



doi: 10.33188/ vetheder.987047

Araştırma Makalesi / Research Article

## Simental ırkı ineklerde *MBL-1* geninde bulunan üç SNP'nin (1252 G>A, 2534 G>A, 2569 T>C) subklinik mastitis üzerine etkisinin araştırılması

**Esmâ Gamze AKSEL<sup>1a\*</sup>, Aytaç AKÇAY<sup>2,b</sup>, Elif ÇELİK<sup>3, c</sup>, Bilal AKYÜZ<sup>4, d</sup>**

<sup>1,4</sup> Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>3</sup> Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

ORCID: 0000-0002-0040-8933<sup>a</sup>; 0000-0001-6263-5181<sup>b</sup>; 0000-0002-5073-1907<sup>c</sup>; 0000-0001-7548-9830<sup>d</sup>

## MAKALE BİLGİSİ/

ARTICLE  
INFORMATION:

Geliş / Received:

25 Ağustos 21

25 August 21

Revizyon/Revised:

04 Ekim 21

04 October 21

Kabul / Accepted:

12 Ekim 21

12 October 21

Anahtar Sözcükler:

MBL-1

RFLP

SNP

Simental

CMT

Keywords:

MBL-1

RFLP

SNP

Simental

CMT

## ÖZET:

Yapılan bu çalışmada Simental ırkı ineklerde subklinik mastitis ile mannoz bağlayıcı lektin-1 (Mannose-binding lectin-1, MBL-1) geninde bulunan (1252 G>A, 2534 G>A, 2569 T>C) üç tek nükleotid polimorfizminin (Single nucleotide polymorphism, SNP) etkisinin lojistik regresyon analizi ile araştırılması amaçlandı. Çalışmanın materyalini hepsi ikinci laktasyonda olan 309 baş Simental ırkı inek oluşturdu. Çiftlik şartlarında elde edilen sütlerden Kaliforniya mastitis testi ile subklinik mastitis taraması yapıldı. Yine çiftlik şartlarında K<sub>3</sub>EDTA'lı tüplere alınan kanlardan fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemi ile DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA'lar, MBL-1 geninde bulunan 1252 G>A, 2534 G>A, 2569 T>C kodlu üç SNP yönünden kesim enzimi uzunluğu polimorfizmi (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) analizi ile genotiplendirildi. Populasyona ait genotipler Hardy-Weinberg ki-kare uyum iyiliği testi ile analiz edildi. İncelenen süt örneklerinden %37,5'inin CMT testi pozitif olarak belirlendi. Elde edilen CMT sonuçları ile SNP'lerin etki payları lojistik regresyon analizi ile incelendi. Örneklenen popülasyonda 2534 G>A SNP'si yönünden Hardy-Weinberg dengesinde olmadığı gözlemlendi. Lojistik regresyon analizi sonunda incelenen Simental ırkı ineklerde subklinik mastitis üzerine bu üç SNP'nin etki paylarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. MBL-1 geninde bulunan üç SNP (1252 G>A, 2534 G>A, 2569 T>C) ile subklinik mastitis arasındaki ilişkinin aydınlatılması için farklı ırklarda benzer çalışmaların planlanmasının gerektiği kanaatine varıldı.

### *Investigation of the effect for three SNP (1252 G>A, 2534 G>A, 2569 T>C) of MBL-1 gene on subclinic mastitis in Simmental cows*

## ABSTRACT:

In this study it was aimed to investigate the effect of the three single nucleotide polymorphisms (1252 G>A, 2534 G>A, 2569 T>C) found in the mannose-binding lectin-1 (Mannose-binding lectin-1, MBL-1) gene and subclinical mastitis in Simmental cows using logistic regression analysis. The material of the study consisted of 309 Simmental cows, all of them were in the second lactation stage. Subclinical mastitis screening was performed with the California mastitis test from the milk obtained under farm conditions. Again under farm conditions, with the help of the phenol-chloroform-isoamyl alcohol method, DNA was isolated from the blood taken into tubes containing K<sub>3</sub>EDTA. The obtained DNAs were genotyped by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in relation to the three SNPs coded 1252 G>A, 2534 G>A, 2569 T>C in the MBL-1 gene. The genotypes of the population were analyzed by the Hardy-Weinberg chi-square test. CMT test was determined as positive in 37.5% of the examined milk samples. The obtained CMT results and the effect shares of SNPs were analyzed by the logistic regression analysis. It was observed that the sampled population was not in the Hardy-Weinberg equilibrium in terms of 2534 G>A SNPs. At the end of the logistic regression analysis, it was determined that the effects of these three SNPs on subclinical mastitis in Simmental cows were not statistically significant. It was concluded that similar studies should be planned in different breeds to elucidate the relationship between the three SNPs (1252 G>A, 2534 G>A, 2569 T>C) in the MBL-1 gene and subclinical mastitis.

## 1. Giriş

Memelilerde mastitis; bakteri, virüs, maya ve küf gibi farklı patojenik ajanlar ile termal, kimyasal ve mekanik hasar gibi fiziksel etkenlere bağlı olarak da ortaya çıkmaktadır (1, 2). Hastalık tüm dünyada özellikle süt sığıru yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (3). Klinik, subklinik olarak iki forma ayrılan mastitisin klinik formunda, klinik belirti gösterdikleri için hasta hayvanların tespiti ve sürüden ayrımı kolaydır. Bu sayede hasta hayvanların sebep olabileceği bulaşma önlenir. Ancak masraflı ve uzun süren bir tedavi sürecini gerektiren klinik mastitiste tedavi her zaman başarılı olmaz ve hasta hayvanların damızlıktan çıkarılma riski bulunur. Buna karşın tedavisi daha kolay olan subklinik mastitiste ise klinik belirtiler göstermediği için hasta hayvanların teşhisinde geç kalınması, hastalığın klinik forma geçmesine ve bu arada da hastalığın sürü içinde yayılma riski bulunmaktadır (4, 5). Hem klinik (6), hem de subklinik mastitis (7, 8) işletmelerde önemli ekonomik kayıplara neden olmasına rağmen, süt sığırcılığı yapan işletmelerde kayıpların %70-80'i subklinik mastitisten kaynaklanmaktadır (9). İşletmelerde mastitisin önlenmesi için gerekli hijyen ve yönetimsel tedbirlerin alınması yanında, genetik olarak mastitise dirençli sürülerin geliştirilmesine ilgi giderek artmaktadır. Bu nedenle, son zamanlarda hastalıklara yatkınlık/dirençlilik hususunda konakçı genetik faktörlerine odaklanılmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda TLR4 (10), PTK2B, SYK, TNFRSF21 (11), CXCR1 (12), MAP4K4 (13), CD14 (14) gibi immun sistemle ilişkili bazı aday genlerin mastitise dirençle ilişkisi ortaya konulmuştur.

Evrimsel olarak korunmuş örüntü tanıma proteinleri grubunda bulunan ve doğal bağışıklık sisteminin aktifleştirilmesinde önemli rollere sahip olan kollajen lektinlerin enfeksiyöz hastalıklara karşı konakçıda artan duyarlılıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir (15-17). Karaciğerde sentezlenen ve serin proteazlarla (MASP'ler), komplekslenmiş oligomerler olarak dolaşan serum proteini olan mannoz bağlayıcı lektin (MBL), kollektin ailesinin bir üyesidir (18-20). Dolaşımda bulunan MASP'ler patojenin yüzeyinde bulunan karbohidrat kısımlarına bağlanarak, kompleman aktivasyonu için lektin yolağını aktive ederler. Bu sayede patojenik etkenin opsonizasyonu, fagositozu ya da lizisine neden olur. Ayrıca MBL, konakçıda inflamatuvar yanıtı ve immün aktivasyonu, makrofajlarda sitokin ekspresyonunu değiştirme, apoptotik hücrelerin fagositik hücreler tarafından alınımı da artırabilir (18, 21, 22).

MBL proteinleri ile enfeksiyon gelişimi arasındaki ilişki ilk olarak Sumiya ve ark. (23) tarafından çocuklarda tekrarlayan enfeksiyonlar ile serum MBL protein seviyesi arasında ilişki olduğunun belirlenmesiyle ortaya konulmuştur. Daha sonra insanlarda yapılan çalışmalarda, MBL genindeki bazı varyasyonların serum MBL seviyeleri ve bunun da bazı enfeksiyöz hastalıklara duyarlılıkla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (24-26). Farklı türlerde MBL geninde bulunan polimorfizmler ile hastalıklar arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Bu çalışmaların birinde domuzlarda, MBL-1 geninde bulunan polimorfizmler ile serum MBL-A miktarı arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (27-30). Bir başka çalışmada da insan, domuz, sığır gibi farklı türlerde kollajen lektin genlerindeki kısa nükleotid varyantlarının (SNV'ler), canlılarda bulaşıcı hastalığa duyarlılık ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (20). Buna karşın sığırlarda kollajen lektinlerindeki polimorfizmler hakkında nispeten az çalışma bulunmakta ve yapılan bu çalışmalarda da mastitise direnç konusuna odaklanılmıştır (31-33).

Sığırlarda mannoz bağlayıcı lektin A ve C'yi (MBL-1 ve MBL-2) kodlayan genler dahil olmak üzere on bir kollajen lektin geni tanımlanmıştır (34, 35). Sığırdaki BTA 28 kromozomu üzerinde bulunan ve 248 amino asit kodlayan MBL-1 geni (NCBI Erişim No. AC\_000185.1), 5223 baz çifti (bp) uzunluğunda beş ekson ve dört intron içerir (35). Bu çalışmada ise CMT ile subklinik mastitis taraması yapılan 309 baş Simental ırkı inekte, MBL-1 geninde bulunan üç SNP (1252 G>A, 2534 G>A, 2569 T>C) ile subklinik mastitis üzerine etkisinin lojistik regresyon analizi ile araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. Gereç ve Yöntem

### Hayvan materyali ve Kaliforniya mastitis testi:

Çalışmada hepsi ikinci laktasyonda olan toplam 309 baş sağmal Simental ırkı inek incelendi. Çalışma materyalini oluşturan ineklerin subklinik mastitis teşhisi çiftlik şartlarında CMT ile yapıldı ve sonuçlar mastitis pozitif

(1) ve negatif (0) şeklinde kaydedildi. CMT muayene sonucunda her 4 meme lobu da CMT (-) olanlar negatif, herhangi bir meme lobunda pozitif sonuç veren inekler pozitif olarak değerlendirildi. CMT testleri çiftliklere ait rutin kontrol şartlarında yapıldı.

### Genetik analizler:

Genetik analizlerde kullanılacak DNA'lar, çiftlik şartlarında rutin tanı ve kontrol amacıyla Vena jugularis'ten K3EDTA'lı, vakumlu tüplere alınan ve laboratuvar şartlarında muhafaza edilen kanlardan elde edildi. Elde edilen kanlardan Standart fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemi ile DNA izolasyonu yapıldı (36). İzole edilen DNA'lar ile kurulacak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için Yuan ve ark (31) tarafından Tablo 1'de verilen primerler kullanıldı.

Yapılan PCR işlemi için toplam reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde; 1 X tampon solüsyonu, dNTP (0.25 mmol/l), MgCl<sub>2</sub> (2.0 mmol/L), 0.5 U Taq DNA polimeraz ve 3 µl DNA (50 ng/µl) eklenerek hazırlandı. PCR reaksiyonu; 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon, 95 °C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 30 saniye olacak şekilde toplamda 35 döngüyü takiben 7 dakika 72 °C'de tutularak tamamlandı. "Elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzim kesim protokolleri üretici firmanın (Thermo) protokolüne göre gerçekleştirildi

**Tablo 1:** İncelenen SNP'lere ait primerler dizileri, bölge, bağlanma sıcaklığı, genotipler ve kesim enzimi

**Table 1:** Primer sequences of the examined SNPs, region, annealing temperature, genotypes and restriction enzymes

SNP	Bölge	Forward ve Reverse Primerler	TA (°C)	AL	Genotip /bç	RE
1252 G>A	Int-1	F: ACCTTGGGTCACCTGCAACAG R: GGTAGTTTAGGCAGCCCTAAAGC	62.5	226 bç	GG: 193,33 GA: 226, 193, 33 AA: 226	<i>AvaII</i>
2534 G>A	Ex-2	F: GTATCCTTCTCAAATACAAAAGAC R: CCCCTGTCTCTATGCTAGAC	52.5	217 bç	GG: 194, 23 GA: 217, 194, 23 AA: 217	<i>MaeII</i>
2569 T>C	Ex-2	F: GTGGTGGCAAATGTTGGCTAAAC R: TGGCTCTCCCTTTTCTCCCTT	63.5	255 bç	TT: 255 TC: 255, 178, 77 CC: 178, 77	<i>HaeIII</i>

TA: Primer bağlanma sıcaklığı; bç: Baz çifti; AL: PCR ürün büyüklüğü; RE: Restriksiyon enzimi; Int: Intron; Ex: Ekzon

Elde edilen PCR ürünlerinin bant büyüklükleri, primer bağlanma sıcaklığı (TA), kesim enzimleri ve elde edilen parça büyüklükleri Tablo 1'de bildirilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzim kesim protokolleri üretici firmanın (Thermo) protokolüne göre gerçekleştirildi.

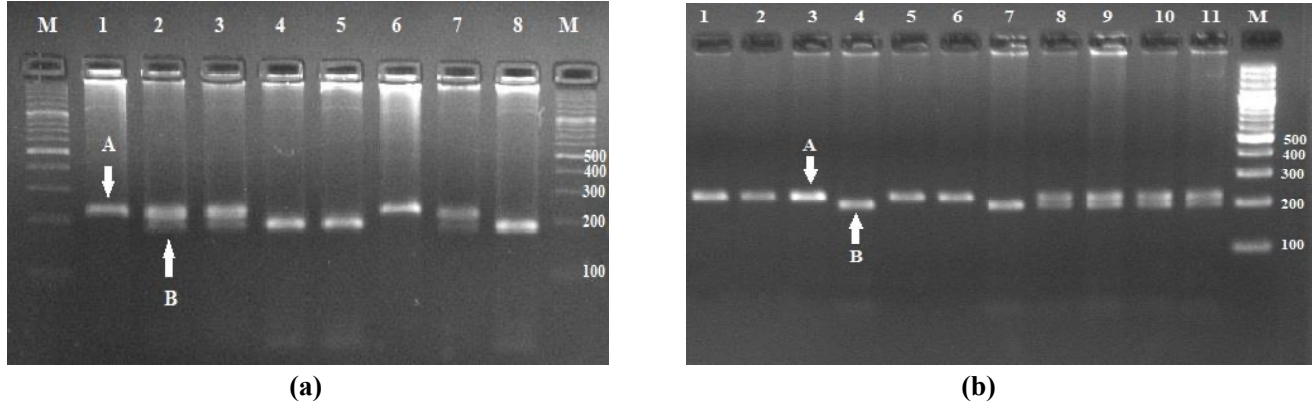
### İstatistiksel analiz:

Bu çalışmada incelenen Simental ırkı ineklerin MBL-1 geninde bulunan üç SNP (1252G>A, 2534 G>A ve 2569 T>C) yönünden Hardy-Weinberg (H-W) dengesinde olup olmadığı ki-kare uyum iyiliği testi ile belirlendi. Çalışmadaki 309 baş ineğin subklinik mastitis durumları CMT sonuçlarına göre pozitif (1) veya negatif (0) olarak kategorize edilerek kaydedildi. Subklinik mastitis üzerinde genotiplerin etkisi lojistik regresyon analizi ile belirlendi. Tek değişkenli modeldeki değişkenlerin anlamlılık düzeyi, Wald istatistikleri kullanılarak değerlendirildi. Tek değişkenli lojistik modellerin katsayıları maksimum olabilirlik tahmin yöntemi kullanılarak hesaplandı. Modellerin sınıflandırma başarı oranı [tahmin edilen olasılıklar ve modelin subklinik mastitis pozitif (+) ve negatif (-) inekleri ayırma yeteneği] belirlendi. Modeller, olasılık oranları [OR, Exp (β)] kullanılarak yorumlandı. İstatistiksel analizler SPSS for Windows 14.01 (Lisans No: 9869264) yazılımı ile yapıldı.

### 3. Bulgular

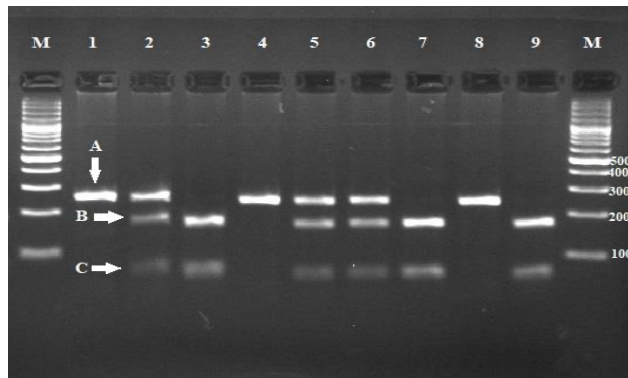
#### Genotip ve fenotip verileri:

Restriksiyon enzim kesimi sonucu, MBL-1 geninin intron 1’de bulunan 1252G>A kodlu SNP yönünden incelenen Simental ırkı ineklerin polimorfik olduğu ve incelenen örneklerde AA, GA ve GG olarak adlandırılan üç genotipin bulunduğu belirlendi (Şekil 1a).



**Şekil 1 a)** 1252 G>A SNP için PCR-RFLP ürünlerinin jel-elektroforez görüntüsü; M: 100 bç’lik DNA merdiveni; A: 193 bç; B: 226 bç; GG: 4, 5, 8; GA: 2, 3, 7; AA: 1, 6. **b)** 2534 G>A için PCR-RFLP ürünlerinin jel-elektroforez görüntüsü; M: 100 bç’lik DNA merdiveni A: 217; B: 194; AA:1, 2, 3, 5, 6; GA: 8, 9, 10, 11; GG: 4, 7.

**Figure 1 a)** Gel-electrophoresis image of restricted PCR products for 1252 G>A SNP; M: Marker with 100 base pairs; A:193 bp ; B:226 bp; GG: 4, 5, 8; GA: 2, 3, 7; AA: 1, 6. **b)** Gel-electrophoresis image of restricted PCR products for 2534 G>A; M: Marker with100 base pairs. A: 217; B: 194; AA: 1, 2, 3, 5, 6; GA: 8, 9, 10, 11; GG: 4, 7.



**Şekil 2:** 2569 T>C için PCR-RFLP ürünlerinin jel-elektroforez görüntüsü; M: 100 bç’lik DNA merdiveni; A: 255; B: 178; C: 77; TT: 1; TC: 2, 5, 6; CC: 3, 7, 9.

**Figure 2:** Gel-electrophoresis image of restricted PCR products for 2569 T>C; M: Marker with100 base pairs. A: 255; B: 178; C: 77; TT: 1; TC: 2, 5, 6; CC: 3, 7, 9.

Kesim reaksiyonu sonucu, incelenen Simental ırkı ineklerin ekzon 2’de bulunan 2534 G>A kodlu SNP için AA, GG ve GA olarak adlandırılan üç genotipin bulunduğu belirlendi (Şekil 1b). Kesim reaksiyonu sonucu, incelenen Simental ırkı ineklerin ekzon 2’de bulunan 2569 T>C kodlu SNP yönünden TT, CC ve TC olarak adlandırılan üç genotipin bulunduğu belirlendi (Şekil 2).

Yapılan ki-kare uyum iyiliği testi sonuçlarına göre incelenen Simental ırkı ineklerin 1252 G>A ve 2569 T>C SNP’leri açısından Hardy Weinberg (H-W) dengesinde olduğu, ancak 2534 G>A açısından H-W dengesinde olmadıkları görüldü (Tablo 2).

**Tablo 2:** Hardy-Weinberg ki-kare uyum iyiliği testi**Table 2:** Goodness of fit test for Hardy-Weinberg Equilibrium

SNP	Genotip Frekansı (Gözlenen Değer)			Allel Frekansı		Ki-kare Analizi (H-W)
	AA	GA	GG	A	G	
1252G>A	AA	GA	GG	A	G	$\chi^2 = 2,069$
	1,6 (5)	15,9 (49)	82,5 (255)	0,096	0,905	p =0,150 (Sd=1)
2534 G>A	AA	GA	GG	A	G	$\chi^2 = 11,330$
	14,2 (44)	58,6 (181)	27,2 (84)	0,435	0,565	p <0,001(Sd =1)
2569 T>C	TT	TC	CC	T	C	$\chi^2 = 0,367$
	29,8 (92)	51,1 (158)	19,1 (59)	0,553	0,447	p =0,545 (Sd =1)

Sd: Serbestlik derecesi

**Tablo 3:** İneklerin subklinik mastitis durumunun genotip frekansları**Table 3:** Genotype frequencies of cows subclinical mastitis status

SNP	GENOTİP	SUBKLİNİK MASTİTİS	
		NEGATİF	POZİTİF
1252G>A	AA	3 (%1,60)	2 (%1,70)
	GA	27 (%14,00)	22 (%19,00)
	GG	163 (%84,50)	92 (%79,30)
2534 G>A	AA	29 (%15,00)	15 (%12,90)
	GA	111 (%57,50)	70 (%60,30)
	GG	53 (%27,50)	31 (%26,70)
2569 T>C	TT	57 (%29,50)	35 (%30,20)
	TC	98 (% 50,80)	60 (%51,70)
	CC	38 (%19,70)	21 (%18,10)

Çalışmada incelenen ineklere ait CMT testi sonucunda ineklerin %37,5'inin testi pozitif, %62,5'i negatif olarak belirlendi. Çalışmada pozitif ve negatif olarak belirlenen ineklere ait incelenen üç SNP yönünden genotip dağılımları Tablo 3'te verilmiştir.

Genotiplenen SNP'ler ile subklinik mastitis arasındaki etkilerinin araştırılması amacıyla tek değişkenli lojistik modeller ile yapılan analiz sonucunda subklinik mastitis üzerine 1252 G>A, 2534 G>A ve 2569 T>C kodlu SNP'lerin istatistiksel olarak anlamlı etkisinin bulunmadığı belirlendi (p> 0,25) (Tablo 4).

**Tablo 4:** Genotiplerin lojistik regresyon modelleri**Table 4:** Logistic regression models of genotypes

SNPs	Genotipler	$\beta$	SE ( $\beta$ )	Wald	p	OR	OR's 95% CI	
							Min	Max
1252 G> A	AA			1,368	0,505			
	GA	0,201	0,957	0,044	0,834	1,222	0,187	7,975
	GG	-0,166	0,922	0,033	0,857	0,847	0,139	5,160
	Constant	-0,405	0,913	0,197	0,657	0,667		
2534 G> A	AA			0,336	0,845			
	GA	0,198	0,353	0,316	0,574	1,219	0,611	2,434
	GG	0,123	0,390	0,099	0,753	1,131	0,526	2,430
	Constant	-0,659	0,318	4,297	0,038	0,517		
2569 T> C	TT			0,118	0,943			
	TC	0,105	0,346	0,092	0,761	1,111	0,563	2,191
	CC	0,102	0,317	0,104	0,747	1,108	0,595	2,064
	Constant	-0,593	0,272	4,757	0,029	0,553		

$\beta$ : Kestirilen eğim katsayısı; SE ( $\beta$ ): Kestirilen eğim katsayısının standart hatası; Wald: Model için eğim katsayılarının sıfıra eşit olup olmadığını test eden Wald istatistiği; p: Wald istatistiğinin p değeri; OR: Kestirilen odds oranı ve buna ait %95 güven aralığı değerleri verilmiştir

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Süt sığır yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara sebep olması nedeniyle mastitise dirençli hayvanların yetiştirilmesi araştırmacılar için ilgi odağı olmuştur. Moretti ve ark. (37) tarafından İtalyan-Holstain boğa spermalarına ait DNA'ların yeni nesil dizileme analizi aracılığı ile incelenmesi sonucu, mastitise dirençle ilişkilendirilen yedi genden birinin de MBL-1 geni olduğu bildirilmiştir. Çalışmada belirlenen genlere ait SNP'lerin, mastitis direnci için gelecekteki genetik seçim için aday olarak düşünülebileceği, ancak diğer süt sığır ırklarındaki varlıklarını ve diğer özelliklerle olası negatif korelasyonlarını değerlendirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (37).

MBL-1 geninde bulunan ve bizim çalışmamızda da genotipleme yapılan bu üç SNP (1252 G>A, 2534 G>A ve 2569 T>C) yönünden Çin'de yetiştirilen Simental ırkı ineklerin incelendiği bir çalışmada; 1252 G>A, 2534 G>A kodlu SNP'ler için G allel frekansının (0,62), 2569 T>C kodlu SNP için ise T allel frekansının (0,67) en yüksek olduğu ve incelen örneklerin sadece 1252 G>A kodlu SNP yönünden H-W dengesinde olduğu bildirilmiştir (31). Yuan ve ark. (31) bulgularına benzer şekilde, Türkiye'de yetiştirilen 309 baş Simental ırkı ineğin incelendiği bu çalışmada da benzer bir sonuç elde edilmiştir (Tablo 2). Bu çalışmada Yuan ve ark. (31) bulgularından farklı olarak 2534 G>A kodlu SNP yönünden incelenen Simental ırkı ineklerin H-W dengesinde olmadıkları gözlenmiştir (Tablo 2). İncelenen popülasyonlar doğal popülasyonlar olmamakla birlikte allel frekanslarında belirlenen benzerlik ile H-W dengesinde belirlenen farklılıkların verim yönünde uygulanan seleksiyondan kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Daha önce Aksel ve ark. (38) tarafından Türkiye’de yetiştirilen 65 baş Simental ırkı sığırın incelendiği çalışmada, 309 baş Simental ırkı ineğin incelendiği bu çalışma ile Yuan ve ark. (31) tarafında yapılan çalışma verilerine uygun şekilde 1252 G>A, kodlu SNP’de G alleli (0,85) frekansı daha yüksek olduğu bildirilmişken; bizim çalışmamız ile Yuan ve ark (31) tarafında yapılan çalışmadan farklı olarak, Aksel ve ark (38) 2534 G>A kodlu SNP yönünden inceledikleri Simental ırkı sığırlarda A allel frekansının (0,52), 2569 T>C kodlu SNP’de ise C allel frekansının (0,63) yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bizim çalışmamız ile Yuan ve ark. (31) tarafında yapılan çalışmadan farklı olarak, Aksel ve ark. (38) inceledikleri Simental ırkı sığırların 1252 G>A kodlu SNP yönünden H-W dengesinden saptığını bildirilmişlerdir. Türkiye’de yetiştirilen 309 baş Simental ırkı ineğin incelendiği bu çalışma ile Yuan ve ark. (31) tarafında yapılan polimorfizm çalışmalarının sonuçlarının, Aksel ve ark. (38) tarafından yapılan çalışmada elde edilen sonuçlardan farklı olmasının örneklenen popülasyonlar arası farktan kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Yuan ve ark. (31) tarafından yapılan çalışmada Holstein ve Simental ırkları ile lokal Sahne ırkında somatik hücre skoru ile bu çalışmada incelenen üç SNP arasındaki ilişki araştırılmış ve 2534 G>A kodlu SNP yönünden GG genotipli bireylerin GA ve AA genotipli bireylere göre daha az somatik hücre skoruna sahip olduğu bildirilmiştir. Aynı gen üzerinde China Holstein, Luxi Yellow ve Bohai Black ırkı sığırlarda yapılan bir başka çalışmada da g.855G>A, g.2651G>A (2534 G>A) ve g.2686T>C kodlu SNP’lerden bu çalışmada da kullanılan g.2651G>A (2534 G>A) kodlu SNP’i ile somatik hücre skoru (32), serum MBL-A konsantrasyonu ve serum CH50 değerleri arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (33). Literatür taramalarında mastitis ile ilişkili bulunduğu bildirilen 2534 G>A SNP’nin (31-33) ve 1252 G>A SNP’sinin subklinik mastitisi belirleme oranının Holştayn ırkı ineklerde % 62.3 olduğu bildirilmiştir (39). Fakat bizim çalışmamızla uyumlu olarak, Asaf ve ark. (40) Hindistan’da Avrupa orijinli Holstein-Friesian, İsviçre Esmeri ve Jersey ırkları ile yerli bir zebu ırkı olan Hariana sığırından geliştirilen melez Vrindavani sığırlarında yapılan bir çalışmada ise bu çalışmada incelenen SNP’lerden 2534 G>A kodlu SNP ile CMT ve SHS ile tanısı yapılan subklinik mastitis arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığını bildirilmişlerdir. Türkiye’de yetiştirilen Simental ırkı sığırların incelendiği bu çalışmada da CMT sonucu subklinik mastitis olarak tanımlanan örnekler lojistik regresyon analizi ile incelenmiş ve SNP’lerin subklinik mastitis üzerine etki payının düşük olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar ile Simental ırkı ineklerde MBL-1 geninde incelenen üç SNP’ye ait genotipik frekanslar belirlenmiştir. İncelenen bu SNP’lerin CMT taraması sonucu subklinik mastitis üzerine etkilerinin istatistiki açıdan önemsiz olduğu belirlenmiştir. Subklinik mastitisin oluşumunda birçok faktörün rol alması genotipik etkinin diğer etkilerden arındırılmasını güçleştirebilir. Diğer taraftan bir türdeki kromozomlara dağılmış olan SNP’lerin, türün tüm ırklarında aynı şekilde etki etmesi beklenemez (41). Bu nedenle elde edilen sonuç ve literatür taramaları bakımından konu ele alındığında mastitis ve subklinik mastitisin incelenen SNP’ler yönünden bazı çalışmalarda ilişkili bulunup bazılarında bulunmayışının netleştirilmesi için farklı ırklarda daha fazla çalışma yapılmasının gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

### **Teşekkür**

Bu çalışmanın materyali olan kanlar ve süt numunelerine ait veriler TYL-2019-8802 ve TYL-2019-8822 kodlu projelerden elde edilmiştir.

### **Çıkar Çatışması Beyanı**

Bu çalışma kapsamında herhangi bir kişisel ve finansal çıkar çatışması yoktur.

### **Finansal Kaynak Beyanı**

Bu çalışma sırasında yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

### Yazar Katkısı Beyanı

Fikir/kavram: Esmâ Gamze Aksel, Aytaç Akçay  
 Deneysel tasarımı: Esmâ Gamze Aksel, Aytaç Akçay, Bilal Akyüz  
 Denetim/Danışmanlık: Aytaç Akçay, Bilal Akyüz  
 Veri toplama: Esmâ Gamze Aksel  
 Veri analizi ve yorum: Aytaç Akçay, Elif Çelik  
 Kaynak taraması: Esmâ Gamze Aksel, Elif Çelik  
 Makalenin yazımı: Esmâ Gamze Aksel, Aytaç Akçay, Elif Çelik, Bilal Akyüz  
 Eleştirel inceleme: Aytaç Akçay, Elif Çelik, Bilal Akyüz

### Etik Onay

Bu makalede yer alan verilerin kullanılmasında Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onay alınmıştır (11/41-2011 ve 18/154-2018). Ayrıca bu makaledeki sunulan verilerin, bilgilerin ve dokümanların akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde edildiği, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçlarının bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunulduğuna dair yazarlardan etik beyan alınmıştır.

### Kaynaklar

1. Awale MM, Dudhatra GB, Kumar A, Chauhan BN, Kamani DR, Modi CM, et al., Bovine mastitis: A threat to the economy. *Sci Rep* 2012;1: 295.
2. Zhang C, Wang Y, Chen H, Gu C, Fang X. SLC11A1 gene polymorphisms are not associated to somatic cell score and milk yield in Chinese Holstein. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;127(3-4):389–292.
3. Heikkilä AM, Nousiainen JI, Pyörälä S. Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *J Dairy Sci* 2012;95:139–150.
4. Della Libera AMMP, Souza FN, Blagitz MG, Batista CF. Evaluation of the indicators of inflammation in the diagnosis of bovine mastitis. *Arq Inst Biol* 2011;78:297–300.
5. Mira CS, Della Libera AMMP, Souza FN, Lima SM, Blagitz MG. Milk cellularity in the diagnosis of intramammary infection in cattle. *Rev Cienc Agrar* 2013;56:7–11.
6. Hertl JA, Schukken YH, Welcome FL, Tauer LW, Gröhn YT. Pathogen specific effects on milk yield in repeated clinical mastitis episodes in Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 2014;97:465–1480.
7. Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q* 2007;29:18–31.
8. Mir AQ, Bansal BK, Gupta DK. Subclinical mastitis in machine milked dairy farms in Punjab: Prevalence, distribution of bacteria and current antibiogram, *Vet World* 2014;7(5):291–294.
9. Gürbulak K, Canoğlu E, Abay M, Atabay O, Bekyürek T. Determination of subclinical mastitis in dairy cows different methods. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2009;15:765–770.
10. Panigrahi M, Sharma A, Bhushan B. Molecular characterization and expression profile of partial TLR4 gene in association to mastitis in crossbred cattle. *Anim Biotechnol* 2014;25(3):188–199.
11. Yang F, Chen F, Li L, Yan L, Badri T, Lv C, et al., Three Novel Players: PTK2B, SYK, and TNFRSF21 Were Identified to Be Involved in the Regulation of Bovine Mastitis Susceptibility via GWAS and Post-transcriptional Analysis. *Front Immunol* 2019;10:1579.
12. Pawlik A, Sender G, Kapera M, Korwin-Kossakowska A. Association between interleukin 8 receptor  $\alpha$  gene (CXCR1) and mastitis in dairy cattle. *Cent Eur J Immunol* 2015;40(2):153–158.
13. Bhattarai D, Chen X, Ur Rehman Z, Hao X, Ullah, F, Dad R, et al. Association of MAP4K4 gene single nucleotide polymorphism with mastitis and milk traits in Chinese Holstein cattle. *J Dairy Res* 2017;84(1):76–79.



14. Prajapati BM, Gupta JP, Pandey DP, Parmar GA, Chaudhari JD. Molecular markers for resistance against infectious diseases of economic importance. *Vet World* 2017;10(1):112–120.
15. Fujita T. Evolution of the lectin–complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:346–353.
16. Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol* 2003;21:547–578.
17. Lillie BN, Brooks AS, Keirstead ND, Hayes MA. Comparative genetics and innate immune functions of collagenous lectins in animals. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;108:97–110.
18. Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev* 2009;230(1):9–21.
19. Heitzeneder S, Seidel M, Forster-Waldl E, Heitger A. Mannan-binding lectin deficiency—goodnews, badnews, doesn'tmatter? *Clin Immunol* 2012;143:22–38.
20. Fraser RS, Lumsden JS, Lillie BN. Identification of polymorphisms in the bovine collagenous lectins and their association with infectious diseases in cattle. *Immunogenetics* 2018;70:533–546.
21. Bohlson SS, Fraser DA, Tenner AJ. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol Immunol* 2007;44(1-3):33–43.
22. Cai YX, Zhang WJ, Xiong SD. Mannose-binding lectin blunts macrophage polarization and ameliorates lupusnephritis. *PLoS One* 2013;8(4):e62465.
23. Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner M. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 1991;337(8757): 1569–1570.
24. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfus Med* 2002;12:335–352.
25. Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2003;37:1496–1505.
26. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 2003;40:423–429.
27. Lillie BN, Keirstead ND, Squires EJ, Hayes MA. Single nucleotide polymorphisms in porcine mannan-binding lectin A. *Immunogenetics* 2006;58:983–993.
28. Phatsara C, Jennen DGJ, Ponsuksili S, Murani E, Tesfaye D, Schellander K, et al.,. Molecular genetic analysis of porcine mannose-binding lectin genes, MBL1 and MBL2, and their association with complement activity. *Int J Immunogenet* 2007;34:55–63.
29. Juul-Madsen HR, Kjaerup RM, Toft C, Henryon M, Heegaard PMH, Berg P, et al.,. Structural gene variants in the porcine mannose-binding lectin 1 (MBL1) gene are associated with low serum MBL-A concentration. *Immunogenetics* 2011;63:309–317.
30. Bergman IM, Sandholm K, NilssonEkdahl K, Okumura N, Uenishi H, Guldbbrandtsen B, et al.,. MBL1 genotypes in wild boar populations from Sweden, Austria, the Czech Republic, and Japan. *Int J Immunogenet* 2012;40:131–139.
31. Yuan Z, Li J, Li J, Gao X, Xu S. SNPs identification and its correlation analysis with milk somatic cell score in bovine MBL1 gene. *Mol Biol Rep* 2013;40(1):7–12.
32. Wang C, Liu M, Li Q, Ju Z, Huang J, Li J. Three novel single-nucleotide polymorphisms of MBL1 gene in Chinese native cattle and their associations with milk performance traits. *Vet Immunol Immunopathol* 2011;139:229–236.
33. Liu J, Ju Z, Li Q, Huang J, Li R, Li J, et al.,. Mannose-binding lectin 1 haplotypes influence serum MBL-A concentration, complement activity, and milk production traits in Chinese Holstein cattle. *Immunogenetics* 2011;63(11):727–742.
34. Hansen S, Holmskov U. Lung surfactant protein D (SP-D) and the molecular divergent descendants: conglutinin, CL-43 and CL-46. *Immunobiology* 2002;205:498–517.

35. Gjerstorff M, Hansen S, Jensen B, Dueholm B, Horn P, Bendixen C, et al.,. The genes encoding bovine SP-A, SP-D, MBL-A, conglutinin, CL-43 and CL-46 form a distinct collectin locus on *Bos taurus* chromosome 28 (BTA28) at position q.1.8- 1.9. *Anim Genet* 2004;35:333–337.
36. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed., New York: Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
37. Moretti R, Soglia D, Chessa S, Sartore S, Finocchiaro R, Rasero R, et al.,. Identification of SNPs Associated with Somatic Cell Score in Candidate Genes in Italian Holstein Friesian Bulls. *Animals* 2021;11(2):366.
38. Aksel EG, Arslan K, Özdemir F, Akyüz B. Türkiye’de yetiştirilen bazı sığır ırklarında MBL-1 gen polimorfizminin araştırılması. *Mediterr Agric Sci* 2019;32(1):25–30.
39. Aksel EG, Akçay A, Arslan K, Sohel M H, Güngör G, Akyüz B. The Effects of MBL1 Gene Polymorphism on Subclinical Mastitis in Holstein Cows. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 2021;27(3):389–395.
40. Asaf VNM, Bhushan B, Panigrahi M, Dewangan P, Kumar A, Kumar P, et al.,. Association study of genetic variants at single nucleotide polymorphism rs109231409 of mannose-binding lectins 1 gene with mastitis susceptibility in Vrindavani crossbred cattle. *Vet World* 2014;7(10):807–810.
41. Wiggans GR, Cole JB, Hubbard SM, Sonstegard TS. Genomic selection in dairy cattle: the USDA experience. *Annu Rev Anim Biosci* 2017;5:309–327.