

## تأثیر منابع مختلف چربی بر عملکرد و شاخص‌های فعالیت کبدی گاوهای شیری هلشتاین در دوره انتقال

هادی مرادی<sup>۱</sup>، مهدی گنج خانلو<sup>۲\*</sup>، ابوالفضل زالی<sup>۲</sup> و مهدی دهقان بنادکی<sup>۳</sup>  
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۹)

### چکیده

هدف از این بررسی ارزیابی تأثیر تغذیه منابع مختلف چربی بر عملکرد تولیدی و برخی از شاخص‌های فعالیت کبدی گاوهای هلشتاین در دوره انتقال بود. ۳۵ رأس دام از ۲۱ روز پیش از زایش تا ۲۱ روز پس از زایش به صورت کامل تصادفی به پنج جیره غذایی متشکل از جیره حاوی پودر چربی با منبع نخل (پالم) روغنی به عنوان جیره شاهد (T1)، جیره حاوی مکمل CLA (ترکیبی از ترانس ۱۰ سیس ۱۲ و سیس ۹ ترانس ۱۱) (T2)، جیره حاوی دانه کتان نواری (اکستروید) شده (T3)، جیره حاوی مخلوطی از مکمل CLA و دانه کتان نواری شده (T4) و جیره حاوی مخلوط روغن و کنجاله کنجد (T5) اختصاص داده شدند. مقدار مصرف خوراک و تولید شیر به صورت روزانه و ترکیب شیر به صورت هفتگی اندازه‌گیری شد. نمونه‌های خون به صورت هفتگی به منظور تعیین غلظت فراسنجه‌های پلاسما گردآوری شد. مقادیر ماده خشک مصرفی، تولید شیر و ترکیب شیر تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ( $P > 0.05$ ). از بین فراسنجه‌های خون، غلظت پروتئین کل و اوره خون در زمان پس از زایش تحت تأثیر تیمار قرار گرفت ( $P < 0.05$ ). غلظت پروتئین کل در گاوهای تغذیه شده با T3 نسبت به گاوهای تغذیه شده با T1 بیشتر بود و غلظت اوره خون در گاوهای تغذیه شده با T5 زیادتر از T3 بود ولی بین دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. تفاوت‌ها در غلظت آسپاراتات آمینو ترانسفراز خون در دوره پیش از زایش بین تیمارها تمایل به معنی‌داری داشت ( $P < 0.1$ ) به طوری که بیشترین مقدار برای گاوهای گروه T1 بود. از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت، دانه کتان نواری شده با افزایش پروتئین کل پلاسما و کاهش اوره خون پس از زایش و مکمل CLA با کاهش آسپاراتات آمینو ترانسفراز پس از زایش تأثیر سودمندی بر سلامت کبد در دوره انتقال دارد.

واژه‌های کلیدی: دوره انتقال، فراسنجه‌های خون، فعالیت کبد، گاو شیری، مکمل چربی.

## The effect of different sources of fatty acids on the performance and liver function indices in Holstein dairy cows during transition period

Hadi Moradi<sup>1</sup>, Mehdi Ganjkanlou<sup>2\*</sup>, Abolfazl Zali<sup>2</sup> and Mehdi Dehghan Banadaky<sup>3</sup>

1, 2, 3. M. Sc. Student, Associate Professor and Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Jan. 16, 2018 - Accepted: Jun. 30, 2018)

### ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effects of different sources of fatty acids on the performance and liver activity indices of Holstein cows during the transition period. Thirty-five cows were randomly assigned from 21 days prepartum to 21 days postpartum to 5 dietary treatments consisting of a diet containing palm oil (T1) as control, CLA fat supplement (T2), extruded flaxseed (T3), mixes of CLA fat supplement and extruded flaxseed (T4), and sesame oil and sesame meal (T5). The amounts of dry matter intake and milk yields were measured daily and milk composition was measured weekly. Blood samples were collected weekly to determine the concentration of plasma parameters. Feed intake, milk yields and milk composition were generally similar among treatments ( $P > 0.05$ ). Among blood parameters, the levels of urea and total protein affected by treatment in postpartum ( $P < 0.05$ ). The concentration of total protein in group T3 was higher than group T1. The urea concentration in group T5 was higher as compared with group T3. Amount of aspartate aminotransferase in prepartum had a significant tendency between treatments ( $P < 0.1$ ) and the highest amount was observed for group T1. The results of this study showed that CLA supplementation and extruded flaxseed increased total protein and reduced blood urea and has a beneficial effect on the health of the liver during the transition period.

**Keywords:** Blood parameters, dairy cow, fat supplement, transition period, liver function.

\* Corresponding author E-mail: ganjkanlou@ut.ac.ir

## مقدمه

دوره انتقال به طور معمول با توازن منفی انرژی همراه است و با افزایش اسیدهای چرب غیر استریفه، کتون‌ها، مقاومت به انسولین و کاهش گلوکز خون مشخص می‌شود (Grummer & Carroll, 1991). در همه حیوانات برای مدیریت توازن منفی انرژی، چندین سازگاری سوخت‌وسازی (متابولیکی) از جمله آزادسازی بافت چربی و افزایش اسیدهای چرب غیر استریفه پلاسما و صرفه‌جویی در گلوکز برای لاکتوز وجود دارد. اما برخی از حیوانات توازن منفی انرژی بیش‌ازحدی را تجربه خواهند کرد که این امر با پیامدهای منفی مانند افزایش خطر گسترش بیماری‌ها و کاهش در تولید شیر و توان تولیدمثل همراه هستند (Ospina et al., 2013). حدود ۱۵ تا ۲۰ درصد از NEFA گردش خون وارد کبد می‌شود و چهار سرنوشت خواهد داشت که عبارت‌اند از: ۱- اکسایش (اکسیداسیون) در کبد و تولید ATP، ۲- انتقال به بیرون از کبد به شکل لیپوپروتئین با چگالی کم، ۳- تبدیل به کتون بادی از طریق مسیر بتا-اکسایش یا از طریق اکسایش پراکسی‌زومی، و ۴- ذخیره به شکل تری‌گلیسرید در کبد (Drackley et al., 2001). فراسنجه‌های اصلی خون که شاخص آسیب و ناهنجاری در عملکرد کبد هستند، شامل آنزیم‌های آسپارات ترانس آمیناز، آلانین ترانسفراز، گاما-گلوتامیل ترانسفراز، گلوتامات دهیدروژناز است که غلظت پلاسمایی این‌ها در آسیب‌های کبدی افزایش می‌یابد و متابولیت‌های پروتئین متصل‌شونده به رتینول، کلسترول و آلبومین که غلظت پلاسمایی این‌ها در آسیب‌های کبدی کاهش می‌یابد (Bobe et al., 2004).

استفاده از چربی‌ها باعث بهبود وضعیت انرژی در دوره انتقال می‌شود ولی شواهدی وجود دارد که باعث افزایش اسیدهای چرب غیر استریفه پلاسما می‌شود که به‌نوبه خود باعث افزایش تری‌گلیسرید در کبد می‌شود (Grummer, 2008). با این حال تأثیر نوع اسیدهای چرب جیره بر فعالیت کبد نتایج مختلفی نشان داده است. در بررسی روی گاوهای خشک نشان داده شد، استفاده از چربی‌ها تمایل به کاهش تری‌گلیسرید در کبد را منجر خواهد شد (Douglas, 2004). امروزه در بررسی

درون‌تنی نشان داده شد، اسیدهای چرب امگا-۳ اکسایش اسید چرب و اتصال آن را به تری‌گلیسرید در یاخته‌های کبد افزایش می‌دهند (Mashek et al., 2002). زمان استفاده از مکمل چربی (پیش یا پس از زایش) نیز می‌تواند تأثیرگذار باشد. به‌عنوان مثال، تغذیه تا ۱۵ درصد دانه کامل کتان (یک منبع غنی از اسیدهای چرب امگا-۳) از زمان زایش تا هفته ۲۴ شیردهی، بر غلظت اسیدهای چرب غیراستریفه گاوهای شیری تأثیری نداشت (Peti, 2015). برعکس، تغذیه دانه کتان از ۶ هفته پیش از زایمان باعث کاهش اسیدهای چرب غیر استریفه پلاسما و تری‌گلیسرید کبد و افزایش غلظت گلیکوژن کبدی در گاوهای چند بار زایش در دوره پس از زایمان شد (Petit et al., 2007). در بررسی دیگر، تزریق دروایه (امولسیون) روغن کتان در مقایسه با تیمارهای پیه و روغن ماهی موجب کاهش تری‌گلیسرید، غلظت NEFA و بتاهیدروکسی بوتیرات در پلاسما شد، اما دروایه‌های مختلف هیچ تأثیری بر اکسایش پراکسی‌زومی کبد نداشتند (Mashek et al., 2005). همچنین فعالیت پاداکسنده (آنتی‌اکسیدان)‌های کبد مانند سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز را افزایش داد (Rajasha et al., 2006). در بررسی، گاوهای تغذیه‌شده با چربی اشباع دارای تری‌گلیسرید کبدی بیشتری نسبت به گاوهای تغذیه‌شده با دانه کتان بودند (Prado et al., 2016). تغذیه همپار (ایزومر)‌های cis-9, trans-11 و trans-10، cis-12 اسید لینولئیک مزدوج در شکل محافظت شده باعث بهبود سلامت و غلظت گلوکز خون و کاهش تعادل منفی انرژی، NEFA و BHBA خون در دوره انتقال شده است (Mattos et al., 2000; Odense et al., 2007). اسید لینولئیک مزدوج باعث افزایش ماده خشک مصرفی و برخی از پروتئین‌های حالت (فاز) حاد منفی مانند آلبومین و کلسترول می‌شود (Esposito et al., 2014). استفاده از اسید لینولئیک مزدوج یکی از راهکارهای بهبود توازن انرژی از طریق کاهش محتوی چربی شیر است که ساخت (سنتز) آن هزینه انرژی زیادی برای گاو دارد از سوی دیگر در مقایسه با دیگر ترکیب‌های شیر به‌آسانی از طریق تغییر جیره غذایی قابل تنظیم است. همچنین، در بررسی با تغذیه موش‌های آزمایشگاهی

## مواد و روش‌ها

### حیوانات و جیره‌های آزمایشی

این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی به مدت ۴۲ روز (۲۱ روز پیش از زایش و ۲۱ روز پس از زایش) در ایستگاه علمی پژوهشی علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران اجرا شد. شمار ۳۵ رأس گاو چند بار زایش غیر شیرده هلشتاین بر پایه تاریخ احتمالی زایش، بارهای زایش و تولید شیر دوره پیش به صورت تصادفی به پنج تیمار و هفت تکرار توزیع شدند. تیمارها شامل: ۱- جیره حاوی مکمل پودر چربی با منبع نخل (پالم) روغنی (T1) -۲ جیره حاوی مکمل CLA (T2) -۳ جیره حاوی دانه کتان نواری (اکستروود) شده (T3) -۴ جیره حاوی مخلوط مکمل CLA و دانه کتان نواری شده (T4) -۵ جیره حاوی کنجاله و روغن کنجد (T5) بود (جدول ۱).

توسط روغن سویا و ایزومر Trans-10 cis-12 CLA نشان داده شد، مکمل CLA باعث کاهش تری‌گلیسرید کبد و افزایش بتا اکسایش در کبد می‌شود (Gudbrandsen *et al.*, 2009). در یک بررسی، مصرف اسید پالمیتیک، روغن ماهی، دانه کتان و مکمل CLA بررسی شد و بیشترین مقدار اسیدهای چرب غیر استریفه خون مربوط به گاوهای تغذیه شده با اسید پالمیتیک بود. افزون بر این، بیشترین مقدار تولید شیر و کمترین درصد چربی شیر برای گاوهای تغذیه شده با مکمل CLA مشاهده شد (Hutchinson *et al.*, 2012).

در حال حاضر، تأثیر مکمل چربی بر تولید و ترکیب شیر، مصرف خوراک و قابلیت هضم به طور گسترده بررسی شده، اما شمار بررسی کمی برای ارزیابی تأثیر چربی جیره بر سوخت‌وساز (متابولیسم) کبد در گاوهای شیری انجام شده است. بنابراین هدف از این بررسی ارزیابی تأثیر منبع‌های مختلف چربی بر عملکرد دام و شاخص‌های فعالیت کبد در گاوهای هلشتاین در دوره انتقال بود.

جدول ۱. مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره‌های پیش و پس از زایش  
Table 1. Ingredients and nutrient composition of pre and postpartum diets

Diet*	Prepartum					Prepartum				
	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5
Ingredient (% of DM)										
Alfalfa hay, mid	31.75	31.75	31.75	31.75	31.75	24.25	24.25	24.25	24.25	24.25
Corn silage	28.57	28.57	28.57	28.57	28.57	17.15	17.15	17.15	17.15	17.15
Beet pulp, dehydrated	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Corn grain, ground	7.94	7.94	7.94	7.94	7.94	15.16	15.16	15.16	15.16	15.16
Barley grain, ground	11.90	11.90	11.90	11.90	11.90	12.91	12.91	12.91	12.91	12.91
Soybean meal	5.16	5.16	5.16	5.16	5.16	11.45	11.45	11.45	11.45	11.45
Cottonseed, whole	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	1.68	1.68	1.68	1.68	1.68
Corn gluten meal	-	-	-	-	-	1.68	1.68	1.68	1.68	1.68
Canola meal	3.17	3.17	0.99	1.87	-	6.72	6.72	2.35	3.65	-
Wheat bran	6.55	6.55	6.75	6.67	7.62	-	-	0.49	0.34	2.53
Extruded linseed	-	-	2.86	1.67	-	-	-	5.09	3.65	-
Fat powder	0.95	0.56	-	-	-	1.68	1.23	-	-	-
Sesame meal	-	-	-	-	2.18	-	-	-	-	4.32
Ca salt of Sesame oil <sup>1</sup>	-	-	-	-	0.83	-	-	-	-	1.4
CLA supplement <sup>2</sup>	-	0.4	-	0.4	-	-	0.5	0.5	-	-
Glycoline	1.19	1.19	1.19	1.19	1.19	1.40	1.40	1.40	1.40	1.40
Sodium bicarbonate	-	-	-	-	-	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Ammonium chloride	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79	-	-	-	-	-
Magnesium oxide	-	-	-	-	-	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
Magnesium sulfate	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	-	-	-	-	-
Salt	-	-	-	-	-	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
Min and vit premix <sup>3</sup>	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56
Calcium carbonate	0.4	0.4	0.48	0.48	0.4	0.34	0.34	0.73	0.67	0.56
Dicalcium phosphate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.28	0.34	0.34	0.28	0.16
Zeolite	-	-	-	-	-	0.78	0.78	0.72	0.67	0.78
Toxin binder	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
NE <sub>L</sub> (Mcal/Kg)	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.68	1.68	1.66	1.66	1.66
CP (% of DM)	15.5	15.5	15.53	15.53	15.56	17.27	17.28	17.27	17.28	17.29
Fat (% of DM)	3.45	3.45	3.46	3.45	3.47	4.08	4.10	4.10	4.09	4.08
NDF (% of DM)	37.63	37.63	37.44	37.51	37.77	30.25	30.25	29.85	30.01	30.6
ADF (% of DM)	22.57	22.57	22.45	22.5	22.55	18.67	18.67	18.39	18.52	18.64
NFC (% of DM)	36.34	36.34	36.55	36.45	36.05	39.66	39.66	39.97	39.87	39.04

۱. شرکت دانش‌بنیان کیمیا دانش الوند - قم - ایران

۲. شرکت گلبار نوید بهار

۳. شامل (به ازای هر کیلوگرم): ۱,۶۰۰,۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۵۰,۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D<sub>3</sub>، ۷,۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۲۵۰ میلی‌گرم ویتامین بیوتین، ۴۰ گرم فسفر، ۱۶۰ گرم کلسیم، ۱۰,۰۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۳۰ میلی‌گرم گوگرد، ۱۴,۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۵,۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۶,۰۰۰ میلی‌گرم مس، ۱۰۰ میلی‌گرم کبالت، ۲۰۰ میلی‌گرم ید، ۱۰۰ میلی‌گرم سلنیوم و ۳,۰۰۰ میلی‌گرم پاداکسند.

1. Kimiya Alvand Sience based Company, Ghom, Iran.

2. Lutrel Pure, BASF, Ludwigshafen, Gemany  
 3. Contained (per kg): 1,600,000 IU of Vitamin A, 250,000 IU of Vitamin D3, 7000 mg of Vitamin E, 250 mg Vitamin biotin (H2), 40 g of P, 160 g of Ca, 10,000 mg of Mn, 30 mg of S, 14,000 mg of Zn, 5,000 mg of Fe, 6,000 mg of Cu, 100 mg of Co, 200 mg of I, 100 mg of Se, and 3000 mg of Anti-oxidant.  
 \* T1= Diet containing palm fat, T2= Diet containing CLA supplement, T3= Diet containing flaxseed, T4= Diet containing a mixture of flax seed and CLA supplements, T5= Diet containing a mixture of sesame oil and meal

شده‌اند با استفاده از رویه MIXED و دیگر فراسنجه‌ها (اسیدهای چرب غیر استریفه و فراسنجه‌های خونی زمان زایش) با استفاده از رویه GLM توسط نرم‌افزار آماری SAS تجزیه شد. مدل آماری برای فراسنجه‌های تکرار شده به صورت زیر بود:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + TP_{ij} + e_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  = مشاهده،  $\mu$  = میانگین،  $T_i$  = اثر تیمار،  $P_j$  = اثر زمان نمونه‌گیری،  $TP_{ij}$  = اثر متقابل تیمار و زمان،  $e_{ijk}$  = اثر اشتباه آزمایشی.

برای فراسنجه‌های تک مشاهده‌ای مدل آماری به صورت زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

$Y_{ij}$  = مشاهده،  $\mu$  = میانگین،  $T_i$  = اثر تیمار،  $e_{ij}$  = اثر اشتباه آزمایشی.

## نتایج و بحث

### پاسخ‌های تولیدی

نتایج مربوط به ماده خشک مصرفی، و تولید و ترکیب شیر در جدول ۲ ارائه شده است. ماده خشک مصرفی پیش و پس از زایش تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت ( $P > 0.05$ ) که با نتایج برخی از بررسی‌ها همخوانی دارد (Odens *et al.*, 2007; Petit *et al.*, 2002). اما، در بررسی مصرف روغن ماهی (امگا-۳) باعث افزایش مصرف خوراک در مقایسه با دانه پنبه (امگا-۶) شد (Qiu *et al.*, 2004). در بررسی دیگر، گاوهای تغذیه‌شده با دانه کتان مصرف خوراک بیشتری در مقایسه با دانه سویا و چربی اشباع داشتند (Petit & Benchaar, 2007). در بررسی Petit *et al.* (2004) تغذیه دانه کامل کتان از شش هفته پیش از زایش تا شش هفته پس از زایش ماده خشک مصرفی را افزایش داد. علت عدم تغییر ماده خشک مصرفی در این بررسی می‌تواند درصد پایین مکمل چربی و فرم‌های محافظت‌شده چربی، سطوح یکسان چربی در جیره‌های آزمایشی و باشد. تأثیر زمان پیش و پس زایش برای ماده خشک مصرفی معنی‌دار بود

جیره‌ها با استفاده از نرم‌افزار Amino cow و بر پایه NRC (2001) تنظیم شد و به صورت کامل مخلوط شده در دو وعده صبح و ظهر (۸ صبح و ۴ پس از ظهر) به گاوها داده و مقدار ماده خشک مصرفی به طور روزانه ثبت شد.

### نمونه‌گیری از خون و تعیین غلظت فراسنجه‌های خونی

نمونه‌گیری خون در طول دوره آزمایش از طریق سیاهرگ دمی چهار ساعت پس از مصرف خوراک و با استفاده از لوله‌های تحت خلأ حاوی هپارین از همه گاوها در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ پیش زایش، روز زایش و روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ پس زایش گردآوری و در  $g \times 1232$  به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و پلاسما استخراج و در ریزلوله (میکروتیوب) ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و تا زمان اندازه‌گیری فراسنجه‌های موجود در آن در دمای ۲۰- نگهداری شد. پس از یخ‌گشایی نمونه‌ها، غلظت پروتئین کل، اوره خون، و آلبومین با روش طیف‌سنج نوری (اسپکتروفوتومتر) و با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون، اسیدهای چرب غیر استریفه توسط کیت BioRex و دستگاه تجزیه‌گر خودکار (اتوانالیزر) آلفا و آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آسپارات آمینوترانسفراز و گاما گلوتامیل ترانسفراز با دستگاه تجزیه‌گر خودکار آلفا و کیت پیش‌تاز طب اندازه‌گیری شدند.

### شیردوشی و ثبت تولید و ترکیب شیر

همه گاوها در سه وعده صبح، عصر و شب دوشیده و رکورد هر وعده ثبت شد تا تولید روزانه محاسبه شود. همچنین، نمونه شیر طی ۲۱ روز شیردهی به صورت هفتگی گردآوری شد و مقدار چربی، پروتئین، و لاکتوز شیر توسط دستگاه تجزیه‌گر شیر (Kombi-fross 5000, Denmark) در آزمایشگاه جهاد کشاورزی شهریار اندازه‌گیری شد.

### تجزیه آماری

فراسنجه‌هایی (عملکرد و فراسنجه‌های خونی پیش و پس زایش) که چند بار در طول آزمایش اندازه‌گیری

لاکتوز در مقایسه با پروتئین و چربی، کمتر تحت تأثیر تغییرپذیری‌های جیره قرار می‌گیرد و غلظت آن در شیر به نسبت ثابت است (Jenkins & McGuire, 2006).  
 باین حال، در برخی بررسی‌ها مصرف مکمل CLA (Petit et al., 2012) و دانۀ کتان (Petit et al., 2007)، باعث افزایش لاکتوز شیر شد که علت آن صرفه‌جویی انرژی به‌خاطر کاهش چربی شیر بود. اما در بررسی دیگر مصرف دانۀ کتان فرمالدهیدی و لینولا تأثیری بر چربی و پروتئین شیر نداشت (Goodridge et al., 2001). کاهش نیافتن چربی شیر در هفته‌های اول پس از زایش توسط مکمل CLA در این آزمایش با نتایج برخی بررسی‌ها همخوانی دارد (Bernal-Santos et al., 2012; Schlegel et al., 2003). ولی با نتایج بررسی‌های دیگر (Odens et al., 2007; Haung et al., 2008) مغایر است. تأثیر مکمل CLA بر افت چربی شیر وابسته به مرحله شیردهی است به‌طوری‌که در اواخر و اواسط دوره شیردهی باعث کاهش چربی شیر می‌شود استفاده از اسید لینولئیک مزدوج در هفته اول پس از زایمان تأثیر کاهندگی کمتری بر چربی شیر دارد و به مقادیر بالایی برای کاهش چربی شیر در این دوره مورد نیاز است (Odens et al., 2007). تأثیر زمان برای تولید شیر ( $P=0/055$ )، درصد چربی و پروتئین شیر معنی‌دار بود ( $P<0/05$ ). تولید شیر به‌مرور زمان روند افزایشی نشان داد، ولی درصد چربی و پروتئین شیر تا سه هفته پس از زایش روند کاهشی داشت. به‌طورمعمول بین تولید شیر و درصد چربی و پروتئین آن رابطه معکوس وجود دارد و به موازات افزایش در تولید، درصد این دو ماده در شیر کاهش می‌یابد (NRC, 2001).

( $P<0/001$ )، به‌طوری‌که از سه هفته پیش از زایش تا زمان زایش روند کاهشی و از زمان زایش تا سه هفته پس از زایش روند افزایشی داشت (شکل ۱). اثر متقابل تیمار و زمان نیز برای ماده خشک مصرفی پس از زایش معنی‌دار بود ( $P<0/01$ ) (شکل ۱).

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، تولید و ترکیب شیر تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت ( $P>0/05$ ). در بررسی انجام شده توسط Pradoe et al. (2016)، استفاده از دانۀ کتان، لینولا و مگالاک و همچنین در بررسی Mattos et al. (2004) استفاده از روغن‌زیتون و روغن ماهی تأثیری بر تولید و ترکیب‌های شیر نداشت که موافق با نتایج این بررسی است. اما در برخی از بررسی‌ها، افزایش تولید شیر در نتیجه استفاده از دانۀ کتان در مقایسه با چربی اشباع مشاهده شده است (Petit et al., 2007; Petit et al., 2004). در بررسی دیگری مصرف مکمل CLA باعث افزایش تولید شیر در مقایسه با روغن نخل، دانۀ کتان و روغن ماهی شد (Hutchinson et al., 2012). تغییر نیافتن میزان تولید شیر در بررسی می‌تواند به دلیل تغییر نیافتن ماده خشک مصرفی باشد. اگرچه هنوز در ارتباط با اینکه آیا مصرف خوراک بر تولید شیر اثر می‌گذارد یا اینکه متأثر از آن است، بحث و اختلاف‌نظر وجود دارد اما بر پایه نظریه تنظیم انرژی مصرفی، گاوها برای تأمین نیاز خود به انرژی غذا می‌خورند و بنابراین می‌توان مصرف خوراک را متأثر از تولید شیر دانست (NRC, 2001). افزایش مصرف خوراک، موجب می‌شود تا فراهمی گلوکز برای غده پستان، به‌منظور ساخت لاکتوز و تولید شیر افزایش یابد (Heravi et al., 2007)، اما در این پژوهش چنین نبود.

جدول ۲. میانگین مصرف ماده خشک، تولید شیر و ترکیب شیر در گاوهای مصرف‌کننده جیره‌های آزمایشی

Variable	Diets					SEM	P-value**		
	T1	T2	T3	T4	T5		Diet	Time	Diet*Time
Prepartum									
DMI (kg)	14.49	13.08	13.28	14.27	14.37	0.71	0.51	<0.0001	0.53
Postpartum									
DMI (kg)	19.22	18.33	18.29	18.17	18.81	0.85	0.90	<0.0001	0.001
Milk yield (kg/d)	35.07	34.43	36.46	37.01	36.28	1.73	0.84	0.055	0.398
FCM 3.5% (kg/d)	36.76	35.41	37.47	37.13	35.98	2.59	0.981	0.241	0.942
Milk fat (%)	3.72	3.64	3.66	3.77	3.46	0.24	0.90	0.03	0.84
Milk protein (%)	2.88	2.86	2.84	2.84	2.74	0.1	0.91	0.002	0.33
Milk lactose (%)	4.69	4.63	4.65	4.62	4.41	0.11	0.47	0.15	0.62
Milk fat (kg/d)	1.36	1.24	1.35	1.41	1.25	0.12	0.81	0.70	0.50
Milk protein (kg/d)	1.07	0.99	1.04	1.03	1.03	0.07	0.97	0.04	0.22
Milk lactose (kg/d)	1.72	1.57	1.73	1.71	1.67	0.11	0.87	0.005	0.22

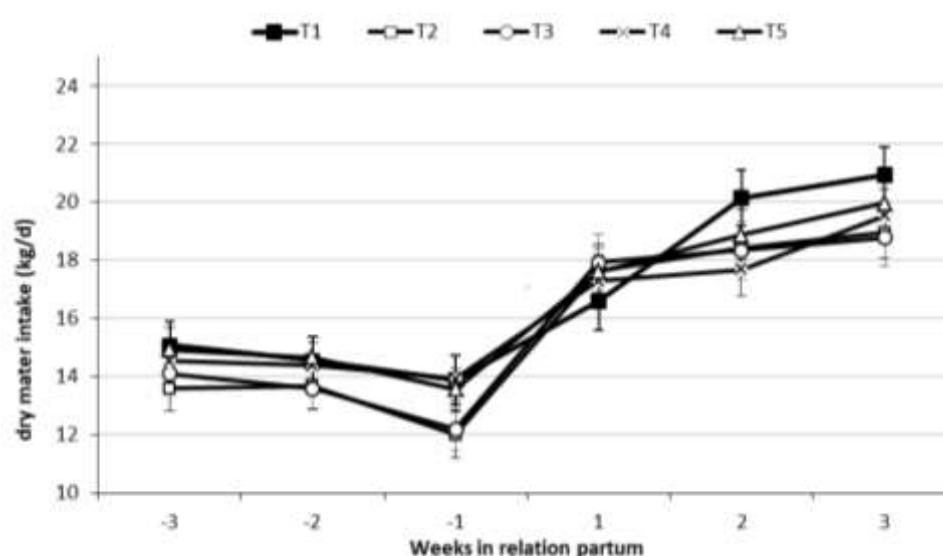
\* T1 جیره حاوی پودر چربی با منبع نخل T2 = جیره حاوی مکمل CLA = T3 جیره حاوی دانۀ کتان T4 = جیره حاوی مخلوط مکمل CLA و دانۀ کتان T5 = جیره

حاوی مخلوط روغن و کنجاله کنجد.

\*\* سطح معنی‌داری  $P < 0.05$ .

\* T1= Diet containing palm fat, T2= Diet containing CLA supplement, T3= Diet containing flaxseed, T4= Diet containing a mixture of flax seed and CLA supplements, T5= Diet containing a mixture of sesame oil and meal.

\*\* Significance level  $P < 0.05$ .



شکل ۱. ماده خشک مصرفی (کیلوگرم در روز) گاوهای تغذیه‌شده با جیره‌های آزمایشی

T1 = جیره حاوی پودر چربی با منبع نخل T2 = جیره حاوی مکمل CLA = T3 جیره حاوی دانه کتان T4 = جیره حاوی مخلوط مکمل CLA و دانه کتان T5 = جیره حاوی مخلوط روغن و کنجاله کنجد. سطح معنی‌داری  $P < 0.05$

Figure 1. Dry matter intake of cows fed with experimental diets

(T1= Diet containing palm fat, T2= Diet containing CLA supplement, T3= Diet containing flaxseed, T4= Diet containing a mixture of flax seed and CLA supplements, T5= Diet containing a mixture of sesame oil and meal. Significance level  $P < 0.05$ )

اسیدهای آمینه از مخاط روده باریک شود (Haag *et al.*, 2003). افزون بر این، دانه کتان به‌عنوان یک منبع انرژی قندسازی یا گلوکونیک (van Knegsel *et al.*, 2007) می‌تواند باعث صرفه‌جویی اسیدهای آمینه برای ساخت قند از من‌های غیرقندی (گلوکونوز) شود. بخش اعظم پروتئین کل را آلومین و ایمونوگلوبولین تشکیل می‌دهد. غلظت برخی از پروتئین‌های پلاسما در برخی از بیماری‌ها تغییر می‌کند، برای مثال غلظت آلومین در گاوهای مبتلا به کبد چرب کاهش می‌یابد (Issi *et al.*, 2016). با توجه به اینکه در این بررسی میزان آلومین پلاسما بین تیمارها تفاوتی نداشت می‌توان احتمال داد، اما در بررسی دیگری (Rodrigues *et al.*, 2014) مصرف روغن سویا و مگالاک تأثیری بر پروتئین کل پلاسما نداشت.

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، هیچ‌یک از آنزیم‌های کبدی در زمان‌های مختلف تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت و تنها غلظت

### فراسنجه‌های خون

نتایج تجزیه بیوشیمیایی پلاسمای خون در جدول ۳ نشان داده شده است. همه فراسنجه‌های اندازه‌گیری‌شده در این بررسی در دامنه بهینه برای گاوهای شیری بودند (Farid *et al.*, 2013; Bertoni & Trevisi, 2013). تیمارهای آزمایشی در دوره پیش از زایش تأثیری بر فراسنجه‌های مختلف خون نداشت ( $P > 0.05$ ) و تنها غلظت آسپاراتات آمینو ترانسفراز متمایل به تغییر بود.

غلظت پروتئین کل پلاسما در اوایل زایش در گاوهای گروه T3 (دانه کتان) در مقایسه با گروه T1 (منبع نخل روغنی) به‌طور معنی‌دار بیشتر بود ( $P < 0.05$ ). در نتایج بررسی دیگری نشان داده شده است، اسیدهای چرب بلند زنجیر امگا-۳ می‌توانند بر فعالیت ATPase موجود در غشای قاعده‌ای جانبی یاخته‌های پوششی روده تأثیر بگذارند. بنابراین احتمال دارد مصرف دانه کتان موجب افزایش در بازده جذب

2015) تفاوتی بین منابع امگا-۳ و امگا-۶ بر مقدار آسپاراتات آمینو ترانسفراز وجود نداشت. تغییر نیافتن آلکالین فسفاتاز و گاما گلوتامیل ترانسفراز و آل‌بومین در این بررسی با بررسی‌های دیگر (Rodrigues *et al.*, 2015; Nudda *et al.*, 2014) همخوانی داشت که نشان‌دهنده تفاوت نداشتن بین تیمارها در تأثیر بر سلامتی کبد است. همچنین در غلظت اسیدهای چرب غیراستریفه تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. تغییر نیافتن اسیدهای چرب غیر استریفه در این بررسی با نتایج محققان دیگر (Odens *et al.*, 2007) مغایر بود. محققان نام‌برده در نتایج بررسی‌های خود گزارش دادند، تغییر در غلظت اسیدهای چرب غیر استریفه می‌تواند به دلیل تغییر در مصرف خوراک، توازن انرژی، تولید و ترکیب شیر باشد که در این بررسی هیچ‌یک از این شاخص‌ها تحت تأثیر تیمار قرار نگرفتند. ولی موافق با نتایج Hutchinson *et al.* (2012) و Rodrigues *et al.* (2014) بود. غلظت اوره پلاسما در گروه T5 نسبت به گروه T3 بیشتر بود ( $P < 0.05$ ) که موافق با نتایج محققان دیگر بود (Nudda *et al.*, 2015).

آسپاراتات آمینو ترانسفراز پیش از زایش بین تیمارها تمایل به معنی‌داری داشت ( $P = 0.096$ ) و کمترین مقدار برای گاوهای گروه T2 (مکمل CLA) بود. بسیج شدید ذخایر چربی در دوره انتقال موجب تجمع تری گلیسیرید در کبد می‌شود که گلوکونوژنز و اورئوژنز را در گاو کاهش می‌دهد و حیوان را مستعد ابتلا به دیگر اختلال‌های سوخت‌وسازی می‌کند (Brickner *et al.*, 2009). افزایش بیش‌ازحد حجم یاخته‌های کبدی در پی ذخیره بیش از اندازه چربی نیز می‌تواند موجب آسیب دیدن غشای یاخته‌ای و پارگی آن و در نتیجه افزایش غلظت پلاسمایی آلکالین فسفاتاز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و گاما گلوتامیل ترانسفراز شود. تغییر در غلظت پلاسمایی این ترکیب‌ها نشان از تغییر در سوخت‌وساز و فعالیت کبدی این آنزیم‌ها به واسطه آسیب‌های کبدی دارد (Farid *et al.*, 2013). در بررسی Roy *et al.* (2007) بر موش‌های آزمایشگاهی، مصرف اسیدهای چرب امگا-۳ باعث افزایش پروتئین کل و کاهش آسپاراتات آمینو ترانسفراز شد و این موش‌ها میزان چربی کمتری در کبد ذخیره کرده بودند. ولی در نتایج بررسی دیگری (Nudda *et al.*,

جدول ۳. میانگین فراسنجه‌های پلاسمای خون در گاوهای تغذیه‌شده با جیره‌های آزمایش

Table 3. Least squares means for blood parameters among the cows fed with experimental diets

Variable	Diets <sup>1</sup>					SEM	P.value <sup>**</sup>		
	T1	T2	T3	T4	T5		Diet	Time	Diet*Time
Prepartum <sup>1</sup>									
NEFA 7d pre calving (mmol/L)	0.26	0.26	0.24	0.26	0.25	0.01	0.9	-	-
Total protein (g/dL)	6.91	7.08	6.88	6.61	7.48	0.287	0.31	0.706	0.897
Albumin (g/dL)	3.94	4.59	4.65	4.4	3.93	0.251	0.11	0.507	0.851
Urea (mg/dL)	25.08	23.93	25.62	21.22	22.9	1.495	0.181	0.502	0.848
AST (U/L)	58	48.7	55.36	57.47	67.66	5.746	0.096	0.308	0.868
ALP (U/L)	145.5	100.94	132.39	112.17	112.17	17.956	0.287	0.365	0.7
GGT (U/L)	28.07	29.77	31.77	26.72	29.02	3.434	0.836	0.752	0.987
Calving day <sup>2</sup>									
Total protein (g/dL)	6.34	7.23	6.78	6.91	7.95	0.65	0.412	-	-
Albumin (g/dL)	4.33	5.14	4.19	4.49	3.85	0.543	0.325	-	-
Urea (mg/dL)	21.92	24.02	18.48	24.47	24.26	2.864	0.527	-	-
AST (U/L)	90.25	55.75	73.67	60	86.67	14.543	0.237	-	-
ALP (U/L)	125.25	126.33	188	117.33	188.66	30.16	0.439	-	-
GGT (U/L)	26.75	30.12	31.85	25.33	28.5	6.163	0.916	-	-
Postpartum <sup>3</sup>									
NEFA 7d post calving (mmol/L)	0.38	0.34	0.34	0.44	0.37	0.04	0.37	-	-
Total protein (g/dL)	6.68 <sup>b</sup>	6.86 <sup>ab</sup>	8.02 <sup>a</sup>	7.21 <sup>ab</sup>	6.83 <sup>ab</sup>	0.332	0.029	0.531	0.552
Albumin (g/dL)	4.63	4.6	4.6	5.4	4.45	0.313	0.121	0.338	0.059
Urea (mg/dL)	24.59 <sup>ab</sup>	25.28 <sup>ab</sup>	20.76 <sup>b</sup>	22.95 <sup>ab</sup>	27.27 <sup>a</sup>	1.455	0.02	0.891	0.972
AST (U/L)	78.52	73.86	73.86	67.38	80.38	5.159	0.123	0.593	0.848
ALP (U/L)	82.25	113.86	113.86	84.33	90.22	12.145	0.217	0.971	0.668
GGT (U/L)	28.02	31	31.77	26.72	29.02	3.434	0.836	0.598	0.992

\* T1 جیره حاوی پودر چربی با منبع نخل T2 = جیره حاوی مکمل T3 = CLA جیره حاوی دانه کتان T4 = جیره حاوی مخلوط مکمل CLA و دانه کتان T5 = جیره حاوی مخلوط روغن و کنجاله کنجد

۱- میانگین مربعات روزهای ۱۴، ۷ و ۲۱ پیش از زایش ۲- میانگین مربعات روزهای اول زایش ۳- میانگین مربعات روزهای ۱۴، ۷ و ۲۱ پس از زایش

\*\* سطح معنی‌داری  $P < 0.05$ .

\* T1= Diet containing palm fat, T2= Diet with CLA supplement, T3= Diet containing flaxseed, T4= Diet containing a mixture of flax seed and CLA supplements, T5= Diet containing a mixture of sesame oil and meal  
 Least squares means for days 7, 14 and prepartum, 2= Least squares means for calving days 3= Least squares means for days 7, 14 and 21 postpartum  
 \*\* Significance level  $P < 0.05$ .

### نتیجه‌گیری کلی

دانه کتان با افزایش پروتئین کل پلاسما پس از زایش احتمال دارد باعث بهبود عملکرد کبد یا افزایش جذب اسیدهای آمینه از روده شود. با توجه به اینکه گاوهای تغذیه‌شده با دانه کتان کمترین اوره خون را دارند می‌توان این احتمال را داد که با توجه به قندساز بودن

دانه کتان باعث صرفه‌جویی در اسیدهای آمینه برای قندسازی از منابع غیرقندی شود. مکمل CLA با کاهش آسپاراتات آمینو ترانسفراز پیش از زایش آثار مثبتی بر بهبود فعالیت کبد دارد که احتمال دارد با افزایش بتا-اکسایش باعث کاهش تجمع تری‌گلیسیرید در کبد شود.

### REFERENCES

- Bertoni, G., Trevisi, E., Han, X. & Bionaz, M. (2008). Effects of Inflammatory Conditions on Liver Activity in Puerperium Period and Consequences for Performance in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3300-3310.
- Bobe, G., Young, J. W. & Beitz, D. C. (2004). Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3105-3124.
- Brickner, A. E., Pires, J. A. A., Gressley, T. F. & Grummer, R. R. (2009). Effects of abomasal lipid infusion on liver triglyceride accumulation and adipose lipolysis during fatty liver induction in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4954-4961.
- do Prado, R. M., Palin, M. F., do Prado, I. N., dos Santos, G. T., Benchaar, C. & Petit, H. V. (2016). Milk yield, milk composition, and hepatic lipid metabolism in transition dairy cows fed flaxseed or linola. *Journal of Dairy Science*, 99(11), 8831-8846.
- Drackley, J. K., Overton, T. R. & Douglas, G. N. (2001). Adaptations of Glucose and Long-Chain Fatty Acid Metabolism in Liver of Dairy Cows during the Periparturient Period. *Journal of Dairy Science*, 84, E100-E112.
- Esposito, G., Irons, P. C., Webb, E. C. & Chapwanya, A. (2014). Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 144(3-4), 60-97.
- Farid, A. S., Honkawa, K., Fath, E. M., Nonaka, N. & Horii, Y. (2013). Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. *BMC veterinary research*, 9(1), 73.
- Goodridge, J., Ingalls, J. R. & Crow, G. H. (2001). Transfer of omega-3 linolenic acid and linoleic acid to milk fat from flaxseed or Linola protected with formaldehyde. *Canadian Journal of Animal Science*, 81(4), 525-532. <https://doi.org/10.4141/A01-024>.
- Grummer, R. R. (2008). Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet.J.*, 176(1090-0233 (Print) LA - eng PT - Journal Article SB - IM), 10-20.
- Grummer, R. R. & Carroll, D. J. (1991). Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. *Journal of Animal Science*, 69(9), 3838-3852.
- Gudbrandsen, O. A., Rodríguez, E., Wergedahl, H., Mørk, S., Reseland, J. E., Skorve, J., Berge, R. K. (2009). Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid reduces the hepatic triacylglycerol content and the leptin mRNA level in adipose tissue in obese Zucker fa/fa rats. *British Journal of Nutrition*, 102(6), 803-815.
- Haag, M., Magada, O. N., Claassen, N., Böhmer, L. H. & Kruger, M. C. (2003). Omega-3 fatty acids modulate ATPases involved in duodenal Ca absorption. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 68(6), 423-429.
- Heravi Moussavi, A. R., Gilbert, R. O., Overton, T. R., Bauman, D. E. & Butler, W. R. (2007). Effects of Feeding Fish Meal and n-3 Fatty Acids on Ovarian and Uterine Responses in Early Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 90(1), 145-154.
- Hutchinson, I. A., Hennessy, A. A., Waters, S. M., Dewhurst, R. J., Evans, A. C. O., Lonergan, P. & Butler, S. T. (2012). Effect of supplementation with different fat sources on the mechanisms involved in reproductive performance in lactating dairy cattle. *Theriogenology*, 78(1), 12-27.
- Ii, J. W. P., Barbano, D. M., Bauman, D. E. & Overton, T. R. (2003). Production Responses of Dairy Cows to Dietary Supplementation with Conjugated Linoleic Acid (CLA) During the Transition Period and Early Lactation 1, 2. *Journal of Dairy Science*, 86(10), 3218-3228.
- Issi, M., Gül, Y. & Başbuğ, O. (2016). Evaluation of renal and hepatic functions in cattle with subclinical and clinical ketosis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 40(1), 47-52.
- Jenkins, T. C. & McGuire, M. A. (2006). Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition.



- Journal of Dairy Science*, 89(4), 1302-1310.
18. Kneegsel, A. T. M. Van, Brand, H. Van Den, Dijkstra, J. & Kemp, B. (2007). Effects of dietary energy source on energy balance , metabolites and reproduction variables in dairy cows in early lactation, 274-280.
  19. Mashek, D. G., Bertics, S. J. & Grummer, R. R. (2002). Metabolic Fate of Long-Chain Unsaturated Fatty Acids and Their Effects on Palmitic Acid Metabolism and Gluconeogenesis in Bovine Hepatocytes. *Journal of Dairy Science*, 85(9), 2283-2289.
  20. Mattos, R., Staples, C. R., Arteché, A., Wiltbank, M. C., Diaz, F. J., Jenkins, T. C. & Thatcher, W. W. (2004). The Effects of Feeding Fish Oil on Uterine Secretion of PGF 2  $\alpha$  , Milk Composition , and Metabolic Status of Periparturient Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 921-932.
  21. Mattos, R., Staples, C. R. & Thatcher, W. W. (2000). Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants, 5(2000), 38-45.
  22. Nudda, A., Correddu, F., Marzano, A., Battacone, G., Nicolussi, P., Bonelli, P. & Pulina, G. (2015). Effects of diets containing grape seed, linseed, or both on milk production traits, liver and kidney activities, and immunity of lactating dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 98(2), 1157-1166.
  23. Odens, L. J., Burgos, R., Innocenti, M., Vanbaale, M. J. & Baumgard, L. H. (2007). Effects of Varying Doses of Supplemental Conjugated Linoleic Acid on Production and Energetic Variables During the Transition Period 1. *Journal of Dairy Science*, 90(1), 293-305.
  24. Ospina, P. A., McArt, J. A., Overton, T. R., Stokol, T. & Nydam, D. V. (2013). Using nonesterified fatty acids and ??-hydroxybutyrate concentrations during the transition period for herd-level monitoring of increased risk of disease and decreased reproductive and milking performance. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 29(2), 387-412.
  25. Petit, H. V. (2015). Milk production and composition, milk fatty acid profile, and blood composition of dairy cows fed different proportions of whole flaxseed in the first half of lactation. *Animal Feed Science and Technology*, 205, 23-30.
  26. Petit, H. V., Dewhurst, R. J., Scollan, N. D., Proulx, J. G., Khalid, M., Haresign, W., Mann, G. E. (2002a). Milk Production and Composition, Ovarian Function, and Prostaglandin Secretion of Dairy Cows Fed Omega-3 Fats. *Journal of Dairy Science*, 85(4), 889-99.
  27. Petit, H. V., Dewhurst, R. J., Scollan, N. D., Proulx, J. G., Khalid, M., Haresign, W., Mann, G. E. (2002b). Milk Production and Composition, Ovarian Function, and Prostaglandin Secretion of Dairy Cows Fed Omega-3 Fats1. *Journal of Dairy Science*, 85(4), 889-899.
  28. Petit, H. V., Germiquet, C. & Lebel, D. (2004). Effect of Feeding Whole, Unprocessed Sunflower Seeds and Flaxseed on Milk Production, Milk Composition, and Prostaglandin Secretion in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 87(11), 3889-3898.
  29. Petit, H. V. & Benchaar, C. (2007). Milk production, milk composition, blood composition, and conception rate of transition dairy cows fed different profiles of fatty acids. *Canadian journal of animal science*, 87(4), 591-600.
  30. Petit, H. V., Palin, M. F. & Doepel, L. (2007). Hepatic Lipid Metabolism in Transition Dairy Cows Fed Flaxseed 1. *Journal of Dairy Science*, 90(10), 4780-4792.
  31. Qiu, X., Eastridge, M. L. & Firkins, J. L. (2004). Effects of dry matter intake, addition of buffer, and source of fat on duodenal flow and concentration of conjugated linoleic acid and trans-11 C18:1 in milk. *Journal of Dairy Science*, 87(12), 4278-4286.
  32. Rajesha, J., Murthy, K. N. C., Kumar, M. K., Madhusudhan, B. & Ravishankar, G. A. (2006). Antioxidant potentials of flaxseed by in vivo model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3794-3799.
  33. Gandra, J. R., Freitas Junior, J. E. D., Maturna Filho, M., Barletta, R. V., Verdurico, L. C. & Rennó, F. P. (2014). Soybean oil and calcium salts of fatty acids as fat sources for Holstein dairy cows in transition period. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 15(1), 83-93.
  34. Roy, R., Chandrasekhar, D. & Pujari, P. (2007). Dietary fish oil as hepatoprotective agent in *Mus musculus*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(4), 367-370.
  35. Schlegel, G., Ringseis, R., Windisch, W., Schwarz, F. J. & Eder, K. (2012). Effects of a rumen-protected mixture of conjugated linoleic acids on hepatic expression of genes involved in lipid metabolism in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(7), 3905-3918.