Uniwersytet
Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką

„Wpływ podwyższonego stężenia β-hydroksymaślanu w surowicy krów rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej na poziom ekspresji wybranych genów w wątrobie.”

lek. wet. Dominika Grzybowska

Praca doktorska wykonana w:

Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką

Promotor:

prof. dr hab. Przemysław Sobiech

Promotor pomocniczy:

dr hab. Katarzyna Żarczyńska, prof. UWM

Olsztyn 2023

Badania sfinansowano ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu nr 2018/29/N/NZ5/00520, pt. „Analiza transkryptomu wątroby u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej przy użyciu techniki AMPLI-seq”.

PODZIĘKOWANIA

PROF. DR HAB. ANDRZEJOWI POMIANOWSKIEMU

PROF. DR HAB. PRZEMYSŁAWOWI SOBIECHOWI

ORAZ

WSZYSTKIM PRACOWNIKOM KATEDRY CHORÓB WEWNĘTRZNYCH Z KLINIKĄ

- za umożliwienie realizacji pracy doktorskiej, poświęcony czas, nieocenione wsparcie i owocną współpracę

DR HAB. PAWŁOWI BRYMOWI, PROF. UWM

- za poświęcony czas i wsparcie podczas realizacji pracy doktorskiej

DR DAWIDOWI TOBOLSKIEMU

- za owocną współpracę i pomoc w obliczeniach statystycznych

MĘŻOWI I RODZINIE

- za cierpliwość i wsparcie w chwilach zwątpienia

CIOCI KRYSI

- żałuję, że nie zobaczyłaś najważniejszych momentów w moim życiu…

SPIS TREŚCI

1. Wykaz skrótów 4
2. Wykaz tabel 7
3. Wykaz rycin 9
4. Streszczenie 12
5. Summary 16
6. Wstęp 19
6.1. Metaboliczne mechanizmy adaptacyjne w okresie przejściowym 20
6.2. Hiperketonemia krów mlecznych i jej skutki 23
7. Cel pracy 26
8. Materiał i metody 27
8.1. Zwierzęta wykorzystane w eksperymencie i schemat pobierania materiału badawczego 29
8.2. Badania biochemiczne i morfologiczne krwi 32
8.3. Ocena kondycji krowy 37
8.4. Ultrasonograficzna ocena obrazów wątroby 38
8.5. Biopsja gruboigłowa pod kontrolą USG 40
8.6. Izolacja RNA 42
8.7. qRT-PCR 43
8.8. Analiza statystyczna 46
9. Wyniki 47
9.1. Badanie morfologiczne krwi 48
9.2. Badanie biochemiczne krwi 51
9.3. Kondycja krowy na podstawie grubości podskórnej tkanki tłuszczowej 65
9.4. Obrazy ultrasonograficzne wątroby 68
9.5. Izolacja RNA i qRT-PCR 71
10. Omówienie wyników 74
11. Wnioski 81
12. Piśmiennictwo 83

Wykaz skrótów

WYKAZ SKRÓTÓW

ALT – aminotransferaza alaninowa

ALP – fosfataza alkaliczna

AST – aminotransferaza asparaginianowa

ATP – adenozynotrifosforan

BASO – bezwzględna liczba granulocytów zasadochłonnych

BCS – *body condition score,* kondycja ciała w skali

BFT – *backfat thickness*, grubość podskórnej tkanki tłuszczowej okolicy zadu

BHB – β-hydroksymaślan

CHOL – cholesterol

CK – kinaza kreatynowa

CKet – ang. *clinical ketosis,* ketoza kliniczna

DMI – *dry matter intake,* pobranie suchej masy

EOS – bezwzględna liczba granulocytów kwasochłonnych

GLUC – glukoza

GSH-Px – peroksydaza glutationowa

HCT – hematokryt

HDW – miara zróżnicowania wysycenia krwinek czerwonych hemoglobiną

HGB – stężenie hemoglobiny

LDH – dehydrogenaza mleczanowa

LUC – bezwzględna liczba niedojrzałych komórek peroksydazoujemnych

LYMPH –bezwzględna liczba limfocytów

MCH – średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej

MCHC – średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej

MCV – średnia objętość krwinki czerwonej

MONO – bezwzględna liczba monocytów

MPV – średnia objętość płytki krwi

NEB – *negative energy balance,* ujemny bilans energetyczny

NEFA – *nonestrified fatty acids*, niezestryfikowane kwasy tłuszczowe

NEUT – bezwzględna liczba granulocytów obojętnochłonnych

PLT – liczba płytek krwi

p.p. – *post partum*; po porodzie

qRT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym

RBC – liczba krwinek czerwonych

RDW – miara zróżnicowania wielkości krwinek czerwonych

RFT – reaktywne formy tlenu

SCK – *subclinical ketosis,* ketoza podkliniczna

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

TG – trójglicerydy

WBC – liczba krwinek białych

%BASO – względna liczba granulocytów zasadochłonnych wśród wszystkich krwinek białych

%EOS – względna liczba granulocytów kwasochłonnych wśród wszystkich krwinek białych

%LUC – względna liczba niedojrzałych leukocytów wśród wszystkich krwinek białych

%LYMPH – względna liczba limfocytów wśród wszystkich krwinek białych

%MONO – względna liczba monocytów wśród wszystkich krwinek białych

%NEUT – względna liczba granulocytów obojętnochłonnych wśród wszystkich krwinek białych

Wykaz tabel

WYKAZ TABEL

Tabela 1. Skład dawki pokarmowej
Tabela 2. Metody wykonania oznaczeń we krwi obwodowej
Tabela 3. Charakterystyka amplikonów wykorzystanych w reakcji qRT-PCR
Tabela 4. Profil termiczny reakcji qRT-PCR
Tabela 5. Wyniki badań morfologicznych krwi krów z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Tabela 6. Wyniki badań biochemicznych krwi krów z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Tabela 7. Wyniki pomiaru aktywności GSH-Px w surowicy (U/l)
Tabela 8. Wyniki pomiaru aktywności SOD w surowicy (U/l)
Tabela 9. Wyniki 1. pomiaru grubości podskórnej tkanki tłuszczowej (BFT)
Tabela 10. Wyniki 2. pomiaru grubości podskórnej tkanki tłuszczowej (BFT)
Tabela 11. Odsetek krów w cechami tłuszczowego nacieczenia hepatocytów w badaniu ultrasonograficznym wątroby
Tabela 12. Parametry jakości wyizolowanego RNA
Tabela 13. Wynik testu U Manna-Whitneya dla porównania ekspresji wybranych genów między grupami w 4. tygodniu po porodzie
Tabela 14. Wynik testu U Manna-Whitneya dla porównania ekspresji wybranych genów między grupami w 4. tygodniu po porodzie
Tabela 15. Wzajemna zależność ekspresji genów w oparciu o wynik korelacji metodą Spearmana

Wykaz rycin

WYKAZ RYCIN

Rycina 1. Ogólny schemat przebiegu doświadczenia
Rycina 2. Schemat pomiaru BFT – pomiar 1. i 2.
Rycina 3. Cechy tłuszczowego nacieczenia hepatocytów wg KOMEILIAN i wsp. (2011)
Rycina 4. Przebieg biopsji wątroby
Rycina 5. Zmiany stężenia GLUC w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Rycina 6. Zmiany stężenia Ca w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Rycina 7. Zmiany stężenia TG w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Rycina 8. Zmiany stężenia BHB w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Rycina 9. Zmiany stężenia NEFA w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Rycina 10. Zmiany stężenia CHOL w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Rycina 11. Zmiany aktywności ALT w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Rycina 12. Zmiany aktywności AST w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Rycina 13. Zmiany aktywności ALP w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Rycina 14. Zmiany aktywności CK w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Rycina 15. Zmiany aktywności LDH w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Rycina 16. Zmiany aktywności GSH-Px we krwi zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Rycina 17. Zmiany aktywności SOD we krwi zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej
Rycina 18. Zmiany grubości BFT zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej – pomiar 1.

Rycina 19. Zmiany grubości BFT zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej – pomiar 2.
Rycina 20. Przykładowe obrazy ultrasonograficzne wątroby zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej w 4. tygodniu po porodzie
Rycina 21. Przykładowe obrazy ultrasonograficzne wątroby zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej w 7. tygodniu po porodzie
Rycina 22. Zestawienie ekspresji GPX3, SOD 1, SOD 2, SOD 3

Streszczenie

4. STRESZCZENIE

Kluczowym momentem dla zdrowia i produkcyjności bydła mlecznego jest tzw. okres przejściowy trwający od 3. tygodnia przed do 3. tygodnia po porodzie. Pomimo przeprowadzenia wielu badań nad odpowiednimi strategiami monitorowania zdrowia i dobrostanu krów w tym okresie, częstotliwość występowania negatywnych następstw ujemnego bilansu energetycznego oraz hiperketonemii pozostaje wysoka.

Celem pracy była ocena zmian wybranych wskaźników hematologicznych i biochemicznych krwi krów rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej oraz określenie stopnia tłuszczowego nacieczenia wątroby i zmian poziomu ekspresji genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową i peroksydazę glutationową w wątrobie krów z podwyższonym poziomem β-hydroksymaślanu (BHB) w surowicy.

Badania zostały przeprowadzone w Stacji Dydaktyczno-Badawczej Bałdy – gospodarstwie hodującym bydło rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej, należącym do Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Do udziału w eksperymencie zakwalifikowano 23 krowy będące po drugiej laktacji, charakteryzujące się wysoką wydajnością mleczną w poprzednich laktacjach (średnio 9500 kg mleka). Wyselekcjonowane krowy podzielono na dwie grupy: kontrolną - CONT (n=11) - zwierzęta zdrowe, które w okresie od tygodnia przed do trzech tygodni po porodzie nie wykazywały podwyższonego stężenia BHB w surowicy oraz doświadczalną - EXP (n=12) - zwierzęta, u których co najmniej raz w tym przedziale czasowym stężenie BHB znajdowało się w przedziale od 0,9 do 1,4 mmol/l, a średnie stężenie tego związku w trzech tygodniach po porodzie wynosiło ponad 0,8 mmol/l.

Począwszy od 1. tygodnia przed porodem do 9. tygodnia po porodzie pobierano materiał badawczy, który stanowiły: krew pełna (co tydzień) i uzyskana z krwi pełnej surowica (co tydzień), obrazy ultrasonograficzne wątroby (4. tydzień po porodzie, 7. tydzień po porodzie) i podskórnej tkanki tłuszczowej okolicy zadu (co tydzień) oraz wycinki wątroby uzyskane w wyniku biopsji gruboigłowej pod kontrolą USG (4. tydzień po porodzie, 7. tydzień po porodzie).

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w badaniu morfologicznym krwi pomiędzy grupami zwierząt tydzień przed porodem oraz w 4. i 7. tygodniu po porodzie. Stwierdzono natomiast szereg zmian we wskaźnikach biochemicznych. Stężenie glukozy różniło się istotnie pomiędzy grupami w czasie trwania eksperymentu ($P<0,05$). Stężenie

jonów wapnia w 9. tygodniu po porodzie różniło się istotnie pomiędzy grupami i w grupie doświadczalnej było ono niższe (P<0,05), natomiast mieściło się przez cały okres eksperymentu w zakresie wartości referencyjnych. Po wycieleniu u zwierząt z obu grup nastąpił spadek stężenia trójglicerydów, który w 2. tygodniu p.p. był istotnie niższy u zwierząt z grupy doświadczalnej (P<0,05). W 7. tygodniu p.p. zwierzęta z grupy kontrolnej miały istotnie wyższe stężenie TG w surowicy (P<0,05). U zwierząt z grupy doświadczalnej wysokie stężenie BHB utrzymywało się przez 3 tygodnie p.p. na istotnie wyższym poziomie niż w grupie kontrolnej (P<0,05). Zmiany stężenia BHB w czasie były istotnie różne pomiędzy grupami (P<0,05).Stężenie NEFA wykazywało istotne różnice w czasie (P<0,05), natomiast nie różniło się istotnie pomiędzy grupami. Aktywność ALT po porodzie spadała u zwierząt z grupy doświadczalnej, natomiast rosła w grupie kontrolnej. Od 6. do 9. tygodnia p.p. były to różnice statystycznie istotne (P<0,05). W 5. i 6. tygodniu p.p. aktywność AST w grupie doświadczalnej była istotnie niższa niż w grupie kontrolnej (P<0,05). Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej była wyższa w grupie doświadczalnej, przyjmując w 6. i 7. tygodniu p.p. wartość istotnie różniącą się w porównaniu z grupą kontrolną (P<0,05). Aktywność ALP wykazywała istotne różnice w czasie (P<0,05), natomiast nie różniła się istotnie pomiędzy grupami. Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu cholesterolu oraz aktywności CK, LDH i GSH-Px pomiędzy grupami.

Nie wykazano również statystycznie istotnych różnic w grubości podskórnej tkanki tłuszczowej pomiędzy grupami przez cały czas trwania eksperymentu, natomiast parametr ten wykazywał istotne zmiany w czasie (P<0,05).

W badaniu ultrasonograficznym wątroby krów w grupie kontrolnej w 4. tygodniu po porodzie nie stwierdzono cech 2. i 3. stopnia stłuszczenia tego narządu w przeciwieństwie do grupy doświadczalnej. Odsetek krów z prawidłowym obrazem ultrasonograficznym wątroby był wyższy w grupie kontrolnej w 4. i 7. tygodniu po porodzie, aczkolwiek wartości te były zbliżone.

Ekspresja SOD2 w wątrobie różniła się istotnie pomiędzy grupami w 4. tygodniu po porodzie (P<0,05) i była istotnie skorelowana z ekspresją SOD3 (P<0,05). Poziomy ekspresji SOD 1, SOD 3 i GPX3 nie różniły się istotnie ani pomiędzy grupami ani pomiędzy 4. a 7. tygodniem po porodzie.

Uzyskane wyniki dowodzą, że krowy z utrzymującym się wyższym stężeniem BHB po porodzie (powyżej 0,8 mmol/l) wykazują podobny poziom mobilizacji rezerw tłuszczowych do krów niewykazujących takich zmian. Aktywność ALT może być

przydatnym wskaźnikiem różnicującym krowy niewykazujące podwyższenia stężenia BHB tradycyjnie uznawanego za towarzyszące podklinicznej ketozie, a narażone na negatywne skutki hiperketonemii. Ponadto, wyniki analiz molekularnych wskazują na możliwość wykorzystania oceny poziomu transkrypcji genów, w szczególności SOD2 jako biomarkera stopnia ketozy. Analiza ekspresji genów może być również pomocna do określenia potencjału regeneracyjnego wątroby u krów po wystąpieniu ketozy, w szczególności w odniesieniu do stanów zaburzenia metabolizmu, którego wynikiem może być stres oksydacyjny.

Summary

5. SUMMARY

The key moment for the health and productivity of dairy cattle is the period from the 3rd week before to the 3rd week after calving called transition period. Despite research on appropriate strategies for monitoring the cattle's health and welfare during this time, the incidence of negative consequences of negative energy balance and hyperketonaemia remains high.

The aim of the study was to evaluate changes in blood morphology and biochemistry, and to determine the degree of hepatic fatty infiltration as well as changes in the level of hepatic expression of selected genes (SOD1, SOD2, SOD3, GPX3) in Holstein-Friesian cows with elevated serum β-hydroxybutyrate (BHB) levels.

The study was conducted at the Bałdy Teaching and Research Centre - a Holstein-Friesian cattle farm of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. Twenty three cows after the second lactation, characterized by high milk yield in previous lactations (average 9500 kg of milk) were qualified to participate in the experiment. The selected cows were divided into two groups: control - CONT (n=11) - healthy animals, which did not show increase in serum BHB concentration from one week prepartum to three weeks postpartum, and experimental - EXP (n=12) - animals with BHB concentration in the range of 0,9 to 1,4 mmol/l at least once in this period, and the average concentration of this compound in three weeks after calving at over 0,8 mmol/l.

The research material was collected from the 1st week prepartum to the 9th week postpartum: whole blood (weekly) and whole blood serum (weekly), ultrasonograms of the liver (4th week postpartum, 7th week postpartum) and backfat thickness (weekly), and liver biopsy specimen obtained by ultrasound-guided core needle biopsy (4th week postpartum, 7th week postpartum).

There were no statistically significant differences in blood morphology between the groups one week prepartum, 4 and 7 weeks postpartum. However, a number of changes in blood biochemistry were found. Serum glucose concentration differed significantly between the groups during the time of the experiment ($P<0,05$). Ca concentration at 9 weeks postpartum differed significantly between the groups and was lower in the EXP animals ($P<0,05$), but remained within the reference range throughout the entire experiment. There was a decrease in triglycerides concentration in both groups after calving. Triglycerides level was significantly lower in EXP group ($P<0,05$) during

the 2nd week postpartum and significantly higher in CONT animals 7 weeks postpartum (P<0,05). BHB concentration in EXP group remained significantly higher for 3 weeks postpartum (P<0,05). Moreover, changes in BHB levels over time were significantly different between the groups (P<0,05). NEFA levels showed significant differences over time (P<0,05), but were not significantly different between the groups. ALT activity decreased in EXP animals after calving, while it increased in the CONT group. From 6th to 9th week postpartum these differences were statistically significant (P<0,05). AST activity in the EXP group was significantly lower than in the control group (P<0,05) during the 5th and 6th week postpartum. Superoxide dismutase activity was higher in the study group, from 6th and 7th week postpartum compared to the control group (P<0,05). ALP activity showed significant differences over time (P<0,05), but was not significantly different between groups. There were no significant differences in cholesterol level and CK, LDH and GSH-Px activity between groups.

There were no statistically significant differences in the backfat thickness between the groups throughout the experiment, while this parameter showed significant changes over time (P<0,05).

No ultrasonographic signs typical to the 2nd or 3rd degree of fatty infiltration of the liver were found in the CONT group, contrary to the EXP group. The percentage of cows with a normal hepatic ultrasonograms was higher in the CONT group in the 4th and 7th week after parturition, however those levels were similar.

Hepatic SOD2 expression differed significantly between groups at 4 weeks postpartum (P<0,05) and was significantly correlated with SOD3 expression (P<0,05). Expression levels of SOD 1, SOD 3 and GPX3 did not differ significantly between groups nor between 4 and 7 weeks postpartum.

The obtained results prove that cows with persistently higher BHB concentration after parturition (above 0,8 mmol/l) show a similar level of mobilization of fat reserves to cows not showing such changes. ALT activity may be a useful indicator differentiating cows that do not show an increase in BHB levels traditionally considered as SCK but are at risk of the negative effects of hyperketonaemia. In addition, the results of molecular analyses indicate the possibility of using the level of gene transcription, in particular SOD2, as a biomarker of the degree of ketosis. Gene expression analysis can also be helpful in determining the hepatic regenerative potential in cows after ketosis, in relation to impaired metabolism causing oxidative stress in particular.

Wstęp

6. WSTĘP

6.1. METABOLICZNE MECHANIZMY ADAPTACYJNE W OKRESIE PRZEJŚCIOWYM

Czas przechodzenia z okresu zasuszenia w laktację, który rozpoczyna się na trzy tygodnie przed porodem (*prepartum*) i kończy trzy tygodnie po porodzie (*postpartum)* w literaturze naukowej i weterynaryjnej nazywany jest okresem przejściowym (ang. *transition period*) (GRUMMER 1995). Jest to kluczowy moment dla dobrostanu, produkcji mleka oraz zdrowia krów mlecznych, ponieważ towarzyszy mu szereg zmian fizjologicznych, immunologicznych i metabolicznych. (MULLIGAN i DOHERTY 2008).

W okresie przejściowym krowa musi dostosować swój metabolizm w taki sposób, aby poradzić sobie ze wzrostem zapotrzebowania na energię i składniki odżywcze, które są niezbędne do prawidłowego rozwoju płodu, produkcji siary oraz mleka. Nie bez znaczenia są również stres i wysiłek związane z porodem. Selekcja hodowlana i intensyfikacja produkcji mleka sprawiły, że wysokowydajne krowy mleczne stały się zwierzętami o ogromnym obciążeniu metabolicznym, a trwający sześć tygodni okres przejściowy wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia takich chorób jak: hipokalcemia poporodowa, zatrzymanie łożyska, *mastitis, metritis*, przemieszczenie trawieńca, ketoza czy stłuszczenie wątroby (KELTON i wsp. 1998, BEZERRA i wsp. 2014).

W okresie przejściowym organizm krowy uruchamia mechanizmy adaptacyjne mające na celu przystosowanie do zmieniającego się zapotrzebowania na energię i składniki odżywcze, które są niezbędne do zwiększającej się produkcji mleka w wymieniu oraz odpowiednie zaopatrzenie matki i płodu w składniki odżywcze. Zaliczamy do nich m.in.: nasilenie procesu glukoneogenezy, mobilizację rezerw tłuszczowych i zmniejszenie obwodowej wrażliwości na insulinę. Należy pamiętać, że zmiany te mają charakter fizjologiczny, natomiast ich nasilenie może przyczynić się do rozwoju wyżej wymienionych schorzeń (SUNDRUM 2015).

Najważniejszymi narządami służącymi adaptacji organizmu krowy do zwiększającej się laktacji są:

- żwacz – miejsce syntezy prekursorów glukozy (krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych),
- wątroba – koordynacja metabolizmu glukozy, lipidów i ciał ketonowych,
- tkanka tłuszczowa – rezerwa tłuszczów,
- krew – transport substancji pomiędzy narządami.

Przeżuwacze są niemal całkowicie zależne od prawidłowego przebiegu procesu glukoneogenezy, ponieważ glukoza z węglowodanów pochodzenia roślinnego prawie nie dociera do jelita cienkiego z powodu zachodzącej przy udziale drobnoustrojów fermentacji w żwaczu, w wyniku której powstają krótkołańcuchowe – lotne – kwasy tłuszczowe – LKT (CECILIANI i wsp. 2018). LKT, do których zaliczamy między innymi kwas propionowy i kwas izomasłowy, są najważniejszymi prekursorami glukozy dla krów i substratami w procesie glukoneogenezy (ASCHENBACH i wsp. 2011, ZEBELI i wsp. 2015). Wydajność tego procesu zależy od wielu czynników takich jak: dostępność prekursorów glukozy, status hormonalny (najistotniejsze hormony to: glukagon, hormon wzrostu i insulina) oraz zdolność komórek wątroby do przeprowadzenia glukoneogenezy, czyli tzw. pojemność metaboliczna hepatocytów (ASCHENBACH i wsp. 2010).

U przeżuwaczy, w przeciwieństwie do zwierząt monogastrycznych, proces glukoneogenezy jest najbardziej nasilony po karmieniu i przy wysokiej podaży energii, ponieważ produkcja i wchłanianie kwasu propionowego w tych okresach są również na wysokim poziomie, co zapobiega spadkowi apetytu (YOUNG 1977, DEODATO i wsp. 2004, ALLEN i wsp. 2005, ASCHENBACH i wsp. 2010). Krowy w laktacji dostosowują się do zwiększonego zapotrzebowania na glukozę wykorzystywaną do produkcji laktozy mleka poprzez mobilizację endogennych substratów dla procesu glukoneogenezy i zwiększoną ekspresję karboksylazy pirogronianowej w wątrobie (WHITE i wsp. 2011).

Tkanka tłuszczowa stanowi u ssaków miejsce magazynowania energii. Adipocyty przechowują i uwalniają niezestryfikowane kwasy tłuszcze (NEFA) w postaci trójglicerydów (TG) w procesie nazywanym mobilizacją tłuszczów, na który składają się lipogeneza i lipoliza. (CONTRERAS i wsp. 2018). Kilka tygodni przed porodem tempo lipolizy przewyższa tempo lipogenezy ze względu na zmiany hormonalne towarzyszące zbliżającym się porodowi i laktacji, a w późniejszym okresie deficyty energetyczne wynikające ze zwiększającej się produkcji mleka i ograniczone spożycie suchej masy po porodzie (BRADFORD i wsp. 2015). Zwiększone nasilenie lipolizy prowadzi do przebudowy tkanki tłuszczowej, której towarzyszy reakcja zapalna, migracja komórek układu immunologicznego oraz proliferacja komórek i przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej (CONTRERAS i wsp. 2015). Zintensyfikowany proces lipolizy, choć zapewnia odpowiednią podaż energii w okresie okołoporodowym, ogranicza zdolność tkanki tłuszczowej do buforowania energii i przyczynia się do podwyższonego stężenia NEFA we krwi. Predysponuje to organizm krowy do rozwoju stanów zapalnych i chorób

metabolicznych (CONTRERAS i SORDILLO 2011, CONTRERAS i wsp. 2018, ESPOSITO i wsp. 2020, MARKANTONATOS i VARGA 2017).

Wątroba, obok tkanki tłuszczowej i mięśni szkieletowych, uczestniczy w regulacji szeregu procesów metabolicznych, kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu ssaka (FRAYN i wsp. 2006). Odgrywa ona główną rolę w metabolizmie białek, glukozy, lipidów, ketogenezie czy gospodarce mineralno-witaminowej. Zdrowie krowy w okresie przejściowym jest ściśle związane ze zdolnością tego narządu do koordynacji tych procesów, radzenia sobie ze zmianami podaży składników odżywczych i zmieniającymi się wymaganiami metabolicznymi towarzyszącymi pojawieniu się laktacji.

Wątroba odgrywa kluczową rolę w metabolizmie tłuszczów. Jest centralnym miejscem utleniania i przemian metabolicznych niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych. Ponadto posiada zdolność do lipogenezy *de novo*, syntezy kwasów tłuszczowych z glukozy i innych nielipidowych prekursorów (NGUYEN i wsp. 2008). Kolejną ważną funkcją wątroby w metabolizmie lipidów jest gromadzenie trójglicerydów w hepatocytach. Jednak u przeżuwaczy ich eksport do krwioobiegu jest ograniczony ze względu na niski poziom syntezy lipoprotein o bardzo niskiej gęstości – VLDL (ang. *very low density lipoproteins*) – łącznika pomiędzy wątrobą a krwioobiegiem (RABOISSON i wsp. 2014).

Najważniejszym aspektem udziału wątroby w metabolizmie glukozy u przeżuwaczy jest proces glukoneogenezy, czyli syntezy glukozy ze związków nie będących cukrami tj. kwasu propionowego, kwasu izomasłowego i niektórych aminokwasów (LARSEN i KRISTENSEN 2013).

Proces utleniania kwasów tłuszczowych dostarcza acetylo-CoA, który jest następnie kondensowany ze szczawiooctanem tworząc cytrynian, który wchodzi do cyklu Krebsa. Jednakże, gdy zapotrzebowanie na glukozę jest wysokie, szczawiooctan jest coraz częściej wykorzystywany w procesie glukoneogenezy, a zatem acetylo-CoA nie może zostać całkowicie utleniony i przekształcany jest w ciała ketonowe, do których zaliczamy: kwas acetooctowy, aceton i beta-hydroksymaślan (BHB) (ESPOSITO i wsp. 2014, RABOISSON i wsp. 2014).

6.2. HIPERKETONEMIA KRÓW MLECZNYCH I JEJ SKUTKI

Zachodzące okołoporodowo zmiany behawioralne, hormonalne i metaboliczne sprawiają, że krowy wykazują w tym czasie wyraźny spadek spożycia suchej masy - DMI (ang. *dry matter intake*) (GRUMMER i wsp. 2004, ALLEN i wsp. 2005). Skutkiem zwiększonego zapotrzebowania energetycznego idącego w parze ze zmniejszonym pobraniem paszy jest ujemny bilans energetyczny - NEB (ang. *negative energy balance*), który może być pogłębiany przez fakt, że transport składników odżywczych do wymienia staje się priorytetem (LUCY i wsp. 2009, ROCHE i wsp. 2017). W odpowiedzi organizm krowy aktywnie uruchamia rezerwy tłuszczowe, a niedobór prekursorów glukozy nasila syntezę ciał ketonowych, co może doprowadzić do hiperketonemii, czyli podwyższonego stężenia BHB w płynach ustrojowych uznawanego za wskaźnik zbyt dużego NEB u krów mlecznych (DUFFIELD i wsp. 2009).

Wielu autorów traktuje hiperketonemię jako synonim stanu podklinicznej ketozy (SCK – ang. *subclinical ketosis*), czyli stężenia BHB we krwi obwodowej we wczesnej laktacji na poziomie równym lub wyższym niż 1,2-1,4 mmol/l bez towarzyszących temu stanowi wyraźnych objawów klinicznych (DUFFIELD i wsp. 2009, OSPINA i wsp. 2010, RABOISSON i wsp. 2014). Natomiast kliniczną ketozą (CKet- ang. *clinical ketosis*) określa się stężenie BHB na poziomie wyższym niż 2,4-3 mmol/l z wyraźną utratą apetytu i osłabieniem. W ostatnich latach pojawiły się jednak wzmianki o przypadkach CKet przy stężeniu BHB $\geqslant$1,1 mmol/l (SUTHAR i wsp. 2013, SONG i wsp. 2016, BENEDET i wsp. 2019). Ponadto niektórzy autorzy diagnozowali SCK 7-10 dni po porodzie u krów ze stężeniem BHB $\geqslant$1,0 mmol/l (WALSH i wsp. 2007, PUPPEL i KUCZYNSKA 2016).

Takie doniesienia potwierdzają potrzebę ponownego zdefiniowania podklinicznej ketozy i hiperketonemii w literaturze, oddzielnego rozpatrywania tych dwóch pojęć oraz konieczność traktowania wszystkich przypadków podwyższenia stężenia ciał ketonowych jako potencjalne zagrożenie negatywnymi skutkami hiperketonemii. Z tego też względu niniejsza praca porusza zagadnienia związane z hiperketonemią/ podwyższonym stężeniem BHB.

Podwyższonemu stężeniu ciał ketonowych towarzyszy niższa wydajność mleczna krów, słabsze wyniki w rozrodzie, zwiększona częstotliwość występowania innych chorób okresu przejściowego oraz częstsze brakowanie zwierząt ze stada, co pociąga za sobą ogromne straty finansowe wśród hodowców (MCART K i wsp. 2012, SUTHAR i wsp. 2013). RABOISSON i wsp. (2015) oszacowali, że średnie straty wynikające z jednego

przypadku SCK wynoszą około 257 euro. SCK powoduje znacznie większe straty niż CKet, ponieważ występuje częściej i jest znacznie trudniejsza do zdiagnozowania bez wdrożenia odpowiednich programów diagnostycznych w stadzie (GEISHAUSER i wsp. 2000). Dlatego też poszukiwanie i wdrażanie skutecznych strategii monitorowania stad w kierunku diagnozowania hiperketonemii zyskuje coraz większe znaczenie w środowisku naukowym i wśród hodowców bydła mlecznego (PRYCE i wsp. 2016).

Podwyższone stężenie BHB u bydła mlecznego jest nie tylko ważnym czynnikiem prowadzącym do wystąpienia ketozy. Istnieją bowiem badania potwierdzające udział BHB w nasilaniu reakcji zapalnych, apoptozy komórek i powstawaniu stresu oksydacyjnego powodującego uszkodzenia narządów, między innymi wątroby (FU i wsp. 2014, DENG i wsp. 2015, BICALHO i wsp. 2017).

Stres oksydacyjny można zdefiniować jako zachwianie równowagi pomiędzy powstawaniem RFT (reaktywnych form tlenu) a mającymi neutralizować ich działanie antyoksydantami (MARTINDALE i HOLBROOK 2002, HE i wsp. 2017). Negatywne skutki tego zjawiska można podzielić na bezpośrednie - peroksydacja lipidów i pośrednie - wpływ na błony komórkowe i modyfikacja szlaków metabolicznych (DAVIES 2000). RFT powstające podczas stresu oksydacyjnego są eliminowane poprzez działanie szeregu enzymów antyoksydacyjnych i tzw. nieenzymatycznych mechanizmów obronnych (m.in. witamina E i selen) (GONG i XIAO 2016). Do enzymów antyoksydacyjnych, których aktywność jest często oznaczana jako marker zdolności antyoksydacyjnej organizmu, zaliczamy m.in. dysmutazę ponadtlenkową (SOD) i peroksydazę glutationową (GSH-Px) (CHENG i wsp. 2019, SHARMA i wsp. 2011). GSH-Px głównie katalizuje reakcje redukcji nadtlenków wodoru i nadtlenków organicznych (np. lipidów), natomiast SOD jest głównym zmiataczem rodników ponadtlenkowych (ang. *superoxide radical scavenger*) i tworzy pierwszą linię obrony przed utleniaczami (CELI 2011). BÜHLER i wsp. (2018) sugerują, że u krów wieloródek w okresie okołoporodowym występuje zwiększone obciążenie oksydacyjne niż u pierwiastek, co można wytłumaczyć większą wydajnością mleczną tych zwierząt (TIENKEN i wsp. 2015a, TIENKEN i wsp. 2015b). U krów tych wykazano także wyższe aktywności GSH-Px w surowicy i wyższą ekspresję GPX1 i SOD2 w leukocytach (BÜHLER i wsp. 2018).

Zagadnienia dotyczące wydajności, zdrowia, żywienia oraz zarządzania stadami bydła mlecznego w okresie przejściowym były przedmiotem setek badań naukowych przeprowadzonych w ostatnich trzydziestu latach, począwszy od lat 90. ubiegłego wieku, kiedy to termin „okres przejściowy" zaczął pojawiać się w międzynarodowej literaturze

naukowej (GRUMMER 1995, DRACKLEY 1999, PROUDFOOT i wsp. 2009, ATKINSON 2016, REDFERN i wsp. 2021). Pomimo tak dużego zainteresowania naukowców i przeprowadzenia tak wielu badań w zakresie odpowiednich strategii postępowania w celu poprawy zdrowia i dobrostanu krów w okresie przejściowym, częstotliwość występowania chorób i brakowania zwierząt w tym okresie pozostaje nadal wysoka.

Obecnie zakres wiedzy na temat hiperketonemii, SCK i CKet u bydła mlecznego jest dość szeroki – znane są ogólnoustrojowe mechanizmy i konsekwencje dla zdrowia, produkcyjności i dobrostanu bydła, rośnie świadomość strat finansowych, a lekarze weterynarii dysponują szeregiem możliwości diagnostycznych. Jednak pomimo wielu badań na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat, temat hiperketonemii i jej skutków u bydła mlecznego jest nadal aktualny i każdego roku publikowane są nowe materiały w renomowanych czasopismach naukowych (HA i wsp. 2017, SHAHZAD i wsp. 2019, STURM i wsp. 2020, SOARES i wsp. 2021).

Mając na uwadze ogromne obciążenie metaboliczne krów mlecznych w okresie przejściowym zasadne jest ciągłe podejmowanie tematyki badawczej związanej z hiperketonemią, mechanizmów jej powstawania na poziomie molekularnym, konsekwencji jakie za sobą pociąga na poziomie stad, poszczególnych krów, narządów i komórek. Takie badania są pomocne w odnalezieniu markerów genetycznych i biochemicznych pozwalających na wykrycie jeszcze przed porodem krów zagrożonych hiperketonemią i złagodzenie skutków tego stanu, a tym samym przyczynić się do zmniejszenia odsetka brakowania zwierząt.

Ponieważ większość naukowców, którzy badali problem zaburzeń zdrowotnych i towarzyszących im zmian na poziomie molekularnym u krów mlecznych, koncentrowała się na wykrywaniu nieprawidłowości u krów z podkliniczną ketozą, identyfikowaną jako podwyższenie surowiczego stężenia BHB >1,2 mmol/l, w niniejszej pracy została podjęta próba określenia stopnia nasilenia zmian u krów z niższą koncentracją BHB sięgającą poziomu 0,8-1,2 mmol/l.

Cel pracy

7. CEL PRACY

Celem pracy była ocena zmian wybranych wskaźników hematologicznych i biochemicznych krwi krów rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej oraz określenie zmian poziomu ekspresji wybranych genów w wątrobie w przebiegu podwyższonego surowiczego stężenia BHB.

Cele szczegółowe obejmowały:

- ocenę ogólnego stanu klinicznego zwierząt na podstawie zmian wskaźników morfologicznych i biochemicznych krwi;
- ocenę obecności cech tłuszczowego nacieczenia hepatocytów w badaniu ultrasonograficznym wątroby;
- izolację RNA w celu określenia poziomu ekspresji genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową i peroksydazę glutationową;
- określenie wpływu podwyższonego stężenia β-hydroksymaślanu w surowicy krów rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej na poziom ekspresji genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową i peroksydazę glutationową w wątrobie.

Materiał i metody

8. MATERIAŁ I METODY

8.1. ZWIERZĘTA WYKORZYSTANE W EKSPERYMENCIE I SCHEMAT POBIERANIA MATERIAŁU BADAWCZEGO

Doświadczenie zostało przeprowadzone w stadzie bydła mlecznego rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej (HF) liczącego 189 krów mlecznych znajdującym się na terenie województwa warmińsko-mazurskiego w Stacji Dydaktyczno-Badawczej Bałdy należącej do Uniwersytetu-Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie. Zwierzęta były utrzymywane w oborze wolnostanowiskowej, spełniającej wymogi dla dobrostanu zwierząt gospodarskich zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. W pomieszczeniach, gdzie przebywały zwierzęta była wentylacja grawitacyjna i naturalne oświetlenie. W czasie trwania całego eksperymentu wszystkie zwierzęta przebywały w gospodarstwie i tam pobierano materiał badawczy. Krowy miały stały dostęp do wody, karmione były dwukrotnie w ciągu doby przy użyciu TMR (z ang. *total mixed ration*) w dawce *ad libitum*, którego skład przedstawiony jest w Tabeli 1. Dój w gospodarstwie odbywał się dwukrotnie w ciągu dnia, na hali udojowej. Stado znajduje się pod stałą opieką lekarsko-weterynaryjną Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie.

Przez okres 6 miesięcy monitoringowi podlegały wszystkie krowy w stadzie będące co najmniej 3 tygodnie przed planowanym porodem. Czynnikami wykluczającymi udział zwierzęcia w eksperymencie były schorzenia wymagające leczenia farmakologicznego i/lub chirurgicznego w przedziale: tydzień przed porodem – 3 tygodnie po porodzie. Ponadto wykluczono wszystkie pierwiastki i jałówki.

Do udziału w doświadczeniu zakwalifikowano 23 krowy będące po drugiej laktacji, charakteryzujące się wysoką wydajnością mleczną w poprzednich laktacjach (średnio 9500 kg mleka). Do celów badawczych wyselekcjonowane krowy podzielono na dwie grupy: kontrolną - CONT (n=11) oraz doświadczalną - EXP (n=12). Grupę CONT stanowiły zwierzęta zdrowe, które w okresie od tygodnia przed i do trzech tygodni po porodzie nie wykazywały podwyższonego stężenia BHB w surowicy. Grupę EXP stanowiły zwierzęta, u których co najmniej raz w tym przedziale czasowym stężenie BHB znajdowało się w przedziale od 0,9 do 1,4 mmol/l, a średnie stężenie tego związku w trzech tygodniach po porodzie wynosiło ponad 0,8 mmol/l.

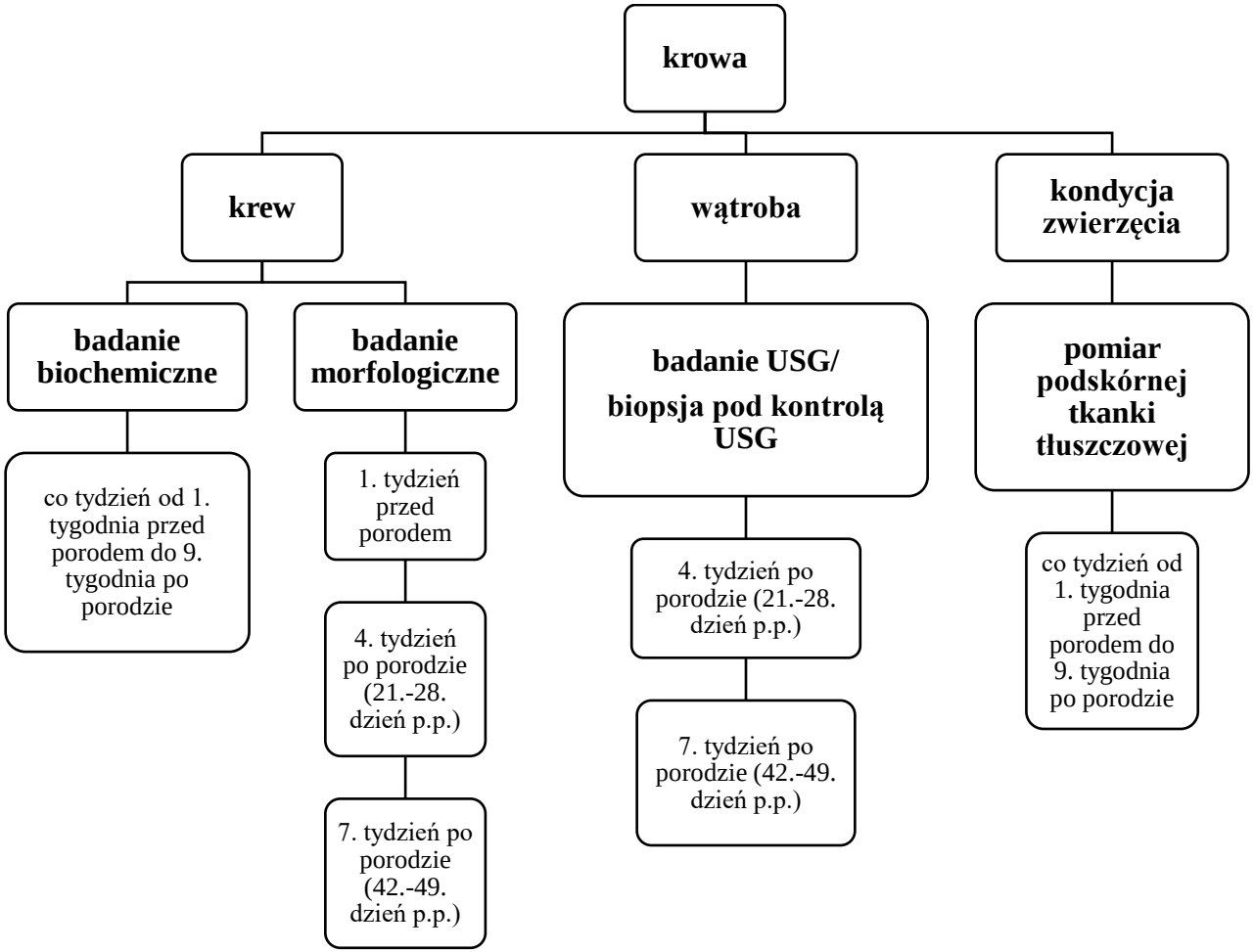
Przeprowadzenie procedur doświadczalnych uzyskało aprobatę Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach (Uchwała Nr 28/2020 z dnia 22.04.2020).

Materiał badawczy od zwierząt z obu grup stanowiły: krew pełna, surowica, wycinki wątroby, obrazy ultrasonograficzne wątroby i podskórnej tkanki tłuszczowej okolicy zadu – BFT (ang. *backfat thickness*). Był on pobierany według schematu przedstawionego na Rycinie 1.

Tabela 1. Skład dawki pokarmowej

Składnik paszy	Dawka dla krowy w laktacji na dzień (kg)
kiszonka z kukurydzy	25
sianokiszonka	9
słoma	0,5
pszenżyto	2
Rzepmix® (śruta rzepakowa)	2
Milkor 38® (korektor białkowo-energetyczny)	3
olej palmowy	0,25
glikol	0,23
Repromax® (dodatek mineralny)	0,23
kwaśny węglan	0,48
Killacid® (drożdże)	0,1
kreda	0,05
Somifix® (premiks witaminowo-mineralny)	0,1

Rycina 1. Ogólny schemat przebiegu doświadczenia



8.2. BADANIA BIOCHEMICZNE I MORFOLOGICZNE KRWI

Krew obwodową do badań biochemicznych i morfologicznych pobierano z żyły pośrodkowej ogona (łac. *vena coccygea mediana*) za pomocą próżniowego systemu BD VACUTAINER (Becton Dickinson, USA). Do wkłucia użyto igieł iniekcyjnych BD VACUTAINER 20G 0,9x38 mm (Becton Dickinson, USA). Miejsce pobrania krwi najpierw oczyszczano suchym ręcznikiem papierowym, a następnie dezynfekowano wacikiem nasączonym alkoholem. W celu uzyskania surowicy krew pobierano do trzech 9 ml probówek z aktywatorem wykrzepiania (Becton Dickinson, USA), natomiast aby uzyskać krew pełną pobierano ją do dwóch 4 ml probówek z K_2EDTA (Becton Dickinson, USA). Uzyskaną krew przechowywano w lodówce transportowej o temperaturze około 5^{o}C i w ciągu godziny od pobrania przewożono ją do laboratorium Katedry Chorób Wewnętrznych z Kliniką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie.

Pobrany materiał posłużył do wykonania następujących oznaczeń:

- badanie morfologiczne krwi – wykonywano bezpośrednio po przywiezieniu krwi do laboratorium w celu określenia ogólnego stanu zwierzęcia. Krew pozostała po wykonaniu badania była odwirowana w celu uzyskania krwinek i przechowywana w zamrażarce w temperaturze -80^{o}C. Krwinki posłużyły do oznaczenia aktywności peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej;
- badanie aktywności peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej - wykonano po uzyskaniu materiału badawczego od wszystkich zwierząt;
- badanie biochemiczne surowicy – wykonywano bezpośrednio po uzyskaniu surowicy poprzez odwirowanie krwi pełnej pobranej do probówek z aktywatorem wykrzepiania. Krew wirowano przez 10-15 minut z szybkością 1500 obr./min. Po oddzieleniu surowicy do 4 czystych, szklanych probówek materiał wykorzystano do wykonania oznaczeń biochemicznych (lista oznaczanych parametrów przedstawiona jest w Tabeli 2.);

Oznaczenia poszczególnych parametrów we krwi obwodowej wykonano metodami przedstawionymi w Tabeli 2.

Tabela 2. Metody wykonania oznaczeń we krwi obwodowej

Parametr/Badanie	Materiał badawczy	Metoda	Analizator i odczynniki
morfologia krwi (CBC+DIFF) WBC %NEUT %LYMPH %MONO %EOS %BASO %LUC NEUT LYMPH MONO EOS BASO LUC RBC HGB HCT MCV	krew pełna pobrana na K_2EDTA	- odczyt cytometryczno-laserowy z zestawami: • zestaw optyczny perox – pomiar światła rozproszonego i pochłoniętego przez pojedyncze komórki z wykorzystaniem hydrodynamicznego ogniskowania strumienia komórek w kuwecie przepływowej • laserowy zestaw optyczny – wysoko i nisko kątowy pomiar światła rozproszonego i pochłanianego przez poszczególne komórki, którego źródłem jest dioda lasera – pomiar wykorzystywany do oceny układu czerwonokrwinkowego i płytkowego oraz określający płatowość jądra komórkowego w układzie biało krwinkowym • zestaw kolorymetryczny hemoglobinowy – wartości napięcia na lampie hemoglobinowej odpowiadają ilości transmitowanego światła • zestaw odczynników PEROX i BASO – wykorzystuje reakcje cytochemiczne do DIFF	-analizator hematologiczny ADVIA 2120i (Siemens, Niemcy)

MCH MCHC RDW HDW PLT MPV			
stężenie glukozy (GLUC)	surowica	- metoda oksydazowa, pomiar kolorymetryczny przy długości fali 510 nm/670 nm	-analizator biochemiczny ACCENT-200 (Cormay, Polska) -odczynniki firmy Cormay (Polska)
aktywność aminotransferazy asparaginianowej (AST)	surowica	- metoda kinetyczna IFCC bez aktywacji fosforanem pirydoksalu, pomiar kolorymetryczny przy długości fali 340 nm/450 nm	-analizator biochemiczny ACCENT-200 (Cormay, Polska) -odczynniki firmy Cormay (Polska)
aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT)	surowica	- metoda kinetyczna IFCC bez aktywacji fosforanem pirydoksalu, pomiar kolorymetryczny przy długości fali 340 nm/450 nm	-analizator biochemiczny ACCENT-200 (Cormay, Polska) -odczynniki firmy Cormay (Polska)
aktywność kinazy kreatynowej (CK)	surowica	- metoda kinetyczna IFCC z fosforanem kreatyny, pomiar kolorymetryczny przy długości fali 340 nm/450 nm	-analizator biochemiczny ACCENT-200 (Cormay, Polska) -odczynniki firmy Cormay (Polska)
aktywność dehydrogenazy	surowica	- metoda kinetyczna DGKC z pirogronianem, pomiar kolorymetryczny przy długości fali 340 nm/450 nm	-analizator biochemiczny ACCENT-200 (Cormay, Polska) -odczynniki firmy Cormay (Polska)

mleczanowej (LDH)			
aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP)	surowica	- metoda kinetyczna IFCC, kolorymetryczny pomiar szybkości powstawania p-nitrofenolu przy długości fali 405 nm/670 nm	-analizator biochemiczny ACCENT-200 (Cormay, Polska) -odczynniki firmy Cormay (Polska)
stężenie cholesterolu (CHOL)	surowica	- metoda kolorymetryczna z esterazą i oksydazą cholesterolu – CHOD/PAP, pomiar kolorymetryczny przy długości fali 510 nm/670 nm	-analizator biochemiczny ACCENT-200 (Cormay, Polska) -odczynniki firmy Cormay (Polska)
stężenie trójglicerydów (TG)	surowica	- metoda enzymatyczna z oksydazą glicerofosforanową, pomiar kolorymetryczny przy długości fali 546 nm/670 nm	-analizator biochemiczny ACCENT-200 (Cormay, Polska) -odczynniki firmy Cormay (Polska)
stężenie Ca	surowica	- metoda kolorymetryczna Arsenazo III, pomiar kolorymetryczny przy długości fali 670 nm	-analizator biochemiczny ACCENT-200 (Cormay, Polska) -odczynniki firmy Cormay (Polska)
stężenie niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (NEFA)	surowica	- metoda kolorymetryczna WAKO, pomiar kolorymetryczny przy długości fali 546 nm/670 nm	-analizator biochemiczny ACCENT-200 (Cormay, Polska) -odczynniki firmy Wako Chemicals GmbH (Niemcy)
stężenie β-hydroksymaślanu (BHB)	surowica	- metoda kolorymetryczna WAKO), pomiar kolorymetryczny przy długości fali 546 nm	-analizator biochemiczny ACCENT-200 (Cormay, Polska) -odczynniki firmy DiaSys (USA)

aktywność peroksydazy glutationowej (GSH-Px)	krew pełna/krwinki	- metoda Paglia i Valentine z kumenem), pomiar kolorymetryczny przy długości fali 340 nm	-analizator biochemiczny ACCENT-200 (Cormay, Polska) -odczynniki Ransel firmy Randox (Wielka Brytania)
aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)	krew pełna/ krwinki	- metoda z oksydazą ksantynową XOD, pomiar kolorymetryczny przy długości fali 505 nm	-analizator biochemiczny ACCENT-200 (Cormay, Polska) -odczynniki RANSOD firmy Randox (Wielka Brytania)

8.3. OCENA KONDYCJI KROWY

Ocenę ogólnej kondycji krowy oraz stopień utraty masy ciała po porodzie oceniano poprzez pomiar BFT wykonany przy pomocy aparatu ultrasonograficznego 4 Vet Slim (Dramiński, Polska). Pomiar wykonywany był w połowie linii łączącej guz biodrowy z guzem kulszowym używając takich samych ustawień aparatu (częstotliwość – 7 MHz, zakres – 80 mm) za pomocą głowicy liniowej rektalnej. Uzyskany obraz zapisywano, zgrywano na dysk i przy pomocy programu MicroDicom viewer (MicroDicom Ltd, Bułgaria) mierzono grubość podskórnej tkanki tłuszczowej (BFT) zgodnie ze schematami przedstawionymi na Rycinie 2. Każdy z pomiarów (pomiar 1 – uwzględniający samą tkankę tłuszczową i pomiar 2. – do którego włączono grubość skóry) wykonywano trzykrotnie i wyciągano średnią, którą użyto w analizie statystycznej.

Rycina 2. Schemat pomiaru BFT – pomiar 1 i 2.

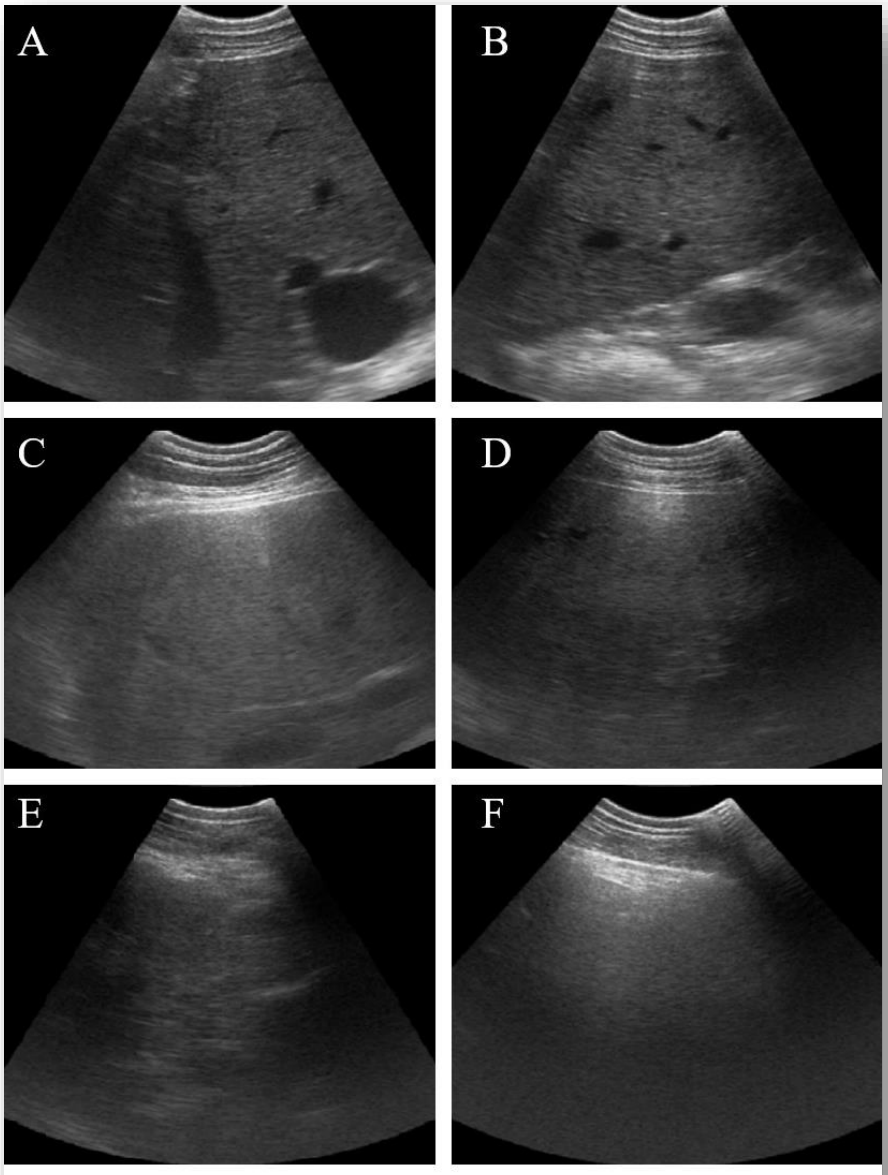


8.4. ULTRASONOGRAFICZNA OCENA OBRAZÓW WĄTROBY

Materiał do ultrasonograficznej oceny obecności cech tłuszczowego nacieczenia hepatocytów stanowiły obrazy uzyskane za pomocą aparatu 4 Vet Slim (Dramiński, Polska) z wykorzystaniem głowicy typu convex (częstotliwość – 3,5 MHz, zakres – 250 mm) w wygolonym obszarze umiejscowionym 10 cm dobrzusznie od wyrostków poprzecznych kręgów o wielkości około 20cm x 20cm dogłowowo od ostatniej przestrzeni międzyżebrowej (Ryc. 4). Uzyskane obrazy zapisywano, zgrywano na dysk i analizowano przy pomocy programu MicroDicom viewer (MicroDicom Ltd, Bułgaria).

Obrazy wątroby oceniano pod kątem obecności cech nacieczenia tłuszczowego tego narządu opisanych przez KOMEILIAN i wsp. (2011) i przedstawionych na Rycinie 3. – zwiększona echogeniczność miąższu wątroby (ang. *brightness pattern*), rozmycie naczyń wątrobowych (ang. *vessel blurring*), obecność głębokiego tłumienia echa (ang, *deep attenuation*) oraz widoczność przepony (ang. *diaphragm visibility*).

Rycina 3. Cechy tłuszczowego nacieczenia hepatocytów wg KOMEILIAN i wsp. (2011)



A, B - prawidłowy obraz wątroby; **C** - stłuszczenie wątroby 1. stopnia (łagodne) - zwiększona echogeniczność miąższu wątroby, rozmycie ścian naczyń wątrobowych; **D** - stłuszczenie wątroby 2. stopnia (umiarkowane) - zwiększona echogeniczność miąższu wątroby, rozmycie ścian naczyń, obecność głębokiego tłumienia echa, przepona widoczna, rozmyta; **E, F** - stłuszczenie wątroby 3. stopnia (zaawansowane) - zwiększona echogeniczność miąższu wątroby, niewidoczne naczynia wątrobowe, głębokie tłumienie echa, przepona niewidoczna

8.5. BIOPSJA GRUBOIGŁOWA POD KONTROLĄ USG

Materiał do reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym (qRT-PCR), służącej do ilościowej oceny poziomu ekspresji genów kodujących SOD i GSH-Px, stanowiły wycinki wątroby pobrane pod kontrolą aparatu ultrasonograficznego (4 Vet Slim, Dramiński, Polska) z wykorzystaniem głowicy typu convex.

Tkankę wątrobową pobierano przy użyciu automatycznego aparatu do biopsji gruboigłowej Pro-mag Ultra 765016200 (Argon Medical Devices, USA) i igieł do biopsji gruboigłowej o średnicy 1,6 mm i długości 20 cm (Argon Medical Devices, USA) zgodnie z poniższą procedurą (Rycina 4.):

- wygolenie obszaru umiejscowionego 10 cm dobrzusznie od wyrostków poprzecznych kręgów o wielkości około 20cm x 20cm dogłowowo od ostatniej przestrzeni międzyżebrowej o wielkości około 10 cm x 20 cm dogłowowo od ostatniej przestrzeni międzyżebrowej,

-wykonanie badania USG wątroby (4 Vet Slim, Dramiński, Polska) i wybranie miejsca pobrania materiału,

-znieczulenie miejscowe nasiękowe - POLOCAINUM HYDROCHLORICUM 5% (Biowet Drwalew) - 5 ml,

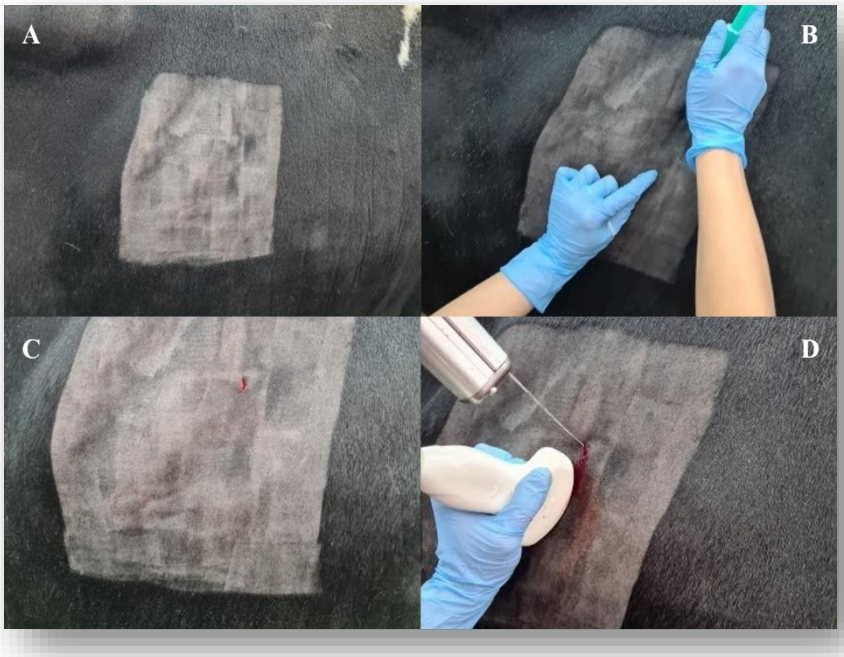
-nacięcie skóry i tkanki podskórnej o długości około 1 cm wykonane za pomocą jednorazowego skalpela,

-wprowadzenie igły biopsyjnej pod kontrolą USG i pobranie fragmentu wątroby poprzez zwolnienie blokady; przy każdej biopsji igłę wprowadzano 4 razy w celu pobrania 4 wycinków wątroby, użyty automatyczny aparat do biopsji gruboigłowej umożliwił pobieranie jednakowych wycinków za każdym razem;

-zabezpieczenie rany preparatem antybiotykowym w sprayu (Cyclo Spray, Dechra, Wielka Brytania); tak małe nacięcie nie wymagało założenia szwów;

Wycinki wątroby pobierano do opisanych (oborowy numer identyfikacyjny krowy/numer pobrania) jałowych probówek odpornych na przechowywanie w niskich temperaturach (Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5 ml, PCR clean, Eppendorf Poland) i transportowano w szczelnym pojemniku wypełnionym ciekłym azotem. Tkanki do czasu wykonania oznaczeń przechowywane były w zamrażarce w temperaturze -80^{0}C.

Rycina 4. Przebieg biopsji wątroby



(A-wygolony obszar, B-znieczulenie miejscowe, C-nacięcie skóry skalpelem, D-biopsja pod kontrolą USG)

8.6. IZOLACJA RNA

Izolacja RNA została przeprowadzona po zakończeniu części terenowej doświadczenia, gdy wycinki wątroby od wszystkich krów biorących udział w eksperymencie zostały już zebrane i przechowywane w temperaturze – 80^0C do momentu izolacji.

Wszystkie etapy izolacji RNA wykonano zgodnie z protokołem PureLink™ RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, USA) i przy użyciu odczynników z tego zestawu. Probówki z wycinkami po wyjęciu z zamrażarki przenoszono do styropianowego pojemnika wypełnionego kruszonym lodem, tak jak zaleca producent odczynników do izolacji RNA. Homogenizacji dokonano stosując kulki ze stali nierdzewnej przeznaczone do lizy tkanek miękkich o średnicy 5mm (Qiagen, GmbH, Niemcy) i wytrząsając je przez 2 minuty w homogenizatorze TissueLyser LT (Qiagen, GmbH, Niemcy), po uprzednim dodaniu do każdej probówki odpowiedniej ilości buforu lizującego z dodatkiem 2-merkaptoetanolu (Sigma-Aldrich, USA). Po uzyskaniu lizatu postępowano zgodnie z wyżej wymienionym protokołem, aż do uzyskania produktu końcowego w postaci RNA. Ilość i czystość uzyskanego RNA analizowano spektrofotometrycznie za pomocą urządzenia NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, USA). Natomiast jakość uzyskanych preparatów RNA reprezentowaną jako wartość RIN (ang. *RNA integrity number*) analizowano za pomocą elektroforezy kapilarnej w urządzeniu Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) i zestawu odczynnikowego Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, USA) zgodnie z procedurą producenta.

W celu zabezpieczenia RNA przed degradacją probówki przechowywano w temperaturze – 80^0C do czasu wykonania odwrotnej transkrypcji.

8.7. qRT-PCR

1000 ng całkowitego RNA (ang. *Total RNA*) poddano odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu odczynnikowego Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Szwajcaria) zgodnie z instrukcją producenta. Uzyskane cDNA rozcieńczano 100-krotnie i do czasu przeprowadzenia reakcji qRT-PCR przechowywano w temperaturze -20^{o}C.

Reakcja amplifikacji Real Time (w czasie rzeczywistym) została przeprowadzona w aparacie LightCycler LC 480 II (Roche, Szwajcaria) na płytkach 96-cio dołkowych (LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white, Roche, Szwajcaria). Mieszanina reakcyjna składała się z: 5 µl 100-krotnie rozcieńczonego cDNA, 10 pmol każdego ze starterów (Tabela 3.), 3 µl wody (PCR-Grade Water Roche, Szwajcaria) i 10 µl LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Szwajcaria). Każda reakcja była wykonana w 2 powtórzeniach, natomiast kontrola negatywna (zawierająca wodę zamiast cDNA) wykonywana była w potrójnym powtórzeniu dla każdego z genów. Profil termiczny reakcji przedstawia Tabela 4.

Dla każdego amplikonu szacowano wydajność reakcji oraz *error value* – średni błąd kwadratowy dopasowania pojedynczych punktów do linii regresji używając 6-cio punktowej krzywej standardowej opartej o 4-krotne rozcieńczenia. Wartość Cq była określona przez oprogramowanie aparatu LightCycler 480 SW 1.5 software w oparciu o domyślne ustawienia i metodę maksimum drugiej pochodnej (ang. *second derivative maximum method*).

Tabela 3. Charakterystyka amplikonów wykorzystanych w reakcji qRT-PCR

Symbol genu i nazwa genu	Sekwencja startera *forward* Sekwencja startera reverse	Tm amplikonu[+] (^oC)	Dł. amplikonu (pz)	Acc. No[*].
GAPDH - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego[^]	5'GTCTTCACTACCATGGAGAAGG3' 5'TCATGGATGACCTTGGCCAG3'	86,22	197	NM_001034034.2
RPL32 – białko rybosomalne L32[^]	5'AAAGAGGACCAAGAAGTTCATTAGG 3' 5'CGCCAGTTCCGCTTGATTT3'	78,90	66	NM_001034783.2
GPx3 – peroksydaza glutationowa 3	5'GTCAACGTGGCCAGCTACTGA3' 5'CAGAATGACCAGACCAAATGGTT3'	83,77	93	NM_174077.5
SOD1 – dysmutaza ponadtlenkowa 1	5'TGTTGCCATCGTGGATATTGTAG3' 5'CCCAAGTCATCTGGTTTTTCATG3'	80,13	102	NM_174615.2
SOD2 – dysmutaza ponadtlenkowa 2	5'CGCTGGAGAAGGGTGATGTT3' 5'GATTTGTCCAGAAGATGCTGTGAT3'	82,68	99	NM_201527.2
SOD3 – dysmutaza ponadtlenkowa 3	5'GCAGCAGATGGGCTCCAA3' 5'GCATCATCTCCTGCCAGATCTC3'	85,26	80	XM_024993274.1

*Acc. No (ang. *accesion number*) - numer identyfikacyjny genu wg NCBI

+ temperatura topnienia amplikonu

^ gen referencyjny

Tabela 4. Profil termiczny reakcji qRT-PCR

Etap reakcji		Temperatura (°C)	Czas
Preinkubacja		95	5 minut
Amplifikacja (45 cykli)	Denaturacja	95	10 sekund 10x
	Przyłączanie starterów	60	10 sekund 10x
	Amplifikacja i odczyt fluorescencyjny	72	10 sekund 10x
Krzywa topnienia (z ang. *melting curve*)		95	5 sekund
Chłodzenie		do 65	1 minuta
Podgrzanie i stały odczyt fluorescencyjny		od 65 – 97	0,11°C/sek.
Chłodzenie		do 45	

8.8. ANALIZA STATYSTYCZNA

Dane zgromadzone do analizy były przechowywane w plikach tekstowych oraz arkuszach kalkulacyjnych EXCEL. Następnie, analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą dwóch języków programowania: Python 3.10.0 (VAN ROSSUM i DRAKE 2009) oraz R 4.3.1 (R CORE TEAM 2020). Statystyki opisowe, uwzględniające średnie wartości i odchylenia standardowe dla poszczególnych zmiennych oraz punktów czasowych, zostały przedstawione w formie tabelarycznej. W celu weryfikacji założenia o normalności rozkładu danych, użyto testu Shapiro-Wilka (ROYSTON 1995). Jednorodność wariancji pomiędzy grupami sprawdzono za pomocą testu Levene'a (LEVENE 1960). Z uwagi na charakterystykę próby oraz niespełnienie założeń normalności rozkładu, wybrano metodykę analizy nieparametrycznej dla porównań między grupami badawczymi w każdym dniu doświadczenia. W tym celu wykorzystano test U Manna-Whitneya (MANN i WHITNEY 1947). Do przeprowadzenia analizy efektów wewnątrz oraz międzygrupowych zastosowano analizę wariancji dla pomiarów powtarzanych (Repeated Measures Analysis of Variance, RM ANOVA). Dla testu RM ANOVA badano również założenie sferyczności danych przy użyciu testu Mauchly'ego, a w przypadku naruszenia założenia, do korekty stopni swobody zastosowano procedurę Greenhouse-Geissera. Do oceny wzajemnej zależności ekspresji genów użyto metody Spearmana Wizualizacja wyników została zrealizowana za pomocą wykresów liniowych oraz słupkowych, skonstruowanych przy użyciu biblioteki Matplotlib (Hunter, 2007).

Wyniki

WYNIKI

9.1. BADANIE MORFOLOGICZNE KRWI

Wyniki badań morfologicznych krwi zostały przedstawione w Tabeli 5. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic ($P<0,05$) we wskaźnikach układu czerwonokrwinkowego, białokrwinkowego i wskaźników płytkowych pomiędzy grupami tydzień przed porodem oraz w 4. i 7. tygodniu po porodzie.

Tabela 5. Wyniki badań morfologicznych krwi krów z grupy kontrolnej i doświadczalnej

	EXP tydzień przed porodem		**CONT tydzień przed porodem**		**EXP 4. tyg, przed porodem**		**CONT 4. tyg, po porodzie**		**EXP 7. tyg, po porodzie**		**CONT 7. tyg, po porodzie**	
	Średnia	**SD**	**Średnia**	**SD**	**Średnia**	**SD**	**Średnia**	**SD**	**Średnia**	**SD**	**Średnia**	**SD**
WBC ($\times 10^9$/l)	8,18	2,034	8,36	1,613	8,01	2,255	8,24	2,457	7,55	2,386	7,13	1,943
%NEUT	46,34	7,734	44,54	5,981	44,77	10,805	46,17	13,814	42,02	10,833	43,31	11,895
%LYMPH	40,78	8,862	41,11	5,295	42,94	11,650	43,83	12,318	46,11	11,707	46,06	10,213
%MONO	5,14	1,605	4,81	0,939	6,05	1,575	5,13	1,843	5,47	1,573	5,23	2,144
%EOS	6,54	3,293	8,29	1,942	4,87	3,888	3,81	2,836	5,37	4,702	4,22	3,417
%BASO	0,59	0,202	0,75	0,245	0,63	0,195	0,68	0,335	0,61	0,285	0,66	0,332
%LUC	0,59	0,373	0,53	0,306	0,69	0,470	0,37	0,250	0,39	0,260	0,52	0,315
NEUT ($\times 10^9$/l)	3,79	1,191	3,76	1,023	3,64	1,601	3,99	2,102	3,31	1,597	3,24	1,596
LYMPH ($\times 10^9$/l)	3,30	1,002	3,43	0,742	3,35	1,002	3,39	0,796	3,34	0,822	3,19	0,689
MONO ($\times 10^9$/l)	0,42	0,181	0,40	0,095	0,47	0,153	0,40	0,147	0,39	0,134	0,35	0,090
EOS ($\times 10^9$/l)	0,56	0,322	0,67	0,099	0,43	0,388	0,31	0,274	0,43	0,410	0,27	0,176
BASO ($\times 10^9$/l)	0,05	0,021	0,06	0,021	0,05	0,019	0,05	0,024	0,05	0,019	0,04	0,025
LUC ($\times 10^9$/l)	0,05	0,040	0,04	0,030	0,05	0,030	0,03	0,023	0,03	0,027	0,04	0,029
RBC ($\times 10^{12}$/l)	5,77	0,405	5,88	0,378	5,70	0,473	5,73	0,447	5,42	0,624	5,58	0,434
HGB (g/l)	10,72	0,371	10,40	0,705	10,50	0,530	10,24	0,783	9,95	0,728	9,81	0,621
HCT (%)	27,89	1,079	27,04	1,630	27,40	1,406	26,58	1,865	25,70	2,258	25,50	1,544
MCV (fl)	48,47	3,034	46,03	1,822	48,21	2,975	46,41	2,118	47,57	2,977	45,81	1,793
MCH (pg)	18,67	1,131	17,70	0,756	18,50	1,165	17,88	0,876	18,46	1,111	17,60	0,876
MCHC (g/l)	38,52	1,093	38,48	0,471	38,37	0,904	38,54	1,044	38,82	0,939	38,43	0,650

RDW (%)	17,30	1,056	18,28	1,965	17,04	0,799	18,09	1,707	17,02	0,722	17,81	1,652
HDW (%)	2,10	0,161	2,24	0,140	2,05	0,129	2,15	0,107	2,07	0,119	2,13	0,107
PLT ($\times 10^9$/l)	310,55	93,473	275,38	108,750	334,40	91,686	296,78	142,904	363,30	148,900	391,67	77,018
MPV (fl)	6,72	0,958	6,61	0,757	6,58	0,801	6,60	1,513	6,73	1,466	5,72	0,418

9.2. BADANIE BIOCHEMICZNE KRWI

Wyniki badań biochemicznych krwi zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej zostały przedstawione w Tabelach 6, 7 i 8. Cotygodniowe zmiany stężenia/aktywności oznaczanych wskaźników u zwierząt z obu grup przedstawione zostały na Rycinach 5-17.

Stężenie GLUC u zwierząt z grupy kontrolnej tydzień przed i tydzień po porodzie było podwyższone (zakres referencyjny laboratorium - 2,20–4,50 mmol/l). Po wycieleniu stężenie GLUC spadło w obu grupach, natomiast w 7. tygodniu po porodzie było ono istotnie wyższe w grupie doświadczalnej ($P<0,05$). Ponadto zmiany tego wskaźnika w czasie trwania eksperymentu różniły się istotnie pomiędzy grupami ($P< ,05$).

Stężenie Ca w 9. tygodniu po porodzie różniło się istotnie pomiędzy grupami i w grupie doświadczalnej było ono niższe ($P<0,05$), natomiast mieściło się przez cały okres eksperymentu w zakresie wartości referencyjnych (2,25–3,03 mmol/l).

Po wycieleniu u zwierząt z obu grup nastąpił spadek stężenia TG, który w 2. tygodniu p.p. był istotnie niższy u zwierząt z grupy doświadczalnej ($P<0,05$). W 7. tygodniu p.p. zwierzęta z grupy kontrolnej miały istotnie wyższe stężenie TG w surowicy ($P<0,05$).

Stężenie BHB zmieniało się w czasie w sposób istotnie różny pomiędzy grupami ($P<0,05$). U zwierząt z grupy doświadczalnej wysokie stężenie BHB utrzymywało się przez 5 tygodni p.p., aczkolwiek przez pierwsze 3 tygodnie p.p. była to różnica statystycznie istotna pomiędzy grupami ($P<0,05$). Ponadto w pierwszym tygodniu przed porodem zwierzęta z grupy doświadczalnej miały wyższe stężenie tego związku, lecz ta różnica nie była statystycznie istotna.

Stężenie NEFA wykazywało istotne różnice w czasie ($P<0,05$), natomiast nie różniło się istotnie pomiędzy grupami.

Aktywność ALT po porodzie spadała u zwierząt z grupy doświadczalnej, natomiast rosła w grupie kontrolnej. Od 6. do 9. tygodnia p.p. były to różnice statystycznie istotne ($P<0,05$).

W 5. i 6. tygodniu p.p. aktywność AST różniła się istotnie pomiędzy grupami ($P<0,05$). W grupie doświadczalnej była ona niższa niż w grupie kontrolnej.

Aktywność ALP wykazywała istotne różnice w czasie ($P<0,05$), natomiast nie różniło się istotnie pomiędzy grupami.

Aktywność SOD była wyższa w grupie doświadczalnej, przyjmując w 6. i 7. tygodniu p.p. wartość istotnie różniącą się w porównaniu z grupą kontrolną ($P<0,05$).

Nie stwierdzono istotnych różnic ($P<0,05$) w stężeniu CHOL oraz aktywności CK, LDH i GSH-Px pomiędzy grupami.

Tabela 6. Wyniki badań biochemicznych krwi krów z grupy kontrolnej i doświadczalnej

czas w stosunku do porodu (tyg.)		-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
GLUC (mmol/l)											
EXP	**Średnia**	4,125	3,503	3,873	3,605	3,563	3,865	3,940	4,168*	4,145	4,393
	±SD	±1,317	±0,607	±1,094	±1,035	±0,224	±0,570	±0,744	±0,652	±0,931	±0,818
	SEM	0,365	0,175	0,316	0,299	0,065	0,165	0,215	0,188	0,269	0,236
CONT	**Średnia**	5,018	4,885	3,778	3,397	3,466	3,641	3,837	3,474*	3,866	3,988
	±SD	±2,896	±2,751	±0,672	±0,495	±0,470	±0,542	±1,110	±0,630	±0,765	±0,762
	SEM	0,916	0,829	0,203	0,149	0,142	0,164	0,335	0,190	0,231	0,230
Ca (mmol/l)											
EXP	**Średnia**	0,718	0,904*	0,818*	0,888*	0,821	0,839	0,758	0,753	0,747	0,692
	±SD	±0,266	±0,201	±0,252	±0,116	±0,109	±0,192	±0,086	±0,076	±0,072	±0,244
	SEM	0,074	0,058	0,073	0,034	0,032	0,055	0,025	0,022	0,021	0,070
CONT	**Średnia**	0,648	0,642*	0,578*	0,560*	0,738	0,691	0,778	0,808	0,874	0,807
	±SD	±0,242	±0,279	±0,240	±0,198	±0,167	±0,130	±0,142	±0,161	±0,194	±0,154
	SEM	0,077	0,084	0,072	0,060	0,050	0,039	0,043	0,048	0,058	0,047
TG (mmol/l)											
EXP	**Średnia**	0,495	0,119	0,127*	0,134	0,115	0,136	0,114	0,091*	0,120	0,104
	±SD	±0,779	±0,090	±028	±0,095	±0,102	±0,105	±0,052	±0,035	±0,071	±0,048
	SEM	0,216	0,026	0,008	0,027	0,030	0,030	0,015	0,010	0,021	0,014
CONT	**Średnia**	0,427	0,309	0,280*	0,215	0,162	0,154	0,154	0,246*	0,163	0,155
	±SD	±0,560	±0,337	±0,247	±0,194	±0,120	±0,097	±0,105	±0,261	±0,096	±0,014

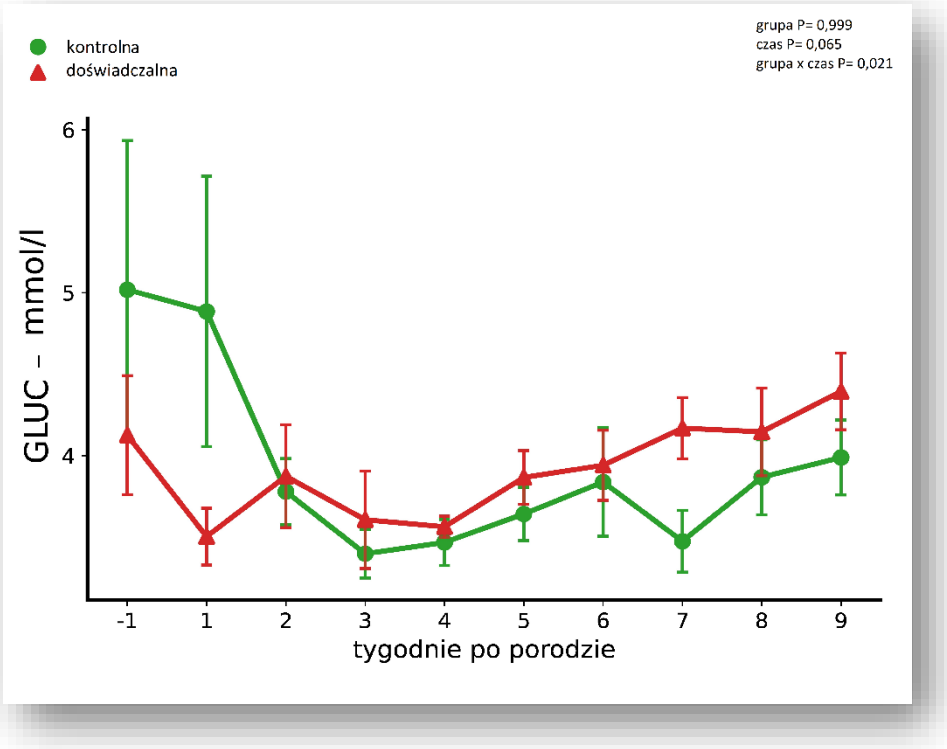
	SEM	0,177	0,102	0,074	0,059	0,036	0,029	0,032	0,079	0,029	0,034
BHB (mmol/l)											
EXP	**Średnia ±SD**	0,718 ±0,266	0,904* ±0,201	0,818* ±0,252	0,888* ±0,116	0,821 ±0,109	0,839 ±0,192	0,758 ±0,086	0,753 ±0,076	0,747 ±0,072	0,692 ±0,244
	SEM	0,074	0,058	0,073	0,034	0,032	0,055	0,025	0,022	0,021	0,070
CONT	**Średnia ±SD**	0,648 ±0,242	0,642* ±0,279	0,578* ±0,240	0,560* ±0,198	0,738 ±0,167	0,691 ±0,130	0,778 ±0,142	0,808 ±0,161	0,874 ±0,194	0,807 ±0,154
	SEM	0,077	0,084	0,072	0,060	0,050	0,039	0,043	0,048	0,058	0,047
NEFA (mmol/l)											
EXP	**Średnia ±SD**	0,444 ±0,714	0,691 ±0,616	0,841 ±0,645	0,627 ±0,599	0,600 ±0,516	0,602 ±0272	0,448 ±0,244	0,313 ±0,203	0,291 ±0,147	0,313 ±0,181
	SEM	0,198	0,178	0,186	0,173	0,149	0,079	0,070	0,059	0,042	0,052
CONT	**Średnia ±SD**	0,379 ±0,269	0,510 ±0,287	0,702 ±0,374	0,532 ±0,226	0,543 ±0,286	0,525 ±0,313	0,451 ±0,301	0,435 ±0,225	0,503 ±0,352	0,355 ±0,263
	SEM	0,085	0,087	0,113	0,068	0,086	0,094	0,091	0,068	0,106	0,079
CHOL (mmol/l)											
EXP	**Średnia ±SD**	2,265 ±0,778	1,650 ±0,484	2,496 ±0,860	3,321 ±0,809	3,797 ±0,900	4,257 ±0,913	4,483 ±1,159	4,673 ±1,206	4,957 ±1,163	5,143 ±1,356
	SEM	0,216	0,140	0,248	0,234	0,260	0,263	0,335	0,348	0,336	0,391
CONT	**Średnia ±SD**	2,396 ±1,004	2,252 ±0,909	2,657 ±0,680	3,206 ±0,580	3,705 ±0,612	4,065 ±0,870	4,288 ±1,064	4,588 ±1,118	4,954 ±1,272	5,052 ±1,273
	SEM	0,318	0,274	0,205	0,175	0,185	0,262	0,321	0,337	0,384	0,384

ALT (U/l)											
EXP	**Średnia**	48,15	50,00	44,83	37,42	33,67	31,92	29,42*	29,50*	27,42*	26,58*
	±SD	±34,307	±26,978	±25,743	±14,969	±14,773	±15,710	±13,420	±9,239	±7,292	±7,669
	SEM	9,515	7,788	7,431	4,321	4,265	4,535	3,874	2,667	2,105	2,214
CONT	**Średnia**	39,600	48,727	42,455	46	49,364	49,727	51,727*	52,727*	48,636*	48,273*
	±SD	±20,195	±38	±24,897	±25,334	±36,702	±28,727	±27,335	±30,796	±28,218	±23,230
	SEM	6,386	11,458	7,507	7,638	11,066	8,661	8,242	9,285	8,508	7,004
AST (U/l)											
EXP	**Średnia**	101,692	103,917	101,750	89,792	85,167	78,333*	81,000*	95,667	100,083	94,250
	±SD	±59,458	±27,298	±25,392	±21,786	±24,132	±22,223	±26,371	±37,869	±36,768	±30,416
	SEM	16,491	7,880	7,330	6,289	6,996	6,415	7,613	10,932	10,614	8,780
CONT	**Średnia**	79,700	106,909	97,182	90,364	94,182	103,273*	105,636*	113,455	116,182	123,182
	±SD	±16,872	±35,492	±25,918	±13,056	±22,221	±24,183	±23,838	±31,998	±37,989	±40,593
	SEM	5,336	10,701	7,815	3,936	6,700	7,291	7,187	9,648	11,454	12,239
ALP (U/l)											
EXP	**Średnia**	58,769	53,833	49,167	47,708	47,083	45,500	47,333	48,583	48,883	47,333
	±SD	±19,383	±20,591	±11,559	±10,015	±4,055	±9,327	±6,020	±14,860	±12,467	±16,244
	SEM	5,376	5,944	3,337	2,891	1,171	2,693	1,738	4,290	3,599	4,689
CONT	**Średnia**	67,900	55,818	53,455	50,273	50,545	49,182	50,636	48,182	43,364	46,545
	±SD	±18,747	±13,029	±9,417	±8,707	±6,362	±7,125	±6,392	±9,516	±10,698	±10,967
	SEM	5,928	3,928	2,839	2,625	1,918	2,148	1,927	2,869	3,226	3,307
CK (U/l)											
EXP	**Średnia**	195,615	204,042	134,692	160,021	171,150	93,417	105,133	125,917	156,542	201,867

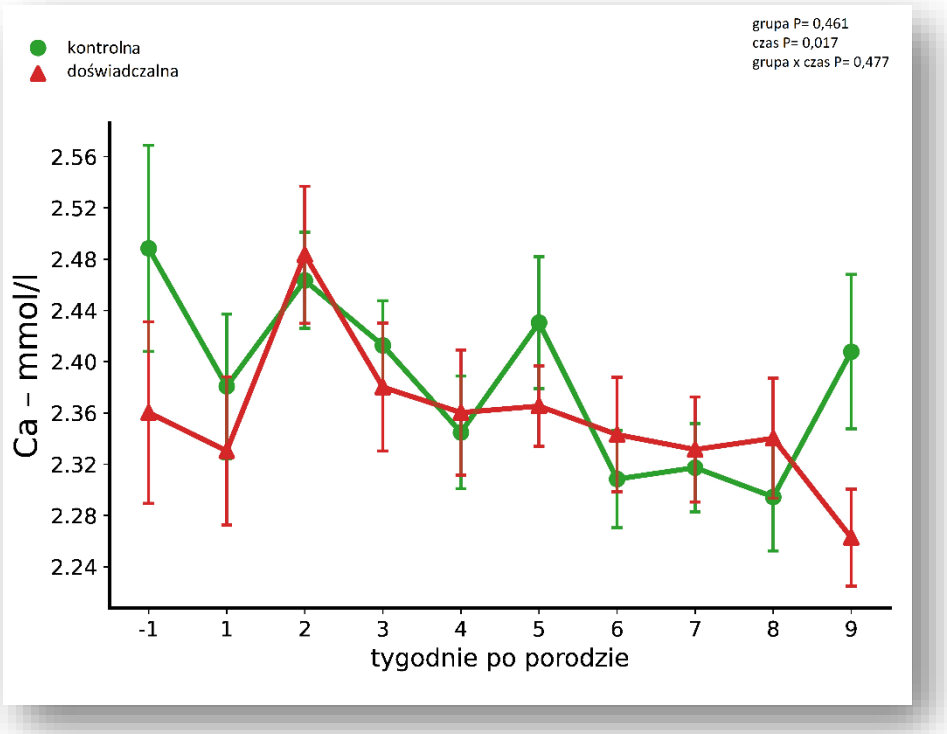
	±SD	±314,807	±202,502	±55,407	±122,682	±189,590	±24,534	±53,126	±53,247	±140,166	±216,987
	SEM	87,312	58,457	15,995	35,415	54,730	7,082	15,336	15,371	40,462	62,639
CONT	**Średnia**	118,260	321,664	125,791	120,691	126,482	114,355	108,545	176,200	204,473	154,927
	±SD	±100,863	±500,280	±61,897	±46,783	±36,312	±34,104	±28,913	±147,998	±241,246	±94,016
	SEM	31,896	150,840	18,663	14,106	10,948	10,283	8,717	44,623	72,738	28,347
LDH (mmol/l)											
EXP	**Średnia**	2999,923	3172,000	3196,500	3014,000	2976,917	2921,750	3084,833	2979,417	3112,250	2868,083
	±SD	±355,815	±558,135	±517,175	±541,225	±507,721	±149,007	±355,801	±349,731	±405,536	±361,420
	SEM	98,685	161,120	149,296	156,238	146,566	43,015	102,711	100,959	117,068	104,333
CONT	**Średnia**	2893,900	3073,818	3070,545	2988,182	2959,818	2904,364	3027,000	3140,091	3060,364	3144,727
	±SD	±265,043	±477,850	±515,281	±238,433	±286,279	±371,152	±326,838	±339,965	±440,360	±468,179
	SEM	83,814	144,077	155,363	71,890	86,316	111,906	98,545	102,503	132,774	141,161

* - statystycznie istotna różnica pomiędzy grupami (P<0,05)

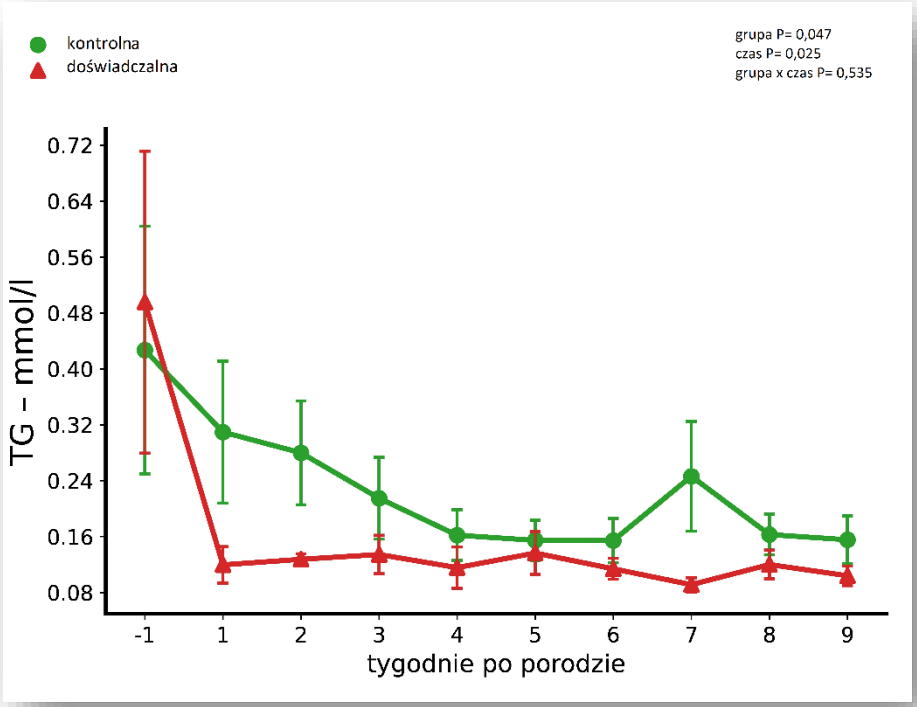
Rycina 5. Zmiany stężenia GLUC w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej



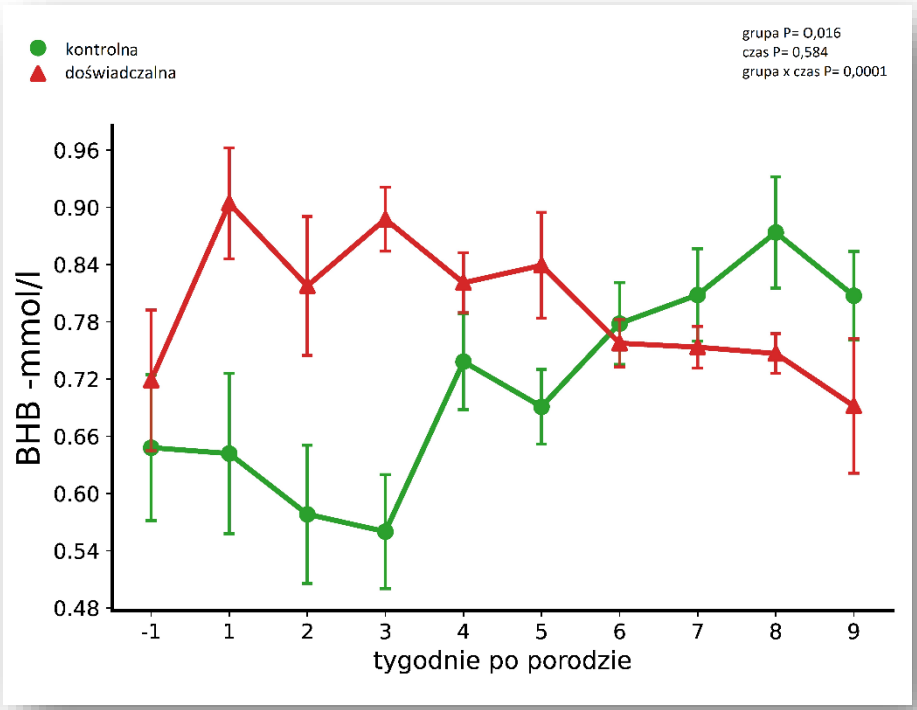
Rycina 6. Zmiany stężenia Ca w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej



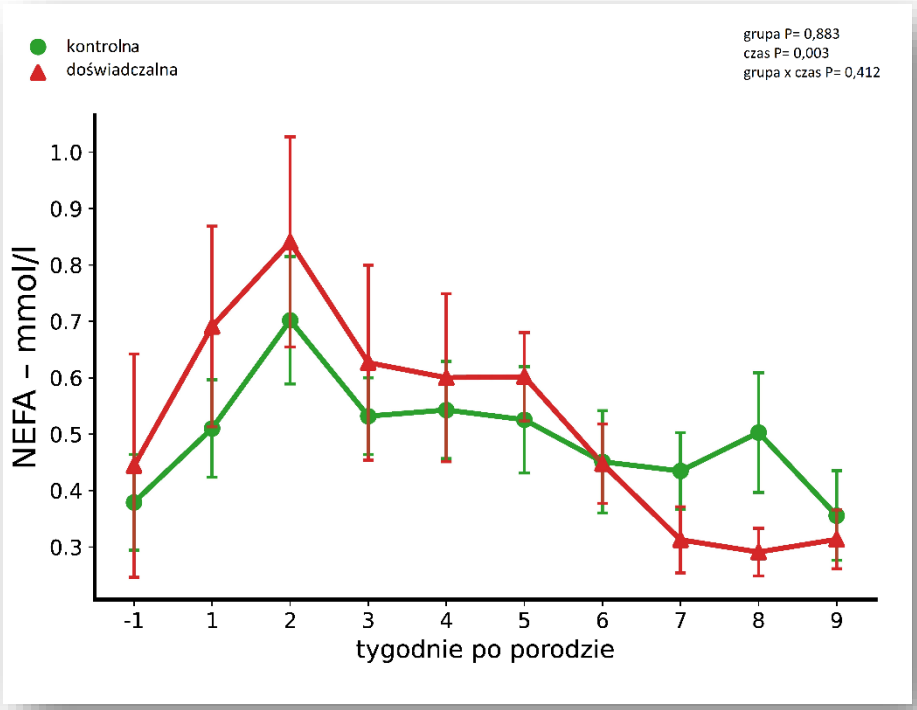
Rycina 7. Zmiany stężenia TG w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej



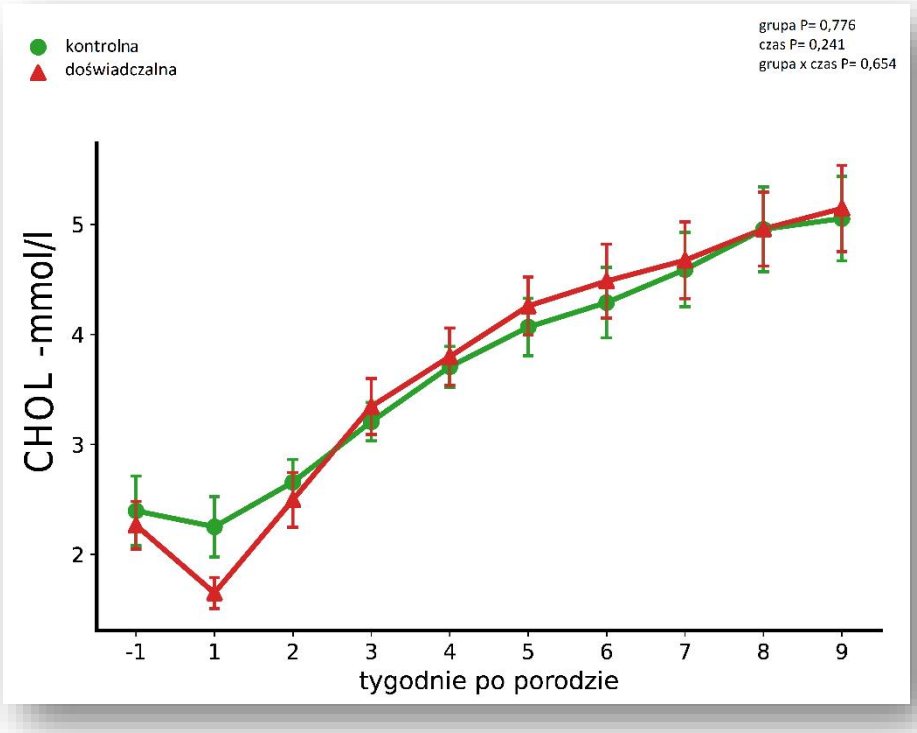
Rycina 8. Zmiany stężenia BHB w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej



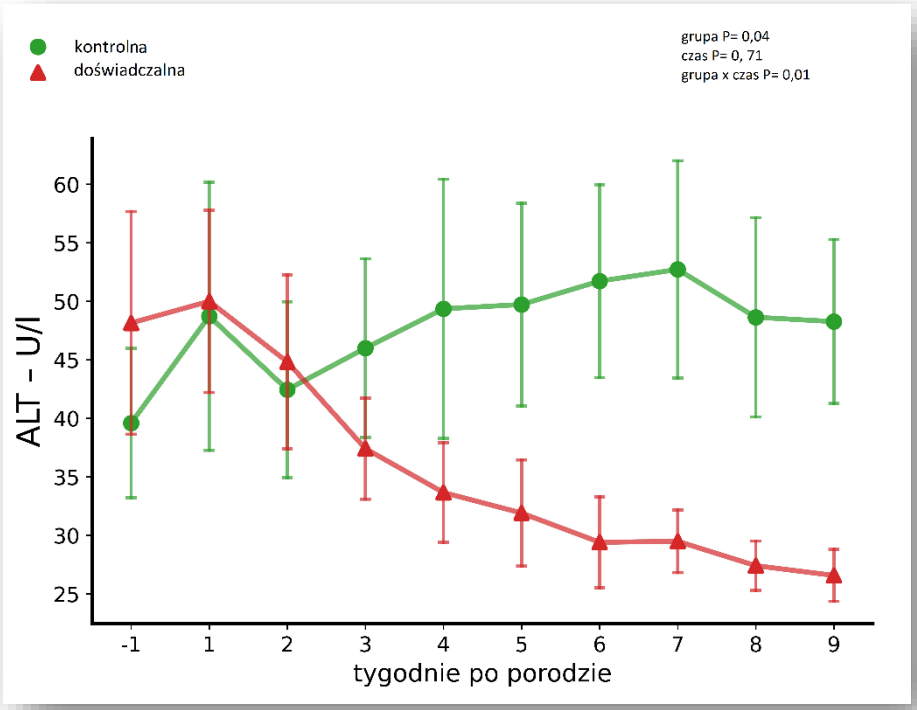
Rycina 9. Zmiany stężenia NEFA w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej



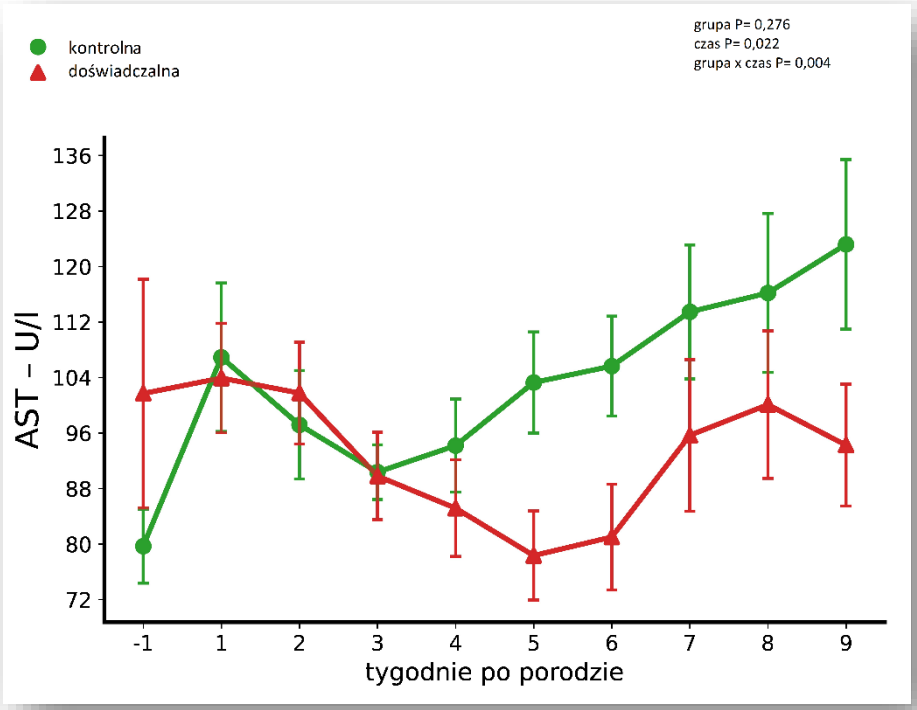
Rycina 10. Zmiany stężenia CHOL w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej



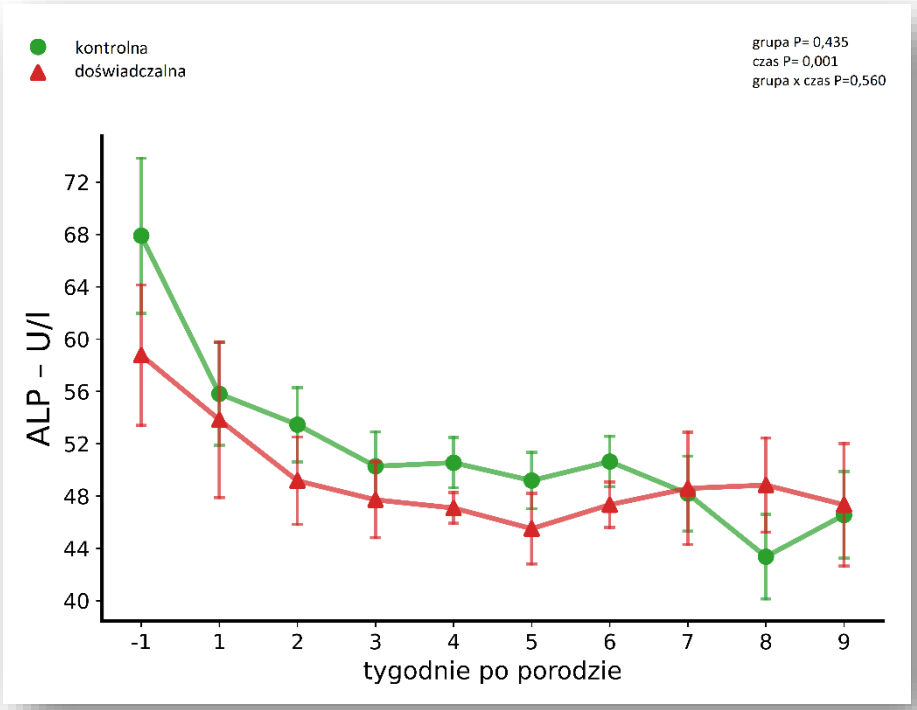
Rycina 11. Zmiany aktywności ALT w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej



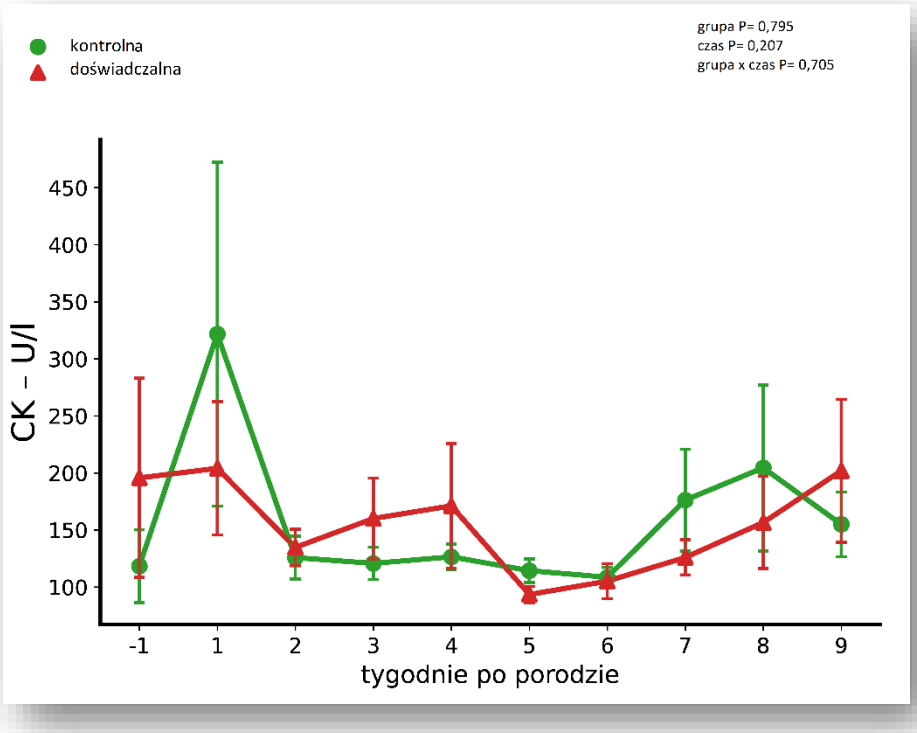
Rycina 12. Zmiany aktywności AST w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej



Rycina 13. Zmiany aktywności ALP w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej



Rycina 14. Zmiany aktywności CK w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej



Rycina 15. Zmiany aktywności LDH w surowicy zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej

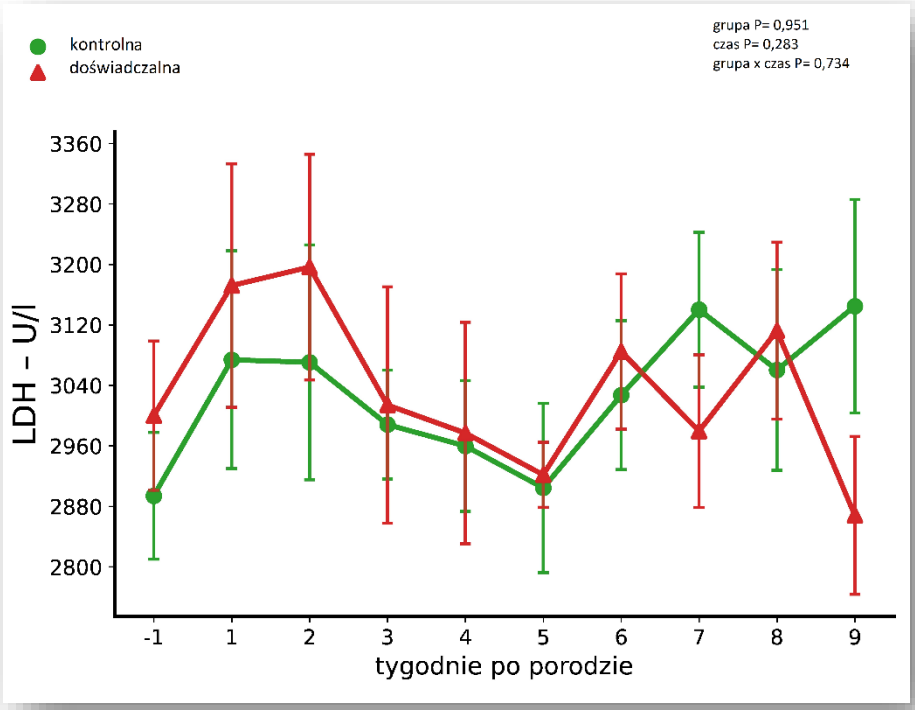


Tabela 7. Wyniki pomiaru aktywności GSH-Px w surowicy (U/l)

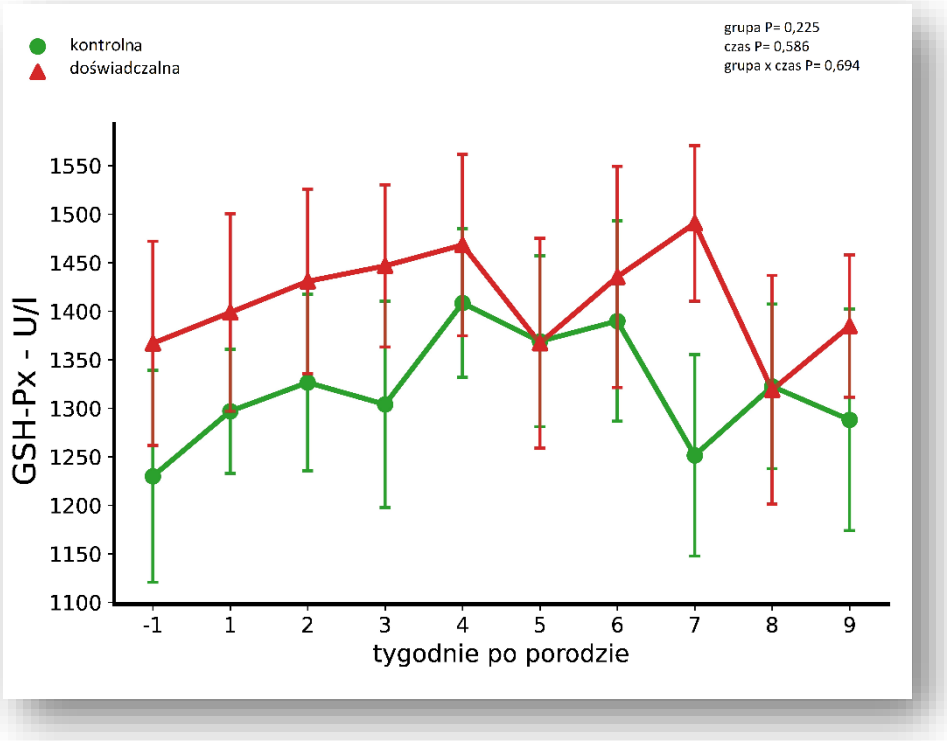
czas w stosunku do porodu (tyg.)		-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
EXP	**Średnia**	1366,846	1398,667	1430,708	1446,667	1468,250	1367,000	1435,333	1490,500	1318,917	1384,583
	±SD	±379,165	±352,567	±329,395	±289,624	±324,141	±374,783	±394,763	±277,609	±408,435	±253,982
	SEM	105,162	101,777	95,088	83,607	93,571	108,190	113,958	80,139	117,905	73,318
CONT	**Średnia**	1229,800	1296,864	1326,500	1303,909	1408,364	1368,909	1389,818	1251,364	1322,455	1288,091
	±SD	±345,409	±211,914	±301,309	±353,010	±254,207	±291,801	±342,521	±344,319	±281,174	±378,857
	SEM	109,228	63,895	90,848	106,436	76,646	87,981	103,274	103,816	84,777	114,230

Tabela 8. Wyniki pomiaru aktywności SOD w surowicy (U/l)

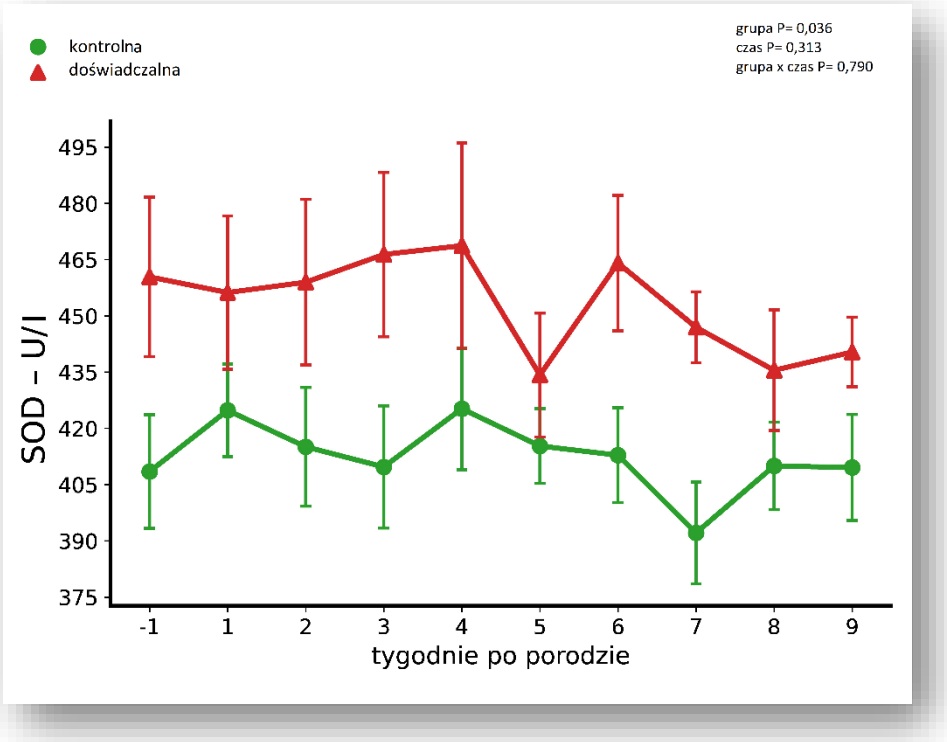
czas w stosunku do porodu (tyg.)		-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
EXP	**Średnia**	460,384	456,203	458,966	466,361	468,713	434,207	464,099*	446,940*	435,478	440,343
	±SD	±76,735	±70,812	±76,532	±75,871	±94,766	±57,303	±62,590	±32,731	±55,800	±32,168
	SEM	21,282	20,442	22,093	21,902	27,357	16,542	18,068	9,449	16,108	9,286
CONT	**Średnia**	408,464	424,800	415,081	409,706	425,228	415,278	412,837*	392,122*	409,973	409,544
	±SD	±47,961	±40,933	±52,525	±54,033	±53,877	±33,036	±41,877	±44,988	±38,665	±46,945
	SEM	15,167	12,342	15,837	16,292	16,245	9,961	12,626	13,564	11,658	14,154

* - statystycznie istotna różnica pomiędzy grupami (P<0,05)

Rycina 16. Zmiany aktywności GSH-Px we krwi zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej



Rycina 17. Zmiany aktywności SOD we krwi zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej



9.3. KONDYCJA KROWY NA PODSTAWIE GRUBOŚCI PODSKÓRNEJ TKANKI TŁUSZCZOWEJ

Wyniki pomiarów grubości podskórnej tkanki tłuszczowej (BFT) zostały przedstawione w Tabelach 9 i 10.

Tygodniowe zmiany w grubości podskórnej tkanki tłuszczowej zostały przedstawione na Rycinach 18. i 19.

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w grubości podskórnej tkanki tłuszczowej pomiędzy grupami przez cały czas trwania eksperymentu zarówno przy pomiarze 1. (sama podskórna tkanka tłuszczowa) jak i 2. (skóra i podskórna tkanka tłuszczowa) natomiast w czasie były to różnice statystycznie istotne ($P<0,05$).

Tabela 9. Wyniki 1. pomiaru grubości podskórnej tkanki tłuszczowej (BFT)

czas w stosunku do porodu (tyg.)		-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
EXP	**Średnia**	27,917	28,147	26,594	23,761	23,868	23,268	23,949	23,388	21,113	22,819
	±SD	±4,524	±4,770	±4,347	±3,423	±2,221	±4,172	±5,316	±5,661	±4,198	±3,666
	SEM	1,255	1,377	1,255	0,988	0,641	1,204	1,535	1,634	1,212	1,058`
CONT	**Średnia**	26,962	24,973	23,296	23,064	22,281	21,879	22,448	22,830	22,784	24,884
	±SD	±8,293	±6,802	±6,211	±6,157	±4,478	±4,542	±4,196	±4,669	±4,548	±8,688
	SEM	2,622	2,051	1,873	1,856	1,350	1,370	1,265	1,408	1,371	2,620

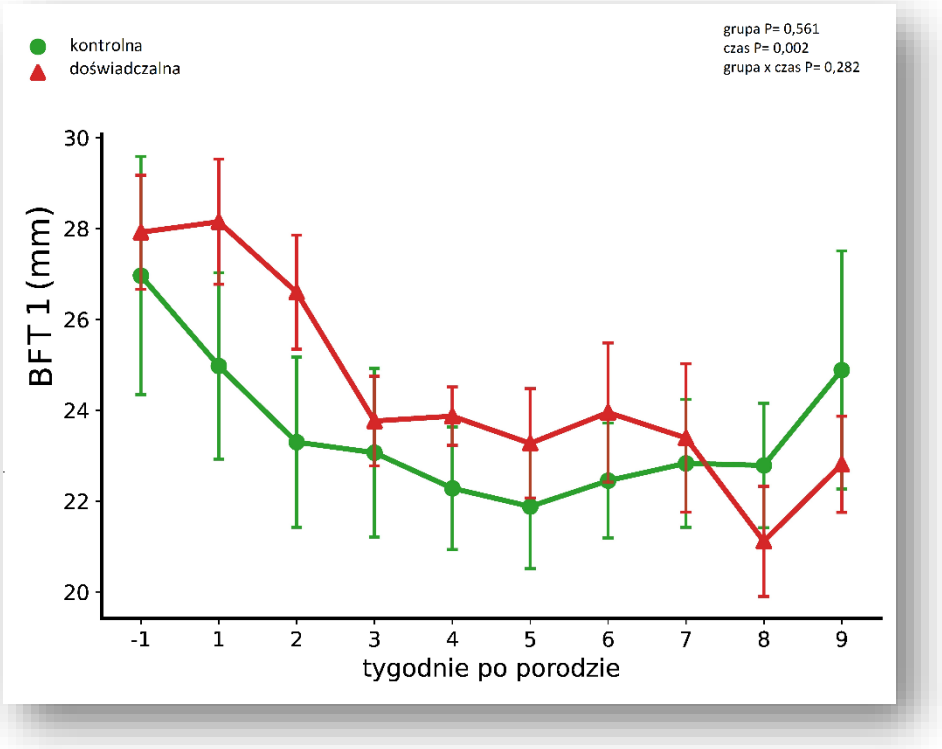
* - statystycznie istotna różnica pomiędzy grupami (P<0,05)

Tabela 10. Wyniki 2. pomiaru grubości podskórnej tkanki tłuszczowej (BFT)

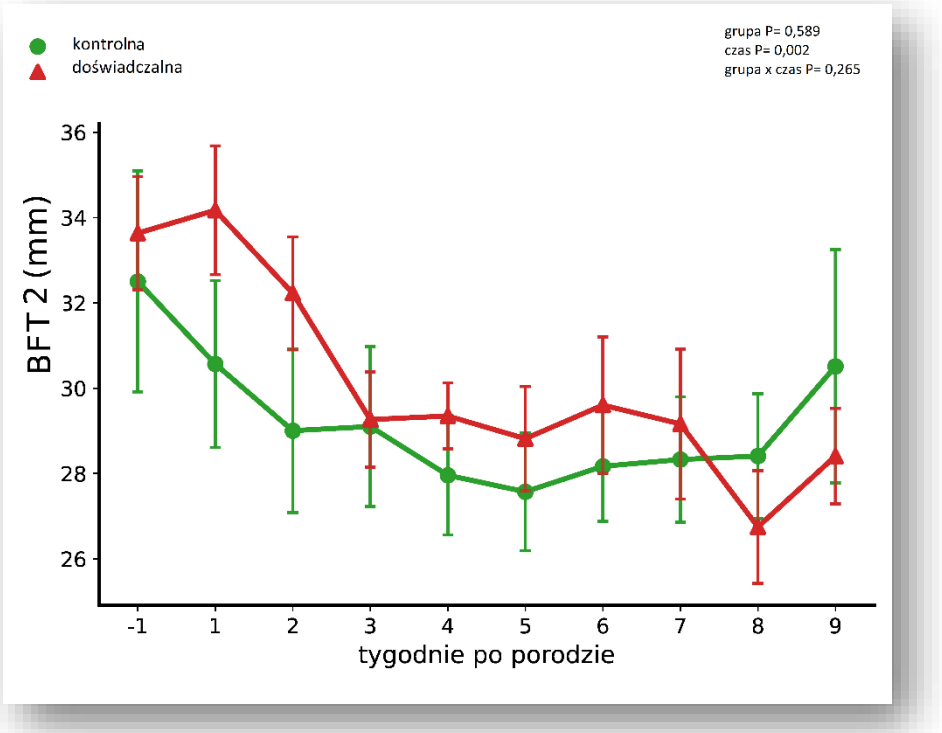
czas w stosunku do porodu (tyg.)		-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
EXP	**Średnia**	33,634	34,172	32,225	29,264	29,348	28,815	29,603	29,161	26,746	28,406
	±SD	±4,796	±5,232	±4,584	±3,870	±2,683	±4,244	±5,529	±6,091	±4,583	±3,878
	SEM	1,330	1,510	1,323	1,117	0,774	1,225	1,596	1,758	1,323	1,119
CONT	**Średnia**	32,503	30,566	29,003	29,101	27,958	27,570	28,168	28,327	28,408	30,511
	±SD	±8,188	±6,490	±6,358	±6,218	±4,640	±4,582	±4,277	±4,872	±4,857	±9,077
	SEM	2,589	1,957	1,917	1,875	1,399	1,382	1,289	1,469	1,464	2,737

* - statystycznie istotna różnica pomiędzy grupami (P<0,05)

Rycina 18. Zmiany grubości BFT zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej – pomiar 1.



Rycina 19. Zmiany grubości BFT zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej – pomiar 2.



9.4. OBRAZY ULTRASONOGRAFICZNE WĄTROBY

Odsetek krów wykazujących cechy tłuszczowego nacieczenia hepatocytów w grupie kontrolnej i doświadczalnej przedstawione są w Tabeli 11.

W grupie kontrolnej w 4. tygodniu po porodzie nie stwierdzono cech 2. i 3. stopnia stłuszczenia tego narządu w przeciwieństwie do grupy doświadczalnej. Odsetek krów z prawidłowym obrazem ultrasonograficznym wątroby był wyższy w grupie kontrolnej w 4. i 7. tygodniu po porodzie, aczkolwiek wartości te były do siebie zbliżone.

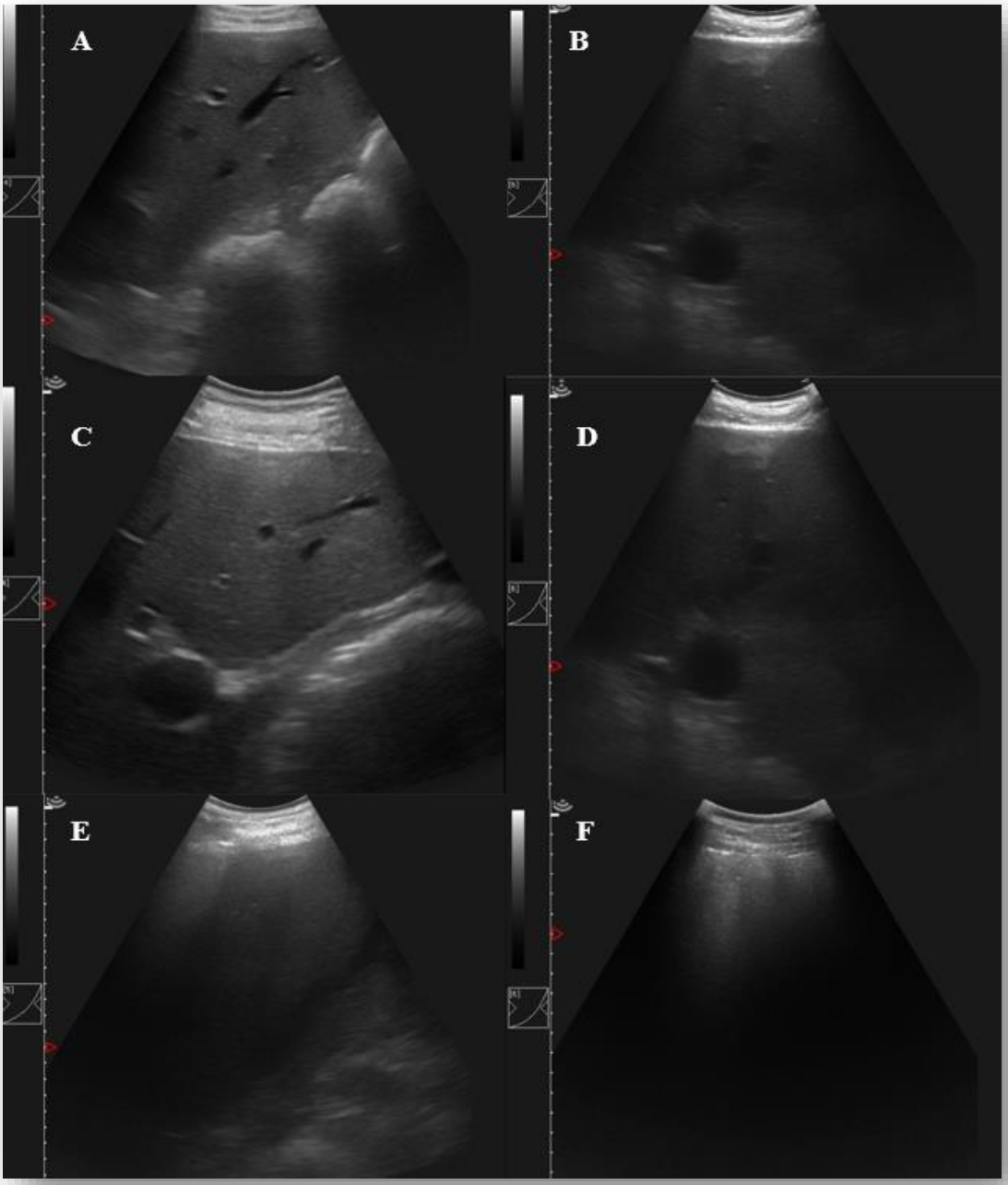
Przykładowe ultrasonogramy przedstawiające prawidłową wątrobę oraz wątrobę z cechami tłuszczowego nacieczenia hepatocytów u zwierząt w grupie kontrolnej i doświadczalnej w 4. tygodniu po porodzie są umieszczone na Rycinie 20.

Przykładowe ultrasonogramy przedstawiające prawidłową wątrobę oraz wątrobę z cechami tłuszczowego nacieczenia hepatocytów u zwierząt w grupie kontrolnej i doświadczalnej w 7. tygodniu po porodzie są umieszczone na Rycinie 21.

Tabela 11. Odsetek krów w cechami tłuszczowego nacieczenia hepatocytów w badaniu ultrasonograficznym wątroby

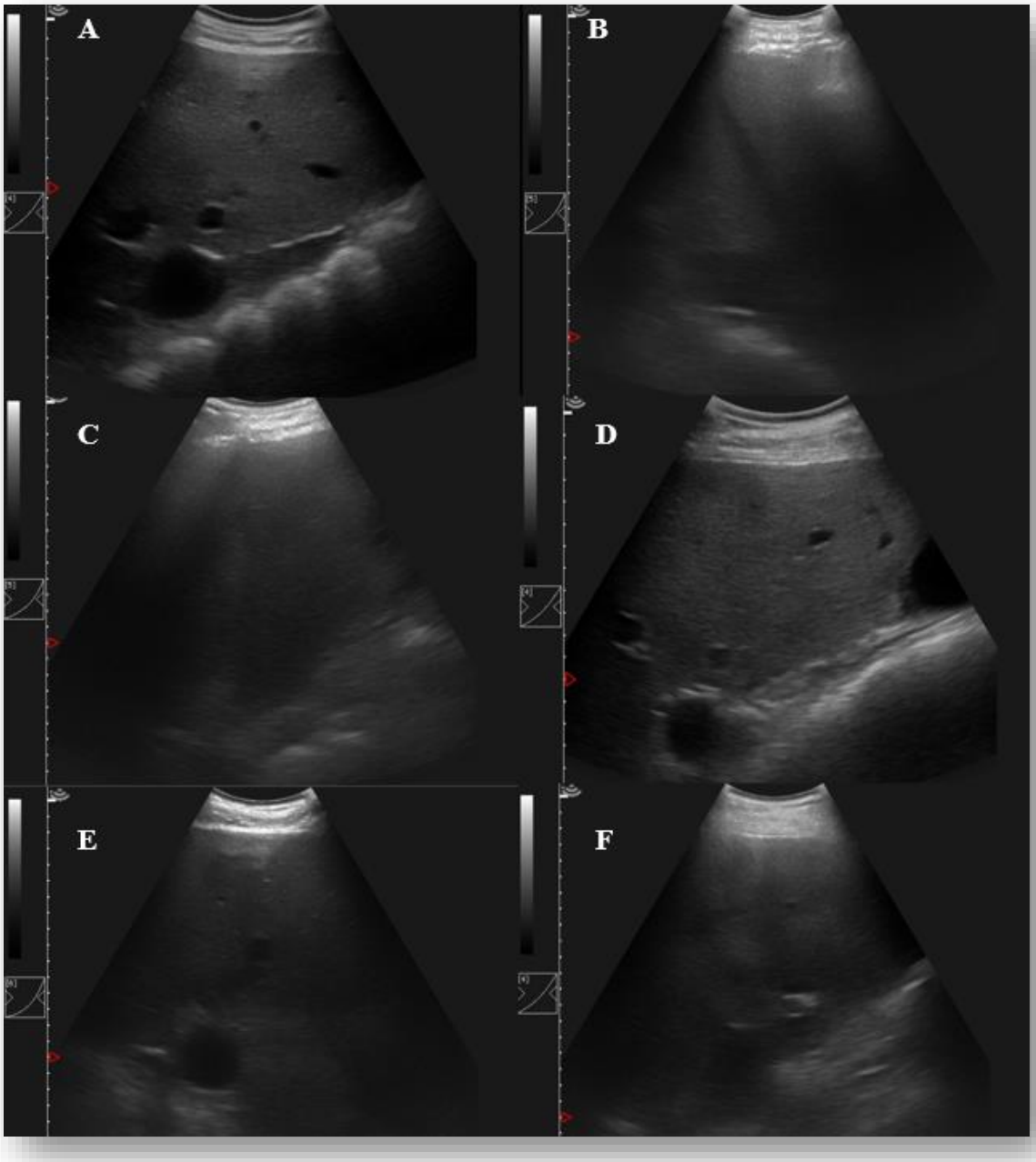
	prawidłowy obraz wątroby (%)	stłuszczenie 1. stopnia (%)	stłuszczenie 2. stopnia (%)	stłuszczenie 3. stopnia (%)
4. tydzień po porodzie				
CONT	63,64 (n=7)	36,36 (n=4)	0	0
EXP	50,00 (n=6)	33,33 (n=4)	8,33 (n=1)	8,33 (n=1)
7. tydzień po porodzie				
CONT	54,55 (n=6)	36,36 (n=4)	9,09 (n=1)	0
EXP	41,67 (n=5)	41,67 (n=5)	16,66 (n=2)	0

Rycina 20. Przykładowe obrazy ultrasonograficzne wątroby zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej w 4. tygodniu po porodzie



A- przykładowy prawidłowy obraz wątroby u krowy z grupy kontrolnej; B- przykładowy obraz łagodnego stłuszczenia wątroby u krowy z grupy kontrolnej; C- przykładowy prawidłowy obraz wątroby u krowy z grupy doświadczalnej; D- przykładowy obraz łagodnego stłuszczenia wątroby u krowy z grupy doświadczalnej; E- przykładowy obraz umiarkowanego stłuszczenia wątroby u krowy z grupy doświadczalnej; F- przykładowy obraz zaawansowanego stłuszczenia wątroby u krowy z grupy doświadczalnej

Rycina 21. Przykładowe obrazy ultrasonograficzne wątroby zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej w 7. tygodniu po porodzie



A- przykładowy prawidłowy obraz wątroby u krowy z grupy kontrolnej; B- przykładowy obraz łagodnego stłuszczenia wątroby u krowy z grupy kontrolnej; C- przykładowy obraz umiarkowanego stłuszczenia wątroby u krowy z grupy kontrolnej; D- przykładowy prawidłowy obraz wątroby u krowy z grupy doświadczalnej; E- przykładowy obraz łagodnego stłuszczenia wątroby u krowy z grupy doświadczalnej; F- przykładowy obraz umiarkowanego stłuszczenia wątroby u krowy z grupy doświadczalnej;

9.5. Izolacja RNA i qRT-PCR

Wykorzystane w analizie próby RNA nie różniły się istotnie pod względem jakości i czystości wyizolowanego materiału pomiędzy grupami zwierząt i pobraniami wycinków wątroby, co przedstawia Tabela 12.

Poziom ekspresji wybranych genów u krów z grupy kontrolnej i doświadczalnej w 4. i 7. tygodniu został przedstawiony na Rycinie 29. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla porównania ekspresji wybranych genów między grupami w 4. tygodniu po porodzie zostały przedstawione w Tabeli 13., a w 7. tygodniu w Tabeli 14. Wzajemna zależność ekspresji genów w oparciu o wynik korelacji metodą Spearmana została przedstawiona w Tabeli 15.

Ekspresja SOD2 różniła się istotnie pomiędzy grupami w 4. tygodniu po porodzie ($P<0,05$) i była istotnie skorelowana z ekspresją SOD3 ($P<0,05$).

Poziomy ekspresji SOD 1, SOD 3 i GPX3 nie różniły się istotnie ani pomiędzy grupami ani pomiędzy 4. a 7. tygodniem po porodzie.

Rycina 22. Zestawienie ekspresji GPX3, SOD 1, SOD 2, SOD 3

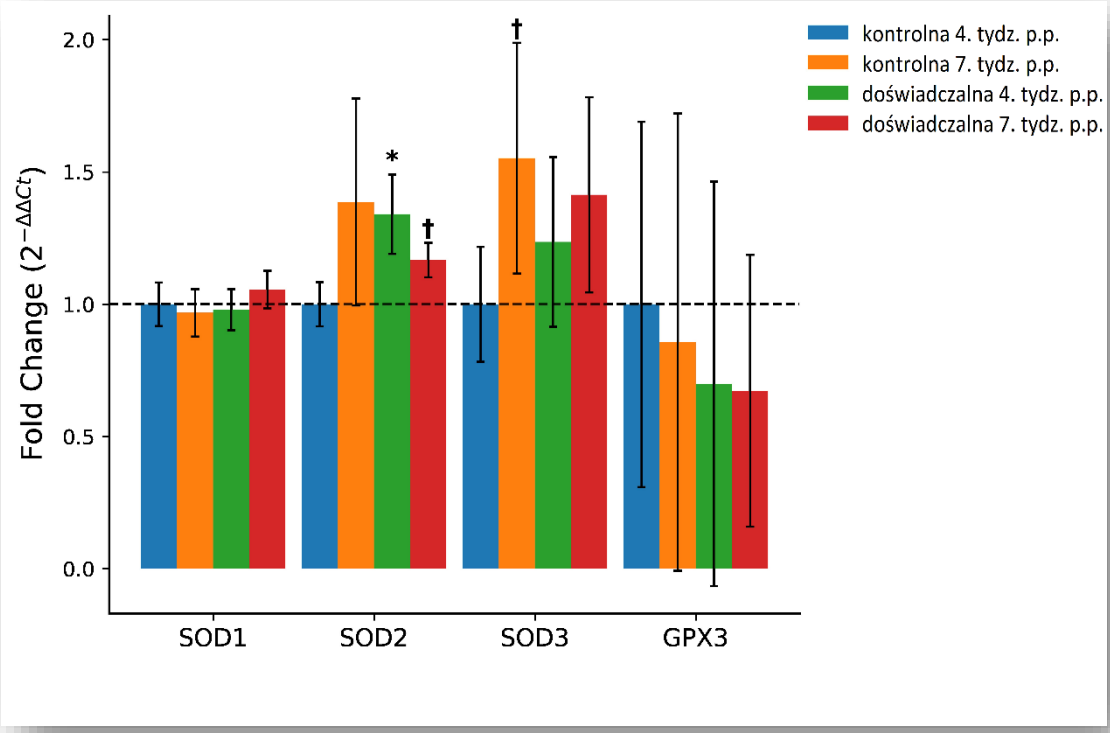


Tabela 12. Parametry jakości wyizolowanego RNA

	CONT 4. tydzień p.p.		CONT 7. tydzień p.p.		EXP 4. tydzień p.p.		EXP 7. tydzień p.p.		P-value
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	
A260/A280*	2,053	0,034	2,069	0,049	2,067	0,019	2,058	0,031	0,703
RIN#	9,11	0,694	9,13	0,694	9,35	0,576	9,24	0,305	0,673
28S/18S+	1,779	0,400	1,702	0,567	1,638	0,581	1,739	0,459	0,922

* miara czystości RNA # RIN miara integralności RNA + rRNA Ratio (28s/18s) miara integralności RNA

Tabela 13. Wynik testu U Manna-Whitneya dla porównania ekspresji wybranych genów między grupami w 4. tygodniu po porodzie

			GPX3	SOD1	SOD2	SOD3
Istotność asymptotyczna (dwustronna)			,806	,498	**,031**	,424
Istotność dokładna [2*(jednostronna)]			,833	,525[b]	**,032**	,449
Istotność Monte Carlo (dwustronna)	Istotność		,833	,526[c]	**,032**	,449
	99% przedział ufności	Dolna granica	,830	,522	,030	,445
		Górna granica	,836	,530	,033	,453

różnice statystycznie istotne (P<0,05)

Tabela 14. Wynik testu U Manna-Whitneya dla porównania ekspresji wybranych genów między grupami w 7. tygodniu po porodzie

			GPX3	SOD1	SOD2	SOD3
Istotność asymptotyczna (dwustronna)			,510	,218	,742	,712
Istotność dokładna [2*(jednostronna)]			,539	,235[b]	,771	,740
Istotność Monte Carlo (dwustronna)	Istotność		,539[c]	,235[c]	,770	,741
	99% przedział ufności	Dolna granica	,535	,232	,766	,737
		Górna granica	,543	,239	,773	,744

Tabela 15. Wzajemna zależność ekspresji genów w oparciu o wynik korelacji metodą Spearmana

Wartość korelacji				
	GPX3	SOD1	SOD2	SOD3
GPX3	1	-0,257	0,008	-0,272
SOD1	-0,257	1	0,283	0,198
SOD2	0,0089	0,283	1	**0,455**
SOD3	-0,272	0,198	**0,455**	1
Istotność korelacji p-value				
	GPX3	SOD1	SOD2	SOD3
GPX3	0	0,084	0,952	0,066
SOD1	0,084	0	0,056	0,186
SOD2	0,952	0,056	0	**0,001**
SOD3	0,066	0,186	**0,001**	0
różnice statystycznie istotne (P<0,05)				

Omówienie wyników

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Rozpoznanie danej jednostki chorobowej rzadko opiera się tylko i wyłącznie na analizie wyników badania morfologicznego krwi. Jednak jest ono pomocne w procesie diagnostycznym oraz pozwala na uzupełnienie oceny stanu ogólnego pacjenta i oceny dalszego przebiegu choroby (ROLAND i wsp. 2014). Z tego względu zdecydowano się umieścić w niniejszej pracy wyniki badania morfologicznego krwi zwierząt pobranej w kluczowych momentach eksperymentu – tydzień przed porodem oraz w dniach pobierania wycinków wątroby (4. i 7. tydzień po porodzie).

Badania przeprowadzone przez CHOI i wsp. (2023) u krów w okresie okołoporodowym wykazały istotnie wyższą wartość HGB i HCT 5 tygodni przed porodem oraz istotnie wyższe MCV i MCH przez cały okres przedporodowy u krów wieloródek dotkniętych ketozą po porodzie. Ponadto krowy wieloródki z ketozą po porodzie charakteryzowały się niższą liczbą PLT. W niniejszej pracy nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami w badaniu morfologicznym krwi, co może wskazywać na fakt, że BHB ma wpływ na wskaźniki morfologiczne krwi jedynie przy stężeniach typowych dla klinicznej ketozy.

Ze względu na zmiany metaboliczne spowodowane zwiększonym zapotrzebowaniem energetycznym i ryzykiem wystąpienia chorób metabolicznych, badania dotyczące wskaźników krwi w okresie przejściowym u bydła mlecznego skupiają się głównie na analizie parametrów biochemicznych (IMHASLY i wsp. 2015, LUKE i wsp. 2019, GONZÁLEZ i wsp. 2011, PAIANO i wsp. 2020, HA i wsp. 2022). Wykazano, że BHB, CHOL i NEFA odzwierciedlają bilans energetyczny bydła mlecznego, a ich wysokie stężenia w surowicy są związane z częstszym występowaniem chorób metabolicznych w okresie okołoporodowym (KIDA 2003, BOBE i wsp. 2004, OETZEL 2007, STENGÄRDE i wsp. 2008). W badaniach własnych krowy z grupy EXP miały istotnie wyższe stężenie BHB przez 3 tygodnie p.p. ($P<0,05$). W trakcie doświadczenia stężenie BHB zmieniało się także pomiędzy pobraniami ($P<0,05$), co odzwierciedla zmiany w bilansie energetycznym badanych zwierząt po porodzie. Stężenie NEFA wykazywało istotne różnice w czasie ($P<0,05$), natomiast nie różniło się istotnie pomiędzy grupami i nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami w stężeniu CHOL. Fakt ten można wytłumaczyć podobnym stopniem mobilizacji rezerw tłuszczowych w obu grupach potwierdzony brakiem istotnych zmian w pomiarze BFT pomiędzy grupami i istotnymi

zmianami grubości podskórnej w czasie u obu grup zwierząt (P<0,05). Badanym czynnikiem biorącym udział w mobilizacji rezerw tłuszczowych, któremu towarzyszyły istotne zmiany było stężenie TG. Po wycieleniu u zwierząt z obu grup nastąpił spadek stężenia tych związków, który w 2. tygodniu p.p. był istotnie niższy w grupie doświadczalnej w porównaniu z grupą kontrolną (P<0,05). Stan ten mógł być związany z transportem tłuszczów do wątroby i nieco większym odsetkiem zwierząt w grupie doświadczalnej wykazującym cechy nacieczenia tłuszczowego tego narządu w badaniu ultrasonograficznym.

Stężenie Ca różniło się istotnie pomiędzy grupami tylko w 9. tygodniu po porodzie, natomiast przez cały okres eksperymentu mieściło się w zakresie wartości referencyjnych. Brak istotnych zmian był spowodowany przyjętym schematem doświadczenia wykluczającym zwierzęta wymagające leczenia farmakologicznego. Różnica w stężeniu Ca w 9. tygodniu była najprawdopodobniej spowodowana cechami osobniczymi i różnicami w dziennej wydajności mlecznej, których w tym doświadczeniu nie poddawano analizie.

Przez wiele lat uważano, że aktywność ALT nie ma wielkiego znaczenia diagnostycznego u przeżuwaczy (LATIMER 2011, SHIN i wsp. 2015). Najnowsze doniesienia przeczą temu twierdzeniu, a w literaturze pojawiają się wzmianki o zmienionej aktywności tego enzymu u krów dotkniętych ketozą i konieczności wznowienia badań nad przydatnością tego wskaźnika w diagnostyce chorób bydła (DU i wsp. 2017, HA i wsp. 2022). Badania DU i wsp. (2017) potwierdzają zwiększoną aktywność ALT idącą w parze z nasiloną apoptozą hepatocytów u krów z podwyższonym poziomem BHB w surowicy. SAKOWSKI i wsp. (2012) wspominają że podwyższona aktywność ALT może być powiązana ze zmianami w wątrobie spowodowanymi przez NEB we wczesnej laktacji. Natomiast HA i wsp. (2022) stwierdzili odwrotną zależność – krowy z CKet po porodzie miały w dniu porodu niższą aktywność ALT niż krowy zdrowe. W opisywanych badaniach własnych statystycznie istotne różnice w aktywności ALT pomiędzy grupami zwierząt zauważono dopiero w 6. tygodniu po porodzie i stan ten utrzymał się aż do końca eksperymentu, aczkolwiek już po upływie dwóch tygodni od porodu aktywność tego enzymu u grupy doświadczalnej była niższa niż w grupie kontrolnej. Dowodzi to bezsprzecznie, że aktywność ALT u bydła nie powinna być pomijana w programach monitoringowych stad w okresie przejściowym, a jej niska aktywność może świadczyć o narażeniu danego zwierzęcia na negatywne skutki hiperketonemii lub ketozy. Brak istotnych różnic w aktywności ALT przed porodem i w

pierwszych tygodniach po porodzie może być związany ze stwierdzonym podobnym poziomem mobilizacji rezerw tłuszczowych u obu grup zwierząt oraz zbliżonym odsetkiem występowania cech stłuszczenia wątroby w badaniu ultrasonograficznym. Istnieje potrzeba przeprowadzenia dalszych badań nad zmianami aktywności ALT na większej populacji zwierząt przed i po porodzie w celu ustalenia konkretnego przedziału czasowego, w którym wartość diagnostyczna tego wskaźnika będzie największa.

O uszkodzeniu komórek wątroby świadczy również wzrost w badaniu biochemicznym krwi m.in. takich parametrów jak aktywność: AST i LDH (THARWAT i wsp. 2012b, LI i wsp. 2016), co potwierdza MIKUŁA i wsp. (2021) stwierdzając, że o prawidłowym funkcjonowaniu wątroby świadczy brak istotnych różnic w średniej aktywności enzymów wątrobowych przed i po porodzie.

AST to jeden z enzymów, który wytwarzany jest m.in. przez hepatocyty, a krowy z ketozą często wykazują jego podwyższoną aktywność. Aktywność AST powyżej 100 IU/L uznawana jest jako jeden z parametrów wskazujących na występowanie tego schorzenia u krów mlecznych (CAO i wsp. 2017, SHULTZ i wsp. 2014). W niniejszym doświadczeniu tę wartość przekraczały krowy z grupy doświadczalnej od tygodnia przed porodem do 2 tygodni po porodzie, co potwierdza wartość diagnostyczną tego wskaźnika przed i tuż po wycieleniu, nawet, gdy stężenie BHB nie osiąga wartości zwyczajowo uznawanych za towarzyszące podklinicznej ketozie. Ponadto średnia aktywność AST wykazywała zmiany pod wpływem czasu, które były istotnie różne w obu grupach ($P<0,05$). Odmienne zachowanie się tego parametru pomiędzy grupą CONT a EXP po porodzie stanowi argument, że określanie aktywności AST może być wskaźnikiem różnicującym krowy zdrowe od krów narażonych na negatywne skutki hiperketonemii.

LDH jest enzymem, który jest uwalniany podczas uszkodzenia błon komórkowych hepatocytów (TANAKA i wsp. 2011). Badania LI i wsp. (2016) wykazały, że krowy z hiperketonemią mają istotnie wyższy poziom aktywności tego enzymu niż krowy zdrowe, co świadczy o występującym u tych zwierząt uszkodzeniu wątroby. Wyniki niniejszej pracy nie wykazały takiej zależności, co można wytłumaczyć faktem podobnego odsetka krów z objawami tłuszczowego nacieczenia hepatocytów podczas badania ultrasonograficznego w obydwu grupach.

Po analizie wyników aktywności ALP zauważono jedynie zmienność tego parametru w czasie trwania eksperymentu (aktywność sukcesywnie spadała), natomiast nie zauważono różnic pomiędzy grupami. Obserwowana najwyższa aktywność tego enzymu tuż po porodzie związana jest prawdopodobnie ze stresem i wysiłkiem

porodowym, natomiast brak różnic pomiędzy grupami wskazuje na to, że parametr ten nie jest przydatny w diagnostyce hiperketomenii, co potwierdzają badania innych autorów (CHIBA i wsp. 2020)

Poród jest bardzo stresujący dla organizmu samicy, a zwiększona aktywność procesów metabolicznych, która towarzyszy krowom między innymi w okresie przejściowym, powoduje nagromadzenie RFT (VALKO i wsp. 2007, BÜHLER i wsp. 2018). Zwiększenie aktywności GSH-Px w pierwszym miesiącu po porodzie u wszystkich zwierząt biorących udział w tym eksperymencie może być odpowiedzią organizmu na zwiększone zapotrzebowanie na antyoksydanty w celu neutralizacji nagromadzonych RFT. Badania NAKOV i wsp. (2016) nad aktywnością enzymów w surowicy krów w okresie okołoporodowym i różnych okresach laktacji również wykazały wzrost aktywności GSH-Px w pierwszym miesiącu laktacji w porównaniu z okresem zasuszenia. Dostępne są dane literaturowe, że SOD tworzy pierwszą linię obrony przed utleniaczami (CELI 2011). Istotnie wyższą aktywność tego enzymu w grupie doświadczalnej w 6. i 7. tygodniu po porodzie można wyjaśnić tym, że wysokie stężenia BHB mogą powodować stres oksydacyjny w hepatocytach i zwiększać zapotrzebowanie organizmu na przeciwutleniacze (SHI i wsp. 2014, TIAN i wsp. 2014).

Zwyczajowo do oceny kondycji ciała (oceny ilości tkanki tłuszczowej) krów mlecznych na każdym etapie cyklu produkcyjnego stosuje się 5-cio stopniową skalę BCS z interwałami co 0,25 pkt opracowaną dla bydła rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej, której największą wadą jest jej subiektywność (EDMONSON i wsp. 1989, SCHRÖDER i STAUFENBIEL 2006). Skalę tę można jednak zastąpić bardziej obiektywnym narzędziem jakim jest ultrasonograficzny pomiar grubości podskórnej tkanki tłuszczowej (BFT) wykonywany w połowie linii łączącej guz biodrowy z guzem kulszowym, wykazano bowiem, że BFT jest silnie skorelowany z wynikiem w skali BCS (HUSSEIN i wsp. 2013).

Spadek kondycji ciała krowy po porodzie (niski BCS) wiąże się z intensyfikacją mobilizacji rezerw tłuszczowych, która jest mechanizmem adaptacyjnym mającym na celu zaspokojenie zwiększonego zapotrzebowania na energię po porodzie (PIRES i wsp. 2013). Dlatego też pomiar BFT może być wykorzystywany nie tylko jako narzędzie do monitorowania stopnia otłuszczenia ciała, ale również zdrowia krów mlecznych w okresie przejściowym jako czynnik predykcyjny w diagnostyce ketozy, czy syndromu tłustej krowy (STRIEDER-BARBOZA i wsp. 2015).

Wyniki niniejszej pracy nie wykazały istotnych różnic w grubości BFT pomiędzy zwierzętami z grupy kontrolnej i doświadczalnej, natomiast pomiar BFT był zmienny w

czasie (P<0,05), co świadczy o podobnym poziomie mobilizacji rezerw tłuszczowych po porodzie w obu grupach.

Właściwa ocena funkcjonowania wątroby jest niezbędna do oceny statusu metabolicznego krowy (GERSPACH i wsp. 2017, DU i wsp. 2017, DU i wsp. 2018, SHEN i wsp. 2019). Czynność tego narządu można ocenić za pomocą takich metod jak: badanie biochemiczne krwi, badanie ultrasonograficzne, czy biopsja gruboigłowa pod kontrolą USG i ocena histopatologiczna lub pomiar ciężaru właściwego pobranych wycinków tego narządu (BOBE i wsp. 2004, THARWAT i wsp. 2012a, JAWOR i wsp. 2016). Pomimo, że biopsja wątroby i histopatologiczna ocena stopnia jej stłuszczenia pozostaje złotym standardem, to ciągłe doskonalenie weterynaryjnych aparatów ultrasonograficznych i ich oprogramowania sprawia, że ultrasonografia staje się coraz częściej wybieranym narzędziem stosowanym w diagnostyce chorób metabolicznych bydła mlecznego w okresie przejściowym.

Badania KOMEILIAN i wsp. (2011) wykazały obecność zmian charakterystycznych dla tłuszczowego nacieczenia hepatocytów w obrazie ultrasonograficznym wątroby u 55,55% badanych krów po porodzie, natomiast według JORRITSMA i wsp. (2001) nadmierna akumulacja TG w wątrobie w ciągu pierwszego miesiąca laktacji może dotyczyć do 50% krów. Wyniki niniejszej pracy wskazują na nieco niższy odsetek krów z ultrasonograficznymi objawami stłuszczenia wątroby, osiągający w 4. tygodniu po porodzie wartość 43,48% wszystkich zwierząt (36,36% w grupie CONT i 50% w grupie EXP), a w 7. tygodniu po porodzie 47,82% (45,45% w grupie CONT i 58,33% w grupie EXP). Różnice te mogą być spowodowane małą populacją badanych zwierząt i przeprowadzeniem doświadczenia w jednym gospodarstwie.

Stres oksydacyjny jest wynikiem działania różnego rodzaju stresorów na komórki organizmów żywych i może prowadzić do upośledzenia ich struktury i funkcji. Badania przeprowadzone na przeżuwaczach wykazały, że BHB i NEFA indukują stres oksydacyjny w komórkach wątroby dorosłych zależnie od stężenia (SONG i wsp. 2014, SONG i wsp. 2016). Ponadto, wysokie stężenia BHB mogą powodować stres oksydacyjny w komórkach mięśni gładkich trawieńca, hepatocytach cieląt i wpływać na funkcjonowanie tych narządów u przeżuwaczy (SHI i wsp. 2014, TIAN i wsp. 2014). Zgodnie z tymi stwierdzeniami zwierzęta z grupy badanej powinny być bardziej narażone na wystąpienie negatywnych skutków stresu oksydacyjnego.

Aby lepiej zrozumieć zagadnienia związane z hiperketonemią i możliwością różnicowania zwierząt najbardziej na nią narażonych przeprowadzono szereg badań

uwzględniających szlaki metaboliczne, geny kandydujące, sieci regulacyjne genów, czy poziom ekspresji wybranych genów w poszczególnych narządach (HUANG i wsp. 2019, NAYERI i wsp. 2019, SOARES i wsp. 2021)

BÜHLER i wsp. (2018) informują o najwyższych poziomach ekspresji genów związanych ze stresem oksydacyjnym w leukocytach już przed wycieleniem. Można przypuszczać, że podobna sytuacja ma miejsce również w wątrobie – kluczowym narządzie odpowiadającym za metabolizm energetyczny i syntezę szeregu enzymów. W przeprowadzonym doświadczeniu badano jedynie poziom ekspresji genów po porodzie. Jednak mając na uwadze wyniki powyższej pracy można domniemywać, że zasadnym jest szukanie w wątrobie markerów molekularnych i biochemicznych dla hiperketonemii przed porodem porównując wyniki z tymi otrzymanymi po porodzie w celu wyselekcjonowania tych najbardziej przydatnych.

W niniejszym doświadczeniu wykazano istotną różnicę w poziomie ekspresji SOD2 pomiędzy grupami w 4. tygodniu po porodzie. Była ona istotnie wyższa w grupie badanej ($P<0,05$), co po 2 tygodniach przełożyło się na istotnie wyższą aktywność SOD ($P<0,05$) w surowicy krów z wysokim poziomem BHB. Można więc wyciągnąć wniosek, że w okresie poporodowym u krów mlecznych główną rolę odgrywa syntetyzowana w wątrobie izoforma SOD2. Wymaga to jednak potwierdzenia badaniami nad aktywnością poszczególnych izoform tego enzymu w surowicy bydła.

W przeprowadzonych badaniach nie zaobserwowano zmian ekspresji SOD 1, SOD 2, SOD 3, GPX3 w późniejszym okresie eksperymentu, co może świadczyć o dążeniu organizmu krowy do powrotu do równowagi na poziomie molekularnym przed upływem 2 miesięcy po porodzie. Pozwala to przypuszczać, że skutki hiperketonemii na poziomie ekspresji niektórych genów w wątrobie nie utrzymują się dłużej niż 7 tygodni. Aby potwierdzić te założenia należy przeprowadzić badania na większej populacji zwierząt oraz zmierzyć poziom ekspresji wybranych genów w różnych płatach wątroby, aby potwierdzić jednolitość procesu transkrypcji w całym narządzie. Można także podejrzewać, że zmiany w ekspresji genów w wątrobie krów w drugiej połowie okresu przejściowego mają charakter bardzo dynamiczny i aby uchwycić zmiany materiał badawczy należy pobierać w interwałach krótszych niż kilka tygodni. Należy również podkreślić, że wykazane w badaniach własnych zmiany poziomu ekspresji SOD 2 i brak zmian w ekspresji SOD 1, SOD 3 i GPX3 zostały zaobserwowane w materiale podobnej jakości wykluczając tym samym wpływ czynników zewnętrznych na czystość i stopień degradacji RNA, a co za tym idzie poziom ekspresji genów.

Wnioski

WNIOSKI

1. Wysokie stężenie BHB nie wpływa na wyniki badania morfologicznego krwi.
2. Aktywność ALT jest przydatnym wskaźnikiem różnicującym krowy narażone na negatywne skutki hiperketonemii.
3. Utrzymujące się wyższe stężenie BHB u krów po porodzie powoduje podwyższenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, natomiast nie wpływa istotnie na aktywność peroksydazy glutationowej.
4. Krowy z utrzymującym się wyższym stężeniem BHB po porodzie (powyżej 0,8 mmol/l) wykazują podobny poziom mobilizacji rezerw tłuszczowych do krów niewykazujących takich zmian.
5. Obecność cech tłuszczowego nacieczenia hepatocytów nie wpływa na jakość RNA izolowanego z wycinków wątroby.
6. Wyniki analiz molekularnych wskazują na możliwość wykorzystania oceny poziomu transkrypcji genów, w szczególności SOD2 jako wskaźnika biomarkera stopnia ketozy.
7. Analiza ekspresji genów może być pomocna do określenia potencjału regeneracyjnego wątroby u krów po wystąpieniu ketozy, w szczególności w odniesieniu do zaburzonego metabolizmu powodującego stres oksydacyjny.

Piśmiennictwo

PIŚMIENNICTWO

1. ALLEN M.S., BRADFORD B.J., HARVATINE K.J. (2005) *The cow as a model to study food intake regulation* Annual Review of Nutrition 25: 523–547. DOI: 10.1146/annurev.nutr.25.050304.092704
2. ASCHENBACH J.R., KRISTENSEN N.B., DONKIN S.S., HAMMON H.M., PENNER G.B. (2010) *Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough* IUBMB Life 62: 869-877. DOI: 10.1002/iub.400
3. ASCHENBACH J. R., PENNER G. B., STUMPFF F., GÄBEL G. (2011) *Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH* Journal of Animal Science 89: 1092–1107. DOI:10.2527/jas.2010-3301
4. ATKINSON O. (2016) *Management of transition cows in dairy practice* In Practice 38: 229–240. DOI: 10.1136/inp.i1829
5. BENEDET A., MANUELIAN C. L., ZIDI A., PENASA M., DE MARCHI M. (2019). *Invited review: β-hydroxybutyrate concentration in blood and milk and its associations with cow performance. Animal : an international journal of animal bioscience* 13: 1676–1689. DOI:10.1017/S175173111900034X
6. BEZERRA L., CEZARIO B., NETO D. O., DE ARAÚJO J. M., EDVAN R. L., DE OLIVEIRA W. D. C., PEREIRA, F. B. (2014) *Major metabolic diseases affecting cows in transition period* International Journal of Biology 6: 82–91. DOI: 10.5539/ijb.v6n3p85
7. BICALHO M.L., MARQUES E.C., GILBERT R.O., BICALHO R.C. (2017) *The association of plasma glucose, BHBA, and NEFA with postpartum uterine diseases, fertility, and milk production of Holstein dairy cows* Theriogenology 88: 270–282. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.036
8. 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: 3105-3124. DOI: 10.3168/jds.S0022-
9. BRADFORD B. J., YUAN K., FARNEY J. K., MAMEDOVA L. K., CARPENTER A. J. (2015) *Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame* Journal of Dairy Science 98: 6631–6650. DOI: 10.3168/jds.2015-9683
10. BÜHLER S., FRAHM J., TIENKEN R., KERSTEN S., MEYER U., HUBER K., DÄNICKE S. (2018) *Effects of energy supply and nicotinic acid supplementation on serum anti-*

oxidative capacity and on expression of oxidative stress-related genes in blood leucocytes of periparturient primi- and pluriparous dairy cows Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 102: e87–e98. DOI: 10.1111/jpn.12705

11. CAO Y., ZHANG J., YANG W., XIA C., ZHANG H.Y., WANG Y.H., XU C. (2017) *Predictive value of plasma parameters in the risk of postpartum ketosis in dairy cows* Journal of Veterinary Research 61:91-95. DOI: 10.1515/jvetres-2017-0011
12. CECILIANI F., LECCHI C., URH C., SAUERWEIN H. (2018) *Proteomics and metabolomics characterizing the pathophysiology of adaptive reactions to the metabolic challenges during the transition from late pregnancy to early lactation in dairy cows* Journal of Proteomics 178: 92-106. DOI: 10.1016/j.jprot.2017.10.010
13. CELI P. (2011) *Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine* Immunopharmacology and Immunotoxicology 33: 233-240. DOI: 10.3109/ 08923973.2010.514917
14. CHENG X., YANG S., XU C., LI L., ZHANG Y., GUO Y., ZHANG C., LI P., LONG M., HE J. (2019) *Proanthocyanidins protect against β-hydroxybutyrate-induced oxidative damage in bovine endometrial cells* Molecules (Basel, Switzerland), 24(3): 400. DOI: 10.3390/molecules24030400
15. CHOI W., RO Y., CHOE E., HONG L., KIM D., KIM S., YOON I., KIM D. (2023) *Comparison of prepartum blood parameters in dairy cows with postpartum ketosis and new risk prediction candidates* Frontiers in Veterinary Science 10: 1161596. DOI: 10.3389/fvets.2023.1161596
16. CHIBA A., HATATE K., ONOMI R., KAWASHIMA C., HANADA M., MORIYAMA T., GOTO A., YAMAGISHI N. (2020) *Consecutive changes in serum alkaline phosphatase isoenzyme 3 activities in Holstein heifers during the first 18 months of life.* The Journal of Veterinary Medical Science, 82: 1643–1647. DOI: 10.1292/jvms.20-0306
17. CONTRERAS G. A., KABARA E., BRESTER J., NEUDER L., KIUPEL M. (2015) *Macrophage infiltration in the omental and subcutaneous adipose tissues of dairy cows with displaced abomasum* Journal of Dairy Science 98: 6176–6187 DOI: 10.3168/jds.2015-9370
18. CONTRERAS G.A., SORDILLO L.M. (2011) *Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows* Comparative Immunology,

Microbiology and Infectious Diseases 34: 281-289. DOI: 10.1016/j.cimid.2011.01.004

19. CONTRERAS G.A., STRIEDER-BARBOZA C., DE KOSTER J. (2018) *Symposium review: Modulating adipose tissue lipolysis and remodeling to improve immune function during the transition period and early lactation of dairy cows* Journal of Dairy Science 101: 2737-2752. DOI: 10.3168/jds.2017-13340
20. DAVIES K.J. (2000) *Oxidative stress, antioxidant defences, and damage removal, repair, and replacement systems* IUBMB Life 50: 279–289. DOI: 10.1080/713803728
21. DENG Q., LIU G., LIU L., ZHANG Y., YIN L., SHI X., WANG J., YUAN X., SUN G., LI Y., YANG W., GUO L., ZHANG R., WANG Z., LI X., LI X. (2015) *BHBA influences bovine hepatic lipid metabolism via AMPK signaling pathway* Journal of Cellular Biochemistry 116: 1070–1079 DOI: 10.1002/jcb.25062
22. DEODATO F., BOENZI S., SANTORELLI F. M., DIONISI-VICI C. (2006) *Methylmalonic and propionic aciduria* Seminars in Medical Genetics, Part C of the American Journal of Medical Genetic 142: 104–112. DOI: 10.1002/ajmg.c.30090
23. DRACKLEY J.K. (1999) *Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?* Journal of Dairy Science 82: 2259–2273. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75474-3
24. DUFFIELD T.F., LISSEMORE K.D., MCBRIDE B.W., LESLIE K.E. (2009) *Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production* Journal of Dairy Science 92:571-580. DOI: 10.3168/jds.2008-1507
25. DU X., CHEN L., HUANG D., PENG Z., ZHAO C., ZHANG Y., ZHU Y., WANG Z., LI X., LIU G. (2017) *Elevated Apoptosis in the Liver of Dairy Cows with Ketosis* Cellular Physiology and Biochemistry 43: 568-578 DOI: 10.1159/000480529
26. DU X., SHEN T., WANG H., QIN X., XING D., YE Q., SHI Z., FANG Z., ZHU Y., YANG Y., PENG Z., ZHAO C., LV. B, LI. X, LIU. G, LI. X. (2018) *Adaptations of hepatic lipid metabolism and mitochondria in dairy cows with mild fatty liver* Journal of Dairy Science 101: 9544-9558. DOI: 10.3168/jds.2018-14546
27. EDMONSON A. J., LEAN I. J., WEAVER L. D., FARVER T., WEBSTER G. (1989) *A body condition scoring chart for Holstein dairy cows* Journal of Dairy Science 72: 68–78 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0
28. 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: 60-71. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.11.007

29. ESPOSITO G., RAFFRENATO E., LUKAMBA S.D., ADNANE M., IRONS P.C., CORMICAN P., TASARA T., CHAPWANYA A. (2020) Characterization of metabolic and inflammatory profiles of transition dairy cows fed an energy-restricted diet. Journal of Animal Science 98: skz391. DOI: 10.1093/jas/skz391
30. FRAYN K.N., ARNER P., YKI-JÄRVINEN H. (2006) *Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease* Essays in Biochemistry 42: 89-103. DOI: 10.1042/bse0420089
31. FU S.P., LI S.N., WANG J.F., LI Y., XIE S.S., XUE W.J., LIU H.M., HUANG B.X., LV Q.K., LEI L.C., LIU G.W., WANG W., LIU J.X. (2014) *BHBA suppresses LPS-induced inflammation in BV-2 cells by inhibiting NF-kappaB activation* Mediators of Inflammation 983401. DOI: 10.1155/2014/983401
32. GEISHAUSER T., LESLIE K., KELTON D., DUFFIELD T. (2000) Lohnt regelmassige Uberwachung auf Ketose in Milchkuhherden? (Does monitoring for ketosis in dairy herds pay?) Der Praktische Tierarzt 82: 850-858.
33. GERSPACH C., IMHASLY S., KLINGLER R., HILBE M., HARTNACK S., RUETTEN M. (2017). *Variation in fat content between liver lobes and comparison with histopathological scores in dairy cows with fatty liver* BMC Veterinary Research 13: 98. DOI: 10.1186/s12917-017-1004-9
34. GONG J., XIAO M. (2016) *Selenium and antioxidant status in dairy cows at different stages of lactation* Biological Trace Element Research 171: 89–93. DOI: 10.1007/s12011-015-0513-2
35. GONZÁLEZ F.D., MUIÑO R., PEREIRA V., CAMPOS R., BENEDITO J.L. (2011) *Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows* Journal of Veterinary Science, 12: 251–255. DOI: 10.4142/jvs.2011.12.3.251
36. GRUMMER R.R. (1995) *Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow* Journal of Animal Science 73: 2820–2833. DOI: 10.2527/1995.7392820x
37. GRUMMER R.R., MASHEK D.G., HAYIRLI A. (2004) *Dry matter intake and energy balance in the transition period* Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 20: 447–470. DOI: 10.1016/j.cvfa.2004.06.013

38. HA N.T., DRÖGEMÜLLER C., REIMER C., SCHMITZ-HSU F., BRUCKMAIER R.M., SIMIANER H., GROSS J.J. (2017) *Liver transcriptome analysis reveals important factors involved in the metabolic adaptation of the transition cow* Journal of Dairy Science 100: 9311-9323. DOI: 10.3168/jds.2016-12454
39. HA S., KANG S., HAN M., LEE J., CHUNG H., OH S.I., KIM S., PARK J. (2022) *Predicting ketosis during the transition period in Holstein Friesian cows using hematological and serum biochemical parameters on the calving date* Scientific reports 12: 853. DOI: 10.1038/s41598-022-04893-w
40. He L., He T., Farrar S., Ji L., Liu T., Ma X. (2017) *Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species* Cellular Physiology and Biochemistry 44: 532-553. DOI: 10.1159/000485089
41. HUANG H., CAO,J., HANIF,Q., WANG,Y., YU,Y., ZHANG,S., ZHANG, Y. (2019) *Genome-wide association study identifies energy metabolism genes for resistance to ketosis in Chinese Holstein cattle* Animal genetics, 50: 376–380. DOI:10.1111/age.12802
42. HUSSEIN H.A., WESTPHAL A., STAUFENBIEL R. (2013*) Relationship between body condition score and ultrasound measurement of backfat thickness in multiparous Holstein dairy cows at different production phases* Australian Veterinary Journal 91: 185-189. DOI: 10.1111/avj.12033
43. IMHASLY S., BIELI C., NAEGELI H., NYSTRÖM L., RUETTEN M., GERSPACH C. (2015). *Blood plasma lipidome profile of dairy cows during the transition period* BMC Veterinary Research 11: 252. DOI: 10.1186/s12917-015-0565-8
44. JAWOR P., BRZOZOWSKA A., SŁONIEWSKI K., KOWALSKI Z.M., STEFANIAK T. (2016) *Acute phase response in the primiparous dairy cows after repeated percutaneous liver biopsy during the transition period*. Polish Journal of Veterinary Science 19: 393-399. DOI: 10.1515/pjvs-2016-0049
45. JORRITSMA R., JORRITSMA H., SCHUKKEN Y.H., BARTLETT P.C., WENSING T., WENTINK G.H. (2001) *Prevalence and indicators of postpartum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in the Netherlands* Livestock Production Science 68: 53-60. DOI: 10.1016/S0301-6226(00)00208-6
46. KELTON D.F, LISSEMORE K.D., MARTIN R.E. (1998) *Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle* Journal of Dairy Science 81: 2502–2509. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(98)70142-0

47. KIDA K. (2003) *Relationships of metabolic profiles to milk production and feeding in dairy cows* The Journal of Veterinary Medical Science, 65: 671–677. DOI: 10.1292/jvms.65.671
48. KOMEILIAN M.M., SAKHA M., NADALIAN M.G., VESHKINI A. (2011) *Hepatic ultrasonography of dairy cattle in postpartum period: finding the sonographic features of fatty liver syndrome* Australian Journal of Basic and Applied Sciences 5: 701-706
49. LARSEN M., KRISTENSEN N.B. (2013) *Precursors for liver gluconeogenesis in periparturient dairy cows* Animal 7: 1640-1650. DOI: 10.1017/S1751731113001171
50. LATIMER K.S. (2011) *Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology 5th Edition* wyd. Wiley-Blackwell. ISBN: 978-0-813-82014-9
51. LEVENE H. (1960) *Robust Tests for Equality of Variances* Contributions to Probability and Statistics, Stanford University Press, Palo Alto, 278-292.
52. LI Y., DING H.Y., WANG X.C., FENG S.B., LI X.B., WANG Z., LIU G.W., LI X.W. (2016) *An association between the level of oxidative stress and the concentrations of NEFA and BHBA in the plasma of ketotic dairy cows* Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 100: 844–851. DOI: 10.1111/jpn.12454
53. LUCY M. C., VERKERK G. A., WHYTE B. E., MACDONALD K. A., BURTON L., CURSONS R. T., ROCHE J. R., HOLMES C.W. (2009) *Somatotropic axis components and nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in a pasture system* Journal of Dairy Science 92: 526–539. DOI: 10.3168/JDS.2008-1421
54. LUKE T.D.W., ROCHFORT S., WALES W.J., BONFATTI V., MARETT L., PRYCE J.E. (2019). *Metabolic profiling of early-lactation dairy cows using milk mid-infrared spectra* Journal of Dairy Science 102: 1747–1760. DOI:10.3168/jds.2018-15103
55. MANN H.B., WHITNEY D.R. (1947) *On a Test of Whether One of Two Random Variables Is Stochastically Larger than the Other* Annals of Mathematical Statistics 18: 50-60. DOI: 10.1214/aoms/1177730491
56. MARKANTONATOS X., VARGA G.A. (2017) *Effects of monensin on glucose metabolism in transition dairy cows* Journal of Dairy Science 100: 9020-9035. DOI: 10.3168/jds.2016-12007

57. MARTINDALE J.L., HOLBROOK N.J. (2002) *Cellular response to oxidative stress: signalling for suicide and survival* Journal of Cellular Physiology 192: 1–15. DOI: 10.1002/jcp.10119

58. MCART JA.A., NYDAM D.V., OETZEL G.R. (2012) *Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle* Journal of Dairy Science 95: 5056-5066. DOI: 10.3168/jds.2012-5443

59. MIKUŁA R., PRUSZYŃSKA-OSZMAŁEK E., PSZCZOLA M., RZĄSIŃSKA J., SASSEK M., NOWAK K.W., NOGOWSKI L., KOŁODZIEJSKI P.A. (2021) *Changes in metabolic and hormonal profiles during transition period in dairy cattle - the role of spexin* BMC veterinary research 17: 359. DOI: 10.1186/s12917-021-03069-4

60. MOSTERT P.F., BOKKERS E.A.M., VAN MIDDELAAR C.E., HOGEVEEN H., DE BOER I.J.M. (2018) *Estimating the economic impact of subclinical ketosis in dairy cattle using a dynamic stochastic simulation model* Animal 12: 145-154. DOI: 10.1017/S1751731117001306

61. MULLIGAN F.J., DOHERTY M.L. (2008) *Production diseases of the transition cow* Veterinary Journal 176: 3–9 DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.12.018

62. NAKOV D., ANDONOV S., TRAJCHEV M. (2016) *Antioxidant status in dairy cows during lactation* Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences 68: 1e8. DOI: 10.15835/buasvmcn-vm:63:1-2:2445

63. NAYERI S., SCHENKEL F., FLEMING A., KROEZEN V., SARGOLZAEI M., BAES C., CÁNOVAS A., SQUIRES J., MIGLIOR F. (2019) *Genome-wide association analysis for β-hydroxybutyrate concentration in milk in Holstein dairy cattle* BMC genetics 20: 58. DOI: 10.1186/s12863-019-0761-9

64. NGUYEN P., LERAY V., DIEZ M., SERISIER S., BLOC'H, J.L., SILIART B., DUMON, H. (2008) *Liver lipid metabolism* Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 92: 272-283. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x

65. OETZEL G.R. (2007) *Herd-level ketosis – diagnosis and risk factors* American Association of Bovine Practitioners 40th Annual Conference, Vancouver, BC, 67–97.

66. OSPINA P.A., NYDAM D.V., STOKOL T., OVERTON T.R. (2010) *Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level* Journal of Dairy Science 93: 3595-601. DOI: 10.3168/jds.2010-3074

67. PAIANO R.B., BIRGEL D.B., BONILLA J., BIRGEL JUNIOR E.H. (2020) *Evaluation of biochemical profile of dairy cows with metabolic diseases in tropical conditions* Reproduction of Domestic Animals 55: 1219e28. DOI:10.1111/rda.13768
68. PIRES J.A., DELAVAUD C., FAULCONNIER Y., POMIÈS D., CHILLIARD Y. (2013) *Effects of body condition score at calving on indicators of fat and protein mobilization of periparturient Holstein-Friesian cows* Journal of Dairy Science 96: 6423-6439. DOI: 10.3168/jds.2013-6801
69. PROUDFOOT K., VEIRA D., WEARY D., VON KEYSERLINGK, M. (2009) *Competition at the feed bunk changes the feeding, standing, and social behavior of transition dairy cows* Journal of Dairy Science 92: 3116–3123. DOI: 10.3168/jds.2008-1718
70. PRYCE J.E., PARKER GADDIS K.L., KOECK A., BASTIN C., ABDELSAYED M., GENGLER N., MIGLIOR F., HERINGSTAD B., EGGER-DANNER C., STOCK K.F., BRADLEY A.J., COLE J.B. (2016) *Invited review: Opportunities for genetic improvement of metabolic diseases* Journal of Dairy Science 99: 6855–6873. DOI: 10.3168/jds.2016-10854
71. PUPPEL K., KUCZYŃSKA B. (2016) *Metabolic profiles of cow's blood; a review* Journal of the Science of Food and Agriculture, 96: 4321–4328. DOI: 10.1002/jsfa.7779
72. PUTMAN A.K., BROWN J.L., GANDY J.C., WISNIESKI L., SORDILLO L.M. (2018) *Changes in biomarkers of nutrient metabolism, inflammation, and oxidative stress in dairy cows during the transition into the early dry period* Journal of Dairy Science 101: 9350–9359. DOI: 10.3168/jds.2018-14591
73. RABOISSON D, MOUNIÉ M, KHENIFAR E, MAIGNÉ E. (2015) *The economic impact of subclinical ketosis at the farm level: Tackling the challenge of over-estimation due to multiple interactions* Preventive Veterinary Medicine 122: 417-25. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2015.07.010
74. RABOISSON D, MOUNIÉ M, MAIGNÉ E. (2014) *Diseases, reproductive performance, and changes in milk production associated with subclinical ketosis in dairy cows: a meta-analysis and review* Journal of Dairy Science 97: 7547-7563. DOI: 10.3168/jds.2014-8237
75. R CORE TEAM (2020) *R: A Language and Environment for Statistical Computing* R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
76. REDFERN E.A., SINCLAIR L.A., ROBINSON P.A. (2021) *Dairy cow health and management in the transition period: The need to understand the human*

dimension Research in Veterinary Science 137: 94-101. DOI: 10.1016/j.rvsc.2021.04.029

77. ROCHE J.R., BURKE C.R., CROOKENDEN M.A., HEISER A., LOOR J.L., MEIER S., MITCHELL M.D., PHYN C.V.C., TURNER S.A. (2017) *Fertility and the transition dairy cow* Reproduction, Fertility and Development 30: 85-100. DOI: 10.1071/RD17412
78. ROLAND L., DRILLICH M., IWERSEN M. (2014) Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 26: 592–598. DOI: 10.1177/1040638714546490
79. ROYSTON P. (1995) *Remark AS R94: A Remark on Algorithm AS 181: The W-test for Normality* Journal of the Royal Statistical Society Series C (Applied Statistics) 44: 547-551
80. SAKOWSKI T., KUCZYŃSKA B., PUPPEL K., METERA E., SŁONIEWSKI K., BARSZCZEWSKI J. (2012) *Relationships between physiological indicators in blood, and their yield, as well as chemical composition of milk obtained from organic dairy cows* Journal of the Science of Food and Agriculture, 92: 2905–2912. DOI: 10.1002/jsfa.5900
81. SHARMA N., SINGH N., SINGH O. (2011) *Oxidative stress and antioxidant status during transition period in dairy cows* Asian Australasian Journal of Animal Sciences 24: 479e84. DOI: 10.5713/ajas.2011.10220
82. SCHRÖDER U.J., STAUFENBIEL R. (2006) *Invited review: Methods to determine body fat reserves in the dairy cow with special regard to ultrasonographic measurement of backfat thickness* Journal of Dairy Science 89: 1-14. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72064-1
83. SCHULZ K., FRAHM J., MEYER U., KERSTEN S., REICHE D., REHAGE J., DÄNICKE S. (2014) *Effects of prepartal body condition score and peripartal energy supply of dairy cows on postpartal lipolysis, energy balance and ketogenesis: an animal model to investigate subclinical ketosis* Journal of Dairy Research 81: 257-66. DOI: 10.1017/S0022029914000107
84. SHAHZAD K., LOPREIATO V., LIANG Y., TREVISI E., OSORIO J.S., XU C., LOOR J.J. (2019) *Hepatic metabolomics and transcriptomics to study susceptibility to ketosis in response to prepartal nutritional management* Journal of Animal Science and Biotechnology 10: 96. DOI: 10.1186/s40104-019-0404-z

85. SHEN T., LI X., LOOR J.J., ZHU Y., DU X., WANG X., XING D., SHI Z., FANG Z., LI X., LIU G. (2019) *Hepatic nuclear factor kappa B signaling pathway and NLR family pyrin domain containing 3 inflammasome is over-activated in ketotic dairy cows* Journal of Dairy Science 102: 10554-10563. DOI: 10.3168/jds.2019-16706
86. SHI X., LI X., LI D., LI Y., SONG Y., DENG Q., WANG J., ZHANG Y., DING H., YIN L. ZHANG Y., WANG Z., LI X., LIU G. (2014) *Beta-hydroxybutyrate activates the NF-kappa B signaling pathway to promote the expression of pro-inflammatory factors in calf hepatocytes* Cellular Physiology and Biochemistry 33, 920–932. DOI: 10.1159/000358664
87. SHIN E.K., JEONG J.K., CHOI I.S., KANG H.G., HUR T.Y., JUN, Y.H., KIM I.H. (2015) *Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows* Theriogenology 84: 252–260. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.03.014
88. SOARES R.A.N., VARGAS G., MUNIZ M.M.M., SOARES M.A.M., CÁNOVAS A., SCHENKEL F., SQUIRES E.J. (2021) *Differential gene expression in dairy cows under negative energy balance and ketosis: A systematic review and meta-analysis* Journal of Dairy Science 104: 602-615. DOI: 10.3168/jds.2020-18883
89. SONG Y., LI N., GU J., FU S., PENG Z., ZHAO C., ZHANG Y., LI X., WANG Z., LI X., LIU G. (2016) *β-hydroxybutyrate induces bovine hepatocyte apoptosis via an ROS-p38 signaling pathway* Journal of Dairy Science 99: 9184–9198. DOI: 10.3168/jds.2016-11219
90. SONG Y., LI X., LI Y., LI N., SHI X., DING H., ZHANG Y., LI X., LIU G., WANG Z. (2014) *Non-esterified fatty acids activate the ROS-p38-p53/Nrf2 signaling pathway to induce bovine hepatocyte apoptosis in vitro* Apoptosis: an International Journal on Programmed Cell Death 19: 984–997. DOI: 10.1007/s10495-014-0982-3
91. STEENEVELD W., AMUTA P., VAN SOEST F.J.S., JORRITSMA R., HOGEVEEN H. (2020) *Estimating the combined costs of clinical and subclinical ketosis in dairy cows* PLoS One 15: e0230448. DOI: 10.1371/journal.pone.0230448
92. STENGÄRDE L., TRÅVÉN M., EMANUELSON U., HOLTENIUS K., HULTGREN J., NISKANEN R. (2008) *Metabolic profiles in five high-producing Swedish dairy herds with a history of abomasal displacement and ketosis* Acta Veterinaria Scandinavica 50:31. DOI: 10.1186/1751-0147-50-31

93. STRIEDER-BARBOZA C., ZONDLAK A., KAYITSINGA J., PIRES A.F.A., CONTRERAS G.A. (2015) *Lipid mobilization assessment in transition dairy cattle using ultrasound image biomarkers* Livestock Science 177: 159–164. DOI: 10.1016/j.livsci.2015.04.020
94. STURM V., EFROSININ D., ÖHLSCHUSTER M., GUSTERER E., DRILLICH M., IWERSEN M. (2020) *Combination of Sensor Data and Health Monitoring for Early Detection of Subclinical Ketosis in Dairy Cows.* Sensors (Basel) 20: 1484. DOI: 10.3390/s20051484
95. SUNDRUM A. (2015) *Metabolic disorders in the transition period indicate that the dairy cows' ability to adapt is overstressed* Animals 5: 978–1020. DOI: 10.3390/ani5040395
96. SUTHAR V.S., CANELAS-RAPOSO J., DENIZ A., HEUWIESER W. (2013) *Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows* Journal of Dairy Science 96: 2925-38. DOI: 10.3168/jds.2012-6035
97. TANAKA A., URABE S., TAKEGUCHI A., MIZUTANI H., SAKO T., IMAI S., YOSHIMURA I., KIMURA N., ARAI T. (2006) *Comparison of activities of enzymes related to energy metabolism in peripheral leukocytes and livers between Holstein dairy cows and ICR mice* Veterinary Research Communications 30: 29–38. DOI: 10.1007/s11259-005-3223-y
98. THARWAT M. (2012a) *Ultrasonography as a diagnostic and prognostic approach in cattle and buffaloes with fatty infiltration of the liver*. Polish Journal of Veterinary Science 15: 83-93/ DOI: 10.2478/v10181-011-0118-4
99. THARWAT M., TAKAMIZAWA A., HOSAKA Y. Z., ENDOH D., OIKAWA S. (2012b) *Hepatocyte apoptosis in dairy cattle during the transition period* Canadian Journal of Veterinary Research 76: 241–247.
100. TIAN W., WEI T., LI B., WANG Z., ZHANG N., XIE G. (2014) *Pathway of programmed cell death and oxidative stress induced by β-hydroxybutyrate in dairy cow abomasum smooth muscle cells and in mouse gastric smooth muscle* PloS One 9: e96775. DOI: 10.1371/journal.pone.0096775
101. TIENKEN R., KERSTEN S., FRAHM J., HÜTHER, L., MEYER U., HUBER K., REHAGE J., DÄNICKE S. (2015a) *Effects of prepartum dietary energy level and nicotinic acid supplementation on immunological, hematological and biochemical parameters of periparturient dairy cows differing in parity* Animals 5: 910–933. DOI: 10.3390/ani5030391

102. TIENKEN R., KERSTEN S., FRAHM J., MEYER U., LOCHER L., REHAGE J., HUBER K., KENÉZ Á., SAUERWEIN H., MIELENZ M., DÄNICKE S. (2015) *Effects of an energy-dense diet and nicotinic acid supplementation on production and metabolic variables of primiparous or multiparous cows in periparturient period* Archives of Animal Nutrition 69: 319–339. DOI: 10.1080/1745039X.2015.1073002

103. VALKO M., LEIBFRITZ D., MONCOL J., CRONIN M. T., MAZUR M., TELSER, J. (2007) *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease* International Journal of Biochemistry and Cell Biology 39: 44–84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001

104. VAN ROSSUM G., DRAKE JR F.L. (1995) *Python reference manual* Centrum voor Wiskunde en Informatica Amsterdam.

105. WALSH R.B., WALTON J.S., KELTON D.F., LEBLANC S.J., LESLIE K.E., DUFFIELD T.F. (2007) *The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows* Journal of Dairy Science 90: 2788–2796. DOI: 10.3168/jds.2006-560

106. WHITE, H. M., KOSER, S. L., DONKIN, S. S. (2011) *Differential regulation of bovine pyruvate carboxylase promoters by fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor-α agonist* Journal of Dairy Science 94: 3428-3436. DOI: 10.3168/jds.2010-3960

107. YOUNG J. W. (1977) *Gluconeogenesis in cattle: significance and methodology* Journal of Dairy Science 60: 1–15. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(77)83821-6

108. ZEBELI Q., GHAREEB K., HUMER E., METZLER-ZEBELI B.U., BESENFELDER U. (2015) *Nutrition, rumen health and inflammation in the transition period and their role on overall health and fertility in dairy cows* Research in Veterinary Science 103: 126-136. DOI: 10.1016/j.rvsc.2015.09.020