

lennogo stada v kletochnyh batareyah firmy Big Dutchman / V. N. Haustov // Vestnik Altajskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2018. – № 8 (166). – S. 143-147.

5. Bessarabov, B.F. Kontrol i sohranenie estestvennoj rezistentnosti ptic v promyshlennom pticevodstve / B.F. Bessarabov, A.A. Krykanov,

A.A. Surkov, A.B. Bajdevlyatov. – Moskva: MVA, 1987. – 51 s.

6. Appleby M.C. (1984). Factors Affecting Floor Laying By Domestic Hens: A Review. *World's Poultry Science Journal*. 40 (3): 241-249. DOI: 10.1079/WPS19840019.

7. Lakin, G.F. Biometriya / G.F. Lakin. – Moskva: Vysshaya shkola, 1990. – 422 s.



УДК 619:616.98

DOI: 10.53083/1996-4277-2024-242-12-59-64

А.И. Леткин, А.С. Зенкин, В.В. Федоськин,
Д.Е. Явкин, Т.А. Батяева
A.I. Letkin, A.S. Zenkin, V.V. Fedoskin,
D.E. Yavkin, T.A. Batyayeva

ИЗУЧЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ ЗАВИСИМОСТИ ЦИТОКИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ ОТ ПЛОТНОСТИ ПОСАДКИ

STUDY OF THE CORRELATION DEPENDENCE OF SERUM CYTOKINES OF BROILER CHICKENS ON POULTRY DENSITY

Ключевые слова: бройлеры, цитокины, стресс, плотность посадки, корреляция, критерий Фишера.

Отражены результаты биохимических исследований сыворотки крови цыплят-бройлеров на фоне скученного напольного содержания. Плотность посадки цыплят при напольном содержании зависела от возраста птицы. До 10-суточного возраста плотность посадки для цыплят-бройлеров всех групп была одинаковой – 30 гол. на 1 м² площади пола. В дальнейшем, начиная с 11-суточного возраста, плотность посадки на 1 м² площади пола при содержании цыплят-бройлеров опытной группы увеличивали на 30% от аналогичного показателя контрольной птицы. В сыворотке крови бройлеров были выявлены следующие показатели цитокинового профиля: интерлейкин 1β (ИЛ-1β), интерлейкин 6 (ИЛ-6), фактор некроза опухолей (ФНО), интерлейкин 4 (ИЛ), интерлейкин 10 (ИЛ-10), трансформирующий фактор роста β1 (ТФР β1). Переуплотнение цыплят-бройлеров при напольном содержании приводит к активизации цитокинового профиля сыворотки крови. Полученные данные подвергнуты статистической обработке в виде расчетов корреляционной зависимости показателей цитокинового профиля сыворотки крови бройлеров от различных параметров площади посадки. Соотношение цитокинов за время наблюдения в течение 42 сут. завышено в сторону провоспалительных интерлейкинов ИЛ-1β, ИЛ-6 и фактора некроза опухолей ФНО. Уровни противовоспалительных цитокинов к 42-м сут. исследований снизились до минимальных значений. Статистическую обработку проводили по расчету F-критерия Фишера. Установлено, что

уровни интерлейкинов ИЛ-1β и ИЛ-6 у цыплят-бройлеров не зависят от плотности посадки. На показатели фактора некроза опухолей, интерлейкинов ИЛ-4 и ИЛ-10, а также трансформирующего фактора роста β1 плотность посадки оказывает существенное влияние. Результаты биохимических исследований на показатели цитокинового профиля цыплят-бройлеров являются важными диагностическими маркерами стресс-реакции и развития защитно-приспособительной реакции у сельскохозяйственной птицы.

Keywords: broilers, cytokines, stress, poultry density, correlation, F-test.

The findings of biochemical studies of blood serum of broiler chickens kept in crowded floor conditions are discussed. The stocking density of chickens kept on the floor depended on the age of the birds. Up to ten-day age, the stocking density for broiler chickens of all groups was the same - 30 birds per 1 square meter of floor area. Later, starting from the age of 11 days, the stocking density per 1 square meter in the trial group was increased by 30% of that index in the control group. The following cytokine profile indices were detected in the blood serum of broilers: interleukin 1β (IL-1β), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), interleukin 4 (IL-4), interleukin 10 (IL-10), and transforming growth factor β1 (TGF β1). Overcrowding of broiler chickens during floor housing leads to activation of the blood serum cytokine profile. The obtained data underwent statistical processing in the form of calculations of the correlation dependence of the indices of the cytokine profile of the blood serum of broilers regarding various param-

eters of the housing area. The cytokine ratio during the observation period of 42 days was overestimated in favor of proinflammatory interleukins IL-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor TNF. The levels of anti-inflammatory cytokines decreased to minimum values by the 42nd day of the study. Statistical processing was performed by using *F*-test. It was found that the levels of interleukins IL-1 β and

IL-6 in broiler chickens do not depend on the poultry density. The poultry density has a significant effect on the tumor necrosis factor, interleukins IL-4 and IL-10, and transforming growth factor β 1. The findings of biochemical studies on the cytokine profile of broiler chickens are important diagnostic markers of stress response and the development of a protective and adaptive response in poultry.

Леткин Александр Ильич, д.в.н., доцент, профессор, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва, г. Саранск, Российская Федерация, e-mail: vetagro2003@mail.ru.

Зенкин Александр Сергеевич, д.в.н., профессор, ст. науч. сотр., Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва, г. Саранск, Российская Федерация, e-mail: zenkin1950@mail.ru.

Федоськин Вадим Владимирович, аспирант, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва, г. Саранск, Российская Федерация, e-mail: vadikfedoskin@mail.ru.

Явкин Даниил Евгеньевич, аспирант, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва, г. Саранск, Российская Федерация, e-mail: d-yavkin@mail.ru.

Батяева Татьяна Александровна, к.п.н., доцент, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва, г. Саранск, Российская Федерация, e-mail: tabt2705@mail.ru.

Letkin Aleksandr Ilich, Dr. Vet. Sci., Prof., National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation, e-mail: vetagro2003@mail.ru.

Zenkin Aleksandr Sergeevich, Dr. Vet. Sci., Prof., Chief Researcher, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation, e-mail: zenkin1950@mail.ru.

Fedoskin Vadim Vladimirovich, post-graduate student, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation, e-mail: vadikfedoskin@mail.ru.

Yavkin Daniil Evgenevich, post-graduate student, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation, e-mail: d-yavkin@mail.ru.

Batyeva Tatyana Aleksandrovna, Cand. Pedagogic Sci., Assoc. Prof., National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation, e-mail: tabt2705@mail.ru.

Введение

Цитокины играют центральную роль в функционировании иммунной системы, обеспечивая сложное и многоуровневое взаимодействие между клетками. Основные функции цитокинов заключаются в регулировании клеточной активности, активизации или подавлении функций различных клеток иммунной системы, таких как Т-лимфоциты, В-лимфоциты и макрофаги; стимуляции воспалительной реакции [1].

Такие цитокины, как интерлейкин-15, поддерживают выживание памяти Т-лимфоцитов, что важно для долгосрочной иммунной памяти. Таким образом, цитокины представляют собой важнейшие инструменты межклеточного взаимодействия, которые регулируют иммунный ответ. Их баланс и уровень экспрессии могут оказать значительное влияние на здоровье животных и птицы [1, 7]. Провоспалительные цитокины, такие как интерлейкин-1 (ИЛ-1), интерлейкин-6 (ИЛ-6) и фактор некроза опухоли альфа (ФНО α), активируются в ответ на инфекцию или травму. Они способствуют привлечению иммунных клеток к месту воспаления и активной защите организма от патогенов. Однако, если их уро-

вень становится чрезмерно высоким или действие длится слишком долго, это может приводить к хроническому воспалению и повреждению здоровых тканей. Противовоспалительные цитокины, такие как интерлейкин-4 (ИЛ-4), интерлейкин-10 (ИЛ-10) и трансформирующий фактор роста бета (ТФР β), действуют как регуляторы, способствующие снижению воспалительных процессов. Они помогают в восстановлении тканей и уменьшении реакции иммунной системы [8]. Данные обстоятельства подчеркивают важность дальнейших исследований в области цитокиновой медиаторной системы для разработки новых терапевтических стратегий.

Стрессы технологического происхождения у животных и птицы сопровождаются нарушением выработки показателей цитокинового профиля. Особенно выражено это проявляется при скученном выращивании сельскохозяйственной птицы, а именно, цыплят-бройлеров [9]. Для диагностики стрессового состояния у птиц используются различные методики и подходы. Они обладают определенными особенностями, которые актуализируют различные подходы к диагностике стрессов у птицы с учетом этиологии

стресс-фактора и особенностей их биологического развития [8].

Морфобиохимическая интерпретация полученных результатов лабораторных исследований не может в полной мере считаться важным диагностическим критерием стресс-реакции, поэтому целесообразно проводить оценку корреляционной зависимости по различным статистическим критериям [2, 3, 10].

Цель исследований: изучение цитокинового профиля сыворотки крови цыплят-бройлеров на фоне переуплотнённого содержания и расчет корреляционной зависимости по значениям критерия Стьюдента и *F*-критерия Фишера.

Объект и методы исследования

Объект исследования – цыплята-бройлеры кросса СООВ-700 в возрасте до 42 сут. При этом использованы клинические, лабораторные птицы. Статистическую обработку результатов проводили по оценке критериев Стьюдента и Фишера.

Экспериментальная часть

Исследования выполнены в рамках гранта Российского научного фонда № 23-26-00034 «Диагностика стрессочувствительности сельскохозяйственной птицы по результатам комплексной оценки цитокинов органов-мишеней» на цыплятах-бройлерах кросса СОВВ-700 в виварии кафедры морфологии, физиологии и ветеринарной патологии ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева». Поголовье цыплят-бройлеров в возрасте 1-2 сут. содержали напольно в течение 42 сут. Технологический стресс моделировали путем создания условий скученного содержания бройлеров. До 10-суточного возраста плотность посадки для цыплят-бройлеров опытной и контрольной групп была одинаковой – 30 гол. на 1 м² площади пола. В дальнейшем, начиная с 11-суточного возраста, плотность посадки на 1 м² площади пола при содержании цыплят-бройлеров опытной группы увеличивали на 30% от аналогичного показателя контрольной птицы. Кормление цыплят осуществляли полнорационными комбикормами серии ПК-5.

Кровь для получения сыворотки и дальнейших биохимических исследований отбирали на 2-е, 20-е и 42-е сут. от начала опытов. Цитокины в сыворотке крови бройлеров определяли, ис-

пользуя ИФА-анализ с набором реактивов ООО «Вектор-Бест-Волга», а также метод электрохемилюминесцентного анализа (ЭХЛА). Количественные значения показателей цитокинового профиля у цыплят-бройлеров при скученном напольном содержании представлены в таблице 1.

Таблица 1

Содержание цитокинов в сыворотке крови цыплят-бройлеров при разной плотности посадки

Виды цитокинов, пг/мл	Группы цыплят-бройлеров	
	опыт	контроль
В начале опыта		
ИЛ-1β	45,85+3,48	46,27+2,34
ИЛ-6	1,58+0,17	1,61+0,56
ФНО	2,09+0,11	2,14+0,05
ИЛ-4	5,42+0,25	4,97+0,89
ИЛ-10	0,69+0,05	0,81+0,06
ТФР	36,43+3,47	33,27+2,56
Через 20 сут. от начала опыта		
ИЛ-1β	53,23+3,14	45,17+2,44
ИЛ-6	1,68+0,67	1,55+0,08
ФНО	4,73+0,94	2,99+0,87
ИЛ-4	2,27+0,44*	5,17+1,13
ИЛ-10	0,23+0,02*	1,43+0,11
ТФР	26,15+3,17**	42,17+1,86
Через 42 сут. от начала опыта		
ИЛ-1β	61,05+4,41*	46,89+4,12
ИЛ-6	2,30+0,09**	1,85+0,08
ФНО	4,75+1,04	3,01+0,23
ИЛ-4	1,87+0,24*	5,25+0,76
ИЛ-10	0,12+0,01**	1,33+0,22
ТФР	18,33+3,69**	43,08+2,71

Примечание. Случаи достоверных отклонений *при $P \leq 0,05$, **при $P \leq 0,01$.

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что переуплотнение цыплят-бройлеров при напольном содержании сопровождается активизацией цитокинового профиля сыворотки крови. При этом уровни провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у опытных и контрольных цыплят-бройлеров изменяются разнонаправленно.

Дальнейшая статистическая обработка проводилась с целью выявления зависимости полученных результатов исследования от плотности посадки бройлеров. Оценка корреляционной зависимости с использованием *F*-критерия Фишера проводили для проверки значимости регрессионной модели. Критерий Фишера, основанный на сравнении вариаций между группами и внутри групп, вычисляется как отношение дис-

персии, объясненной моделью (межгрупповая дисперсия), к дисперсии, которую не может объяснить модель (внутригрупповая дисперсия). Принято находить отношение большей дисперсии к меньшей:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \text{ при условии, что } s_1^2 \geq s_2^2,$$

где s_1 – среднее квадратическое отклонение в опытной группе;

s_2 – в контрольной группе [6, 9, 11].

Проверка гипотез с помощью критерия Фишера часто применяется в исследованиях, связанных с влиянием различных условий на физиологические показатели животных и людей, в биологии и медицине [12].

В исследовании количество цыплят-бройлеров в каждой группе равно 30 ($n_1 = n_2 = 30$), число степеней свободы: $k_1 = k_2 = 29$. В таблице 2 представлены значения дисперсий для опытной и контрольной групп после 42 дней опыта и соответствующее им дисперсионное отношение F (оно округлено до сотых).

В таблице 3 сравниваются табличные значения F_{st} -критерия Фишера и значение F , полученное в исследовании. Для $k_1 = k_2 = 29$ табличные значения равны $F_{0,05} = 1,83$; $F_{0,01} = 2,41$ [2, 3].

Нулевая гипотеза (H_0) указывает на то, что между исследуемыми переменными нет статистически значимой зависимости. В нашем случае, это означает, что уровень цитокинов в сыворотке крови не зависит от плотности посадки цыплят-бройлеров. H_0 принимается (зависимость отсутствует), если полученное в исследовании значение F меньше табличного значения F_{st} ($F < F_{st}$). В противном случае, когда $F \geq F_{st}$, нулевая гипотеза отвергается (показатели зависимости) [4, 5].

Согласно альтернативной гипотезе (H_1), предполагается наличие зависимости между показателями цитокинового профиля и площадью пола на 1 птицу. Это значит, что изменение плотности посадки влияет на уровень цитокинов в сыворотке.

Таблица 2

Расчет дисперсионного отношения F для критерия Фишера

Виды цитокинов, пг/мл	Опыт		Контроль		Дисперсионное отношение F
	s_1	s_1^2	s_2	s_2^2	
ИЛ-1β	4,41	19,4481	4,12	16,9744	1,15
ИЛ-6	0,09	0,0081	0,08	0,0064	1,27
ФНО	1,04	1,0816	0,23	0,0529	20,45
ИЛ-4	0,24	0,0576	0,76	0,5776	10,03
ИЛ-10	0,01	0,0001	0,22	0,0484	484
ТФР β1	3,69	13,6161	2,71	7,3441	1,85

Таблица 3

Сравнение значений F -критерия Фишера при различных уровнях значимости

Виды цитокинов, пг/мл	Полученное значение F -критерия Фишера	Сравнение значений	Вывод
ИЛ-1β	1,15	1,15 < 1,83	Зависимость отсутствует
ИЛ-6	1,27	1,27 < 1,83	Зависимость отсутствует
ФНО	20,45	20,45 > 2,41	Показатели зависимы*
ИЛ-4	10,03	10,03 > 2,41	Показатели зависимы*
ИЛ-10	484	484 > 2,41	Показатели зависимы*
ТФР	1,85	1,85 > 1,83	Показатели зависимы**

Примечание. * H_0 – гипотеза опровергается на 1%-ном уровне значимости; ** H_0 – гипотеза опровергается на 5%-ном уровне значимости.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о развитии стресс-реакции у цыплят-бройлеров на фоне переуплотненного со-

держания. Соотношение цитокинов за время наблюдения в течение 42 сут. завышено в сторону провоспалительных интерлейкинов ИЛ-1β,

ИЛ-6 и ФНО. Уровни противовоспалительных цитокинов к 42-м сут. исследований снизились до минимальных значений.

Выявленные уровни интерлейкинов ИЛ-1 β и ИЛ-6 у цыплят-бройлеров не зависят от плотности посадки. На показатели фактора некроза опухолей, интерлейкинов ИЛ-4 и ИЛ-10, а также трансформирующего фактора роста β 1 плотность посадки оказывает существенное влияние. Кроме того, результаты биохимических исследований показателей цитокинового профиля цыплят-бройлеров являются важными диагностическими маркерами стресс-реакции и развития защитно-приспособительной реакции у сельскохозяйственной птицы.

Выводы

1. Скученное содержание цыплят-бройлеров приводит к стресс-реакции в виде активизации показателей цитокинового профиля.

2. При скученном содержании цыплят-бройлеров к концу опыта уровень провоспалительных цитокинов повышался, а противовоспалительных цитокинов – резко снижался.

3. От плотности посадки цыплят-бройлеров не зависят уровни интерлейкинов ИЛ-1 β и ИЛ-6. Существенно влияет плотность посадки на фактор некроза опухолей, интерлейкинов ИЛ-4 и ИЛ-10, а также трансформирующего фактора роста β 1.

Библиографический список

1. Боровска, Д. Платформа на основе высокоплотной количественной ПЦР для оценки иммунных реакций цыплят Бейли / Д. Боровска, Р. А. Куо, К. А. Уотсон [и др.]. – Текст: электронный // PLoS ONE. – 2019. – № 14 (12). – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225658>.

2. Гребенникова, И. В. Методы математической обработки экспериментальных данных. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2015. – 124 с. – Текст: непосредственный.

3. Закс, Л. Статистическое оценивание / Л. Закс; перевод с немецкого В. Н. Варыгина; под редакцией Ю. П. Адлера, В. Г. Горского. – Москва: Статистика, 1976. – 598 с. – Текст: непосредственный.

4. Ильин, В.П. Методические особенности применения статистических непараметрических методов в анализе медико-биологических данных / В. П. Ильин. – Текст: непосредственный //

Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – № 5 (81). – С. 157-160.

5. Влияние препаратов-эрготропиков на качественные показатели инкубационных яиц и вывод цыплят / Л. В. Клетикова, М. А. Щербинина, Н. В. Кокурина, Н. Н. Якименко. – DOI 10.30917/АТТ-ВК-1814-9588-2024-1-11. – Текст: непосредственный // Ветеринария и кормление. – 2024. – № 1. – С. 53-56.

6. Лакин, Г. Ф. Биометрия: учебное пособие / Г. Ф. Лакин. – Москва: Высшая школа, 1990. – 352 с. – Текст: непосредственный.

7. Провоспалительные цитокины у кур-несушек при развитии технологического стресса / А. И. Леткин, А. С. Зенкин, В. В. Федоськин, Д. Е. Явкин. – Текст: непосредственный // Аграрный вестник Верхневолжья. – 2024. – № 1. – С. 62-67.

8. Циркадианные ритмы цитокинов / О. А. Радаева, Ю. А. Костина, Г. А. Солодовникова [и др.]. – DOI 10.17513/spno.32778. – Текст: непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2023. – № 4. – С. 144.

9. Сайфутдинова, Л. Н. Оценка биологических связей кортикостерона и кортизола в организме кур при стресс-реакции / Л. Н. Сайфутдинова, М. А. Дерхо. – DOI 10.31588/2413-4201-1883-246-2-187-193. – Текст: непосредственный // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – 2021. – Т. 246, № 2. – С. 187-193.

10. Халафян, А. А. Statistica 6. Статистический анализ данных: учебник / А. А. Халафян. – 3-е изд. – Москва: БиномПресс, 2008. – 512 с. – Текст: непосредственный.

11. Gomes, M., Guillou, A. (2015). Extreme Value Theory and Statistics of Univariate Extremes: A Review. *International Statistical Review*. 83. DOI: 10.1111/insr.12058.

12. Young, M. R., Matthews, J. P., Kanabrocki, et al. (1995). Circadian rhythmometry of serum interleukin-2, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in men. *Chronobiology International*, 12 (1), 19–27. <https://doi.org/10.3109/07420529509064496>.

References

1. Borovska, D. Platforma na osnovе vysokoplotnoj kolichestvennoj PCR dlya ocenki immunnyh reakcij cyplyat Bejli / Borovska D., Kuo R.A., Uotson K.A., Kajzer P., Vervelde L. // PLoS ONE,

2019. 14 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225658>.

2. Grebennikova, I.V. *Metody matematicheskoy obrabotki eksperimentalnykh dannykh.* – Ekaterinburg: Izd-vo Ural. un-ta, 2015. – 124 s.

3. Zaks, L. *Statisticheskoe ocenivanie.* Per. s nem. V.N. Varygina / pod red. Yu.P. Adlera, V.G. Gorskogo. – Moskva: Statistika, 1976. – 598 s.

4. Ilin, V.P. *Metodicheskie osobennosti primeniya statisticheskikh neparametricheskikh metodov v analize mediko-biologicheskikh dannykh* // *Byull. VSNC SO RAMN.* – 2011. – No. 5 (81). – S. 157-160.

5. Kletikova, L.V. *Vliyanie preparatov-ergotropikov na kachestvennyye pokazateli inkubatsionnykh yaic i vyvod cyplyat* / L.V. Kletikova, M.A. Shcherbinina, N.V. Kokurina, N.N. Yakimenko // *Veterinariya i kormlenie.* – 2024. – No. 1. – S. 53-56. – DOI 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2024-1-11.

6. Lakin, G.F. *Biometriya: ucheb. posobie.* – Moskva: Vyssh. shk., 1990. – 352 s.

7. Letkin, A.I. *Provospalitelnye citokiny u kur-nesushek pri razvitii tekhnologicheskogo stressa* / A.I. Letkin, A.S. Zenkin, V.V. Fedoskin, D.E. Yavkin // *Agrarnyj vestnik Verhnevolzhya.* – 2024. – No. 1. – S. 62-67.

8. Radaeva, O.A. *Cirkadiannye ritmy citokinov* / O.A. Radaeva, Yu.A. Kostina, G.A. Solodovnikova i dr. // *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya.* – 2023. – No. 4. – S. 144. – DOI 10.17513/spno.32778.

9. Sajfutdinova L.N., Derho M.A. *Ocenka biologicheskikh svyazey kortikosterona i kortizola v organizme kur pri stress-reakcii* // *Uchenye zapiski Kazanskoj gosudarstvennoj akademii veterinarnoj mediciny im. N.E. Baumana.* – 2021. – T. 246, No. 2. – S. 187-193. – DOI 10.31588/2413-4201-1883-246-2-187-193.

10. Halafyan, A.A. *Statistica 6. Statisticheskij analiz dannykh.* 3-e izd. Uchebnik. – Moskva: BionomPress, 2008. – 512 s.

11. Gomes, M., Guillou, A. (2015). *Extreme Value Theory and Statistics of Univariate Extremes: A Review.* *International Statistical Review.* 83. DOI: 10.1111/insr.12058.

12. Young, M. R., Matthews, J. P., Kanabrocki, et al. (1995). *Circadian rhythmometry of serum interleukin-2, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in men.* *Chronobiology International,* 12 (1), 19–27. <https://doi.org/10.3109/07420529509064496>.

