

Predviđanje rizika od subkliničke ketoze u mliječnih krava na temelju metaboličkih pokazatelja i sastava mlijeka

Crnjak, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:958449>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**PREDVIĐANJE RIZIKA OD SUBKLINIČKE
KETOZE U MLIJEČNIH KRAVA NA TEMELJU
METABOLIČKIH POKAZATELJA I SASTAVA
MLIJEKA**

DIPLOMSKI RAD

Petra Crnjak

Zagreb, rujan, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Hranidba životinja i hrana

**PREDVIĐANJE RIZIKA OD SUBKLINIČKE
KETOZE U MLIJEČNIH KRAVA NA TEMELJU
METABOLIČKIH POKAZATELJA I SASTAVA
MLIJEKA**

DIPLOMSKI RAD

Petra Crnjak

Mentor:

Prof. dr. sc. Krešimir Salajpal

Zagreb, rujan, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Petra Crnjak**, JMBAG 0178121329, rođena 18.11.2000. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**PREDVIĐANJE RIZIKA OD SUBKLINIČKE KETOZE U MLIJEČNIH KRAVA NA
TEMELJU METABOLIČKIH POKAZATELJA I SASTAVA MLIJEKA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studenta/ice **Petra Crnjak**, JMBAG 0178121329, naslova

**PREDVIĐANJE RIZIKA OD SUBKLINIČKE KETOZE U MLIJEČNIH KRAVA NA
TEMELJU METABOLIČKIH POKAZATELJA I SASTAVA MLIJEKA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana
_____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. prof. dr. sc. Krešimir Salajpal mentor

2. prof.dr.sc. Goran Kiš član

3. prof.dr.sc. Antun Kostelić član

Zahvala

Zahvaljujem svom ocu, koji mi je uvijek bio podrška i koji mi je prenio ljubav prema govedarstvu i zahvaljujem mojem mentoru prof. dr. sc. Krešimiru Salajpalu koji mi je pomogao u pisanju ovog diplomskog rada.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Patofiziološka osnova ketoze	2
2.1. Ketonska tijela	2
2.2. Ketogeneza	5
2.2.1. Ketogeneza u ostalim tkivima	9
2.3. Ketoliza.....	9
2.4. Glukoneogeneza	11
2.4.1. Glukoneogeni prekursori.....	13
3. Negativna energetska ravnoteža – hormonska regulacija	14
4. Ketoza.....	19
4.1. Primarna ketoza - Tip I	20
4.2. Sekundarna ketoza - Tip II	21
4.3. Alimentarna ketoza	22
4.4. Sindrom masne jetre	24
4.5. Klinička slika ketoze	26
4.6. Rizični faktori za nastanak subkliničke ketoze	27
4.7. Utjecaj ketoze na komponente mlijeka	28
5. Dijagnosticiranje ketoze	29
5.1. Brzi test za ketozu - <i>Cow-side tests</i>	29
5.2. Testiranje urina na ketozu	30
5.3. Testiranje mlijeka na ketozu	30
5.4. Testiranje krvi na ketozu.....	32
5.5. Ostali načini testiranja	33
5.6. Laboratorijske metode	34
5.6.1. Baze podataka metabolomike i bioinformatički alati za metabolomiku. 35	

6. Liječenje ketoze	37
7. Prevencija ketoze.....	40
8. Zaključak.....	44
9. Popis literature	45
Životopis	50

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Petre Crnjak**, naslova

PREDVIĐANJE RIZIKA OD SUBKLINIČKE KETOZE U MLIJEČNIH KRAVA NA TEMELJU METABOLIČKIH POKAZATELJA I SASTAVA MLIJEKA

Ketoza je metabolički poremećaj koji se javlja u periodu neposredno poslije telenja, a najčešće zahvaća visoko proizvodne krave. U radu je opisana ketogeneza i ketoliza, odnosno sinteza i trošenje ketonskih tijela (acetoacetata, β -3-hidroksibutirata i acetona), kao i kontrola ketogeneze na koju utječu hormoni inzulin i glukagon. S obzirom na prisutnost kliničkih znakova ketoza se pojavljuje u subkliničkom ili kliničkom obliku. Nadalje, s obzirom na etiopatogenezu, ketoza se još dijeli na tip I i tip II koji imaju zajednički uzrok, negativnu energetska ravnotežu, ali imaju drugačiji put nastanka. Ketoza se može dijagnosticirati brzim testovima, koji određuju koncentraciju ketonskih tijela u krvi, mlijeku i urinu ili pak laboratorijskim metodama. Prevencija ketoze se temelji na postizanju optimalne kondicije u suhostaju ali i davanju prekursora glukoze u obroku kravama u ranoj laktaciji.

Prolazno povećanje sadržaja mliječne masti u mlijeku kao i promjena omjera sadržaja masti i proteina u mlijeku, te prisutnost povećane razine 3BH u krvi rani su pokazatelji promjena u energetska metabolizmu krave, dok prisutnost ketonskih tijela u tjelesnim izlučevinama (mlijeko, urin) ukazuju na već uznapredovali stadij navedenih metaboličkih poremećaja.

Ključne riječi: ketoza, ketonska tijela, prevencija, rana dijagnostika

Summary

Of the master's thesis – student **Petra Crnjak**, entitled

PREDICTION OF SUBCLINICAL KETOSIS RISK IN DAIRY COWS BASED ON METABOLIC INDICATORS AND MILK COMPOSITION

Ketosis is a metabolic disorder that occurs in the period immediately after calving and most often affects highly productive dairy cows. The paper describes ketogenesis and ketolysis, the synthesis and utilization of ketone bodies (acetoacetate, β -3-hydroxybutyrate, and acetone), as well as the control of ketogenesis influenced by the hormones insulin and glucagon. According to clinical signs, ketosis manifests as subclinical or clinical ketosis, and it is further divided into Type I and Type II, which share a common cause, negative energy balance, but have different pathophysiological pathways. Ketosis can be diagnosed through rapid tests that determine the concentration of ketone bodies in blood, milk, and urine, and it can also be diagnosed using laboratory methods.

The prevention of ketosis is based on achieving optimal condition in dryness, but also on giving glucose precursors in the diet to cows in early lactation. A transient increase in the milk fat content as well as a change in the ratio of fat and protein content in milk and the presence of an increased level of 3BH in the blood are early indicators of changes in the cow's energy metabolism, while the presence of ketone bodies in body secrets (milk, urine) indicate an already advanced stage of the mentioned metabolic disorders.

Keywords: ketosis, ketone bodies, prevention, early diagnosis

1. Uvod

Ketoza mliječnih krava je metabolička bolest koja se javlja kod visoko mliječnih krava u ranoj laktaciji kao rezultat nedovoljnog unosa hranjivih tvari pri čemu dolazi do mobilizacije tjelesnih masti kako bi se zadovoljile potrebe za energijom. Pri tome velika količina masnih kiselina dolazi u jetru koje se tamo metaboliziraju do ketonskih tijela. Stoga bolest karakterizira porast razine ketonskih tijela kao i drugih metaboličkih pokazatelja u krvi te pokazatelja funkcije jetre što se odražava i na promjene u sastavu mlijeka i tjelesnih tekućina. Bolest se češće javlja u subkliničkom obliku, a zahvaćeno može biti do 30% jedinki u stadu.

Subkliničku ketozu karakterizira odsutnost vidljivih i jasnih simptoma, pa se prema tome teže primjećuje i često se kasno započinje s liječenjem, ali i ostavlja posljedice u nadolazećim laktacijama.

Ketoza je općenito poremećaj koji se treba pratiti kroz cijelo razdoblje tranzicije, mjereći koncentraciju ketonskih tijela u organizmu, jer je to najbolji način da se njezina pojava spriječi ili ublaži. Preventiva se temelji na dobrom menadžmentu hranidbe, smještaja, reprodukcije i stresa. Iako ovaj poremećaj nije od jučer i poznati su uzroci i greške koje dovode do ketoze, ketoza se ipak javlja i njezina prisutnost u nekim stadima je stalna. Kao najvažnije posljedice njezine prisutnosti u stadu javlja se pad proizvodnje mlijeka ali i povećanje rizika od pojave drugih bolesti.

Cilj rada je dati pregled promjena u metabolizmu krave u ranoj laktaciji koji mogu dovesti do pojave ketoze te definirati pokazatelje u krvi i mlijeku koji mogu poslužiti za ranu procjenu rizika od pojave subkliničkih oblika ketoze.

2. Patofiziološka osnova ketoze

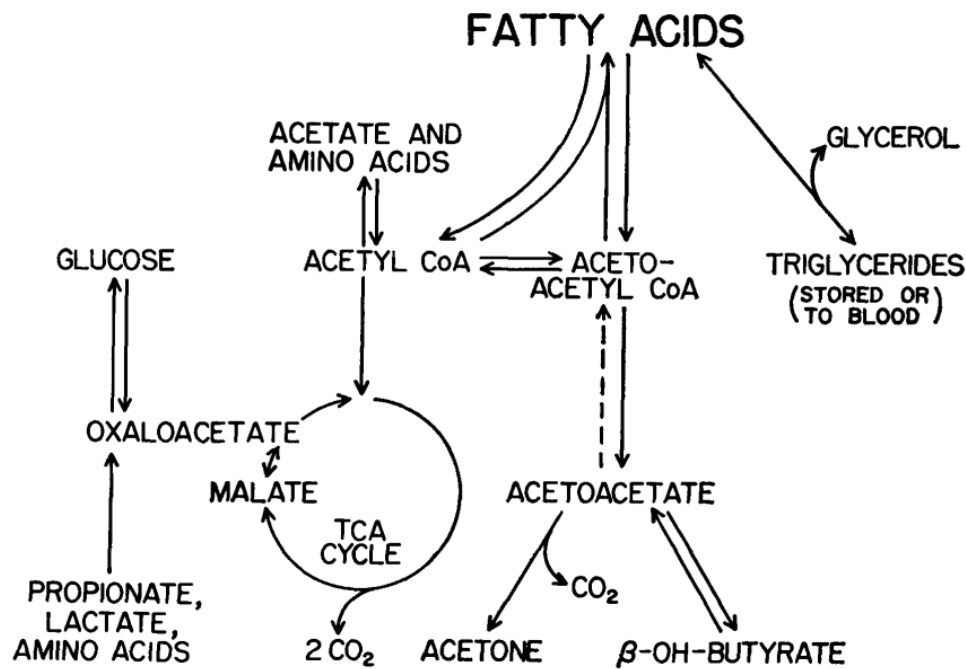
2.1. Ketonska tijela

Tranzicijsko razdoblje ili tranzicija je vrlo često spominjan pojam u mliječnom govedarstvu. Ona predstavlja prijelaz, odnosno period od tri tjedna prije i nakon telenja. Ovo razdoblje započinje još u suhostaju stoga je pod velikim utjecajem hranidbe i uvjete držanja u tom periodu. Postupak zasušenja obično započinje 60 dana prije očekivanog poroda, a postupci tijekom tog perioda uvelike ovise o zdravlju krave i njezinoj kondiciji. Uobičajeno, suhostaj dijelimo na pravi suhostaj (*far dry off*) i pripremu za telenje (*close up*). Razdoblje nakon telenja naziva se i ulazak u laktaciju i traje tri tjedna. Nakon dugog perioda laktacije krava u kratkom vremenskom razdoblju prolazi kroz niz fizioloških promjena koje uvelike određuju mogućnost konzumacije hrane, a samim time i količinu unjetih hranjivih tvari potrebnih za sintezu mlijeka i druge potrebe organizma. Uobičajeno, smanjena je konzumacija hrane tijekom suhostaja i ona se nastoji povećati u ranoj laktaciji kako bi se podmirile potrebe krava na hranjivim tvarima potrebnim za povećanu sintezu mlijeka u tom razdoblju. U praktičnom smislu to predstavlja prelazak s obroka bogatog voluminoznom hranom, nešto nižeg sadržaja energije, na obrok bogat koncentriranim krmivima. Navedeno ima za posljedicu i promjenu strukture mikropopulacije u buragu (Duffield, 2000).

Navedeno razdoblje (tranzicija) je dakle razdoblje kojem treba posvetiti pažnju jer pogreške u hranidbi i menadžmentu u tom razdoblju dovode do većeg broja metaboličkih poremećaja i bolesti, a jedna od njih je ketoza. Ketoza je relativno čest poremećaj mijene tvari ili tzv. metabolički poremećaj koji obilježava povišena razina ketonskih tijela u krvi, mokraći i mlijeku.

Ketonska tijela su skupina spojeva koja uključuje acetoacetat (AcAc), 3- β -hidroksibutirat (3BH) i aceton. Četvrta komponenta, izopropanol, detektiran je u buragu, ali njegova važnost trenutno nije poznata. Slika 2.1.1. prikazuje da ta ketonska tijela nastaju iz acetoacetyl CoA, koji je normalni međuprodukt u oksidaciji masnih kiselina, ali se također lako stvara i iz acetyl CoA. Tijekom ketoze, jetra je primarni organ koji proizvodi ketonska tijela, ali jednom formirana ketonska tijela više se ne mogu razgraditi u jetri do acetoacetyl CoA i to zato što jetra ne posjeduje za to potrebni enzimski sustav. Acetoacetat je ketonsko tijelo iz kojeg nastaju 3BH i aceton, konverzijom. Veliki dio AcAc reducira se do 3BH pomoću enzima 3- β -hidroksibutirat dehidrogenaze. Ta reakcija je reverzibilna i te dvije komponente su međusobno pretvorive. AcAc je nestabilna komponenta i formira aceton i CO₂ ireverzibilno i neenzimatski, otprilike 5% po satu pri tjelesnoj temperaturi. Međutim, aceton se slabo iskorištava i od male je važnosti za životinju osim ako ketoza nije teška i dugotrajna. On je hlapljiv i ima karakterističan miris. Prekursori ketonskih tijela su u principu slobodne masne kiseline (SMK) sa dužinom ugljikovog lanca od 16 do 18 C atoma, koje su mobilizirane iz tjelesne rezerve. Masne kiseline kratkog lanca porijeklom iz hrane sa parnim brojem C atoma (4-10) mogu također u određenoj mjeri

poslužiti kao prekursori u sintezi ketonskih tijela. To je prvenstveno maslačna kiselina (4C) koja je glavna kiselina u ovoj skupini. Propionska kiselina (3C) je jedina glukoneogena masna kiselina porijeklom iz probavnog sustava, a osim nje važne glukoneogene komponente za preživače predstavljaju i neke aminokiseline. S druge pak strane aminokiseline tirozin, izoleucin, fenilalanin i leucin mogu biti prekursori za sintezu ketonska tijela (Bergman, 1971).



Slika 2.1.1. Glavni put stvaranja ketonskih tijela
Izvor: (Bergman, 1971).

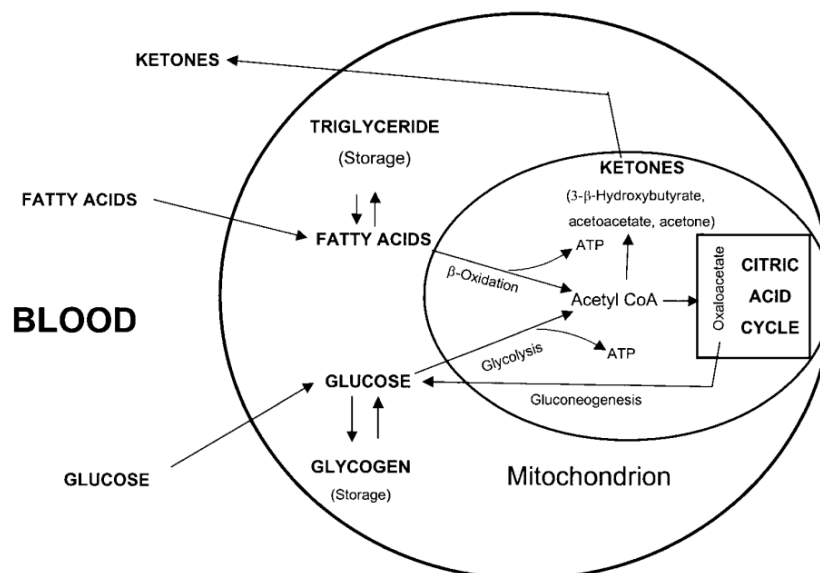
Ketonska tijela su slobodno topljivi, cirkulirajući lipidi. Mogu se ukloniti iz krvi i koristiti u većini aerobnih tkiva (npr. mišići, mozak, bubrezi, mliječna žlijezda, tanko crijevo i fetalna jetra), ali ih ne može oksidirati jetra u kojoj se proizvode. Acetoacetat se akumulira tijekom metabolizma masnih kiselina pri niskim koncentracijama ugljikohidrata. 3HB se formira redukcijom AcAc u mitohondrijima. Ova dva dominantna ketonska tijela bogata su energijom, koja transportiraju energiju od jetre do drugih tkiva. Tijekom razdoblja nedostatka glukoze, ketonska tijela igraju ključnu ulogu u štednji potrošnje glukoze i smanjenju proteolize. Za razliku od većine drugih tkiva, mozak ne može koristiti masne kiseline kao izvor energije kada razina glukoze u krvi postane niska. U tom slučaju, ketonska tijela pružaju mozgu alternativni izvor energije, pokrivajući gotovo $\frac{2}{3}$ potreba mozga za energijom tijekom razdoblja dugotrajnog gladovanja. Ketonska tijela važan su supstrat za biosintezu kompleksnih lipida kod fetusa i novorođenčadi (Laffel, 1999).

Oko samog termina „ketonska tijela“ postoji nekoliko nelogičnosti. U osnovi navedeni spojevi nisu "tijela", a 3BH nije keton (opća formula R_1-CO-R_2). U krvi postoji nekoliko ketona, koji se ne nazivaju ketonskim tijelima (npr. piruvat i fruktoza). Naziv keton ovim je spojevima dat prije više od 100 godina od strane njemačkih liječnika koji su otkrili da urin dijabetičnih pacijenata daje pozitivan rezultat s reagensima koji se koriste za otkrivanje ketona. U tim okolnostima, AcAc i aceton (CH_3COCH_3 ; propanon) pridonijeli su reakciji, ali ne i 3BH. Aceton, koji je metabolički inertan, nastaje spontanom dekarboksilacijom AcAc-a i može se otkriti samo kada je koncentracija visoka (Engelking, 2015).

Ketonska tijela, acetoacetat (AcAc), 3BH i aceton, su supstrati koji nose energiju, a prvenstveno se sintetiziraju u mitohondrijima jetre i buraga te služe kao metabolička goriva za stanično disanje u ekstrahepatičkim tkivima. Iako se ketoni mogu sintetizirati iz aminokiselina, masne kiseline predstavljaju daleko najveći izvor ketona u većini metaboličkih situacija. Ketoni su molekule topive u vodi koje se sastoje od dvije R-skupine vezane na karboksilnu skupinu ($C=O$). Od tri ketonska tijela, AcAc i 3HB se uglavnom nalaze u svom kiselom, deprotoniranom stanju, pri fiziološkom pH ($pK_a = 3.6$ i 4.7 , redom). Budući da aceton nema ionizirajući vodikov atom, on je neutralna molekula, bez kiselosti kako navode Rico i Barrientos-Blanco (2024).

2.2. Ketogeneza

Metabolizam ketonskih tijela uključuje ketogenezu i ketolizu. Ove biokemijske reakcije omogućuju dobivanje energije iz masnog tkiva te osiguravaju drugim organima dostupan izvor energije (mozak, srce, bubrezi) u uvjetima nedostatka glukoze (gladovanje). To se odvija u slučajevima kada nema dostupnih izvora glukoze (ugljikohidrata) ili kada oni ne mogu biti efikasno korišteni (Laffel 1999). Korak koji generira tok u formiranju ketonskih tijela je obično lipoliza triglicerida u adipocitima, a fiziološki put obuhvaća više od jednog tkiva i uključuje adipocite, krv i jetru. Slobodne masne kiseline (SMK) u jetri prvo bivaju aktivirane kroz acetil CoA formu, zatim se transportiraju u mitohondrije pomoću karnitina, što je prikazano na slici 2.2.1. Nakon β oksidacije, konverzija u ketonska tijela zahtjeva još četiri koraka.



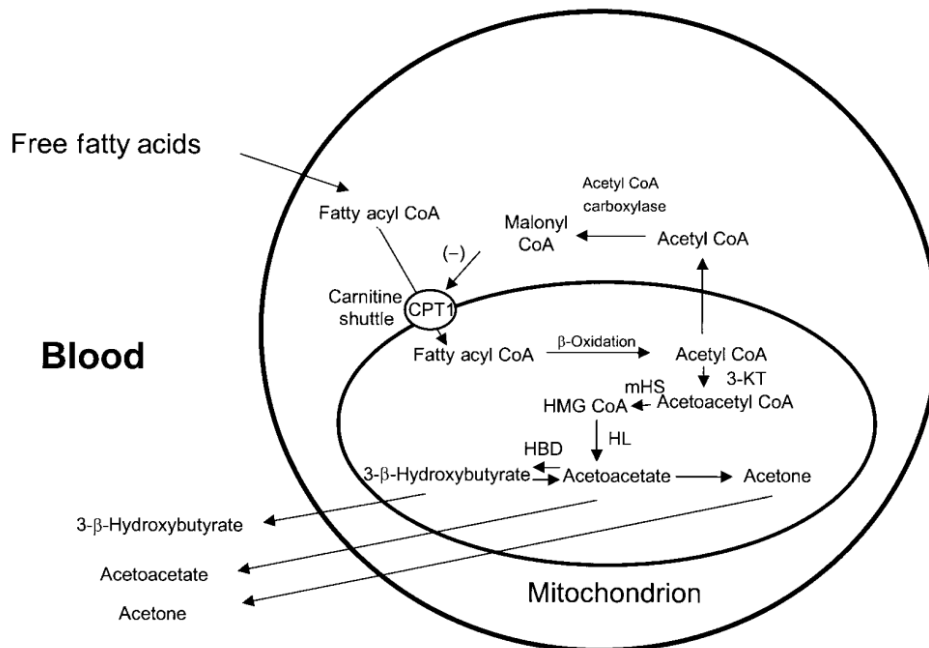
Slika 2.2.1. Proces stvaranja energije

Veza između glukoze i metabolizma masnih kiselina je formiranje ketonskih tijela u hepatocitima. Glukoza i masne kiseline metaboliziraju se do acetil CoA, koji ulazi u ciklus limunske kiseline i spaja se s oksaloacetatom. Glikoliza proizvodi piruvat, koji je prekursor oksaloacetata. Ako glikoliza više ne može u dovoljnoj mjeri proizvoditi piruvat, oksaloacetat ulazi u proces glukoneogeneze, u tom slučaju oksaloacetat nije dostupan za spajanje s acetil CoA proizvedenog iz masnih kiselina i acetil CoA biva preusmjeren iz CLK u formiranje ketonskih tijela.

Izvor: Laffel 1999

Ketogeneza je proces putem kojeg su masne kiseline transformirane u AcAc i 3BH. Ovaj proces odvija se u mitohondrijima hepatocita i on je određen s nekoliko faktora. Oslobođanje masnih kiselina u masnom tkivu stimulirano je epinefrinom i glukagonom, a inhibirano od strane inzulina. Acetil CoA je poveznica s CLK, a nastaje glikolizom iz glukoze ili β -oksidacijom masnih kiselina. Da bi ušao u CLK acetil CoA prvo se mora povezati s oksaloacetatom, koji nastaje iz piruvata dobivenog glikolizom. Esencijalno je imati kontinuiranu glikolizu kako bi se osigurala dovoljna

količina oksaloacetata koji se povezuje s acetil CoA. U slučaju kada glikoliza nije stalna, oksaloacetat ulazi u proces glukoneogeneze, umjesto u CLK. U tom slučaju acetil CoA se pretvara u ketonska tijela kao što je prikazano u slici 2.2.1. (Laffel, 1999). Proces stvaranja ketonskih tijela uključuje slijedeće korake: β -oksidacija masnih kiselina do acetil CoA, formiranje acetoacetyl CoA, konverzija acetoacetyl CoA u 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA (HMG CoA), zatim u acetoacetat i naposljetku njegova redukcija u 3- β -hidroksibutirat, kao što prikazuje slika 2.2.2.



Slika 2.2.2. Ketogeneza

Enzimi u hepatocitima uključeni su u formaciju ketonskih tijela. Masni acetyl-CoA transportiran je u mitohondrije pomoću karnitina, kojeg pokreće karnitin palmitoltransferaza 1 (CPT 1). Acetyl CoA karboksilaza katalizira produkciju malonil CoA iz acetyl CoA koji je nastao β oksidacijom masnih kiselina. Malonil CoA inhibira CPT 1. Smanjena aktivnost acetyl CoA karboksilaze, odnosno smanjena proizvodnja malonil CoA, potiče transport masnih kiselina u mitohondrije. Enzim koji konvertira acetyl CoA u acetoacetyl CoA je 3-ketotiolaza (3-KT), HMG CoA sintaza (mHS) u HMG CoA i HMG CoA laza (HL) u acetoacetat. Acetoacetat je reduciran u 3BH uz pomoć 3-BH dehidrogenaze (HBD), te se aceton formira spontanom dekarboksilacijom iz acetoacetata.

Izvor: Laffel 1999.

HMG CoA također nastaje iz ketogenih aminokiselina kao što su leucin, lizin i triptofan. HMG CoA se rascjepljuje i oslobađa se AcAc uz pomoć HMG CoA-liaze (HL), a redukcija AcAc do 3HB je katalizirana 3-hidroksibutirat dehidrogenazom (HBD) - enzim ovisan o fosfatidil kolinu. Tijekom ovog koraka, NADH se oksidira u NAD⁺, i kao posljedica toga, konačni omjer 3HB i AcAc u krvi ovisi o redoks potencijalu (tj. omjeru NADH/NAD⁺) unutar mitohondrija jetre. Acetoacetat i 3HB su organske kiseline kratkog lanca (4C) i mogu slobodno difundirati kroz stančne membrane. Stoga, ketonska tijela mogu služiti kao izvor energije za mozak (koji ne koristi masne kiseline) i druge gore spomenute organe. Ketonska tijela se filtriraju i

ponovno apsorbiraju u bubrezima. Stvaranje ketonskih tijela prati i snižavanje pH (povećanje koncentracije H⁺ iona) tijekom njihova prekomjerna stvaranja (npr. dijabetička ketoacidoza) čime se brzo nadmašuje normalni kapacitet pufera i dovodi do razvoja metaboličke acidoze.

Brzina ketogeneze ovisi o aktivnosti tri enzima: hormon senzitivnoj lipazi (koja se nalazi u perifernim adipocitima), te acetil CoA karboksilaza i mHS koji se nalaze u jetri. Prva dva enzima, hormon senzitivna lipaza i acetil CoA karboksilaza, izuzetno su kontrolirana razinom cirkulirajućeg inzulina, koji djeluje na inhibiciju ketogeneze, te adrenalina i glukagona, koji djeluju na stimulaciju ketogeneze. Inzulin inhibira lipolizu i stimulira lipogenezu deaktivacijom hormon senzitivne lipaze i aktivacijom acetil CoA karboksilaze. Drugim riječima, inzulin inhibira ketogenezu, dok glukagon, koji se javlja tijekom gladovanja ili dijabetesa, pogoduje ketogenezi poticanjem lipolize u adipocitima i stimulacijom β -oksidacije slobodnih masnih kiselina u jetri.

Hormon senzitivna lipaza katalizira konverziju triglicerida u digliceride za daljnu degradaciju do slobodnih masnih kiselina koje služe u sintezi ketonskih tijela. U drugu ruku acetil CoA karboksilaza katalizira konverziju acetil CoA u malonil CoA, povećavajući razinu primarnog supstrata za biosintezu masnih kiselina u jetri. Razine malonil CoA u jetri variraju izravno prema brzini sinteze masnih kiselina i obrnuto prema brzini oksidacije masnih kiselina. Malonil CoA ima ključnu ulogu u regulaciji ketogeneze. Niska koncentracija malonil CoA stimulira transport masnih kiselina u mitohondrije, koje ulaze pomoću karnitina i bivaju oksidirane, te pretvorene u ketonska tijela. Pri visokim koncentracijama, malonil CoA inhibira CPT 1, enzim koji transportira masni acetil CoA kroz mitohondrijsku membranu. Navedeno znači da regulacija ulaska slobodnih masnih kiselina u proces β oksidacije je regulirana enzimom CPT-1, čija je aktivnost niska kada organizam ne gladije, dovodeći do manjeg ulaska SMK. U slučaju kada organizam gladije njegova aktivnost je visoka, te dozvoljava povećanje β oksidacije SMK (Laffel, 1999).

Kod nekih vrsta, kao što su konji, proces ketogeneze nije dobro razvijen, stoga je ketoza neuočljiva, ali zadržavaju značajnu sposobnost izbacivanja VLDL u krv tijekom gladovanja, što rezultira hipertrigliceridemijom. S druge strane preživaci nemaju sposobnost otpuštanja VLDL iz jetre u krv (Engelking, 2015), što ih čini sklonijima infiltraciji jetre masnim tkivom što rezultira nastankom sindroma masne jetre.

Inzulin inhibira ketogenezu pokrećući defosforilaciju hormon senzitivne lipaze i aktivira lipogenezu tako što stimulira acetil CoA karboksilazu (tablica 2.2.1.). U adipocitima defosforilacija hormon senzitivne lipaze inhibira razgradnju triglicerida do masnih kiselina i glicerola, korak koji ograničava brzinu oslobađanja slobodnih masnih kiselina iz adipocita. Time se reducira količina supstrata dostupnog za ketogenezu. Osim toga, inzulinom posredovana defosforilacija inhibitorskih mjesta na jetrenoj acetil CoA dekarboksilazi povećava produkciju malonil CoA i stimulatивно reducira koncentraciju masnih kiselina koje mogu ući u mitohondrij.

Glukagon stimulira ketogenezu potičući fosforilaciju oba enzima, hormon senzitivne lipaze i acetil CoA karboksilaze uz pomoć protein kinaze 1. U adipocitima,

fosforilacija hormon senzitivne lipaze, putem ciklički AMP-ovisne protein kinaze stimulira oslobađanje masnih kiselina iz triglicerida. Glicerol slobodno difundira iz adipoznog tkiva u cirkulaciju, te biva transportiran do jetre. Slobodne masne kiseline ulaze u cirkulaciju iz jetre vezane na albumin i spremne su za preuzimanje i metabolizam u drugim tkivima kao što su srce, skeletni mišići, bubrezi i jetra. U hepatocitima, fosforilacija acetil CoA karboksilaze uz pomoć protein kinaze 1, reducira proizvodnju malonil CoA, što posljedično dovodi do stimulacije ulaska slobodnih masnih kiselina u mitohondrije, čime se povećava količina supstrata za ketogenezu (Laffel, 1999).

Jetreni mitohondrijski HMG CoA sintaza (mHS) je treći ključni enzim u kontroli ketogeneze. Aktivnost ovog enzima povećava se gladovanjem i hranom koja sadrži puno masti, a smanjuje djelovanjem inzulina. Povećanje aktivnosti mHS dovodi do proizvodnje ketonskih tijela (Laffel 1999).

Tablica 2.2.1. Utjecaj inzulina i glukagona na ključne enzime u ketogenezi

Enzim	Lokacija	Djelovanje	Posljedica	Inzulin	Glukagon
Hormon senzitivna lipaza	Periferni adipociti	Razlaganje triglicerida u masne kiseline	Podizanje razine cirkulirajućih masnih kiselina	Inhibira	Stimulira
Acetil CoA karboksilaza	Hepatociti	Konverzija acetil CoA u malonil CoA	Malonil CoA blokira transport masnih kiselina u mitohondrije	Stimulira	Inhibira
HMG CoA sintaza	Jetreni mitohondriji	Konverzija acetoacetyl CoA u acetoacetat	Korak koji ograničava brzinu u proizvodnji prvog u seriji ketonskih tijela	Inhibira	Stimulira

Izvor: (Laffel 1999).

Tijekom gladovanja, biljojedi će imati malo ili nimalo propionata koji ulazi u portalnu cirkulaciju, posljedično i u glukoneogenezu, stoga će biti prisiljeni koristiti glicerol i glukogene aminokiseline kako bi održali razine glukoze u krvi unutar fizioloških granica. Nadalje, ako su životinje gravidne ili u laktaciji, bit će manje dostupnih aminokiselina u hepatocitima za biosintezu Apo B100, ključnog lipoproteina za proizvodnju VLDL-a i otpremu triglicerida prema perifernim tkivima zbog čega će se oni zadržavati u jetri (steatoza).

2.2.1. Ketogeneza u ostalim tkivima

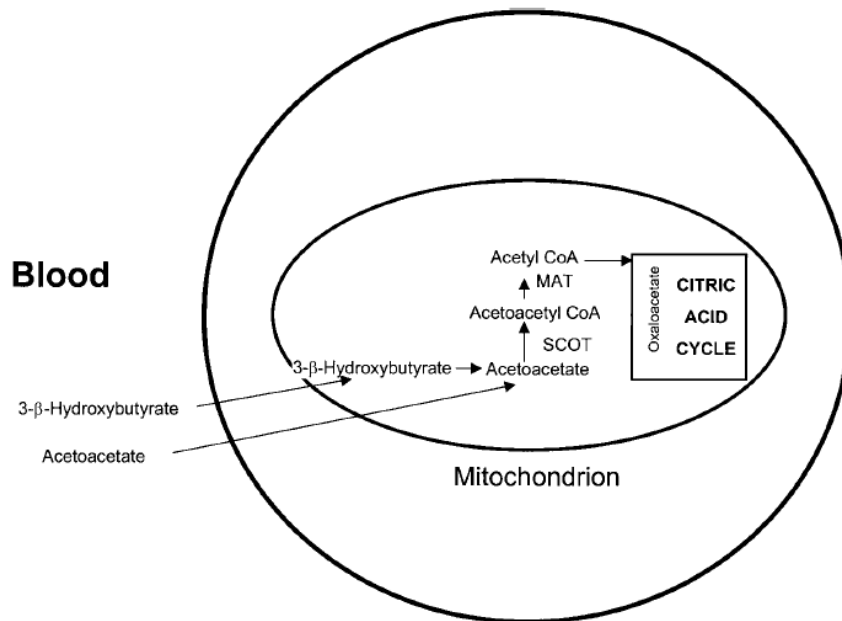
Kod preživača, odnosno mliječnih krava, glavni organi za ketogenezu su jetra i burag, iako nedavna istraživanja upućuju da fermentacija u debelom crijevu ima skroman doprinos proizvodnji 3BH. Hlapive masne kiseline nastale mikrobnom fermentacijom u buragu, bivaju metabolizirane u stanicama buražnog zida, posebice maslačna kiselina. Od ukupne maslačne kiseline proizvedene u buragu 74 do 90% se oksidira u buražnom epitelu, dok se octena smatra jako slabim prekursorom za ketogenezu. Konverzija maslačne kiseline u AcAc i 3BH događa se odmah u buražnom epitelu i iznosi 83% (Remond i sur., 1995).

2.3. Ketoliza

Iskorištavanje ketonskih tijela odvija se u cijelome tijelu, osim u jetri i to procesom kojim se acetoacetil konvertira u acetoacetil CoA, zatim u acetil CoA, što je prikazano i u slici 2.3.1. Zatim jedan od puta kojim acetil CoA može ići je oksidacija u ciklusu limunske kiseline ili može biti korišten za sintezu masnih kiselina, specifično u mliječnoj žlijezdi, ili za sintezu nekih drugih komponenti. Slobodni aceton, međutim, jest glukogeni, jer se pretvara u piruvat i, kao što je ranije rečeno, obično je od male važnosti. Kako su ketonska tijela stvorena u jetri, a koriste se u ekstrahepatičkim tkivima, ketoza teoretski može nastati iz nekoliko razloga: a) nedovoljno iskorištavanje u ekstrahepatičkim tkivima ili b) prekomjerna proizvodnja u jetri. S time da je češći uzrok prekomjerna proizvodnja u jetri, nego nedovoljno iskorištavanje ketonskih tijela od strane ekstrahepatičkih tkiva. Maksimalno iskorištavanje ketonskih tijela se događa pri koncentraciji od oko 20 mg na 100 ml, a nakon postizanja ovog maksimuma samo mali porasti u proizvodnji uzrokovali bi velike poraste koncentracije u krvi (Bergman, 1971).

Ketoliza je proces putem kojeg ketonska tijela bivaju prevedena u energiju koja služi kao gorivo mnogim unutarstaničnim metaboličkim aktivnostima. Ketoliza se odvija u mitohondrijima mnogih ekstrahepatičkih organa. Središnji živčani sustav posebno ovisi o dostavi ketonskih tijela proizvedenih u jetri za proces ketolize, budući da se ketogeneza u središnjem živčanom sustavu odvija vrlo sporo, ili čak i ne događa. Ketoliza uključuje dva ključna koraka. Rekonstituciju acetoacetil CoA iz AcAc pomoću enzima sukcinil CoA- oxoacid transferaza (SCOT) i naknadno cijepanje acetilne grupe s acetoacetil CoA za formiranje acetil CoA pomoću enzima metilacetoacetil CoA tiolaze (MAT), kao što je prikazano na slici 2.3.1. SCOT određuje brzinu u ketolizi, njezina aktivnost je najveća u srcu i bubrezima, zatim u središnjem živčanom sustavu i skeletnim mišićima. Zbog velike mase skeletnih mišića, ovo tkivo čini najveći dio ukupnog metabolizma ketonskih tijela u stanju mirovanja.

MAT, enzim odgovoran za drugi ključni korak u ketolizi, prisutan je u jetri, primarnom mjestu ketogeneze, kao i u ekstrahepatičkim tkivima. U ekstrahepatičkim tkivima, ovaj enzim potiče proizvodnju acetil CoA iz acetoacetyl CoA, kao što je gore spomenuto. Međutim, u jetri, MAT igra ključnu ulogu u ketogenezi, u tom slučaju, MAT pomaže u stvaranju acetoacetyl CoA, supstrata za mitohondrijsku HMG CoA sintazu (mHS) (Laffel, 1999).

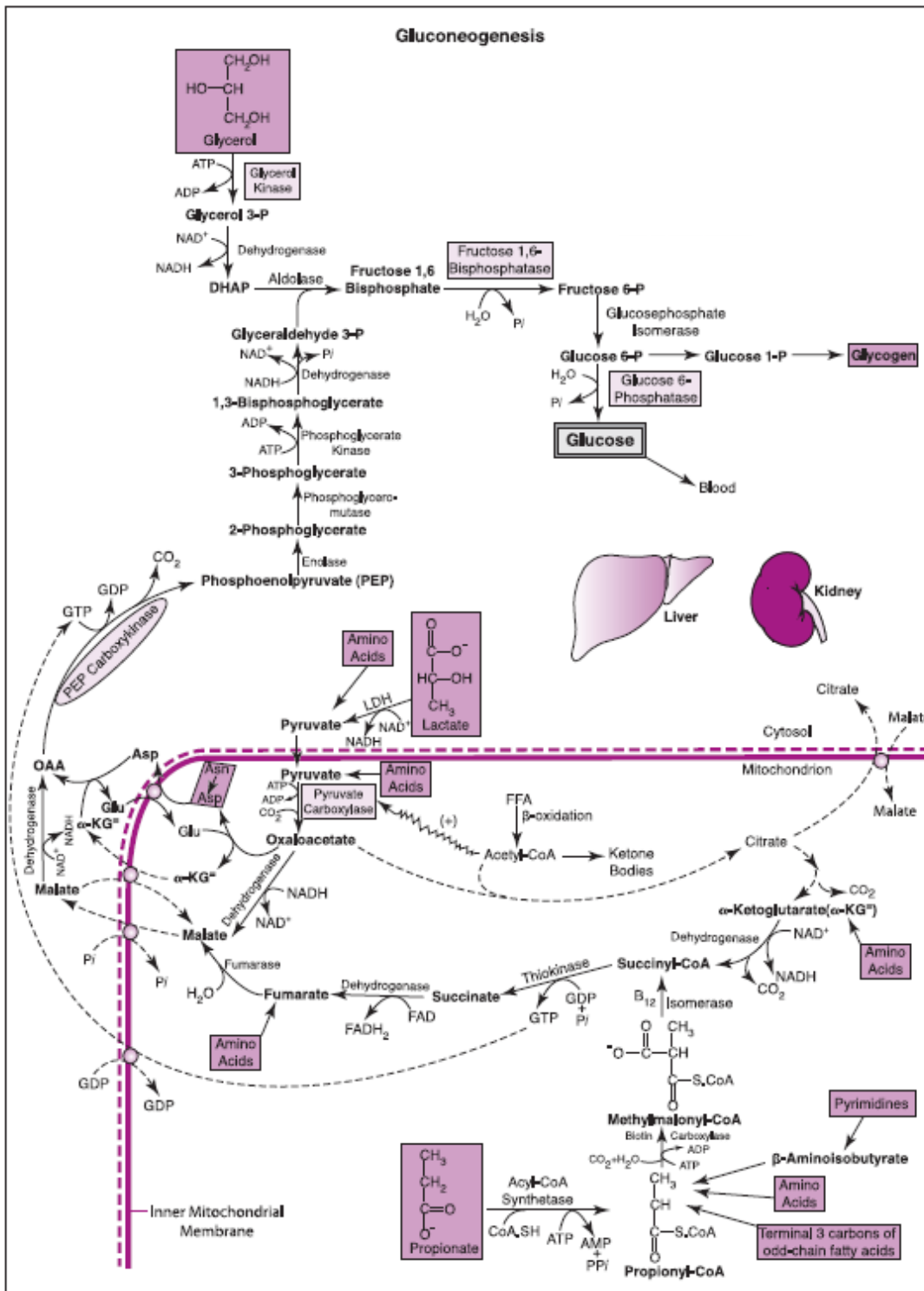


Slika 2.3.1. Ketoliza

Ulazak ketonskih tijela u ciklus limunske kiseline. Ulaze u CLK nakon što su konvertirani u acetyl CoA uz pomoć SCOT i MAT.
Izvor: (Laffel 1999).

2.4. Glukoneogeneza

Glukoneogeneza je glavni regulatorni proces u jetri i bubrezima u kojem se proizvodi glukoza iz neugljikohidratnih izvora kao što su glicerol, mliječna kiselina, propionska kiselina i glukogene aminokiseline, a koje se potom konvertiraju u glukoza-6-fosfat (Glc-6-P) koji može završiti svoj put kao slobodna glukoza ili kao glikogen. Jetra i bubrezi su glavni organi koji sadrže sve potrebne glukoneogene enzime (piruvat karboksilaza, PEP karboksilinaza, fruktoza 1,6-bisfosfataza i glukoza 6-fosfataza). Glukoneogeneza je potrebna da nadoknadi nedostatak glukoze koji se dogodi između obroka, a glukoza je izuzetno važan izvor energije za živčane stanice, eritrocite i druge tipove anaerobnih stanica. U slučaju da glukoneogeneza zakaže dolazi do disfunkcije mozga, kome i smrti. Kod mesojeda i preživača glukoneogeneza u jetri je kontinuirana i kao proces koji je bez prekida ima malo ili ništa povezanosti sa konzumacijom hrane. U situacijama kada se najviše energije dobiva oksidacijom masnih kiselina, za opskrbu organizma uvijek postoji određena osnovna potreba za glukozom. Također glukoza je glavni supstrat koji osigurava skeletnom mišićju energiju u anaerobnim uvjetima. Mehanizam glukoneogeneze u jetri služi kao „čistač“ nekih produkata metabolizma iz krvi (laktat, koji proizvode eritrociti, mrežnica, bubrežna medula i anaerobna mišićna vlakna i glicerol, koji kontinuirano proizvodi masno tkivo kada se mast mobilizira za podmirenje energetske potrebe). Od aminokiselina porijeklom iz mišića koje se mobiliziraju tijekom gladovanja, dominantna je alanin. Ova aminokiselina je dio glukoza-alanin ciklusa, koji ima utjecaj na kruženje glukoze od jetre do mišićja i formiranju piruvata, praćeno transaminacijom alanina, zatim transportom alanina do jetre i naposljetku glukoneogenezom do glukoze. Tijekom gladovanja razgranati lanac aminokiselina oksidira se u mišićima i služi kao izvor amonijaka (NH_3). Tako se ostvaruje neto prijenos aminodušika iz mišića u jetru (zatim u ureu) i potencijalne energije (glukoze) iz jetre u mišiće. Energija potrebna jetri da sintetizira glukozu iz piruvata ili laktata vjerojatno potječe od oksidacije masnih kiselina (Engelking, 2015).



Slika 2.4.1. Glukoneogeneza
Izvor: Engelking 2015

2.4.1. Glukoneogeni prekursori

Općenito se aminokiseline koriste za mnoge vitalne biosintetske funkcije u jetri, kao što je sinteza proteina, ali generalno služe i u glukoneogenezi. Tijekom pretvorbe glukoneogenih aminokiselina u glukozu, amino skupina ireverzibilno se pretvara u ureu, koja zatim ulazi u krvotok. Većina aminokiselina tvori intermedijere CLK i piruvat, te su stoga glukogene. Druge tvore acetyl CoA i stoga su ketogene. Acetyl-CoA nije supstrat za glukoneogenezu jer se njegova dva atoma ugljika gube kao CO_2 u CLK. Posebno su važni za glukoneogenezu alanin (u jetri) i glutamin (u bubrezima). Procjenjuje se da doprinos aminokiselina glukoneogenezi kod preživača iznosi oko 5-7% proizvedene glukoze, kako u stanju hranjenja, tako i u stanju gladovanja. Dobar izvor glukoze tijekom vježbe je mliječna kiselina i tijekom hranjenja koncentratima na bazi lako topivih ugljikohidrata (u tom slučaju u buragu se nalaze velike koncentracije mliječne kiseline), tada postaje važan supstrat glukoneogeneze u jetri. Mliječna kiselina se također lako oksidira u srčanom mišiću, koji je bogat mitohondrijima.

U trenutku kada je glicerol kinaza aktivna u adipoznom tkivu, glicerol postaje nusproizvod lipolize i zatim se konvertira u glukozu u jetri. Ovaj supstrat je ključan za hibernirajuće životinje koje tijekom mirovanja koriste masno tkivo, a lipoliza je neophodna za preživljavanje. Treba napomenuti da sinteza glukoze iz glicerola zahtijeva manje koraka (i stoga manje energije) nego sinteza iz drugih prekursora.

Propionska kiselina je hlapiva masna kiselina dobivena mikrobnom razgradnjom ugljikohidrata u buragu i glavni je supstrat za glukoneogenezu u jetri. Postotak glukoze dobiven iz propionske kiseline jako varira, od maksimalno 70% tijekom hranidbe velikim količinama zrnjevlja žitarica, do nekoliko postotaka tijekom gladovanja. Važnost propionske kiseline kao glukoneogenog supstrata ilustrirana je opažanjem da vime u laktaciji može koristiti 60-85% glukoze koju proizvodi jetra za proizvodnju mlijeka. Za razliku od propionske kiseline, mliječna i maslačna, druge dvije glavne hlapljive masne kiseline koje se proizvode mikrobnom razgradnjom ugljikohidrata, ne doprinose izravno neto sintezi glukoze (Engelking, 2015).

3. Negativna energetska ravnoteža – hormonska regulacija

Metabolička goriva organizma su: ugljikohidrati, aminokiseline i masti. Prilagodba na negativnu energetska ravnotežu je konstantna promjena korištenja ovih supstrata, kao i njihovo skladištenje. Pohrana ugljikohidrata je ograničena, stoga u periodima kada su potrebni organizmu moraju se sintetizirati iz drugih preteča ili se umjesto njih koriste alternativni izvori energije. Ugljikohidrati se mogu sintetizirati iz proteina, ali ne i iz masti. Korištenje ugljikohidrata kao izvora energije tijekom negativne energetske ravnoteže, rezultira potrošnjom proteina, važnih strukturnih proteina i enzima. Takvo korištenje energije je neučinkovito i ograničeno stoga se organizam prilagođava na način da mobilizira rezerve energije iz masti. Kod preživača je ovaj način korištenja masti jako bitan jer se većina ugljikohidrata fermentira u buragu i vrlo malo apsorbira u krvotok. Ograničena opskrba ugljikohidratima ima veliki značaj za krave u laktaciji, jer sinteza laktoze zahtjeva velike količine ugljikohidrata. Preživači taj veliki zahtjev za glukozom nadomještaju glukoneogenezom. Glavni supstrat za glukoneogenezu je propionska kiselina, jedna od triju hlapivih masnih kiselina nastala buražnom fermentacijom. Ni jedna druga masna kiselina nije prigodna za ulazak u glukoneogenezu, pa čak ni dugolančane masne kiseline iz masnog tkiva. Iako se propionska kiselina učinkovito pretvara u ugljikohidrat i dalje postoji neto gubitak ukupnih ugljikohidrata koji su uneseni hranom. To je zato što propionska kiselina čini otprilike trećinu od ukupne energije nastale fermentacijom, ostatak predstavlja octena i maslačna kiselina.

Adipozno tkivo i jetra su glavni organi ključni za adaptaciju organizma na negativnu energetska ravnotežu. Adipozno tkivo ili masno tkivo predstavlja rezervu energije, uskladištenu u obliku triglicerida koji su upakirani u stanice, adipocite. Trigliceridi su molekule koje sadrže tri dugolančane masne kiseline esterificirane na molekulu glicerola. Razlaganje triglicerida odvija se prekidanjem esterskih veza, što rezultira oslobađanjem neesterificiranih masnih kiselina i ovaj proces se još naziva lipolizom. Suprotan proces lipolizi naziva se lipogeneza. Slobodne masne kiseline odlaze u krvotok i njihova koncentracija proporcionalna je lipolizi. Skeletni mišići isto tako imaju važnu ulogu u homeostazi energije dijelom zbog svoje veličine i zato što mogu koristiti slobodne masne kiseline i ketonska tijela kao izvor energije, a dijelom zato što su mišići skladišta proteina koji jednim dijelom odlaze u proces glukoneogeneze. Mliječna žlijezda i posteljica ne mogu preusmjeriti iskorištavanje energije iz drugih izvora, kao druga tkiva, nego su ovisna o glukozu i aminokiselinama. Korištenje hranjivih tvari kao izvora energije u mliječnoj žlijezdi i posteljici nije pod utjecajem inzulina, što je glavni način na koji tijelo regulira raspodjelu i alokaciju supstrata za dobivanje energije. Laktacija i kasni graviditet postavljaju veliki stres za organizam. Jetra služi kao ključni element u prilagodbi na negativnu energetska ravnotežu i održavanju zaliha energije u tijelu. Prigušuje fluktuacije koncentracija glukoze i drugih izvora energije u krvi, održavajući stalan dotok energetskeg supstrata tkivima. Metabolizam jetre prilagođava distribuciju svih tjelesnih izvora energije uključujući glukozu, aminokiseline, propionsku kiselinu, maslačnu kiselinu, slobodne masne

kiseline, mliječnu kiselinu i ketonska tijela. Jetra je glavni regulator glukoze u krvi i njezine distribucije u druga tkiva. U jetri se odvija glavna glukoneogeneza dok se manji dio odvija u bubrezima. Višak glukoze skladišti se u obliku glikogena. S druge pak strane pri niskim koncentracijama glukoze, glikogen se razlaže. Količina skladištenog glikogena nije dovoljna za velike zahtjeve u periodu negativne energetske ravnoteže. Iscrpljivanje rezervi glikogena, posebno u kombinaciji s povećanom koncentracijom triglicerida u jetri, može povećati rizik od kliničke ketoze. Tijekom negativne energetske ravnoteže otpušta se velika količina slobodnih masnih kiselina iz masnog tkiva, te one kruže cirkulacijom i dostupne su većini tjelesnih tkiva, ali jetra uzima najveći dio. U jetri se slobodne masne kiseline ili pretvaraju u ketonska tijela ili u trigliceride. Usmjeravanje slobodnih masnih kiselina (SMK) u jedan od ta dva metabolička puta ključan je faktor adaptacije organizma na negativnu energetske ravnotežu. Glavna metabolička kontrolna točka koja odlučuje hoće li se SMK pretvoriti u ketonska tijela je transport SMK u mitohondrij. SMK koje ne uđu u mitohondrij se reesterificiraju u trigliceride. Tijekom perioda intenzivne lipidne mobilizacije i visoke koncentracije SMK u krvi, velika količina triglicerida može biti sintetizirana u jetri. Uklanjanje triglicerida zahtjeva sintezu i sekreciju lipoproteina vrlo male gustoće VLDL, koji na sebi odnosi trigliceride u krvotok, koji mogu kao takvi biti korišteni od strane drugih tkiva uključujući i mliječnu žlijezdu za sintezu mliječne masti (Herdt, 2000).

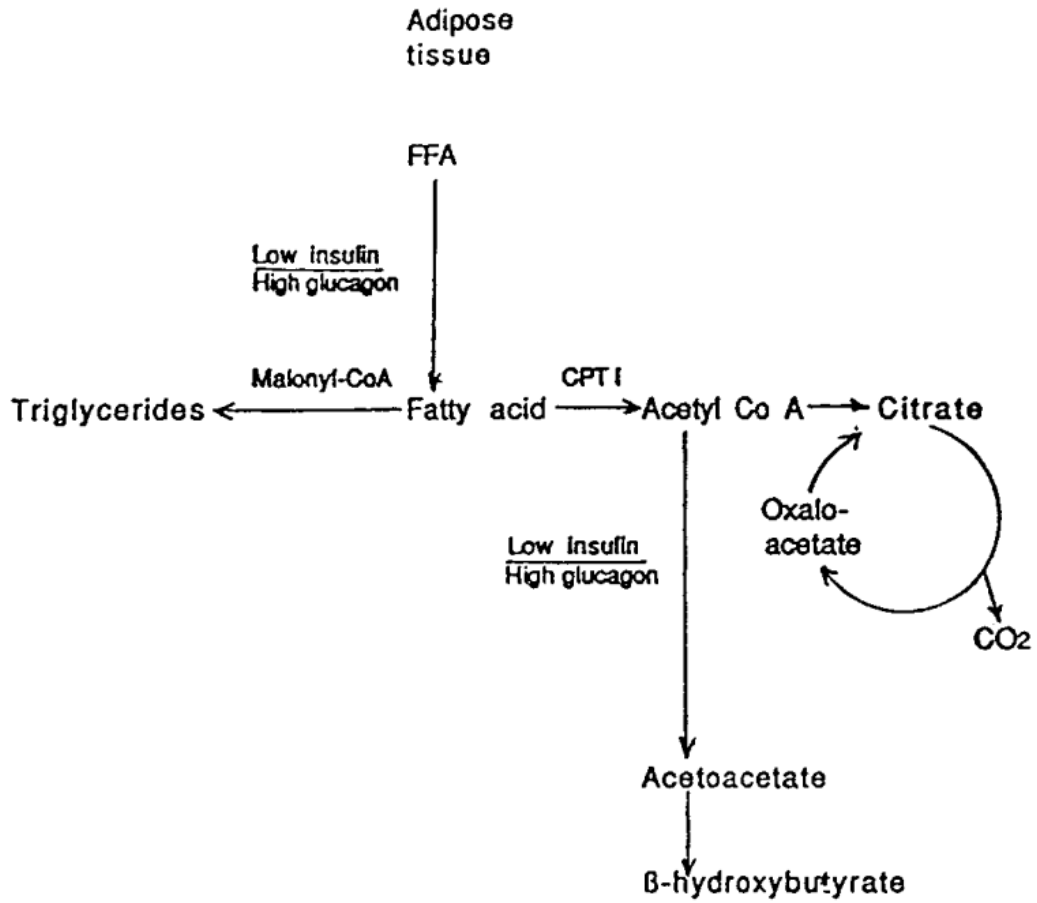
Sustav odgovoran za regulaciju i adaptaciju na negativnu energetske ravnotežu dolazi od specifične interakcije između energetske supstrate i tkiva i organa koje ga koriste. Ta je interakcija bazirana na dostupnosti opskrbe glukozom, SMK i ketonskih tijela. Veza između ta tri metabolita je kružna, pa kako navodi Herdt (2000) najbolje je započeti opisivanje s glukozom. Kada je koncentracija glukoze u krvi zadovoljavajuća, u masnom tkivu odvija se lipogeneza. To rezultira supresijom otpuštanja SMK i njihova je koncentracija u krvi niska. Kako u masnom tkivu masne kiseline kruže iz SMK u trigliceride, potrebna je konstantna prisutnost glicerola za sintezu triglicerida. Glukoza je glavni prekursor za sintezu glicerola u adipocitima, a njezina prisutnost povećava dostupnost glicerola i pogoduje lipogenezi. Za vrijeme negativne energetske ravnoteže koncentracija glukoze u krvi je niska i oslobađanje SMK u adipocitima je stimulirano zbog nedostatka glicerola. Kako se koncentracija SMK u krvi povećava kao odgovor na nisku razinu glukoze u krvi, metabolički učinak je ponovno uspostavljanje ravnoteže u dostupnosti izvora energije podizanjem koncentracije glukoze u krvi. Utjecaj SMK na glukozu u krvi odražava se putem nekoliko mehanizama. U ekstrahepatičnim tkivima SMK inhibiraju korištenje glukoze. Dostupnost glukoze i SMK imaju značajnu i međusobno povezanu ulogu o utjecaju na metabolizam jetre. Metaboličke reakcije u hepatocitima odvojene su i odvijaju se ili u citosolu ili u mitohondrijima. Tijekom normalne opskrbe glukozom ona konstantno ulazi u CLK što rezultira time da u CLK ulazi više glukoze nego što je potrebno energije. Energetski višak dovodi do usporavanja aktivnosti CLK, što rezultira nakupljanjem međuprodukata CLK unutar mitohondrija, uključujući citrat, prvi međuprodukt u ciklusu. Višak citrata transportiran je izvan mitohondrija gdje se

konvertira u malonil CoA, koji je prvi metabolit u sintezi masnih kiselina i on specifično inhibira enzim karnitin palmitil transferazu I (CPT I). CPT I je enzim neophodan za transport SMK u mitohondrije i sintezu ketonskih tijela. Kontrolna točka ulaska SMK u mitohondrije je upravo CPT I i najbolje je funkcionalan kod krava nego kod ostalih vrsta. Citrat – malonil CoA - CPT I veza rezultira recipročnom povezanosti između statusa ugljikohidrata i brzine korištenja SMK u jetri za sintezu ketonskih tijela.

U suprotnom slučaju kada glukoze nema dovoljno, u CKL ulazi samo mala količina glukoze, što rezultira time da iz mitohondrija izlazi malo ili skoro ništa citrata za proizvodnju malonil CoA. Niske koncentracije malonil CoA aktiviraju CPT I i dolazi do rapidnog ulaska SMK u mitohondrije. Mitohondrijski metabolizam SMK stimulira proizvodnju i glukoze i ketonskih tijela. Ti efekti su posljedica posredovanja acetil CoA međuprodukta metabolizma SMK. Acetil CoA potiskuje korištenje glukoze i stimulira glukoneogenezu, iako acetil CoA nije sam po sebi prekursor glukoze. Mitohondrijski acetil CoA je prekursor ketonskih tijela, te se metabolizira do acetoacetata, najvažnijeg ketoskog tijela. Acetoacetat izlazi iz mitohondrija u citosol, gdje se veći dio acetoacetata konvertira u β -hidroksibutirat, prije nego što napusti jetru. Ketonska tijela služe kao povratni regulator otpuštanja SMK, odnosno njihova prisutnost u krvotoku zaustavlja lipolizu u adipocitima (Herdt, 2000).

Endokrini sustav je važan u adaptaciji organizma na negativnu energetska ravnotežu, zato što cijeli mehanizam koji uključuje razna tkiva i organe ne može funkcionirati sam. Endokrini sustav je primarno kontrolirati brzinu metabolizma, odnosno regulirati sve procese. Inzulin je ključan hormon. Njegova koncentracija u krvi primarno je izazvana dostupnom glukozom i njezinim prekursorom, propionskom kiselinom. Inzulin povećava korištenje glukoze od strane mišićnog tkiva i smanjuje glukoneogenezu, što rezultira smanjenom razinom glukoze u krvi. Suprotno, kako se koncentracija glukoze i propionske kiseline smanjuje, smanjuje se i koncentracija inzulina. U adipoznom tkivu inzulin stimulira lipogenezu i inhibira lipolizu. U jetri inzulin reducira aktivnost CPT I i transport SMK u mitohondrije, odnosno inhibira ketogenezu, što je prikazano na slici 3.1. Nadalje, inzulin potiče esterifikaciju SMK. Glukagon ima suprotan učinak inzulinu i kod preživača ima najveće djelovanje u jetri, gdje stimulira glukoneogenezu i promovira aktivaciju CPT I. Slijedeći važni hormoni u regulaciji poslije inzulina su epinefrin i norepinefrin, odnosno katekolamini. Oni su potencijalni stimulatori lipolize. Simpatički živčani završeci otpuštaju norepinefrin u adipocitima što za posljedicu ima otpuštanje SMK u cirkulaciju. Epinefrin izlučen iz srži nadbubrežne žlijezde također je snažan stimulator lipolize u masnom tkivu, što ukazuje na to da stres može potaknuti izlučivanje SMK. Hormon rasta reducira lipogenezu i potiče mobilizaciju SMK. Sekretacija hormona rasta stimulirana je hipoglikemijom, te je normalno da su koncentracije hormona rasta visoke u ranoj laktaciji u usporedbi s kasnom laktacijom (Herdt, 2000). Endokrini sustav koji je uvelike odgovorna za održavanje razine glukoze u krvi i odgovarajući stanični unos i razmjenu "metabolita" je gušterača. Glavni hormoni koje luči gušterača su inzulin i glukagon, a pored njih još luči somatostatin i pankreasni polipeptid. Inzulin je hormon

sa više funkcija i ima utjecaj na sve organe i tkiva direktno ili indirektno. Glavna zadaća inzulina je stimulirati anaboličku reakciju kako bi se povećala količina pospremljenih ugljikohidrata, aminokiselina i masti. Takva reakcija ima za posljedicu nižu razinu glukoze u krvi i veće skladištenje hranjive tvari. Lučenje inzulina raste nakon obroka, kao odgovor na porast koncentracije glukoze i aminokiselina u krvi. Metaboličko djelovanje inzulina odvija se preko njegovih učinaka na membranski prijenos i aktivnost različitih unutar staničnih enzima. Stimulirani su procesi preuzimanja glukoze i sinteza glikogena u stanicama, zatim preuzimanje aminokiselina i sinteza bjelančevina. Inzulin povećava sintezu glikogena u jetri i skeletnim mišićima, te također blokira proizvodnju glukoze u jetri inhibiranjem glukoneogeneze. Povećana je aktivnost različitih unutar staničnih enzima uključenih u metabolizam glukoze, aminokiselina i masti. Odnosno povećava sintezu triglicerida u masnom tkivu, te smanjuje lipolizu, inhibirajući hormon senzitivnu lipazu. Molekule glukoze ne prolaze lako staničnu membranu i u stanice se unose specifičnim prijenosnim bjelančevinama. Ove prijenosne molekule se označavaju kao Glut-molekule, što je kratica od njihovog engleskog naziva (*glucose transport molecules*). Postoji najmanje sedam različitih Glut molekula. Inzulin regulira prijenos glukoze pomoću jedne od njih, Glut-4. Inzulin potiče prijenos glukoze u mnogim tkivima, naročito u skeletnim mišićima i masnom tkivu. U mozgu, jetri, eritrocitima, kao i u epitelu bubrega, crijeva i mliječne žlijezde, preuzimanje glukoze se ne odvija uz pomoć Glut-4 i zbog toga je ovo preuzimanje neovisno o inzulinu. Glukagon se može smatrati indirektnim antagonistom inzulina. Stimulira kataboličku reakciju, koja odmah dovodi do razlaganja glikogena, proteina i masti, što rezultira povećanom koncentracijom glukoze u krvi. Stoga gušterača kontinuirano prilagođava koncentracije inzulina i glukagona. Anatomski gušterača se može podijeliti u lobule koje sadrže egzokrine žlijezde koje izlučuju enzime potrebne za probavu i endogene Langerhans-ove otočiće koji sadrže inzulin, glukagon i somatostatin za sekreciju u krv. Na otočićima se nalazi nekoliko vrsta stanica: α za sekreciju glukagona, β za sekreciju inzulina i δ za sekreciju somatostatina (Norman i Henry, 2015).



Slika 3.1. Metabolizam masnih kiselina u jetri
Izvor: Holtenius i Holtenius, 1996

4. Ketoza

Ketoza je metabolički poremećaj mliječnih krava kojeg karakterizira visoka razina ketonskih tijela β hidroksibutirata (3BH), acetoacetata (AcAc) i acetona u krvi, mlijeku i urinu u ranoj laktaciji. Izvor ketonskih tijela može biti egzogeni (hrana) ili endogeni (adipozno tkivo). Trenutno, etiologija ketoze je pojava negativne energetske ravnoteže u periodu oko telenja, koji je okidač za mobilizaciju dugolančanih masnih kiselina iz adipoznog tkiva, koji se oksidacijom u jetri pretvaraju u ketonska tijela. Točnije odmah nakon telenja postoji neravnoteža između energije koja ulazi u organizam hranom i energije koja se iznosi putem mlijeka. Zbog toga krava ulazi u negativnu energetske ravnotežu i organizam započinje s lipolizom triacilglicerida pohranjenih u adipoznom tkivu, otpuštajući veliku količinu neesterificiranih masnih kiselina u cirkulaciju. U normalnim okolnostima neesterificirane masne kiseline u jetri bivaju esterificirane i otklanjaju se iz jetre u cirkulaciju putem lipoproteina vrlo male gustoće (VLDL). U slučaju kada u jetru dolazi vrlo velika količina neesterificiranih masnih kiselina jetra ne može sve esterificirati, pa se one nepotpunom oksidacijom pretvaraju u ketonska tijela u mitohondrijima hepatocita. Mobilizacija neesterificiranih masnih kiselina i njihova pretvorba u acetil CoA te zatim u ketonska tijela, služi da bi se „uštedjela“ glukoza i nadomjestila potrebna energija. Oslobođene masne kiseline mogu ući u nekoliko procesa, a to su: potpuna oksidacija u ciklusu limunske kiseline do CO_2 i vode, nepotpuna oksidacija kojom se stvaraju ketonska tijela, izlaskom iz jetre uz pomoć VLDL –a i esterifikacija neesterificiranih masnih kiselina do triglicerida koji se nakupljaju u hepatocitima što dovodi do masne jetre koja nije u stanju vršiti glukoneogenezu. Nakon porođaja jetra ne može provoditi glukoneogenezu u tolikoj mjeri da bi zadovoljila potrebe za glukozom, jer čak do 85% glukoze biva potrošeno u mliječnoj žlijezdi (Zhang i Ametaj, 2020).

Nekoliko je shema koje klasificiraju ketozu sa različitih gledišta. Prva kategorizacija je bazirana na koncentraciji 3BH u krvi i na prisutnost, odnosno odsutnost simptoma. Pa se tako ketoza može podijeliti na dvije forme: subkliničku i kliničku ketozu, pri čemu se subklinička ketoza definira kao stanje pri kojemu su povišene razine 3BH od 1200 do 1400 $\mu\text{mol/L}$, ali bez jasnih simptoma. Krave nemaju promjena u ponašanju i imaju dobar apetit. Kliničku ketozu karakteriziraju koncentracije 3BH između 2600 i 3000 $\mu\text{mol/L}$, hiperketonemija, hipoglikemija i prisutnost simptoma kao što su: slab apetit, gubitak tjelesne mase, smanjena proizvodnja mlijeka, itd. Druga kategorizacija ketozu dijeli na tri tipa: tip I, tip II i alimentarna ketoza. Ova podjela se temelji na etiologiji i „pojavnosti“ hiperketonemije (Oetzel 2007).

4.1. Primarna ketoza - Tip I

Tip I ili primarna ketoza je klasičan oblik ketoze koje se pojavljuje između 3 i 6 tjedna nakon telenja kada energija koja se izlučuje putem mlijeka doseže svoj vrh. Naziva se tip I zbog sličnosti s dijabetesom tipa I kod ljudi. Jedinke sa ketozom tipa I imaju hipoinzulemiiju zbog kronične hipoglikemije koja nastaje zbog nedostatka prekursora za glukoneogenezu. U tom slučaju prekursori glukoze bivaju apsorbirani iz hrane (najviše propionska kiselina) ili iz aminokiselina mišićnog tkiva, koje je ograničeno zbog samoočuvanja organizma. U drugu ruku lipoliza i ketogeneza su povećane, a masne kiseline i ketonska tijela se iskorištavaju u korist glukoze. Kod krava sa ovim tipom ketoze razina inzulina je niska, a koncentracija slobodnih masnih kiselina i ketonskih tijela visoka. Reakcije razine glukoze i inzulina nakon injekcija glukagonom su vrlo slabe, što dokazuje da je glukoneogeneza već maksimalno stimulirana, samo joj nedostaje prekursora. Niska reakcija glukoze, na glukagon, svakako je posljedica ograničenih rezervi glikogena u stanicama jetre, a kako lučenje inzulina zahtijeva prisutnost stimulirajućih razina glukoze u β -stanicama, ta je funkcija smanjena. U takvoj situaciji krava pokazuje simptome bolesti, uglavnom smanjen unos hrane i proizvodnju mlijeka.

Metabolizam glukoze u gušterači kod krava s ketozom, nije toliko aktivan kao kod zdravih krava. Primarni faktor za ketozu je visoka potražnja za glukozom i nedovoljna glukoneogeneza, koja se nadoknađuje povećanom ketogenezom. U takvim uvjetima, postoje vrlo male predispozicije za sintezu lipida u stanicama jetre i male su šanse za nakupljanje masti, ali se događa u manjoj mjeri. Ovaj hipoglikemijski tip ketoze obično se javlja 3-6 tjedana nakon telenja i u pravilu, nije povezana s drugim bolestima, pa se stoga općenito naziva primarnom ili spontanom ketozom. Međutim, hiperketonemija nije primarna, već je posljedica promjena u metabolizmu (Holtenius i Holtenius 1996).

4.2. Sekundarna ketoza - Tip II

Tip II ili sekundarna ketoza događa se kada u jetru pristiže velika količina slobodnih masnih kiselina, a glukoneogeneza i ketogeneza nisu maksimalno stimulirane. Pod tim okolnostima mitohondrijska apsorpcija SMK nije toliko aktivna kao kod ketoze tipa I. Neesterificirane masne kiseline ne ulaze u mitohondrij za proizvodnju ketonskih tijela, već su esterificirane u citosolu tvoreći trigliceride. Naime da bi se stvoreni trigliceridi transportirali iz jetre u druga tkiva, mora se sintetizirati i otpustiti VLDL kojeg jetra preživača prirodno ne može u velikoj mjeri sintetizirati. Ova prirodno urođena pojava niske proizvodnje VLDL-a još više dolazi do izražaja u ranoj laktaciji i tada kapacitet krave za mobilizaciju triglicerida iz jetre biva preplavljen, jer u jetru pritječu velike količine SMK, a sinteza ketonskih tijela je osrednja. Tada govorimo o masnoj jetri. Ovaj tip se pojavljuje u ranoj laktaciji i često popratno sa drugim poremećajima kao što su metritis, mastitis, laminitis i drugi problemi vezani uz papke. Ovaj tip ketoze prati hiperglikemija i hiperinzulemija, te odgovor na injekciju glukagona je snažan, odnosno rapidno se povećava koncentracija glukoze u plazmi. Takve jedinice imaju simptome inzulinske rezistencije, intoleranciju glukoze te u rijetkim slučajevima i nastanak dijabetesa tipa II, odnosno postaju neovisne o inzulinu ili drugim riječima tijelo postaje „otporno“ na inzulin, ali ga i dalje proizvodi. Glavni razlog zašto se događa poremećaj u metabolizmu glukoze, je prekomjerno hranjenje u suhostaju. To dovodi do povećanja koncentracije glukoze i inzulina u plazmi. Ako je pak krava pod stresom, transport SMK prema jetri je povećan, koncentracije glukoze i inzulina u plazmi su povećane, što može dovesti do povećanja proizvodnje masti u jetri. Pretjerano nagomilavanje triglicerida u jetri ne samo da umanjuje glukoneogenezu nego guši imunosne funkcije hepatocita (Holtenius i Holtenius, 1996). Kod ketoze tipa II, tkiva ne reagiraju na inzulin zbog razvoja inzulinske rezistencije. Inzulinska rezistencija nastaje kada stanice u tijelu, poput mišićnih, jetrenih i masnih stanica, postanu manje osjetljive na djelovanje inzulina. U peripartalnom periodu, krave često ulaze u stanje negativne energetske ravnoteže, što uzrokuje pojačanu mobilizaciju masti iz adipocita, što ima za posljedicu povećanje SMK u krvotoku. Visoke razine SMK mogu smanjiti osjetljivost tkiva na inzulin, te ometaju normalni signalni put inzulina unutar stanica, što dovodi do smanjene sposobnosti stanica da uzimaju glukozu iz krvi, čak i u prisutnosti inzulina. Masti mogu smanjiti sposobnost jetre da pravilno reagira na inzulin, što smanjuje inhibiciju glukoneogeneze i dovodi do povećane proizvodnje glukoze, unatoč visokim razinama inzulina. Pojačana mobilizacija masti i nakupljanje lipida u tkivima mogu pokrenuti upalne procese. Ovi upalni procesi dodatno pogoršavaju inzulinsku rezistenciju, jer proinflammatorni citokini (poput TNF- α) koji se oslobađaju tijekom upale mogu interferirati s inzulinskim signaliziranjem. Hormoni poput kortizola (hormon stresa) mogu dodatno pogoršati inzulinsku rezistenciju. Kortizol smanjuje osjetljivost stanica na inzulin i potiče glukoneogenezu, što doprinosi hiperglikemiji i smanjenoj osjetljivosti na inzulin. Iz gušterače, inzulin je transportiran putem portalne vene do jetre. Većina izlučenog inzulina uklanja jetra i to 60% kod krava u laktaciji i 85% kod

krava u suhostaju. Masne kiseline i masti inhibiraju uklanjanje inzulina u jetri, što rezultira hiperinzulemijom. Zbog smanjenog vezanja inzulina u jetri, proizvodnja glukoze može biti povećana i metabolički put masnih kiselina može biti zamijenjen, pa tako umjesto lipogeneze masne kiseline završe u ketogenezi (Oetzel, 2007).

4.3. Alimentarna ketoza

U nekim stadima ketoza postaje problem jer je uzrokovana silažom koja sadrži puno ketogenih tvari, prvenstveno maslačnu kiselinu. Travne sjenaže koje su silirane s previše vlage ili sadrže malo vodotopivih ugljikohidrata. To pogoduje rastu bakterija roda *Clostridium* sp. Te bakterije fermentiraju ugljikohidrate u maslačnu kiselinu. Kukuruzna silaža ili silirano zrno kukuruza rijetko podržavaju rast *Clostridia* iz razloga što sadrže puno vodotopivih ugljikohidrata isto kao i ljuļjevi. Silaže koje su podvrgnute fermentaciji *Clostridia* lako se prepoznaju, zato što imaju oporan miris po maslačnoj kiselini i raspadanju proteina, odnosno po amonijaku. Oetzel (2007) navodi kako dnevne doze maslačne kiseline preko 50 do 100 g mogu uzrokovati ketozu, dok količine od 200 g uzrokuju teški oblik ketoze. Količina od 450 do 950 g uzrokuje također težak oblik ketoze kod gotovo svake krave u ranoj laktaciji. Nadalje, isti autor navodi kako današnje visoko produktivne krave imaju veću nasljednu predispoziciju za ketozu. Isto tako navodi se da podaci o količini maslačne kiseline koja može biti uzrokom pojave ketoze su okvirni jer je teško točno odrediti koliko svaka krava može podnijeti maslačne kiseline. Krave mogu metabolizirati maslačnu kiselinu nastalu buražnom fermentacijom (otprilike 750 g/d) u najvećoj mjeri koristeći ju kao metaboličko gorivo u buražnoj muskulaturi. Otprilike 75% maslačne kiseline koja je unesena hranom se konvertira u 3BH i direktno uzrokuje ketozu. Jetra zatim može konvertirati 3BH u AcAc i obratno.

Tablica 4.3.1. Podjela ketoze

Opis	Tip ketoze		
	Tip I	Tip II	Alimentarna ketoza
	Spontan, mršave jedinke	Debele krave, masna jetra	Mokra silaža
3BH u krvi	Vrlo visok	Visok	Vrlo visok
SMK u krvi	Visoke	Visoke	Normalne ili visoke
Glukoza u krvi	Niska	Niska, moguće visoka u početku	Varijabilno
Inzulin u krvi	Nizak	Nizak, moguće visok u početku	Varijabilno
Tjelesna kondicija	Mršava	Debela	Varijabilno
„Sudbina“ SMK	Ketonska tijela	Trigliceridi	Varijabilno
Glukoneogeneza u jetri	Visoka	Niska	Varijabilno
Promjene na jetri	Nema	Nakupljanje masti	Varijabilno
Period s najvećim rizikom	3-6 tjedana poslije telenja	1-2 tjedna poslije telenja	Varijabilno
Prognoza	Izvrсна	Loša	Dobra
Ključni dijagnostički test	Mjerenje 3BH poslije telenja	Mjerenje 3BH prije telenja	Analiza HMK u silaži
Ključna intervencija	Hranidba i menadžment poslije telenja	Hranidba i menadžment prije telenja	Uništavanje, razrjeđivanje takve silaže

Izvor: Oetzel, 2007.

4.4. Sindrom masne jetre

Masna jetra pojavljuje se kada su serumske koncentracije masnih kiselina povišene. Gerloff i Herdt (1986.) obavili su nekoliko biopsija jetre i to na kravama u kasnom graviditetu i u ranoj laktaciji te došli su do slijedećeg zaključka. Koncentracije masti u jetri počinju se povećavati tijekom kasnog graviditeta, sa vrhom u prva tri tjedna laktacije. Mast kod krava, koja se počela nakupljati u kasnom graviditetu i njezin intenzitet određuju težinu bolesti nakon telenja, odnosno što ranije započne nakupljanje masti u jetri slučaj će biti teži. Masna jetra se pojavljuje kada su koncentracije masnih kiselina povećane, a proizvodnja lipoproteina u jetri mala ili reducirana. Debljina tijekom gravidnosti često se povezuje sa sindromom masne jetre, ali iako je to čest slučaj, masnu jetru mogu razviti i krave normalne tjelesne mase. Masna jetra je ipak više povezana sa stupnjom i brzinom gubitka tjelesne mase, nego sa debljinom. Gubitak tjelesne mase posljedica je lipolize u adipocitima. Velika skladišta masti kod krava uzrokuju veliki gubitak apetita, odnosno osjećaj sitosti u kasnoj gravidnosti, zato su one u predispoziciji za nastanak masne jetre.

Jetra sa visokom koncentracijom triglicerida ima zaobljene rubove, povećana je i promijenjene je boje. Boja varira od blijede u lakšim slučajevima, do žuto-naračaste u teškim slučajevima. Tkivo je krhko i masno i pluta u formalinu. Histološki masna jetra se karakterizira kao prisutnost velikih kapljica masti u centralnim regijama lobula jetre i malim kapljicama na periferiji lobula. Povećan je volumen hepatocita, smanjen volumen organela i reduciran broj endoplazmatkih retikuluma, te se događaju promjene na mitohondrijima. Serumske koncentracije SMK kao i glukoze i aspartat aminotransferaze, najbolji su pokazatelji masne jetre, te se kao takvi preporučuju u preventivnom otkrivanju u mliječnim stadima. Ketonska tijela u serumu i urinu obično su blago povišena, ali korelacija između koncentracije masti u jetri i ketonskih tijela u krvi je jako slaba. Koncentracija glukoze u krvi obično je blago snižena u slučajevima masne jetre, ali stupanj hipoglikemije slabo je povezan s koncentracijom masnoće u jetri. Biopsija jetre je jedini pouzdani način utvrđivanja masne jetre. Sadržaj masti u uzorku može biti mjereno kemijski, histološki ili testom plutanja. Životinje s koncentracijama lipida u jetri većim od 35 % praktički nemaju histološki normalno tkivo jetre i biti će klinički bolesne, te nemaju velike izgleda za preživljavanje. Grla sa 25 do 35 % zahvaćenosti jetre često, ali ne i uvijek imaju kliničke znakove. Hoće li životinje u ovoj kategoriji postati klinički pogođene vjerojatno ovisi o ozbiljnosti prisutnih bolesti i oštećenja te vjerojatno postoji interakcija između stresa i koncentracije masnoće u jetri koja određuje hoće li se bolest razviti ili ne. Važno je procijeniti sadržaj masnoće u jetri u svim slučajevima sumnje na kliničku masnu jetru, jer su znakovi ovog stanja nejasni i često su povezani s drugim prisutnim bolestima. Klinička masna jetra često se dijagnosticira izostankom drugih objašnjenja za stanje krave koje se ne može utvrditi fizičkim pregledom. To je neprikladno, sve krave u postporođajnom razdoblju koje ne reagiraju na liječenje uobičajenih bolesti nemaju nužno tešku masnu jetru (Herdt, 1988). Nema posebnog i utvrđenog lijeka za masnu jetru, ali postoje terapije koje su dizajnirane tako da smanje mobilizaciju masnog tkiva

i potiču apetit i jako je važno liječiti sekundarna stanja. Intravenozna primjena glukoze, oralno davanje prekursora glukoze, davanje preparata sa sporo otpuštajućim inzulinom i farmakološki preparati niacina pridonose smanjivanju otpuštanja masnih kiselina iz adipocita. Prevencija masne jetre biti će opisana u poglavlju preventive.



Slika 4.4.1. Masna jetra
Izvor: Divers i Peek, 2008

4.5. Klinička slika ketoze

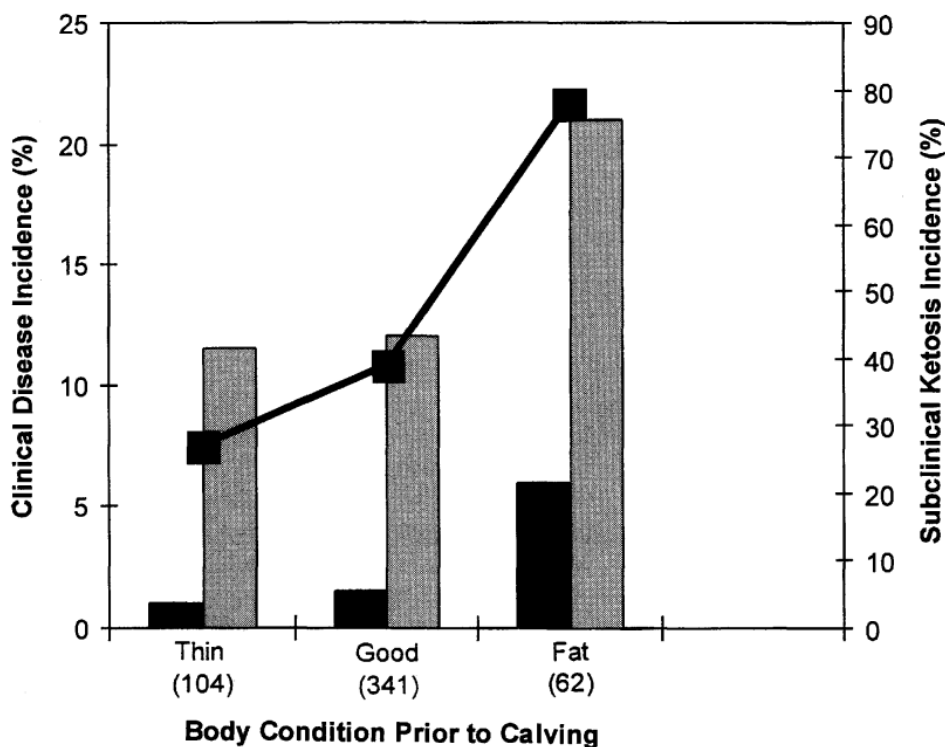
Krave oboljele od primarne ketoze imaju smanjen unos hrane. Ako se hrane pojedinačnim krmivima, onda preferiraju voluminozna krmiva, a odbijaju koncentratna. Temperatura, puls i disanje je normalno, iako u nekim slučajevima može biti ispod normalnog. Klinička ketoza ima vidljive simptome koji se pojavljuju 6 do 8 tjedana poslije telenja, a to su: anoreksija, lizanje i sljepoća, suha stolica, karakterističan miris po acetonu, rapidni gubitak kondicije i smanjenje proizvodnje mlijeka (Youssef i sur., 2010). Također, u rijetkim slučajevima, kod krava sa teškim oblikom ketoze mogu nastati smetnje u radu živčanog sustava, pa tako krave nenormalno ližu i žvaču predmete oko sebe, glasno muču i agresivne su. Mliječna mast oboljelih krava je privremeno povećana zbog visokih koncentracija 3BH i masnih kiselina u krvi. Kliničku ketozu je lako dijagnosticirati simptomima, dok sa subkliničkom ketozom to nije slučaj i može uzrokovati velike ekonomske gubitke. Krave koje imaju bilo koji oblik ketoze imaju veliki rizik od nastanka drugih bolesti, kao što su najčešće dislokacija sirišta i problemi s reprodukcijom (McArt, 2024).



Slika 4.5.1. Krava s kroničnom ketozom
Izvor: Divers i Peek, 2008.

4.6. Rizični faktori za nastanak subkličke ketoze

Važni faktori koji uzrokuju pojavu subkličke ketoze uključuju stado, redosljed laktacije, tjelesnu kondiciju, genetiku i godišnje doba. Tjelesna kondicija (*Body condition score (BCS)*) prije telenja je važan faktor za nastanak ketoze. Dohoo i Martin (1984) navode kako prethodni produženi interval telenja povećava šanse za nastanak subkličke ketoze. Duffield i sur. (1998) navode kako pretile krave (BSC 4 i više) imaju visoke koncentracije 3BH poslije telenja i veliki rizik za razvoj subkličke ketoze u usporedbi s kravama s umjerenom tjelesnom kondicijom. Razlike u raspodjeli debelih, umjerenih i mršavih krava unutar stada mogu također objasniti razlike u pojavi subkličke ketoze među stadima. Povezanost između tjelesne kondicije prije telenja i subkličke ketoze, kliničke ketoze i mnogobrojnih bolesti koje se javljaju poslije telenja prikazano je na slici 4.6.1. Genetska osnova je također potencijalni izvor varijacija među stadima. Andersson i Emanuelson (1985.) otkrili su da su krave švedske crveno-bijele (*Swedish Red and White Breed*) pasmine imale značajno više razine acetona u mlijeku u usporedbi sa švedskim frizijkama (*Swedish Friesian*). Procjene heritabiliteta za subkličku ketozu variraju, što znači da je genetska komponenta u ketozi različita ovisno o studiji ili populaciji koja se istražuje. U slučaju subkličke ketoze, procjene heritabilnosti su često niske do umjerene, što sugerira da na pojavu bolesti utječu i genetski i okolišni faktori. Dohoo i Martin (1984.) izračunali su da je heritabilitet za kliničku ketozu 0.32, a za subkličku ketozu nisu pronašli genetsku povezanost. Tveit i sur. (1992.) navode da je heritabilitet za koncentraciju serumskog AcAc 0.11, sa genetskom korelacijom za količinu mlijeka od 0.87 kod norveškog crvenog goveda (*Norwegian Red*). Godišnje doba utječe na stupanj izraženosti ketoze. Norveške studije pronašle su povećanu razinu AcAc u plazmi koja se povećavala svakim mjesecom od kolovoza do prosinca, te da je rizik za kliničku ketozu veći tijekom hranjenja u štali od rujna do svibnja (Tveit i sur., 1992). Također autori Dohoo i Martin (1984.) su naveli kako su koncentracija 3BH i veća mogućnost za ketozu u ljetnim mjesecima što je povezano sa smanjenjem unosa hrane, toplinskim stresom, promjenom krmiva i smanjenim menadžmentom od lipnja do rujna.



Slika 4.6.1. Utjecaj tjelesne kondicije na pojavu subkliničke ketoze

Veza između tjelesne kondicije (BSC) prije telenja i mogućnost obolijevanja od subkliničke ketoze (kvadrati), kliničke ketoze (crni stupci) i druge bolesti (sivi stupci). Istraživanje je provedeno na 507 krava holštajn pasmine u Kanadi. Mršava kondicija (BSC 3), dobra kondicija (BSC 3.25 – 3.75) i debela kondicija (više od 4).

Izvor: Duffield 2000.

4.7. Utjecaj ketoze na komponente mlijeka

Općenito, postoji poveznica između ketoze i smanjenja proizvodnje mlijeka. Kako bi se procijenila hranidba, konverzija hranjivih tvari i metabolizam, važno je proučiti omjer mliječne masti i mliječnih proteina. Idealni omjer mliječna masti/mliječni protein (M/P) je 1.2 – 1.4. Niže vrijednosti upućuju na to da je prisutna subklinička acidoza buraga, koja može dovesti do reproduktivnih problema i poremećaja metabolizma minerala. Veći omjer M/P od 1.4 signalizira deficit energije i subkliničku ketozu, ako su paralelno prisutna ketonska tijela. Također kvaliteta mlijeka kod krava sa ketozom je umanjena. Mlijeko sa visokim koncentracijama ketonskih tijela ima gorak okus i zagara prilikom toplinskog procesa obrade (Čejna i Chládek, 2005). Richardt (2004) navodi kako je omjer M/P dobra metoda za kontrolu subkliničke ketoze kod individua, ali ne i kod stada.

5. Dijagnosticiranje ketoze

Koncentracije ketonskih tijela u krvi, urinu i mlijeku korištene su za dijagnosticiranje ketoze dugi niz godina. „Zlatni standard“ za uspostavljanje dijagnoze je koncentracija 3BH u krvi, zato što je prevladavajuće ketonsko tijelo kod preživača, te je mnogo stabilniji od AcAc i acetona. Za subkliničku ketozu granica koja potvrđuje subkliničku ketozu je $\geq 1400 \mu\text{mol/L}$ 3BH, dok je za kliničku ketozu ta granica viša i iznosi $\geq 3000 \mu\text{mol/L}$ 3BH. Za uzimanje uzoraka nema mnogo specifičnih zahtjeva, ali kod određivanja koncentracije 3BH krv se ne uzima iz mamarne vene, jer vime ima tendenciju uzimanja 3BH i otpuštanja AcAc, zato je u mamarnoj veni koncentracija 3BH niža i uzorak nije reprezentativan. Za dijagnosticiranje ketoze danas postoje različiti brzi testovi koji se provode na farmama i laboratorijske metode, koje u najvećoj mjeri služe u istraživačke svrhe. Neke od laboratorijskih metoda su fluorometrijska determinacija, plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS) i nuklearna magnetska rezonancija (NMR). Brzi testovi najčešće dolaze u obliku trakica, štapića, tableta i praha koji sadržavaju određeni reagens, a mogu se koristiti u mlijeku, urinu i krvi. U brze testove se ubraja i ketometar, uređaj koji uz pomoć senzora detektira koncentraciju ketonskih tijela (Zhang i Ametaj, 2020).

5.1. Brzi test za ketozu - *Cow-side tests*

Testovi za ketozu koji se provode neposredno „uz kravu“ (*cow-side tests*) koriste se za brzo i jednostavno otkrivanje ketoze na terenu odnosno u staji. Ovi testovi mogu uključivati mjerenje koncentracije 3BH ili acetona u mlijeku, krvi ili urinu krava, a mogu se koristiti kao dijagnostički alati za ranu detekciju ketoze i praćenje metaboličkog stanja krava tijekom laktacije. Ovakvi testovi imaju za prednost nižu cijenu, odmah dostupan rezultat, te zahtijevaju manje rada u usporedbi s laboratorijskim analizama. Sve tri tjelesne tekućine (krv, urin i mlijeko) pogodne su za brze testove na ketozu. Također postoji prijenosni biosenzor za mjerenje ketonskih tijela u krvi, koji je često korišten uređaj za dijagnozu ketoze kod tek oteljenih krava, a temelji se na određivanju koncentracije 3BH u krvi. Za kontrolu ketoze u stadu dostupni su razni „brzi“ testovi, ali niti jedan nema savršenu osjetljivost i specifičnost kao dijagnoza na temelju koncentracije 3BH u krvi. Testiranje stada na ketozu zahtjeva više različitih strategija testiranja u usporedbi s dijagnostičkim odlučivanjem za već bolesne krave. U kontekstu dijagnosticiranja ketoze, osjetljivost i specifičnost odnose se na učinkovitost dijagnostičkog testa u prepoznavanju bolesti. Osjetljivost (senzitivnost) testa predstavlja njegovu sposobnost da ispravno identificira oboljele krave, npr. osjetljivost od 58% znači da će test ispravno identificirati 58 od 100 krava koje su oboljele od ketoze. Drugim riječima 42% krava koje imaju ketozu ostat će „neotkrveno“ (lažno negativni rezultat). Specifičnost testa predstavlja njegovu sposobnost da ispravno identificira krave koje nisu oboljele, npr. specifičnost od 69% znači da će test ispravno prepoznati 69 od 100 krava koje nisu oboljele od ketoze.

Preostalih 31% će biti pogrešno identificirano kao oboljele (lažno pozitivni rezultati). Ukratko, osjetljivost se odnosi na to koliko dobro test prepoznaje bolesne krave, dok se specifičnost odnosi na to koliko dobro test prepoznaje zdrave krave (Oetzel, 2007). Najviše koncentracije 3BH su 4 sata poslije hranjenja. Andersson (1988) je ustanovio da aceton u mlijeku čini 95% ukupnog acetona krvi, acetoacetat 45% ukupnog iz krvi dok je vrijednost acetoacetata u krvi iznosila 13% od vrijednosti 3BH u krvi.

5.2. Testiranje urina na ketozu

Puno je teže sakupiti urin nego mlijeko. Acetoacetat u urinu može se odrediti kvantativno uz pomoć nitropursid tableta i ovaj test ima izvrsnu osjetljivost i slabu specifičnost što ovaj test čini izvrsnim za individualno testiranje, ali nije pogodan za stada. Od brzih testova za urin koriste se semi-kvantativne trake/štapići, koji mjere AcAc. Produženo djelovanje reagensa, na uzorak može dati lažno pozitivne rezultate (Zhang i Ametaj, 2020). Od uranjanja testa u urin treba proći točno 15 sekundi i zatim se očitava rezultat. Carrier i sur. (2003) navode kako se manje koncentracije očitane sa rezultata, ne bi trebale zanemarivati s obzirom na to da tretmani glukozom nisu skupi, a to može spriječiti dovođenje organizma u stanje ketoze.

5.3. Testiranje mlijeka na ketozu

Testovi koji se rabe u mlijeku imaju višestruke prednosti u odnosu na testiranje urina, ali je u drugu ruku test manje osjetljiv nego kad se radi testiranje urina. Brzi test na ketozu iz mlijeka ima prednost u odnosu na testiranje urina i krvi, zbog lakog sakupljanja uzorka mlijeka svih jedinki u stadu za vrijeme mužnje. Nitropursid prah može se koristiti za kvantativan test mlijeka na AcAc. On ima jako malu osjetljivost i nije prigodan za testiranje stada. Najbolji brzi test mlijeka na ketozu daju 3BH semi-kvantativni štapići. Oetzel (2007) u svom istraživanju je utvrdio kako u slučaju kritične točke od $\geq 100 \mu\text{mol/L}$, test je otprilike 83% osjetljiv i 82% specifičan. Kod individualnog korištenja s točkom od $\geq 50 \mu\text{mol/L}$, test osigurava bolju senzitivnost, ali isto tako dalje lažno pozitivne rezultate s učestalosti 69%. Unatoč svim prednostima brzog testiranja neusporedivo bolje i kvalitetnije testiranje se obavlja uz pomoć „zlatnog standarda“ određivanja koncentracije 3BH u krvi.

Novije generacije brzih testova više su senzitivni i uz pomoć senzora mogu odrediti sastav mlijeka i omjer mliječne masti i proteina (M/P). Istraživanje koje su proveli Jenkins i sur. (2015) odredili su koji pragovi omjera mliječna mast/protein određuju ketozu. Omjer mliječna mast/protein > 1.33 rezultira niskom osjetljivošću (58%) i specifičnošću (69%). Najbolji prag u ovoj studiji bio je omjer M/P veći od 1,42, što je rezultiralo osjetljivošću od 92% i specifičnošću od 65%. Ovi podaci upućuje na to da omjer M/P u mlijeku pokazuje da u stvarnom vremenu kod 8 krava izostaje subklinička ketoza na svakih 100 krava, te ima visoku stopu lažno pozitivnih

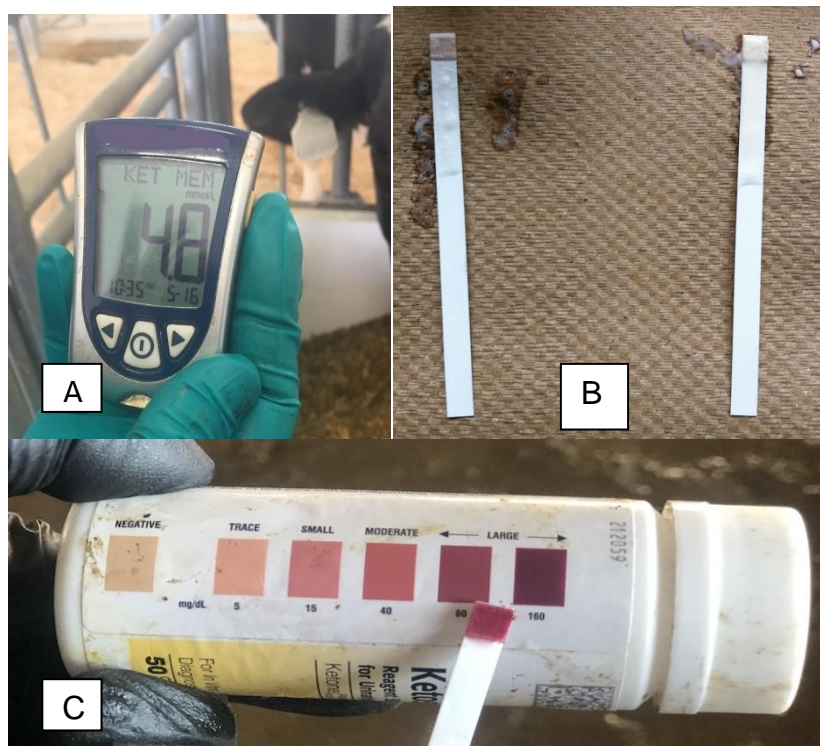
rezultata, jer 68% krava s omjerom M/P većim od 1,42 zapravo ne boluje od subkliničke ketoze. Meta-analitička studija koju su proveli Tatone i sur. (2016) usporedila je točnost triju testova, uključujući test za mjerenje 3BH u krvi, te dva polukvantitativna testa za ketonska tijela u mlijeku i urinu. Autori su zaključili da mjerenje 3BH u krvi ima najvišu ukupnu točnost među dostupnim testovima na farmi za otkrivanje ketoze, s pragom od 1,2–1,4 mmol/L. Navedeni autori su također zaključili da su potrebna daljnja istraživanja kako bi se potvrdile tehnologije automatskog testiranja mlijeka. FTIR (Fourierova transformacijska infracrvena spektroskopija) može se integrirati u *inline* sustave na farmama ili pružiti putem usluga specijaliziranih tvrtki. Međutim, studije koje su do sada provedene pokazale su velike varijacije u eksperimentalnim dizajnim, što otežava donošenje konačnih zaključaka. Potreban je veći broj standardiziranih studija koje koriste automatizirane tehnologije testiranja mlijeka kako bi se u potpunosti procijenila njihova korisnost u detekciji hiperketonemije. Primjerice, studija van Kneysel i sur. (2010) koristila je FTIR za mjerenje ketonskih tijela u mlijeku, uključujući aceton i 3BH, te omjer M/P u mlijeku. Autori su naveli da je mjerenje acetona i 3BH u mlijeku imalo osjetljivost od 80% za otkrivanje ketoze, u usporedbi sa 66% za omjer M/P u mlijeku. Međutim, tri FTIR testa (3BH, aceton i omjer M/P) imala su sličnu specifičnost, koja je iznosila redom 71%, 70% i 71%. S obzirom na visoku stopu lažno pozitivnih rezultata, praktična primjena FTIR testova ne bi bila preporučljiva dok se ne razvije bolji test. Studija koju su proveli Jorjong i sur. (2015) istražila je potencijal masnih kiselina u mlijeku kao dijagnostičkog alata za ketozu. Autori su mjerili 45 različitih masnih kiselina i omjere C15:0 (pentadekanska kiselina), C17:0 (margarinska kiselina) i omjera C18:1 cis-9 (oleinska kiselina) prema C15:0 u mlijeku mliječnih krava. Krave su bile klasificirane kao oboljele (3BH > 1,2 mmol/L) ili zdrave (3BH < 1,2 mmol/L) na temelju razine 3BH u krvi. Utvrđeno je da je omjer C18:1 cis-9 prema C15:0 bio najdiskriminirajuća varijabla za dijagnozu ketoze. Rezultati studije također su pokazali da je 90% zdravih krava imalo omjer C18:1 cis-9 prema C15:0 od 40 ili niži, dok je 70% oboljelih krava imalo omjer veći od 40. Glavni problem primjene ovog otkrića jest da još ne postoji metoda za mjerenje C15:0 u mlijeku. Autori Andersson i Emanuelson (1985) koristi su prag od 400 $\mu\text{mol/l}$ (4mg/dl) acetona u mlijeku za određivanje ketoze. Ova koncentracija acetona od 4 mg/dl bila bi jednaka koncentraciji 3BH od 15 mg/dl.

5.4. Testiranje krvi na ketozu

Subklinička ketoza može nastupiti sa koncentracijama 3BH 1000 $\mu\text{mol/l}$ (10.4 mg/dl) i klinička ketoza sa serumskom koncentracijom 3BH iznad 2 600 $\mu\text{mol/l}$ (27 mg/dl), ali pri kojoj će koncentraciji točno svaka individua pokazati simptome jako je varijabilno. Koncentracija 3BH u plazmi iznad 1400 $\mu\text{mol/l}$ (15 mg/dl) u kombinaciji sa koncentracijom glukoze manjom od 3.0 mmol/l (55 mg/dl) koristi se za klasifikaciju krava sa lošim energetske statusom. Nadalje, Baird (1982) je predložio prag od 500 $\mu\text{mol/l}$ (5,0 mg/dl) aceoacetata u krvi za određivanje hiperketonemije. Za brzi test krvi na ketozu koristi se mjerni uređaj, ketometar/glukometar, koji može izmjeriti ukupnu glukozu u krvi i ukupnu koncentraciju 3BH. Korištenje je jednostavno, na mjerno mjesto kapne se nekoliko kapljica krvi i rezultat je gotov za 15 sekundi. Dijagnosticiranje ketoze u stadu zahtjeva potpuno drugačiji pristup od individualnog dijagnosticiranja. Testiranja u stadu vrše se na minimalno 12 jedinki, testiranje manje od toga nije prikladno, za ovakav oblik testiranja. Taj broj od minimalno 12 jedinki mora biti reprezentativan, odnosno ta grla moraju biti rizična na ketozu i mjerenja se obavljaju 5 do 50 dana laktacije u uzorku mlijeka i zatim se procjenjuje udio krava iznad granične vrijednosti od 14.4 mg/dl. Alarmantni broj krava koje ukupno budu prelazile granicu nije strogo definiran, ali Oetizel (2007) navodi kako je 10% alarmantna brojka.

5.5. Ostali načini testiranja

Rutinsko testiranje mlijeka na subkliničku ketozu moguće je provesti u centralnim laboratorijima za mlijeko i praktična je metoda za praćenje energetskeg statusa stada. Uređaj Fossomatic 4000 ima mogućnost mjerenja koncentracije citrata u mlijeku. Citrat igra veliku ulogu u cijelom energetskeg metabolizmu kao ključna komponenta ciklusa limunske kiseline, ali biološka uloga citrata u mlijeku je uglavnom nepoznata. Teoretski niske razine citrata trebale bi biti prisutne zbog niske razine oksaloacetata, ali nije se ustanovila poveznica sa subkliničkom ketozom i nije trenutno primjenjivo u dijagnosticiranju ketoze, u jednu ruku zbog promjena u postotcima mliječne masti i mliječnih proteina tijekom subkliničke ketoze (Duffield, 2000).



Slika 5.5.1.

A: Brzi test krvi uz pomoć ketometra, B: Brzi test mlijeka trakicama, lijeva trakica pokazuje pozitivan rezultat, desna negativan i C: Brzi test urina s pozitivnim rezultatom. Izvor: McArt 2024

5.6. Laboratorijske metode

Metabolomika je novi pristup dijagnostici ketoze. NMR (nuklearna magnetska rezonancija) spektroskopija i MS (masena spektrometrija) ključne su tehnologije u metabolomici, omogućujući preciznu identifikaciju i kvantifikaciju metabolita, što je ključno za razumijevanje kompleksnih bioloških procesa i razvoj novih dijagnostičkih alata (Van der Drift i sur., 2012). NMR spektroskopija i MS-bazirana metabolomika predstavljaju relativno novu "omiks" znanost, koja se definira kao sveobuhvatna i potpuno kvantitativna analiza svih detektabilnih metabolita (molekula male molekularne mase, MW < 1500 Daltona) unutar određenog biološkog uzorka, kako bi se dobio cjelovit pregled metaboličkog statusa. Ova analiza pruža nove uvide u patofiziološke mehanizme bolesti. Metabolomika je „moćan alat“ u otkrivanju etiologije bolesti, novih biomarkera za detekciju, te služi za praćenje i detekciju složenih bolesti. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) spektroskopija i tehnike masene spektrometrije (MS) najčešće su korištene analitičke platforme za studije metabolomike, iako se koriste i drugi analitički alati. MS detekcija obično se integrira s drugim tehnikama kemijske separacije kao što su plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija (LC) ili kapilarna elektroforeza (CE). Korištenje ovih platformi omogućilo je istraživačima proučavanje metaboličkih profila koristeći biološke tekućine poput krvi (serum/plazma), urina, mlijeka, sline i cerebrospinalne tekućine. Analiza metabolomike općenito se klasificira u dvije eksperimentalne strategije, tj. ciljane i neciljane (*non-targeted*) metabolomika, temeljene na cilju istraživanja (Dunn i sur., 2011). Ciljana metabolomika uključuje kvantifikaciju definirane skupine biokemijski poznatih i kemijski karakteriziranih metabolita, dok neciljana (*non-targeted*) metabolomika obuhvaća globalnu, nepristranu kvalitativnu analizu što većeg broja mjerljivih malih molekula metabolita prisutnih unutar biološkog uzorka, uključujući nepoznate spojeve (Naz i sur., 2014; Roberts i sur., 2012). Teoriju NMR-a (nuklearne magnetske rezonancije) izvorno je predložio Wolfgang Pauli 1924. godine, a NMR spektroskopija prvi put je razvijena i korištena za mjerenje NMR fenomena 1946. godine od strane istraživača na sveučilištima Stanford i M.I.T. u SAD-u (Bloch i sur., 1946). Od tada su kemičari počeli primjenjivati ovu tehnologiju za rješavanje kemijskih problema, kao što je karakterizacija detaljne kemijske strukture velikih i malih molekula. U posljednjim godinama, NMR tehnologija naširoko se koristi u studijama metabolomike za određivanje strukture i kvantifikaciju metabolita (Lane, 2012). NMR tehnologija temelji se na činjenici da određene jezgre atoma (npr. ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N , ^{19}F , itd.) imaju magnetska svojstva (tj. spin koji generira malo, lokalno magnetsko polje) koje može proizvesti kemijske informacije. NMR spektar može pružiti mnogo informacija o kemijskoj strukturi čistih tvari ili kemijskom sastavu složenih mješavina uzoraka. Protonska (^1H) NMR spektroskopija najpopularnija je u istraživanjima metabolomike jer je vodik prirodno prisutan u gotovo svim organskim molekulama. Jednodimenzionalni (1D) i dvodimenzionalni (2D) NMR pristupi najčešće se primjenjuju za određivanje poznatih, neočekivanih, pa čak i nepoznatih metabolita. Međutim, najčešći, najbrži i najjednostavniji NMR eksperimenti u studijama metabolomike uključuju prikupljanje 1D-NMR spektara.

NMR spektroskopija prepoznata je kao jedan od vrhunskih pristupa za analizu višekomponentnih smjesa zbog svojih mnogih prednosti, uključujući jednostavnu pripremu uzoraka, univerzalnu detekciju (široki spektar različitih klasa metabolita), relativno brz postupak (više od 100 uzoraka je moguće analizirati dnevno) i niske troškove (nakon početnih troškova kupnje i instalacije). Najveći nedostatak NMR-a je visoka cijena samog uređaja i njegova slaba osjetljivost u usporedbi s masenom spektrometrijom. Razni pristupi masene spektrometrije omogućuju kvantitativno i kvalitativno određivanje metabolita iz malih uzoraka biološkog materijala (Dettmer i sur., 2007). Ukratko prvi korak MS-a je generiranje plinske faze iona molekule koja se istražuje pomoću ionizacijskog izvora (elektronska ionizacija, kemijska ionizacija, elektrosprej ionizacija (ESI) i laserska desorpcija uz pomoć matriksa (MALDI)). Nakon toga, ionska faza u plinu treba biti razdvojena prema omjeru masa-naboj i detektirana pomoću analizatora mase. Kako postoje različiti izvori ionizacije, dostupno je nekoliko tipova analizatora mase. Svaki analizator mase ima svoje prednosti i nedostatke. Svaki od njih koristi dinamično ili statično magnetsko ili električno polje, koje se može koristiti pojedinačno ili u kombinaciji. Najveći nedostatak masene spektrometrije je dugotrajna priprema uzorka (npr. ekstrakcija i derivatizacija) za analizu pri čemu može doći do gubitka metabolita i mnogi specifični metaboliti mogu biti „ignorirani“ ili „diskriminirani“ prilikom analize. Masena spektrometrija često se koristi u kombinaciji s prethodnim modalitetima separacije, poput plinske kromatografije (GC), tekućinske kromatografije (LC) i kapilarne elektroforeze (CE). U literaturi se navodi kako se koristi i direktno ubrizgavanje (DI) seruma ili urina u uređaj masene spektrometrije (Boernsen i sur., 2005).

5.6.1. Baze podataka metabolomike i bioinformatički alati za metabolomiku

Osim nedavnih inovacija u instrumentaciji, alati za bioinformatiku i metabolomičke baze podataka ključni su za nepristranu, visokoprotočnu i sveobuhvatnu analizu metabolita. U metabolomici i NMR i MS podatci su sačinjeni od tisuće signala koje su proizvele na stotine malih molekula. Analiza takvih složenih podataka izuzetno je izazovna i zahtijeva puno vremena. Paralelno s razvojem analitičkih tehnika, istraživači u metabolomici su razvili različite metabolomske baze podataka i računalne alate. Baza podataka pod nazivom *Human Metabolome Database* (HMDB, <http://www.hmdb.ca>) trenutno je u svijetu jedina baza koja je u najvećoj mjeri dovršena i sveobuhvatna, te sadrži najviše trenutno poznatih ljudskih metabolita (Wishart i sur., 2013). U skorije vrijeme je nadograđena i proširena, pa tako sad od prethodno 6 500 poznatih metabolita sadržava 41 993 metabolita, koji uključuju i vodotopive metabolite i metabolite topive u mastima kao i metabolite koji su ili prisutni u velikim količinama (>1 μM) ili relativno rijetki. Cilj BMDB-a (*Bovine Metabolome Database*) je uspostaviti sveobuhvatnu, slobodno dostupnu elektroničku bazu podataka svih detektibilnih metabolita kod mliječnih i mesnih goveda. Informacije koje su pohranjene sadrže literaturu i eksperimentalne rezultate dobivene iz seruma, urina, mlijeka, buražne tekućine i mesa goveda (Xia i sur., 2012). Uz pomoć

tekućinske kromatografije otkriveno je u plazmi nekoliko biomarkera uključujući aminokiseline, ugljikohidrate i masne kiseline. GC-MS bazirana (plinska kromatografija i masena spektrometrija) metabolomika krvi korištena je za razlikovanje metaboličkih promjena kod krava s kroničnom ketozom, subkliničkom ketozom i zdravih krava (Zhang i sur., 2013). Identificirani su različiti metabolički putevi povezani s razvojem ketoze, uključujući metabolizam aminokiselina, metabolizam masnih kiselina, glukoneogenezu, glikolizu i put pentoza fosfata. U drugom nedavnom istraživanju, metabolomika plazme bazirana na NMR-u korištena je za razlikovanje krava s kliničkom i subkliničkom ketozom od zdravih krava. U svom istraživanju Sun i sur. (2013) utvrdili su da je 25 metabolita, uključujući acetoacetat, aceton, mliječnu kiselinu, glukozu, kolin, glutaminsku kiselinu i glutamin, različite koncentracije u svakoj od tri grupe (kontrolna grupa, grupa s kliničkom ketozom i grupa sa subkliničkom ketozom). U drugom istraživanju temeljeno na analizama plinske kromatografije, Li i sur. (2014) zaključili su da koncentracije valina, glicina, glikoholne kiseline, tetradecenoične kiseline i palmitoleinske kiseline znatno povišene kod krava zahvaćenih kliničkom ketozom. U drugu ruku koncentracije arginina, aminobuterne kiseline, leucina, izoleucina, triptofana, kreatinina, lizina, norkortinina i undekanske kiseline drastično smanjene. U nedavnom istraživanju autori Xu i sur. (2015) izveli su drugačije metaboličke profile određujući ih za ketozu Tip I i ketozu Tip II koristeći $^1\text{H-NMR}$ analizu. Tip I je u usporedbi s Tip II imao veće koncentracije acetona, acetoacetata, 3BH, izoleucina, leucina, lipoproteina male gustoće (LDL), valina i VLDL-a, te niže koncentracije α -glukoze, β -glukoze, citrata, kreatina, formijata, glutamina, glutamata, glicina, histidina, lizina, O-acetil glikoproteina, fosfoholina, fenilalanina i tirozina. Rezultat ovog istraživanja indicira da postoji drugačiji put patofiziologije za tip I i tip II ketozu.

6. Liječenje ketoze

Liječenje ketoze usmjereno je na obnavljanje metabolizma energije. Najčešće korišten način liječenja uključuje davanje 500 ml 50%-tne dekstroze intravenozno (IV) jednom ili dva puta dnevno, primjena glukokortikoida (10 do 20 mg deksametazona, jednom) i davanje 300 ml propilen glikola oralno, jednom ili dva puta dnevno, kroz 5 dana. Hranidba u periodu liječenja treba sadržavati ječmeni kvasac koji će potaknuti apetit. Krave sa živčanim smetnjama, mogu se tretirati sa klor hidratom (40g dnevno, oralno), jer on sedira i služi kao supstrat za glukogene bakterije. Krave sa ketozom tijekom kasne gravidnosti, zahtjevaju brzu intervenciju kako bi se spriječila ireverzibilna lipidoza jetre i zakazivanje organa. Takvi slučajevi ponekad zahtijevaju inducirani porod ili carski rez, također neophodna je terapija dekstrozom i prisilno hranjenje. U slučaju da je terapija prekinuta, ketoza će se vratiti u roku 48h. Krave sa ketozom i masnom jetrom su komplicirani i teški slučajevi za liječenje. Krave sa kroničnom mobilizacijom masti i ketozom/lipidozom najčešće su najbolje u stadu i proizvode najviše mlijeka. Ovakvi slučajevi ne ozdrave „preko noći“ niti sa jednom terapijom. Terapija treba uključivati konstantnu 5% glukozu u izbalansiranoj otopini elektrolita sa 40 mEq kalij klorida na litru tekućine. Inzulin (200 IU cink protamin) treba davati subkutano svakih 24 do 36h, ako se koristi kontinuirana intravenozna primjena glukoze. Inzulin će potaknuti unos glukoze u periferna tkiva, što bi trebalo umanjiti lipolizu. Druga metoda za podizanje razine inzulina je davanje 250 ml glukoze intravenozno, dva puta dnevno. Niacin (12g oralno dnevno) isto tako smanjuje lipolizu i preporuča se svakodnevno kravama s kroničnom ketozom. Vitamini B kompleksa često se preporučuju (sporo IV) na dnevnoj bazi. Za krave s kroničnom mobilizacijom masti i lipidozom u jetri se preporuča i primjena 100g kalij klorida i malo buražnog sadržaja od zdrave krave.

Primjena glukoze ili dekstroze i.v. je uobičajena terapija za liječenje ketoze. Ovaj tretman čini se logičnim za bolest koja je karakterizirana niskim koncentracijama glukoze u krvi. Međutim, otopina glukoze, koja se daje brzom intravenskom injekcijom, neizbježno dovodi do prolazne hiperglikemije, što rezultira dijurezom i gubitkom velikog dijela primijenjene glukoze putem urina. Približno 80% unijete glukoze brzom i.v. injekcijom se izgubi u urinu, no onih preostalih 20% ima snažni učinak.

Brza intravenska infuzija glukoze u rasponu doza od 200 do 400 mg/kg (8-10 mg/kg/min u 60min) odmah povećava koncentracije glukoze u krvi na 300 do 400 mg/dL (Herdt i Emery, 1992).

Razina glukoze u krvi brzo pada na razinu prije infuzije za 2h, ali ipak primjena glukoze rezultira redukcijom glukoneogeneze i padom koncentracije ketonskih tijela u krvi. Ovakav odgovor rezultat je povećanja citrata u jetri i vjerojatno redukcija glukagona u plazmi, jer je to normalna pojava na hiperglikemiju. Također smanjuje se koncentracija SMK u krvi. Odgovor inzulina na glukozu kod krava s ketozom postoji, ali on je puno slabiji u odnosu na odgovor kod zdravi jedinki.

Šećeri i alkoholi šećera koji nisu glukoza, također se primjenjuju u liječenju ketoze. Fruktaza i sorbitol su najčešće korišteni. Oni se metaboliziraju do glukoze, a njihova navodna prednost u odnosu na glukozu je ta što ih u potpunosti preuzima jetra, a ne periferno tkivo. Dobivena glukoza dobivena metaboliziranjem ovih tvari koncentrira se u jetri gdje izaziva supresiju ketogeneze, puno efektivnije nego jednake doze glukoze dodane direktno koja se najviše metabolizira u ekstrahepatičnim tkivima.

Nekoliko je komponenti koje mogu poslužiti kao supstrat za glukoneogenezu, ako se primjenjuju oralno. A to su glicerol, propilen glikol i soli propionske kiseline. Od svih propilen glikol je najpraktičniji i najčešće korišten. Put prekursora glukoze je kroz ciklus limunske kiseline i primjena prekursora povećava unutarmitohondrijsku koncentraciju citrata, što rezultira reduciranjem ketogeneze koja se postiže smanjenjem ulaska masnih kiselina u mitohondrije. Iako je primjena propilen glikola više povezana sa prevencijom ketoze nego sa liječenjem. Ovi rezultati pokazuju da ravnoteža ugljikohidrata ima veći utjecaj na ketogenezu nego energetska ravnoteža. Kada postoji velika negativna ravnoteža ugljikohidrata, ulazak masnih kiselina u mitohondrije se stimulira. S druge strane, kada je ravnoteža ugljikohidrata pozitivnija, čak i uz isti stupanj negativne energetske ravnoteže, masne kiseline se usmjeravaju daleko od ketogeneze i koriste se izravno kao izvori energije. Propilen glikol primijenjen oralno, apsorbira se u buragu. Maksimalne razine u krvi vidljive su nakon 30 minuta od primjene, a maksimalna konverzija u glukozu odvija se 4h poslije primjene. Nakon primjene 400 g propilen glikola oralno, povećanje glukoze u krvi povećalo se na 20 mg/dl. Metabolizam propilen glikola odvija se preko konverzija u piruvat, zatim uz pomoć enzima piruvat karboksilaze pretvara se u oksaloacetat. Povećanje oksaloacetata, povećava sintezu citrata, te sprječava ketogenezu. Primjena propilen glikola u terapiji za krave s masnom jetrom nije istražena, ali se vjeruje da jetra nema veliki kapacitet za glukoneogenezu, jer je isti reduciran prisutnošću masti u jetri. Česti su slučajevi da krave sa osrednjom zamašćenošću jetre imaju istovremeno i ketozu, pa primjena propilen glikola i nebi bila toliko loša. Od svih terapija ketoze kod mliječnih krava glukokortikoidi su najbolja opcija u kliničkim slučajevima. Glukokortikoidi induciraju hiperglikemiju mijenjajući distribuciju i potrošnje glukoze, a ne glukoneogenezu. Glukokortikoidi karakteristično smanjuju proizvodnju mlijeka kod normalnih, laktirajućih krava, a stupanj supresije pozitivno je povezan sa stupnjem izazvane hiperglikemije. To sugerira da je smanjena upotreba glukoze za sintezu laktoze djelomično odgovorna za porast razine glukoze u krvi. Smanjena upotreba glukoze tijekom terapije glukokortikoidima kod preživača zapravo može rezultirati smanjenjem glukoneogeneze. Takvo smanjenje omogućava porast koncentracije međuprodukata Krebsova ciklusa, kao što su oksaloacetat i citrat, unutar mitohondrija, uz istovremeno smanjenje ketogeneze. Tri najčešće korištena glukokortikoida su 9-Flurprednisolone acetate (1,33mg/45kg), Dexamethasone (1.33mg/45kg) i Flumethasone (0.33 mg/45kg). Njihova primjena rezultira maksimalnom razinom glukoze u roku od 24h nakon primjene. Primjena hormona koji inducira hipoglikemiju za liječenje hipoglikemije može biti ironično, posebno kad se uzme u obzir da primjena inzulina kod zdravih krava može indicirati ketozu. Samo hipoglikemija i klinički znakovi ketoze su uzrokovani primjenom inzulina, ali ne i

hiperketonemija. Doduše inzulin je jaki antiketogeni hormon što sugerira da, ako se njegovi hipoglikemijski učinci mogu izbjeći, može biti vrijedan terapijski agens za liječenje ketoze. Antiketogeni efekti inzulina mogu proizaći iz jedne ili više od četiri različite akcije. Prvo, inzulin sprječava otpuštanje masnih kiselina iz adipoznog tkiva, drugo, potiče trošenje ketonskih tijela u perifernim tkivima i treće male koncentracije inzulina mogu blokirati ketogeni efekt glukagona. Ovaj posljednji efekt inzulina je važan jer povećava koncentraciju malonil CoA, što dovodi do blokiranja ulaska masnih kiselina u mitohondrije. Terapija inzulinom kombinira se sa glukozom ili glukokortikoidima da se spriječi hipoglikemijski efekt inzulina. Takav pristup u terapiji preporuča se kod krava koje su razvile ketozu u prvom tjednu laktacije i koje se nisu oporavljale od terapije samo sa glukozom ili samo sa glukokortikoidima. Niacin ili nikotinska kiselina ima benefite u liječenju ketoze. Niacin je antilipolitička tvar koja povisuje koncentraciju glukoze i inzulina. Antilipolitički efekt niacina očituje se u inhibiciji adenilat ciklaze, što dovodi do smanjenja razine cikličkog AMP-a (cAMP) u masnom tkivu. Ciklički AMP igra ključnu ulogu u regulaciji lipolize, procesa razgradnje masti. Smanjenjem razine cAMP-a, niacin smanjuje aktivnost hormona senzitivne lipaze, enzima odgovornog za razgradnju triglicerida u slobodne masne kiseline i glicerol, čime se inhibira lipoliza i smanjuje oslobađanje slobodnih masnih kiselina u krvotok. Hiperglikemijski učinak postiže se smanjivanjem trošenja glukoze i inzulinske rezistencije. Ovi korisni učinci niacina, nažalost, brzo se poništavaju nakon prestanka primjene niacina. Štoviše, nakon povlačenja niacina dolazi do očitog "rebound" efekta, pri čemu koncentracije SMK i ketonskih tijela postaju čak i više nego što su bile prije početka terapije. To dovodi do zaključka da niacin, u indiciranim dozama, nije učinkovita terapija za ketozu. Međutim, novija terapijska ispitivanja koja su koristila manju dozu niacina (12 g/dan) pokazala su povoljnije učinke, pri čemu su se sve krave oporavile unutar 7 dana. Ako se niacin koristi kao terapija treba ga kombinirati sa glukokortikoidima (Herdt i Emery, 1992).

7. Prevencija ketoze

Ketoza se pojavljuje u ranoj laktaciji i zato se preporuke za prevenciju ketoze odnose na menadžment hranidbe krava u suhostaju i tranziciji. Česta je preporuka da se krave podjele u dvije „hranidbene“ grupe, a to su pravi suhostaj (*far-off*) i priprema za telenje (*close-up*). Hranidbene preporuke koje se odnose na pravi suhostaj pretežno prate preporuke NRC-a (*National Research Council*) za suhostaj, a za pripremu za telenje preporuke su kombinacija preporuka za suhostaj i ranu laktaciju. Za pripremu za telenje takav poseban režim hranidbe trebao bi početi tri tjedna prije očekivanog telenja. Prednost takvog načina hranidbe je u tome što je obrok specijalno dizajniran za sprječavanje subkličke ketoze tako što se njime maksimalizira unos suhe tvari i osigurava adekvatnu koncentraciju energije. Također se preporučuje izbjegavanje predebele kondicije krava u kasnoj laktaciji i ranom suhostaju i poželjno je davanje koncentrata tek tri tjedna prije telenja.

Određeni dodaci hrani mogu imati benefite u smanjivanju subkličke ketoze, kada se dodaju preventivno. Niacin, koji je detaljnije opisan u poglavlju 7., prije telenja u dozi od 6 do 12 g/d može pomoći u smanjivanju koncentracije 3BH u krvi. Također propilen glikol je uspješan u prevenciji ketoze u količini od jedne litre dnevno, oralnom primjenom kao napitak, tijekom 9 dana prije telenja smanjuje razinu 3BH i neesterificiranih masnih kiselina, a povećava razinu glukoze. Schultz (1958) navodi kako se natrij propionat može davati kao preventivna mjera za ketozu. Propilen glikol zahtjeva svakodnevnu primjenu, a natrij propionat može smanjiti unos hrane. Ionofori su male molekule topive u mastima, obično mikrobnog podrijetla, čija je funkcija provoditi ione kroz membrane. Oni su nosači olakšane difuzije koji prenose ione niz njihov elektrokemijski gradijent. Ionofori se mogu podijeliti u dvije osnovne klase: formatori kanala i mobilni nosači. Neki najpoznatiji komercijalno dostupni ionofori su: monensin, lasalocid, salinomycin, narasin itd. Ionofori povećavaju količinu proizvedene energije dostupne u hrani. Funkcija ionofora je selekcija i negativno utjecanje na metabolizam gram-pozitivnih bakterija i protozoa u buragu. Odnosno uništava bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu, pa to ostavlja prostor za rast i razvoj bakterija koje proizvode propionsku kiselinu. Proizvodnja propionske kiseline je energetski najefikasnija. Ionofori su toksični za ljudske stanice, konje i dr. i koriste se samo u veterinarske svrhe. Ionofori su potencijalna preventiva za redukciju hiperketonemije. U usporedbi s propilen glikolom i natrijevim propionatom, ionofori su puno jeftiniji i lakši za primjenu, ali nisu dozvoljeni za korištenje tijekom laktacije u SAD-u. Ionofori su strogo regulirani i u Europskoj uniji zbog nekoliko razloga, koji se uglavnom odnose na zaštitu zdravlja životinja, sigurnost hrane i sprječavanje razvoja antimikrobne rezistencije. U istraživanju, koje je su proveli autori Rogers i Hope-Cawdery (1980) za cilj je imalo istražiti koliko glukoneogeni potencijal monesina ima utjecaja na smanjenje ketoze. Monesin je korišten u količini od 30 g po toni TMR-a. Rezultat je bio taj da je mogućnost za ketozu smanjena za 50%, kao i koncentracija 3BH u krvi za 40%, tri tjedna poslije telenja, a sam tretman monesinom je trajao 4 tjedna prije telenja (Duffield, 2000). Redukcija ozbiljnosti i trajanja negativnog energetskog balansa je ključno u prevenciji ketoze i sindroma masne jetre. Kritično

vrijeme za prevenciju masne jetre je tjedan prije i poslije telenja, tada je krava najviše podložna razvijanju masne jetre. Maksimaliziranje unosa suhe tvari tijekom perioda prije i poslije telenja može se postići izbjegavanjem prekomjerne kondicije krava, naglim promjenama obroka, neukusnih krmiva i okolišnog stresa. Efekti tjelesne kondiciji na zdravlje i produktivnost su varijabilni. Ekstremno mršave ili debele krave trebale bi se izbjegavati. Krave sa BSC 3 mogu biti dodatno hranjenje energetski bogatijim krmivima tijekom suhostaja, bez uzrokovanja sindroma masne jetre, jer jetra nije depo masti tijekom pozitivne energetske bilance.



.Slika 7.1. Tjelesna kondicija holštajn krava
Izvor: Divers i Peek, 2008.

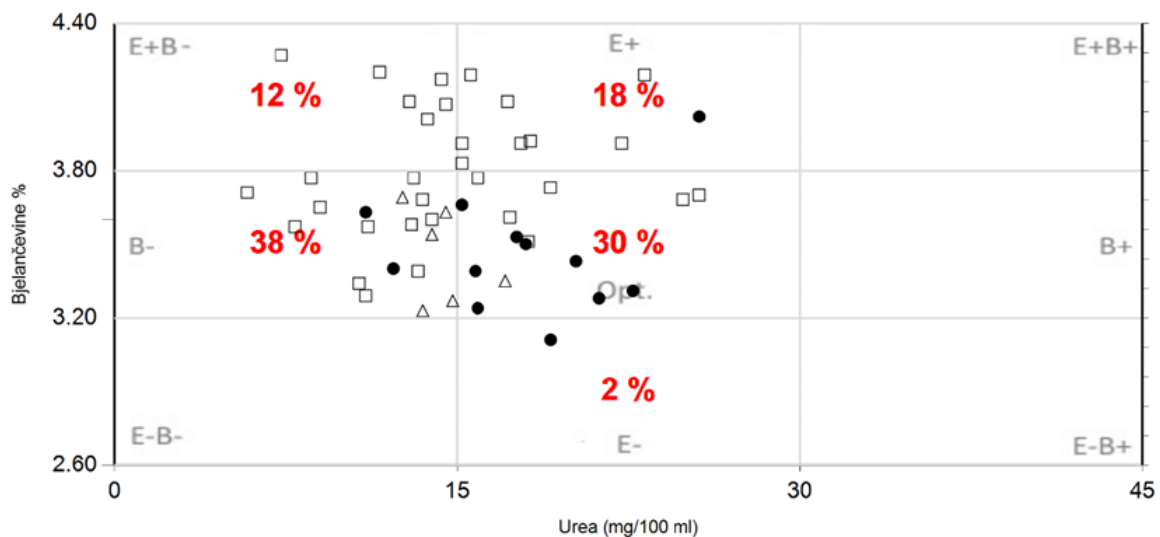
Mjerenja koja su dizajnirana za redukciju mobilizacije masnog tkiva u periodu prije telenja su važna za sprječavanje nastanka masne jetre. Te mjere podrazumijevaju izbjegavanje pretilih krava i krave treba hraniti sa palatabilnim krmivima u količinama koje će biti u skladu sa njihovim potrebama. Obroci dizajnirani za gubitak tjelesne mase, koji će potaknuti mobilizaciju masnog tkiva, nikada se ne smiju primjenjivati u suhostaju. BSC skala za holštajn pasminu kreće se od 0 do 5, gdje je 0 jako mršavo, a 5 jako debelo. Za dobru prilagodbu hranidbe, tjelesna kondicija bi se trebala ocjenjivati nekoliko puta tijekom laktacije. Krave bi trebale ući u suhostaj sa BSC-om 3.0 do 3.5. Krave s ocjenom tjelesne kondicije 3 ili višom trebale bi zadržati istu tjelesnu kondiciju tijekom cijelog razdoblja suhostaja. Dodatno tovljenje tijekom suhostaja poželjno je za mršave krave, ali to je obično teško postići. Kravama nikada

ne treba dopustiti da izgube tjelesnu kondiciju tijekom suhostaja (Herdt, 1988.). Povećanje energije u obrocima za suhostaj posljednja 2 do 3 tjedna prije telenja ima svoje benefite. To rezultira približavanjem energetske potrebama za rast ploda i pozitivno utječe na smanjivanje metaboličkih poremećaja. Ako se dodatna energija osigurava ograničenim količinama koncentrata, to ima dodatnu korist od privikavanja mikroba u buragu na određenu količinu koncentrata, što može pomoći u prijelazu na hranidbu s većim udjelom koncentrata nakon telenja. Kako bi se smanjio rizik od ketoze kod mliječnih krava nakon telenja, važno je pažljivo upravljati hranidbom. To uključuje dodavanje pufera u hranu kako bi se smanjio kiseli učinak visokog udjela žitarica u obrocima nakon telenja, dodavanje izvora masti, te pažljivo balansiranje količine buražno razgradljivih proteina i ne razgradljivih proteina. Ako postoji višak razgradljivih proteina u buragu, to može povećati energetske potrebe krave zbog povećane potrebe za sintezom uree, što može dovesti do većeg rizika od ketoze. S druge strane, pretjerana količina ne razgradljivih proteina u buragu, posebno tijekom razdoblja negativne energetske ravnoteže, također može pridonijeti povećanom riziku od ketoze stimulirajući mobilizaciju masnih kiselina. Krave koje se u suhostaju hrane isključivo sijenom, imaju smanjen unos silaže nakon telenja. Stoga, ako se silaže koriste u hranidbi krava u laktaciji, poželjno je da se one također uvode u hranidbu krava u suhostaju, barem u posljednja 2 do 3 tjedna prije telenja. Kada je kukuruzna silaža jedini izvor voluminozne hrane za krave u suhostaju, postoji povećan rizik od dislokacije sirišta. Zbog toga je važno da u prehrani krava u suhostaju postoji određena količina voluminozne hrane s dugim česticama kako bi se održao dobar volumen i popunjenost buraga. Prekomjerno hranjenje koncentratima tijekom suhostaja može biti štetno i dovesti do ozbiljnih gubitaka zbog kliničke masne jetre. Stoga bi unos koncentrata za krave u suhostaju trebao biti ograničen na 35% suhe tvari u obroku, ili čak i manje (Gerloff, 1988).

Parametri metaboličkog profila daju precizan uvid u funkcionalno stanje organizma, prvenstveno jetre, ali je njihovo dobivanje povezano sa uzimanjem krvi što za životinju predstavlja stres. Zbog toga se preporučuje da se parametri metaboličkog profila određuju na reprezentativnom uzorku krava na ulasku u suhostaj, zatim 2-3 tjedna prije telenja, te kod krava u ranoj laktaciji. Na osnovu rezultata moguće je izvršiti potrebne korekcije obroka. Odnos koncentracije uree i proteina u mlijeku predstavlja pouzdan pokazatelj opskrbljenosti jedinke energijom. Koncentracija uree ispod 4,0 mmol/l (25 mg/100 ml) i proteina iznad 32,0 g/l (3,2%), ukazuje na to da je krava hranjena primjereno proizvodnim potrebama. Nagli prelazak na drugu hranu, pogotovo u ljetnom periodu (zelena krma, bogata lako probavljivim proteinima, uz nizak sadržaj sirovih vlakana) uzrokuje porast koncentracije uree iznad 4,0 mmol/l, dok je sadržaj proteina isti, što ukazuje na nedovoljnu opskrbu energijom. Pri jače izraženom deficitu energije, koncentracija uree se povećava (5-10 mmol/l), a koncentracija proteina pada ispod 30 g/l. Postoji i istovremeni deficit energije i proteina. Pored odnosa koncentracije uree i proteina, opskrbljenost krava energijom može se uspješno procijeniti i na osnovu odnosa koncentracija mliječna mast i proteina. Kod krava kod kojih postoji intenzivan proces lipomobilizacije, nivo SMK u krvi je povišen. To dovodi do povećanja njihovog usvajanja od strane mliječne

Žlijezde i prolazno povećanja koncentracije mliječne masti. Savić i sur. (2010) navode da su krave optimalno opskrbljene energijom ako im je koncentracija mliječne masti ispod 45 g/l, a proteina iznad 32,0 g/l. Smanjenje koncentracije proteina, uz povećanje koncentracije mliječne masti ukazuje na energetski deficit. Urea se u organizmu stvara detoksikacijom amonijaka u jetri. Kod preživača amonijak je glavni produkt razgradnje proteina unijetih hranom, djelovanjem mikroflora predželudaca. Da bi se stvoreni amonijak mogao iskoristiti, mikroorganizmi moraju biti opskrbljeni dovoljnom količinom lako probavljivih ugljikohidrata kao izvora energije. Proteini mikroorganizama predželudaca predstavljaju važan izvor aminokiselina za sintezu proteina mlijeka. Deficit lako iskoristive energije u obroku dovodi do njihove smanjene sinteze i posljedično smanjenja koncentracije proteina u mlijeku.

Iz sadržaja mliječnih komponenti može se iščitati energetski status krave, odnosno jeli u obroku nedostaje energija i/ili protein ili je obrok optimalan. Na slici 7.2. prikazan je primjer raspodjele krava u devet mogućih kvadranta.



Slika 7.2. Odnos koncentracije uree i proteina u mlijeku krava u ovisnosti o različitim sadržajima energije i proteina u obroku

E-B- deficit energije i proteina; B- deficit proteina; E+B- suficit energije, deficit proteina; E- deficit energije; O –optimalno; E+ suficit energije; E-B+ deficit energije, suficit proteina; B+ suficit proteina; E+B+ suficit energije i proteina.

Izvor: Vrtarić, 2019.

8. Zaključak

Ketoza je metabolički poremećaj mliječnih krava u ranoj laktaciji koju karakterizira visoka razina ketonskih tijela (β hidroksibutirat (3BH), acetoacetat (AcAc), aceton) u krvi, mlijeku i urinu. Ketonska tijela nastaju procesom ketogeneze koja se odvija u jetri, uslijed velikog i kontinuiranog pritoka slobodnih masnih kiselina iz adipoznog tkiva. Mobilizaciju masnih kiselina potiču hormoni, prvenstveno glukagon i adrenalin, koji su odgovor na nisku koncentraciju glukoze u krvi. Hipoglikemija se javlja u periodu rane laktacije kada se fiziološkim javlja nesrazmjer između unosa energije hranom i potrebe organizma za energijom. Masne kiseline pristigle u jetru ulaze u mitohondrije gdje se oksidiraju do ketonskih tijela ili se u citosolu esterificiraju do triglicerida. S obzirom na navedeno dolazi do razvoja ketoze ili sindroma masne jetre kao metaboličkih poremećaja karakterističnih za visoko proizvodne mliječne krave u ranoj laktaciji.

Procjena rizika od pojave navedenih metaboličkih poremećaja se temelji na ocjeni kondicije, utvrđivanju prisutnosti ketonskih tijela u tjelesnim tekućinama (krv, urin, mlijeko) te temeljem analize kemijskog sastava mlijeka.

Prolazno povećanje sadržaja mliječne masti u mlijeku kao i promjena omjera sadržaja masti i proteina u mlijeku te prisutnost povećane razine 3BH u krvi rani su pokazatelji promjena u energetsom metabolizmu krave, dok prisutnost ketonskih tijela u tjelesnim izlučevinama (mlijeko, urin) ukazuju na već uznapredovali stadij navedenih metaboličkih poremećaja.

9. Popis literature

1. Andersson L., (1984). Concentrations of blood and milk ketone bodies, blood isopropanol and plasma glucose in dairy cows in relation to the degree of hyperketonaemia and clinical signs. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe. A31(1-10): 683-693*
2. Andersson L., (1988). Subclinical ketosis in dairy cows. *Veterinary clinics of north america: Food animal practice. 4(2): 233-251*
3. Andersson L., Emanuelson U. (1985). An epidemiological study of hyperketonaemia in Swedish dairy cows; determinants and the relation to fertility. *Preventive Veterinary Medicine. 3(5): 449-462*
4. Baird G.D., (1982). Primary ketosis in the high-producing dairy cow: clinical and subclinical disorders, treatment, prevention, and outlook. *Journal of Dairy Science. 65(1): 1-10*
5. Bergman E.N. (1971). Hyperketonemia-ketogenesis and ketone body metabolism. *Journal of dairy science. 54(6): 936-948*
6. Bloch F. (1946). Nuclear induction. *Physical review. 70(7-8): 460*
7. Carrier J., Stewart S., Godden S., Fetrow J., Rapnicki P. (2003). Evaluation of three cow-side diagnostic tests for the detection of subclinical ketosis in fresh cows. In: *Proceedings of the 2003 Four-State Nutrition Conference, La Crosse, WI, Midwest Plan Service, Ames. IA: pp. 9-13*
8. Čejna V., Chládek G. (2005). The importance of monitoring changes in milk fat to milk protein ratio in Holstein cows during lactation. *Journal of Central European Agriculture. 6(4): 539-546*
9. Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews. 26(1): 51-78*
10. Divers T. J., Peeek S. F. (2008.) *Rebhun's diseases od dairy cattle, St. Louis, Missouri*
11. Dohoo I.R., Martin S.W. (1984). Subclinical ketosis: prevalence and associations with production and disease. *Canadian Journal of Comparative Medicine. 48(1): 1*
12. Duffield T.F., Kelton D.F., Leslie K.E., Lissemore K.D., Lumsden J.H. (1997). Use of test day milk fat and milk protein to detect subclinical ketosis in dairy cattle in Ontario. *The Canadian Veterinary Journal. 38(11): 713*

13. Duffield T.F., Sandals D., Leslie K.E., Lissemore K., McBride B.W., Lumsden J.H., Bagg R. (1998). Efficacy of monensin for the prevention of subclinical ketosis in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*. 81(11): 2866-2873
14. Dunn W.B., Broadhurst D.I., Atherton H.J., Goodacre R., Griffin J.L. (2011). Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical society reviews*. 40(1): 387-426
15. Englking L. R. (2015.) *Veterinary physiological chemistry*. Elsevier. London
16. Gerloff B.J. (1988). Feeding the dry cow to avoid metabolic disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 4(2): 379-390
17. Herdt T.H. (2000). Ruminant adaptation to negative energy balance: Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 16(2): 215-230
18. Herdt T.H., Emery R.S. (1992). Therapy of diseases of ruminant intermediary metabolism. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 8(1): 91-106
19. Holtenius P., Holtenius K. (1996). New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: a review. *Journal of veterinary medicine series A*. 43(1-10): 579-587
20. Jenkins N.T., Peña G., Risco C., Barbosa C.C., Vieira-Neto A., Galvão K.N. (2015). Utility of inline milk fat and protein ratio to diagnose subclinical ketosis and to assign propylene glycol treatment in lactating dairy cows. *The Canadian Veterinary Journal*. 56(8): 850
21. Jorjong S., Van Kneegsel A.T.M., Verwaeren J., Bruckmaier R.M., De Baets B., Kemp B., Fievez V. (2015). Milk fatty acids as possible biomarkers to diagnose hyperketonemia in early lactation. *Journal of dairy science*. 98(8): 5211-5221
22. Laffel L. (1999). Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 15(6): 412-426
23. Lane A.N. (2012). Principles of NMR for Applications in Metabolomics. *The Handbook of Metabolomics*. 127-197

24. Li Y., Xu C., Xia C., Zhang H.Y., Sun L.W., Gao Y. (2014). Plasma metabolic profiling of dairy cows affected with clinical ketosis using LC/MS technology. *Veterinary Quarterly*. 34(3): 152-158
25. McArt J.A.A., Nydam D.V., Oetzel G.R. (2012). Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *Journal of dairy science*. 95(9): 5056-5066
26. Naz S., Vallejo M., García A., Barbas C. (2014). Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *Journal of Chromatography. A*: 1353, 99-105
27. Norman A. W. i Henry H. L. (2015) Hormones, California.
28. NRC - National Research Council (2001.) Washington D. C.
29. Oetzel G.R., 2007. Herd-level ketosis – diagnosis and risk factors. In: Preconference Seminar C. vol. 7: pp. 67-91.
30. Rémond D., Ortigues I., Jouany J.P. (1995). Energy substrates for the rumen epithelium. *Proceedings of the Nutrition Society*. 54(1): 95-105
31. Richardt W. (2004). Milk composition as an indicator of nutrition and health. *The breeding*. 11: 26-27
32. Rico J. E., Barrientos-Blanco M.A. (2024). Invited review: Ketone biology: the shifting paradigm of ketones and ketosis in the dairy cow. *Journal of Dairy Science*
33. Roberts L.D., Souza A.L., Gerszten R.E., Clish C.B. (2012). Targeted metabolomics. *Current protocols in molecular biology*. 98(1): 30-2
34. Robertson J.M. (1966). The evaluation of results from a therapeutic trial on bovine ketosis. 1620-1623
35. Sauer F.D., Kramer J.K.G., Cantwell W.J. (1989). Antiketogenic effects of monensin in early lactation. *Journal of Dairy Science*. 72(2): 436-442
36. Savić Đ., Matarugić D., Delić N., Kasagić D., Stojanović M. (2010). Određivanje organskih sastojaka mleka kao metoda ocene energetskeg statusa mlečnih krava. *Veterinarski glasnik*. Vol 64: 3-21
37. Stewart W.E., Stewart, D.G., Schultz L.H. (1958). Rates of volatile fatty acid production in the bovine rumen. *Journal of Animal Science*. 17(3): 723-736
38. Sun L.W., Zhang H.Y., Wu L., Shu S., Xia C., Xu C., Zheng J. S. (2014). ¹H-Nuclear magnetic resonance-based plasma metabolic profiling of dairy cows with clinical and subclinical ketosis. *Journal of dairy science*. 97(3): 1552-1562.

39. Tatone E.H., Gordon J.L., Hubbs J., LeBlanc S.J., DeVries T.J., Duffield T.F. (2016). A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of point-of-care tests for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *Preventive veterinary medicine*. 130: 18-32
40. Tveit B., Lingaas F., Svendsen M., Sjaastad Ø.V. (1992). Etiology of acetonemia in Norwegian cattle. 1. Effect of ketogenic silage, season, energy level, and genetic factors. *Journal of Dairy Science*. 75(9): 2421-2432
41. Van der Drift S.G.A., Jorritsma R., Schonewille J.T., Knijn H.M., Stegeman J.A. (2012). Routine detection of hyperketonemia in dairy cows using Fourier transform infrared spectroscopy analysis of β -hydroxybutyrate and acetone in milk in combination with test-day information. *Journal of dairy science*. 95(9): 4886-4898
42. Van Kneegsel A.T.M., Van der Drift S.G.A., Horneman M., De Roos A.P.W., Kemp B., Graat E.A.M. (2010). Ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy: Value for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93(7): 3065-3069
43. Vrtarić, M. (2019). 'Procjena utjecaja unosa energije na uspostavu spolnog ciklusa kod visokomliječnih krava nakon telenja', Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, citirano: 23.09.2024., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:262582>
44. Wishart D.S., Jewison T., Guo A.C., Wilson M., Knox C., Liu Y., Scalbert A. (2012). HMDB 3.0—the human metabolome database in 2013. *Nucleic acids research*. 41(D1): D801-D807
45. Xia, J., Mandal, R., Sinelnikov, I. V., Broadhurst, D., & Wishart, D. S. (2012). MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic acids research*, 40(W1), W127-W133.
46. Xu C., Shu S., Xia C., Wang P., Sun Y., Xu C., Li C. (2015). Mass spectral analysis of urine proteomic profiles of dairy cows suffering from clinical ketosis. *Veterinary Quarterly*. 35(3): 133-141
47. Youssef M.A., El-Khodery S.A., El-deeb W.M., El-Amaiem W.E.A. (2010). Ketosis in buffalo (*Bubalus bubalis*): clinical findings and the associated oxidative stress level. *Tropical animal health and production*. 42: 1771-1777
48. Zhang G., Ametaj B.N. (2020). Ketosis an old story under a new approach. *Dairy*. 1(1): 5

49. Zhang H., Wu L., Xu C., Xia C., Sun L., Shu S. (2013). Plasma metabolomic profiling of dairy cows affected with ketosis using gas chromatography/mass spectrometry. *BMC Veterinary Research*. 9: 1-13

Životopis

Petra Crnjak rođena 18.11.2000. u Zagrebu, gdje je i završila srednju Poljoprivrednu školu.