

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra veterinárních disciplín



Indikátory negativní energetické bilance u dojeného skotu
doktorská disertační práce

Autor: Magdaléna Štolcová
Školitel: prof. Mgr. Ing. Markéta Sedmíková, Ph.D.
Konzultant: Ing. Dalibor Řehák, Ph.D., VÚŽV, v. v. i.

Praha 2021

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou disertační práci na téma „Indikátory negativní energetické bilance u dojeného skotu“ vypracovala samostatně a použila jsem pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne

Podpis autora

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph.D. za vedení mé disertační práce a prof. Mgr. Ing. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za pomoc s dokončením práce. Mé poděkování patří také Ing. Daliboru Řehákovi, Ph.D. za cenné rady a odbornou pomoc při statistickém zpracování výsledků. Děkuji též Ing. Lud'ku Bartoňovi za připomínky a čas, který mé práci věnoval.

OBSAH

Seznam použitých zkratk.....	VI
1 Úvod.....	1
2 Literární přehled	2
2.1 Negativní energetická bilance (NEB)	2
2.1.1 Metabolické změny při NEB.....	2
2.1.2 Přímá indikace NEB.....	5
2.2 Onemocnění související s NEB	6
2.2.1 Ketóza.....	6
2.2.2 Steatóza jater	7
2.2.3 Poruchy reprodukce.....	8
2.3 Nepřímá indikace NEB pomocí složek mléka.....	8
2.3.1 Základní složky mléka	10
2.3.2 Mastné kyseliny mléčného tuku.....	11
2.3.3 Faktory ovlivňující složení mastných kyselin mléka.....	14
2.3.4 Možnosti odhadu NEB pomocí mastných kyselin v mléce.....	19
2.4 Prevence NEB.....	20
3 Cíl práce a hypotézy	23
4 Materiál a metodika	24
4.1 Charakteristika účelového hospodářství VÚŽV v Netlukách.....	24
4.2 Vlastní experiment.....	25
4.2.1 Krevní vzorky.....	25
4.2.2 Vzorky mléka	27
4.2.3 Zpracování dat a statistická analýza.....	28
5 Výsledky a diskuze	33
5.1 Porovnání mléčné užitkovosti, sérových parametrů energetického profilu a vybraných složek mléka u dvou plemen dojeného skotu	33
5.1.1 Mléčná užitkovost, základní složky mléka a ketolátky.....	33
5.1.2 Vybrané sérové parametry energetického profilu	36

5.1.3	Vybrané mastné kyseliny mléčného tuku.....	39
5.2	Porovnání energetického profilu a složení mléka mezi skupinami dojnic vytvořenými podle výskytu a hloubky NEB	47
5.2.1	Mléčná užitkovost, základní složky mléka a ketolátky.....	47
5.2.2	Vybrané sérové parametry energetického profilu	50
5.2.3	Vybrané mastné kyseliny mléčného tuku.....	53
5.3	Stanovení vztahů mezi složkami mléka a sérovými NEFA a možnosti predikce NEB pomocí vybraných složek mléka	60
6	Závěr.....	64
7	Literatura.....	66
	Seznam použitých obrázků a tabulek.....	81
	Seznam autorových publikací.....	83

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACTH	adrenokortikotropní hormon
ADH	antidiuretický hormon (vazopresin)
ALNA	α -linolenová kyselina (α -linolenic acid), viz C18:3, <i>cis</i> -9,12,15
ATP	adenosintrifosfát
BCFA	mastné kyseliny s rozvětveným uhlíkovým řetězcem (branched-chain fatty acids)
BCS	body condition score
BHB	β -hydroxybutyrát
C	české strakaté plemeno
C14:0	kyselina myristová (kyselina tetradekanová)
C14:1 <i>cis</i> -9	kyselina myristoolejová (kyselina (9 <i>Z</i>)-tetradec-9-enová)
C15:0	kyselina pentadecylová
C16:0	kyselina palmitová (kyselina hexadekanová)
C16:1 <i>cis</i> -9	kyselina palmitoolejová (kyselina (9 <i>Z</i>)-hexadec-9-enová)
C17:0	kyselina heptadecylová
C18:0	kyselina stearová (kyselina oktadekanová)
C18:1	kyselina oktadecenová
C18:1 <i>cis</i> -9	kyselina olejová (kyselina (9 <i>Z</i>)-oktadec-9-enová)
C18:1 <i>trans</i> -11	kyselina vakcenová (kyselina (11 <i>E</i>)-oktadec-11-enová)
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	kyselina rumenová (kyselina (9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i>)-oktadeka-9,11-dienová)
C18:2 <i>cis</i> -9,12	kyselina linolová (kyselina (9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i>)-oktadeka-9,12-dienová)
C18:3 <i>cis</i> -9,12,15	kyselina α -linolenová (kyselina (9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i>)-oktadeka-9,12,15-trienová), viz ALNA
C20:5	kyselina eikosapentaenová
C22:5	kyselina dokosapentaenová
C22:6	kyselina dokosahexaenová
C4:0	kyselina máselná (kyselina butanová)
C6:0	kyselina kapronová (kyselina hexanová)
C8:0	kyselina kaprylová (kyselina oktanová)
CLA	konjugovaná kyselina linolová (conjugated linoleic acid)
CoA	koenzym A
FADH ₂	flavinadenindinukleotid (redukovaná forma)

FFA	volné mastné kyseliny (free fatty acids)
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier transform infrared spectroscopy)
H	holštýnské plemeno
LCFA	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (long-chain fatty acids)
LKS	silážovaná drť kukuřičných palic s listeny (Lieschen Kolben Schrott)
MCFA	mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (medium-chain fatty acids)
MIR	střední infračervená spektroskopie (middle infrared spectroscopy)
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny (mono-unsaturated fatty acids)
NADH	nikotinaminadeninindinukleotid (redukovaná forma)
NEB	negativní energetická balance
NEFA	neesterifikované mastné kyseliny (non-esterified fatty acids)
OCFA	mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků (odd-chain fatty acids)
PGE1	prostaglandin E1
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (poly-unsaturated fatty acids)
SARA	subakutní ruminální acidóza
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short-chain fatty acids)
SFA	nasyčené mastné kyseliny (saturated fatty acids)
T:P	poměr tuku a proteinu
TG	triacylglyceroly (syn. triglyceridy)
TMR	směsná krmná dávka (total mixed ration)
TSH	tyreotropní hormon
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein)

1 ÚVOD

V intenzivních systémech chovu dojeného skotu jsou dojnice na počátku laktace vystaveny velké zátěži. Prudce narůstající výdej energie v důsledku nastupující produkce mléka není kompenzován dostatečným příjmem energie z krmiva a dojnice se dostávají do negativní energetické bilance (NEB). Stav lze považovat za fyziologický a dojnice jsou schopny do značné míry nedostatek energie kompenzovat mobilizací vlastních tukových rezerv. Intenzivním a jednostranným šlechtěním na mléčnou užitkovost v minulosti se však energeticky nevyvážený stav následkem zvýšené produkce mléka prohloubil a prodloužil mimo organismem tolerované hranice. NEB se stala jednou z hlavních příčin zhoršeného zdravotního stavu, snížení reprodukční výkonnosti i zkrácení produkčního věku dojnic, což se významně promítá i do celkové ekonomiky chovu.

Předpokladem úspěšného snížení rizik spojených s NEB je její včasné odhalení pomocí přímých či nepřímých indikátorů. Přímý odhad založený na hodnocení sérových koncentrací určitých parametrů energetického profilu je však pracný a ekonomicky náročný, proto je snahou najít vhodnější a lépe v praxi využitelné nástroje pro nepřímou indikaci NEB. Současné moderní vybavení laboratoří pro rozbor mléka umožňuje stanovení velkého počtu parametrů, mezi nimi i jednotlivé mastné kyseliny mléčného tuku. Ukazuje se, že některé mastné kyseliny nebo skupiny mastných kyselin by mohly mít silný vztah k přímým indikátorům NEB a existuje tedy potenciál jejich využití pro nepřímou indikaci NEB. Včasná identifikace zvířat s hluboce narušenou nebo dlouhotrvající NEB umožní zlepšit zdravotní stav a pohodu zvířat, snížit rizika poruch reprodukce, omezit užívání léčiv a zlepšit tak ekonomiku produkce mléka.

Cílem předkládané disertační práce je stanovení přímých a nepřímých indikátorů NEB, dále jejich porovnání mezi dvěma plemeny dojeného skotu a mezi skupinami dojnic vytvořenými podle výskytu a hloubky NEB, a nakonec stanovení vztahů mezi přímými a nepřímými indikátory a nastínění možnosti odhadu NEB.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Negativní energetická bilance (NEB)

U krav v období okolo porodu (typicky období 3 týdny před až 3 týdny po porodu, tzv. tranzitní perioda) dochází k mnohým metabolickým a hormonálním změnám, které odrážejí narůstající energetické požadavky způsobené růstem plodu a následným nástupem laktace (Arfuso et al. 2016). Většina dojnic v časně laktaci navíc není schopna přijmout dostatečné množství sušiny pro pokrytí potřeb vysoké mléčné produkce (Roche et al. 2013). U dojnic se tak objeví určitý stupeň negativní energetické bilance (**NEB**), která je do jisté míry fyziologickým stavem. Intenzivním a jednostranným šlechtěním na mléčnou užitkovost v minulosti se však NEB prohloubila a prodloužila mimo organismem tolerované hranice. NEB se tak stala jednou z hlavních příčin zhoršeného zdravotního stavu, snížené reprodukční výkonnosti i zkrácení produkčního věku dojnic, což se významně promítá i do celkové ekonomiky chovu.

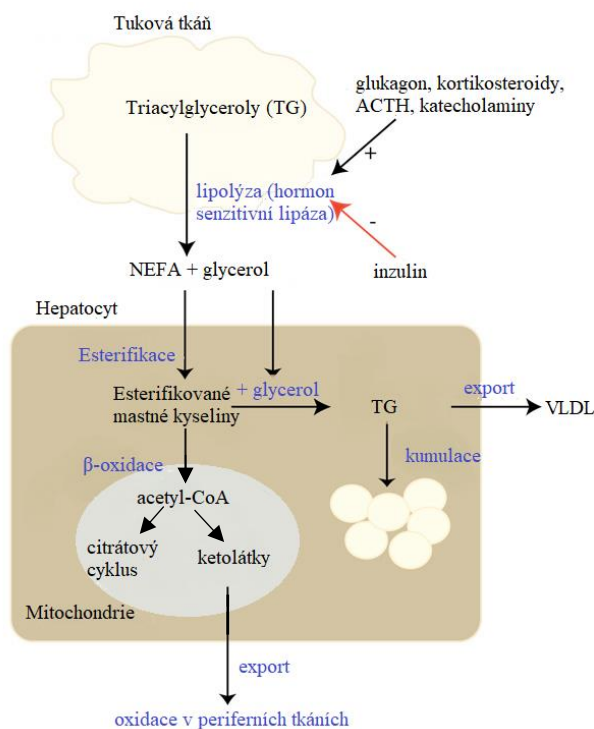
2.1.1 Metabolické změny při NEB

Zvýšená potřeba glukózy v mléčné žláze, zejména jako základního zdroje pro syntézu laktózy, vede ke zvýšení glukoneogeneze a glykogenolýzy v játrech a snížení využití glukózy ostatními tkáněmi (Weber et al. 2013). Glukoneogeneze je tvorba glukózy z necukerných zdrojů. Hlavními prekurzory pro syntézu glukózy jsou propionát vzniklý bacheřovou fermentací krmiva (70 %), laktát (15–20 %), aminokyseliny (10–15 %, zejména alanin) a glycerol (2–4 %) vzniklý lipolýzou (Larsen & Kristensen 2009). Dostupnost propionátu je závislá na příjmu krmiva, který je v období okolo porodu a při NEB nedostatečný, proto se pro glukoneogenezi využívají další jmenované zdroje. Hlavním regulačním hormonem metabolismu v okoloporodním období je somatotropin, který zvyšuje jaterní glukoneogenezi a spolupodílí se na fyziologické rezistenci tkání na inzulin, čímž zabraňuje využití glukózy v játrech, svalech nebo tukové tkáni a dochází ke směrování glukózy především do mléčné žlázy, ve které transport glukózy probíhá zejména pomocí přenašeče GLUT1, který není závislý na inzulinu (Wankhade et al. 2017). Somatotropin, spolu s nedostatkem inzulinu a glukózy, také podporuje mobilizaci svalových proteinů pro syntézu proteinů mléka a pro glukoneogenezi (Bell et al. 2000).

NEB, spolu s působením somatotropinu a dalších hormonů, vede k mobilizaci tukových rezerv (lipomobilizace), které jsou tvořeny triacylglyceroly (**TG**) a jsou hlavním „rezervním palivem“. Hydrolýza TG (lipolýza) je umožněna hormon senzitivní lipázou, která se nachází v cytosolu adipocytů. Aktivita hormon senzitivní lipázy je stimulována glukagonem,

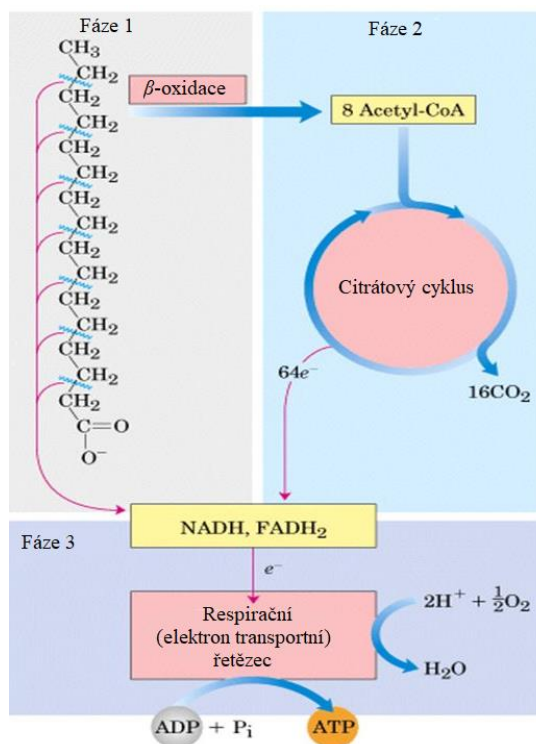
katecholaminy, adrenokortikotropním hormonem (**ACTH**), tyreotropním hormonem (**TSH**), antidiuretickým hormonem (**ADH**) a kortikosteroidními hormony. Účinek hormon senzitivní lipázy je naopak inhibován inzulinem, prostaglandiny (**PGE1**) a kyselinou nikotinovou (Murray et al. 2002; De Koster & Opsomer 2013). Při hydrolýze TG se do krevního oběhu uvolňují glycerol a neesterifikované mastné kyseliny (non-esterified fatty acid, **NEFA**, syn. volné mastné kyseliny, free fatty acid, **FFA**), které jsou obvykle tvořeny mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem (long-chain fatty acid, **LCFA**). Glycerol je absorbován buňkami a je využíván v energetickém metabolismu prostřednictvím meziproductů glukoneogeneze a glykolýzy nebo může být využit k opětovné tvorbě TG. V plazmě jsou NEFA, resp. LCFA navázány na albumin a v buňce na vazebný protein pro mastné kyseliny, tzv. protein Z, takže ve skutečnosti nejsou NEFA nikdy „volné“. Cirkulující NEFA mohou být inkorporovány do mléčného tuku nebo mohou být využity periferními tkáněmi jako zdroj energie, případně jsou transportovány do jater k dalšímu metabolismu (Puppel & Kuczyńska 2016). V játrech se NEFA mohou metabolizovat třemi možnými způsoby: **(1)** kompletní oxidace za vzniku energie v hepatocytech, **(2)** neúplná oxidace za vzniku ketoláttek nebo **(3)** reesterifikace do formy TG, které jsou transportovány z jater ve formě lipoproteinů o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein, **VLDL**), nebo se v játrech kumulují (Gross et al. 2013; Sun et al. 2016). Metabolismus NEFA je znázorněn na obrázku 1.

Obrázek 1: Metabolismus NEFA (eClinPath, online textbook of Veterinary Clinical Pathology 2021)



β -oxidace mastných kyselin (**ad způsob 1**) probíhá v mitochondriích většiny tkání, vyjma erytrocytů, nejvíce v játrech, kosterní svalovině a srdci. NEFA před štěpením musí být převedeny na „aktivní mastnou kyselinu“ čili acyl-CoA (koenzym A). Acyl-CoA s dlouhým řetězcem nepronikají do mitochondrií a nemohou být oxidováni, pokud nejsou převedeny na acylkarnitiny pomocí karnitinpalmitoyltransferázy I, která se vyskytuje ve vnější mitochondriální membráně. Acylkarnitiny mohou pronikat do mitochondrií a zapojit se do β -oxidace mastných kyselin. Molekuly acyl-CoA jsou při β -oxidaci štěpeny od karboxylového konce za uvolnění dvouuhlíkatých zbytků, které tvoří acetyl-CoA. Acetyl-CoA dále vstupuje do citrátového cyklu, kde kondenzuje s oxalacetátem za vzniku citrátu, který se dále oxiduje až na redukční ekvivalenty (nikotinaminadenin dinukleotid (**NADH**), flavinadenin dinukleotid (**FADH₂**)), a ty jsou poté využity v respiračním řetězci, kde vzniká základní zdroj energie adenosintrifosfát (**ATP**) (Drackley et al. 2001). Kompletní oxidace mastných kyselin je znázorněna na obrázku 2. Mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků jsou oxidovány na acetyl-CoA plus molekulu propionyl-CoA. Propionyl-ový zbytek je jedinou součástí mastné kyseliny, která se může použít pro glukoneogenezi. Modifikovaná forma β -oxidace probíhá také v peroxisomech. Tato dráha není přímo spojená s produkcí ATP a slouží k oxidaci mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (Murray et al. 2002).

Obrázek 2: Kompletní oxidace mastných kyselin (Bioinfo 2021)



Pro zdárný průběh citrátového cyklu je zapotřebí oxalacetát, jak je popsáno výše, ovšem pokud organismus trpí nedostatkem glukózy, je oxalacetát primárně využíván pro glukoneogenezi. Jestliže nemůže probíhat kompletní oxidace v citrátovém cyklu, dochází k nekompletní oxidaci mastných kyselin (**ad způsob 2**), kdy se v procesu zvaném ketogeneze spojují acetylové zbytky a tvoří se ketolátky; aceton, acetoacetát, β -hydroxybutyrát (**BHB**), které slouží jako alternativní zdroje energie. Ketogeneze je běžná metabolická cesta poskytující energii v časně laktaci. Pokud je ovšem syntetizováno příliš velké množství ketolátek, může dojít k patologickému stavu zvanému ketóza (Duffield et al. 2009).

Přibližně 25 % NEFA je v játrech reesterifikováno zpět na TG (**ad způsob 3**) a následně konvertováno na VLDL, které transportují TG z jater do mimojaterních tkání (Katoh 2002). Pokud však syntéza překročí exportní kapacitu jater, TG se začnou hromadit v játrech a může dojít k jaterní steatóze.

2.1.2 Přímá indikace NEB

Jak vyplývá z výše uvedeného popisu metabolických procesů, ke kterým během NEB dochází, změny určitých sérových parametrů mohou sloužit jako přímé indikátory NEB a poruch s ní souvisejících. Pro odhad samotné NEB lze využít sérové hladiny NEFA, které reflektují mobilizaci tukových zásob, vysoké hladiny jsou spojovány s vyšší incidencí peripartálních poruch. Stanovit referenční hodnoty je poměrně složité, jelikož je třeba si uvědomit, že vysokoprodukční dojnice mají vyšší metabolickou zátěž a koncentrace NEFA mohou mít fyziologicky vyšší než dojnice s nižší užitkovostí. Například Kaneko et al. (2008) uvádějí referenční rozmezí od 0,10 do 0,35 mmol/l, nicméně u vysokoužitkových dojnic ani hodnoty dosahující až 1,4 mmol/l nemusí ohrozit zvíře na zdraví (Quiroz-Rocha 2009). Existuje poměrně značné množství prací, které se týkají rizik spjatých s vysokými sérovými koncentracemi NEFA. Podle LeBlanc et al. (2005) hladiny NEFA vyšší než 0,4 mmol/l u zasušených a vyšší než 0,6 mmol/l u čerstvě otelených dojnic jsou spojovány se čtyři až pětkrát vyšším rizikem onemocnění. Bylo také zjištěno, že koncentrace NEFA vyšší než 0,5 mmol/l týden před otelením a vyšší než 1,0 mmol/l v prvním týdnu po porodu významně zvyšují riziko výskytu levostranné dislokace slezu (Borchardt & Staufenbiel 2012). Hodnoty nad 0,26 mmol/l v období 14 dnů před porodem a nad 0,57 v prvních 14 dnech po porodu byly spojovány s vyšším rizikem vzniku ketóz (Oetzel 2004). Hraniční hodnota pro samotnou diagnostiku NEB a rizik s ní spojených v období po porodu je 0,6 mmol/l a vyšší (Van Saun 2016). Další metabolity v krevním séru slouží pro indikaci nebo přímou diagnostiku konkrétních onemocnění spjatých s NEB, o kterých bude pojednáno v další kapitole.

2.2 Onemocnění související s NEB

Všechny metabolické změny související s NEB jsou do určité míry fyziologické a nezbytné k úspěšné adaptaci na vysokou mléčnou užitkovost. Problém je, pokud jsou příliš výrazné nebo dlouhotrvající, protože pak se zvyšují rizika vzniku onemocnění, jakými jsou například ketóza, jaterní steatóza, dislokace slezu a další (Contreras et al. 2018). Některé poruchy se také vyskytují v subklinické formě, která je pro chovatele obtížně rozpoznatelná a postupně narušuje celkový zdravotní stav, mléčnou produkci a reprodukční schopnosti dojnic (Imhasly et al. 2015). Mezi nejvýznamnější a nejčastěji se vyskytující poruchy, které souvisí s NEB, patří ketóza, steatóza jater a poruchy plodnosti.

2.2.1 Ketóza

Ketogeneze je běžná metabolická cesta poskytující alternativní zdroje energie pro periferní tkáň v podobě ketolátek při masivní lipomobilizaci u dojnic v časně laktaci. Pokud ovšem syntéza ketolátek překročí tkáňovou kapacitu pro jejich využití jako energetického paliva, zvýší se jejich koncentrace v krvi (hyperketonémie), v moči a mléce a vzniká onemocnění zvané ketóza (Duffield et al. 2009). Ta se vyskytuje buď v klinické formě, nebo subklinické formě. Klinická forma je méně častá a je doprovázena velmi pestrými příznaky projevujícími se buď na trávicím traktu (digestivní forma), nebo na nervovém aparátu (nervová forma). Digestivní forma je charakteristická náhlým vznikem inapetence, která je provázena malátností, poklesem dojivosti, dojnice odmítají krmivo, zvířata rychle ztrácí hmotnost a dech, moč i mléko páchnou po acetonu. Nervová forma začíná neklidem, střídáním vstávání a lehání a postupně přechází v deprese nebo křeče, zvířata se tlačí dopředu, bučí, mají strnulou chůzi a naráží do překážek, poté nastupuje otupělost, apatie až ulehnutí (Hofírek et al. 2009). Mnohem častěji se ketóza vyskytuje v subklinické formě. U dojnic se subklinickou ketózou se objevuje nižší produkce mléka a mléko má vyšší obsah tuku, což je dáno tím, že BHB je využíván jako prekurzor pro syntézu tuku v mléčné žláze (Melendez et al. 2016). Dojnice jsou imunodeficientní a mnohem náchylnější ke vzniku infekčních onemocnění, především mastitid. Obě formy lze diagnostikovat podle zvýšené sérové koncentrace BHB. Hladiny BHB nižší než 2,6 mmol/l a vyšší než 1,4 mmol/l v prvním týdnu po porodu a vyšší než 1,0 mmol/l během 7. až 10. dne laktace určují zvířata se subklinickou ketózou (Geishauser et al. 2001). Dojnice s vyššími hladinami než 2,6 mmol/l mají klinickou formu ketózy. Dojnice se subklinickou formou ketózy (BHB > 1,2 mmol/l) mají podle McArt et al. (2012) až třikrát vyšší riziko úhynu nebo předčasného vyřazení než dojnice bez tohoto onemocnění. Vysoké hladiny BHB se kromě ketóz podílejí také na vzniku dalších poruch. Například Suthar et al.

(2013) zjistili, že hladiny BHB vyšší než 1,1 mmol/l dvojnásobně zvyšují riziko laminitid. Při hladinách BHB vyšších než 1,0 mmol/l v prvním týdnu po otelení nebo vyšších než 1,4 mmol/l v druhém týdnu po otelení se až o 20 % snižuje pravděpodobnost zabřeznutí po první inseminaci (Walsh et al. 2007) a stejné hladiny BHB v prvních 14 dnech po otelení jsou spojovány s vysokým rizikem vzniku metritidy (Ospina et al. 2010). Ketózy jsou často komplikovány vznikem steatózy jater.

2.2.2 Steatóza jater

Různé stupně steatózy jater (lipidóza, ztučnění, tuková degenerace, angl. fatty liver) jsou nejčastější formou hepatopatie u skotu. Steatóza jater je charakteristická přítomností nadměrného množství tuku v hepatocytech (Hofírek et al. 2009). Hlavní příčinou vzniku jaterní steatózy je masivní lipomobilizace (vysoké koncentrace NEFA v krvi), při které musí játra mimo jiné odvádět velké množství TG v podobě VLDL do extrahepatálních tkání (Gross et al. 2013). Schopnost přežvýkavců konvertovat TG do jejich transportní formy VLDL je limitována, a proto při překročení exportní kapacity jater dochází k hromadění TG v hepatocytech a tím vzniká jaterní steatóza (Sejersen et al. 2012). Snížená koncentrace sérových TG (zpravidla nižší než 0,17 mmol/l) indikuje energetický deficit a rozvoj steatózy jater (Drackley 2001). Přímá diagnostika jaterní steatózy je možná biopsií jater, což je nejspolehlivější metoda k určení stupně ztučnění jater. Fyziologické koncentrace TG ve zdravých játrech se pohybují do 1 %, v případě mírného ztučnění jsou hladiny do 5 %, u středně těžkého postižení 5 až 10 % a při těžkém stupni steatózy jater jsou hladiny TG vyšší než 10 % (Bobe et al. 2004). V časně laktaci se mírný a střední stupeň steatózy jater považuje za fyziologický a většinou probíhá subklinicky (Ingvartsen 2006). S jaterní steatózou také souvisejí hladiny sérového cholesterolu, který je součástí lipoproteinů, mimo jiné také VLDL. Sérové koncentrace cholesterolu v časně a střední laktaci fyziologicky rostou, aby byla zajištěna dostatečná syntéza VLDL a tím se do jisté míry zabránilo kumulaci TG v játrech (Gross et al. 2013).

Dojnice s jaterní steatózou jsou náchylnější k dalším onemocněním a poruchám. Často jaterní steatóze předchází ketóza, dále je steatóza spojována s poškozením jaterních funkcí, rozvojem dislokace slezu a snížením reprodukční výkonnosti (Drackley et al. 2001; Jorritsma et al. 2001). U skotu je steatóza jater většinou reverzibilní stav, kdy nedochází k trvalému poškození jaterních funkcí (Ingvartsen 2006). Ztučnění jater, stejně jako ketóza, je následkem NEB, ale zároveň může NEB prodlužovat a prohlubovat skrze snížení příjmu krmiva a sekundární onemocnění, které s oběma poruchami souvisejí.

2.2.3 Poruchy reprodukce

NEB také zásadně ovlivňuje reprodukční schopnosti. Hluboká a dlouhotrvající NEB je považována za hlavní rizikový faktor výskytu zpožděné ovariální cyklicity (Opsomer et al. 2000; Samarütel et al. 2008), kdy luteální aktivita většinou nastoupí až po překonání dna (nadir) negativní energetické bilance (Beam & Buttler 1999). Vysoké sérové koncentrace NEFA, které se při NEB vyskytují, mimo jiné také brání zrání oocytů a kompetentnímu vývoji zárodku *in vitro* (Leroy et al. 2005). Ačkoli přímý vliv vysoké hladiny NEFA nebyl dosud jednoznačně prokázán, studie ukazují, že dojnice po porodu s ovulujícím dominantním folikulem měly nižší sérové hladiny NEFA ve srovnání s dojnicemi, u nichž k ovulaci nedošlo (Butler et al. 2008). Při NEB dochází k významným ztrátám hmotnosti a bylo zjištěno, že dojnice, u kterých došlo k rychlejšímu zvyšování hmotnosti po porodu (tedy rychlejšímu překonání dna NEB), vykazovaly časnější ovulaci a známky říje (Sakaguchi 2009; Santolaria et al. 2012).

Kromě přímého vlivu na fertilitu NEB také zvyšuje výskyt zadržetí placenty a zánětů dělohy (metritidy, endometritidy). Imunitní funkce v děložní tkáni je během březosti potlačena (mimo jiné působením progesteronu) za účelem ochrany plodu před mateřským imunitním systémem (Esposito et al. 2014). Po porodu je tedy děloha zvláště náchylná k infekcím, čemuž se nedá zabránit, nicméně NEB může tuto náchylnost ještě zvyšovat prostřednictvím vysokých koncentrací NEFA, které inhibují neutrofilů *in vitro*, tedy působí imunopresivně (LeBlanc 2010). Metabolické poruchy související s vysokými sérovými hladinami NEFA a BHB, jakými jsou ketóza a jaterní steatóza, mohou přispívat ke zhoršení celkové reprodukční výkonnosti (Drackley & Cardoso 2014).

2.3 Nepřímá indikace NEB pomocí složek mléka

Předpokladem úspěšného snížení rizik spojených s NEB je její včasná detekce pomocí přímých či nepřímých indikátorů. Přímá diagnostika založená na hodnocení sérových koncentrací především NEFA je finančně i časově velmi náročná, proto jsou snahy o hledání nástrojů pro nepřímou indikaci, která by umožnila faremnímu managementu včas preventivně zasáhnout.

Jednou ze základních možností, jak identifikovat individuální stupeň adaptace na NEB, je hodnocení kondičního skóre (body condition score, **BCS**). Dojnice s vysokým stupněm kondičního skóre v období okolo porodu mají vyšší riziko vzniku metabolických onemocnění a poruch plodnosti ve srovnání s dojnicemi, které byly v optimální kondici (Ingvarsen 2006;

Roche et al. 2009; Remppis et al. 2011). Hodnocení tělesné kondice je poměrně snadné a velmi praktické, nicméně novější výzkumy poukazují na nedostatečnou citlivost BCS při detekci tukových zásob, a to při špatném vyhodnocení, které je navíc zatíženo značnou mírou subjektivity, může riziko poruch zdraví a reprodukce naopak zvýšit (Drackley et al. 2014). Další metodou pro stanovení tukových zásob je ultrasonografické měření výšky podkožního tuku (Schröder & Staufenbiel 2006). Tato metoda je méně subjektivní než vizuální hodnocení BCS, ale v praxi není příliš využívána, jelikož vyžaduje přenosný sonograf a kvalifikovaný personál.

Vhodnější možností, jak identifikovat individuální stupeň adaptace na NEB, je měření tělesné hmotnosti, resp. změn hmotnosti po porodu, kdy dojnice s extrémní mobilizací tukových rezerv, tedy s vysokými ztrátami hmotnosti, mají vyšší riziko metabolických poruch (Bobe et al. 2004), vykazují horší reprodukční schopnosti (Santos et al. 2009) a produkují menší objem mléka (Reist et al. 2003). Poncheki et al. (2015) ve své studii zjistili vliv velkých ztrát hmotnosti po porodu do nadir na další zabřezávání, kdy krávy s nízkými ztrátami (do 30 kg) zabřezly do 180 dnů po porodu ve 45 %, zatímco krávy s vysokými ztrátami (nad 60 kg) jen ve 25 %. Byl sledován také vliv změn hmotnosti na výskyt prvních ovulací a říjí, kdy krávy s časnější ovulací a říjí vykazovaly dřívější zvyšování hmotnosti po porodu ve srovnání s těmi, které měly pozdější projevy reprodukce. Z výsledků studií také vyplynulo, že projevy říje mohou být citlivější na změny hmotnosti než samotné zabřezávání (Sakaguchi 2009; Santolària et al. 2012). Pro sledování hmotnosti je samozřejmě nutné mít vybavenou stáj automatickou váhou, která zaznamenává hmotnost jednotlivých dojnic například při odchodu z dojírny.

Existují další možnosti, které mohou napomoci v diagnostice NEB a metabolických poruch. Například měření aktivity zvířat, tělesné teploty, doby přežvykování, real-time měření mléčných složek a další. Vše jsou to metody, které vyžadují moderní technologické vybavení ve stájích a jsou nad rámec této práce, která se zabývá možnostmi indikace NEB pomocí měření mléčných složek metodou infračervené spektroskopie (**MIR**), konkrétně infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (**FTIR**), která je standardně využívána v rámci běžných, případně rozšířených laboratorních rozborů mléka, které jsou běžně dostupné všem chovatelům dojeného skotu. Proto je kapitola týkající se nepřímé indikace NEB zaměřena pouze na jednotlivé složky mléka.

2.3.1 Základní složky mléka

Samotné zastoupení základních složek mléka analyzovaných při kontrole užitekosti z hlediska odhadu energetické bilance neposkytuje úplně kompletní výpověď. Vztah k energetické bilanci z běžně stanovovaných složek mléka mají především tuk, citrát a ketolátky.

Obsah tuku se obtížně interpretuje a jeho množství v mléce je velmi variabilní. Koncentrace tuku během NEB zprvu stoupá díky lipomobilizaci, později však obsah tuku v mléce poklesne a zůstává na nízké úrovni i ve chvíli, kdy se již energetická bilance obrací do pozitivní fáze. Pro zjišťování metabolického stavu zvířat se zdá být efektivnější sledování poměru tuku a proteinů (**T:P**), který lze využít pro odhad nutriční nerovnováhy a některých metabolických poruch. Zvyšování poměru T:P například souvisí s hyperketonémií a výskytem subklinických i klinických ketóz (Koeck et al. 2013; 2014). Hodnota T:P vyšší než 1,5 indikuje energetický deficit, respektive poukazuje na vysokou míru lipomobilizace a zvyšuje riziko metabolických poruch (Mulligan et al. 2006). Naopak pokles poměru T:P (většinou T:P < 1) může indikovat subakutní ruminální acidózu (**SARA**) známou také jako syndrom nízké tučnosti mléka (Danscher et al. 2015). Pro SARA je dále charakteristický pokles tuku v mléce a zvýšený výskyt průjmů a laminitid (Plaizier et al. 2008).

Citrát je produkovaný v citrátovém cyklu kondenzací acetyl-CoA s oxalacetátem a hraje velmi důležitou roli v *de novo* syntéze mastných kyselin v mléčné žláze. Hladiny citrátu v mléce jsou ve vyšších koncentracích u zdravých dojnic v časně laktaci v důsledku přirozeně vyššího obratu citrátového cyklu a zvýšené absorpce NEFA pro syntézu mléčného tuku (Garnsworthy et al. 2006). Ve stavu NEB však dochází ke snížení hladiny citrátu v důsledku snížené dostupnosti oxalacetátu, který je primárně využíván v procesu glukoneogeneze. Pokud není k dispozici oxalacetát, tak neprobíhá citrátový cyklus, je inhibována syntéza citrátu a acetyl-CoA vstupuje do procesu ketogeneze (Baticz et al. 2002). Z výše uvedeného se zdá, že by obsah citrátu v mléce mohl sloužit jako indikátor stavů podvýživy, problémem je však jeho velká variabilita, která se při 48 hodinovém sledování pohybovala okolo 20 % (Masson 2004). Obsah ketolátek v mléce (aceton, BHB) dobře koreluje s hyperketonémií a může být snadno využíván pro odhad subklinických ketóz (Van der Drift et al. 2012). Hraníční hodnoty obsahu ketolátek v mléce pro diagnostiku subklinických ketóz se v dostupné literatuře velmi liší, pro BHB se pohybují od 0,14 do 0,20 mmol/l (Denis-Robichaud et al. 2014; Renaud et al. 2019) a pro aceton od 0,15 do 0,70 mmol/l (Gustafsson & Emanuelson 1996; De Roos et al. 2007).

2.3.2 Mastné kyseliny mléčného tuku

2.3.2.1 Složení mléčného tuku a zastoupení jednotlivých mastných kyselin

Mléčný tuk obsahuje více než 95 % TG, dále diacylglyceroly (cca 2 %), cholesterol (< 0,5 %), fosfolipidy (okolo 1 %) a stopové množství volných mastných kyselin (cca 0,1 %). Mléčné TG jsou syntetizovány z více než 400 různých mastných kyselin, které jsou ve stopových množstvích, a pouze asi 15 z nich je v koncentraci 1 % nebo vyšší (Moate et al. 2007). Mastné kyseliny můžeme rozdělit podle délky uhlíkového řetězce na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short-chain fatty acids, **SCFA**) s počtem do 10 uhlíků, mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (medium-chain fatty acids, **MCFA**) s 11 až 16 uhlíky a LCFA s 18 uhlíky a více. Dále můžeme mastné kyseliny rozdělit dle stupně nasycení (přítomnost a počet dvojných vazeb) na nasycené mastné kyseliny (saturated fatty acids, **SFA**), které neobsahují žádné dvojně vazby, mononenasycené mastné kyseliny (mono-unsaturated fatty acids, **MUFA**) s jednou dvojnou vazbou a polynenasycené mastné kyseliny (poly-unsaturated fatty acids, **PUFA**) se dvěma a více dvojnými vazbami. SFA představují 70 % všech mastných kyselin v kravském mléce. Kvantitativně nejdůležitější je kyselina palmitová (**C16:0**), která tvoří 30 % všech mastných kyselin v mléce. Následují kyselina stearová (**C18:0**) a myristová (**C14:0**), které tvoří 12, respektive 11 %. Deset procent nasycených mastných kyselin představují SCFA. Podíl kyseliny máselné (**C4:0**) bývá okolo 4 % a kapronové (**C6:0**) cca 2,5 % ze všech mléčných mastných kyselin (MacGibbon & Taylor 2006). Přibližně 25 % mastných kyselin v mléce tvoří MUFA, kdy nejvýznamnější podíl představuje kyselina olejová (**C18:1 cis-9**). PUFA jsou zastoupeny 2,3 % a hlavními zástupci jsou kyselina linolová (**C18:2 cis-9, 12**) a kyselina α -linolenová (α -linolenic acid, **ALNA**, **C18:3 cis-9, 12, 15**). Zhruba 2,7 % mléčných mastných kyselin tvoří trans-mastné kyseliny s jednou nebo více dvojnými vazbami v *trans* pozici. Hlavní trans-mastnou kyselinou je kyselina vakcenová (**C18:1 trans-11**). Mléčný tuk obsahuje také konjugovanou kyselinu linolovou (conjugated linoleic acid, **CLA**) s několika různými izomery, kdy hlavním izomerem je kyselina rumenová (rumenic acid, **C18:2 cis-9, trans-11**), která tvoří 75 až 95 % celkové CLA (Lindmark Månsson 2008).

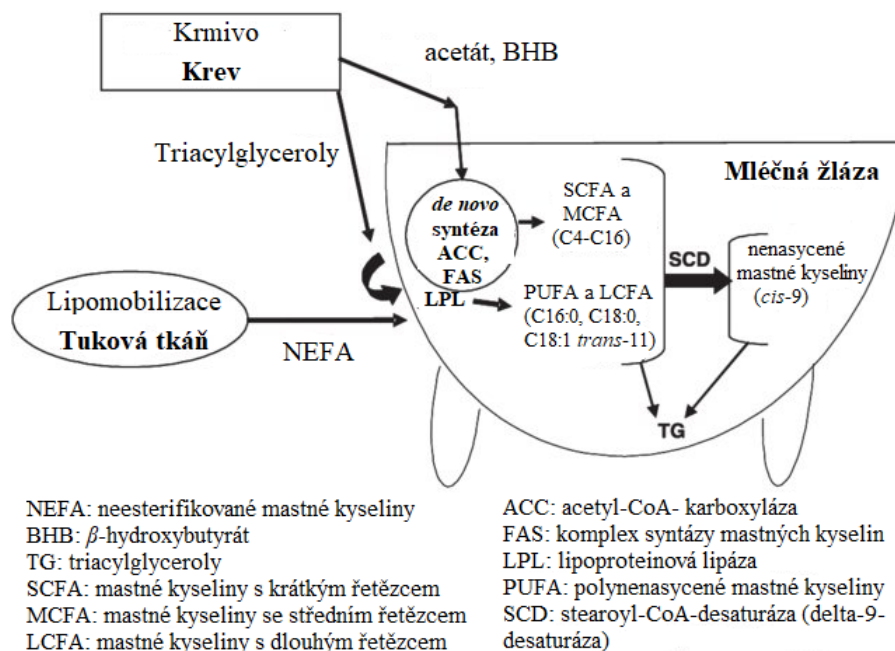
2.3.2.2 Syntéza mastných kyselin mléčného tuku

Mléčné mastné kyseliny pocházejí ze čtyř zdrojů (Stoop et al. 2009): **(1)** z *de novo* syntézy v mléčné žláze pochází asi 50 % mastných kyselin, **(2)** z krmiva pochází 40–45 %, **(3)** méně než 10 % mastných kyselin je uvolňováno lipolýzou tukové tkáně, **(4)** zbytek je tvořen v bachoru biohydrogenací (nasycení dvojných vazeb), bakteriální degradací a mikrobiální *de novo* syntézou. Navzdory faktu, že přežvýkavci absorbují ze střev zejména nasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, které mají vysoký bod tání, projevuje se u nich několik zvláštností metabolismu, kterými je zajišťováno snížení bodu tání lipidů, a to zejména v mléce. Mezi tyto zvláštnosti, které jsou podrobněji rozebrány níže, patří desaturace (vytvoření dvojné vazby) LCFA ve střevní a tukové tkáni a v tkáni mléčné žlázy pomocí enzymu delta-9-desaturázy, která vytváří dvojnou vazbu na delta⁹ pozici mastné kyseliny (počítáno od karboxylové skupiny). V mléčné žláze je to pak *de novo* syntéza SCFA, MCFA, absence elongace (prodlužování) uhlíkového řetězce a nerovnoměrná esterifikace různých mastných kyselin (Chilliard et al. 2000).

De novo syntéza mléčných mastných kyselin probíhá v cytosolu buněk mléčné žlázy z acetyl-CoA, jehož prekurzorem je u přežvýkavců acetát, který vzniká bachorovou fermentací krmiva. V prvním a hlavním regulačním kroku samotné syntézy mastných kyselin je acetyl-CoA karboxylován pomocí enzymu acetyl-CoA-karboxyláza a vzniká malonyl-CoA. Malonyl-CoA je dále využíván jako stavební blok pro mastné kyseliny pomocí multienzymového komplexu zvaného komplex syntázy mastných kyselin. Dochází k postupnému přidávání dvou atomů uhlíku (C2) k rostoucímu řetězci mastné kyseliny. Tento proces končí u C16 (palmitoyl), který je poté uvolněn thioesterázou (deacylázou) a většinou dále esterifikován na acylglyceroly. V mléčné žláze jsou pro acylové zbytky C8, C10 a C12 zvláštní thioesterázy, které jsou u přežvýkavců přímo součástí komplexu syntázy mastných kyselin. Kromě acetátu může sloužit jako prekurzor pro syntézu mastných kyselin v mléčné žláze butyryl-CoA vzniklý z butyrátu, který stejně jako acetát vzniká bachorovou fermentací krmiva (Kaneko et al. 2008). Většina *de novo* syntetizovaných mastných kyselin je nasycená, jelikož delta-9-desaturáza má velmi nízkou aktivitu u mastných kyselin s méně než 18 uhlíky, ačkoli malý podíl C14:0 a C16:0 je desaturován na kyselinu myristoolejovou (**C14:1 cis-9**) a palmitoolejovou (**C16:1 cis-9**). *De novo* syntézou vznikají mastné kyseliny se sudým počtem uhlíků a s délkou maximálně 16 uhlíků (C16), protože, oproti ostatním tkáním, v laktující mléčné žláze nedochází ke konverzi C16:0 na C18:0 pouhou elongací uhlíkového řetězce (Chilliard et al. 2000). Část C16:0 a LCFA pochází z krmiva nebo lipolýzy tkáňových triacylglycerolů, přičemž NEFA

prochází do mléčné žlázy pouze při jejich vysoké koncentraci v krvi (Lindmark Månsson 2008). Syntéza a sekrece lipidů v mléčné žláze je zjednodušeně zobrazena na obrázku 3.

Obrázek 3: Syntéza a sekrece lipidů v mléčné žláze přežvýkavců (Leroux et al. 2003)



Tuky pocházející z krmiva se obvykle do mléčné žlázy nedostávají beze změny, ale jsou v batoru hydrolyzovány a poté jsou nenasycené mastné kyseliny biohydrogenovány, kdy dochází k nasycení dvojných vazeb (C18:1, C18:2 a C18:3 \rightarrow biohydrogenace na C18:0), v jehož průběhu dochází také i izomeracím. V důsledku těchto procesů mají mastné kyseliny opouštějící bator jiný profil než v lipidech přijatých v krmivu. V zásadě lipidy, které opouštějí bator, obsahují podstatně více kyseliny stearové a méně nenasycených mastných kyselin C18, které představují většinu mastných kyselin v krmivech (Harfoot & Hazlewood 1997). Biohydrogenace v batoru je zahájena velmi rychle a má intenzivní průběh, protože se předpokládá, že PUFA mají toxické účinky na mikrobiální systém v batoru (Jenkins 1993; Maia et al. 2007). Rozsah a produkty izomerace a biohydrogenace volných mastných kyselin v batoru jsou však velmi proměnlivé a závisí na složení stravy, která může ovlivnit složení mikrobiální populace, velikosti částic a rychlost průchodu tráveniny z batoru do střev (Jenkins 1993; Harfoot & Hazlewood 1997; Bauman et al. 2001). Kvantifikace přechodu každé mastné kyseliny z krmiva do mléčného tuku je komplikovaná kvůli *de novo* syntéze části C16:0, desaturaci v mléčné žláze, kdy až 40 % C18:0 je pomocí delta-9-desaturázy konvertováno na C18:1 (Enjalbert et al. 1998), a batorové biohydrogenaci.

Některé bachorové mikroorganismy, zejména bakterie, mají schopnost také *de novo* syntézy mastných kyselin (Jenkins 1993), přičemž vznikají zejména kyseliny palmitová a stearová, v menším množství také mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků (odd-chain fatty acids, **OCFA**) a rozvětveným uhlíkovým řetězcem (branched-chain fatty acids, **BCFA**). Bakteriální *de novo* syntéza mastných kyselin je obdobná *de novo* syntéze v mléčné žláze, liší se prekurzorem, který je využíván syntázou mastných kyselin, kdy je kromě acetylu-CoA využíván také propionyl-CoA (C3) nebo valeryl-CoA (C5) ke tvorbě OCFA a další prekurzory pro syntézu BCFA. Posuny v profilu OCFA a BCFA mohou nastat v důsledku afinity prekurzorů k příslušné syntáze mastných kyselin, což závisí zejména na složení bakteriální populace, protože některé syntázy mastných kyselin jsou specifické pro jednotlivé bakteriální druhy (Vlaeminck et al. 2006).

2.3.3 Faktory ovlivňující složení mastných kyselin mléka

Variabilita poměru mastných kyselin v mléce je podmíněna několika faktory, mezi které patří plemeno, genetika, pořadí a fáze laktace, bachorová fermentace, zdravotní stav, příjem energie a vlákniny v krmné dávce, doplňky tuku v krmivu a sezónní vlivy na krmivo. Dlužno dodat, že většina studií zabývajících se složením mastných kyselin v mléce a faktory, které obsahy mastných kyselin ovlivňují, cílí primárně na zdraví konzumentů mléka a mléčných výrobků, nikoli na zdraví a metabolické změny dojníc.

2.3.3.1 Vliv genetiky, plemene, pořadí laktace, fáze laktace a lipomobilizace

Z genetických aspektů byla věnována pozornost zejména výzkumu heritability obsahu mastných kyselin v mléce. Nízká dědivost (okolo 0,2) byla odhadnuta pro LCFA, což lze vysvětlit jejich původem z krmiva, zatímco *de novo* syntetizované mastné kyseliny dosahovaly hodnot dědivosti od 0,3 do 0,5 (Stoop et al. 2008; Bastin et al. 2011). Kay et al. (2005) prokázali u dvou genetických linií holštýnského plemene, že dlouhodobá selekce na mléčnou užitkovost neměla žádný, nebo jen velmi malý vliv na obsahy většiny mastných kyselin mléčného tuku.

Meziplenné rozdíly byly nejčastěji zkoumány mezi holštýnským plemenem a jersey (Morales et al. 2000; White et al. 2001), ale byly publikovány i studie s dalšími plemeny, jako jsou belgické modré, brown swiss, montbéliarde, salers nebo simentálské (Moore et al. 2005; Soyeurt et al. 2006; Barłowska et al. 2009, Gottardo et al. 2017), zejména v porovnání s holštýnským plemenem. Srovnávací studie naznačují, že dojená plemena s vysokou užitkovostí mléčného tuku mají často méně žádoucí složení mastných kyselin z hlediska zdraví konzumentů mléka a mléčných výrobků (vyšší hladiny nasycených mastných kyselin a nižší podíl PUFA) než plemena s nižší užitkovostí. Meziplenné rozdíly by mohly být dány

odlišnou užítkovostí, různou aktivitou desaturáz (Schennink et al. 2008) a genetickým polymorfismem některých genů zodpovídajících za syntézu mastných kyselin (Arnould & Soyeurt 2009). Metaanalýza publikovaných dat je velmi problematická kvůli mnohdy nejednoznačným výsledkům, použití různých metodik a experimentálních podmínek a často z důvodu zahrnutí velmi malého počtu jednotlivých dojnic do pokusu (Samková et al. 2012). Někteří autoři se shodují, že existuje větší variabilita ve složení mastných kyselin v mléce mezi jednotlivými dojnicemi (uvnitř plemene) než mezi samotnými plemeny (Kelsey et al. 2003; Soyeurt et al. 2006).

Vliv pořadí laktace (parita) na složení mastných kyselin mléka není příliš zdokumentovaný. V některých studiích nebyl objeven žádný vliv pořadí laktace (Secchiari et al. 2003; Kgwatalala et al. 2009), zatímco v jiných vliv parity na složení mastných kyselin mléčného tuku byl prokázán (Kelsey et al. 2003; Craninx et al. 2008, Soyeurt et al. 2008). Nejvíce byly sledovány rozdíly mezi prvotelkami a dojnicemi na druhé a vyšších laktacích. Například Bilal et al. (2014) zjistili, že prvotelky měly v mléce vyšší zastoupení C18:1 *cis*-9, ALNA, vakcenové a CLA a nižší obsahy C12:0 až C16:0 ve srovnání s dojnicemi na druhé a vyšších laktacích. Nižší podíl *de novo* syntetizovaných mastných kyselin u prvotelek může být vysvětlen nižší metabolickou aktivitou mléčné žlázy a menší expresí syntázy mastných kyselin (Miller et al. 2006).

V časně laktaci má velký vliv na složení mastných kyselin mléka lipomobilizace tukové tkáně, která se u dojnic na začátku laktace běžně objevuje, jak je popsáno výše. V tukové tkáni dominují zejména C16:0, C18:0 a C18:1, přičemž vysoká koncentrace C18:1 je dána nárůstem aktivity delta-9-desaturázy v tukové tkáni (Smith et al. 2006). Aktivita tohoto enzymu je pravděpodobně adaptivní mechanismus sloužící k utilizaci dominantních nasycených mastných kyselin absorbovaných ze střeva (Loften et al. 2014). Při lipomobilizaci tedy roste jejich koncentrace v krevním oběhu (jakožto NEFA). Takto uvolněné LCFA, zejména kyselina olejová, jsou do velké míry přenášeny z krve do mléčné žlázy a jsou inkorporovány do mléčného tuku (Tyburczy et al. 2008). Bylo prokázáno, že LCFA pocházející z krve a zabudované do mléčného tuku inhibují *de novo* syntézu SCFA a MCFA (C6:0 až C16:0), jelikož snižují aktivitu acetyl-CoA-karboxylázy, která je primárním regulačním krokem syntézy mastných kyselin, jak je vysvětleno výše (Palmquist et al. 1993; Stoop et al. 2009; Gross et al. 2011). Syntéza kyseliny máselné (C4:0) však není inhibována vůbec, jelikož tato se tvoří dvěma cestami nezávislými na acetyl-CoA-karboxyláze (Palmquist et al. 1993). Při NEB se tedy do mléka nejvíce dostávají C16:0, C18:0 a C18:1. Nicméně s C16:0 je situace komplikovanější, protože kyselina palmitová se tvoří také *de novo*, ale při NEB je syntéza

inhibována, a zároveň při nadbytku energie v suchostojném období (> 150 %) se snižuje oxidace palmitátu, proto se C16:0 při překrmování v období stání na sucho poté kumuluje v játrech (Litherland et al. 2011). Oproti tomu C18:0 při NEB není kumulována ve tkáních, ale je metabolizována v játrech či svalech na energii nebo je sekretována do mléka (Sato & Inoue 2006).

Velký vliv na zabudování konkrétních mastných kyselin do mléčného tuku má také struktura nově utvářených triacylglycerolů v mléce, které zodpovídají, mimo jiné, za viskozitu mléka. Dojnice totiž selektivně včleňují mastné kyseliny tak, aby udržely optimální tekutost mléka. Pokud při NEB roste koncentrace mastných kyselin o vysokých teplotách tání (C16:0, C18:0), pak dochází ke stimulaci obsazování pozic glycerolu mastnými kyselinami o nízkých teplotách tání (C4:0, jejíž *de novo* syntéza není inhibována, a C18:1) a tvoří se TG s teplotou tání ideální pro udržení tekutosti mléka (Gross et al. 2011; Loften et al. 2014).

2.3.3.2 Vliv výživy

Jak již bylo uvedeno výše, na složení mastných kyselin v mléce má velký vliv složení krmiva. Krmivo a jeho složky ovlivňují složení mastných kyselin nejen přímo, ale také nepřímo prostřednictvím vlivu na biohydrogenační procesy v bacheru a samotnou syntézu mastných kyselin v mléčné žláze.

Objemná krmiva pokrývají 20 až 100 % energetických požadavků v závislosti na systému chovu, resp. krmení (Halmemies-Beauchet-Filleau et al. 2013). Význam pícnin jako zdroje mastných kyselin je velký, i přesto, že samy obsahují velmi malá množství mastných kyselin (Harfoot & Hazlewood 1997). Čerstvá či konzervovaná píce obsahuje zejména kyselinu linolovou, palmitovou a ALNA v různých koncentracích v závislosti na botanickém složení, ročním období, klimatu, úrovni zralosti, hnojení a konzervační metodě (Chilliard et al. 2001; Dewhurst et al. 2006; Elgersma et al. 2006). Objemná krmiva jsou nejdůležitějším zdrojem vlákniny, která je nepostradatelná pro bacherovou fermentaci a tvorbu acetátu, který je nezbytný pro syntézu mastných kyselin v mléčné žláze (Ashes et al. 1997).

Couvreur et al. (2006) zjistili, že se zvyšujícím se příjmem čerstvé píce (0–100 %) rostly koncentrace ALNA, kyseliny vakcenové a kyseliny rumenové v mléce, zatímco koncentrace kyselin s C10 – C16 naopak poklesly. Koncentrace ALNA v mléce vzrůstají, protože při vysokém příjmu píce, která je významným zdrojem ALNA, může více ALNA uniknout bacherové biohydrogenaci. Vysoká zásoba substrátů pro bacherovou biohydrogenaci také vede ke zvýšenému přenosu meziproductů (především kyseliny vakcenové) do mléčné žlázy (Chilliard et al. 2007). Kyselina rumenová (hlavní izomer CLA) je však zejména meziproductem biohydrogenace kyseliny linolové, nikoli ALNA, a zvýšené koncentrace CLA

v mléce krav na pastvinách jsou spíše připisovány vyšší desaturázové aktivitě v mléčné žláze než zvýšené tvorbě v bachoru (Lahlou et al. 2014). I přes nízké podíly kyseliny olejové v píce bylo často pozorováno, že krávy na pastvinách vykazují také zvýšené koncentrace kyseliny olejové v mléce (Ferlay et al. 2006; La Terra et al. 2010; Lahlou et al. 2014). Tento jev lze vysvětlit tím, že mléčná žláza vychytává velké množství C18:0, která vznikla biohydrogenací ALNA a vysokou aktivitou desaturázy v mléčné žláze, díky které z C18:0 vzniká kyselina olejová (Schroeder et al. 2004). Se zvyšujícím se příjmem čerstvé píce klesaly v mléce obsahy kyseliny palmitové a v menší míře také myristové (Couvreur et al. 2006).

Čerstvá píce ovlivňuje složení mastných kyselin v mléce jiným způsobem než píce konzervovaná a existují také rozdíly mezi konkrétními substráty pro konzervaci a metodou konzervace. Seno má ve srovnání se silážemi například nižší obsah ALNA, nicméně míra využitelnosti mastných kyselin ze sena je pro změnu vyšší než ze siláží, proto mléko dojnic krmených senem obsahovalo paradoxně vyšší podíl ALNA než mléko dojnic krmených silážemi (Shingfield et al. 2005). Oproti tomu Halmemies-Beauchet-Filleau et al. (2013) nezjistili významné rozdíly v obsahu ALNA a kyseliny linolové ani v celkových koncentracích PUFA v mléce dojnic krmených senem nebo silážemi. Porovnání různých druhů siláží (travní, jetelová, vojtěšková, siláž z luskovin) ukázalo, že nejvyšší obsah kyseliny linolové a ALNA v mléce byl u dojnic krmených silážemi z luskovin, pak jetelovou, vojtěškovou a travní siláží (Dewhurst et al. 2003).

Kukuřičná siláž obvykle obsahuje 30 až 60 % zrna a má oproti travní siláži vysoký obsah škrobu a nižší obsah vlákniny, má nízký obsah ALNA, ale je bohatá na kyselinu linolovou a olejovou (Chilliard et al. 2001; Ferlay et al. 2006). Navzdory poměrně vysokému množství kyseliny olejové v kukuřičné siláži nebyl prokázán vliv na zvýšení kyseliny olejové v mléce, což by mohlo být důsledkem přeměny kyseliny olejové v bachoru na kyselinu stearovou (Ferlay et al. 2006; Chilliard et al. 2007; Van Gastelen et al. 2015).

Složení mastných kyselin v mléce ovlivňuje nejen zdroj objemného krmiva, ale také množství koncentrovaných krmiv ve stravě. Vysoký obsah škrobu v krmivu může způsobit posun k amylytickým kmenům bachorových mikrobů, snížit pH bachoru a tím snížit biohydrogenační procesy (Doreau & Ferlay 1994). To také vede k posunu ve fermentačních procesech, kdy se tvoří méně acetátu a více propionátu, což může narušit syntézu mléčného tuku v mléčné žláze, a tak vyvolat jeho úbytek (Ashes et al. 1997).

2.3.3.2.1 Vliv podávání doplňků tuků do krmné dávky

Predikce účinku podávání doplňků tuků je velmi obtížná vzhledem k povaze jednotlivých tuků (složení mastných kyselin), úpravě (olejnatá semena, chráněné vs. nechráněné tuky) a množství spolu s interakcemi s ostatními složkami krmiva, jelikož složení krmné dávky má významný vliv na biohydrogenaci v bachoru. Důvodem manipulace se složením mastných kyselin byly zejména snahy o zlepšení nutriční kvality mléka pro spotřebitele, které se týkaly především snížení podílu nasycených mastných kyselin a navýšení podílu polynenasycených mastných kyselin podáváním různých forem doplňků tuku (chráněné a nechráněné oleje, olejnatá semena, duodenální infúze mastných kyselin).

Pokusy o snížení podílu saturevaných mastných kyselin ukázaly, že podíl kyseliny máselné (C4:0) nebyl nikdy signifikantně snížen, spíše měl naopak tendenci se navyšovat (Palmquist et al. 1993; Enjalbert et al. 1998), pravděpodobně z důvodu zachování tekutosti mléčného tuku, jelikož kyselina máselná má nízký bod tání. Podíl mastných kyselin s délkou řetězce C6 až C8 se snížil pouze tehdy, když nechráněný olej ovlivňoval bachorové funkce. Poměry C4:0, C6:0 a kyseliny kaprylové (**C8:0**) se při podávání chráněných tuků či duodenálních infúzí neměnily (Christensen et al. 1994; Drackley et al. 1992). Pokles poměru C16:0 k C18:0 může být přínosný pro lidské zdraví. Podíl C16:0 byl při podávání doplňků tuku vždy snížen, samozřejmě vyjma podávání doplňků s vysokým obsahem palmového tuku, navíc zkrmování C16:0 snížilo *de novo* syntézu (Loften et al. 2014). Dalším cílem pro lidské zdraví a mlékařskou technologii (zlepšení tekutosti tuků) bylo snížení poměru C18:0 k C18:1 *cis*-9, přičemž prostředkem k dosažení tohoto cíle je krmení oleamidů nebo účinně chráněných olejů nebo semen bohatých na kyselinu olejovou (řepka, sója). Zároveň krmné doplňky bohaté na kyselinu stearovou nezvyšují její množství v mléčném tuku, protože velká část C18:0 je desaturována na kyselinu olejovou. Poměr C18:0 k C18:1 *cis*-9 se naopak výrazně zvyšuje krmením nechráněných semen bavlníku, pravděpodobně v důsledku inhibice delta-9-desaturázy kyselinou cyklopropenovou z bavlníkových semen (Chilliard et al. 2000).

Esenciální polynenasycené mastné kyseliny, kyselina linolová a ALNA, se v tkáních přežvýkavců nesyntetizují, proto je jejich koncentrace v mléce závislá na výživě. Tyto mastné kyseliny slouží jako prekurzory pro syntézu ostatních PUFA (Rodriguez-Cruz et al. 2006). Podíl PUFA, které projdou z bachoru dál do trávicího traktu, může být zvýšen pomocí krmiv bohatých na PUFA a faktory, které je chrání před mikrobiální biohydrogenací. Podíl kyseliny linolové v mléce lze zvýšit asi o 3 % přidáním světlicového oleje a směsi bavlníkového a světlicového oleje (Demeyer & Doreau 1999). Hlavním zdrojem ALNA je především zelená píce, proto u krav na pastvě může být koncentrace této mastné kyseliny až čtyřikrát vyšší

než u krav krmených konzervovanými krmivy. Záleží ovšem také na druhu porostu a ročním období. Nejvyšší podíl ALNA v píci je na jaře a ke konci podzimu, proto se může stát, že i u pasoucích se krav nebude nárůst kyseliny linolenové v mléce žádný (Lawless et al. 1998). Mezi nezelenými krmivy je lněné semeno jediné, které obsahuje významné množství ALNA. Podáváním lněného semene se zvýšil podíl ALNA až na 1,5 % z celkových mastných kyselin v mléce. Podávání čistého nechráněného lněného oleje ovšem koncentraci ALNA nezvyšuje (Kelly et al. 1998), což je dáno pravděpodobně tím, že celé lněné semeno je lépe chráněno před biohydrogenací v bachoru než samotný olej. Nicméně lněné semeno má negativní účinek na trávení vlákniny (Broudiscou et al. 1994), takže potenciální pozitivní účinky na zvýšení ALNA jsou za cenu snížení energetické hodnoty krmiva, proto se lněné semeno příliš nevyužívá. Svou roli hraje i jeho cena. Byly také provedeny pokusy o zvýšení pro lidskou výživu esenciálních mastných kyselin eikosapentaenové (**C20:5**), dokosapentaenové (**C22:5**) a dokosahexaenové (**C22:6**) v mléce, čehož lze dosáhnout přidavkem rybího oleje, který má ovšem velmi negativní vliv na chuť mléka (Lacasse et al. 2002). Další důležitá mastná kyselina ve výživě člověka je CLA. Buňky mléčné žlázy a tukové tkáně jsou schopné syntetizovat izomery CLA z kyseliny vakcenové a dalších izomerů C18:1. Pro zvyšování CLA a jejích prekurzorů v mléce jsou účinné zejména rostlinné oleje s vysokým obsahem kyseliny linolové (slunečnicový, řepkový, sójový) a pasterizovaný porost v rané fázi růstu (Chilliard et al. 2000).

2.3.4 Možnosti odhadu NEB pomocí mastných kyselin v mléce

Z výše uvedených poznatků vyplývá, že vysoký obsah C18:0 a C18:1 a zároveň snížená koncentrace *de novo* syntetizovaných mastných kyselin by mohly napomáhat v diagnostice NEB. Několik autorů se zabývalo možnostmi predikce zvýšených sérových NEFA a souvisejících metabolických onemocnění pomocí složení mastných kyselin v mléčném tuku u dojnic v časně laktaci (Jorjong et al. 2014; Mann et al. 2016; Dórea et al. 2017; Puppel et al. 2017; Mäntysaari et al. 2019). Porovnání výsledků není jednoduché, jelikož studie používaly odlišné metodické postupy. Prvním rozdílem byly samotné vzorky, kdy pro analýzu NEFA bylo použito buď sérum, nebo plazma, a pro samotnou diagnostiku NEB a souvisejících poruch byla hraniční koncentrace NEFA $\geq 0,6$ mmol/l nebo NEFA $\geq 1,0$ mmol/l. Vzorky mléka pocházely buď z ranního nebo odpoledního dojení nebo se jednalo o směsný vzorek. Rozdíly byly také v laboratorní metodě pro analýzu mastných kyselin mléčného tuku, kdy byla použita buď plynová chromatografie, nebo infračervená spektroskopie, která je standardně využívána v rámci kontroly užitkovosti. V téměř každé studii byl využit jiný matematicko-statistický model (korelace, predikční modely, výpočet hraniční hodnoty pro diagnostiku). I přes vyjmenované rozdíly se většina autorů shodla, že při vysokých hladinách NEFA se

významně zvyšuje C18:1, C18:1 *cis*-9, případně také C16:0 a C16:1 *cis*-9, a naopak se snižují obsahy SCFA a MCFA. Ve dvou studiích sledovali také poměry mezi některými mastnými kyselinami mléčného tuku a došli k závěru, že s vysokými koncentracemi NEFA se zvyšují poměry mezi C16:1 *cis*-9 a kyselinou pentadecylovou (C15:0), mezi kyselinou heptadecylovou (C17:0) a C15:0, mezi C18:1 a C14:0, mezi C18:1 a SCFA a MCFA a mezi C18:1 *cis*-9 a C15:0 (Dórea et al. 2017; Mann et al. 2016). Pro úspěšnější odhad NEB a rizik s ní souvisejících bude pravděpodobně potřeba využívat složitější predikční modely s využitím většího množství dat (vliv parity, období, mléčné užitkovosti, prostředí atp.) než jen samotné mastné kyseliny mléka či jejich poměry (Reus & Mansfeld 2020).

2.4 Prevence NEB

Existuje několik možností, jak preventivně zasáhnout a zamezit tak dalšímu prohlubování NEB a eliminovat případné související zdravotní problémy. Mezi základní preventivní opatření patří (1) správný management období stání na sucho, (2) podpora přirozených mechanismů odbourávání nadbytečných NEFA a (3) podání umělých zdrojů energie.

(1) Klíčovým faktorem úspěšného přechodu na vysokou laktaci se jeví tělesná kondice při otelení (Roche et al. 2009). Optimální kondice při otelení závisí na plemeni a mléčné užitkovosti. Pro dojnice holštýnského plemene je optimální BCS 3,0 až 3,25 a 3,5 až 3,75 bodu u jalovic (Roche et al. 2009; Drackley & Cardoso 2014). U kříženek lze optimální rozmezí rozšířit od 3,0 až do 3,75 bodu podle podílu krve plemene kombinovaného užitkového typu. Cílem k udržení kondice v suchostojném období je podávání nízkoenergetické krmné dávky s vysokým obsahem vlákniny zabraňující nadměrnému zvýšení kondice krav před porodem.

(2) Podporou přirozených mechanismů se rozumí využití takových opatření, která umožňují zvýšit jaterní β -oxidaci. Například podávání krmiva s vysokým obsahem kyseliny palmitové a olejové, které zvyšují oxidační kapacitu jater a snižují koncentraci TG v játrech (Grum et al. 1996, Mashek & Grummer 2003). Je však potřeba mít na paměti, že příliš vysoký obsah mastných kyselin v krmné dávce může snižovat trávení vlákniny, což snižuje produkci acetátu využívaného k syntéze mléčného tuku, může také vést k poklesu proteinu v mléce a ke snížení růstu bachorových mikroorganismů.

Jinou možností zvyšování β -oxidace, a tím snižování sérových hladin NEFA, je podpora fyzické aktivity dojníc (Pethick 1991). Bylo zjištěno, že výskyt některých metabolických poruch souvisejících se zvýšenou hladinou NEFA může být potlačen, pokud dojnice

v tranzitním období budou vystaveny dennodenní aktivitě, jakou je například pohyb na pastvě či ve výbězích (Adewuyi et al. 2005).

(3) Další možností prevence je podání umělých zdrojů energie, jedná se o exogenní glukoneogenní substráty (aminokyseliny, těkavé mastné kyseliny, propylenglykol) a minerální látky, jejichž podání zvyšuje účinnost přirozených mechanismů a pomáhá dojnícím v boji nebo mírnění peripartálních chorob (Overton & Waldron 2004). Jedním z nejvíce využívaných glukoneogenních substrátů je propylenglykol, který je rychle absorbován bachorem a konvertován na glukózu, a částečně, ještě před absorpcí, je metabolizován na propionát, který je také substrátem pro glukoneogenezi (Nielsen & Ingvarsen 2004). Propylenglykol se používá k ošetření ketóz již od 50. let 20. století. Ukázalo se, že propylenglykol zmírňuje negativní efekt sníženého množství sušiny na energetickou bilanci a snižuje riziko ketóz a jaterních steatóz (Studer et al. 1993; Formigoni et al. 1996). Výsledky účinků propylenglykolu jsou ovšem nekonzistentní. Studer et al. (1993) zjistili, že litr propylenglykolu dodávaný během posledních 10 dnů před porodem zvyšuje koncentraci glukózy a snižuje hladiny plazmatických NEFA a BHB. Burhans et al. (1997) naopak žádný efekt podávání propylenglykolu na hladiny NEFA a BHB před porodem nenašli, ale drenáž propylenglykolu těsně po porodu signifikantně snížila plazmatické koncentrace NEFA i BHB. Butler et al. (2006) zjistili zlepšení negativní energetické bilance u krav, kterým byl podáván propylenglykol, nicméně tento efekt se v jiných studiích neukázal (Pickett et al. 2003; Moallem et al. 2007). Ve studii Liu et al. (2009) podávali propylenglykol v různých dávkách dojnícím od 1. do 63. dne laktace a sledovali účinky na metabolismus. Koncentrace sérové glukózy a inzulínu se zvyšovaly s rostoucí dávkou propylenglykolu a v průměru byla koncentrace glukózy o 6 % vyšší u krav, které dostaly propylenglykol, než u kontrolní skupiny.

Využití umělého podání exogenních zdrojů může být užitečné, ale bývá dosti nákladné a výsledky jsou nejednoznačné. Za užitečnější se považuje využití fyziologických mechanismů, jako je optimální management krmení v období stání na sucho a podpora každodenní fyzické aktivity, která pomáhá spalovat přebytečné NEMK pomocí β -oxidace (Adewuyi et al. 2005).

Negativní energetická bilance je stále aktuálním problémem. Spolehlivým ukazatelem NEB a s ní souvisejících problémů jsou přímé indikátory v krevním séru dojnic (zejména NEFA a BHB), jejichž stanovení je pro chovatele (jak z hlediska odběru, tak i vlastního stanovení) pracné a ekonomicky náročné. Současné moderní vybavení laboratoří pro rozbor mléka umožňuje stanovení velkého počtu parametrů, které zahrnují i mastné kyseliny mléčného tuku, které mohou být využity jako nepřímé indikátory NEB. Jsou tak vytvořeny předpoklady pro využití rozšířené analýzy vzorků mléka v rámci kontroly užitkovosti k odhadu energetické bilance, včasné predikci zvýšeného zdravotního rizika, ztráty reprodukční výkonnosti dojnic i následných ekonomických důsledků. Včasná identifikace zvířat s hlubokou a dlouhotrvající NEB by umožnila zlepšit zdravotní stav a pohodu zvířat, snížit rizika poruch reprodukce, omezit užívání léčiv a zlepšit tak ekonomiku produkce mléka.

3 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY

Na základě současné úrovně poznání byly stanoveny následující pracovní hypotézy:

- 1) Existující rozdíly v mléčné užitkovosti dojnic českého strakatého (**C**) a holštýnského (**H**) plemene se významně promítají do rozdílů v parametrech energetického metabolismu i obsahu vybraných složek mléka.
- 2) Dojnice vystavené výraznější NEB (z hlediska koncentrace sérových NEFA a doby trvání) mají významně horší parametry energetického profilu i rozdílné složky mléka.
- 3) Mezi sérovými koncentracemi NEFA a vybranými složkami mléka existují vztahy, které umožňují predikovat zvýšené riziko NEB dojnic.

Cíle práce:

- Porovnat mléčnou užitkovost, sérové parametry energetického profilu a vybrané složky mléka dojnic C a H plemene.
- Porovnat mléčnou užitkovost, sérové parametry energetického profilu a vybrané složky mléka u skupin dojnic vytvořených podle výskytu a hloubky NEB.
- Stanovit vztahy mezi vybranými složkami mléka a sérovými NEFA a nastítnit možnosti predikce NEB pomocí vybraných složek mléka.

4 MATERIÁL A METODIKA

Práce je založena na experimentu zaměřeném na stanovení přímých a nepřímých indikátorů NEB a jejich vzájemných vztahů u holštýnského (H) a českého strakatého (C) plemene chovaných v identických podmínkách.

4.1 Charakteristika účelového hospodářství VÚŽV v Netlukách

Experiment byl realizován v definovaném prostředí akreditovaných stájí na účelovém hospodářství VÚŽV v Netlukách. Chov čítá přibližně 200 kusů dojníc, přičemž jedna třetina je tvořena plemenem C a dvě třetiny plemenem H. Průměrná užitkovost v době experimentu byla u plemene H 9 894 kg a u plemene C 7 908 kg mléka za normovanou laktaci (tabulka 1).

Tabulka 1: Průměrná mléčná užitkovost a obsah mléčných složek základního stáda během experimentálního období

Užitkovost a složky mléka	C	H
Mléko (kg/305 dnů)	7 908	9 894
Tuk (%)	3,87	3,47
Protein (%)	3,50	3,20

Ustájovací prostory jsou tvořeny komplexem čtyř navazujících stájí s technologií volného ustájení se stelivovými boxy. Zvířata mají umožněn stálý přístup do přilehlých výběhů. Na stáje navazuje autotandemová dojírna 2 x 5 míst, kde jsou dojnice dvakrát denně (4:00 a 16:00) dojeny. Pracoviště je vybaveno modulárním systémem řízení stáda Afifarm (SAE, Afikim, Izrael), který umožňuje individuální záznamy užitkovosti, hmotnosti a aktivity jednotlivých dojníc při každém dojení (2x denně). Automaticky získávaná data jsou průběžně doplňována zootechnickou službou podrobnými informacemi o reprodukci, zdraví a léčení dojníc. Dojnice jsou krmeny dvakrát denně *ad libitum* směsnou krmnou dávkou (total mixed ration, **TMR**) podle fáze laktace a reprodukčního cyklu. Krmivo je šestkrát denně přihrnováno automatickým přihrnovačem. Suchostojné krávy v období přípravy na otelení a následnou laktaci (close-up, tj. 3 týdny před předpokládaným otelením) dostávají speciální krmnou směs. Po porodu krávy přecházejí na krmnou směs pro vysokou užitkovou dojnici (I. fáze laktace), aby byly splněny energetické požadavky na vysokou produkci mléka (přibližně 40 l/den). Základem TMR je kukuřičná siláž, vojtěšková senáž, vojtěškové seno, **LKS** (Lieschen Kolben Schrott, silážovaná kukuřičná drť s listeny), pivovarské mláto, sláma a směs koncentrovaných krmiv včetně minerálně-vitaminových doplňků. Složení krmné směsi pro krávy v jednotlivých fázích je zobrazeno v tabulce 2.

Tabulka 2: Složení krmné směsi pro dojnice v různé fázi laktace

	Suchostojné krávy	Close-up*	I. fáze laktace	II. fáze laktace	III. fáze laktace
Sušina (%)	43,8	46,5	45,0	42,2	37,8
NEL (MJ/kg)	5,5	6,5	7,7	6,8	6,3
Složky (% v sušině)					
Celkový protein	11,3	14,2	17,8	17,1	14,2
Vláknina	27,5	20,8	14,8	17,2	20,4
Tuk		3,8	5,3	3,5	3,8
Škrob		22,7	30,0	26,2	25,0
Ca/P	2,1	3,3	2,1	2,8	2,2
K/Na	8,3	5,0	3,6	3,7	6,3
PDIA/celkový protein		40,0	40,4	35,6	40,6

NEL: netto energie laktace; PDIA: protein digestible in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein (protein skutečně stravitelný v tenkém střevě)

* close-up: krmeno v období 3 týdnů před předpokládaným termínem otelení

4.2 Vlastní experiment

Vlastní experimentální činnost probíhala v období od listopadu 2015 do dubna 2016. Do pokusu bylo zahrnuto celkem 66 dojnic na 1. až 10. laktaci, které byly pro potřeby dalšího zpracování kategorizovány podle pořadí laktace do tří skupin, jak je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3: Počet a pořadí laktace krav zahrnutých do experimentu

Pořadí laktace	C	H
1.	6	17
2. a 3.	8	14
4. a vyšší	10	11
Celkem	24	42

4.2.1 Krevní vzorky

Ke stanovení vybraných parametrů energetického profilu byly odebírány krevní vzorky dojnic. První odběr byl plánován 14 dnů před předpokládaným termínem otelení, ale ve skutečnosti byly odběry provedeny 2–23 dnů před porodem (týden -2), a to z důvodu pozdějšího či naopak předčasného porodu. Další odběr byl prováděn v peripartální periodě (1–4 dny po porodu, týden 0), a dále 7. den (± 2 dny) po porodu (týden 1) a poté v týdenních intervalech až do ukončení experimentu (8 týdnů po porodu, týden 2 – týden 8). Krev byla odebírána z *vena coccygea* do BD Vacutainer® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) zkumavek pro krevní sérum (obrázek 4) vždy ve stejnou denní dobu (7:30–9:00). Z krve bylo

separováno sérum (obrázek 5), které bylo poté zamraženo do doby vlastní analýzy, která se uskutečnila během června 2016. Samotná biochemická analýza byla provedena na Katedře veterinárních disciplín České zemědělské univerzity v Praze pomocí automatického biochemického analyzátoru Erba XL 200® (Erba Mannheim, Mannheim, Německo). Byly stanoveny celkem čtyři vybrané parametry energetického profilu, přičemž pro stanovení triacylglycerolů (TG) a cholesterolu byly využity komerční diagnostické kity Erba (Erba Mannheim) a pro stanovení neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) a β -hydroxybutyrátu (BHB) diagnostické kity Randox (Randox Laboratories, Crumlin, UK).

Obrázek 4: Odběr krevních vzorků do zkumavek pro krevní sérum



Obrázek 5: Separované krevní sérum v mikrozukmavkách připravené pro laboratorní analýzu



4.2.2 Vzorky mléka

Kromě vzorků krve byly od stejných dojníc také pravidelně odebírány vzorky mléka (obrázek 6) pro podrobnější laboratorní analýzu. Vzorky mléka byly po otelení odebírány ve stejných termínech (± 1 den) jako vzorky krve. Mléko bylo odebíráno během odpoledního dojení do standardních vzorkovnic (obrázek 7) obsahujících konzervační tabletu s kombinací Bronopolu a Natamycinu (Broad Spectrum Microtabs II®, D&F Control System, Inc., Dublin, CA, USA) a následně odesíláno na analýzu do Laboratoře pro rozbor mléka v Buštěhradě. Všechny složky mléka byly stanoveny pomocí analyzátoru MilkoScan™ FT+ (Foss Electric, Hillerød, Denmark), který pracuje na principu infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Ze vzorků mléka byly stanovovány obsahy základních složek mléka: tuk, protein, laktóza a ketolátky (aceton a BHB), a skupiny mastných kyselin; (1) dle délky uhlíkového řetězce (podle aplikační nóty 64 pro MilkoScan): mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) s délkou C4–C10, se středním řetězcem (MCFA) s délkou C12–C16 a s dlouhým řetězcem (LCFA), které mají řetězec C18 a delší; (2) dle počtu dvojných vazeb: mononenasyčené mastné kyseliny (MUFA) a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). Dále byly stanoveny obsahově významné jednotlivé mastné kyseliny: kyselina palmitová (C16:0), kyselina stearová (C18:0) a kyselina oktadecenová (C18:1). Metodou FTIR byly stanoveny mastné kyseliny v jednotkách g/100 g mléka. Pro účely této práce byly obsahy přepočítány na jednotky g/100 g mléčného tuku podle následující rovnice:

$$\text{Mastné kyseliny [g/100 g tuku]} = \text{mastné kyseliny [g/100 g mléka]} * 100/\text{mléčný tuk [\%]}.$$

Výsledky byly k dispozici online v průběhu několika dnů od provedení analýzy. Údaje o užitkovosti jednotlivých zvířat byly převzaty ze systému AfíFarm.

Obrázek 6: Odběr vzorků mléka



Obrázek 7: Vzorkovnice s konzervační tabletou a vzorkem mléka



4.2.3 Zpracování dat a statistická analýza

Z již výše uvedeného popisu experimentálního pracoviště je zřejmé, že výchozím zdrojem informací pro plánování, organizaci i sledování jednotlivých dojnic v průběhu experimentu byla elektronicky vedená databáze systému AfiFarm. Veškeré údaje z hlediska původu, evidence (otec, matka, plemeno, datum narození, datum otelení, pořadí laktace) a užitkovosti (denní nádoje) jednotlivých dojnic byly převedeny a dále zpracovávány v prostředí programového balíku SAS (version 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC). Následně byla výchozí databáze doplněna o výsledky rozboru vzorků krve a mléka.

Veškerá data byla podrobena explorační analýze zaměřené na kontrolu normality rozdělení jednotlivých závisle proměnných a odhalení odlehlých hodnot. Bylo prokázáno log-normální rozdělení NEFA, BHB, TG a cholesterolu v krevním séru dojnic a pro další zpracování byly proto hodnoty uvedených parametrů transformovány (přirozený logaritmus).

Do vlastního vyhodnocení byly zahrnuty pouze dojnice se záznamy sledovaných parametrů po dobu přesahující $\frac{1}{2}$ experimentálního období, tj. minimálně výsledky rozboru vzorků 5 odběrů krve, resp. 4 odběrů mléka. Statistickému vyhodnocení byly podrobeny výsledky měření získané v průběhu experimentu od celkem 66 dojnic C (N = 24) a H (N = 42) plemene. Pro potřeby dalšího zpracování byly dojnice kategorizovány podle pořadí laktace do 3 skupin (viz tabulka 3).

4.2.3.1 Porovnání mléčné užitkovosti, sérových parametrů energetického profilu a vybraných složek mléka dojnic C a H plemene

Výchozí model statistické analýzy mléčné užitkovosti, složek mléka i sérových parametrů energetického profilu zahrnoval pevné efekty plemene, týdne laktace, pořadí laktace a jejich vzájemné dvoufaktorové interakce a také náhodný efekt dne odběru. Na základě výsledků dílčích analýz byly z modelu postupně odebrány nesignifikantní efekty. S ohledem na počet dojnic v experimentu, hypotézu a cíle práce byly ve výsledném modelu začleněny pevné efekty týdne a plemene (ve formě kombinovaného efektu) a efekt pořadí laktace uvnitř plemene. Všechny závislé proměnné byly analyzovány smíšeným lineárním modelem s opakováním. Parametry byly odhadnuty s použitím metody REML procedurou MIXED (version 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC) v následujícím modelu:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i P_j + L_k(P_j) + o_l + e_{ijklm},$$

kde:

Y_{ijklm} = závisle proměnná; alternativně mléčná užitkovost a složky mléka (nádoj, tuk, protein, laktóza, aceton, mléčný BHB, vybrané mastné kyseliny mléčného tuku), sérové parametry (NEFA, BHB, TG, cholesterol),

μ = střední hodnota,

$T_i P_j$ = kombinovaný efekt týdne T_i ($i = -2; 0$ až 8) a plemene P_j ($j = 1; 2$),

$L_k(P_j)$ = pořadí laktace L_k ($k = 1$ až 3) uvnitř plemene P_j ($j = 1; 2$),

o_l = náhodný vliv dne odběru,

e_{ijklm} = náhodná chyba, $e_{ijklm} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

Náhodné kovariance mezi týdny byly shrnuty v reziduální matici R , která byla předpokládána jako blokově diagonální se shodnými submaticemi 8×8 u parametrů mléčné užitkovosti a složek mléka, resp. 10×10 u biochemických parametrů krevního séra.

$$R = \begin{bmatrix} R_1 & & & \\ & R_2 & & \\ & & \dots & \\ & & & R_n \end{bmatrix} = \text{kde } R_1 = R_2 = \dots = R_n$$

Alternativně byly porovnávány následující struktury kovariancí: nestrukturovaná, autoregresní prvního řádu samostatně i společně s náhodným efektem dojnice, Toeplitzova a univerzální. Na základě Akaikeho informačního kritéria (AIC) a Schwarz-Bayesova kritéria (SBC) (Littel et al. 2000) byla jako nejvhodnější vybrána autoregresní struktura prvního řádu s náhodným efektem dojnice (AR(1) + RE). Byly odhadnuty průměry nejmenších čtverců a porovnána významnost rozdílů mezi plemeny v daném týdnu. Odhady transformovaných parametrů krevního séra (NEFA, BHB, TG a cholesterol) spolu s hraničními hodnotami 95% intervalů spolehlivosti ($\alpha = 0,05$) byly pomocí inverzní funkce převedeny do původní škály.

4.2.3.2 Porovnání energetického profilu a složení mléka u skupin dojnic s různou úrovní NEB

Z dílčích analýz výsledků experimentu i publikovaných studií je patrné, že k největším změnám energetického metabolismu dochází v prvních dvou týdnech laktace. Za spolehlivý přímý indikátor NEB je považována koncentrace sérových NEFA vyšší než 0,6 mmol/l (Van Saun 2016). Reakce organismu dojnice na zvýšenou koncentraci NEFA je však velmi variabilní. Je zřejmé, že kromě hloubky propadu energetické bilance má na zátěž organismu významný vliv i doba, po kterou je NEB vystaven. S ohledem na výše uvedené skutečnosti byly proto dojnice rozděleny do následujících 3 skupin podle koncentrace NEFA a doby trvání NEB v prvních 2 týdnech laktace (týden 0, 1 a 2):

- **NEB0** – v prvních 2 týdnech laktace koncentrace NEFA $\leq 0,6$ mmol/l, tj. dojnice bez NEB (N = 17, z toho 10 C a 7 H),
- **NEB1** – v prvních 2 týdnech laktace 1x koncentrace NEFA $> 0,6$ mmol/l, tj. dojnice s NEB (N = 28, z toho 7 C a 21 H),
- **NEB2** – v prvních 2 týdnech laktace minimálně 2x koncentrace NEFA $> 0,6$ mmol/l, tj. dojnice s hlubší NEB, s delší adaptací a s potenciálně vyšším rizikem onemocnění spjatých s NEB v porovnání se skupinou NEB1 (N = 21, z toho 7 C a 14 H).

K vlastní statistické analýze byl použit opět smíšený lineární model (procedura MIXED) s opakováním. V návaznosti na výsledky předchozích analýz a s ohledem na design experimentu byla v modelové rovnici změněna struktura pevných efektů. Kromě kombinovaného efektu týdne a skupiny dle úrovně NEB bylo, s ohledem na signifikantní rozdíly ve složení mléka mezi plemeny, nezbytné zahrnout do modelu i vliv výše uvedeného kombinovaného efektu uvnitř plemene. Náhodné efekty zahrnuté v modelu, stejně jako použitá

metoda odhadu parametrů (REML) i struktura náhodných kovariancí (AR(1) + RE) byly vybrány obdobně jako v předcházející části zpracování, viz následující model:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i E_j + T_i E_j (P_k) + o_l + e_{ijklm},$$

kde:

Y_{ijklm} = závisle proměnná; alternativně mléčná užitkovost a složky mléka (nádoj, tuk, protein, laktóza, aceton, mléčný BHB, vybrané mastné kyseliny mléčného tuku), sérové parametry (NEFA, BHB, TG, cholesterol),

μ = střední hodnota,

$T_i E_j$ = kombinovaný efekt týdne T_i ($i = -2; 0$ až 8) a skupiny dle NEB E_j ($j = 1$ až 3),

$T_i E_j (P_k)$ = kombinovaný efekt týdne T_i a skupiny NEB E_j uvnitř plemene P_k ($k = 1; 2$),

o_l = náhodný vliv dne odběru,

e_{ijklm} = náhodná chyba, $e_{ijklm} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

Byly odhadnuty průměry nejmenších čtverců a s korekcí pravděpodobnosti dle Tukeyho porovnána významnost rozdílů mezi skupinami NEB v daném týdnu, v případě vybraných složek mléka i mezi skupinami NEB uvnitř plemen. Odhady transformovaných parametrů krevního séra (NEFA, BHB, TG a cholesterol) spolu s hraničními hodnotami 95% intervalů spolehlivosti ($\alpha = 0,05$) byly pomocí inverzní funkce převedeny do původní škály.

4.2.3.3 Vztahy vybraných složek mléka a sérových NEFA, možnosti predikce NEB dojnic

Vztahy sérových NEFA a vybraných složek mléka byly kvantifikovány prostřednictvím Pearsonových korelačních koeficientů s použitím procedury CORR (version 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC). S ohledem na logaritmicko-normální rozdělení byly ve výpočtech použity koncentrace sérových NEFA po logaritmické transformaci. Do korelační analýzy byly zahrnuty výsledky rozboru celkem 490 vzorků krve a mléka. Pearsonovy korelace a jejich statistická významnost byly stanoveny také v rámci jednotlivých plemen ($N_C = 183$; $N_H = 311$) a skupin dle NEB ($N_{NEB0} = 128$; $N_{NEB1} = 206$; $N_{NEB2} = 156$).

Možnosti predikce energetické bilance dojnic (vyjádřené koncentrací sérových NEFA) na základě vybraných složek mléka byly ověřovány ve dvou krocích. Nejprve byly metodou postupné vícenásobné regrese (stepwise) s využitím procedury REG (version 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC) vybrány parametry s největším podílem na objasněné proměnlivosti koncentrace sérové NEFA (zvýšení koeficientu determinace R^2). Bylo použito jak dopředného

(forward), tak zpětného (backward) metodického postupu výběru parametrů, a to v lineární i kvadratické formě. Vybrané parametry byly následně zahrnuty spolu s pevným efektem plemene a týdnem laktace do následujícího obecného lineárního modelu v proceduře GLM (version 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC):

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + \beta x_{ijk} + \beta_j x_{ijk} + e_{ijk},$$

kde:

Y_{ijk} = přirozený logaritmus sérové koncentrace NEFA,

μ = střední hodnota,

T_i = pevný efekt týdne T_i ($i = 1$ až 8),

P_j = pevný efekt plemene P_j ($j = 1; 2$),

βx_{ijk} = regresní koeficient β a koncentrace vybrané složky mléka x_{ijk} alternativně C16:0, C18:1 a LCFA,

$\beta_j x_{ijk}$ = regresní koeficient β_j ve skupině dle plemene ($j = 1; 2$),

e_{ijk} = náhodná chyba, $e_{ijk} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

Byla provedena analýza kovariance a vypočteny koeficienty determinace (R^2) jednotlivých modelových rovnic.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Porovnání mléčné užitkovosti, sérových parametrů energetického profilu a vybraných složek mléka u dvou plemen dojeného skotu

Vliv plemene na mléčnou užitkovost, sérové parametry energetického profilu a vybrané složky mléka jsou znázorněny v tabulkách 4 a 5 a pro lepší názornost také graficky na obrázcích 8 až 12.

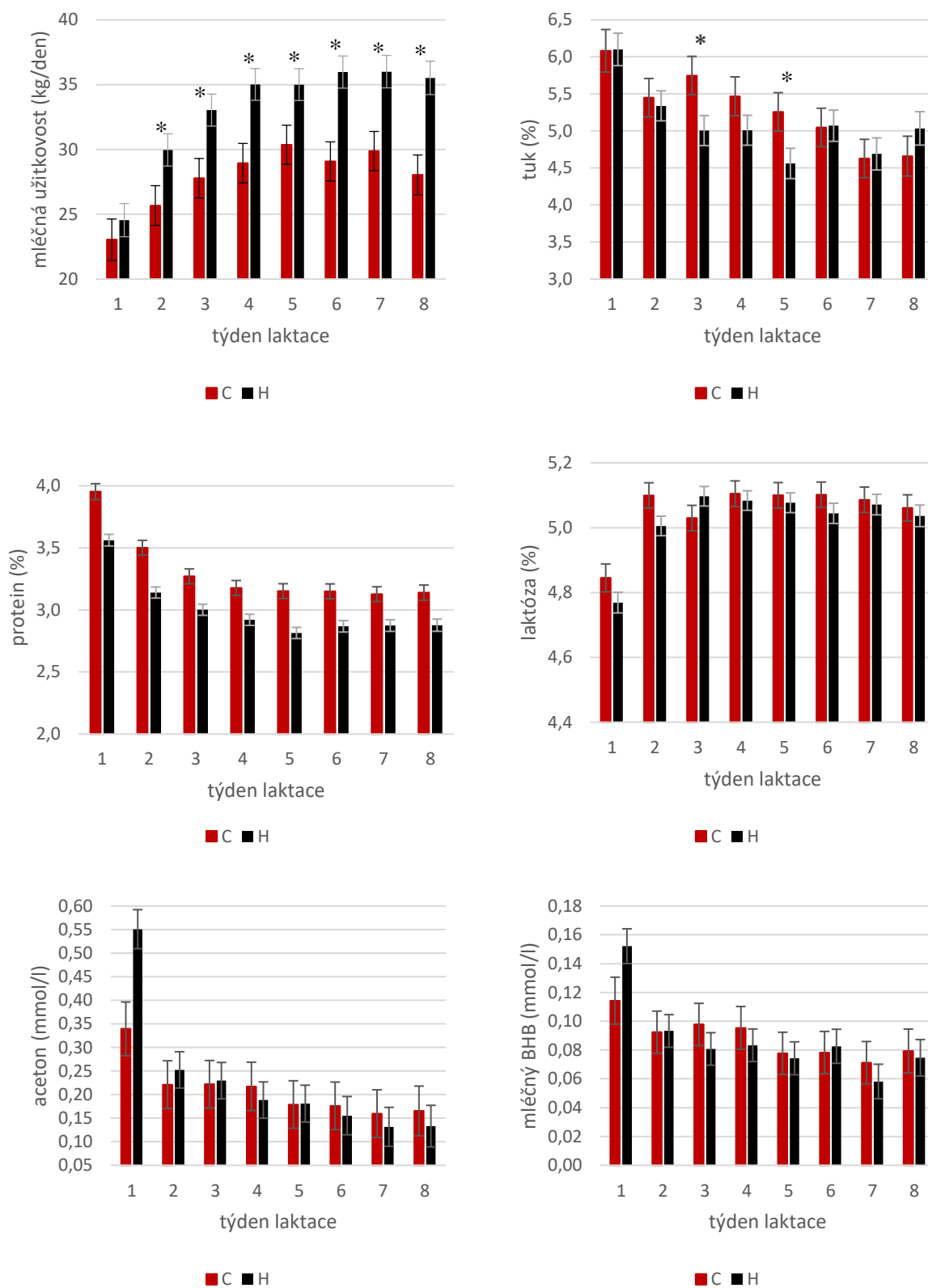
5.1.1 Mléčná užitkovost, základní složky mléka a ketolátky

Dojnice holštýnského plemene (H) produkovaly signifikantně ($P < 0,05$) větší objem mléka než dojnice českého strakatého plemene (C) po celou dobu sledování, vyjma prvního týdne. V procentuálním obsahu proteinu a laktózy v mléce nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi plemeny. Obsah tuku v mléce byl u obou plemen podobný, signifikantní rozdíly byly pozorovány ve 3. a 5. týdnu sledování, kdy vyšší obsah tuku v mléce měly dojnice C (ve 3. týdnu 5,7 % vs. 5,0 % a v 5. týdnu 5,3 % vs. 4,6 %; $P < 0,05$). Rozdíly v mléčné užitkovosti byly očekávané, vycházejí z odlišného produkčního zaměření plemen (Barth et al. 2011) a odpovídají také rozdílům v mléčné užitkovosti zjištěných při kontrole užitkovosti pro jednotlivá plemena v České republice. Průměrná mléčná užitkovost (kg/dojnice) v roce 2016, kdy probíhal experiment, pro H plemeno činila 9 740 kg mléka a 3,36 % proteinů a pro C plemeno byla 7 297 kg mléka a 3,55 % proteinů (ICAR 2020). Obsah mléčného tuku zjištěný v této práci byl vyšší než průměr zjištěný při kontrole užitkovosti v rámci celé populace H a C plemen (3,85 % pro H a 4,05 % pro C plemeno; ICAR 2020). Vyšší procentuální obsahy mléčného tuku jsou pravděpodobně dány tím, že analýza mléka byla prováděna ze vzorků z odpoledního dojení. Vliv ranního a odpoledního dojení potvrzují studie Lakic et al. (2009) a Forsbäck et al. (2010), kde dojnice dojené dvakrát denně měly o 2 % vyšší obsah tuku v mléce z odpoledního dojení oproti mléku z ranního dojení.

Hladiny ketolátek (aceton, BHB) v mléce byly u obou plemen na podobné úrovni. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v prvním týdnu po otelení (týden 1), kdy byly pozorovány i vyšší hodnoty u dojníc H oproti C, ačkoli tyto rozdíly nebyly statisticky významné. Vývoj obsahu ketolátek v mléce odpovídá sérovým koncentracím BHB (viz níže), kdy také nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v prvním týdnu po otelení a vyšší koncentrace měly H dojnice oproti C dojnícím, přičemž v období těsně okolo porodu (týden 0) byly rozdíly statisticky signifikantní, zatímco v týdnu 1 již statisticky významné nebyly. Hladiny ketolátek v mléce by mohly sloužit k včasnému odhalení dojníc s vysokými hladinami BHB v krvi (hyperketonémie; $BHB > 1,2$ mmol/l, McArt et al. 2012) a napomáhat tak v diagnostice subklinických i klinických

ketóz. Hraniční hodnoty pro určení dojnic s hyperketonémií pomocí mléčného BHB se v literatuře pohybují od 0,14 do 0,20 mmol/l (Denis-Robichaud et al. 2014; Renaud et al. 2019) a u dojnic v této práci nebyly překročeny. Prahové hodnoty pro určení hyperketonémie pomocí mléčného acetonu uváděné v literatuře mají velký rozptyl, který je třeba dále vysvětlit. Podle De Roos et al. (2007) je hraniční hodnota pro určení subklinické ketózy pomocí mléčného acetonu u dojnic H plemene v prvních třech týdnech laktace 0,15 mmol/l, která byla v našem případě výrazně překročena v prvním týdnu po otelení, kdy obsah acetonu v mléce byl 0,55 mmol/l. Lze tedy tvrdit, že tato zvířata trpěla subklinickou ketózou, což dosvědčuje i překročení hladin sérového BHB, ke kterému došlo u 26 % dojnic H plemene v prvních dvou týdnech po otelení, jak je popsáno níže. Podle studie Gustafsson a Emanuelson (1996) by však ani takto vysoké hodnoty mléčného acetonu neznamenal vliv na produkční a reprodukční výkonnost, negativní vliv by měly hladiny vyšší než 0,7 mmol/l. Zmiňovaná studie se kromě dojnic holštýnského plemene zabývala i švédským červenobílým plemenem, u kterého byla zjištěna vyšší citlivost na koncentraci acetonu v mléce, která se projevila výraznějším snížením mléčné produkce. Ovšem při koncentraci acetonu v mléce vyšší než 1,4 mmol/l byl u obou plemen úbytek mléčné produkce podobný, což naznačuje, že při velmi vysoké koncentraci acetonu byla fyziologická reakce obou plemen stejná. Podle Chandler et al. (2018) jsou však samotné obsahy ketolátek v mléce pro predikci hyperketonémie u dojnic nevhodné pro relativně vysoký podíl falešně pozitivních výsledků. Podle našich zkušeností jsou hodnoty obsahu ketolátek v mléce velmi variabilní, což přímou diagnostiku zejména subklinických ketóz znesnadňuje. Lze doporučit dojnice s abnormálně vysokými hladinami nebo výraznými změnami v obsahu ketolátek v mléce označit jako podezřelé a provést standardní vyšetření ketonémie.

Obrázek 8: Vývoj mléčné užitkovosti, obsahu základních složek mléka a ketolátek ($\bar{x} \pm SE$) u dojnic holštýnského (H) a českého strakatého (C) plemene v prvních 8 týdnech laktace



BHB: β -hydroxybutyrát; statisticky významné rozdíly mezi plemeny v daném týdnu jsou znázorněny * ($P < 0,05$)

5.1.2 Vybrané sérové parametry energetického profilu

Hodnocení parametrů energetického profilu je velmi přínosné pro odhalení NEB, která se objevuje zejména u vysokoužitkových dojnic na začátku laktace a je spojována s výskytem dalších metabolických poruch a narušením produkčních i reprodukčních funkcí. K přímému odhadu NEB se nejvíce využívá hodnocení sérových koncentrací NEFA, přičemž hodnoty 0,6 mmol/l a vyšší určují, že se dojnice potýká s NEB (Van Saun 2016). Sérové koncentrace NEFA před porodem zjišťované v předkládané práci byly u obou plemen nízké, v prvním týdnu po porodu výrazně vzrostly a poté nastal opět pokles. Po celou dobu experimentu byly pozorovány vyšší koncentrace u H dojnic, ale rozdíly, i přes významně vyšší mléčnou užitkovost u H dojnic, nebyly statisticky významné, vyjma 4. týdne po otelení (0,24 vs. 0,13 mmol/l; $P < 0,05$). Podobné výsledky byly publikovány ve studii Barth et al. (2011), ve které byly zkoumány rozdíly mezi holštýnským a německým červenostrakatým plemenem chovanými v obdobných podmínkách. Holštýnské dojnice měly signifikantně vyšší užitkovost, ale sérové koncentrace NEFA byly u obou plemen na podobné úrovni. I další studie (např. Urdl et al. 2015) uvádí pouze malý vliv plemene na hladiny sérových NEFA, ale je potřeba si uvědomit, že v drtivé většině prací nebyla porovnávána plemena chována ve stejných podmínkách, jako tomu bylo v případě našeho experimentu. V takových případech mělo prostředí a management větší vliv než samotné plemeno. Co se týče samotného odhadu výskytu NEB u dojnic v našem experimentu, v prvních dvou týdnech po porodu překročilo hraniční hodnotu NEFA 0,6 mmol/l 21 H dojnic (50 %) a 7 C dojnic (29 %). Vyšší frekvence výskytu takto diagnostikované NEB plemene H byla ve shodě s vyššími průměrnými koncentracemi NEFA u H dojnic v průběhu celého sledovaného období (byť tyto rozdíly nebyly statisticky významné).

Při nedostatku energie (resp. glukózy a jejích prekurzorů) jsou NEFA nekompletně oxidovány na ketolátky (acetát, BHB, acetoacetát) v procesu zvaném ketogeneze, což je běžná metabolická cesta poskytující alternativní zdroje energie v rané laktaci. Pokud je ovšem syntetizováno příliš velké množství ketolátek, může dojít k patologickému stavu zvanému ketóza (Duffield et al. 2009). BHB se proto využívá jako indikátor energetického deficitu a ketóz. V našem experimentu byly sérové koncentrace BHB před porodem u obou plemen téměř stejné. Těsně po porodu (týden 0) však byly zjištěny signifikantně ($P < 0,05$) vyšší koncentrace BHB u dojnic H plemene (0,62 mmol/l), zatímco u C dojnic zůstaly koncentrace BHB stejné jako v období před porodem (0,41 mmol/l). V dalších týdnech po porodu se hladiny BHB zvýšily i u C dojnic, ovšem ne tak výrazně jako u H, a rozdíly mezi plemeny nebyly po zbytek experimentálního období statisticky významné.

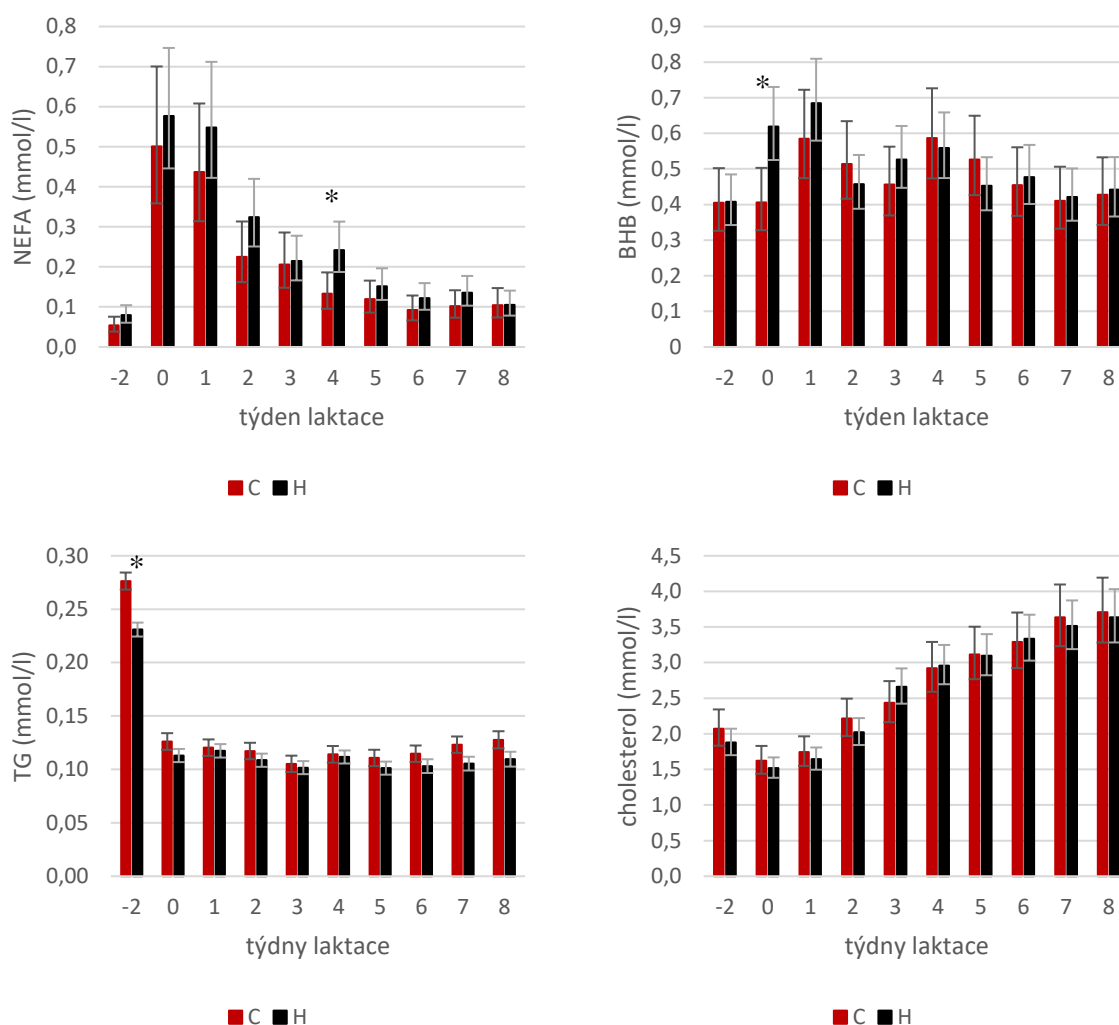
Interval hraničních hodnot BHB pro diagnostiku subklinických ketóz se pohybuje od 1,2 do 2,9 mmol/l (McArt et al. 2012). Subklinická ketóza je přímým a častým důsledkem NEB na počátku laktace, kdy při masivní lipomobilizaci a nedostatku energie dochází k nekompletní oxidaci NEFA a tvoří se ketolátky, jak je popsáno výše. Podíváme-li se na dojnice v prvních dvou týdnech laktace, tak v jistém stupni NEB (NEFA > 0,6 mmol/l) bylo 50 % H dojnic a 29 % dojnic plemene C. Do subklinické ketózy dle výše uvedeného kritéria (1,2 do 2,9 mmol/l) se dostalo 11 H dojnic (26 %) a pouze 1 dojnice (4 %) plemene C, z čehož je možné odhadovat, že u H dojnic byla NEB hlubší. Hranici pro klinickou ketózu (BHB > 2,9 mmol/l; McArt et al. 2012) překročila pouze 1 dojnice H plemene. V souladu s předkládanou prací byly vyšší koncentrace BHB během tranzitní periody zjištěny u dojnic dojených plemen H a brown swiss ve srovnání se simentálským plemenem s kombinovanou užitkovostí (Urđl et al. 2015).

Sérové koncentrace TG v období před porodem byly signifikantně vyšší u C dojnic ve srovnání s H dojnicemi (0,28 vs. 0,23; $P < 0,05$). Po porodu hladiny TG poklesly a zůstaly téměř na stejné úrovni u obou plemen po zbývající dobu experimentu. Pokles hladin TG po porodu souvisí jednak s vyšším vychytáváním TG mléčnou žlázou pro syntézu mléčného tuku (Kurpińska et al. 2015) a jednak může být výsledkem zvýšené lipolýzy a snížené lipogeneze (Piccione et al. 2009) nebo snížené kapacity jater pro tvorbu transportní formy TG (McArt et al. 2013). Referenční hodnoty pro TG se pohybují od 0,14 do 0,27 mmol/l (Cozzi et al. 2011). Průměrné koncentrace TG u dojnic obou plemen v našem experimentu byly pod referenčním rozmezím, což může značit energetický deficit a rozvoj jaterní steatózy. Při masivní lipomobilizaci je velké množství NEFA v játrech reesterifikováno na TG, které již jaterní kapacita nezvládá formovat do exportní formy (VLDL), a tak se TG kumulují v játrech (Drackley et al. 2001). Neznamena to však, že při nadbytku NEFA v krvi se automaticky sníží také sérové hladiny TG. V krvi nejsou TG nikdy volně, jsou vždy transportovány ve vazbě na lipoproteiny (kromě jiných také právě VLDL pro přenos TG z jater). Sérové TG jsou v podstatě synonymem těchto lipoproteinů. Při nadbytku NEFA v krvi a dostatečné funkci jater se bude hladina TG v séru navyšovat úměrně s hladinami NEFA až do okamžiku, kdy už exportní kapacita jater nebude schopná produkovat VLDL (Kaneko et al. 2008).

Cholesterol je součástí sérových lipoproteinů a jeho koncentrace v séru tak nepřímou vyjadřuje celkovou hladinu lipoproteinů a tím i schopnost jater produkovat VLDL (Kaneene et al. 1997). Fyziologické hodnoty cholesterolu se pro dojnice pohybují od 1,11 do 8,57 mmol/l (Oregon State University 2019), konkrétněji pro dojnice v období 3 týdnů před porodem (tzv. close-up perioda) je udávané rozmezí hodnot nižší a pohybuje se od 1,68 do 2,95 mmol/l, zatímco pro čerstvě otelené je rozmezí širší – 1,63 až 6,08 mmol/l (Pennsylvania State University 2013). V případě našeho experimentu byly koncentrace sérového cholesterolu v rámci referenčního rozmezí a u obou plemen na podobné úrovni. Nejnižší hladiny byly zjištěny v prvním týdnu po porodu a poté narůstaly u obou plemen až do konce experimentálního pozorování. Mírný pokles sérových hladin cholesterolu v poslední fázi březosti je způsoben zvýšenými požadavky na syntézu steroidních hormonů (Pysera & Opalka 2000). Postupný nárůst koncentrací cholesterolu po porodu a v průběhu laktace je fyziologický jev potřebný k zajištění dostatečné syntézy VLDL, čímž jsou chráněna játra před kumulací TG (Gross et al. 2013). Podobné hladiny cholesterolu u obou plemen v naší práci naznačují obdobný stupeň lipomobilizace a potřebu cholesterolu pro syntézu VLDL v játrech. Oproti tomu Urdl et al. (2015) publikovali nižší hladiny cholesterolu u dojnic kombinovaného simentálského plemene ve srovnání s dojnicemi plemen H a brown swiss po celou dobu sledovaných 105 dnů laktace.

Dynamika vývoje parametrů energetického profilu naznačuje, že obě plemena podstoupila určitý stupeň NEB, zejména v prvních dvou týdnech laktace, přičemž nástup metabolických změn byl rychlejší a výraznější u H plemene. Úroveň metabolického stresu a jeho vliv na jaterní funkce skrze posouzení výše uvedených sérových parametrů se zdají být u obou plemen podobné.

Obrázek 9: Vývoj koncentrací vybraných parametrů energetického profilu ($\bar{x} \pm 95\%$ interval spolehlivosti) v séru dojnic holštýnského (H) a českého strakatého (C) plemene v období od 2 týdnů před porodem do 8 týdnů laktace



NEFA: neesterifikované mastné kyseliny; BHB: β -hydroxybutyrát; TG: triacylglyceroly; statisticky významné rozdíly mezi plemeny v daném týdnu jsou znázorněny * ($P < 0,05$)

5.1.3 Vybrané mastné kyseliny mléčného tuku

Mimo základní složky mléka byly také stanoveny obsahy mastných kyselin mléčného tuku s předpokládaným predikčním potenciálem pro NEB; skupiny mastných kyselin podle délky uhlíkového řetězce (SCFA, MCFA, LCFA) a skupiny nenasycených mastných kyselin (MUFA, PUFA). Obsah SCFA byl signifikantně ($P < 0,05$) vyšší u C dojnic ve srovnání s dojnici plemene H po celou dobu sledování vyjma 8. týdne po porodu, kdy rozdíl již nebyl statisticky průkazný. Naopak obsah LCFA byl vyšší u dojnic plemene H, přičemž v 1., 2., 3. a 5. týdnu po otelení byly rozdíly statisticky významné ($P < 0,05$). Rozdíly v obsahu MCFA mezi plemeny nebyly statisticky významné. Hladiny MUFA v mléčném tuku byly signifikantně ($P < 0,05$) vyšší u plemene H v prvních 5 týdnech po otelení. Obsah PUFA byl u obou plemen

na podobné úrovni, vyjma 5. týdne po porodu, kdy byly hladiny PUFA významně vyšší u H dojnic ve srovnání s C dojnicemi (7,2 vs. 6,3 g/100 g mléčného tuku; $P < 0,05$).

Kromě skupin mastných kyselin byly analyzovány také obsahově významné jednotlivé mastné kyseliny mléčného tuku. Obsah C16:0 byl v prvním týdnu po otelení významně vyšší u dojnic plemene C ve srovnání s H (29,2 vs. 26,9 g/100 g mléčného tuku; $P < 0,05$). Po zbytek sledovaného období byl obsah C16:0 u obou plemen na podobné úrovni. Zatímco v prvním týdnu po otelení byl obsah C18:0 signifikantně vyšší u dojnic plemene H (16,0 vs. 15,0 g/100 g mléčného tuku; $P < 0,05$), ke konci sledovaného období (6. až 8. týden po otelení) byly obsahy C18:0 významně ($P < 0,05$) vyšší u C dojnic. Nejvýraznější rozdíly byly pozorovány v obsahu C18:1, který byl významně ($P < 0,05$) vyšší u H dojnic po celou dobu experimentu, vyjma 8. týdne po otelení.

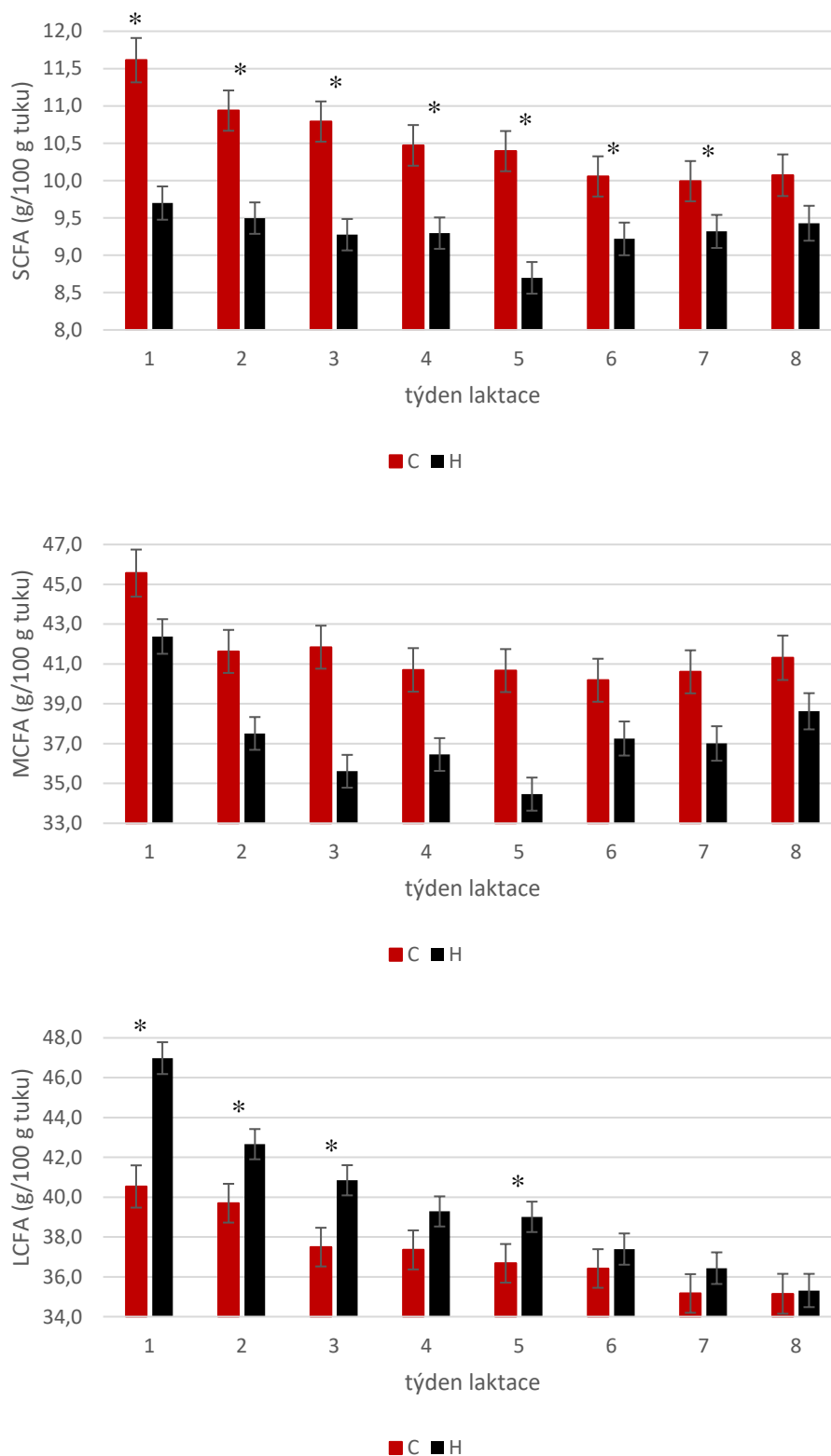
Studii, které porovnávají složení mastných kyselin mléčného tuku mezi vysokoužitkovými plemeny a plemeny s kombinovanou užitkovostí, je velmi málo. Relevantní vědecké studie, které by se týkaly přímo srovnání holštýnského a českého strakatého plemene, v současné době nejsou dostupné. Nejčastěji se lze setkat s porovnáním mezi holštýnským plemenem a jersey, brown swiss (švýcarský hnědý skot), simentálským (švýcarský strakatý skot), alpine grey, meuse-rhine-yssel (**MRY**, maas rýnsko ysselské) a montbéliarde. Z nich nejbližší českému strakatému plemeni, co se mléčné užitkovosti týká (porovnání průměrné mléčné užitkovosti, včetně procentuálního zastoupení tuku a proteinů v mléce podle ICAR (2020)), jsou plemena brown swiss, simentálské a MRY. Kromě úzkého spektra zkoumaných plemen je dalším faktorem limitujícím srovnání složení mastných kyselin mléčného tuku mezi jednotlivými studii i odlišná metodika stanovení mastných kyselin a způsoby vyjádření jejich obsahu. Velká část studií používá pro analýzu mastných kyselin plynovou chromatografii, která je pro toto stanovení metodou referenční. Další studie, včetně této práce, využívají metodu FTIR, která je běžně využívána při laboratorním rozboru mléka v kontrole užitkovosti. Avšak ani studie, v nichž byla použita metoda FTIR, nemusí být vždy pro porovnání výsledků využitelné, a to kvůli odlišnému vyjádření obsahu mastných kyselin. Výsledný obsah mastných kyselin v mléčném tuku je obvykle uváděn v gramech ve 100 g mléka (aplikační nota 64 pro MilkoScan), ale běžný je přepočítání na gramy ve 100 g mléčného tuku či na 100 g celkových mastných kyselin. Pro účely této práce byly jako nejvhodnější pro porovnání obsahů mastných kyselin v mléce mezi jednotlivými plemeny vybrány studie Gottardo et al. (2017), Maurice-Van Eijndhoven et al. (2013), Soyeurt et al. (2006) a Kelsey et al. (2003). Gottardo et al. (2017) sledovali rozdíly ve složení mastných kyselin mléčného tuku mezi čtyřmi plemeny v období celé laktace. Výsledky byly velmi podobné

výsledkům v předkládané práci. Dojnice holštýnského plemene měly nejnižší obsah SCFA a zároveň nejvyšší obsah C18:1 v porovnání s plemeny brown-swiss, simentálským a alpine grey. Obsah LCFA a MUFA byl vyšší u plemene holštýnského pouze ve srovnání s brown-swiss. Studie Maurice-Van Eijndhoven et al. (2013) porovnávala pět plemen po celou dobu laktace, přičemž pro účely předkládané práce lze hodnotit porovnání mezi dojnici holštýnského a MRY plemene. Byl zjištěn rozdíl v mléčné užitkovosti, ale ve složení mastných kyselin rozdíly nalezeny nebyly. Shodnou metodiku i výsledky jako předchozí publikace, co se týče porovnání holštýnského a MRY plemene, měla práce Soyeurt et al. (2006). Studie Kelsey et al. (2003) srovnávala plemeno holštýnské a brown swiss po celou dobu laktace a pro analýzu mastných kyselin byla použita metoda plynové chromatografie. Stejně jako v předchozích publikacích, i v tomto případě koncentrace obsahově důležitých mastných kyselin byly u obou plemen podobné.

Další významný faktor, který může zkreslovat porovnání našich výsledků s ostatními pracemi, je období pozorování. Zatímco ve většině publikací bylo sledováno období celé laktace, náš výzkum byl soustředěn pouze na prvních 8 týdnech laktace, kdy dojnice podstupují významné metabolické a hormonální změny, které mohou složení mastných kyselin mléčného tuku výrazně ovlivňovat. Vezmeme-li do úvahy fakt, že i přes obdobnou úroveň metabolického stresu danou podobným vývojem parametrů energetického profilu byl nástup metabolických změn rychlejší a výraznější u dojnic H plemene (výskyt NEB v prvních dvou týdnech laktace 50 % H a 29 % C), pak i rozdíly ve složení mléka jsou logické. U H plemene byl významně vyšší obsah LCFA, MUFA a C18:1 a zároveň nižší obsah SCFA po téměř celé sledované období ve srovnání s dojnici plemene C. Tyto rozdíly jsou dány tím, že při výrazné lipomobilizaci a z ní plynoucí NEB se do mléka z tukové tkáně dostávají především C16:0, LCFA a MUFA (zejména C18:1), které významně inhibují *de novo* syntézu SCFA a MCFA v mléčné žláze (Palmquist et al. 1993; Tyburczy et al. 2008; Stoop et al. 2009; Gross et al. 2011).

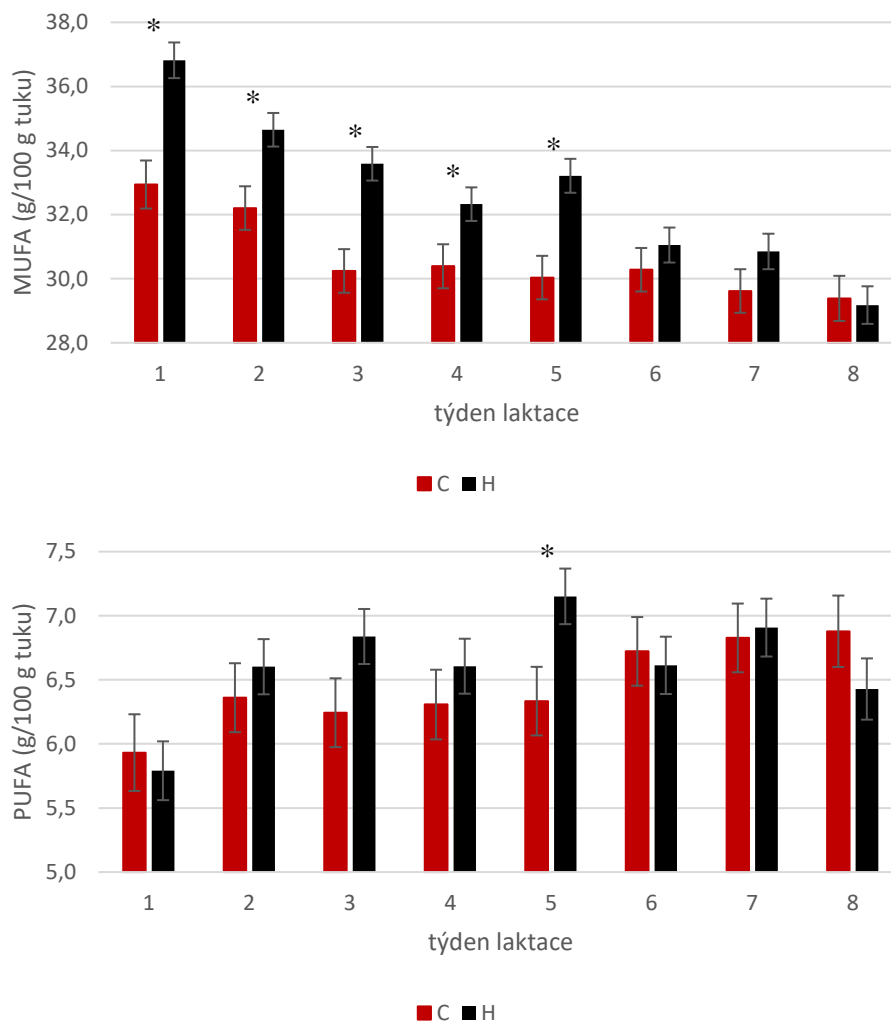
Metabolické změny na počátku laktace budou mít pravděpodobně větší vliv na složení mastných kyselin než plemeno. Také někteří další autoři se shodují, že existuje větší variabilita ve složení mastných kyselin mezi jednotlivými dojnici (uvnitř plemene) než mezi samotnými plemeny (Kelsey et al. 2003; Soyeurt et al. 2006). Proto i následující kapitoly budou věnovány rozdílům v metabolickém profilu a složení mléka mezi skupinami dojnic vytvořených podle výskytu a hloubky NEB na začátku laktace.

Obrázek 10: Vývoj koncentrací skupin mastných kyselin podle délky uhlíkového řetězce v mléčném tuku ($\bar{x} \pm SE$) u dojnic holštýnské (H) a českého strakatého (C) plemene v prvních 8 týdnech laktace



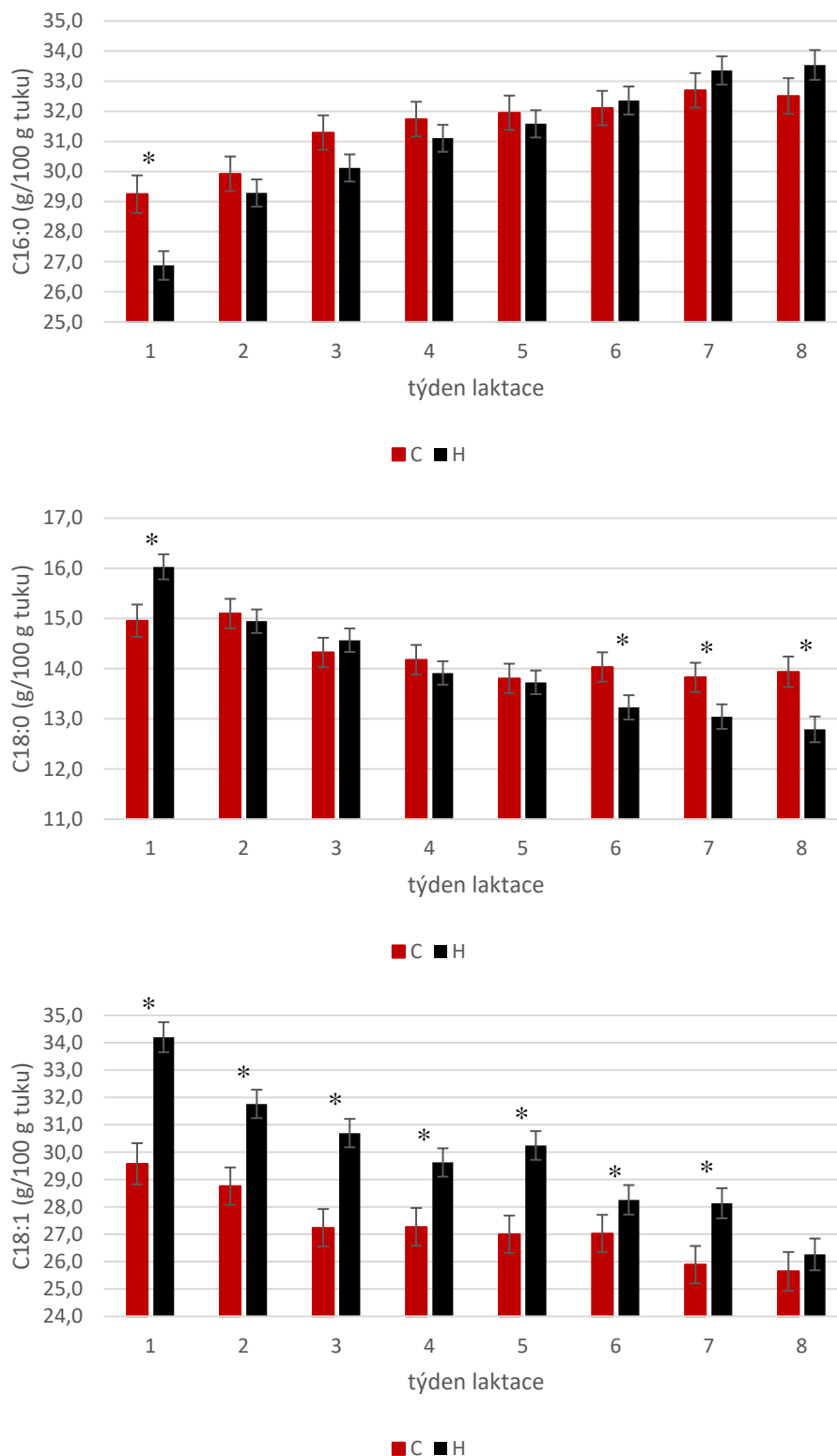
SCFA: mastné kyseliny s krátkým řetězcem; MCFA: mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem; LCFA: mastné kyseliny s dlouhým řetězcem; statisticky významné rozdíly mezi plemeny v daném týdnu jsou znázorněny * ($P < 0,05$)

Obrázek 11: Vývoj obsahu nenasycených mastných kyselin v mléčném tuku ($\bar{x} \pm SE$) u dojnic holštýnského (H) a českého strakatého (C) plemene v prvních 8 týdnech laktace



MUFA: mononenasycené mastné kyseliny; PUFA: polynenasycené mastné kyseliny; statisticky významné rozdíly mezi plemeny v daném týdnu jsou znázorněny * ($P < 0,05$)

Obrázek 12: Vývoj obsahu jednotlivých mastných kyselin v mléčném tuku ($\bar{x} \pm SE$) u dojníc holštýnského (H) a českého strakatého (C) plemene v prvních 8 týdnech laktace



Statisticky významné rozdíly mezi plemeny v daném týdnu jsou znázorněny * ($P < 0,05$)

Tabulka 4: LSM vybraných sérových parametrů energetického profilu holštýnského (H) a českého strakatého (C) plemene v období 2 týdnů před a 8 týdnů po otelení

Týdny	Plemeno	Energetický profil (mmol/l)			
		NEFA	BHB	TG	Cholesterol
-2	H	0,08	0,41	0,23 ^a	1,88
	C	0,05	0,4	0,28 ^b	2,07
0	H	0,58	0,62 ^a	0,11	1,52
	C	0,50	0,41 ^b	0,13	1,62
1	H	0,55	0,68	0,12	1,64
	C	0,44	0,59	0,12	1,74
2	H	0,32	0,46	0,11	2,02
	C	0,23	0,51	0,12	2,22
3	H	0,21	0,53	0,1	2,66
	C	0,21	0,46	0,11	2,43
4	H	0,24 ^a	0,56	0,11	2,96
	C	0,13 ^b	0,59	0,11	2,92
5	H	0,15	0,45	0,1	3,1
	C	0,12	0,53	0,11	3,11
6	H	0,12	0,48	0,1	3,33
	C	0,09	0,45	0,11	3,29
7	H	0,14	0,42	0,11	3,51
	C	0,10	0,41	0,12	3,64
8	H	0,10	0,44	0,11	3,64
	C	0,10	0,43	0,13	3,71

LSM: least squares means; NEFA: neesterifikované mastné kyseliny; BHB: β -hydroxybutyrát; TG: triacylglyceroly; statistická signifikance mezi plemeny v daném týdnu je označena písmeny a, b ($P < 0,05$)

Tabulka 5: LSM mléčné užitkovosti a vybraných složek mléka holštýnského (H) a českého strakatého (C) plemene v období prvních 8 týdnů laktace

Týden	Plemeno	Mléčná užitkovost (kg/den)	Základní složky mléka (%)			Ketolátky (mmol/l)		Skupiny MK (g/100 g tuku)					Jednotlivé MK (g/100 g tuku)		
			Tuk	Protein	Laktóza	Aceton	BHB_m	SCFA	MCFA	LCFA	MUFA	PUFA	C16:0	C18:0	C18:1
1	H	24,5	6,1	3,6	4,8	0,55	0,15	9,7 ^a	42,4	47,0 ^a	36,8 ^a	5,8	26,9 ^a	16,0 ^a	34,2 ^a
	C	23,0	6,1	4,0	4,8	0,34	0,11	11,6 ^b	45,6	40,5 ^b	32,9 ^b	5,9	29,2 ^b	15,0 ^b	29,6 ^b
2	H	30,0 ^a	5,3	3,1	5,0 ^a	0,25	0,09	9,5 ^a	37,5	42,7 ^a	34,6 ^a	6,6	29,3	14,9	31,8 ^a
	C	25,7 ^b	5,4	3,5	5,1 ^b	0,22	0,09	10,9 ^b	41,6	39,7 ^b	32,2 ^b	6,4	29,9	15,1	28,8 ^b
3	H	33,0 ^a	5,0 ^a	3,0	5,1	0,23	0,08	9,3 ^a	35,6	40,8 ^a	33,6 ^a	6,8	30,1	14,6	30,7 ^a
	C	27,8 ^b	5,7 ^b	3,3	5,0	0,22	0,10	10,8 ^b	41,8	37,5 ^b	30,2 ^b	6,2	31,3	14,3	27,2 ^b
4	H	35,0 ^a	5,0	2,9	5,1	0,19	0,08	9,3 ^a	36,5	39,3	32,3 ^a	6,6	31,1	13,9	29,6 ^a
	C	28,9 ^b	5,5	3,2	5,1	0,22	0,10	10,5 ^b	40,7	37,4	30,4 ^b	6,3	31,7	14,2	27,3 ^b
5	H	35,0 ^a	4,6 ^a	2,8	5,1	0,18	0,07	8,7 ^a	34,5	39,0 ^a	33,2 ^a	7,2 ^a	31,6	13,7	30,2 ^a
	C	30,4 ^b	5,3 ^b	3,2	5,1	0,18	0,08	10,4 ^b	40,7	36,7 ^b	30,0 ^b	6,3 ^b	31,9	13,8	27,0 ^b
6	H	36,0 ^a	5,1	2,9	5,0	0,16	0,08	9,2 ^a	37,3	37,4	31,1	6,6	32,4	13,2 ^a	28,3
	C	29,1 ^b	5,0	3,2	5,1	0,18	0,08	10,1 ^b	40,2	36,4	30,3	6,7	32,1	14,0 ^b	27,0
7	H	36,0 ^a	4,7	2,9	5,1	0,13	0,06	9,3 ^a	37,0	36,4	30,8	6,9	33,4	13,0 ^a	28,1 ^a
	C	29,9 ^b	4,6	3,1	5,1	0,16	0,07	10,0 ^b	40,6	35,2	29,6	6,8	32,7	13,8 ^b	25,9 ^b
8	H	35,5 ^a	5,0	2,9	5,0	0,13	0,07	9,4	38,6	35,3	29,2	6,4	33,5	12,8 ^a	26,3
	C	28,0 ^b	4,7	3,1	5,1	0,17	0,08	10,1	41,3	35,1	29,4	6,9	32,5	13,9 ^b	25,6

LSM: least squares means, BHB_m: mléčný β -hydroxybutyrát; MK: mastné kyseliny; SCFA: mastné kyseliny s krátkým řetězcem; MCFA: mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem; LCFA: mastné kyseliny s dlouhým řetězcem; MUFA: mononenasyčené mastné kyseliny; PUFA: polynenasycené mastné kyseliny; statistická signifikance mezi plemeny v daném týdnu je označena písmeny a, b ($P < 0,05$)

5.2 Porovnání energetického profilu a složení mléka mezi skupinami dojnic vytvořenými podle výskytu a hloubky NEB

Pro lepší orientaci je v této kapitole zopakované rozdělení dojnic do skupin podle výskytu a hloubky NEB tak, jak je uvedeno v metodice. Z výsledků uvedených v kapitole 5.1 i publikovaných studií je patrné, že k největším změnám energetického metabolismu dochází v prvních dvou týdnech laktace. Za spolehlivý přímý indikátor NEB je považována koncentrace sérových NEFA vyšší než 0,6 mmol/l (Van Saun 2016). Reakce organismu dojnice na zvýšenou koncentraci NEFA je však velmi variabilní. Je zřejmé, že kromě hloubky propadu energetické bilance má na zátěž organismu významný vliv i doba, po kterou je NEB vystaven. S ohledem na výše uvedené skutečnosti byly proto dojnice rozděleny do následujících 3 skupin podle koncentrace NEFA a doby trvání NEB v prvních 2 týdnech laktace (týden 0, 1 a 2):

- **NEB0** – v prvních 2 týdnech laktace koncentrace NEFA \leq 0,6 mmol/l, tj. dojnice bez NEB
- **NEB1** – v prvních 2 týdnech laktace 1x koncentrace NEFA $>$ 0,6 mmol/l, tj. dojnice s NEB
- **NEB2** – v prvních 2 týdnech laktace minimálně 2x koncentrace NEFA $>$ 0,6 mmol/l, tj. dojnice s hlubší NEB, s delší adaptací a s potenciálně vyšším rizikem onemocnění spjatých s NEB v porovnání se skupinou NEB1

Vliv skupiny na mléčnou užitkovost, sérové parametry energetického profilu a vybrané složky mléka jsou znázorněny v tabulkách 6 a 7, pro lepší názornost také graficky na obrázcích 13 až 17.

5.2.1 Mléčná užitkovost, základní složky mléka a ketolátky

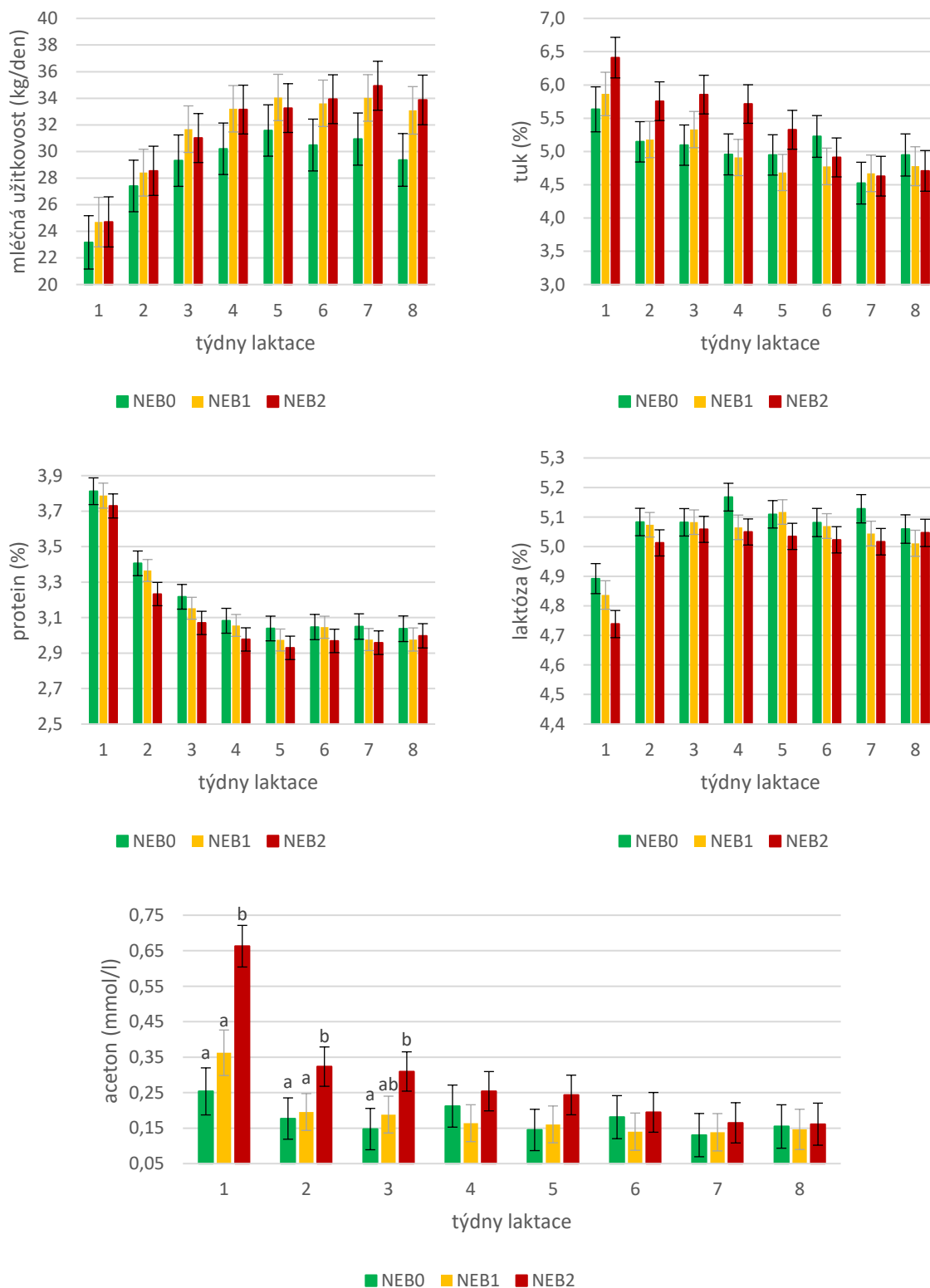
Denní nádoj byl v celém sledovaném období numericky nižší u skupiny NEB0, ale rozdíly nebyly statisticky signifikantní. Nižší nádoj mohl být v našem případě ovlivněn zejména plemenem, protože ve skupině NEB0 mírně převažovaly dojnice plemene C, zatímco v ostatních skupinách bylo více zastoupeno plemeno H s vyšší mléčnou užitkovostí. S nástupem vysoké produkce mléka je také spjata větší zatížení metabolismu, takže dojnice s vyšší mléčnou produkcí jsou náchylnější ke vzniku NEB. Tímto lze rovněž vysvětlit vyšší denní nádoj na počátku laktace u skupin NEB1 a NEB2. Větší míře lipomobilizace odpovídá i vyšší procentuální zastoupení mléčného tuku ve skupině NEB2, byť rozdíly nebyly statisticky

významné. Zjištěné hodnoty odpovídaly výsledkům, které ve svém review uvádějí Mulligan et al. (2006). Obsahy mléčného proteinu a laktózy se u všech skupin lišily jen nepatrně.

Nejvíce rozdílů bylo pozorováno v obsahu ketolátek. Obsah mléčného acetonu byl v prvních 3 týdnech laktace významně vyšší u dojnic ve skupině NEB2 ve srovnání se skupinou NEB0 (NEB2: 0,66; 0,32; 0,31 vs. NEB0: 0,25; 0,18; 0,15 mmol/l, $P < 0,05$). Zároveň byl v prvních dvou týdnech laktace obsah acetonu signifikantně vyšší ve skupině NEB2 oproti NEB1 (NEB2: 0,66; 0,32 vs. NEB1 0,36; 0,20 mmol/l, $P < 0,05$). V obsahu mléčného BHB byly pozorovány signifikantní ($P < 0,05$) rozdíly mezi všemi skupinami (NEB0 vs. NEB1, NEB0 vs. NEB2 a NEB1 vs. NEB2) v prvních pěti týdnech laktace a v týdnu sedmém, přičemž nejvyšší BHB byl ve skupině NEB2 a nejnižší ve skupině NEB0. V 6. týdnu laktace byl významně ($P < 0,05$) vyšší obsah mléčného BHB ve skupině NEB2 oproti NEB1 a zároveň došlo k mírnému nárůstu ve skupině NEB0. V osmém týdnu byl obsah signifikantně ($P < 0,05$) nižší u skupiny NEB0 oproti NEB1 a NEB2.

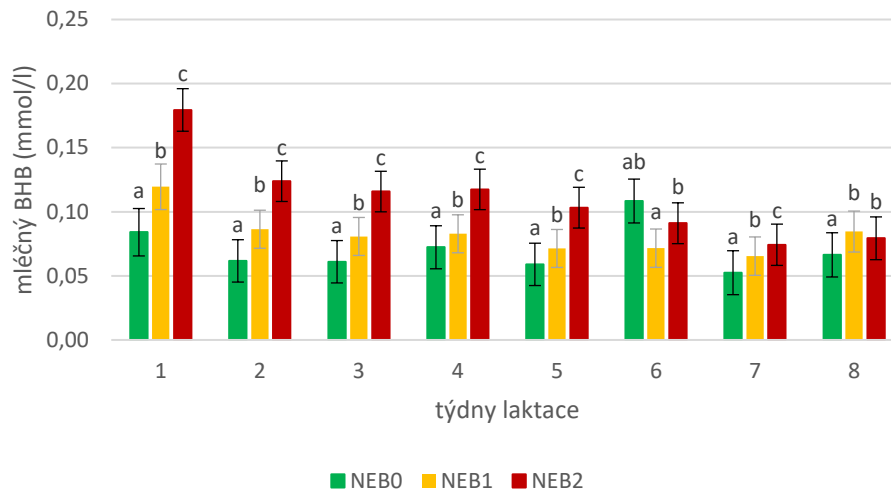
Nejvyšší hodnoty mléčného acetonu byly tedy pozorovány ve skupině NEB2 v prvních třech týdnech laktace a zároveň byl v prvních pěti týdnech v NEB2 nejvyšší i obsah mléčného BHB. Hodnoty odpovídají koncentracím BHB v séru, kdy nejvyšší hladiny byly pozorovány ve skupině NEB2 v prvních dvou týdnech laktace (viz níže). Nejvyšší hodnoty mléčných ketolátek ve skupině NEB2, případně i v NEB 1 oproti NEB0, pramení z nedostatku energie při různém stupni NEB, kdy se uvolněné NEFA nekompletně oxidují až na ketolátky (Duffield et al. 2009). Čím hlubší NEB (četnější výskyt nadlimitních sérových koncentrací NEFA ve skupině NEB2), tím vyšší bude obsah ketolátek jak v krvi, tak v mléce. Zároveň je ale potřeba mít na paměti, že samotné obsahy ketolátek v mléce jsou pro predikci hyperketonémií nevhodné pro relativně vysoký podíl falešně pozitivních výsledků (Chandler et al. 2008).

Obrázek 13: Vývoj mléčné užitkovosti, obsahu základních složek mléka a ketolátů ($\bar{x} \pm SE$) v prvních 8 týdnech laktace u tří skupin dojníc (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech laktace



BHB: β -hydroxybutyrát; statisticky významné rozdíly mezi skupinami v daném týdnu jsou označeny rozdílnými písmeny a, b, c ($P < 0,05$)

Obrázek 13: Vývoj mléčné užitkovosti, obsahu základních složek mléka a ketolátek ($\bar{x} \pm SE$) v prvních 8 týdnech laktace u tří skupin dojnic (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech laktace



BHB: β -hydroxybutyrát; statisticky významné rozdíly mezi skupinami v daném týdnu jsou označeny rozdílnými písmeny a, b, c ($P < 0,05$)

5.2.2 Vybrané sérové parametry energetického profilu

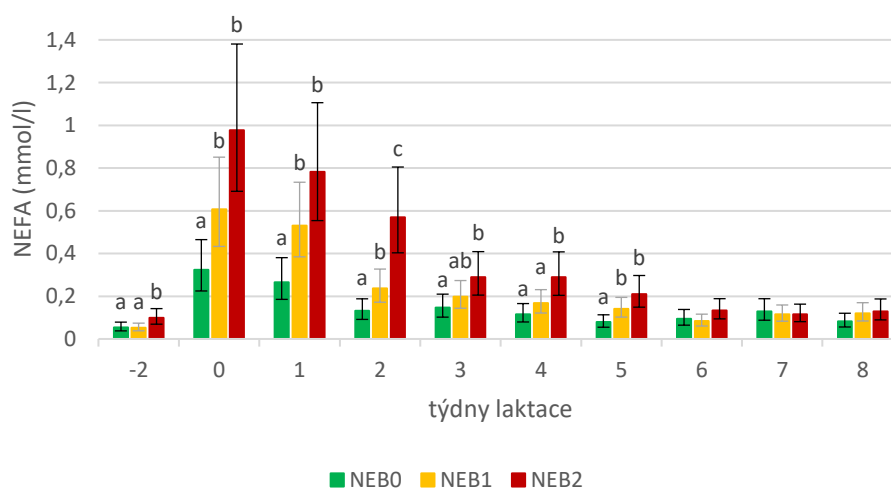
Významně ($P < 0,05$) vyšší koncentrace sérových NEFA byly zjištěny ve skupině NEB2 ve srovnání se skupinou NEB0 v období před porodem a během prvních 5 týdnů laktace. Významné ($P < 0,05$) rozdíly mezi ostatními skupinami se vyskytovaly v různých týdnech laktace. Zatímco rozdíly mezi NEB0 a NEB1 byly pozorovány v období těsně po porodu (odběr 0) a v prvních dvou a 5. týdnu laktace, rozdíly mezi NEB1 a NEB2 byly detekovány před porodem a ve 2. a 4. týdnu laktace. Přestože rozdíly v období před porodem byly signifikantní, tak byly velmi malé. Vždy přitom platilo, že ve skupině s hlubší NEB byly naměřené koncentrace vyšší. Pozorované rozdíly jsou logické, protože podle sérových koncentrací NEFA byly sledované skupiny utvářeny. Z výsledků je patrné, že hlubší NEB v prvních dvou týdnech laktace se významně projevuje ještě v 5. týdnu po otelení.

Koncentrace sérového BHB byly signifikantně ($P < 0,05$) vyšší ve skupině NEB2 oproti skupině NEB0 v prvním a druhém týdnu laktace. S vyšším stupněm NEB je spojeno masivnější uvolňování NEFA z tukové tkáně do krve. Při dlouhotrvající NEB (v našem případě četnější výskyt nadlimitních koncentrací NEFA ve skupině NEB2) následně dochází k jejich nekompletní oxidaci na ketolátky, což se projeví zvýšenými hladinami BHB v krevním séru (Duffield et al. 2009).

Hladiny sérových TG byly významně ($P < 0,05$) vyšší u dojnic ve skupině NEB2 ve srovnání se skupinou NEB0 v období před porodem, těsně po porodu a v prvních dvou týdnech laktace. Tyto rozdíly vyplývají z odlišných koncentrací NEFA a spolu s nimi poukazují na vysokou míru lipomobilizace, kdy dochází ke zvýšenému uvolnění NEFA z tukové tkáně a TG z jater ve formě VLDL (Kaneko et al. 2008). V koncentracích sérového cholesterolu rozdíly pozorovány nebyly, vyjma období těsně okolo porodu (týden 0), kdy byly hladiny významně ($P < 0,05$) vyšší u NEB0 oproti NEB1.

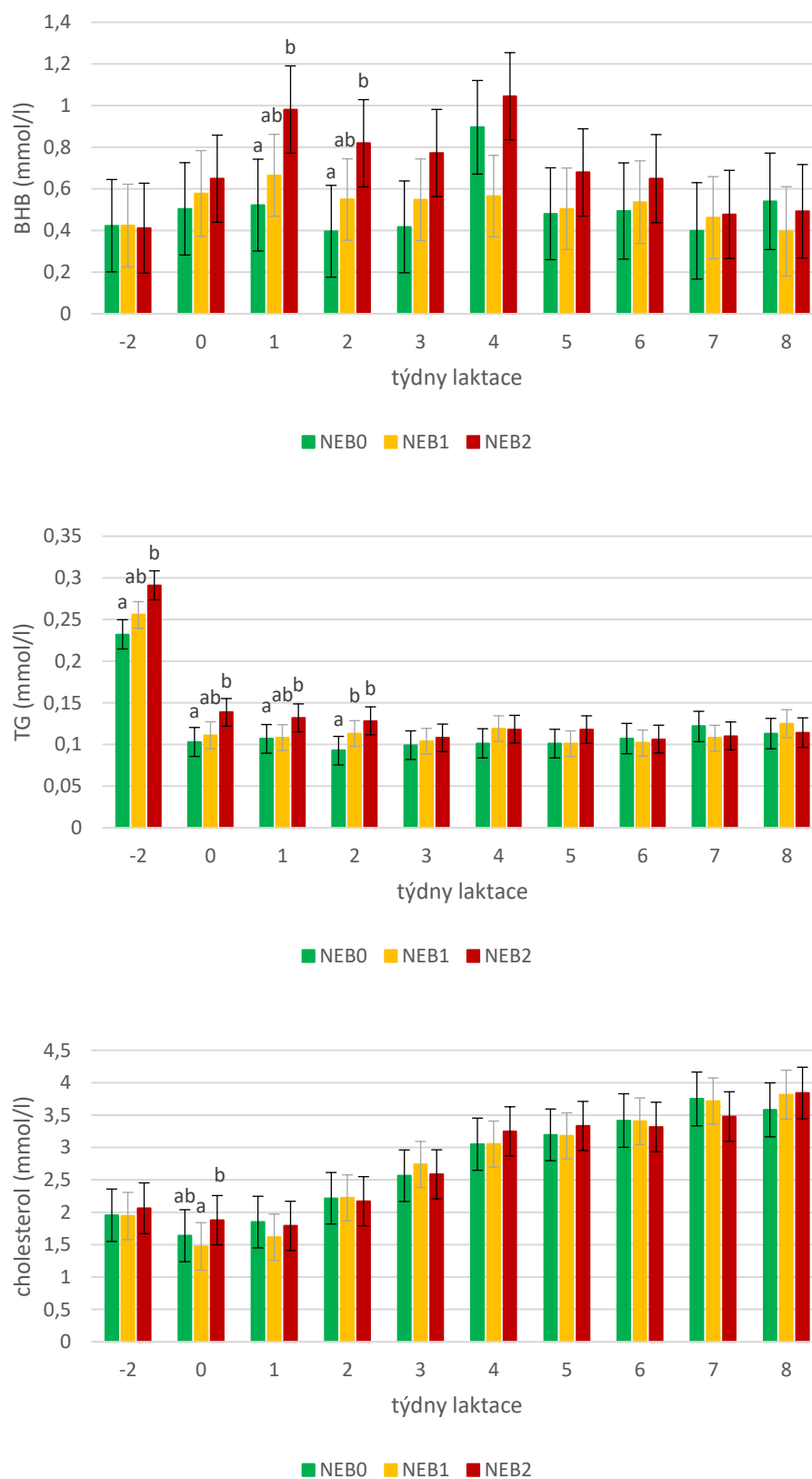
Jak již bylo uvedeno výše, s ohledem na předchozí výsledky a výsledky publikovaných studií je patrné, že na zátěž organismu při NEB má vliv jednak výskyt a hloubka propadu energetické bilance a jednak také doba trvání NEB. Je potřeba mít na paměti, že skupiny dojnic byly vytvářeny pro účely této práce a zjištěné výsledky jsou platné pro dojnice ve zkoumaném managementu chovu. Vzhledem k tomu je velmi obtížné najít relevantní publikace pro porovnání našich výsledků. Nejčastější výskyt NEB, resp. vysokých hodnot NEFA a BHB v prvních 2 až 3 týdnech laktace potvrzují například studie Patton et al. (2007) a Mann et al. (2016). Naše výsledky ohledně vyšší koncentrace sérového BHB u dojnic s nejhlubší NEB korespondují s výsledky Xu et al. (2020), kteří zjišťovali vztahy energetické bilance vypočítané na základě informací o individuálním příjmu a výdeje energie a plazmatických koncentrací vybraných parametrů analyzovaných pomocí chromatografie s hmotnostní spektrometrií a nukleární magnetické rezonance.

Obrázek 14: Vývoj vybraných parametrů energetického profilu v séru ($\bar{x} \pm 95\%$ intervaly spolehlivosti) v období 2 týdnů před a 8 týdnů po otelení u tří skupin dojnic (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech po otelení



NEFA: neesterifikované mastné kyseliny; BHB: β -hydroxybutyrát; TG: triacylglyceroly; statisticky významné rozdíly mezi skupinami v daném týdnu jsou označeny rozdílnými písmeny a, b, c ($P < 0,05$)

Obrázek 14: Vývoj vybraných parametrů energetického profilu v séru ($\bar{x} \pm 95\%$ intervaly spolehlivosti) v období 2 týdnů před a 8 týdnů po otelení u tří skupin dojníc (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech po otelení



NEFA: neesterifikované mastné kyseliny; BHB: β -hydroxybutyrát; TG: triacylglyceroly; statisticky významné rozdíly mezi skupinami v daném týdnu jsou označeny rozdílnými písmeny a, b, c ($P < 0,05$)

5.2.3 Vybrané mastné kyseliny mléčného tuku

Ze sledovaných mastných kyselin mléčného tuku byly významné ($P < 0,05$) rozdíly pozorovány u LCFA, MUFA a C18:1 v prvních 3 týdnech laktace. Obsah všech zmíněných mastných kyselin byl vyšší ve skupině NEB2 ve srovnání se skupinou NEB0. Zároveň byly pozorovány signifikantně ($P < 0,05$) vyšší obsahy ve skupině NEB2 oproti skupině NEB1, kdy u LCFA byly tyto rozdíly patrné v prvních 3 týdnech laktace, u MUFA v prvním týdnu a u C18:1 v prvních 2 týdnech laktace.

Rozdíly v obsahu zmíněných mastných kyselin v mléčném tuku odpovídají výskytu i hloubce NEB. V tukové tkáni dominují zejména C16:0, C18:0 (součástí LCFA) a C18:1 (součástí LCFA a MUFA). Při lipomobilizaci roste koncentrace těchto mastných kyselin v krevním oběhu a tyto jsou přenášeny z krve do mléčné žlázy, kde jsou zabudovány do mléčného tuku (Tyburczy et al. 2008). Zjednodušeně řečeno, při NEB se do mléka nejvíce uvolňují C16:0, C18:0 a C18:1. Bylo prokázáno, že LCFA přecházející z krve do mléka inhibují *de novo* syntézu SCFA (kromě C4:0) a MCFA, jelikož snižují aktivitu acetyl-CoA-karboxylázy, jejíž aktivita je primárním regulačním krokem syntézy mastných kyselin (Palmquist et al. 1993).

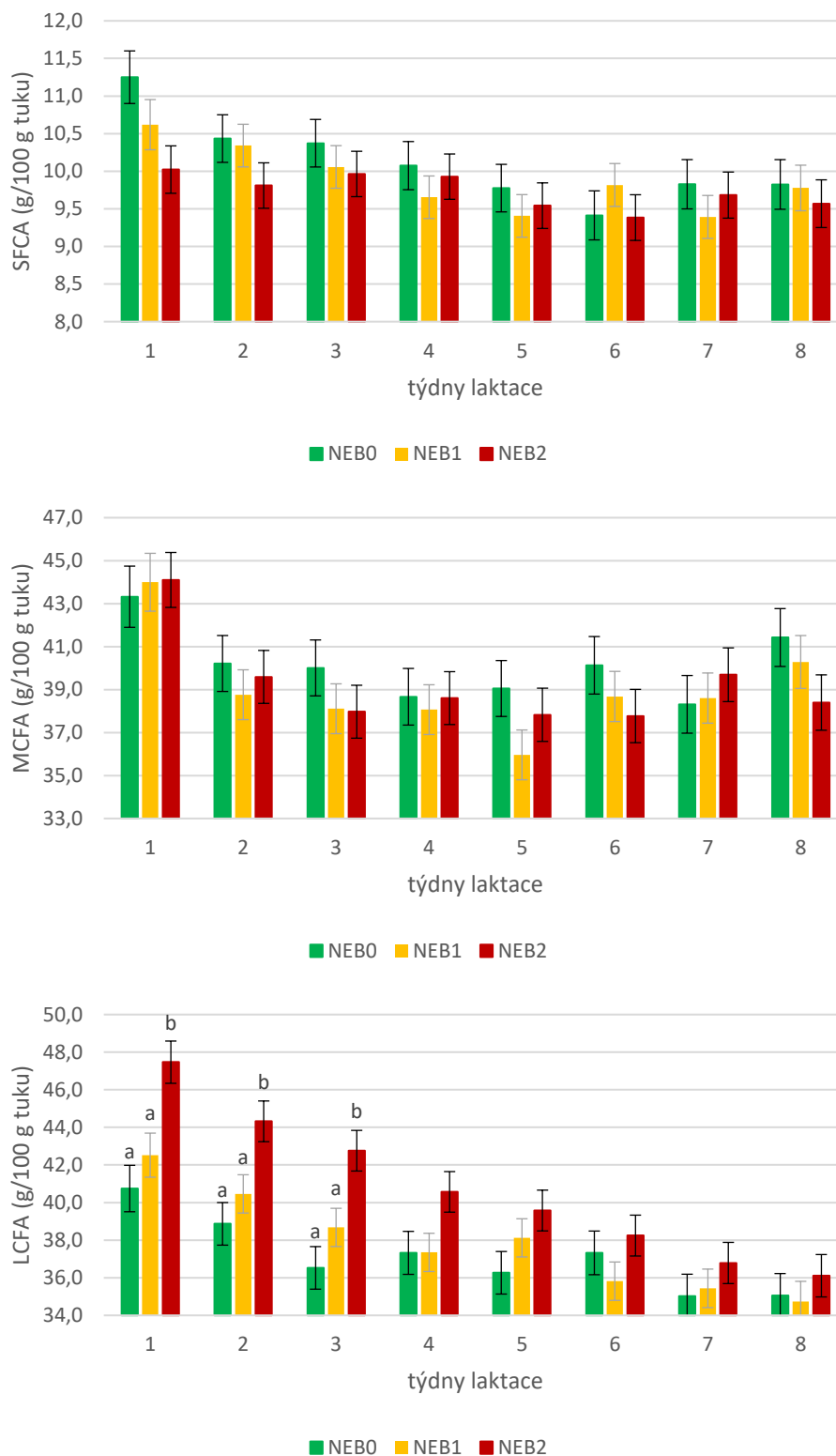
Rozdíly v obsahu C16:0 a C18:0 mezi jednotlivými skupinami však v naší práci pozorovány nebyly. Může to být dáno tím, že velká část C18:0 je v mléčné žláze desaturována na C18:1, a to zejména z důvodu zachování optimální tekutosti mléka. Pokud při NEB roste koncentrace mastných kyselin o vysokých teplotách tání (C16:0 a C18:0), dochází při tvorbě struktury nově utvářených TG v mléce ke stimulaci obsazování pozic glycerolu mastnými kyselinami o nízkých teplotách tání (C4:0 a C18:1) a tvoří se TG s teplotou ideální pro udržení tekutosti mléka (Gross et al. 2011; Loften et al. 2014). Kvantifikovat přechod C16:0 původem z tukových rezerv do mléka je velmi komplikované, jelikož část je tvořena i *de novo* syntézou, která je však současně při lipomobilizaci inhibována, jak je vysvětleno výše. Zároveň se při nadbytku energie v suchostojném období snižuje oxidace palmitátu, proto se C16:0 při překrmování v období stání na sucho kumuluje v játrech a do mléka se nezabudovává (Litherland et al. 2011).

Porovnání zmiňovaných výsledků s jinými autory je obtížnější z důvodů specifického vytvoření skupin dojníc v předkládané práci, jak bylo zmíněno výše. Gross et al. (2011) zjistili, že u dojníc při nejvyšší úrovni lipomobilizace (zjišťované pomocí výpočtu individuálního příjmu a výdeje energie) je C16:0 v prvním týdnu po porodu na nejnižší úrovni a poté s časem dále její obsah narůstá, zatímco C18:1 má opačný vývoj, tedy v prvním týdnu po porodu je její obsah nejvyšší a poté postupně klesá. To je srovnatelné s našimi výsledky a odpovídá tvorbě

mastných kyselin v mléčné žláze při NEB, jak je popsáno výše. Podobný vývoj obsahu C16:0 a C18:1 byl pozorován také v práci Kay et al. (2005), která se však primárně netýká NEB. Vliv výskytu a hloubky NEB na vybrané mastné kyseliny mléčného tuku zjištěné v předkládané práci jsou také v souladu se vztahy mezi sérovými koncentracemi NEFA a vybranými mastnými kyselinami v mléčném tuku (Jorjong et al. 2014; Mäntysaari et al. 2019; Aernouts et al. 2020), jak je diskutováno níže v kapitole 5.3.

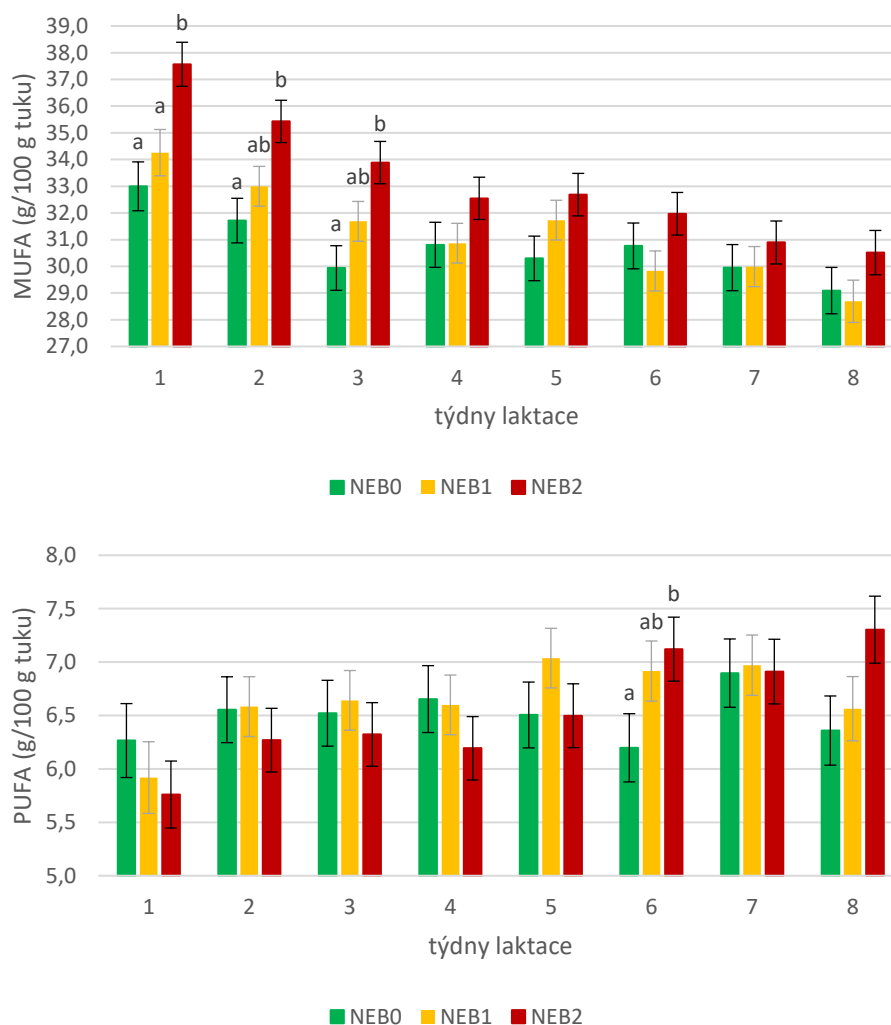
Významné rozdíly byly zjištěny i mezi plemeny (kapitola 5.1), a to v denní mléčné užitkovosti, SCFA, LCFA, MUFA a C18:1. Rozdíly byly také v mléčném tuku, PUFA, C16:0 a C18:0, ale v těchto parametrech byly rozdíly buď pouze v jednom týdnu, nebo až ke konci pozorovaného období. Proto tyto parametry byly posouzeny i v rámci skupin vytvořených podle výskytu a hloubky NEB také samostatně uvnitř každého plemene, kdy se statisticky významné ($P < 0,05$) rozdíly mezi skupinami dle NEB projevily pouze u MUFA a C18:1, přičemž C18:1 je nejvýznamnější součástí MUFA. Nejvyšší obsah MUFA a C18:1 byl ve skupině NEB2 oproti NEB0, a to v případě plemene C v prvních dvou týdnech laktace a v případě plemene H pouze ve 3. týdnu laktace. Nutno podotknout, že tímto rozdělením na skupiny uvnitř každého plemene došlo k významnému poklesu počtu zvířat v jednotlivých skupinách (NEB0 10 C a 7 H, NEB1 7 C a 21 H, NEB2 C 7 a 14 H), což může do určité míry omezovat praktické využití tohoto výsledku.

Obrázek 15: Vývoj obsahu skupin mastných kyselin podle délky uhlíkového řetězce v mléčném tuku ($\bar{x} \pm SE$) v prvních 8 týdnech laktace u tří skupin dojnic (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech laktace



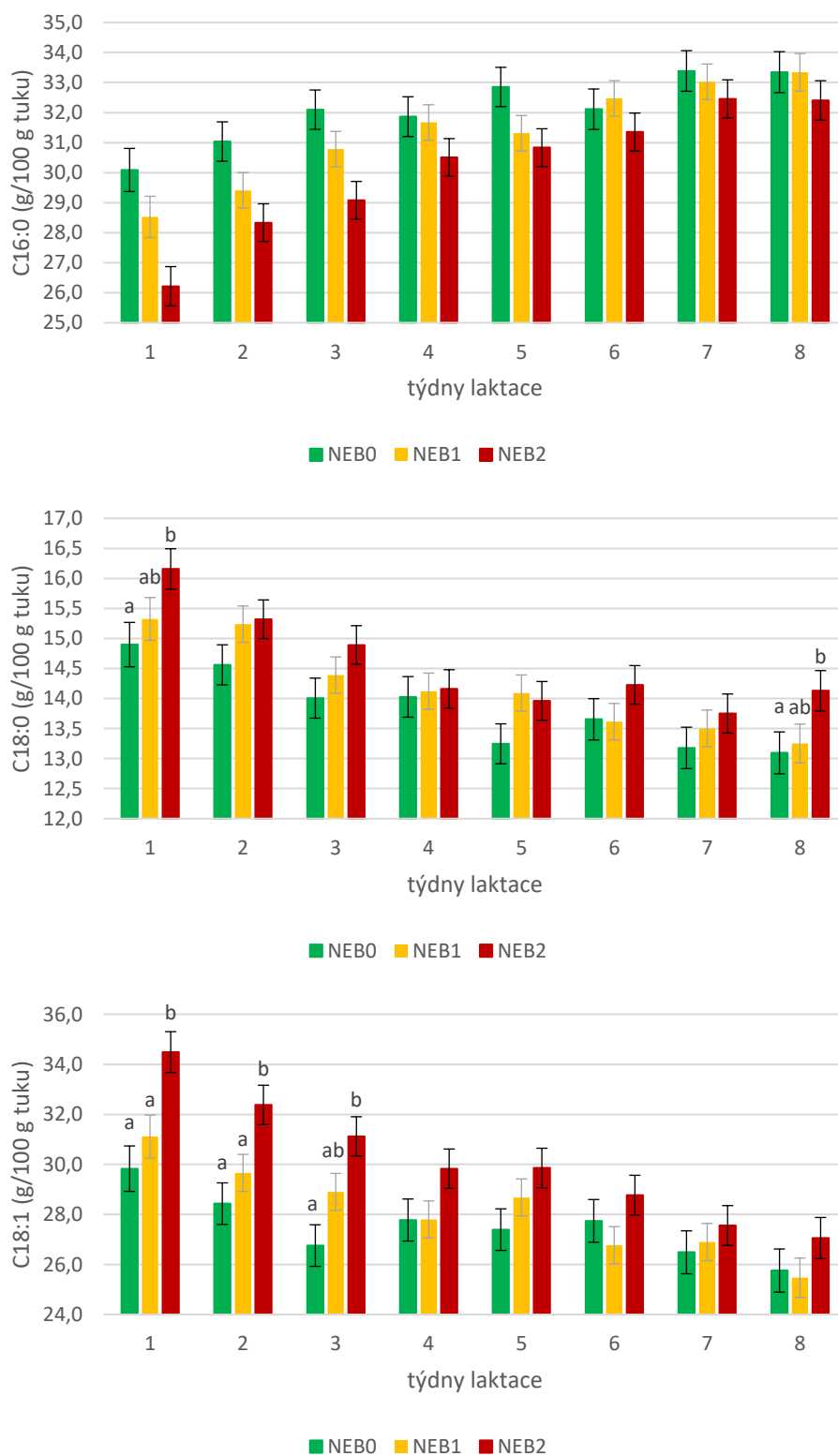
SCFA: mastné kyseliny s krátkým řetězcem; MCFA: mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem; LCFA: mastné kyseliny s dlouhým řetězcem; statisticky významné rozdíly mezi skupinami v daném týdnu jsou označeny rozdílnými písmeny a, b, c ($P < 0,05$)

Obrázek 16: Vývoj obsahu nenasycených mastných kyselin v mléčném tuku ($\bar{x} \pm SE$) v prvních 8 týdnech laktace u tří skupin dojnic (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech laktace



MUFA: mononenasyčené mastné kyseliny; PUFA: polynenasycené mastné kyseliny; statisticky významné rozdíly mezi skupinami v daném týdnu jsou označeny rozdílnými písmeny a, b, c ($P < 0,05$)

Obrázek 17: Vývoj obsahu jednotlivých mastných kyselin v mléčném tuku ($\bar{x} \pm SE$) v prvních 8 týdnech laktace u tří skupin dojníc (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech laktace



Statisticky významné rozdíly mezi skupinami v daném týdnu jsou označeny rozdílnými písmeny a, b, c ($P > 0,05$)

Tabulka 6: LSM vybraných sérových parametrů energetického profilu v období 2 týdnů před a 8 týdnů po otelení u tří skupin dojníc (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech laktace

Týden	Skupina	Energetický profil (mmol/l)			
		NEFA	BHB	TG	Cholesterol
-2	NEB0	0,05 ^a	0,42	0,23 ^a	1,95
	NEB1	0,05 ^a	0,42	0,26 ^{ab}	1,94
	NEB2	0,10 ^b	0,41	0,29 ^b	2,06
0	NEB0	0,32 ^a	0,50	0,10 ^a	1,64 ^{ab}
	NEB1	0,61 ^b	0,58	0,11 ^{ab}	1,47 ^a
	NEB2	0,98 ^b	0,65	0,14 ^b	1,88 ^b
1	NEB0	0,27 ^a	0,52 ^a	0,11 ^a	1,85
	NEB1	0,53 ^b	0,67 ^{ab}	0,11 ^{ab}	1,61
	NEB2	0,78 ^b	0,98 ^b	0,13 ^b	1,79
2	NEB0	0,13 ^a	0,40 ^a	0,09 ^a	2,22
	NEB1	0,24 ^b	0,55 ^{ab}	0,11 ^b	2,22
	NEB2	0,57 ^c	0,82 ^b	0,13 ^b	2,17
3	NEB0	0,15 ^a	0,42	0,10	2,56
	NEB1	0,20 ^{ab}	0,55	0,10	2,74
	NEB2	0,29 ^b	0,77	0,11	2,59
4	NEB0	0,11 ^a	0,90	0,10	3,05
	NEB1	0,17 ^a	0,57	0,12	3,05
	NEB2	0,29 ^b	1,05	0,12	3,25
5	NEB0	0,08 ^a	0,48	0,10	3,20
	NEB1	0,14 ^b	0,50	0,10	3,18
	NEB2	0,21 ^b	0,68	0,12	3,33
6	NEB0	0,09	0,49	0,11	3,42
	NEB1	0,08	0,54	0,10	3,41
	NEB2	0,13	0,65	0,11	3,32
7	NEB0	0,13	0,40	0,12	3,75
	NEB1	0,12	0,46	0,11	3,72
	NEB2	0,12	0,48	0,11	3,48
8	NEB0	0,08	0,54	0,11	3,58
	NEB1	0,12	0,40	0,13	3,82
	NEB2	0,13	0,49	0,11	3,84

LSM: least square means; NEFA: neesterifikované mastné kyseliny; BHB: β -hydroxybutyrát; TG: triacylglyceroly; statistická signifikance mezi skupinami v daném týdnu je označena rozdílnými písmeny a, b, c ($P < 0,05$)

Tabulka 7: LSM vybraných parametrů mléčné užitkovosti a složení mléka v prvních 8 týdnech laktace u tří skupin dojníc (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech laktace

Týden	Skupina	Mléčná užitkovost (kg/den)	Základní složky mléka (%)			Ketolátky (mmol/l)		Skupiny MK (g/100 g tuku)					Jednotlivé MK (g/100 g tuku)		
			Tuk	Protein	Laktóza	Aceton	BHB_m	SCFA	MCFA	LCFA	MUFA	PUFA	C16:0	C18:0	C18:1
1	NEB0	23,2	5,6	3,8	4,9	0,25 ^a	0,08 ^a	11,3	43,3	40,7 ^a	33,0 ^a	6,3	30,1	14,9 ^a	29,8 ^a
	NEB1	24,7	5,9	3,8	4,8	0,36 ^a	0,12 ^b	10,6	44,0	42,5 ^a	34,3 ^a	5,9	28,5	15,3 ^{ab}	31,1 ^a
	NEB2	24,7	6,4	3,7	4,7	0,66 ^b	0,18 ^c	10,0	44,1	47,5 ^b	37,6 ^b	5,8	26,2	16,2 ^b	34,5 ^b
2	NEB0	27,4	5,1	3,4	5,1	0,18 ^a	0,06 ^a	10,4	40,2	38,9 ^a	31,7 ^a	6,6	31,0	14,6	28,4 ^a
	NEB1	28,4	5,2	3,4	5,1	0,20 ^a	0,09 ^b	10,3	38,8	40,5 ^a	33,0 ^{ab}	6,6	29,4	15,2	29,7 ^a
	NEB2	28,5	5,8	3,2	5,0	0,32 ^b	0,12 ^c	9,8	39,6	44,3 ^b	35,4 ^b	6,3	28,3	15,3	32,4 ^b
3	NEB0	29,3	5,1	3,2	5,1	0,15 ^a	0,06 ^a	10,4	40,0	36,5 ^a	29,9 ^a	6,5	32,1	14,0	26,8 ^a
	NEB1	31,7	5,3	3,2	5,1	0,19 ^{ab}	0,08 ^b	10,1	38,1	38,7 ^a	31,7 ^{ab}	6,6	30,8	14,4	28,9 ^{ab}
	NEB2	31,0	5,9	3,1	5,1	0,31 ^b	0,12 ^c	10,0	38,0	42,8 ^b	33,9 ^b	6,3	29,1	14,9	31,1 ^b
4	NEB0	30,2	5,0	3,1	5,2	0,21	0,07 ^a	10,1	38,7	37,3	30,8	6,7	31,9	14,0	27,8
	NEB1	33,2	4,9	3,1	5,1	0,16	0,08 ^b	9,7	38,1	37,3	30,9	6,6	31,7	14,1	27,8
	NEB2	33,1	5,7	3,0	5,0	0,25	0,12 ^c	9,9	38,6	40,6	32,5	6,2	30,5	14,2	29,8
5	NEB0	31,6	4,9	3,0	5,1	0,14	0,06 ^a	9,8	39,0	36,3	30,3	6,5	32,9	13,2	27,4
	NEB1	34,1	4,7	3,0	5,1	0,16	0,07 ^b	9,4	36,0	38,1	31,7	7,0	31,3	14,1	28,7
	NEB2	33,3	5,3	2,9	5,0	0,24	0,10 ^c	9,5	37,8	39,6	32,7	6,5	30,8	14,0	29,9
6	NEB0	30,5	5,2	3,0	5,1	0,18	0,11 ^{ab}	9,4	40,1	37,3	30,8	6,2 ^a	32,1	13,7	27,7
	NEB1	33,6	4,8	3,0	5,1	0,14	0,07 ^a	9,8	38,7	35,8	29,8	6,9 ^{ab}	32,5	13,6	26,8
	NEB2	33,9	4,9	3,0	5,0	0,19	0,09 ^b	9,4	37,8	38,2	32,0	7,1 ^b	31,4	14,2	28,8
7	NEB0	30,9	4,5	3,0	5,1	0,13	0,05 ^a	9,8	38,3	35,0	30,0	6,9	33,4	13,2	26,5
	NEB1	34,0	4,7	3,0	5,0	0,14	0,06 ^b	9,4	38,6	35,4	30,0	7,0	33,0	13,5	26,9
	NEB2	34,9	4,6	3,0	5,0	0,16	0,07 ^c	9,7	39,7	36,8	30,9	6,9	32,5	13,8	27,6
8	NEB0	29,4	4,9	3,0	5,1	0,15	0,07 ^a	9,8	41,4	35,0	29,1	6,4	33,3	13,1 ^a	25,8
	NEB1	33,1	4,8	3,0	5,0	0,15	0,08 ^b	9,8	40,3	34,7	28,7	6,6	33,3	13,3 ^{ab}	25,5
	NEB2	33,9	4,7	3,0	5,0	0,16	0,08 ^b	9,6	38,4	36,1	30,5	7,3	32,4	14,1 ^b	27,1

LSM: least square means; BHB_m: mléčný β -hydroxybutyrát; SCFA: mastné kyseliny s krátkým řetězcem; MCFA: mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem; LCFA: mastné kyseliny s dlouhým řetězcem; MUFA: mononenasyčené mastné kyseliny; PUFA: polynenasycené mastné kyseliny; statistická signifikance mezi skupinami v daném týdnu je označena rozdílnými písmeny a, b, c (P < 0,05)

5.3 Stanovení vztahů mezi složkami mléka a sérovými NEFA a možnosti predikce NEB pomocí vybraných složek mléka

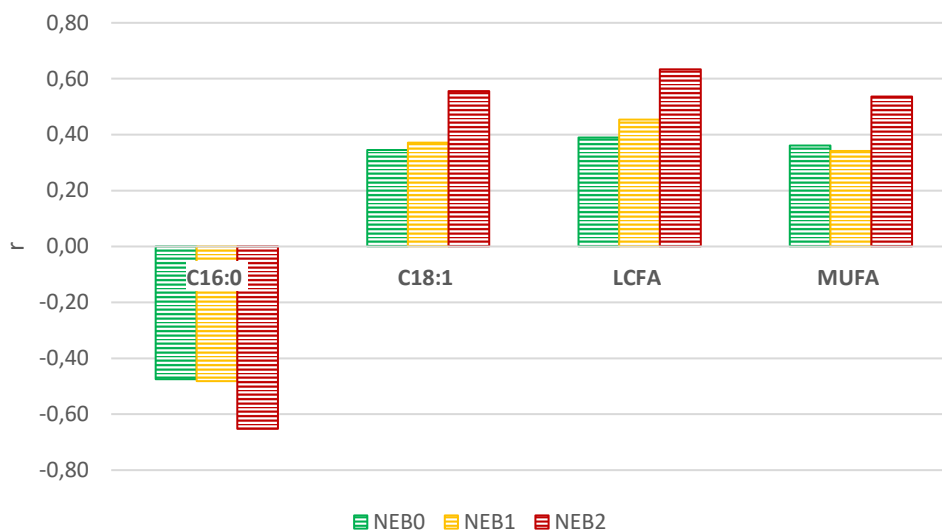
Pro hodnocení vztahů mezi sérovou koncentrací NEFA a vybranými složkami mléka byly vypočteny Pearsonovy korelační koeficienty, a to jednak v rámci celého souboru dojnic zařazených do experimentu, jednak odděleně pro každé plemeno zvlášť a jednak také v rámci skupin utvořených podle NEB, jak je vysvětleno v metodice. Pro výpočet vztahů ve skupinách podle NEB uvnitř jednotlivých plemen byl k dispozici malý počet pozorování a výsledky by měly nízkou vypovídací schopnost.

V rámci skupiny všech dojnic bez ohledu na plemeno byly nejtěsnější vztahy pozorovány mezi NEFA a LCFA ($r = 0,56$), MUFA ($r = 0,47$), C16:0 ($r = -0,58$), C18:1 ($r = 0,50$); $P < 0,0001$. Uvnitř obou plemen byly korelace na podobných úrovních. Zajímavější je pohled na vztahy v rámci skupin podle NEB. Z obrázku 18 je patrné, že sledované mastné kyseliny mléčného tuku ve skupinách NEB0 a NEB1 korelovaly s NEFA slabě až středně silně, zatímco ve skupině NEB2 byly u C16:0 a LCFA hodnoty korelačních koeficientů ($P < 0,0001$) $r = -0,65$, resp. $r = 0,63$, což značí těsný vztah. Pro možnosti predikce výskytu a hloubky NEB pomocí vybraných mastných kyselin mléčného tuku je to velmi zajímavé zjištění, jelikož je zřejmé, že nejtěsnější vztahy byly pozorovány u zvířat s hlubší a déletrvajícím NEB (četnější překročení hraničních hodnot NEFA v séru).

Vztahy mezi koncentracemi sérových NEFA a obsahem mastných kyselin v mléce se zabývali Mäntysaari et al. (2019), kteří ve své práci zkoumali 137 dojnic plemene nordic red. Vzorky krve a mléka byly odebírány ve 2., 3. a 20. týdnu laktace. Mastné kyseliny mléčného tuku byly, stejně jako v našem případě, analyzovány pomocí metody FTIR. Nejtěsnější vztahy s NEFA byly zjištěny u C18:1, LCFA a MUFA, což odpovídá i našim výsledkům, ačkoli zjištěné vztahy byly těsnější než v případě předkládané práce. Korelace mezi NEFA a C18:1 byla $r = 0,73$ při použití mléka z večerního dojení a $r = 0,64$ při použití mléka z ranního dojení. Korelace mezi NEFA a MUFA byla při použití vzorků z ranního dojení $r = 0,61$ a při použití vzorků z večerního dojení $r = 0,71$. Velice podobné korelace byly mezi NEFA a LCFA; $r = 0,61$ ze vzorků ranního mléka a $r = 0,70$ ze vzorků mléka večerního. V případě C16:0 nebyly ve zmiňované práci korelace s NEFA významné, zatímco v našem případě byl vztah s NEFA negativní a poměrně těsný ($r = -0,58$), zejména pak ve skupině NEB2 ($r = -0,65$). Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, kvantifikace přechodu C16:0 z krevního oběhu do mléka je velmi komplikovaná, jednak kvůli částečné *de novo* syntéze, která je však při lipomobilizaci

inhibována, a jednak kvůli změně jejího metabolismu při nadbytku energie v období stání na sucho. To může být jednou z příčin rozdílných výsledků.

Obrázek 18: Pearsonovy korelační koeficienty ($P < 0,0001$) vybraných mastných kyselin mléčného tuku se sérovými koncentracemi NEFA v jednotlivých skupinách dojnic (NEB0, NEB1, NEB2) vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech po otelení



MUFA: mononenasyčené mastné kyseliny; signifikance korelačních koeficientů je u všech parametrů $P < 0,0001$

Predikce NEB dojnic, resp. koncentrace sérových NEFA na základě vybraných složek mléka, byla ověřována prostřednictvím analýzy kovariance v obecném lineárním modelu. Vzhledem k relativně malému množství zvířat a počtu měření získaných v rámci experimentu bylo možné zahrnout do modelové rovnice jen omezený počet faktorů a výsledky mají pouze informativní charakter. V souladu s výsledky korelační analýzy se projevil kolineární charakter vztahů složek mléka s nejtěsnějším vztahem ke koncentraci sérových NEFA (C16:0, LCFA a C18:1) a začlenění více než jednoho parametru do modelu nepřineslo signifikantní efekt. Jak je zřejmé z tabulky 8, při použití C16:0 v pozici nezávisle proměnné bylo vysvětleno nejvyšší procento celkové proměnlivosti koncentrace sérových NEFA ($R^2 = 0,43$). Komplikovaná biologická interpretace vztahu C16:0 a sérových NEFA byla komentována výše a uvedený výsledek je poplatný konkrétním chovatelským podmínkám v průběhu experimentu a má pro perspektivu predikce energetické bilance dojnic jen omezený význam.

Alternativní zařazení koncentrace LCFA, resp. C18:1 do modelu přineslo velmi podobné výsledky predikce ($R^2 = 0,42$, resp. $R^2 = 0,38$). Z výsledků je patrné, že kromě signifikantního vlivu plemene a týdne laktace ($P < 0,01$) je ve všech variantách zaznamenán statisticky vysoce významný rozdíl regresních koeficientů mezi plemeny ($P < 0,01$). Všechny varianty výpočtu

poskytly relativně nízký podíl vysvětlené proměnlivosti koncentrace sérových NEFA (cca 40 %).

Možnostmi predikce NEB na základě vybraných složek mléka se zabývalo několik studií. V práci Jorjong et al. (2014) byl testován vztah mezi sérovými NEFA a obsahem mastných kyselin v mléčném tuku. Celkem bylo sledováno 92 dojnic holštýnského plemene v období 3 týdnů před porodem do 8 týdnů laktace, přičemž krevní vzorky byly odebírány každý týden a vzorky mléka 2., 3., 4. a 8. týden laktace, čímž se tato studie metodicky podobá předkládané práci. Pro analýzu mastných kyselin mléčného tuku však byla použita plynová chromatografie, zatímco v naší práci metoda FTIR. Nejvhodnější pro predikci sérové koncentrace NEFA a tím i NEB se jevila kyselina olejová (C18:1 *cis*-9, která tvoří většinu celkové C18:1), u které použitý regresní model dosáhl stejných výsledků predikce ($R^2 = 0,38$) jako model použitý v předkládané práci. Zajímavých výsledků dosáhli Aernouts et al. (2020), kteří se zabývali predikcí sérových NEFA pomocí MIR spektra mléka u 143 dojnic plemene nordic red. Vzorky krve a mléka byly odebírány ve stejném schématu jako ve studii Mäntysaari et al. (2019), která je zmiňována výše. Přesnost predikce byla dostatečná pro relativně nízké hladiny NEFA v krvi ($< 0,6$ mmol/l), ale nedostatečná při vysokých koncentracích NEFA ($> 1,2$ mmol/l). Z našich výsledků však vyplývá opak; při bližším rozboru reziduí se ukazuje, že rozdíly odhadů a naměřených hodnot koncentrací sérových NEFA se s rostoucí koncentrací výrazně snižují, což koresponduje i s výsledky korelační analýzy. Možnosti predikce NEFA pomocí MIR spektra mléka byly zkoumány i v dalších studiích, přičemž predikční schopnost byla různá. V modelu Grelet et al. (2019) byla predikce ($R^2 = 0,39$) podobná jako v našem případě a v modelu Benedet et al. (2019) byla o něco vyšší ($R^2 = 0,52$). Luke et al. (2019) upozorňují na silný vliv stáda, koeficient determinace v jejich studii se snížil z $R^2 = 0,61$ na $R^2 = 0,45$, když stejný model použili v jiném stádě. I v našem případě je nutné vždy dodat, že výsledky jsou platné pro konkrétní stádo.

Uvedená zjištění mají jen informativní charakter, ale zjištěné tendence jsou velmi slibné a vyžadují detailní ověření na mnohem rozsáhlejším souboru měření v různých podmínkách, na což je zaměřen náš další výzkum. Potvrzení výše uvedených výsledků by pak mohlo umožnit predikovat s dostatečnou přesností zvýšené riziko NEB dojnic na základě výsledků rozboru mléka.

Tabulka 8: Výsledky analýzy kovariance a koeficienty determinace (R^2) koncentrace sérových NEFA s lineární regresi

Zdroj proměnlivosti	Stupně volnosti	Suma čtverců	Průměr čtverců	F	P	R^2
plemeno	1	3,925	3,925	7,27	0,0073	0,431
týden	7	38,977	5,568	10,31	<0,0001	
C16:0	1	59,739	59,739	110,65	<0,0001	
C16:0 * plemeno	1	4,717	4,717	8,74	0,0033	
plemeno	1	4,266	4,266	7,69	0,0058	0,415
týden	7	45,865	6,552	11,81	<0,0001	
LCFA	1	52,691	52,691	94,97	<0,0001	
LCFA * plemeno	1	4,011	4,011	7,23	0,0074	
plemeno	1	4,953	4,953	8,46	0,0038	0,383
týden	7	61,651	8,807	15,05	<0,0001	
C18:1	1	38,212	38,212	65,31	<0,0001	
C18:1 * plemeno	1	4,940	4,940	8,44	0,0038	

LCFA: mastné kyseliny s dlouhým řetězcem

6 ZÁVĚR

Cílem předkládané práce bylo

- porovnání energetického profilu a vybraných složek mléka dojnic C a H plemene
- stanovení rozdílů sledovaných parametrů mezi skupinami dojnic s různou úrovní NEB
- a kvantifikace vztahů mezi sérovými koncentracemi NEFA a vybranými složkami mléka s perspektivou predikce zvýšeného rizika NEB na základě obsahu určitých složek mléka.

Vyšší produkce mléka dojnic H plemene se v obsahu základních složek mléka a ketolátek výrazně neprojevila. Dynamika vývoje parametrů energetického profilu v tranzitní periodě byla u obou sledovaných plemen obdobná a byly zaznamenány jen nevýrazné rozdíly v parametrech energetického metabolismu. Výsledky ukázaly výraznou zátěž organismu dojnic v prvních dvou týdnech laktace, přičemž nástup metabolických změn byl rychlejší a výraznější u plemene H. Pracovní hypotéza (1) nebyla potvrzena v celém rozsahu. Zjištěné tendence v energetickém profilu sledovaných plemen byly v souladu s předpoklady, ale zjištěné rozdíly mezi plemeny nebyly signifikantní. V navazujícím výzkumu bude třeba ověřit vliv konkrétních podmínek experimentu (totožné podmínky chovu pro obě plemena), zaměřit se i na rozdíly v distribuci energie a mobilizaci rezerv mezi plemeny (užitkovými typy).

Mezi skupinami dojnic s různou úrovní NEB v prvních 2 týdnech laktace byly zaznamenány významné rozdíly v obsahu ketolátek i parametrech energetického profilu dojnic. Nejvyšší koncentrace NEFA, BHB i obsah ketolátek v mléce byly u skupiny dojnic s nejhlubší NEB (NEB2). Mezi skupinou NEB2 a skupinou NEB0, která se v průběhu prvních 2 týdnů laktace nedostala do NEB, se projevily významné rozdíly i v obsahu mastných kyselin mléčného tuku, zejména u LCFA, MUFA a C18:1 (signifikantně vyšší obsah ve skupině NEB2 v prvních třech týdnech laktace). Výsledky rovněž ukázaly, že hloubka propadu energetické bilance v prvních 2 týdnech laktace se významně projevuje ještě v pátém týdnu laktace, a může tak nepříznivě ovlivnit zdravotní stav dojnic v důsledku dlouhotrvajícího stavu nerovnováhy. Dosažené výsledky potvrdily platnost pracovní hypotézy (2).

Signifikantní korelace mezi sérovými NEFA a mastnými kyselinami mléčného tuku byly pozorovány u LCFA, MUFA, C16:0 a C18:1, navíc u skupiny s nejhlubší NEB (NEB2) byly vztahy těsnější než u skupin NEB0 a NEB1. Pro možnou predikci se jeví jako velmi zajímavé využití obsahů LCFA a C18:1, ačkoli výpočet poskytl relativně nízký podíl vysvětlené proměnlivosti koncentrace sérových NEFA (cca 40 %). Při bližším rozboru reziduí se ukázalo, že rozdíly odhadů a naměřených hodnot koncentrací NEFA se s rostoucí koncentrací výrazně

snižují, což koresponduje s výsledky korelační analýzy. Byla tak potvrzena pracovní hypotéza (3) a vytvořen prostor pro další výzkum, který by mohl být zaměřen na výběr dojnic s vysokým rizikem NEB na základě parametrů stanovených v rámci rozšířeného laboratorního rozboru mléka. Z dosažených výsledků je zřejmé, že bude třeba věnovat pozornost nelineárnímu charakteru vztahů sledovaných parametrů a zřejmě i rozdílům mezi plemeny, které se projeví v signifikantně rozdílných směrniciích lineární regrese.

Výsledky zjištěné v této práci jsou poplatné konkrétním chovatelským podmínkám experimentální farmy. Další výzkum, který již probíhá, je cílen na ověřování vztahů na rozsáhleším souboru pozorování uvnitř jednotlivých plemen a také v různých podmínkách chovu s cílem najít model, který by umožnil včasnou predikci NEB na základě vybraných mastných kyselin mléka. Velký potenciál pro využití v chovatelské praxi by pak mělo rozšíření kontroly užitečnosti o vybrané mastné kyseliny a spolu s tím i stanovení rizika NEB u jednotlivých dojnic.

Závěrem je možno konstatovat, že stanovené cíle práce byly naplněny. Dosažené výsledky se staly impulzem pro podání úspěšného návrhu projektu NAZV QK21010038 s řešením v období 2021 až 2025 a s názvem: „Včasná predikce zdravotních rizik a poruch reprodukce dojnic s využitím rozšířeného spektra parametrů získávaných laboratorním rozbořem vzorků mléka“.

7 LITERATURA

- Adewuyi AA, Gruys E, Van Eerdenburg FJCM. 2005. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Veterinary Quarterly* **27**:117-126.
- Aernouts B, et al. 2020. Mid-infrared spectroscopic analysis of raw milk to predict the blood nonesterified fatty acid concentrations in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **103**:6422-6438.
- Arfuso F, Fazio F, Levanti M, Rizzo M, Di Pietro S, Giudice E, Piccione G. 2016. Lipid and lipoprotein profile changes in dairy cows in response to late pregnancy and the early postpartum period. *Archives Animal Breeding* **59**:429-434.
- Arnould VMR, Soyeurt H. 2009. Genetic variability of milk fatty acids. *Journal of Applied Genetics* **50**:29-39.
- Ashes JR, Gulati SK, Scott TW. 1997. Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. *Journal of Dairy Science* **80**:2204-2212.
- Barłowska J, Grodzicki T, Topyła B, Litwińczuk Z. 2009. Physicochemical properties of milk fat from three breeds of cows during summer and winter feeding. *Archives Animal Breeding* **52**:356-363.
- Barth K, Aulrich K, Haufe HC, Müller U, Schaub D, Schulz F. 2011. Metabolic status in early lactating dairy cows of two breeds kept under conditions of organic farming – a case study. *Landbauforschung* **61**:307-316.
- Bastin C, Gengler N, Soyeurt H. 2011. Phenotypic and genetic variability of production traits and milk fatty acid contents across days in milk for Walloon Holstein first-parity cows. *Journal of Dairy Science* **94**:4152-4163.
- Baticz O, Tömösközi S, Vida L. 2002. Concentrations of citrate and ketone bodies in cow's raw milk. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* **46**:93-104.
- Bauman DE, Corl BA, Baumgard LH, Griinari JM. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. Pages 221-250 in Garnsworthy P, Wiseman J, editors. *Recent advances in animal nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham.
- Beam SW, Butler WR. 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility* **54**(Supplement):411-424.
- Bell AW, Burhans WS, Overton TR. 2000. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. *Proceedings of the Nutrition Society* **59**:119-126.

- Benedet A, Franzoi M, Penasa M, Pellattiero E, De Marchi M. 2019. Prediction of blood metabolites from milk mid-infrared spectra in early-lactation cows. *Journal of Dairy Science* **102**:11298-11307.
- Bilal G, Cue RI, Mustafa AF, Hayes JF. 2014. Effects of parity, age at calving and stage of lactation on fatty acid composition of milk in Canadian Holsteins. *Canadian Journal of Animal Science* **94**:401-410.
- Bobe G, Qoung J, Beitz D. 2004. Invited review: Pathology, aetiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **87**:3105-3124.
- Borchardt S, Staufenbiel R. 2012. Evaluation of the use of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations in pooled serum samples for herd-based detection of subclinical ketosis in dairy cows during the first week after parturition. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **240**:1003-1011.
- Broudiscou L, Pochet S, Poncet C. 1994. Effect of linseed oil supplementation on feed degradation and microbial synthesis in the rumen of ciliate-free and refaunated sheep. *Animal Feed Science and Technology* **49**:189-202.
- Burhans WS, Briggs EA, Rathmacher JA, Bell AW. 1997. Glucogenic supplementation does not reduce body tissue protein degradation in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* **80**(Supplement):167 (abstract).
- Butler ST, Pelton SH, Butler WR. 2006. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *Journal of Dairy Science* **89**:2938-2951.
- Butler ST, Pelton SH, Knight PG, Butler WR. 2008. Follicle-stimulating hormone isoforms and plasma concentrations of estradiol and inhibin A in dairy cows with ovulatory and non-ovulatory follicles during the first postpartum follicle wave. *Domestic Animal Endocrinology* **35**:112-119.
- Chandler TL, Pralle RS, Dórea JRR, Poock SE, Oetzel GR, Fourdraine RH, White HM. 2018. Predicting hyperketonemia by logistic and linear regression using test-day milk and performance variables in early-lactation Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science* **101**:2476-2491.
- Chilliard Y, Ferlay A, Doreau M. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Production Science* **70**:31-48.

- Chilliard Y, Ferlay A, Mansbridge RM, Doreau M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. *Annales de zootechnie* **47**:181-205.
- Chilliard Y, Glasser F, Ferlay A, Bernard L, Rouel J, Doreau M. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology* **109**:828-855.
- Christensen RA, Drackley JK, LaCount DW, Clark JH. 1994. Infusion of four long-chain fatty acid mixtures into the abomasum of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **77**:1052-1069.
- Contreras GA, Strieder-Barboza C., DeKoster J. 2018. Symposium review: Modulating adipose tissue lipolysis and remodelling to improve immune function during the transition period and early lactation of dairy cows. *Journal of Dairy Science* **101**:2737-2752.
- Couvreur S, Hurtaud C, Lopez C, Delaby L, Peyraud JL. 2006. The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. *Journal of Dairy Science* **89**:1956-1969.
- Cozzi G, Ravarotto L, Gottardo F, Stefani AL, Contiero B, Moro L, Brscic M, Dalvit P. 2011. Short Communication: Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effect of parity, stage of lactation and season of production. *Journal of Dairy Science*. **94**:3895-3901.
- Craninx M, Steen A, Van Laar H, Van Nespen T, Martin-Tereso J, De Baets B, Fievez V. 2008. Effect of lactation stage on the odd- and branched-chain milk fatty acids of dairy cattle under grazing and indoor conditions. *Journal of Dairy Science* **91**:2662-2677.
- Danscher AM, Li S, Andersen PH, Khafipour E, Kristensen NB, Plaizier JC. 2015. Indicators of induced subacute ruminal acidosis (SARA) in Danish Holstein cows. *Acta Veterinaria Scandinavica* **57**:39-53.
- De Koster JD, Opsomer G, 2013. Insulin resistance in dairy cows. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* **29**:299-322.
- De Roos APW, Van den Bijgaart HJCM, Hørlyk J, De Jong G. 2007. Screening for Subclinical Ketosis in Dairy Cattle by Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Journal of Dairy Science* **90**:1761-1766.
- Demeyer D, Doreau M. 1999. Targets and means for altering meat and milk lipids. *Proceedings of the Nutrition Society* **58**:593-607.

- Denis-Robichaud J, Dubuc J, Lefebvre D, DesCoteaux L. 2014. Accuracy of milk ketone bodies from flow-injection analysis for the diagnosis of hyperketonemia in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **97**:3364-3370.
- Dewhurst RJ, Fisher WJ, Tweed J, Wilkins RJ. 2003. Comparison of grass and legume silages for milk production. 1. Production responses with different levels of concentrate. *Journal of Dairy Science* **86**:2598-2611.
- Dewhurst RJ, Shingfield KJ, Lee M, Scollan ND. 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology* **131**:168-206.
- Dórea JRR, French EA, Armentano LE. 2017. Use of milk fatty acids to estimate plasma nonesterified fatty acid concentrations as an indicator of animal energy balance. *Journal of Dairy Science* **100**:6164-6176.
- Doreau M, Ferlay A. 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology* **45**:379-396.
- Drackley JK, Cardoso FC. 2014. Prepartum and postpartum nutritional management to optimize fertility in high-yielding dairy cows in confined TMR systems. *Animal* **8**(Supplement):5-14.
- Drackley JK, Klusmeyer TH, Trusk AM, Clark JH. 1992. Infusion of long-chain fatty acids varying in saturation and chain length into the abomasum of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **75**:1517-1526.
- Drackley JK, Overton TR, Douglas GN. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acids metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* **84**(E Suppl.):E100-E112.
- Drackley JK, Wallace RL, Graugnard D, Vasquez J, Richards BF, Loor JJ. 2014. Visceral adipose tissue mass in nonlactating dairy cows fed diets differing in energy density. *Journal of Dairy Science* **97**:3420-3430.
- Duffield TF, Lissemore KD, McBride BW, Leslie KE. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science* **92**:571-580.
- Elgersma A, Tamminga S, Ellen G. 2006. Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology* **131**:207-225.
- Enjalbert F, Nicot M, Bayourthe C, Moncoulon R. 1998. Duodenal infusions of palmitic, stearic or oleic acids differently affect mammary gland metabolism of fatty acids in lactating dairy cows. *The Journal of Nutrition* **128**:1525-1532.

- Esposito G, Irons PC, Webb EC, Chapwanya A. 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal reproduction science* **144**:60-71.
- Ferlay A, Martin B, Pradel P, Coulon JB, Chilliard Y. 2006. Influence of grass-based diets on milk fatty acid composition and milk lipolytic system in Tarentaise and Montbéliarde cow breeds. *Journal of Dairy Science* **89**:4026-4041.
- Formigoni A, Cornil MC, Prandi A, Mordenti A, Rossi A, Portetelle D, Renaville R. 1996. Effect of propylene glycol supplementation around parturition on milk yield, reproduction performance and some hormonal and metabolic characteristics in dairy cows. *Journal of Dairy Research* **63**:11-24.
- Forsbäck L, Lindmark-Månsson H, Andrén A, Akerstedt M, Andrée L, Svennersten-Sjaunja K. 2010. Day-to-day variation in milk yield and milk composition at the udder-quarter level. *Journal of Dairy Science* **93**:3569-3577.
- Garnsworthy PC, Masson LL, Lock AL, Mottram TT. 2006. Variation of milk citrate with stage of lactation and *de novo* fatty acid synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **89**:1604-1612.
- Geishauser T, Leslie K, Kelton D, Duffield T. 2001. Monitoring for subclinical ketosis in dairy herds. *Compendium* **23**:S65-S71.
- Gottardo P, Penasa M, Righi F, Lopez-Villalobos N, Cassandro M, De Marchi M. 2017. Fatty acid composition of milk from Holstein-Friesian, Brown Swiss, Simmental and Alpine Grey cows predicted by mid-infrared spectroscopy. *Italian Journal of Animal Science* **16**:380-389.
- Grelet C, et al. 2019. Potential of milk mid-IR spectra to predict metabolic status of cows through blood components and a innovative clustering approach. *Animal* **13**:649-658.
- Gross J, Van Dorland HA, Bruckmaier RM, Schwarz FJ. 2011. Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows. *Journal of Dairy Research* **78**:479-488.
- Gross JJ, Schwarz FJ, Eder K, Van Dorland HA, Bruckmaier RM. 2013. Liver fat content and lipid metabolism in dairy cows during early lactation and during a mid-lactation feed restriction. *Journal of Dairy Science* **96**:5008-5017.
- Grum DE, Drackley JK, Younker RS, Lacount DW, Veenhuizen JJ. 1996. Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* **79**:1850-1864.
- Gustafsson AH, Emanuelson U. 1996. Milk acetone concentration as an indicator of hyperketonaemia in dairy cows: the critical value revised. *Animal Science* **63**:183-188.

- Halmemies-Beauchet-Filleau A, Kairenius P, Ahvenjärvi S, Toivonen V, Huhtanen P, Vanhatalo A, Givens DI, Shingfield KJ. 2013. Effect of forage conservation method on plasma lipids, mammary lipogenesis, and milk fatty acid composition in lactating cows fed diets containing a 60:40 forage-to-concentrate ratio. *Journal of Dairy Science* **96**:5267-5289.
- Harfoot CG, Hazlewood GP. 1997. Lipid metabolism in the rumen. Pages 382-426 in Hobson PN, Steward CS, editors. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Hofirek B, Dvořák R, Němeček L, Doležel R, Pospíšil Z. 2009. *Nemoci skotu*. Noviko, Brno.
- ICAR. 2020. Milk recording surveys on cow, sheep and goats. Available from www.icar.org (accessed Listopad 2020).
- Oregon State University. 2019. Biochemistry Reference Interval. Available from: https://vetmed.oregonstate.edu/sites/vetmed.oregonstate.edu/files/biochemistry_reference_intervals_1.pdf (accessed Červen 2019).
- eClinPath online textbook of Veterinary Clinical Pathology. 2021. Production and metabolism of non-esterified fatty acids. Available from: <https://eclinpath.com/chemistry/energy-metabolism/non-esterified-fatty-acids/print-2/> (accessed Leden 2021).
- Bioinfo. 2021. Bioenergetics metabolism: oxidation of fatty acids. Available from: <http://www.bioinfo.org.cn/book/biochemistry/chapt16/bio2.htm> (accessed Leden 2021).
- Pennsylvania State University. 2013. Metabolic Profiling. Reference Values. Available from: <https://extension.psu.edu/metabolic-profiling#section-55> (accessed Červen 2019).
- Imhasly S, Bieli C, Naegeli H, Nyström L, Ruetten M, Gerspach C. 2015. Blood plasma lipidome profile of dairy cows during the transition period. *BMC Veterinary Research* (252) DOI: [10.1186/s12917-015-0565-8](https://doi.org/10.1186/s12917-015-0565-8).
- Ingvarsen KL. 2006. Feeding- and management-related diseases in the transition cow, physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology* **126**:175-213.
- Jenkins TC. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* **76**:3851-3863.
- Jorjong S, Van Knegsel ATM, Verwaeren J, Val Lahoz M, Bruckmaier RM, De Baets B, Kemp B, Fievez V. 2014. Milk fatty acids as possible biomarkers to early diagnose elevated concentrations of blood plasma nonesterified fatty acids in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **97**:7054-7064.

- Jorritsma R, Jorritsma H, Schukken YH, Barlett PC, Wenting T, Wenting GH. 2001. Prevalence and indicators of postpartum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in the Netherlands. *Livestock Production Science* **68**:53-60.
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss M. 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic Press/Elsevier, Boston.
- Kaneene JB, Miller R, Herdt TH, Gardiner JC. 1997. The association of serum nonesterified fatty acids and cholesterol, management and feeding practices with peripartum disease in dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* **31**:59-72.
- Katoh N. 2002. Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science* **64**:293-307.
- Kay JK, Weber WJ, Moore CE, Bauman DE, Hansen LB, Chester-Jones H, Crooker BA, Baumgard LH. 2005. Effects of week of lactation and genetic selection for milk yield on milk fatty acid composition in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* **88**:3886-3893.
- Kelly ML, Berry JR, Dwyer DA, Griinari JM, Chouinard PY, Van Amburgh ME, Bauman DE. 1998. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *Journal of Nutrition* **128**:881-885.
- Kelsey JA, Corl BA, Collier RJ, Bauman DE. 2003. The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *Journal Dairy Science* **86**:2588-2597.
- Kgwatalala PM, Ibeagha-Awemu EM, Mustafa AF, Zhao X. 2009. Stearoyl-CoA desaturase 1 genotype and stage of lactation influences milk fatty acid composition of Canadian Holstein cows. *Animal Genetics* **40**:609-615.
- Koeck A, Jamrozik J, Schenkel FS, Moore RK, Lefebvre DM, Kelton DF, Miglior F. 2014. Genetic analysis of milk β -hydroxybutyrate and its association with fat-to-protein ratio, body condition score, clinical ketosis, and displaced abomasum in early first lactation of Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science* **97**:7286-7292.
- Koeck A, Miglior F, Jamrozik J, Kelton DF, Schenkel FS. 2013. Genetic associations of ketosis and displaced abomasum with milk production traits in early first lactation of Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science* **96**:4688-4696.
- Kurpińska AK, Jarosz A, Ozgo M, Skrzypczak WF. 2015. Changes in lipid metabolism during last month of pregnancy and first two months of lactation in primiparous cows – analysis of apolipoprotein expression pattern and changes in concentration of total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides. *Polish Journal of Veterinary Science* **18**:291-298.

- La Terra S, Marino VM, Manenti M, Licitra G, Carpino S. 2010. Increasing pasture intakes enhances polyunsaturated fatty acids and lipophilic antioxidants in plasma and milk of dairy cows fed total mix ration. *Dairy Science and Technology* **90**:687-698.
- Lacasse P, Kennelly JJ, Delbecchi L, Ahnadi CE. 2002. Addition of protected and unprotected fish oil to diets for dairy cows. I. Effects on the yield, composition and taste of milk. *Journal of Dairy Research* **69**:511-520.
- Lahlou MN, Kanneganti R, Massingill LJ, Broderick GA, Park Y, Pariza MW, Ferguson JD, Wu Z. 2014. Grazing increases the concentration of CLA in dairy cow milk. *Animal* **8**:1191-1200.
- Lakic B, Wredle E, Svennersten-Sjaunja K, Ostensson K. 2009. Is there a special mechanism behind the changes in somatic cell and polymorphonuclear leukocyte counts, and composition of milk after a single prolonged milking interval in cows? *Acta Veterinaria Scandinavica* (4) DOI: [10.1186/1751-0147-51-4](https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-4).
- Larsen M, Kristensen NB. 2009. Effect of abomasal glucose infusion on splanchnic and wholebody glucose metabolism in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* **92**:1071-1083.
- Lawless F, Murphy JJ, Harrington D, Devery R, Stanton C. 1998. Elevation of conjugated *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation. *Journal of Dairy Science* **81**:3259-3267.
- LeBlanc S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development* **56**(Supplement):S29-S35.
- LeBlanc SJ, Leslie KE, Duffield TF. 2005. Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. *Journal of dairy science* **88**:159-170.
- Leroux C, Le Provost F, Petit E, Bernard L, Chilliard Y, Martin P. 2003. Real-time RT-PCR and cDNA microarray to study the impact of the genetic polymorphism at the α -s1-casein locus on the expression of genes in the goat mammary gland during lactation. *Reproduction Nutrition Development* **43**:459-469.
- Leroy JL, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, De Kruif A. 2005. Non-esterified fatty acid in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* **130**:485-495.
- Lindmark Månsson H. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. *Food and Nutrition Research* (1821) DOI: [10.3402/fnr.v52i0.1821](https://doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1821).

- Litherland NB, Dann HM, Drackley JK. 2011. Prepartum nutrient intake alters palmitate metabolism by liver slices from peripartal dairy cows. *Journal of Dairy Science* **94**:1928-1940.
- Littel RC, Pendergast J, Natarajan R. 2000. Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. *Statistics in Medicine* **19**:1793-1819
- Liu Q, Wang C, Yang WZ, Zhang XM, He DC, Dong KH, Huang YX. 2009. Effects of feeding propylene glycol on dry matter intake, lactation performance, energy balance and blood metabolites in early lactation dairy cows. *Animal* **3**:1420-1427.
- Loften JR, Linn JG, Drackley JK, Jenkins TC, Soderholm CG, Kertz AF. 2014. Invited review: Palmitic and stearic acid metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **97**:4661-4674.
- Luke TDW, Rochfort S, Wales WJ, Bonfatti V, Marett L, Pryce JE. 2019. Metabolic profiling of early-lactation dairy cows using milk mid-infrared spectra. *Journal of Dairy Science* **102**:1747-1760.
- MacGibbon AKH, Taylor MW. 2006. Composition and structure of bovine milk lipids. Pages 1-42 in Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry*. Springer, New York.
- Maia MRG, Chaudhary LC, Figueres L, Wallace RJ. 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek* **91**:303-314.
- Mann S, Nydam DV, Lock AL, Overton TR, McArt JAA. 2016. Short communication: Association on milk fatty acids with early lactation hyperketonemia and elevated concentration of nonesterified fatty acids. *Journal of Dairy Science* **99**:5851-5857.
- Mäntysaari P, Mäntysaari EA, Kokkonen T, Mehtiö T, Kajava S, Grelet C, Lidauer MH. 2019. Body and milk traits as indicators of dairy cow energy status in early lactation. *Journal of Dairy Science* **102**:7904-7916.
- Mashek DG, Grummer RR. 2003. Effects of long chain fatty acids on lipid and glucose metabolism in monolayer cultures of bovine hepatocytes. *Journal of Dairy Science* **86**:2390-2396.
- Masson LL. 2004. On-line metabolic profiling in dairy cows [PhD Thesis]. University of Nottingham, Nottingham.
- McArt JAA, Nydam DV, Oetzel GR. 2012. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **95**:5056-5066.

- McArt JAA, Nydam DV, Oetzel GR, Overton TR, Ospina PA. 2013. Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *Veterinary Journal* **198**:560-570.
- Melendez P, Pinedo P, Bastias J, Paz Marin M, Rios C, Bustamante C, Adaro N, Duchens M. 2016. The association between serum β -hydroxybutyrate and milk fatty acid profile with special emphasis on conjugated linoleic acid in postpartum Holstein cows. *BMC Veterinary Research* **12**:50-55.
- Miller N, Delbecchi L, Petitclerc D, Wagner GF, Talbot BG, Lacasse P. 2006. Effect of stage of lactation and parity on mammary gland cell renewal. *Journal of Dairy Science* **89**:4669-4677.
- Moallem U, Katz M, Lehrer H, Livshitz L, Yakoby S. 2007. Role of peripartum dietary propylene glycol or protected fats on metabolism and early postpartum ovarian follicles. *Journal of Dairy Science* **90**:1243-1254.
- Moate PJ, Chalupa W, Boston RC, Lean IL. 2007. Milk fatty acids. I. Variation in the concentration of individual fatty acids in bovine milk. *Journal of Dairy Science* **90**:4730-4739.
- Moore CE, Kay JK, Collier RJ, VanBaale MJ, Baumgard LH. 2005. Effect of supplemental conjugated linoleic acids on heat-stressed Brown Swiss and Holstein cows. *Journal of Dairy Science* **88**:1732-1740.
- Morales MS, Palmquist DL, Weiss WP. 2000. Milk fat composition of Holstein and Jersey cows with control or depleted copper status and fed whole soybeans or tallow. *Journal of Dairy Science* **83**:2112-2119.
- Mulligan FJ, O'Grady L, Rice DA, Doherty ML. 2006. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. *Animal Reproduction Science* **96**:331-353.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. 2002. *Harperova Biochemie*. H&H, Jinočany.
- Nielsen NI, Ingvarsen KL. 2004. Propylene glycol for dairy cows: a review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Animal Feed Science and Technology* **115**:191-213.
- Oetzel GR. 2004. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* **20**:651-674.

- Opsomer G, Gröhn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, De Kriuf A. 2000. Risk factors for post-partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* **53**:841-857.
- Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. 2010. Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science* **93**:1596-1603.
- Overton TR, Waldron MR. 2004. Nutritional Management of Transition Dairy Cows: Strategies to Optimize Metabolic Health. *Journal of Dairy Science* **87**(Supplement):E105-E119.
- Patton J, Kenny DA, McNamara S, Mee JF, O'Mara FP, Diskin MG, Murphy JJ. 2007. Relationships among milk production, energy balance, plasma analytes, and reproduction in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science* **90**:649-658.
- Palmquist DL, Beaulieu AD, Barbano DM. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science* **76**:1753-1771.
- Pethick DW. 1991. Comparative aspects of fuel supply during exercise. Pages 197-204 in *Proceedings of the Nutrition Society of Australia*, Canberra.
- Pickett MM, Piepenbring MS, Overton TR. 2003. Effect of propylene glycol or fat drench on plasma metabolites, liver composition, and production of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* **86**:2113-2121.
- Piccione G, Caola G, Giannetto C, Grasso F, CalanniRunzo S, Zumbo A, Pennisi P. 2009. Selected biochemical serum parameters in ewes during pregnancy, post-parturition, lactation and dry period. *Animal Science Papers and Reports* **27**:321-330.
- Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN, McBride BW. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *The Veterinary Journal* **176**:21-31.
- Poncheki JK, Schultz Canha ML, Viechnieski SL, De Aimeida R. 2015. Analysis of daily body weight of dairy cows in early lactation and associations with productive and reproductive performance. *Revista Brasileira de Zootecnia* **44**:187-192.
- Puppel K, Kuczyńska B. 2016. Metabolic profiles of cow's blood: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **96**:4321-4328.
- Puppel K, Solarczyk P, Kuczyńska B, Madras-Majewska B. 2017. Oleic acid as a biomarker for early diagnosis of elevated blood level of non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyric acid in the early stages of lactation in high-yielding Polish Holstein cows. *Animal Science Papers and Reports* **35**:387-396.

- Pysera B, Opalka A. 2000. The effect of gestation of dairy cows on lipid and lipoprotein patterns and composition in serum during winter and summer feeding. *Journal Animal Feed Science* **9**:411-424.
- Quiroz-Rocha GF, LeBlanc SJ, Duffield TF, Wood D, Leslie KE, Jacobs RM. 2009. Reference limits for biochemical and haematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition. *The Canadian Veterinary Journal* **50**:383-388.
- Reist M, et al. 2003. Postpartum reproductive function: association with energy, metabolic and endocrine status in high yielding dairy cows. *Theriogenology* **59**:1707-1723.
- Remppis S, Steingass H, Gruber L, Schenkel H. 2011. Effects of energy intake on performance, mobilization and retention of body tissue, and metabolic parameters in dairy cows with special regard to effects of pre-partum nutrition on lactation. A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **24**:540-572.
- Renaud DL, Kelton DF, Duffield TF. 2019. Short communication: Validation of a test-day milk test for β -hydroxybutyrate for identifying cows with hyperketonemia. *Journal of Dairy Science* **102**:1589-1593.
- Reus AM, Mansfeld R. 2020. Predicting metabolic health status using milk fatty acid concentrations in cows – a review. *Milk Science International* **73**:7-15.
- Roche JR, Bell AW, Overton TR, Looor JJ. 2013. Nutritional management of the transition cow in the 21st century – a paradigm shift in thinking. *Animal Production Science* **53**:1000-1023.
- Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ, Berry DP. 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science* **92**:5769-5801.
- Rodriguez-Cruz M, Tovar AR, Palacios-González B, Del Prado M, Torres N. 2006. Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in lactating mammary gland: role of $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturases, SREBP-1, PPAR α , and PGC-1. *Journal of Lipid Research* **47**:553-560.
- Sakaguchi M. 2009. Differences between body condition scores and body weight changes in postpartum dairy cows in relation to parity and reproductive indices. *The Canadian Veterinary Journal* **50**:649-653.
- Samarütel J, Waldmann A, Ling K, Jaakson H, Kaart T, Leesmäe A, Kärt O. 2008. Relationships between luteal activity, fertility, blood metabolites and body condition score in multiparous Estonian Holstein dairy cows under different management. *Journal of Dairy Research* **75**:485-490.

- Samková E, Špička J, Pešek M, Pelikánová T, Hanuš O. 2012. Animal factor affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *South African Journal of Animal Science* **42**:83-100.
- Santolaria P, López-Gatius F, Sánchez-Nadal JA, Yániz J. 2012. Relationships between body weight and milk yield during the early postpartum period and bull and technician and the reproductive performance of high producing dairy cows. *Journal of Reproduction and Development* **58**:366-370.
- Santos JEP, Rutigliano HM, Sá Filho MF. 2009. Risk factors for resumption of postpartum oestrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* **110**:207-221.
- Sato H, Inoue A. 2006. Decrease in stearic acid proportions in adipose tissues and liver lipids in fatty liver of dairy cows. *Animal Science Journal* **77**:347-351.
- Schennink A, Heck JML, Bovenhuis H, Visker MHPW, Van Valenberg HJF, Van Arendonk JAM. 2008. Milk fatty acid unsaturation: Genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1). *Journal of Dairy Science* **91**:2135-2143.
- Schröder UJ, Staufenbiel R. 2006. Invited Review: Methods to determine body fat reserves in the dairy cow with special regard to ultrasonographic measurement of backfat thickness. *Journal of Dairy Science* **89**:1-14.
- Schroeder GF, Gagliostro GA, Bargo F, Delahoy JE, Muller LD. 2004. Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: A review. *Livestock Production Science* **86**:1-18.
- Secchiari P, Mele M, Serra A, Buccioni A, Paoletti F, Antongiovanni M. 2003. Effect of breed, parity and stage of lactation on milk conjugated linoleic acid content in Italian Friesian and Reggiana cows. *Italian Journal of Animal Science* **2**:269-271.
- Sejersen H, Sørensen MT, Larsen T, Bendixen E, Ingvarsen KL. 2012. Liver protein expression in dairy cows with high liver triglycerides in early lactation. *Journal of dairy science* **95**:2409-2421.
- Shingfield KJ, Salo-Väänänen P, Pahkala E, Toivonen V, Jaakkola S, Piironen V, Huhtanen P. 2005. Effect of forage conservation method, concentrate level and propylene glycol on the fatty acid composition and vitamin content of cows' milk. *Journal of Dairy Research* **72**:349-361.

- Smith SB, Lunt DK, Chung KY, Choi CB, Tume RK, Zembayashi M. 2006. Adiposity, fatty acid composition, and delta-9 desaturase activity during growth in beef cattle. *Animal Science Journal* **77**:478-486.
- Soyeurt H, Dardenne P, Gillon A, Croquet C, Vanderick S, Mayeres P, Bertozzi C, Gengler N. 2006. Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds. *Journal of Dairy Science* **89**:4858-4865.
- Soyeurt H, Dehareng F, Mayeres P, Bertozzi C, Gengler N. 2008. Variation of Delta(9)-desaturase activity in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **91**:3211-3224.
- Stoop WM, Bovenhuis H, Heck JML, Van Arendonk JAM. 2009. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science* **92**:1469-1478.
- Stoop WM, Van Arendonk JAM, Heck JML, Van Valenberg HJF, Bovenhuis H. 2008. Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science* **91**:385-394.
- Studer VA, Grummer RR, Bertics SJ. 1993. Effect of prepartum propylene glycol administration on periparturient fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **76**:2931-2939.
- Sun F, Cao Y, Cai C, Li S, Yu C, Yao J. 2016. Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. *PLoS ONE* (e0160659) DOI: [10.1371/journal.pone.0160659](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160659).
- Suthar VS, Canelas-Raposo J, Deniz A, Heuwieser W. 2013. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *Journal of Dairy Science* **96**:2925-2938.
- Tyburczy C, Lock AL, Dwyer DA, Destailats F, Mouloungui Z, Candy L, Bauman DE. 2008. Uptake and utilization of *trans* octadecenoic acids in lactating cows. *Journal of Dairy Science* **91**:3850-3861.
- Urdl M, Gruber L, Obritzhauser W, Schauer A. 2015. Metabolic parameters and their relationship to energy balance in multiparous Simmental, Brown Swiss and Holstein cows in the periparturient period as influenced by energy supply pre- and post-calving. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **99**:174-189.
- Van Der Drift SGA, Jorritsma R, Schonewille JT, Knijn HM, Stegeman JA. 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**:4886-4898.

- Van Gastelen S, Antunes-Fernandes EC, Hettinga KA, Klop G, Alferink SJJ, Hendriks WH, Dijkstra J. 2015. Enteric methane production, rumen volatile fatty acid concentrations, and milk fatty acid composition in lactating Holstein-Friesian cows fed grass silage or corn silage-based diets. *Journal of Dairy Science* **98**:1915-1927.
- Van Saun RJ. 2016. Indicators of dairy cow transition risks: metabolic profiling revisited. *Tierärztliche Praxis Großtiere* **44**:118-126.
- Vlaeminck B, Fievez V, Cabrita A, Fonseca A, Dewhurst RJ. 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Animal Feed Science and Technology* **131**:389-417.
- Walsh RB, Walton JS, Kelton DR, LeBlanc SJ, Leslie KE, Duffield TF. 2007. The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science* **90**:2788-2796.
- Wankhade PR, Manimaran A, Kumaresan A, Jeyakumar S, Ramesha KP, Sejian V, Rajedran D, Varghese MR. 2017. Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review. *Veterinary World* **10**:1367-1377.
- Weber C, et al. 2013. Variation in fat mobilization during early lactation differently affects feed intake, body condition, and lipid and glucose metabolism in high-yielding dairy cows. *Journal of Dairy Science* **96**:165-180.
- White SL, Bertrand JA, Wade MR, Washburn SP, Green Jr. JT, Jenkins TC. 2001. Comparison of fatty acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pasture or total mixed ration. *Journal of Dairy Science* **84**:2295-2301.
- Xu W, Vervoort J, Saccenti E, Kemp B, Van Hoeij RJ, Van Knegsel ATM. 2020. Relationship between energy balance and metabolic profiles in plasma and milk of dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science* **103**:4795-4805.

SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Metabolismus NEFA (eClinPath, online textbook of Veterinary Clinical Pathology 2021)	3
Obrázek 2: Kompletní oxidace mastných kyselin (Bioinfo 2021)	4
Obrázek 3: Syntéza a sekrece lipidů v mléčné žláze přežvýkavců (Leroux et al. 2003).....	13
Obrázek 4: Odběr krevních vzorků do zkumavek pro krevní sérum.....	26
Obrázek 5: Separované krevní sérum v mikrozkušavkách připravené pro laboratorní analýzu	26
Obrázek 6: Odběr vzorků mléka.....	27
Obrázek 7: Vzorkovnice s konzervační tabletou a vzorkem mléka	28
Obrázek 8: Vývoj mléčné užitkovosti, obsahu základních složek mléka a ketolátek ($\bar{x} \pm SE$) u dojnic holštýnského (H) a českého strakatého (C) plemene v prvních 8 týdnech laktace	35
Obrázek 9: Vývoj koncentrací vybraných parametrů energetického profilu ($\bar{x} \pm 95\%$ interval spolehlivosti) v séru dojnic holštýnského (H) a českého strakatého (C) plemene v období od 2 týdnů před porodem do 8 týdnů laktace.....	39
Obrázek 10: Vývoj koncentrací skupin mastných kyselin podle délky uhlíkového řetězce v mléčném tuku ($\bar{x} \pm SE$) u dojnic holštýnského (H) a českého strakatého (C) plemene v prvních 8 týdnech laktace.....	42
Obrázek 11: Vývoj obsahu nenasycených mastných kyselin v mléčném tuku ($\bar{x} \pm SE$) u dojnic holštýnského (H) a českého strakatého (C) plemene v prvních 8 týdnech laktace	43
Obrázek 12: Vývoj obsahu jednotlivých mastných kyselin v mléčném tuku ($\bar{x} \pm SE$) u dojnic holštýnského (H) a českého strakatého (C) plemene v prvních 8 týdnech laktace	44
Obrázek 13: Vývoj mléčné užitkovosti, obsahu základních složek mléka a ketolátek ($\bar{x} \pm SE$) v prvních 8 týdnech laktace u tří skupin dojnic (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech laktace.....	49
Obrázek 14: Vývoj vybraných parametrů energetického profilu v séru ($\bar{x} \pm 95\%$ intervaly spolehlivosti) v období 2 týdnů před a 8 týdnů po otelení u tří skupin dojnic (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech po otelení	51
Obrázek 15: Vývoj obsahu skupin mastných kyselin podle délky uhlíkového řetězce v mléčném tuku ($\bar{x} \pm SE$) v prvních 8 týdnech laktace u tří skupin dojnic (NEB0, NEB1,	

NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech laktace	55
Obrázek 16: Vývoj obsahu nenasycených mastných kyselin v mléčném tuku ($\bar{x} \pm SE$) v prvních 8 týdnech laktace u tří skupin dojnic (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech laktace.....	56
Obrázek 17: Vývoj obsahu jednotlivých mastných kyselin v mléčném tuku ($\bar{x} \pm SE$) v prvních 8 týdnech laktace u tří skupin dojnic (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech laktace.....	57
Obrázek 18: Pearsonovy korelační koeficienty ($P < 0,0001$) vybraných mastných kyselin mléčného tuku se sérovými koncentracemi NEFA v jednotlivých skupinách dojnic (NEB0, NEB1, NEB2) vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech po otelení.....	61
Tabulka 1: Průměrná mléčná užitkovost a obsah mléčných složek základního stáda během experimentálního období.....	24
Tabulka 2: Složení krmné směsi pro dojnice v různé fázi laktace	25
Tabulka 3: Počet a pořadí laktace krav zahrnutých do experimentu.....	25
Tabulka 4: LSM vybraných sérových parametrů energetického profilu holštýnského (H) a českého strakatého (C) plemene v období 2 týdnů před a 8 týdnů po otelení	45
Tabulka 5: LSM mléčné užitkovosti a vybraných složek mléka holštýnského (H) a českého strakatého (C) plemene v období prvních 8 týdnů laktace.....	46
Tabulka 6: LSM vybraných sérových parametrů energetického profilu v období 2 týdnů před a 8 týdnů po otelení u tří skupin dojnic (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech laktace.....	58
Tabulka 7: LSM vybraných parametrů mléčné užitkovosti a složení mléka v prvních 8 týdnech laktace u tří skupin dojnic (NEB0, NEB1, NEB2) obou plemen vytvořených podle úrovně NEFA v krvi v prvních 2 týdnech laktace.....	59
Tabulka 8: Výsledky analýzy kovariance a koeficienty determinace (R^2) koncentrace sérových NEFA s lineární regresí	63

SEZNAM AUTOROVÝCH PUBLIKACÍ

Vědecké publikace s IF

Štolcová M, Řehák D, Bartoň L, Rajmon R. 2020. Blood biochemical parameters measured during the periparturient period in cows of Holstein and Fleckvieh breeds differing in production purpose. *Czech Journal of Animal Science* **65**:172-181.

Mikešová K, Zita L, Chmelíková E, Hůlková M, Rajmon R. 2014. The Effect of Evening Primrose Oil on Biochemical Parameters of Thorough bred Horses under Maximal Training Conditions. *Czech Journal of Animal Science* **59**:488-493.

Recenzované vědecké publikace

Sloup V, Jankovská I, Langrová I, Štolcová M, Sloup S, Nechybová S, Peřínková P. 2016. Changes of Some Biochemical Parameters in Rats Supplemented with High Doses of Zinc Lactate. *Scientia Agriculturae Bohemica* **47**:148-153.

Odborné recenzované publikace

Štolcová M, Řehák D, Bartoň L. 2020. Mastné kyseliny mléčného tuku jako potenciální biomarkery negativní energetické balance dojnic v časně laktaci. *Mlékařské listy* **31**:8-11.

Štolcová M, Bartoň L, Řehák D. 2019. Význam a interpretace nepřímých indikátorů NEB dojnic. *Náš chov* **79**:44-47.

Härtlová H, Mikešová K, Chmelíková E, Hůlková M, Rajmon R, Hučko B. 2014. Vliv pupalkového oleje na vnitřní prostředí organismu dostihových koní. *Veterinářství* **64**:708-713.

Ostatní publikace

Štolcová M, Bartoň L, Řehák D. 2019. Výběr systému monitorujícího aktivitu a přežvykování krav. *Náš chov* **79**:8-9.

Štolcová M. 2016. Precizní zemědělství v chovech dojeného skotu. *Náš chov* **76**: 28-29.

Lázničková I, Fedorová T, Štolcová M, Kubátová A. 2020. Urinary reproductive hormones influence seed germination within diluted urine of heifers: alternative pregnancy diagnostic method. *Journal of Animal & Plant Sciences* **46**:8090-8099.