

Zawartość interleukin i metabolizm lipidów w surowicy krwi krów z subkliniczną ketozą

DMYTRO KIBKAŁO, OLGA TYMOSZENKO, HALINA WIKULINA

Zakład Chorób Wewnętrznych i Diagnostyki Klinicznej Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Państwowy Uniwersytet Biotechnologiczny w Charkowie, ul. Alczewskich 44, 61002 Charków, Ukraina

Otrzymano 11.05.2023

Zaakceptowano 02.08.2023

Kibkalo D., Timoshenko O., Vikulina G.

Serum interleukin content and lipid metabolism in cows with subclinical ketosis

Summary

This paper analyses the diagnostic utility of interleukins (1, 4, 6) and lipid metabolism products (cholesterol, triacylglycerols, lipoprotein fractions) in subclinical ketosis in cows. It was found that serum levels of pro-inflammatory (IL-1 and IL-6) and anti-inflammatory (IL-4) interleukins in cows with ketosis did not differ from those in clinically healthy animals. This therefore indicates the absence of inflammation in the subclinical form of ketosis. These data were also confirmed by normal α 1- and α 2-globulin levels. IL-6 is known to increase the synthesis of acute phase inflammatory proteins. There was no significant difference in the IL-4 content between the experimental and control groups of cows. In the subclinical form of ketosis in cows, abnormalities in lipid and lipoprotein metabolism were detected in the form of hypertriglyceridaemia and hyperlipoproteinaemia with very low-density lipoproteins, an increase in low-density lipoproteins, and a decrease in very high-density lipoproteins. This was verified by similar changes in β -lipoprotein levels and lipoprotein fractions and was specific to the first stage of lipomobilisation syndrome.

Keywords: interleukins, ketosis, cows, proteins, lipids, lipoproteins

W okresie poporodowym u krów występuje ujemny bilans energetyczny, co prowadzi do zwyrodnienia tłuszczowego wątroby. Stłuszczenie tego organu ma poważny wpływ na zdrowie i reprodukcję zwierząt (10). Wszystkie wysoko wydajne krowy mleczne mają ujemny bilans energetyczny na początku laktacji. Wysoka lipomobilizacja jest u nich normalną reakcją fizjologiczną (1), jednak głęboki deficyt energii może prowadzić do wzrostu poziomu ciał ketonowych, a tym samym do subklinicznej lub klinicznej ketozy. Subkliniczna ketoza jest jednym z najczęstszych zaburzeń metabolicznych u wysoko wydajnych krów mlecznych we wczesnej laktacji (18). W rzeczywistości potrzeba produkcji mleka wymaga znacznej ilości energii. Jej niedobór powoduje zwiększoną podatność na zaburzenia metaboliczne (13), dlatego wczesne wykrywanie i zapobieganie subklinicznej ketozie jest bardzo ważne ze względów ekonomicznych i dobrostanu zwierząt (5). Opracowanie zweryfikowanych modeli predykcyjnych stanowi wyzwanie, ponieważ ketoza jest zwykle zależna od wielu czynników.

W literaturze naukowej istnieje wiele badań dotyczących etiologii, diagnostyki, terapii i zapobiegania ketozie u bydła. Niektóre z nich poświęcone są ustaleniu

kryteriów diagnostycznych ketozy w próbkach mleka (1, 10, 13, 18) lub krwi (2, 7, 9, 11, 12, 15, 17), inne koncentrują się na patologii wielonarządowej, takiej jak: ketoza-endometritis, endometritis-hipoluteoliza i ketoza-endometritis-hipoluteoliza (10). Według badań (13) najczęstszymi patologiami poporodowymi są: ketoza, hipoluteoliza, inwolucja macicy, hipokalcemia, zatrzymanie popłodu i zapalenie błony śluzowej macicy. Choroby te mają największy wpływ na późniejszy okres laktacji, a nawet mogą determinować późniejsze produkcyjne wykorzystanie zwierząt (7).

W jednym z badań (4) przedstawiono stopień hipoglikemii, ketonemii i ketozy u krów rasy holsztyńskiej o wysokiej produkcji mleka. Autorzy (7) uważają, że głównym wskaźnikiem postępujących zaburzeń metabolicznych u krów we wczesnym okresie poporodowym jest obniżenie stężenia glukozy we krwi poniżej 2,2 mmol/l. Zaproponowano również praktyczne wykorzystanie monitorowania glikemii u krów 2 tygodnie przed i 3 tygodnie po wycieleniu (11).

Główne objawy kliniczne ketozy to: zmniejszony apetyt i odmowa przyjmowania paszy, zmniejszona produkcja mleka, atonia żwacza, oddech acetonowy i kliniczne objawy odwodnienia. Rozwojowi ketozy

towarzyszy spektrum reakcji patobiochemicznych. Wyraźny jest rozwój zespołu zatrucia i miejscowej reakcji zapalnej. Występują również biochemiczne objawy niedoboru żywieniowego, takie jak: hipalbuminemia, hipocholesterolemia, hipokalcemia, hipofosfatemia. Objawy reakcji zapalnej to wzrost całkowitej liczby leukocytów, a także przesunięcie obrazu leukocytów w prawo i nagromadzenie segmentowanych neutrofilii. Ważne oznaki procesu patologicznego obejmują spadek bezwzględnej liczby limfocytów o 10,8%, głównie z powodu utraty odporności komórek T u krów z objawami ketonemii i średnią zawartością wodorowęglanów. U klinicznie chorych krów stwierdzono tendencję do wzrostu aktywności transaminaz (aminotransferazy asparaginianowej), dehydrogenazy mleczanowej i fosfatazy alkalicznej we krwi (12).

Stwierdzono, że u krów w 5.-7. miesiącu ciąży z subkliniczną ketozą występuje wzrost stężenia kwasu hydroksymasłowego, co wskazuje na supresję mikroflory jelita, która bierze udział w syntezie kwasu propionowego i kobalaminy. Wskazuje to na ketozę związaną z hamowaniem produkcji adenozylokobalaminy, pochodnej kobalaminy i koenzymu mutazy metylomalonylo-CoA, który jest przekształcany w metylomalonylo-CoA, wytwarzający sukcylo-CoA z propionianu. Jest ona niezbędna do utleniania ciał ketonowych w cyklu Krebsa, w tym hydroksymasłanu. Wykorzystanie witaminy B12 w organizmie nie zmniejsza się dramatycznie i nadal jest wystarczające do produkcji fosfatydylocholiny, niezbędnej do zapobiegania stłuszczeniu wątroby. Istnieje tendencja do zmniejszania zawartości tego fosfolipidu w surowicy krwi krów z subkliniczną ketozą. Objawy niedokrwistości, towarzyszącego niedotlenienia krwi i stresowi oksydacyjnemu nie są jeszcze wyraźne, pomimo obniżenia się zawartości żelaza we krwi i zdolności wiązania żelaza w osoczu. Jego brak zapobiega rozwojowi dysfunkcji wątroby i innym objawom niewydolności narządów (11).

Niektóre badania sugerują wykorzystanie wskaźnika tłuszczowo-białkowego (FPR) jako wskaźnika ketozy w badaniu krwi (13).

Inne dane wskazują na wzrost stężenia kwasu β -hydroksymasłowego w surowicy krwi w pierwszym i drugim tygodniu po wycieleniu. Jest to związane z niższą procentową zawartością białka mleka i wyższą zawartością tłuszczu w pierwszym dniu laktacji (15). W okresie przed porodem krowy mleczne przechodzą dramatyczne zmiany fizjologiczne. W ciągu 2 tygodni po wycieleniu krowy są narażone na wysokie ryzyko chorób. Te zmiany fizjologiczne wpływają również na ich układ odpornościowy, w efekcie czego dochodzi do wytworzenia u krów niskiej kompetencji immunologicznej (2), dlatego w tym przypadku naukowcy sugerują zastosowanie testu immunokompetencji, ponieważ γ -interferon (IFN γ), czynnik martwicy nowotworów, IL-17 i IL-10 wykazują stan obniżonej immunokompetencji u średnich krów po wycieleniu (2).

Materiał i metody

Badaniu poddano czerwono-białe krowy mleczne w wieku 3-5 lat ($n = 14$). Ich wydajność wynosiła ponad 6000 litrów na laktację. Krowy podzielono na 2 grupy: kontrolną ($n = 7$) i doświadczalną ($n = 7$). Grupa eksperymentalna obejmowała krowy z poziomem ciał ketonowych w surowicy krwi (1,1-2,1 mmol/l). Krowy te wykazywały następujące objawy kliniczne: hiporeksję, depresję, tachykardię, tachypnoe. Krowy z grupy kontrolnej były klinicznie zdrowe; poziom ciał ketonowych w surowicy krwi wynosił od 0,4 do 0,7 mmol/l. Badanie zwierząt i pobranie krwi do analizy przeprowadzono w pierwszym tygodniu po zakończeniu laktacji.

Przeprowadzono ogólne badanie kliniczne krów i oznaczono poziom ciał ketonowych metodą przy użyciu ketometru Optium Xceed (USA). W przypadku badań krwi przy użyciu ketometru i liczby leukocytów próbki pobierano z żyły ogonowej. Wyniki uzyskiwano w ciągu 5-10 sekund. Normalna wartość dla ciał ketonowych wynosi do 0,6 mmol na litr. Wartości od 0,6 do 1 mmol/l są uważane za nieznacznie podwyższone, ale nie wymagają natychmiastowego działania. Poziomy ketonów powyżej 1 i do 1,4 mmol/l wskazują na subkliniczną ketozę, która wymaga leczenia. Jeśli wartość wynosi 1,5 mmol/l lub więcej, można mówić o ketozie, która wymaga natychmiastowej interwencji. Do określenia liczby leukocytów wykorzystywano komorę Goryaeva po pobraniu i rozcieńczeniu krwi metodą melanzową.

Próbki krwi pobierano z żyły szyjnej do sterylnych próbek próżniowych bez dodatku antykoagulantów. W celu przyspieszenia tworzenia się skrzepu próbki umieszczono w termostacie o temperaturze 37°C. Następnie próbki krwi wirowano w laboratoryjnej wirówce klinicznej (OPN-3) przy 3000 obr./min przez 10 minut. W surowicy przeprowadzono badania biochemiczne w laboratorium ALVIS-class (Charków, Ukraina). Poziom albuminy i frakcje globulin (alfa1, alfa2, beta i gamma) określono w próbkach krwi za pomocą turbidymetrii. Następnie obliczono stosunek albuminy do globuliny (A/G). Poziom interleukiny (IL) oznaczono metodą immunoenzymatyczną przy użyciu systemu testowego Peninsula laboratories Inc. (USA). W surowicy oznaczono również poziom: cholesterolu całkowitego i triacylogliceroli metodą enzymatyczno-kolorymetryczną, frakcji lipoprotein (o wysokiej gęstości (HDL), niskiej gęstości (LDL) i bardzo niskiej gęstości (VLDL), stosunek frakcji lipoprotein (wskaźnik aterosogenności w medycynie ludzkiej, FLR), stężenie β -lipoprotein (LP) metodą turbidymetryczną (Burshtein i Samay).

HDL (lub α -lipoproteinę) oznaczano po wytrąceniu z osocza za pomocą heparyny, chlorku manganu lub innego środka strącającego lipoproteiny. W celu określenia zawartości cholesterolu LDL, zastosowano następujący wzór: cholesterol całkowity – (cholesterol HDL + cholesterol VLDL). Wzór użyty do określenia VLDL to: triacyloglicerole/2,181. FLR obliczono przy użyciu następującego wzoru: (LPDL + LPDL)/LPDL.

Uzyskane wyniki zostały poddane ocenie statystycznej przy użyciu testu t-Studenta. Istotność statystyczną ustalono na poziomie $p < 0,05$. Wszystkie dane zostały wyrażone jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. Różnice między grupami oceniano za pomocą testów t dla prób niezależnych.

Wyniki i omówienie

Stwierdzono, że zawartość leukocytów nie różniła się między krowami obu grup (tab. 1). Była ona jednak nieco wyższa w grupie zwierząt eksperymentalnych i mogła wskazywać na stopniowy rozwój procesu zapalnego u zwierząt hiperketonemicznych.

W subklinicznym przebiegu ketozy poziom prozapalnych interleukin IL-1 i IL-6 w surowicy krwi nie różnił się od poziomu u klinicznie zdrowych zwierząt. Uzyskane dane potwierdzają brak znaczących różnic w poziomach α_1 - i α_2 -globulin, ponieważ IL-6 zwiększa syntezę białek zapalnych ostrej fazy, które są częścią tych ostatnich. Zawartość IL-4 również nie różniła się znacząco w grupach doświadczalnych i kontrolnych krów.

U krów z subkliniczną postacią ketozy zawartość cholesterolu nie różniła się istotnie od grupy kontrolnej (tab. 2). Natomiast zawartość triacylogliceroli w ketozie była 1,4 razy wyższa niż w grupie kontrolnej. Zawartość lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL) miała tendencję do zmniejszania się w subklinicznej postaci ketozy – ich zawartość zmniejszyła się o 1,2 raza, co doprowadziło do braku zmian w stężeniu cholesterolu całkowitego. W subklinicznej postaci ketozy zawartość lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) wzrosła 1,5-krotnie. To ostatnie odpowiadało kierunkowi zmian zawartości β -LP, która wzrosła o 1,2 raza. Najbardziej znaczące zmiany dotyczyły FLR. W subklinicznej postaci ketozy wskaźnik ten wzrósł 1,55 raza.

Tak więc w subklinicznej postaci ketozy u krów stwierdzono zaburzenia metabolizmu lipidów i lipoprotein w postaci hipertriglicydemii i hiperlipoproteinemii spowodowanej VLDL z tendencją do wzrostu LDL i spadku HDL, co zostało potwierdzone podobnymi zmianami poziomu β -LP i FLR i jest specyficzne dla pierwszego etapu zespołu lipomobilizacji (6).

W przeprowadzonych badaniach określono poziom niektórych interleukin (IL-1, IL-4 i IL-6). Powszechnie wiadomo, że interleukiny należą do grupy cytokin, które są ważne dla funkcjonowania układu odpornościowego, zarówno wrodzonego, jak i adaptacyjnego. Wśród cytokin, będących ogólnie zwiastunami fizjologicznej homeostazy, interleukiny są kluczowym elementem. Złożone interakcje między komórkami krwiotwórczymi a tkankami, w których się przemieszczają lub przebywają, podkreślają wpływ interleukin na odporność (8).

Wiadomo zatem, że w interakcjach między komórkami odpornościowymi i zapalnymi w dużej mierze pośredniczą białka zwane interleukinami, które mogą promować wzrost, różnicowanie i aktywację funkcjonalną komórek (14). Opisano siedem interleukin; każda z nich ma unikalną aktywność biologiczną, a niektóre

Tab. 1. Wyniki badania biochemicznego surowicy w 2 grupach krów

Wskaźnik	Grupa eksperymentalna (n = 7)	Grupa kontrolna (n = 7)	Współczynnik ufności (p <)
IL-1, pg/ml	22,05 ± 1,10	20,45 ± 0,82	–
IL-4, pg/ml	8,64 ± 0,21	8,77 ± 1,50	–
IL-6, pg/ml	11,68 ± 0,68	11,79 ± 0,45	–
Leukocyty1000 × MCRL	9,19 ± 0,65	8,80 ± 0,66	–
Proteinogram, %			
Albuminy	41,88 ± 2,44	38,43 ± 2,28	–
α_1 -globuliny	5,23 ± 0,20	4,93 ± 0,29	–
α_2 -globuliny	10,43 ± 0,90	11,17 ± 0,45	–
β -globuliny	13,07 ± 0,91	15,93 ± 1,22	0,1
γ -globuliny	29,39 ± 2,14	29,54 ± 2,35	–
A/G ratio	0,74 ± 0,07	0,64 ± 0,06	–

Tab. 2. Wskaźniki metabolizmu lipidów w 2 grupach krów

Parametry biochemiczne	Grupa kontrolna (n = 7)	Grupa eksperymentalna (n = 7)	Współczynnik ufności (p <)
Cholesterol, mmol/l	2,73 ± 0,19	2,99 ± 0,33	0,5
Trójglicerydy, mmol/l	0,18 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,04
HDL, mmol/l	0,93 ± 0,04	0,76 ± 0,10	0,1
LDL, mmol/l	1,71 ± 0,16	2,11 ± 0,23	0,05
VLDL, mmol/l	0,081 ± 0,005	0,12 ± 0,01	0,01
β -LP, units	5,29 ± 0,24	6,27 ± 0,27	0,02
FLR	1,91 ± 0,13	2,97 ± 0,15	0,001

interleukiny nakładają się na inne. Makrofagi, komórki odgrywające ważną rolę zarówno w odporności, jak i zapaleniu, wytwarzają IL-1 i IL-6, podczas gdy limfocyty T wytwarzają IL-2 do IL-6, a komórki zrębu szpiku kostnego wytwarzają IL-7. Wiadomo, że IL-1 i IL-6 nie tylko odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu komórek odpornościowych, ale także stymulują szereg typów komórek zapalnych i wywołują gorączkę. Wzrost i różnicowanie eozynofili jest znacznie wzmocniony przez IL-5. IL-2 i jest silnym sygnałem proliferacyjnym dla limfocytów T, komórek naturalnych zabójców i komórek zabójców aktywowanych limfokinami. IL-1, IL-3, IL-4 i IL-7 zwiększają rozwój różnych prekursorów krwiotwórczych. IL-4 do IL-6 promują również proliferację komórek B i produkcję przeciwciał. Zrozumienie struktury i funkcji interleukin doprowadziło do nowego i ważnego wglądu w podstawową biologię odporności i stanu zapalnego (14).

W medycynie istnieje wiele prac naukowych poświęconych roli ILs w procesach fizjologicznych i patofizjologicznych, określaniu ich poziomów w różnych chorobach zakaźnych, niezakaźnych itp., jednak ich znaczenie w medycynie weterynaryjnej dużych zwierząt nie zostało wystarczająco zbadane. Na przykład w artykule opisującym poziom IL-6 u pacjentów z cukrzycą i hiperketonią (3) autorzy stwierdzili, że poziom IL-6 był wyższy u pacjentów z cukrzycą

hiperketonemiczną niż u pacjentów z cukrzycą normoketonemiczną i zdrowych osób z grupy kontrolnej. Stwierdzono również istotną korelację między ketozą a poziomem IL-6 we krwi pacjentów z cukrzycą.

Inne badania (4) wskazały na rolę cytokin w zmniejszaniu ketonów związanych z infekcją. Autorzy badali wpływ endotoksyny, interleukiny-1 i czynnika martwicy nowotworów na poziom ciał ketonowych w surowicy i wątrobie, poziom wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy i poziom malonylo-CoA w wątrobie. Otrzymane wyniki wskazują, że IL-1 i czynnik martwicy nowotworów mogą pośredniczyć w antyketogennym działaniu infekcji, a IL-1 ma właściwości podobne do lipopolisacharydu (endotoksyny).

Najistotniejsze wydają się wyniki badań Heisera i wsp. (5). Krowy z ketozą miały wyższe stężenia kwasu β -hydroksymasłowego (BHBA), interleukiny (IL-6), czynnika martwicy nowotworów (TNF), amyloidu A (SAA) i mleczanu w surowicy w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Stężenia BHBA, IL-6, TNF i mleczanu w surowicy były wyższe od 8 tygodni i 4 tygodni przed porodem u krów ketotycznych. Kilka tygodni przed rozpoznaniem choroby u krów zaobserwowano wzrost odporności wrodzonej oraz zmieniony metabolizm węglowodanów i lipidów. IL-6 i mleczan w surowicy były najsilniejszymi czynnikami różnicującymi krowy ketotyczne i kontrolne przed wystąpieniem ketozy, co może być wykorzystane jako biomarkery prognostyczne choroby. W innych badaniach (7) stwierdzono, że w okresie poporodowym u krów mobilizacja lipidów i utlenianie kwasów tłuszczowych występuje wraz z późniejszym wzrostem ciał ketonowych BHBA, co powoduje stan zapalny. W wyniku tego stanu cytokiny prozapalne mogą uwalniać i stymulować uwalnianie białek ostrej fazy (haptoglobiny, amyloidu A w surowicy, fibrynogenu, ceruloplazminy i α 1-kwaśnej glikoproteiny) z makrofagów lub innych narządów. Białka ostrej fazy mogą naprawiać uszkodzone tkanki objęte stanem zapalnym, dlatego białka ostrej fazy i cytokiny prozapalne mogą być wykorzystywane jako obiecujące biomarkery ketozy u poporodowych krów mlecznych (9).

W badaniach własnych nie odnotowano u krów z subklinikzną ketozą różnic w poziomach IL w porównaniu do osobników klinicznie zdrowych. Wskazuje to, że w subklinikznej ketozie nie występowały procesy zapalne, ale poziom leukocytów może sugerować ich powolny rozwój. Potwierdza to też poziom α 1- i α 2-globulin. Jak wiadomo, ta grupa białek obejmuje białka ostrej fazy, których wzrost w surowicy krwi prowadzi do procesu zapalnego.

Badanie metabolizmu lipidów u krów z subklinikzną ketozą wykazało wzrost cholesterolu, triacylogliceroli, LDL, VLDL i β -lipoprotein. Może to być wynikiem zwiększonego zapotrzebowania na składniki odżywcze związanego z laktacją, które jest zaspokajane przez wyższą mobilizację endogennych lipidów z ich rezerw w tkance tłuszczowej. Produkcja mleka wymaga

również wzmożonej syntezy lipoprotein surowicy w wątrobie i ścianie jelita, aby znacznie podwyższyć transport lipidów.

Brak równowagi w metabolizmie glukozy, szczególnie w okresie laktacji, powoduje mobilizację tłuszczu i nasila ketogenezę w hepatocytach. W związku z tym obserwuje się ogólną lipomobilizację pod względem poziomu ciał ketonowych. Ten ostatni proces może skutkować wzrostem stężenia lipidów we krwi. Głównymi transporterami cholesterolu i triacylogliceroli w organizmie są LDL i VLDL, które transportują je z wątroby do tkanek obwodowych, dlatego krowy z subklinikzną ketozą będą miały wyższy poziom nie tylko cholesterolu, ale także form lipoprotein, które je transportują. Poważną patologią, która może być spowodowana mobilizacją tłuszczu jest stłuszczenie wątroby.

Poziomy prozapalnych i przeciwzapalnych interleukin nie różniły się między badanymi grupami zwierząt (kontrolną i eksperymentalną). Wskazywało to na brak procesów zapalnych w subklinikznej postaci ketozy. Potwierdzała to również prawidłowa zawartość α 1- i α 2-globulin. Niewielka różnica w poziomie β -globulin ($p < 0,1$) między obiema grupami krów koreluje z aktywnością metabolizmu lipidów, zwłaszcza β -lipoprotein. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono wzrost β -lipoprotein we krwi krów z subklinikzną ketozą ($p < 0,02$).

Piśmiennictwo

1. Belousov A., Krasnoperov A., Oparina O., Suzdalceva M.: Metabolicheskie priznaki alimentarnogo ketoza u vysokoproduktivnyh korov. Trudy Vserossijskogo Nauchno-Issled. Instituta Eksperimentalnoj Veterinarii im. K. I. Skryabina i J. R. Kovalenko. Moskva 2018, 80 (1), 88-100.
2. Dembic Z.: The cytokins of the immune system. The role of cytokines in disease related to immune response. 1st ed. Academic Press 2015, eBook doi: 10.1016/B978-0-12-419998-9.00006-7.
3. Duffield T. F., Lissemore K. D., McBride B. W., Leslie K. E.: Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. J. Dairy Sci. 2009, 92 (2), 571-580, doi: 10.3168/jds.2008-1507.
4. Ehret A., Hochstuhl D., Krattenmacher N., Tetens J., Klein M. S., Gronwald W., Thaller G.: Short communication: Use of genomic and metabolic information as well as milk performance records for prediction of subclinical ketosis risk via artificial neural networks. J. Dairy Sci. 2015, 98 (1), 322-329, doi: 10.3168/jds.2014-8602.
5. Heiser A., McCarthy A., Wedlock N., Meier S., Kay J., Walker C., Crookenden M. A., Mitchell M. D., Morgan S., Watkins K., Loo J., Roche R.: Grazing dairy cows had decreased interferon- γ , tumor necrosis factor, and interleukin-17, and increased expression of interleukin-10 during the first week after calving. J. Dairy Sci. 2015, 98 (2), 937-946, doi: 10.3168/jds.2014-8494.
6. Humer E., Bruggeman G., Zebeli Q.: A meta-analysis on the impact of the supplementation of rumen-protected choline on the metabolic health and performance of dairy cattle. Animals (Basel) 2019, 9 (8), 566, doi: 10.3390/ani9080566. <https://www.mdpi.com/2076-2615/9/8/566>
7. Jain S. K., Kannan K., Lim G., Matthews-Greer J., McVie R. et al.: Elevated blood Interleukin-6 levels in hyperketonemic type 1 diabetic patients and secretion by ccetoacetate-treated cultured U937 monocytes. Diabetes Care 2003, 26 (7), 2139-2143, doi: 10.2337/diacare.26.7.2139.
8. Klein S. L., Scheper C., Brüggemann K., Swalve H. H., König S.: Phenotypic relationships, genetic parameters, genome-wide associations, and identification of potential candidate genes for ketosis and fat-to-protein ratio in German Holstein cows. J. Dairy Sci. 2019, 102 (7), 6276-6287, doi: 10.3168/jds.2019-16237.
9. Levchenko V., Vlizlo V., Kondrakhin I., Melnychuk D., Apukhovska L., Halias V. L.: Veterynarna Klinichna Biokhimiia. Ukraina, Bila Tserkva 2002.

10. *Likhoman A., Usenko V., Koshchaeva O.*: Influence of metoclopramide on clinical manifestation of the endogenous intoxication in cows under ketonemia. Trudy Kubanskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta. Krasnodar 2018, 75, 137-143, doi: 10.21515/1999-1703-75-137-143.
11. *Memon R., Feingold K., Moser A., Doerrler W., Adi S., Dinarello C. A., Grunfeld C.*: Differential effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor on ketogenesis. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabolism 1992, 263 (2), 301-309, doi: 10.1152/ajpendo.1992.263.2.E301.
12. *Mizel S. B.*: The interleukins. The FASEB J. 1989, 3 (12), 2379-2388, doi: 10.1096/fasebj.3.12.2676681.
13. *Skachkov D., Zabolotnyh M., Konvaj V., Orzhekhovskij S., Milovskaya G.*: Metabolic disorders in pregnant cows with subclinical ketosis. Uchenye Zapiski Kazanskoy Gosudarstvennoy Akademii Vet. Med. im. N. E. Bauman. Kazan 2019, 238 (2), 189-194, doi: 10.31588/2413-4201-1883-238-2-189-194.
14. *Tetens J., Heuer C., Heyer I., Klein M. S., Gronwald W., Wolfgang J., Oefner P. J., Thaller G., Krattenmacher N.*: Polymorphisms within the APOBR gene are highly associated with milk levels of prognostic ketosis biomarkers in dairy cows. Physiological Genomics 2015, 47 (4), 129-137, doi: 10.1152/physiolgenomics.00126.2014.
15. *Wael M. El-Deeb, Sabry M. El-Bahr.*: Biomarkers of ketosis in dairy cows at postparturient period: acute phase proteins and pro-inflammatory cytokines, 2017. Website <https://www.semanticscholar.org/paper/Biomarkers-of-ketosis-in-dairy-cows-at-period%3A-and-El-deeb-El-Bahr/f04600e90a7af-57198ce694e617fd4a3b0c7e09b>, doi: 10.24099/vet.arhiv.160126c.
16. *Xue J. X.*: Influence of sub-clinical ketosis on immunological function of dairy cows during peripartum. J. Shanghai Jiaotong Univ. (Agricultural Science) 2011, 29 (1), 48-53.
17. *Zhang G., Hailemariam D., Dervishi E., Goldansaz S. A., Deng Q et al.*: Dairy cows affected by ketosis show alterations in innate immunity and lipid and carbohydrate metabolism during the dry off period and postpartum. Res. Vet. Sci. 2016, 107, 246-256, doi: 10.1016/j.rvsc.2016.06.012.
18. *Zubkov O., Skliarov P.*: Structure and prevalence of polyorgans pathology of cows of the postpartum period. Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences 2017, 19 (82), 145-147, doi: 10.15421/nvlvet8230.

Adres autora: prof. dr hab. Dmytro Kibkało, ul. Alczewskich, 44, 61002 Charków, Ukraina; e-mail: diagnost_96@ukr.net