

اثر افزودن منابع پروتئین عبوری در جیره گاوهای پابه‌ماه بر وضعیت متابولیکی و بروز ناهنجاری‌های سلامتی گاوهای هلستاین طی فصل گرم

فاطمه احمدی^۱، حمید امانلو^۲، طاهره امیرآبادی فراهانی^{۳*} و نجمه اسلامیان فارسونی^۴
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۳. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴. استادیار، گروه علوم دامی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی شهرکرد، شهرکرد، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۱۹)

چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر افزودن منابع پروتئین عبوری در جیره گاوهای پابه‌ماه هلستاین بر متابولیت‌های خونی و بروز ناهنجاری‌های متابولیکی در فصل گرم بود. ۸۸ راس گاو هلستاین چندبار زایش کرده، ۳۰ روز پیش از تاریخ زایش مورد انتظار وارد طرح شدند و به یکی از ۲ تیمار آزمایشی: پروتئین خام پایین (۱۴/۳ درصد پروتئین خام؛ LCP) و پروتئین خام بالا (۱۷/۱ درصد پروتئین خام؛ HCP) با استفاده از کنجاله گلوتن ذرت و پودر ماهی اختصاص یافتند. به منظور بررسی متابولیت‌های خونی، از ۳۰ روز پیش از زایش تا روز زایش هر هفته و همچنین در روزهای صفر، ۵، ۱۴ و ۲۱ پس از زایش، خونگیری از تمام گاوها انجام شد. غلظت آلبومین، نیتروژن اوره‌ای خون (BUN) و منیزیم در گروه HCP در دوره پیش از زایش بالاتر بود. در دوره پس از زایش در تیمار HCP، مقدار آلبومین و کراتینین بیشتر و مقدار FFA، BHB و گلوکز کمتر بود. بروز کتوزیس تحت بالینی، متريت و اندومتريت در تیمار HCP نسبت به تیمار LCP کمتر بود. خوراندن جیره حاوی پروتئین عبوری بالا در دوره پابه‌ماه در فصل گرم باعث افزایش آلبومین در دوره پیش و پس از زایش، افزایش غلظت کراتینین در دوره پس از زایش و کاهش بروز کتوزیس، متريت و اندومتريت شد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین غیر قابل تجزیه، دوره پابه‌ماه، فصل گرم، گاو هلستاین، ناهنجاری‌های متابولیکی.

Effects of supplementing close-up diets with rumen undegradable protein on metabolite status and the incidence of health disorders of Holstein cows during the hot season

Fateme Ahmadi¹, Hamid Amanlou², Tahere Amirabadi Farahani^{3*} and Najme Eslamian Farsuni⁴

1, 2. PhD. Candidate and Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

3. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

4. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Agriculture and Natural Resources Research Center, Shahrekord, Iran

(Received: Jan. 29, 2022 - Accepted: Apr. 8, 2021)

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of supplementing close-up diets with rumen undegradable protein on serum metabolites and the incidence of health disorders of Holstein dairy cows, during the hot season. Eighty-eight multiparous Holstein dairy cows were randomly assigned to 1 of 2 treatment groups: low crude protein (14.3% CP; 14CP) and high crude protein (17.1% CP; 17CP) diets. Blood samples were collected weekly from d -30 up to calving and then at 0, 5, 14, and 21 days after calving, for serum metabolites determination. Cows fed the 17CP diet had higher serum concentrations of albumin, blood urea nitrogen, and Mg than 14CP cows during the close-up period. In postpartum, the 17CP cows had higher serum albumin and creatinine and lower free fatty acid, BHB, and glucose concentrations than the 14CP cows. The risk to developing subclinical ketosis (SCK), metritis and endometritis were higher for the 14CP cows than the 17CP cows. Overall, feeding high rumen undegradable protein diet to close-up cows during the hot season increased serum creatinine concentrations and lowered the incidence of SCK and metritis and endometritis postpartum.

Keywords: Holstein cows, hot season, metabolic disorders, rumen undegradable protein, transition cow.

* Corresponding author E-mail: Amirabadi@sku.ac.ir; Amirabadi_t@yahoo.com

دهد. برخی پژوهش‌ها (Baumgard *et al.*, 2006) گزارش کرده‌اند که حساسیت به انسولین در دوره تنش گرمایی در بافت آدیپوز، اما نه در بافت پروتئینی افزایش می‌یابد به طوری که به دلیل نیاز بیشتر به پیش‌سازهای گلوکز موبیلیزه شدن بافت چربی کاهش و تجزیه بافت پروتئینی در گاوهای شیری افزایش می‌یابد. سازگاری متابولیکی در گاوهای خشک به طور متفاوتی اتفاق می‌افتد، به طوری که آن‌ها به خاطر ماده خشک مصرفی کمتر حرارت متابولیکی کمتری تولید می‌کنند (West, 2003)، اما تنش گرمایی در اواخر دوره آبستنی، عملکرد و سلامت گاوها را در دوره شیردهی بعدی تحت تاثیر قرار می‌دهد (Gernand *et al.*, 2019; Das *et al.*, 2016; Urdaz *et al.*, 2006). ما فرض کردیم که گاوهایی که در اواخر آبستنی در معرض تنش گرمایی قرار دارند به پروتئین بیشتری برای به تاخیر انداختن تجزیه پروتئین در پیش از زایش و نگهداری این منابع پروتئینی ناپایدار برای پس از زایش نیاز دارند. بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر افزایش سطح پروتئین عبوری جیره در دوره پابه‌ماه بر متابولیت‌های خونی و بروز ناهنجاری‌های متابولیکی در گاوهای هلشتاین طی فصل گرم بوده است.

مواد و روش‌ها

تغذیه، مدیریت گاوها و طرح آزمایشی

این پژوهش در یک مزرعه تجاری گاو شیری در استان قزوین از مرداد تا شهریور ۱۳۹۸ انجام شد. ۸۸ راس گاو هلشتاین، ۳۰ روز پیش از تاریخ زایش مورد انتظار وارد طرح شدند و به طور تصادفی به یکی از دو تیمار آزمایشی: پروتئین خام پایین (LCP) (۱۴/۳ درصد پروتئین خام با ۴/۲ درصد پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه RUP) و پروتئین خام بالا (HCP) (۱۷/۱ درصد پروتئین خام با ۶ درصد RUP) اختصاص یافتند. تمام گاوها پیش از تقسیم‌بندی در دو تیمار، از لحاظ دوره شیردهی، مقدار شیر تولیدی دوره پیشین، امتیاز وضعیت بدنی متوازن شدند. انرژی خالص شیردهی هر دو گروه برابر با ۱/۶۰ مگا کالری در کیلوگرم ماده خشک بود و مقدار پروتئین خام با

مقدمه

با وجود تغذیه گاوها براساس توصیه‌های NRC (2001) طی دوره انتقال، گاوها تجزیه بافت چربی و پروتئین را به دلیل کاهش خوراک مصرفی همراه با افزایش مواد مغذی مورد نیاز برای رشد جنین، تولید آغوز، تولید شیر و عملکرد سیستم ایمنی تجربه می‌کنند. تجزیه بافت پروتئینی ممکن است پیش از تجزیه بافت چربی اتفاق بیفتد و از پیش از زایش تا ۲۸ روز پس از زایش ادامه یابد که ممکن است به دلیل عرضه ناکافی پروتئین جیره در دوره پیش از زایش باشد (Van der Drift *et al.*, 2017). افزایش پروتئین جیره در دوره پیش از زایش با استفاده از منابع پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه (RUP)، باعث بهبود بازده خوراک مصرفی، افزایش تولید شیر و کاهش اسیدهای چرب آزاد (FFA) و بتا‌هیدروکسی بوتیرات (BHB) در دوره پس از زایش می‌شود (Farahani *et al.*, 2017, 2019). تصور بر این است که افزایش RUP جیره در دوره پابه‌ماه ممکن است باعث افزایش ذخایر ناپایدار پروتئینی در بدن شده و از تجزیه بافت پروتئینی در پیش از زایش پیشگیری کند. اما، اثر این راهکار در گاوهایی که در دوره انتقال تحت تنش گرمایی هستند مورد بررسی قرار نگرفته است.

تغییرات آب و هوایی و تنش گرمایی به عنوان یک مشکل جهانی، صنعت گاو شیری را نیز درگیر کرده است. انتخاب ژنتیکی برای تولید شیر بالا، باعث بوجود آمدن گاوهای آسیب‌پذیرتر در مقابل تنش گرمایی شده است (West, 2003). علیرغم استفاده از سیستم‌های خنک‌کننده در مزارع گاو شیری، تنش گرمایی به طور منفی، تولید شیر (Barash *et al.*, 2001)، باروری (Avendano-Reyes *et al.*, 2006)، عملکرد سیستم ایمنی (Tao & Dahl, 2013) و یکپارچگی روده (Koch *et al.*, 2019) را تحت تاثیر قرار می‌دهد، که با ضررهای اقتصادی بزرگ همراه است (St-Pierre *et al.*, 2003). چالش‌های فیزیولوژیکی و متابولیکی طی دوره انتقال همراه با تنش گرمایی می‌تواند تجزیه بافت پروتئینی را تشدید کرده و خطر ابتلا به بیماری‌های متابولیکی را افزایش

زایشگاه منتقل شدند. امتیاز مشکلات زایش (CDS) با استفاده از شاخص ۵ امتیازی (۱ = بدون مشکل، ۲ = مشکل خیلی جزئی، ۳ = نیاز به کمک، ۴ = کمک قابل توجه و ۵ = سزارین) ثبت شد (Park et al., 2002). پس از زایش گاوها به جایگاه فری استال با بستر ماسه بادی دارای سیستم خنک کننده منتقل شدند و تا ۲۱ روز در آن جایگاه ماندند. پس از زایش تمام گاوها به مدت ۲۱ روز جیره یکسانی دریافت کردند (جدول ۱). خوراک در ساعات ۹:۰۰، ۱۷:۰۰ و ۱:۰۰ در حد اشتها توزیع شد. شیردوشی از گاوها ۳ بار در روز در ساعات ۸:۰۰، ۱۶:۰۰ و ۰۰:۰۰ انجام شد. جیره نویسی توسط نرم افزار NRC (2001) انجام شد. اجزا و ترکیبات شیمیایی جیره ها در جدول های ۱ و ۲ ارائه شده است.

در دوره انتقال دمای راست روده سه بار در هفته در روزهای شنبه، دوشنبه و چهارشنبه در ساعت ۷:۰۰ و ۱۴:۰۰ ثبت گردید و میانگین دمای راست روده ای آنالیز شد.

افزودن منابع پروتئین عبوری (کنجاله گلوتن ذرت و پودر ماهی) افزایش یافت. خوراک در ساعات ۹:۰۰ و ۱۷:۰۰ در حد اشتها در دوره پایه ماه در اختیار گاوها قرار گرفت. در دوره پایه ماه، گاوها در بهاربندهایی قرار داشتند که دارای فن و مه پاش بود. طول دوره پایه ماه در تیمارهای LCP و HCP به ترتیب ۲۷/۱۳ و ۲۸/۳۰ روز بود.

نمونه گیری، جمع آوری داده و طرح آزمایشی

کمینه، بیشینه و میانگین دمای هوا و رطوبت نسبی بهاربندها در طول دوره آزمایش به طور روزانه ثبت شد و شاخص حرارتی-رطوبتی (THI) با استفاده از معادله زیر حساب گردید (Dikmen & Hansen, 2009).

$$THI = (1.8 \times T + 32) - [(0.55 - 0.0055 \times RH) \times (1.8 \times T - 26)]$$

که در آن، T= دمای هوا (درجه سانتی گراد) و RH= رطوبت نسبی (درصد) بود.

پس از مشاهده اولین علائم زایش، گاوها به

جدول ۱. اجزای تشکیل دهنده جیره های پایه ماه و تازهزا (بر اساس درصد ماده خشک)

Table 1. Feed ingredients of close-up and fresh cows diets (% of DM)

| Ingredient | Close-up diets ¹ | | Fresh |
|------------------------------------|-----------------------------|-------|-------|
| | LCP | HCP | |
| Legume forage hay, mature | 23.50 | 23.50 | 14.50 |
| Corn silage, normal | 33.57 | 33.57 | 21.30 |
| Wheat straw | - | - | 1.58 |
| Beet sugar pulp, dried | - | - | 3.70 |
| Barley grain, rolled | 8.60 | 5.25 | 13.68 |
| Corn grain, ground, dry | 15.03 | 12.53 | 19.70 |
| Canola meal, mechanical extraction | 3.0 | 3.0 | - |
| Soybean meal, solvent | 8.45 | 8.45 | 15.40 |
| Meat and bone meal | 2.67 | 2.67 | 2.10 |
| Fish meal | - | 3.05 | - |
| Corn gluten meal | - | 2.88 | - |
| Cottonseed, whole with lint | - | - | 1.80 |
| Soybean seed, whole heated | - | - | 1.50 |
| Calcium soaps of fatty acids | - | - | 0.32 |
| Calcium carbonate | 1.42 | 1.42 | 0.98 |
| Magnesium oxide | 0.16 | 0.16 | 0.34 |
| Magnesium sulfate | 0.84 | 0.84 | - |
| Calcium chloride | 0.54 | 0.54 | - |
| Ammonium chloride | 0.32 | 0.24 | - |
| NaHCO ₃ | - | - | 0.80 |
| Salt | - | - | 0.45 |
| Bentonite | - | - | 0.49 |
| Vitamin premix ² | 0.95 | 0.95 | 0.68 |
| Mineral premix ³ | 0.95 | 0.95 | 0.68 |

۱. جیره های طراحی شده به صورت LCP و HCP به ترتیب حاوی ۱۴/۳ و ۱۷/۱ درصد CP بودند.

۲. پرمیکس حاوی ۱,۲۰۰,۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۲۵۰,۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D و ۱۰,۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین E، ۲۰۰ میلی گرم بیوتین و ۳,۰۰۰ میلی گرم مونسین در هر کیلوگرم بود.

۳. پرمیکس حاوی ۱۰۵ میلی گرم کبالت، ۴,۲۰۰ میلی گرم مس، ۱۹۰ میلی گرم ید، ۱۴,۵۰۰ میلی گرم منگنز، ۸۰ میلی گرم سلنیوم و ۱۵,۰۰۰ میلی گرم روی بود.

1. Diets designated as LCP and HCP contained 14.3 and 17.1% CP, respectively.

2. Premix contained 1,200,000 IU of vitamin A/kg, 250,000 IU of vitamin D/kg, 10,000 IU of vitamin E/kg, 200 mg of biotin/kg, and 3,000 mg of monensin/kg.

3. Premix contained 105 mg of Co/kg, 4200 mg of Cu/kg, 190 mg of I/kg, 14500 mg of Mn/kg, 80 mg of Se/kg, and 15000 mg of Zn/kg.

جدول ۲. ترکیب شیمیایی جیره‌های تغذیه‌شده در دوره پابه‌ماه و تازه‌زا (بر اساس درصد ماده خشک به‌غیر از موارد بیان‌شده)

Table 2. Chemical composition of the diets fed during close-up and fresh periods (% of DM, unless otherwise stated)

| Composition | Close-up diets ¹ | | Fresh |
|--------------------------------|-----------------------------|------|-------|
| | LCP | HCP | |
| NE _L , Mcal/Kg DM | 1.61 | 1.63 | 1.66 |
| CP | 14.3 | 17.1 | 16.0 |
| RDP | 10.1 | 11.1 | 10.8 |
| RUP | 4.2 | 6.0 | 5.2 |
| RDP balance, gr/d | +8.0 | +131 | +91 |
| RUP balance, gr/d | +419 | +649 | -518 |
| MP balance ² , gr/d | +196 | +400 | -421 |
| NDF | 32.2 | 31.6 | 28.0 |
| ADF | 22.2 | 22.1 | 18.0 |
| NFC | 43.1 | 40.6 | 45.9 |
| EE | 2.8 | 2.9 | 3.5 |
| Ca | 1.6 | 1.7 | 1.2 |
| P | 0.5 | 0.5 | 0.4 |
| Mg | 0.40 | 0.40 | 0.41 |
| Na | 0.04 | 0.07 | 0.44 |
| K | 1.31 | 1.32 | 1.22 |
| Cl | 0.73 | 0.70 | 0.49 |
| S | 0.30 | 0.35 | 0.20 |
| DCAD, Meq/kg DM | -43 | -45 | +242 |

۱. جیره‌های طراحی شده به‌صورت LCP و HCP به ترتیب حاوی ۱۴/۳ و ۱۷/۱ درصد CP بودند.

۲. پروتئین قابل متابولیسم مورد نیاز مدل NRC بعلاوه ۱۲۰ گرم MP برای در نظر گرفتن رشد پستان‌ها بود (Bell *et al.*, 2000).

1. Diets designated as LCP and HCP contained 14.3 and 17.1% CP, respectively.

2. MP requirement was NRC model plus 120 g of MP to account for mammary growth (Bell *et al.*, 2000).

Oetzel and Eastridge, 2012)، هیپوکلسیمی (al., 2012)، کتوزیس تحت بالینی (McArt *et al.*, 2015)، متريت (Sheldon *et al.*, 2006)، اندومتريت بالینی (Sheldon *et al.*, 2006)، ورم پستان بالینی (Jamali *et al.*, 2018) و جابجایی شیردان با تشخیص دامپزشک مزرعه تا روز ۲۱ پس از زایش ثبت گردید. از ۸۸ گاو وارد شده در این طرح داده‌های مربوط به ۸۵ راس (۴۱ راس در تیمار LCP و ۴۴ راس در تیمار HCP) مورد آنالیز قرار گرفتند. ۳ راس گاو از تیمار LCP از طرح خارج شدند (۲ راس به دلیل تاخیر در زایش و ۱ راس به دلیل سقط). تمام آنالیزهای آماری با ویرایش ۹/۴ نرم‌افزار SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) آنالیز شدند. تولید شیر دوره شیردهی پیشین، دوره زایش و طول دوره پابه‌ماه بین تیمارها با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS آنالیز شدند. رگرسیون لجستیک (PROC GENMOD) برای بررسی نسبت گاوها در هر گروه تیماری برای امتیاز وضعیت بدنی (BCS) ($BCS \leq 3.25$, $3.25 < BCS < 3.75$, and $BCS \geq 3.75$) استفاده شد. داده‌های تکرار شده در زمان (دمای راست روده و متابولیت‌های سرم) با استفاده از رویه MIXED آنالیز شدند. مدل آماری شامل

نمونه خون ۳ تا ۴ ساعت پس از خوراک‌ریزی صبح از ورید دمی با استفاده از لوله‌های تحت خلا (FL Medical, Torreglia, Italy) به‌طور هفتگی از روز ۳۰- تا زایش و در روزهای ۰، ۵، ۱۴ و ۲۱ پس از زایش گرفته شد. نمونه خون‌ها با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و نمونه سرم‌های جدا شده در میکروتیوپ در ۲۰- درجه منجمد شدند. غلظت گلوکز، آلبومین، پروتئین کل، نیتروژن اورهای خون، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، کلسترول، کراتینین، انسولین، کلسیم، FFA و BHB نمونه‌های سرم اندازه‌گیری شد. تعداد ۱۲ نمونه از هر تیمار به‌طور تصادفی برای اندازه‌گیری FFA و انسولین در روزهای صفر، ۵، ۱۴ و ۲۱ پس از زایش انتخاب شدند. غلظت گلوبولین از کم کردن مقدار آلبومین از پروتئین کل محاسبه شد. امتیاز وضعیت بدنی در روزهای ۳۰-، ۳-، صفر و ۲۱ روز نسبت به زایش، توسط دو فرد مجرب با استفاده از شاخص ۵ امتیازی (Edmonson *et al.*, 1989) ثبت و میانگین داده‌ها برای آنالیز استفاده شد. بروز ناهنجاری‌های متابولیکی از قبیل سخت‌زایی (به مواردی با امتیاز بالای ۳ $CDS \geq 3$)، جفت ماندگی (Kelton *et al.*, 1998)، تب شیر (Jawor *et al.*, 2000)

متابولیت‌های خونی

تأثیر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار در زمان بر غلظت متابولیت‌های خونی پیش از زایش در جدول ۴ آرایه شده است. غلظت پروتئین کل، گلوبولین، گلوکز، کلسترول و کلسیم تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفتند ($P > 0/05$). غلظت آلبومین سرم در گروه HCP بالاتر بود ($P < 0/01$). اثر زمان ($P < 0/01$) و اثر متقابل تیمار در زمان ($P < 0/01$) بر مقدار آلبومین معنی‌دار بود، به طوری که در تیمار HCP غلظت آلبومین سرم از ۳ هفته پیش از زایش تا یک هفته پیش از زایش بالاتر از تیمار LCP بود (شکل ۲). غلظت نیتروژن اوره‌ای خون (BUN) در تیمار HCP نسبت به تیمار LCP بالاتر بود (جدول ۴؛ $P < 0/01$). اما اثر زمان ($P = 0/41$) و اثر متقابل تیمار در زمان بر غلظت BUN معنی‌دار نبود ($P = 0/35$). تغییرات BCS با افزایش سطح پروتئین در دوره پابه‌ماه تحت تاثیر قرار نگرفت (جدول ۴؛ $P = 0/17$). در شرایط نرمال، برخی از پژوهش‌ها (Farahani *et al.*, 2017, 2019) تأثیر سطوح پروتئین را در دوره پابه‌ماه بررسی کردند و اثری از افزایش پروتئین بر غلظت آلبومین پیدا نکردند. تفاوت پژوهش‌های پیشین با پژوهش حاضر، شاید به دلیل مکانیسم فیزیولوژی درگیر در تنش گرمایی باشد.

آلبومین یک پروتئین فاز حاد منفی است (Bertoni *et al.*, 2008) که در شرایط التهاب در کبد مقدار آن کاهش می‌یابد و این شاخصی از نقص عملکرد کبد است. در پژوهش حاضر، کاهش معنی‌دار آلبومین در گروه LCP، یک عامل خطر برای بروز ناهنجاری‌ها در گاو تازه‌زا است. علاوه بر این، در پژوهش دیگر (Moorby *et al.*, 2002) گزارش شد که آلبومین پلاسما یک منبع آمینواسیدی برای تامین آمینواسیدهای مورد نیاز در شرایطی که جیره کمبود پروتئین دارد، محسوب می‌شود. این نتایج پیشنهاد می‌کند که گروه LCP توانایی تامین پروتئین را نسبت به گروه HCP نداشته است. نتایج BUN با پژوهش‌های پیشین (Hartwell *et al.*, 2000; Doepel *et al.*, 2002) همسو است که افزایش غلظت BUN را با افزایش

آثار تیمار، زمان، اثر متقابل تیمار در زمان و BCS به عنوان اثر ثابت و گاو در تیمار به عنوان اثر تصادفی بود. برای آنالیز تغییرات BCS، اثر ثابت زمان و اثر متقابل آنها از مدل ANOVA خارج شد. برای آنالیز داده‌های مربوط به متابولیت‌های سرم، غلظت متابولیت‌ها در ۳۰- روز پیش از زایش (اگر معنی‌دار بودند؛ $P < 0/1$) به عنوان عامل کووریت استفاده شدند. داده‌های مربوط به ناهنجاری‌های سلامتی با رگرسیون لجستیک با استفاده از رویه LOGISTIC برای به‌دست‌آوردن نرخ بروز^۱ (RR) و فاصله اطمینان ۹۵ درصد آنالیز شدند. مدل لجستیک برای داده‌های ناهنجاری‌های سلامتی شامل آثار ثابت تیمار، BCS در زمان ورود به طرح و اثر متقابل آنها با تیمار بود. داده‌ها به‌صورت LSM گزارش شدند و سطح معنی‌داری به‌صورت $P \leq 0/05$ و تمایل به معنی‌داری $0/05 < P \leq 0/10$ با آزمون توکی در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

در زمان شروع آزمایش، تفاوتی بین گاوها از لحاظ گروه‌بندی BCS ($P > 0/1$)، مقدار تولید شیر دوره شیردهی پیشین ($P = 0/55$)، دوره شیردهی ($P = 0/69$) و طول دوره پابه‌ماه ($P = 0/88$) بین تیمارها وجود نداشت، میانگین طول دوره پابه‌ماه در تیمار LCP و HCP به ترتیب برابر با $27/13 \pm 0/76$ و $28/30 \pm 0/81$ روز بود (جدول ۳).

شرایط محیطی

الگوی کمینه، بیشینه و میانگین شاخص حرارتی-رطوبتی در دوره پابه‌ماه در شکل ۱ نشان داده شده است. در پژوهش حاضر، میانگین THI برابر با $75/8$ واحد بود که نشان‌دهنده تنش گرمایی متوسط (72 تا 79) است (Zimbelman *et al.*, 2009). میانگین درجه حرارت راست روده‌ای به عنوان شاخصی از تنش گرمایی، در گاوهای LCP و HCP برابر با $39/5$ و $39/4$ بود (جدول ۴؛ $P = 0/21$).

سطح پروتئین در دوره پابه‌ماه گزارش کردند. نیتروژن اورهای خون علاوه بر عملکرد پروتئین مصرف شده، شاخصی از موبیلیزه‌شدن پروتئین در شرایط کمبود پروتئین و تنش گرمایی است. در پژوهش حاضر سطح پایین BUN در گروه LCP بیانگر کاهش پروتئین مصرفی نسبت به گروه HCP است.

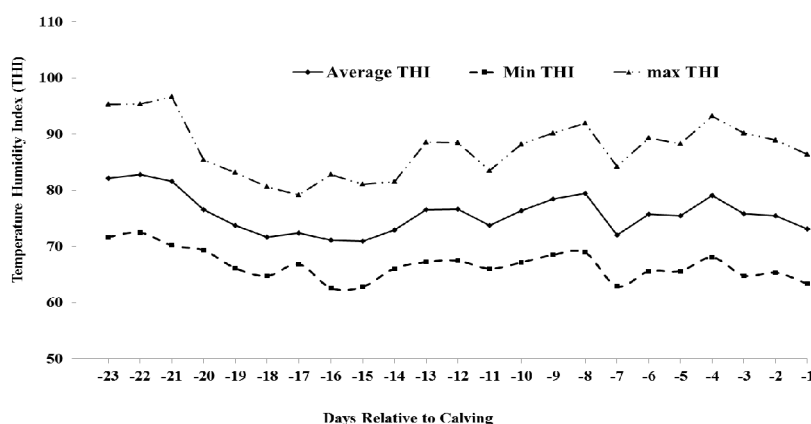
جدول ۳. نسبت گاوها با $BCS \leq 3.25$ ، $3.25 < BCS < 3.75$ ، و $BCS \geq 3.75$ ، و میانگین حداقل مربعات (\pm SEM) تولید شیر دوره شیردهی پیشین، طول دوره پابه‌ماه و دوره زایش برای گاوها برای هر گروه تیماری در ۳۰- روز نسبت به تاریخ زایش مورد انتظار.

Table 3. Proportions of cows with $BCS \leq 3.25$, $3.25 < BCS < 3.75$, and ≥ 3.75 , as well as LSM (\pm SEM) of previous lactation milk yield, close-up period length, and parity for each treatment group at -30 d relative to expected calving date

| Item | Diet ¹ | | P-value Diet |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| | LCP | HCP | |
| BCS [% (no./ no.)] | | | |
| ≤ 3.25 | 63.63 (28/44) | 60.97 (25/41) | 0.80 |
| $3.25 < BCS < 3.75$ | 29.54 (13/44) | 24.39 (10/41) | 0.59 |
| ≥ 3.75 | 6.81 (3/44) | 14.63 (6/41) | 0.25 |
| Previous lactation milk yield, kg | 11649 \pm 172.42 | 11498 \pm 182.94 | 0.55 |
| Close up period length, d | 27.13 \pm 0.76 | 28.30 \pm 0.81 | 0.88 |
| Parity | 3.13 \pm 0.20 | 3.25 \pm 0.21 | 0.69 |

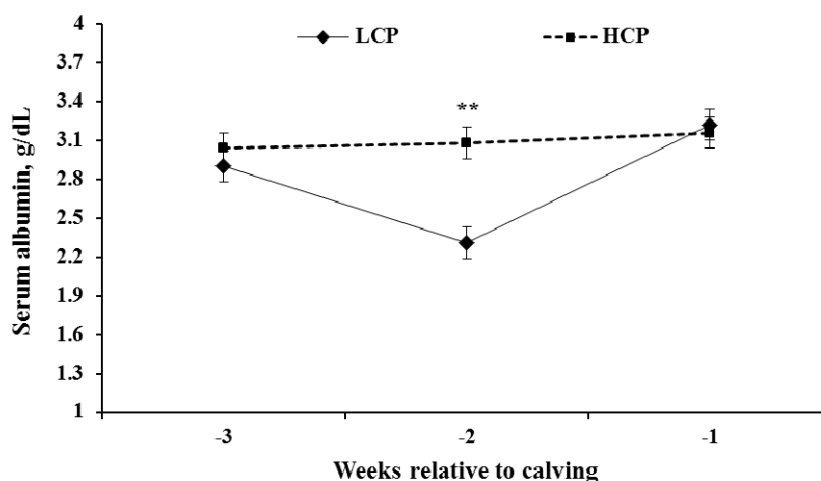
۱. جیره‌های طراحی شده به‌صورت LCP و HCP به ترتیب حاوی ۱۴/۳ و ۱۷/۱ درصد CP بودند.

1. Diets designated as LCP and HCP contained 14.3 and 17.1% CP, respectively.



شکل ۱. الگوی تغییرات کمینه، بیشینه و میانگین شاخص حرارتی-رطوبتی در دوره پابه‌ماه

Figure 1. Temporal pattern of minimum, maximum, and average temperature-humidity index (THI) during the close-up period.



شکل ۲. اثر سطوح مختلف پروتئین خام در دوره پابه‌ماه بر غلظت آلبومین در دوره پیش از زایش گاوهای هلشتاین در فصل گرم. داده‌ها به‌صورت حداقل میانگین مربعات و SEM گزارش شده‌اند. تیمار ($P < 0.01$)، زمان ($P < 0.01$)، تیمار در زمان ($P < 0.01$).

Figure 2. Effects of different crude protein levels in close-up diets on serum albumin concentrations precalving in Holstein dairy cows during the hot season. Data are presented as least squares means and SEM. Treat, $P < 0.01$; time, $P < 0.01$; treat \times time, $P < 0.01$.

جدول ۴. اثر سطوح مختلف پروتئین در جیره‌های پایه‌ماه بر روی فراسنجه‌های خونی پیش از زایش در گاوهای شیری هلشتاین طی فصل گرم

Table 4. Effects of different crude protein levels in close-up diets on serum metabolites, BCS changes, and rectal temperature precalving of Holstein dairy cows during the hot season

| Item | Diet ¹ | | SEM | P-value | | |
|--------------------------|-------------------|-------|------|---------|-------|-------------|
| | LCP | HCP | | Diet | Week | Diet × Week |
| Total Protein, gr/dL | 6.57 | 6.47 | 0.25 | 0.69 | 0.48 | 0.93 |
| Albumin, gr/dL | 2.77 | 3.12 | 0.08 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| Globulin, gr/dL | 3.77 | 3.37 | 0.28 | 0.16 | 0.16 | 0.06 |
| BUN, mg/dL | 13.17 | 14.50 | 0.3 | <0.01 | 0.41 | 0.35 |
| Glucose, mg/dL | 61.06 | 67.07 | 4.62 | 0.19 | 0.05 | 0.10 |
| Cholesterol, mg/dL | 85.71 | 92.08 | 3.96 | 0.11 | <0.01 | 0.22 |
| Ca, mg/dL | 8.46 | 8.58 | 0.13 | 0.39 | 0.85 | 0.05 |
| Rectal temperature, °C | 39.5 | 39.4 | 0.05 | 0.21 | 0.11 | 0.14 |
| BCS changes ² | 0.16 | 0.22 | 0.03 | 0.17 | - | - |

۱. جیره‌های طراحی شده به صورت LCP و HCP به ترتیب حاوی ۱۴/۳ و ۱۷/۱ درصد CP بودند.

۲. تفاوت بین -۳۰ و -۳ روز پیش از زایش

1. Diets designated as 14CP and 17CP contained 14.3 and 17.1% CP, respectively.

2. Difference between -30 and -3 d relative to calving.

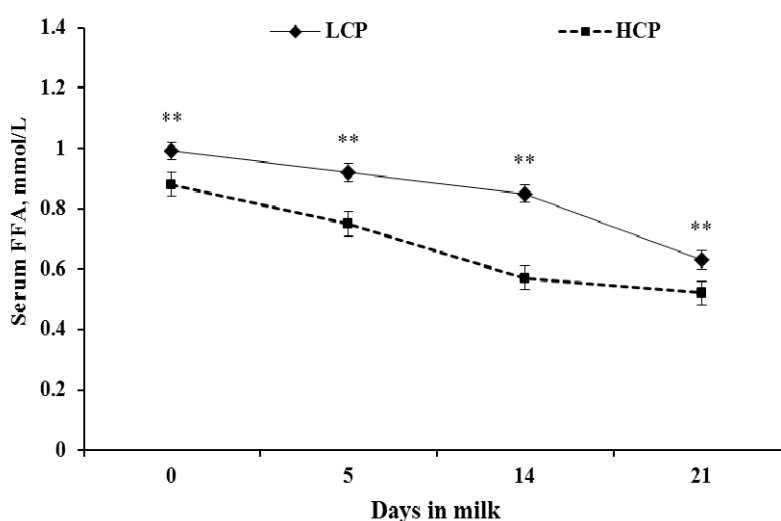
آمینواسیدها برای گلوکونئوز در کبد و یا ساخت پروتئین در غدد پستانی و سایر سلول‌ها ضروری است. بنابراین، آمینواسیدهای آزاد شده از بافت عضلانی ممکن است در تنظیم توازن انرژی موثر باشند. اما اگر جیره پیش از زایش کمبود پروتئین داشته باشد، تجزیه بافت پروتئینی ممکن است از پیش از زایش آغاز گردد (Van der Drift *et al.*, 2012) و ذخایر ناپایدار پروتئینی که در اوایل زایش بایستی استفاده شود ممکن است به مخاطره بیافتد و مشکلات متابولیکی را افزایش دهد. گاوهای دوره انتقال، کاهش آلبومین را به ویژه در روزهای اول پس از زایش تجربه می‌کنند. این حالت ممکن است با تنش گرمایی به دلیل کاهش پروتئین مصرفی، تشدید شود. افزون بر این، گزارش شده است که کاهش غلظت آلبومین در دوره انتقال با افزایش غلظت FFA و نسبت FFA به آلبومین، همبستگی دارد (Contreras & Sordillo, 2011) که با پژوهش حاضر مطابقت دارد، به طوری که در این پژوهش، غلظت FFA در گروه HCP پایین تر بود. اگرچه کاهش غلظت FFA بخشی از مکانیسم هموستاتیک در تنش گرمایی برای کاهش تولید حرارت متابولیکی است (Baumgard *et al.*, 2006)، اما غلظت‌های پایین تر FFA در گروه HCP ممکن است نشان‌دهنده برداشت بیشتر FFA از کبد در این گروه باشد. برخی از پژوهش‌ها (Kaufman *et al.*, 2018) گزارش کردند که در تنش گرمایی، افزایش پروتئین خام جیره از ۱۴ به ۱۸ درصد در گاوهای

اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار در زمان بر غلظت متابولیت‌های سرم در دوره پس از زایش در جدول ۵ نشان داده شده است. غلظت پروتئین کل، گلوبولین، BUN، کلسترول، انسولین، AST و کلسیم با تیمارها تحت تاثیر قرار نگرفت ($P > 0.05$). اثر معنی‌داری ($P < 0.01$) از تیمار بر غلظت آلبومین مشاهده شد، به طوری که مقدار آن در گروه HCP نسبت به تیمار LCP بالاتر بود. غلظت سرمی FFA و BHB در تیمار HCP کمتر بود ($P < 0.01$). گاوهای HCP دارای غلظت بالاتری از کراتینین ($P = 0.07$) و غلظت پایین تری از گلوکز ($P = 0.04$) بودند. اثر زمان بر غلظت تمام متابولیت‌ها به جز کراتینین ($P = 0.63$) و BUN معنی‌دار بود ($P = 0.21$). اثر متقابل تیمار در زمان بر غلظت FFA معنی‌دار ($P < 0.01$) بود و در گروه HCP غلظت آن نسبت به گروه LCP از زمان زایش تا ۲۱ روز پس از زایش پایین تر بود (شکل ۳). تغییرات غلظت کراتینین سرم یک شاخص سودمندی از بافت عضله است (Megahed *et al.*, 2019; McCabe & Boerman, 2020)، به طوری که از دست دادن زیاد بافت عضلانی، باعث کاهش غلظت کراتینین سرم می‌شود.

در پژوهش حاضر، متاسفانه غلظت ۳- متیل هیسیتیدین که شاخصی از تجزیه عضله است اندازه‌گیری نشد، اما در گروه HCP غلظت کراتینین نسبت به گروه LCP بالاتر بود. در اوایل زایش، موبیلیزه‌شدن پروتئین از ذخایر بدنی برای تامین

موبیلیزه‌شدن پروتئین اتفاق افتاده است. همچنین، کاهش غلظت BHB در گروه HCP نسبت به گروه LCP با پژوهش پیشین (Van der Drift *et al.*, 2012) مطابقت دارد که گزارش کردند گاوهایی که موبیلیزه شدن پروتئین بیشتری را تجربه کردند، دارای غلظت پایین‌تر BHB بودند. این نتایج، بررسی بیشتر نقش بالقوه آمینواسیدهای گلوکوژنیک را در متابولیسم انرژی در گاوهای دوره انتقال که در استرس گرمایی هستند را می‌طلبد.

شیری با افزایش غلظت انسولین و کاهش غلظت FFA و افزایش غلظت BHB همراه بوده است. آنها پیشنهاد کردند که اکسیداسیون کامل FFA به دلیل افزایش غلظت انسولین کاهش می‌یابد و منجر به افزایش غلظت BHB می‌شود. در پژوهش حاضر، نبود پاسخ انسولین به تیمارها و غلظت‌های پایین‌تر BHB در گروه HCP نسبت به گروه LCP احتمالاً نشان‌دهنده این است که شاید اکسیداسیون کامل FFA به دلیل تامین کافی آمینواسیدهای گلوکوژنیک از طریق



شکل ۳. اثرات سطوح متفاوت پروتئین خام جیره پابه‌ماه بر غلظت FFA سرم

Figure 3. Effects of different crude protein levels in close-up diets on serum FFA concentrations

جدول ۵. اثر سطوح مختلف پروتئین در جیره‌های پابه‌ماه بر روی فراسنجه‌های خونی پس از زایش در گاوهای شیری هلستاین طی فصل گرم

Table 5. Effects of different crude protein levels in close-up diets on serum metabolites postcalving of Holstein dairy cows during the hot season

| Item | Diet ¹ | | SEM | P-value | | |
|--------------------------|-------------------|-------|------|---------|-------|------------|
| | 14CP | 17CP | | Diet | Day | Diet × Day |
| Total protein, gr/dL | 7.53 | 7.56 | 0.11 | 0.81 | <0.01 | 0.64 |
| Albumin, gr/dL | 3.40 | 3.56 | 0.05 | <0.01 | <0.01 | 0.97 |
| Globulin, gr/dL | 4.13 | 4.00 | 0.11 | 0.25 | 0.01 | 0.68 |
| BUN, mg/dL | 15.38 | 15.72 | 0.37 | 0.36 | 0.21 | 0.93 |
| Creatinine, mg/dL | 1.40 | 1.65 | 0.10 | 0.07 | 0.63 | 0.19 |
| Glucose, mg/dL | 86.55 | 80.38 | 1.89 | 0.04 | <0.01 | 0.80 |
| Insulin, ng/mL | 1.28 | 1.30 | 0.04 | 0.69 | <0.01 | 0.53 |
| FFA, mmol/L | 0.85 | 0.68 | 0.02 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| BHB, mmol/L | 0.73 | 0.59 | 0.03 | <0.01 | <0.01 | 0.13 |
| Cholesterol, mg/dL | 96.50 | 95.56 | 1.91 | 0.62 | <0.01 | 0.20 |
| AST, U/L | 82.10 | 76.79 | 5.1 | 0.30 | <0.01 | 0.48 |
| Ca, mg/dL | 8.95 | 8.86 | 0.25 | 0.70 | 0.04 | 0.94 |
| BCS changes ² | -0.21 | -0.27 | 0.03 | 0.20 | - | - |

۱. جیره‌های طراحی شده به صورت LCP و HCP به ترتیب حاوی ۱۴/۳ و ۱۷/۱ درصد CP بودند.

۲. تفاوت بین روز زایش و ۲۱ روز پس از زایش

1. Diets designated as 14CP and 17CP contained 14.3 and 17.1% CP, respectively.
2. Difference between calving day and 21st DIM.

برخلاف نتایج پژوهش حاضر در رابطه با غلظت BHB و FFA، در چندین پژوهش (Huyler *et al.*, 1999; Hartwell *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002) اثری از خوراندن پروتئین بیشتر در دوره پیش از زایش بر غلظت FFA و BHB مشاهده نشد. نتایج متفاوت از غلظت پروتئین در دوره پیش از زایش ممکن است ناشی از پروتئین قابل متابولیسم متفاوت، مقدار آمینواسیدهای متفاوت در پروتئین قابل متابولیسم، منابع پروتئین، شرایط فیزیولوژیکی گاو، ترکیبات جیره پایه و شرایط محیطی باشد.

ناهنجاری‌های متابولیکی

اثر سطوح مختلف پروتئین در جیره‌های پابه‌ماه بر روی بروز ناهنجاری‌های متابولیکی در جدول ۶ خلاصه شده است. هیچ موردی از بروز کتوزیس بالینی در تیمارها مشاهده نشد. بروز ناهنجاری‌های متابولیکی شامل جابجایی شیردان، ورم پستان، سخت‌زایی و جفت ماندگی، هیپوکلسیمی و تب شیر بین تیمارها مشابه بود ($P > 0.1$). اما، شیوع کتوزیس تحت بالینی در تیمار LCP نسبت به HCP، $4/41$ برابر بود ($P=0.02$). بروز متریت و اندومتريت نیز در تیمار HCP نسبت به تیمار LCP تمایل به کاهش داشت ($P=0.1$).

نتایج برخی از پژوهش‌ها (Curtis *et al.*, 1985; Van)

برخلاف نتایج پژوهش حاضر در رابطه با غلظت BHB و FFA، در چندین پژوهش (Huyler *et al.*, 1999; Hartwell *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002) اثری از خوراندن پروتئین بیشتر در دوره پیش از زایش بر غلظت FFA و BHB مشاهده نشد. نتایج متفاوت از غلظت پروتئین در دوره پیش از زایش ممکن است ناشی از پروتئین قابل متابولیسم متفاوت، مقدار آمینواسیدهای متفاوت در پروتئین قابل متابولیسم، منابع پروتئین، شرایط فیزیولوژیکی گاو، ترکیبات جیره پایه و شرایط محیطی باشد.

ناهنجاری‌های متابولیکی

اثر سطوح مختلف پروتئین در جیره‌های پابه‌ماه بر روی بروز ناهنجاری‌های متابولیکی در جدول ۶ خلاصه شده است. هیچ موردی از بروز کتوزیس بالینی در تیمارها مشاهده نشد. بروز ناهنجاری‌های متابولیکی شامل جابجایی شیردان، ورم پستان، سخت‌زایی و جفت ماندگی، هیپوکلسیمی و تب شیر بین تیمارها مشابه بود ($P > 0.1$). اما، شیوع کتوزیس تحت بالینی در تیمار LCP نسبت به HCP، $4/41$ برابر بود ($P=0.02$). بروز متریت و اندومتريت نیز در تیمار HCP نسبت به تیمار LCP تمایل به کاهش داشت ($P=0.1$).

نتایج برخی از پژوهش‌ها (Curtis *et al.*, 1985; Van)

افزایش $3/3$ و $1/5$ برابری متریت در گاوهای مبتلا به کتوزیس تحت بالینی در مقایسه با گاوهای سالم گزارش شد. از طرفی دیگر، در پژوهشی (McArt *et al.*, 2015) بیان شد که ۷۰ درصد موارد متریت به کتوزیس تحت بالینی مربوط است.

افزون بر آن، گزارش شده است که تغذیه نامناسب به‌ویژه عرضه ناکافی پروتئین و آمینواسید در دوره انتقال می‌تواند توازن منفی انرژی در دوره پس از زایش را تحت تاثیر قرار دهد (Amanlou *et al.*, 2017). هم‌چنین، اثر منفی غلظت بالای BHB بر عملکرد آنتی میکروبی لکوسیت‌ها اثبات شده است (Hammon *et al.*, 2006; Grinberg *et al.*, 2008).

جدول ۶. اثر سطوح مختلف پروتئین در جیره‌های پابه‌ماه بر روی درصد بروز ناهنجاری‌های متابولیکی در گاوهای شیری هلشتاین طی فصل گرم

Table 6. Effects of different crude protein levels in close-up diets on metabolic disorders of Holstein dairy cows during the hot season

| Disorders | Diet ¹ | | Estimate | SE ³ | RR ⁴ (95% CI) | P-value |
|-----------------------|-------------------|-------------|----------|-----------------|--------------------------|---------|
| | LCP | HCP | | | | |
| Dystocia ² | 6.81 (3/44) | 7.31 (3/41) | -0.07 | 0.78 | 0.93 (0.19 - 4.35) | 0.92 |
| Retained placenta | 2.27 (1/44) | 4.87 (2/41) | -0.76 | 1.20 | 0.46 (0.04 - 4.94) | 0.52 |
| Milk fever | 4.54 (2/44) | 2.43 (1/41) | 0.62 | 1.20 | 1.86 (0.17-19.78) | 0.60 |
| Hypocalcemia | 50 (22/44) | 39 (16/41) | 0.21 | 0.28 | 1.24 (0.71 - 2.14) | 0.45 |
| Subclinical ketosis | 34.09 (15/44) | 7.31 (3/41) | 1.48 | 0.61 | 4.41 (1.32 - 14.32) | 0.02 |
| Metritis | 15.90 (7/44) | 4.87 (2/41) | 1.18 | 0.77 | 3.26 (0.71 - 14.80) | 0.10 |
| Endometritis | 22.72 (10/44) | 9.75 (4/41) | 0.84 | 0.55 | 2.33 (0.79 - 6.85) | 0.10 |
| Displaced abomasum | 2.27 (1/44) | 2.43 (1/41) | -0.07 | 1.39 | 0.93 (0.06 - 14.41) | 0.95 |
| Mastitis | 6.81 (3/44) | 2.43 (1/41) | 1.02 | 1.13 | 2.79 (0.30 - 25.81) | 0.36 |
| Laminitis | 6.81 (3/44) | 4.87 (2/41) | 0.33 | 0.88 | 1.39 (0.24 - 7.49) | 0.70 |

۱. جیره‌های طراحی شده به‌صورت LCP و HCP به ترتیب حاوی $14/3$ و $17/1$ درصد CP بودند.

۲. سخت‌زایی: گاوها با اسکور سخت‌زایی ۳ و بیشتر از ۳.

۳. خطای استاندارد برای برآوردها

۴. نسبت خطر، ۹۵ درصد فاصله اطمینان

1. Diets designated as 14CP and 17CP contained 14.3 and 17.1% CP, respectively.

2. Dystocia: cows with CDS ≥ 3 .

3. Standard error for estimate.

4. Risk ratio, 95% confidence interval.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، افزایش پروتئین خام جیره گاوهای پابه‌ماه با افزودن منابع RUP در فصل گرم باعث افزایش آلبومین در دوره پیش و پس از زایش، افزایش کراتینین سرم و کاهش کلسترول، FFA و BHB در دوره پس از زایش شد. هم‌چنین، افزایش سطح پروتئین جیره پیش از زایش بروز کتوزیس تحت بالینی، متریت و اندومتريت را کاهش داد.

بنابراین، گاوهای مبتلا به کتوزیس بیشتر مستعد ابتلا به بیماری‌های عفونی مثل متریت و اندومتريت هستند. در پژوهش حاضر، افزایش غلظت BHB سرمی و به‌دنبال آن افزایش بروز کتوزیس تحت بالینی در گاوهای LCP نسبت به گاوهای HCP می‌تواند باعث کاهش عملکرد سیستم ایمنی و در نتیجه افزایش بروز متریت و اندومتريت در گاوهای دوره انتقال طی فصل گرم باشد.

REFERENCES

1. Amanlou, H., Farahani, T. A., & Farsuni, N. E. (2017). Effects of rumen undegradable protein supplementation on productive performance and indicators of protein and energy metabolism in Holstein fresh cows. *Journal of Dairy Science*, 100(5), 3628-3640.
2. Avendano-Reyes, L., Alvarez-Valenzuela, F. D., Correa-Calderon, A., Saucedo-Quintero, J. S., Robinson, P. H. & Fadel, J. G. (2006). Effect of cooling Holstein cows during the dry period on postpartum performance under heat stress conditions. *Livestock Science*, 105(1), 198-206.
3. Baumgard, L. H., Wheelock, J. B., Shwartz, G., O'Brien, M., VanBaale, M. J., Collier, R. J., Rhoads, M. L. & Rhoads, R. P. (2006). Effects of heat stress on nutritional requirements of lactating dairy cattle. In: *Proceedings of the 5th Annual Arizona Dairy Production Conference*, Arizona University, Tucson, Arizona, 10 Oct., pp. 8-17.
4. Barash, H., Silanikove, N., Shamay, A. & Ezra, E. (2001). Interrelationships among ambient temperature, day length, and milk yield in dairy cows under a Mediterranean climate. *Journal of Dairy Science*, 84(10), 2314-2320.
5. Bell, A. W., Burhans, W. S. & Overton, T. R. (2000). Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59(1), 119-126.
6. Bertoni, G., Trevisi, E., Han, X. & Bionaz, M. (2008). Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3300-3310.
7. Burke, C. R., Meier, S., McDougall, S., Compton, C., Mitchell, M. & Roche, J. R. (2010). Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture grazed dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(11), 5363-5373.
8. Chapinal, N., Carson, M., Duffield, T. F., Capel, M., Godden, S., Overton, M., Santos, J. E. P. & LeBlanc, S. J., 2011. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 4897-4903.
9. Contreras, G. A. & Sordillo, L. M. (2011). Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(3), 281-289.
10. Curtis, C. R., Erb, H. N., Sniffen, C. J., Smith, R. D. & Kronfeld, D. S. (1985). Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 68(10), 2347-2360.
11. Das, R., Sailo, L., Verma, N., Bharti, P., Saikia, Intiwati, J. & Kumar, R. (2016). Impact of heat stress on health and performance of dairy animals. *A review, Veterinary World*, 9(3), 260-268.
12. Dikmen, S. & Hansen, P. J. (2009). Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment?. *Journal of Dairy Science*, 92(1), 109-116.
13. Doepel, L., Lapiere, H. & Kennelly, J. (2002). Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. *Journal of Dairy Science*, 85(9), 2315-2334.
14. Duffield, T. F., Lissemore, K. D., McBride, B.W. & Leslie, K. E. (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science*. 92(2), 571-580.
15. Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T. & Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72(1), 68-78.
16. Farahani, T. A., Amanlou, H. & Kazemi-Bonchenari, M. (2017). Effects of shortening the close-up period length coupled with increased supply of metabolizable protein on performance and metabolic status of multiparous Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 100(8), 6199-6217.
17. Farahani, T. A., Amanlou, H., Farsuni, N. E. & Kazemi-Bonchenari, M. (2019). Interactions of

- protein levels fed to Holstein cows pre-and postpartum on productive and metabolic responses. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 246-259.
18. Gernand, E., König, S. & Kipp, C. (2019). Influence of on-farm measurements for heat stress indicators on dairy cow productivity, female fertility, and health. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 6660-6671.
 19. Grinberg, N., Elazar, S., Rosenshine, I. & Shpigel, N. Y. (2008). Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 76 (6), 2802-2807.
 20. Hammon, D. S., Evjen, I. M., Dhiman, T. R., Goff, J. P. & Walters, J. L. (2006). Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunopathol*, 113(1-2), 21-29.
 21. Hartwell, J. R., Cecava M. & Donkin, S. (2000). Impact of dietary rumen undegradable protein and rumen-protected choline on intake, peripartum liver triacylglyceride, plasma metabolites and milk production in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83 (12), 2907-2917.
 22. Huyler, M. T., Kincaid, R. & Dostal, D. (1999). Metabolic and yield responses of multiparous Holstein cows to prepartum rumen-undegradable protein. *Journal of Dairy Science*, 82(3), 527-536.
 23. Jamali, H., Barkema, H. W., Jacques, M., Lavallée-Bourget, E. M., Malouin, F., Saini, V., Stryhn, H. & Dufour, S. (2018). Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 4729-4746.
 24. Jawor, P. E., Huzzey, J. M., LeBlanc, S. J. & von Keyserlingk, M. A. J. (2012). Associations of subclinical hypocalcemia at calving with milk yield, and feeding, drinking, and standing behaviors around parturition in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1240-1248.
 25. Kaufman, J. D., Pohler, K. J., Mulliniks, J. T. & Rius, A.G. (2018). Lowering rumen degradable and rumen-undegradable protein improved amino acid metabolism and energy utilization in lactating dairy cows exposed to heat stress. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 386-395.
 26. Kelton, D. F., Lissemore, K.D. & Martin, R. E. (1998). Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 81(9), 2502-2509.
 27. Koch, F., Thom, U., Albrecht, E., Weikard, R., Nolte, W., Kuhla, B. & Kuehn, C. (2019). Heat stress directly impairs gut integrity and recruits distinct immune cell populations into the bovine intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(21), 10333-10338.
 28. McArt, J. A. A., Nydam, D. V. & Overton, M. W. (2015). Hyperketonemia in early lactation dairy cattle: A deterministic estimate of component and total cost per case. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 2043-2054.22
 29. McCabe, C. J. & Boerman, J. P. (2020). Invited Review: Quantifying protein mobilization in dairy cows during the transition period. *Applied Animal Science*, 36(3), 389-396.
 30. Megahed, A. A., Hiew, M. W. H., Ragland, D. & Constable, P. D. (2019). Changes in skeletal muscle thickness and echogenicity and plasma creatinine concentration as indicators of protein and intramuscular fat mobilization in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(6), 5550-5565.
 31. Moorby, J. M., Dewhurst, R. J., Evans, R. T. & Fishurt, W. J. (2002). Effects of level of concentrate feeding during the second gestation of Holstein-Friesian dairy cows. 2. Nitrogen balance and plasma metabolites. *Journal of Dairy Science*, 85(1), 178-189.
 32. NRC. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* (7th rev. ed), Natl. Acad. Press, Washington, DC.
 33. Oetzel, G. R. & Eastridge, M. (2013). Minimizing hypocalcemia during early lactation. In: *Proceedings of 22nd Tri-State Dairy Nutrition Conference*, April 23-24, Michigan State University, Ann Arbor, PP. 23-32.
 34. Park, A. F., Shirley, J., Titgemeyer, E., Meyer, M., VanBaale, M. & VandeHaar, M. (2002). Effect of protein level in prepartum diets on metabolism and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 85(7), 1815-1828.
 35. Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S. & Gilbert, R. O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65(8), 1516-1530.
 36. St-Pierre, N. R., Cobanov, B. & Schnitkey, G. (2003). Economic losses from heat stress by US livestock industries. *Journal of Dairy Science*, 86(1), E52-E77.
 37. Suthar, V. S., Canelas-Raposo, J., Deniz, A. & Heuwieser, W. (2013). Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96 (5), 2925-2938.
 38. Tao, S. & Dahl, G., 2013. Heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves. Invited review. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4079-4093.
 39. Urdaz, J. H., Overton, M. W., Moore, D. A. & Santos, J. E. P. (2006). Effects of adding shade and fans to a feedbunk sprinkler system for preparturient cows on health and performance. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 2000-2006.

40. Van der Drift, S. G. A., Houweling, M., Schonewille, J. T., Tielens, A. G. M. & Jorritsma, R. (2012). Protein and fat mobilization and associations with serum β -hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 4911-4920.
41. Van Saun, R. J. & Sniffen, C. J. (1995). Effects of undegradable protein fed prepartum on lactation, reproduction, and health in dairy cattle. II. Postpartum diets and performance. *Journal of Dairy Science*, 78(Suppl. 1), 265.
42. Van Soest, P. J., Robertson, J. & Lewis, B. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597.
43. West, J. W. (2003). Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 86(6), 2131-2144.
44. Zimbelman, R. B., Rhoads, R. P., Rhoads, M. L., Duff, G. C., Baumgard, L. H. & Collier, R. J. (2009). A re-evaluation of the impact of temperature humidity index (THI) and black globe humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. In: *Proceedings of the Southwest Nutrition Conference*, 9-11 Mar., pp. 158-169.