

PARATHORMONO, KALCITONINO IR VITAMINO D ĮTAKA MINERALINIŲ MEDŽIAGŲ KIEKIUI SVEIKŲ IR SERGANČIŲ KARVIŲ KRAUJO SERUME

Virginija Bandzaitė, Irena Klimienė, Vytautas Špakauskas, Julija Šilkūnaitė
Lietuvos veterinarijos akademijos Veterinarijos institutas, Gyvulių sveikatingumo ir epidemiologijos skyrius,
Instituto g. 2, LT-56115 Kaišiadorys; tel. (8-346) 60 692; el. paštas: bagriv@one.lt

Santrauka. 2004–2005 m. tirta parathormono (PTH), kalcitonino (CT), 25-hidroksicholekalciferolio (25-OH vitamino D) bei makroelementų kalcio (Ca), fosforo (P) ir magnio (Mg) kiekio kaita sveikų ir sergančių karvių kraujo serume. Parathormono ir kalcitonino kiekis buvo nustatomas *in vitro* „Immulite“ (USA, Diagnostic Products Corporation) analizatoriumi, imunometriniu metodu. Vitamino D kiekis nustatytas imunofermentinės analizės (ELISA) metodu. Kalcio, fosforo ir magnio kiekis nustatytas automatinio „Eos-Bravo“ analizatoriumi (Italija, Hospitex Diagnostics) su „Hospitex“ firmos reagentais.

Sudarytos trys sąlyginai sveikų (veršingų telyčių, užtrūkusių veršingų ir melžiamų karvių) ir trys sergančių (osteomaliacija, mastitu, pareze po veršiavimosi) karvių grupės, po 10–15 kiekvienoje.

Visų trijų sergančių galvijų grupių kraujyje buvo sumažėjęs kalcio kiekis. Mažiausiai kalcio nustatyta pareze po veršiavimosi sergančioms karvėms. Fosforo ir magnio sumažėja sergančių osteomaliacija, o fosforo – pareze po veršiavimosi sergančių karvių kraujyje. Daugiausia PTH nustatyta sąlyginai sveikų užtrūkusių veršingų, mažiausiai – melžiamų karvių kraujyje. Statistiškai patikimas PTH kiekio padidėjimas nustatytas pareze po veršiavimosi sirgusių karvių kraujyje. Pareze sergančių karvių kraujyje nustatyta daugiausia vitamino D. Vitamino D kiekis visose karvių grupėse atvirkščiai koreliuoja su kalcio kiekiu ($r = -0,701$, $r = -0,971$).

Raktažodžiai: karvės, parathormonas, kalcitoninas, 25-OH vitaminas D, kalcis, fosforas, magnis.

PARATHYROID HORMONE, CALCITONIN AND VITAMIN D INFLUENCE ON CALCIUM, PHOSPHORUS AND MAGNESIUM LEVEL IN HEALTHY AND SICK COWS

Summary. A study was carried out in October 2004-February 2005 with the aim to measure changes in blood serum parathyroid hormone (PTH), calcitonin (CT), 25-hydroxicholecalciferol (25-OH vitamin D) and macronutrients – calcium (Ca), phosphorus (P) and magnesium (Mg) levels in healthy and sick cows. The amounts of the parathyroid hormone and calcitonin were determined *in vitro* using the IMMULITE (USA, Diagnostic Products Corporation) analyser, by the immunometric method. Amounts of 25-hydroxicholecalciferol were determined using ELISA method. Amounts of macronutrients (calcium, phosphorus, magnesium) were measured using the Eos-Bravo analyser (Italy, Hospital Diagnostics) and reagents of the company HOSPITEX.

Cattle were divided into 3 groups of healthy cows (heifer's in-calf, dry cow's in-calf, milk producing cows) and 3 groups of sick cows (having parturient paresis, mastitis, and osteomalacia). 10-15 cows were in each group.

The investigation showed hypocalcaemia in all three groups of sick cows, the lowest amounts of calcium were in cows having parturient paresis. Hypophosphatemia and hypomagnesaemia were found in cows with osteomalacia; hypophosphatemia was characteristic for cows having parturient paresis. In healthy cow groups, the highest levels of the blood PTH was determined for the dry cows in calf, lowest – for milk producing cows. A significantly higher blood PTH level was determined for the cows having parturient paresis. The highest amounts of calcitonin and 25-OH vitamin D were in cows with parturient paresis. A negative correlation was determined between the amount of vitamin D and the amount of calcium ($r = -0.701$, $r = -0.971$).

Keywords: cow, parathyroid hormone, calcitonin, 25-OH vitamin D, Ca, P, Mg.

Įvadas. Nustatyta, kad kalcio, fosforo bei magnio apykaitos reguliacijai didžiausią įtaką daro polipeptidiniai hormonai parathormonas bei kalcitoninas ir steroidinis hormonas cholekalciferolis, dar vadinamas vitaminu D. Netiesiogiai dalyvauja ir kitos vidinės sekrecijos liaukos, audinių bei ląstelių fermentai, įvairūs mikroelementai ir vitaminai (Deftos, 1998; Brown, 2001). Parathormonas yra vienas pagrindinių hormonų, reguliuojančių kalcio kiekį kraujyje. Svarbiausias jo biologinis vaidmuo – tiesiogiai veikti ląsteles – taikinius kauluose ir inkstuose, o netiesiogiai – žarnose ir taip palaikyti pakankamą kalcio kiekį plazmoje bei užtikrinti optimalų kūno ląstelių funkcionavimą. PTH sintetinamas prieskydinėse liaukose. Jis sudarytas iš vienos polipeptidinės grandinės, turinčios

84 aminorūgščių liekanas (Potts, 1997). Kalcio ir fosforo apykaita reguliuojama hormonų veikimo principu, t. y. sumažėjus kalcio koncentracijai kraujyje, daugiau išsiskiria parathormono, skatinančio hidroksilazės aktyvumą inkstuose ir aktyvinančio 1,25 (OH)₂ vitamino D sintezę iš 25-OH vitamino D. 25-OH vitaminas D – didžiausias cirkuliuojantis vitamino D metabolitas kraujyje, kepenyse sintetinamas iš cholekalciferolio. Nors 1,25-(OH)₂ vitamino D metabolitas yra biologiškai aktyvesnis už 25-OH vitamino D metabolitą, manoma, kad cirkuliuojantis 25-OH vitaminas D geriausiai atspindi informaciją apie vitamino D kiekį kraujyje ir leidžia diagnozuoti hipovitaminozes (Scharla, 1998). 1,25-OH vitaminas D stimuliuoja kalcio ir fosforo rezorbciją

žarnyne bei inkstuose. Taip sunormalėja kalcio ir fosforo koncentracija kraujyje. Kalcio perteklius slopina parathormono bei $1,25(OH)_2D_3$ sintezę ir kartu kalcio rezorbciją žarnyne. Sumažėjus kalcio kiekiui kraujyje, parathormonas tam tikrą laiką mobilizuoja kalcį iš kaulų, dėl to jie minkštėja. Kai vitamino D nepakanka, parathormonas veikia priešingai, t. y. slopina fosfatų reabsorbciją inkstų kanalėliuose ir skatina juos išsiskirti su šlapimu, todėl kraujyje sumažėja fosforo. Hipermagnemija gali slopinti PTH sekreciją, o hipomagnemija – skatinti, tačiau, jei magnio trūksta ilgą laiką, gali būti slopinama PTH biosintezė ir sekrecija (Bruder et al., 2001; Drezner, 2002).

Kalcitoninas yra skydliaukėje sintetinamas peptidas, susidedantis iš 32 aminorūgščių. Pagrindinė jo funkcija – mažinti kalcio ir fosforo kiekį. Kalcitonino sekrecija priklauso nuo kalcio koncentracijos kraujyje: padidėjus kalcio kiekiui, daugėja ir kalcitonino (Austin, Heath, 1981; Deftos, Gagel, 2000).

PTH, CT ir aktyviems vitamino D metabolitams darant įtaką kaulų, inkstų ir virškinimo trakto veiklai, užtikrinama pastovi kalcio koncentracija kraujyje. Kalcio kiekio pokyčiai veikia PTH sekreciją prieskydinėse liaukose, CT sekreciją skydliaukėje ir $1,25-OH$ vitamino D sintezę inkstuose. Šie kalcitropinių hormonų pokyčiai didžiausią reikšmę turi normalizuojant kalcio ir šiek tiek mažesnę – fosforo ir magnio kiekį kraujo serume iš skeleto rezervų (Favus, 1992).

Darbo tikslas – nustatyti PTH, CT, vitamino D įtaką normalizuojant mineralinių medžiagų (Ca, P ir Mg) kiekį sveikų ir sergančių karvių kraujo serume.

Tyrimų sąlygos ir metodai. Tyrimai atlikti 2004–2005 m. LVA Veterinarijos instituto Gyvulių sveikatingumo ir epidemiologijos skyriuje bei galvijų fermose spalio–vasario mėnesiais, t. y. tvartiniu laikotarpiu. Buvo tirtos Lietuvos juodmargių veislės 2–12 metų telyčios ir karvės. Sudarytos trys sąlyginai sveikų (veršingų telyčių, užtrūkusių veršingų ir melžiamų karvių) ir trys sergančių (osteomaliacija, mastitu, pareze po veršiavimosi) karvių grupės, po 10–15 kiekvienoje.

Sergančių karvių kraujas tyrimui į vienkartinis mėgintuvėlius „Venoject“ (Terumo Europe N. V., Belgium) be antikoagulianto imtas iš jungo venos. Mėginiai per vieną valandą buvo pristatomi į laboratoriją, centrifuguojami 5 minutes 3 tūkst. kartų per minutę apsisukimu. Atskirtas kraujo serumas dozatoriumi pipete nusiurbtas į Eppendorfo (Eppendorf AG, Germany, Hamburg) mėgintuvėlius su dangteliu. Pripildyti kraujo serumo mėgintuvėliai buvo laikomi šaldytuve $-20^{\circ}C$ temperatūroje. Visus mėgintuvėlius su kraujo serumu vienu metu atšildžius, tirta „Immulite“ analizatoriumi (USA, Diagnostic Products Corporation), imunometrinio metodu. Nustatytas parathormono ir kalcitonino kiekis. Vitamino D kiekis nustatytas imunofermentinės analizės (ELISA) metodu. Makroelementų Ca, P bei Mg kiekis nustatytas automatinio „Eos-Bravo“ analizatoriumi (Italija, Hospitex Diagnostics) su „Hospitex“ firmos reagentais.

Tyrimo rezultatai ir statistiniai duomenys apskaičiuoti kompiuterine programa „Epi Info“ (1996; Centers For Disease Control & Prevention (CDC), U. S. A., Version 6,04). Apskaičiuoti duomenų aritmetiniai vidurkiai (M), absoliuti paklaida (m), Pirsono koreliacijos koeficientas (r). Skirtumo tarp grupių patikimumo kriterijui (p) nustatyti taikytas Stjudento daugybinio palyginimo metodas. Skirtumas laikytas statistiškai patikimu, jei $p < 0,05$.

Rezultatai ir jų aptarimas. Ištyrę PTH, CT, $25-OH$ vitamino D bei makroelementų Ca, P, Mg kiekį nustatėme, kad sąlyginai sveikų karvių kraujyje magnio ir fosforo kiekis buvo normalus, o įprastas kalcio kiekis ($2,62 \pm 0,11$ mmol/l) nustatytas tik veršingų telyčių kraujyje. Užtrūkusių ir melžiamų karvių kraujyje nustatyta hipokalcemija (1 lentelė, 1–3 pav.). PTH sveikų karvių grupėse kito nuo 3,47 iki 5,20 pmol/l. Didžiausias PTH kiekis sąlyginai sveikų karvių grupėse nustatytas užtrūkusioms veršingoms karvėms ($5,20 \pm 0,41$ pmol/l), mažiausias – melžiamoms. Veršingų telyčių kraujyje palyginti su melžiamomis taip pat nustatyta daugiau PTH ($p < 0,05$). Manoma, kad augant vaisiui didėja kalcio poreikis, didėja ir PTH aktyvumas, todėl jo randama daugiau (Malz, Mayer, 1993). Didesnis PTH kiekis nustatytas veršingų telyčių nei užtrūkusių karvių kraujyje. Kadangi užtrūkusių veršingų karvių grupei parinktos 4–10 metų karvės, tai mūsų tyrimo duomenys sutampa su P. J. Rajala ir J. Grohn teiginiais (1998), kad su amžiumi mažėja kalcio ir didėja PTH aktyvumas.

Kalcitonino kiekis visų trijų sąlyginai sveikų karvių kraujyje kito nuo 1,46 iki 2,40 pmol/l ir statistiškai nesiskyrė ($p > 0,05$). Sergančių karvių grupėse daugiausia kalcitonino nustatyta pareze po veršiavimosi sergančių karvių kraujyje ($p > 0,05$).

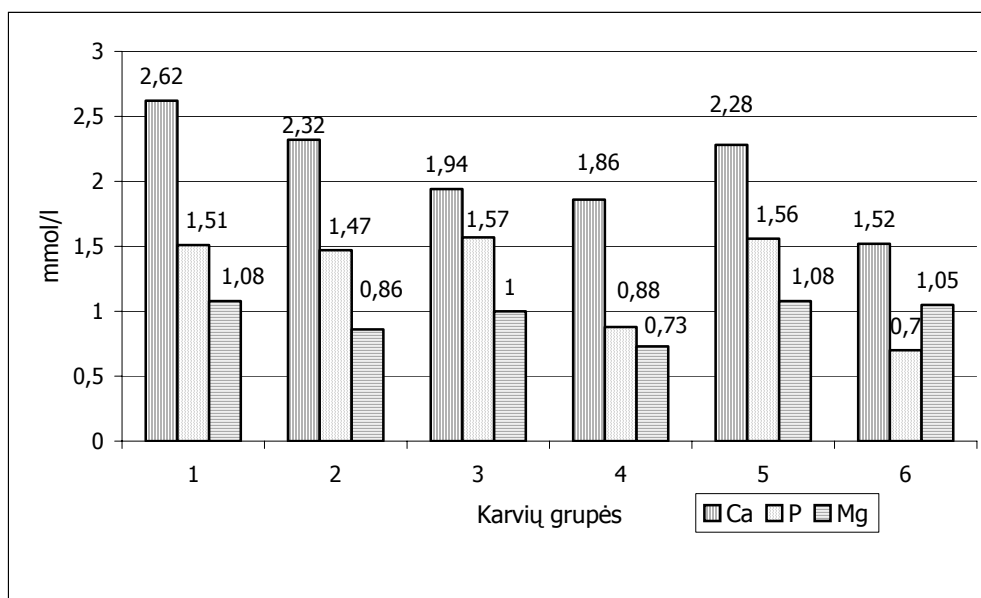
Vitamino D kiekis 2 ir 3 grupių karvių kraujyje buvo labai panašus, telyčių (1 grupė) kraujyje nustatyta jo žymiai mažiau, tačiau statistiškai patikimo skirtumo nebuvo ($p > 0,05$). Analogiškus tyrimo duomenis gavo ir S. H. Scharla 1998 m. Šio tyrėjo teigimu, tyrimo rezultatus galima sieti su amžiumi, nes su gyvulio amžiumi kraujyje daugėja ir $25-OH$ vitamino D. J. M. Bruder ir kiti mokslininkai teigia, kad vitamino D aktyvumas priklauso nuo kalcio kiekio kraujyje (2001). Mūsų tyrimu, šis teiginys pasitvirtino, nes 1 ir 2 grupės karvių kraujyje nustatytas kalcio ir vitamino D kiekis tarpusavyje ženkliai atvirkščiai koreliuoja (atitinkamai $r = -0,701$ ir $r = -0,971$). Trečiojoje grupėje šios koreliacijos nenustatėme.

Tirdami kalcitropinių hormonų, vitamino D ir makroelementų Ca, P, Mg kiekį sergančių karvių kraujyje nustatėme, kad visų trijų galvijų grupių kraujyje buvo sumažėję kalcio. Mažiausiai jo nustatyta pareze sergančių karvių kraujyje ($1,52 \pm 0,09$ mmol/l) (1 lentelė, 1–3 pav.). Fosforo kiekis fiziologinę normą atitiko tik mastitu sergančių karvių kraujyje. Įprastas magnio kiekis nustatytas mastitu ir pareze sergančių, o sergančių osteomaliacija karvių kraujyje jis buvo mažesnis už fiziologinę normą ir patikimai statistiškai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo kitų karvių grupių rodmenų.

1 lentelė. **Kalcio, fosforo, magnio, parathormono, kalcitonino ir vitamino D kiekio vidurkis sveikų ir sergančių karvių kraujo serume**

Karvių grupės	Tyrimų rezultatų statistiniai vidurkiai (X±SD)					
	Ca, mmol/l	P, mmol/l	Mg, mmol/l	PTH, pmol/l	CT, pmol/l	Vit. D, nmol/l
Sąlyginai sveikų karvių grupės						
Veršingos telyčios (n=10)						
1	2,62±0,11	1,51±0,15	1,08±0,11	4,37±0,51	1,75±0,09	26,76±2,22
Užtrūkusios veršingos karvės (n=10)						
2	2,32±0,12	1,47±0,17	0,86±0,10	5,20±0,41	1,61±0,13	37,8±2,52
Melžiamos karvės (n=15)						
3	1,94±0,12	1,57±0,13	1,00±0,06	3,47±0,53	1,57±0,06	37,15±3,46
Sergančių karvių grupės						
Sergančios osteomaliacija n=10						
4	1,86±0,11	0,88±0,06	0,73±0,06*	3,95±0,41	1,55±0,05	33,97±2,58
Sergančios mastitu (n=10)						
5	2,28±0,10	1,56±0,09	1,08±0,04	3,97±0,66	1,83±0,12	23,72±2,67*
Sergančios pareze po veršiamosios (n=15)						
6	1,52±0,09	0,7±0,05*	1,05±0,04	15,21±1,27*	2,28±0,25	38,12±1,18

*p<0,05 palyginti su sveikomis karvėmis

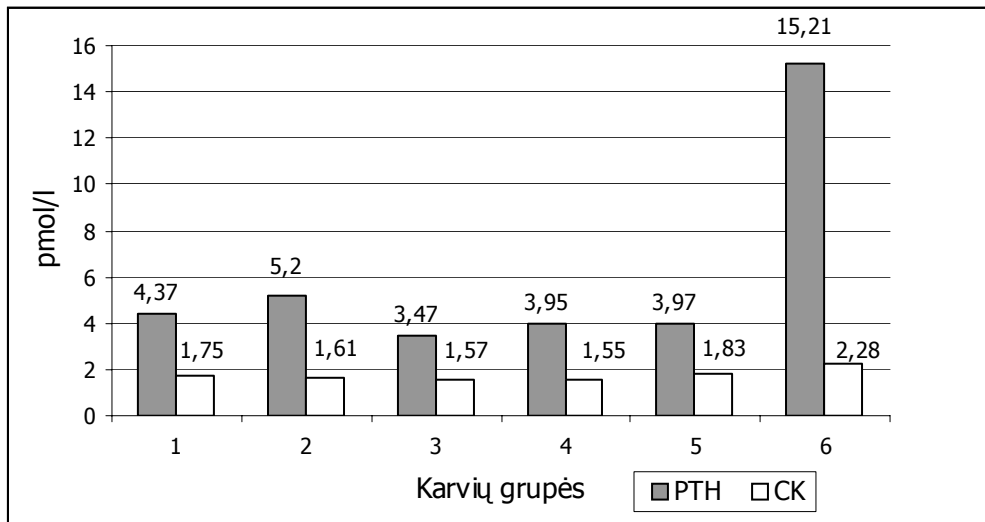
1 pav. **Kalcio, fosforo ir magnio kiekio kaita karvių grupėse** (1 – veršingos telyčios, 2 – užtrūkusios veršingos karvės, 3 – melžiamos karvės, 4 – karvės, sergančios osteomaliacija, 5 – karvės, sergančios mastitu, 6 – karvės, sergančios pareze po veršiamosios)

4 ir 5 grupių karvių kraujyje PTH kiekis beveik nesiskyrė, o 6 grupės karvių kraujyje buvo žymiai padidėjęs ($p<0,05$). Literatūroje nurodoma, kad PTH koncentracija serume atvirkščiai koreliuoja su kalcio koncentracija, t. y. mažas kalcio kiekis skatina prieskydinių liaukų sekreciją (Potts, 1997; Goff, Horst, 1997). Mūsų tyrimų duomenimis, osteomaliacija sergančių karvių kraujyje PTH kiekis atvirkščiai koreliavo su kalcio kiekiu ($r = -0,999$) ir tiesiogiai koreliavo pareze po veršiamosios sergančių karvių kraujyje ($r = -0,616$). Matyt, esant ūmiai hipokalcemijai

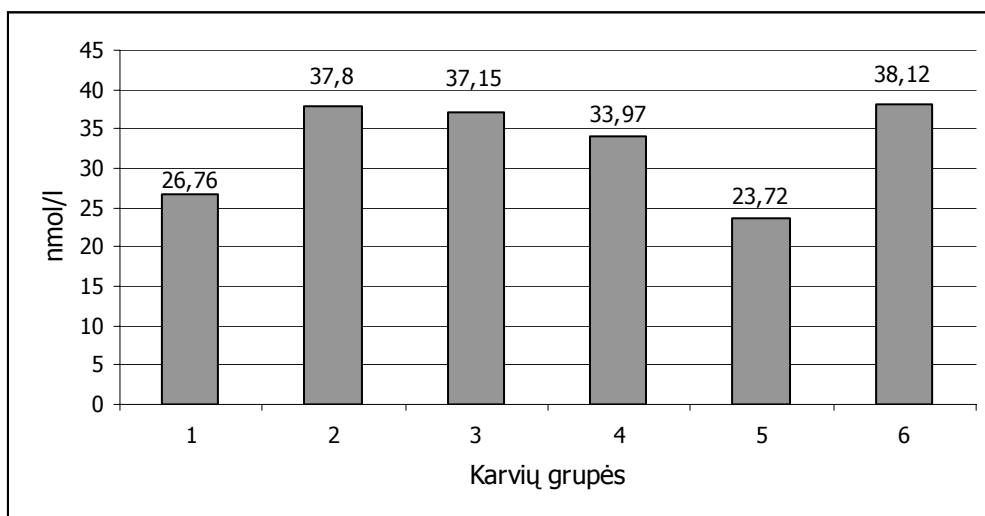
prieskydinės liaukos, reaguodamos į kalcio mažėjimą kraujyje, produkuoja PTH, o esant lėtinei hipokalcemijai (sergant osteomaliacija) prieskydinės liaukos ilgą laiką nesugeba kompensuoti kalcio kiekio pokyčių sergančių karvių kraujyje. Fosforo kiekis, nustatytas 4 ir 6 grupėse, mažai priklausė nuo PTH kiekio, nes koreliacijos koeficientas buvo nedidelis (atitinkamai $r = 0,466$ ir $r = 0,500$). Pareze sergančių karvių kraujyje nustatytas nežymiai padidėjęs kalcitonino ($2,28\pm0,12$ pmol/l) ir didelis vitamino D kiekis. Literatūros duomenimis, kalcitonino kiekis tiesiogiai priklauso nuo kraujo serume

esančio kalcio kiekio (Austin, Heath, 1981; Deftos, Gagel, 2000). Tyrimais nustatėme, kad pareze sergančių karvių CT kiekis turėjo atvirkščią koreliacinę priklausomybę su kalcio ($r = -0,314$) ir fosforo ($r = -0,352$) kiekiu. Matyt, dėl to, kad CT sekrecija kontroliuojama per tuos pačius kalcio ir su juo susijusių jonų, kurie reguliuoja PTH sekreciją ir veikia osteoklastų sintezę (Deftos, Gagel, 2000). Didžiausią sergančių karvių kraujyje nustatytą vitamino D kiekį galima paaiškinti tuo, kad vitamino D aktyvumas priklauso nuo kalcio gausos kraujyje, t. y. kuo mažiau Ca, tuo daugiau PTH, kuris aktyvina vitamino D sintezę (Bruder et al., 2001). Mūsų tyrimais, vitamino D kiekis, nustatytas 4 grupės karvių kraujyje, atvirkščiai koreliuoja su kalcio kiekiu ($r = -0,940$), 5 grupėje – su kalcio ($r = -0,740$) ir fosforo kiekiu ($r = -0,823$) ir 6 grupėje – su fosforo kiekiu ($r = -0,558$). Iš mūsų nustatytų koreliacinių ryšių

galima matyti, kaip ilgalaikė hipokalcemija daro įtaką vitamino D sintezei, kad būtų intensyvinama kalcio ir fosforo rezorbcija iš žarnyno. Mastitu ir osteomaliacija sergančių karvių PTH daugis labai panašus, tačiau vitamino D kiekis skiriasi (atitinkamai 23,7 ir 33,97 nmol/l). Sergančių mastitu karvių kraujyje fosforo kiekis atitiko fiziologinę normą, o kalcio kiekis kinta neviršydamas žemutinės fiziologinės normos. Mūsų tyrimo rezultatai sutampa su M. R. Haussler ir kitų mokslininkų 1998 m. duomenimis, kurie rodo, kad vitamino D kiekis priklauso ir nuo kalcio ir nuo fosforo koncentracijos serume, tačiau, lyginant su PTH, ši sąveika gerokai silpnesnė. Mes tyrimais nustatėme, kad PTH neženkliai koreliuoja su kalcio ($r = 0,520$) ir fosforo ($r = 0,394$) kiekiu, o su vitamino D kiekiu koreliuoja ženkliai atvirkščiai (atitinkamai $r = -0,740$ ir $r = -0,823$).



2 pav. Parathormono ir kalcitonino kiekio kaita karvių grupėse (1 – veršingos telyčios, 2 – užtrūkusios veršingos karvės, 3 – melžiamos karvės, 4 – karvės, sergančios osteomaliacija, 5 – karvės, sergančios mastitu, 6 – karvės, sergančios pareze po veršiavimosi)



3 pav. **Vitamino D kiekio kaita karvių grupėse** (1 – veršingos telyčios, 2 – užtrūkusios veršingos karvės, 3 – melžiamos karvės, 4 – karvės, sergančios osteomaliacija, 5 – karvės, sergančios mastitu, 6 – karvės, sergančios pareze po veršiavimosi)

Išvados. 1. PTH sveikų karvių kraujyje kito nuo 3,47 iki 5,20 pmol/l, o sergančių karvių kraujyje – nuo 3,95 iki 15,21 pmol/l. Daugiausia PTH sąlyginai sveikų karvių grupėse nustatyta užtrūkusių veršingų karvių kraujyje, mažiausiai – melžiamų karvių kraujyje. Didžiausias ir statistiškai patikimas PTH kiekio padidėjimas nustatytas pareze po veršiavimosi sirgusių karvių kraujyje.

2. Visų trijų sergančių galvijų grupių kraujyje buvo sumažėję kalcio. Mažiausias kalcio ($1,52 \pm 0,09$ mmol/l) ir fosforo ($0,7 \pm 0,05$ mmol/l) kiekis nustatytas pareze po veršiavimosi sergančių karvių kraujyje. Fosforo ir magnio mažėja sergančių osteomaliacija karvių kraujyje.

3. Pareze po veršiavimosi ir osteomaliacija sergančių karvių kraujyje nustatyta daug vitamino D (atitinkamai 38,12 nmol/l ir 33,97 nmol/l). Jų kraujyje kalcio kiekis ženkliai atvirkščiai koreliuoja su PTH ($r = -0,999$) ir vitamino D kiekiu ($r = -0,940$). Kalcitonino kiekis visose karvių grupėse kito nuo 1,46 pmol/l iki 2,40 pmol/l ir statistiškai patikimai nesiskyrė.

Literatūra

1. Austin L., Heath H. Calcitonin; physiology and pathophysiology. *New Engl J Med.* 1981. 304. P. 269–278.
2. Brown E. M. Physiology of Calcium Homeostasis. In: *The Parathyroids*, Second Edition, J. P. Bilezikian, R. Marcus and A. Levine (eds.). 2001. 10. P. 167–182.
3. Bruder J. M., Guise T. A., Mundy G. R. Mineral Metabolism. In: *Endocrinology & Metabolism*, Fourth Edition P. Felig and L. A. Frohman (eds.). 2001. 22. P. 1079–1159.
4. Deftos L. J. *Clinical Essentials of Calcium and Skeletal Metabolism*. Professional Communication Inc, First Edition. 1998. P. 1–208.
5. Deftos L., Gagel R. Calcitonin and Medullary Thyroid Carcinoma In: *Cecil Textbook of Medicine*, Twentieth First Edition, J. B. Wyngarden and J. C. Bennett. 2000. 265. P. 1406–1409.
6. Drezner M. K. Phosphorus Homeostasis and Related Disorders. In: *Principles of Bone Biology*, Second Edition, J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan (eds.). 2002. 22. P. 321–338.
7. Favus M. J. Intestinal Absorption of Calcium, Magnesium, and Phosphorus. In: *Disorder of Bone and Mineral Metabolism*, F. L. Coe and M. J. Favus (eds.). 1992. 3. P. 57–82.
8. Goff J. P., Horst R. L. Effect of dietary potassium and sodium, but not calcium, on the incidence of milk fever in dairy cows. *J Dairy Sci.* 1997. 80. P. 176–184.
9. Hausler M. R., Whitfield G. K., Hausler C. A. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res.* 1998. 13. P. 325–349.
10. Malz C., Mayer C. New aspects on the pathogenesis and therapy of hypocalcemic parturient paresis. *Lohmann Information.* 1993. P. 9–13.
11. Potts J. T. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in calcium homeostasis, bone metabolism, and bone development: the proteins, their genes, and receptors. In: *Metabolic bone disease* Avioli L. V., Krane S. M. (eds), 3rd ed. New York, Academic Press. 1997. P. 1–51.
12. Rajala P. J., Grohn Y. T. Disease occurrence and risk factor analysis in Finnish Ayrshire cows. *Acta Vet Sc.* 1998. 39 (1). P. 1–13.
13. Scharla S. H. Prevalence of subclinical vitamin D deficiency in different European countries. *Osteoporos Int.* 1998, 8 (suppl. 2). P. 7–12.