawieniem się klinicznego zapalenia wymienia a SCC jest wysoka (0,7 do 0,8), zatem selekcja mająca na celu zmniejszenie SCC powinna zwiększyć odporność na zapalenie wymienia (Jattawa i in., 2012). Dane literaturowe wskazują na przeprowadzone badania (u krów i owiec), które są dowodem na to, że możliwe jest przeprowadzenie selekcji z wytworzeniem linii zwierząt z niskim wskaźnikiem SCC, u której zaobserwowano spadek zachorowalności na *mastitis* (Rupp i in., 2009; Bloemhof i in., 2008).

Należy jednak podchodzić do zagadnienia poprawienia zdrowotności wymienia z dużą ostrożnością (Thompson-Crispi i in., 2014). W linii tej obniżona zawartość SCC związana była ze spadkiem zachorowalności na podkliniczne *mastitis*, przy jednoczesnym, dalszym występowaniu klinicznej formy choroby (Rainard i in., 2018; Rupp i in., 2009; Bloemhof i in., 2008). Co więcej, zbyt niska zawartość komórek somatycznych związana jest ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na kliniczne *mastitis* (Suriyasathaporn i in., 2000).

Silva i in. (2020) również starali się oszacować parametry genetyczne liczby komórek somatycznych, a także związek genetyczny między SCC a cechami produkcji mleka przy użyciu dwóch różnych metod normalizacji SCC (Silva i in. 2020). Dowiedli, że szacunki odziedziczalności dla SCC były niskie niezależnie od zastosowanej metody transformacji, co według badaczy wskazuje na niewielką możliwość ekspresyjnych korzyści genetycznych z bezpośredniej selekcji tych cech. Jednak powtarzalność wyników wskazywała na możliwość

zwiększenia szacunków odziedziczalności, jeśli zmniejszy się wpływ stałego środowiska (Silva i in. 2020).

Źródła literaturowe donoszą, że selekcja w kierunku SCC, choć kontrowersyjna (Rainard i in. 2018), jest kolejną alternatywą dla zwalczania zapalenia wymienia i została uznana za odpowiednie kryterium selekcji, ponieważ umożliwia selekcję pod kątem oporności zarówno na kliniczne, jak i subkliniczne zapalenie wymienia. Ponadto, jak wyżej wspomniano, współczynnik odziedziczalności SCC jest wyższy niż samego *mastitis*, a jego wartość szacuje się na poziomie (0.01–0.15) (Silva i in. 2020). Strategia ta staje się bardziej istotna, gdy weźmie się pod uwagę trudność kontrolowania subklinicznego zapalenia wymienia za pomocą środków higienicznych i sanitarnych (Silva i in. 2020).

Choć odziedziczalność odporności na zapalenie wymienia wydaje się relatywnie niska, to wykazano, że selekcja genetyczna na odporność na *mastitis* zmniejsza częstotliwość występowania choroby szczególnie, gdy w selekcji uwzględnia się udział markerów genetycznych dla cech zapalenia wymienia (Nash i in., 2000; Kühn i in., 2008). Ze względu na potencjalnie znaczące korzyści selekcji wspomaganej markerami i selekcji genomowej, dążenie do odkrycia markerów genetycznych odporności na *mastitis* jest w kręgu głównych zainteresowań badaczy z dziedziny nauk dotyczących mleczarstwa i hodowli bydła.

Czynniki genetyczne wpływające na intensywność reakcji zapalnej różnią się znacznie między poszczególnymi chorobami wywołanymi różnymi patogenami, ale z definicji obejmują wszelkie zmiany w sekwencjach zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną. Odporność jest zatem cechą ilościową, co oznacza, że skumulowany wpływ wielu genów (poligenów) i interakcja między nimi determinuje fenotyp. Taki typ dziedziczenia nazywamy poligenicznym. Daje on ciągły gradient fenotypów, a nie odrębne kategorie fenotypowe.

Także odporność na *mastitis* jest wieloczynnikową cechą ilościową (Morris, 2007; Tiezzi i in., 2015). Oprócz czynników środowiskowych – odżywianie, sposób hodowli i utrzymania, standardy dojenja, utrzymanie sprzętu do dojenja, sposób zasuszania krów, stadium laktacji, status rozrodczy, równoległe choroby (ogólny stan zdrowia i status metaboliczny zwierzęcia) (Waller, 2002; Barkema i in, 1999; Sordillo i Streicher, 2002; Sordillo i in., 2009), duże znaczenie mają czynniki genetyczne, które wpływają na odporność na zapalenie wymienia, co oznacza, że wiele *loci* związanych jest z cechą podatności/odporności na *mastitis*.

1.6.2. Loci cech ilościowych - Quantitative Trait Loci (QTLs) i geny kandydujące

Wyróżniane są dwa główne podejścia w badaniu genów związanych z podatnością/odpornością na *mastitis*. Jednym z nich jest wykrycie i zlokalizowanie QTL, podczas gdy drugim jest wytypowanie genów kandydujących, a następnie wyszukanie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w genach powiązanych z *mastitis*.

Regiony genomu związane z cechami ilościowymi, takimi jak podatność na zapalenie wymienia, określa się mianem loci cech ilościowych (QTL). Identyfikacja polimorficznych QTL związanych z fenotypem danej cechy stanowi podstawę selekcji wspomaganą markerowo w hodowli zwierząt.

W podejściu tym analizuje się „w ciemno” jak największą dostępną liczbę *loci* polimorficznych i wyłania te z nich, które są związane z rozpatrywaną cechą. Procedurę taką nazywany GWAS (ang. *Genome wide association study*). Pozwala ona zidentyfikować miejsca w genomie, gdzie mogą znajdować się czynniki genetyczne determinujące naszą cechę. Wskazane w ten sposób sekwencje nie muszą być funkcjonalnie związane z badaną cechą. Czasami mogą być jedynie silnie sprzężone z jakąś inną sekwencją, która jest zaangażowana w kształtowanie badanej cechy. W obrębie regionów QTL istnieje wiele rozpoznanych i opisanych typów zmian, które mogą wpływać na fenotyp. Należą do nich m.in. różnice w liczbie kopii genów (ang. *Copy Number Variations*, CNV), mikro- i minisatelity (mikrosatelity – powtarzający się odcinek DNA krótszy niż 10pb; minisatelity – powtarzający się odcinek DNA o długości od 10 do 100pb) i polimorfizmy sekwencyjne (Wang T. i Wang H., 2009). Najczęstszą formą zmiany w obrębie DNA jest polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP). Są to miejsca w genomie, w których zmiany alleliczne w pojedynczej parze zasad występują u ponad 1% populacji. Mogą one występować w kodujących i niekodujących regionach i mieć wpływ na ekspresję genów i ich produkty (Wang T. i Wang H., 2009; Vignal i in., 2002). Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów są związane ze zmianami specyficznych cech fenotypowych u wielu gatunków, w tym cech zapalenia wymienia u krów.

W przypadku genów kandydujących z góry wskazuje się jakiś znany gen (sekwencję), o którym wiadomo, że jego produkt, z racji pełnionych przez siebie funkcji, bierze udział w kształtowaniu badanej cechy. Następnie poszukuje się w tym genie polimorfizmu, gdyż zakłada się hipotezę, że różne jego warianty mogą w różny sposób wpływać na analizowaną cechę. Badania te skupiają się na wykrywaniu powiązań zmienności genetycznej z danymi fenotypami/stanami chorobowymi. Metoda ta jest powszechnie stosowana z w badaniach asocjacyjnych ze względu na łatwość uzyskania próbek i danych genotypowych (Rasheed i in.,

2020). Jak opisano wcześniej, odporność na zapalenie wymienia jest złożoną cechą kontrolowaną przez kilka *loci* i obejmującą różne ścieżki biologiczne, cząsteczki i komórki. Dlatego też można wytypować wiele funkcjonalnych genów kandydujących w odporności/podatności na *mastitis* (Rasheed i in., 2020).

Identyfikacja i walidacja markerów genetycznych odporności na *mastitis*, a także ich wdrożenie w programie hodowlanym nie są pozbawione wyzwań. Wiedza dotycząca markerów genetycznych stanowi potężne narzędzie do doskonalenia cech funkcjonalnych (odporności na *mastitis*), ale wyniki muszą być powtarzalne w celu potwierdzenia prawdziwych asocjacji (Smulski, 2014). Identyfikacja genów kandydujących może służyć jako przewodnik dla dalszych badań w celu zdefiniowania funkcjonalnego znaczenia wariantów i może pogłębić wiedzę na temat patogenezy choroby. Dodatkowo, stosując techniki wspomagane markerowo w celu ulepszenia wartości genetycznej zwierząt hodowlanych, należy wziąć pod uwagę wpływ selekcji jednej cechy na inne ważne cechy zdrowotne lub produkcyjne.

Wśród genów kandydujących można wymienić także *microRNA*, które działają jako kluczowy regulator nabłonkowej odpowiedzi immunologicznej (Taganov i in., 2006; Dai i in., 2016). Oceniono, że *microRNA* mogą regulować nabłonkową odpowiedź immunologiczną na wielu etapach, tj. regulacji, wytwarzania i wydzielania cytokin zapalnych czy chemokin (Dai i in., 2016). Gros autorów donosi, że poziomy ekspresji wielu *microRNA* wykrytych metodą PCR (ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy, ang. *quantitative polymerase chain reaction*) zmieniają się w odpowiedzi na zapalenie wymienia lub inne stany zapalne aktywowane w bydlęcych komórkach nabłonkowych wymienia. Stwierdzono na przykład zwiększoną ekspresję *miRNA-223*, *miRNA-146a*, *miRNA-146b*, *miRNA 15a-5p* i zmniejszoną w przypadku *miRNA-16a*, *miRNA-31* i *miRNA-181a* w zainfekowanej tkance wymienia w porównaniu z ekspresją mierzoną w zdrowej tkance wymienia (Wang i in., 2016; Naeem i in., 2012; Li i in., 2014). Mimo wielu badań dotyczących związku *microRNA* z *mastitis*, obecny stan wiedzy na temat molekularnego tła tego związku jest w dalszym ciągu niedoskonały i wymaga pogłębienia. Niezbędne jest zatem dalsze badanie mechanizmów molekularnych regulacji zapalenia wymienia kierowanych przez *microRNA*.

1.6.3. Efekty nieaddytywne

Do opisu zjawiska dziedziczenia podatności na choroby przyjmowane są różne modele statystyczne, najczęściej model addytywny (kumulatywny), który w prosty sposób sumuje efekty genów z różnych *loci*. Polega on na tym, że fenotyp heterozygot charakteryzuje wartość

pośrednia między wartością cechy u homozygot dominujących a wartością cechy u homozygot recesywnych. Jest to najprostszy sposób wyjaśnienia dziedziczenia, ale niestety niekompletny.

Poprzez swoje eksperymenty na roślinach grochu, Grzegorz Mendel (1866) zdał sobie sprawę, że niektóre cechy dominują nad innymi (np. groszek gładki dominował nad groszkiem pomarszczonym). Kilkadziesiąt lat później, w 1909 roku, zauważono, że w niektórych przypadkach, dodanie indywidualnych efektów genów nie wyjaśniało sposobu dziedziczenia. To właśnie wtedy Bateson ukuł termin „epistaza”, aby opisać przypadki, w których działania dwóch lub więcej genów z różnych *loci* wchodzi w interakcję. Należy dokonać rozróżnienia między biologicznymi (funkcjonalnymi) skutkami genetycznymi, które odpowiadają definicji Mendla (tj. dominacja oznacza, że wartość heterozygoty jest wyższa lub niższa niż średnia homozygotycznych genotypów), a efektami statystycznymi (populacyjnymi lub ważonymi), które zależą od częstotliwości alleli. W przypadku tych ostatnich istotną kwestią jest udział efektów nieaddytywnych w wariancji genetycznej (Varona i in., 2018). Niektórzy autorzy argumentują, że nieaddytywne efekty genetyczne mogą być zjawiskiem ogólnym, którego zrozumienie jest ważne dla uzyskania większej wiedzy na temat natury cech ilościowych (Crow, 2010).

Fisher (1918), z perspektywy genetyki ilościowej, stworzył model poligeniczny, który postuluje, że bardzo duża liczba niepołączonych genów kontroluje genetyczną zmienność cech ilościowych. Opisał podobieństwo między krewnymi w czystym modelu addytywnym, który został szybko rozszerzony o dominację (Fisher, 1918; Wright, 1921). Opisano również podobieństwo między krewnymi drugiego i wyższego rzędu włączając do opisu efekty epistatyczne (Cockerham, 1954; Kempthorne, 1955). Jednakże, mimo że model poligeniczny w kontekście addytywnym jest oczywisty, to jego interpretacja nie jest jasna, gdy uwzględnimy efekty nieaddytywne (Barton i in., 2017).

Terminu epistaza używamy w odniesieniu do braku addytywności w działaniu kilku genów dla danej cechy, co oznacza, że efekty alleli jednego genu zależą od tła genetycznego. Epistaza ma zatem kluczowe znaczenie dla zrozumienia odpowiedzi na selekcję w programach hodowli zwierząt oraz czynników genetycznych leżących u podstawy choroby wieloczynnikowej. Tym samym modele uwzględniające epistazę, zwłaszcza w świetle nowych narzędzi molekularnych i statystycznych, mogą stać się bardziej przydatne do badania efektów allelicznych (Alvarez-Castro i Carlborg, 2007).

Zainteresowanie tym, w jaki sposób współdziałające geny determinują wartości cech ilościowych, jest coraz większe zarówno w genetyce ilościowej, jak i ewolucyjnej, ponieważ

wykazano, że geny często wchodzą w interakcje, i że wpływ tych interakcji na ewolucję i sztuczną selekcję cech jest daleki od nieistotnego (Alvarez-Castro i Carlborg, 2007).

W zrozumieniu dziedziczenia podatności/odporności na *mastitis* niezbędne jest uwzględnienie oddziaływania genów z różnych *loci* na siebie, czyli uwzględnienie występowania zjawiska epistazy. Coraz częściej zwraca się uwagę na oddziaływania dominacyjne i epistatyczne, co jest bardziej wiarygodne w porównaniu z badaniami uwzględniającymi jedynie oddziaływania addytywne (Govignon-Gion i in., 2016).

Głównym celem hodowli zwierząt jest identyfikacja, selekcja i kojarzenie najlepszych osobników stada hodowlanego w celu maksymalizacji wydajności w przyszłych pokoleniach. Istotną rolę odgrywa tu procedura obliczania wartości hodowlanych (ocena genetyczna) kandydatów do selekcji. Tradycyjne metody wykorzystują informacje fenotypowe i genealogiczne, takie jak indeks selekcji lub Najlepsza Liniowa Nieobciążona Predykcja (ang. *Best Linear Unbiased Prediction*, BLUP) i opierają się na podstawach modelu poligenicznego (Varona i in., 2018).

Niemniej jednak, nieaddytywne efekty genetyczne zostały zignorowane w ocenie genetycznej zwierząt gospodarskich z kilku powodów: (I) brak informacji o rodowodach (II) obliczenia są bardziej złożone, (III) fakt, że statystyczna addytywna wariancja obejmuje dominację biologiczną lub efekty interakcji wyższego rzędu oraz (IV) trudności w stosowaniu efektów dominacyjnych w praktyce (systemie kojarzenia). W konsekwencji szacowania nieaddytywnych wariancji genetycznych są rzadkie w populacjach zwierząt gospodarskich (Varona i in., 2018).

1.6.4. Plejotropowe efekty markerów

Plejotropia (z języka greckiego: *pleion* – więcej, *tropos* – sposób, metoda) jest zjawiskiem, w którym pojedynczy gen wpływa na dwie lub więcej, odrębnych, często pozornie niepowiązanych ze sobą, cech fenotypowych. Geny, które wpływają na wiele, pozornie niepowiązanych fenotypów, nazywane są genami plejotropowymi. Mutacja w genie plejotropowym może mieć wpływ na kilka cech jednocześnie, ze względu na fakt, że produkt kodowany przez taki gen, może brać udział w wielu różnych procesach biologicznych na poziomie komórkowym (Lobo, 2008).

Wiele badań poświęcono próbie wyjaśnienia konkretnych przypadków plejotropii będącej przyczyną korelacji pomiędzy różnymi cechami. Od dziesięcioleci wiemy, że plejotropia jest powszechna, ponieważ w hodowli roślin i zwierząt oraz w laboratoryjnych eksperymentach selekcyjnych, gdy selekcja jest stosowana względem jednej cechy, średnia

innych cech również zmienia się z pokolenia na pokolenie. Odpowiedź na selekcję odzwierciedla genetyczną korelację między cechami, która podsumowuje średnie efekty plejotropii w całym genomie we wspólnych loci (Solovieff i in., 2013; Gratten i Visscher, 2016).

Przed wdrożeniem jakiegokolwiek metody selekcji, w tym selekcji wspomaganą markerowo, należy wziąć pod uwagę wpływ wybranej metody na inne cechy. W niektórych przypadkach doskonalenie jednej cechy może mieć ujemny wpływ na postęp selekcji odmiennych cech (Dekkers, 2004). Wykazano na przykład niekorzystną korelację genetyczną pomiędzy selekcją dotyczącą cech odporności na *mastitis* a produkcją mleka (Zhao i in., 2015; Sodeland i in., 2011; Rupp i Boichard, 1999).

W niektórych regionach genomu istnieje nierównowaga sprzężeń między wariantami przyczynowymi tych dwóch cech ze wspólnymi haplotypami zawierającymi niekorzystne allele dla jednej cechy i korzystne allele dla drugiej (Sodeland i in., 2011; Kadri i in., 2015). Ponieważ obie te cechy uważane są za szczególnie ważne u bydła mlecznego, należy zachować ostrożność, aby nie faworyzować w trakcie selekcji jednej cechy względem drugiej. Korzystna selekcja ze względu na obie cechy jest możliwa, gdy dochodzi do wyboru haplotypów nadających korzystne allele dla obu cech (Kadri i in., 2015; Bagheri i in., 2013).

Badań nad plejotropią genów związanych z odpornością na *mastitis* podjęli się także Lee i in. (2021). Zaproponowane przez badaczy kandydujące SNP wykazywały antagonistyczne działanie alleli na wydajność mleczną (allel związany z wysoką odpornością na kliniczne *mastitis* związany był z niższą wydajnością i odwrotnie). Wykazano, że pojedynczy wariant plejotropowy reguluje obie cechy. Co więcej, *locus* to okazało się być *locus* cech ilościowych dla wielu innych cech, jak przyrost masy ciała, płodność czy długowieczność.

Lund i in. (2008) także przeprowadzili badania nad *loci* cech ilościowych (QTL) związanych z występowaniem klinicznych przypadków *mastitis*, poziomem SCC, cechami budowy wymion i wydajnością mleczną u krów rasy holsztyńskiej, lecz doszli do odmiennych wniosków niż w/w autorzy badań. Celem badania Lund i in. (2008) było 1) wykrycie QTL w genomie bydła, które wpływają na częstość występowania klinicznego zapalenia wymienia i poziom komórek somatycznych (SCS), oraz 2) scharakteryzowanie tych QTL pod kątem plejotropii, gdy wybrane regiony chromosomalne wpływające na kliniczne zapalenie wymienia, oddziaływały również na inne cechy wskaźnika zdrowia wymion lub cechy produkcji mleka. Badacze potwierdzili, że markery w chromosomach 6, 11, 15 i 26 można wykorzystać do przeprowadzenia selekcji przypadków klinicznego *mastitis* bez bezpośredniego, negatywnego wpływu na wydajność mleczną.

1.7. MicroRNA

MicroRNA (miRNA) zostały zidentyfikowane w komórkach, a także w egzosomach w płynach biologicznych, takich jak mleko. W gruczole mlekowym większość badanych microRNA pełni funkcje związane z odpornością wykazując zmiany w poziomach ekspresji podczas laktacji (Gigli i Maizon, 2013). Pierwszy microRNA (lin-4) został odkryty u nicienia przez dwie grupy badawcze jednocześnie w 1993 roku (Lee i in., 1993; Wightman i in., 1993). Odkryta wtedy funkcja miRNA lin-4 polegała na kontroli czasu rozwoju komórek w stadium larwalnym nicienia *Caenorhabditis elegans*.

W 2000 roku zidentyfikowano drugi microRNA (lin-7) u tego samego nicienia (Reinhart i in., 2000), a wkrótce potem u wielu innych gatunków (Pasquinelli i in., 2000). Do 2001 roku stało się jasne, że microRNA reprezentują klasę krótkich konserwatywnych odcinków RNA (Lagos-Quintana i in., 2001; Lau i in., 2001; Lee i Ambros, 2001).

MicroRNA są krótkimi (~ 25pz), niekodującymi jednoniciowymi cząsteczkami RNA, które regulują ekspresją genów, co zachodzi głównie poprzez zmniejszenie zdolności określonych mRNA do kierowania syntezą poszczególnych białek. Wiele badań donosi, że microRNA biorą udział w regulacji systemu odpornościowego. Badania te wykazują, że microRNA modeluje wiele aspektów odpowiedzi immunologicznej, takich jak różnicowanie, przeżycie czy ogólne funkcje komórek układu odpornościowego. Cząsteczki microRNA mają także wpływ na odpowiedź cytokin prozapalnych, a także wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe (Bi i in., 2009).

MicroRNA regulują ekspresją genów na poziomie posttranskrypcyjnym, powodując degradację RNA lub blokowanie translacji, poprzez parowanie zasad z komplementarnymi sekwencjami w obrębie mRNA. Nawet niewielki odcinek sekwencji *microRNA* jest w stanie komplementarnie przyłączyć się do mRNA, co powoduje, że każdy *microRNA* ma zdolność do regulacji ogromną ilością genów. Konserwatywne *microRNA* mogą regulować różnymi szlakami genetycznymi i procesami rozwojowymi u wielu organizmów (Gigli i Maizon, 2013).

1.7.1. Biogeneza microRNA

MicroRNA to transkrypty RNA wywodzące się ze struktury DNA, które nie ulegają procesowi translacji; ich biosynteza to złożony proces złożony z kilku etapów, który rozpoczyna się w jądrze komórkowym, a kończy w cytoplazmie (Bruce i in., 2015). Geny kodujące *microRNA* zlokalizowane są w obszarach międzygenowych i występują jako

pojedyncze geny z własnym promotorem lub jako grupy genów ze wspólnym promotorem (Czech i Hannon, 2011).

Geny *microRNA* zlokalizowane w intronach ulegają transkrypcji z wykorzystaniem promotora „genu gospodarza” i w dalszych etapach podlegają splicingowi (wycinaniu intronów) (Czech i Hannon, 2011). Proces biogenezy *microRNA* wymaga obecności dwóch enzymów – Drosha i Dicer, a samo *microRNA* może powstawać w dwojaki sposób – w tzw. ścieżce kanonicznej i niekanonicznej. W ścieżce kanonicznej, geny *microRNA* z własnym promotorem, podobnie jak geny kodujące białka, ulegają transkrypcji przez polimerazę RNA II, w wyniku, czego tworzy się „pierwotny” prekursor zwany pri-miRNA (ang. *primary miRNA*). Prekursor ten zawiera czapkę (cap) 7-metyloguanozynową na końcu 5' oraz ogon poli (A) na końcu 3'.

W kolejnych etapach, transkrypt pri-miRNA rozpoznawany jest przez kompleks złożony z rybonukleazy Drosha (RNaza III) i białka wiążącego RNA, DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome critical region 8*). Następnie pri-miRNA przycinany jest w celu uwolnienia fragmentu o strukturze „spinki do włosów” zwanym pre-miRNA (ang. *precursor miRNA*), który jest aktywnie transportowany do cytoplazmy przez eksportynę-5 współpracującą z guanozotrifosfatazą Ran (RanGTP) (Lin i Gregory, 2015). W wyniku hydrolizy RanGTP do RanGDP, reakcji katalizowanej przez GTPazę - RanGAP, z kompleksu pre-miRNA/Eksportyna-5/RanGTP, do cytoplazmy uwalniany jest pre-miRNA. Transport pre-miRNA do cytoplazmy możliwy jest dzięki energii uzyskanej w wyniku hydrolizy GTP. Pre-miRNA jest następnie przetwarzane w cytoplazmie przy udziale endonukleazy Dicer (RNAzy III), co skutkuje powstaniem dupleksu komplementarnych cząsteczek miRNA o długości około 22 nukleotydów.

Po odcięciu pętli, z cząsteczki prekursorowej pre-miRNA mogą powstać dwie cząsteczki *microRNA-X*, gdzie X oznacza numer identyfikacyjny *microRNA*. Stosowane nazewnictwo wskazuje na ramię (nić) pre-miRNA, z którego powstała cząsteczka miRNA, i tak miR-X-3p oznacza cząsteczkę powstającą z ramienia 3', a miR-X-5p z ramienia 5' pre-miRNA (Lin i Gregory, 2015). Enzym Dicer jest wspomagany i stabilizowany przez dwa białka o podobnej strukturze - TRBP (ang. *HIV-1 transactivating response RNA-binding protein*) oraz PACT (ang. *protein activator of protein kinase R*), które przekazują dupleks *microRNA* do białka Argonaute (Ago) (Alles i in., 2019). Białko to stanowi główny składnik kompleksu wyciszającego indukowanego przez RNA (*RNA-induced silencing complex, RISC*), podczas gdy druga nić jest degradowana. Kompleks RISC rozpoznaje nić wiodącą, która staje się dojrzałym *microRNA* (Chong i in., 2010). Chong i in. (2010) badali myszy z usuniętymi

enzymami Dicer i Drosha (Dicer- and Drosha-knock-out) w celu potwierdzenia zapotrzebowania obu enzymów w procesie biosyntezy microRNA. Ścieżka niekanoniczna powstawania microRNA, w przeciwieństwie do kanonicznej, nie wymaga obecności kompleksu Drosha i DGCR8 do wytworzenia pre-miRNA (Ruby i in., 2007).

1.7.2. Funkcje microRNA a odporność na infekcje

Wykazano specyficzną ekspresję typu komórkowego u microRNA w komórkach odporności wrodzonej i nabytej (Alam i O'Neill, 2011); jest także coraz więcej dowodów na to, że microRNA regulują różnicowaniem, rozwojem i funkcjami tych komórek (Xiao i Rajewsky, 2009). Badania nad hematopoetycznymi komórkami macierzystymi potwierdzają wpływ *microRNA* (*microRNA-125b*, *microRNA-126* i *microRNA-196b*) na ich różnicowanie się w linii komórkowe mieloidalne i limfoidalne (Rossi i in., 2011). Delecja genu kodującego enzym Dicer, krytycznego w prawidłowym przebiegu biosyntezy microRNA, skutkuje osłabieniem rozwoju limfocytów T. Krytycznymi w rozwoju limfocytów B są *microRNA-17-92*, *microRNA-150* i *microRNA-155*, który wpływa także na produkcję przeciwciał przez limfocyty B i T (O'Connell i in., 2012).

Cząsteczki microRNA są często ewolucyjnie konserwatywne i wiele z nich posiada swoje homologi u bydła, stąd badania nad ludzkimi czy mysimi microRNA mogą dostarczyć wielu cennych informacji dotyczących roli tych cząsteczek w bydłych chorobach zakaźnych (Lawless i in., 2014).

Pierwsze badania demonstrujące ekspresję *microRNA* w tkankach bydłych miały miejsce w 2007 roku (Coutinho i in., 2007, Gu i in., 2007). Od tego czasu zidentyfikowano około 800 *microRNA* zakodowanych w genach leżących na 30 chromosomach w genomie *Bos taurus*. Stanowią one około jedną czwartą wszystkich ujętych w bazie Ensembl niekodujących RNA (Flicek i in., 2014). Zazwyczaj *microRNA* grupowane są z wykorzystaniem kryteriów dotyczących komplementarności zasad ze szczególnym uwzględnieniem całkowitej lub bliskiej komplementarności w tzw. „seed region”, którym to terminem określa się nukleotydy 2-8 od 5' końca *microRNA* lub ze względu na komplementarność w tzw. prekursorowej sekwencji *microRNA* (Kozomara i Griffiths-Jones, 2014).

Modulacja ekspresji genów wywołana działaniem cząsteczek microRNA odgrywa bardzo ważną rolę w regulacji wieloma procesami w żywych komórkach. Należą do nich ich wzrost, rozwój czy metabolizm na każdym stopniu proliferacji, różnicowania się i w końcu apoptozy komórki. Ponieważ jeden *microRNA* może regulować ekspresją wielu genów targetowych zaangażowanych w różne procesy, to jasnym staje się, że nieprawidłowa ekspresja

microRNA może powodować wiele poważnych i nieodwracalnych konsekwencji w organizmie (Skok i in., 2013, Strynowska-Czerwinska i in., 2014).

Bardzo ważnym zjawiskiem mogącym wpływać na zdolność *microRNA* do wyciszania ekspresji poszczególnych genów jest obecność genetycznych polimorfizmów. Przeważnie rozważane są polimorfizmy w sekwencjach targetowych, ponieważ mogą one skutkować nieutworzeniem się kompleksu *microRNA*-mRNA. Wiadomym jest jednak, że *microRNA* mogą regulować ekspresję genów niewykazujących pełnej komplementarności i dlatego zmiana nukleotydomowa może, ale nie musi, powodować zmian funkcjonalnych (Skok i in., 2013, Strynowska-Czerwinska i in., 2014).

Możliwy jest także przypadek, gdy polimorfizmy obserwowane są wśród genów kodujących *microRNA*. Polimorfizmy, które zlokalizowane są w regionach kodujących dojrzałe *microRNA*, również mogą wywoływać zmiany w regulatorowych funkcjach *microRNA*. Duża zachorowalność na *mastitis* i niedostateczna do tej pory wiedza dotycząca markerów genetycznych odporności na *mastitis* stała się problemem badawczym w niniejszej pracy, na podstawie którego postawiona została hipoteza, że istnieje związek pomiędzy polimorficznymi wariantami *microRNA* a odpornością na *mastitis*. Celem pracy jest ustalenie czy istnieją statystycznie istotne związki pomiędzy polimorfizmami w wybranych *microRNA* a odpornością na zapalenie wymienia.

Aby to zweryfikować, do analizy genetycznej wybrano pięć *microRNA*. Są to *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e*. Dane literaturowe wskazują na udział *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e* (Skok i in., 2013) w procesach prozapalnych, jednak w przypadku stada krów rasy polskiej holsztyńsko – fryzyjskiej odmiany czarno – białej stwierdzono monomorfizm w badanych *loci*, w związku z tym dalsza analiza okazała się niemożliwa.

1.7.4. MicroRNA2467

Gen *microRNA2467*, badany w niniejszej pracy, został również poddany analizie przez Dai i współpracowników (Dai i in., 2020). Naukowcy mieli na celu wykrycie poziomu *microRNA2467* w surowicy kobiet ciężarnych z cukrzycą ciążową (ang. *gestational diabetes mellitus* (*GDM*)) i analizę jego znaczenia klinicznego. Zauważono, że poziom *microRNA2467* w surowicy w grupie *GDM* były wyższe niż w grupie kontrolnej. Analiza badań wykazała, że poziom *microRNA2467* w surowicy był niezależnym czynnikiem ryzyka *GDM*, a samym genem docelowym *microRNA2467* był gen adiponektyny (*ADPN*) (Dai i in., 2020), czyli hormonu wpływającego na szereg procesów metabolicznych, szczególnie przemianę glukozy

i kwasów tłuszczowych w wątrobie i mięśniach oraz pośrednio oddziałującego na wrażliwość tkanek obwodowych na insulinę (Dąbrowska i in., 2011). Stwierdzono, że wysoki poziom *microRNA2467* w surowicy może być indykatorem kwalifikującym do wstępnego badania przesiewowego GDM. Ukierunkowanie na regulację *microRNA2467* i adiponektyny może być nową strategią zapobiegania GDM (Dai i in., 2020).

Cardinali i in. (2022) opisali użyteczność kliniczną *microRNA* jako biomarkerów raka piersi. W doświadczeniu swym, badacze wytypowali kilka *microRNA*, w tym *microRNA2467-3p*, jako potencjalny biomarker, który może stanowić narzędzie w praktyce klinicznej.

1.7.5. *MicroRNA2313*

MicroRNA2313 został uznany potencjalnym biomarkerem do diagnozowania zapalenia wymienia u krów mlecznych. Stwierdzono, że *microRNA2313* ulega zróżnicowanej ekspresji w próbkach tkanki gruczołu mlekowego bydła, u których stwierdzono *mastitis* wywołane zakażeniem przez *Staphylococcus aureus* (Li i in., 2015).

Gen *microRNA2313* badany w niniejszej pracy u krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, został również poddany analizie przez Malovrh i współpracowników (2018). Celem pracy badaczy była analiza zmienności genetycznej w genie *microRNA2313* i zbadanie zależności między zmiennością genetyczną genu *microRNA1213* a cechami wzrostu i tuszy u słowiańskiej rasy bydła Simental. Ponadto w pracy uzyskano zweryfikowane informacje genomowe związane z genem *microRNA2313*, które zaprezentowano w postaci atlasu elementów regulatorowych *microRNA*. Nie stwierdzono istotnego wpływu polimorfizmów na badane cechy wzrostu i tuszy, jednak zweryfikowane polimorfizmy można z powodzeniem przetestować w połączeniu z innymi cechami w innych populacjach bydła (Malovrh i in., 2018).

1.7.6. *MicroRNA2489*

Skok i in. (2013) przeprowadzili badania przesiewowe *in silico* całego genomu pod kątem zmienności genetycznej *microRNA* u gatunków zwierząt gospodarskich. Celem było określenie zmienności genetycznej genów *microRNA* u gatunków zwierząt gospodarskich.

Badając kompilacje genomów w bazach Ensembl i miRbase możliwe było zaprojektowanie narzędzia bioinformatycznego do analizy genomów, w tym przypadku genomów gatunków zwierząt gospodarskich: świń, koni, bydła i kurczaków. Analiza ujawniła 65 polimorfizmów zlokalizowanych w dojrzałych regionach *microRNA* u tych czterech gatunków, w tym 28% w regionie seed u bydła i kurczaków. Polimorficzne geny *microRNA*, w tym *microRNA2489*, u bydła i kurczaków, były dalej badane pod kątem mapowania regionów

loci cech ilościowych związanych z cechami produkcyjnymi i zdrowotnymi. Opracowane narzędzie bioinformatyczne umożliwia analizę polimorficznych genów *microRNA* i ustalanie potencjalnych polimorfizmów regulatorowych, a tym samym przyczynia się do rozwoju biomarkerów opartych na *microRNA* u gatunków zwierząt gospodarskich (Skok i in., 2013).

1.7.7. MicroRNA29b-2

Zhao i in. (2019) po raz pierwszy porównali wzorce regulacji *microRNA29b* między ludzkimi i mysimi liniami komórkowymi. Porównując profile transkryptomu ludzkich i mysich linii komórkowych, *microRNA29b* wykazywał wspólne szlaki regulacyjne obejmujące regulację cyklu komórkowego oraz szlaków sygnałowych Wnt i PI3K-Akt. *microRNA29b* wykazywał również specyficzne funkcje odzwierciedlające cechy komórek, w tym zwłóknienie i regulacje neuronalne w komórkach NIH / 3T3 oraz powstawanie nowotworów i starzenie się komórek w liniach komórkowych. *microRNA29b* został także powiązany z różnymi zaburzeniami, w tym chorobami zwłóknieniowymi, nowotworami i chorobami neurodegeneracyjnymi (Bowen i in., 2013). Kasimanickam i Kastelic (2016) wykazali też, że *microRNA29b* ulegał zróżnicowanej ekspresji w surowicy krów z zapaleniem macicy (Kasimanickam i Kastelic, 2016). Li i in. (2018) odkryli także, że *microRNA29b-2-5p* hamuje proliferację komórek poprzez bezpośrednie ukierunkowanie na gen *Cbl-b* w komórkach nowotworowych trzustki (Li i in., 2018).

1.7.8. MicroRNA29e

Ma i in. (2022) przeprowadzili ocenę profili *microRNA* w małych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wyizolowanych z siary bydłowej o różnych stężeniach immunoglobulin G. Łącznie zidentyfikowali 389 cząsteczek *microRNA* w małych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (ang. sEV - small extracellular vesicles) wyizolowanych z bydłowego kolostrum, przy czym stwierdzili udział pięćdziesięciu *microRNA*, w tym *microRNA29e*, w regulacji około 2655-oma genami związanymi z procesami komórkowymi czy przetwarzaniem informacji środowiskowych. Lv i in. (2021) badali natomiast rolę *microRNA* w działaniu ochronnym forsytozydu A przeciwko zapaleniu indukowanemu przez lipopolisacharydy (LPS) w komórkach endometrium bydła. LPS może regulować w górę ekspresję takich cząsteczek jak TLR4 czy TLR2. Badacze odkryli, że regulacja w górę TLR2 może być związana ze zwiększoną ekspresją *microRNA29e* (Lv i in., 2021).

2. CEL PRACY

Celem pracy jest poszukiwanie asocjacji pomiędzy odpornością na *mastitis* u krów mlecznych rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej a genetycznymi wariantami genów *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e*. Na realizację powyższego celu składają się następujące zadania badawcze:

1. Identyfikacja polimorficznych wariantów wybranych genów *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e* oraz oszacowanie frekwencji alleli i genotypów występujących w badanej grupie krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej;
2. Ustalenie czy istnieją statystycznie istotne związki pomiędzy polimorfizmem wybranych genów *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e* a odpornością/podatnością na *mastitis* wyrażoną jako liczba komórek somatycznych w mleku;
3. Oszacowanie ewentualnych efektów dominacyjnych oraz interakcji pomiędzy genetycznymi wariantami wytypowanych genów w kształtowaniu zmienności liczby komórek somatycznych w mleku w badanej populacji krów;
4. Analiza asocjacji pomiędzy allelami wybranych genów a liczbą komórek somatycznych w mleku w kolejnych laktacjach, w wybranych stadiach laktacji oraz klasach SCC;
5. Zweryfikowanie hipotez dotyczących możliwości wykorzystania badanych genów jako markerów odporności na *mastitis* w selekcji pod kątem ich ewentualnego wpływu na użytkowość mleczną bydła.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

Badaniami objęto stado liczące 644 krowy rasy polskiej holsztyńsko–fryzyjskiej odmiany czarno–białej. Wszystkie zwierzęta utrzymywane były w tych samych warunkach, w jednej wolnostanowiskowej oborze. Krowy były dojone na hali udojowej typu rybia ość, pojone *ad libitum* z indywidualnych poidel automatycznych i karmione identyczną standardową dawką TMR (ang. *total mixed ratio*). Dodatkowo podczas udoju każda krowa otrzymywała paszę treściwą w dawce odpowiedniej do obecnej kondycji fizjologicznej oraz poziomu mleczności.

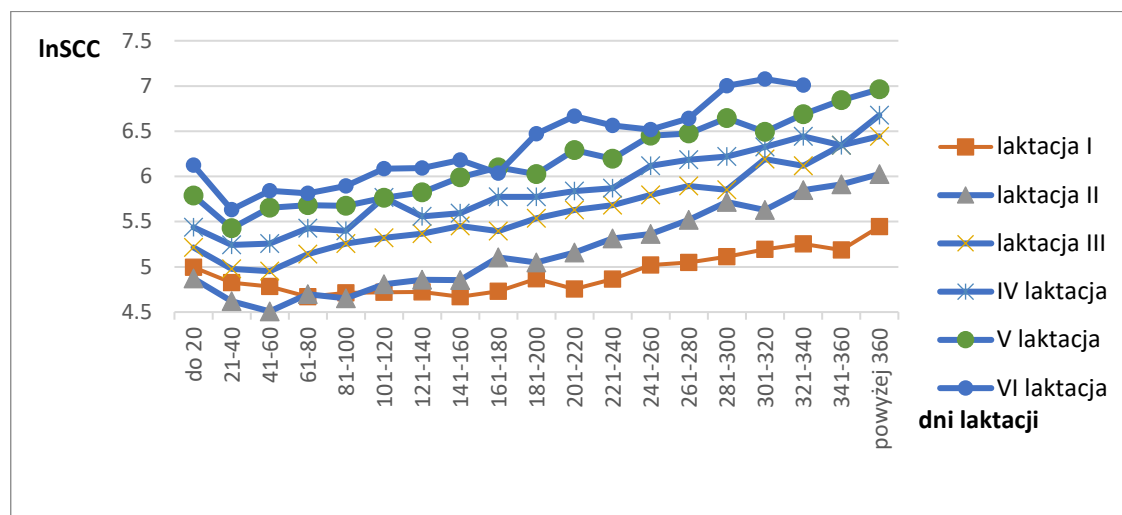
Krowy podlegały kontroli użytkowości mlecznej prowadzonej metodą A4. W pracy zostały zebrane wyniki próbných udojów pochodzące z dokumentacji hodowlanej i dotyczące dobowej wydajności mlecznej, procentowej zawartości białka i tłuszczu oraz liczby komórek somatycznych SCC. Koncentracje tłuszczu i białka określone były metodą instrumentalną zgodną z PN – EN ISO / IEC 17025 za pomocą sprzętu Combifoss, w skład którego wchodzi MilkoScan oraz Fossmatic, w certyfikowanym laboratorium oceny jakości mleka podległym Krajowemu Centrum Hodowli Zwierząt w Polsce. Krowy pochodziły po 244 różnych buhajach.

W badanych próbkach mleka przyjęto trzy klasy wartości poziomu komórek somatycznych: krowy zdrowe $SCC \leq 200$ tys./ml, stan podkliniczny $200 < SCC \leq 400$ tys./ml i krowy chore $SCC > 400$ tys./ml. Podział ten zastosowano ze względu na możliwość występowania odmienných efektów badanych genów w różnych stanach fizjologicznych. Poziom komórek somatycznych stanowi odzwierciedlenie odpowiedzi immunologicznej na infekcje. Występowanie *mastitis* jest ściśle skorelowane z podwyższoną SCC. Wartość graniczna liczby komórek somatycznych w mleku była do tej pory wielokrotnie ustalana w wielu publikacjach (Middleton i in., 2017; Schukken i in., 2003; Williamson i in., 2022), a przyjęte w niniejszej pracy klasy wartości poziomu SCC stanowią wypadkową z tych publikacji.

Badane krowy były w laktacji od pierwszej do ósmej. Analizy przeprowadzono osobno dla każdej laktacji, jedynie ze względu na stosunkową małą liczebność w późniejszych laktacjach, połączono laktacje 6., 7. i 8. w jedną klasę. Każda z laktacji uwzględnionych w analizie stada została podzielona na trzy stadia. Wybór takiego podziału został dokonany na podstawie analiz przebiegu laktacji i zawiera ich najbardziej charakterystyczne i kluczowe

etapy (wykres 1). Na wykresie przedstawiono różnice w SCC w zależności od dnia laktacji. Wykres uzasadnia wybór charakterystycznych okresów do dalszych analiz. W tabeli 1. przedstawiono charakterystykę ilościową badanego materiału.

Wykres 1. Liczba komórek somatycznych (lnSCC) w mleku w zależności od dnia laktacji w badanym stadzie krów



Źródło: opracowanie własne.

Tabela 1. Materiał badawczy - liczebności krów i próbnych udojów w analizowanych klasach

Specyfikacja		Liczba krów	Liczba próbnych udojów
Laktacja	I	481	4 282
	II	581	5 430
	III	564	4 824
	IV	400	3 438
	V	259	2 340
	VI	166	1 978
Stadium	I	644	6 670
	II	644	6 777
	III	644	8 845
SCC (tys/ml)	$0 \leq 200$	634	10 572
	$>200 \leq 400$	616	3 868

Źródło: opracowanie własne.

3.2. Metody laboratoryjne

Od wszystkich badanych zwierząt została pobrana krew obwodowa do próbek zawierających EDTA jako antykoagulant. Następnie wyizolowano genomowe DNA przy użyciu zestawu do izolacji *Master Pure™ DNA Purification Kit for Blood* (Epicentre Biotechnologies, Madison, USA). Polimorfizm badanych genów *microRNA* zaangażowanych w immunologiczne – *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e* – identyfikowany był metodą PCR – RFLP.

Gen *microRNA2467* (Gene ID: 100313301) zlokalizowany jest w chromosomie 8. (GenBank: AC_000165.1), w bazie miRBase *microRNA2467* opisany jest numerem MI0011527. Numer rs badanej mutacji (polimorfizmu) nukleotydowego T/C to rs109063650. Startery genu *microRNA2467* zaczerpnięte zostały z publikacji Łukaszewicz i in. (2015).

Gen *microRNA2313* (Gene ID: 100313327) zlokalizowany jest w chromosomie 15. (GenBank: AC_000172.1), w bazie miRBase *microRNA2313* opisany jest numerem MI0011330. Sekwencja genu *microRNA2313* pokrywa się z intronową sekwencją należącą do genu *GRAMD1B* (Malovrh i in., 2018). Startery genu *microRNA2313* (opracowanie własne) zostały zaprojektowane przy użyciu programu Primer 3 v. 0.4.0 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). SNP C/T zlokalizowany w sekwencji *microRNA2313* został zlokalizowany także w sekwencji genu *GRAMD1B* z numerem rs 41761413.

Gen *microRNA2489* (Gene ID: 100313407) zlokalizowany jest w chromosomie 14. (GenBank: AC_000171.1), w bazie miRBase *microRNA2489* opisany jest numerem MI0011578. Numer rs badanej mutacji (polimorfizmu) nukleotydowego C/T to rs110544069. Startery genu *microRNA2489* (opracowanie własne) zostały zaprojektowane przy użyciu programu Primer 3 v. 0.4.0 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

Gen *microRNA29b-2* (Gene ID: 791042) zlokalizowany jest w chromosomie 16. (GenBank: AC_000173.1), w bazie miRBase *microRNA29b-2* opisany jest numerem MI0000107. Numer rs badanej mutacji (polimorfizmu) nukleotydowego T/A to rs462139209. Startery genu *microRNA29b-2* (opracowanie własne) zostały zaprojektowane przy użyciu programu Primer 3 v. 0.4.0 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

Gen *microRNA29e* (Gene ID: 100313099) zlokalizowany jest w chromosomie 16. (GenBank: AC_000173.1), w bazie miRBase *microRNA29e* opisany jest numerem MI0010454. Numer rs badanej mutacji (polimorfizmu) nukleotydowego C/T to rs41825418. Startery genu *microRNA29e* (opracowanie własne) zostały zaprojektowane przy użyciu programu Primer 3 v. 0.4.0 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

W tabeli 2. przedstawiono wykorzystane sekwencje starterowe *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2* oraz *microRNA29e*.

Tabela 2. Sekwencje starterowe wykorzystane przy amplifikacji badanych fragmentów genów

Gen	Sekwencja starterowa	Źródło
<i>microRNA2467</i> Polimorfizm T/C Enzym restrykcyjny HaeIII	F:5'- TGGGGAGGTTTTGATGTTTC - 3' R:5'- CCTGAAAACATCCTGGCTGT - 3'	Łukaszewicz i in. (2015)
<i>microRNA2313</i> Polimorfizm C/T Enzym restrykcyjny AvaII	F:5'- GCTGCATGCATTCACATGCCAGGTC - 3' R:5'- GGAGCCTGCCATAGTCAGGCTG - 3'	Opracowanie własne
<i>microRNA2489</i> Polimorfizm C/T Enzym restrykcyjny HaeIII	F:5' – ACAGCCAGGATGTTTTTCAGG - 3' R:5' – TGGGGAGGTTTTGATGTTTC - 3'	Opracowanie własne
<i>microRNA29b-2</i> Polimorfizm T/A Enzym restrykcyjny BclI	F:5' - TGTGACTTACCAGCTTTGACT - 3' R:5' - CTTCAGAGGAGCTGCTGCCC - 3'	Opracowanie własne
<i>microRNA29e</i> Polimorfizm C/T Enzym restrykcyjny AluI	F:5'- CAAAGGCTGGGTCTTCTGAT - 3' R:5' – TGTGCTGCAATTCTACTCCT - 3'	Opracowanie własne

Źródło: opracowanie własne.

W analizach laboratoryjnych wykorzystano odczynniki firmy Fermentas (Fermentas International INC, Burlington, Kanada), z wyjątkiem starterów zamawianych z firmy Oligo.pl (Serwis Sekwencjonowania i Syntezy DNA IBB PAN, Warszawa). Reakcje PCR przeprowadzane były w termocyklerach firmy Whatman Biometra (Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Niemcy).

Fragmenty restrykcyjne rozdzielane były w 2 % żelu agarowym z dodatkiem bromku etydy. Długości otrzymanych fragmentów restrykcyjnych wizualizowano i analizowano w promieniach UV, w zestawie do dokumentacji i analizy żeli elektroforetycznych firmy Vilber Lourmat (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Niemcy).

3.3. Metody statystyczne

Uzyskane wyniki zostały opracowane i poddane analizie statystycznej. Określona została struktura genetyczna badanej populacji – frekwencje alleli i genotypów analizowanych genów. Analiza objęła również poszukiwania asocjacji pomiędzy odpornością na *mastitis* a polimorfizmem wytypowanych genów.

Wiadomo, że poziom liczby komórek somatycznych (podobnie jak i cech produkcyjnych) ulega zmianom w trakcie laktacji, zatem wpływ czynników środowiskowych na te cechy można eliminować, analizując kumulowane wartości cech za całe laktacje lub – co jest bardziej skuteczne – stosując model dla dziennych wydajności (ang. *test day model* – TDM). Modele takie stosuje się do rutynowej oceny zarówno liczby komórek somatycznych jak i cech produkcyjnych (Schaeffer, 2004).

Do eliminacji wpływu czynników stałych oraz losowych wytypowano więc model dla próbnych udojów, zawierający, poza efektami analizowanych polimorfizmów, także efekty stałe: daty doju w stadzie (roku/miesiąca), dnia laktacji DIM (ang. *day in milk*), roku/miesiąca wycielenia, udziału genów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, a także efekty losowe: addytywny genetyczny (tzw. tła genetycznego) i permanentny środowiskowy (efekt ten włączono ze względu na powtarzalność w czasie mierzonych cech, obejmuje on czynniki niezmiennie we wszystkich próbnych udojach w danej laktacji dla konkretnej krowy).

Zawartość komórek somatycznych w mleku transformowano na skalę logarytmiczną w celu uzyskania rozkładu normalnego tej cechy. Rodzaj transformacji – logarytm naturalny – wybrano po wstępnych badaniach statystycznych testujących (test Kołmogorowa-Smirnowa z poprawkami Lilleforsa oraz test Shapiro-Wilka) najlepsze dopasowanie rozkładu przy różnych typach transformacji (np. log₂, ln, log₁₀), uwzględniając przy tym wartości skośności i kurtozy.

Asocjacje były badane w całej populacji łącznie oraz osobno w klasach wyłonionych ze względu na kolejną laktację, stadium laktacji i przedział liczby komórek somatycznych wskazujący na stan zdrowotny wymienia.

Do modeli statystycznych zostały włączone efekty dominacyjne oraz efekty epistazy pomiędzy genami w oparciu o model NOIA (ang. *Natural and Orthogonal interactions*) – obejmujące 4 kombinacje interakcji (Alvarez-Castro i Calbourg, 2007):

- addytywny – addytywny,
- addytywny – dominujący,
- dominujący – addytywny,

- dominujący – dominujący.

Do estymacji parametrów dobowej wydajności mleka oraz procentowej zawartości tłuszczu i białka jako funkcji dnia doju DIM wybrano wielomiany Legendre'a trzeciego stopnia, a do estymacji parametrów lnSCC zastosowano wielomian Wilminka (Wilmink, 1987).

W celu oszacowania efektów genetycznych badanych *loci* we wszystkich laktacjach, stadiach i klasach SCC traktowanych łącznie wykorzystano jednocechowe, mieszane modele regresji wielorakiej z czynnikami losowymi i stałymi. Ogólny zapis wybranych modeli wyglądał następująco:

$$Y_{jklmn} = \mu + \sum_{i=1}^8 G_{ij} + TD_k + P_l + YS_m + DIM_n + A_j + PE_j + e_{jklmn}$$

gdzie:

Y_{jklmn} – lnSCC (lub dobowy wydajność mleka, procentowa zawartość tłuszczu, białka) dla j -tej krowy, w k - tej klasie roku / miesiąca próbnego udoju, m -tej klasie roku/sezonu wycielenia, w n - tym dniu;

μ – średnia wartość cechy w badanej populacji;

G_{ij} – i -ty efekt – addytywny (a), dominacyjny (d) lub interakcji *loci* *microRNA2313* (1), *microRNA246* (2) j - tej krowy:

$$\sum_{i=1}^8 G_{ij} = a_1 + a_2 + d_1 + d_2 + a_1a_2 + a_1d_2 + d_1a_2 + d_1d_2$$

gdzie:

DT_k – efekt k - tej klasy roku / miesiąca próbnego udoju;

P_l – efekt l – tej laktacji

YS_m – efekt m - tej klasy roku /miesiąca;

DIM_n – efekt n - tego dnia laktacji;

A_j – losowy efekt addytywny poligeniczny dla j - tej krowy;

PE_j – losowy efekt trwały środowiskowy j ;

e_{jklmn} – reszta losowa dla j - krowy, w k - tej klasie roku / miesiąca próbnego udoju, m -tej klasie roku / sezonu wycielenia zagnieżdżonej w l - tej laktacji, w n - tym dniu l - tej laktacji.

Rozwiązywanie równań dla wybranych stadiów laktacji odbywało się z uwzględnieniem tych samych czynników, co w przypadku wyznaczania krzywych dla wszystkich próbnym udojów łącznie. Podobnie w przypadku analiz w grupach zwierząt o SCC mieszczących się w trzech zakresach: 0 – 200 tys/ml, >200 – 400 tys/ml oraz >400 tys/ml zastosowano model analogiczny do modelu traktującego wszystkie laktacje łącznie. Natomiast

w modelu stosowanego do analiz asocjacji w poszczególnych laktacjach pominięto efekt kolejnej laktacji.

3.4. Ocena efektów badanych *loci*

W pracy zastosowano model obejmujący efekty addytywne i dominacyjne badanych genów oraz występujące pomiędzy nimi interakcje wykorzystując skalę zaproponowaną przez Alvarez-Castro i Calbourg'a (2007). Prawidłowo skonstruowany model powinien spełniać założenie ortogonalności sformułowane przez Cockerhama (1954). Warunek ortogonalności modelu dla efektów addytywnych jest spełniony wówczas, gdy średnia wartość oszacowanych efektów genotypów homozygotycznych jest równa rzeczywistej średniej wartości cechy osobników homozygotycznych w populacji. Podobny warunek dotyczy także efektów dominacyjnych i epistatycznych.

Model funkcjonalny NOIA spełnia założenie ortogonalności dla wszystkich efektów genetycznych tylko w przypadku, gdy:

$$p_{11} = p_{22} \quad \text{lub} \quad p_{12} = 0$$

gdzie:

p_{11} i p_{22} – częstości homozygot,

p_{12} – częstość heterozygot w populacji (Alvarez-Castro i Calbourg'a (2007)).

Ponieważ w badanej populacji nie stwierdzono takiego rozkładu rozpatrywanych genotypów, w pierwszym etapie analiz posłużono się formułą statystyczną. Na początku dokonano kodowania efektów genetycznych pojedynczych *loci*.

Parametryzacja Alvareza-Castro (2007) – model statystyczny dla szacowania efektów (tylko dla genów, które w wyniku dalszych analiz okazały się polimorficzne):

– addytywnych genu *microRNA2467*:

$$X = \begin{cases} -p_{12} - 2p_{22} - p_{12} - 2p_{22} & \text{dla genotypu TT} \\ 1 - p_{12} - 2p_{22} \quad 1 - p_{12} - 2p_{22} & \text{dla genotypu TC} \\ 2 - p_{12} - 2p_{22} \quad 2 - p_{12} - 2p_{22} & \text{dla genotypu CC} \end{cases}$$

– addytywnych genu *microRNA2313*:

$$X = \begin{cases} -p_{12} - 2p_{22} - p_{12} - 2p_{22} & \text{dla genotypu CC} \\ 1 - p_{12} - 2p_{22} \quad 1 - p_{12} - 2p_{22} & \text{dla genotypu CT} \\ 2 - p_{12} - 2p_{22} \quad 2 - p_{12} - 2p_{22} & \text{dla genotypu TT} \end{cases}$$

– dominacyjnych genu *microRNA2467*:

$$X = \begin{cases} -\frac{2p_{12}p_{22}}{p_{11} + p_{22} - (p_{11} - p_{22})^2} - \frac{2p_{12}p_{22}}{p_{11} + p_{22} - (p_{11} - p_{22})^2} & \text{dla genotypu TT} \\ -\frac{2p_{12}p_{22}}{p_{11} + p_{22} - (p_{11} - p_{22})^2} - \frac{2p_{12}p_{22}}{p_{11} + p_{22} - (p_{11} - p_{22})^2} & \text{dla genotypu TC} \\ -\frac{2p_{11}p_{12}}{p_{11} + p_{22} - (p_{11} - p_{22})^2} - \frac{2p_{11}p_{12}}{p_{11} + p_{22} - (p_{11} - p_{22})^2} & \text{dla genotypu CC} \end{cases}$$

– dominacyjnych genu *microRNA2313*:

$$X = \begin{cases} -\frac{2p_{12}p_{22}}{p_{11} + p_{22} - (p_{11} - p_{22})^2} - \frac{2p_{12}p_{22}}{p_{11} + p_{22} - (p_{11} - p_{22})^2} & \text{dla genotypu CC} \\ -\frac{2p_{12}p_{22}}{p_{11} + p_{22} - (p_{11} - p_{22})^2} - \frac{2p_{12}p_{22}}{p_{11} + p_{22} - (p_{11} - p_{22})^2} & \text{dla genotypu CT} \\ -\frac{2p_{11}p_{12}}{p_{11} + p_{22} - (p_{11} - p_{22})^2} - \frac{2p_{11}p_{12}}{p_{11} + p_{22} - (p_{11} - p_{22})^2} & \text{dla genotypu TT} \end{cases}$$

gdzie: p_{11} , p_{12} , p_{22} to odpowiednio: częstości genotypów TT, TC i CC dla genu *microRNA2467* oraz CC, CT i TT dla genu *microRNA2313*.

Następnie rozszerzono formułę, wprowadzając wartości interakcji dwugenowych jako iloczyn Kroneckera macierzy wartości dla dwóch pojedynczych loci (*microRNA2467*) i C (*microRNA2313*):

$$G_{TC} = (S_C \otimes S_T) \cdot E_{TC}$$

W ten sposób dla każdej pary genów otrzymano cztery możliwe rodzaje interakcji:

- 1) $\alpha_{T\alpha C}$: T – addytywny, C – addytywny,
- 2) $\delta_{T\alpha C}$: T – dominujący, C – addytywny,
- 3) $\alpha_{T\delta C}$: T – addytywny, C – dominujący,
- 4) $\delta_{T\delta C}$: T – dominujący, C – dominujący.

W celu oszacowania funkcjonalnego efektu substytucji genów dokonano transformacji formuły statystycznej na funkcjonalną według procedury Alvarez-Castro i Calbourg'a (2007). Estymatory funkcjonalne uzyskane po transformacji zostały oznaczone odnośnymi symbolami i tak: a – oznacza funkcjonalny efekt addytywny (efekt allelu w układzie homozygotycznym), d – funkcjonalny efekt dominacyjny (efekt allelu w układzie heterozygotycznym), natomiast symbole aa , ad , da oraz dd oznaczają odpowiednie rodzaje interakcji pomiędzy allelami z różnych par w układzie homo- i heterozygotycznym:

aa – allele w obydwu loci występują w układzie homozygotycznym,

ad – allele: w *locus microRNA2467* w układzie homozygotycznym,
w *microRNA2313* – w układzie heterozygotycznym,
da – allele: w *locus microRNA2467* w układzie heterozygotycznym,
w *microRNA2313* – w układzie homozygotycznym,
dd – allele w obydwu *loci* w układzie heterozygotycznym.

Funkcjonalny efekt dominacyjny *d* – zgodnie z modelem NOIA – przedstawiono odchylenie wartości genotypu heterozygotycznego od średniej arytmetycznej obydwu genotypów homozygotycznych. Jeżeli efekt ten ma taki sam znak jak efekt addytywny danego allelu, świadczy to o dominacji analizowanego allelu, natomiast różne znaki efektów addytywnego i dominacyjnego informują o recesywnym działaniu badanego allelu. Wartości interakcji wyrażono natomiast jako odchylenia od wartości przewidywanych, oszacowanych przy założeniu, że występuje jedynie proste sumowanie efektów addytywnych.

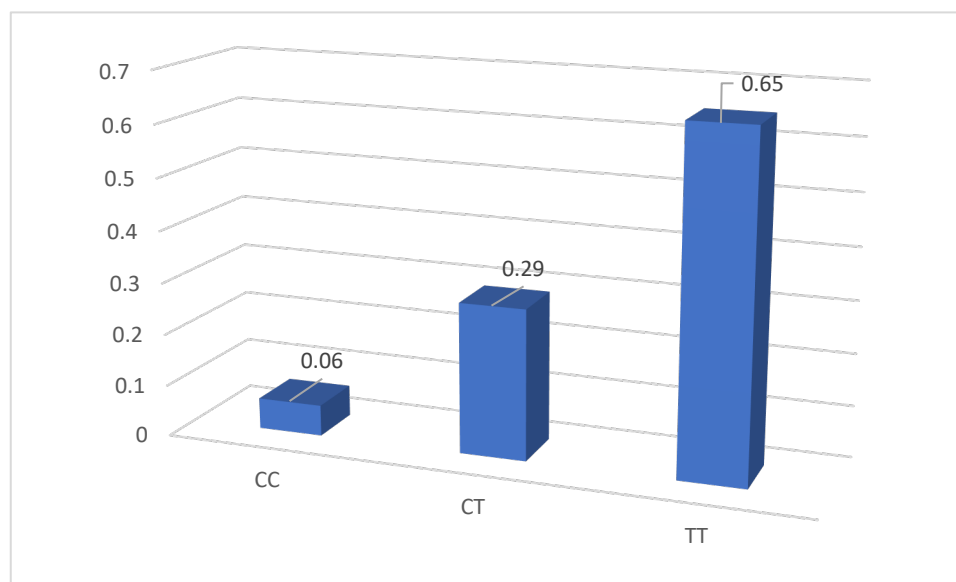
4. WYNIKI

4.1. Frekwencje genotypów i alleli badanych genów

W przypadku *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e* w badanej populacji stada krów rasy polskiej holsztyńsko–fryzyjskiej odmiany czarno–białej, pomimo odmiennych danych literaturowych, stwierdzono monomorfizm, dlatego wyłączono powyższe geny z dalszych analiz.

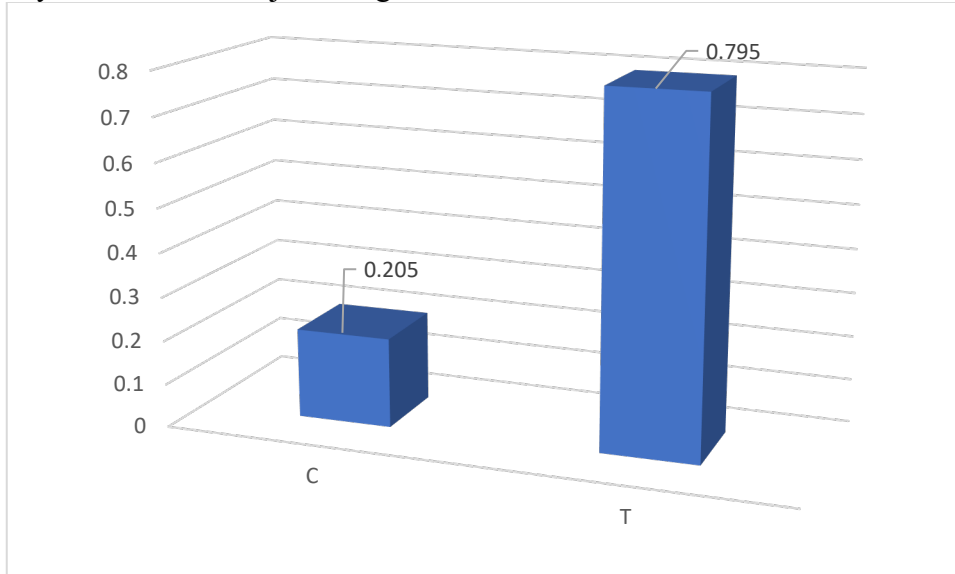
W wyniku przeprowadzonej analizy w badanej grupie krów zidentyfikowano po dwa allele genu *microRNA2467* oraz *microRNA2313* - na wykresach 2. – 5. przedstawiono ich frekwencje oraz frekwencje warunkowanych przez nie genotypów. Analizując frekwencje dotyczące genu *microRNA2467*, zaobserwowano największą liczbę osobników o genotypie TT, następnie pod względem częstości występowania plasowały się kolejno osobniki o genotypach CT i CC. Frekwencje genotypów przedstawiały się kolejno: TT na poziomie 0,65, CT na poziomie 0,29 i CC na poziomie 0,06 (wykres 2). W przypadku genu *microRNA2467* najczęściej występującym okazał się allel T, którego frekwencja wynosiła 0,795, następnie allel C, którego frekwencja wynosiła 0,205 (wykres 3).

Wykres 2. Frekwencje genotypów genu *microRNA2467*



Źródło: opracowanie własne.

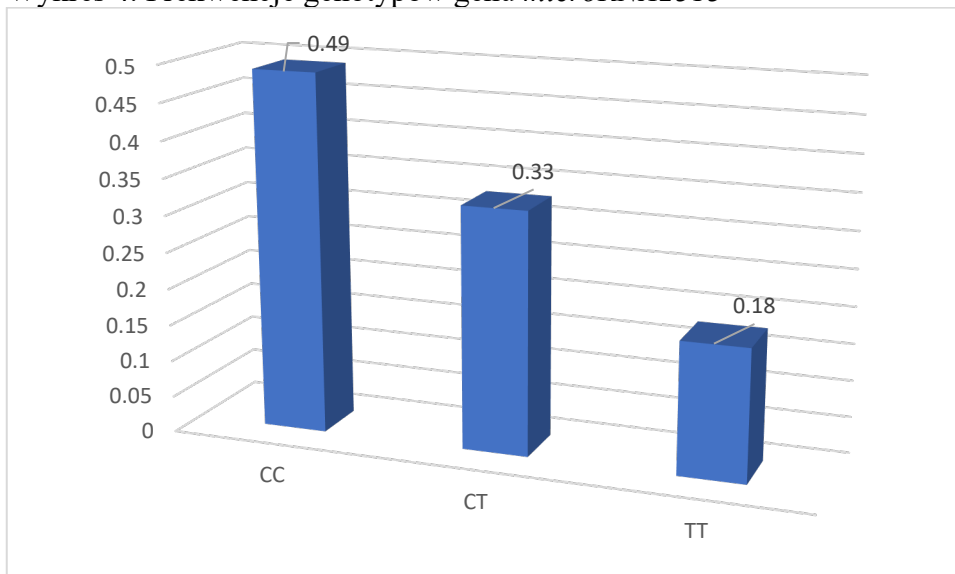
Wykres 3. Frekwencje alleli genu *microRNA2467*



Źródło: opracowanie własne.

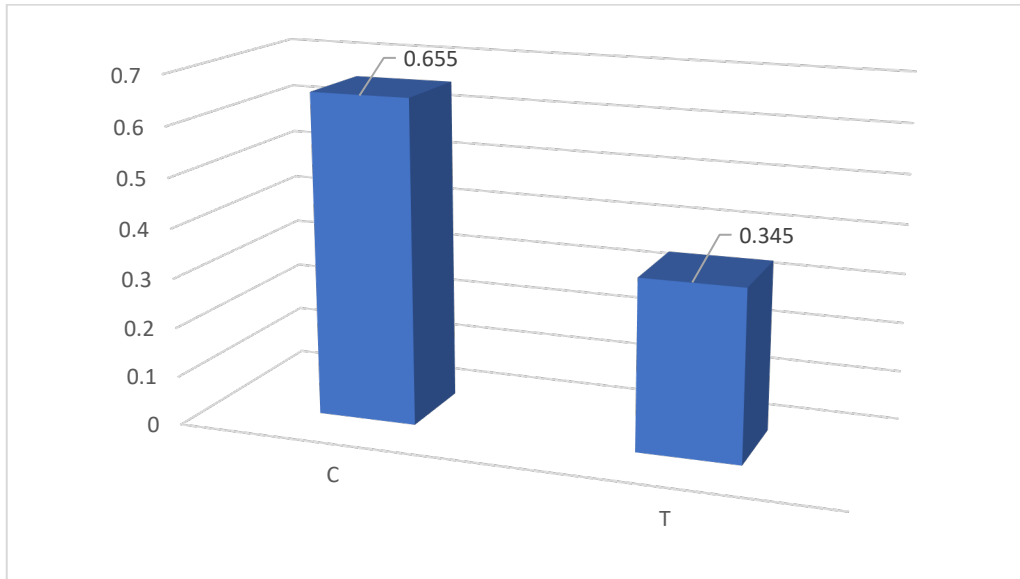
Analiza frekwencji dotyczących genu *microRNA2313* wykazała, że największą częstością występowania charakteryzowały się genotypy CC, następnie pod względem częstości występowania plasowały się kolejno genotypy CT i TT. Frekwencje genotypów przedstawiały się kolejno: CC - 0,49, CT - 0,33 i CC - 0,18 (wykres 4). W przypadku genu *microRNA2313* najczęstszym okazał się allel C, którego frekwencja wynosiła 0,655, następnie allel T, którego frekwencja wynosiła 0,345 (wykres 5).

Wykres 4. Frekwencje genotypów genu *microRNA2313*



Źródło: opracowanie własne.

Wykres 5. Frekwencje alleli genu *microRNA2313*



Źródło: opracowanie własne.

Tabela 3. przedstawia liczebności i frekwencje alleli i genotypów z całkowitej liczby obserwacji z danych zebranych ze wszystkich próbnych udojów. W przypadku *microRNA2467* frekwencje genotypów TT (14694), CT (6346) i CC (1252) stanowią odpowiednio 65,92%, 28,47% i 5,62% z całkowitej liczby obserwacji, która wynosiła 22 292.

Tabela 3. Frekwencje alleli i genotypów *microRNA2313* i *microRNA2467* w próbnych udojach

Genotyp	<i>microRNA2313</i>		<i>microRNA2467</i>	
	N	%	N	%
TT	4 225	18,95	14 694	65,92
CT	7 314	32,81	6 346	28,47
CC	10 753	48,24	1 252	5,62
Razem	22 292	100,00	22 292	100,00
Allel				
T	15 764	35,36	35 734	80,15
C	28 820	64,64	8 850	19,85
Razem	44 584	100,00	44 584	100,00

Źródło: opracowanie własne.

W przypadku *microRNA2313* frekwencje genotypów CC (10 753 próbnych udojów), CT (7 314 próbnych udojów) i TT (4 225 próbnych udojów) stanowią odpowiednio 48,24%,

32,81% i 18,95% z całkowitej liczby obserwacji. W tabeli 4. przedstawiono liczebności poszczególnych haplotypów.

Tabela 4. Liczebności haplotypów *microRNA2313* i *microRNA2467* w próbnym udojach

<i>microRNA2467</i> \ <i>microRNA2313</i>	TT		CT		CC		Razem	
	N	%	N	%	N	%	N	%
TT	2 662	11,94	1 202	5,39	361	1,62	4 225	18,95
CT	4 513	20,24	2 407	10,80	394	1,77	7 314	32,81
CC	7 519	33,73	2 737	12,28	497	2,23	10 753	48,24
Razem	14 694	65,92	6 346	28,47	1252	5,62	22 292	100

Źródło: opracowanie własne.

4.2. Statystyki opisowe

W badanym stadzie krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej zanotowano częste występowanie stanów zapalnych wymion, co stanowiło poważny problem ekonomiczny, jak również organizacyjny. W analizowanym okresie stwierdzono podwyższoną liczbę komórek somatycznych, przekraczającą zakładaną dopuszczalną normę 200 tys/ml w ponad 50% przebadanych próbek mleka.

W tabeli 5. przedstawiono statystyki opisowe średnich wartości fenotypowych badanych cech w próbnym udojach. SCC transformowana na skalę logarytmiczną przyjmowała najmniejsze wartości w I laktacji. W II laktacji zaobserwowano wyraźny wzrost poziomu SCC w mleku badanych krów, z wyjątkiem pierwszych próbnym udojów. W kolejnych laktacjach – III, IV, V i VI tendencja wzrostowa została zachowana na podobnym poziomie. Największą liczbę komórek somatycznych w mleku analizowanego stada stwierdzono w III stadium laktacji (z wyjątkiem laktacji szóstej). Prawidłowość tą można zaobserwować na wykresie 1.

W I laktacji odnotowano najmniejszą dobową wydajność mleka w stadzie. Wzrostowa tendencja wydajności utrzymywała się do III laktacji, natomiast od IV do VI laktacji stwierdzono utrzymujący się stopniowy spadek ilości pozyskiwanego mleka. Stwierdzono także największą wydajność mleka w I stadium laktacji, a najmniejszą w statnich próbnym udojach, przed zasuszeniem – III stadium laktacji. Zauważono też wyraźny związek pomiędzy dobową wydajnością mleka a liczbą komórek somatycznych w nim zawartych. Wydajność mleka była mniejsza o 4,22 litra na dobę u krów, których poziom SCC zawierał się w przedziale $>200 \leq 400$ tys/ml. Ponadto w I laktacji stwierdzono jedną z najwyższych zawartości białka oraz

najniższą zawartość tłuszczu. Najwyższą procentową zawartością tłuszczu charakteryzowały się zwierzęta w II stadium laktacji, natomiast białka w ostatnim stadium.

U osobników przekraczających założoną normę poziomu komórek somatycznych w mleku zaobserwowano wyższą koncentrację białka i jedną z wyższych koncentracji tłuszczu w porównaniu do zwierząt mieszczących się w normie. Większa koncentracja tłuszczu i białka u krów, u których zawartość SCC przekraczała 400tys/ml, może być związana ze spadkiem wydajności mlecznej i efektem mniejszego rozcieńczenia tych składników u krów zainfekowanych. Równoległe ze wzrostem SCC u badanych osobników, spadała wydajność mleczna wraz z niewielkim wzrostem koncentracji tłuszczu i białka w nim zawartych. Trzeba pamiętać, że choć procentowa zawartość tłuszczu i białka pozornie wzrosła, to produkcja białka i tłuszczu w kilogramach już nie. Ponadto zmienia się niekorzystnie profil białkowy pociągając za sobą gorszą przydatność technologiczną mleka.

Tabela 5. Statystyki opisowe średnich wartości fenotypowych badanych cech w próbnych udojach

	ln SCC		Mleko/dobę [kg]		Tłuszcz [%]		Białko [%]	
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
Laktacja								
I	4,90	1,20	30,00	7,21	3,99	0,73	3,61	0,44
II	5,13	1,33	33,50	10,51	4,05	0,80	3,63	0,46
III	5,51	1,37	34,99	11,11	4,08	0,82	3,56	0,45
IV	5,76	1,42	34,51	11,68	4,00	0,85	3,53	0,44
V	6,07	1,54	32,71	11,25	3,99	0,81	3,54	0,45
VI+*	6,28	1,53	31,82	10,78	3,99	0,86	3,46	0,42
Stadium								
I	5,13	1,53	41,05	8,78	3,91	0,87	3,24	0,35
II	5,36	1,43	35,29	7,59	3,96	0,74	3,54	0,34
III	5,80	1,31	25,35	8,19	4,17	0,78	3,85	0,41
SCC (tys/ml)								
SCC \leq 200	4,23	0,71	35,92	9,39	3,98	0,77	3,48	0,42
200 <SCC \leq 400	5,64	0,20	31,70	10,40	4,10	0,83	3,63	0,45
SCC>400	7,04	0,81	29,91	11,06	4,04	0,84	3,66	0,46
* Laktacja VI i kolejne								

Źródło: opracowanie własne.

4.3. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w zależności od poziomu SCC

Na wykresie 6. (aneks tab. 1A.) przedstawiono efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do lnSCC w zależności od klasy SCC. Istotny statystycznie addytywny efekt allelu C genu *microRNA2313* stwierdzono w mleku, w którym zawartość komórek somatycznych nie przekraczała 200 tys/ml. Homozygoty CC osiągnęły gorsze wyniki pod względem badanej cechy i zawartość komórek somatycznych w mleku, wyrażona w skali logarytmicznej, była w tym przypadku większa od wartości średniej o 0,06.

Dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313* związany był z większą zawartością komórek somatycznych w mleku o 0,14 ($0 \leq 200$ tys/ml), co okazało się wynikiem statystycznie wysoko istotnym. W tej samej grupie statystycznie wysoko istotny okazał się tylko jeszcze addytywno-dominacyjny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467* związany z mniejszą zawartością SCC o 0,34 od wartości średniej. Pozostałe efekty, tj: efekt addytywny i dominacyjny *microRNA2467* i efekty interakcji okazały się nieistotne statystycznie.

W mleku, którego zawartość komórek somatycznych zawierała się w przedziale od 200 do 400 tys/ml nie stwierdzono statystycznie istotnych efektów. Natomiast w grupie, w których zawartość komórek somatycznych przekraczała 400 tys/ml stwierdzono statystycznie wysoko istotny addytywny efekt allelu C genu *microRNA2313*. Zawartość komórek somatycznych w mleku, wyrażona w skali logarytmicznej, była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o 0,13. Ponadto wykazano statystycznie wysoko istotny dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313*, który związany był z mniejszą zawartością komórek somatycznych w mleku o 0,22 w porównaniu z wartością średnią w tej grupie (> 400 tys/ml). W tej samej grupie statystycznie wysoko istotny okazał się tylko jeszcze addytywny efekt allelu T genu *microRNA2467* związany z wyższym SCC o 0,17 od wartości średniej. Pozostałe efekty, tj: efekt dominacyjny *microRNA2467* oraz efekty epistatyczne okazały się nieistotne statystycznie.

Biorąc pod uwagę powyższe rezultaty (wykres 6.) zauważono, że zachodzi tu interakcja genotyp-środowisko – w różnych klasach SCC efekty tego samego allelu C genu *microRNA2313* różniły się od siebie. U osobników zdrowych addytywny i dominacyjny efekt allelu C wiązał się z niekorzystnie wyższą zawartością SCC, u osobników w stanie podklinicznym efekt allelu C był nieistotny, natomiast u osobników chorych związany był z korzystnie niższą zawartością SCC.

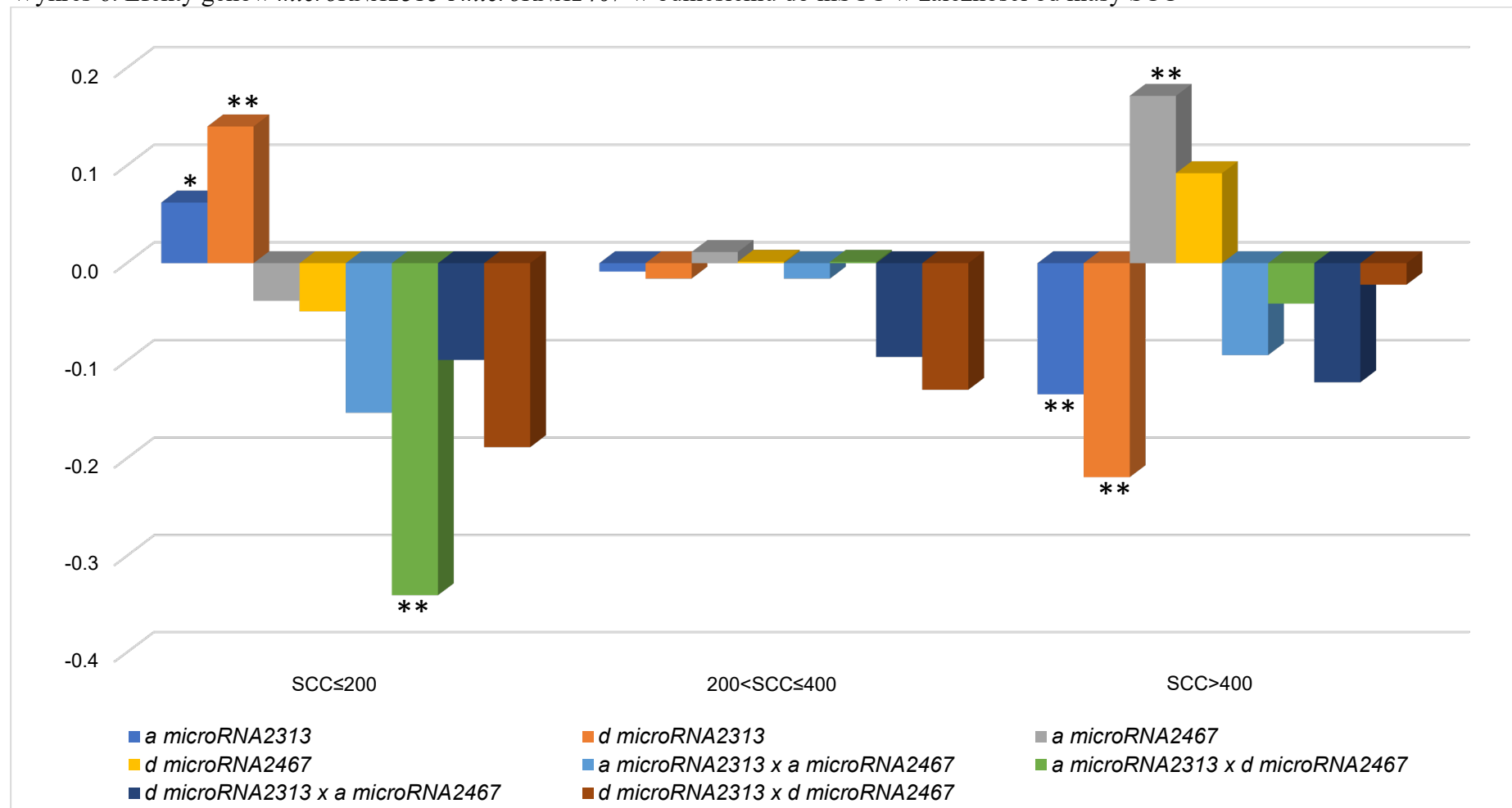
Pomiędzy genami zaobserwowano istotne statystycznie działanie epistatyczne w klasie $SCC \leq 200$. U osobników tych interakcja addytywno-dominacyjna korzystnie wpływała na mniejszą zawartość SCC w mleku. Należy też zwrócić uwagę na ciekawy addytywny efekt allelu T genu *microRNA2467* związany z niekorzystnie wyższą zawartością SCC u osobników chorych, podczas gdy ten sam efekt u osobników zdrowych, mimo iż nieistotny statystycznie, związany był z niższą zawartością SCC. Jest to więc kolejny przykład oddziaływania czynników środowiskowych, w tym przypadku takich jak klasa SCC, na zawartość komórek somatycznych w mleku.

Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od klasy SCC zostały zaprezentowane na wykresie 7. (aneks tab. 2A). Statystycznie wysoko istotny addytywny efekt allelu T genu *microRNA2467* stwierdzono w mleku, w którym zawartość komórek somatycznych nie przekraczała 200 tys/ml. Procentowa zawartość białka w mleku była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o 0,07%. Statystycznie wysoko istotny dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* związany był z mniejszą procentową zawartością białka w mleku o 0,09% w porównaniu z wartością średnią w tej grupie ($0 \leq 200$ tys/ml).

W tej samej grupie statystycznie istotna okazała się tylko jeszcze addytywno-addytywna interakcja allelu C genu *microRNA2313* i allelu T genu *microRNA2467* związana z wyższą procentową zawartością białka o 0,08% od wartości średniej. Pozostałe efekty, tj: efekt addytywny i dominacyjny genu *microRNA2313* oraz efekty interakcji okazały się nieistotne statystycznie.

Natomiast istotny statystycznie addytywny efekt allelu T genu *microRNA2467* stwierdzono w mleku, gdzie zawartość komórek somatycznych mieściła się w przedziale od 200 do 400 tys/ml. Procentowa zawartość białka w mleku była w tym przypadku mniejsza o 0,08% od wartości średniej.

Dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* (wykres 7.) związany był z mniejszą procentową zawartością białka w mleku o 0,1% w porównaniu z wartością średnią w tej grupie ($200 < SCC \leq 400$ tys/ml), co okazało się wynikiem statystycznie wysoko istotnym. W tej samej grupie statystycznie wysoko istotny okazał się addytywno-addytywny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467* związany z wyższą procentową zawartością białka o 0,21% od wartości średniej.

Wykres 6. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do lnSCC w zależności od klasy SCC

Efekty zaznaczone pojedynczą gwiazdką są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast podwójną gwiazdką na poziomie $P \leq 0,01$.

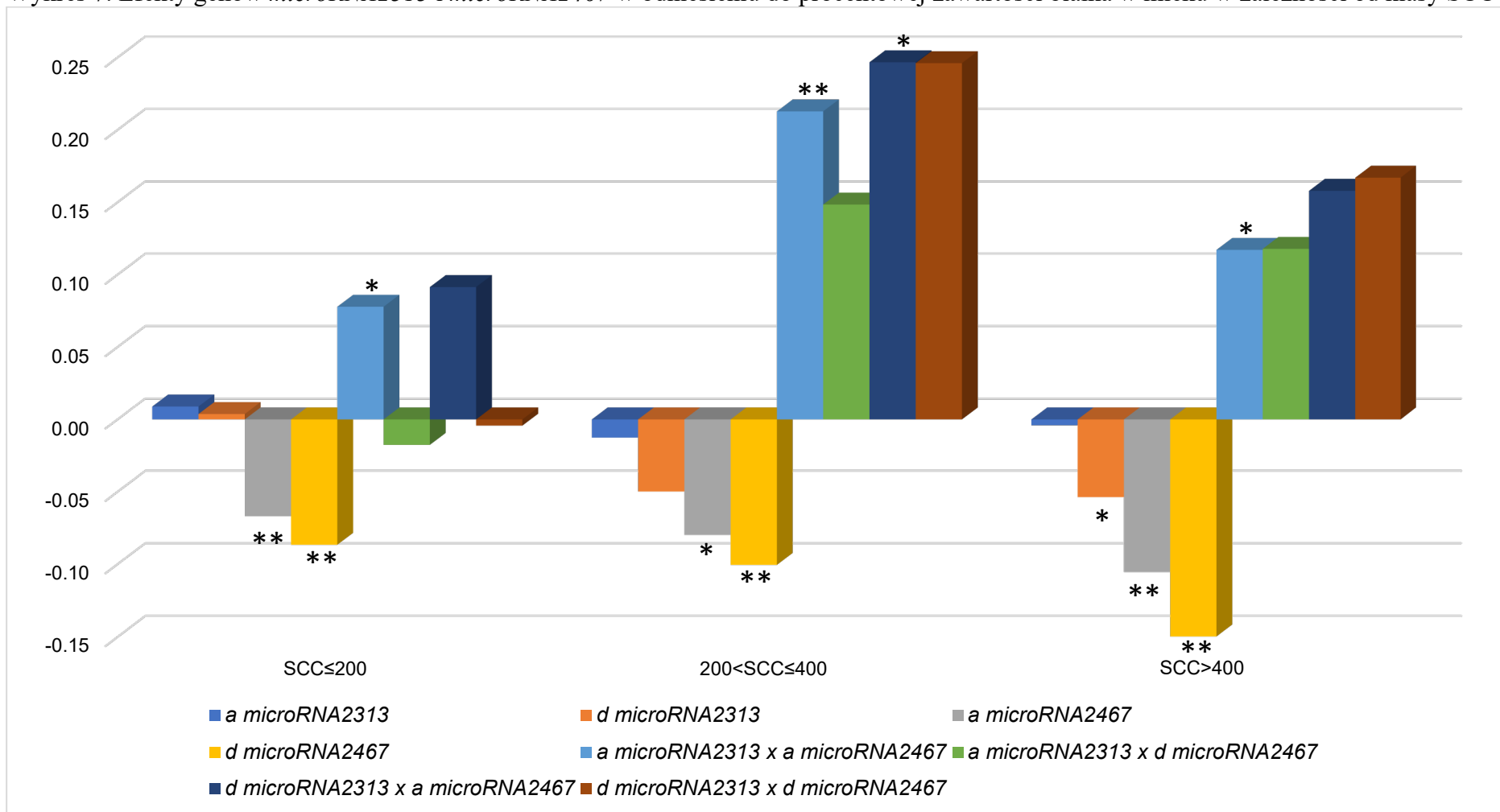
Źródło: opracowanie własne na podstawie tabeli 1A.

Dominacyjno-addytywny efekt interakcji allelu C genu *microRNA2313* i allelu T genu *microRNA2467* (wykres 7.) skorelowany był z wyższą procentową zawartością białka o 0,25%, co okazało się wynikiem istotnym statystycznie. Pozostałe efekty, tj: efekt addytywny i dominacyjny *microRNA2313* i efekty epistatyczne w tej grupie okazały się nieistotne statystycznie.

Istotny statystycznie dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313* stwierdzono w mleku, w których zawartość komórek somatycznych nie przekraczała 400 tys/ml. Procentowa zawartość białka w mleku była w tym przypadku niższa od wartości średniej o 0,05%. Ponadto addytywny efekt allelu T genu *microRNA2467* związany był z mniejszą procentową zawartością białka w mleku o 0,11% w porównaniu z wartością średnią w tej grupie ($200 < \text{SCC} \leq 400$ tys/ml), co okazało się wynikiem statystycznie wysoko istotnym.

W tej samej grupie statystycznie wysoko istotny okazał się jeszcze dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* związany z mniejszą procentową zawartością białka o 0,15% od wartości średniej. Statystycznie istotny okazał się addytywno-addytywny efekt interakcji allelu C genu *microRNA2313* i allelu T genu *microRNA2467*, który skorelowany był z wyższą procentową zawartością białka o 0,12% w porównaniu z wartością średnią. W tej samej grupie pozostałe efekty, tj: efekt addytywny genu *microRNA2313* i efekty interakcji okazały się nieistotne statystycznie.

Reasumując, addytywny i dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313* (wykres 7.) związany był z nieznacznie wyższą procentową zawartością białka w mleku u krów zdrowych ($\text{SCC} \leq 200$), podczas gdy u osobników w stanie podklinicznym i chorych związany był z niższą procentową zawartością białka. Można więc wnioskować, że coraz wyższa zawartość SCC przy addytywnym i dominacyjnym efekcie allelu C wiąże się z niekorzystnie niższą, w porównaniu do średniej w badanej populacji, zawartością białka w mleku. We wszystkich klasach SCC zaobserwowano, że efekt addytywny i dominacyjny allelu T genu *microRNA2467* związany był z niższą od wartości średniej procentową zawartością białka w mleku, co jest niepożądanym efektem. Natomiast w przypadku epistatycznego współdziałania obu genów zauważono tendencję związaną z wyższą, w odniesieniu do średniej, procentową zawartością białka w mleku u niemalże wszystkich osobników we wszystkich klasach SCC. Dowodzi to, że interakcje między badanymi genami są dużo bardziej korzystne niż ich pojedyncze działanie.

Wykres 7. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od klasy SCC

Efekty zaznaczone pojedynczą gwiazdką są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast podwójną gwiazdką na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne na podstawie tabeli 2A.

Wykres 8. (aneks tab. 3A.) przedstawia efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od klasy SCC. Statystycznie wysoko istotny addytywny efekt allelu C genu *microRNA2313* stwierdzono w mleku, w którym zawartość komórek somatycznych nie przekraczała 200 tys/ml. Procentowa zawartość tłuszczu w mleku była w tym przypadku większa od wartości średniej o 0,07%.

Statystycznie wysoko istotny dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313* związany był z większą procentową zawartością tłuszczu w mleku o 0,11% w porównaniu z wartością średnią w tej grupie ($0 \leq 200$ tys/ml). W tej samej grupie statystycznie wysoko istotne okazały się również efekty addytywny i dominacyjny allelu T genu *microRNA2467* wiążące się z mniejszą procentową zawartością tłuszczu o odpowiednio 0,11% i 0,13% od wartości średniej w tej grupie ($0 \leq 200$ tys/ml). Nie potwierdzono istotności efektów interakcji w tej grupie.

W grupie o zawartości komórek somatycznych z przedziału od 200 do 400 tys/ml (wykres 8.) statystycznie istotne okazały się dwa efekty interakcji: addytywno-dominacyjny efekt interakcji allelu C genu *microRNA2313* i allelu T genu *microRNA2467* - związany z wyższą od wartości średniej procentową zawartością tłuszczu o 0,44% oraz dominacyjno-dominacyjny efekt interakcji allelu C genu *microRNA2313* i allelu T genu *microRNA2467*, również związany z wyższą od średniej zawartością procentową tłuszczu (o 0,82%). Pozostałe efekty (addytywne i dominacyjne oraz efekty interakcji) okazały się nieistotne statystycznie w tej grupie.

Statystycznie istotny addytywny i dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313* stwierdzono w mleku, w którym zawartość komórek somatycznych przekraczała 400 tys/ml. Procentowa zawartość tłuszczu w mleku była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o odpowiednio 0,07% i 0,12%. Statystycznie wysoko istotny addytywny efekt allelu T genu *microRNA2467* związany był z mniejszą procentową zawartością tłuszczu w mleku o 0,18% w porównaniu z wartością średnią w tej grupie (>400 tys/ml).

W tej samej grupie statystycznie istotny okazał się również dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* związany z mniejszą procentową zawartością tłuszczu o 0,19% od wartości średniej. Efekty interakcji alleli genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w tej grupie okazały się nieistotne statystycznie.

Analiza wyników przedstawionych na wykresie 8. wykazała istnienie interakcji genotyp-środowisko, ponieważ efekty addytywny i dominacyjny allelu C genu *microRNA2313* były związane ze statystycznie istotnie większą zawartością tłuszczu u osobników zdrowych. Z kolei u osobników w stanie podklinicznym efekty te były nieistotne, natomiast u osobników chorych efekty te były związane ze statystycznie niższą zawartością tłuszczu w mleku.

W przypadku genu *microRNA2467* zaobserwowano związek między obecnością allelu T a niższą procentową zawartością tłuszczu we wszystkich klasach SCC, co świadczy o braku interakcji genotyp – środowisko. Statystycznie istotny efekt wykazywało działanie epistatyczne tylko w klasie SCC $200 < SCC \leq 400$.

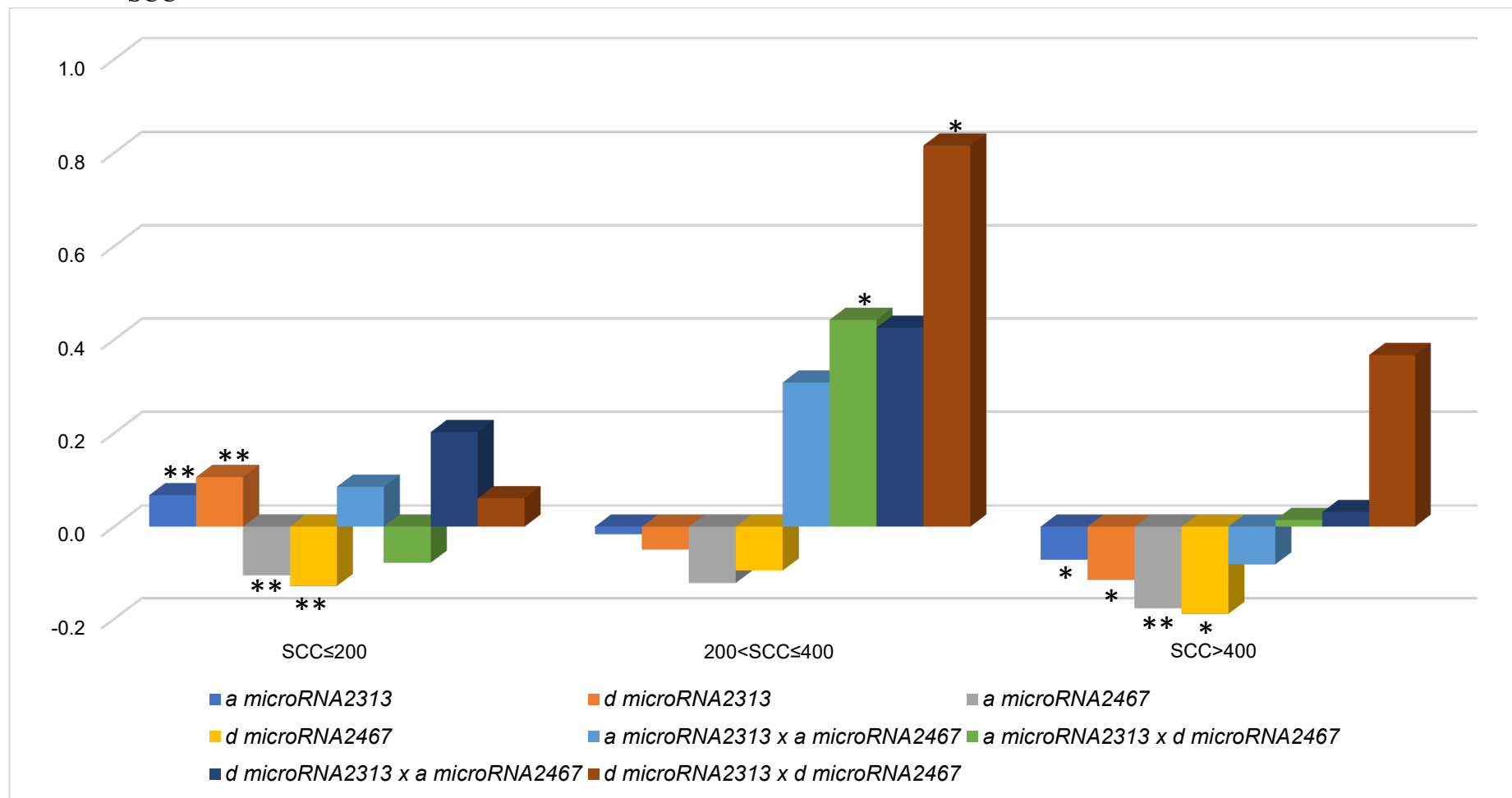
Na wykresie 9. (aneks tab. 4A.) zilustrowano graficznie efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej (kg/dobę) w zależności od klasy SCC. Istotny statystycznie addytywny efekt allelu C genu *microRNA2313* stwierdzono w mleku, w którym zawartość komórek somatycznych nie przekraczała 200 tys/ml. Dobowa wydajność mleczna była w tym przypadku mniejsza o 0,5kg od wartości średniej. Dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313* związany był z mniejszą dobową wydajnością mleczną o 1,2 kg w porównaniu z wartością średnią w tej grupie, co okazało się wynikiem statystycznie wysoko istotnym. W tej samej grupie statystycznie wysoko istotne okazały się efekty addytywny i dominacyjny allelu T genu *microRNA2467* oraz addytywno-dominacyjny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467* związane z wyższą dobową wydajnością mleczną o odpowiednio 1,5 kg, 2,1 kg i 3,6 kg od wartości średniej.

Dominacyjno-dominacyjny efekt interakcji allelu C genu *microRNA2313* i allelu T genu *microRNA2467* także skorelowany był z wyższą dobową wydajnością mleczną o 3,7 kg, co okazało się wynikiem istotnym statystycznie. Nie potwierdzono istotności pozostałych efektów epistatycznych w tej grupie.

Istotny statystycznie addytywny efekt allelu C genu *microRNA2313* stwierdzono w mleku, w którym zawartość komórek somatycznych zawierała się w przedziale od $200 < SCC \leq 400$ tys/ml. Dobowa wydajność mleczna była w tym przypadku mniejsza o 1,1 kg od wartości średniej. Dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313* związany był z mniejszą dobową wydajnością mleczną o 1,6 kg w porównaniu z wartością średnią w tej grupie, co okazało się wynikiem istotnym statystycznie.

Pozostałe efekty, tj. efekt addytywny czy dominacyjny allelu T genu *microRNA2467* oraz efekty interakcji w tej grupie okazały się nieistotne statystycznie.

Wykres 8. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od klasy SCC



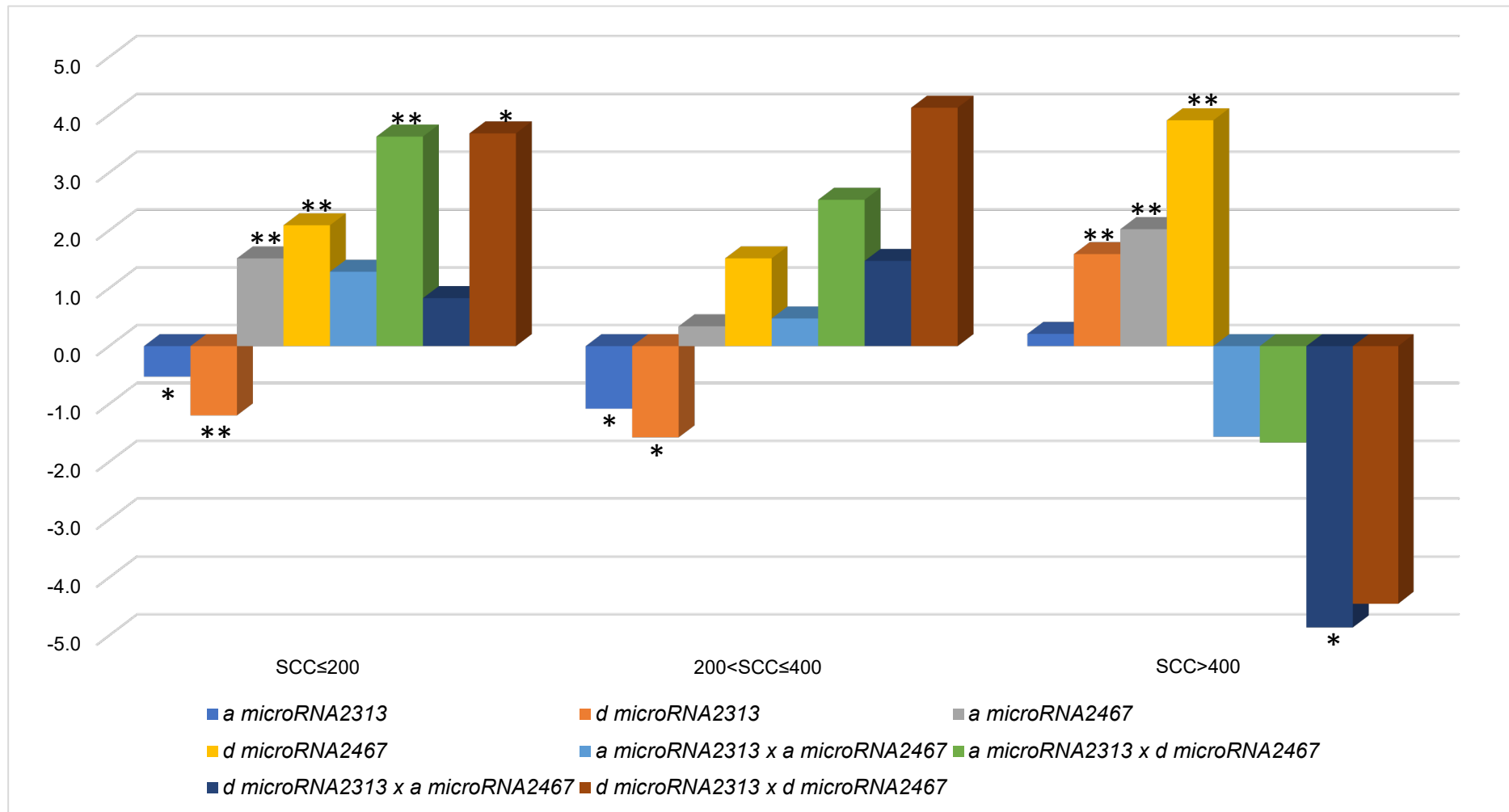
Efekty zaznaczone pojedynczą gwiazdką są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast podwójną gwiazdką na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne na podstawie tabeli 3A.

Statystycznie wysoko istotny dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313* (wykres 9.) stwierdzono w mleku, w którym zawartość komórek somatycznych przekraczała 400 tys/ml. Dobowa wydajność mleczna była w tym przypadku większa o 1,6 kg od wartości średniej. Addytywny i dominacyjny efekty allelu T genu *microRNA2467* związane były z większą dobową wydajnością mleczną o odpowiednio 2 kg i 4 kg w porównaniu z wartością średnią w tej grupie, co okazało się wynikiem statystycznie wysoko istotnym. W tej samej grupie statystycznie istotny okazał się także dominacyjno-addytywny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467* związany z niższą dobową wydajnością mleczną o odpowiednio 4,9 kg od wartości średniej. Nie potwierdzono istotności pozostałych efektów w tej grupie.

Biorąc pod uwagę przedstawione wyniki badań (wykres 9.), po raz kolejny zauważono interakcję genotyp – środowisko. Związane to było z faktem, że efekt addytywny i dominacyjny allelu C genu *microRNA2313* był statystycznie związany z wyższą dobową wydajnością mleczną u krów chorych, podczas gdy ten sam efekt u krów zdrowych i w stanie podklinicznym związany był z niższą dobową wydajnością mleczną. We wszystkich klasach SCC zaobserwowano wyższą od średniej dobową wydajność mleczną, związaną z działaniem efektu addytywnego i dominacyjnego allelu T genu *microRNA2467*, co wskazywało na brak interakcji genotyp – środowisko. Efekty wszystkich interakcji obu genów związane były z wyższą dobową wydajnością mleczną u osobników zdrowych i w stanie podklinicznym, podczas gdy zupełnie odwrotną tendencję zaobserwowano u osobników chorych – tu efekty interakcji obu genów związane były z niższą dobową wydajnością mleczną. W ten sposób po raz kolejny zauważamy, że współdziałanie epistatyczne zależne było od klasy SCC – u osobników chorych zaobserwowano niekorzystny efekt epistatyczny, natomiast u zdrowych efekt ten był korzystny

Wykres 9. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej (kg/dobę) w zależności od klasy SCC



Efekty zaznaczone pojedynczą gwiazdką są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast podwójną gwiazdką na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne na podstawie tabeli 4A.

4.4. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w zależności od kolejnej laktacji

Wykres 10. (aneks tab. 5A.) przedstawia efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do lnSCC w zależności od kolejnej laktacji. W I laktacji nie stwierdzono statystycznie istotnych efektów. Z kolei już w II laktacji zauważono istotny statystycznie addytywny efekt allelu T genu *microRNA2467*. Zawartość SCC w mleku, wyrażona w skali logarytmicznej, była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o 0,26.

Dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* związany był z niższą SCC w mleku o 0,29 w porównaniu z wartością średnią w tej grupie (II laktacja), co okazało się wynikiem statystycznie wysoko istotnym. W tej samej grupie pozostałe efekty, tj. efekt addytywny i dominacyjny allelu C genu *microRNA2313* oraz efekty interakcji, okazały się nieistotne statystycznie.

Istotny statystycznie addytywny efekt allelu C genu *microRNA2313* stwierdzono w III laktacji. SCC w mleku, wyrażona w skali logarytmicznej, była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o 0,15. Natomiast dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* związany był z mniejszą SCC w mleku o 0,4 w porównaniu z wartością średnią w tej grupie (III laktacja), co okazało się wynikiem statystycznie wysoko istotnym. W tej samej grupie statystycznie istotne okazały się jeszcze addytywno-dominacyjny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467* oraz dominacyjno-dominacyjny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467*, które związane były z niższą SCC o odpowiednio 0,6 i 1,3 od wartości średniej. Pozostałe efekty, tj: efekt addytywny *microRNA2467* i dominacyjny *microRNA2313*, a także efekty interakcji okazały się nieistotne statystycznie.

Statystycznie wysoko istotny addytywny efekt allelu C genu *microRNA2313* stwierdzono w IV laktacji. SCC w mleku, wyrażona w skali logarytmicznej, była w tym przypadku większa od wartości średniej o 0,14. W tej samej grupie, istotny statystycznie okazał się tylko jeszcze addytywno-addytywny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467*, związany z wyższą SCC o 0,34 od wartości średniej. Pozostałe efekty, tj: efekt addytywny i dominacyjny *microRNA2467* i efekty epistatyczne w tej grupie (IV laktacja) okazały się nieistotne statystycznie.

Statystycznie wysoko istotny addytywny i dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313* (wykres 10.) stwierdzono w V laktacji. SCC w mleku, wyrażona w skali

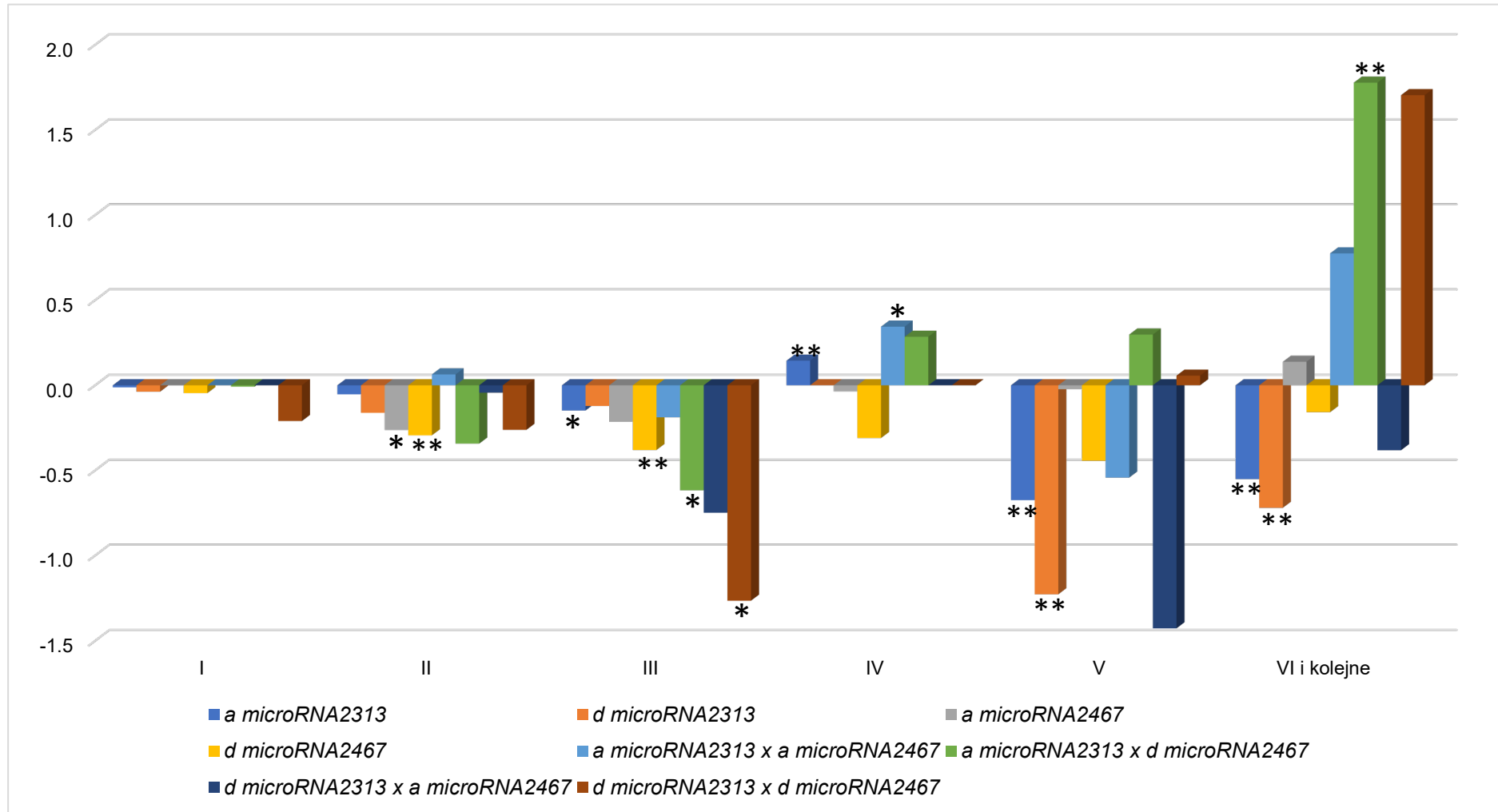
logarytmicznej, była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o odpowiednio 0,67 i 1,23. Pozostałe efekty, tj: efekt addytywny i dominacyjny *microRNA2467* oraz efekty interakcji w tej grupie (V laktacja) okazały się nieistotne statystycznie.

Statystycznie wysoko istotny addytywny i dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313* stwierdzono w VI laktacji. SCC w mleku, wyrażona w skali logarytmicznej była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o odpowiednio 0,55 i 0,72. Stwierdzono również, że addytywno-dominacyjny efekt interakcji allelu C genu *microRNA2313* i allelu T genu *microRNA2467* związany był z większą SCC w mleku o 1,78 w porównaniu z wartością średnią w tej grupie (VI laktacja), co okazało się wynikiem statystycznie wysoko istotnym. Nie potwierdzono istotności pozostałych efektów, tj: efektu addytywnego i dominacyjnego *microRNA2467* czy pozostałych efektów interakcji w tej grupie.

Wobec powyższego, stwierdzono, że efekt addytywny i dominacyjny allelu C genu *microRNA2313* i allelu T genu *microRNA2467*, a także efekty interakcji typu *dd* we wszystkich klasach przedstawiały się podobnie i związane były w większości przypadków z niższą SCC od wartości średniej. Należy jednak zauważyć, że w laktacji IV i VI, gdzie stwierdzono statystycznie istotne i statystycznie wysoko istotne wyniki, efekt addytywny allelu C genu *microRNA2313*, a także addytywno-addytywny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467* (IV laktacja) oraz addytywno-dominacyjny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467* (VI laktacja) związane były z wyższą SCC od wartości średniej laktacji.

Efekty *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od kolejnej laktacji prezentuje wykres 11. (aneks tab. 6A). Dane przedstawione na wykresie pokazują w I laktacji statystycznie wysoko istotny dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467*. Procentowa zawartość białka w mleku była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o 0,04%. Pozostałe efekty, tj: efekt addytywny i dominacyjny *microRNA2467* i *microRNA2313* oraz efekty interakcji okazały się nieistotne statystycznie.

Statystycznie wysoko istotny addytywny efekt allelu T genu *microRNA2467* stwierdzono także w II laktacji. Procentowa zawartość białka w mleku była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o 0,0693%. Dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* związany był z mniejszą procentową zawartością białka w mleku o 0,0694% w porównaniu z wartością średnią w tej grupie (II laktacja), co okazało się istotne statystycznie. Pozostałe efekty, tj: efekt addytywny i dominacyjny *microRNA2313*, a także efekty interakcji w grupie II laktacji okazały się nieistotne statystycznie.

Wykres 10. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do lnSCC w zależności od kolejnej laktacji

Efekty zaznaczone pojedynczą gwiazdką są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast podwójną gwiazdką na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne na podstawie tabeli 5A.

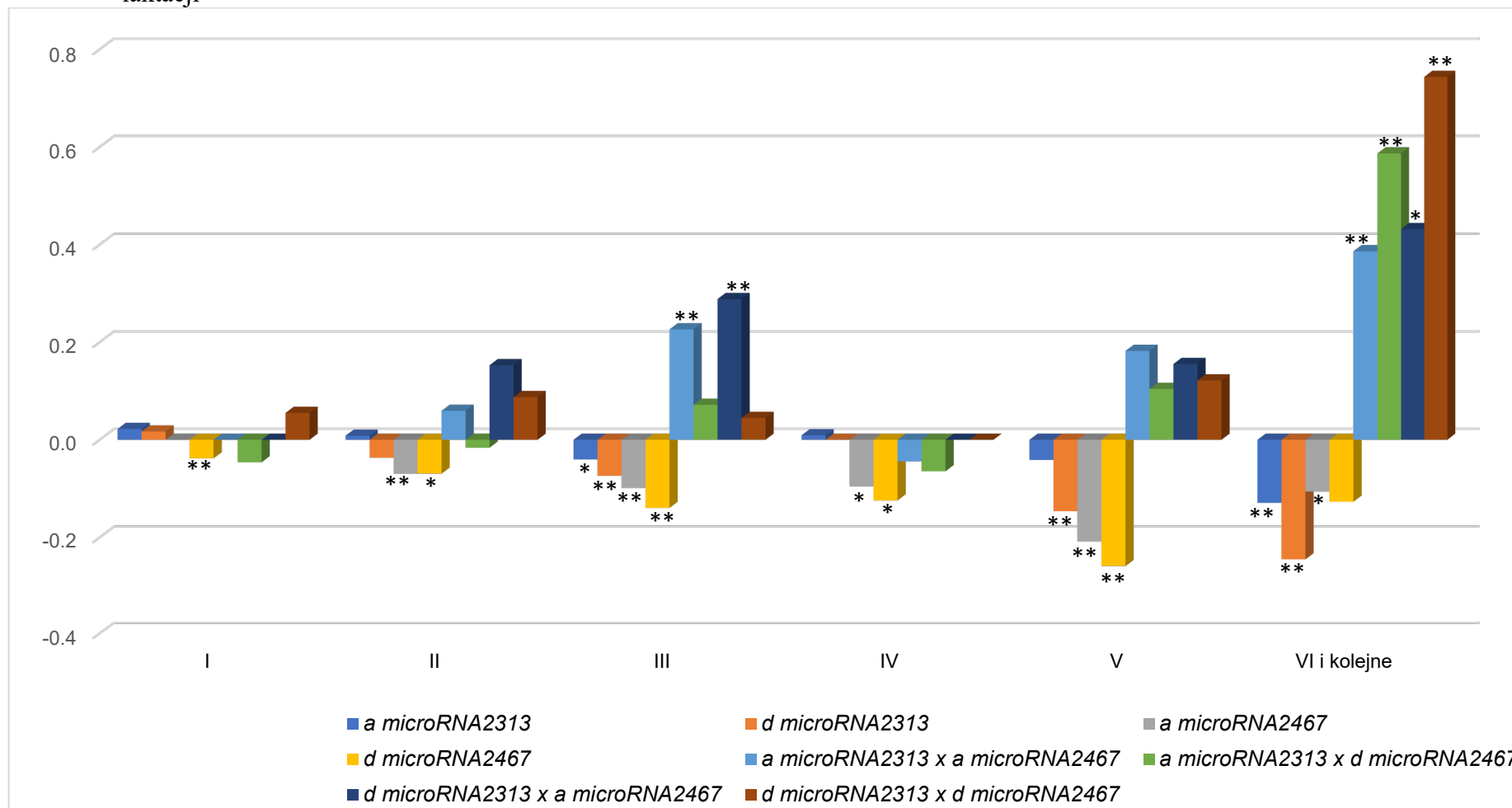
W III laktacji stwierdzono istotny statystycznie addytywny efekt allelu C genu *microRNA2313*. Procentowa zawartość białka w mleku była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o 0,04%. Dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313*, a także addytywny i dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* związane były z mniejszą procentową zawartością białka w mleku o odpowiednio 0,07%, 0,099% i 0,14% w porównaniu z wartością średnią w tej grupie (III laktacja), co okazało się statystycznie wysoko istotnymi wynikami. W tej samej grupie statystycznie wysoko istotne okazały się również addytywno-addytywny i dominacyjno-addytywny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467*, co związane było z wyższą procentową zawartością białka w mleku o odpowiednio 0,23% i 0,29% w porównaniu z wartością średnią. Efekty epistatyczne w grupie III laktacji okazały się nieistotne statystycznie.

Istotny statystycznie addytywny i dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* stwierdzono w IV laktacji. Procentowa zawartość białka w mleku była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o odpowiednio 0,096% i 0,12%. Pozostałe efekty, tj. efekt addytywny *microRNA2313* i efekty interakcji w tej grupie okazały się nieistotne statystycznie.

Statystycznie wysoko istotne efekty: dominacyjny allelu C genu *microRNA2313*, addytywny allelu T genu *microRNA246* oraz dominacyjny allelu T genu *microRNA246* stwierdzono w V laktacji. Procentowa zawartość białka w mleku była w tych przypadkach mniejsza od wartości średniej o odpowiednio 0,15%, 0,21% i 0,26%. W tej samej grupie pozostałe efekty, tj. efekt addytywny *microRNA2313* oraz efekty interakcji okazały się nieistotne statystycznie.

Z kolei statystycznie wysoko istotne efekty addytywny i dominacyjny allelu C genu *microRNA2313* (wykres 11.) oraz istotny statystycznie addytywny efekt allelu T genu *microRNA2467* stwierdzono w VI laktacji. Procentowa zawartość białka w mleku była w tych przypadkach mniejsza od wartości średniej o odpowiednio 0,13%, 0,25% i 0,11%. W tej samej grupie statystycznie wysoko istotne okazały się również addytywno-addytywny i addytywno-dominacyjny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467*, a także dominacyjno-dominacyjny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467*, co skorelowane było z wyższą procentową zawartością białka w mleku o odpowiednio 0,39%, 0,59% i 0,74% w porównaniu z wartością średnią. Statystycznie istotny dominacyjno-addytywny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467* także związany był z wyższą procentową zawartością białka w mleku o 0,43% w porównaniu z wartością średnią. Dominacyjny efekt *microRNA2467* w tej grupie okazał się nieistotny statystycznie.

Wykres 11. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od kolejnej laktacji



Efekty zaznaczone pojedynczą gwiazdką są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast podwójną gwiazdką na poziomie $P \leq 0,01$.

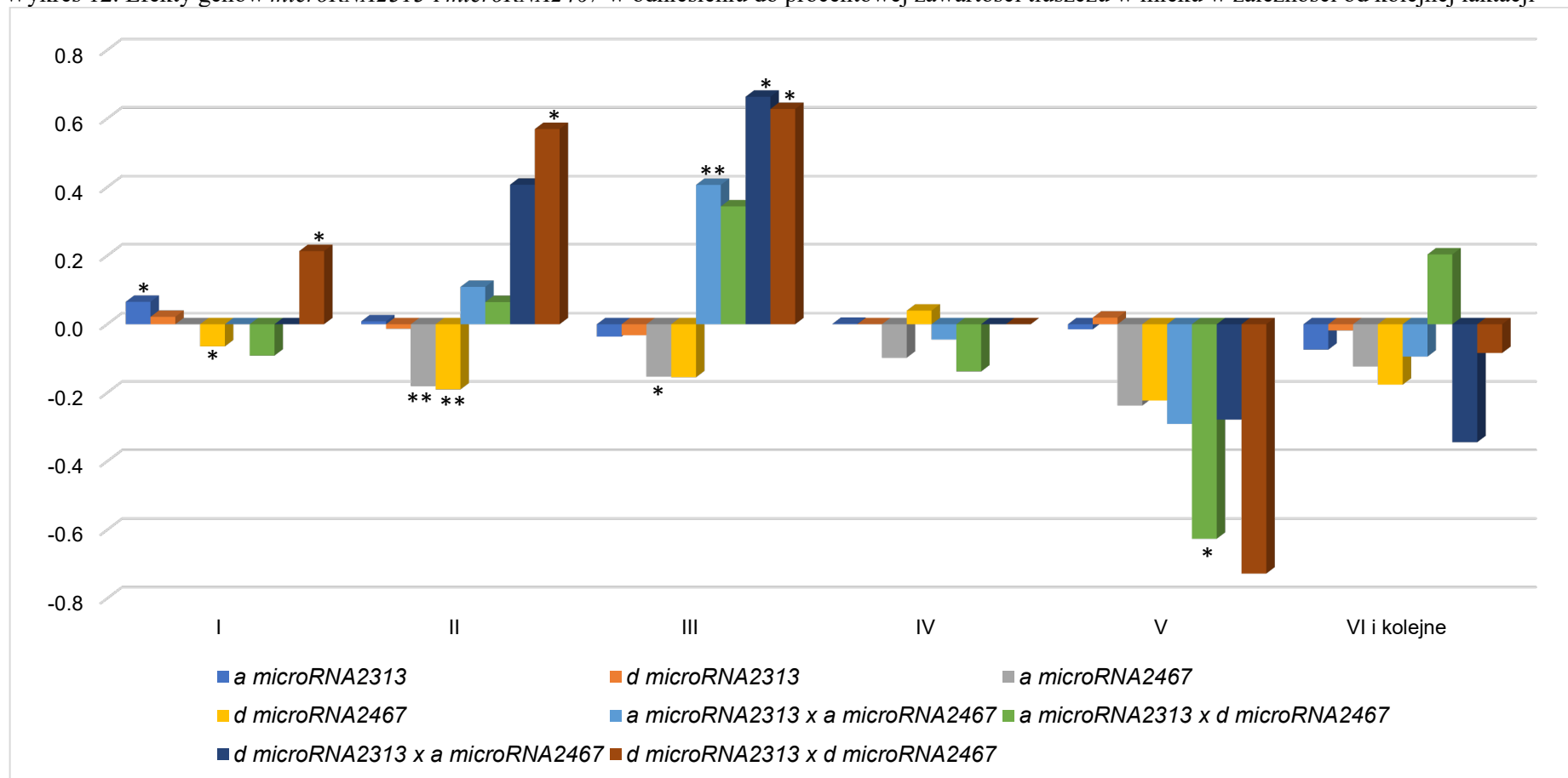
Źródło: opracowanie własne na podstawie tabeli 6A.

Powyższe wyniki (wykres 11.) świadczą o tym, że we wszystkich laktacjach, oprócz czwartej, tendencja związana z wyższą zawartością białka w mleku była zbliżona w przypadku interakcji dominacyjnych alleli obu badanych genów *microRNA*. Natomiast efekt allelu T genu *microRNA2467* i allelu C genu *microRNA2313* związane były częściej z niższą procentową zawartością białka w mleku w porównaniu z wartością średnią tej cechy w badanym stadzie, co można było zaobserwować we wszystkich laktacjach. Wyniki analizy danych przedstawionych na wykresie 11. dowodzą, że współdziałanie epistatyczne obu genów bardzo korzystnie przekłada się na zawartość białka w mleku, która jest zauważalnie wyższa niż w przypadku pojedynczego działania badanych genów.

Na wykresie 12. (aneks tab. 7A.) przedstawiono efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od kolejnej laktacji. Istotny statystycznie okazał się, stwierdzony w I laktacji, addytywny efekt allelu C genu *microRNA2313* - procentowa zawartość tłuszczu w mleku była większa od wartości średniej o 0,07%. W I laktacji zaobserwowano także istotny statystycznie dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* i był on związany z mniejszą procentową zawartością tłuszczu w mleku o 0,06%. W tej samej grupie istotny statystycznie okazał się tylko jeszcze dominacyjno-dominacyjny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467* związany z wyższą procentową zawartością tłuszczu o 0,21% od wartości średniej. Pozostałe efekty, tj: efekt dominacyjny *microRNA2313* i addytywny *microRNA2467*, a także pozostałe efekty interakcji w tej grupie okazały się nieistotne statystycznie.

Statystycznie wysoko istotny addytywny i dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* (wykres 12.) odnotowano w laktacji II. Procentowa zawartość tłuszczu w mleku była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o odpowiednio 0,18% i 0,19%. W tej samej grupie istotny statystycznie okazał się tylko jeszcze dominacyjno-dominacyjny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467* związany z wyższą procentową zawartością tłuszczu o 0,57% od wartości średniej. Pozostałe efekty, tj: efekt addytywny i dominacyjny *microRNA2313* i pozostałe efekty interakcji w tej grupie okazały się nieistotne statystycznie.

Wykres 12. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od kolejnej laktacji



Efekty zaznaczone pojedynczą gwiazdką są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast podwójną gwiazdką na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne na podstawie tabeli 7A.

Otrzymane wyniki badań wykazały istotny statystycznie addytywny efekt allelu T genu *microRNA2467* w III laktacji – procentowa zawartość tłuszczu w mleku była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o 0,15%. W tej samej grupie wysoko istotny statystycznie okazał się addytywno-addytywny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467* związany z wyższą procentową zawartością tłuszczu o 0,41% od wartości średniej. Dominacyjno-addytywny i dominacyjno-dominacyjny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467* także skorelowane były z wyższą procentową zawartością tłuszczu o odpowiednio o 0,664% i 0,628% (w porównaniu z wartością średnią), co okazało się istotne statystycznie. Nie potwierdzono istotności pozostałych efektów, tj: efekt addytywnego i dominacyjnego *microRNA2313* oraz efektów epistatycznych w tej grupie (laktacja III).

W IV laktacji nie stwierdzono statystycznie istotnych efektów, w przeciwieństwie do laktacji V, gdzie stwierdzono istotny statystycznie addytywny efekt allelu T genu *microRNA2467*. Procentowa zawartość tłuszczu w mleku była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o 0,15%. Pozostałe efekty addytywne i dominacyjne oraz efekty epistatyczne w tej grupie okazały się nieistotne statystycznie. W VI laktacji, podobnie jak w IV, nie stwierdzono statystycznie istotnych efektów.

Reasumując, wyniki badań przedstawione na wykresie 12. świadczą o istnieniu interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467*, co wiąże się z korzystnie większą zawartością tłuszczu w mleku w porównaniu z wartością średnią w laktacji I, II i III. Odwrotną tendencję, czyli mniejszą zawartość tłuszczu w mleku u zwierząt homozygotycznych pod względem allelu C i heterozygotycznych pod względem allelu T, można zaobserwować w laktacjach: IV, V, VI i kolejnych. We wszystkich laktacjach efekty addytywne i dominacyjne allelu C genu *microRNA2313* i allelu T genu *microRNA2467* były związane z niższą zawartością tłuszczu, z wyłączeniem laktacji I, gdzie istotny statystycznie addytywny efekt allelu C genu *microRNA2313* był związany z większą od średniej zawartością tłuszczu w mleku. Tendencja, związana z niekorzystnie niższą zawartością tłuszczu w mleku w przypadku pojedynczego działania badanych genów jak i epistatycznych interakcji między nimi, była wyraźnie zauważalna od IV laktacji.

Wykres 13. (aneks tab. 8A.) przedstawia efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej w zależności od kolejnej laktacji. Istotny statystycznie dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313* stwierdzono w laktacji I. Dobowa wydajność mleczna była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o 0,95 kg. W tej samej grupie istotny statystycznie okazał się również dominacyjno-

dominacyjny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467*, związany z mniejszą dobową wydajnością mleczną o 2,25 kg od wartości średniej. Ponadto zauważono, że efekt dominacyjny allelu T genu *microRNA2467* związany był z wyższą dobową wydajnością mleczną o 0,98 kg od wartości średniej, co było wynikiem statystycznie wysoko istotnym. Pozostałe efekty, tj: efekt addytywny allelu C genu *microRNA2313* i allelu T genu *microRNA2467* oraz efekty interakcji w tej grupie okazały się nieistotne statystycznie.

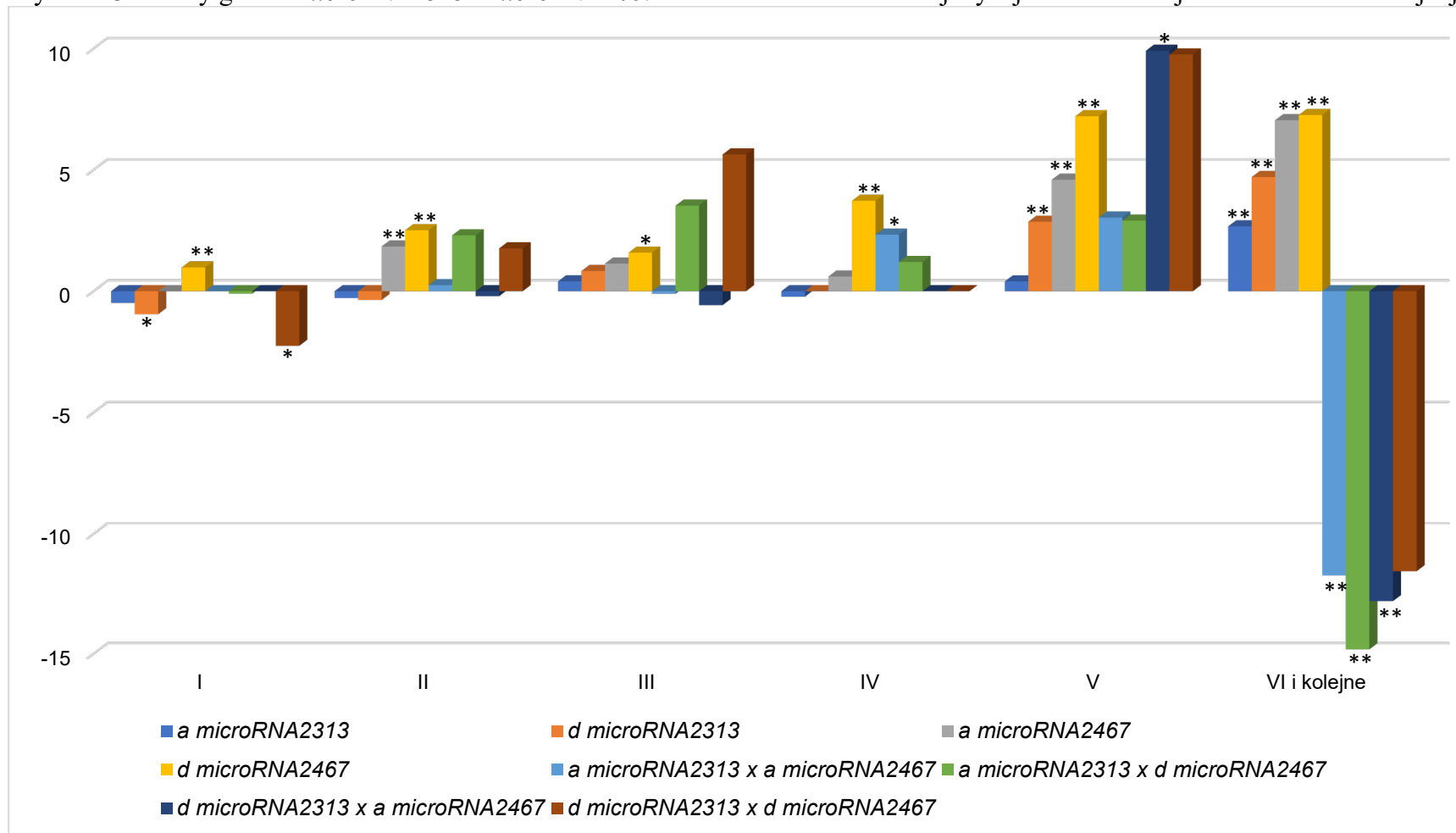
Statystycznie wysoko istotny addytywny i dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* stwierdzono w II laktacji. Dobowa wydajność mleczna była w tym przypadku większa od wartości średniej o odpowiednio 1,84 kg i 2,51 kg. W tej samej grupie pozostałe efekty, tj: efekt addytywny i dominacyjny *microRNA2313* i interakcje okazały się nieistotne statystycznie. Istotny statystycznie dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* stwierdzono w III laktacji. Dobowa wydajność mleczna była w tym przypadku większa od wartości średniej o 1,59 kg. Istotności pozostałych efektów nie stwierdzono.

W IV laktacji odnotowano wysoko istotny statystycznie dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467*. Dobowa wydajność mleczna była w tym przypadku większa od wartości średniej o 3,73 kg. Stwierdzono także, że addytywno-addytywny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467* związany był z wyższą dobową wydajnością mleczną o 2,33 kg (w porównaniu z wartością średnią tej grupy). Pozostałe efekty, czyli: efekt addytywny i dominacyjny *microRN2313*, addytywny *microRNA2467*, a także efekty epistatyczne okazały się nieistotne statystycznie w tej grupie.

Statystycznie wysoko istotny dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313* stwierdzono w V laktacji. Dobowa wydajność mleczna była w tym przypadku większa od wartości średniej o 2,86 kg. Addytywny i dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* związany był z wyższą dobową wydajnością mleczną o odpowiednio 4,59 kg i 7,21 kg w porównaniu z wartością średnią w tej grupie (V laktacja), co okazało się wynikami statystycznie wysoko istotnymi.

W tej samej grupie istotny statystycznie okazał się tylko jeszcze dominacyjno-addytywny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467*, także skorelowany z wyższą dobową wydajnością mleczną o 9,91 kg od wartości średniej. Pozostałe efekty, tj.: efekt addytywny *microRNA2313* oraz pozostałe efekty interakcji w tej grupie okazały się nieistotne statystycznie.

Statystycznie wysoko istotny addytywny i dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313* stwierdzono w VI laktacji (wykres 13.).

Wykres 13. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej w zależności od kolejnej laktacji

Efekty zaznaczone pojedynczą gwiazdką są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast podwójną gwiazdką na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne na podstawie tabeli 8A.

Dobowa wydajność mleczna była w tym przypadku większa od wartości średniej o odpowiednio 2,67 kg i 4,7 kg. Zauważono też, że addytywny i dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* związany był z większą dobową wydajnością mleczną o odpowiednio 7,05 kg i 7,26 kg w porównaniu z wartością średnią w tej grupie (VI laktacja), co okazało się wynikami statystycznie istotnymi. W tej samej grupie wysoko istotne statystycznie były addytywno-addytywny i addytywno-dominacyjny efekty interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467*, a także dominacyjno-addytywny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA246*. Wszystkie związane były z niższą dobową wydajnością mleczną o odpowiednio 11,72 kg, 14,82 kg i 12,79 kg od wartości średniej. Efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA246* w tej grupie okazał się nieistotny statystycznie.

Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje (wykres 13.) stwierdzono, że zwierzęta o heterozygotycznym genotypie CT charakteryzowały się we wszystkich laktacjach większą dobową wydajnością mleczną. Podobnie, z wyjątkiem laktacji I, było w przypadku efektu addytywnego allelu T genu *microRNA2467*. Efekt dominacyjny allelu C genu *microRNA2313* w laktacji III, V, VI i kolejnych związany był z wyższą dobową wydajnością mleczną, podczas gdy w I i II laktacji ten sam efekt związany był z niższą wydajnością mleczną.

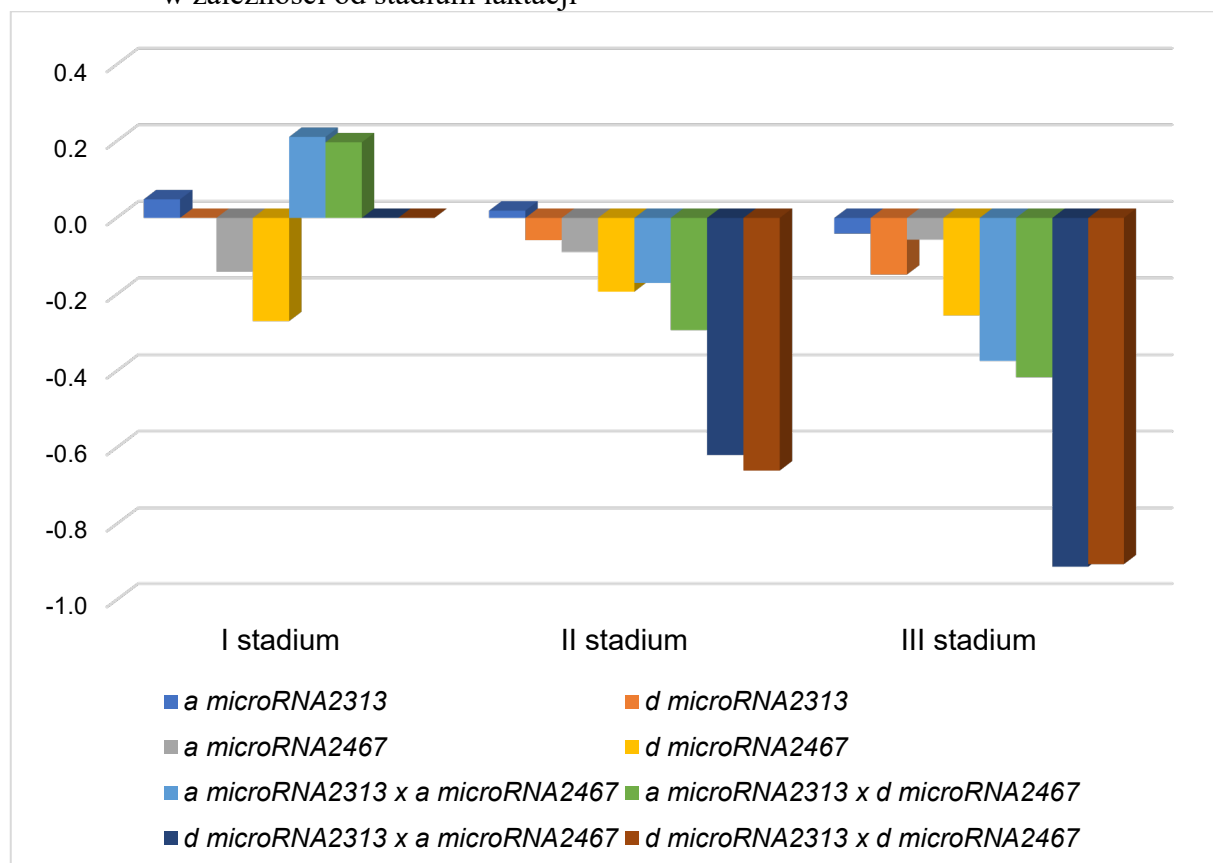
Addytywno-addytywny i addytywno-dominacyjny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467* związany był z niższą wydajnością mleczną tylko w laktacji VI. Wartość dominacyjno-addytywnej interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467*, której istotność potwierdzono w V laktacji, związana była z wyższą wydajnością mleczną od wartości średniej, a w laktacji VI z niższą.

U zwierząt podwójnie heterozygotycznych zauważono niższą wydajnością mleczną tylko w laktacjach I, VI i kolejnych. Bardzo interesujący jest przypadek VI laktacji, gdzie zauważono, że współdziałanie epistatyczne obu genów związane jest ze zdecydowanie niższą dobową wydajnością mleczną niż w przypadku wcześniejszych laktacji. Tu najbardziej widoczna jest zależność efektów genów od czynnika środowiskowego, jakim jest kolejna laktacja.

4.5. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w zależności od stadium laktacji

Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do lnSCC w zależności od stadium laktacji zilustrowano na wykresie 14. (aneks tab. 9A.). W próbkach mleka z I, II i III stadium laktacji nie stwierdzono statystycznie istotnych efektów.

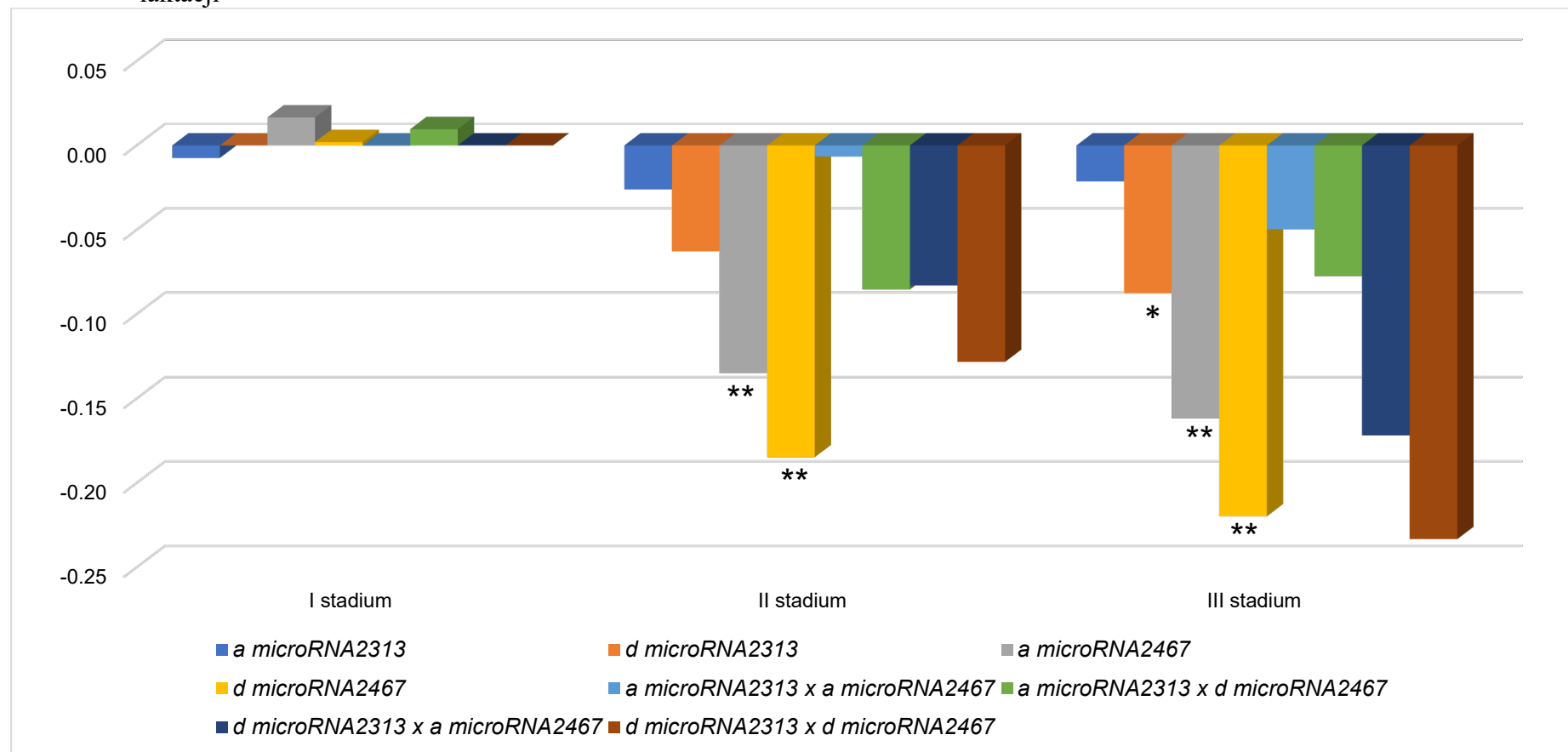
Wykres 14. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do lnSCC w zależności od stadium laktacji



Źródło: opracowanie własne na podstawie tabeli 9A.

Na wykresie 15. (aneks tab. 10A.) zaprezentowano efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od stadium laktacji. W próbkach mleka z I stadium laktacji nie stwierdzono statystycznie istotnych efektów. Statystycznie wysoko istotny addytywny i dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* stwierdzono natomiast w próbkach mleka z II stadium laktacji. Procentowa zawartość białka była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o odpowiednio 0,14% i 0,18%. Pozostałe efekty, tj. efekt addytywny i dominacyjny *microRNA2313* oraz efekty interakcji w tej grupie okazały się nieistotne statystycznie.

Wykres 15. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od stadium laktacji



Efekty zaznaczone pojedynczą gwiazdką są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast podwójną gwiazdką na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne na podstawie tabeli 10A.

W III stadium laktacji stwierdzono istotny statystycznie dominacyjny efekt allelu C genu *microRNA2313*. Procentowa zawartość białka w mleku była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o 0,09%. Zauważono także, że addytywny i dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* (wykres 15.) związany był z mniejszą procentową zawartością białka o odpowiednio 0,16% i 0,22% w porównaniu z wartością średnią w tej grupie (III stadium laktacji), co okazało się wynikiem statystycznie wysoko istotnym. Pozostałe efekty, tj: efekt addytywny *microRNA2313* i efekty epistatyczne okazały się nieistotne statystycznie.

Uwzględniając powyższe wyniki stwierdzono, że efekt addytywny allelu C genu *microRNA2313* w każdym stadium laktacji związany był z niższą zawartością białka w mleku. Pozostałe efekty badanych genów *microRNA* w stadiach II i III związane były z mniejszą procentową zawartością białka w mleku, w przeciwieństwie do stadium I, gdzie te same efekty badanych genów *microRNA* związane były z wyższą zawartością białka lub nie miały z nią związku. Przedstawione na wykresie 15. wyniki badań świadczą o istnieniu interakcji genotyp – środowisko, co przejawia się w o wiele niższej zawartości białka w mleku w stadium II i III w porównaniu ze stadium I.

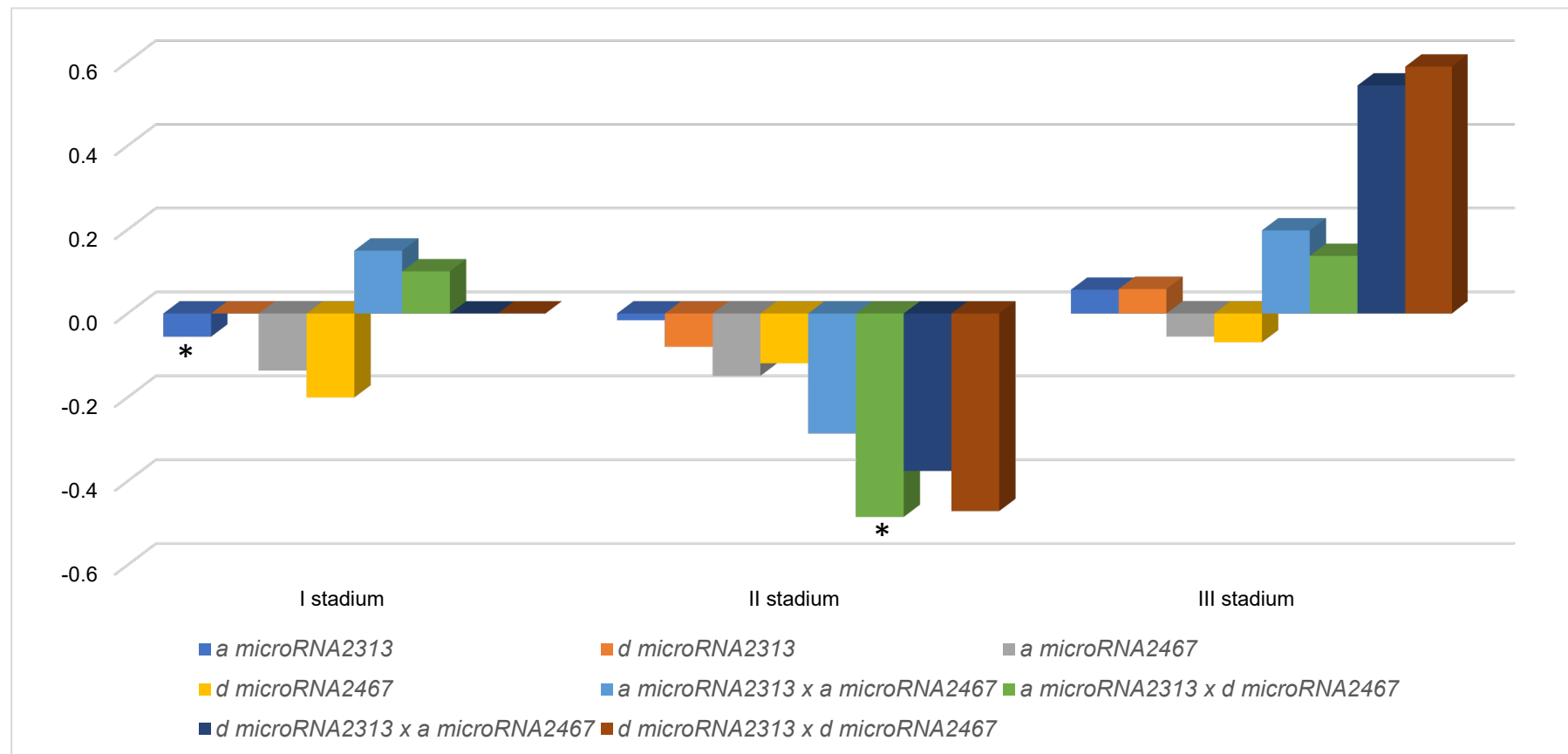
Na wykresie 16. (aneks tab. 11A.) przedstawiono efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od stadium laktacji. Istotny statystycznie addytywny efekt allelu C genu *microRNA2313* stwierdzono w I stadium laktacji. Procentowa zawartość białka w mleku była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o 0,06%. Pozostałe efekty, tj: efekt addytywny *microRNA2467* oraz efekty interakcji w tej grupie okazały się nieistotne statystycznie.

W II stadium laktacji istotny statystycznie okazał się addytywno – dominacyjny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467*. Procentowa zawartość tłuszczu w mleku była w tym przypadku mniejsza od wartości średniej o 0,49%. Pozostałe efekty, tj: efekt addytywny i dominacyjny *microRNA2313* i *microRNA2467*, a także efekty epistatyczne okazały się nieistotne statystycznie.

W III stadium laktacji nie stwierdzono statystycznie istotnych efektów addytywnych i dominacyjnych i efektów interakcji.

Podsumowując powyższe wyniki stwierdzono, że efekty w stadium II laktacji różniły się od pozostałych stadiów. W II stadium zwierzęta homozygotyczne pod względem allelu C i heterozygotyczne w locus *microRNA2467* odznaczały się mniejszą koncentracją tłuszczu w mleku w porównaniu z pozostałymi zwierzętami, co zostało potwierdzone statystycznie.

Wykres 16. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od stadium laktacji



Efekty zaznaczone pojedynczą gwiazdką są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast podwójną gwiazdką na poziomie $P \leq 0,01$

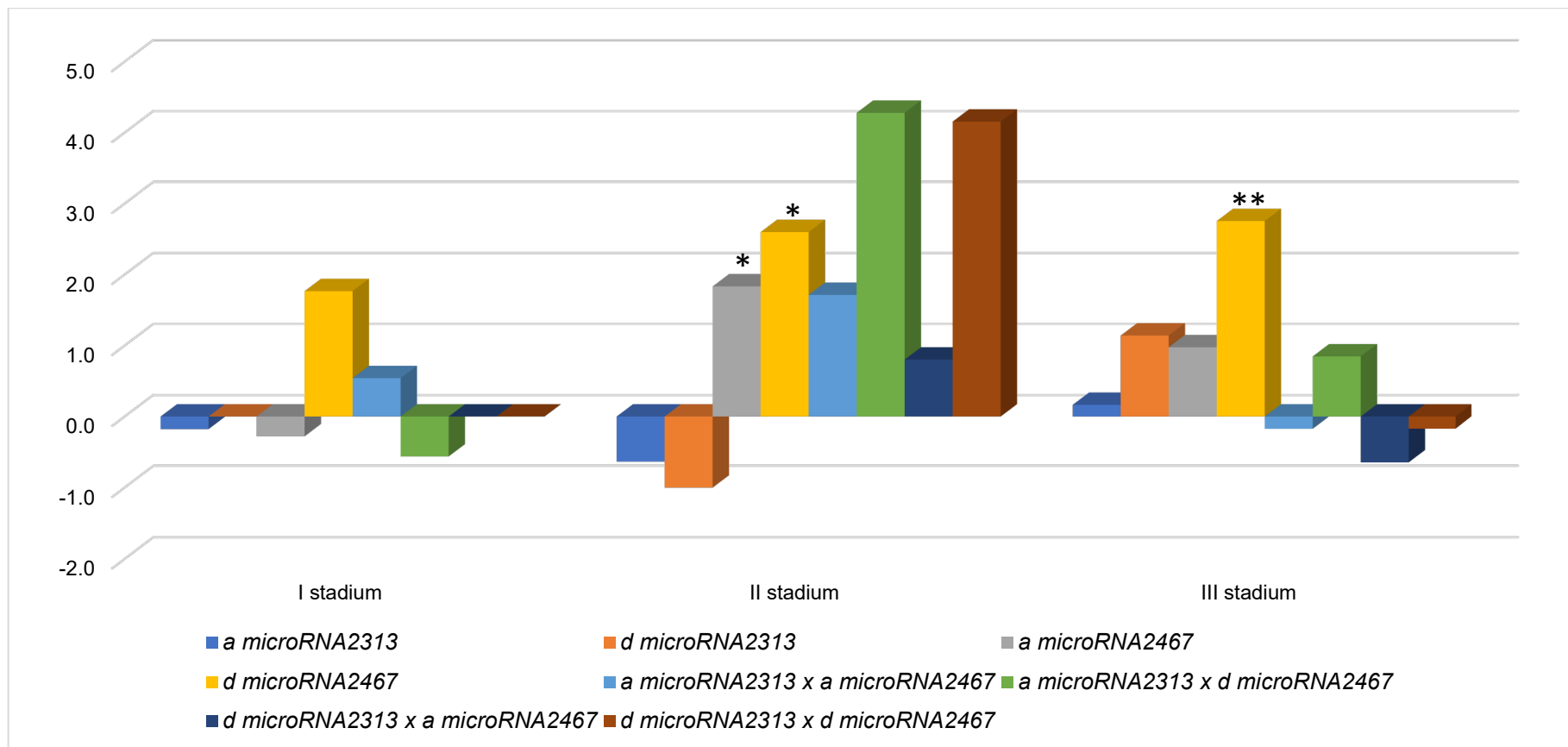
Źródło: opracowanie własne na podstawie tabeli 11A.

Na wykresie 17. (aneks tab. 12A.) zaprezentowane zostały efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej w zależności od stadium laktacji. W I stadium laktacji nie stwierdzono statystycznie istotnych efektów i efektów interakcji, natomiast już w II stadium stwierdzono, że addytywny i dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* związany był z większą dobową wydajnością mleczną o odpowiednio 1,83 kg i 2,6 kg w porównaniu z wartością średnią w tej grupie, co okazało się wynikiem statystycznie istotnym. Pozostałe efekty, tj. efekt addytywny i dominacyjny *microRNA2313* i efekty interakcji okazały się nieistotne statystycznie.

Statystycznie wysoko istotny dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* stwierdzono w III stadium laktacji. Dobowa wydajność mleczna była w tym przypadku większa od wartości średniej o 2,75 kg. Nie potwierdzono istotności pozostałych efektów, tj. addytywnego allelu C *microRNA2313* i allelu T *microRNA2467*, a także efektów epistatycznych w tej grupie.

Analiza danych przedstawionych na wykresie 17. wykazała, że zwierzęta posiadające allel T *microRNA2467* w II stadium charakteryzowały się większą wydajnością mleczną w porównaniu z pozostałymi zwierzętami. Ustalono także, że allel T był dominujący w stosunku do allelu C. Zaobserwowano wręcz efekt heterozji. Efekt ten był istotny także w II stadium.

Wykres 17. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej w zależności od stadium laktacji



Efekty zaznaczone pojedynczą gwiazdką są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast podwójną gwiazdką na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne na podstawie tabeli 12A.

5. DYSKUSJA

5.1. Zaangażowanie microRNA w procesy odpornościowe

W niniejszej pracy wykazano istotny związek pomiędzy genetycznymi wariantami wybranych genów *microRNA2313* oraz *microRNA2467* a odpornością na *mastitis* u krów mlecznych.

Znaczna część postępu naszej wiedzy na temat procesów komórkowych modulowanych przez microRNA koncentruje się na procesach rozwojowych. Stopniowo jednak odkrywana jest rola microRNA w odpowiedzi immunologicznej (Gantier i in., 2007). Uważa się, że odporność wrodzona zapewnia początkową obronę przed infekcjami wywołanymi przez wirusy, bakterie, grzyby, a także pierwotniaki. Pierwsza komórkowa linia obrony, czyli receptory rozpoznających wzorce PRR (ang. *Pattern Recognition Receptors*), jest odpowiedzialna za wykrycie molekularnych wzorców atakujących patogenów. Proces ten jest niezbędny do aktywacji kaskad sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, które prowadzą do transkrypcyjnej ekspresji mediatorów zapalnych w celu koordynowania eliminacji patogenów i zainfekowanych komórek. Aby utrzymać równowagę pomiędzy ochronną odpornością a stanem zapalnym po infekcji, wrodzone szlaki sygnałowe gospodarza muszą być ściśle regulowane. Regulacja ta odbywa się dzięki silnym modulatorom działającym na poziomie potranskrypcyjnym, czyli cząsteczkom microRNA (Zhang i Li, 2013).

Istnieją bezpośrednie dowody na związek między odpowiedzią immunologiczną ssaków a cząsteczkami microRNA. Znaczenie microRNA w odporności komórkowej podkreślają badania Muljo i in. (2005) na myszach z warunkowym nokautem enzymu Dicer, które mają niedobory komórek T. Dicer to enzym podobny do RNazy III, który jest niezbędny w biogenezie kilkunastu nukleotydowych odcinków microRNA. Muljo i in. (2005) zauważyli, że niedobór enzymu Dicer jest niekorzystny dla obwodowych limfocytów T CD4⁺ i może odpowiadać za ich, w przybliżeniu dwukrotną, redukcję w śledzionie, węzłach chłonnych i krwi.

Badacze sugerują także, że zmniejszona ekspresja enzymu Dicer zaburza produkcję i/lub przeżycie prekursorów limfocytów T takich jak tymocytów CD8 SP (Sordillo i in., 2005). Ponadto wykazano w badaniach Li i in. (2012b), że *microRNA4661* może bezpośrednio tłumić ekspresję IFN- α w zainfekowanych wirusami makrofagach i komórkach dendrytycznych oraz hamować wrodzoną przeciwwirusową odpowiedź immunologiczną gospodarza. Podobne

wyniki uzyskali Witwer i in. (2010) zauważając, że *microRNA26a*, *microRNA34a*, *microRNA145* oraz *let-7b* regulują ekspresję IFN- β w komórkach ludzkich i makaków, a w związku z tym wpływają na odporność wrodzoną gospodarza od najwcześniejszych odpowiedzi do stadium infekcji wirusowej. Co ciekawe, wykazano również, że sygnalizacja IFN- β zwiększa ekspresję trzech z czterech wspomnianych wyżej *microRNA*: *-26a*, *-34a* i *let b*, co wskazuje na potencjalną pętlę ujemnego sprzężenia zwrotnego w celu buforowania produkcji IFN- β (Witwer i in., 2010).

Badania Li (2012b) i Witwera (2010) oraz ich współpracowników wykazują ważną, i wielokrotnie poruszaną w publikacjach, rolę cząsteczek *microRNA* w regulacji produkcji interferonu. Może ona być wykorzystana bezpośrednio poprzez celowanie w transkrypcję interferonu lub pośrednio poprzez subtelne manipulacje natężeniem i czasem trwania poprzedzających szlaków sygnałowych receptorów rozpoznających wzorce PRR (Forster i in., 2015). Taganov i in. (2006) podjęli się sprawdzenia potencjalnego udziału *microRNA* w regulacji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej analizując ekspresję 200 cząsteczek *microRNA* po ekspozycji komórek linii THP-1 (ludzka linia komórek monocytowych białaczki) na lipopolisacharyd (LPS). Naukowcy zauważyli, że dla kilku *microRNA*, *-146a/b*, *-132* i *-155*, indukowana jest wtedy produkcja dojrzałych form cząsteczek.

Badacze przyjrzeni się głównie *microRNA146a/b*. Ustalili, że wzrost ekspresji *microRNA146a/b*, w którym pośredniczy LPS, jest zależny od NF- κ B, czyli kompleksu białkowego biorącego udział w odpowiedzi komórki na bodźce. Zidentyfikowali również geny *IRAK1* i *TRAF6* jako geny docelowe hamowania potranslacyjnego przez *microRNA146a/b*, co według badaczy sugeruje nowy mechanizm regulacji negatywnego sprzężenia zwrotnego sygnalizacji receptorów TLR i cytokin (Taganov i in., 2006). Badania Taganova opierały się na mikromacierzach zawierających *microRNA*, które zostały zidentyfikowane już wcześniej, poza kontekstem odpowiedzi immunologicznej. Przewiduje się, że wiele *microRNA* jest indukowanych podczas specyficznych odpowiedzi immunologicznych, zatem strategie wykorzystujące obecne mikromacierze *microRNA* nie odzwierciedlają zakresu *microRNA* rzeczywiście indukowanych podczas odpowiedzi immunologicznej. Stąd zrozumienie immunomodulacyjnego działania *microRNA* wymaga coraz większej ilości kompleksowych badań (Gantier i in., 2007).

Hu i in. (2022) również badali zachowanie *microRNA155* podczas ekspozycji na LPS dojrzewających ludzkich komórek dendrytycznych pochodzących z monocytów. Zauważyli oni, że ilość *microRNA155* wzrasta, a także bezpośrednio celuje w mRNA czynnika transkrypcyjnego PU.1. Ta sama cząsteczka *microRNA* została poddana analizie przez

Tanga i wsp. (2010). Badacze zidentyfikowali gen *MyD88*, kodujący białko adaptorowe (ang. *Myeloid differentiation primary response protein 88*), jako docelowy dla microRNA155. Badacze odkryli, że microRNA155 zmniejszył ekspresję *MyD88* na poziomie białka, ale nie na poziomie mRNA, co sugeruje, że hamowanie aktywności *MyD88* odbywa się na poziomie potranskrypcyjnym. Ponadto w badaniu zauważono, że podczas zakażenia *Helicobacter pylori*, nadekspresja microRNA155 prowadziła do znacznego zmniejszenia poziomu Interleukiny-8. Wykazano w ten sposób, że microRNA155 może regulować stanem zapalnym poprzez celowanie w kluczową cząsteczkę adaptorową *MyD88* w szlakach zapalnych (Tang i in., 2010).

MicroRNA155 jest szeroko opisywany w literaturze i wydaje się być jednym z ważniejszych przedstawicieli tych krótkich niekodujących cząsteczek RNA. *microRNA155* został też, bowiem przebadany przez Ceppi i in. (2009), którzy ustalili, że w odpowiedzi na działanie lipopolisacharydów na komórki dendrytyczne, ekspresja microRNA jest znacznie podwyższona. Zidentyfikowali oni, że szlak zapalny receptora Toll-podobnego i Interleukiny - 1 (TLR/IL-1) jest modulowany przez microRNA155. Autorzy uznali microRNA155 za czynnik odgrywający kluczową rolę w kontrolowaniu intensywności odpowiedzi zapalnej na drobnoustroje w ludzkich komórkach dendrytycznych (Ceppi i in., 2009).

Thulin i in. (2013) badali z kolei wpływ *microRNA9* na regulację ludzkiego genu *PPAR δ* . *PPAR δ* bierze udział w odpowiedzi zapalnej, a jego ekspresję indukują cytokiny. Badacze wykazali, że *PPAR δ* jest również regulowany na poziomie potranskrypcyjnym przez *microRNA9*. Zwiększenie ekspresji *microRNA9* powoduje bezpośrednie wyciszenie ekspresji *PPAR δ* (Thulin i in., 2013). W literaturze *microRNA9* wymieniany jest jako czynnik mający znaczenie w odpowiedzi immunologicznej (Bazzoni i in., 2009) i stresie pourazowym (Zhang i Li, 2013), w procesie różnicowania neuronów, w różnego rodzaju procesach nowotworowych (Nie i in., 2008, Ma i in., 2010) oraz w procesie egzocytozy insuliny z wysp trzustkowych (Plaisance i in., 2006). W swoich badaniach Thulin i in. (2013) wykazali dodatkową funkcję *microRNA9* polegającą na jego zwiększonej ekspresji w ludzkich monocytach po traktowaniu komórek LPS, podczas gdy malała ekspresja *PPAR δ* i jego docelowych genów takich jak *PLIN2*, *CPT1A* i *ANGPTL4*, których ekspresja malała w ciągu 4. do 8. godzin od momentu traktowania LPS (Thulin i in., 2013).

Chen wraz ze swoim zespołem badawczym (2014) sporządzili analizę różnic w ekspresji *microRNA* na szlaku NF- κ B między zdrowymi a chorymi na *mastitis* krowami rasy holsztyńskiej chińskiej. Naukowcy zauważyli, że liczba kopii badanych *microRNA* spada u osobników z zapaleniem wymienia, co może z kolei powodować aktywację szlaku NF- κ B u tychże osobników. U zdrowych osobników szlak ten był nieaktywny ze względu na większą

liczbę kopii *microRNA*. Badacze zauważyli ponadto, że ze względu na oczywiste różnice w ekspresji u osobników chorych i zdrowych, niektóre *microRNA*, zwłaszcza *microRNA16* i *microRNA223*, mogą być z powodzeniem wykorzystane jako prognostyczne markery zapalenia wymienia u krów.

Podobnych markerów szukali w swojej pracy badawczej Li i in. (2017), którzy badali ekspresję *microRNA144-5p* i *microRNA130b-5p* w zdrowych i zainfekowanych (zidentyfikowanych z *mastitis*) tkankach gruczołu mlekowego u krów. Niższą ekspresję *microRNA144-5p* zaobserwowano w zainfekowanych tkankach gruczołu mlekowego w porównaniu z tkankami pochodzącymi od zdrowych zwierząt. Ekspresja tego *microRNA* była wyższa niż w innych tkankach, w tym w tkankach serca, wątroby, śledziony, płuc i nerek zdrowych krów. Ekspresja *microRNA130b-5p* była znacznie wyższa w zainfekowanych tkankach niż w tkankach nieobjętych *mastitis*. Tu również ekspresja tego *microRNA* była wyższa w tkankach gruczołu mlekowego niż w innych tkankach wyżej wymienionych. Odkrycia badaczy sugerują, że obie cząsteczki *microRNA* są silnie skorelowane z zapaleniem wymienia (Li i in., 2017).

W badaniach Zorc i Kunej (2015) wykazano, że *microRNA2313* jest jednym z najbardziej polimorficznych genów u bydła, a ponadto wytypowano go jako jedną z przyczyn mechanizmów regulacyjnych zapalenia wymienia (Li i in., 2015). Dlatego też Malovrh z zespołem (2018) postanowili przeprowadzić analizę powiązań *microRNA2313* z cechami wzrostu i tuszy w słowieńskiej rasie bydła Simmental (Malovrh i in., 2018). Prace Malovrh (2018) nie ujawniły żadnych związków polimorfizmów *microRNA2313* z cechami fenotypowymi, jednak badacze zauważają, że gen *microRNA2313* znajduje się w intronie 2 genu gospodarza *GRAMD1B*, który został wcześniej powiązany z cechami produkcji i reprodukcji u bydła (Höglund i in., 2015; Serão i in., 2013).

Także wyniki badań Barth'a i współpracowników (2008) dowiodły istnienia cząsteczek *microRNA* regulujących ekspresją wirusowych genów poprzez degradację ich transkryptów. Wyniki ich badań są zgodne z poglądem, że *microRNA-BART2* służy jako inhibitor replikacji wirusowego DNA poprzez degradację mRNA wirusowej polimerazy DNA BALF5. *microRNA-BART2* ulega ekspresji podczas utajonej fazy infekcji. Badacze stwierdzili, że *microRNA-BART2* służy do hamowania nieprawidłowo transkrybowanego mRNA BALF5, aby zapobiec przypadkowej replikacji wirusa (Barth i in., 2008).

5.2. Polimorfizm genów *microRNA* a odporność

Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP), najczęstsze mutacje w genomach ssaków, to wymiany pojedynczych zasad, które naturalnie występują w genomie (Sousa i in. 2021). SNP przyczyniają się do powstawania fenotypów związanych z różnymi chorobami, są także zaangażowane w regulację szerokiego zakresu procesów fizjologicznych i patologicznych, takich jak starzenie się komórek, apoptoza czy zapalenie i odpowiedź immunologiczna. Ostatnie badania sugerują, że SNP zlokalizowane w *microRNA* wpływają na różne aspekty chorób poprzez regulację ekspresji lub aktywności samych cząsteczek *microRNA* (Liu i in., 2017).

Wśród *microRNA* ze zmienioną predykcją dotyczącą wiązania z genem targetowym wyróżniamy *microRNA15a* i *-23a*, których geny targetowe zostały zidentyfikowane u bydła. Gen *CD163* jest jednym z genów targetowych dla *microRNA15a*. *microRNA15a*, wiążąc się z genem *CD163* i regulując jego ekspresję u bydła mlecznego, odgrywa ważną rolę w zwalczaniu zapalenia gruczołu mlekowego, (Ju i in., 2018a). Co ciekawe, badania Sousa i in. (2021) ujawniły, że SNP obecny w regionie „seed” (ang. *seed region*) genu *microRNA15a* zmienia jego wiązanie z genem *CD163*, co może wpływać na odpowiedź immunologiczną podczas infekcji (Sousa i in., 2021).

Innym przykładem badań skupiających się na badaniu polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w genach *microRNA* w powiązaniu z odpowiedzią na infekcje jest praca Ju i in. (2018b), którzy zbadali zmienność genu *NCF4* i jej wpływ na zapalenie wymienia u krów. Gen *NCF4* koduje białko, które pełni funkcję obrony gospodarza przed postępem infekcji bakteryjnej. Badania nad zmiennością genetyczną *NCF4* i jej związkiem z podatnością na zapalenie wymienia wykazały, że w obrębie genu istnieje funkcjonalny polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) w nieulegającym translacji regionie 3'UTR i jego docelowego *microRNA*. W regionie seed *microRNA2426* wiążącym się z regionem 3'UTR genu *NCF4* badacze wykryli polimorfizm w locus g.18475 A>G. Test lucyferazy wykonany przez badaczy wykazał, że właśnie ten polimorfizm wpływa na wiązanie genu *NCF4* i *microRNA2426*.

Wyniki analizy asocjacyjnej wykazały, że krowy z genotypem GG w locus g.18475 A>G miały relatywnie niższą wartość SCS (lnSCC) niż krowy z genotypem AA. Ponadto, wyniki ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) wykazały, że krowy z genotypem GG miały stosunkowo wyższą ekspresję mRNA genu *NCF4* w porównaniu z krowami z genotypem AA. Badanie wykazało, zatem, że ekspresja *NCF4* regulowana jest

przez mechanizm interakcji *microRNA*-mRNA oraz wskazało na ważną rolę genu *NCF4* w podatności na zapalenie wymienia (Ju i in., 2018b).

5.3. Związek *microRNA* z produkcją mleka, białka i tłuszczu

W niniejszej pracy wykazano związek polimorfizmu genów *microRNA2313* oraz *microRNA2467* z wydajnością mleczną oraz procentową zawartością tłuszczu i białka.

Gruczoł mlekowy u bydła to złożony narząd, który rośnie i rozwija się po wycieleniu i jest w stanie wyprodukować ponad 30 tysięcy kg mleka w pełnym cyklu laktacyjnym (Cui i in., 2020). Ze względu na swoje ważne funkcje, komórki gruczołu są wykorzystywane jako model do badania profilu ekspresji genów w celu identyfikacji tych najbardziej kluczowych, leżących u podstaw cech produkcji mleka u bydła mlecznego. W literaturze znaleźć można badania, wykazujące, że nieprawidłowa/odbiegająca od normy ekspresja *microRNA* w gruczołach mlekowych może mieć istotny wpływ na ich rozwój, a także na samą laktację.

Li i in. (2012c) zgłosili 283 znanych i 74 nowych *microRNA* w gruczole mlekowym u krów rasy holsztyńskiej, wśród których ekspresja aż 56. *microRNA* różniła się między krowami w okresie laktacji, a tymi nieprodukującymi mleka. W wyniku powyższych obserwacji uznano, że *microRNA* są zaangażowane w regulację laktacji (Li i in., 2012c).

Wang i in. (2014) podjęli się sprawdzenia jak wybrane przez nich geny *microRNA* wpływają na rozwój gruczołu mlekowego oraz samą laktację na poziomie potranskrypcyjnym u bydła mlecznego rasy holsztyńskiej. W badaniach stwierdzono, że ekspresja *microRNA152* różniła się w tkankach gruczołu mlekowego podczas różnych okresów laktacji przy użyciu technik sekwencjonowania małych RNA i qRT-PCR. Zbadano także związek pomiędzy metylotransferazą DNA1 (DNMT1), która jest genem targetowym *microRNA152* a poziomami ekspresji tej cząsteczki RNA. Zauważono, że metylotransferaza DNA1 była odwrotnie skorelowana z poziomami ekspresji *microRNA152* w gruczołach mlekowych u badanych krów. Komórki nabłonka gruczołu mlekowego wykorzystano jako modele komórkowe *in vitro* do badania funkcji *microRNA152*. Wymuszona ekspresja *microRNA152* w modelu komórkowym spowodowała znaczną redukcję metylotransferazy DNA1 zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. To z kolei doprowadziło do zmniejszenia globalnej metylacji DNA i zwiększyło ekspresję dwóch genów związanych z laktacją: *serynowo-treoninowej kinazy białkowej Akt* i *receptora gamma* aktywowowanego przez proliferatory peroksisomów (Ppar γ). Kontrastowo, hamowanie ekspresji *microRNA152* prowadziło do odwrotnych skutków. Przy

wykorzystaniu elektronicznego licznika Coulter i cytometru przepływowego, stwierdzono, że *microRNA152* wzmacnia żywotność i zdolność do powielania komórek nabłonkowych gruczołu mlekowego, co ostatecznie związane jest ze zwiększoną produkcją mleka (Wang i in., 2014).

Ponadto Le Guillou i in. (2012) stwierdzili, że nadekspresja *microRNA30b* powoduje swoisty defekt laktacji i opóźnioną involucję w gruczole mlekowym u myszy. Li i in. (2012a) zbadali z kolei rolę regulatorową genu *microRNA15a* u bydła mlecznego rasy holsztyńskiej. W badaniu ustalono, że genem docelowym dla *microRNA15a* jest gen receptora hormonu wzrostu (ang. *Growth Hormone receptor*, GHR) (Li i in., 2012a). Hormon wzrostu jest jednym z krytycznych regulatorów wzrostu i metabolizmu (Akers, 2006). Odgrywa także ważną rolę w gruczołach mlekowych wpływając nie tylko na ich rozwój, ale też na samą laktację (może wpływać na zwiększoną produkcję mleka u bydła), i skład mleka (Sakamoto i in., 2005). W badaniu Li i in. (2012a) ustalono, że ekspresja *GHR* regulowana jest przez *microRNA15a*, który obniża ekspresję genu receptora hormonu wzrostu, a także wpływa na obniżenie poziomu kazein w mleku.

Liczba i żywotność komórek gruczołu mlekowego związana jest z produkcją mleka, a więc zwiększona liczba komórek wymienia i zwiększona żywotność komórek przyczyniają się do wzmożonej laktacji. Li i in. (2012a), chcąc zbadać mechanizmy odpowiedzialne za zmiany w aktywności i liczbę komórek gruczołu mlekowego, przeanalizowali także wpływ *microRNA15a* na powyższe procesy i ustalili, że bydlęcy *microRNA15a* jest regulatorem promującym laktację w komórkach gruczołu mlekowego, a także może regulować ich żywotność.

Z kolei Tanaka i in. (2009) zidentyfikowali *microRNA101a* jako czynnik odgrywający ważną rolę w procesie rozwoju gruczołu mlekowego. Aby pokazać, że niektóre *microRNA* wykazują zmiany w swojej ekspresji podczas różnicowania komórek nabłonka gruczołu mlekowego myszy, zwanych HC11, do swojej analizy badacze wykorzystali mikromacierze *microRNA*. W tym samym czasie, w którym zachodzą zmiany w ekspresji badanego *microRNA*, komórki te nabywają fenotyp laktocytów, czyli komórek odpowiedzialnych za produkcję mleka. Podczas badania w szczególności zaobserwowano wzrost ekspresji *microRNA101a*, który następował podczas różnicowania i involucji w tkance gruczołu mlekowego, m.in. w komórkach HC11. Jedne z wyników badań ujawniły, że *microRNA101a* tłumiał ekspresję β -kazeiny, białka mleka i markera różnicowania komórek. Nadekspresja *microRNA101a* hamowała również proliferację komórek HC11, co mogło wpływać na stan zróżnicowania komórkowego gruczołu sutkowego.

Wang i Li (2007) także mieli swój udział w opisanie wpływu *microRNA* na rozwój gruczołu mlekowego u myszy. W celu zbadania profili ekspresji *microRNA* i ich funkcji w rozwoju gruczołu mlekowego w trakcie ciąży, a szczególnie w okresie przejścia z ciąży do laktacji, wykorzystano technikę mikromacierzy, a także qRT-PCR. Analiza wykazała, że każdy etap rozwojowy gruczołu mlekowego ma swój własny wzorzec ekspresji *microRNA*. W przypadku niektórych *microRNA* zauważono spadek ekspresji, tj. *microRNA138* czy *-431*, podczas gdy *microRNA133*, *-133a* i *-133b* wykazywały zwiększoną ekspresję podczas ciąży i laktacji. Wyniki te wyraźnie wskazują na funkcjonalne zaangażowanie cząsteczek *microRNA* w rozwój gruczołu mlekowego (Wang i Li, 2007).

Wykorzystując te same techniki badawcze, Cui wraz z zespołem (2011) doszli do bardzo podobnych wniosków podczas analizy ekspresji *microRNA126-3p*. Zauważyli oni różnice w poziomach ekspresji tego *microRNA* podczas rozwoju mysiego gruczołu mlekowego w trakcie trwania ciąży, a zwłaszcza przy przejściu z ciąży do laktacji. Wykorzystano metody bioinformatyczne w celu ustalenia genu docelowego *microRNA126-3p*. Stwierdzono, że receptor progesteronu w regionie 3'UTR jest bezpośrednim miejscem docelowym dla badanej cząsteczki *microRNA* oraz ustalono, że *microRNA126-3p* może hamować proliferację mysich komórek nabłonkowych gruczołu mlekowego, a także obniżać ekspresję białka kodowanego przez gen progesteronu. Wszystko to stanowiło podstawę do stwierdzenia, że *microRNA126-3p* może odgrywać ważną rolę w procesie rozwoju gruczołu mlekowego (Cui i in, 2011). Li i in. (2015) wykryli, że 77, spośród kilkuset badanych przez nich *microRNA*, miały różny profil ekspresji u krów z zapaleniem gruczołu mlekowego i krów zdrowych rasy holsztyńskiej.

Z kolei badania Lin i współbadaczy (2013) dostarczyły pierwszego dowodu na to, że ekspresja *microRNA* jest synergistycznie regulowana w gruczole mlekowym kozy, a także dowiodły biologicznej roli *microRNA* w syntezie tłuszczu w kozim mleku. Wykazano, że ekspresja *microRNA* może być regulowana przez hormony. W swoim badaniu, Lin i in. (2013), zauważyli, że poziomy ekspresji konkretnych *microRNA*, mianowicie *microRNA23a*, *microRNA27b*, *microRNA103* oraz *microRNA200a* były podwyższone wraz ze wzrostem stężenia prolaktyny. Prolaktyna działa poprzez szlak STAT5/JAK2 w celu zwiększenia ekspresji genu mRNA związanego z syntezą tłuszczu w mleku w gruczole mlekowym. Badacze podkreślili, że synteza tłuszczu w mleku może być związana z regulatorową siecią hormon-*microRNA* w gruczole mlekowym.

Bardzo ciekawe badania przeprowadzili Javed i in. (2012), którzy analizowali ekspresję *microRNA* u bydła mlecznego. Stwierdzili oni, że ukierunkowana ekspresja *microRNA* kieruje produkcją wolnego od β -laktoglobuliny, ale o wysokiej zawartości kazeiny, mleka.

Występowanie β -laktoglobuliny w mleku krowim nie jest pożądane, gdyż nie występuje ono w mleku ludzkim i jest głównym alergenem dla ludzi. Badacze podjęli się obniżenia poziomu β -laktoglobuliny w mleku za pomocą RNAi. Badanie przesiewowe *in vitro* dziesięciu *microRNA*, pojedynczo lub w kombinacjach tandemowych, pozwoliło zidentyfikować kilka, które osiągnęły nawet 98%-towy knockdown β -laktoglobuliny. Naukowcy wyprodukowali także transgeniczne cielę zaprojektowane do ekspresji tandemowych *microRNA*, gdyż skumulowane działanie wielu *microRNA* często powoduje silniejszy knockdown niż działanie pojedynczego *microRNA*. Badacze przetestowali więc tandemowe konstrukty *microRNA* i porównali ich aktywność z aktywnością cząsteczek działających „w pojedynkę”. Mimo że nie zaobserwowano istotnych różnic między aktywnością pojedynczych i tandemowych konstruktów, to analiza mleka indukowanego hormonalnie pozyskanego od transgenicznego cielęcia wykazała brak występowania β -laktoglobuliny i równoczesny wzrost kazein w mleku. Odkrycia te wskazują na zubożenie występowania alergennego białka mleka u bydła za pośrednictwem *microRNA* i potwierdzają ukierunkowaną ekspresję *microRNA* jako skuteczną strategię zmiany składu mleka.

Oprócz badań skupiających się na wzorze ekspresji *microRNA* wpływających na wzrost, rozwój i funkcjonowanie gruczołu mlekowego, prowadzono także wiele analiz asocjacyjnych.

Shen i in. (2016) zidentyfikowali trzy *microRNA* w bydlęcych komórkach gruczołu mlekowego (*microRNA33a*, *microRNA152* i *microRNA224*), które według badaczy mogą być zaangażowane w metabolizm tłuszczu w mleku. W badaniu Lian'a i in. (2016) nadekspresja lub wyciszenie bydlęcego *microRNA181a* powodowała zmniejszenie lub wzrost stężenia trójglicerydów i odkładania lipidów w mleku, co sugeruje, że *microRNA181a* może pośrednio wpływać na syntezę tłuszczu mleka poprzez regulację ACSL1 (enzym przekształcający lipofilowe kwasy tłuszczowe w rozpuszczalny w wodzie acylo-CoA, który jest następnie estryfikowany do trójglicerydów). Wyniki badań wskazują, że funkcje *microRNA181a* mogą być kluczowe dla syntezy tłuszczu w komórkach gruczołu mlekowego (Lian i in., 2016).

5.4. Znaczenie epistazy i efektów dominacyjnych

W niniejszej pracy stwierdzono, że niektóre efekty epistatyczne badanych genów *microRNA2467* oraz *microRNA2313* okazały się statystycznie istotne lub statystycznie wysoko istotne, co dokładnie omówione jest w części pracy pt. „Wyniki”.

W swoim pierwotnym znaczeniu epistaza odnosiła się do maskowania lub ujawniania się skutków podstawienia allelicznego w konkretnym *locus* genu. We współczesnym znaczeniu

epistaza odnosi się do dowolnego związku interakcji między dwoma lub więcej genami w ich połączonym wpływie na fenotyp. Epistaza jest definiowana tylko w kontekście zmienności genetycznej w wielu *loci*. Ta zmienność może być naturalna lub eksperymentalna. Epistaza jest ważną koncepcją w genetyce populacyjnej czy ilościowej. Chociaż jej definicja różni się nieco w tych dziedzinach, podstawową koncepcją jest to, że efekty podstawienia allelicznego w jednym genie mogą zależeć od stanu allelicznego innego genu lub genów (Churchill, 2013).

W genetyce populacyjnej epistaza odgrywa rolę w teoriach przystosowania i adaptacji. W genetyce ilościowej epistaza nabrała szerszego znaczenia, które obejmuje wszelkie nieaddytywne interakcje między genami i często jest utożsamiane z terminem interakcji w analizie wariancji. Zdefiniowanie skali pomiaru jest ważne przy rozważaniu epistazy, ponieważ niektóre interakcje statystyczne mogą być usunięte przez zmianę skali. Przykładem są efekty multiplikatywne, które poddane logarytmowaniu przekształcane są w efekty addytywne (Churchill, 2013).

Oddziaływania epistatyczne mogą być synergistyczne (większe niż addytywne) lub antagonistyczne (mniejsze niż addytywne). Kiedy działanie dwóch genów jest istotne statystycznie, sugeruje się, że muszą też oddziaływać fizycznie, albo przez bezpośrednie oddziaływanie (białko-białko), albo pośrednio poprzez sieć oddziałujących produktów genów. Zatem statystyczna epistaza może dostarczyć wglądu w architekturę genetyczną leżącą u podstaw złożonych fenotypów (Churchill, 2013).

Epistaza obejmuje interakcję między genami, które nie są częścią tego samego *locus* i rzeczywiście mogą być bardzo odległe od siebie w genomie. Innymi słowy, epistaza odnosi się do interakcji między genami zajmującymi różne *loci*, a sama interakcja musi mieć konsekwencje fenotypowe: jeden gen epistatyczny może złagodzić ekspresję innego genu (epistaza antagonistyczna) lub przeciwnie, jeden z genów będzie wzmacniał ekspresję drugiego (epistaza synergistyczna). Niemniej jednak, ta nomenklatura nie definiuje, czy efekt fenotypowy jest korzystny czy szkodliwy.

W mutacjach uważanych za korzystne, synergistyczna epistaza wpływa dodatnio na korzystny efekt mutacji, natomiast epistaza antagonistyczna ma efekt negatywny w odniesieniu do mutacji. Z kolei w przypadku mutacji uważanych za niekorzystne, epistaza antagonistyczna zmniejszy szkodliwe działanie mutacji, a więc będzie miała pozytywny skutek, podczas gdy epistaza synergistyczna będzie miała wyraźnie negatywny wpływ (Wolf i in., 2000).

Moore (2003) głosi w swojej pracy, że epistaza jest wszechobecnym składnikiem architektury genetycznej ludzkich chorób, i że złożone interakcje genetyczne są ważniejsze niż niezależne skutki jakiegokolwiek genu związanego z odpornością/podatnością na choroby.

Hipoteza ta opiera się na następujących podstawach: po pierwsze, idea, że epistaza jest niezwykle istotnym elementem genetycznym nie jest nowa, wszak nauka głosząca, że odchylenia od proporcji Mendla wynikają z interakcji między genami istnieje od prawie 100 lat (Nagel, 2005). Po drugie, wszechobecność interakcji biomolekularnych w regulacji genów oraz w układach biochemicznych i metabolicznych sugeruje, że na związek między zmiennością sekwencji DNA a mierzalnymi zmianami stanu zdrowia z wielkim prawdopodobieństwem wpływa epistaza. W końcu po trzecie, pojedyncze polimorfizmy wielokrotnie nie powtarzają się w niezależnych próbkach zarówno w badaniach sprzężeń jak i badaniach asocjacyjnych. Po czwarte, interakcje na poziomie gen-gen są powszechnie spotykane, gdy tylko są odpowiednio zbadane.

Od wielu lat wiadomo, że mutacje powodujące choroby wykazują dużą zmienność fenotypową, co zdarza się nawet wśród członków tej samej rodziny i tylko podkreśla, że wynik mutacji zależy nie tylko od podłoża genetycznego, ale też od czynników środowiskowych. Istnieje wiele przykładów prostych chorób mendlowskich wykazujących zmienność fenotypową (Rose i Bell, 2012). Przykładem takiej choroby, która jest zarazem chorobą immunologiczną, jest zaburzenie limfoproliferacyjne sprzężone z chromosomem X. Dwie rodziny z heterozygotyczną delecją genu *SH2D1A* wykazały dużą wewnątrzrodzinną i międzyrodzinną zmienność klinicznego fenotypu choroby, pomimo identycznych mutacji w genie *SH2D1A* wywołujących wspomnianą chorobę (Mejstříková i in., 2011).

Jako że *microRNA* mogą koordynować głównymi szlakami wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej poprzez regulację ekspresji genów, wielu badaczy zainteresowało się w ostatnich latach epistatycznymi interakcjami pomiędzy samymi *microRNA* w kontekście immunologicznym. Huffaker wraz z zespołem (2012) wykazali dowody na epistatyczne interakcje między *microRNA155* i *-146a* w regulacji przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej aktywowanej za pośrednictwem limfocytów T. Wyniki badań wykazały, że *microRNA155* promuje, a *microRNA146a* hamuje odpowiedzi interferonu γ (IFN γ) wydzielanego przez limfocyty T i zmniejsza wzrost guza litego *in vivo*. Badania przeprowadzono na myszach z podwójnym nokautem z niedoborem zarówno *microRNA155*, jak i *microRNA146a*, co pozwoliło ustalić epistatyczny związek między tymi dwoma *microRNA*. Badania te polegały na ustaleniu, czy *microRNA155* i *microRNA146a* działają zapewniając równowagę immunologiczną lub, czy jeden z tych genów *microRNA* ma dominujący wpływ na tworzenie się limfocytów T, a w konsekwencji IFN γ i odporności nowotworowej. Ustalono, że wzmocniona odpowiedź przeciwnowotworowa obserwowana u myszy z podwójnym nokautem genu *microRNA146a* była zależna

od *microRNA155*, co wskazywało na dominacyjny efekt *microRNA155* w porównaniu z *microRNA146a* (Huffaker i in., 2012).

Kolejnym badaniem skupiającym się na ocenie efektów dominacyjnych i addytywnych wybranych genów, a także ich relacji epistatycznych, była praca badawcza Pizarro i in. (2020). Naukowcy poddali ocenie dominacyjne i addytywne efekty polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) genów kazein $\alpha S1$, $\alpha S2$, β , oraz κ oraz ich relacje epistatyczne w kontekście oceny wartości hodowlanych dotyczących wydajności mlecznej i komponentów mleka u kóz rasy Murciano-Granadina. Zebrano dane z 2594 laktacji zarejestrowanych wśród 159 kóz, które zgenotypowano pod kątem 48 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w *loci* genów kazein. Przeprowadzono testy nieparametryczne z korektą Bonferroniego, analizę głównych składowych kategorii (CATPCA) i nieliniowe korelacje kanoniczne w celu ilościowego określenia efektów addytywnych, dominacyjnych i epistatycznych badanych SNP oraz w celu oceny rezultatu ich włączenia do genetycznych modeli cech produkcji mleka, tj. wydajność, zawartość białka, tłuszczu, laktozy i komórek somatycznych. Zauważono, że odziedziczalność wysokiej wydajności mlecznej, zawartości laktozy i liczby komórek somatycznych znacznie wzrosła, gdy uwzględniono model biorący pod uwagę epistatyczne efekty genetyczne. Wyniki pracy badawczej Pizarro i in. (2020) sugerują, że włączenie do modelu oceniającego genetyczną wydajność mleka i jego komponentów, parametrów dotyczących epistatycznych efektów polimorfizmów, może zwiększyć dokładność szacunkową tego modelu, a także dokładność wartości hodowlanych uwzględnionych przez model, w porównaniu do modeli pozbawionych danych dotyczących efektów epistatycznych polimorfizmów.

5.5. Zmienne efekty genów w zależności od czynników środowiskowych i stanu fizjologicznego zwierząt

W niniejszej pracy opisane zostały efekty *microRNA2313* i *microRNA2467* w różnych warunkach środowiskowych uwzględniających czynniki takie jak klasa SCC, kolejna laktacja i stadium laktacji. Wykazano, że efekty obu genów *microRNA* w dużej mierze zależą od warunków środowiskowych, co zostało dokładnie omówione w części pracy pt. „Wyniki”. Przyczyną interakcji genotyp-środowisko mogą być zmienne profile ekspresji genów *microRNA* w zależności od wielu różnych czynników środowiska zewnętrznego i wewnętrznego (wiek, płeć, ciąża, laktacja, itp.)

Ekspresja genów *microRNA2313* oraz *microRNA2467* może się zmieniać pod wpływem zmiennej ekspresji innych genów w różnych stanach fizjologicznych, a także pod wpływem

różnych hormonów czy neuroprzekaźników. Na przykład hormony steroidowe mogą docierać do wszystkich komórek, ale tylko w niektórych, tzw. komórkach docelowych, mogą wywołać swoisty efekt. Działanie hormonów steroidowych na komórkę docelową powoduje zwykle wzrost aktywności polimeraz RNA i wzrost transkrypcji jednych, a spadek innych genów. Następstwem tego są zmiany ilości odpowiednich mRNA i produktów ich translacji (białek). Ponadto wzrost ilości mRNA nie zawsze idzie w parze ze wzrostem ilości i jakością kodowanego przezeń białka, co świadczy o istnieniu dodatkowych szczebli regulacji na etapach potranslacyjnych (Chrapusta, 1988).

Hormony wywierają silny wpływ na fizjologię rozrodu poprzez regulację ekspresji genów. Ostatnie odkrycia w działaniu hormonów podkreślają, że regulacja ekspresji genów nie ogranicza się do ich zmian w szybkości transkrypcji genów. Wręcz przeciwnie, wpływ hormonów na stabilność określonego mRNA może dogłębnie zmienić jego stężenie w stanie stacjonarnym. mRNA kodujące receptory hormonalne są często regulowane przez ich własne hormony, tworząc pętle sprzężenia zwrotnego autoregulacji. Negatywne i dodatnie pętle sprzężenia zwrotnego autoregulacji służą odpowiednio do ograniczania lub wzmacniania odpowiedzi hormonalnych. Poprzez efekty potranskrypcyjne hormony steroidowe wpływają na ekspresję dużej populacji genów (Ing, 2005).

Ciekawe badania dotyczące interakcji na poziomie genotyp – środowisko (ang. *genotype x environment*, G x E,) przeprowadzili australijscy badacze (Hayes i in., 2003). Interakcja genotyp środowisko występuje, gdy różnice środowiskowe nie wpływają jednakowo na wydajność różnych genotypów (Falconer, 1952). Zdolność żywych organizmów do zmiany fenotypu w odpowiedzi na zmiany w środowisku określana jest jako plastyczność fenotypowa lub wrażliwość środowiskowa (Falconer i Mackay, 1996). Kiedy te same genotypy rozwijają inne fenotypy w różnych środowiskach, to mówimy o interakcji genotyp – środowisko. W przypadku braku interakcji genotyp – środowisko, oczekiwana korelacja genetyczna między środowiskami wynosi jeden (Hammami i in., 2009).

Hodowla bydła mlecznego prowadzona jest niejednokrotnie w skrajnie różnych środowiskach. Różnice te obejmują poziom żywienia czy zmienne klimatyczne takie jak temperatura i wilgotność. Celem badania Hayesa i in. (2003) była ocena wielkości interakcji genotyp – środowisko na cechy produkcji mleka (wydajność mleczna, zawartość białka i tłuszczu) dla szeregu deskryptorów środowiskowych. Środowisko w poszczególnych dniach badań opisano wielkością stada (HS, ang. *herd size*), średnią wydajnością białka w stadzie (AHTDP, ang. *average herd protein yield*), współczynnikiem wydajności białka w dniu

badania stada (HTDCV, ang. *herd test-day coefficient of variation for protein yield*), oraz wskaźnikiem temperatury i wilgotności (THI, ang. *temperature humidity index*).

Do określenia odpowiedzi córek buhajów na zmiany w środowisku oraz do obliczenia korelacji genetycznej między tymi samymi cechami mierzonymi w dwóch bardzo różnych środowiskach został wykorzystany model regresji losowej buhajów. Analizowanie zapisów z dni testowych, a nie średnich wydajności laktacyjnych, umożliwiło dokładniejsze szacunki wartości hodowlanych buhajów pod kątem „odpowiedzi na warunki środowiskowe”. Zaobserwowano indeks interakcji genotyp – środowisko spowodowany zmiennością średniej wydajności białka w stadzie (AHTDP) o korelacji genetycznej na poziomie 0,78. Interakcję genotyp – środowisko zaobserwowano także dla wskaźnika temperatury i wilgotności o korelacji na poziomie 0,90. Naukowcy przyjęli, że wskaźniki takie jak AH~TDP można wykorzystać do określenia warunków środowiskowych poprawiających wydajność mleczną (Hayes i in., 2003).

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. W badanej populacji krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej wykazano istnienie polimorfizmu genów *microRNA2313* oraz *microRNA2467*. W każdym z tych *loci* zidentyfikowano po dwa allele C oraz T. Natomiast w przypadku genów *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e* stwierdzono monomorfizm, więc wyłączono je z dalszych analiz.
 - a. Analiza frekwencji genu *microRNA2467* w badanym stadzie wykazała największą częstość allelu T oraz adekwatnie: największą liczbę osobników o genotypie TT, a następnie heterozygot CT oraz osobników CC.
 - b. W przypadku genu *microRNA2313* najczęściej występującym okazał się allel C, a co za tym idzie odnotowano najwięcej genotypów CC, następnie pod względem częstości występowania plasowały się kolejno genotypy CT i TT.
2. W pracy dowiedziono, że istnieją statystycznie istotne związki pomiędzy polimorfizmem genów *microRNA2313* i *microRNA2467* a odpornością/podatnością na *mastitis* wyrażoną jako liczba komórek somatycznych w mleku.
3. Przeprowadzona analiza wykazała istnienie statystycznie istotnych efektów nie tylko addytywnych, ale także dominacyjnych oraz epistatycznych (pomiędzy genetycznymi wariantami *microRNA2313* i *microRNA2467*) w kształtowaniu zmienności SCC w mleku w badanej populacji krów.
4. Wykazano, że oszacowane efekty addytywne dominacyjne i epistatyczne w odniesieniu do SCC nie zawsze są stałe i w niektórych przypadkach zmieniają się w zależności od czynników środowiska wewnętrznego (stanu fizjologicznego). Przeprowadzona szczegółowa analiza asocjacji badanych polimorfizmów i SCC w kolejnych laktacjach, w wybranych stadiach laktacji oraz klasach SCC pozwoliła na sformułowanie następujących stwierdzeń:
 - a. w różnych klasach SCC efekty allelu C genu *microRNA2313* i allelu T genu *microRNA2467* różniły się od siebie;
 - b. w większości analizowanych laktacji, zarówno pojedyncze (addytywne i dominacyjne), efekty allelu T *microRNA2467* i allelu C *microRNA2313*, jak i interakcje pomiędzy nimi, przybierały wartości ujemne, co oznacza, że te allele

związane były z mniejszą od średniej SCC w badanym stadzie. Warty podkreślenia wydaje się fakt, iż dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467* w każdej laktacji także związany był z niższą zawartością SCC w mleku.

- c. w większości analizowanych stadiów laktacji efekty allelu C genu *microRNA2313* i allelu T genu *microRNA2467*, a także interakcje między nimi, związane były z niższą od średniej SCC w badanym stadzie.
5. Stwierdzono, że polimorficzne warianty badanych genów kandydujących wykazują działanie plejotropowe, gdyż wiążą się nie tylko z SCC, ale także z cechami użytkowości mlecznej, takimi jak dobowy wydajność mleka oraz procentowa zawartość białka i tłuszczu w mleku. Podobnie jak w przypadku asocjacji z SCC, także w odniesieniu do wydajności mlecznej oraz koncentracji białka i tłuszczu w mleku zaobserwowano, że:
 - a. istnieją nie tylko addytywne statystycznie istotne efekty badanych genów *microRNA*, ale także efekty dominacyjne i epistatyczne;
 - b. występuje zmienność badanych efektów w zależności od klasy SCC, stadium laktacji oraz kolejnej laktacji.
 6. Dla wszystkich analizowanych przypadków (klasa SCC, kolejna laktacja i stadium laktacji) korzystnymi (pod względem zawartości SCC i cech użytkowości mlecznej) okazały się: efekt addytywny allelu T genu *microRNA2467* oraz dominacyjno-dominacyjny i dominacyjno-addytywny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467*. Niekorzystnym efektem pod względem zawartości SCC i cech użytkowości mlecznej okazał się addytywno-dominacyjny efekt interakcji pomiędzy allelem C genu *microRNA2313* i allelem T genu *microRNA2467*.
 7. Reasumując, na podstawie uzyskanych wyników trudno jednoznacznie wytypować geny markerowe, których polimorfizm mógłby stanowić podstawę do prowadzenia selekcji mającej na celu ograniczenie występowania *mastitis*, nie zmniejszając jednocześnie wydajności mlecznej i koncentracji zawartych w mleku składników takich jak tłuszcz czy białko. Niemniej jednak uzyskane wyniki badań pokazują, że selekcja skoncentrowana na zwiększeniu frekwencji allelu T *microRNA2467* mogłaby przynieść zadawalające rezultaty pod kątem obniżenia zawartości SCC w mleku u krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej.

8. Stwierdzono, że modele statystyczne służące do szacowania asocjacji, zawierające obok efektów addytywnych także efekty dominacyjne i interakcyjne, umożliwiają kompleksową ocenę całkowitego efektu allelu. Pominięcie efektów dominacyjnych i epistatycznych może przyczynić się do błędów w szacowaniu udziału konkretnego allelu w kształtowaniu cechy. Modele, które ujmują jedynie estymację addytywnego efektu allelu, bez uwzględnienia efektów pozostałych genów, są zbyt uproszczone, co w konsekwencji prowadzi do wysnucia błędnych wniosków o jego całkowitym efekcie. Konieczne jest zatem uwzględnienie efektów nieaddytywnych w analizie asocjacji pomiędzy genami a cechami fenotypowymi.

9. Wykazano, że efekty poszczególnych genów nie są stałe przez całe życie zwierzęcia (jak przez analogię do cech jakościowych, sądzono jeszcze do niedawna), ale mogą się zmieniać w zależności od środowiska wewnętrznego, dlatego analizując asocjacje pomiędzy genami a fenotypem należy każdorazowo zwrócić uwagę na stan fizjologiczny zwierząt, gdyż może on znacząco modyfikować działanie poszczególnych genów.

BIBLIOGRAFIA

- [1.] Abebe R., Hatiya H., Abera M., Megersa B., Asmare K. 2016. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 12:270.
- [2.] Aitken S.L., Corl C.M., Sordillo L.M. 2011. Immunopathology of Mastitis: insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16, 291–304.
- [3.] Akers R.M. 2006. Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows. *J Dairy Sci*, 894, 1222-1234.
- [4.] Alam M.M., O'Neill L.A. 2011. *MicroRNAs* and the resolution phase of inflammation in macrophages. *Eur J Immunol*, 41, 2482–2485.
- [5.] Alles J., Fehlmann T., Fischer U., Backes C., Galata V., Minet M., Hart M., Abu-Halima M., Grässer F.A., Lenhof H.P., Keller A., Meese E. 2019. An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res*, 47, 3353-3364.
- [6.] Alvarez-Castro J.M., Carlborg Ö. 2007. Unified model for functional and statistical epistasis and its application in quantitative trait Loci analysis. *Genetics*, 176, 1151-1167.
- [7.] Antanaitis R., Juozaitienė V., Jonike V., Baumgartner W., Paulauskas A. 2021. Milk lactose as a biomarker of subclinical mastitis in dairy cows. *Animals Basel*, 11(6):1736.
- [8.] Bagheri M., Miraie-Ashtiani R., Moradi-Shahrbabak M., Nejati-Javaremi A., Pakdel A., von Borstel U.U., Pimentel E.C.G, König S. 2013. Selective genotyping and logistic regression analyses to identify favorable SNP-genotypes for clinical mastitis and production traits in Holstein dairy cattle. *Livest Sci* 151, 140–151.
- [9.] Barkema H.W., Schukken Y.H., Lam T.J., Beiboer M.L., Benedictus G., Brand A. 1999. Management practices associated with the incidence rate of clinical mastitis. *J Dairy Sci*, 82(8), 1643–1654.
- [10.] Barth S., Pfuhl T., Mamiani A., Ehses C., Roemer K., Kremmer E., Jäker C., Höck J., Meister G., Grässer F.A. 2008. Epstein-Barr virus-encoded *microRNA* miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res*, 36(2), 666-675.
- [11.] Barton N. H., Etheridge A. M., Véber A. 2017. The infinitesimal model, definition, derivation and implications. *Theor Popul Biol.*, 118, 50–73.
- [12.] Bazzoni F., Rossato M., Fabbri M., Gaudiosi D., Mirolo M., Mori L., Tamassia N., Mantovani A., Cassatella M.A., Locati M. 2009. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(13), 5282-5287.
- [13.] Bi Y., Liu G., Yang R. 2009. *MicroRNAs*, novel regulators during the immune response. *J Cell Physiol.*, 218(3), 467- 472.
- [14.] Bloemhof S., de Jong G., de Haas Y. 2008. Genetic parameters for clinical mastitis in the first three lactations of Dutch Holstein cattle. *Vet Microbiol*, 134(1-2), 165–171.
- [15.] Bourry A., Poutrel B. 1996. Bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*, kinetics of antibody responses in serum and milk after experimental infection. *J Dairy Sci*, 79(12), 2189–2195.
- [16.] Bowen T., Jenkins R. H., Fraser D. J. 2013. *MicroRNAs*, transforming growth factor beta-1, and tissue fibrosis. *J Pathol*, 229(2), 274–285.

- [17.]Bradley A.J., Green M.J. 2004. The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20(3), 547-568.
- [18.]Bruce J.P., Hui A.B., Shi W., Perez-Ordóñez B., Weinreb I., Xu W., Haibe-Kains B., Waggott D.M., Boutros P.C., O'Sullivan B., Waldron J., Huang S.H., Chen E.X., Gilbert R., Liu F.F. 2015. Identification of a *microRNA* signature associated with risk of distant metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*, 6(6), 4537-4550.
- [19.]Burvenich C., Paape M.J., Hill A.W., Guidry A.J., Miller R.H., Heyneman R., Kremer W.D.J., Brand A. 1994. Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving, *Vet Q* 16(1), 45-50.
- [20.]Cardinali B., Tasso R., Piccioli P., Ciferri M.C., Quarto R., Del Mastro L. 2022. Circulating miRNAs in Breast Cancer Diagnosis and Prognosis. *Cancers*, 14(9), 2317.
- [21.]Carlborg Ö., Haley C. 2004. Epistasis: too often neglected in complex trait studies? *Nat Rev Genet*, 5, 618–625.
- [22.]Ceppi M., Pereira P.M., Dunand-Sauthier I., Barras E., Reith W., Santos M.A., Pierre P. 2009. *MicroRNA*-155 modulates the interleukin-1 signalling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(8), 2735-2740.
- [23.]Cervinkova D., Vlkova H., Borodacova I., Makovcova J., Babak V., Lorencova A., Vrtkova I., Marosevic D., Jaglic Z. 2013. Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. *Vet Med*, 58(11), 567-575.
- [24.]Chen L., Liu X., Li Z., Wang H., Liu Y., He H., Yang J., Niu F., Wang L., Guo J. 2014. Expression differences of miRNAs and genes on NF- κ B pathway between the healthy and the mastitis Chinese Holstein cows. *Gene*, 545(1), 117–125.
- [25.]Cheng W.N., Han S.G. 2020. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australas J Anim Sci.*, 33(11), 1699-1713.
- [26.]Chong M.M., Zhang G., Cheloufi S., Neubert T.A., Hannon G.J., Littman D.R. 2010. Canonical and alternate functions of the *microRNA* biogenesis machinery. *Genes Dev.* 24(17), 1951- 1960.
- [27.]Chrapusta S. 1988. Hormony steroideowe jako swoiste regulatory ekspresji genów. *Nowotwory*, 38(2), 78-86.
- [28.]Churchill G.A., 2013. Epistasis. W: Brenner's Encyclopaedia of Genetics (Second Edition) (red. S. Maloy, K. Hughes). Academic Press, 505-507.
- [29.]Čítek J., Brzákova M., Hanusová L., Hanuš O., Večerek L., Samková E., Jozová E., Hoštičková I., Trávníček J., Klojda M., Hasoňová L. 2022. Somatic cell score, gene polymorphisms and other effects in Holstein and Simmental cows. *Anim Biosci*, 35(1), 13-21.
- [30.]Cockerham C.C. 1954. An extension of the concept of partitioning hereditary variance for analysis of covariances among relatives when epistasis is present. *Genetics* 39(6), 859–882.
- [31.]Costa A., Lopez-Villalobos N., Sneddon N.W., Shalloo L., Franzoi M., De Marchi M., Penasa M. 2019. Invited review: Milk lactose - current status and future challenges in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 102(7), 5883–5898.
- [32.]Coutinho L.L., Matukumalli L.K., Sonstegard T.S., Van Tassell C.P., Gasbarre L.C., Capuco A.V., Smith T. P. 2007. Discovery and profiling of bovine *microRNAs* from immune-related and embryonic issues. *Physiol Genomics*, 29(1), 35–43.
- [33.]Crow J. F. 2010. On epistasis: why it is unimportant in polygenic directional selection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1544), 1241–1244.

- [34.]Cui W., Li Q., Feng L., Ding W. 2011. MiR-126-3p regulates progesterone receptors and involves development and lactation of mouse mammary gland. *Mol Cell Biochem*, 355(1-2), 17–25.
- [35.]Cui X., Zhang S., Zhang Q., Guo X., Wu C., Yao M., Sun D. 2020. Comprehensive *MicroRNA* expression profile of the mammary gland in lactating dairy cows with extremely different milk protein and fat percentages. *Front Genet*, 11:548268.
- [36.]Czech B., Hannon G.J. 2011. Small RNA sorting, matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet*, 12(1), 19-31.
- [37.]Dąbrowska M., Szydłarska D., Bar-Andziak E. 2011. Adiponektyna a insulinooporność i miażdżycy. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii*, tom 7, nr 3, 186-191.
- [38.]Dai S., Zhu X., Xia H. 2020. MiR-2467 is a potential marker for prediction of gestational diabetes mellitus in pregnancy. *Clin Lab*, 66(10).
- [39.]Dai Y., Jia P., Fang Y., Liu H., Jiao X., He J. C., Ding X. 2016. Mir-146a is essential for lipopolysaccharide (LPS)-induced cross-tolerance against kidney ischemia/reperfusion injury in mice. *Sci Rep*, 6, 270-291.
- [40.]De Matteis G., Grandoni F., Scatà M.C., Catillo G., Moioli B., Buttazzoni L. 2020. Flow cytometry-detected immunological markers and on farm recorded parameters in composite cow milk as related to udder health status. *Vet Sci*, 7(3), 114.
- [41.]De Vliegher S., Fox L.K., Piepers S., McDougall S., Barkema H.W. 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci*, 95(3), 1025-1040.
- [42.]Dekkers J.C. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J Anim Sci*, 82, E-Suppl., E313–328.
- [43.]Duarte C.M., Freitas P.P., Bexiga R. 2015. Technological advances in bovine mastitis diagnosis, an overview. *J Vet Diagn Invest*, 27(6), 665– 672.
- [44.]Duse A, Persson-Waller K, Pedersen K. 2021. Microbial aetiology, antibiotic susceptibility and pathogen-specific risk factors for udder pathogens from clinical mastitis in dairy cows. *Animals Basel*, 11(7), 2113.
- [45.]Erdem H., Okuyucu I.C. 2019. Influence of hygiene status of cows on somatic cell count and milk components during summer season. *Large Animal Review*, 25, 7-10.
- [46.]Falconer D.S., 1952. The problem of environment and selection. *Am Nat*, 86, 293-298.
- [47.]Falconer D.S., Mackay T.F.C. 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th ed. Harrow, UK, Longman.
- [48.]Fisher R.A. 1918. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian Inheritance. *Trans. R. Soc. Edinburgh* 52, 399–433.
- [49.]Flicek P., Amode M.R., Barrell D., Beal K., Billis K., Brent S., Carvalho-Silva D., Clapham P., Coates G., Fitzgerald S., Gil L., Girón C.G., Gordon L., Hourlier T., Hunt S., Johnson N., Juettemann T., Kähäri A.K., Keenan S., Kulesha E., Martin F.J., Maurel T., McLaren W.M., Murphy D.N., Nag R., Overduin B., Pignatelli M., Pritchard B., Pritchard E., Riat H.S., Ruffier M., Sheppard D., Taylor K., Thormann A., Trevanion S.J., Vullo A., Wilder S.P., Wilson M., Zadissa A., Aken B.L., Birney E., Cunningham F., Harrow J., Herrero J., Hubbard T.J., Kinsella R., Muffato M., Parker A., Spudich G., Yates A., Zerbino D.R., Searle S.M. 2014. Ensembl 2014. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D749–D755.

- [50.]Forster S.C., Tate M.D., Hertzog P.J. 2015. *MicroRNA* as type I interferon-regulated transcripts and modulators of the innate immune response. *Front Immunol*, 6:334.
- [51.]França M.M., Del Valle T.A., Campana M., Veronese L.P., Nascimento G., Morais J.P.G. 2017. Mastitis causative agents and SCC relationship with milk yield and composition in dairy cows. *Archivos de Zootecnia*, 66(253), 45-49.
- [52.]Gantier M.P., Sadler A.J., Williams B.R.G. 2007. Fine-tuning of the innate immune response by *microRNAs*. *Immunol Cell Biol*, 85(6),458–462.
- [53.]Gigli I., Maizon D.O. 2013. *MicroRNAs* and the mammary gland: a new understanding of gene expression. *Genet Mol Biol*, 36(4), 465-474.
- [54.]Gillespie B.E., Oliver S.P. 2005. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Dairy Sci*, 88(10), 3510–3518.
- [55.]Gonçalves J.L., Kamphuis C., Vernooij H., Araújo J.P., Grenfell R.C., Juliano L., Anderson K.L., Hogeveen H., dos Santos M.V. 2020. Pathogen effects on milk yield and composition in chronic subclinical mastitis in dairy cows. *Vet J*, 262, 105473.
- [56.]Gonzalo C., Linage B., Carriedo J. A., de la Fuente F., Primitivo F. S. 2006. Evaluation of the overall accuracy of the DeLaval cell counter for somatic cell counts in ovine milk. *J Dairy Sci*, 89(12), 4613–4619.
- [57.]Govignon-Gion A., Dassonneville R., Baloché G., Ducrocq V. 2016. Multiple trait genetic evaluation of clinical mastitis in three dairy cattle breeds. *Animal*, 10(4), 558-565.
- [58.]Gratten J., Visscher P.M. 2016. Genetic pleiotropy in complex traits and diseases: implications for genomic medicine. *Genome Med*, 8, 78.
- [59.]Gu Z., Eleswarapu S., Jiang H. 2007. Identification and characterization of *microRNAs* from the bovine adipose tissue and mammary gland. *FEBS Lett*, 581(5), 981–988.
- [60.]Hammami H., Rekik B., Gengler N. 2009. Genotype by environment interaction in dairy cattle. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 131, 155-164.
- [61.]Hammer J.F., Morton J.M., Kerrisk K.L. 2012. Quarter-milking-, quarter-, udder- and lactation-level risk factors and indicators for clinical mastitis during lactation in pasture-fed dairy cows managed in an automatic milking system. *Aust Vet J*, 90(5), 167–174.
- [62.]Harjanti D.W., Sambodho P. 2020. Effects of mastitis on milk production and composition in dairy cows. IOP Conf. Ser., *Earth Environ Sci*, 518, 012032.
- [63.]Harmon R.J. 1994. Symposium - Mastitis and genetic evaluation for somatic cell count - physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci*, 77(7), 2103–2112.
- [64.]Hashemi M., Kafi M., Safdarian M. 2011. The prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy cows in the central region of Fars province, south of Iran. *Iranian J Vet. Res*, 12, 236-241.
- [65.]Hauggaard K., Heringstad, B. and Whist, A.C. 2013. Genetic associations between somatic cell score and pathogen-specific subclinical mastitis in Norwegian Red cows. *J Anim Breed Genet*, 130(2), 98-105.
- [66.]Hayes B.J., Carrick M., Bowman P., Goddard M.E. 2003. Genotype × Environment Interaction for Milk Production of Daughters of Australian Dairy Sires from Test-Day Records. *J Dairy Sci*, 86(11), 3736-3744.
- [67.]Heringstad B., Klemetsdal G., Ruane J. 2000. Selection for mastitis in dairy cattle, a review with focus on the situation of the Nordic countries, *Livest Prod Sci*, 64, 95–106.

- [68.]Hogeveen H., Miltenburg J.D., den Hollander S., Frankena K. 2001. Milking three times a day and its effect on milk production and udder health, *Bulletin IDF*, 367, 7.
- [69.]Höglund J. K., Buitenhuis B., Guldbandsen B., Lund M. S., Sahana G. 2015. Genome-wide association study for female fertility in Nordic Red cattle, *BMC Genet*, 16:110.
<https://DOI.org/10.1186/s12863-015-0269-x>
- [70.]Hortet P., Seegers H. 1998. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Prev Vet Med*, 37, 1–20.
- [71.]Hovinen M, Aisla A.-M., Pyörälä S. 2006. Accuracy and reliability of mastitis detection with electrical conductivity and milk colour measurement in automatic milking. *Acta Agric Scand Anim Sci*, 56, 121–127.
- [72.]Hu J., Huang S., Liu X., Zhang Y., Wei S., Hu X. 2022. MiR-155: an important role in inflammation response. *J Immunol Res*, 7437281.
- [73.]Huffaker T.B., Hu R., Runtsch M.C., Bake E., Chen X., Zhao J., Round J.L., Baltimore D., O'Connell R.M. 2012. Epistasis between *microRNAs* 155 and 146a during T cell-mediated antitumor immunity. *Cell Rep*, 2(6), 1697-1709.
- [74.]Ing N.H. 2005. Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs. *Biol Reprod*, 72(6), 1290-1296.
- [75.]Jabed A., Wagner S., McCracken J., Wells D.N., Laible G. 2012. Targeted *microRNA* expression in dairy cattle directs production of β -lactoglobulin-free, high-casein milk. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(42), 16811-16816.
- [76.]Jakóbisiak M. 2017. Główne komponenty i zasadnicze cechy odpowiedzi immunologicznej. W: Immunologia (red. Lasek W., Gołąb J., Jakóbisiak M., Stokłosa T.). Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 4-5.
- [77.]Jattawa D., Koonawootrittriron S., Elzo M.A., Suwanasopee T. 2012. Somatic cells count and its genetic association with milk yield in dairy cattle raised under Thai tropical environmental conditions. *Asian-Australas J Anim Sci*, 25(9), 1216-1222.
- [78.]Jones G.M., Bailey T.L. 2009. Understanding the basics of mastitis. *Virginia Cooperative Extension*, Virginia Tech, Blacksburg.
- [79.]Ju Z., Huang J., Jiang Q., Wang C., Wang X., Zhao S. 2018a. Identification of bta-miR-15a~16a cluster expression, localization and regulated target in Holsteins. *Mol Cell Probes*, 40, 8–12.
- [80.]Ju Z., Wang C., Wang X., Yang C., Zhang Y., Sun Y., Jiang Q., Li R., Li J., Zhong J., Huang J. 2018b. The effect of the SNP g.18475 A>G in the 3'UTR of NCF4 on mastitis susceptibility in dairy cattle. *Cell Stress Chaperones*, 23(3), 385–391.
- [81.]Kadri N.K., Guldbandsen B., Lund M.S., Sahana G. 2015. Genetic dissection of milk yield traits and mastitis resistance quantitative trait loci on chromosome 20 in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 98, 9015–9025.
- [82.]Kasimanickam V., Kastelic J. 2016. Circulating cell-free mature *microRNAs* and their target gene prediction in bovine metritis. *Sci Rep*, 6:29509.
- [83.]Kayano M., Itoh M., Kusaba N., Hayashiguchi O., Kida K., Tanaka Y., Gröhn Y. 2018. Associations of the first occurrence of pathogen-specific clinical mastitis with milk yield and milk composition in dairy cows. *J Dairy Res*, 85(3), 309-316.
- [84.]Kempthorne O. 1955. The correlation between relatives in a random mating population. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 20, 60–78.

- [85.]Koeck A., Miglior F., Kelton D.F., Schenkel F.S. 2012. Health recording in Canadian Holsteins, data and genetic parameters. *J Dairy Sci*, 95(7), 4099–4108.
- [86.]Kozomara A., Griffiths-Jones S. 2014. miRBase, an notating high confidence *microRNAs* using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 42, D68–D73.
- [87.]Kühn C., Reinhardt F., Schwerin M. 2008. Marker assisted selection of heifers improved milk somatic cell count compared to selection on conventional pedigree breeding values. *Arch Anim Breed*, 51, 23–32.
- [88.]Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294, 853-858.
- [89.]Lakew M., Tolosa T., Tigre W. 2009. Prevalence and major bacterial causes of bovine mastitis in Asella, South Eastern Ethiopia. *Trop Anim Health Prod*, 41(7), 1525–1530.
- [90.]Lassa H., Kubiak J., Małkińska-Horodyska M. 2013. Bakterie najczęściej izolowane z klinicznych postaci mastitis u krów oraz ich wrażliwość na antybiotyki. *Ż Wet*, 88(8), 651-653.
- [91.]Lau N.C., Lim L.P., Weinstein E.G., Bartel D.P. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 858-862.
- [92.]Lawless N., Vegh P., O’Farrelly C., Lynn D.J. 2014. The role of *microRNAs* in bovine infection and immunity. *Front Immunol*, 5:611.
- [93.]Le Guillou S., Sdassi N., Laubier J., Passet B., Vilotte M., Castille J., Laloë D., Polyte J., Bouet S., Jaffrézic F., Cribiu E.P., Vilotte J.L., Le Provost F. 2012. Overexpression of miR-30b in the developing mouse mammary gland causes a lactation defect and delays involution. *PLoS One*, 7(9), e45727.
- [94.]Lee R.C., Ambros V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 862-864.
- [95.]Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
- [96.]Lee Y.L., Takeda H., Costa Monteiro Moreira G., Karim L., Mullaart E., Coppieters W., Gpluse consortium, Appeltant R., Veerkamp R.F., Groenen M.A.M., Georges M., Bosse M., Druet T., Bouwman A.C., Charlier C. 2021. A 12 kb multi-allelic copy number variation encompassing a GC gene enhancer is associated with *mastitis* resistance in dairy cattle. *PLoS Genet*, 17(7), 1009331.
- [97.]Li C., Dong Q., Che X. Xu, L., Li Z., Fan Y., Hou K., Wang S., Qu J., Xu L., Wen T., Yang X., Qu X., Liu Y. 2018. *MicroRNA-29b-2-5p* inhibits cell proliferation by directly targeting *Cbl-b* in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer*, 18(1), 681.
- [98.]Li H.M., Wang C.M., Li Q.Z., Gao X.J. 2012a. MiR-15a decreases bovine mammary epithelial cell viability and lactation and regulates growth hormone receptor expression. *Molecules*, 17(10), 12037-12048.
- [99.]Li R., Zhang C.L., Liao X.X., Chen D., Wang W.Q., Zhu Y.H. 2015. Transcriptome *microRNA* profiling of bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus*. *Int J Mol Sci*, 16(3), 4997–5013.
- [100.] Li Y., Fan X., He X., Sun H., Zou Z., Yuan H., Xu H., Wang C., Shi X. 2012b. *MicroRNA-4661* inhibits antiviral innate immune response by targeting interferon-alpha. *Cell Mol Immunol*, 9, 497–502.

- [101.] Li Z., Liu H., Jin X., Lo L., Liu J. 2012c. Expression profiles of *microRNAs* from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. *BMC Genomics*, 13, 731.
- [102.] Li Z., Wang H., Chen L., Zhai M., Chen S., Li N., Liu X. 2017. Identification and expression analysis of miR-144-5p and miR-130b-5p in dairy cattle. *Arch Anim Breed*, 60, 199–204.
- [103.] Li Z., Zhang H., Song N., Wang H., Chen L., Zhai M., Liu X. 2014. Molecular cloning, characterization and expression of miR-15a-3p and miR-15b-3p in dairy cattle. *Mol Cell Probes*, 28(5-6), 255-258.
- [104.] Lian S., Guo J.R., Nan X.M., Ma L., Loo J.J., Bu D.P. 2016. *MicroRNA* Bta-miR-181a regulates the biosynthesis of bovine milk fat by targeting ACSL1. *J Dairy Sci*. 99(5), 3916-3924.
- [105.] Lin S., Gregory R.I. 2015. *MicroRNA* biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*, 15(6), 321-333.
- [106.] Lin X., Luo J., Zhang L., Zhu J. 2013. *MicroRNAs* synergistically regulate milk fat synthesis in mammary gland epithelial cells of dairy goats. *Gene Expr*, 16(1), 1-13.
- [107.] Liu X., Han Z., Yang C. 2017. Associations of *microRNA* single nucleotide polymorphisms and disease risk and pathophysiology. *Clin Genet*, 92(3), 235-242.
- [108.] Lobo I. 2008. Pleiotropy: one gene can affect multiple traits. *Nat edu*, 1(1):10
- [109.] Łukaszewicz A., Basiak S., Proskura W.S., Dybus A. 2015. Nucleotide Substitution in 3' Arm of Bovine MIR-2467 in Five Cattle Breeds, *Anim Biotechnol*, 26(4), 276-278.
- [110.] Lund M.S., Guldbbrandtsen B., Buitenhuis A.J., Thomsen B., Bendixen C. 2008. Detection of quantitative trait loci in Danish Holstein cattle affecting clinical mastitis, somatic cell score, udder conformation traits, and assessment of associated effects on milk yield. *J Dairy Sci*, 91(10), 4028-4036.
- [111.] Lv H., Yan C., Deng L., Peng Z., Yang D., Hu W., Ding X., Tong C., Wang X. 2021. Role of *microRNAs* in protective effects of forsythoside A against lipopolysaccharide-induced inflammation in bovine endometrial stromal cells. *Front Vet Sci*, 8.
- [112.] Ma L., Young J., Prabhala H., Pan E., Mestdagh P., Muth D., Teruya-Feldstein J., Reinhardt F., Onder T.T., Valastyan S., Westermann F., Speleman F., Vandesompele J., Weinberg R.A. 2010. miR-9, a MYC/MYCN-activated *microRNA*, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol.*, 12, 247-256.
- [113.] Ma T., Li W., Chen Y., Cobo E.R., Windeyer C., Gamsjäger L., Diao Q., Tu Y., Guan L.L. 2022. Assessment of *microRNA* profiles in small extracellular vesicles isolated from bovine colostrum with different immunoglobulin G concentrations, *JDS Communications*, 3(5), 328-333.
- [114.] Majewska-Szczepanik M., Szczepanik M. 2006. Rola receptorów toll-podobnych (TLR) w dporności wrodzonej i nabytej oraz ich funkcja w regulacji odpowiedzi immunologicznej. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 60, 52–63.
- [115.] Malek dos Reis C.B., Barreiro J.R., Mestieri L. Porcionato M. A., dos Santos M. V. 2013. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. *BMC Vet Res*, 9, 67.
- [116.] Malovrh Š., Kunej T., Kovač M., Dovč P. 2018. The *microRNA* gene bta-mir-2313 in cattle: an atlas of regulatory elements and an association analysis with growth and carcass traits in the Slovenian Simmental cattle breed. *Arch Anim Breed*, 61, 271-278.

- [117.] Mao Y., London N.R., Ma L., Dvorkin D., Da Y. 2006. Detection of SNP epistasis effects of quantitative traits using an extended Kempthorne model. *Physiol Genomics*, 13, 28(1), 46-52.
- [118.] Martin P., Barkema H.W., Brito L.F., Narayana S.G., Miglior F. 2018. Symposium review, Novel strategies to genetically improve mastitis resistance in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 101(3), 2724-2736.
- [119.] Matteis G., Grandoni F., Scatà M.C., Catillo G., Moioli B., Buttazzoni L. 2020. Flow Cytometry-Detected Immunological Markers and on Farm Recorded Parameters in Composite Cow Milk as Related to Udder Health Status. *Vet Sci*, 7(3), 114.
- [120.] Mejstříková E., Janda A., Hrusák O., Bucková H., Vlčková M., Hancárová M., Freiberger T., Ravčuková B., Vesely K., Fajkusová L., Kopecková L., Sumerauer D., Kabícková E., Sedivá A., Stary J., Sedláček Z. 2011. Skin lesions in a boy with X-linked lymphoproliferative disorder, comparison of 5 SH2D1A deletion cases. *Pediatrics*, 129(2), e523–528.
- [121.] Middleton J.R., Fox L.K., Pghetti G., Petersson-Wolfe C. 2017. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis, 3rd ed., National Mastitis Council, New Prague, MN, USA.
- [122.] Moore J.H. 2003. The ubiquitous nature of epistasis in determining susceptibility to common human diseases. *Hum Hered.*, 56(1-3), 73-82.
- [123.] Moosavi M., Mirzaei A., Ghavami M., Tamadon A. 2014. Relationship between season, lactation number and incidence of clinical mastitis in different stages of lactation in a Holstein dairy farm. *Vet Res Forum*, 5(1), 13-19.
- [124.] Moretti R., Soglia D., Chessa S., Sartore S., Finocchiaro R., Rasero R., Sacchi P. 2021. Identification of SNPs Associated with Somatic Cell Score in Candidate Genes in Italian Holstein Friesian Bulls. *Animals Basel*, 11(2), 366.
- [125.] Morris C.A. 2007. A review of genetic resistance to disease in *Bos taurus* cattle. *Vet J.*, 174(3), 481–491.
- [126.] Morse D., DeLorenzo M.A., Wilcox C.J., Collier R. J., Natzke R. P., Bray D. R. 1988. Climatic effects on occurrence of clinical mastitis. *J Dairy Sci*, 71(3), 848-853.
- [127.] Muljo S.A., Ansel K.M., Kanellopoulou C., Livingston D.M., Rao A., Rajewsky K. 2005. Aberrant T cell differentiation in the absence of *dicer*. *J Exp Med*. 202(2), 261–269.
- [128.] Mungube E.O., Tenhagen B.A., Kassa T., Regassa F., Kyule M. N., Greiner M., Baumann M.P. 2004. Risk factors for dairy cow mastitis in the central highlands of Ethiopia. *Trop Anim Health Prod*, 36(5), 463-472.
- [129.] Naeem A., Zhong K., Moisés S.J., Drackley J. K., Moyes K. M., Loor J. J. 2012. Bioinformatics analysis of *microRNA* and putative target genes in bovine mammary tissue infected with *Streptococcus uberis*. *J Dairy Sci*. 95(11), 6397-6408.
- [130.] Nagel R.L. 2005. Epistasis and the genetics of human diseases. *C R Biol*, 328(7), 606-615.
- [131.] Nash D.L., Rogers G.W., Cooper J.B., Hargrove G.L., Keown J.F., Hansen L.B. 2000. Heritability of clinical mastitis incidence and relationships with sire transmitting abilities for somatic cell score, udder type traits, productive life, and protein yield. *J Dairy Sci*, 83(10), 2350–2360.
- [132.] Nie K., Gomez M., Landgraf P., Garcia J.F., Liu Y., Tan L.H., Chadburn A., Tuschl T., Knowles D.M. 2008. *MicroRNA*-mediated down-regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: a potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas. *Am J Pathol*. 173(1), 242-252.

- [133.] Nogalska A., Momot M., Nogalski Z. 2020. The Mineral Composition of Milk from High-Yielding Dairy Cows Depending on the Month of Lactation and Udder Health. *Applied Sciences*, 10(14), 4803.
- [134.] O’Connell R.M., Rao D.S., Baltimore D. 2012. *microRNA* regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*, 30, 295–312.
- [135.] Ogola H., Shitandi A., Nanua J. 2007. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *J Vet Sci*, 83(3), 237-242.
- [136.] Oliver S.P., Sordillo L.M. 1988. Udder health in the periparturient period. *J Dairy Sci*, 71, 2584-2606.
- [137.] Paixão M.G., Abreu L.R., Richert R., Ruegg P.L. 2017. Milk composition and health status from mammary gland quarters adjacent to glands affected with naturally occurring clinical mastitis. *J Dairy Sci*, 100(9), 7522–7533.
- [138.] Pasquinelli A.E., Reinhart B.J., Slack F., Martindale M.Q., Kuroda M.I., Maller B., Hayward D.C., Ball E.E., Degan B., Müller P., Spring J., Srinivasan A., Fishman M., Finnerty J., Corbo J., Levine M., Leahy P., Davidson E., Ruvkun G. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6808), 86–89.
- [139.] Pilla R., Malvisi M., Snel G. G., Schwarz D., König S., Czerny C. P., Piccinini, R. 2013. Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. *J Dairy Sci*, 96(3), 1653–1660.
- [140.] Pizarro Inostroza M.G., Landi V., Navas González F.J., León Jurado J.M., Delgado Bermejo J.V., Fernández Álvarez J., Martínez Martínez M.D.A. 2020. Integrating casein complex SNPs additive, dominance and epistatic effects on genetic parameters and breeding values estimation for Murciano-Granadina goat milk yield and components. *Genes Basel*, 11(3), 309.
- [141.] Plaisance V., Abderrahmani A., Perret-Menoud V., Jacquemin P., Lemaigre F., Regazzi R. 2006. *MicroRNA-9* controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *J Biol Chem.*, 281(37), 26932-26942.
- [142.] Purcell S., Sham P.C. 2004. Epistasis in quantitative trait locus linkage analysis, interaction or main effect? *Behav Genet*, 34(2), 143–152.
- [143.] Pyörälä S. 2002. New Strategies to Prevent Mastitis, Department of Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Saari Unit, Saarentaus, Finland. *Reprod Dom Anim*, 37, 211-216.
- [144.] Radkowski M., Olszewska D. 2002. Odpowiedź immunologiczna w zakażeniach pasożytniczych. W: Immunologia (red. J. Gołąb, M. Jakóbsiak). Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 337-343.
- [145.] Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W., Constable P.D. 2007. Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. 10th Edition, Elsevier Saunders, London, 966-994. [online]
https://www.researchgate.net/publication/294560612_Veterinary_Medicine_A_textbook_of_the_diseases_of_cattle_horses_sheep_pigs_and_goats (dostęp dn. 8 kwietnia 2022 r.)
- [146.] Rainard P., Foucras G., Boichard D., Rupp R. 2018. Invited review, Low milk somatic cell count and susceptibility to mastitis. *J Dairy Sci*, 101(8), 6703-6714.
- [147.] Rainard P., Riollot C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res.*, 37(3), 369-400.

- [148.] Rasheed A., Tahir U., Niaz K. 2020. A Review on Bovine Mastitis with Special Focus on CD4 as a Potential Candidate Gene for Mastitis Resistance – A Review. *Ann Anim Sci*, 20(3), 735-755.
- [149.] Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., Pasquinelli A.E., Bettinger J.C., Rougvie A.E., Horvitz H.R., Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- [150.] Riffon R., Sayasith K., Khalil H., Dubreuil P., Drolet M., Lagacé J. 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol*, 39(7), 2584–2589.
- [151.] Rivas A.L., Quimby F.W., Blue J., Coksaygan O. 2001. Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. *J Vet Diagn Invest*, 13(5), 399–407.
- [152.] Rose A.M., Bell L.C. 2012. Epistasis and immunity: the role of genetic interactions in autoimmune diseases. *Immunology*, 137(2), 131-138.
- [153.] Rossi R.L., Rossetti G., Wenandy L., Curti S., Ripamonti A., Bonnal R.J., Birolo R.S., Moro M., Crosti M.C., Gruarin P., Maglie S., Marabita F., Mascheroni D., Parente V., Comelli M., Trabucchi E., De Francesco R., Geginat J., Abrignani S., Pagani M. 2011. Distinct *microRNA* signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naïve state in CD4+T cells by the *microRNA* miR-125b. *Nat Immunol*, 12(8), 796–803.
- [154.] Ruby J.G., Jan C.H., Bartel D.P. 2007. Intronic *microRNA* precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149), 83-86.
- [155.] Rupp R., Bergonier D., Dion S., Hygonenq M.C., Aurel M.R., Robert-Granié C., Foucras G. 2009. Response to somatic cell count-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment in sheep. *J Dairy Sci*. 92(3), 1203-1219.
- [156.] Rupp R., Boichard D. 1999. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, production, udder type traits, and milking ease in first lactation Holsteins. *J Dairy Sci.*, 82(10), 2198-2204.
- [157.] Rupp R., Boichard D. 2003. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle (Review article). *Vet Res*, 34(5), 671–688.
- [158.] Sakamoto K., Komatsu T., Kobayashi T., Rose M.T., Aso H., Hagino A., Obara Y. 2005. Growth hormone acts on the synthesis and secretion of alpha-casein in bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Res*, 72(3), 264-270.
- [159.] Sargeant JM, Leslie K.E., Shirley J.E., Pulkrabek B.J., Lim G.H. 2001. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. *J Dairy Sci*, 84(9), 2018–2024.
- [160.] Schaeffer L.R. 2004. Application of random regression models in animal breeding. *Livest Prod Sci*, 1-3, 35-45.
- [161.] Schukken Y., Wilson D., Welcome F., Garrison-Tikofsky L., Gonzalez R. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet Res*, 34(5), 579-596.
- [162.] Serão N. V., González-Peña D., Beever J. E., Faulkner D.B., Southey B.R., Rodriguezas S.L. 2013. Single nucleotide polymorphisms and haplotypes associated with feed efficiency in beef cattle, *BMC Genet.*, 14, 94.
- [163.] Shen B., Zhang L., Lian C., Lu C., Zhang Y., Pan Q., Yang R., Zhao Z. 2016. Deep Sequencing and Screening of Differentially Expressed *MicroRNAs* Related to Milk Fat Metabolism in Bovine Primary Mammary Epithelial Cells. *Int J Mol Sci*, 17(2), 200.

- [164.] Silva R., Lôbo R.N.B., El Faro L. Dos Santos G.G., Bruneli F.Â., Peixoto M.G. 2020. Genetic parameters for somatic cell count SCC and milk production traits of Guzerá cows using data normalized by different procedures. *Trop Anim Health Prod*, 52(5), 2513–2522.
- [165.] Sitkowska B., Piwczyński D., Wójcik P. 2018. Milking traits affected by milking frequency during first month of lactation, *It J of Anim Sci*, 17(3), 777-784.
- [166.] Skok J.D., Godnic I., Zorc M., Horvat S., Dovec P., Kovac M., Kunej T. 2013. Genome-wide in silico screening for *microRNA* genetic variability in livestock species. *Anim Genet*, 44(6), 669–677.
- [167.] Slettbakk T., Jørstad A., Farver T.B., Holmes J.C. 1995. Impact of milking characteristics and morphology of udder and teats on clinical mastitis in first-and second-lactation Norwegian cattle. *Prev Vet Med*, 24(4), 235-244.
- [168.] Smolenski G., Haines S., Kwan F.Y., Bond J., Farr V., Davis S.R., Stelwagen K., Wheeler T.T. 2007. Characterization of host defence proteins in milk using a proteomic approach. *J Proteome Res*, 6(1), 207–215.
- [169.] Smulski S. 2014. Mastitis u bydła mlecznego. Elamed Media Group. Katowice.
- [170.] Sodeland M., Grove H., Kent M., Taylor S., Svendsen M., Hayes B.J., Lien S. 2011. Molecular characterization of a long range haplotype affecting protein yield and mastitis susceptibility in Norwegian Red cattle. *BMC Genet*, 12, 70.
- [171.] Solovieff N., Cotsapas C., Lee P.H., Purcell S.M., Smoller J.W. 2013. Pleiotropy in complex traits: challenges and strategies. *Nat Rev Genet*, 14(7), 483-495.
- [172.] Sordillo L.M., Contreras G., Aitken, S. 2009. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim Health Res Rev*, 10(1), 53-63.
- [173.] Sordillo L.M., Kendall J.T., Corl C.M., Cross T.H. 2005. Molecular characterization of a saposin-like protein family member isolated from bovine lymphocytes. *J Dairy Sci*, 88(4), 1378–1390.
- [174.] Sordillo L.M., Shafer-Weaver K., DeRosa D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci*, 80(8), 1851-1865.
- [175.] Sordillo L.M., Streicher K.L. 2002. Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7(2), 135–146.
- [176.] Sousa M.A.Pd., de Athayde F.R.F., Maldonado M.B.C, Lima A.Od., Fortes M.R.S., Lopes F.L. 2021. Single nucleotide polymorphisms affect miRNA target prediction in bovine. *PLoS ONE*, 16(4), e0249406.
- [177.] Strona główna programu *Primer 3*, [online] <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> (dostęp dn. 6 marca 2016 r.)
- [178.] Strynowska-Czerwinska A., Fiszler A., Krzyzosiak W.J. 2014. The panorama of-miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*, 71(12), 2253–2270.
- [179.] Suriyasathaporn W., Schukken YH, Nielen M., Brand A. 2000. Low somatic cell count, a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *J Dairy Sci*, 83(6), 1248–1255.
- [180.] Taganov K.D., Boldin M.P., Chang K.J., i in. 2006. NF-kappaB-dependent induction of *microRNA* miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(33), 12481-12486.
- [181.] Tanaka T., Haneda S., Imakawa K., Sakai S., Nagaoka K. 2009. A *microRNA*, miR-101a, controls mammary gland development by regulating cyclooxygenase-2 expression. *Differentiation*, 77(2), 181–187.

- [182.] Tang B., Xiao B., Liu Z., Li N., Zhu E.D., Li B.S., Xie Q.H., Zhuang Y., Zou Q.M., Mao X.H. 2010. Identification of MyD88 as a novel target of miR-155, involved in negative regulation of Helicobacter pylori-induced inflammation. *FEBS Lett.*, 584(8), 1481-1486.
- [183.] Televičius M., Juozaitiene V., Malašauskienė D., Antanaitis R., Rutkauskas A., Urbutis M., Baumgartner W. 2021. Inline Milk Lactose Concentration as Biomarker of the Health Status and Reproductive Success in Dairy Cows. *Agriculture*, 11(1), 38.
- [184.] Thompson-Crispi K., Atalla H., Miglior F., Mallard B.A. 2014. Bovine Mastitis: Frontiers in Immunogenetics. *Front Immunol*, 5, 1-10.
- [185.] Thulin P., Wei T., Werngren O., Cheung L., Fisher R.M., Grandér D., Corcoran M., Ehrenborg E. 2013. *MicroRNA-9* regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor δ in human monocytes during the inflammatory response. *Int J Mol Med*, 31(5), 1003-1010.
- [186.] Tiezzi F., Parker-Gaddis K.L., Cole J.B., Clay J.S., Maltecca C. 2015. A genome-wide association study for clinical mastitis in first parity US Holstein cows using single-step approach and genomic matrix re-weighting procedure. *PLoS One*, 10(2), e0114919.
- [187.] Tribout T., Croiseau P., Lefebvre R., Barbat A., Boussaha M., Fritz S., Boichard D., Hoze C., Pierre-Sanchez M. 2020. Confirmed effects of candidate variants for milk production, udder health, and udder morphology in dairy cattle. *Genet Sel Evol*, 52(55), 1-26.
- [188.] Varona L., Legarra A., Toro M.A., Vitezica Z.G. 2018. Non-additive Effects in Genomic Selection. *Front Genet*, 9:78.
- [189.] Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol*, 34(3), 275–305.
- [190.] Viguier C., Arora S., Gilmartin N., Welbeck K., O'Kennedy R. 2009. Mastitis detection, current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol*, 27(8), 486–493.
- [191.] Waller K.P. 2002. Mammary Gland Immunology around Parturition. *Adv Exp Med Biol*, 480, 231–245.
- [192.] Wang C.M., Li Q.Z. 2007. Identification of differentially expressed *microRNAs* during the development of Chinese murine mammary gland. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(11), 966–973.
- [193.] Wang J., Bian Y., Wang Z., Li D., Wang C., Li Q., Gao X. 2014. *MicroRNA-152* Regulates DNA Methyltransferase 1 and Is Involved in the Development and Lactation of Mammary Glands in Dairy Cows. *PLoS One* 9(7), e101358.
- [194.] Wang J.K., Wang Z., Li G. 2019. *MicroRNA-125* in immunity and cancer. *Cancer Lett*, 454, 134-145.
- [195.] Wang T.H., Wang H.S. 2009. A Genome-Wide Association Study Primer for Clinicians. Taiwan. *J Obstet Gynecol*, 48(2), 89–95.
- [196.] Wang X.P., Luoreng Z.M., Zan L.S., Raza S.H., Li F., Li N., Liu S. 2016. Expression patterns of miR-146a and miR-46b in mastitis infected dairy cattle. *Mol Cell Probes.*, 30(5), 342-344.
- [197.] Wang J., Bian Y., Wang Z., Li D., Wang C., Li Q., Gao X. 2014. *MicroRNA-152* Regulates DNA Methyltransferase 1 and Is Involved in the Development and Lactation of Mammary Glands in Dairy Cows. *PLoS One*, 9(7), e101358.
- [198.] Wightman B., Ha I., Ruvkun G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855-862.

- [199.] Williamson J., Callaway T., Rollin E., Ryman V. 2022. Association of Milk Somatic Cell Count with Bacteriological Cure of Intramammary Infection—A Review. *Agriculture*, 12, 1437.
- [200.] Wilmink J.B.M. 1987. Adjustment of test-day milk, fat and protein yield for age, season and stage of lactation. *Livest Prod Sci*, 16(4), 335-348.
- [201.] Windig J.J., Urioste J.I., Strandberg E. 2013. Integration of epidemiology into the genetic analysis of mastitis in Swedish Holstein. *J Dairy Sci*, 96(4), 2617–2626.
- [202.] Witwer K.W., Sisk J.M., Gama L., Clements J.E. 2010. *MicroRNA* regulation of IFN-beta protein expression, rapid and sensitive modulation of the innate immune response. *J Immunol*, 184(5), 2369–2376.
- [203.] Wolf J.B., Brodie I.I.I., Wade M.J. 2000. *Epistasis and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- [204.] Wright S. 1921. Systems of mating. I. The biometric relations between parent and offspring. *Genetics* 6(2), 111–123.
- [205.] Xiao C., Rajewsky K. 2009. *MicroRNA* control in the immune system, basic principles. *Cell*, 136(1), 26–36.
- [206.] Yuan X., Berg N., Lee J.W., Le T.T., Neudecker V., Jing N., Eltzschig H. 2018. *MicroRNA* miR-223 as regulator of innate immunity. *J Leukoc Biol*, 104(3), 515–524.
- [207.] Zadoks R.N., Watts J.L. 2009. Species identification of coagulase-negative staphylococci, genotyping is superior to phenotyping. *Vet Microbiol*, 134(1-2), 20–28.
- [208.] Zhang Y., Li Y.K. 2013. *MicroRNAs* in the regulation of immune response against infections. *J Zhejiang Univ Sci B*, 14(1), 1-7.
- [209.] Zhao F-p., Guo G., Wang Y-c., Guo X-y., Zhang Y., Du L-x. 2015. Genetic parametes for somatic cell score and production traits in the first three lactations of Chinese Holstein cows. *J Integr Agric*, 14(1), 125–130.
- [210.] Zhao W., Cheng L., Quek C. Bellingham S.A, Hill A.F. 2019. Novel miR-29b target regulation patterns are revealed in two different cell lines. *Sci Rep*, 9(1), 17449.
- [211.] Zorc M., Kunej T. 2015. Development of Integrative Map of *MicroRNA* Gene Regulatory Elements. *MicroRNA*, 4(3), 205-208.

ANEKS

A. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w zależności od poziomu SCC

Tabela 1A. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do lnSCC w zależności od klasy SCC

Klasa Efekt	SCC ≤ 200 tys./ml		200 < SCC ≤ 400 tys./ml		SCC > 400 tys./ml	
	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE
<i>a microRNA2313</i>	0,0621	0,0242	-0,0086	0,0128	-0,1344	0,0352
<i>d microRNA2313</i>	0,1401	0,0370	-0,0157	0,0191	-0,2192	0,0528
<i>a microRNA2467</i>	-0,0385	0,0383	0,0114	0,0201	0,1714	0,0627
<i>d microRNA2467</i>	-0,0494	0,0458	0,0015	0,0245	0,0921	0,0728
<i>a microRNA2313</i> <i>x</i> <i>a microRNA2467</i>	-0,1532	0,0927	-0,0158	0,0498	-0,0942	0,1245
<i>a microRNA2313</i> <i>x</i> <i>d microRNA2467</i>	-0,3404	0,1136	0,0014	0,0598	-0,0414	0,1537
<i>d microRNA2313</i> <i>x</i> <i>a microRNA2467</i>	-0,0992	0,1469	-0,0960	0,0785	-0,1221	0,2381
<i>d microRNA2313</i> <i>x</i> <i>d microRNA2467</i>	-0,1885	0,1797	-0,1297	0,0940	-0,0220	0,2752

Efekty zaznaczone na zielono są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast na czerwono na poziomie $P \leq 0,01$

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 2A. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od klasy SCC

Klasa Efekt	SCC ≤ 200 tys./ml		200 < SCC ≤ 400 tys./ml		SCC > 400 tys./ml	
	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE
<i>a microRNA2313</i>	0,0089	0,0102	-0,0126	0,0199	-0,0041	0,0152
<i>d microRNA2313</i>	0,0037	0,0156	-0,0498	0,0297	-0,0537	0,0228
<i>a microRNA2467</i>	-0,0669	0,0161	-0,0798	0,0313	-0,1054	0,0271
<i>d microRNA2467</i>	-0,0866	0,0193	-0,1005	0,0381	-0,1497	0,0314
<i>a microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0778	0,0391	0,2128	0,0774	0,1171	0,0538
<i>a microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	-0,0176	0,0479	0,1484	0,0929	0,1178	0,0664
<i>d microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0914	0,0620	0,2467	0,1219	0,1579	0,1029
<i>d microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	-0,0043	0,0758	0,2461	0,1460	0,1670	0,1189

Efekty zaznaczone na zielono są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast na czerwono na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 3A. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od klasy SCC

Klasa Efekt	SCC ≤ 200 tys./ml		200 < SCC ≤ 400 tys./ml		SCC > 400 tys./ml	
	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE
<i>a microRNA2313</i>	0,0672	0,0243	-0,0161	0,0476	-0,0714	0,0361
<i>d microRNA2313</i>	0,1060	0,0371	-0,0493	0,0710	-0,1152	0,0542
<i>a microRNA2467</i>	-0,1051	0,0384	-0,1219	0,0748	-0,1767	0,0643
<i>d microRNA2467</i>	-0,1283	0,0460	-0,0949	0,0911	-0,1888	0,0747
<i>a microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0853	0,0931	0,3083	0,1852	-0,0814	0,1278
<i>a microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	-0,0779	0,1141	0,4425	0,2224	0,0142	0,1578
<i>d microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,2024	0,1476	0,4258	0,2918	0,0311	0,2443
<i>d microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	0,0608	0,1805	0,8157	0,3495	0,3674	0,2825

Efekty zaznaczone na zielono są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast na czerwono na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 4A. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej (kg/dobę) w zależności od klasy SCC

Klasa Efekt	SCC ≤ 200 tys./ml		200 < SCC ≤ 400 tys./ml		SCC > 400 tys./ml	
	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE
<i>a microRNA2313</i>	-0,5276	0,2357	-1,0817	0,4501	0,2113	0,3543
<i>d microRNA2313</i>	-1,1985	0,3597	-1,5783	0,6714	1,5913	0,5310
<i>a microRNA2467</i>	1,5164	0,3722	0,3427	0,7072	2,0215	0,6305
<i>d microRNA2467</i>	2,0894	0,4459	1,5176	0,8614	3,9052	0,7325
<i>a microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	1,2857	0,9015	0,4782	1,7503	-1,5668	1,2528
<i>a microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	3,6235	1,1047	2,5304	2,1025	-1,6674	1,5470
<i>d microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,8300	1,4296	1,4735	2,7581	-4,8614	2,3956
<i>d microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	3,6782	1,7486	4,1222	3,3034	-4,4526	2,7697

Efekty zaznaczone na zielono są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast na czerwono na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne.

B. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w zależności od kolejnej laktacji

Tabela 5A. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do lnSCC w zależności od kolejnej laktacji

Laktacja Efekt	I laktacja		II laktacja		III laktacja		IV laktacja		V laktacja		VI laktacja	
	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt
<i>a microRNA2313</i>	-0,0123	0,0586	-0,0532	0,0568	-0,1482	0,0648	0,1445	0,0321	-0,6746	0,1158	-0,5514	0,1586
<i>d microRNA2313</i>	-0,0377	0,0838	-0,1618	0,0841	-0,1216	0,0986	0,0000	-	-1,2275	0,1862	-0,7200	0,2765
<i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	-0,2624	0,0924	-0,2143	0,1127	-0,0364	0,1699	-0,0231	0,1970	0,1382	0,1900
<i>d microRNA2467</i>	-0,0460	0,0449	-0,2939	0,1102	-0,3804	0,1307	-0,3098	0,1982	-0,4439	0,2368	-0,1580	0,2436
<i>a microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	0,0638	0,2352	-0,1882	0,2422	0,3444	0,1580	-0,5425	0,4034	0,7748	0,3997
<i>a microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	-0,0081	0,1225	-0,3428	0,2802	-0,6171	0,2977	0,2850	0,1806	0,2980	0,4906	1,7776	0,5508
<i>d microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	-0,0432	0,3554	-0,7486	0,4223	0,0000	-	-1,4268	0,7676	-0,3816	0,7754
<i>d microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	-0,2101	0,1820	-0,2616	0,4254	-1,2648	0,5058	0,0000	-	0,0566	0,8834	1,7042	1,0094

Efekty zaznaczone na zielono są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast na czerwono na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne

Tabela 6A. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od kolejnej laktacji

Laktacja Efekt	I laktacja		II laktacja		III laktacja		IV laktacja		V laktacja		VI laktacja	
	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE
<i>a microRNA2313</i>	0,0222	0,0160	0,0083	0,0154	-0,0402	0,0171	0,0092	0,0082	-0,0411	0,0280	-0,1292	0,0424
<i>d microRNA2313</i>	0,0170	0,0229	-0,0366	0,0229	-0,0738	0,0260	0,0000	-	-0,1463	0,0451	-0,2450	0,0739
<i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	-0,0692	0,0251	-0,0989	0,0297	-0,0956	0,0436	-0,2086	0,0477	-0,1060	0,0508
<i>d microRNA2467</i>	-0,0379	0,0123	-0,0694	0,0299	-0,1395	0,0345	-0,1243	0,0509	-0,2591	0,0573	-0,1269	0,0651
<i>a microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	0,0593	0,0639	0,2264	0,0639	-0,0442	0,0406	0,1821	0,0976	0,3864	0,1068
<i>a microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	-0,0461	0,0335	-0,0161	0,0761	0,0718	0,0786	-0,0645	0,0464	0,1043	0,1188	0,5868	0,1471
<i>d microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	0,1528	0,0966	0,2884	0,1114	0,0000	-	0,1553	0,1858	0,4317	0,2072
<i>d microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	0,0552	0,0497	0,0877	0,1156	0,0449	0,1334	0,0000	-	0,1217	0,2138	0,7435	0,2697

Efekty zaznaczone na zielono są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast na czerwono na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 7A. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od kolejnej laktacji

Laktacja Efekt	I laktacja		II laktacja		III laktacja		IV laktacja		V laktacja		VI laktacja	
	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE
<i>a microRNA2313</i>	0,0654	0,0333	0,0085	0,0348	-0,0360	0,0412	0,0011	0,0212	-0,0148	0,0725	-0,0741	0,1043
<i>d microRNA2313</i>	0,0216	0,0476	-0,0132	0,0516	-0,0321	0,0627	0,0000		0,0193	0,1166	-0,0182	0,1818
<i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	-0,1804	0,0566	-0,1526	0,0717	-0,0975	0,1120	-0,2372	0,1234	-0,1229	0,1249
<i>d microRNA2467</i>	-0,0646	0,0255	-0,1904	0,0675	-0,1548	0,0831	0,0397	0,1306	-0,2225	0,1483	-0,1763	0,1602
<i>a microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	0,1090	0,1442	0,4066	0,1540	-0,0447	0,1042	-0,2909	0,2526	-0,0945	0,2628
<i>a microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	-0,0916	0,0696	0,0647	0,1717	0,3438	0,1894	-0,1379	0,1191	-0,6261	0,3073	0,2037	0,3622
<i>d microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	0,4072	0,2179	0,6639	0,2686	0,0000	-	-0,2784	0,4807	-0,3441	0,5099
<i>d microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	0,2135	0,1034	0,5696	0,2608	0,6281	0,3217	0,0000	-	-0,7275	0,5532	-0,0839	0,6637

Efekty zaznaczone na zielono są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast na czerwono na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 8A. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej w zależności od kolejnej laktacji

Laktacja Efekt	I laktacja		II laktacja		III laktacja		IV laktacja		V laktacja		VI laktacja	
	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE
<i>a microRNA2313</i>	-0,4841	0,2990	-0,2819	0,3273	0,4045	0,3976	-0,2294	0,2051	0,4039	0,6559	2,6726	0,9963
<i>d microRNA2313</i>	-0,9499	0,4278	-0,3641	0,4844	0,8346	0,6045	0,0000	-	2,8613	1,0545	4,7044	1,7369
<i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	1,8423	0,5319	1,1391	0,6914	0,6035	1,0849	4,5942	1,1162	7,0490	1,1932
<i>d microRNA2467</i>	0,9798	0,2291	2,5123	0,6346	1,5862	0,8013	3,7263	1,2651	7,2094	1,3417	7,2612	1,5301
<i>a microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	0,2479	1,3545	-0,1067	1,4850	2,3316	1,0087	3,0342	2,2851	-11,7147	2,5102
<i>a microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	-0,1031	0,6256	2,3015	1,6134	3,5247	1,8258	1,2037	1,1531	2,9106	2,7794	-14,8161	3,4592
<i>d microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	-0,2059	2,0467	-0,5765	2,5897	0,0000	-	9,9095	4,3484	-12,7914	4,8701
<i>d microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	-2,2506	0,9294	1,7669	2,4500	5,6371	3,1014	0,0000	-	9,7552	5,0044	-11,5405	6,3397

Efekty zaznaczone na zielono są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast na czerwono na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne

c. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w zależności od stadium laktacji

Tabela 9A. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do lnSCC w zależności od stadium laktacji

Stadium Efekt	I Stadium		II Stadium		III Stadium	
	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE
<i>a microRNA2313</i>	0,0486	0,0425	0,0190	0,0974	0,1644	0,5026
<i>d microRNA2313</i>	0,0000	-	-0,0579	0,1482	-0,0410	0,0784
<i>a microRNA2467</i>	-0,1397	0,2350	-0,0888	0,1609	-0,1479	0,1189
<i>d microRNA2467</i>	-0,2695	0,2704	-0,1925	0,1902	-0,0567	0,1403
<i>a microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,2115	0,2101	-0,1698	0,3727	-0,2546	0,1630
<i>a microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	0,1974	0,2410	-0,2930	0,4501	-0,3732	0,3241
<i>d microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	-0,6190	0,6161	-0,4160	0,3760
<i>d microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	0,0000	-	-0,6594	0,7327	-0,9124	0,5273

Efekty zaznaczone na zielono są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast na czerwono na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 10A. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od stadium laktacji

Stadium Efekt	I Stadium		II Stadium		III Stadium	
	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE
<i>a microRNA2313</i>	-0,0075	0,0098	-0,0260	0,0218	-0,0213	0,0266
<i>d microRNA2313</i>	0,0000	-	-0,0627	0,0332	-0,0876	0,0404
<i>a microRNA2467</i>	0,0165	0,0544	-0,1350	0,0361	-0,1618	0,0476
<i>d microRNA2467</i>	0,0020	0,0626	-0,1847	0,0426	-0,2198	0,0553
<i>a microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	-0,0001	0,0486	-0,0066	0,0835	-0,0497	0,1101
<i>a microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	0,0096	0,0557	-0,0854	0,1009	-0,0774	0,1277
<i>d microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	-0,0830	0,1381	-0,1718	0,1791
<i>d microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	-0,0075	0,0098	-0,0260	0,0218	-0,0213	0,0266

Efekty zaznaczone na zielono są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast na czerwono na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 11A. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od stadium laktacji

Stadium Efekt	I Stadium		II Stadium		III Stadium	
	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE
<i>a microRNA2313</i>	-0,0553	0,0265	-0,0161	0,0533	0,0566	0,0547
<i>d microRNA2313</i>	0,0000	-	-0,0794	0,0811	0,0583	0,0831
<i>a microRNA2467</i>	-0,1360	0,1468	-0,1488	0,0880	-0,0549	0,0980
<i>d microRNA2467</i>	-0,2002	0,1689	-0,1186	0,1040	-0,0686	0,1138
<i>a microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,1501	0,1312	-0,2861	0,2039	0,1981	0,2264
<i>a microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	0,1005	0,1505	-0,4852	0,2462	0,1374	0,2627
<i>d microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	-0,3755	0,3371	0,5439	0,3683
<i>d microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	0,0000	-	-0,4712	0,4009	0,5889	0,4283

Efekty zaznaczone na zielono są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast na czerwono na poziomie $P \leq 0,01$,
 Źródło: opracowanie własne.

Tabela 12A. Efekty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej w zależności od stadium laktacji

Stadium Efekt	I Stadium		II Stadium		III Stadium	
	Efekt	SE	Efekt	SE	Efekt	SE
<i>a microRNA2313</i>	-0,1772	0,2426	-0,6352	0,5247	0,1644	0,5026
<i>d microRNA2313</i>	0,0000	-	-1,0017	0,7985	1,1410	0,7624
<i>a microRNA2467</i>	-0,2792	1,3417	1,8328	0,8666	0,9754	0,8993
<i>d microRNA2467</i>	1,7664	1,5437	2,5985	1,0242	2,7536	1,0450
<i>a microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,5406	1,1995	1,7136	2,0077	-0,1730	2,0781
<i>a microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	-0,5629	1,3758	4,2788	2,4240	0,8467	2,4111
<i>d microRNA2313</i> x <i>a microRNA2467</i>	0,0000	-	0,8023	3,3186	-0,6460	3,3812
<i>d microRNA2313</i> x <i>d microRNA2467</i>	0,0000	-	4,1552	3,9464	-0,1709	3,9317

Efekty zaznaczone na zielono są istotne na poziomie $P \leq 0,05$, natomiast na czerwono na poziomie $P \leq 0,01$.

Źródło: opracowanie własne.

SPIS WYKRESÓW

Wykres 1. Liczba komórek somatycznych (lnSCC) w mleku w zależności od dnia laktacji w badanym stadzie krów	49
Wykres 2. Frekwencje genotypów genu <i>microRNA2467</i>	57
Wykres 3. Frekwencje alleli genu <i>microRNA2467</i>	58
Wykres 4. Frekwencje genotypów genu <i>microRNA2313</i>	58
Wykres 5. Frekwencje alleli genu <i>microRNA2313</i>	59
Wykres 6. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do lnSCC w zależności od klasy SCC	64
Wykres 7. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od klasy SCC	66
Wykres 8. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od klasy SCC	69
Wykres 9. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej (kg/dobę) w zależności od klasy SCC	71
Wykres 10. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do lnSCC w zależności od kolejnej laktacji	74
Wykres 11. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od kolejnej laktacji	76
Wykres 12. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od kolejnej laktacji	78
Wykres 13. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej w zależności od kolejnej laktacji	81
Wykres 14. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do lnSCC w zależności od stadium laktacji	83
Wykres 15. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od stadium laktacji	84
Wykres 16. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od stadium laktacji	86
Wykres 17. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej w zależności od stadium laktacji	88

SPIS TABEL

Tabela 1. Materiał badawczy - liczebności krów i próbných udojów w analizowanych klasach	49
Tabela 2. Sekwencje starterowe wykorzystane przy amplifikacji badanych fragmentów genów	51
Tabela 3. Frekwencje alleli i genotypów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w próbných udojach.....	59
Tabela 4. Liczebności haplotypów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w próbných udojach.....	60
Tabela 5. Statystyki opisowe średnich wartości fenotypowych badanych cech w próbných udojach.....	61
Tabela 1A. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do lnSCC w zależności od klasy SCC	119
Tabela 2A. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od klasy SCC	120
Tabela 3A. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od klasy SCC	121
Tabela 4A. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej (kg/dobę) w zależności od klasy SCC	122
Tabela 5A. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do lnSCC w zależności od kolejnej laktacji	123
Tabela 6A. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od kolejnej laktacji.....	124
Tabela 7A. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od kolejnej laktacji	125
Tabela 8A. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej w zależności od kolejnej laktacji.....	126
Tabela 9A. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do lnSCC w zależności od stadium laktacji.....	127
Tabela 10A. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do procentowej zawartości białka w mleku w zależności od stadium laktacji.....	128
Tabela 11A. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do procentowej zawartości tłuszczu w mleku w zależności od stadium laktacji.....	129
Tabela 12A. Efekty genów <i>microRNA2313</i> i <i>microRNA2467</i> w odniesieniu do dobowej wydajności mlecznej w zależności od stadium laktacji	130