

ارزیابی رابطه برخی متابولیت‌ها و عناصر خونی با تشکیل فولیکول مقاوم تخمدان در گاوهای شیری هلشتاین

زهرا مراتی^۱، غلامعلی مقدم^۲، سید عباس رأفت^{۲*}

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی، گرایش فیزیولوژی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: abbasrafat@hotmail.com

(دریافت مقاله: ۹۰/۱/۳۰، پذیرش نهایی: ۹۰/۳/۱۸)

چکیده

این مطالعه به منظور ارزیابی اثر برخی از متابولیت‌ها و عناصر خونی بر تشکیل فولیکول‌های مقاوم تخمدان انجام گرفت. برای انجام این تحقیق از ۱۱۷ رأس گاو در دو گروه سالم و دارای فولیکول مقاوم، نمونه‌های خون تهیه گردید. غلظت گلوکز، اوره، پروتئین تام، بتا هیدروکسی بوتیرات و فسفر سرم با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و غلظت هورمون استروژن سرم با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری شد. همچنین اثر برخی عوامل مؤثر بر فولیکول مقاوم از جمله فصل گوساله-زایی، تعداد زایش و تولید شیر در ۶۰-۵۰ روز پس از زایش در گاوهای مورد مطالعه بررسی شد. وضعیت دام (وجود داشتن یا عدم وجود فولیکول مقاوم) بر میزان غلظت اوره سرم خون، پروتئین تام، بتا هیدروکسی بوتیرات، فسفر و استرادیول خون اثر معنی‌داری ($p < 0.05$) داشت. نتایج رابطه رگرسیون لجستیک نشان داد به-شرط ثابت بودن سایر عوامل در مدل، به‌ازای افزایش یک واحد اوره، احتمال نسبی دام سالم به بیمار ۰/۵۴۸ واحد افزایش و همچنین بازای یک واحد افزایش فسفر سرم خون احتمال نسبی دام سالم به بیمار ۱/۰۶ واحد کاهش می‌یابد. بر اساس این مطالعه از علل احتمالی ایجاد فولیکول مقاوم در گاوهای شیری کمبود یا افزایش برخی از متابولیت‌ها و عناصر خونی مانند فسفر و اوره خون می‌باشد.

مجله علوم تشخیصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۹، دوره ۴، شماره ۴، پیاپی ۱۶، صفحات: ۱۰۲۵-۱۰۱۹.

کلید واژه‌ها: الایزا، استرادیول، تخمدان، فولیکول مقاوم، گاو شیری

مقدمه

ریزی در سطح تخمدان لمس می‌شود. این فولیکول‌ها ممکن است تا ۶۰ روز پس از زایش در روی تخمدان گاوهای زایمان کرده مشاهده شوند و باروری را کاهش دهند. بهترین راهکار برای تغییر دینامیک فولیکول‌ها، مدیریت تغذیه‌ای دوره پس از زایش است که باید امتیاز وضعیت بدن^۱ در زمان زایش کمی بالاتر از حد تعادل باشد و سپس کاهش طول مدت تعادل منفی انرژی^۲ (NEB) مدیریت شود. تحقیقات بسیاری نشان داده

در صنعت گاو شیری جهت تداوم تولید بهینه شیر در نسل‌های بعد ضروری است که تولیدمثل با بازدهی بالایی صورت گیرد. در این بین فولیکول‌های تخمدان نقش زیادی در موفقیت تولیدمثلی ایفا می‌کنند. رشد نکردن و عدم تخمک گذاری فولیکول‌ها یکی از دلایل کاهش باروری و آبستنی می‌باشد که این حالت فیزیولوژیک رشد نکردن فولیکول‌ها باعث ایجاد فولیکول‌های مقاوم یا ایستا می‌گردد. فولیکول‌های ایستا فولیکول‌هایی به اندازه ۱/۵ - ۱ سانتی‌متر هستند که در دو نوبت توشه رکناال به فاصله ۱۴ روز بدون رشد و تخمک-

¹ Body condition score

² Negative energy balance

که بالانس انرژی جیره بر روی رشد فولیکول‌ها بسیار مؤثرند به طوری که عدم تخمک گذاری پس از زایش ارتباط مستقیمی با میزان NEB دارد. علت مقاوم شدن فولیکول‌ها در طی اوایل بعد از زایمان را به عوامل متعددی از جمله تعادل منفی انرژی، تعداد شکم زایش، میزان تولید شیر و فصل گوساله‌زایی نسبت داده‌اند (۱ و ۲).

در مورد اثر غلظت گلوکز بر روی وضعیت دام گزارش شده که در اوایل شیردهی نسبت ترکیبات لیپوژنیک به گلوکوژنیک بالا بوده و در نتیجه قابلیت دسترسی بیشتر این ترکیبات برای تولید شیر در حیوانی که دچار کمبود انرژی شده، افزایش غلظت بتاهیدروکسی بوتیرات و اوره سرم خون و کاهش غلظت سرمی گلوکز، انسولین و ضربات LH-FSH را باعث می‌شود. در این حالت فراوانی نبض‌های LH پائین آمده و در نتیجه فولیکول غالب استرادیول کمی تولید می‌کند که باعث ایجاد فولیکول‌های مقاوم خواهد شد (۴ و ۵).

در مطالعه‌ای بر روی گاوهای شیری گزارش شده که در اوایل شیردهی به دلیل بالا بودن تولید شیر و پائین بودن میزان خوراک مصرفی حیوان، انرژی مصرفی تکاپوی نیاز تولید بالا را نمی‌کند، لذا حیوان در این دوره با بالانس منفی انرژی مواجه است و راندامان استفاده از پروتئین جیره کاهش یافته و اوره دفع می‌شود. افزایش دفع اوره و بالانس منفی انرژی به طور مستقیم و غیر مستقیم با تأثیر بر روی رویدادهای تولید مثلی موجب غیرفعال شدن تخمدان‌ها و کوچک شدن اندازه فولیکول‌ها می‌گردد. همچنین مقادیر مازاد بر نیاز ^۱RDP و ^۲RUP جیره باعث کاهش باروری و افزایش غلظت ازت اوره‌ای پلاسما در گاوهای شیری می‌شود. گاوهای شیری که در بالانس منفی انرژی هستند نسبت به گاوهای غیر شیرده تحمل کمتری به افزایش غلظت اوره و آمونیاک داشته و اثرات منفی

افزایش غلظت اوره و آمونیاک بر باروری این گاوها بیشتر دیده می‌شود (۱، ۶، ۷ و ۸).

در منابع مختلف غلظت گلوکز را مهم‌ترین و مؤثرترین فاکتور بر فراوانی نبض‌های LH بیان کرده‌اند ولی متابولیت‌های خون نظیر فسفر، پروتئین خام، نیتروژن اوره‌ای و همچنین امتیاز وضعیت بدنی نیز می‌توانند از شاخص‌های مهم بر اختلالات تخمدانی و عدم رشد فولیکول‌ها بعد از زایمان گاو شیری باشند (۱ و ۱۰).

بسیاری از محققین در تحقیقات خود کاهش و یا افزایش پروتئین جیره را نیز علت عدم رشد فولیکول‌ها می‌دانستند ولی اکثر آنها بر این باورند که کمبود انرژی اثر بیشتری نسبت به کمبود پروتئین روی تولید مثل و باروری دارد (۵، ۹ و ۱۰).

هدف از این تحقیق بررسی عوامل مؤثر بر ایجاد فولیکول مقاوم بعد از زایمان در گاوهای شیری و ارائه راهکارهای مفید جهت کاهش این عارضه و در نتیجه کاهش فاصله گوساله‌زایی است.

مواد و روش‌ها

محل انجام آزمایش

این تحقیق در یکی از گله‌های بزرگ گاو شیری در اطراف تبریز اجرا گردید. این گاوداری دارای ۱۵۰۰ رأس دام بوده که به طور متوسط روزانه ۷۰۰ رأس گاو دوشیده می‌شود و میانگین شیر تولیدی روزانه ۳۴ کیلوگرم می‌باشد و در آن گاوها به صورت جیره کاملاً مخلوط با مقدار مشخص کنسانتره، سیلاژ ذرت و یونجه تغذیه می‌شدند. کل حیوانات مورد بررسی ۱۱۷ رأس بودند که در دو گروه شاهد یا سالم (۷۸ رأس) و بیمار (۳۹ رأس) قرار داشتند. بعد از تشخیص گاوهای درگیر با فولیکول مقاوم از طریق توشه رکتال در ۶۰-۵۰ روز پس از زایمان ۵ میلی‌لیتر نمونه خونی داخل وریدی از گاوها گرفته شده و سریعاً نمونه‌ها همراه یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند و سرم آنها توسط سانتریفوژ ۱۵۰۰ دور در ۱۵ دقیقه جدا شدند و تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای خونی در درجه حرارت ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مشخصات گاوهای تحت

^۱ Rumen degradable protein

^۲ Rumen undegradable protein

نامتعادل بودن داده‌ها تجزیه و تحلیل با کمک رویه GLM نرم افزار SAS انجام گرفت.

$$Y_{ijklm} = \mu + C_i + S_j + P_k + M_l + (S \times M)_{jl} + e_{ijklm}$$

که در آن:

$$Y_{ijklm} = \text{هر مشاهده}$$

$$l = \text{میانگین کل}$$

$$C_i = \text{اثر وضعیت دام (i=1, 2)}$$

$$S_j = \text{اثر فصل زایش (j=1, 2)}$$

$$P_k = \text{اثر شکم زایش (k=1, 2, 3, 4)}$$

$$M_l = \text{اثر میزان تولید شیر در ۶۰-۵۰ روز پس از زایش (l=1, 2, 3, 4)}$$

$$(S \times M)_{jl} = \text{اثر متقابل فصل زایش و میزان تولید شیر}$$

$$e_{ijklm} = \text{اشتباه یا اثرات باقیمانده}$$

تجزیه عوامل مؤثر بر روی وضعیت دام

وضعیت دام (سالم یا بیمار) صفتی باینری^۱ (دو حالتی) است که برای تجزیه و تحلیل آن از رگرسیون لجستیک استفاده شد (۳). رگرسیون لجستیک رابطه بین یک متغیر وابسته رسته‌ای و تعدادی از متغیرهای مستقل را توصیف می‌نماید. یک متغیر رسته‌ای می‌تواند به شکل باینری، رتبه‌ای یا اسمی باشد که هر کدام از آنان نیاز به روش‌های مختلفی جهت مدل‌سازی دارند. گاهی در مسائل رگرسیون متغیر وابسته دو حالت دارد، یعنی می‌تواند فقط دو مقدار را بپذیرد. در رگرسیون لجستیک از آنجایی که متغیر وابسته فقط دو حالت دارد، برآورد یک واحد تغییر آن مثل حالت رگرسیون خطی مفهوم چندانی نخواهد داشت. بنابراین رگرسیون لجستیک به منظور مدل‌سازی مقدار متغیر وابسته، از احتمالات نسبی^۲ استفاده می‌کند. در نتیجه رابطه هر کدام از متغیرهای مستقل با متغیر وابسته (لگاریتم احتمال نسبی) با شیب‌هایی (Slope) مشخص می‌شود. در پژوهش حاضر پیدا کردن رابطه بین وضعیت دام و پارامترهای

مطالعه از جمله سن فیزیولوژیک (شکم زایش) و متوسط تولید شیر در ۶۰-۵۰ روز پس از زایش و فصل گوساله زایی ثبت شدند. گاوها از نظر تولید روزانه در ۴ دسته کم تولید (کمتر از ۲۰ لیتر)، متوسط تولید (۲۰-۳۰ لیتر)، پر تولید (۴۰-۳۰ لیتر) و سوپر تولید (۴۰ لیتر و بالاتر) و همچنین از نظر شکم زایش در ۴ سطح قرار داشتند. پارامترهای خونی که در گاوهای سالم (با فولیکول گراف) و بیمار (با فولیکول مقاوم) اندازه‌گیری شدند شامل گلوکز، بتاهیدروکسی بوتیرات، اوره سرم خون (BUN)، فسفر، پروتئین تام و هورمون استروژن بودند. پارامترهای خونی توسط کیت شرکت زیست شیمی و اسپکتروفتومتر ژنوس ۲۰ (Geneus20) و استروژن سرم خون به روش (ELISA) و با استفاده از کیت شماره (EIA-۱۵۶۱) شرکت DRG آلمان به وسیله دستگاه الیزا ریدر اورنس (Avernes3200) آمریکا اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری میزان بتاهیدروکسی بوتیرات اسید (BHBA) سرم خون از روش اولتراویوله و دستگاه اسپکتروفتومتر و کیت شماره (RB-1007) شرکت راندوکس انگلستان استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی استفاده شد. اثرات عوامل محیطی شامل وضعیت دام، فصل گوساله‌زایی، سن فیزیولوژیک و میزان تولید شیر (در ۶۰-۵۰ روز پس از زایش) بر روی متابولیت‌های خونی (گلوکز، فسفر، پروتئین، اوره، بتا هیدروکسی بوتیرات)، هورمون استروژن و تأثیر آنها بر ایجاد فولیکول مقاوم بررسی گردید. میانگین تولید شیر روزانه در چهار گروه کدبندی شدند و ارقام کمتر از ۳۲، ۳۲ تا ۴۰، ۴۰ تا ۴۵ و بیشتر از ۴۵ لیتر به ترتیب کدهای ۱ تا ۴ گرفتند. در مدل اولیه کلیه عوامل اصلی و متقابل در نظر گرفته شد و سپس با توجه به غیرمعنی‌دار بودن اثرات متقابل، این اثرات به استثنای اثر متقابل فصل و تولید شیر حذف شدند. بر اساس مدل آماری نهایی زیر و با توجه به

¹ Binary

² Odds

خونی اندازه‌گیری شده مورد نظر بود. با استفاده از رویه Logistic نرم افزار SAS ابتدا کلیه عوامل مؤثر بر وضعیت دام در مدل لجستیک اعمال شدند، سپس با انتخاب به روش گام به گام (Stepwise) کلیه عوامل غیر معنی‌دار حذف شدند. وضعیت دام متغیر وابسته و متابولیت‌های اندازه‌گیری شده در خون، شکم زایش، تولید شیر و فصل به‌عنوان متغیرهای مستقل در مدل وارد شدند.

یافته‌ها، بحث و نتیجه‌گیری

اثر وضعیت دام بر متابولیت‌های اندازه‌گیری شده

بر اساس جدول شماره ۱ وضعیت دام (وجود داشتن یا عدم وجود فولیکول مقاوم) بر میزان غلظت اوره سرم خون، پروتئین تام، بتا هیدروکسی بوتیرات، فسفر و استرادیول خون اثر معنی‌داری ($p < 0.05$) داشت که معنی‌دار بودن اثر وضعیت دام بر میزان اوره سرم خون با نتایج Butler در سال ۱۹۹۸ (۱) همخوانی داشت و معنی‌دار شدن اثر وضعیت دام بر غلظت فسفر خون با نتایج Leroy و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۷) مغایر بود. همچنین معنی‌دار شدن اثر وضعیت دام بر میزان غلظت پروتئین تام سرم خون با نتایج برخی محققین (۱۱)

موافقت داشت. طبق جدول شماره ۳ مشاهده می‌شود گاوهای سالم دارای ازت اوره‌ای کمتری نسبت به گاوهای بیمار هستند. اوره یک منبع محلول برای تولید آمونیاک است که در تغذیه نشخوارکنندگان استفاده می‌شود ولی در صورت تغذیه گاوها با غذاهای حاوی پروتئین بالا و یا پائین بودن کربوهیدرات جیره، ممکن است مقدار اوره خون گاو افزایش یابد که این افزایش علاوه بر ایجاد استرس در دام سبب کاهش باروری می‌شود. پائین بودن میزان گلوکز در گاوهای دارای فولیکول مقاوم (جدول ۳) بیشتر به دلیل تعادل منفی انرژی بالا در این گاوها در هفته‌های اول بعد از زایمان و نیز کاهش مصرف خوراک است که منجر به غیر فعال شدن تخمدان‌ها می‌شود. کمبود انرژی همچنین با کاهش تولید استرادیول توسط فولیکول غالب باعث کاهش فرکانس ترشح LH و کاهش قطر فولیکول غالب و ایجاد فولیکول مقاوم می‌شود (۱۱ و ۱۳).

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس عوامل مؤثر بر غلظت برخی متابولیت‌های خون

استروژن	بتا هیدروکسی	پروتئین	اوره	فسفر	گلوکز	
**	ns	**	ns	ns	*	فصل زایش
**	**	**	*	*	ns	وضعیت دام
ns	ns	ns	ns	ns	ns	میزان تولید شیر
ns	ns	ns	ns	ns	ns	شکم زایش

** و * معنی‌داری به ترتیب در سطح احتمال یک و پنج درصد خطا، ns: غیر معنی‌دار

جدول ۲- اثر فصل زایش بر میانگین حداقل مربعات غلظت متابولیت‌های خون

فصل زایش	گلوکز	ازت اوره ای	استرادیول
گرم	۵۰/۸۶	۲۲/۳۶	۱۶/۹۹
سرد	۵۹/۳۵*	۱۶/۸۳*	۷۳/۷۹*

علامت * در هر ستون بیانگر وجود اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد خطا است.

جدول ۳- اثر بود و نبود فولیکول مقاوم بر غلظت متابولیت‌های خون

فولیکول	گلوکز mg/dl	فسفر mg/dl	پروتئین gr/dl	اوره mg/dl	بتاهدروکسی Mmol/lit	استرادیول pg/ml
سالم	۵۷/۵	۶/۵۹	۸/۸	۱۵/۹۷	۷/۲۵	۱۸/۹۷
بیمار	۵۳/۲۴*	۵/۲۳*	۷/۷۳*	۲۳/۲۳*	۴/۹۴*	۷۱/۸*

علامت * در هر ستون بیانگر وجود اختلاف حداقل در سطح احتمال ۵ درصد خطا است.

اثر فصل زایش بر متابولیت‌های اندازه‌گیری شده

فصل زایش بر میزان گلوکز خون، اوره سرم خون و استرادیول اثر معنی‌داری داشت (جدول ۱) و میزان گلوکز در گاوهای که در فصل گرم گوساله‌زائی داشتند کمتر از گاوهای بود که در فصل سرد گوساله‌زائی داشتند که این امر احتمالاً به دلیل افزایش استرس گرمائی و در نتیجه کاهش مصرف خوراک و اثر آن روی دینامیک تخمدانی می‌باشد. البته استرس گرمائی بیشتر با تأثیر بر سیستم آندوکرینی بدن دام باعث وقوع فرایندهای گلوکونئوز و گلیکوژنولیز شده و دام گلوکز بیشتری را برای مقابله با این استرس‌ها مصرف می‌کند و در نتیجه این فرایند باعث کمبود انرژی در بدن دام می‌شود که مشابه نتایج (۹ و ۱۲) بود. کمبود انرژی در بدن دام باعث کاهش بازدهی مصرف پروتئین و افزایش ازت اوره‌ای سرم خون می‌گردد (جدول ۲) که با نتایج Lopez و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۹) همخوانی داشت. در فصل گرما افزایش

کورتیزول در اثر استرس گرمائی از ترشح GnRH ممانعت می‌کند و به دنبال آن ترشح LH و استروژن کاهش می‌یابد. در گاوهای شیری بین ماده خشک مصرفی، میزان تولید شیر و بالانس منفی انرژی با استرس گرمائی رابطه متقابلی وجود دارد که در نتیجه آنها ترشح LH و قطر فولیکول‌های غالب در دوره پس از زایش کاهش می‌یابد که کاهش ماده خشک مصرفی در زمان استرس گرمائی باعث بالانس منفی انرژی، و کاهش میزان انرژی در بدن باعث می‌شود که لایه‌های گرانولوزای فولیکول‌ها توانائی تولید استرادیول به میزان کافی را نداشته باشند (۱۱) و (۱۲).

نتایج رگرسیون لجستیک برای عوامل مؤثر بر فولیکول مقاوم جدول شماره ۴ نتایج رگرسیون لجستیک را نشان می‌دهد که اثرات میزان غلظت اوره سرم خون و فسفر روی وضعیت دام (بیمار یا سالم) معنی‌دار و سایر اثرات معنی‌دار نبودند که از مدل اولیه حذف شدند. بر این اساس مدل لجستیک به صورت زیر اجرا گردید:

$$\text{Log [p/ (1-p)]} = -3.92 + 0.55*U - 1.06* Ph$$

که در آن، p = احتمال وضعیت دام (۱ = بیمار، صفر = سالم)، U = اوره و Ph = فسفر می‌باشد. این رابطه نشان می‌دهد با فرض ثابت بودن سایر متغیرها در مدل، اگر اوره ۱ واحد زیاد شود آنگاه احتمال تبدیل شدن وضعیت یک حیوان از سالم به بیمار ۰/۵۴۸ واحد افزایش می‌یابد. همچنین اگر فسفر ۱ واحد افزایش یابد احتمال تبدیل شدن وضعیت یک حیوان از سالم به بیمار ۱/۰۶ واحد کاهش می‌یابد به شرطی که سایر عوامل در مدل ثابت باشند. فسفر به خاطر نقشی که در بسیاری از واکنش‌های بدن خصوصاً متابولیسم انرژی دارد به عنوان مهم‌ترین عنصر خونی مؤثر بر باروری و عملکرد تولید مثلی دام است و با افزایش یک واحد BUN گاوها بیشتر مستعد ابتلا به سندرم فولیکول مقاوم می‌گردند. در دام‌های دارای فولیکول مقاوم میزان اوره بالاتر از دام‌های سالم است (جدول ۳) و از طرف دیگر با افزایش یک واحد BUN نسبت دام سالم به بیمار کاهش می‌یابد (جدول ۴) یعنی دام‌ها بیشتر مستعد ابتلا به سندرم فولیکول مقاوم می‌شوند. یک رابطه دو طرفه یا مکمل بین میزان غلظت اوره سرم خون و ایجاد فولیکول مقاوم وجود دارد که یکی می‌تواند دیگری را توجیه کند که هر دو این رابطه‌ها را می‌توان به بالانس منفی انرژی در دام‌های دارای فولیکول مقاوم نسبت داد. کمبود انرژی در این دام‌ها باعث کاهش راندمان استفاده از پروتئین جیره و افزایش دفع اوره می‌گردد. با افزایش یک واحد از اوره سرم خون مخصوصاً در اوائل زایمان میزان غلظت گلوکز خون شدیداً کاهش خواهد یافت که کمبود انرژی باعث کاهش ترشح

فراوانی نبض LH و کاهش تولید استرادیول و متعاقب آن کاهش قطر فولیکول غالب و ایجاد فولیکول ایستا می‌گردد. هرچند اثر میزان استرادیول خون در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار نشده است ولی سطح احتمال معنی‌داری ۰/۰۹ نشان می‌دهد که استرادیول نیز دارای اثر بر روی ایجاد فولیکول مقاوم می‌باشد و پیشنهاد می‌شود برای مطالعات آتی با تعداد نمونه‌های بیشتری مورد بررسی قرار گیرد.

جدول ۴- نتایج رگرسیون لجستیک برای عوامل مؤثر بر فولیکول مقاوم

P value	Chi-square	DF	منابع تغییرات
۰/۰۳	۴/۲۲	۱	فسفر
۰/۰۰۴	۷/۹۹	۱	اوره
۰/۰۹	۸/۵۶	۱	استرادیول

با توجه به این تحقیق استنباط می‌شود که یکی از علت‌های عدم رشد فولیکول در گاوهای شیری کمبود برخی از عناصر و متابولیت‌های خونی است. کمبود مواد مغذی در گاو شیری مهم تلقی شده و باید با مدیریت صحیح از پیشرفت و عوارض آن جلوگیری گردد. همچنین با کنترل جیره در زمان خشکی و زایمان می‌توان در طی اوائل شیردهی فعالیت تخمدان‌ها و بالطبع رشد فولیکول‌های نارس و در نتیجه راندمان تولید مثلی را افزایش داد.

1. Butler, W.R. 1998. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81(9): 2533-2539.
2. Butler, W.R. 2000. Nutrition interaction with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Rep. Sci.* 60-61: 449-457.
3. Dickman, P.W. 2003. Logistic in SAS Version 8.0. [Department of medical Epidemiology and Biostatistics] [Karolinska Institutent]; Available at:<http://www.pauldickman.com/teaching/sas/sas-logistic-seminar> 8. pdf.
4. Doepel, L., Lapierre, H. and Kennelly, J.J. 2002. Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. *J. Dairy Sci.* 85(9): 2315-2334.
5. Garcia-Bojalil, C.M., Staples, C.R., Thatcher, W.W. and Drost, M. 1994. Protein intake and development of ovarian follicles and embryos of super ovulated non lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77(9): 2537-2548.
6. Jorritsma, R., Wensing, T., Kruip, T.A.M., Vos, P.L.A.M. and Noordhuizen, J.P.T.M. 2003. Metabolic change in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet. Res.* 34: 11-26.
7. Leroy, J.L.M., Vanholder, T., Delanghe, J.R., Opsomer, G., Vansoon, A., Bols, P.E.J., Dewulf, J. and Dekurif, A. 2004. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high yielding dairy cows early postpartum. *Theriogenology.* 62(6): 1131-1143.
8. Lopez-Gatius, F., Santolavia, P., Yaniz, J., Rutlant, J. and Lopez-Bejar, M. 2001. Persistent ovarian follicles in dairy cows: a therapeutic approach. *Theriogenology.* 56(4): 649-659.
9. Lopes, A.S., Butler, S.T., Gilbert, R.O. and Butler, W.R. 2007. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Anim. Rep. Sci.* 99(1):34-43.
10. Lucy, M.C. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J. Dairy Sci.* 84(6): 1277-1293.
11. Rensis, F. and Scaramuzzi, R.J. 2003. Heat stress and seasonal effect on reproduction in dairy cow – a review. *Theriogenology.* 60(6): 1139-1151.
12. Savio, J.D., Boland, M.P., Hynes, N. and Roche, J.F. 1990. Resumption of follicular cows in the early postpartum period of dairy cows. *J. Reprod. Fertil.* 88(2): 569-579.
13. Shrestha, H.K., Nakao, T., Suzuki, T., Akita, M. and Hiqaki, T. 2005. Relationships between body condition score, body weight, and some nutritional parameters in plasma and resumption of ovarian cyclicity postpartum during pre- service period in high-producing dairy cows in a subtropical region in Japan. *Theriogenology.* 64(4): 855-866.