

## تأثیر مکمل بتائین و تزریق ویتامین B12 در دوره انتقال بر فراسنجه‌های سرم خون در گاوهای شیری

آرش آذر فر<sup>۱\*</sup>، فرشید فتاح نیا<sup>۲</sup> و رضا خدابخش<sup>۳</sup>

۱ و ۳. دانشیار و دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۰)

### چکیده

هدف از این تحقیق ارزیابی تأثیر مکمل بتائین و تزریق ویتامین B12 در دوره انتقال روی فراسنجه‌های سرم گاوهای شیری در دوره انتقال است. بدین منظور ۳۲ گاو هلشتاین چند بار زایش کرده (۲۱ روز پیش از زایش) انتخاب شدند و به یکی از چهار تیمار آزمایشی تخصیص داده شدند: تیمار شاهد یا CC (بدون تزریق ویتامین B12 و دریافت مکمل بتائین)، تیمار دوم یا CB (تزریق هفتگی ۱۰ سی‌سی ویتامین B12)، تیمار سوم یا BC (دریافت روزانه ۵۰ گرم مکمل بتائین) و تیمار چهارم یا BB (تزریق هفتگی ۱۰ سی‌سی ویتامین B12 و دریافت روزانه ۵۰ گرم مکمل بتائین). نمونه‌های خون در روزهای ۷ روز از زایش و همچنین ۲ و ۴۲ روز پس از زایش برای تعیین فراسنجه‌های خونی سرم گاوها و همچنین خون گوساله‌های تازه متولد شده گرفته شد. فراسنجه‌های سرم خونی گاوها تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند ( $P > 0.05$ )، به جز برای گلوکز که در تیمارهای بتائین و B12 + بتائین نسبت به دو تیمار دیگر به طور معنی‌داری بیشتر بود ( $P < 0.05$ ). در بین شاخص‌های آنزیمی، گاماگلوتامیل ترانسفراز در تیمار B12 + بتائین در مقایسه با تیمار دوم (B12) کاهش معنی‌دار داشت ( $P < 0.05$ ). فراسنجه‌های سرمی گوساله‌های تازه متولد شده از گاوهای دوره انتقال تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت. در نتیجه بتائین و ویتامین B12 تنها توانستند در بین فراسنجه‌های خونی گلوکز را افزایش دهند.

واژه‌های کلیدی: بتائین، دوره انتقال، فراسنجه‌های سرم، گاو شیری، ویتامین B12.

## Effects of betaine supplementation and B12 injection during the transition period on serum metabolite in dairy cows

Arash Azarfar<sup>1\*</sup>, Farshid Fattahnia and Reza Khodabakhshi<sup>3</sup>

1, 3. Associate Professor and Ph. D. Candidate, Faculty of Agriculture, University of Lorestan, Khorram-Abad, Iran

2. Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Ilam, Iran

(Received Dec. 24, 2017 – Accepted: Mar. 1, 2018)

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of betaine supplementation (B-SUP) and vitamin B12 injection (VI-B12) during the transition period on serum metabolites in dairy cows. Thirty-two over conditioned multiparous Holstein cows assigned into 1 of 4 diets containing: CB (VI-B12), BC (50 g/day B-SUP), BB (VI-B12+ 50 g/day B-SUP) and control (CC) from 21 d before parturition (dbp) to 21 d postparturition (dpp). Blood sample was collected at -7, 2 and 42 dpp to determine serum metabolites of dairy cow and neonatal calves. The serum metabolites were not affected by experimental treatments ( $P > 0.05$ ), except for glucose which was greater in BC and CB as compared to CC and CB treatments ( $P < 0.05$ ). Among enzymatic indexes, a significant decrease was just showed in BB treatment as compared to CB treatment for GGT enzyme ( $p < 0.05$ ). Also, serum metabolites in neonatal calves were not influenced by experimental treatments ( $P > 0.05$ ). In conclusion, B-SUP and VI-B12 improved just glucose amount without any change in other blood parameters. Anyway, more researches can be give suitable results to us, particular if the protected form of the betaine is used.

**Keywords:** Betaine, dairy cow, serum metabolites, transition period, vitamin B12.

\* Corresponding author E-mail: arash.azarfar@gmail.com

## مقدمه

گاوه‌های شیری به‌طورمعمول با یک دوره ۶ تا ۸ هفته موازنه (بالانس) منفی انرژی در بعد زایش هستند (Butler & Smith, 1989) که با بسیج ذخایر بدنی برای تأمین نیازهای انرژی همراه است که با افت امتیاز وضعیت بدنی، عملکرد نامطلوب و بیماری‌های سوخت‌وسازی (متابولیکی) همراه خواهد بود (Kim & Suh, 2003). لذا، یافتن راهکارهایی برای بهبود موازنه انرژی و به کمینه رساندن بسیج ذخیره چربی می‌تواند راه گشا باشد. نیازهای بالای انرژی برای تولید شیر و دستخوش موازنه منفی انرژی بودن دلیل اصلی مقاومت انسولین در گاوه‌های شیری پر تولید به‌ویژه گاوه‌های چاق چند بار زایش کرده است (Gummer, 1995).

بتائین یک دهنده متیل گروه آمونیوم و دوقطبی دارد. اضافه بر نقش در فعالیت اسمزی<sup>۱</sup> (Simon, 1999)، تثبیت عملکرد پاخته‌ای (Klasing et al., 2002)، کاهش اسهال و تنش گرمایی (Zhang et al., 2014)، کاهش تنش اکسایشی یا اکسیداتیو (Douglas et al., 2006)، می‌تواند در سوخت‌وساز (متابولیسم) متیونین از طریق دادن گروه متیل به سبب متیله کردن (متیلاسیون) هموسیستئین به متیونین نقش ایفا کند (Banskalieva et al., 2005). Fernandez et al. (1998) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، بتائین به شکل همکوشی با ویتامین B12 و اسیدفولیک می‌تواند در چرخه متیله کردن میکروبی‌های شکمبه شرکت کرده و با پیوند دادن چرخه متیله کردن به چرخه کربس از طریق آلفا کتوتیورات به تولید انرژی منجر شده و با آزادسازی و ساخت (سنتر) لیپوپروتئین با چگالی خیلی پایین یا VLDL در کبد توأم بوده و از روند افزایشی NEFA جلوگیری می‌کند (Fernandez et al., 1998). دو آنزیم متیونین سنتتاز و متیل مالونیل کوآ موتاز به‌طورجدی به غلظت سرمی ویتامین B12 وابسته است (Girard et al., 2005). نکته برجسته در انجام این آزمایش استفاده از گاوه‌های چند بار زایش کرده به چندین دلیل است: نخست اینکه گاوها در معرض کبد چرب و کتوز قرار دارند، دوم، ظرفیت

کبدی این گاوها برای جلوگیری از تجمع تری‌گلیسریدها برای ساخت VLDL محدود است، سوم اینکه مقاومت انسولین در این گاوها مشهودتر است (Davidson et al., 2008). به‌هرحال، تأثیر تغذیه بتائین و ویتامین B12 در گاوه‌های شیری چاق چند بار زایش کرده در فرایند دوره انتقال هرگز بررسی نشده است. بنابراین، هدف از این تحقیق بررسی تأثیر مکمل بتائین و ویتامین B12 روی فراسنجه‌های سرم خونی گاوه‌های شیری دوره انتقال و همچنین گوساله‌های تازه متولدشده از این گاوها است.

## مواد و روش‌ها

### دام‌ها و جیره‌ها

این آزمایش از اول خردادماه تا ۱۰ شهریور در گاوداری زاگرس واقع در ۱۰ کیلومتری شهرکرد وابسته به بنیاد مستضعفان انجام گرفت. در این آزمایش، ۳۲ راس گاو شیری هلشتاین چند بار زایش کرده با میانگین وزن  $803 \pm 68$  کیلوگرم، میانگین امتیاز وضعیت بدنی  $3/9$ ، میانگین تولید شیر  $42 \pm 6$  کیلوگرم (۲۱ تا ۶۰ روز پس از زایش) و میانگین شکم زایش چهار انتخاب و در چهار گروه هشت رأسی تقسیم شدند. تغذیه دام‌ها در آزمایش از ۲۱ روز مانده به زایش آغاز و تا ۲۸ روز پس از زایش ادامه داشت. تیمارهای آزمایشی شامل چهار گروه تیمار شاهد یا CC (بدون افزودنی)، تیمار دوم یا CB (افزودن ۵۰ گرم بتائین حفاظت نشده در هر روز به ازای هر راس دام)، تیمار سوم یا BC (تزریق ده روز یک‌بار ۱۰ سی‌سی ویتامین B12) و تیمار چهارم یا BB (افزودن ۵۰ گرم بتائین حفاظت نشده و تزریق ده روز یک‌بار ۱۰ سی‌سی ویتامین B12) بود. بتائین تجاری مورد استفاده در آزمایش مربوط یک شرکت چینی با درجه خلوص ۹۷ درصد است (anhydrous betaine with 0.97 purity; Shanxi Xinliyuan Biotechnology Co. Ltd, Taiyuan, China). همچنین ویتامین B12 تزریقی به‌صورت کوبافوس شامل ۱۲۵ میلی‌گرم آلفا اکسی بنزیل فیسفینکوم به‌عنوان منبع فسفر و ۰/۵ میلی‌گرم ویتامین B12 استفاده شد. جیره‌های آزمایشی به‌صورت جیره به‌کلی مخلوط در اختیار دام‌ها قرار گرفت و مکمل بتائین به‌صورت سرک به جیره‌ها اضافه شد. در دوره پیش از

1. Osmolality

فرابنفش و مبتنی بر تبدیل واکنش آنزیمی دی ۳- هیدروکسی بوتیرات انجام گرفت. میزان NEFA مبتنی بر واکنشگرهای متانول- کلروفورم- هپتان- تیزولیلازو ۲- نافول و کمک دستگاه طیفسنج نوری انجام گرفت. کلاسترول و تری گلیسرید مبتنی بر شاخص رنگی Quinonemine و همچنین جذب نوری با طیفسنج نوری تعیین شد. پایه روش اندازه گیری MDA<sup>۴</sup> سرمی بر پایه واکنش با تیوباربیتوریک اسید (TBA)<sup>۵</sup>، استخراج با بوتانل نرمال، اندازه گیری جذب با روش طیفسنج نوری و مقایسه جذب با منحنی استاندارد است. همچنین، آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارات آمینو ترانسفراز و گاما گلوتامیل ترانسفراز نیز با روش (RAL, Madrid, Spain, Clima plus Analyzer) اندازه گیری شد. در این آزمایش برای گوساله های تازه متولد شده، فراسنجه های خونی مانند گلوکز، پروتئین، آلبومین، اوره و تری گلیسرید نیز با استفاده از دستگاه طیفسنج نوری تجزیه گر خودکار (RAL, Madrid, Spain, Clima Plus Analyzer) و همچنین کیت های آزمایشی راندوکس و پارس آزمون اندازه گیری شد.

### نتایج و بحث

در این آزمایش (شکل ۱)، سطوح بالاتر گلوکز برای گروه های BC (دریافت کننده مکمل بتائین) و BB (مصرف کننده مکمل بتائین و تزریق شده با ویتامین B12) نسبت به دو تیمار دیگر مشاهده شد ( $P < 0.05$ ) که با نتایج به دست آمده Hall et al. (2014) همخوانی داشت. در نقطه مقابل نتایج تحقیق کنونی، Zhang et al. (2014) تأثیر چهار سطح ۰، ۱۰، ۱۵ و ۲۵ گرم مکمل بتائین را روی فراسنجه های خون بررسی کردند و هیچ تغییر معنی داری را روی مقدار گلوکز مشاهده نکردند. روابط همکوشی میان بتائین، اسید فولیک و ویتامین B12، که پیوند دهنده چرخه کربس به چرخه متیله کردن از طریق آلفا-کتوبوتیرات است، برای تأمین گلوکز در شرایط بحرانی ضروری است (Hall et al., 2016). در این بررسی همچنین، اثر متقابل تیمار و دوره برای غلظت گلوکز خون معنی دار بود ( $P < 0.05$ ).

زایش، جیره ها (جدول ۱) به صورت دو وعده و در پس از زایش به صورت سه وعده در روز در حد اشتها در اختیار دامها قرار گرفت.

نمونه های خون یک هفته پیش از زایش، دو روز پس از زایش و چهار هفته پس از زایش گرفته شد. خون گیری سه ساعت و نیم پس از خوراک دهی صبح از سیاهرگ دمی گرفته شد. بدین صورت که در حدود ۱۴ میلی لیتر خون گرفته شده و درون دو سری لوله (یکی حاوی EDTA<sup>۱</sup> و دیگری حاوی اگزالات پتاسیم و فلورید سدیم به عنوان مهار کننده گلیکولایتیک) ریخته شده و توسط لوله های ونوجکت حاوی تسریع کننده تشکیل لخته و ژل جدا کننده سرم ریخته شد. لوله های ونوجکت به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و نمونه های سرم و پلاسما تا زمان تجزیه در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای حذف تأثیر تنش زای تزریق، گروه هایی که با ویتامین B12 تزریق نشدند، با سرم فیزیولوژیک تزریق شدند. در این آزمایش، سرم خون برای فراسنجه های گلوکز، پروتئین، کلاسترول، آلبومین، لیپوپروتئین ها، مالون آلدهید، نیتروژن اوره ای خون، تری گلیسرید، بتاهیدروکسی بوتیرات، اسیدهای چرب غیراستریفه (NEFA) و آنزیم های گاما گلوتامیل ترانسفراز، AST<sup>۲</sup> و ALT<sup>۳</sup> به کار گرفته شد. فراسنجه های خونی با استفاده از کیت های آزمایشگاهی راندوکس و پارس آزمون و به کار گیری دستگاه طیفسنج نوری (اسپکتروفتومتر) تجزیه گر خودکار یا اتوآنالیز (RAL, Madrid, Spain, Clima Plus Analyzer) اندازه گیری شد. میزان گلوکز با روش نورسنجی (فتومتریک) با شاخص آنزیمی گلوکز اکسیداز و میزان پروتئین نیز با روش نورسنجی و شاخص بیورت صورت گرفت. اندازه گیری اوره با استفاده از روش نورسنجی و کمک اشعه فرابنفش انجام گرفت. میزان آلبومین با استفاده از روش نورسنجی و معرف برموکروزول گرین و میزان بتاهیدروکسی بوتیرات تحت روش آزمایشی اشعه

1. EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid  
2. AST: Asparate amino transferase  
3. ALT: Alanine amino transferase

4. Malonedialdehyde  
5. Thiobarbitic Acid

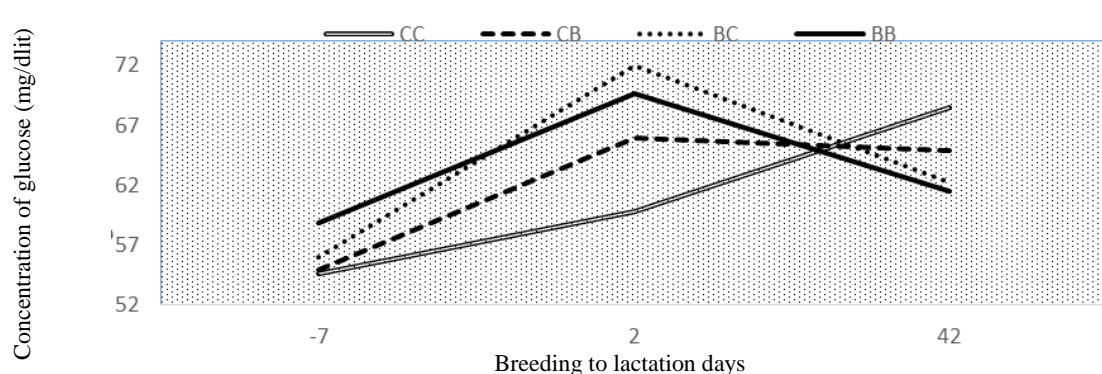
جدول ۱. اجزاء و ترکیب شیمیایی خوراک جیره‌های آزمایشی

Table 1. Ingredients and chemical composition of experimental diets

Ingredient (%DM)	Close up	fresh
Corn silage	41.6	25.34
Alfalfa hay	16	14.27
Wheat straw	2.7	1.84
Beet pulp	2.22	4.05
Corn grain	13.07	11.09
Barley grain	10.46	19.53
Cottonseed whole	1.093	0.66
Cottonseed meal	0.53	1.61
Canola meal	----	5.87
Soybean meal	5.29	9.05
Soybean-whole roast	1.622	0.98
Fish meal	1.09	1.66
Calcium chloride	0.35	----
Magnesium sulphate	0.46	----
limestone	0.59	0.59
Phosphate dicalcium	----	0.28
Magnesium oxide	----	0.21
Fat crystallite	----	0.71
Salt white	----	0.43
Sodium bicarbonate	----	0.85
Mineral and vitamin premix <sup>1</sup>	2.925	1.00
Yeast composition <sup>2</sup>	----	0.04
Chemical composition (% DM)		
OM	68.41	77.12
CP	13.52	16.73
Ether extract	3.15	3.65
NDF	36.6	33.9
ADF	21.5	20.4
NFC <sup>3</sup>	37.7	37.1
Ash	6.42	9.35
NE <sub>i</sub> <sup>4</sup> (Mcal/kg)	1.50	1.63
Ca (%DM)	0.89	0.81
P (%DM)	0.32	0.44

۱. هر کیلوگرم مکمل مواد ویتامینه- کانی دارای ۱۸۰ گرم کلسیم، ۷۰ گرم فسفر، ۳۵ گرم پتاسیم، ۵۰ گرم سدیم، ۵۸ گرم کرب، ۳۰ گرم منیزیم، ۳۲ گرم سولفور، ۵ گرم منگنز، ۴ گرم آهن، ۳ گرم روی، ۳۰۰ میلی‌گرم مس، ۱۰۰ میلی‌گرم ید، ۱۰۰ میلی‌گرم کبالت، ۲۰ میلی‌گرم سلنیوم، ۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۱۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E و ۳ گرم پاداکسند بود. ۲- مخمر مربوطه Beta Agriculture Yüreğir/Adana بود. ۳- بتائین (anhydrous betaine with 0.97 purity; Shanxi Xinliyuan Biotechnology Co. Ltd, Taiyuan, China) مربوط به یک شرکت چینی است. ویتامین B12 به صورت کوبافوس شامل ۱۲۵ میلی‌گرم آلفا اکسی بنزیل فیسفینکوم به عنوان منبع فسفر و ۰/۵ میلی‌گرم ویتامین B12 استفاده شد

1. Each kg (DM basis) of mineral and vitamin premix contained 180 g of Ca; 70 g of P; 35 g of K; 50 g of Na; 58 g of Cl; 30 g of Mg; 32 g of S; 5 g of Mn; 4 g of Fe; 3 g of Zn; 300 mg of Cu; 100 mg of I; 100 mg of Co; 20 mg of Se; 500,000 IU of vitamin A; 100,000 IU of vitamin D<sub>3</sub>; 100 IU of vitamin E; and 3 g of antioxidant., <sup>2</sup>yeast: Beta Agriculture, Yüreğir/Adana, <sup>3</sup>Non-fiber carbohydrates (NFC) = 100 - (CP + NDF + EE + ash), <sup>4</sup>Net energy for lactation (NE<sub>l</sub>) was calculated respectively in close up and fresh according to NRC (2001). Betaine (anhydrous betaine with 0.97 purity; Shanxi Xinliyuan Biotechnology Co. Ltd, Taiyuan, China). B12 as (Phosphor + b12, Each ml contain 125 mg  $\alpha$ -oxy benzyl physphinicum as P source and 0.5 mg vitamin B12)



شکل ۱. غلظت گلوکز خون در گاوهای تزریق شده با ویتامین B12 یا مکمل سازی شده با مکمل بتائین از ۷ روز از زایش تا ۴۲ روز پس از زایش (CC گروه شاهد، CB گروه تزریق شده با ویتامین B12، BC گروه دریافت کننده بتائین و BB گروه مصرف کننده بتائین و تزریق شده با ویتامین B12)

Figure 1. Serum concentration of glucose in dairy cows either injected with vitamin B12 or supplemented with betaine from day 7 prepartum until day 42 postpartum (CC, control group; CB, vitamin B12 injected group; BC, betaine supplemented group; BB, vitamin B12 and betaine supplemented group)

بین بتائین و گلیسرول روی فراسنجه‌های خونی انجام دادند که تأثیر معنی‌دار بتائین را روی میزان کورتیزول، گلوکز خون، لاکتات، آلبومین، پروتئین توتال و اوره پلاسما مشاهده نکردند، ولی کاهش در میزان هماتوکریت خون مشاهده شد. بتائین در یاخته‌ها توسط حامل متصل به سدیم انباشته می‌شود. در فرایند التهاب‌های یاخته‌ای رهاسازی بتائین به سرعت رخ داده که می‌تواند نیتروژن اوره‌ای خون را کاهش داده و باعث بهبود ابقاء نیتروژن کل پلاسما شود که این روند برای سامانه ایمنی بدن ضروری است. مکمل بتائین می‌تواند به‌طور معنی‌داری فعالیت استیل کوآ کربوکسیلاز و فتی اسیل سنتتاز را کاهش داده و بیان ژنی mRNA را در زمینه آن کاهش می‌دهد. بتائین می‌تواند رشد ریزجانداران (میکروارگانسیم‌های) سودمند را در شرایط تنش‌زا مانند تغییرپذیری‌های pH بهبود بخشد. برخی محققان در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، استفاده توأم اسیدفولیک و ویتامین B12 توانست آلانین و گلوکز پلاسما را افزایش و نیتروژن اوره‌ای خون را در گاوهای شیری کاهش دهد (Girard & Matte, 2005). به‌رغم ساخت ویتامین B12 توسط میکروب‌های شکمبه، در شرایط تنش‌زای حوالی زایش، تخصیص مکمل B12 به جیره دام‌ها یا تزریق عضلانی ویتامین B12 ضروری است (Girard & Matte, 1999).

برابر با جدول ۲، نتایج آزمایش گویای بدون تأثیرپذیری تری گلیسرید، کلسترول، HDL، LDL و VLDL از تیمارهای آزمایشی مربوطه بود ( $P > 0.05$ ) که با نتایج Davidson *et al.* (2008) همخوانی داشت. با نزدیک شدن به زایش، روند کاهشی در غلظت‌های تری گلیسرید، VLDL و روند افزایشی در غلظت کلسترول، HDL و LDL مشهود بود ( $P < 0.05$ ). دو استدلال کلی برای تجمع تری گلیسریدها در کبد گاوهای چاق شامل مقاومت برگشت‌ناپذیر انسولین و روند تشدید بیماری (تنش اکسایشی، آزاد شدن سیتوکین‌های التهابی، تنش اندوپلاسمیک، التهاب کبدی و مرگ) در این گروه از دام‌ها است (Walsh *et al.*, 2007). بررسی‌های پیشین انجام‌شده روی بزها

بنابر جدول ۲، تفاوت معنی‌داری در مقادیر پروتئین، آلبومین و نیتروژن اوره‌ای سرم تحت تأثیر تیمارها مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). در موازنه منفی انرژی نزدیک به زایش، به‌طورمعمول بدن به تجزیه بافت خود برای تأمین اسیدهای آمینه برای روند گلوکونئوز و اادار می‌شود. با نزدیک شدن به زایمان، مقدار پروتئین به‌طور معنی‌داری کاهش و پس از آن افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). اضافه شدن بتائین به جیره می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین متیونین را به‌جای مشارکت در سوخت‌وساز انرژی به سمت ساخت پروتئین هدایت کند، زیرا متیونین برای ایفای نقش سوخت‌وسازی خود بایستی به شکل فعال خود (S-آدنوزیل متیونین) تبدیل شود که تحمیل‌کننده انرژی (مصرف ATP) به دام در شرایط بحرانی است (Davidson *et al.*, 2008). در گاوهای شیری در طی دوره انتقال، سطوح پلاسمایی آلبومین به‌طور ویژه در طی هفته اول پس از زایش کاهش می‌یابد. به‌طورکلی آلبومین به‌عنوان پروتئین فاز حاد در نظر قرار می‌گیرد که در فرایند التهاب ساختارمند (سیستماتیک) غلظت خونی آن کاهش می‌یابد (Carlson *et al.*, 2007).

کاهش غلظت آلبومین در طی دوره انتقال، می‌تواند با تشدید بسیج چربی و افزایش نسبت NEFA به آلبومین در پلاسما توأم باشد. افزایش نسبت NEFA به آلبومین همچنین می‌تواند روی ویژگی‌های پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) آلبومین (متصل به عنصر مس) تأثیر بگذارد. افزایش اتصال اسیدهای چرب به آلبومین می‌تواند موجب تغییر شکل ساختار پروتئین‌ها و تغییر در ظرفیت پاداکسندگی عنصر مس متصل به آلبومین در فرآیند مهمی مانند پراکسیداسیون یاخته‌ای شود (Gryzunov *et al.*, 2003). بتائین می‌تواند به فعالیت فاگوسیتوزی درشت بیگانه‌خوار (ماکروفاژ)ها از طریق ثبات فشار اسمزی کمک کند، زیرا این تغییرات در فشار اسمزی می‌تواند روی بیان ژنی سیتوکین‌های پیش التهابی مانند TNF- $\alpha$  و همچنین آنزیم پیش التهابی COX-2 یا سیکلواکسیژناز ۲ تأثیر بگذارد (Eklund *et al.*, 2005).

در تحقیقی، Pinotti *et al.* (2002) مقایسه‌ای را

غلظت سرمی NEFA افزایش و غلظت سرمی BHBA به طور معنی داری کاهش یافت ( $P < 0.05$ )، اما تحت تأثیر افزودن مکمل بتائین جیره‌ای یا تزریق عضلانی ویتامین B12 قرار نگرفتند ( $P < 0.05$ )، که با نتایج Davidson *et al.* (2008) همخوانی داشت.

در اصل گاو مبتلا به کتوز به گاو ایمنی می‌شود که میزان BHBA بالاتر از ۱/۴ مول بر لیتر داشته باشد (Duffield, 2000). همچنین نوع بتائین استفاده شده نیز محافظت نشده بود که در نتیجه اثرگذاری پایین‌تری داشته است.

نشان داده است، افزودن بتائین اندوژنوس می‌تواند سطوح تری‌گلیسریدها را در خون کاهش دهد (Fernandez *et al.*, 2009). رویه تغییرپذیری‌های فراسنج‌های خونی به‌ویژه بتا‌هیدروکسی بوتیرات، NEFA و مالون آلدئید به‌خوبی می‌تواند روند تغییرپذیری‌های سوخت‌وساز اسیدهای چرب، تنش‌های اکسایشی و همچنین پراکسیداسیون اسیدهای چرب را مشخص کند. با نزدیک شدن به زایش، غلظت‌های سرمی NEFA و BHBA به طور معنی داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). در پس از زایش

جدول ۲. تأثیر تیمارهای آزمایشی روی رخ‌نمای خونی گاوهای هلشتاین در دوره انتقال

Table 2. Effects of experimental treatment on blood serum parameters of Holstein cow in transition period

Serum variable	Diets				SEM	p-value		
	CC	CB	BC	BB		Diet	Time	Diet × Time
Glucose (mg/dl)	60.98 <sup>b</sup>	61.93 <sup>b</sup>	64.42 <sup>a</sup>	63.3 <sup>a</sup>	0.88	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Protein (g/dl)	6.69	6.79	6.84	6.98	0.141	0.54	< 0.01	6.98
Albumin (g/dl)	3.02	3.15	3.17	3.19	0.071	0.38	0.0006	0.54
BUN <sup>1</sup> (mg/dl)	24.04	22.62	22.37	22.75	1.002	0.06	< 0.01	0.31
TG <sup>2</sup> (mg/dl)	16.46	15.96	16.71	16.01	0.81	0.89	< 0.01	0.68
Cholesterol (mg/dl)	133.96	130.7	145.58	124.58	6.9	0.20	< 0.01	0.26
HDL (mg/dl)	43.31	46.58	53.46	48.54	2.68	0.08	< 0.01	0.25
LDL (mg/dl)	87.31	80.93	88.78	72.84	6.19	0.27	< 0.01	0.04
VLDL (mg/dl)	3.33	3.19	3.34	3.19	0.166	0.87	< 0.01	0.66
NEFA (mmol/l)	0.70	0.78	0.531	0.58	0.101	0.31	< 0.01	< 0.01
BHBA (mmol/l)	0.60	0.71	0.43	0.39	0.09	0.06	< 0.01	0.26
MAO <sup>3</sup> (nM)	1.79	1.87	1.68	1.62	0.109	0.29	0.04	0.19
ALT <sup>4</sup> (U/L)	25.99	25.67	24.37	24.11	0.61	0.09	< 0.01	0.05
AST <sup>5</sup> (U/L)	79.87	80.89	82.91	80.41	2.26	0.79	< 0.01	0.13
GGT <sup>6</sup> (U/L)	26.54 <sup>ab</sup>	28.44 <sup>a</sup>	26.80 <sup>ab</sup>	25.29 <sup>b</sup>	0.25	0.04	< 0.01	0.13

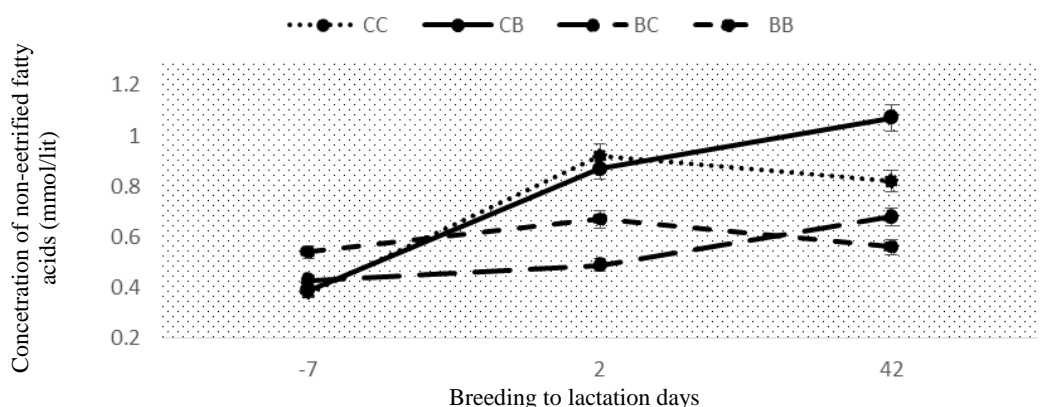
استفاده از مکمل بتائین و بدون تزریق عضلانی گاوها با ویتامین B12، جیره‌ای با تزریق هفتگی گاوها با ۱۰ میلی‌گرم ویتامین B12 به صورت عضلانی جیره‌ای تنها شامل ۵۰ گرم مکمل بتائین، جیره‌ای شامل ۵۰ گرم مکمل بتائین و توأم با تزریق عضلانی گاوها با ویتامین B12، سطح معنی داری.

\* در هر ردیف میانگین حداقل مربعاتی که با حرف‌های غیر همسان نشان داد شده‌اند اختلاف معنی داری دارند ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Diets CC: diet without betaine supplement and B12 injection; CB: diet containing 10 cc weekly injection of B12; BC: diet containing 50 g betaine top-dressed; BB: diet containing 50 g betaine top-dressed and 10 cc weekly injection of B12.

\* Different superscripts a, b in the same row indicate significant difference ( $p < 0.05$  or less according to treatments).

1-Blood urine nitrogen, 2-triglyceride, 3-Malone aldehyde oxidase 4-Alanine amino transferase 5-Asparate amino transferase 6-Gama glutamine transferase



شکل ۲. غلظت اسیدهای چرب غیر استریفه در گاوهای تزریق شده با ویتامین B12 یا مکمل سازی شده با مکمل بتائین از ۲۱ روز پیش از زایش تا ۴۲ روز پس از زایش (CC گروه شاهد، CB گروه تزریق شده با ویتامین B12، BC گروه دریافت کننده بتائین و BB گروه مصرف کننده بتائین و تزریق شده با ویتامین B12)

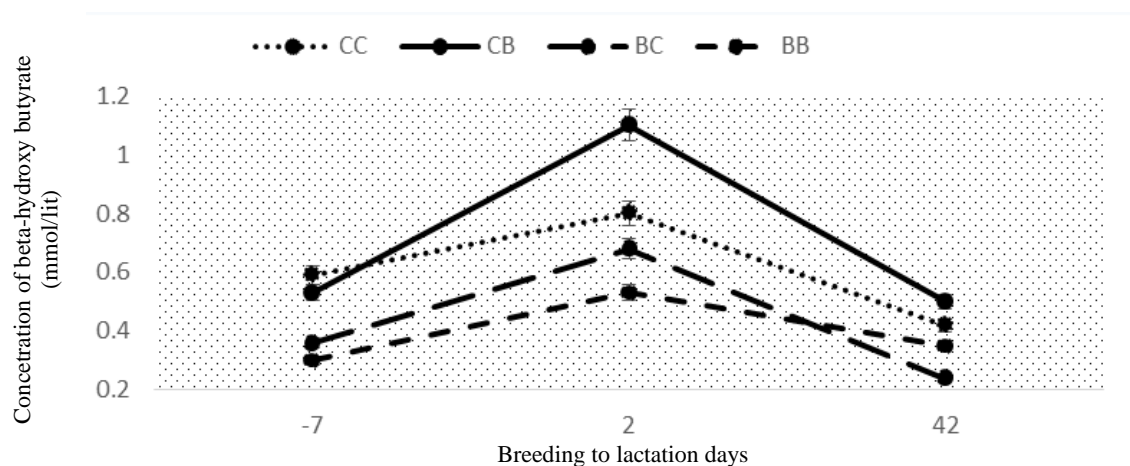
Figure 2. Serum concentration of non-esterified fatty acids in dairy cows either injected with vitamin B12 or supplemented with betaine from day -21 prepartum until day 42 postpartum (CC, control group; CB, vitamin B12 injected group; BC, betaine supplemented group; BB, vitamin B12 and betaine supplemented group)

قابلیت دسترسی به اسیدهای چرب غیر استریفه و مقاومت انسولین، ج) کاهش سطح گلوکز خون تحت تأثیر NEFA در گاوهای چاق، خ) تبدیل اسفنگوزینها به سرآمیدها، افزایش سطوح NEFA خون و افزایش التهابهای یاخته‌ای با نزدیک شدن به زایش، د) بیشتر بودن اسفنگوزین در گاوهای لاغر و سرآمیدها در گاوهای چاق، ر) پشتیبانی اسیدهای چرب آزاد و NEFA خون برای ساخت دنوو سرآمیدها، ز) ارتباط بینابینی بین بیومارکرها، میزان سرآمیدها و مقاومت انسولین، ژ) نقش اسیدهای چرب آزاد در ارسال سیگنال‌های التهابی حوالی زایش و در نهایت، ف) تأثیر منفی سطوح بالای انسولین خون به دنبال تزریق روی توسعه فولیکول‌های تخمدانی (توأم با مرگ یاخته‌ای و کاهش نرخ آبستنی) (Rico *et al.*, 2015).

در آزمایشی بدون تأثیر معنی‌دار کولین حفاظت‌شده شکمبه‌ای را روی NEFA پلاسما در طی دوره انتقال مشاهده کردند (Zom *et al.*, 2011)، درحالی‌که در آزمایش دیگر غلظت پایین‌تر NEFA را در زمان زایش برای گاوهای مصرف‌کننده کولین مشاهده کردند (Pinotti *et al.*, 2003). برخی محققان در نتایج بررسی‌های خود دریافتند، بین NEFA و BHBA با وضعیت پاداکسندگی سرم همبستگی مثبتی وجود دارد.

در اصل گاوهای چند بار زایش کرده غلظت‌های سرمی بالاتری از NEFA و BHBA نسبت به گاوهای زایش اول دارند (Davidson *et al.*, 2008). لذا، گاوهای خیلی چاق بیشتر مستعد کتوز و کبد چرب هستند، همچنین مقاومت انسولین در این گاوها بیشتر بوده و ظرفیت کبدی این گاوها برای بسته‌بندی تری گلیسریدها به شکل VLDL به دلیل محدودیت ساخت کبدی آپولیپوپروتئین یا فسفولیپیدها بیشتر با مشکل روبه‌رو است. تغییرپذیری‌های سطوح آنزیمی ALT، AST و GGT همچنین می‌تواند شاخص مناسبی برای بررسی تضعیف سامانه ایمنی گاوهای شیری باشد. افزایش سطح BHBA خون با افزایش دمای بدن و التهاب‌های گوارشی توأم بوده که این نیز به‌نوبه خود می‌تواند روی مصرف خوراک و آسایش دام متأثر از تنش نزدیک به زایش تأثیر بگذارد (Siavoshian *et al.*, 2000).

در اصل روابط بین مقاومت انسولین شدیدتر با امتیاز وضعیت بدنی بالاتر در گاوهای چاق می‌تواند به چندین دلیل بروز کند الف) پایین‌تر بودن اشتهای گاوهای خیلی چاق، ب) سطوح بالاتر سرآمیدها با نزدیک شدن به زایش در پاسخ همورال به تغییر وضعیت فیزیولوژیک دام‌ها، پ) همبستگی مثبت و منفی تجمع سرآمیدهای پلاسما خون به ترتیب با



شکل ۳. غلظت بتاهدروکسی بوتیرات در گاوهای تزریق‌شده با ویتامین B12 یا مکمل‌سازی‌شده با مکمل بتائین از ۲۱ روز پیش از زایش تا ۴۲ روز پس از زایش (CC گروه شاهد، CB گروه تزریق‌شده با ویتامین B12، BC گروه دریافت‌کننده بتائین و BB گروه مصرف‌کننده بتائین و تزریق‌شده با ویتامین B12)

Figure 3. Serum concentration of beta-hydroxy butyrate in dairy cows either injected with vitamin B12 or supplemented with betaine from day -21 prepartum until day 42 postpartum (CC, control group; CB, vitamin B12 injected group; BC, betaine supplemented group; BB, vitamin B12 and betaine supplemented group)

افزایش و در پی آن در پس از زایش روندی کاهشی را دنبال کرد ( $P > 0.05$ ). به دنبال استفاده از مکمل بتائین و تزریق ویتامین B12 (تیمار چهارم)، کاهش فراوانی در میزان آنزیم گاماگلوتامیل ترانسفراز یا GGT در تیمار چهارم در مقایسه با تیمار دوم مشاهده شد ( $P > 0.05$ )، اما این تیمار هیچ تأثیر معنی‌داری روی سطوح آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارات آمینو ترانسفراز (AST) نداشت ( $P > 0.05$ ) (جدول ۲). با نزدیک شدن به زایش، کاهش معنی‌داری در سطوح آنزیمی آلانین آمینو ترانسفراز مشاهده شد، اما سطوح آنزیمی آسپارات آمینوترانسفراز و گاما گلوتامیل ترانسفراز به‌طور معنی‌داری روند افزایشی داشتند ( $P < 0.05$ ). نتایج آزمایش Wang *et al.* (2014) گویای افزایش شاخص پاداکسندگی مالون آلدئید در فرایند استفاده از بتائین در جیره آزمایشی بود، اما در تحقیق کنونی تغییر نداشت.

نتایج مربوط به تأثیر تغذیه گاوهای دوره انتقال با مکمل بتائین و ویتامین B12 بر فراسنجه‌های خونی، وزن تولد و قد سه‌روزگی (ناحیه جدوگاه دام) گوساله‌های تازه متولدشده در جدول ۳ آورده شده است. نتایج این تحقیق نشان داد، تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری روی فراسنجه‌های خون (گلوکز، پروتئین، نیتروژن اوره‌ای خون، آلبومین و تری گلیسرید) و رشد (وزن تولد و ارتفاع جدوگاه سه‌روزگی) در گوساله‌های متولدشده از گاوهای دوره انتقال نداشت ( $P > 0.05$ ).

نشان داده شده است که بتائین ممکن است آسیب ناشی از کم‌خونی‌های شدید را با جلوگیری از فعال‌سازی یاخته‌های کاپفر کاهش دهد (Barak *et al.*, 1996). همچنین مشخص شده که مصرف بتائین می‌تواند از افزایش عامل بافت‌مردگی غده یا نکروز تومور (TNF $\alpha$ ) و آسیب کبدی ایجادشده توسط لیپولی ساکاریدها (اندوتوکسین) جلوگیری کند که می‌تواند گویای نقش حفاظتی بتائین از کبد با جلوگیری از فعال‌سازی یاخته‌های کاپفر باشد. این نقش را می‌توان به فعالیت اسمزی بتائین نسبت داد، که با توجه به حساسیت یاخته‌های کاپفر به افزایش حجم از آن‌ها در برابر فشار اکسایشی حفاظت می‌کند (Kim & Young, 2002).

در فرایند بسیج چربی‌ها و افزایش سطح NEFA خون، سطوح اسیدهای چرب اشباع مانند پالمیتات و استئارات افزایش یافته که می‌تواند به‌طور مستقیم مسیره‌های پیام‌رسان NF-Kb را فعال کرده و رونویسی چندین مولکول مانند مولکول پیوندی لوکوسایت اندوتلیال (ELAM-1)، مولکول پیوندی یاخته عروقی (VCAM-1)، مولکول پیوندی بین و E-selectin را مدنظر قرار دهد (Collins *et al.*, 1995; Ahn & Aggarwal, 2005).

در این آزمایش، شاخص پراکسیداسیون (MAO) تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی (مکمل بتائین یا تزریق بتائین) قرار نگرفت ( $P > 0.05$ ) (جدول ۲). با نزدیک شدن به زمان زایش، مالون آلدئید به‌طور معنی‌داری

جدول ۳. تأثیر تیمارهای آزمایشی روی رخ‌نمای خونی، وزن تولد و قد سه‌روزگی (ارتفاع جدوگاه) گوساله‌های متولدشده از

گاوهای هلشتاین در دوره انتقال

Table 3. This study indicated that the experimental treatments hadn't any significant effect over either blood parameters (glucose, protein, BUN, albumin and TG) or performance (IBW and IWH) in calves born from these cows

Variable	Diets <sup>1</sup>				SEM	P-value Treatment
	CC	CB	BC	BB		
<b>Blood</b>						
Glucose (mg/dl)	100.88	102.13	106.16	102.01	3.22	0.67
Protein (g/dl)	25.84	25.11	25.38	28.30	1.87	0.58
BUN <sup>2</sup> (mg/dl)	6.22	6.17	6.18	6.12	0.31	0.99
Albumin (g/dl)	2.34	2.50	2.44	2.56	0.11	0.52
TG <sup>3</sup> (mg/dl)	18.32	17.33	17.22	17.86	0.36	0.14
<b>Performance</b>						
IBW (kg) <sup>4</sup>	39.75	43.50	41.12	42.01	2.09	0.64
IWH (cm) <sup>5</sup>	73.62	73.50	74.37	73.80	0.83	0.88

استفاده از مکمل بتائین و بدون تزریق عضلانی گاوها با ویتامین B12، جیره‌ای با تزریق هفتگی گاوها با ۱۰ میلی‌گرم ویتامین B12 به‌صورت عضلانی.

جیره‌ای تنها شامل ۵۰ گرم مکمل بتائین، جیره‌ای شامل ۵۰ گرم مکمل بتائین و توأم با تزریق عضلانی گاوها با ویتامین B12.

1. Diets C: diet without betaine and B12; BC: diet containing 50g betaine top-dressed; CB: diet containing 10 cc weekly injection of B12; MM: diet containing 50g betaine top-dressed and 10 cc weekly injection of B12.

2. Blood urea nitrogen; 3. Triglyceride; 4. Initial body weight; 5. Initial wither height



## REFERENCES

1. Ahn, K. & Aggarwal, B. (2005). Transcription factor NF-kB: a sensor for smoke and stress signals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1056, 218-33.
2. Banskalieva, V., Puchala, R., Goetsch, A. L., Luo, J. & Sahlu, T. (2005). Effects of ruminally protected betaine and choline on net flux of nutrients across the portal-drained viscera and liver of meat goat wethers consuming diets differing in protein concentration. *Small Ruminant Research*, 57(2), 193-202.
3. Barak, A. J., Beckenhauer, H. C. & Tuma, D. J. (1996). Betaine, ethanol, and the liver: a review. *Alcohol*, 13, 395-398.
4. Butler, W. R. & Smith, R. D. (1989). Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 72(3), 767-783.
5. Carlson, D. B., McFadden, J. W., D'Angelo, A., Woodworth, J. C. & Drackley, J. K. (2007). Dietary l-carnitine affects periparturient nutrient metabolism and lactation in multiparous cows. *Journal of Dairy Science*, 90, 3422-41.
6. Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D. & Maniatis, T. (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB Journal*, 9, 899-909.
7. Davidson, S., Hopkins, B. A., Odle, J., Brownie, C., Fellner, V. & Whitlow, L. W. (2008). Supplementing limited methionine diets with rumen-protected methionine, betaine, and choline in early lactation Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1552-1559.
8. Douglas, G. N., Overton, T. R., Bateman, H. G., Dann, H. M. & Drackley, J. K. (2006). Prepartal plane of nutrition, regardless of dietary energy source, affects periparturient metabolism and dry matter intake in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 2141-2157.
9. Duffield, T. (2000). Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2), 231-253.
10. Eklund, M., Bauer, E., Wamatu, J. & Mosenthin, R. (2005). Potential nutritional and physiological functions of betaine in livestock. *Nutrition Research Reviews*, 18(01), 31-48.
11. Fernandez, F. M., Conner, M. E., Hodgins, D. C., Parwani, A. V., Nielsen, P. R., Crawford, S. E. & Saif, L. J. (1998). Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. *Vaccine*, 16(5), 507-516.
12. Fernández, C., Sánchez-Seiquer, P., Sánchez, A., Contreras, A. & de la Fuente, J. M. (2004). Influence of betaine on milk yield and composition in primiparous lactating dairy goats. *Small Ruminant Research*, 52(1), 37-43.
13. Fernández-García, A., Risco-Castillo, V., Pedraza-Díaz, S., Aguado-Martínez, A., Álvarez-García, G., Gómez-Bautista, M. & Ortega-Mora, L. M. (2009). First isolation of *Besnoitia besnoiti* from a chronically infected cow in Spain. *Journal of Parasitology*, 95(2), 474-476.
14. Girard, C. L. & Matte, J. J. (1999). Changes in serum concentrations of folates, pyridoxal, Pyridoxal-5-phosphate and vitamin B12 during lactation of dairy cows fed dietary supplements of folic acids. *Can. Journal Animal Science*, 79, 107-113.
15. Girard, C. L. & Matte, J. J. (2005). Effects of intramuscular injections of vitamin B 12 on lactation performance of dairy cows fed dietary supplements of folic acid and rumen-protected methionine. *Journal of Dairy Science*, 88(2), 671-676.
16. Grummer, R. R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*, 73(9), 2820-2833.
17. Gryzunov, Y. A., Arroyo, A., Vigne, J. L., Zhao, Q., Tyurin, V. A. & Hubel, C. A. (2003). Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants. *Arch Biochemist Biophysics*, 413, 53-66.
18. Hall, L. W. (2014). The evaluation of dietary betaine, pre and probiotics, transitional substrates, and  $\beta$ -mercaptoacetate on physiological, metabolic, hormonal and production responses in lactating Holstein cows subjected to thermal stress. *The University of Arizona*.
19. Hall, L., Dunshea, F., Allen, J., Rungruang, S., Collier, J., Long, N. & Collier, R. (2016). Evaluation of dietary betaine in lactating Holstein cows subjected to heat stress. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9745-9753.
20. Kim, Sang, K. & Young, C. K. (2002). Attenuation of bacterial lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity by betaine or taurine in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 40(4), 545-549.
21. Kim, I. H. & Suh, G. H. (2003). Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows. *Theriogenology*, 60(8), 1445-1456.

22. Klasing, K. C., Adler, K. L., Remus, J. C. & Calvert, C. C. (2002). Dietary betaine increases intraepithelial lymphocytes in the duodenum of coccidia-infected chicks and increases functional properties of phagocytes. *The Journal of nutrition*, 132(8), 2274-2282.
23. Mulligan, F. J. & Doherty, M. L. (2008). Production diseases of the transition cow. *The Veterinary Journal*, 176(1), 3-9.
24. Pinotti, L., Baldi, A., Politis, I., Rebucci, R., Sangalli, L. & Dell'orto, V. (2003). Rumen protected choline administration to transition cows: Effect on milk production and vitamin E status. *Transboundary and Emerging Diseases*, 50, 18-21.
25. Rico, J. E., Bandaru, V. V. R., Dorskind, J. M., Haughey, N. J. & McFadden, J. W. (2015). Plasma ceramides are elevated in overweight Holstein dairy cows experiencing greater lipolysis and insulin resistance during the transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7757-7770.
26. SAS Institute. 2003. User's Guide: Statistics. Version 9.1. *SAS Inst., Inc., Cary, NC*.
27. Simon, J. (1999). Choline, betaine and methionine interactions in chickens, pigs and fish (including crustaceans). *World's Poultry Science Journal*, 55(04), 353-374.
28. Siavoshian, S., Segain, J. P., Kornprobst, M., Bonnet, C., Cherbut, C., Galmiche, J. P. & Blottiere, H. M. (2000). Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut*, 46(4), 507-514.
29. Van Den Top, A. M., Wensing, T., Geelen, M. J. H., Wentink, G. H., Van't Klooster, A. T. & Beynen, A. C. (1995). Time trends of plasma lipids and enzymes synthesizing hepatic triacylglycerol during postpartum development of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 78, 2208-2220.
30. 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), 2788-2796.
31. Wang, L-J., Zhang, H-W., Zhou, J-Y., Liu, Y., Yang, Y., Chen, X-L., Zhu, C-H., Zheng, R-D., Ling, W-H. & Zhu, H-L. (2014). Betaine attenuates hepatic steatosis by reducing methylation of the MTTP promoter and elevating genomic methylation in mice fed a high-fat diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(3), 329-336.
32. Zhang, F., Warskulat, U., Wessstein, M., Haussinger, D., 1996. Identification of betaine as an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *Gastroenterology*, 110, 1543-1552.
33. Zhang, L., Ying, S. J., an, W. J., Lian, H., Zhou, G. B. & Han, Z. Y. (2014). Effects of dietary betaine supplementation subjected to heat stress on milk performances and physiology indices in dairy cow. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 7577-7586.
34. Zom, R., Van Baal, J., Goselink, R., Bakker, J., De Veth, M. & Van Vuuren, A. (2011). Effect of rumen-protected choline on performance, blood metabolites, and hepatic triacylglycerols of periparturient dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 4016-4027.