

---

**Investigating changes in G-CSF and ISG-15 gene expression in peripheral blood polynuclear cells of dairy cows with normal pregnancy and embryonic death**

**Salar Farshbaf Nobarian<sup>1</sup>, Reza Asadpour<sup>2\*</sup>, Masoumeh Firouzmandi<sup>3</sup>,  
Fereydon Rezazadeh<sup>4</sup>, Shokoufeh Zakeri Rostam<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> MSc graduated of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.  
Email: r\_asadpour@tabrizu.ac.ir; rasdapour4@gmail.com

<sup>3</sup> Associate Professor of Pathobiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>5</sup> MSc graduated of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

---

**Article Info**

**Article type:**  
Research Full Paper

**Article history:**  
Received: 11/06/2023  
Revised: 01/10/2024  
Accepted: 01/16/2024

**Keywords:**  
Embryonic death  
Granulocyte-colony-  
Stimulating factor  
Interferon stimulating gene  
Mononuclear cell  
Peripheral blood

---

**ABSTRACT**

**Background and Objectives:** Pregnancy loss can occur in different stages of pregnancy for various reasons; however, the increase in embryonic mortality in the early stages of pregnancy is currently a concern in the dairy cow industry. Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) is a hematopoietic cytokine that is mainly produced by monocytes and macrophages and causes the proliferation and differentiation of myeloid hematopoietic cells. Interferon-Stimulated Gene-15 (ISG-15) functions as an intracellular ubiquitin homologue and extracellular cytokine that may serve as a surrogate marker for early pregnancy in ruminants. It is assumed that these cytokines increase in the peripheral blood simultaneously with the production of interferons in the uterus. The present study was an attempt to shorten the number of open days in dairy cows by detecting pregnancy in the early stages of pregnancy using cytokines such as G-CSF and ISG-15. Therefore, this study aimed to compare the gene expression changes between pregnant and non-pregnant dairy cows with early or late embryonic death, so that open days can be reduced in dairy cows.

**Material and Methods:** Blood samples from 30 animals with embryonic death (10 cows for each time group) and 30 cows with normal pregnancy (30 cows for each time group) were collected in vacuum tubes containing EDTA anticoagulant on days 15–24, 25–34, and 35–44 after inoculation. Cows were divided into pregnant and non-pregnant groups based on progesterone concentration on day 21, and non-pregnant cows were classified into those with early embryonic death (day 1-26) and late embryonic death (day 26-45). Neutrophils were then extracted from the blood samples, and G-CSF and ISG-15 gene expression was measured using Real-Time PCR.

**Results:** The results showed that the concentration of progesterone in the blood plasma of pregnant cows was significantly higher than that of non-pregnant cows in the time interval of 15 to 24, 25 to 34 and 35 to 44 days after artificial insemination. The concentration of glucose in the blood plasma of pregnant cows between 15 and 24 h

---

( $P < 0.001$ ) was significantly higher in the time intervals of 25 to 34 days and 35 to 44 days, compared to the concentration of glucose in the blood plasma of non-pregnant cows. Cholesterol concentration in the plasma of pregnant cows between 25 and 34 days after artificial insemination (AI) showed a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) from the cholesterol concentration in the blood plasma of non-pregnant cows. Examination of the concentration of triglycerides in the blood plasma of pregnant cows at 15–24, 25–34, and 35–44 days after inoculation showed no statistically significant difference from the concentration of triglycerides in the blood plasma of non-pregnant cows on the same days. The highest level of G-CSF gene expression was observed between days 15 and 24 in the blood neutrophils of pregnant cows. In addition, the highest ISG-15 expression was observed between 35 and 44 days after inoculation.

**Conclusion:** The results of the present study showed that these genes can be used clinically to diagnose early and late embryonic death.

---

**Cite this article:** Farshbaf Nobarian, S., Asadpour, R., Firouzamandi, M., Rezazadeh, F., Zakeri Rostam, Sh. (2024). Studying the effect of Multi-Act on milk production, milk composition, some parameters of blood health and reproduction of Holstein cows. *Journal of Ruminant Research*, 12(3), 1-20.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/ejrr.2024.21881.1923

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

---

## بررسی تغییرات بیان ژن ISG-15 و G-CSF در سلول‌های چند هسته‌ای خون محیطی گاوهای آبستن و مبتلا به مرگ رویانی

سالار فرشایف نوپریان<sup>۱</sup>، رضا اسدپور<sup>۲\*</sup>، معصومه فیروزامندی<sup>۳</sup>، فریدون رضازاده<sup>۴</sup>، شکوفه ذاکری رستم<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، رایانامه: r\_asadpour@tabrizu.ac.ir; rasdapour4@gmail.com

<sup>۳</sup> دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

<sup>۴</sup> دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

<sup>۵</sup> دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	<b>سابقه و هدف:</b> از دست دادن آبستنی در مراحل مختلف آبستنی می‌تواند به دلایل مختلفی اتفاق بیفتد، اما افزایش میزان مرگ و میر رویانی در مراحل اولیه آبستنی یکی از چالش‌های صنعت پرورش گاو شیری در حال حاضر است. محرک کلونی گرانولوسیت‌ها (G-CSF) یکی از سایتوکاین‌های خون‌ساز است که عمدتاً توسط سلول‌های منوسیت و ماکروفاژ تولید و موجب تکثیر و تمایز سلول‌های خون‌ساز می‌لوییدی می‌شود. ISG-15 به عنوان یک همولوگ یویکوتین داخل سلولی و نیز به عنوان یک سایتوکاین خارج سلولی عمل می‌کند که ممکن است به عنوان یک نشانگر اولیه آبستنی در نشخوارکنندگان عمل کند. این سایتوکاین‌ها همزمان با تولید اینترفرون‌ها در رحم در خون محیطی افزایش می‌یابند. در مطالعه حاضر تشخیص آبستنی در مراحل اولیه آن توسط سایتوکاین‌هایی از جمله ISG-15 و G-CSF مورد بررسی قرار گرفت. لذا هدف از این پژوهش، مقایسه تغییرات بیان ژن در دام‌های آبستن، غیرآبستن دچار مرگ زودرس یا دیررس جنینی در گاو شیری است.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۱۵ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۶	<b>واژه‌های کلیدی:</b> ژن محرک تولید اینترفرون‌ها سلول چند هسته‌ای خون محیطی فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت مرگ رویان
	<b>مواد و روش‌ها:</b> نمونه خون از ۳۰ رأس دام مبتلا به مرگ رویانی (برای هر گروه زمانی ۱۰ رأس) و ۳۰ رأس دام آبستن طبیعی (برای هر گروه زمانی ۳۰ رأس) در لوله‌های خلأ حاوی ماده ضد انعقاد EDTA، در روزهای ۱۵ تا ۲۴، ۲۵ تا ۳۴ و ۳۵ تا ۴۴ پس از تلقیح اخذ شد. دام‌ها به دو گروه آبستن و غیرآبستن بر اساس غلظت پروژسترون در روز ۲۱ تقسیم شدند، سپس گاوهای غیرآبستن نیز به دام‌ها با مرگ زودرس جنین (روز ۱ تا ۲۶) و مرگ دیررس جنین (روز ۲۶ تا ۴۵) طبقه‌بندی شدند. سپس نسبت به استخراج نوتروفیل‌ها از نمونه خون اقدام و بیان ژن ISG-15 و G-CSF با استفاده از تکنیک Real-Time PCR اندازه‌گیری شد.
	<b>یافته‌ها:</b> نتایج نشان داد غلظت پروژسترون در پلاسمای خون گاوهای آبستن در فاصله‌ی زمانی ۱۵ تا ۲۴، ۲۴ تا ۳۴ و ۳۵ تا ۴۴ روز بعد از تلقیح مصنوعی به طور معنی‌داری نسبت به گاوهای غیرآبستن بیشتر بود. غلظت گلوکز در پلاسمای خون گاوهای آبستن، در فاصله‌ی زمانی ۱۵ تا ۲۴

نسبت به فواصل زمانی ۲۵ تا ۳۴ و ۳۵ تا ۴۴، به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت گلوکز پلاسمای خون گاوهای غیرآبستن بالاتر بود ( $P < 0/001$ ). غلظت کلاسترول در فاصله‌ی زمانی ۲۵ تا ۳۴ بعد از تلقیح مصنوعی در پلاسمای گاوهای آبستن تفاوت آماری معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) با غلظت کلاسترول در پلاسمای خون گاوهای غیرآبستن داشت. بررسی غلظت تری‌گلیسرید در پلاسمای خون گاو آبستن در فاصله‌ی زمانی ۱۵ تا ۲۴، ۲۵ تا ۳۴ و ۳۵ تا ۴۴ روز بعد از تلقیح تفاوت آماری معنی‌داری با غلظت تری‌گلیسرید پلاسمای خون گاوهای غیرآبستن در همان روزها نداشت ( $P < 0/05$ ). بیشترین مقدار بیان ژن G-CSF در فاصله‌ی زمانی ۱۵ تا ۲۴ در نوتروفیل خون گاوهای آبستن مشاهده شد. همچنین، بیشترین مقدار بیان ژن ISG-15 در فاصله‌ی زمانی ۳۵ تا ۴۴ روز بعد از تلقیح مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد این ژن‌ها می‌توانند به عنوان تشخیص مرگ زودرس و دیررس جنینی کاربرد بالینی داشته باشند.

**استناد:** فرشبات نوبریان، سالار؛ اسدپور، رضا؛ فیروزامندی، معصومه؛ رضازاده، فریدون؛ ذاکری رستم، شکوفه. (۱۴۰۳). بررسی تغییرات بیان ژن G-CSF و ISG-15 در سلول‌های چند هسته‌ای خون محیطی گاوهای آبستن و مبتلا به مرگ رویانی. پژوهش در نشخوارکنندگان، ۱۲ (۳)، ۱-۲۰

DOI: 10.22069/ejrr.2024.21881.1923



© نویسنده‌گان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

## مقدمه

بهبود مدیریت، تغذیه و انتخاب ژنتیکی، صنعت پرورش گاو شیری را به‌طور چشمگیری در جهان تغییر داده است. با این حال، افزایش تولید شیر برای هر گاو همراه با افزایش میزان ناباروری، اثرات منفی بر کارایی تولیدمثل دارد (Lucy, 2001). تلفات آبستنی (مرگ جنینی و رویانی) از دلایل مهم خسارات تولیدمثلی در حیوانات هستند و اثر قوی بر سودبخشی تولیدمثل حیوانات دارند. بیشتر این خسارت‌ها در طی دوره رویانی آبستنی اتفاق می‌افتند. اثر این دوره بر باروری تا تکمیل دوره‌های مختلف ادامه دارد (زمانی که رویان لانه‌گزینی را آغاز کند، جنین نامیده می‌شود)، به علاوه بیشتر خسارات رویانی در اولین روزهای پس از باروری و در طی فرآیند لانه‌گزینی اتفاق می‌افتد (Parmar و همکاران، 2016). میزان مرگ رویانی در گاو حدود 20 تا 40 درصد تخمین زده شده است. «مرگ رویانی» اثر قوی بر باروری حیوان‌های اهلی دارد. بیشتر خسارات ناشی از آسیب‌های جنینی در اولین روزهای باروری و طی فرآیند لانه‌گزینی رخ می‌دهد. دلایل مرگ رویانی به دو دسته عفونی (ویروس، باکتری، پروتوزوا، مایکوپلاسما) و غیر عفونی (ناهنجاری‌های کروموزومی: هاپلوئیدی، پلی پلوئیدی، میکس پلوئیدی) تقسیم می‌شوند. در اغلب موارد بیشتر به موارد عفونی توجه می‌شود. در حالی که دلایل غیر عفونی احتمالاً علت 70 درصد و یا بیشتر موارد مرگ رویانی هستند. عفونت محیط جنینی می‌تواند به دلیل پاتوژن‌های اختصاصی یا غیراختصاصی رحم باشد (Vanroose و همکاران، 2000).

پاتوژن‌های رحمی ممکن است از طریق تغییر محیط رحمی (اندومتریت) یا از طریق اثرات مستقیم سیتولیتیکی روی جنین باعث «مرگ رویانی» شوند. دلایل غیر عفونی مرگ رویانی مانند ناهنجاری‌های

کروموزومی، فاکتورهای خارجی (مانند محدوده دمایی بالا و فاکتورهای غذایی) و فاکتورهای مادری (مانند عدم تعادل هورمونی و سن) چندعاملی هستند که تشخیص آن‌ها سخت است. مرگ‌ومیر زودرس رویانی به معنی مرگ تخمک‌ها و جنین‌های بارور شده تا روز 28 آبستنی در نظر گرفته می‌شود (Diskin و همکاران، 2016؛ Wiltbank و همکاران، 2016؛ Ayalon, 1968؛ Sreenan و Diskin, 1986). روزهای 28 تا 30 معمولاً به عنوان نقطه تنظیمی برای تعیین موفقیت آبستنی استفاده می‌شود، زیرا این اولین زمانی است که آبستنی اتفاق می‌افتد. آبستنی را می‌توان با سونوگرافی ترانس رکتال یا آزمایش خون شیمیایی در یک سناریوی تجاری به‌طور دقیق تشخیص داد. مکانیسم‌هایی که منجر به از دست دادن زود هنگام آبستنی در گاو می‌شوند، به‌ویژه ناهنجاری‌های ژنتیکی، به علت ایجاد ناهمزمانی بین رحم و رویان، سبب ناتوانی در تشخیص آبستنی یا تحلیل زودرس جسم زرد توسط مادر می‌شود (Forde و همکاران، 2015؛ Bridges و همکاران، 2013؛ Morris و Diskin, 2008). حتی اگر این دوره بخش بیشتر نارسایی تولیدمثلی گاو را شامل شود، معمولاً بر طول چرخه فعلی تأثیر نمی‌گذارد، بنابراین تولیدمثل مجدد را به تأخیر نمی‌اندازد. در گاو، مرگ‌ومیر دیررس جنینی معمولاً با مرگ‌ومیر رویان بین روزهای 28 تا 42 مشخص می‌شود (Sheikh و همکاران، 2018). این دوره شامل تغییرات فیزیولوژیکی مهم در طول جفت، اندام‌زایی و انتقال از رویان به جنین است. این دسته از تلفات، معمولاً در مزارع تجاری زمانی که تشخیص آبستنی دوم رخ می‌دهد، تشخیص داده می‌شود. تلفات مرگ رویانی طور متوسط در گاوهای گوشتی 8 درصد و در گاوهای شیری 14 درصد تخمین زده شده است (Pohler و همکاران، 2016؛ Franco و همکاران، 2018). تشخیص به‌موقع آبستنی

به دامداران این امکان را می‌دهد که گاوهای غیرآبستنی را شناسایی کرده و قبل از تخمک ریزی بعدی، این گاوها تحت تلقیح مصنوعی قرار گیرند (Pohler و همکاران، ۲۰۱۶).

در حال حاضر از دو روش برای تشخیص آبستنی در گاو استفاده می‌شود. یک روش از طریق لمس راست‌روده ای برای وجود علائم مثبت آبستنی است که جهت تشخیص جنین بعد از روز ۴۰ تا ۵۰ آبستنی مفید است (Beal و همکاران، ۱۹۹۲؛ Fricke، ۲۰۰۲). با استفاده از لمس راست‌روده ای می‌توان آبستنی را در روز ۳۵ تعیین کرد، اما این امر توصیه نمی‌شود زیرا دست‌کاری رحم و غشاهای جنین می‌تواند منجر به سقط جنین شود (Abbitt و همکاران، ۱۹۷۸؛ Vaillancourt و همکاران، ۱۹۷۹). دومین روش انجام شده برای تشخیص آبستنی سونوگرافی ترانس رکتال است که از روز ۲۷ آبستنی دقیق است، اما همچنین به یک تکنسین ماهر نیز نیاز دارد. هر دو روش به دنبال تشخیص آبستنی توسط مادر که بین روزهای ۱۴ تا ۱۸ در گاو اتفاق می‌افتد، نسبتاً دیر است (Bazer و همکاران، ۱۹۹۱). سایر شاخص‌های محیطی آبستنی در اوایل آبستنی در گاو شامل میزان فاکتور اولیه آبستنی در خون (EPF)؛ (Cordoba و همکاران، ۲۰۰۱، Gandy و همکاران، ۲۰۰۱) و پروتئین B مخصوص آبستنی (PSPB) (Austin و همکاران، ۱۹۹۲) می‌باشند. استفاده از EPF نیز که به‌عنوان عامل آبستنی زودرس یاد می‌شود، به‌عنوان یک روش تشخیصی زود هنگام مشکل‌ساز بوده است. PSPB، هم‌چنین به‌عنوان گلیکوپروتئین مرتبط با آبستنی شناخته می‌شود، در پیش‌بینی آبستنی پس از روز ۳۰ دقیق است (Szenci و همکاران، ۱۹۹۸).

پروتئین B مخصوص آبستنی دارای نیمه عمر طولانی است و چند ماه پس از زایمان در گردش خون باقی می‌ماند و بر PSBP به‌عنوان علامت‌گذاری برای

آبستنی در هنگام تلقیح گاوها قبل از روز ۷۰ پس از زایمان تأثیری می‌گذارد. تشخیص هورمون استروئیدی، پروژسترون، می‌تواند برای تعیین وضعیت آبستنی در گاوها مورد استفاده قرار گیرد. از آنجا که طول بیشتر چرخه‌های فحلی ۱۶ تا ۲۴ روز بوده و به‌طور متوسط ۲۱ روز است، می‌توان از بیشتر گاوهای غیرآبستنی در یک زمان که غلظت پروژسترون کم است، نمونه‌برداری کرد که باعث می‌شود آن‌ها از گاوهای آبستنی که غلظت پروژسترون بالا دارند، قابل تشخیص باشند. با این حال، از آنجا که گاوهای غیرآبستنی نیز ممکن است پروژسترون بالایی داشته باشند، استفاده از آن در پیش‌بینی آبستنی پس از روزهای ۲۱ تا ۲۴ بعد از تلقیح مصنوعی دقیق‌تر است. کانسپتوس سیگنال‌هایی را برای حفظ تولید پروژسترون توسط جسم زرد در اوایل آبستنی آزاد می‌کند. در طول دوره شناخت آبستنی توسط مادر (روزهای ۱۵ تا ۱۸)، کانسپتوس در رحم شناور است. اینترفون تاو (IFN- $\tau$ ) یک سیگنال مهم پاراکرین است که توسط کانسپتوس گاو تولید می‌شود و بر اندومتر عمل می‌کند تا پاسخ‌های ثانویه را که برای حفظ آبستنی ضروری هستند، ایجاد کند. IFN- $\tau$  تولیدشده از کانسپتوس، مسیر انتقال سیگنال را که تنظیم‌کننده تولید پروستاگلاندین  $F2\alpha$  (PGF $2\alpha$ ) است، مختل می‌کند. IFN- $\tau$  همچنین باعث سنتز و ترشح یک همولوگ Ubiquitin (همولوگ UBQ)؛ پروتئین واکنشی متقابل یوبیکویتین) می‌شود که ISG-15 (Interferon-Stimulated Gene 15) نام دارد (همان‌طور که توسط نام ژن HUGO شرح داده شده است) (Han و همکاران، ۲۰۰۶) ISG-15. یک پروتئین شبه یوبیکویتین (Ubl) بوده که از طریق

## 1. Interferon-tau

گیرنده آن در رده سلولی خون‌ساز و همچنین در سایر انواع سلول از جمله فیبروبلاست‌ها، الیگودندروسیت‌ها، تروفوبلاست، اندوتلیال و نئوپلاستیک شناسایی شده‌اند (Baldwin و همکاران، ۱۹۹۳). در بافت‌های تولیدمثل، GM-CSF در بیضه، جفت، رحم، مجرای تخمدان و تخمدان شناسایی شده است (Brännström و همکاران، ۱۹۹۴). GM-CSF در داخل رحم توسط سلول‌های اپی‌تلیال مجرا و غدد بیان می‌شود و متعاقباً در مجرای رحم ترشح می‌شود، جایی که نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها را در طول چرخه فحلی و اوایل آبستنی فعال می‌کند (Robertson و همکاران، ۱۹۹۶). گیرنده GM-CSF در تخمک بارور شده از طریق مرحله بلاستوسیست هم در موش و هم در انسان شناسایی شده است (Sjoblom et al., 2002).

بیان انتخابی GM-CSF در سلول‌های تکا، گرانولوزا و لوتال با اوج رشد فولیکولی، تخمک‌ریزی و لوتئین شدن هم‌زمان است. برخی از نویسندگان گزارش کرده‌اند که غلظت GM-CSF سرم به‌طور قابل توجهی در طول فاز تخمک‌ریزی در مقایسه با تمام مراحل دیگر افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد GM-CSF می‌تواند نقش مهمی در تخمک‌ریزی داشته باشد (Makinoda و همکاران، ۱۹۹۵). GM-CSF، هم‌چنین به‌عنوان CSF2 شناخته می‌شود، یک سایتوکاین لنفاوی خون‌ساز با اثرات مؤثر بر تکثیر و تمایز انواع مختلف سلول است. بیان GM-CSF گیرنده‌های آن در دستگاه تناسلی انسان برای اولین بار در اوایل دهه ۹۰ گزارش شد (Chegini و Zhao، ۱۹۹۴). افزودن GM-CSF به محیط کشت جنین موش سبب افزایش تولید نتاج زنده از جنین‌های انتقال‌یافته می‌شود و تا حدودی اثرات نامطلوب طولانی مدت بر رشد جنین، پس از کشت جنین در شرایط آزمایشگاهی و پس از تولد را کاهش می‌دهد (Sjoblom و همکاران، ۲۰۰۵). این احتمال وجود

عملکرد متوالی سه آنزیم، یعنی آنزیم فعال‌کننده UBE1L، UBCH8، E3 ligase Herc5 به پروتئین‌های هدف متصل می‌شود (Haq و همکاران، ۲۰۱۶). این آنزیم‌ها باعث تحریک تولید IFN- $\tau$  شده که در نهایت منجر به افزایش بیان ژن‌های تحریک‌شده با IFN- $\tau$  از قبیل ISG-15 و 2,5-oligoadenylate synthetase (OAS-1) در رحم و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی می‌شود (Haq و همکاران، ۲۰۱۶). Bazer و همکاران (۲۰۰۸) گزارش دادند که علاوه بر IFN- $\tau$ ، پروژسترون به‌طور مجاز برای القای تولید ISG عمل می‌کند. تنوع بیان mRNA ژن ISG-15 در مراحل اولیه می‌تواند به دلیل تفاوت در رشد، سلامت جنین اولیه باشد که منجر به تولید تأخیری یا افتراقی IFN- $\tau$  می‌شود.

Interferon-Stimulated Gene-15 در آبستنی گاوها (Austin و همکاران، ۲۰۰۴؛ Johnson و همکاران، ۱۹۹۸)، موش‌ها (Austin و همکاران، ۲۰۰۳) و پریمات‌ها (Bebington و همکاران، ۱۹۹۹) القا می‌شود. از آنجا که ISG-15 به‌عنوان یک همولوگ یوبیکوئیتین داخل سلولی و نیز به‌عنوان یک سایتوکاین خارج سلولی عمل می‌کند (Hansen، ۱۹۹۷)، ممکن است به‌عنوان یک نشانگر اولیه تشخیص برای اوایل آبستنی در نشخوارکنندگان عمل کند (Haq و همکاران، ۲۰۱۶).

فاکتور تحریک‌کننده کلونی-گرانولوسیت ماکروفاژ (GM-CSF) یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۱۸ تا ۳۰ کیلو دالتون است (Hill و همکاران، ۱۹۹۵). گیرنده آن از دو زیرواحد  $\alpha$  مخصوص سایتوکاین و دو زیرواحد  $\beta$  مبدل سیگنال تشکیل شده است (Bagley و همکاران، ۱۹۹۷). پس از اتصال، مجموعه گیرنده GM-CSF قادر به تحریک زنده‌مانی، تکثیر و بلوغ سلول‌های خون‌ساز و غیر خون‌ساز است (Zambrano و همکاران، ۲۰۱۰). هم GM-CSF و هم

### مواد و روش‌ها

**حیوانات:** این مطالعه در شرکت دامداری آذر نگین واقع در استان آذربایجان شرقی شهر خسرو شاه، جاده خسرو شاه-تازه کند انجام گرفت. دوشش روزانه با دفعات سه بار به صورت منظم انجام می‌شد. گاوهای تازه زایمان کرده به مدت سه روز تحت مراقبت و در جایگاه مجزا نگهداری می‌شدند. گاوهای شیری توسط جیره کاملاً مخلوط بالانس شده شامل کنسانتره، سیلوی ذرت مرغوب و علوفه تغذیه می‌شدند. این جیره چهار بار در روز به صورت دو بار پس از شیردوشی و دو بار در سایر اوقات داده شد. میزان نمک‌های انیونیک نیز به طور دائم توسط متخصص تغذیه در سطح گله بالانس می‌شد. آب تازه و خنک به صورت نامحدود در آبخوری در اختیار دام قرار می‌گرفت. میانگین سرانه تولید شیر هر گاو  $40/5$  کیلوگرم بود. میانگین روز تا اولین تلقیح مصنوعی، روزهای باز و نرخ آبستنی به ازای اولین تلقیح<sup>۱</sup> به ترتیب برابر با  $83 \pm 5$  روز و  $42/4$  درصد بود. میانگین نمره وضعیت بدنی گاوهای گله  $2/75 \pm 0/25$  بود. میانگین سرانه تولید شیر گاو (گله) حدود  $12400$  کیلوگرم بود. دوره انتظار اختیاری<sup>۲</sup>  $50$  روز برای گاوهای گله در نظر گرفته شد. همه گاوها به صورت روزانه در دو نوبت صبح و عصر، تحت مشاهده تشخیص فحلی قرار گرفته و در صورت مشاهده علائم فحلی در هریک از نوبت‌ها، ۱۲ ساعت بعد تلقیح مصنوعی می‌شدند و گاوهایی که علائم فحلی نشان ندادند با استفاده روش‌های پری سینک اوسینک و دابل اوسینک بر اساس وضعیت تخمدانی همزمان‌سازی فحلی شده سپس در زمان ثابت تلقیح می‌شدند.

دارد که CSF2 در طول دوره قبل از لانه‌گزینی بر بقا تأثیرگذار باشد و بعد از ۳۰-۳۵ روز نشان‌دهنده تغییرات اپی‌ژنوم باشد، نشان می‌دهد که CSF2 ممکن است یکی از مولکول‌هایی باشد که از طریق آن تغییرات در فیزیولوژی مادر منجر به تغییرات در جنین می‌شود. در مجموع، GM-CSF در تنظیم فرآیندهای متعدد مربوط به تولیدمثل، از جمله بلوغ تخمک، پذیرش آندومتر، مهاجم تروفوبلاست و لانه‌گزینی جنین و افزایش میزان آبستنی نقش دارد (Ding و همکاران، ۲۰۲۲).

انجام یک آزمایش تشخیصی زود هنگام برای آبستنی می‌تواند به مدیریت گاوهایی که در روز ۱۸ پس از تلقیح قادر به زنده نگه‌داشتن جنین نیستند، کمک کند. به عنوان مثال، بسیاری از گاوهای شیری پس از اولتراسونوگرافی ترانس رکتال یا تشخیص پروتئین مخصوص آبستنی در روز ۳۰ باید دوباره تلقیح شوند، زیرا پس از تلقیح اول آبستن نیستند. شناسایی گاوهای غیرآبستن در روزهای ۱۸ تا ۲۰ پس از اولین تلقیح، زمینه را برای تلقیح دوم این گاوها، تقریباً ۱۰ روز زودتر از تشخیص آبستنی توسط سونوگرافی ترانس رکتال یا PSPB، تسهیل می‌کند و ضررهای اقتصادی ناشی از افزایش فاصله گوساله‌زایی و حذف دام را کاهش می‌دهد (Lucy, 2001). ما فرض کردیم که سطوح mRNA ژن‌های ISG-15 و GM-CSF در خون از روز ۱۶ تا ۲۳ سیکل فحلی در گاوهای آبستن بیشتر از غیرآبستن است. با توجه به مطالب فوق فرض شد که سطح پایین mRNA ژن-های ISG-15, GM-CSF شاید بتواند به عنوان یک شاخص برای تشخیص گاوهای غیر آبستن باشد. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی تغییرات بیان mRNA ژن‌های ISG-15, GM-CSF در سلول‌های چندهسته‌ای خون محیطی گاوهای آبستن و گاوهای مبتلا به مرگ رویانی می‌باشد.

1. First-service conception rate (FSCR)
2. The voluntary waiting period



نمونه‌های خون به وسیله سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و پلاسما حاصله برای تعیین متابولیت‌های خونی از جمله گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسیرید و پروژسترون در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

#### اندازه‌گیری فاکتورهای متابولیکی

اندازه‌گیری هورمون پروژسترون: جهت تعیین میزان غلظت هورمون پروژسترون از کیت الیزا (RE52231) شرکت IBL ساخت کشور آلمان ( $CV < 10\%$ ) استفاده شد. مراحل انجام آزمایش به شرح زیر می‌باشد. ابتدا  $25 \mu L$  از نمونه را داخل هر چاهک ریخته، سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و بعد از آن  $20 \mu L$  از آنزیم کنژوگه به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۱۰ ثانیه تکان داده و پس از طی ۶۰ دقیقه شست‌وشو صورت گرفت (سه بار و به ازای هر چاهک  $400 \mu L$ ). پس از شست‌وشو  $200 \mu L$  محلول سوپسترا به هر چاهک اضافه شد و پس از سپری شدن ۱۵ دقیقه،  $200 \mu L$  محلول متوقف‌کننده به هر چاهک اضافه شد و بعد از ۱۰ دقیقه با استفاده از فتومتر با طول موج ۴۵۰ نانومتر جذب نوری را سنجیده و بر اساس منحنی استاندارد غلظت هورمون تعیین شد.

#### اندازه‌گیری غلظت گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسیرید

برای گلوکز از کیت GOD-PAP (Cat no: ۹۸۰۰۶) شرکت پارس آزمون، ایران، کلسترول از کیت CHOD-PAP (Cat no: ۹۸۰۰۴) شرکت پارس آزمون، ایران، و تری‌گلیسیرید از کیت GPO-PAP (Cat no: ۹۸۰۰۳) شرکت پارس آزمون، ایران، استفاده و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۶۸۵۰، انگلستان) به روش فتومتریک اندازه‌گیری شد.

$10 \mu L$  نمونه را با  $100 \mu L$  معرف مخلوط کرده، ۲۰ دقیقه در دمای محیط (۲۰ الی ۲۵ درجه سانتی‌گراد)

ارزیابی مرگ زودرس و دیررس رویانی و پایداری آبستنی پس از تلقیح مصنوعی: تعداد ۹۰ رأس گاو چند شکم زاینده با نمره وضعیت بدنی ۲ تا ۳، عدم سابقه بیماری‌های حاد متابولیکی و عفونی گاوها در دو نوبت بین روزهای ۲۵ تا ۴۵ بعد از تلقیح با استفاده از دستگاه اولتراسونوگرافی برای تشخیص آبستنی معاینه شدند و نتایج آبستنی ثبت شدند. با توجه به اینکه احتمال عدم تشخیص مرگ رویانی زودرس در روزهای ۱۵ تا ۲۴ با اولتراسونوگرافی وجود داشت مرگ زودرس رویانی با اندازه‌گیری پروژسترون در روز ۲۱ و برگشت به فحلی دام‌های بعد از ۲۶ روز از زمان تلقیح مصنوعی مشخص شد. برای تأیید مرگ دیررس رویانی علاوه بر اندازه‌گیری پروژسترون از دستگاه اولتراسوند (مدل CTS 800V، ساخت شرکت SIUI مجهز به پروب خطی مولتی فرکانس با فرکانس ۷ هرتز، آمریکا) استفاده شد و رویان‌هایی که فاقد ضربان قلب و یا ساختارهای شناور و یا جداشدگی و بی‌نظمی پرده‌های جنینی در روز ۲۶ تا ۴۵ بودند به عنوان مرگ رویانی در نظر گرفته شدند (Lucy, 2001) گاوهایی که آبستن تشخیص داده شدند، در ۳ تا ۴ ماهگی و ۷ ماهگی مورد معاینه مجدد با استفاده از دستگاه اولتراسونوگرافی قرار گرفتند و آبستنی، عدم مرگ و یا سقط در آن‌ها مجدد ارزیابی شد.

نمونه‌گیری و استخراج پلاسما: نمونه خون از ۳۰ رأس دام مبتلا به مرگ رویانی (برای هر گروه زمانی ۱۰ رأس) و ۳۰ رأس دام آبستن طبیعی (برای هر گروه زمانی ۱۰ رأس) با استفاده از لوله‌های خلاء ۵ میلی‌لیتری حاوی ماده ضد انعقاد EDTA<sup>۱</sup>، از ورید دمی، در روزهای ۱۵ تا ۲۴، ۲۵ تا ۳۴ و ۳۵ تا ۴۴ پس از تلقیح مصنوعی گرفته شد. جهت استخراج پلاسما،

1. Ethylene Diamine Tetra Acetic acid

حجم پت سلولی با افزودن ۲-۵ میلی لیتر PBS به آرامی به وسیله سمپلر به حجم ۱۰ ml رسانده شد؛ مانند مراحل قبل، ۲ میلی لیتر آب افزوده و به مدت ۳۵ ثانیه به آرامی مخلوط شد. سپس فوراً یک میلی لیتر NaCl ۲/۷ درصد افزوده و در دور ۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، مخلوط رویی دور ریخته شد و ۱۰ میلی لیتر PBS به آرامی اضافه و مخلوط گردید. سانتریفیوژ در ۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه تکرار شد. مخلوط رویی دور ریخته شد و پس از شمارش نوتروفیل‌ها با استفاده از لام هموسیتومتر تیوب‌های حاوی نوتروفیل جدا شده برای انجام آزمایش Real-time PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Mehrzaad و همکاران، ۲۰۰۱).

**طراحی پرایمر:** جهت انجام Real Time-PCR، بیان نسبی ژن‌های هدف با کمک ژن بتا اکتین ارزیابی شد، ژن‌های مورد مطالعه G-CSF و ISG-15 بودند که پس از یافتن توالی ژن‌ها در بانک ژنی با استفاده از نرم افزار طراحی پرایمر 7 oligo (Rychlik, ۲۰۰۷) در سایت NCBI پرایمر مناسب برای هر کدام از این ژن‌ها طراحی شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ درج شده است.

انکوبه شد و حداکثر طی ۶۰ دقیقه جذب نوری استاندارد و نمونه با طول موج ۵۴۶ نانومتر در برابر بلانک با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. رابطه (۱)

$$Gl, CHL, TG \left( \frac{mg}{dl} \right) = \frac{Abs \ Sample}{Abs \ Std/Cal} \times Conc. Std/Cal \left( \frac{mg}{dl} \right)$$

GI: گلوکز، CHL: کلسترول، TG: تری‌گلیسیرید، Abs Sample: مقدار نمونه، Abs Std/Cal: مقدار استاندارد / کالیبراتور، Conc.Std/Cal: ثابت استاندارد / کالیبراتور (Ghojoghi و همکاران، ۲۰۱۳).

**جداسازی نوتروفیل:** برای جداسازی نوتروفیل نمونه‌های خون به آرامی تکان داده شد و سپس به لوله‌های فالکن (۵۰mL) منتقل شد. پس از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) پلاسما و باقی‌کوت جدا شد، ۲۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیرشده به نمونه باقی‌مانده اضافه شد. مخلوط به مدت ۴۵ ثانیه به آرامی ورتکس شده (برای لیز شدن RBC) و پس از آن، فوراً ۱۰ میلی لیتر NaCl ۲/۷ درصد اضافه شد و دوباره به آرامی مخلوط شدند. نمونه‌ها با ۱۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مخلوط رویی دور ریخته شد.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای مطالعه بیان ژن‌های CSF, ISG-15 و beta actin

Table 1- Forward and reverse primers Sequences of ISG-15, CSF, and beta actin genes

Name	Sequences(5'-3')	TM	GenBank
ISG-15- Forward	CCTGAGCAGGATGGAATTACA	60.65	NM_174366.1
ISG-15- Reverse	TCCAGAACATGCCGCAGAG	58.83	NM_174366.1
CSF- Forward	CTGGGTGAGACTGGGAAATG	59.35	AF092533.1
CSF- Reverse	TGTGACGGGGTGTGAGAGA	58.83	AF092533.1
beta actin- Forward	TGGCACCCAGCACAATGAAGATC	62	DQ838049.1
beta actin- Reverse	GCAAATGCTTCTAGCGGACTGT	52	DQ838049.1

ورتکس شد، ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده و سپس ۲۰۰ μL کلروفرم سرد به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان داد شد. ۱۰ الی ۱۵ دقیقه میکروتیوب را در دمای اتاق قرار گرفت و سپس با دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴

**استخراج RNA:** استخراج RNA با استفاده از محلول ترایزول (YTzol pure RNA: Cat number YT9064) (یکتا تجهیزآزما، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای شروع کار ۱ میلی لیتر ترایزول روی نمونه‌ها ریخته شد و ۱۰ ثانیه به شدت

دقیقه، سپس در دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و بعد از آن در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. میکروتیوب در کنار یخ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سرانجام، cDNA تهیه شده به یخچال ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

**Real-time PCR:** برای انجام آزمایش  $3/5 \mu L$  آب مقطر دیونیزه دوبار تقطیرشده،  $2 \mu L$  cDNA و  $1 \mu L$  از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت برای ژن‌های G-CSF، ISG-15، Beta actin (به صورت جداگانه) به همراه سایبرگرین هر میکروتیوب اضافه شد (حجم کل هر میکروتیوب  $7/5 \mu L$ ). سپس میکروتیوب‌ها به دستگاه ترموسایکلر (مدل THERMAL CYCLER T100TM، ساخت سنگاپور) منتقل و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۲</sup> انجام شد. واسرشت‌سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، انجام ۴۰ سیکل با واسرشت‌سازی DNA طی ۱۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA طی ۱۵ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و بسط آغازگر طی ۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط انتهایی طی ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. خروجی دستگاه به صورت Ct (Threshold Cycle) یا چرخه آستانه ثبت شد. تغییرات نسبی (آنالیز داده‌ها) بیان ژن‌های G-CSF و ISG-15 به روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak و Schmittgen، ۲۰۰۱) محاسبه شد.

### آنالیز آماری

برای ارزیابی نرمال بودن داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. تفاوت‌های بین گروه‌ها توسط روش Two-Way ANOVA بررسی شد. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه شماره ۲۲ انجام شد.

درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در این مرحله سه لایه قابل مشاهده است، لایه‌ی رویی (فاز آبی) به میکروتیوب جدید منتقل گردید. پس از افزودن ۵۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپیل الکل ( $C_3H_8O$ ) توسط پیپت، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شده و سپس میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه با دور  $12000g$  سانتریفیوژ شد و پس از حذف مایع رویی مقدار ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد به رسوب اضافه و پس از هم زدن مجدداً به مدت ۲ دقیقه با دور  $12000g$  سانتریفیوژ شد، سپس مایع رویی کاملاً تخلیه و رسوب میکروتیوب تا زمان خشک شدن محتویات در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. در مرحله آخر  $30 \mu L$  آب مقطر دیونیزه حاوی DEPC<sup>۱</sup> به میکروتیوب افزوده شد. مخلوط چندین بار توسط پیپت کشیده و تخلیه شده، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

**سنتز cDNA:RNA** استخراج شده به عنوان الگوی سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA و پرایمر Oligo dT (پارس طوس بیوتکنولوژی، Cat NO. A101161، ایران) طبق دستورالعمل سازنده استفاده شد. ابتدا برای جلوگیری از تولید محصول PCR از DNA ژنومی سلول، فرآورده RNA با آنزیم DNase (دئوکسی ریبونوکلاز) تیمار و آلودگی احتمالی DNA حذف شد. سپس کیفیت و کمیت محصول با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

در یک میکروتیوب  $1ng$  تا  $5 \mu L$  از نمونه RNA با  $10 \mu L$  بافر میکس ۲x (امپلیکون، دانمارک) و  $2 \mu L$  آنزیم میکس مخلوط شد. حجم میکروتیوب با استفاده از آب دو بار تقطیر به  $20 \mu L$  رسانده شد. میکروتیوب در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰

2. Polymerase Chain Reaction

1. Diethyl Pyrocarbonate

برای رسم گراف‌ها از نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه شماره ۸ استفاده شد. سطح اطمینان آماری برای مطالعه  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

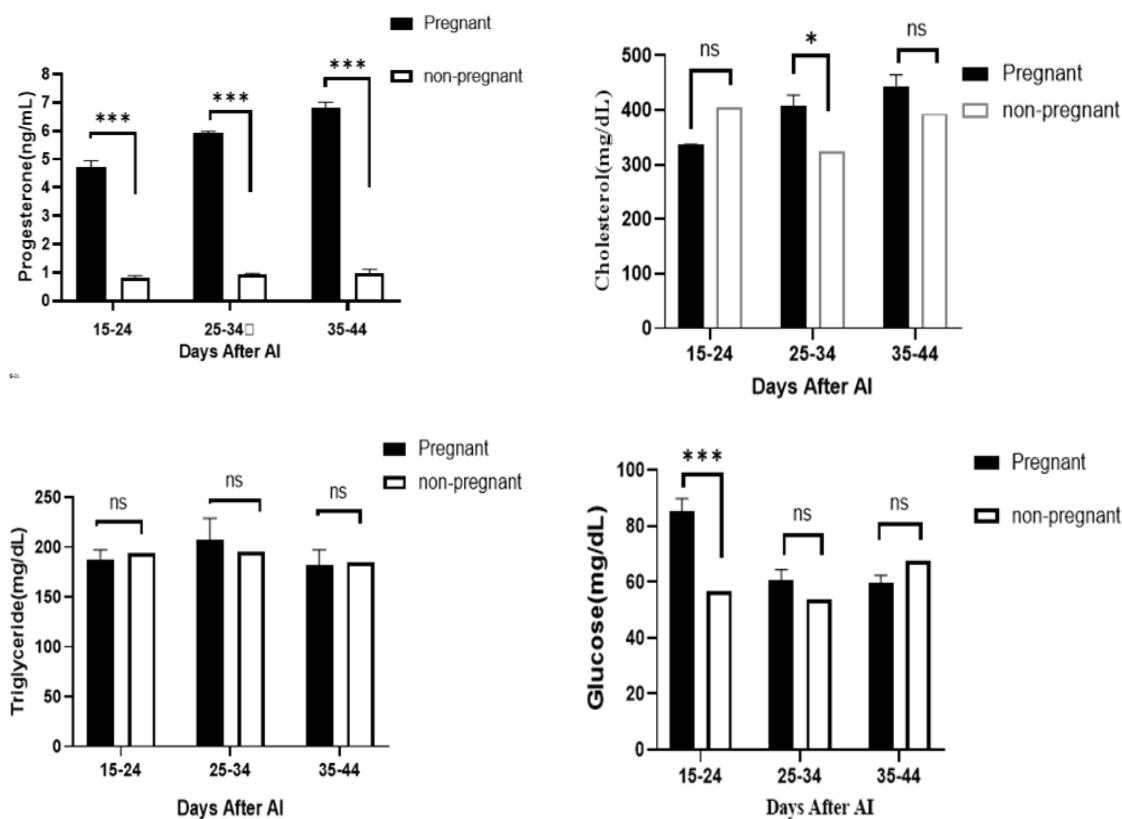
### نتایج و بحث

در مطالعه حاضر بررسی غلظت پروژسترون در پلاسمای خون گاوهای آبستن در فاصله‌ی زمانی ۱۵ تا ۲۴، ۲۵ تا ۳۴ و ۳۵ تا ۴۴ روز بعد از تلقیح به‌طور معنی‌داری نسبت به گاوهای غیرآبستن بالاتر بود. بیشترین غلظت پروژسترون در پلاسمای خون گاوهای آبستن در فاصله‌ی زمانی ۳۵ تا ۴۴ مشاهده شد (شکل ۱). غلظت پروژسترون در گاوهای آبستن، به دنبال مرگ و میر دیررس جنینی، نارسایی لقاح و مرگ و میر زودرس جنینی بالاتر بود. کاهش غلظت پروژسترون در گاوهای غیرآبستن ممکن است با پسروی جسم زرد (CL; Corpus Luteum) مرتبط باشد (Mann و همکاران، ۱۹۹۸). به نظر می‌رسد در میان اجزای مختلف، گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید مواد مغذی مهمی هستند که بر باروری و چرخه در حیوانات مزرعه تأثیر می‌گذارند.

در مطالعه حاضر، بررسی غلظت کلسترول در پلاسمای خون گاوهای آبستن در فاصله‌ی زمانی ۱۵ تا ۲۴ و ۳۵ تا ۴۴ بعد از تلقیح تفاوت آماری معنی‌داری با غلظت کلسترول در پلاسمای خون گاوهای غیرآبستن نداشت. درحالی‌که غلظت کلسترول در فاصله‌ی زمانی ۲۵ الی ۳۴ بعد از تلقیح در پلاسمای گاوهای آبستن تفاوت آماری معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) با غلظت کلسترول در پلاسمای خون گاوهای غیرآبستن نداشت (شکل ۱). کلسترول، ترکیبی از لیپوپروتئین‌های

پلاسمای، در سیستم انتقال چربی بدن نقش دارد و یک پیش‌ساز ضروری برای استروئیدزایی در غدد جنسی است. غلظت پایین‌تر کلسترول پلاسمای در گاوهای با مرگ جنینی در مقایسه با گاوهای بارور، نشان‌دهنده وضعیت انرژی غیرطبیعی است که بر عملکرد غده هیپوفیز تأثیر می‌گذارد، در نتیجه ترشح گنادوتروپین‌ها را کاهش می‌دهد که ممکن است منجر به کاهش رشد فولیکولی، افزایش آترزی فولیکولی و کاهش نرخ باروری شود (Oliveira و همکاران، ۲۰۰۸). در مطالعه حاضر، بررسی غلظت تری‌گلیسیرید در پلاسمای خون گاو آبستن در فاصله‌ی زمانی ۱۵ تا ۲۴، ۲۵ تا ۳۴ و ۳۵ تا ۴۴ روز بعد از تلقیح تفاوت آماری معنی‌داری با غلظت تری‌گلیسیرید پلاسمای خون گاوهای غیرآبستن در همان روزها نداشت (شکل ۱). در گاوهای مبتلا به مرگ جنینی غلظت تری‌گلیسیرید در گردش خون مادر با لقاح و لانه‌گزینی همبستگی مثبت داشت (Grummer، ۱۹۹۳).

در مطالعه حاضر بررسی غلظت گلوکز در پلاسمای خون گاوهای آبستن در فاصله‌ی زمانی ۱۵ تا ۲۴ روز ( $P < 0.001$ ) به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت گلوکز پلاسمای خون گاوهای غیرآبستن بالاتر بود. درحالی‌که غلظت گلوکز در پلاسمای خون گاوهای آبستن و غیرآبستن در فاصله‌ی زمانی ۲۵ تا ۳۴ و ۳۵ تا ۴۴ روز بعد از تلقیح تفاوت آماری معنی‌داری نداشت (شکل ۱). نتایج یک مطالعه، مشخص کرد که غلظت‌های بیشتر گلوکز خون در هفته‌های ۳ و ۴ پس از زایمان با روزهای باز کوتاه‌تر تا آبستنی مجدد مرتبط است (Robertson و همکاران، ۲۰۱۱).



شکل ۱- میزان پروژسترون، کلسترول، تری گلیسیرید و گلوکز خون در گاوهای آبستن و غیرآبستن در روزهای بعد از تلقیح مصنوعی  
Figure 1- Blood Progesterone, Cholesterol, Triglyceride and Glucose concentration in pregnant and non-pregnant cows after artificial insemination

خون گاوهای آبستن مشاهده شد (شکل ۲). بررسی میزان بیان ژن ISG-15 در فاصله زمانی ۱۵ الی ۲۴ ( $P < 0.001$ )، در فاصله زمانی ۲۵ تا ۳۴ ( $P < 0.001$ ) و در فاصله‌ی زمانی ۳۵ تا ۴۴ ( $P < 0.01$ ) در نوتروفیل خون گاوهای آبستن تفاوت آماری معنی‌داری با گاوهای غیرآبستن داشت. بیشترین میزان بیان ژن ISG-15 در فاصله زمانی ۳۵ تا ۴۴ روز بعد از تلقیح مشاهده شد (شکل ۲).

آبستنی منجر به تولد گوساله سالم مهم‌ترین عامل برای کسب اطمینان از عملکرد مؤثر و پربازده تولید گوشت و شیر در صنعت گاو شیری است. برای یک گاو‌داری صنعتی و سودآور، گاوهای شیری باید هر ۱۲ تا ۱۴ ماه یک بار زایمان کنند. برای دستیابی به این

در این بررسی میزان بیان ژن ISG-15 و G-CSF در خون محیطی گاوهای مبتلا به مرگ رویانی در فاصله زمانی ۱۵ تا ۲۴، ۲۵ تا ۳۴ و ۳۵ تا ۴۴ روز بعد از تلقیح بررسی و تعدادی نمونه خون نیز از گاوهای آبستن در فاصله زمانی فوق‌الذکر اخذ شد. نتایج حاصل از بررسی‌ها نشان می‌دهد که میزان بیان ژن G-CSF در نوتروفیل‌های خون محیطی در گاوهای آبستن در فاصله زمانی ۱۵ تا ۲۴ به‌طور معنی‌داری بیشتر از گاوهای غیرآبستن بود. در حالی که میزان بیان این ژن در فاصله‌ی زمانی ۲۵ تا ۳۴ و ۳۵ تا ۴۴ بعد از تلقیح در خون گاوهای آبستن و غیرآبستن تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. بیشترین میزان بیان ژن G-CSF در فاصله زمانی ۱۵ تا ۲۴ روز بعد از تلقیح در نوتروفیل

سایتوکاین G-CSF در روزهای پس از لقاح نشان می‌دهد که G-CSF نقش مهمی در فرآیند لانه‌گزینی و در حفظ آبستنی ایفا می‌کند. سایر نویسندگان، همچنین گزارش کرده‌اند که غلظت G-CSF سرم به‌طور قابل توجهی در مرحله تخمک ریزی و در طول آبستنی افزایش یافته و نقش مهمی در تخمک ریزی و حفظ آبستنی ایفا می‌کند (Makinoda و همکاران، ۱۹۹۵).

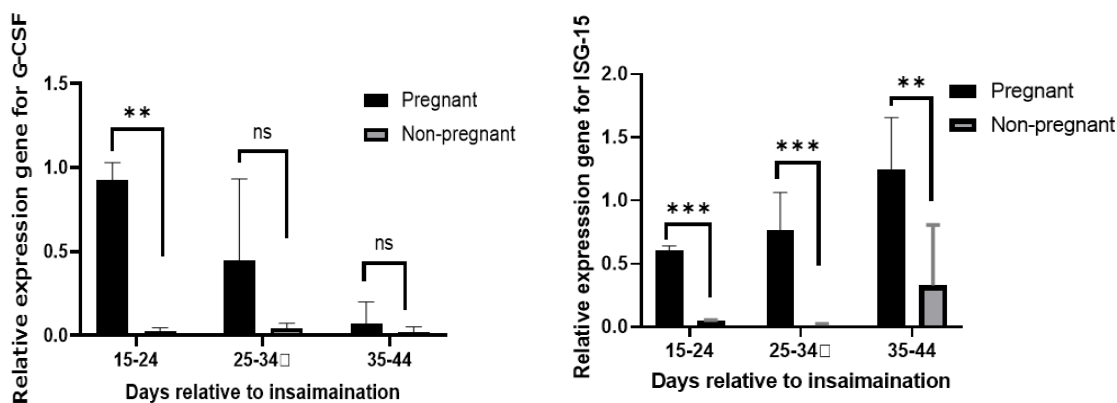
سطح پروژسترون پلازما و بیان mRNA ژن ISG-15 یک نمای کلی از عملکرد جسم زرد و حضور یک جنین زنده ارائه می‌دهد. بر اساس سطوح پایین ژن ISG-15 و پروژسترون در خون، می‌توان حیوانات را غیرآبستن پیش‌بینی کرد. بیان mRNA ژن ISG-15 در نوتروفیل‌های گاوهای آبستن بیشتر از گاوهای غیرآبستن و آبستن با مرگ‌ومیر دیررس جنینی بود. بیان mRNA ژن ISG-15 در روز ۱۴ تا ۲۱ در گروه گاوهای آبستن بیشتر بود. این تغییرات در بیان mRNA ژن ISG-15 با غلظت IFN- $\tau$  پلازما در روز ۱۴-۲۱ در گاوهای آبستن و دیررس جنین مطابقت دارد (Han و همکاران، ۲۰۰۶). در این مطالعه سطح بیان ژن ISG-15 افزایش یافت که نشان می‌دهد. IFN- $\tau$  وارد جریان خون عمومی شده تا اثرات خود را اعمال و فیزیولوژی مادر را اصلاح کند. Shirasuna و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که ISG-15ها را می‌توان در سلول‌های ایمنی از جمله گرانولوسیت‌های چندهسته‌ای (PMN) شناسایی کرد، زیرا به IFN- $\tau$  پاسخ بیشتری می‌دهند. یافته‌های حاضر با یافته‌های Shirasuna و همکاران (۲۰۱۲) و Bott و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد که دریافتند بیان mRNA ژن ISG-15 در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) در روز ۸ در گاوهای آبستن بیشتر از گاوهای غیر آبستن است. IFN- $\tau$  ترشح‌شده از تروفکتودرم روی PBMC اثر می‌گذارد تا بیان mRNA ژن ISG-15 افزایش یابد

موفقیت، شناسایی حیوانات غیر آبستن در اوایل تاریخ تلقیح از اهمیت بالایی برخوردار است. Diskin و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کرده‌اند که نرخ باروری گاو ۹۰ درصد است، اما میانگین نرخ زایش فقط ۵۵ درصد است (Current، ۲۰۲۳). در نتیجه، مرگ‌ومیر حدود ۳۵ درصد از نوزادان و جنین‌ها شاهد خواهیم بود که از این تعداد ۷۰-۸۰ درصد بین ۸ تا ۱۶ روز پس از لقاح رخ می‌دهد. از دست دادن زودرس جنین در گاوهای شیری با تولید بالا بیشتر است و این یک محدودیت عمده در افزایش تولید شیر محسوب می‌شود (Lidfors و همکاران، ۲۰۰۸). اگرچه مرگ‌ومیر دیررس جنینی کمتر از ۱۰ درصد از دست دادن آبستنی را تشکیل می‌دهد، اما خسارت مالی آن برای دامدار بیشتر از مرگ‌ومیر زودرس جنینی است (Parmar و همکاران، ۲۰۱۶).

در حال حاضر یکی از مؤثرترین راهکارهای مدیریت باروری برای پیشگیری و کاهش زیان‌های اقتصادی در گله‌های شیری، شناسایی دام‌های آبستن یا غیر آبستن پس از تلقیح مصنوعی است. IFN- $\tau$  جنینی نه تنها موجب مهار مکانیسم لوتئولیتیک می‌شود، بلکه بیان ژن‌های هدف آن را هم در بافت‌های داخل رحمی و هم در بافت‌های خارج رحمی تحریک می‌کند. پیشرفت سریع تکنیک‌های مولکولی راه‌های جدیدی را برای کشف این مولکول‌ها به عنوان نشانگرهای اولیه آبستنی در لکوسیت‌های خون محیطی (PBL) نشخوارکنندگان در اوایل آبستنی گشوده است (Sheikh و همکاران، ۲۰۱۸). استراتژی‌هایی برای بهبود باروری گاوهای شیری در صنعت گاو شیری مورد نیاز است و باید بر یک رویکرد جامع استوار باشد. نتایج ما به وضوح نشان داد که آن دسته از گاوهایی که دچار مرگ رویانی نشده‌اند افزایش بیان مداوم G-CSF را از روز لانه‌گزینی تا اواخر آبستنی نشان می‌دهند. بیان

میش‌های غیر آبتن بیان بیشتری داشتند. Rempel و همکاران (۲۰۰۵) گزارش دادند که ژن UBE1L، آنزیم آغازگر برای ISG-15، پس از روز ۱۸ تلقیح در اندومتر گاو بیشتر شد. می‌ش‌های تزریق‌شده با IFN- $\tau$  نوترکیب به ورید رحم بیان mRNA ژن ISG-15 را نه تنها در اندومتر و جسم زرد، بلکه در کبد نیز نشان دادند (Bott و همکاران، ۲۰۱۰). Mauffré و همکاران (۲۰۱۶) تنوع بالایی از بیان ISG-15 را در سلول‌های ایمنی در اوایل آبتن در می‌ش مشاهده کردند. Carvalho و همکاران (۲۰۱۷) کاهش بیان mRNA ژن ISG-15 را در گاوهای با پروژسترون بالا نسبت به گاوهای با غلظت پروژسترون پلاسمایی پایین مشاهده کردند (Jain و همکاران، ۲۰۱۲). Kose و همکاران (۲۰۱۶) به این نتیجه رسیدند که بیان ISG-15 و MX1 در خون گوسفند ممکن است به عنوان نشانگر مرگ جنینی عمل کند.

(Haq و همکاران، ۲۰۱۶). هنگامی که PBMC با IFN- $\tau$  تحریک شد، افزایش وابسته به دوز در بیان ISG-15 و پروتئین آن مشاهده شد. فراوانی نسبی ISG-15 و MX1 (میکسوویروس ۱) در سلول‌های هپاتوسیت گاوهای آبتن در مقایسه با تلیسه‌های غیرآبتن در روز ۱۸ پس از فحلی بیشتر بود (Meyerholz و همکاران، ۲۰۱۶). Soumya و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند بیان نسبی mRNA ژن ISG-15 در PBMC های گاوهای آبتن بیشتر از گاوهای غیرآبتن بود. علاوه بر این، گیفورد و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که بیان نسبی mRNA ژن ISG-15 در لکوسیت‌های خون محیطی گاوهای آبتن در روزهای ۱۸ و ۲۰ پس از تلقیح مصنوعی افزایش می‌یابد. نتایج مطالعه حاضر در تأیید یافته‌های Kiyama و همکاران (۲۰۱۶) می‌باشد که گزارش کردند ISG-15 ها در اندومتر می‌ش‌های آبتن در روز ۱۳ نسبت به



شکل ۲- میزان بیان نسبی ژن G-CSF و ISG-15 در خون محیطی گاوهای آبتن و غیرآبتن در روزهای بعد از تلقیح مصنوعی  
Figure 2- The relative expression level of G-CSF and ISG-15 gene in the peripheral blood of pregnant and non-pregnant cows in the days after artificial insemination.

مبتنی بر هورمون استروئیدی و تغییرات ایمنولوژیک که مشخصه رحم است، زیرا با چرخه تولیدمثل و آبتنی سازگار است. نیز، بیشترین مقدار بیان ژن ISG-15 در فاصله زمانی ۳۵ تا ۴۴ روز بعد از تلقیح در گاوهای آبتن مشاهده شد. این افزایش می‌تواند

### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین مقدار بیان ژن G-CSF در فاصله زمانی ۱۵ تا ۲۴ در نوتروفیل خون گاوهای آبتن می‌باشد. G-CSF می‌تواند نقش مهمی در میانجیگری بازسازی بافت

از جمله ISG-15 و مقاومت میکسو ویروس ۱ درخون می‌تواند به‌عنوان نشانگر مرگ رویانی عمل کند. در نتیجه این ژن‌ها می‌توانند در تشخیص مرگ زودرس و دیررس جنینی کاربرد داشته و ضررهای اقتصادی مرتبط که به دلیل از دست رفتن آبستنی می‌باشد کاهش یابد.

به‌عنوان نشانگر اولیه آبستنی در گاوهای شیری به‌ویژه در تلیسه‌ها استفاده شود. کاهش غلظت پروژسترون یک پاسخ فوری به PGF2 $\alpha$  بود و رویان می‌تواند بر اساس دوره طولانی بیان ISG‌ها طولانی‌تر از جسم زرد زنده بماند. این نشان می‌دهد که عدم وجود پروژسترون می‌تواند دلیل مرگ رویانی باشد تا اثر مستقیم PGF2 $\alpha$ . در نتیجه، بیان ISG‌ها،

## References

- Abbitt, B., Ball, L., Kitto, G. P., Sitzman, C. G., Wilgenburg, B., Raim, L. W. & Seidel Jr, G. E. (1978). Effect of three methods of palpation for pregnancy diagnosis per rectum on embryonic and fetal attrition in cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 173(8): 973-977.
- Abdullah, M., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., Mohanty, A. K., Madkar, A. R., Baithalu, R. K. & Bhakat, M. (2014). Early pregnancy diagnosis in dairy cattle: economic importance and accuracy of ultrasonography. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 2(8): 464-467.
- Austin, K. J., Bany, B. M., Belden, E. L., Rempel, L. A., Cross, J. C. & Hansen, T. R. (2003). Interferon-stimulated gene-15 (Isg15) expression is up-regulated in the mouse uterus in response to the implanting conceptus. *Endocrinology*, 144(7): 3107-3113.
- Austin, K. J., Carr, A. L., Pru, J. K., Hearne, C. E., George, E. L., Belden, E. L. & Hansen, T. R. (2004). Localization of ISG15 and conjugated proteins in bovine endometrium using immunohistochemistry and electron microscopy. *Endocrinology*, 145(2): 967-975.
- Austin, K. J., King, C.P., Vierk, J.E., Sasser, R.G. & Hansen, T.R. (1999). Pregnancy-specific protein B induces release of an alpha chemokine in bovine endometrium. *Endocrinology*, 140(1): 542-545.
- Ayalon, N. (1978). A review of embryonic mortality in cattle. *Reproduction*, 54(2), 483-493.
- Bagley, C. J., Woodcock, J.M., Stomski, F.C. & Lopez, A.F. (1997). The structural and functional basis of cytokine receptor activation: lessons from the common  $\beta$  subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, Interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 89(5): 1471-1482.
- Baldwin, G.C., Benveniste, E.N., Chung, G.Y., Gasson, J.C. & Golde, D.W. (1993). Identification and characterization of a high-affinity granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor on primary rat oligodendrocytes. *Blood*, 82 (11): 3279-3282.
- Balhara, A.K., Gupta, M., Singh, S., Mohanty, A.K. & Singh, I. (2013). Early pregnancy diagnosis in bovines: current status and future directions. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Bazer, F.W., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Spencer, T.E. & Wu, G. (2008). Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reproductive Biology*, 8(3): 179-211.
- Bazer, F.W., Thatcher, W.W., Hansen, P. J., Mirando, M.A., Ott, T.L. & Plante, C. (1991). Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. *Journals of Reproduction & Fertility Ltd*, 43: 39-47.
- Beal, W.E., Perry, R.C. & Corah, L.R. (1992). The use of ultrasound in monitoring reproductive physiology of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 70(3): 924-929.
- Bebington, C., Doherty, F.J. & Fleming, S.D. (1999). Ubiquitin cross-reactive protein gene expression is increased in decidualized endometrial stromal cells at the initiation of pregnancy. *Molecular Human Reproduction*, 5(10): 966-972.



- Booth, P.J., Collins, M.E., Jenner, L., Prentice, H., Ross, J., Badsberg, J. H. & Brownlie, J. (1998). Noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus (BVDV) reduces cleavage but increases blastocyst yield of *in vitro* produced embryos. *Theriogenology*, 50(5): 769-777.
- Bott, R. C., Ashley, R. L., Henkes, L. E., Antoniazzi, A. Q., Bruemmer, J. E., Niswender, G. D. & Hansen, T. R. (2010). Uterine vein infusion of interferon tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. *Biology of Reproduction*, 82(4): 725-735.
- Brännström, M., Norman, R. J., Seamark, R. F. & Robertson, S. A. (1994). Rat ovary produces cytokines during ovulation. *Biology of Reproduction*, 50(1): 88-94.
- Bridges, G. A., Day, M. L., Geary, T. W. & Cruppe, L. H. (2013). Triennial Reproduction Symposium: deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *Journal of Animal Science*, 91(7): 3002-3013.
- Cartmill, J. A., El-Zarkouny, S. Z., Hensley, B. A., Lamb, G. C. & Stevenson, J. S. (2001). Stage of cycle, incidence, and timing of ovulation, and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. *Journal of Dairy Science*, 84(5): 1051-1059.
- Carvalho, P. D., Consentini, C. C., Weaver, S. R., Barleta, R. V., Hernandez, L. L. & Fricke, P. M. (2017). Temporarily decreasing progesterone after timed artificial insemination decreased expression of interferon-tau stimulated gene 15 (ISG15) in blood leukocytes, serum pregnancy-specific protein B concentrations, and embryo size in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 100(4): 3233-3242.
- Chaouat, G., Menu, E., Clark, D. A., Dy, M., Minkowski, M. & Wegmann, T. G. (1990). Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 89(2): 447-458.
- Cordoba, M. C., Sartori, R. & Fricke, P. M. (2001). Assessment of a commercially available early conception factor (ECF) test for determining pregnancy status of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 84(8): 1884-1889.
- Current, J.Z. (2023). The Investigation of Novel Bovine Oocyte-Specific Long Non-coding RNAs and Their Roles in Oocyte Maturation and Early Embryonic Development (Doctoral dissertation, West Virginia University).
- Ding, J., Wang, J., Cai, X., Yin, T., Zhang, Y., Yang, C. & Yang, J. (2022). Granulocyte colony-stimulating factor in reproductive-related disease: Function, regulation and therapeutic effect. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150: 112903.
- Diskin, M. G. & Morris, D. G. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 43: 260-267.
- Diskin, M. G., Waters, S. M., Parr, M. H. & Kenny, D. A. (2016). Pregnancy losses in cattle: potential for improvement. *Reproduction, Fertility, and Development*, 28(1-2): 83-93.
- Forde, N., Bazer, F. W., Spencer, T. E. & Lonergan, P. (2015). 'Conceptualizing' the endometrium: identification of conceptus-derived proteins during early pregnancy in cattle. *Biology of Reproduction*, 92(6): 156-1.
- Franco, G. A., Peres, R. F. G., Martins, C. F. G., Reese, S. T., Vasconcelos, J. L. M. & Pohler, K. G. (2018). Sire contribution to pregnancy loss and pregnancy-associated glycoprotein production in Nelore cows. *Journal of Animal Science*, 96(2): 632-640.
- Fricke, P. M. (2002). Scanning the future—Ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85(8): 1918-1926.
- Gandy, B., Tucker, W., Ryan, P., Williams, A., Tucker, A., Moore, A. & Willard, S. (2001). Evaluation of the early conception factor (ECF™) test for the detection of nonpregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, 56(4): 637-647.
- Ghojoghi, S.h., Samadi, F. & Hasani, S. (2013) Comparison of blood serum biochemical compositions and ovarian follicular fluid of different-sized follicles in dairy cows. *Research on Animal Production*, 4(7): 106-123. (In Persian).
- Gifford, C. A., Racicot, K., Clark, D. S., Austin, K. J., Hansen, T. R., Lucy, M. C. & Ott, T. L. (2007). Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(1): 274-280.

- Grummer, R. R. (1993). Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 76(12): 3882-3896.
- Han, H., Austin, K. J., Rempel, L. A. & Hansen, T. R. (2006). Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. *Journal of Endocrinology*, 191(2): 505-512.
- Hansen, P. J. (1997). Interactions between the immune system and the bovine conceptus. *Theriogenology*, 47(1): 121-130.
- Hansen, T. R., Sinedino, L. D. & Spencer, T. E. (2017). Paracrine and endocrine actions of interferon tau (IFNT). *Reproduction*, 154(5); F45-F59.
- Haq, I. U., Han, Y., Ali, T., Wang, Y., Gao, H., Lin, L. & Zeng, S. (2016). Expression of interferon-stimulated gene ISG15 and ubiquitination enzymes is upregulated in peripheral blood monocyte during early pregnancy in dairy cattle. *Reproductive Biology*, 16(4): 255-260.
- Hill, A. D., Naama, H. A., Calvano, S. E. & Daly, J. M. (1995). The effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myeloid cells and its clinical applications. *Journal of Leucocyte Biology*, 58(6): 634-642.
- Işık, G., Oktem, M., Guler, I., Oktem, E., Ozogul, C., Saribas, S., Erdem, A. & Erdem, M.E.H.M.E.T. (2021). The impact of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on thin endometrium of an animal model with rats. *Gynecological Endocrinology*, 37(5): 438-445.
- Jain, A., Baviskar, P. S., Kandasamy, S., Kumar, R., Singh, R., Kumar, S. & Mitra, A. (2012). Interferon stimulated gene 15 (ISG15): Molecular characterization and expression profile in endometrium of buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Reproduction Science*, 133(3-4): 159-168.
- Johnson, G.A., Austin, K.J., Van Kirk, E.A. & Hansen, T.R. (1998). Pregnancy and interferon-tau induce conjugation of bovine ubiquitin cross-reactive protein to cytosolic uterine proteins. *Biology of Reproduction*, 58: 898-904.
- Kim, D., Kim, M., Kang, H., Lee, H., Park, W. & Kwon, H. (2001). The supplementation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in culture medium improves the pregnancy rate in human ART programs. *Fertility and Sterility*, 76(3): S6.
- Kiyma, Z., Kose, M., Atli, M. O., Ozel, C., Hitit, M., Sen, G. & Guzeloglu, A. (2016). Investigation of interferon-tau stimulated genes (ISGs) simultaneously in the endometrium, corpus luteum (CL) and peripheral blood leukocytes (PBLs) in the pre-luteolytic stage of early pregnancy in ewes. *Small Ruminant Research*, 140: 1-6.
- Kose, M., Kaya, M. S., Aydilek, N., Kucukaslan, I., Bayril, T., Bademkiran, S. & Atli, M. O. (2016). Expression profile of interferon tau-stimulated genes in ovine peripheral blood leukocytes during embryonic death. *Theriogenology*, 85(6): 1161-1166.
- Kutlu, M. & Dinç, D. A. (2020). Comparison of the effects of two pre-synchronization protocols (G6G and PG-3-G) on some reproductive performance parameters in Holstein cows. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 36(4):248-254.
- Lidfors, L., Gunnarsson, S., Algers, B., Emanuelson, U., Berglund, B., Andersson, G., Håård, M., Lindhé, B., Stålhammar, H. & Gustafsson, H. (2008). Reproductive performance in high-producing dairy cows: can we sustain it under current practice?. *IVIS Reviews in Veterinary Medicine, IVIS (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www. ivis. org). Last updated.*
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- Lucy, M. C. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end ?. *Journal of Dairy Science*, 84(6): 1277-1293.
- Makinoda, S., Mikuni, M., Furuta, I., Okuyama, K., Sagawa, T. & Fujimoto, S. (1995). Serum concentration of endogenous G-CSF in women during the menstrual cycle and pregnancy. *European Journal of Clinical Investigation*, 25(11): 877-879.
- Mann, G.E., Lamming, G.E. & Payne, J.H. (1998). Role of early luteal phase progesterone in control of the timing of the luteolytic signal in cows. *Reproduction*, 113(1): 47-51.

- Mauffré, V., Grimard, B., Eozenou, C., Inghels, S., Silva, L., Giraud-Delville, C. & Constant, F. (2016). Interferon stimulated genes as peripheral diagnostic markers of early pregnancy in sheep: a critical assessment. *Animal*, 10(11): 1856-1863.
- Mehrzhad, J., Dosogne, H., Meyer, E., Heyneman, R. & Burvenich, C. (2001). Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation. *Journal of Dairy Research*, 68(3): 399-415.
- Meyerholz, M. M., Mense, K., Knaack, H., Sandra, O. & Schmicke, M. (2016). Pregnancy- Induced ISG- 15 and MX- 1 Gene Expression is Detected in the Liver of Holstein-Friesian Heifers During Late Peri- Implantation Period. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(1): 175-177.
- Moore, K. & Thatcher, W. W. (2006). Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(4): 1254-1266.
- Oliveira, J. F., Henkes, L. E., Ashley, R. L., Purcell, S. H., Smirnova, N. P., Veeramachaneni, D. R. & Hansen, T. R. (2008). Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN- $\tau$  release from the uterine vein. *Endocrinology*, 149(3): 1252-1259.
- Parmar, S. C., Dhami, A. J., Hadiya, K. K. & Parmar, C. P. (2016). Early embryonic death in bovines: an overview. *Raksha Tech Rev*, 6 1: 6-12.
- Pereira, M. H. C., Wiltbank, M. C. & Vasconcelos, J. L. M. (2016). Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. *Journal of Dairy Science*, 99(3): 2237-2247.
- Pohler, K. G., Franco, G. A., Reese, S. T., Dantas, F. G., Ellis, M. D. & Payton, R. R. (2016). Past, present and future of pregnancy detection methods. *Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, 7-8.
- Pohler, K. G., Green, J. A., Geary, T. W., Peres, R. F. G., Pereira, M. H. C., Vasconcelos, J. L. M. & Smith, M. F. (2015). Predicting embryo presence and viability. *Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals: Tribute to 45 Year Anniversary of Roger V. Short's "Maternal Recognition of Pregnancy"*, 253-270.
- Pohler, K. G., Peres, R. F. G., Green, J. A., Graff, H., Martins, T., Vasconcelos, J. L. M. & Smith, M. F. (2016). Use of bovine pregnancy-associated glycoproteins to predict late embryonic mortality in postpartum Nelore beef cows. *Theriogenology*, 85(9): 1652-1659.
- Rempel, L. A., Francis, B. R., Austin, K. J. & Hansen, T. R. (2005). Isolation and sequence of an interferon- $\tau$ -inducible, pregnancy-and bovine interferon-stimulated gene product 15 (ISG15)-specific, bovine ubiquitin-activating E1-like (UBE1L) enzyme. *Biology of Reproduction*, 72(2): 365-372.
- Robertson, S. A., Chin, P. Y., Glynn, D. J. & Thompson, J. G. (2011). Peri- conceptual cytokines—setting the trajectory for embryo implantation, pregnancy and beyond. *American Journal of Reproductive Immunology*, 66: 2-10.
- Robertson, S. A., Mayrhofer, G. & Seamark, R. F. (1996). Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. *Biology of Reproduction*, 54(1): 183-196.
- Robertson, S. A., Roberts, C. T., Farr, K. L., Dunn, A. R. & Seamark, R. F. (1999). Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Biology of Reproduction*, 60(2): 251-261.
- Rychlik, W. (2007). Oligo 7 primer analysis software. *PCR primer design*, 35-59.
- Sheikh, A. A., Hooda, O. K., Kalyan, A., Kamboj, A., Mohammed, S., Alhussien, M. & Dang, A. K. (2018). Interferon-tau stimulated gene expression: A proxy to predict embryonic mortality in dairy cows. *Theriogenology*, 120: 61-67.
- Shirasuna, K., Akabane, Y., Beindorff, N., Nagai, K., Sasaki, M., Shimizu, T. & Miyamoto, A. (2012). Expression of prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) receptor and its isoforms in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and PGF2 $\alpha$ -induced luteolysis. *Domestic Animal Endocrinology*, 43(3): 227-238.

- Silke, V., Diskin, M. G., Kenny, D. A., Boland, M. P., Dillon, P., Mee, J. F. & Sreenan, J. M. (2002). Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 71(1-2): 1-12.
- Sjöblom, C., Roberts, C. T., Wikland, M. & Robertson, S. A. (2005). Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Alleviates Adverse Consequences of Embryo Culture on Fetal Growth Trajectory and Placental Morphogenesis. *Endocrinology*, 146(5): 2142-2153.
- Soumya, N. P., Das, D. N., Jeyakumar, S., Mondal, S., Mor, A. & Mundhe, U. T. (2017). Differential expression of ISG 15 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of nulliparous and multiparous pregnant versus non-pregnant *Bos indicus* cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(1): 97-106.
- Sreenan, J. M. & Diskin, M. G. (1986). The extent and timing of embryonic mortality in the cow. In *Embryonic Mortality in Farm Animals* (pp. 1-11). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Szenci, O., Beckers, J. F., Humblot, P., Sulon, J., Sasser, G., Taverne, M. A. M., & Schekk, G. (1998). Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology*, 50(1): 77-88.
- Vaillancourt, D., Bierschwal, C. J., Ogwu, D., Elmore, R. G., Martin, C. E., Sharp, A. J. & Youngquist, R. S. (1979). Correlation between pregnancy diagnosis by membrane slip and embryonic mortality. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 175(5): 466-468.
- Vanroose, G., de Kruif, A. & Van Soom, A. (2000). Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Animal Reproduction Science*, 60: 131-143.
- Vasconcelos, J. L. M., Silcox, R. W., Lacerda, J. A., Pursley, J. R. & Wiltbank, M. C. (1997). Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to head stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. *Biology of Reproduction*, 230-230.
- Wilmot, I. & Sales, D. I. (1981). Effect of an asynchronous environment on embryonic development in sheep. *Reproduction*, 61(1): 179-184.
- Wiltbank, M. C., Baez, G. M., Garcia-Guerra, A., Toledo, M. Z., Monteiro, P. L., Melo, L. F. & Sartori, R. (2016). Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 86(1): 239-253.
- Xie, Y., Tian, Z., Qi, Q., Li, Z., Bi, Y., Qin, A. & Yang, Y. (2020). The therapeutic effects and underlying mechanisms of the intrauterine perfusion of granulocyte colony-stimulating factor on a thin-endometrium rat model. *Life Sciences*, 260: 118439.
- Zambrano, A., Jara, E., Murgas, P., Jara, C., Castro, M. A., Angulo, C. & Concha, I. I. (2010). Cytokine stimulation promotes increased glucose uptake via translocation at the plasma membrane of GLUT1 in HEK293 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110(6): 1471-1480.
- Zhao, Y. & Chegini, N. (1994). Human fallopian tube expresses granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF alpha and beta receptors and contain immunoreactive GM-CSF protein. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 79(2): 662-665.