

بررسی بیان ژن اینترلوکین ۲ در سلول‌های سوماتیکی تلیسه‌های شیری هلشتاین سالم و مبتلا به ورم پستان *E.coli*

Gene expression analysis of *IL-2* in milk somatic cell from normal and *E.coli* mastitis of Holstein dairy heifers

مصطفی محقق دولت‌آبادی^{۱*}، الناز حیدری ارجلو^۲، هاجر السادات حسینی دولت‌آبادی^۲

۱- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

۲- دانشجویان کارشناسی، ارشد ژنتیک و اصلاح دام دانشگاه یاسوج

Muhagheh-Dolatabady M^{1*}, Heidary Arjlo E², Hosseiny Dolatabady H²

1. Associate professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University
2. MSc students, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mmuhagheh@yu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۰۳)

چکیده

ورم پستان پر هزینه‌ترین بیماری در گاوهای شیری بوده که معمولاً در پاسخ به عفونت باکتریایی داخل غدد پستانی ایجاد می‌شود. شناسایی ژن‌هایی که بیان آن‌ها در پاسخ به این عفونت‌های باکتریایی تغییر می‌کنند و گروه‌بندی این ژن‌ها بر اساس نقش‌های بیولوژیکی آن‌ها در فهم پاسخ میزبان به نوع پاتوژن کمک بسزایی می‌کند. از این رو، هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان ژن اینترلوکین ۲ در تلیسه‌های شیری سالم در سه مرحله شیردهی (اوایل، اواسط و اواخر دوره‌ی شیردهی) و دام‌های مبتلا به ورم پستان کلینیکی *E. coli* در تلیسه‌های شیری هلشتاین بود. بدین منظور RNA کل از سلول‌های سوماتیکی نمونه‌های شیر ۱۸ دام سالم (۶ نمونه برای هر مرحله) و ۴ دام مبتلا به ورم پستان ناشی از باکتری *E. coli* استخراج شد و بیان ژن اینترلوکین ۲ با ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن مرجع مورد مقایسه قرار گرفت. برای آنالیزهای بیان ژن مورد نظر از برنامه REST, 2009, V2.0.13 استفاده شد. نتایج این مطالعه افزایش معنی‌دار بیان ژن اینترلوکین ۲ در گاوهای ورم پستانی نسبت به تمام مراحل شیردهی دام‌های سالم را نشان داد. حداکثر و حداقل تفاوت بیان به ترتیب برای مراحل اوایل و اواخر شیردهی در دام‌های سالم مشاهده شد. به‌طور کلی نتایج مطالعه این نشان داد که امکان تأیید تغییر بیان ژن اینترلوکین ۲ در تلیسه‌های شیری سالم و مبتلا به ورم پستان *E. coli* وجود داشته و ژن اینترلوکین ۲ ممکن است نقش مهمی در مبارزه با عفونت داخل پستانی ایجاد شده توسط *E. coli* بازی کند.

واژه‌های کلیدی

اینترلوکین ۲
بیان ژن
تلیسه‌های هلشتاین
ژن مرجع
ورم پستان

مقدمه

یکی از مهم‌ترین راهکارهای افزایش بازدهی تولیدات دامی، استفاده از برنامه‌های اصلاح نژادی برای افزایش پتانسیل ژنتیکی دام‌ها می‌باشد. در دهه گذشته، استفاده از اطلاعات ژنومی به‌عنوان یک ابزار قوی در برنامه‌های اصلاح نژاد استفاده شده است و توسعه و افزایش تمرکز روی برنامه‌های انتخاب کارآمد، بهبود ژنتیکی در تعدادی از نژادها را سرعت بخشیده است (Groeneveld et al. 2010). یکی از راهکارهای به‌کارگرفته برای افزایش پتانسیل ژنتیکی، بررسی تأثیر میزان بیان ژن‌های کاندیدا بر صفات اقتصادی دام در جمعیت می‌باشد. ژن‌های کاندیدا ژن‌هایی هستند که قبلاً شناسایی شده‌اند و نقش زیستی شناخته شده در چرخه‌های فیزیولوژی داشته و می‌توانند صفات مورد نظر را تحت تأثیر قرار دهند. ژن‌های کاندیدا یا به‌طور مستقیم صفت مورد نظر را تحت تأثیر قرار می‌دهند یا با ژن‌های اثرگذار بر صفت مورد بررسی همبستگی دارند (Taylor et al. 1997). تشخیص و بررسی ژن‌های کاندیدایی که مقاومت به بیماری را تنظیم می‌کنند و همچنین ارتباط این ژن‌ها با صفات تولیدی، دانش ما را در مورد مقاومت ژنتیکی به بیماری‌ها افزایش می‌دهد (Ghebremicael et al. 2008).

امروزه به‌دلیل افزایش تقاضای مصرف کنندگان برای محصولات زیستی و سالم، توجه به سلامت حیوان اهمیت فزاینده‌ای یافته است. از جمله بیماری‌های شایع و پرهزینه در صنعت دام شیری می‌توان به ورم پستان اشاره نمود که باعث ضررهای متعدد اقتصادی از جمله کاهش تولید شیر، حذف زود هنگام دام از گله، و هزینه‌های بالای درمان می‌شود. از نظر ژنتیکی حساسیت به این بیماری می‌تواند تحت تأثیر عوامل پیچیده و ژن‌های متعددی بوده و به‌همین دلیل مقاومت به ورم پستان هدف مهمی در برنامه‌های اصلاح نژاد گاو شیری است (Citek et al. 2011; Ju et al. 2018; Prendiville et al. 2010). اگرچه روش‌های مدیریت در بروز این بیماری و مهار آن نقش مهمی را ایفا می‌کند، برنامه‌های اصلاح نژادی جدید جهت افزایش مقاومت در مقابل ورم پستان در گله‌های شیرده می‌تواند بدون تغییر در میزان تولید شیر کمک به‌سزایی بکند (Beecher et al. 2010). در این راستا، یکی از ژن‌های مؤثر بر صفات اقتصادی در گله‌های شیرده، ژن اینترلوکین

۲ است. این ژن متعلق به خانواده‌ای به نام سیتوکین بوده و در تنظیم نوع و میزان پاسخ‌های ایمنی در عفونت نقش محوری دارند. این ژن ارتباط معنی‌داری با بیماری‌هایی نظیر ورم پستان در گاو، تریپانوزومیوز در گاو، انسان و موش، ایدز و لشمینوز و عفونت با عامل تریپانوز کروز دارد (Prakash et al. 2010). تزریق اینترلوکین ۲ به درون پستان‌های عفونی منجر به یک افزایش معنی‌دار در توان سامانه ایمنی می‌شود که به‌وسیله سلول‌های بدنی، لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها، ائوزینوفیل‌ها بیان می‌شود (Alluwaimi. 2004). ارتباط این ژن با صفات تولیدی شیر و تعداد سلول‌های بدنی در بسیاری از پژوهش‌ها مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج حاصل نشان می‌دهد که احتمالاً می‌توان از این ژن به‌عنوان یک نشانگر ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد. به‌طور کلی انتخاب جهت افزایش تولید شیر در نژاد هلشتاین منجر به افزایش فراوانی ژن‌های مؤثر بر صفات تولید شیر شده که به نوبه خود فراوانی آللی در ژن‌های مربوط به مقاومت به بیماری‌ها مانند ژن اینترلوکین ۲ تغییر می‌کند و در نهایت منجر به افزایش حساسیت این نژاد به بسیاری از بیماری‌ها مانند ورم پستان می‌شود. از این رو، هدف از پژوهش حاضر بررسی بیان ژن اینترلوکین ۲ در تلیسه‌های شیری سالم و مبتلا به ورم پستان بالینی کشور می‌باشد و انتظار می‌رود از نتایج آن بتوان در برنامه‌های اصلاح نژادی بهره برد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۶ دام سالم در اوایل شیردهی (۱۰-۷ روز پس از زایش)، ۶ دام سالم در اواسط شیردهی (۱۵۰-۱۴۰ روز پس از زایش)، ۶ دام سالم در اواخر شیردهی (۲۹۵-۲۹۰ روز پس از زایش) و ۶ گاو مبتلا به ورم پستان بالینی بر اساس نظر دامپزشک از گاوداری بنیاد مستضعفان استان کهگیلویه و بویر احمد انتخاب شدند. مقدار مناسب شیر مورد نیاز برای استخراج RNA در این آزمایش ۱۰۰۰ میلی‌لیتر تعیین شد زیرا در این مقدار پلت سلولی و RNA بهتر و بیشتری استخراج می‌شد.

جهت استخراج RNA باید سلول‌های سوماتیکی شیر جداسازی شوند. برای این منظور مقدار ۱۰۰۰ میلی‌لیتر شیر هر گاو به مدت

همچنین کیفیت cDNA سنتز شده با استفاده از ژل آگارز ۱/۲ درصد تعیین شد.

برای بررسی بیان ژن هدف و مرجع از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد (Leutenegger et al. 2000) که ویژگی‌های آن‌ها در جدول ۱ آمده است. برای واکنش Real time PCR از مسترمیکس سیناژن q-RT-PCR استفاده شد. برای هر نمونه نیز دو تیوب به منظور دو تکرار در نظر گرفته شد که در هر تیوب ۴ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، یک میکرولیتر آغازگر رفت با غلظت ۵ پیکومول، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت با غلظت ۵ پیکومول، ۱ میکرولیتر cDNA سنتز شده و ۳ میکرولیتر آب DNaseFree به هر میکروتیوب اضافه شد که در کل حجم نهایی هر تیوب ۱۰ میکرولیتر بود. به منظور تشخیص آلودگی، کاهش خطا و افزایش دقت دو نمونه NTC و NTR برای هر نمونه به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شدند. برای نمونه NTC تمامی اجزای واکنش PCR به غیر از cDNA در یک تیوب به‌خوبی مخلوط می‌شوند. در نمونه NTR، به جای cDNA از RNA استخراج شده هر نمونه استفاده می‌شود. اگر دستگاه برای نمونه‌های NTC و NTR عددی ارائه دهد نشان دهنده وجود آلودگی در نمونه‌ها می‌باشد. در تکنیک PCR کمی به‌منظور کمی‌سازی داده‌های حاصل از اندازه‌گیری سطوح mRNA می‌توان میزان mRNA ژن هدف را نسبت به میزان mRNA یک ژن رفرنس داخلی مورد سنجش قرار داد. برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده برای Real time PCR برای ژن‌های *GAPDH* و اینترلوکین ۲ شامل دمای ۵۰°C برای مدت ۲۰ ثانیه، ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵°C، ۴۰ چرخه در شرایط دمایی ۹۵°C برای ۱۵ ثانیه و دمای ۶۰°C به مدت ۶۰ ثانیه بود (Leutenegger et al. 2000).

۲۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ فاز بالایی سلول پلت دور ریخته شد و ۳ میلی‌لیتر بافر PBS 1X به پلت باقی‌مانده اضافه و پس از انحلال کامل پلت، مرحله شستشوی پلت با سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰ g و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. این مرحله شست و شو ۲ مرتبه تکرار شد و پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر از بافر PBS-EDTA (SSPE) 1X به پلت اضافه شد و با انحلال کامل پلت، نمونه‌ها به درون میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری استریل شده منتقل شدند. در نهایت استخراج RNA از سلول‌های پلت با استفاده از کیت ستونی دنایست و بر اساس دستورالعمل شرکت انجام گرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. همچنین جهت شناسایی عامل بیماری‌زا از نمونه‌های شیر استفاده و با جداسازی باکتری‌ها در محیط‌های کشت اختصاصی عامل ایجاد ورم پستان در دام‌های مبتلا شناسایی شد.

برای سنتز cDNA در این آزمایش از مسترمیکس لیوفیلیزه بایونیز شرکت تکاپوزیست استفاده شد. بدین منظور مقدار ۱۰ پیکومول از آغازگر تصادفی هگزامر به‌همراه ۲ میکرولیتر RNA استخراج شده به میکروتیوب‌های حاوی مسترمیکس اضافه شد و نهایتاً حجم نهایی مواد افزوده شده به میکروتیوب توسط آب RNase Free به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از مخلوط کامل، برای سنتز cDNA برنامه حرارتی دمای ۱۵°C برای ۱ دقیقه، دمای ۵۰°C برای ۶۰ دقیقه و دمای ۹۰°C برای ۵ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. پس از سنتز، cDNA در دمای ۲۰- نگهداری شدند.

جدول ۱- خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

ژن	شماره دسترسی	آغازگر	توالی	طول (bp)
Gene	Access. No	Primer	Sequence	Length(bp)
<i>GAPDH</i>	AF022183	GAPDH.463f	5'-GGCGTGAACACGAGAAGTATAA-3'	120
		GAPDH.582r	5'-CCCTCCACGATGCCAAAGT-3'	
<i>IL-2</i>	M12791	IL-2.107f	5'-GGATTACAGTTGCTTTTGGAGAAA-3'	165
		IL-2.271r	5'-GCACTTCTCTAGAAGTTGAGTTCTT-3'	

جدول ۲- بیان ژن اینترلوکین ۲ در تلیسه‌های مبتلا به ورم پستان بالینی ناشی از

<i>E. coli</i> نسبت به دام‌های سالم در مراحل مختلف شیردهی			
نتایج	P value	میزان بیان	مراحل شیردهی
افزایش	۰/۰۰۱**	۳۱۹/۲۰	اوایل
افزایش	۰/۰۱۴*	۴/۶۲	اواسط
افزایش	۰/۰۰۹**	۷۴/۸۹	اواخر

تاکنون مطالعات متعددی در زمینه بررسی بیان ژن‌های سیتوکین در مراحل مخلف شیردهی و همچنین در دام‌های مبتلا به ورم پستان جهت تجزیه و تحلیل پاسخ ایمنی در گاوهای شیری انجام شده است (Alluwaimi et al. 2002; Rania and Helmy, 2016). برای مثال، فعالیت رونویسی سیتوکین‌ها در ۷، ۲۴ و ۳۲ ساعت پس از عفونت غدد پستانی در گاوهای شیری مورد بررسی و مشخص شد که در تمام زمان‌ها، اینترلوکین ۶ و اینترلوکین ۲ در پایین‌ترین سطح بیانی بودند (Alluwaimi et al. 2002) که بر اساس میانگین Cp (۳۳) در تحقیق حاضر، با یکدیگر همخوانی دارند. به عبارت دیگر علیرغم تفاوت معنی‌دار بیان اینترلوکین ۲ در دام‌های مبتلا به ورم پستان نسبت به دام‌های سالم، ولی میزان بیان این ژن در هر دو گروه پایین بود. در تحقیق دیگری بیان ژن‌های اینترلوکین ۱-آلفا، اینترلوکین ۱-بتا، اینترلوکین ۲، اینترلوکین ۴، اینترلوکین ۶، اینترلوکین ۸، اینترلوکین ۱۰، اینترلوکین ۱۲، اینترفرون گاما و فاکتور نکروزه کننده‌ی تومور آلفا در سلول‌های شیر از گاوهای دو هفته قبل از زایش و گاوهایی که در اواسط دوره‌ی شیردهی بودند با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت (Alluwaimi et al. 2007). در دوره‌ی قبل از زایش همه‌ی سیتوکین‌ها به جز اینترلوکین ۱۲ در سلول‌های شیر شناسایی شدند در حالی‌که در سلول‌های شیر در اواسط دوره‌ی شیردهی cDNA سیتوکین‌های اینترلوکین ۲، اینترلوکین ۴ و اینترلوکین ۱۲ موفق به شناسایی نشدند که در مطالعه ما بیان اینترلوکین ۲ در اواسط شیردهی قابل تشخیص و بالاتر از اوایل شیردهی بود.

در نهایت مقایسه بیان ژن در دام‌های سالم و مبتلا به ورم پستان با استفاده از برنامه REST و بر اساس تفاوت n- برای بیان ژن اینترلوکین ۲ در دام‌های مبتلا به ورم پستان نسبت به دام‌های سالم در مراحل مختلف شیردهی محاسبه شد (Pfaffl et al. 2002).

نتایج و بحث

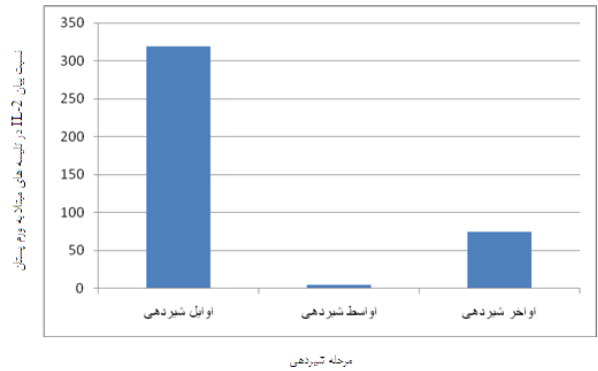
پس از شناسایی عمل بیماری‌زایی در تلیسه‌های مبتلا به ورم پستان بالینی در ۶ راس دام مبتلا، عامل بیماری‌زایی در ۴ راس باکتری *E. coli* و در ۲ راس از تلیسه‌ها باکتری‌های دیگر بودند که برای کاهش خطا از ۴ راس تلیسه مبتلا به ورم پستان با عامل بیماری‌زایی *E. coli* جهت ادامه تحقیق استفاده شدند. نمودار ارائه شده توسط RT-PCR برای هر دو ژن معرف استفاده مناسب آغازگرها و شرایط تکثیر برای ژن‌های این مطالعه بود. همچنین تجزیه و تحلیل منحنی ذوب در انتهای هر واکنش تنها یک پیک را نشان داد که خود معرف فقدان پرایمر دایمر در طول واکنش و تکثیر تخصصی قطعه مورد نظر می‌باشد. در روش تعیین کمی بیان ژن تصحیح تغییرات آزمایشی ضروری می‌باشد. برای این منظور در این مطالعه، از یک ژن کنترل داخلی، GAPDH، در دو گروه دام سالم و مبتلا به بیماری ورم پستان، استفاده شد. مقایسه بیان ژن اینترلوکین ۲ در دام‌های مبتلا به بیماری ورم پستان نسبت به دام‌های سالم در تمام مراحل شیردهی افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$). همان‌طور که اعداد جدول ۲- نشان می‌دهد بیان ژن اینترلوکین ۲ در دام‌های مبتلا به ورم پستان در مقایسه با دام‌های سالم در تمام مراحل شیردهی افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد که بیشترین اختلاف با اوایل شیردهی با ۳۱۹/۲۰ برابر و کمترین اختلاف را با بیان ژن در دام‌های اواسط دوره شیردهی با ۴/۶۲ برابر نشان می‌دهد (نمودار ۱). بر اساس داده‌های جدول کمترین میزان بیان ژن اینترلوکین ۲ در دام‌های سالم در اوایل مرحله شیردهی و بیشترین بیان در اواسط شیردهی در دام‌های سالم رخ داده بود.

قرار گرفت و اینترلوکین ۲ در هیچ کدام از نمونه‌ها مشاهده نشد (Leutenegger et al. 2000). سطح فعالیت اینترلوکین ۲ در ترشحات غده‌ی پستانی در طول هفته‌ی آخر بارداری در مقایسه با سطح تعیین شده‌ی ۲ هفته قبل از زایش پایین تر بود و بالاترین سطح فعالیت اینترلوکین ۲ در ترشحات غدد پستانی حدود ۱۴ روز قبل از زایمان مشاهده شد (Sordillo et al. 1991). از این رو کاهش سطح این سیتوکین با کاهش عملکرد سلول‌های ایمنی و افزایش استعداد ابتلا به ورم پستان در ارتباط می‌باشد. پروفیل بیان سیتوکین‌های اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما و سیتوکین‌های مختلف دیگر در کشت سلولی سلول‌های غدد پستان گزارش شدند (Okada et al. 1997). از سوی دیگر، هیچ‌گونه mRNA از اینترلوکین ۲ در گاوهای سالم و مبتلا به ورم پستان ناشی از *Staphylococcus aureus* مشاهده نشد (Taylor et al. 1997)، در حالی که mRNA اینترفرون گاما در تمام نمونه‌های آزمایش شده گزارش شد (Sordillo et al. 1991). همچنین، تفاوت معنی‌داری برای بیان ژن اینترلوکین ۲ در گاوهای کراس برد سالم و مبتلا به ورم پستان مشاهده نشد (Fonseca et al. 2011). در مطالعه دیگری، سلول‌های اپیتلیال غدد پستانی گاو را در محیط کشت با لیپوپلی ساکارید تحریک کردند که با بررسی پروفیل بیانی سیتوکین‌ها، افزایش معنی‌داری برای ژن اینترلوکین ۲ گزارش نشد (Didier and Kessel. 2004).

به‌طور کلی در این تحقیق علیرغم بیان نسبتاً پایین اینترلوکین ۲ در هر دو گروه تلیسه سالم و مبتلا به ورم پستان، تفاوت معنی‌دار بیان ژن اینترلوکین ۲ در دام‌های دارای ورم پستان بالینی نسبت به دام‌های سالم آشکار شد که از آن می‌توان به فهم بهتر نقش ایمنی اینترلوکین-۲ در سیستم دفاعی غدد پستان استفاده کرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه یاسوج جهت تامین هزینه‌های این پژوهش تقدیر و سپاسگزاری می‌شود.



شکل ۱- نسبت بیان ژن اینترلوکین ۲ تلیسه‌های مبتلا به ورم پستان در مقایسه به تلیسه‌ها سالم در مراحل مختلف شیردهی

به‌منظور مشخص کردن بیان ژن‌های مرتبط با مکانیسم‌های پاسخ ایمنی به ورم پستان، بیان نسبی اینترلوکین ۲، اینترلوکین ۴، اینترلوکین ۶، اینترلوکین ۸، اینترلوکین ۱۰، اینترفرون گاما، فاکتور نکروزه‌کننده‌ی تومور آلفا در سلول‌های بدنی شیر گاوهای سالم و گاوهای مبتلا به ورم پستان با استفاده از روش Real-Time PCR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Fonseca et al. 2009). با یک تفاوت معنی‌دار برای ژن‌های اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما در میان گاوهای سالم، گاوهای هلشتاین تمایل به بیان بالاتری از تمام ژن‌های مورد مطالعه داشتند. برای حیوانات مبتلا به ورم پستان در بیان ژن‌ها بین ۲ نژاد گاو هلشتاین و گاو جبر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. مقایسه حیوانات ۲ نژاد عاری از ورم پستان بیان پایین‌تری از اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما را در گاوهای جبر نشان دادند (Fonseca et al. 2009). همچنین فعالیت رونویسی سیتوکین‌های گاوی با استفاده از روش Taq Man-qPCR در سلول‌های بدنی شیر در اواسط و اواخر دوره‌ی شیردهی مورد بررسی قرار گرفت (Alluwaimi and Cullor. 2002). سطح رونویسی اینترلوکین ۶ و اینترلوکین ۲ در میان سیتوکین‌های مورد مطالعه کمترین میزان بود، اگر چه فعالیت رونویسی اینترلوکین ۲ افزایش معنی‌دار و قابل توجهی را در اواخر دوره‌ی شیردهی نشان داد که با نتایج این مطالعه که بیان اینترلوکین-۲ در اواخر نسبت به اواسط پایین تر بود، در تضاد است. در مطالعه‌ی دیگر، بیان سیتوکین‌ها در سلول‌های بدنی شیر گاوهای هلشتاین سالم در اواسط دوره‌ی شیردهی مورد بررسی

منابع

- Alluwaimi AM, Leutenegger CM, Farver TB, Rossitto PV, Smith WL, Cullor JS (2003) The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 50:105-111.
- Alluwaimi AM, Cullor JS (2002) Cytokines gene expression patterns of bovine milk during middle and late stages of lactation. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 49: 105-110.
- Alluwaimi AM (2004) The cytokines of bovine mammary gland: Prospects for diagnosis and therapy. *Research in Veterinary Science* 77:211- 222.
- Alluwaimi AM (2007) The bovine mammary glands cytokines at the periparturient period. *Scientific Journal of King Faisal University* 8:121-130.
- Beecher C, Daly M, Childs S, Berry DP, Magee DA, McCarthy TV, Giblin L (2010) Polymorphism in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. *BMC Genetic* 11: 99.
- Číték J, Rehout V, Hanusová L, Míková A, Jaskova I (2011) Polymorphisms in *CGIL4*, breeding value for somatic cell count and resistance to mastitis. *Czech Journal of Animal Science* 7:301-304.
- Didier A, Kessel S (2004) Novel in-vitro co-culture system for studies on leukocyte-mammary gland epithelial cell cross-talk. *Milchwissenschaft* 59:236-239.
- Fonseca I, Antunes GR, Paiva DS, Lange CC, Guimarães SE, Martins MF (2011) Differential expression of genes during mastitis in Holstein-Zebu crossbreeds dairy cows. *Genetic and Molecular Research* 10:1295-1303.
- Fonseca, I., Vendramini, P. S., Lange, C. C., Marta, F. M., Weller MM DC A, Sousa KR S, Lopes PS, Guimarães JD, Guimarães EF (2009) Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. *Genetics and Molecular Biology* 32: 776-781.
- Ghebremicael SB, Hasenstein JR, Lamont SJ (2008) Association of interleukin-10 cluster gene and salmonella response in the chicken. *Poultry Science* 87: 22- 26.
- Groeneveld LF, Lenstra JA, Eding H, Toro MA, Scherf B, Pilling D, Negrini R, Finlay EK, Jianlin H, Groeneveld E, Weigend S (2010) Genetic diversity in farm animals—a review. *Animal Genetics* 41:6-31.
- Ju Z, Wang C, Wang X, Yang C, Zhang Y, Sun Y, Jiang Q, Li R, Li J, Zhong J, Huang J (2018) The effect of the SNP g. 18475 A> G in the 3' UTR of *NCF4* on mastitis susceptibility in dairy cattle. *Cell Stress and Chaperones* 1:1-7.
- Leutenegger CM, Alluwaimi AM, Smith WL, Perani L, Cullor JS. (2000) Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan® polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 77: 275-287.
- Okada H, Ito T, Ohtsuka H, Kirisawa R, Iwai H, Yamashita K, Yoshino TO, Rosol TJ (1997) Detection of interleukin-1 and interleukin-6 on cryopreserved bovine mammary epithelial cells in vitro. *Journal of Veterinary Medical science* 59: 503-507.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30:9.
- Prakash V, Bhattacharya TK, Pandey OP (2010) Genetic polymorphism study of promoter region of interleukin-2 gene and its association with certain milk associated traits in Indian crossbred cattle. *Journal of Molecular Genetics* 2:15-19.
- Prendiville R, Pierce KM, Buckley F(2010) A comparison between Holstein-Friesian and jersey dairy cows and their F1 cross with regard to milk yield, somatic cell score, mastitis and milking characteristics under grazing conditions. *Journal of Dairy Science* 93:2741-2750.
- Rania FH, Helmy AT. (2016) Cytokines expression associated with *E. coli* infection in bovine mammary glands. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences* 48: 54-60
- Sordillo LM, Redmond MJ, Campos M, Warren L, Babiuk LA (1991) Cytokine activity in bovine mammary gland secretions during the periparturient period. *Canadian Journal of Veterinary Research* 55: 298-301.
- Taylor BC, Keefe RG, Dellinger JD, Nakamura Y, Cullor JS, Stott JL (1997) T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. *Cellular immunology* 182: 68-76.