

Research Paper

Determining the Relationship Between Oxidative Stress and Subclinical Ketosis in Dairy Cows

Seyyed Mohammad Hosein Ghaheer¹, Seyede Ommolbanin Ghasemian²  and Behnam Pedram¹

1- Department of Veterinary, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran

2- Department of Veterinary, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran,

(Corresponding author: Ghasemian1249@yahoo.com)

Received: 12 April, 2024

Revised: 26 July, 2024

Accepted: 17 August, 2024

Extended Abstract

Background: The transition period is of great importance in the health, production, and profitability of dairy cows due to fundamental changes in nutrition, metabolism, hormonal changes, and immunity. During this period, a negative energy balance occurs due to the increased demand for milk production and the subsequent decrease in blood glucose levels. Subclinical ketosis is a disorder of energy metabolism in high-producing cows that causes a decrease in dairy cow performance without obvious clinical signs. Subclinical ketosis occurs without obvious clinical signs due to a decrease in dry matter intake in early lactation of dairy cows. This disease is diagnosed by ketone body tests, which are usually used for diagnosis from the beta-hydroxybutyrate (BHB) test in blood, serum, and plasma, as well as the acetostat test in urine. Malondialdehyde (MDA) is generally considered one of the best predictors of oxidative damage, which often shows good correlation with other stress parameters. The antioxidant enzymes, e.g., superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT), are considered the first line of intracellular defense against reactive oxygen species. Total antioxidant capacity (TAC) is a sensitive, reliable, and useful index for measuring the cumulative function of all antioxidants present in plasma. The present study aimed to investigate the relationship between subclinical ketosis and biochemical factors indicative of oxidative stress in the postpartum period of dairy cows.

Methods: This clinical study was conducted on 50 Holstein dairy cows in the industrial dairy farm of Shams Abad Dairy Complex, Qom province, Iran, over three months in the summer of 2022. The samples were selected randomly from apparently healthy cows in the last lactation period, present in the dry period. In total, the samples consisted of 17 heifers, 15 cows in the second calving period, six in the third period, and seven in the fourth period. The transition of cows to the close-up period was determined based on the average annual calving in the mentioned dairy farm at 251 days of gestation for heifers and 254 days of gestation for multiparous cows. To investigate subclinical ketosis and the effects of oxidative stress on it, it was decided to prepare and evaluate samples one week before and one week after calving. Accordingly, the initial sampling schedule was determined based on the transition time to the close-up period at 265 days of gestation for heifers and 268 days of gestation for multiparous cows. Then, the day of calving was recorded, and resampling was performed 1 week later. The general condition of the animals was recorded before and after calving. Urine samples were taken before and after calving to examine the amount of ketone bodies, pH, glucose, and specific gravity. Milk samples were taken at the time of calving to study the quality and the average milk record for the first 2 months after calving. Serum MDA, SOD, GPX, and TAC indices were measured by taking blood samples one week before and after calving. Serum antioxidant enzymes and biochemical indices were measured with commercial kits and the spectrophotometric method. Based on the level of BHB, cows were divided into two groups, healthy and those with subclinical ketosis, and the relationship of the obtained data with the level of BHB was examined as an index of subclinical ketosis. The data obtained from all experiments were analyzed by SPSS software, and the mean and standard deviation of the range were determined. Furthermore, their changes before and after calving were examined by the paired t-test, and these factors were compared in healthy and sick groups by the independent t-test. Finally, their relationship with BHB levels was examined by the correlation test.



Copyright ©2025 Ghaheer et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

Results: In the studied population, 10 cows presented subclinical ketosis in the postpartum period, and no cases of subclinical ketosis were observed before calving. A comparison of data in apparently healthy cows and those with subclinical ketosis after calving showed that BCS, rectal temperature, and stool scores did not differ between healthy and subclinical ketosis. Blood glucose and serum MDA levels were significantly higher in cows with subclinical ketosis than in healthy cows ($p < 0.05$). No significant difference was observed in milk quality indicators and serum TAC, SOD, and GPX levels between healthy and subclinical ketosis cows. A significant correlation was found between MDA and BHB ($p < 0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that MDA values as an indicator of oxidative stress increase significantly in subclinical ketosis, and, in addition to other biochemical indicators determining subclinical ketosis, are helpful in diagnosing this disease. Moreover, the lack of correlation between the level of BHB and the antioxidant enzymes GPX and SOD, despite the positive correlation with MDA as an indicator of oxidative stress, indicates the different effects of antioxidants in different degrees of subclinical ketosis.

Keywords: β -hydroxybutyrate (BHBA), Malondialdehyde (MDA), Oxidative stress, Subclinical ketosis

How to Cite This Article: Ghaheri, S. M. H., Ghasemian, S. O., & Pedram, B. (2025) Determining the Relationship Between Oxidative Stress and Subclinical Ketosis in Dairy cows. *Res Anim Prod*, 16(1), 85-98. DOI:10.61186/rap.16.1.85

مقاله پژوهشی

تعیین ارتباط بین استرس اکسیداتیو و بیماری کتوز تحت بالینی در گاوهای شیری

سید محمد حسین قاهر^۱، سیده ام البنین قاسمیان^۲، بهنام پدرام^۱^۱ - گروه دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران^۲ - گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران، (نویسنده مسئول: Ghasemian1249@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۷

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۵/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۲۴

صفحه: ۸۵ تا ۹۸

چکیده مبسوط

مقدمه: دوره انتقال به دلیل تغییرات اساسی در روند تغذیه، متابولیسم، تغییرات هورمونی و ایمنی از اهمیت زیادی در زمینه سلامت، تولید و سوددهی گاوهای شیری برخوردار است. طی این دوره بالانس منفی انرژی به دلیل افزایش تقاضا برای تولید شیر و به دنبال آن کاهش سطح گلوکز خون رخ می‌دهد. کتوز تحت بالینی نوعی اختلال در متابولیسم انرژی گاوهای پر تولید بوده که بدون نشانه‌های بالینی آشکار موجب کاهش عملکرد گاوهای شیری می‌شود. کتوز تحت بالینی بدون علائم آشکار بالینی به دلیل کاهش مصرف ماده خشک در اوایل شیردهی گاوهای شیری رخ می‌دهد. این بیماری به وسیله آزمایشات اجسام کتون تشخیص داده می‌شود که معمولاً برای تشخیص از تست BHB در خون، سرم و پلاسما و همچنین تست استواستات در ادرار استفاده می‌شود. عموماً مالون دی آلدهید (MDA) به عنوان یکی از بهترین پیش‌بینی کننده‌های آسیب اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود که اغلب همبستگی خوبی با سایر پارامترهای استرس نشان داده است. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) و کاتالاز (CAT) اولین خط دفاع درون‌سولی در برابر گونه‌های فعال اکسیژن محسوب می‌شوند. TAC شاخص حساس، قابل اعتماد و مفید برای اندازه‌گیری عملکرد تجمعی همه آنتی‌اکسیدان‌های موجود در پلاسما است. هدف از مطالعه اخیر بررسی ارتباط بین کتوز تحت بالینی و فاکتورهای بیوشیمیایی معرف استرس اکسیداتیو در دوره پس از زایش گاوهای شیری بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بالینی در یک بازه زمانی سه ماهه در تابستان ۱۴۰۱ در گاوداری صنعتی مجتمع شیروگوش شمس‌آباد استان قم بر روی ۵۰ رأس گاو شیری نژاد هولشتاین انجام گرفت. انتخاب نمونه‌ها به صورت تصادفی و از گاوهای به ظاهر سالم در آخرین دوره شیرداری، حاضر در دوره خشکی (far off) انجام شد. در مجموع از ۱۷ مورد تلیسه، ۱۵ مورد گاو در دوره دوم زایش، ۶ مورد در دوره سوم و ۷ مورد از دوره چهارم نمونه‌گیری شد. انتقال گاوها به دوره close up بر اساس میانگین زایش‌های سالیانه در دامداری یاد شده برای تلیسه‌ها ۲۵۱ روز آبستنی و برای گاوهای چند شکم ۲۵۴ روز آبستنی معین شد. به منظور بررسی بیماری کتوز تحت بالینی و اثرات استرس اکسیداتیو بر آن مقرر شد تا نمونه‌گیری، یک هفته قبل و یک هفته پس از زایش تهیه و ارزیابی شود. بر این اساس، زمانبندی نمونه‌گیری اولیه باتوجه به زمان انتقال به دوره close up برای تلیسه‌ها ۲۶۵ روز آبستنی و برای گاوهای چندشکم ۲۶۸ روز آبستنی تعیین شد. سپس روز زایش ثبت و یک هفته پس از آن نمونه‌گیری مجدد انجام شد. وضعیت عمومی دام‌ها قبل و پس از زایش ثبت شد. نمونه ادرار قبل و پس از زایش برای بررسی میزان کتون بادی‌ها، pH، گلوکز و وزن مخصوص اخذ شد. نمونه شیر در زمان زایش جهت بررسی کیفیت و میانگین رکورد شیر دو ماه اول پس از زایش محاسبه شد. همچنین با اخذ نمونه خون یک هفته قبل و پس از زایش، شاخص‌های سرمی مالون دی آلدهید، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و آنتی‌اکسیدان تام سنجش شد. اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های بیوشیمیایی سرم با کیت‌های تجاری و به روش اسپکتروفتومتری انجام شد. براساس میزان بتا هیدروکسی بوتیرات، گاوها به دو دسته سالم و مبتلا به کتوز تحت بالینی تقسیم شدند و ارتباط داده‌های بدست آمده با میزان بتا هیدروکسی بوتیرات به عنوان شاخص کتوز تحت بالینی بررسی شدند. داده‌های بدست آمده از تمام آزمایشات توسط نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شده و میانگین و انحراف معیار محذوده مشخص شد. همچنین بررسی تغییرات آن‌ها قبل و پس از زایش توسط آزمون T جفت شده و مقایسه این فاکتورها در گروه‌های سالم و بیمار توسط آزمون T مستقل انجام گرفت. نهایتاً ارتباط آن‌ها با میزان BHBA توسط آزمون همبستگی بررسی شد.

یافته‌ها: در جمعیت مورد بررسی ۱۰ گاو در دوره پس از زایش مبتلا به کتوز تحت بالینی بوده‌اند و هیچ مورد ابتلا به کتوز تحت بالینی قبل از زایش مشاهده نشد. مقایسه داده‌ها در گاوهای به ظاهر سالم و مبتلا به کتوز تحت بالینی بعد از زایش نشان می‌دهد BCS، دامی رکتوم و امتیاز مدفوع در دام سالم و مبتلا به کتوز تحت بالینی تفاوتی نداشت. گلوکز خون و مالون دی‌آلدهید سرم در دام‌های مبتلا به کتوز تحت بالینی به صورت معنی‌داری بیشتر از دام‌های سالم بود ($p < 0.05$). همچنین تفاوت معنی‌داری از نظر شاخص‌های کیفیت شیر و میزان TAC، SOD و GPx سرم در دام سالم و مبتلا به کتوز تحت بالینی مشاهده نشد. همبستگی بین مالون دی آلدهید و بتا هیدروکسی بوتیرات (BHBA) معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که در کتوز تحت بالینی مقادیر MDA به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو به طور معنی‌دار افزایش می‌یابد و در مجاور سایر شاخص‌های بیوشیمیایی تعیین کننده کتوز تحت بالینی در تشخیص این بیماری کمک کننده است. همچنین عدم وجود همبستگی میان میزان بتا هیدروکسی بوتیرات و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPx و SOD علی‌رغم همبستگی مثبت با MDA به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو، گویای تأثیرات متفاوت آنتی‌اکسیدان‌ها در درجات مختلف کتوز تحت بالینی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استرس اکسیداتیو، بتا هیدروکسی بوتیرات (BHBA)، کتوز تحت بالینی، مالون دی آلدهید (MDA)

مقدمه

خود استفاده کرده که منجر به افزایش غلظت برخی متابولیت‌های خونی از جمله اسیدهای چرب غیراستریفیه (NEFA)^۱ و به دنبال آن بتا هیدروکسی بوتیرات (BHB)^۲ خواهد شد. BHB از نظر کمی بالاترین کتون در گردش خون گاو است. درواقع متابولیسم اسیدهای چرب در میتوکندری سلول‌های کبدی باعث تولید اجسام کتون از جمله بتا هیدروکسی بوتیرات می‌شود (Constable et al., 2016).

دوره انتقال به دلیل تغییرات اساسی در روند تغذیه، متابولیسم، تغییرات هورمونی و ایمنی از اهمیت زیادی در زمینه سلامت، تولید و سوددهی گاوهای شیری برخوردار است. طی این دوره بالانس منفی انرژی به دلیل افزایش تقاضا برای تولید شیر و به دنبال آن کاهش سطح گلوکز خون رخ می‌دهد (Krug et al., 2018). بدن در جهت جبران کمبود انرژی از ذخایر چربی

^۱ - Non-esterified fatty acids (NEFA)^۲ - beta-hydroxy-butyric acid (BHBA)

را به تأخیر می‌اندازد و در مواردی باعث حذف آن می‌شود تعریف کرد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اولیه در سلول‌ها عبارت‌اند از سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز. سوپراکسید دیسموتاز^۶ تبدیل رادیکال سوپراکسید سمی به پراکسید هیدروژن را تسریع می‌کند. این آنزیم اولین خط دفاع درون‌سلولی در برابر گونه‌های فعال اکسیژن محسوب می‌شود (Moolchandani & Sareen, 2018).

در طی سال‌های اخیر مطالعاتی در زمینه اثرات استرس اکسیداتیو بر بیماری‌های دوره انتقال به تفکیک صورت گرفته‌است اما باتوجه به اهمیت موضوع در زمینه کیفیت محصولات دامی و همچنین خسارات جبران‌ناپذیر ناشی از ارتباط یادشده بر سلامت گاوهای شیری برآن شدیم تا شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسیداتیو را در کتوز تحت بالینی در اوایل دوره شیردهی بررسی کنیم. هدف از این مطالعه تعیین ارتباط میان استرس اکسیداتیو و بیماری کتوز تحت بالینی بود که در این خصوص به اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز و همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پرداخته و با سنجش مالون دی آلدئید ارتباط بروز استرس اکسیداتیو و افزایش BHB و نهایتاً رخداد کتوز تحت بالینی مورد بررسی قرار داده‌ایم.

مواد و روش‌ها طراحی مطالعه

این مطالعه بالینی در یک بازه زمانی سه ماهه در تابستان ۱۴۰۱ روی ۵۰ رأس گاو شیری نژاد هولشتاین در گاوداری صنعتی ۱۰۰۰ رأسی مجتمع شیروگوشت شمس‌آباد استان قم انجام گرفت. انتخاب نمونه‌ها به صورت تصادفی و از گاوهای فاقد بیماری در آخرین دوره شیرواری، حاضر در دوره farr off صورت گرفت. در مجموع از ۱۷ مورد تلیسه، ۱۵ مورد گاو در دوره دوم زایش، ۶ مورد در دوره سوم و ۷ مورد از دوره چهارم زایش نمونه‌گیری شد. همچنین ۵ رأس از دام‌ها به بیماری‌های پس از زایش مبتلا شده و نمونه آن‌ها فاقد اعتبار بوده که با ثبت وضعیت عمومی و علت حذف از مطالعه خارج شدند. انتقال گاوها به دوره close up بر اساس میانگین زایش‌های سالیانه در دامداری یاد شده برای تلیسه‌ها ۲۵۱ روز آبستنی و برای گاوهای چند شکم زا ۲۵۴ روز آبستنی معین شد. به‌منظور بررسی بیماری کتوز تحت بالینی و اثرات استرس اکسیداتیو بر تشدید آن مقرر شد تا نمونه‌گیری، یک هفته قبل و یک هفته پس از زایش تهیه و سنجیده شود. بر این اساس زمانبندی نمونه‌گیری اولیه باتوجه به زمان انتقال به دوره close up برای تلیسه‌ها ۲۶۵ روز آبستنی و برای گاوهای چند شکم‌زا ۲۶۸ روز آبستنی تعیین شد. سپس روز زایش ثبت و یک هفته پس از آن نمونه‌گیری مجدد انجام شد.

کتوز تحت بالینی^۱ (هایپرکتونمی)، بدون بروز علائم آشکار به‌دلیل کاهش مصرف ماده خشک در اوایل شیردهی گاوهای شیری رخ می‌دهد. این بیماری به‌وسیله آزمایشات اجسام کتون^۲ تشخیص داده می‌شود که معمولاً برای تشخیص از تست BHB در خون، سرم و پلاسما و همچنین تست استواسات در ادرار استفاده می‌شود (Constable et al., 2016). تعیین سقف معمول غلظت سرمی BHB برای کتوز تحت بالینی و بالینی متنوع گزارش شده و بستگی به شرایط محیطی، کیفیت غذا، فعالیت فلور گوارش و شرایط فیزیولوژیک مختلف دارد. به‌صورتی‌که سقف BHB را برای کتوز تحت بالینی بین ۰/۷ تا ۱/۷ بیان کرده‌اند (Ramin et al., 2018). در مطالعه‌ای نقاط برش برای غلظت سرمی BHB در هفته اول و دوم پس از زایمان بین ۱ الی ۱/۴ برحسب میلی‌مول برلیتر پیشنهاد شده‌است (Walsh et al., 2007).

بسیاری از محققین عامل بروز و پیشرفت بیماری‌های حوالی زایمان از جمله کتوز تحت بالینی را اختلال در روند طبیعی وقایعی می‌دانند که به‌دنبال افزایش بیش‌ازحد رادیکال‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و شکل‌گیری استرس اکسیداتیو^۳ رخ می‌دهند. مرحله شیردهی تأثیر دوچندانی بر وضعیت اکسیداتیو حیوان می‌گذارد. به‌صورتی‌که محققان استرس اکسیداتیو بالاتری در گاوهای شیری پرتولید در مقایسه با گاوهای شیری با تولید متوسط گزارش کرده‌اند. گاوهای شیری عمدتاً در طول دوره پس از زایمان تحت تأثیر استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرند (Castillo et al., 2006). از طرفی افزایش تحرک لیپیدها به‌منظور رفع نیاز به انرژی برای تولید بیشتر شیر باعث تحریک لکوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال و تولید رادیکال‌های آزاد بیشتر می‌شود. تخریب اکسیداتیو لیپیدها (پراکسیداسیون لیپیدی)^۴ یک واکنش زنجیره‌ای مخرب و مداوم است که مالون دی آلدئید (MDA) را به‌عنوان محصول نهایی آزاد می‌کند. سنجش مالون دی آلدئید یکی از بهترین پیش‌بینی‌کننده‌های آسیب اکسیداتیو بوده که اغلب همبستگی خوبی با سایر پارامترها نشان داده‌است (Sharma et al., 2011).

در سال‌های اخیر نگرانی فزاینده‌ای برای تشخیص آسیب رادیکال‌های آزاد به‌عنوان یک ابزار مکمل در ارزیابی وضعیت متابولیک وجود داشته‌است. در شرایط عادی فیزیولوژیک، بدن دارای ذخایر کافی از آنتی‌اکسیدان‌ها برای مبارزه با رادیکال‌های آزاد است. دستیابی به تعادل بین تولید و خنثی‌سازی ROS برای حفظ هموستاز بدن بسیار حائز اهمیت است. پایش کارایی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در برابر ROS با تخمین TAC انجام می‌شود. TAC^۵ یک شاخص حساس، قابل‌اعتماد و مفید برای اندازه‌گیری عملکرد تجمعی همه آنتی‌اکسیدان‌های موجود در پلاسما و ابزار مفید برای اندازه‌گیری استرس گوساله‌ها در دوره انتقال می‌باشد (Halliwell et al., 2015).

آنتی‌اکسیدان‌ها را می‌توان به‌طور کلی به‌عنوان هر ماده‌ای که از آسیب اکسیداتیو مولکول‌های هدف جلوگیری کرده و یا آن

^۱- Subclinical ketosis

^۲- Oxidative stress

^۳- Lipid peroxidation

^۴- Malondialdehyde (MDA)

^۵- Total Antioxidant Capacity (TAC)

^۶- Superoxide dismutase (SOD)

جیره غذایی

مورد نیاز نظارت به عمل آمد که مقادیر ترکیبات آن در جدول ۲ ذکر گردید. مقادیر اضافی خوراک موجود در آخورها که به صورت میانگین به ازای هر رأس دام زیر یک کیلوگرم برآورد می‌شد در ساعات پایانی روز جمع‌آوری و آخورها تمیز می‌شد. آبخوری‌ها نیز به صورت منظم چک شده و به مقدار آزاد آب مورد نیاز در اختیار دام قرار می‌گرفت.

جیره غذایی مورد استفاده در دوره close up و دوره پس از زایش از زمان دو هفته قبل از شروع نمونه‌گیری با در نظر گرفتن تعداد ورود و خروج گاوها از هر دوره به صورت روزانه وزن کشی و در اختیار دام‌ها قرار گرفت. ساعت خوراک‌دهی در این دو دوره ۸-۹ صبح تعیین شد. جیره غذایی مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. همچنین در این سه ماه بر ساخت کنستانت

جدول ۱- ترکیب جیره مورد استفاده در گاوهای تحت مطالعه

Table 1. Ingredients of diets that used in studied cows

کل جیره مصرفی در روز به ازای هر گاو (کیلوگرم) Total consumed diet in each day per cow (Kg)	تفاله خشک (کیلوگرم) Dry waste (Kg)	کنسانتره (کیلوگرم) Concentrated feed (Kg)	سیلوذرت (کیلوگرم) Corn silage (Kg)	یونجه (کیلوگرم) Alfaalfa (Kg)	کاه (کیلوگرم) Straw (Kg)	اقلام جیره Ingredients of diets
25	0	6	14	4	1	قبل زایش Before claving
33	1	12	14	6	0	بعد زایش After claving

جدول ۲- ترکیب کنسانتره مورد استفاده در جیره غذایی گاوهای تحت مطالعه

Table 2. The composition of concentrated food in studied cows

درصد Percent	آماده زایش Ready calving	درصد Percent	گم شیر Low milk	درصد percent	پر شیر High milk	اقلام جیره Diet ingredients
27.5	550	20	600	20	800	جو barley
27.5	550	20	600	30	1200	ذرت Corn
0	0	10	300	8.75	350	گندم Wheat
17.5	350	18	540	23	920	کنجاله سویا Soy meal
17.5	350	26	780	4.5	180	سبوس گندم Wheat bran
0.6	120	0	0	7	280	پنبه دانه Cotton seed meal
0	0	1.2	36	1.8	72	بیکربنات سدیم Sodium bicarbonate
0	0	0.4	12	0.4	16	اکسید منیزیم Magnesium oxide
0	0	0.2	6	0.2	8	نمک Salt
0	0	0.5	15	0.625	25	مکمل ویتامینه شیری for milking
0	0	0.5	15	0.625	25	مکمل معدنی شیری for milking
0.5	10	0	0	0.4	16	دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate
1	20	0	0	0	0	مکمل ویتامینه پرورشی supplement for growing
1	20	0	0	0	0	مکمل معدنی پرورشی supplement for growing
0	0	1	30	0.7	28	کربنات کلسیم Calcium carbonate
0.25	5	0.17	5	0.25	10	توکسین بایندر Toxin binder
1.25	25	1.5	43	1.25	50	زیرین بایندر Zarin binder
0	0	0.6	18	0.5	20	اوره Urea
100	2000	100	3000	100	4000	جمع Total

بررسی وضعیت عمومی

امتیازدهی صورت گرفت. بدین منظور وضعیت مدفوع، دمای رکتال، و اسکور مدفوع مورد ارزیابی قرار گرفت تا تغییر وضعیت عمومی پس از زایش در موارد بیمار و سالم مقایسه و BCS دام مشخص شود.

دمای رکتوم به وسیله دماسنج جیوه‌ای از ناحیه دیواره داخلی رکتوم با اطمینان از عدم توشه رکتال اندازه‌گیری شد. وضعیت

گاوهای انتخاب شده فاقد بیماری‌های تیپیک نظیر ورم پستان، متريت و کتوز در آخرین دوره شیرآوری در یک سال گذشته بوده‌اند. در صورت مشاهده هرگونه بیماری نمونه جدا شده و علت آن ذکر گردید. وضعیت عمومی گاوها نیز در قبل و بعد زایش بررسی و براساس اسکورهاییان هولزن

مدفوع از نظر قوام، رنگ، هضم و وجود حباب بررسی و امتیاز داده شد.

تهیه نمونه ادرار

نمونه ادرار برای بررسی میزان کتون بادی‌ها، pH ادرار، گلوکز موجود در ادرار و وزن مخصوص آن اخذ شد. بدین منظور یک ساعت قبل از خوراک‌دهی روزانه و دو ساعت بعد از شیردوشی صبح‌گاهی در هر دو دوره قبل و پس از زایش به‌وسیله ظرف مخصوص و تمیز از ادرار دام نمونه گرفته و با استفاده از نوار ادراری شرکت کیمیا پژوهان ارزیابی شد. نمونه ادرار پس از اخذ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت تا درجه حرارت نمونه با محیط متعادل شود. سپس نوار کاملاً وارد ظرف نمونه شد و بلافاصله خارج شد. تغییر رنگ برای pH پس از ۲۰ ثانیه و برای تعیین سایر معرف‌ها در مدت یک دقیقه مشخص و با نمودار شاخص مقایسه و ارزیابی شد. بررسی وجود مواد کتونی از قبیل استون، استواستات و بتا هیدروکسی بوتیرات از طریق تست Legal در نمونه ادرار صورت گرفت که براساس این تست نیتروپروکساید در محیط تامپونی مناسب روی کتون بادی‌ها اثر کرده و متناسب با غلظت آن به رنگ صورتی تا ارغوانی در می‌آید. PH ادرار به‌وسیله دو اندیکاتور رنگی معین شد که براین اساس با غلظت متعادل به تفکیک با تغییر رنگ نارنجی تا زرد و سبز تا آبی مشخص شده که نشان‌دهنده PH ۵ تا ۹ می‌باشد. میزان گلوکز در ادرار نیز توسط این نوار ارزیابی شد. معرف گلوکز حاوی دو آنزیم گلوکز اکسیداز و پراکسیداز میزان غلظت گلوکز را بر اثر تغییر رنگ زرد به سبز نشان می‌دهد. غلظت بالای ۵۰ میلی گرم مواد کتونی در ادرار باعث کاهش رنگ گلوکز می‌شود. به‌وسیله ترکیب مواد یونی در ادرار با پلی الکترولیت موجود در نوار وزن مخصوص نسبی ادرار به‌دست‌آمد. در نهایت داده‌های به‌دست‌آمده در نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ جمع‌آوری و از طریق نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل گردید و به‌وسیله آزمون T جفت‌شده (مقایسه صفات قبل و بعد از زایش) و T مستقل (مقایسه گروه‌های سالم و بیمار پس از زایش) مورد مقایسه قرار گرفت. سپس توسط آزمون همبستگی ارتباط آن‌ها با میزان بتا هیدروکسی بوتیرات مشخص شد.

تهیه نمونه شیر

به‌منظور تعیین میزان سلول‌های ایمنی در شیر و بررسی عوارض استرس اکسیداتیو و کتوز بر روی میزان ایمونوگلوبولین‌ها نمونه شیر آغوز تهیه شد. بدین‌منظور بلافاصله پس از زایش، گاو مورد نظر به محل شیردوش منتقل و در طی دوشیدن آغوز پس از چند دوشش اولیه نمونه شیر به‌میزان مشخص به‌وسیله پی‌پت اخذ و به‌صورت پایش در محل با دستگاه رفرکتومتر بریکس آغوز مشخص شد تا بدین روش از افزایش بار میکروبی و خطای حاصل از آن جلوگیری شود و اعداد حاصل مورد ارزیابی قرار گیرد. رفرکتومتر مورد استفاده مدل VMK1 تعیین‌کننده بریکس نمونه در بازه ۰ الی ۳۲٪ و دارای رزولوشن ۰/۲٪ بود که پس از قرائت بریکس هر نمونه آغوز، توسط آب مقطر ضد عفونی و کالیبره می‌شد. نهایتاً مقادیر ایمونوگلوبولین موجود در نمونه آغوز براساس میزان بریکس

قرائت‌شده محاسبه گردید و اثرات هر دو فاکتور بر میزان ابتلا به کتوز تحت بالینی ارزیابی شد.

در دامداری فوق که سه بار دوش بوده اندازه‌گیری رکورد شیر به‌صورت جمع میزان دوشش هر دام در سه وعده یک شبانه روز انجام شد. در وعده ظهر بیشترین میزان تولید شیر و در وعده شبانه‌گاهی کمترین میزان تولید در روز محاسبه و از جمع هر سه وعده رکورد دام مشخص شد. از آنجا که با در نظر گرفتن روز زایش، اولین رکورد پس از زایش، کمترین میزان تولید شیر در شروع دوره شیرواری بوده و با پیک شیردهی فاصله زیادی دارد، از میانگین دو رکورد پس از زایش به‌منظور بررسی و آنالیز استفاده شد. بدین‌منظور رکوردگیری ثانویه یک ماه پس از رکوردگیری اولیه انجام گرفت. همچنین در صورت کاهش میزان تولید شیر در رکورد دوم نسبت به رکورد اول، شرایط دام در روز رکوردگیری از نظر وقوع فحلی، بیماری یا موارد دیگر بررسی و با استفاده از فرمول رکورد صحیح به‌دست‌آمد و محاسبه شد. در نهایت تاثیر یا عدم تاثیر بیماری کتوز بر میزان تولید شیر به‌وسیله نرم‌افزار SPSS و آزمون T مستقل مورد آنالیز قرار گرفت.

تهیه نمونه خون

زمان‌بندی تهیه نمونه خون اولیه یک هفته قبل از زایش برحسب میانگین زایش سالیانه در دامداری ذکر شده انجام شد. بر این اساس، تهیه نمونه خون اولیه از تلیسه‌ها در ۲۶۵ روز آبستنی و تهیه نمونه خون اولیه از گاو‌های چند شکم‌زا در ۲۶۸ روز آبستنی صورت گرفت. همچنین به‌منظور مقایسه وضعیت فاکتورهای انتخابی از بیماری‌های کتوز تحت بالینی و استرس اکسیداتیو نمونه خون ثانویه یک هفته پس از زایش از دام‌های انتخابی اخذ شد. بدین‌منظور نمونه خون از طریق ورید دمی توسط ونوجکت به‌کمک هولدر و سوزن خونگیری سایز G20 در لوله‌های آزمایش ۸ سی‌سی خالدار فاقد هپارین اخذ شد. به منظور دو فاز شدن، نمونه یک ساعت در دمای محیط حفظ شده و سپس به‌وسیله دستگاه سانتریفیوژ موجود در دامداری با دور ۱۸۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سرم از سلول‌های خونی جدا و با سرنگ استریل ۵ سی‌سی و سرسوزن ۱۸ به لوله‌های گاما منتقل و شماره‌گذاری شد. به‌منظور انتقال ابتدا سرم‌ها در فریزر محیط دامداری فیکس شده و سپس به‌وسیله باکس دردار حاوی یخ خشک به آزمایشگاه منتقل و در دمای منفی ۲۲ درجه نگهداری شد تا آزمون‌های بتا هیدروکسی بوتیرات اسید، مالون دی‌آلدئید، آنتی اکسیدان تام، سوپراکسید دیسموتاز و گلووتاتیون پراکسیداز روی آن‌ها صورت گیرد. از کیت Nasdiox، Nagpix، Naxifer و Nalondi ساخت شرکت ناوند سلامت (ایران) به ترتیب برای سنجش میزان سوپراکسید دیسموتاز (واحد در میلی‌لیتر)، گلووتاتیون پراکسیداز (نانومول در دقیقه در میلی‌لیتر)، آنتی اکسیدان تام (میلی مول در لیتر) و مالون دهالدهید (نانومول در میلی گرم) سرم استفاده شد. روش کار مطابق دستورالعمل سازنده کیت انجام شد.

برای سنجش سوپراکسید دیسموتاز و آنتی اکسیدان تام، از الیزابدر MB580 ساخت چین به ترتیب در طول موج ۴۰۵، ۶۳۰ نانومتر استفاده شد و با استفاده از فرمول دستورالعمل مقدار SOD محاسبه گردید.

گروه‌های سالم و بیمار توسط آزمون T مستقل انجام گرفت. نهایتاً ارتباط آن‌ها با میزان BHBA توسط آزمون همبستگی بررسی شد.

نتایج و بحث

وضعیت عمومی قبل و پس از زایش

نتایج به‌دست‌آمده در جدول ۱-۴ بیانگر آن است که امتیاز شرایط بدن (BCS) بعد از زایش به‌صورت معنی‌داری کمتر از قبل از زایش است. اما دمای رکتوم علی‌رغم کاهش میانگین و امتیاز مدفوع علی‌رغم افزایش میانگین پس از زایش تفاوت معنی‌داری در آزمون Paired Sample t test نشان ندادند. در این آزمون تغییر میانگین و انحراف معیار BCS در بازه یک هفته قبل تا یک هفته پس از زایش با مقدار $\alpha (0/01)$ و P-Valua مشاهده شده ۰/۰۱ سطح اطمینانی بالغ بر ۹۹٪ را نشان داد که مشخص‌کننده از دست دادن امتیاز بدن به‌علت زایمان بود.

برای سنجش گلوکوتائون پراکسیداز و مالون دی‌آلدئید نمونه‌ها در دستگاه الایزایدر MB580 2021 ساخت چین قرار داده شد و با برنامه Point-Point به‌ترتیب در طول موج ۳۴۰ و ۵۵۰ نانومتر قرائت شد و براساس OD به‌دست آمده در فرمول نصب‌شده بر روی دستگاه، جواب نهایی محاسبه شد. پروتئین و گلوکز سرم با کیت‌های پارس آزمون (ایران) و مطابق دستورالعمل با دستگاه اتولایزر ریدر ساخت فرانسه ۲۰۲۰ سنجش شد که به‌صورت اتوماتیک محلول کار را با نمونه ترکیب و od را مشخص و جواب نهایی را اندازه‌گیری می‌کند. توتال پروتئین بر حسب گرم بر دسی‌لیتر و تست قند بر حسب میلی‌گرم بر دسی‌لیتر قرائت شد.

روشی آنالیز آماری

داده‌های به‌دست‌آمده از تمام آزمایشات توسط نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شده و میانگین و انحراف معیار محدوده مشخص شد. همچنین بررسی تغییرات آن‌ها قبل و پس از زایش توسط آزمون T جفت‌شده و مقایسه این فاکتورها در

جدول ۳- تغییرات وضعیت عمومی قبل و پس از زایش در گاوهای تحت مطالعه

Table 3. The changes in common condition of studied cows in before and after calving

فاکتور Factor	شاخص بدنی (BCS)	دما	امتیاز مدفوع
زمان Time	Body condition scoring (BSD)	Temperature	Fecal score
قبل زایش Before calving	3.45±0.25	39.22±0.26	2.06±0.61
بعد زایش After calving	2.93±0.26	39.18±0.22	2.26±0.52
سطح معنی‌داری Significant level	0.001**	0.23 ^{ns}	0.09 ^{ns}

ns: no significant differences

ns: تفاوت قبل و بعد زایش معنی‌دار نیست ($p>0.05$).

** : The different between before and after calving was significant at $p<0.01$

** : تفاوت قبل و بعد زایش با احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار است ($p<0.01$).

شاخص‌های ادراری قبل و پس از زایش

نتایج به‌دست‌آمده در جدول ۴ بیانگر آن است که pH ادرار بعد از زایش به‌صورت معنی‌داری بیشتر از قبل از زایش است. پروتئین ادرار، وزن مخصوص و کتون بادی درون ادرار نیز پس از زایش نسبت به قبل از زایش افزایش معنی‌داری را نشان دادند. در این آزمون تغییرات میانگین و انحراف معیار pH و

وزن مخصوص با مقدار $\alpha (0/01)$ و P-Valua مشاهده شده کمتر از ۰/۰۱، سطح اطمینان ۹۹٪ را نشان دادند. همچنین تغییرات کتون بادی ادرار با همین مقدار p و سطح اطمینان، سطح معنی‌داری ($\alpha (0/004)$) را نشان داد. تغییرات میزان پروتئین ادرار نیز با مقدار $\alpha (0/02)$ و P-Valua مشاهده شده کمتر از ۰/۰۵، سطح اطمینان ۹۵٪ را نشان داد.

جدول ۴- تغییرات ادرار قبل و پس از زایش

Table 4. The changes in urine composition in before and after calving

فاکتور Factor	اسیدیته	پروتئین	وزن مخصوص	کتون بادی
زمان Time	pH	Protein	Specific gravity	Keton body
قبل زایش Before calving	6.42±0.58	118.22±170.14	1.01±0.01	0.11±0.74
بعد زایش After calving	6.84±0.50	200.00±195.34	1.02±0.01	1.44±2.94
سطح معنی‌داری Significant level	0.001**	0.02*	0.001**	0.004**

*: Significant difference between before and after calving by 95% validity ($p<0.05$)

** : تفاوت قبل و بعد زایش با احتمال ۹۵ درصد معنی‌دار است ($p<0.05$).

** : Significant difference between before and after calving by 99% validity ($p<0.01$)

** : تفاوت قبل و بعد زایش با احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار است ($p<0.01$).

فاکتورهای بیوشیمیایی قبل و پس از زایش

نتایج بدست آمده در جدول ۵ بیانگر آن است که توتال پروتئین خون بعد از زایش به‌صورت معنی‌داری کمتر از قبل از زایش بود که با سطح معنی‌داری ۰/۰۴۵، اطمینان ۹۵٪ را نشان داد.

گلوکز خون نیز پس از زایش نسبت به قبل از زایش کاهش معنی‌داری یافت که با مقدار $\alpha (0/01)$ و p کمتر از ۰/۰۱ سطح اطمینان ۹۹٪ را نشان داد که به دلیل فرآیند تولید شیر و افزایش مصرف انرژی اتفاق افتاده بود.

جدول ۵- فاکتورهای بیوشیمیایی سرم قبل و پس از زایش

Table 5. The serum biochemical parameters in before and after calving

فاکتور Factor	توتال پروتئین Total protein	گلوکز Glucose
زمان Time		
قبل زایش Before calving	0.74±7.41	79.11±12.93
بعد زایش After calving	7.16±0.48	64.20±9.88
سطح معنی داری Significant level	0.045*	0.001**

*: تفاوت قبل و بعد زایش با احتمال ۹۵ درصد معنی دار است ($p<0.05$).**: تفاوت قبل و بعد زایش با احتمال ۹۹ درصد معنی دار است ($p<0.01$).*: Significant difference between before and after calving by 95% validity ($p<0.05$)**: Significant difference between before and after calving by 99% validity ($p<0.01$)

وضعیت کتوز قبل و پس از زایش

بالینی با نقطه برش بالای ۱/۲ میلی مول در لیتر گزارش نشد. همچنین مشخص شد که موارد ابتلا به کتوز تحت بالینی تماماً از نمونه‌های پس از زایش بود. در این مطالعه میزان ابتلا به کتوز تحت بالینی قبل از زایش صفر و پس از زایش ۲۲/۲٪ گزارش می‌شود (جدول ۶). همچنین میانگین و انحراف معیار شیوع این بیماری در جدول ۶ بیانگر آن است که BHBA بعد از زایش به صورت معنی داری بیشتر از قبل از زایش می‌باشد که بر این اساس تغییرات آن در دوره یک هفته قبل تا یک هفته پس از زایش با سطح معنی داری ۰/۰۰۱ و p کمتر از ۰/۰۱ سطح اطمینان ۹۹٪ را نشان داد.

میزان غلظت بتا هیدروکسی بوتیرات در تعداد ۹۰ نمونه آزمایش شده بیانگر آن بود که در تعداد ۸۰ راس گاو BHBA کمتر از ۰/۸ میلی مول در لیتر و فاقد کتوز تحت بالینی گزارش شد. همچنین در تعداد ۱۰ راس گاو BHBA بین ۰/۸ تا ۱/۲ میلی مول در لیتر گزارش شد که به عنوان کتوز تحت بالینی ثبت شد. از این تعداد یک نمونه شکم اول، پنج نمونه شکم دوم، دو نمونه شکم سوم و دو نمونه شکم چهارم بودند. به این ترتیب کمترین درصد ابتلا در گاوهای شکم اول به میزان ۲٪ و بیشترین میزان ابتلا در گاوهای شکم دوم به میزان ۱۱٪ از میان ۴۵ راس گاو گزارش شد. در این آزمون موردی از ابتلا به کتوز

جدول ۶- میزان شیوع کتوز قبل و پس از زایش

Table 6. The prevalence of ketosis in before and after calving

بتا هیدروکسی بوتیرات BHBA	کمتر از ۰/۸ میلی مول در لیتر Lower than 0.8 mmol/L	۰/۸ تا ۱/۲ میلی مول در لیتر 0.8-1.2 mmol/L	بیش از ۱/۲ میلی مول در لیتر Higher than 1.2 mmol/L
قبل زایش Before calving	45 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
بعد زایش After calving	35 (77.77%)	10 (33.33%)	0 (0%)

استرس اکسیداتیو قبل و پس از زایش

یافتند اما این کاهش از نظر آزمون Paired Sample t test معنی دار نبود. در جدول ۷ میزان تغییرات میانگین و انحراف معیار این فاکتورها در قبل و پس از زایش همراه با سطح معنی داری آن‌ها مشخص شده است.

تمام فاکتورهای استرس اکسیداتیو از جمله مالون دی آلدئید (MDA)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) و آنتی اکسیدان تام (TAC) اگرچه پس از زایش کاهش

جدول ۷- تغییرات مالون دی آلدئید و BHBA در قبل و بعد زایش

Table 7. The changes in MDA and BHBA in before and after calving

فاکتور Factor	بتا هیدروکسی بوتیرات BHBA	مالون دی آلدئید MDA	آنتی اکسیدان تام TAC	سوپراکسید دیسموتاز SOD	گلوکاتایون پراکسیداز GPX
زمان Time					
قبل زایش Before calving	0.42±0.12	57.06±35.33	0.37±0.10	28.98±57.7	186.2±89.8
بعد زایش After calving	0.71±0.16	0.18±19.33	0.35±0.12	274.02±63.2	182.9±125.04
سطح معنی داری Significant level	0.001**	0.23 ^{ns}	0.31 ^{ns}	0.24 ^{ns}	0.89 ^{ns}

ns: تفاوت قبل و بعد زایش معنی دار نیست ($p<0.05$).**: تفاوت قبل و بعد زایش با احتمال ۹۹ درصد معنی دار است ($p<0.01$).**: Significant difference between before and after calving by 99% validity ($p<0.01$)

وضعیت عمومی در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی و به ظاهر سالم

نتایج به دست آمده در جدول ۸ بیانگر آن است که در فاکتورهای وضعیت عمومی بدن از جمله امتیاز وضعیت بدن (BCS)، دمای رکتال و امتیاز مدفوع بین دام‌های سالم و مبتلا به کتوز تحت بالینی تفاوت معنی داری از نظر آزمون Independent Sample t test وجود ندارد. هرچند میانگین BSC در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی مشخصاً نسبت به گاوهای سالم

به طور کلی مقایسه تغییرات میانگین و انحراف معیار شاخص‌های مورد نظر در قبل و پس از زایش که به وسیله آزمون Paired Sample t test انجام شد، مشخص شد که فاکتورهای BCS، توتال پروتئین و گلوکز خون نسبت به قبل از زایش کاهش داشته و فاکتورهای ادراری و BHBA افزایش معنی داری داشتند.

مقایسه شاخص‌ها در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی و به ظاهر سالم

افزایش داشته است که می‌تواند نشان از افزایش احتمال ابتلا به کتوز تحت بالینی در گاوهای چاق و پرتولید باشد اما این اختلاف در آزمون یادشده معنی‌دار نبود.

جدول ۸- مقایسه شاخص‌های مربوط به وضعیت عمومی در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی و به ظاهر سالم

Table 8. The comparison of common condition in cows affected with subclinical ketosis and healthy

فاکتور Factor	شاخص توده بدنی BCS	دما Temperature	امتیاز مدفوع Fecal score
زمان Time			
سالم Healthy	2.91±0.28	39.18±0.23	2.33±0.55
بیمار Diseased	3.00±0.20	39.18±0.20	2.35±0.41
سطح معنی‌داری Significant level	0.37 ^{ns}	1.00 ^{ns}	0.52 ^{ns}

ns: no significant differences

ns: تفاوت سالم و بیمار معنی‌دار نیست.

میزان کتون بادی موجود در ادرار گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی نسبت به گاوهای سالم افزایش چشم‌گیری داشته‌است اما این اختلاف در آزمون Independent Sample t test معنی‌دار نبود. که نشان از عدم توانایی استناد به میزان اسیداستواستیک به‌عنوان ماده کتونی ادرار جهت تشخیص بیماری کتوز تحت بالینی می‌باشد.

فاکتورهای ادراری در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی و به ظاهر سالم

نتایج به‌دست‌آمده در جدول ۹ بیانگر آن است که در شاخص‌های ادرار از جمله pH ادرار، پروتئین ادرار، وزن مخصوص ادرار و کتون بادی موجود در ادرار تفاوت معنی‌داری بین دام سالم و مبتلا به کتوز تحت بالینی ندارد. هرچند میانگین

جدول ۹- مقایسه فاکتورهای ادراری در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی و به ظاهر سالم

Table 9. The comparison of urine factors in cows affected with subclinical ketosis and healthy

فاکتور Factor	اسیدیته PH	پروتئین Protein	وزن مخصوص Specific gravity	کتون بادی Keton body
زمان Time				
سالم Healthy	6.8±0.44	198.29±195.62	1.02±0.008	1.14±2.13
بیمار Diseased	7.0±0.67	206.00±204.79	1.03±0.008	2.50±4.86
سطح معنی‌داری Significant level	0.26 ^{ns}	0.91 ^{ns}	0.37 ^{ns}	0.41 ^{ns}

ns: no significant differences

ns: تفاوت سالم و بیمار معنی‌دار نیست.

اطمینان می‌باشد. همچنین علی‌رغم افزایش توتال پروتئین در دام‌های مبتلا به کتوز تحت بالینی نسبت به دام‌های سالم از نظر آزمون Independent Sample t test تفاوت معنی‌داری یافت نشد.

فاکتورهای بیوشیمیایی سرم در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی و به ظاهر سالم

نتایج به‌دست‌آمده در جدول ۱۰ بیانگر آن است که گلوکز خون در دام‌های بیمار به‌صورت معنی‌داری بیشتر از دام‌های سالم بود که سطح معنی‌داری آن ۰/۰۱۱ با میزان ۹۵٪ سطح

جدول ۱۰- مقایسه فاکتورهای بیوشیمیایی سرم در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی و به ظاهر سالم

Table 10. The comparison of serum biochemical factors in cows affected with subclinical ketosis and healthy

فاکتور Factor	توتال پروتئین Total protein	گلوکز Glucose
زمان Time		
سالم Healthy	7.09±0.48	62.23±8.75
بیمار Diseased	7.38±0.39	71.10±10.96
سطح معنی‌داری Significant level	0.09 ^{ns}	0.011 [*]

ns: no significant differences

ns: تفاوت سالم و بیمار معنی‌دار نیست.

*: تفاوت سالم و بیمار با احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار است ($p<0.01$).**: Significant difference between healthy and diseased by 99% validity ($p<0.01$)

بیشتر از دام‌های سالم می‌باشد. همچنین باوجود کاهش فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون Independent Sample t test در میزان TAC، SOD و GPx بین دام‌های سالم و بیمار مشاهده نشد.

فاکتورهای استرس اکسیداتیو در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی و به‌ظاهر سالم

نتایج به‌دست‌آمده در جدول ۱۱ بیانگر آن است که MDA سرم با سطح اطمینان ۹۹٪ در دام‌های بیمار به‌صورت معنی‌داری

تعیین ارتباط بین استرس اکسیداتیو و بیماری کتوز تحت بالینی در گاوهای شیری ۹۴

جدول ۱۱- مقایسه فاکتورهای استرس اکسیداتیو در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی و به ظاهر سالم

Table 11. The comparison of serum oxidative stress in cows affected with subclinical ketosis and healthy

فاکتور Factor	مالون دی آلدئید MDA	آنتی اکسیدان تام TAC	سوپراکسید دیسموتاز SOD	گلوتاتیون پراکسیداز GPX
زمان Time				
سالم Healthy	44.74±17.01	0.36±0.13	274.34±7.07	187.6±140.08
بیمار Diseased	69.21±14.72	0.32±0.06	272.9±25.78	166.4±43.89
سطح معنی داری Significant level	0.001**	0.40 ^{ns}	0.95 ^{ns}	0.64 ^{ns}

ns: no significant differences

ns: تفاوت سالم و بیمار معنی دار نیست.

** : Significant difference between healthy and diseased by 99% validity (p<0.01)

***: تفاوت سالم و بیمار با احتمال ۹۹ درصد معنی دار است (p<0.01).

فاکتورهای شیر در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی و به ظاهر سالم
نتایج به دست آمده در جدول ۱۲ بیانگر آن است که تفاوت معنی داری از نظر میانگین رکورد تولید شیر و بریکس آغوز در دامهای سالم و مبتلا به کتوز تحت بالینی مشاهده نشد.

جدول ۱۲- مقایسه فاکتورهای شیر در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی و به ظاهر سالم

Table 12. The comparison of milk factors in cows affected with subclinical ketosis and healthy

فاکتور Factor	بریکس آغوز Brix of primary milk	میانگین رکورد شیر Mean of milk production
زمان Time		
سالم Healthy	23.43±4.17	39.43±6.94
بیمار Diseased	22.20±2.82	40.88±5.78
سطح معنی داری Significant level	0.39 ^{ns}	0.55 ^{ns}

ns: no significant differences

ns: تفاوت سالم و بیمار معنی دار نیست.

همبستگی فاکتورهای اندازه گیری شده با تغییرات BHBA

همبستگی وضعیت عمومی با تغییرات BHBA
جدول ۱۳ بیانگر آن است که همبستگی بین BHBA با وضعیت عمومی بدن معنی دار نبود.

به طور کلی، مقایسه شاخص های دام های سالم و بیمار که به وسیله آزمون Independent Sample t test انجام شد، مشخص شد گلوکز خون در دام های بیمار به صورت معنی داری بیشتر از دام های سالم بود. همچنین مالون دی آلدئید سرم در دام های بیمار به صورت معنی داری نسبت به دام های سالم افزایش داشت.

جدول ۱۳- همبستگی بتا هیدروکسی بوتیرات با وضعیت عمومی بدن

Table 13. The correlation between beta hydroxy butyrate with body condition scoring

فاکتور Factor	شاخص توده بدنی BCS	دما Temperature	امتیاز مدفوع Fecal score
فاکتور Factor			
بتا هیدروکسی بوتیرات BHBA	0.095	0.089	0.027
سطح معنی داری Significant level	0.52 ^{ns}	0.56 ^{ns}	0.86 ^{ns}

ns: no significant relationship

ns: همبستگی معنی دار نیست.

جدول ۱۴ بیانگر آن است که همبستگی بین BHBA با فاکتورهای ادرار معنی دار نبود.

همبستگی وضعیت عمومی با تغییرات BHBA

جدول ۱۴- همبستگی بین BHBA با فاکتورهای ادراری

Table 14. The correlation between BHBA with urine factors

فاکتور Factor	اسیدیته PH	پروتئین Protein	وزن مخصوص Specific gravity	کتون بادی Keton body
فاکتور Factor				
بتا هیدروکسی بوتیرات BHBA	0.015	0.034	0.067	0.069
سطح معنی داری Significant level	0.92 ^{ns}	0.82 ^{ns}	0.66 ^{ns}	0.65 ^{ns}

ns: no significant relationship

ns: همبستگی معنی دار نیست.

همبستگی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم با تغییرات BHBA

جدول ۱۵ بیانگر آن است که همبستگی بین BHBA با فاکتورهای توتال پروتئین و گلوکز معنی‌دار نبود.

جدول ۱۵- همبستگی بین BHBA با فاکتورهای ادراری

Table 15. The correlation between serum biochemical factors with BHBA

فاکتور	توتال پروتئین	گلوکز
Factor	Total protein	Glucose
بناهیروکسی بوتیرات BHBA	0.223	0.283
سطح معنی‌داری	0.14 ^{ns}	0.054 ^{ns}

ns: no significant differences

ns: تفاوت سالم و بیمار معنی‌دار نیست.

بیانگر آن است که همبستگی بین BHBA با MDA از نوع مثبت و معنی‌دار بوده اما با سایر فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی فاقد همبستگی می‌باشد.

همبستگی فاکتورهای استرس اکسیداتیو سرم با تغییرات BHBA

جدول ۱۶ نتایج آزمون همبستگی بین بیماری کتوز تحت بالینی و فاکتورهای استرس اکسیداتیو را نشان می‌دهد که

جدول ۱۶- همبستگی بناهیروکسی بوتیرات با فاکتورهای استرس اکسیداتیو

Table 16. The correlation between BHBA with oxidative stress indices

فاکتور	مالون دی‌آلدهید	آنتی‌اکسیدان تام	سوپراکسید دیسموتاز	گلوکاتیون پراکسیداز
Factor	MDA	TAC	SOD	GPX
بناهیروکسی بوتیرات BHBA	0.586	0.013	0.006	-0.012
سطح معنی‌داری	0.001**	0.92 ^{ns}	0.97 ^{ns}	0.96 ^{ns}

ns: No significant relationship

ns: همبستگی معنی‌دار نیست.

** : Significant relationship by 99% validity ($p < 0.01$)

**همبستگی با احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار است ($p < 0.01$).

همبستگی فاکتورهای شیر با تغییرات BHBA

زمان زایش بوده که از نظر آزمون انجام شده معنی‌دار نبوده است.

جدول ۱۷ نشان‌دهنده همبستگی منفی بین BHBA با میانگین رکورد تولید شیر در زمان ماه اول و دوم و بریکس آغوز

جدول ۱۷- همبستگی بناهیروکسی بوتیرات و فاکتورهای شیر

Table 17. The correlation between beta hydroxy butyrate with milk factors

فاکتور	بریکس آغوز	میانگین رکورد شیر
Factor	Brix of primary milk	Mean of milk production
بناهیروکسی بوتیرات BHBA	-0.096	-0.081
سطح معنی‌داری	0.53 ^{ns}	0.59 ^{ns}

ns: no significant relationship

ns: همبستگی معنی‌دار نیست.

گاوه‌های شیری وجود داشت و در مواقع بروز کتوز، مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو افزایش یافت.

به‌طور کلی، آزمون‌های همبستگی انجام‌شده در میزان بناهیروکسی بوتیرات و شاخص‌های یادشده قبل و پس از زایش تنها همبستگی مثبت معنی‌دار بین میزان MDA و BHBA را نشان داد.

در مطالعه‌ای مشابه، اوکاوا و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مطالعه‌ای به ارزیابی شاخص‌های استرس اکسیداتیو قبل و بعد از زایمان در گاوه‌های مبتلا به کتوز تحت بالینی پرداختند و گزارش نمودند که در گاوه‌های مبتلا به کتوز تحت بالینی غلظت مالون‌دی‌آلدهید سرم نسبت به گاوه‌های سالم افزایش معنی‌داری یافت که با یافته‌های مطالعه حاضر کاملاً هم‌خوانی دارد (Oikawa & Oztel, 2006).

کتوز یک اختلال متابولیک شایع در طول دوره‌گذار پس از زایمان در گاوه‌های شیری است. میزان تاثیر روش تولیدمثل، زمان زایمان و وزن تولد گوساله بر وقوع کتوز در گله‌های شیری، هنوز مشخص نیست (Ha et al., 2023). در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در ارتباط با استرس اکسیداتیو در گاوه‌های شیری و اثرات آن بر بیماری‌های متابولیک و عفونی صورت گرفته است که با نتایج متفاوتی همراه بوده‌اند. به‌علت اهمیت بیماری‌های حوالی زایش، این دوره مورد بحث بسیاری از محققان بوده‌است. در مطالعات مختلف از روش‌های متنوعی از جمله اندازه‌گیری انواع آنتی‌اکسیدان‌ها، رادیکال‌های آزاد و پارامترهای آسیب اکسیداتیو با هدف بررسی بروز استرس اکسیداتیو حوالی زایش استفاده شده‌است (Salzano et al., 2022). و چنانچه که در مطالعه حاضر مشخص شد ارتباط قابل توجهی بین استرس اکسیداتیو و بیماری کتوز تحت بالینی در

در مطالعه دیگر لی و همکاران (۲۰۱۵) تایید نمودند که ارتباط معنی‌دار و مستقیمی بین سطوح استرس اکسیداتیو با غلظت اسیدهای چرب غیراستریفیه، مالون‌دی‌آلدهید و میزان بناهیروکسی بوتیرات در گاوه‌های شیری مبتلا به کتوز وجود دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که گاوه‌های مبتلا به کتوز دچار افزایش غلظت‌های سرمی پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدهید می‌شوند. این محققین ارتباط معنی‌دار و مستقیمی را بین میزان اسیدهای چرب غیرضروری پلاسما و مالون‌دی‌آلدهید گزارش

نمودند (Li et al., 2015). الدیب و الباهر (۲۰۱۷) نیز نشان دادند که سطح آسپارات آمینوترانسفراز و مالون دی‌آلدئید در گاوهای شیری مبتلا به کتوز نسبت به گاوهای سالم بیشتر است. این محققین تایید نمودند که بیومارکرهای استرس اکسیداتیو و به‌ویژه میزان MDA می‌توانند به‌عنوان بیومارکرهای امیدوارکننده برای پیشگویی کتوز در گاوهای شیری در دوره پس از زایمان باشند (El-Deeb & El-Bahr, 2017). در مطالعه‌ای دیگر امیدی و همکاران نشان دادند که افزایش غلظت سرمی مالون دی‌آلدئید در زمان زایمان به موازات کاهش سطح سرمی TAC افزایش خواهد یافت. به‌عبارت دیگر افزایش فرایندهای متابولیسمی و سرعت تولید اکسید آن‌ها در دوره انتقال بسیار سریع‌تر از ظرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن می‌باشد. همچنین این محققین گزارش نمودند که افزایش تولید شیر در دوره ابتدایی پس از زایمان باعث افزایش شدت و وخامت کتوز شده و بالانس منفی انرژی و دیگر بیماری‌های متابولیک را تشدید می‌کند. امیدی همچنین مالون دی‌آلدئید را به‌عنوان شاخصی اساسی جهت تشخیص کتوز بالینی دانست که همسو با یافته‌های به‌دست‌آمده در مطالعه ما می‌باشد (Omidi et al., 2017). در مطالعه حاضر علاوه بر افزایش معنی‌دار میزان MDA در گاوهای مبتلا به استرس اکسیداتیو، همبستگی مثبت و معنی‌دار بین BHA و MDA مشاهده شد و نشان‌دهنده بروز استرس اکسیداتیو در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی می‌باشد. در همین راستا، مطالعه یوسف و همکاران (۲۰۱۰) در ۶۱ گاو میش مبتلا به کتوز بالینی و تحت بالینی نشان داد که در مبتلایان به کتوز بالینی در مقایسه با تحت بالینی، مقادیر بتا‌هیدروکسی بوتیرات و مالون دی‌آلدئید به میزان معنی‌داری بالاتر بود و بین این مقادیر ارتباط مثبت معنی‌داری وجود داشت که ارتباط بین هاپیرکتونمی و افزایش استرس اکسیداتیو در گاو میش را نشان داد (Youssef et al., 2010). در این مطالعه نیز همبستگی معنی‌دار MDA در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی با شاخص BHBA وجود داشت. جهت توجیه علت افزایش مالون دی‌آلدئید در بیماری‌های متابولیک و به‌ویژه کتوز تحت بالینی باید توجه نمود که غلظت بالای NEFA و BHBA خون پس از زایمان علت اصلی افزایش غلظت MDA است زیرا پراکسیدهای لیپیدی مانند ROM و مواد واکنش‌دهنده اسید تیوباربیتوریک افزایش یافته و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این شرایط کاهش می‌یابند (Macciotta et al., 2017). درمان سلول‌های کبدی گاو با NEFA و BHBA بلا منجربه فعال شدن بیان ژن NF-kB می‌شود که سیتوکین‌های پیش التهابی مانند TNF- α ، IL-6 و IL-1 β را تنظیم می‌کند (Shin et al., 2015). افزایش این سیتوکین‌های پیش التهابی باعث افزایش تولید پراکسیدهای لیپیدی مانند ROS و MDA می‌شود. بنابراین، افزایش پس از زایمان در غلظت MDA می‌تواند ناشی از اثر مستقیم افزایش غلظت NEFA و BHBA در خون یا اثر غیرمستقیم افزایش NEFA و BHBA از طریق آزادسازی سیتوکاین‌های پیش التهابی باشد (Zhang et al., 2011).

نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر بیانگر آن بود که گلوکز سرم در دام‌های بیمار به‌صورت معنی‌داری بیشتر از دام‌های

سالم بود. بیشتر بودن میزان گلوکز در موارد مبتلا به کتوز تحت بالینی نسبت به گاوهای سالم با عدم وجود همبستگی بین میزان بتا‌هیدروکسی بوتیرات و گلوکز سرم نشان‌دهنده آن است که گلوکز سرم نمی‌تواند معیار مناسبی جهت تشخیص کتوز تحت بالینی باشد. گزارشات مختلفی وجود دارد که به ارتباط کاهش گلوکز و کتوز تحت بالینی پرداخته‌اند. مالینووسکی و همکاران (۲۰۰۶) افزایش میزان اجسام کتون و کاهش میزان گلوکز سرمی را در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی و متريت و جفت ماندگی بیان نموده‌اند (Malinowski et al., 2006). اوئزل و همکاران افزایش میزان بتا‌هیدروکسی بوتیرات توأم با کاهش میزان گلوکز و افزایش اسیدهای چرب غیر استریفیه و تری‌گلیسرید را در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی گزارش کرده‌اند (Oetzel, 2003). کیمورا و همکاران کاهش گلوکز خون را در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی عنوان کرده و معتقد هستند وجود محدودیت در غذای وارده به بدن سبب می‌شود انرژی از طریق چربی تأمین شود و تری‌گلیسرید در سلول‌های کبدی و خون افزایش یابد و برخی از اسیدهای چرب به اجسام کتون تبدیل شوند (Kimura et al., 2002). تجمع چربی در سلول‌های کبدی باعث کاهش فعالیت کبد و کاهش عملکرد سلول‌های کبدی برای تولید گلوکز می‌شود. برعکس، نوروزی اصل و همکاران (۱۳۸۷) در مطالعه‌ای به بررسی شیوع کتوز تحت بالینی در تعدادی از گاوداری‌های شیری اطراف شهرستان شیراز پرداختند و گزارش نمودند که غلظت گلوکز سرم نمی‌تواند معیار خوبی برای تشخیص کتوز تحت بالینی باشد (Nowroozi-Asi et al., 2016). نتایج مطالعه ما با مطالعه نوروزی و همکاران هم‌راستا است و همبستگی معنی‌داری بین میزان گلوکز و BHA وجود ندارد.

در مطالعه حاضر میزان فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی گلوکاتیبون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و آنتی‌اکسیدان تام در گاوهای مبتلا به کتوز تحت بالینی و به‌ظاهر سالم تفاوت معنی‌دار نداشت و همبستگی بین میزان BHA و این شاخص‌های آنتی‌اکسیدان مشاهده نشد. نتایج مطالعه اخیر با مطالعه ژانگ و همکاران مطابقت دارد به‌طوری‌که در مطالعه ژانگ و همکاران که برای تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گاوهای شیری مبتلا به کتوز تحت بالینی با نمونه‌گیری از ۹ گاو سالم و ۷ گاو مبتلا به کتوز تحت بالینی طی دو ماه اول شیرواری انجام شد، در گاوهای مبتلا، غلظت بتا‌هیدروکسی بوتیرات و اسیدهای چرب غیر استریفیه به‌طور معنی‌داری بالاتر بود اما هیچ تفاوت معنی‌داری بین مقادیر سرمی سوپراکسید دیسموتاز، مالون دی‌آلدئید، گلوکاتیبون پراکسیداز و وضعیت آنتی‌اکسیدانی تام بین دو گروه سالم و مبتلا به کتوز تحت بالینی مشاهده نشد که عدم مشاهده این اختلاف را به دلیل شدت درجات کتوز تحت بالینی دانستند (Zhang et al., 2011).

به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که در کتوز تحت بالینی مقادیر MDA به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو به‌طور معنی‌دار افزایش می‌یابد و در مجاور سایر شاخص‌های بیوشیمیایی تعیین‌کننده کتوز تحت بالینی در تشخیص این بیماری کمک‌کننده است. همچنین عدم وجود همبستگی میان میزان بتا‌هیدروکسی بوتیرات و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPx

و SOD علی‌رغم همبستگی مثبت با MDA به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو، گویای تأثیرات متفاوت آنتی‌اکسیدان‌ها در درجات مختلف کتوز تحت بالینی می‌باشد.

References

- Castillo, C., Hernandez, J., Valverde, I., Pereira, V., Sotillo, J., Alonso, M. L., & Benedito, J. L. (2006). Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 80(2), 133-139.
- Constable, P. D., Hinchcliff, K. W., Done, S. H., & Grünberg, W. (2016). Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. *Elsevier Health Sciences*, 11th Edition - Imprint: Saunders Ltd. Hardback ISBN: 9780702052460.
- El-Deeb, W. M., & El-Bahr, S. M. (2017). Biomarkers of ketosis in dairy cows at postparturient period, acute phase proteins and pro-inflammatory cytokines. *Veterinarski arhiv*, 87(4), 431-40.
- Ha, S., Kang, S., Jeong, M., Han, M., Lee, J., Chung, H., & Park, J. (2023). Characteristics of Holstein cows predisposed to ketosis during the post-partum transition period. *Veterinary Medicine and Science*, 9(1), 307-314.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). Free radicals in biology and medicine. Oxford university press., USA. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1, 331-334.
- Kimura, K., Goff, J. P., & Kehrl, Jr M. E. (2002). Reinhardt T.A. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85(3), 544-50.
- Krug, C., Morin, P. A., Lacasse, P., Santschi, D. E., Roy, J. P., Dubuc, J. & Dufour, S. (2018). A randomized controlled trial on the effect of incomplete milking during the first 5 days in milk on culling hazard and on milk production and composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4367-4377.
- Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W. & Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26087-26124.
- Macciotta, N. P., Biffani, S., Bernabucci, U., Lacetera, N., Vitali, A., Ajmone-Marsan, P., & Nardone, A. (2017). Derivation and genome-wide association study of a principal component-based measure of heat tolerance in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4683-97.
- Malinowski, E., Lassa, H., Kłossowska, A., Smulski, S., Markiewicz, H., & Kaczmarski, M. (2006). Etiological agents of dairy cows' mastitis in western part of Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 9(3), 191-4.
- Moolchandani, A., & Sareen, M. A. (2018). Review: Oxidative stress during lactation in dairy cattle. *Journal of Dairy Veterinary Science*, (5), 555-669.
- Nowroozi-Asi, A., Aarabi, N. & Rowshan-Ghasrodashti, A. (2016). Ghrelin and its correlation with leptin, energy related metabolites and thyroidal hormones in dairy cows in transitional period. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(1), 100-110.
- Oikawa, S. & Oetzel, G. R. (2006). Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis. *Journal of Dairy Science*, 89(8), 2999-3005.
- Oetzel, G. R. (2003). Ketosis and hepatic lipidosis in dairy herds. *In Annual Conference American Association of Bovine Practitioners*, 36, 1-19.
- Omidi, A., Fathi, M. H. & Parker, M. O. (2017). Alterations of antioxidant status markers in dairy cows during lactation and in the dry period. *Journal of Dairy Research*, 84(1), 49-53.
- Ramin, A. G., Asri-Rezaie, S. & Khorashadizadeh, V. (2018). Evaluation of the correlation of beta hydroxyl butyrate with oxidative stress., energy and trace minerals parameters in dairy cows. *Veterinary Researches & Biological Products*, 31(3), 77-88 [In Persian]
- Salzano, A., Di Meo, M. C., D'Onofrio, N., Bifulco, G., Cotticelli, A., Licitra, F., Iraci Fuintino, A., Cascone, G., Balestrieri, M. L., Varricchio, E., & Campanile, G. (2022). Breed & Feeding System Impact the Bioactive Anti-Inflammatory Properties of Bovine Milk. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11088.
- Sharma, N., Singh, N. K., Singh, O. P., Pandey, V., Verma, P. K. (2011). Oxidative stress and antioxidant status during transition period in dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(4), 479-484.

- Shin, E. K., Jeong, J. K., Choi, I. S., Kang, H. G., Hur, T. Y., Jung, Y. H. & Kim, I. H. (2015). Relationships among ketosis., serum metabolites., body condition., and reproductive outcomes in dairy cows. *Theriogenology*, 84(2), 252-60.
- Walsh, R. B., Walton, J. S., Kelton, D. F., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E. & Duffield, T. F. (2007). The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2788-96.
- Youssef, M. A., El-Khodery, S. A., El-deeb, W. M., & El-Amaiem, W. E. (2010). Ketosis in buffalo (*Bubalus bubalis*), clinical findings and the associated oxidative stress level. *Tropical Animal Health and Production*, (42), 1771-7.
- Zhang, Z. G., Li, X. B., Gao, L., Li, Y. F., Liu, G. W., Wang, H. B., & Wang, Z. (2011). Serum antioxidant capacity of dairy cows with subclinical ketosis. *The Veterinary Record*, 168(1), 22.