

О. В. Алейникова¹, А. А. Соломахин², О. С. Митяшова¹, И. Ю. Лебедева¹

Тиреоидный профиль крови у высокопродуктивных молочных коров при разной реакции яичников на суперовуляторную обработку

Аннотация.

Реакция яичников коров на суперовуляторную обработку существенно зависит от физиологического состояния животного, в первую очередь от его эндокринного статуса. Имеющаяся информация свидетельствует о том, что тиреоидные гормоны могут влиять на процессы овариального фолликулогенеза у крупного рогатого скота.

Цель: изучение тиреоидного профиля в крови высокопродуктивных молочных коров в связи с реакцией яичников на суперовуляторную обработку.

Материалы и методы. Исследовано 34 цикла стимуляции суперовуляции у 16 коров голштинской породы. После синхронизации полового цикла и суперовуляторной обработки в первый день осеменения животных с помощью УЗИ сканера в каждом яичнике регистрировали число фолликулов диаметром более 5 мм. Кроме того, в этот день и на 7 день после осеменения у коров брали кровь для анализа содержания половых стероидных и тиреоидных гормонов методом ИФА. Реакцию яичников оценивали по общему числу выявленных фолликулов и разделили на 3 типа: I — более 12 фолликулов (сильная), II — 8–12 фолликулов (умеренная), III — менее 8 фолликулов (слабая).

Результаты. Содержание половых стероидных гормонов в крови коров в день осеменения не зависело от типа овариального ответа. К 7-му дню после осеменения концентрация прогестерона возрастала у большинства животных, но была в 2,7 раза выше ($P < 0,01$) в случае сильной реакции (I типа), чем в случае слабой (III типа). Сывороточная концентрация эстрадиола-17 β , напротив, снижалась в 1,1 раза ($P < 0,05$) у коров с умеренным овариальным ответом (II типа). У животных с реакцией I типа содержание тироксина (Т4) в крови уменьшалось в 1,2 раза ($P < 0,05$) через 1 неделю после осеменения. В исследуемый период также наблюдалось снижение концентрации общего трийодтиронина (Т3) и реверсивного Т3 (rТ3) у коров с овариальным ответом I и II типа (в 1,1–1,3 раза, $P < 0,01$ – $0,05$). При этом в день осеменения содержание Т3 в крови особей с реакцией II типа было в 1,2 раза выше ($P < 0,05$), чем у особей с реакцией III типа. В целом, обнаружена позитивная взаимосвязь между концентрацией эстрадиола-17 β и концентрацией тиреоидных гормонов: для Т4 — в случае овариального ответа II типа ($r = 0,44$, $P < 0,05$), для Т3 — в случае ответа I и II типа ($r = 0,57$ – $0,64$, $P < 0,001$ – $0,05$), для rТ3 — в случае ответа III типа ($r = 0,52$, $P < 0,01$).

Заключение. Таким образом, содержание трийодтиронина в крови высокопродуктивных молочных коров в день осеменения связано с овариальным ответом на суперовуляторную обработку. Кроме того, в течение недели после осеменения состояние тиреоидной системы и его связь с уровнем эстрадиола-17 β в крови различаются при разной реакции яичников на введение экзогенных гонадотропных гормонов.

Ключевые слова: высокопродуктивные молочные коровы, суперовуляторная обработка, реакция яичников, тиреоидные гормоны, прогестерон, эстрадиол-17 β .

Авторы:

Алейникова Ольга Викторовна — аспирант, младший научный сотрудник; e-mail: 68ovk@mail.ru;

Соломахин Алексей Александрович — кандидат биологических наук, начальник отдела; e-mail: alsolomahin@yandex.ru;

Митяшова Ольга Сергеевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; e-mail: mityashova_o@mail.ru;

Лебедева Ирина Юрьевна — доктор биологических наук, главный научный сотрудник, зав. лабораторией; e-mail: irledv@mail.ru.

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», 142132, Московская область, городской округ Подольск, поселок Дубровицы, д. 60.

² АО «Московское» по племенной работе», 142401, Московская область, г. Ногинск, ул. Соединительная, д. 7.

Введение. Репродуктивные технологии, используемые для ускорения генетического прогресса в молочном скотоводстве, направлены на получение как можно большего числа эмбрионов от наиболее ценных особей и их успешную пересадку менее ценным реципиентам [1]. На начальном этапе стоит задача увеличения числа фолликулов, способных отвечать на суперовуляторную обработку, путем стимуляции их роста и ингибирования атрезии. Для индукции множественных овуляций на основе запаса овариальных фолликулов, имеющегося у коров-доноров, применяют гормональную обработку животных различными препаратами, содержащими фолликулостимулирующий (ФСГ) и лютеинизирующий гормоны (ЛГ). Несмотря на значительные достижения в области производства препаратов с высокоочищенными ФСГ и ЛГ и совершенствования протоколов их применения [2], полученные результаты не всегда оптимальны. Высокая вариабельность ответа яичников на суперовуляторную обработку, очевидно, является следствием разного физиологического статуса животных, в том числе состояния их эндокринной системы [3]. Однако этот вопрос до сих пор недостаточно изучен.

Хотя гонадотропные и половые стероидные гормоны играют основную роль в регуляции функции яичников у млекопитающих, но и другие эндокринные и паракринные факторы участвуют в ее модуляции [4]. Данные, полученные разными исследователями, свидетельствуют о том, что тиреоидные гормоны могут влиять на процессы овариального фолликулогенеза. Так, у коров показано присутствие свободного тироксина и трийодтиронина в фолликулярной жидкости, а также экспрессия специфических тиреоидных рецепторов в клетках кумулюса [5, 6]. В исследованиях *in vitro* было продемонстрировано модулирующее действие гормонов щитовидной железы на стероидогенную активность фолликулярных клеток коров и способность трийодтиронина усиливать ингибирующее влияние ФСГ на апоптотические изменения клеток гранулы свиней и крыс [7–9]. Таким образом, тиреоидная система могла бы участвовать в модуляции роста и атрезии фолликулов, отвечающих на стимуляторное воздействие экзогенных гонадотропных гормонов.

Цель исследований — изучить тиреоидный профиль в крови высокопродуктивных молочных коров в связи с реакцией яичников на суперовуляторную обработку.

Материалы и методы. Работу проводили в лаборатории биологических проблем репродукции животных ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста и на базе Волоколамского отделения АО «Мос-

ковское» по племенной работе». В экспериментах было исследовано 34 цикла стимуляции суперовуляции у 16 коров голштинской породы со средней продуктивностью 12114 ± 203 кг молока за 305 дней лактации. Синхронизацию полового цикла проводили путем инъекции 3 мл эстрофана («Биовета», Чехия) на 1 и 11 дни обработки. Стимуляцию суперовуляции выполняли с использованием препарата Плюсет («Laboratorios Calier», Испания), применяя нисходящую дозу (от 4 до 0,5 мл) с 24 по 27 день обработки. Осеменение коров проводили двукратно, на 27 и 28 дни. В первый день осеменения (день 0) с помощью УЗИ сканера CTS-800 (SIUI, Китай) в каждом яичнике регистрировали число фолликулов диаметром более 5 мм. Кроме того, в этот день и на 7 день после первого осеменения (день 7) у коров брали кровь для анализа. Реакцию яичников оценивали по общему числу выявленных фолликулов и разделили на 3 типа: I — более 12 фолликулов (сильная; $n=9$), II — 8–12 фолликулов (умеренная; $n=13$), III — менее 8 фолликулов (слабая; $n=12$).

Концентрацию половых стероидных и тиреоидных гормонов в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием планшетного спектрофотометра Униплан (Пикон, Россия). ИФА проводили согласно инструкции производителей соответствующих коммерческих наборов: прогестерон (P4) и эстрадиол-17 β (E2) — ООО «Хема» (Россия), общий тироксин (T4) и трийодтиронин (T3) — НВО Иммунотех (Россия), реверсивный трийодтиронин (rT3) — Diagnostics Biochem Canada, Inc. (Канада). Чувствительность метода составляла 0,25 нмоль/л (прогестерон), 0,025 нмоль/л (эстрадиол-17 β), 5,0 нмоль/л (общий тироксин), 0,15 нмоль/л (общий трийодтиронин), 0,03 нмоль/л (реверсивный трийодтиронин). Коэффициент вариации в анализах не превышал 18%.

Данные обрабатывали методом однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями при помощи программы SigmaStat 4.0 (Systat Software, Inc.). В качестве фактора повторных измерений использовали период времени относительно осеменения. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки. Полученные результаты выражали как средние значения $\pm$ стандартные ошибки. Корреляционные отношения вычисляли с помощью коэффициента Пирсона.

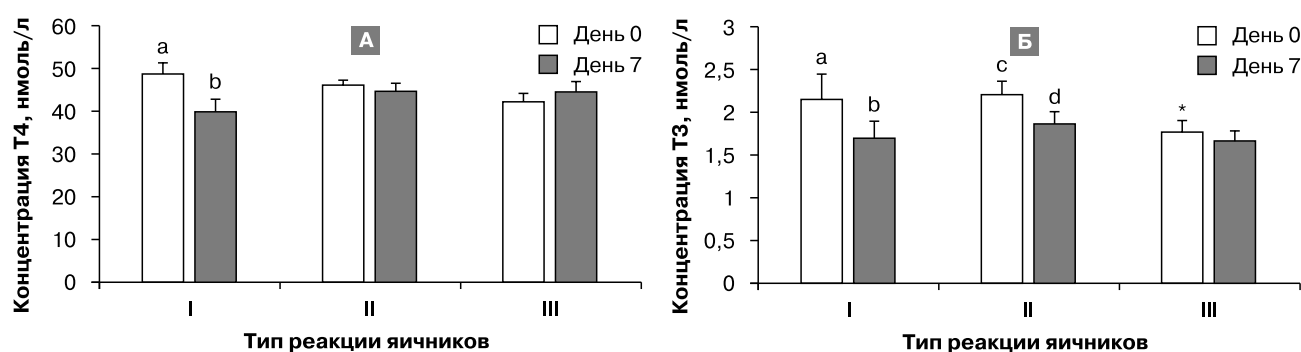
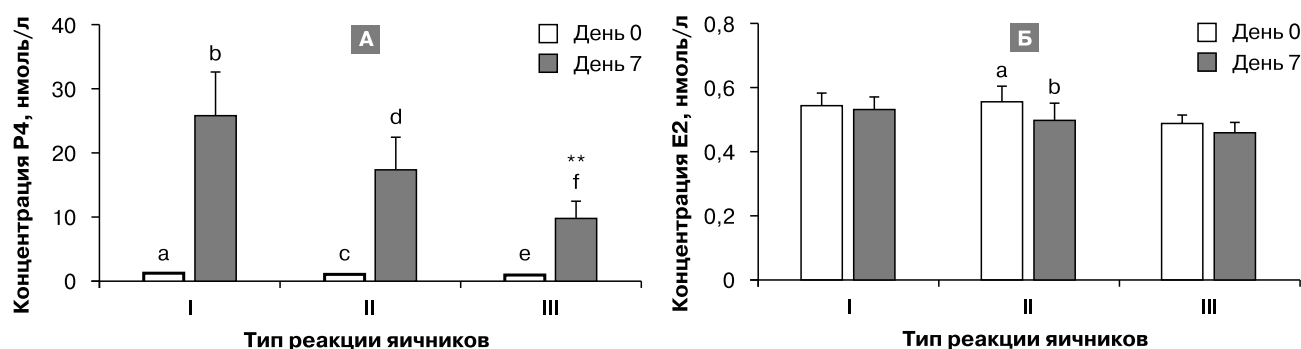
Результаты и обсуждение. Содержание прогестерона в крови коров в день осеменения не зависело от типа реакции яичников и многократно

возрастало ($P < 0,001-0,05$) к 7 дню у большинства животных (рис. 1А). Через неделю после осеменения средняя концентрация этого гормона была в 2,7 раза выше ($P < 0,01$) в случае сильной овариальной реакции (I типа), чем в случае слабой (III типа), что предполагает образование большего числа функциональных желтых тел в первой группе. Сывороточное содержание эстрадиола-17 β у коров с разным овариальным ответом не различалось как в день осеменения, так и через 1 неделю (рис. 1Б). Тем не менее в течение этого периода у животных с умеренной реакцией (II типа) происходило снижение данного показателя в 1,1 раза ($P < 0,05$).

В день осеменения концентрация в крови тироксина и реверсивного трийодтиронина, а через 7 дней — концентрация всех трех тиреоидных гормонов была одинаковой у животных с разным

типом реакции яичников (рис. 2). В то же время изменение этих концентраций между днем 0 и днем 7 было различным. У животных с сильным овариальным ответом содержание тироксина в крови уменьшалось в 1,2 раза ($P < 0,05$) через 1 неделю после осеменения (рис. 2А). В данный период также наблюдалось снижение концентрации общего и реверсивного трийодтиронина при сильной (в 1,1–1,3 раза, $P < 0,01$) и умеренной (в 1,1–1,2 раза, $P < 0,05$) реакции яичников (рис. 2Б и В). При этом в день осеменения содержание общего трийодтиронина в крови коров с реакцией II типа было в 1,2 раза выше ($P < 0,05$), чем у коров с реакцией III типа, но было сходно с таковым у коров с реакцией I типа (рис. 2Б).

При проведении ассоциативных исследований была выявлена положительная связь концентрации эстрадиола-17 β с концентрацией тиреоидных



гормонов (табл. 1): общего тироксина — при умеренной реакции яичников ($p < 0,05$), общего трийодтиронина — при сильной ($p < 0,05$) и умеренной реакции ($p < 0,01$) и реверсивного трийодтиронина — при слабой реакции ($p < 0,01$).

Различие в содержании общего трийодтиронина в крови было единственным различием в эндокринном статусе коров, выявленным в день регистрации овариального ответа. Хотя этот показатель был самым высоким у особей с умеренной реакцией яичников, он не отличался от такового у особей с сильной реакцией ($2,21 \pm 0,15$ против $2,16 \pm 0,28$ нмоль/л). Следует подчеркнуть, что именно трийодтиронин представляет наиболее активную форму тиреоидных гормонов, способную влиять на функциональную активность клеток [10]. Недавно было продемонстрировано ростостимулирующее и антиапоптотическое действие трийодтиронина, особенно в сочетании с ФСГ, на преантральные фолликулы крыс [11, 12]. Можно предположить, что более высокое содержание этого гормона в крови коров с более многочисленной популяцией растущих антральных фолликулов связано с его способностью оказывать сходное влияние на преантральные фолликулы таких животных. Альтернативно, более низкая концентрация общего трийодтиронина в крови особей с небольшим числом растущих фолликулов могла быть следствием более слабой реакции организма на суперовуляторную обработку.

Изменение содержания в крови тиреоидных гормонов в течение недели после осеменения различалось у коров с разным типом овариального ответа. Снижение концентрации тироксина, свидетельствующее об уменьшении активности щитовидной железы, наблюдалось только у животных с сильной реакцией яичников. В то же время снижение содержания общего и реверсивного трийодтиронина, предполагающее уменьшение активности дейодиназ [13], происходило как у особей с сильным, так и с умеренным ответом. Это свидетельствует о том, что у таких животных тиреоидная система была более чувствительна к изменениям, происходящим в организме в данный период. Одним из факторов, влияющих на активность тиреоидной системы, мог служить эстрадиол-17 β , концентрация которого в крови положительно коррелировала с концентрацией тиреоидных гормонов. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что наличие такой корреляции также зависело от типа овариальной реакции на суперовуляторную обработку.

Заключение. Таким образом, содержание трийодтиронина в крови высокопродуктивных молочных коров в день осеменения связано с овариальным ответом на суперовуляторную обработку. Кроме того, в течение недели после осеменения состояние тиреоидной системы и его связь с уровнем эстрадиола-17 β в крови различаются при разной реакции яичников на введение экзогенных гонадотропных гормонов.

Таблица 1. Взаимосвязь содержания эстрадиола-17 β и тиреоидных гормонов в крови коров с разной реакцией яичников на суперовуляторную обработку

Сравниваемые концентрации		Коэффициент корреляции, r		
		I	II	III
T4	E2	0,082	0,439*	-0,179
T3	E2	0,567*	0,637***	0,024
rT3	E2	-0,176	0,370	0,516**

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-316-90054 Аспиранты).

Литература

1. Mapletoft R. J. Assisted reproductive technologies in cattle: a review / R. J. Mapletoft, J. F. Hasler // Rev. Sci. Tech. — 2005. — V. 24. — P. 393–403. doi: 10.20506/rst.24.1.1582.
2. Mapletoft R. J. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle / R. J. Mapletoft, G. A. By // Reprod. Fertil. Dev. — 2011. — V. 24. — P. 278–283. doi: 10.1071/RD11919.
3. Mikkola M. Factors affecting embryo production in superovulated Bos taurus cattle / M. Mikkola, J. F. Hasler, J. Taponen // Reprod. Fertil. Dev. — 2019. — V. 32. — P. 104–124. doi: 10.1071/RD19279.
4. Shimizu T. Molecular and cellular mechanisms for the regulation of ovarian follicular function in cows / T. Shimizu // J. Reprod. Dev. — 2016. — V. 62. — P. 323–329. doi: 10.1262/jrd.2016-044.

5. Ashkar F. A. Thyroid hormone concentrations in systemic circulation and ovarian follicular fluid of cows / F. A. Ashkar, P. M. Bartlewski, J. Singh, et al. // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). — 2010. — V. 235. — P. 215–221. doi: 10.1258/ebm.2009.009185.
6. Costa N. N. Effect of triiodothyronine on developmental competence of bovine oocytes / N. N. Costa, M. S. Cordeiro, T. V. Silva, et al. // *Theriogenology*. — 2013. — V. 80. — P. 295–301. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.04.011.
7. Spicer L. J. Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins / L. J. Spicer, J. Alonso, C. S. Chamberlain // *J. Dairy Sci.* — 2001. — V. 84. — P. 1069–1076. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74567-5.
8. Asahara S. Thyroid hormone synergizes with follicle stimulating hormone to inhibit apoptosis in porcine granulosa cells selectively from small follicles / S. Asahara, A. Sato, A. A. Aljonaid, T. Maruo // *Kobe J. — Med. Sci.* — 2003. — V. 49. — P. 107–116.
9. Zhang C. Interactions of thyroid hormone and FSH in the regulation of rat granulosa cell apoptosis / C. Zhang, G. Xia, B. K. Tsang // *Front. Biosci. (Elite Ed.)* — 2011. — V. 3. — P. 1401–1413. doi: 10.2741/E342. PMID: 21622145.
10. Mullur R. Thyroid hormone regulation of metabolism / R. Mullur, Y. Y. Liu, G. A. Brent // *Physiol. Rev.* — 2014. — V. 94. — P. 355–382. doi: 10.1152/physrev.00030.2013.
11. Zhang C. Effects of 3, 5, 3'-triiodothyronine (t3) and follicle stimulating hormone on apoptosis and proliferation of rat ovarian granulosa cells / C. Zhang, L. Guo, B. Zhu, et al. // *Chin. J. Physiol.* — 2013. — V. 56. — P. 298–305. doi: 10.4077/CJP.2013.BAB186.
12. Canipari R. Thyroid hormones act as mitogenic and pro survival factors in rat ovarian follicles / R. Canipari, C. Mangialardo, V. Di Paolo, et al. // *J. Endocrinol. Invest.* — 2019. — V. 42. — P. 271–282. doi: 10.1007/s40618-018-0912-2.
13. Pezzi C. 5'-deiodinase activity and circulating thyronines in lactating cows / C. Pezzi, P. A. Accorsi, D. Vigo, et al. // *J. Dairy Sci.* — 2003. — V. 86. — P. 152–158. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73595-4.

Aleinikova O.¹, Solomakhin A.², Mityashova O.¹, Lebedeva I.¹

Thyroid blood profile in high-yielding dairy cows with different ovarian reactions to superovulatory treatment

Abstract.

The reaction of cow ovaries to superovulatory treatment significantly depends on the physiological state of the animal, primarily on its endocrine status. The available information indicates that thyroid hormones can affect the processes of ovarian folliculogenesis in cattle.

Objective: *To study the thyroid profile in the blood of high-yielding dairy cows in relation to the response of the ovaries to superovulatory treatment.*

Materials and methods. *Thirty four cycles of superovulation stimulation in 16 Holstein cows were studied. After synchronization of the estrous cycle and superovulatory treatment, on the first day of insemination (Day 0), the number of follicles with a diameter of more than 5 mm was recorded in each ovary using an ultrasound scanner. Furthermore, on Day 0 and on the 7th day after insemination (Day 7), the blood was taken from the cows to analyze the content of sex steroids and thyroid hormones by ELISA. The ovarian reaction was assessed by the total number of detected follicles and was divided into 3 types: I — more than 12 follicles (strong), II — 8–12 follicles (moderate), III — less than 8 follicles (weak).*

Results. *The content of sex steroid hormones in the blood of cows on Day 0 did not depend on the type of the ovarian response. By Day 7, the concentration of progesterone increased in most animals, but was 2.7-fold higher ($P < 0.01$) in the case of the strong reaction (type I) than in the case of the weak reaction (type III). Conversely, the serum concentration of estradiol-17 β decreased 1.1 times ($P < 0.05$) in cows with the moderate ovarian response (type II). In animals with the type I reaction, the content of thyroxine [T₄] in the blood declined 1.2 times ($P < 0.05$) one week after insemination. During the study period, there was also a reduction in the concentration of total triiodothyronine [T₃] and reverse T₃ (rT₃) in cows with ovarian responses of types I and II (1.1–1.3 times, $P < 0.01$ – 0.05). Concurrently, on Day 0, the T₃ content in the blood of individuals with the type II reaction was 1.2-fold*

higher ($P < 0.05$) than in individuals with the type III reaction. Totally, a positive relationship was found between the concentration of estradiol-17 β and the concentration of thyroid hormones: for T₄ — in the case of the type II ovarian response ($r = 0.44$, $P < 0.05$), for T₃ — in the case of the type I and II responses ($r = 0.57$ – 0.64 , $P < 0.001$ – 0.05), for rT₃ — in the case of the type III response ($r = 0.52$, $P < 0.01$).

Conclusions. Thus, the content of triiodothyronine in the blood of high-yielding dairy cows on the day of insemination is associated with the ovarian response to superovulatory treatment. In addition, during one week after insemination, the state of the thyroid system and its relationship with the level of estradiol-17 β in the blood differ with different reactions of the ovaries to the introduction of exogenous gonadotropic hormones.

Keywords: high-yielding dairy cows, superovulatory treatment, ovarian response, thyroid hormones, progesterone, estradiol-17 β .

Authors:

Aleinikova O. — postgraduate student, junior researcher; e-mail: 68ovk@mail.ru;

Mityashova O. — PhD (Biol. Sci.), senior researcher; e-mail: mityashova_o@mail.ru;

Solomakhin A. — PhD (Biol. Sci.), head of department; e-mail: alsolomahin@yandex.ru;

Lebedeva I. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), head of laboratory; e-mail: irledv@mail.ru.

¹ L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry; Dubrovitsy, 60, Podolsk Municipal District, Moscow Region, 142132.

² AO «Moskovskoe» for breeding work», 142401, Moscow Region, Noginsk, Connective st., 7.

References

1. Mapletoft R. J. Assisted reproductive technologies in cattle: a review / R. J. Mapletoft, J. F. Hasler // Rev. Sci. Tech. — 2005. — V. 24. — P. 393–403. doi: 10.20506/rst.24.1.1582.
2. Mapletoft R. J. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle / R. J. Mapletoft, G. A. By // Reprod. Fertil. Dev. — 2011. — V. 24. — P. 278–283. doi: 10.1071/RD11919.
3. Mikkola M. Factors affecting embryo production in superovulated Bos taurus cattle / M. Mikkola, J. F. Hasler, J. Taponen // Reprod. Fertil. Dev. — 2019. — V. 32. — P. 104–124. doi: 10.1071/RD19279.
4. Shimizu T. Molecular and cellular mechanisms for the regulation of ovarian follicular function in cows / T. Shimizu // J. Reprod. Dev. — 2016. — V. 62. — P. 323–329. doi: 10.1262/jrd.2016-044.
5. Ashkar F. A. Thyroid hormone concentrations in systemic circulation and ovarian follicular fluid of cows / F. A. Ashkar, P. M. Bartlewski, J. Singh, et al. // Exp. Biol. Med. (Maywood). — 2010. — V. 235. — P. 215–221. doi: 10.1258/ebm.2009.009185.
6. Costa N. N. Effect of triiodothyronine on developmental competence of bovine oocytes / N. N. Costa, M. S. Cordeiro, T. V. Silva, et al. // Theriogenology. — 2013. — V. 80. — P. 295–301. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.04.011.
7. Spicer L. J. Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins / L. J. Spicer, J. Alonso, C. S. Chamberlain // J. Dairy Sci. — 2001. — V. 84. — P. 1069–1076. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74567-5.
8. Asahara S. Thyroid hormone synergizes with follicle stimulating hormone to inhibit apoptosis in porcine granulosa cells selectively from small follicles / S. Asahara, A. Sato, A. A. Aljonaid, T. Maruo // Kobe J. — Med. Sci. — 2003. — V. 49. — P. 107–116.
9. Zhang C. Interactions of thyroid hormone and FSH in the regulation of rat granulosa cell apoptosis / C. Zhang, G. Xia, B. K. Tsang // Front. Biosci. (Elite Ed.) — 2011. — V. 3. — P. 1401–1413. doi: 10.2741/E342. PMID: 21622145.
10. Mullur R. Thyroid hormone regulation of metabolism / R. Mullur, Y. Y. Liu, G. A. Brent // Physiol. Rev. — 2014. — V. 94. — P. 355–382. doi: 10.1152/physrev.00030.2013.
11. Zhang C. Effects of 3, 5, 3'-triiodothyronine (t3) and follicle stimulating hormone on apoptosis and proliferation of rat ovarian granulosa cells / C. Zhang, L. Guo, B. Zhu, et al. // Chin. J. Physiol. — 2013. — V. 56. — P. 298–305. doi: 10.4077/CJP.2013.BAB186.
12. Canipari R. Thyroid hormones act as mitogenic and pro survival factors in rat ovarian follicles / R. Canipari, C. Mangialardo, V. Di Paolo, et al. // J. Endocrinol. Invest. — 2019. — V. 42. — P. 271–282. doi: 10.1007/s40618-018-0912-2.
13. Pezzi C. 5'-deiodinase activity and circulating thyronines in lactating cows / C. Pezzi, P. A. Accorsi, D. Vigo, et al. // J. Dairy Sci. — 2003. — V. 86. — P. 152–158. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73595-4.