

RYSZARD BOBOWIEC, JÓZEF FILAR\*, JAN MARCZUK\*, URSZULA KOSIOR

# Zmiany w składzie lipoprotein osocza krów w okresie okołoporodowym

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

\*Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

## Summary

### Periparturient changes in plasma lipoprotein composition of dairy cows

Protein and lipid content of three lipoprotein fractions (VLDL, LDL, HDL) were measured before and after parturition in nine healthy and twelve diseased cows with symptoms of subclinical fatty liver. By means of ultracentrifugation it has been shown that after parturition the only visible fraction among lipoproteins is HDL<sub>1</sub> with a density gradient of 1.063. Concentration of protein in VLDL, LDL and HDL fractions increased after parturition in both groups of animals but values significantly lower in LDL and higher in HDL ( $p < 0.05$ ) in diseased cows have been obtained. Simultaneous to the progressive increasing protein content the level of triglyceride dropped in investigated fractions after parturition. In this period almost twice as low values of triglyceride in fractions of VLDL and LDL in diseased cows were observed. In VLDL fraction cholesterol and phospholipid levels increased after parturition in healthy cows, but decreased in diseased cows. Analysis of apoproteins of HDL fraction with the use of electrophoresis on polyacrylamide gel revealed that in diseased cows, apart from apo-A I band, especially apo-C III band was demonstrated. We conclude that additionally to the suppression of triglyceride transport by fraction of VLDL and LDL in postpartum cows with a syndrome of fatty liver, a very important causative impact on the development of disease is exerted by apolipoproteins belonging to apo C isoforms.

Zwiększona mobilizacja wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu w okresie okołoporodowym uważana była w pierwszych pracach za czynnik etiologiczny stłuszczenia wątroby u krów (16, 23, 34). Następne (6, 14, 22) lokalizowały zarówno skutek jak i przyczynę w samej wątrobie. Reakcja na stres metaboliczny okresu okołoporodowego uzależniona jest bowiem od wielkości wątrobowej syntezy a głównie sekrecji trójglicerydów (Tg) w formie lipoprotein (Lp) frakcji VLDL, warunkujących transport kwasów tłuszczowych do tkanek. Wydzielanie tej frakcji jest najniższym ogniwem przemian lipidowych wątroby u krów (10, 12, 15). Wzmoczona infiltracja wątroby tłuszczem, która jest następstwem tego ograniczenia, występuje często u wysokomlecznych krów w okresie poporodowym i określana

bywa jako zespół stłuszczenia wątroby. W prezentowanej pracy zwrócono uwagę na dotychczas nie uwzględnione trzecie ogniwo przemian lipidowych, związane z procesem degradacji osoczowych lipoprotein i pobieraniem uwalnianych kwasów tłuszczowych przez tkanki docelowe. Lipoproteiny osoczowe pochodzenia wątrobowego będąc kompleksami złożonymi z centralnie zlokalizowanych obojętnych trójglicerydów i estrów cholesterolu oraz obwodowo położonych polarnych fosfolipidów i niestryfikowanego cholesterolu zawierają również polimorficzne apolipoproteiny (17, 18). Determinują one nie tylko ich fizyko-chemiczne właściwości ale również metabolizm lipidowy (29). Zmiany w składzie lipidowym i białkowym Lp decydują o ich zdolnościach transportowych i o wykorzystaniu kwasów tłuszczowych przez tkanki obwodowe (20). Zwiększone wątrobowe wydzielanie bogatych w Tg lipoprotein frakcji VLDL (Lp o bardzo małej gęstości) we wczesnej laktacji przy podwyższonym stężeniu wolnych kwasów tłuszczowych (wkt) w osoczu indukuje zależną od lipazy lipoproteinowej (LpL) masywną wewnątrznaczyniową lipolizę frakcji VLDL (32). Okazuje się, iż aktywność LpL uzależniona jest od jednego z komponentów białkowych frakcji HDL znanych jako apolipoproteina C (apo C) (2). Frakcja VLDL w osoczu natychmiast przekształcana jest w bardzo lekką frakcję HDL (Lp o dużej gęstości) zlokalizowaną podczas ultrawiwiania, wyjątkowo u bydła, w zakresie gęstości frakcji LDL (Lp o małej gęstości). Podjęte badania obejmujące rozdział frakcji lipoprotein, ustalenie ich składu lipidowego oraz elektroforetyczną analizę apolipoprotein wykonano w celu stwierdzenia jakościowych i ilościowych zmian w ich składzie w okresie przed i poporodowym u krów zdrowych i z objawami stłuszczenia wątroby. Postanowiono również określić zależność pomiędzy składem kwasów tłuszczowych we frakcjach Lp a okresem ciąży i laktacji oraz stanem zdrowia krów.

## Material i metody

Badaniami objęto 21 krów, rasy czarno-białej z dolewem krwi HF, w wieku 4-10 lat, pochodzących z wysokoprodukcyjnego stada, w którym w kolejnych trzech

latach poprzedzających obecne badania, stwierdzono występowanie zespołu stłuszczenia wątroby.

Krew pobierano o tej samej porze dnia, przed karmieniem, z żyły jarzmowej w odstępach tygodniowych od 4 tygodnia przed do 4 tygodnia po porodzie. Krew z dodatkiem 1mg/ml Na<sub>2</sub>EDTA poddano odwirowaniu (15 min, 2500 g) a do uzyskanego osocza ponownie dodano Na<sub>2</sub>EDTA w celu inhibicji zawartych proteaz. Lipoproteiny z objętości 1 ml osocza uzyskiwano metodą flotacji za pomocą preparatywnego ultrawierowania (18 h przy 165 000 g) w izopyknotycznym gradiencie gęstości KBr (1,006 <  $\rho$  < 1,21) przy użyciu ultrawirówki typu UP-65 z rotorem horyzontalnym (3). Indywidualne lipoproteiny zbierano przez uważne pobranie stałej objętości z poszczególnych gęstości KBr, z rozdzielaniem na cztery klasy gęstości: VLDL  $\rho$  < 1,006, LDL 1,006 <  $\rho$  < 1,019, HDL<sub>1</sub> 1,019 <  $\rho$  < 1,063, HDL<sub>2</sub> 1,063 <  $\rho$  < 1,21 (26). W celu uwidocznienia frakcji Lp do osocza dodawano 50  $\mu$ l 1% roztworu czerni sudanowej. Lipidy całkowite osocza i poszczególnych frakcji lipoprotein ekstrahowano podwójnie metodą Folscha i wsp. (9). W ekstraktach oznaczano: kolorymetrycznie fosfor, którego ilość przeliczano na zawartość fosfolipidów (5), czułymi metodami enzymatycznymi cholesterol całkowity i trójglicerydy (21). Stężenie białka we wszystkich wyizolowanych frakcjach lipoprotein oznaczono zmodyfikowaną metodą Lowrego (28) z użyciem albuminy bydlęcej jako standardu. Skład kwasów tłuszczowych we frakcjach lipoprotein oznaczano metodą chromatografii gazowej i komputującego integratora (estry metylowe kwasów tłuszczowych otrzymane przez reakcję z metanolem roztworem trójfluorku boru poddawano analizie w warunkach: kolumna szklana 1,5 m wypełniona 20% DEAGS na chromosorbie W, gaz nośny N<sub>2</sub>, przepływ 5 ml/min) (34). Kwas heptadekanowy użyto jako wewnętrzny standard do wyliczeń % wagowej ilości kwasów tłuszczowych. Elektroforetyczne rozdziały apolipoprotein w żelu poliakrylamidowym (PAGE) przeprowadzono po uprzedniej dializie preparatów lipoprotein w roztworze zawierającym bufor Tris-glicynowy (pH 8,91) i roztwór glikolu polietylenowego z dodatkiem azydku sodowego. Po zagęszczeniu, lipoproteiny delipidowano 1,1,3,3-tetrametylomocznikiem (TMU) uwalniającym w obecności roztworu redukującego (tiodiglikol-kwas merkaptaoctowy-wersenian czterosodowy 2:5:4) wszystkie apolipoproteiny z wyjątkiem apo-B. Po odwirowaniu lipidów do supernatantu dodawano odpowiednio 10% objętości 80 % roztworu sacharozy i 10% objętości 1% roztworu błękitu bromofenyloвого i nanoszono na żel (7). Po 4 h elektroforezy żel utrwalano w 12,5% roztworze kwasu trójchlorooctowego i barwiono 0,25% roztworem Coomassie Brilliant Blue R-250 w roztworze metanol/kwas octowy/woda 4:1:15. W ten sposób wyeliminowano wszystkie białka osocza z wyjątkiem zawartych w największej u bydła frakcji HDL. Apo B jest przez TMU wytrącana z roztworu (13) dzięki masie cząsteczkowej (550 kDa) wielokrotnie przewyższającej masę innych apolipoprotein. Pążki rozpoznawano na podstawie standardów białkowych. Wykonano 12,5% PAGE uwzględniając masę czą-

steczkową w zakresie 7,6-34 kDa apolipoprotein frakcji HDL bydła.

Spośród 21 krów, na podstawie badań klinicznych i laboratoryjnych obejmujących oznaczenie stężenia glukozy, wkt, związków ketonowych, cholesterolu całkowitego, Tg, bilirubiny całkowitej i aktywności enzymów (AST, GGT i GLDH) we krwi, 9 uznano za zdrowe a 12 za chore. U chorych krów, w porównaniu ze zdrowymi, stwierdzono w okresie poporodowym zaburzenia przemiany węglowodanowo-tłuszczowej oraz upośledzenie funkcji wątroby typowe dla zespołu stłuszczenia wątroby (8). Wyrazem tego był statystycznie istotny ( $p < 0,05$ ) spadek stężenia glukozy z  $4,20 \pm 0,30$  mmol/l w 2 tygodniu przed porodem do  $2,40 \pm 0,40$  mmol/l w 2 tygodniu po porodzie, wzrost stężenia wkt z  $0,32 \pm 0,10$  do  $1,40 \pm 0,40$  mmol/l, związków ketonowych z  $0,40 \pm 0,17$  do  $2,47 \pm 0,95$  mmol/l, spadek stężenia cholesterolu z  $3,30 \pm 0,29$  do  $2,70 \pm 0,23$  mmol/l i Tg z  $0,36 \pm 0,06$  do  $0,09 \pm 0,02$  mmol/l, wzrost stężenia bilirubiny całkowitej z  $4,62 \pm 0,98$  do  $16,90 \pm 6,53$   $\mu$ mol/l oraz aktywności enzymów: AST z  $30,10 \pm 4,70$  do  $71,40 \pm 16,80$  IU/l, GGT z  $10,50 \pm 1,30$  do  $13,00 \pm 2,52$  IU/l i GLDH z  $5,10 \pm 1,20$  do  $22,10 \pm 8,00$  IU/l. Szczegółowe omówienie wyników tej części badań podano we wcześniejszej publikacji (8). Istotność różnic między badanymi parametrami określano stosując test - t-Studenta dla prób nieparzystych oraz prostą analizę regresji (ANOVA) z wykorzystaniem programu komputerowego Statgraf.

## Wyniki i omówienie

Skład lipoprotein u krów zdrowych i chorych. Przeważającym komponentem frakcji VLDL zarówno u krów zdrowych jak i chorych były trójglicerydy (Tg) (tab. 1). Ich stężenie w okresie przedporodowym było większe niż po porodzie. U krów zdrowych przed porodem we frakcji VLDL zawartość Tg wynosiła około 2,29 mg/dl a u chorych 1,51 mg/dl. Stężenie białka w tej frakcji było istotnie niższe ( $p < 0,05$ ) w okresie poporodowym w grupie krów chorych. Również zmniejszoną zawartość cholesterolu (0,33 mg/dl) i fosfolipidów (0,28 mg/dl) wykazano po porodzie u krów chorych. We frakcji LDL stężenie białka było większe w okresie poporodowym z istotnie mniejszą zawartością u krów chorych (tab. 1). Obniżenie Tg stwierdzane w okresie poporodowym było istotnie większe ( $p < 0,01$ ) u krów chorych (2,49 mg/dl). Postępujący wzrost zawartości białka we frakcji LDL i spadek Tg w końcowym okresie ciąży i pierwszych 4 tygodniach po porodzie przedstawia ryc. 3. Zmiany stężenia Tg we frakcji LDL zachodzące u krów zdrowych i chorych w okresie przed i poporodowym poddano analizie regresji w stosunku do zmian stężenia białka. Wykazano w ten sposób ujemny związek ( $r = -0,87$ ) białka z Tg, szczególnie u krów chorych ( $r = -91$ ) (ryc. 6 i 7). Niższe wartości cholesterolu w tej frakcji u krów chorych osiągały 28 dzień laktacji (ryc. 3). Najwyższe proporcje białka w stosunku do

Tab. 1. Zawartość białka, trójglicerydów, cholesterolu oraz fosfolipidów we frakcjach lipoprotein osocza krów zdrowych i z objawami stłuszczenia wątroby ( $x \pm sD$ )

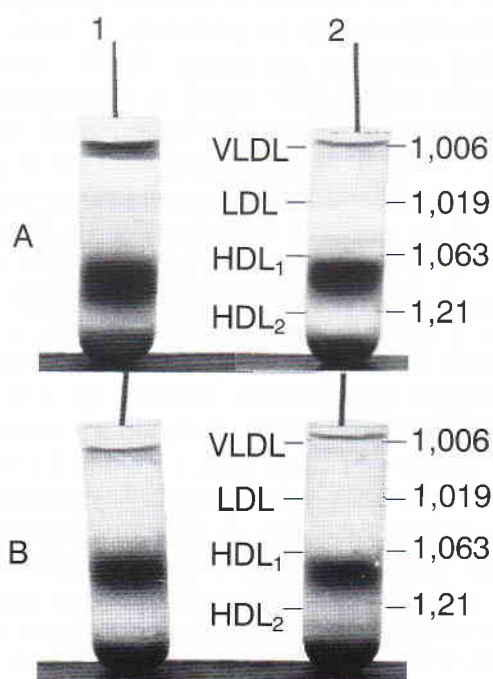
Oznaczone parametry	VLDL		LDL		HDL	
	przed porodem	po porodzie	przed porodem	po porodzie	przed porodem	po porodzie
<b>Białko mg/dl</b>						
Krowy zdrowe (n=9)	0,19 ± 0,023	0,22 ± 0,009	35,16 ± 2,56	40,77 ± 3,24	54,67 ± 2,25	62,12 ± 4,75
Krowy chore (n=12)	0,18 ± 0,028	0,18 ± 0,007*	27,83 ± 1,52	35,11 ± 2,45*	61,18 ± 2,78*	69,45 ± 3,34*
<b>Trójglicerydy mg/dl</b>						
Krowy zdrowe	2,29 ± 0,21	1,96 ± 0,18	11,50 ± 1,76	7,89 ± 1,51	2,58 ± 1,35	0
Krowy chore	1,51 ± 0,51	1,04 ± 0,27*	6,16 ± 1,62*	2,49 ± 0,76**	0,68 ± 0,26*	0
<b>Cholesterol mg/dl</b>						
Krowy zdrowe	0,72 ± 0,27	0,87 ± 0,18	42,70 ± 7,47	37,11 ± 5,94	46,33 ± 6,78	40,21 ± 2,11
Krowy chore	0,57 ± 0,22	0,33 ± 0,12	28,66 ± 4,76*	20,78 ± 6,88*	36,16 ± 7,43*	31,42 ± 6,69*
<b>Fosfolipidy mg/dl</b>						
Krowy zdrowe	0,37 ± 0,09	0,41 ± 0,08	24,11 ± 1,86	19,66 ± 1,53	35,04 ± 1,71	32,15 ± 1,17
Krowy chore	0,34 ± 0,07	0,28 ± 0,04	20,33 ± 3,42	17,22 ± 2,91	32,94 ± 2,25*	29,13 ± 1,53

Objaśnienia: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ .

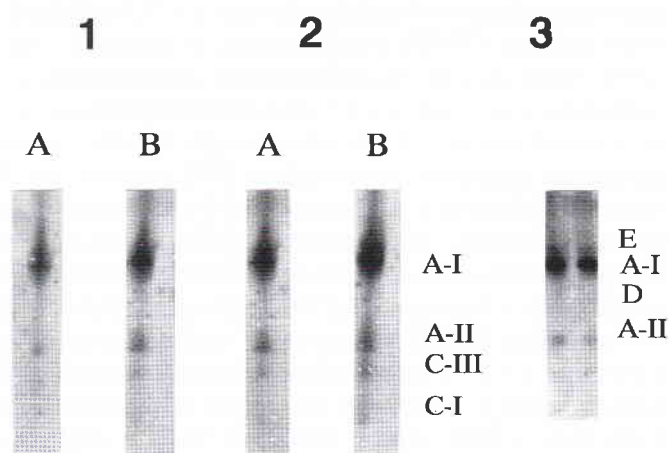
lipidów występowały we frakcji HDL (tab. 1). U krów chorych we frakcji HDL stwierdzono wysokie stężenie białka w okresie poporodowym (69,45 mg/dl), istotnie większe ( $p < 0,05$ ) w porównaniu do wartości stwierdzanych w tym okresie u krów

zdrowych (62,12 mg/dl). Laktacja powoduje, iż zarówno w grupie krów zdrowych jak i chorych nie stwierdzano w tej frakcji Tg. Istotnie niższe wartości Tg występowały u krów chorych w okresie przedporodowym. Zubożenie frakcji HDL po porodzie w cholesterol i fosfolipidy dotyczyło zwłaszcza krów chorych.

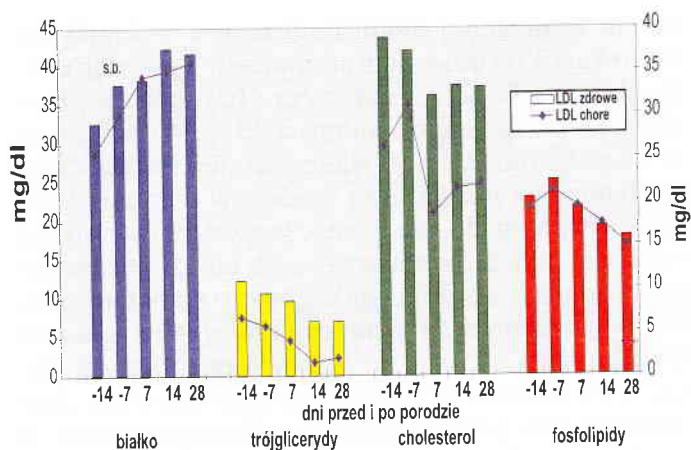
Profil kwasów tłuszczowych w osoczu krwi i frakcji LDL u krów w okresie poporodowym. W osoczu krwi krów zdrowych stosunek kwasów nienasyconych do nasyconych ( $33:68=0,48$ ) był niższy niż u krów chorych ( $36:64=0,56$ ). Frakcja LDL lipoprotein zawierała zarówno w grupie I jak i II znacznie



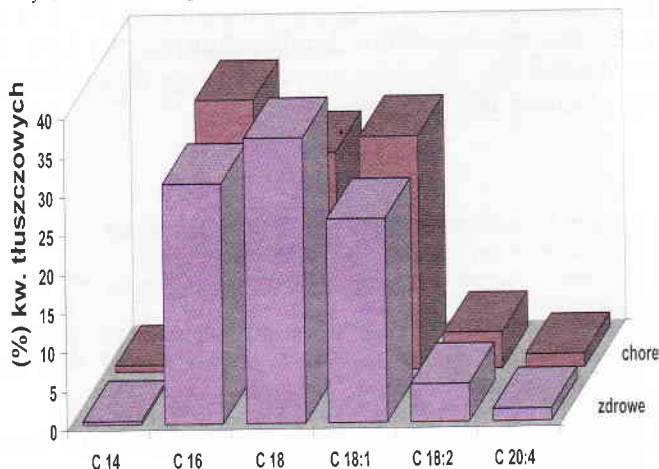
Ryc. 1. Rozdział lipoprotein osocza krów zdrowych (A) i chorych (B) po ultrawirowaniu w gradiencie KBr. 1-14 dni przed porodem, 2-14 dni po porodzie



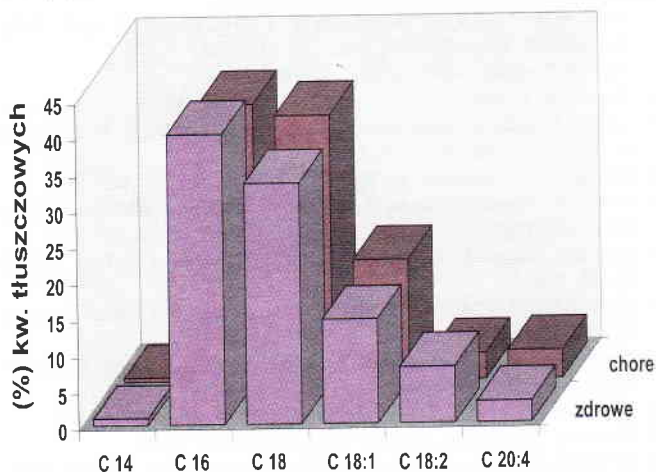
Ryc. 2. Elektroforetyczna analiza na żelu poliakrylamidowym apolipoprotein frakcji HDL krów  
Objaśnienia: 1 – zdrowej, 2 – chorej, 3 – zasuszonych poddanych ubojowi, A – przed porodem, B – po porodzie



Ryc. 3. Skład frakcji LDL u krów zdrowych (n=9) i chorych (n=12)



Ryc. 4. Skład kwasów tłuszczowych lipidów całkowitych osocza krów

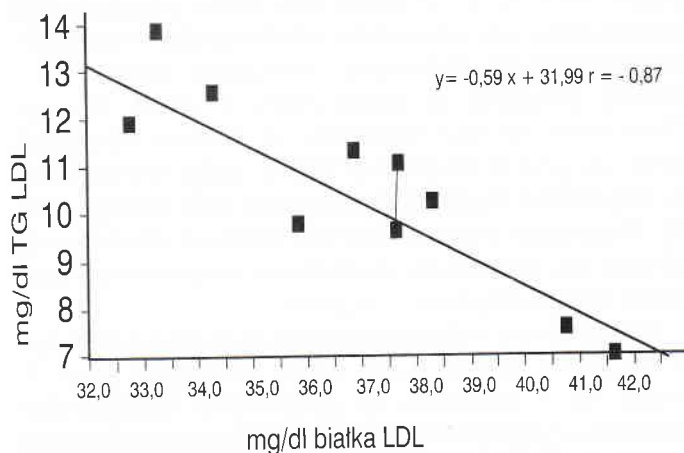


Ryc. 5. Skład kwasów tłuszczowych frakcji LDL lipoprotein osocza krów

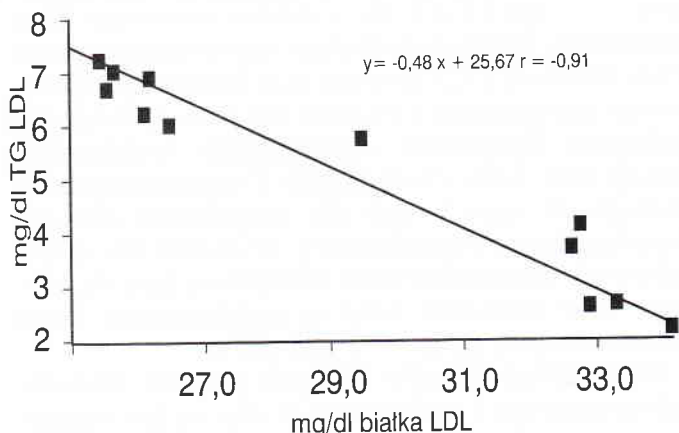
więcej nasyconych kwasów tłuszczowych a stosunek kwasów nienasyconych do nasyconych osiągał wartość 0,34 u zdrowych i 0,32 u chorych krów. Dominującym kwasem tłuszczowym w osoczu krwi krów zdrowych był kwas stearynowy (C18:0) (36,6%) a u chorych palmitynowy (C16:0) (34,8%) a następnie oleinowy (C18:1) (26,18%) (ryc. 4). Krowy zdrowe charakteryzowała obecność we frakcji LDL kwasu palmitynowego w ilości 40,1% oraz większa zawartość kwasu linolowego (C18:2) w porównaniu do krów chorych (ryc. 5).

**Apolipoproteiny frakcji HDL.** W zastosowanej procedurze eliminującej apo-B, która stanowi składnik białkowy frakcji LDL i VLDL uchwyciono zmiany w składzie białkowym apoprotein frakcji HDL. U krów zdrowych wykazano duży prążek apo-A<sub>1</sub> i niewielki prążek apo-C<sub>1</sub>. Krowy chore we frakcji HDL posiadały wyraźny prążek apo-A<sub>1</sub> i apo-C<sub>1</sub> a ponadto występował dodatkowy prążek apo-C<sub>3</sub>.

Lipidy osocza krwi byłą w 90% transportowane są w formie lipoprotein (2, 6, 18). Występująca w najmniejszej ilości u krów frakcja VLDL, w której 94% masy zajmują lipidy a jedynie 6% białko (głównie apo-B) (26) ma zdecydowanie największy obrót wynoszący 9 razy/h (31) i znaczący udział w przenoszeniu lipidów. Niejednorodna pod względem składu białkowego (apo-B<sub>100</sub> i apo-B<sub>48</sub>) frakcja LDL, nie zawsze oddzielająca się od frakcji HDL, określa efektywność dostarczania głównie Tg do tkanki tłuszczowej, gruczołu mlekowego i mięśni szkieletowych (20), mimo iż stanowi 10% wszystkich lipoprotein byłą (2). Stwierdzana w przeważającej ilości u krów (przekraczającej 80%) frakcja HDL (4, 27) (ryc. 1), o największej gęstości i najmniejszej cząsteczce (6,5 nm), w której białko w polimorficznej formie apo-A<sub>1</sub> oraz apo-C i apo-E stanowi 30% masy, kieruje metabolizmem lipoprotein. Apo-C<sub>1</sub> jest aktywatorem lipazy lipoproteino-



Ryc. 6. Analiza regresji różnych odpowiedzi białka frakcji LDL w stosunku do TG u krów zdrowych



Ryc. 7. Analiza regresji odpowiedzi białka frakcji LDL w stosunku do TG u krów chorych

wej (LpL) odszczepiającej Tg w tkankach docelowych (32), a izoforma apo-C<sub>3</sub> inhibitorem tego enzymu. Apo-E mając specyficzne powinowactwo do wątrobowych receptorów lipoproteinowych zapewnia zwrotny powrót resztkowych cząsteczek LDL ponownie do wątroby po oddaniu Tg w tkankach (10). U krów zdrowych frakcja LDL jest większa i lżejsza, w okresie przedporodowym stanowi zaledwie 50% ilości obserwowanej w okresie wczesnej laktacji (ryc. 6). Frakcja LDL widoczna, gdy do osocza przed ultrawirowaniem dodano czerń sudanową, ulegała zredukowaniu u krów chorych; jest ona cięższa i układa się w dolnej części gradientu (ryc. 6). Podobnie dochodzi do supresji frakcji HDL. Elektroforetycznie wykazano, iż we frakcji HDL krów chorych jest nie tylko wyraźniejsza ekspresja apo-C, ale również apolipoproteina ta pojawia się w dwóch formach (apo-C I i apo-C III) (ryc. 2). Wskazuje to, iż w warunkach zmniejszonej sekrecji Tg z wątroby dochodzi do modyfikacji aktywności LpL w tkankach, dalsze badania muszą wyjaśnić jednak jakiego typu są to zmiany, wykazano bowiem, że apo-C I pobudza a apo-C III jest inhibitorem LpL (2). Duże zwiększenie Tg we frakcji VLDL i LDL w okresie przedporodowym ulega zmniejszeniu w okresie laktacji u krów zdrowych, a u chorych stwierdzono istotne ( $p < 0,01$ ) dalsze obniżenie w porównaniu do krów zdrowych. Arave (1) stwierdził zwiększenie udziału estrów cholesterolu w transporcie kwasów tłuszczowych i obniżenie udziału Tg z chwilą przejścia ze stanu ciąży w okres laktacji. Otrzymane wyniki wskazują, iż u krów zdrowych możliwe jest to we frakcji VLDL, gdyż stwierdzono w niej wzrost stężenia cholesterolu całkowitego (tab. 1). Natomiast u krów chorych stężenie cholesterolu obniża się, powodując dodatkowe utrudnienie transportu trójglicerydów z wątroby.

Stwierdzona większa proporcja kwasu linolowego (C18:2) we frakcji LDL krów zdrowych (ryc. 1) wiąże się z zależnym od aktywności lecytyn-cholesterol-acyltransferazy (LCAT) przenoszeniem tego kwasu z fosfatydylocholino frakcji HDL do estrów cholesterolu frakcji LDL (2, 12). Wysoka specyficzność u bydła LCAT do wiązania estrowego  $\beta$  w cząsteczce fosfatydylocholino zajmowanego przez kwas linolowy (12) promuje stan korzystnych przesunień nienasyconych kwasów tłuszczowych między frakcjami lipoprotein. Zmniejszenie fosfolipidów frakcji HDL krów chorych (tab. 1) ogranicza jednak dostępność tego kwasu dla aktywności enzymu transferującego kwas linolowy. W osoczu krwi krów zdrowych dominował kwas stearynowy (ryc. 4), którego ilość wzrastała wraz ze zwiększeniem ilości resorbowanych kwasów z jelit (33).

Stwierdzony u krów chorych przyrost kwasów palmitynowego i oleinowego w osoczu jest następ-

stwem wzmożonej mobilizacji rezerw z tkanki tłuszczowej (33) i powodem akumulacji Tg w wątrobie. Badania, zwłaszcza Grummera (10), potwierdzone również przez innych autorów (33, 34) wskazują, że kwas oleinowy jest o wiele ważniejszy jako czynnik hamujący metabolizm lipidów w wątrobie krów w porównaniu do mało znaczących w estryfikacji i oksydacji kwasów tłuszczowych takich hormonów jak estrogeny, insulina, glukagon czy somatotropina. Nie wyjaśniono nadal działania estrogenów, głównie łożyskowego estronu na wzmożoną infiltrację tłuszczową wątroby w okresie okołoporodowym. Jego stężenie, tuż przed porodem stukrotnie wyższe w porównaniu do okresu rujowego, powoduje wprawdzie pobudzenie sekrecji Tg w formie VLDL z wątroby ale równocześnie działa hamująco na LpL w tkankach (10) i wtórnie przyczynia się do infiltracji tłuszczowej tego narządu.

#### Piśmiennictwo

1. Arave C. W., Miller R. H., Lamb R. C.: J. Dairy Sci. 58, 423, 1975.
2. Bauchart D.: J. Dairy Sci. 76, 3864, 1992.
3. Bobowiec R., Radymka-Wawrzyniak K.: Medycyna Wet. 50, 457, 1994.
4. Campbell E. A.: Res. Vet. Sci. 4, 56, 1963.
5. Van Dijk S., Wensing Th.: Comp. Biochem. Physiol. 94B, 735, 1989.
6. Dryden F. D., Marchello J. A., Adams G. H., Hale W. H.: J. Anim. Sci. 32, 1016, 1971.
7. Ferreri L. F., Gleockler D. H.: J. Dairy Sci. 62, 1577, 1979.
8. Filar J., Marczuk J., Madej E., Stec A., Szalecki J.: Proc. XVIII World Buiatrics Congress, 1994, s. 1273.
9. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H.: J. Biol. Chem. 226, 497, 1957.
10. Grummer Ric R.: J. Dairy Sci. 76, 3882, 1993.
11. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H.: J. Clin. Invest. 34, 1345, 1955.
12. Holtenius P., Hjort M.: Bov. Pract. 25, 91, 1990.
13. Kane J. P.: Anal. Biochem. 53, 350, 1973.
14. Kinsella J. E., Butler T. F.: J. Dairy Sci. 53, 604, 1970.
15. Leplaix-Charlat L., Bauchart D., Durand D., Laplaud P. M., Chapman M. J.: J. Dairy Sci. 79, 1267, 1996.
16. Macleod G. K., Wood A. S., Yad Y. T.: J. Dairy Sci. 55, 446, 1972.
17. Marcos E., Mazur A., Cardot P., Rayssiguier Y.: Comp. Biochem. Physiol. 94 B, 171, 1989.
18. Marcos E., Mazur A., Cardot P., Coxam V., Rayssiguier Y.: Biol. Neonate 59, 22, 1991.
19. Markwell M. A. K., Hass S. M., Bieber L. L., Tolbert N. E.: Anal. Biochem. 87, 206, 1978.
20. Mazur A., Gueux E., Chilliard Y., Rayssiguier Y.: J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr. 59, 233, 1988.
21. Mazur A., Marcos E., Rayssiguier Y.: Lipids 24, 805, 1989.
22. Mazur A., Rayssiguier Y.: Ann. Rech. Vet. 19, 53, 1988.
23. McCarthy R. D., Porter G. A., Griel L. C.: J. Dairy Sci. 51, 459, 1968.
24. Palmquist D. L., Mattos W.: J. Dairy Sci. 61, 561, 1978.
25. Puppione D. L.: J. Dairy Sci. 61, 651, 1978.
26. Raphael B. C., Dimick P. S., Puppione D. L.: J. Dairy Sci. 56, 1411, 1973.
27. Rayssiguier Y., Mazur A., Guex E.: Res. Vet. Sci. 45, 389, 1988.
28. Redgrave T. G., Roberts D. C. K., West C. E.: Anal. Biochem. 65, 42, 1975.
29. Rifai N., Merrill J. R., Holly R. G.: Ann. Clin. Biochem. 27, 489, 1990.
30. Shore B., Shore V.: Biochemistry 8, 4510, 1969.
31. Stead D., Welch V. A.: J. Dairy Sci. 59, 9, 1976.
32. Sundheim G., Zimmer T. L., Astrup H. N.: J. Dairy Sci. 66, 400, 1983.
33. Wallenius R. W., Whitchurch R. E.: J. Dairy Sci. 59, 85, 1976.
34. Yamdagni S., Schultz L. H.: J. Dairy Sci. 53, 1046, 1970.

Adres autora: dr hab. Ryszard Bobowiec, ul. Powstania Styczniowego 94, 20-706 Lublin