

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Kvalita embryí ve vztahu k energetické bilanci dojnic

Diplomová práce

Bc. Nicola Kučerová

Chov hospodářských zvířat

doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Kvalita embryí ve vztahu k energetické bilanci dojnic" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Luďkovi Stádníkovi, Ph.D. a Ing. Jaromíru Ducháčkovi, Ph.D. za odborné vedení, poskytnuté konzultace a pomoc při zpracování diplomové práce.

Kvalita embryí ve vztahu k energetické bilanci dojníc

Souhrn

Pouze zdravá kráva v dobré tělesné kondici s odpovídající energetickou bilancí a vyváženým metabolickým stavem je schopna poskytovat zdravá a přenosuschopná embrya. Diplomová práce zkoumá vliv energetické bilance na množství a kvalitu embryí při výplachu. Ze stáda dojníc byla vybrána skupina 59 holštýnských krav, které byly na 1. až 5. laktaci, s počtem dnů v laktaci od 32 do 123 dnů a hodnotou BCS v intervalu 2–5. Dojnice byly krmeny a dojeny dvakrát denně. Před zahájením pokusu byly všechny dojnice sonograficky vyšetřeny. Při pozitivní indikaci CL jim byl injekčně podán analog PGF2 α . Superovulace proběhla 13. – 16. den cyklu, aplikací FSH 2x denně, po dobu 4 dnů. Opakovaná dávka analogu PGF2 α byla podána 15. den od zahájení superovulace. Po zjištění estru proběhly 3 inseminace po 12 hodinách stejným inseminačním technikem. Výplach byl proveden 7. den od první inseminace. U embryí byla hodnocena morfologie a kvalita dle metodiky IETS. V experimentu byl sledován nádoj, obsah tuku a bílkovin v mléce a stanoven poměr tuku a bílkovin (FPR) 25 a 11 dní před výplachem a 3 dny po výplachu. Vyhodnocení bylo provedeno statistickým programem SAS 9.3. Modelová rovnice byla sestavena pro pořadí laktace, skupinu velikosti vaječníků, FPR 11 dnů před výplachem (FPR2), dny v mléce a nádoj. Vyhodnocení modelu proběhlo metodou GLM – LSM. Vzájemné korelace mezi sledovanými parametry byly stanoveny metodou CORR.

Modelová rovnice byla průkazná pro hodnocení počtu corpus luteum na pravém vaječniku (CLPv) ($r^2 = 0,569$; $P < 0,001$) a pro hodnocení corpus luteum na levém vaječniku (CLLv) ($r^2 = 0,651$; $P < 0,001$). V rámci modelové rovnice byl k CLPv a CLLv průkazný efekt skupiny velikosti vaječníků ($P < 0,001$). Pro celkový počet získaných a přenosuschopných embryí byla modelová rovnice průkazná ($r^2 = 0,600$; $r^2 = 0,558$; $P < 0,001$). K celkovému počtu embryí byla průkaznost potvrzena pro efekty skupiny velikosti vaječníků, FPR2 a DIM ($P < 0,05$). Pro počet přenosuschopných embryí byla potvrzena průkaznost pro vlivy skupiny velikosti vaječníků a DIM ($P < 0,05$).

Vliv pořadí laktace nebyl tak významný, ale lze pozorovat určitý trend, který ukazuje, že dojnice v průběhu vyšších laktací byly vhodnějšími kandidátkami pro získávání embryí. Vyšší celkové množství embryí bylo získáno u dojníc na 2., 3. a další laktaci (4,67; 4,55) v porovnání s prvotelkami (3,27), podobné rozdíly byly pozorovány u celkového počtu přenosuschopných embryí.

Efekt poměru tuku k bílkovinám v mléce 11 dní před výplachem byl k celkovému počtu získaných a přenosuschopných embryí průkazný. Celkové množství vypláchnutých a přenosuschopných embryí bylo získáno průkazně více při poměru tuku k proteinu od 1,1 do 1,3 (5,74; 3,66), než při poměru nad 1,3 (2,84; 1,69) ($P < 0,05$).

Vliv skupiny velikosti vaječníků se také ukázal jako významný ve vztahu k počtu získaných a přenosuschopných embryí. Celkový počet vypláchnutých embryí byl prokazatelně vyšší u velkých vaječníků (6,83) ve srovnání s malými (1,88) ($P < 0,001$) a dále byl prokazatelně vyšší počet embryí ve skupině velkých ovarii oproti skupině středních ovarii (3,77) ($P < 0,05$).

V mé práci byl potvrzen prokazatelný vliv stavu energetické bilance vyjádřený poměrem FPR k celkovému množství získaných a přenosuschopných embryí. Dojnice s vyváženou energetickou bilancí a odpovídajícím metabolickým stavem reprezentovaným FPR 1,1 – 1,3 produkovaly nejvyšší počet vypláchnutých a přenosuschopných embryí.

Klíčová slova: zárodek, dojený skot, negativní energetická bilance, výplach embryí, embryotransfer, kvalita embryí

Quality of embryos in relation to the energy balance of dairy cows

Summary

Only a healthy cow in good physical condition with an adequate energy balance and metabolic state is able to provide healthy and transferable embryos. The diploma thesis examines the effect of energy balance on the quantity and quality of embryos during flushing. A group of 59 Holstein cows were selected from a herd of dairy cows, which were in the 1.–5. parity, with days in milk from 32 to 123 days and a BCS value in the range of 2–5. The dairy cows were fed and milked twice a day. All dairy cows were examined sonographically before the start of the experiment. At the positive indication of CL, they were given the analog PGF2 α . Superovulation took place on days 13–16 of the cycle, FSH application twice a day, for 4 days. A repeated dose of PGF2 α analogue was administered on day 15 from the start of superovulation. After finding the ester, 3 inseminations were performed after 12 hours by the same insemination technician. Flushing was performed on day 7 after the first insemination. The morphology and quality of the embryos were evaluated according to the IETS methodology. The experiment was monitored for milk, fat and protein content in milk and fat / protein ratio (FPR) 25 and 11 days before flushing and 3 days after flushing. The evaluation was performed by the statistical program SAS 9.3. The model equation was compiled for lactation order, ovarian size group, FPR 11 days before flushing (FPR2), days in milk and milking. The model was evaluated using the GLM – LSM method. Mutual correlations between the monitored parameters were determined by the CORR method. The model equation was conclusive for the evaluation of the number of corpus luteum on the right ovary (CLR_v) ($r^2 = 0.569$; $P < 0.001$) and for the evaluation of the corpus luteum on the left ovary (CLL_v) ($r^2 = 0.651$; $P < 0.001$). Within the model equations, the ovarian size group had a demonstrable effect on CLR_v and CLL_v ($P < 0.001$). The model equation was conclusive for the total number of obtained and transferred embryos ($r^2 = 0.600$; $r^2 = 0.558$; $P < 0.001$). For the total number of embryos, evidence was confirmed for the ovarian size group, FPR2 and DIM effects ($P < 0.05$). For the number of transferable embryos, evidence for the effects of ovarian size group and DIM ($P < 0.05$) was confirmed.

The influence of lactation order was not so significant, but a certain trend can be observed, which shows that dairy cows in higher parity were more suitable candidates for embryo collection. A higher total number of embryos was obtained in dairy cows at the 2nd, 3rd and next lactation (4.67; 4.55) compared to primiparous (3.27), similar differences were observed in the total number of transferable embryos. The effect of fat to protein ratio in the milk 11 days before flushing was conclusive for the total number of embryos obtained and transferred. The total number of flushed and transferable embryos was demonstrated more at a fat to protein ratio of 1.1 to 1.3 (5.74; 3.66) than at a ratio above 1.3 (2.84; 1.69) ($P < 0.05$).

The influence of the ovarian size group also proved to be significant in relation to the number of embryos obtained and transferable. The total number of flushed embryos was demonstrably higher in large ovaries (6.83) compared to small (1.88) ($P < 0.001$) and the number of embryos in the large ovary group was demonstrably higher compared to the middle ovarian group (3.77) ($P < 0.05$).

In my work, the demonstrable influence of the state of energy balance expressed by the ratio of FPR to the total number of obtained and transferable embryos was confirmed. Dairy cows with a balanced energy balance and a corresponding metabolic status represented by FPR 1.1 – 1.3 produced the highest number of flushed and transferable embryos.

Keywords: embryo, dairy cattle, negative energy balance, embryo flushing, embryo transfer, embryo quality

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Holštýnské plemeno	10
3.2	Výživa a krmení	12
3.3	Negativní energetická bilance (NEB)	14
3.3.1	Hormony a krevní metabolity podílející se na NEB	15
3.3.2	Postupy řízení chovu zmírňující průběh NEB	21
3.3.2.1	Zkrácení suchostojného období	21
3.3.2.2	Modifikace krmné dávky	22
3.3.2.3	Přídavek jadrných krmiv	23
3.3.2.4	Přídavek tuku	23
3.3.2.5	Vysokovláknitá krmná dávka	24
3.4	Zdravotní stav	25
3.4.1	Reprodukční poruchy	26
3.4.2	Metabolické poruchy	26
3.5	Metody stanovení EB	28
3.5.1	Body condition score (BCS)	28
3.5.2	Poměr tuku a bílkovin v mléce (FPR)	31
3.6	Embryotransfer	31
3.7	Hodnocení vývoje a kvality embryí	33
4	Materiály a metody	36
4.1	Popis ustájení a podmínek prostředí	36
4.2	Sběr dat	36
4.3	Statistické vyhodnocení	37
5	Výsledky	38
6	Diskuze	46
7	Závěr	49
8	Seznam zkratk	50
9	Literatura	51
10	Samostatné přílohy	58

1 Úvod

Mléčná produkce dojnic se za posledních pět desetiletí zvýšila a však byla doprovázeno celosvětovým poklesem plodnosti skotu (Walsh et al. 2011, Farman et al. 2016).

Plodnost je multifaktoriální vlastnost a její zhoršování je způsobeno sítí genetických, environmentálních a manažerských faktorů a jejich složité interakce ztěžují určení přesné příčiny tohoto poklesu (Walsh et al. 2011).

U subfertilních dojnic lze z velké části rozpoznat dva hlavní reprodukční problémy. Za prvé, až 50 % moderních dojnic vykazuje po porodu abnormální estrální cykly, sníženou expresi říje či tvorbu cyst, což vede k opoždění první ovulace, zvýšení počtu inseminací na zabřeznutí a prodlouženému mezidobí. Druhým problémem je neuspokojivá míra zabřezávání a stále se zvyšující výskyt rané embryonální mortality. U optimálně načasovaných umělých inseminací současných dojnic dojde ve více než 90 % k oplodnění oocyty, ale do dvou týdnů po inseminaci dochází u 40 % oplodněných samic k časné embryonální odúmrti. To pravděpodobně z důvodu snížené kvality oocytů a embryí v průběhu rané fázi jejich vývoje. Ztráty embryí v další fázi vývoje, tedy po 28. dni od inseminace mohou dosahovat více než 20 %, také v pozdějším období březosti může docházet až k 5 % abortů (Leroy et al. 2012).

Zlepšení plodnosti dojnic je tedy jednou z největších výzev reprodukčních biologů, odborníků na výživu a genetiků lépe porozumět základní biologii dojnic, která přispívá k nízké plodnosti, jak na úrovni zvířat, jejich orgánů, tak na úrovni buněčných struktur v kritických časových bodech produktivního života, a vyvinout strategie ke zlepšení plodnosti (Walsh et al. 2011).

V posledních letech se v rámci selekčních indexů holštýnsko-fríského skotu začal klást důraz na znaky spojené se zlepšením zdraví a plodnosti dojnic. Nyní existují důkazy, že historický pokles plodnosti dosáhl nejnižší hodnoty a začal se zlepšovat (Walsh et al. 2011).

Primárním faktorem, který brání dobré plodnosti, je rozsah negativní energetické bilance časné po porodu, který může oddálit dobu do první ovulace, obnovení ovariální aktivity prostřednictvím účinků na funkci osy hypotalamus–hypofýza–vaječníky a zhoršit kvalitu a životaschopnost oocytů (Drackley & Cardoso 2014).

Zvláště během prvních 14 dnů laktace je průběh a hloubka negativní energetická bilance rozhodující pro pozdější reprodukční výkonnost, protože právě v tomto období jsou dojnice nejnáchylnější ke zdravotním problémům (Drackley & Cardoso 2014).

Proto by budoucí strategie ke zlepšení fertility se zaměřením na časné poporodní období měly být založeny na minimalizaci trvání a stupně negativní energetické bilance (Walsh et al. 2011).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem diplomové práce bylo vyhodnotit vztah mezi vybranými indikátory energetické bilance dojnic po porodu a kvalitou jejich embryí při výplachu, resp. embryotransferu. Hypotézou byl předpoklad, že vyšší úroveň negativní energetické bilance snižuje počet vypláchnutých, resp. přenosuschopných embryí.

3 Literární rešerše

3.1 Holštýnské plemeno

V roce 2020 se v České republice chovalo celkem 1 417 795 ks skotu. Z toho bylo 359 476 krav dojených plemen. V kontrole užítkovosti bylo zapojeno v roce 2020/2021 96,5 % dojených krav, tedy 347 075 ks dojnic. V současnosti v České republice tvoří holštýnský skot včetně kříženek největší plemennou skupinu dojného skotu. Postupně se zvyšující zastoupení holštýnského skotu mezi dojenými plemeny v roce 2020/2021 dosáhlo 60,4 %, tedy 209 658 holštýnských krav v KU. Holštýnský skot patří do skupiny nížinných plemen a je nejrozšířenějším kulturním plemenem na světě. Jedná se o nejvýznamnější dojené plemeno skotu s jednostranným zaměřením na mléčnou produkci. Je známé také pod názvem holštýnsko-fríský či černostrakatý skot (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. 2020).

Plemeno holštýn vzniklo v Evropě na místě dnešního Nizozemska, konkrétněji ve dvou severních provinciích – Severní Holandsko a Friesland (Global Ag Network 2000).

Plemeno se postupně vyvíjelo v období od 17. – 19. století. Plemenná kniha byla nejdříve založena v Holandsku v roce 1874, následně v Německu roku 1876 a později v Dánsku v roce 1881. Po založení plemenných knih následovalo v Evropě zavedení kontroly užítkovosti, hodnocení exteriéru a později také kontrola dědičnosti (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. 2020).

Do této doby bylo plemeno šlechtěno na dobrou mléčnou produkci s vysokým obsahem mléčných složek a na střední tělesný rámec s přiměřeným osvalením (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. 2020).

Do Severní Ameriky se holštýnský skot dostal s příchodem osadníků. Při selekci zvířat do plemnitby byla upřednostňována zvířata většího tělesného rámce s vynikající mléčnou užítkovostí. V USA v roce 1885 bylo toto plemeno zapsáno do plemenné knihy pod názvem holštýnsko-fríský skot (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. 2020).

Holštýn je skot velkého tělesného rámce s černobíle strakatou srstí (Global Ag Network 2000), nejčastěji má černě zbarvenou hlavu s bílou lysinou či hvězdou. Ačkoliv v případě homozygotně recesivní sestavy alel má holštýnský skot červenobílé zbarvení a nazývá se red holštýn (Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. 2020).

Průměrná živá hmotnost samic je 675 kg s kohoutkovou výškou cca 147 cm. Do chovu jsou zařazovány ve věku 15 měsíců, vhodná doba prvního telení u tohoto plemene je v rozmezí 24 až 27 měsíců věku. Standartní délka produkčního věku holštýnské dojnice je 6 let. Holštýnky dosahují nejvyšší produkce mléka na světě. Genetický pokrok v produkci mléka o 1 až 2 % ročně je zcela realistický. Vzhledem k vysoké produkci mléka holštýnských dojnic má jejich mléko nízký obsah tuku a tukuprosté sušiny. Další schopností tohoto plemene je přizpůsobení se všem systémům řízení, od jednoduchých zemědělských systémů až po chov dojnic v intenzivním zemědělství. Holštýn však ve srovnání s primitivními plemeny nejsou v náročných agroekologických oblastech tak odolné vůči vysokým teplotám a chorobám (Global Ag Network 2000).

Tabulka 1 Parametry holštýnského skotu v ČR 2019/2020

Tělesný rámec	velký
Výška krav v kříži v dospělosti	151–155 cm
Hmotnost krav v dospělosti	680–720 kg
Věk při I. otelení	23–27 měsíců
Mezidobí	400 dní
Průměrná užitkovost v ČR	10 226 kg
Průměrný obsah tuku v mléce	3,9 %
Průměrný obsah bílkovin v mléce	3,41 %

(Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. 2020)

Tabulka 2 Reprodukční ukazatele u holštýnského skotu

ukazatel	krávy		jalovice	
	optimum	ČR 2020	optimum	ČR 2020
Věk při 1. zapuštění (měsíce)			13–15 m 380–420 kg	
Věk při 1. zabřeznutí			13–16 m	
Průměrný věk otelení			24–25 m 560–580 kg	
Servis perioda	85–95 dní	120 dní		
Mezidobí	380 dní	400 dní		
Inseminační interval	61–75 dní	74 dní		
Inseminační index (bez RE)	<1,8	2,2	<1,3	1,6
Inseminační index s RE	<1,9			
% připouštěných do 100. dne	>95 %			
% březosti po 1. inseminaci	>45 %	37,7 %	>60 %	59,0 % *
% zabřezávání po všech ins.	>40 %	37,8 %	>60 %	58,8 %
% vyhledaných říjí	>80 %			
Průměrný lakrační den stáda	170 dní			

* Z důvodu vysokého použití sexovaných inseminačních dávek, kleslo procento březosti po 1. inseminaci u jalovic pod 60 %. A to, protože při využívání konvenčních inseminačních dávek je procento březosti po 1. inseminaci o 10–15 % vyšší (Burdych et al. 2021).

I když v posledních desetiletích došlo u dojníc k dramatickému zvýšení produkce mléka v důsledku genetické selekce a zlepšeného managementu stád, jejich plodnost se snížila. Laktační cyklus je závislý na schopnosti krávy zabřeznout, protože hormony uvolňované během březosti a po ní jsou nezbytné pro vývoj mléčné žlázy a zvýšení produkce mléka.

Nedostatečný příjem energie a nedostatečné tělesné zásoby během rané laktace jsou hlavními faktory ovlivňujícími reprodukční výkonnost dojnic. Metabolické změny u dojnic v období porodu spojené s nástupem NEB se zdají být nejvíce odpovědné za koordinované škodlivé účinky na metabolické zdraví a reprodukční výkonnost. NEB během rané laktace souvisí se snižujícím se příjmem krmiva před porodem a poskytuje hlavní nutriční vazbu na nízkou plodnost u laktujících dojnic (Nigussie 2018).

Selekce zaměřená pouze na zvýšení užitkovosti dojnic měla za následek zhoršení plodnosti a parametrů reprodukce většiny stád. Postupně se zvyšující stupeň inbreedingu je dalším faktorem souvisejícím se zhoršováním reprodukce. Dalším důvodem je rozšíření embryotransferu a vyšší využití moderních léčiv, které umožní udržet ve stádě i dojnice s problematickým zabřezáváním a umožnit jejich následné otelení. Tím se postupem času kumulovala frekvence nežádoucích genů v populacích holštýnských dojnic, která generovala všeobecný pokles reprodukce stád do té míry, že negativně ovlivnila jejich dlouhověkost. Poruchy reprodukce jsou stále jednou z nejčastějších příčin vyřazení dojnic z chovu (Motyčka et al. 2005).

Šlechtitelské programy na počátku toto století začaly postupně zahrnovat znaky plodnosti (např. mezidobí), dlouhověkosti a zdraví jako součást selekčních metod. Zahrnutí těchto vlastností posloužilo ke zvrácení některých dřívějších trendů, které vedly ke snížení plodnosti. V posledních 15 letech se trendy jak v dlouhověkosti, tak v plodnosti zlepšily (Crowe et al. 2018).

Projekt „Genotype plus Environment“ (Gpluse) financovaný EU má mezi svými mnoha cíli identifikaci nových fenotypů vlastností mléka, které lze použít jako prediktory obtížně měřitelných, vlastností plodnosti jako je míra početí a zdraví dělohy. Tento projekt si klade za cíl, mimo jiné, najít nové vlastnosti mléka, které korelují a predikují vlastnosti zdraví a plodnosti u dojnic (www.gpluse.eu) (Crowe et al. 2018).

Takové biomarkery, které by bylo snadné měřit v mléce, by umožnily chovatelům skotu vybírat krávy se sklonem ke lepšímu zdravotnímu stavu, a tedy selektovat dojnice s vyšší pravděpodobností lepší plodnosti. (Crowe et al. 2018)

Vývoj trendů plodnosti holštýnského skotu v České republice v období od roku 2010 až 2020 jsou uvedeny v samostatných přílohách.

3.2 Výživa a krmení

Výživu skotu lze široce definovat jako použití složek krmiva pro procesy záchovy, růstu, reprodukce, laktace a zdraví. Sestavená krmná dávka je výběr a vzájemný poměr krmiv a přísad tak, aby bylo dodáno správné množství a vyváženost živin potřebných pro optimální produktivní a reprodukční výkonnost. Krmná dávka je řadou biochemických reakcí, které probíhají v těle dojnice, asimilována a zpracována pro získání živin k uspokojení jejich fyziologických potřeb. Znalost základní a aplikované výživy je důležitá při určování optimálních strategií krmení a managementu mléčného skotu pro zdraví a produkci (Drackley et al. 2006).

Správné nutriční složení krmné dávky je nezbytné pro zajištění rovnováhy všech dodávaných živin. Nevhodná výživa může vést k predispozici metabolických poruch a zhoršené plodnosti. Hlavním bodem v souvislosti s výživou a reprodukcí u dojnic je rozsah a trvání nedostatečného

obsahu živin a negativní energetické bilance v časně laktaci. Tento rozsah a délka trvání jsou silně ovlivňovány výživovým managementem v období přechodu z březosti do laktace. Pro úspěšné zvládnutí přechodného období a dobrou reprodukční výkonnost je důležité řízení výživy před porodem a po něm, podporující vysoký příjem sušiny a vyvážené složení krmné dávky (Drackley & Cardoso 2014).

Úspěšná reprodukce závisí na koordinované řadě fyziologických událostí, včetně obnovení ovariální cyklicity po porodu, vývoje a ovulace životaschopného oocyty, oplodnění, nidace embryí, vývoje plodu, udržení gravidity a involuce dělohy. Složení výživy a její řízení během období stání na sucho, okolo porodu a časného poporodního období mohou usnadnit nebo narušit výše uvedené fyziologické děje. Vysokoprodukční krávy, které se úspěšně přizpůsobí laktaci, mohou mít vysokou reprodukční výkonnost, ale v přechodném období před a po otelení musíme tuto adaptaci usnadnit řízením výživy. Nedostatky v řízení výživy či nedostatečná výživa zvyšují riziko poporodních metabolických poruch a infekčních nemocí, které ovlivňují další plodnost. Primárním faktorem ovlivňujícím plodnost je výskyt negativní energetické bilance po porodu, který může oddalovat návrat k cykličnosti, první ovulaci a snižovat kvalitu oocytů (Drackley & Cardoso 2014).

Jak uvádí Leroy et al. (2008) složení krmné dávky může změnit endokrinní a metabolické mikroprostředí vyvíjejícího se oocyty.

Několik recenzí uvádí, že výživa je důležitá při prevenci a léčbě poruch souvisejících s negativní energetickou bilancí. Byl přezkoumán vztah negativní energetické bilance k metabolismu bílkovin, stejně jako vztah mezi lipidy krmné dávky a metabolickými a reprodukčními poruchami. Zdá se však, že klíčovým problémem, který se vyskytuje v metabolismu dojníc v časně laktaci je nevyvážená dostupnost glykogenních a lipogenních sloučenin z živin a tělesných rezerv. Poměr lipogenních a glykogenních sloučenin může být ovlivněn složkami v krmné dávce. Lze říci, že krmení vysoce lipogenními živinami obecně zvyšuje hladiny NEFA, BHBA a somatotropinu (GH) a snižuje hladinu glukózy a inzulínu. Zvýšená dostupnost glykogenních živin zvyšuje plazmatické koncentrace glukózy a inzulínu snižuje hladiny GH, NEFA a BHBA. To ukazuje, že indikátory nerovnováhy v poměru lipogenních a glykogenních sloučenin lze efektivně ovlivnit zdrojem energie (van Knegsel et al. 2005).

Účinek metabolických změn způsobených negativní energetickou bilancí, která je zapříčiněna energeticky chudou stravou, způsobuje nízkou plodnost u vysokoprodukčních krav. Strava se zvýšeným obsahem surových bílkovin na 17 až 19 % může způsobit sníženou plodnost. Krávy krmené tímto způsobem mají vysoké koncentrace močoviny a amoniaku v krvi a děložních tekutinách, což ovlivňuje životaschopnost spermií, oocytů i embryí. Koncentrace močoviny v krvi vyšší než 200 mg/l jsou spojeny s nízkou plodností. Za podmínek in vitro bylo pozorováno, že koncentrace močoviny ekvivalentní koncentracím, které mají krávy konzumující stravu s vysokým obsahem bílkovin, ovlivňuje embryonální vývoj. To se odráží ve snížení podílu embryí, které dosáhnou stavu blastocysty. Aby bylo možné dodávat všechny potřebné živiny vysoce produkčním kravám, je nutné jim poskytovat vysoce energetickou stravu založenou na vysokých podílech zrnin. Ale jejich účinek způsobuje subklinické změny pH bacheru, vyvolávající acidózu bacheru, kvůli které dochází ke snížení schopnosti zabřezávat, a tím ke snížené plodnosti. Existuje hypotéza, že strava s vysokým obsahem zrnin

způsobuje acidózu a zvýšení volných endotoxinů v krvi, což stimuluje uvolňování prostaglandinu F_{2α} a regresi corpus luteum (Córdova–Izquierdo et al. 2017).

Kromě změn energetické bilance jsou také dočasně regulovány cirkulující koncentrace antioxidantů, jako je β – karoten a vitamíny A (retinol) a E (α–tokoferol), které se snižují v období okolo porodu. Protože tyto sloučeniny hrají důležitou roli v imunitní funkci, nízké koncentrace těchto vitamínů byly spojeny se zvýšenou náchylností k onemocnění a potenciálně se snížením plodnosti u dojnic (Bisinotto et al. 2012).

3.3 Negativní energetická bilance (NEB)

Dlouhodobým problémem současných vysokoprodukčních stád dojeného skotu je stav negativní energetické bilance, který vede k poruchám reprodukce a zdravotním problémům, které mohou končit až předčasným vyražením dojnic ze stáda (Štolcová a Bartoň 2019).

Jedná se o metabolickou poruchu postihující krávy s vysokou užitkovostí, která může poškodit zdraví a mít negativní vliv na plodnost i o několik měsíců později. Délka a hloubka negativní energetické bilance se různí podle genetické hodnoty dojnice, její tělesné kondice před otelením, mléčné užitkovosti, příjmu krmiva a složení krmné dávky (Wathes et al. 2007).

Energetická bilance je rozdíl mezi příjmem energie z krmiva a výdejem energie v mléce. Energetická bilance souvisí se ztrátou nebo ziskem tělesné kondice. Maximální negativní energetická bilance nastává během dvou až tří týdnů po otelení (Klopčič et al. 2011).

Energie je hlavní živinou vyžadovanou při krmení dojnic a nedostatečný příjem energie má škodlivý dopad na jejich reprodukční aktivitu. Pokud příjem sušiny neodpovídá zvýšeným energetickým nárokům, vzniká stav negativní energetické bilance (Nigussie 2018).

U krav s vysokou genetickou hodnotou začíná negativní energetická bilance již před porodem v souvislosti s klesajícím příjmem krmiva, což vede k mobilizaci tělesného tuku ve formě neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) (Nigussie 2018).

Vysokoprodukční dojnice jednoduše nemohou během prvních 60 až 90 dnů laktace zkonsumovat dostatečné množství krmiva, které by podpořilo vysokou dojivost a zabránilo ztrátě hmotnosti (Klopčič et al. 2011).

Potřeba energie je tedy vyšší než množství dodané energie. Kráva tak mobilizuje tělesné zásoby a hubne. V tomto období se obvykle projeví genetický potenciál a kráva pod tlakem negativní energetické bilance produkuje velké množství mléka. Pro krávu je tedy fyziologické mobilizovat tělesný tuk během rané laktace pro podporu vysoké dojivosti. Schopnost dojnice mobilizovat tělesné tuky tedy přispěla k jejímu genetickému potenciálu (to znamená, že krávy s vyšším genetickým potenciálem mobilizují tukové zásoby po delší dobu než krávy s nižším genetickým potenciálem) (Nigussie 2018).

Požadavky na živiny se u dojnic liší v závislosti na březosti a fázi laktace. Nutriční stav krávy v předporodním a poporodním období ovlivňuje její následnou reprodukční výkonnost. Zejména energetická a proteinová bilance během rané laktace patří mezi faktory, které se pravděpodobně podílejí na nízké plodnosti dojnic (Nigussie 2018).

Během prvních tří týdnů laktace negativní energetická bilance oddaluje časnou ovulaci a obnovu poporodní reprodukční funkce a poskytuje hlavní nutriční spojení s nízkou plodností u laktujících dojnic. Negativní energetická bilance může nepříznivě ovlivnit růst a dozrávání folikulů a kvalitu oocytů a embryí, prodloužit dobu do ovulace a také zvyšovat počet inseminací

potřebných k zabřeznutí. Poporodní anestrus může být umocněn ztrátami tělesné kondice v rané laktaci. Během tohoto období může kráva zhubnout až 0,7 kg/den (Nigussie 2018).

Nigussie (2018) udává, že nejméně 80 % dojnic zažívá negativní energetickou bilanci během rané laktace a její rozsah a délka trvání závisí více na příjmu krmiva než na míře dojivosti.

Vzhledem k tomu, že energetická spotřeba na produkci mléka je u všech krav podobná, krávy produkující více mléka na jednotku příjmu sušiny zažívají závažnější negativní energetickou bilanci, protože větší část vydané energie pro potřeby laktace pocházejí spíše z tělesných rezerv než z příjmu krmiva. Jde o neobvyklou situaci, kdy vysoká úroveň mléčné produkce není žádoucí, protože způsobuje zhoršení reprodukčních ukazatelů a má za následek nižší plodnost dojnic (Butler 2012).

Období zahrnující poslední 3 týdny březosti a první 3 týdny laktace je často označováno jako přechodné období, protože kráva „přechází“ z období stání na sucho do období laktace. V přechodném období dochází ke konečnému růstu plodu, otelení a nastartování produkce mléka. Kromě zvýšených požadavků na energii, živiny a minerální látky je kráva vystavena také dalším stresorům, jako je oddělení od telete, imunitní problémy při pročištění dělohy a nejčastěji také vystavení novému režimu krmení (Nigussie 2018).

Správné krmení a management přechodného období má zásadní vliv na příjem sušiny, který jako hlavní faktor ovlivňuje jak dojivost, tak změnu tělesné hmotnosti v rané laktaci. Vyšší příjem sušiny, co nejdříve po porodu zkracuje dobu, po kterou jsou krávy v negativní energetické bilanci. Strategie minimalizace délky trvání a rozsahu negativní energetické bilance má pozitivní dopad na reprodukci (Nigussie 2018).

Nigussie (2018) očekává, že maximalizace příjmu sušiny během přechodného období, minimalizace výskytu peripartálních problémů, zkrácení doby stání na sucho, přídavek doplňkového tuku do krmné dávky a optimalizace obsahu mastných kyselin ve zdrojích tuku dokáže prospět plodnosti dojnic.

3.3.1 Hormony a krevní metabolity podílející se na NEB

Energický stav moduluje sekreci hormonů, které hrají klíčovou roli v růstu folikulů, ovulaci, tvorbě corpus luteum a ve vývoji oocytů. Kromě toho rozsáhlá lipolýza a produkty metabolismu tuků mohou být pro oocyty a následný vývoj embryí škodlivé. Také zhoršené metabolické zdraví často vede k imunosupresi a výskytu nemocí, které dále snižují plodnost. Zvýšená potřeba živin spojená se snížením ochoty přijímat krmivo obvykle vede dojnice do stavu negativní energetické bilance, což je často pozorováno v posledním týdnu březosti a prvních 2 měsících po porodu (Bisinotto et al. 2012).

Řízení metabolismu během pozdní březosti a laktace zahrnuje dva typy regulace – homeostázu a homeorézu. Homeostatická kontrola zahrnuje udržování fyziologické rovnováhy nebo stálosti podmínek prostředí uvnitř zvířete. Homeoréza je řízená a koordinovaná kontrola metabolismu tělesných tkání nezbytná k podpoře fyziologického stavu. Regulace rozdělování živin během březosti zahrnuje homeoretické kontroly zajišťující růst plodu a plodových obalů, potřeby dělohy a také vývoj mléčné žlázy. S nástupem laktace prochází většina mateřských tkání dalšími adaptacemi na podporu produkce mléka. Koordinované změny lipogeneze a lipolýzy v tukové tkáni jsou příklady důležitých homeorhetických kontrol při rozdělování živin, které jsou nezbytné pro zajištění potřeb mléčné žlázy pro produkci mléka (Dale et al. 1980).

Tuková tkáň je centrální zásobárnou energie uložené ve formě lipidů. Navíc byla tuková tkáň klasifikována jako imunologicky a endokrinologicky aktivní. Vysoce účinná schopnost této tkáně ukládat energii je však také životně důležitá pro adaptabilitu mléčného skotu na změnu dostupnosti živin a pro podporu laktace a reprodukce. Nadměrný stupeň mobilizace této tkáně je však spojen s vysokými koncentracemi cirkulujících neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA), což může mít přímé i nepřímé negativní účinky na reprodukční zdraví, produkci mléka a zvyšovat riziko onemocnění (Mann 2022).

Játra jsou hlavním metabolickým orgánem v těle a slouží jako významná hormonální sekreční žláza, která udržuje hormonální rovnováhu a homeostázu (Charni–Natan et al. 2019).

Játra mají zcela zásadní roli v metabolismu většiny živin, a proto jsou označována jako hlavní orgán látkového a energetického metabolismu. Játra dojnic jsou mimo jiné hlavním orgánem syntézy glukózy, plasmatických bílkovin, ale také místem syntézy vitamínu A apod. Nenahraditelná je funkce jater v detoxikačních procesech (např. tvorba močoviny z toxického amoniaku), v tvorbě žluče, metabolismu hormonů a vody, v činnosti imunitního systému a vytváření rezerv řady základních živin. Na základě výše uvedených informací je zřejmé, že při postižení jater patologickými vlivy dochází k narušení rovnováhy metabolismu a je snížena užitečnost a plodnost dojnic (Pavlata a Pechová 2014).

S nástupem laktace musí játra zvládat velkou a rychle se zvyšující metabolickou zátěž pro produkci glukózy a oxidaci mastných kyselin. Nadměrná mobilizace tělesných rezerv je spojena s poporodní tukovou infiltrací jater a sníženou reprodukční výkonností u dojnic s vysokou užitečností. Játra hrají důležitou roli jako místo metabolismu NEFA a jako primární zdroj IGF–I, který stimuluje vývoj ovariálních folikulů (Nigussie 2018).

Jak bylo výše uvedeno játra jsou zodpovědná za metabolizaci cirkulujících NEFA, které mohou být zcela oxidovány pro produkci energie, exportovány z jater jako lipoproteiny nebo částečně oxidovány na BHBA a další ketolátky (Bicalho et al. 2016).

Alternativně mohou být NEFA esterifikovány na triacylglyceroly, které se hromadí v játrech, přičemž jejich koncentrace dosahuje vrcholu 7–13 dnů po otelení a poté postupně klesá. BHBA jsou převládající formou ketolátek v krvi a jejich koncentrace je indexem oxidace mastných kyselin (Wathes et al. 2007).

Akumulace BHBA a dalších ketolátek v játrech nakonec způsobí subklinickou nebo klinickou ketózu (Bicalho et al. 2016).

Steroidní hormony se podílejí na regulaci různých biologických drah především v reprodukčním systému a na udržování metabolické homeostázy. Není tedy divu, že jejich regulace je složitá a je založena na několika parametrech, a to na produkci, degradaci, aktivaci, inaktivaci a poměru mezi volnými a vázanými cirkulujícími steroidními sloučeninami. Kromě toho tato víceúrovňová regulace probíhá nejen ve steroidogenních tkáních, ale také v různých periferních orgánech, a to zejména v játrech. Játra jako centrální metabolický orgán hrají zásadní roli v homeostáze steroidních hormonů (Charni–Natan et al. 2019).

Základním mechanismem regulace tvorby glukózy a jejího využití v orgánech a tkáních jsou vzájemně související účinky hormonů inzulínu a glukagonu produkovaných slinivkou břišní (Sláma et al. 2015).

Glukóza je univerzální palivo pro energetický metabolismus všech typů živočišných buněk. U mléčného skotu poskytují sacharidy ve stravě hlavní zdroj energie pro záchovu, růst a mléčnou produkci. Živočišné buňky vyžadují glukózu pro oxidativní a neoxidativní produkci

adenosintrifosfátu (ATP) a pro anabolické reakce, které produkují různé životně důležité sacharidy. Několik typů buněk a tkání, jako je mozek, červené krvinky, ledviny a mléčná žláza vyžadují jako energetický substrát glukózu. Tkáně jsou závislé na energetických substrátech, jako jsou sacharidy, které cirkulují rozpuštěné v krvi, aby mohly být absorbovány různými tkáněmi a orgány podle jejich požadavků lipolýzu (Abbas et al. 2020).

Proto je glukóza nezbytným zdrojem energie pro všechny organismy a musí být trvale dostupná v adekvátní hladině v krvi. Glukóza je hlavním prekurzorem pro syntézu laktózy, a proto ji dojnice v laktaci potřebují ve velkém množství k pokrytí potřeby produkovaného mléka lipolýzu (Abbas et al. 2020).

Játra hrají důležitou roli v homeostáze glukózy tím, že produkují glukózu z bachorového propionátu, aminokyselin ze svalové tkáně a glycerol z tukové tkáně pomocí procesu zvaného glukoneogeneze. Tuková tkáň hraje důležitou roli v produkci glukózy játry v období, kdy organismus trpí jejím nedostatkem lipolýzu (Abbas et al. 2020).

NEFA působí jako metabolický substrát pro regulaci glukózy, která je nepřímo řízena inzulinem. Normálně jsou během NEB v důsledku přechodného období nebo podvýživy NEFA exportovány z tukové tkáně odesláním lipolytické odpovědi na β -adrenergní látky, které inhibují krevní inzulin a indukují systémový inzulin, který spouští lipolýzu (Abbas et al. 2020). Plazmatické koncentrace glukózy, aminokyselin a mastných kyselin jsou snižovány účinkem inzulinu. Ten má posilující účinek na jejich utilizaci přeměnou na glykogen, bílkoviny a triacylglyceroly. Zvýšená koncentrace glukózy v krevní plazmě po příjmu krmiva stimuluje slinivku břišní k produkci inzulinu (Sláma et al. 2015).

Glukagon a inzulin jsou součástí regulace důležitých procesů intermediárního metabolismu. Glukagon stejně jako inzulin ovlivňuje hladinu glukózy v krvi, ale opačným směrem. Jeho prostřednictvím je zvyšována syntéza glukózy v játrech a tím i její plazmatické koncentrace. Hyperglykémie je způsobena snížením tvorby glykogenu, tím je podpořen jeho rozklad a dochází ke stimulaci glukoneogeneze. Glukagon působí opačně k inzulinu i z hlediska metabolismu lipidů. Snižuje tvorbu triacylglycerolů a podporuje lipolýzu. Dále také inhibuje syntézu a podporuje degradaci bílkovin játry. Glukagon však nezvyšuje hladinu aminokyselin v plazmě, a tak neovlivňuje hlavní rezervoár proteinů těla – svalovinu (Sláma et al. 2015).

Velká potřeba glukózy (např. pro mléčnou žlázu) může snížit množství glukózy dostupné pro jiné tkáně v těle, včetně těch, které se podílejí na poporodní imunitní obraně. V období negativní energetické bilance dochází u dojnic ke snížení hladiny glukózy v krvi a tím k potlačení funkce neutrofilů. Nízké hladiny glukózy pozorované během přechodu na laktaci mohou být spojovány s imunosupresí (Bicalho et al. 2016).

Ukázalo se, že glukóza je nezbytná pro adekvátní zrání oocytů, ovlivňuje expanzi kumulu, jaderné zrání, štěpení a následný vývoj blastocyst. Ačkoli oocyt přímo nevyužívá glukózu jako zdroj energie, musí být snadno dostupná pro buňky kumulu pro glykolýzu, aby poskytla pyruvát a laktát, což jsou preferované substráty oocytů pro produkci ATP (Cetica et al. 2002).

I když je folikul schopen řídit kolísání dostupnosti glukózy, což má obecně za následek koncentrace ve folikulární tekutině vyšší než koncentrace pozorované v krvi, intrafolikulární koncentrace glukózy přesto klesají kolem porodu (Leroy et al. 2004).

Ve skutečnosti jsou koncentrace glukózy kompatibilní s koncentracemi pozorovanými u krav trpících klinickou ketózou. Následkem toho docházelo ke sníženému štěpení a nižšímu podílu embryí, z nichž se vyvíjely blastocysty (Leroy et al. 2006; Bisinotto et al. 2012).

Kromě nepřímých účinků hypoglykémie u dojnic časně po porodu (prostřednictvím vlivu na sekreci LH nebo ovariální citlivost na gonadotropiny) se hypoglykemické stavy (např. klinická ketóza) odrážejí v mikroprostředí preovulačního oocyty a mohou tak ohrozit vývoj oocyty (Leroy et al. 2010).

Inzulínová rezistence je fyziologický stav, kdy mají tělesné tkáně nižší odpověď na inzulín. Hodnotí se inzulínovou odpovědí, což je odpověď inzulínu na glukózu, a inzulínovou senzitivitou, což je citlivost tkání na inzulín. Obecně je inzulínová rezistence spojována s obezitou, krměním tukem, hyperinzulinémií, hyperlipidémií, malnutricí a jinými hormony, jako je růstový hormon (GH) a tyroxin. Samice savců obvykle podléhají inzulínové rezistenci kvůli zvýšeným energetickým požadavkům na růst plodu a laktaci během peripartálního období (Kawashima et al. 2016).

Požadavky na živiny v pozdním období březosti jsou částečně pokryty zvýšenou inzulínovou rezistencí v tukové tkáni a svalech spolu se zvýšenou citlivostí na lipolytické hormony, které v těchto tkáních snižují spotřebu glukózy, a tak je tok živin přesměrován do placenty (Wathes et al. 2007).

Přechodná inzulínová rezistence časně po porodu snižuje využití glukózy periferními tkáněmi k zajištění její dostupnosti pro mléčnou žlázu (Bisinotto et al. 2012).

Nízké koncentrace inzulínu v plazmě snižují vychytávání glukózy svalstvem a tukovou tkání a usnadňují tak zvýšené vychytávání glukózy mléčnou žlázou, která na inzulín nereaguje. Kromě toho je inzulín známý pro své přímé a nepřímé antiketogenní účinky. Mezi tyto účinky patří: snížení vychytávání NEFA v játrech stimulací lipogeneze a inhibice lipolýzy v tukové tkáni, zvýšení využití ketonů v periferní tkáni a změna enzymových aktivit a dostupnosti substrátů, které se účastní jaterní ketogeneze (van Knegsel et al. 2007).

Vysoká produkce mléka může zhoršit stupeň inzulínové rezistence a prodloužit tak negativní energetickou bilanci během poporodního období, zejména u vysoce produkčních dojnic (Kawashima et al. 2016).

Během pozdní březosti přispívá inzulínová rezistence v tukové tkáni ke zvýšení plazmatických koncentrací NEFA a jejich následné oxidaci v játrech. To je příčinou poklesu příjmu sušiny v období blízko otelení. Studie z posledních let naznačují, že vysokoenergetická výživa během období stání na sucho interaguje s inzulínovou rezistencí v pozdním předporodním období. Nadměrný příjem energie nejen v období před otelením, ale také v průběhu celého suchostojného období zhoršuje inzulínovou rezistenci. Obecně lze konstatovat, že nadměrné krmení zaprahých dojnic predisponuje tyto krávy ke sníženému příjmu sušiny a vyšším koncentracím NEFA v období okolo porodu. Zvláště bývají ohroženy dojnice s vysokým BCS (Butler 2012).

Některé studie poskytly nepochybné důkazy o účasti hormonů štítné žlázy v adaptaci na stav negativní energetické bilance a v procesu obnovení ovariální cyklicity u dojnic po porodu. Tyroxin je již řadu let znám jako převládající produkt štítné žlázy. Jeho produkce a uvolňování je řízeno osou hypotalamus – hypofýza (Huszenicza et al. 2002).

Pozitivní korelace mezi cirkulujícími koncentracemi hormonů štítné žlázy a energetickou bilancí je dobře známá u mnoha druhů zvířat včetně skotu. U dojnic byly nízké hladiny tyroxinu a trijodtyroninu pozorovány v prvních 100 dnech laktace, a to i poté, co se koncentrace BHBA a NEFA vrátily do normálních hodnot (Huszenicza et al. 2002).

Nízká koncentrace trijodtyroninu ovlivnila reprodukční výkonnost pouze krav v negativní energetické bilanci. Existují studie, které poskytují podpůrné důkazy pro roli trijodtyroninu a tyroxinu při regulaci steroidogeneze bovinních folikulů. Stimulační účinky trijodtyroninu a tyroxinu lze považovat za součást komplexní multihormonální regulace folikulární steroidogeneze u skotu (Huszenicza et al. 2002).

Stav hormonů štítné žlázy může ovlivnit příjem krmiva, což následně ovlivňuje hladiny IGF-I, a může modifikovat koncentrace IGF-I prostřednictvím účinků na sekreci GH nebo hladiny receptorů (Huszenicza et al. 2002).

Leptin je dalším metabolickým hormonem, který je předmětem zájmu ve vztahu k energetické bilanci, protože jeho cirkulující koncentrace silně koreluje se skóre tělesné kondice (BCS), které v pozdní graviditě klesá. Koncentrace leptinu však zůstává po porodu nízká, i za předpokladu, že se stav energetické bilance zlepšil. Je známo, že leptin může ovlivnit dobrovolný příjem krmiva a také přispívat ke stavu inzulinové rezistence (Wathes et al. 2007).

U multiparních krav byly vyšší koncentrace leptinu před otelením silným prediktorem opožděné první ovulace, také byly spojeny s prodloužením doby první inseminace a doby do zabřeznutí. V období před porodem koncentrace leptinu koreluje s BCS, a může tedy vypovídat o množství dostupné tukové tkáni pro následnou mobilizaci na podporu laktace. Je také možné, že zvýšená koncentrace leptinu před otelením může snižovat chuť k příjmu krmiva, a tím přispívat k větším ztrátám BCS prostřednictvím sníženého příjmu sušiny (Wathes et al. 2007). To znamená, že pokles leptinu působí prostřednictvím hypotalamu naopak ke zvýšení chuti přijímat krmivo, ke snížení energetického výdeje a modifikaci neuroendokrinní funkce směrem, který podporuje přežití. Mezi důsledky poklesu leptinu patří potlačení reprodukční funkce, růstu, narušení osy štítné žlázy a také aktivace stresové osy (Huszenicza et al. 2002).

Během pozdní gravidity zvýšené plazmatické hladiny steroidních hormonů (estradiol a progesteron) potlačují uvolňování hypofyzárních gonadotropinů (luteinizační hormon – LH a folikuly stimulující hormon – FSH) a snižují aktivitu ovariálních folikulů. Po otelení jsou hladiny steroidních hormonů naopak sníženy a dochází k znovu obnovení zvýšené sekrece FSH a LH pulsů. Proto aby došlo ke stimulaci rozvoje velkých ovariálních folikulů a obnově ovariálních cyklů. Během prvních tří týdnů laktace dochází k oddálení ovulace a obnovy poporodní reprodukční funkce v důsledku negativní energetické bilance, která je jedním z hlavních důvodů snížené plodnosti u laktujících dojníc (Nigussie 2018).

Nižší kondice dojníc inhibuje estrální chování snížením citlivosti centrálního nervového systému na estradiol snížením obsahu estrogenového receptoru α v mozku (Nigussie 2018).

V nedávné studii byl sledován vývoj folikulů počínaje týden po porodu za účelem stanovení, zda došlo či nedošlo k ovulaci v závislosti na množství přijímané sušiny, energetické bilanci a hormonálních a metabolických profilech v předporodním období (Nigussie 2018).

Limitujícím faktorem pro ovulaci folikulu je jeho schopnost produkovat velké množství estradiolu (Nigussie 2018).

Krávy, u kterých nedošlo k ovulaci a vykazovaly nízké koncentrace estradiolu měly již tři týdny před porodem nižší příjem sušiny, energetickou bilanci a plazmatické koncentrace inzulinu a IGF-I. Lze tedy tvrdit, že změny v příjmu sušiny začínají již před porodem a jsou nejdůležitějším a určujícím faktorem energetického stavu dojníc po otelení. Snížení příjmu sušiny je spojováno s nižšími plazmatickými koncentracemi metabolických hormonů, inzulinu a IGF-I. Bylo také popsáno, že energetická bilance a příjem sušiny mohou ovlivnit plazmatické

koncentrace progesteronu, což může interferovat s vývojem folikulů a udržení březosti (Nigussie 2018).

Progesteron je nezbytný pro vznik a udržení gravidity působením na vejcovod a dělohu, které regulují vývoj a přežití embrya. Metabolismus spojený s vysokou produkcí mléka zvyšuje rychlost odbourávání progesteronu játry, což vede k jeho nižším hladinám v krvi ve srovnání s hladinami nelakujících krav (Butler 2012).

V období negativní energetické bilance se u krav zvyšují koncentrace růstového hormonu (GH) a NEFA v krvi, zároveň také dochází k poklesu koncentrace insulin-like growth factor- I (IGF- I), glukózy a inzulínu. Tyto změny koncentrací krevních metabolitů a hormonů mohou ohrozit správnou funkci vaječnicků a mít negativní vliv na plodnost (Nigussie 2018).

LH je hormon, který je nezbytný pro konečný růst a zrání ovulačního folikulu, obnovení ovariální aktivity a ovulaci (Nigussie 2018).

Negativní energetická bilance moduluje aktivitu osy hypotalamus-hypofýza-ovaria, takže hypotalamus není schopen stimulovat hypofýzu k optimální frekvenci sekrece LH (Bisinotto et al. 2012).

Stupeň NEB určuje, zda je pulzní frekvence LH během první folikulární vlny dostatečná ke stimulaci vysoké produkce estradiolu, tak aby mohlo dojít k ovulaci (Nigussie 2018).

Pulzní frekvence LH pozitivně koreluje s energetickou bilancí a negativně koreluje s koncentrací NEFA v krvi. Základní mechanismus, kterým NEB potlačuje uvolňování LH, pravděpodobně zahrnuje snížený přísun energie pro neurony a hormonální stimulaci buněk hypotalamu a hypofýzy. Glukóza je preferovaným zdrojem pro energetický metabolismus neuronů a nedostatečný přísun glukózy inhibuje tvorbu pulsů GnRH (Bisinotto et al. 2012).

Bisinotto et al. (2012) uvádí, že za příznivého nutričního stavu podporuje hormonální prostředí hypotalamu a hypofýzy uvolňování GnRH a gonadotropinů. Například leptin, hormon, který zvyšuje svoje koncentrace při pozitivní energetické bilanci, stimuluje uvolňování GnRH hypotalamem. Bylo zjištěno, že leptin v krvi silně koreluje s frekvencí i amplitudou LH pulsů. Kromě nízké sekrece LH mají krávy v negativní energetické bilanci omezenou jaterní expresi GH receptoru 1A způsobenou nízkými koncentracemi inzulínu. Tento jev rozpojuje osu GH-IGF-I, čímž dochází k snížení syntézy IGF-I v játrech (Bisinotto et al. 2012).

To společně způsobuje snížení citlivosti ovariálních folikulů na gonadotropiny. Fyziologicky jsou metabolické a gonadotropinové signály řídící časný vývoj folikulů vzájemně propojeny: FSH stimuluje granulózní buňky ve folikulech k vývoji receptorů pro inzulín, ten působí na expresi GH receptoru, který podporuje produkci IGF-I. Inzulín a IGF-I pak poskytují hormonální stimul pro plný vývoj preovulačních folikulů (Butler 2012).

Zvyšující se koncentrace IGF-I časně po porodu jsou tedy důležité pro brzké obnovení pohlavního cyklu a zabřeznutí (Nigussie 2018).

Jak trvání a závažnost poporodní negativní energetické bilance, tak související snížené plazmatické koncentrace inzulínu, IGF-I a glukózy a zvýšené koncentrace NEFA a BHBA byly spojeny se zhoršenou reprodukční schopností (Maillo et al. 2012).

Snížené koncentrace IGF-I v krvi byly spojeny se sníženou citlivostí folikulů na LH, sníženou steroidogenezi a růstem folikulů. Naopak zvýšení koncentrací inzulínu bylo spojeno se zlepšením energetické bilance a zdá se být jedním ze signálů obnovy exprese receptoru GH v játrech a znovuobnovení syntézy IGF-I u dojníc. Omezení růstu folikulů a snížení syntézy

estradiolu zpomaluje obnovení ovulace po porodu a může ohrozit kvalitu oocytů (Bisinotto et al. 2012).

Metabolické změny spojené s poporodní negativní energetickou bilancí mají vliv na oocyty: některé studie ukázaly, že zvýšené koncentrace NEFA a BHBA ve folikulární tekutině nepříznivě ovlivňují kvalitu oocytů. Kromě toho bylo prokázáno, že NEFA inhibují steroidogenezi a proliferaci ve folikulárních thekálních buňkách (Maillo et al. 2012).

Jak již bylo řečeno negativní energetická bilance snižuje růst dominantních folikulů a produkci estradiolu, pravděpodobně v důsledku snížení cirkulace inzulínu, IGF-I a pulzní frekvence LH. Existuje řada endokrinních a metabolických drah, které regulují reprodukční osu včetně inzulínu a IGF-I (Barletta et al. 2017).

Podle Barletta et al. (2017) může být anovulace důsledkem silného inhibičního působení nízkého množství folikulárního estradiolu na sekreci GnRH z hypotalamu, což vede k nedostatečnému růstu folikulů. Nízká produkce estradiolu není dostatečná k vyvolání nárůstu GnRH a LH a následné ovulaci. Přítomnost této negativní zpětné vazby zprostředkované estradiolem může přímo souviset s energetickou bilancí a tento fyziologický scénář může být důsledkem prodloužené doby do první ovulace u krav s větší ztrátou BCS.

3.3.2 Postupy řízení chovu zmírňující průběh NEB

3.3.2.1 Zkrácení suchostojného období

Období stání na sucho je doba před otelením, kdy krávy nejsou dojeny a trvá obvykle asi 6 až 8 týdnů (Kok et al. 2019).

Období stání na sucho hraje klíčovou roli v přípravě na otelení, produkci mléka a zdraví dojnic. Adekvátní management tohoto období optimalizuje vývoj mléčné žlázy a plodu v posledním měsíci březosti, ovlivňuje produkci mléka v další laktaci a má vliv i na metabolické zdraví a reprodukční výkonnost krav (Soulat et al. 2020).

Zaprahkým dojnicím se buňky mléčné žlázy obnovují rychleji, než kdyby byly dojeny až do otelení. V případě přetrvávající subklinické mastitidy jsou dojnice v tomto období léčeny antibiotiky (Kok et al. 2019).

Vysoká doživost může prohloubit negativní energetickou bilanci, o které se ví, že ovlivňuje plodnost. Se zápornou energetickou bilancí koreluje dlouhý interval od porodu do první ovulace, luteální aktivita a nízká míra zabřezávání. Jedním ze způsobů, jak snížit NEB, a tím zmírnit zátěž metabolismu po otelení, je zkrátit nebo vynechat suchostojné období (O'Hara et al. 2019).

Zkrácení (na 3 až 5 týdnů) nebo vynechání období stání na sucho je strategií snižující maximální produkci mléka tak, že energetické požadavky v kritickém období po porodu jsou částečně přesunuty do období před porodem, kdy je kráva schopná je snadněji splnit (Kok et al. 2019).

Bylo prokázáno, že zkrácení období stání na sucho z osmi týdnů na polovinu zlepšuje poporodní energetickou rovnováhu, vyvolává zvýšení plazmatické koncentrace inzulínu a snížení koncentrací NEFA v období časně laktace. Dále bylo zjištěno, že krávy stojící na sucho pouze čtyři týdny mají vyšší poporodní koncentrace IGF-I ve srovnání s krávami zaprahnutými osm týdnů. Tato skutečnost může vysvětlit zmírněním poklesu progesteronu u krav s kratším suchostojným obdobím (O'Hara et al. 2019).

Obecně je také známo, že u dojnice s nižšími hladinami IGF-I po porodu dochází k obnově estrálního cyklu opožděně (O'Hara et al. 2019).

Jak uvádějí některé studie zlepšení vlastností plodnosti je přikládáno zkrácení období stání na sucho. Například se uvádí, že osmitýdenní stání na sucho zkrácené o 40 % snižuje dobu od otelení do první ovulace (O'Hara et al. 2019).

Leroy et al. (2008) uvádí, že zkrácení nebo dokonce vynechání období stání na sucho zlepšuje příjem sušiny v období okolo porodu, snižuje produkci mléka v časně laktaci, zlepšuje energetickou bilanci a snižuje počet dní od porodu do obnovení ovariální aktivity.

Absence období stání na sucho mění chování krav před i po otelení tak, že se prodlužuje doba ležení a zvyšuje se příjem krmiva po otelení. To svědčí o lepší adaptaci na následnou laktaci. Metabolickou reakci na zkrácené nebo vynechané suchostojné období určují individuální vlastnosti dojnice jako je parita, genotyp, prepartální skóre tělesné kondice a úroveň produkce mléka (Kok et al. 2019).

Je obecně známo, že vysoké koncentrace NEFA v krevní plazmě predisponují dojnice v rané laktaci ke zvýšenému riziku metabolických a jiných onemocnění (O'Hara et al. 2019).

Nemoci související s plodností jsou častěji pozorovány u dojnic se standardní délkou suchostojného období. Krávy zaprahnuté pouze čtyři týdny vykazují mírnější negativní energetickou bilanci a jsou schopné ji překonat rychleji než krávy zaprahlé osm týdnů (O'Hara et al. 2019).

3.3.2.2 Modifikace krmné dávky

Krávy po otelení nedokážou přijmout dostatečné množství energeticky důležitých živin ze sušiny, kterou jsou schopny zkonzumovat, aby splnily energetické požadavky na produkci mléka (Drackley & Cardoso 2014).

Ve skutečnosti se energetické požadavky po otelení rychle zvyšují, ale příjem sušiny roste pomalu, a tak příjem energie nelze zvýšit (Bertoni et al. 2009).

V důsledku toho dochází k negativní energetické bilanci po dobu dní až týdnů během časně laktace (Drackley & Cardoso 2014).

Vyvážená a sofistikovaná péče o porod v kombinaci s přísným sledováním zdravotního stavu krav brzy po porodu je zásadní k zabránění poklesu ochoty přijímat krmivo (Leroy et al. 2008). Obvyklou metodou řízení přechodného období je snižování příjmu energie během prvních týdnů období stání na sucho a následně zvýšení přísunu energie krátce před porodem (Leroy et al. 2008).

Mezi důležité faktory, které podporují ochotu přijímat krmivo a zvyšují příjem celkové sušiny po otelení, patří: minimalizování stresů v životním prostředí a zajištění pohodlí krav, vyhnout se nadměrnému BCS, zabránění nadměrnému přísunu energie během období stání na sucho přesahující nutriční a energetické požadavky dojnic, zajištění adekvátního množství sušiny v krmné dávce, snížení rozdílu kationtů a aniontů před otelením a jeho zvýšení v krmné dávce po porodu, nutriční podpora imunitního systému a zamezení nadměrného příjmu rychle fermentovatelného škrobu v období po porodu (Drackley & Cardoso 2014).

Nejběžnější strategií využívanou ke snížení rozsahu NEB a ztráty BCS na začátku laktace je zvýšení koncentrace energie zakomponováním většího podílu škrobových nebo tukových složek do krmné dávky. Změny v příjmu sacharidů a tuků mají vliv na funkci bачору, složení

mléka, rozdělení živin a metabolické hormony. Takové změny metabolických hormonů jsou důležité pro plodnost dojnic, protože interagují s reprodukčními hormony, které řídí funkci vaječnicků (Garnsworthy et al. 2008).

Koncentrace a poměr škrobu, tuku a fyzikálně efektivní vlákniny v krmné dávce mohou zvýšit příjem energie v poporodním období, mít zásadní vliv na příjem sušiny a také snížit riziko výskytu ketózy u dojnic (Sun 2012).

3.3.2.3 Přídavek jadrných krmiv

Krmiva s vysokým obsahem škrobu (zajišťující dobré hodnoty inzulínu) mají příznivý vliv na růst folikulů a na předčasné obnovení reprodukčního cyklu, nikoli však na kvalitu oocytů a hladinu progesteronu (Bertoni et al. 2009).

Garnsworthy et al. (2008) testoval hypotézu, že podávání krmiva s vysokým obsahem škrobu na počátku laktace vede ke zvýšení koncentrací cirkulujícího inzulínu, což by mohlo zmírnit zpoždění první ovulace po porodu pozorované u dojnic s vysokou genetickou hodnotou. Výsledky ukázaly, že dieta zvyšující koncentrace inzulínu změnila procento podílu krav ovulujících do 50 dnů po porodu z 55 na 90 % a zkrátila interval od porodu do první ovulace ze 48 na 34 dnů. Na druhou stranu krmná dávka s vysokým obsahem škrobu snížila nárůst průměrné koncentrace progesteronu po ovulaci. Protože progesteron hraje klíčovou roli v podpoře funkce dělohy a mnohé studie spojují jeho nízkou sekreci v tomto období se zhoršenou vývojovou schopností oocytů, potlačením vývoje embrya a časnou embryonální odumrtí.

Je také důležité si uvědomit, že ačkoli krmiva s vysokým obsahem škrobu zvýší plazmatický inzulín, nadměrné množství snadno fermentovatelného škrobu má potenciál způsobit bachorovou acidózu, potlačit příjem sušiny a eliminovat tak případné přínosy živin v krmné dávce na funkci vaječnicků (Bisinotto et al. 2012; Sun 2012).

3.3.2.4 Přídavek tuku

Suplementace tuku do krmné dávky dojnic se provádí za účelem zvýšení koncentrace energie krmiva, podpory produkce mléka a zlepšení reprodukčních parametrů. Přidávání doplňkového tuku do krmné dávky je tak jedním z nejběžnějších způsobů, jak zlepšit energetickou bilanci dojnic (Nigussie 2018).

Sun (2012) uvádí, že se přidáním omezeného množství doplňkového tuku do krmné dávky snížila mobilizace NEFA z tukové tkáně a tím došlo ke snížení výskytu ketózy. Naopak diety s nadměrným obsahem tuku mohou uvolňování NEFA z tukové tkáně zvýšit a tím snížit příjem sušiny.

Přidání mírného množství doplňkového tuku do krmné dávky zlepšuje energetický příjem, moduluje sekreci prostaglandinu F_{2α} dělohou, ovlivňuje funkci vaječnicků, zlepšuje funkci luteální tkáně a kvalitu embryí a má mírně pozitivní vliv na plodnost. Konkrétněji, některé mastné kyseliny mohou ovlivnit míru zabřezávání a kvalitu embryí u dojnic. Naopak některé krmné přísady (např. gossypol) při požití ve velkém množství plodnost dojnic snižují kvůli negativním dopadům na kvalitu embryí a udržení březosti (Bisinotto et al. 2012).

Studie in vivo podporují předpoklad, že změna typu mastných kyselin ve výživě ovlivňuje oplodnění a kvalitu embryí u laktujících dojnic. Kromě toho suplementace mastnými

kyselinami během přechodného období a období rozmnožování ovlivňuje plodnost dojníc zlepšením zabřezávání na inseminaci. Předpokládá se, že některé ze specifických účinků mastných kyselin podporujících zlepšení reprodukce jsou zprostředkovány změnami vrozené imunity během přechodného období. Zdá se, že typ mastných kyselin hraje roli při zabřeznutí a udržení gravidity (Bisinotto et al. 2012).

Zahrnutí tuků do krmné dávky během přechodného období zlepšilo reprodukční výkonnost a energetickou rovnováhu, snížilo výskyt metabolických onemocnění a umožnilo udržovat energetickou bilanci, aniž by se zvýšilo využití rychle fermentovatelných sacharidů (Rodney et al. 2015).

Krmení tuků před a bezprostředně po otelení má potenciál snížit příjem sušiny, ale nyní je k dispozici mnoho studií, kde byly pozorovány příznivé účinky tuku v krmivu na produkci a reprodukci. V současné studii celkové účinky příkrmování tukem zvýšily podíl krav zabřeznutých po porodu a měly sklon snižovat servis periodu (Rodney et al. 2015).

Nenasycené mastné kyseliny, zejména kyselina linolová, kyselina linolenová, kyselina eikosapentaénová a kyselina dokosaheptaénová, mohou cílit na reprodukční tkáň, pokud jsou dodávány ve formě absorbovatelné ve dvanáctníku a kyčelníku (Rodney et al. 2015).

Doplnění nenasyceným mastných kyselin n-3 a n-6 obvykle zlepšuje plodnost, pokud nenarušuje mikrobiální metabolismus v bacheru (Bisinotto et al. 2012).

3.3.2.5 Vysokovláknitá krmná dávka

V poslední desetiletí vzrostl zájem o používání nízkoenergetických diet s vysokým obsahem slámy pro dojnice v období stání na sucho. Při správné implementaci byly tyto diety úspěšné při snižování výskytu peripartálních zdravotních poruch. Tyto diety kontrolují celkový energetický příjem krav, a tím zabraňují metabolickým změnám podobným těm, které se vyvíjejí u ztučnělých krav po porodu. Vytvořením vysoce objemné krmné dávky, která omezí celkový energetický příjem, ale poskytne adekvátní množství sušiny, bílkovin a dalších živin, může být kravám umožněno konzumovat krmivo ad libitum a splnit jejich nutriční požadavky a zároveň zabránit nadměrné spotřebě energie (Drackley et al. 2007).

Existují další studie podporující zjištění, že programy s regulovanou energií v krmné dávce zasušených krav snižují zdravotní problémy. Aplikace těchto principů může být provedena limitovaným krmením energeticky adekvátní krmné dávky nebo adlibitním krmením objemných nízkoenergetických krmiv (Drackley & Cardoso 2014).

Během posledních 20 let se stalo běžnou praxí podávat krmné dávky s vyšší energetickou a živinovou hustotou přibližně 3 týdny před očekávaným otelením. Tento přístup byl navržen ve snaze přizpůsobit bacherovou mikrobiální populaci a bacherové papily stravě s vyšším obsahem živin po otelení, snížit mobilizaci tělesného tuku, ukládání tuku v játrech a kontrolovat koncentrace vápníku v krvi. Ačkoli každá z těchto myšlenek sama o sobě byla správná a založená na dobrých výzkumných datech, schopnost těchto vysokoenergetických diet minimalizovat produkční choroby nebyla úspěšná (Drackley et al. 2007).

Podstatou nízkoenergetické diety je omezení obsahu krmiv s koncentrovanou energií a jejich nahrazení objemnými krmivy, tak aby byly splňovány energetické požadavky dojníc za předpokladu adlibitního krmení (Drackley et al. 2007).

Je důležité, slámu upravit na délku cca 5–8 cm a ostatní složky krmiva tak, aby byly skutečně dobře promíchány a konzumovány v požadovaných množstvích. TMR je zdaleka nejlepší volbou pro zavedení diet s vysokým obsahem vlákniny ke kontrole příjmu energie. Takto správně namíchanou nízkoenergetickou dietu lze krmit po celou dobu zasušení (Drackley et al. 2007).

Zvýšením obsahu vlákniny v krmné dávce na optimální úroveň v období stání na sucho, dochází ke stimulaci přežvykávání a tím k udržení normální funkce bahu až do porodu. Vysoký příjem vlákniny zabraňuje extrémnímu poklesu příjmu sušiny před porodem a tím usnadňuje další zvyšování příjmu sušiny v průběhu rané laktace. A však při zvýšení obsahu vlákniny nad optimální úroveň dochází k opačnému efektu, a to ke snižování příjmu sušiny a nižší stravitelnosti krmné dávky (Grant 1991).

Pro úspěšné zavedení vysokovláknité diety jsou rozhodující tři faktory: zamezení separace složek krmiva kravami, zajištění nepřetržitého přístupu k TMR a pečlivé sledování obsahu vlákniny (Drackley et al. 2007).

Takto sestavené krmné dávky vedou k lepší energetické bilanci po otelení s následným zlepšením zdravotního stavu, produkce mléka a reprodukční výkonnosti (Drackley et al. 2007). Bylo zjištěno, že přechodem na vysokovláknitou a nízkoenergetickou dietu v systému TMR došlo k poklesu asistovaného telení o 53 %, k snížení výskytu poporodní parézy o 76 %, zadržení placenty o 57 %, dislokace slezu o 85 % a ketózy o 75 % (Drackley et al. 2007).

Ke stejnému zjištění došel i Beaver (2006), že krmení dojníc krmivem s vysokým obsahem vlákniny v období stání na sucho vede k výraznému zlepšení zdraví, plodnosti a užitkovosti krav.

3.4 Zdravotní stav

Pravidelné rozmnožování závisí na normální funkci reprodukčního systému. Aby se kráva pravidelně telila, musí mít funkční vaječníky, projevat estrální chování, zabřeznout, udržet embryo prostřednictvím gravidity, otelit se a obnovit estrální cyklus a funkci dělohy. Každý z těchto aspektů reprodukční funkce může být ovlivněn řízením chovu, nemocemi a genetickým pokrokem (Abdisa 2018; Nigussie 2018).

Zabřeznutí a udržení březosti do období porodu je ovlivněno několika genetickými, fyziologickými a environmentálními faktory, které lze za účelem udržení vysoké plodnosti ovlivnit. Ačkoli kauzalita není vždy zřejmá, je prokázáno, že nemoci negativně ovlivňují reprodukci u dojníc. Během časně laktace podléhají dojnice extenzivnímu tkáňovému katabolismu z důvodu negativní rovnováhy živin. Ta je spojena s metabolickými poruchami, které často vedou k nemocem, které zase dramaticky snižují produkci i reprodukční výkonnost. Negativní rovnováha živin byla spojena se zhoršenými imunitními a reprodukčními funkcemi u dojníc (Snatos & Ribeiro 2014).

Mnoho nemocí, které postihují mléčný skot, se obvykle vyskytuje v prvních dvou měsících laktace, před první inseminací po otelení. Zvýšená náchylnost k metabolickým a infekčním onemocněním spojená s porodem a nástupem laktace představuje velkou výzvu v reprodukci. K dispozici je velké množství informací ve vědecké literatuře, které spojují nemoci s depresivní reprodukci u dojníc. Bohužel jen málo studií prokázalo příčinnou souvislost mezi určitým onemocněním a plodností a je známo jen málo mechanismů, které jsou základem poklesu

březosti u dojnic, které onemocněly na počátku laktace. Je zřejmé, že u dojnic, které trpí chorobnými procesy, dochází k narušení obnovy poporodní ovulace, znesnadnění oplodnění a vývoje zárodku před uhnížděním a při uhníždění, ke zvýšení abortů a v konečném důsledku ke snížení zabřezávání na inseminaci. Tím dochází k prodloužení doby do zabřeznutí (Snatos & Ribeiro 2014).

3.4.1 Reprodukční poruchy

Reprodukční poruchy byly shledány hlavním důvodem snížené reprodukční výkonnosti u skotu. Reprodukční výkonnost je hlavním určujícím faktorem celoživotní produktivity krav. Období po porodu je v reprodukčních procesech mléčného skotu tím nejzranitelnější obdobím z hlediska zdravotních poruch. Mezi hlavní reprodukční problémy, které mají přímý dopad na reprodukční výkonnost dojnic, patří potrat, zadržení plodových obalů (zadržení lůžka), pyometra, metritida, dystokie, prolaps (výhřez děložní či vaginální) a anestrus. Tyto problémy mají za následek pomalejší involuci dělohy, snížení míry reprodukce, prodloužení servis periody a mezidobí, negativní účinek na plodnost, zvýšení nákladů na medikamenty, pokles produkce mléka, snížení počtu rozených telat a předčasné snížení výkonnosti potenciálně výkonných dojnic (Abdisa 2018; Nigussie 2018).

U 45 až 60 % dojnic po porodu a na začátku laktace dochází k významným metabolickým změnám, které navzdory přísným homeostatickým a homeoretickým kontrolám vedou k rozvinutí metabolických a infekčních onemocnění bez ohledu na úroveň produkce mléka, plemennou příslušnost či systém managementu chovu (Bisinotto et al. 2012).

Krávy po porodu nejsou schopny rychle zvýšit příjem krmiva na potřebnou úroveň, a proto podléhají závažnější negativní energetické bilanci, což zvyšuje jejich náchylnost k nemocem. Je známo, že snížený příjem živin a NEB ještě před otelením jsou spojeny se zpomalenou involucí a výskytem onemocnění dělohy po porodu (Bisinotto et al. 2012).

Wathes et al. (2007) naznačuje, že špatný stav energetické bilance je spojen s vyšším stupněm zánětu dělohy po otelení a zpomalením procesu její reparace. Ke stejným výsledkům dospěl Bicalho et al. (2016) a dále popisuje, že krávy s metritidou a s cystami na vaječníku vykazují zvýšené hladiny ketolátek v krvi.

Bisinotto et al. (2012) došel ve své studii k závěru, že krávy postižené onemocněním dělohy vykazují sníženou schopnost zabřezávání po první inseminaci a podléhají zvýšenému riziku abortů.

Klinická onemocnění jako metritida, endometritida, mastitida, pneumonie, onemocnění GIT a kulhání a subklinická onemocnění jako hypokalcémie, ketóza a negativní energetická bilance nebo jejich kombinace u postižených dojnic mají za následek prodlouženou anovulaci, výrazný pokles zabřezávání po všech inseminacích a zvýšené riziko embryonální úmrtnosti. Z toho je patrné, že nemoci v rané laktaci mají závažný dopad na plodnost dojnic. Zachování metabolické rovnováhy pro minimalizaci klinických a subklinických onemocnění může být přínosem pro plodnost dojnic (Bisinotto et al. 2012).

3.4.2 Metabolické poruchy

Poruchy metabolismu dojného skotu jsou důsledkem narušení jednoho nebo více metabolických procesů v organismu (Senthilkumar et al. 2013).

Nerovnováha energetické bilance a příjmu živin často vede k různým metabolickým poruchám, jako je steatóza jater, ketóza, bachorová acidóza, mléčná horečka a narušené imunitní funkce (zadržená placenta, metritida a mastitida). Společné účinky všech těchto poruch vedou ke snížení plodnosti a produkce mléka v krátkodobém i dlouhodobém horizontu (Wankhade et al. 2017).

Metabolická onemocnění mohou mít nepříznivé účinky na reprodukční výkonnost dojnic. Ty mohou prodloužit inseminační interval, servis periodu, zvýšit inseminační index, snížit míru zabřezávání a způsobit vyšší prevalenci porodních poruch (Paiano et al. 2019).

Krávy s metabolickým onemocněním mohou mít sníženou kontraktilitu dělohy, zhoršené vylučování očístků a zhoršenou plodnost v poporodním období. Metabolická onemocnění prodlužují proces involuce dělohy. Zpoždění involuce dělohy bylo spojeno s opožděným návratem k plnohodnotným cyklům u krav s hyperketonémií a lipomobilizací nebo také zvýšení počtu inseminací na březost u krav s hypokalcémií (Paiano et al. 2019).

Nízká reprodukční výkonnost může být spojena se skutečností, že zvířata s poruchami metabolismu mohou mít změněné složení folikulárních tekutin, což může narušit folikulární steroidogenezi a vývoj oocytů, a následně zhoršit obnovu cyklicity a plodnost. Další příčinou snížené plodnosti může být selhání vrozené imunitní reakce spojené s přítomností metabolických onemocnění, které zpomaluje proces čištění dělohy (Paiano et al. 2019).

Geneticky a hormonálně řízená mobilizace tukových tkání při NEB po otelení se dále zhoršuje nesouladem mezi potřebou energie a schopností krávy tuto energii přijmout. NEB je často ještě dále negativně ovlivňována nedostatečnou adaptací jak gastrointestinálního traktu, tak celkového intermediárního metabolismu (Crowe et al. 2018).

V přechodném období je metabolismus lipidů dojnic výrazně ovlivněn energetickým stavem. Vysoce účinná schopnost tukové tkáně ukládat energii je životně důležitá pro adaptabilitu mléčného skotu na změnu dostupnosti živin pro podporu laktace a reprodukce. Nadměrný stupeň mobilizace této tkáně je však spojen s vysokými koncentracemi cirkulujících neesterifikovaných mastných kyselin, což může mít přímé (ztučnění jater, ketóza) i nepřímé negativní účinky na reprodukční zdraví, produktivitu a riziko dalších onemocnění (Mann 2022). Indukovaná jaterní lipidóza byla spojena se zadržením placenty, ketózou, dislokovaným slezem, zhoršenou imunitní funkcí a plodností. Snížení rizika poruch souvisejících s lipomobilizací by tedy mohlo zlepšit fertilitu dojnic (Bisinotto et al. 2012).

Zdraví v přechodném období je důležitým určujícím faktorem následné produkce a reprodukčního výkonu dojnic. Na druhé straně je výskyt zdravotních problémů během přechodného období hlavním rizikovým faktorem následné produkce a reprodukčního výkonu. Hladký přechod z březosti do laktace je důležitý z hlediska vysoké produktivity a reprodukce v pozdějším období po otelení. Na druhé straně špatný přechod často vede k obrovským hospodářským ztrátám v důsledku zasažení produkce i reprodukce. Proto je pochopení příčin a důsledků metabolických změn během přechodného období velmi důležité pro řízení poporodní péče (Wankhade et al. 2017).

Je téměř nemožné odhalit příčinu zhoršené reprodukce pomocí jedné konkrétní poruchy nebo příznaku. Jelikož existuje vzájemná souvislost mezi predispozičními faktory, jako je řízení porodu a jeho hygiena, parita, fáze gravidity, výživa a životní prostředí (Abdisa 2018).

Nedostatečná znalost mechanismů společného působení jednotlivých faktorů neumožňuje chovatelům zvolit okamžitá konkrétní řešení, která by zvrátila špatnou reprodukci u krav,

u nichž se vyvinuly choroby v období okolo porodu. Existují však výjimky u metod vyvolávajících cyklicitu u anovulujících krav nebo zkrácení doby do inseminace u krav, u kterých nebyla detekována říje. Bez ohledu na lepší pochopení základní biologie špatné plodnosti nemocných krav je klíčovým přístupem provádění strategií, které zmírňují rizikové faktory predisponující krávy k nemocem. Takové zásahy zahrnují: zlepšení řízení převodů krav a jejich seskupování, správné složení krmné dávky k zabránění peripartálních onemocnění spojených s intermediárním a minerálním metabolismem. Dále to jsou strategie pro snížení poruch souvisejících s otelením a metody prevence mastitidy a kulhání. Budoucí vývoj cílových strategií ke zlepšení reprodukce krav trpících chorobami v období okolo porodu bude vyžadovat lépe porozumět narušení biologických procesů, které ohrožují vznik a udržení gravidity v této subfertilní populaci krav (Snatos & Ribeiro 2014).

3.5 Metody stanovení EB

Energetická bilance dojnic se tradičně měří dvěma způsoby: porovnáním příjmu a výdeje energie nebo změnou tělesných zásob. První metoda vyžaduje měření všech energetických vstupů (příjem krmiva) a výdejů (záchova, laktace a růst plodu), ale není v současných komerčních podmínkách proveditelná. Změna tělesných rezerv se zjišťuje měřením tělesné hmotnosti a body condition score (BCS). Stanovení tělesné hmotnosti a BCS je v praxi proveditelné, ale není příliš vhodné pro hodnocení krátkodobých změn energetického stavu, protože jak změny BCS, tak změny hmotnosti se nedokáží projevit okamžitě, ale až později v čase (Friggens et al. 2007).

Dalším přístupem k odhadu energetické bilance je analýza metabolického stavu ze vzorků krve a mléka. Bylo prokázáno, že různé metabolické a hormonální vlastnosti a složky mléka souvisí s energetickou bilancí. Je známo, že koncentrace glukózy, cholesterolu, močoviny, inzulinu, IGF-I, trijodtyroninu a tyroxinu v krevní plazmě a koncentrace laktózy a močoviny v mléce pozitivně korelují s energetickou bilancí. Naproti tomu koncentrace NEFA, kreatininu, albuminu, BHBA a růstového hormonu v krvi a acetonu, tuku, proteinu a poměru tuku a laktózy v mléce negativně korelují s energetickou bilancí dojnic (Schröder & Staufenbiel 2006).

Ale na rozdíl od krve lze vzorky mléka odebírat denně v rámci dojení, přičemž je známo, že složení mléka se mění s energetickým stavem dojnice. Dojivost a složení mléka jsou ovlivňovány mnoha faktory, včetně krmiva (např. obsah energie, tuku v menší míře obsah a kvalita bílkovin poměr píče a jádra), četnosti dojení, parity, věku, plemene, fáze laktace a tělesné kondice, kdy mohou být tělesné zásoby mobilizovány pro produkci mléka během negativní energetické bilance (Cabezas-Garcia et al. 2021).

3.5.1 Body condition score (BCS)

Hodnocení tělesné kondice (BCS) je subjektivní odhad zásob tukových tkání dojnice a funguje jako důležitý nástroj pro management dojnic. (Mishra et al. 2016).

Metoda BCS je jednou z nejpoužívanějších, neinvazivních, rychlých a nenákladných metod, která zahrnuje vizuální a kontaktní hodnocení tloušťky tukové vrstvy na různých kontrolních bodech skeletu. Na základě BCS mohou být dojnice klasifikovány do různých kategorií, které ovlivňují užitkovost zvířat. Během období stání na sucho a v době otelení by neměla mít dojnice

velmi nízké nebo velmi vysoké BCS, optimální hodnota by se měla pohybovat v rozsahu 3,25 až 3,5 bodu (Mishra et al. 2016).

Jak již bylo řečeno, hodnocení tělesného stavu u dojného skotu je vizuální a palpační hodnocení zásob tělesného tuku pomocí pětibodové stupnice s 0,25 bodovými přírůstky. Skóre tělesné kondice je nepřímým odhadem energetické bilance. Skóre 1 označuje velmi vyhublou krávu, zatímco 5 označuje krávu příliš ztučnělou a 3 představuje průměrnou tělesnou kondici. Hodnocení se zaměřuje na trup a bedra. Rozdíl hodnocení stejného zvířete různými lidmi by měl být do 0,25 bodu. BCS ovlivňuje produktivitu, reprodukci, zdraví a dlouhověkost dojnic. Vyhublost nebo nadbytek tuku mohou být zapříčiněny neadekvátní výživou, zdravotními problémy nebo nevhodným řízením stáda. Pokud se kontrola BCS provádí pravidelně, lze hodnocení stavu těla (BCS) použít pro odstranění problémů a zlepšení zdraví, dlouhověkosti a produktivity stád dojnic. Ztučnělá kráva je náchylnější k metabolickým problémům a infekcím a je pravděpodobnější, že bude mít problémy při a po otelení. Zvyšování kondice obvykle začíná během posledních tří až čtyř měsíců laktace, kdy se produkce mléka snižuje, ale energie v krmné dávce a celkové množství živin nebyly odpovídajícím způsobem sníženy. Dalšími běžnými příčinami zvýšené kondice je prodloužené stání na sucho nebo nadměrné krmení během tohoto období. Snížená kondice nebo vyhublost mohou často snížit produkci mléka a hladinu mléčného tuku kvůli nedostatečným zásobám energie a bílkovin k udržení produkce. Hubené krávy často nevykazují příznaky říje nebo nezabřezávají, dokud nezačnou znovu nabývat, nebo alespoň udržovat tělesnou hmotnost. Při krmení těchto zvířat je třeba dbát na zachování produkce při současném zvyšování tělesných zásob (Heinrich et al. 2016).

Skóre tělesné kondice obecně negativně souvisí s příjmem sušiny. To znamená, že u krav s vysokým BCS před otelením je vyšší riziko sníženého příjmu krmiva v kritickém období kolem porodu. To může vést ke ztrátě tělesné hmotnosti a prohloubit negativní energetickou bilanci krav po otelení. Snížený příjem sušiny má zjevné účinky na produkci mléka a může přispět ke ketóze, dislokaci slezu nebo jiným metabolickým a produkčním důsledkům nutričního stresu (Heinrich et al. 2016).

Jak již bylo řečeno Změna BCS u dojnic je považována za ukazatel rozsahu a trvání poporodní negativní energetické bilance. Obecně platí, že dojnice podléhají negativní energetické bilanci po dobu asi 2 až 4 měsíců po otelení. Z důvodu zvýšených požadavků na živiny pro záchovu, fyzickou aktivitu, laktaci a růst (zejména u prvotetek), nejsou dojnice schopny pokrýt energetické potřeby z krmiva. V reakci na energetický deficit krávy mobilizují tukové rezervy. Během laktace se příjem sušiny zvyšuje pomaleji než produkce mléka, to je důvodem prohloubení NEB (Bastin & Gengler 2013).

Proto tedy během rané laktace obecně BCS vykazuje klesající trend. Jakmile se kráva zotaví z negativní energetické bilance, začne zvyšovat svoje BCS během střední a pozdní laktace.

Pravidelné sledování tělesné kondice dojnic poskytuje informace pro nápravná opatření v managementu chovu, a tak může pomoci zlepšit produkční profil zvířete. Vzhledem k tomu, že vzorce změny BCS jsou pod genetickými vlivy, není tedy zvýšení či snížení BCS u všech krav stejné (Mishra et al. 2016).

Změna BCS během laktace má nižší dědivost, odhady heritability úrovně BCS se pohybují od 0,20 do 0,50. Bylo prokázáno že, se dědivost BCS v druhé polovině laktace zvyšuje, což naznačuje, že genetické rozdíly spíše souvisí se schopností krávy zotavit se ze stavu negativní energetické bilance (Bastin & Gengler 2013).

Křivky BCS a produkce mléka jsou často zrcadlovými obrazy. Tudíž krávy produkující nejvíce mléka zažívají největší změnu tělesného stavu a nejnižší BCS v časně laktaci. Vliv BCS na produkci mléka však není lineárním vztahem. Krávy s BCS 3,0 až 3,5 při otelení produkují více mléka než ty, které se otelí buď s nižším, nebo vyšším skóre. Tato skutečnost může být způsobena zvýšením energie dostupné z tělesných zásob až do BCS 3,5 a negativními účinky BCS na příjem sušiny nad tímto bodem. Lze obvykle očekávat, že se krávám sníží BCS během prvních 60 dnů po otelení. Obecně se doporučuje, aby snížení BCS po otelení bylo co nejmenší, ne více než 0,5 až 1,0 bodového skóre, s maximálním snížením o 1,5 bodu (Heinrich et al. 2016).

Geneticky hodnotnější dojnice z hlediska produkce mléka mají tendenci mít nižší BCS zejména během laktace. Tyto dojnice spotřebovávají více energie na produkci mléka a méně energie na tvorbu tělesných rezerv. To může souviset s negativní genetickou korelací mezi produkcí mléka, tuku, bílkovin a BCS. Bylo prokázáno, že pokles BCS na začátku laktace koreluje s horší plodností. BCS v časně laktaci bylo jedním z nejužitečnějších kritérií při výběru z hlediska korelovaného zlepšení schopnosti krávy obnovit svou reprodukční aktivitu po porodu (Bastin & Gengler 2013).

Berry et al. (2003) uvedl, že BCS může sloužit jako prediktor pro odhadovanou plemennou hodnotu plodnosti, i když s přesností ne větší než genetická korelace mezi BCS a vlastností plodnosti.

Protože přímý výběr ke zlepšení plodnosti může být komplikován několika faktory, výběr pro vyšší hladiny BCS, zejména v polovině laktace, se zdá být dobrou možností, jak nepřímo zlepšit plodnost dojnic (Bastin & Gengler 2013).

Energetická bilance hraje velmi důležitou roli v reprodukčním výkonu a současná i minulé energetická bilance ovlivňuje reprodukční schopnost krávy. Větší změna BCS mezi otelením a prvním zapouštěním a nízké BCS při inseminaci je spojeno se sníženou schopností zabřezávat. Několik studií však ukázalo, že změny krmné dávky nebyly schopny překonat ztrátu BCS v časně laktaci, což znamená, že primárním způsobem ovlivnění BCS v chovu je řízení BCS před otelením (Heinrich et al. 2016).

Úprava průměrného BCS by měla být dlouhodobým projektem a neměla by být prováděna během období stání na sucho (Drackley & Cardoso 2014).

Existuje několik studií, které poskytují dobré příklady dopadu BCS na reprodukci. V jedné z nich byly sledovány tři skupiny zasušených krav, aby byl stanoven vliv tělesné kondice během období stání na sucho na následnou reprodukční výkonnost. Krávy s nejvyšším BCS při otelení ztratily nejvíce tělesné hmotnosti v prvních 5 týdnech laktace. Tyto krávy měly delší interval k první ovulaci, vyšší počet dní do první říje a zabřeznutí, a nejnižší procento zabřezávání po první inseminaci. Ztráta tělesné hmotnosti během časně gravidity byla také spojena se zvýšenou embryonální úmrtností (Heinrich et al. 2016).

Jak hluboká, tak dlouhotrvající negativní energetická bilance zjevně dobře koreluje s nižšími hodnotami BCS a je spojena s prodlouženým anestrem, s nižší kvalitou oocytů a později embryí, tedy s nižší plodností (Bertoni et al. 2009).

Carvalho et al. (2014) uvádí, že některé z účinků NEB během časněho poporodního období zahrnují snížení časněho vývoje embrya. Nejmarkantnější výsledek jeho studie ukázal, že krávy s největší ztrátou BCS měly téměř 50 % embryí degenerovaných ve srovnání se skupinami krav s menší ztrátou BCS, u kterých bylo detekováno cca 80 % embryí dobré kvality. To značí, že

nejvyšší pokles tělesné hmotnosti během časného poporodního období souvisí se zvýšenou incidencí poruch vývoje embrya.

3.5.2 Poměr tuku a bílkovin v mléce (FPR)

Další možností, která byla navržena pro stanovení energetické bilance, je změna složení mléka, přesněji změny obsahu mléčného tuku a bílkovin (Friggens et al. 2007).

Je známo, že poměr tuku k bílkovinám (FPR) je geneticky negativně korelován s energetickou bilancí a získal značnou pozornost studií, které naznačují, že FPR má robustnější vztah s energetickou bilancí na začátku laktace než individuální měření obsahu tuku a bílkovin (Cabezas–Garcia et al. 2021).

Poměry mezi složkami mléka, včetně poměru tuku a bílkovin, byly navrženy jako indikátory energetické bilance během časně laktace. Biologický základ FPR jako indikátoru energetické bilance se opírá o dvě tendence. A to že, při nedostatku přijímané energie se obsah tuku v mléce zvyšuje a obsah mléčné bílkoviny se snižuje podle stupně negativní energetické bilance (Cabezas–Garcia et al. 2021).

Koncentrace mléčné bílkoviny je také významným prediktorem, ale sama o sobě má relativně malou vypovídající hodnotu o stavu energetické bilance. Procento mléčné bílkoviny pozitivně koreluje s příjmem energie, proto se nízký příjem energie projeví vyšším poměrem tuku k bílkovinám (Heuer et al. 2000).

Ve své studii Heuer et al. (2000) uvádí, že se vysoký poměr tuku k bílkovinám během 3.–7. týdne laktace shodoval se závažnějším stavem NEB.

FPR v mléce mezi 1,0 a 1,5 je obecně považována za „standardní hodnotu“, která představuje normální fyziologické podmínky u holštýnských krav, zatímco FPR mimo tento rozsah je spojován s výskytem metabolických a zdravotních poruch, často během časně laktace (Cabezas–Garcia et al. 2021).

Toni et al. (2011) došel ve své studii k závěru, že FPR, které je větší než 1,5 ukazuje na nedostatek přijaté energie.

Krávy s FPR vyšším než 1,5 v rané laktaci produkovaly více mléka, ale vykazovaly špatnou reprodukční výkonnost. Autoři dospěli k závěru, že nádoj a FPR na počátku laktace byly spolehlivějšími prediktory poruch plodnosti, metabolických a jiných onemocnění než stupeň a ztráta BCS (Toni et al. 2011).

Dále Cabezas–Garcia et al. (2021) tvrdí, že dojnice s FPR vyšším než 1,5 jsou ohroženy zvýšeným rizikem ketózy, dislokace slezu, cyst na vaječnicích, kulhání a mastitidy, zatímco u krav s FPR nižším než 1,0 bylo zjištěno zvýšené riziko subakutní bachorové acidózy, pro kterou je charakteristický pokles tuku v mléce (Plaizier et al. 2008; Cabezas–Garcia et al. 2021).

3.6 Embryotransfer

Mnohonásobné opakování inseminace z důvodu nezabřezávání je závažnou poruchou reprodukce u mléčného skotu. Důvody opakované inseminace mohou být multifaktoriálním problémem, a však mnoho studií uvádí jeho dvě hlavní příčiny. Jsou to selhání oplození vajíčka nebo předčasná embryonální odúmrť zapříčiněná především špatnou kvalitou oocytů

a neadekvátním prostředím dělohy. Selhání oplodnění může být také způsobeno chromozomálními abnormalitami, tepelným stresem či endokrinními problémy vyvolanými vysokou produkcí mléka nebo nevyváženou výživou. Existují některé studie potvrzující, že oocyty u krav, které opakovaně nezabřezávají, mají horší kvalitu. A právě tento deficit kvality oocytů brání oplození nebo způsobuje úmrtnost embryí (Nowicki 2020).

Kráva za svůj život přirozeně porodí asi 8 až 10 telat. Ale díky embryotransferu je možné získat až 32 embryí na krávu za rok ve srovnání s konvenčním způsobem chovu. Embryo transfer je proces, při kterém je embryo odebráno od dárkyně a poté přeneseno do dělohy příjemkyně, kde embryo dokončí svůj vývoj (Mebratu et al. 2020).

Embryotransfer je proces, který může významně zvýšit počet potomků od geneticky významných zvířat. Jedná se o vícefázový postup zahrnující superovulaci, synchronizaci dárkyň a příjemkyň, inseminaci dárkyně, odběr embryí, jejich izolaci, hodnocení, genetické testování a zmrazení či přímý transfer embrya. Embryotransfer je nejkratší cesta ke genetickému pokroku, zkrácené generačního intervalu a zvýšení intenzity selekce dojnic (Ciornei 2021).

Přenos embryí skotu se široce používá v reprodukci nejcennějších samic s vysokou užitkovostí ve stádě a vytvoření geneticky lepších zvířat. Ročně se ve světě vyprodukuje asi 750 000 embryí od superovulovaných dárkyň a více než 450 000 embryí produkovaných pomocí technik *in vitro*. Embrya jsou navíc nejbezpečnější a nákladově nejefektivnější alternativy k mezinárodnímu přenosu genetiky, kvůli jejich nízkému riziku přenosu infekčních nemocí a genetických vad. (Bó & Mapletoft 2013; Nowicki 2020; Ciornei 2021).

Většinu dárkyň embryí tvoří dojnice s nadprůměrnou produkcí mléka nebo dojnice produkující zdravá telata s vysokou hmotností po odstavu (Curtis 2015).

Výběr dárkyň by měl být založen na třech kritériích: genetické nebo fenotypové nadřazenosti, dobré reprodukční schopnosti (hodnocené veterinárním lékařem) a tržní hodnotě potomstva. Zvířata geneticky nadřazená, která přispívají ke splnění šlechtitelských cílů a mají vysokou pravděpodobnost produkce velkého počtu použitelných embryí, patří mezi dvě základní kritéria pro výběr krav donorek většiny programů přenosu embryí (Mebratu et al. 2020).

Ciornei (2021) uvádí, že dárkyně musí být v dobré fyzické kondici, mít průměrné BCS, dobrý zdravotní stav, být alespoň 50 až 60 dnů po otelení a vykazovat pravidelné cykly. Obecně platí, že krávy s anamnézou reprodukčních problémů, i těch méně závažných, nejsou vhodnými kandidáty pro produkci embryí.

Jedním z nejdůležitějších, a však nedoceněných aspektů úspěšného embryotransferu je výběr příjemkyně. Perspektivními příjemkyněmi jsou krávy, které vykazují dobré reprodukční zdraví a snadno se telí (Mebratu et al. 2020).

Příjemkyně by neměla být březí, musí mít obnovenou ovariální aktivitu (minimálně dva normální cykly) a mít corpus luteum alespoň na jednom z vaječnicků. Aby mohlo dojít k úspěšnému zabřeznutí, měla by být děloha (endometrium) příjemkyně ve stejné fázi cyklu jako děloha donorky. Proto se provádí synchronizace říje. I když je cílem dokonalá synchronizace, za akceptovatelné lze brát rozdíl ve fázi cyklu o 24 hodin. To znamená, že 7denní embryo může být přeneseno do příjemkyně, která měla říji o jeden den dříve či později než dárkyně. A však embrya nižší kvality jsou na asynchronii daleko citlivější. Dojnice mohou být synchronizovány pomocí GnRH a prostaglandinu F2 α či jeho analogů nebo lze použít CIDR (Ciornei 2021).

Za přirozených fyziologických podmínek uvolní kráva během jednoho reprodukčního cyklu jediný oocyt. V případě embryotransferu se využívá uměle vyvolaný proces nazývaný se superovulace (Curtis 2015).

Superovulace je vlastě uvolnění více oocytů během jedné říje, pomocí hormonální stimulace. Při správném hormonálním ošetření dochází k uvolnění 6 až 10 vajíček (Thalkar 2018).

Cílem superovulační léčby u krávy je získat maximální počet oplodněných a přenosuschopných embryí. Výsledek této hormonální stimulace je ovlivněn mnoha faktory, jako jsou věk, plemenná příslušnost, fáze laktace, výživa, roční období či fáze cyklu, ve které se léčba provádí (Ciornei 2021).

Základním principem superovulace je stimulace vývoje folikulů pomocí hormonálních přípravků, které se podávají intramuskulárně nebo subkutánně (Selk 2002).

Folikuly stimulující hormon (FSH) vyžaduje injekce dvakrát denně po dobu 4 až 5 dnů. Zatímco syntetické hormony jako PMSG se podávají v jedné dávce (Ciornei 2021).

Vajíčka spontánně ovulují ze superovulovaných vaječníků po dobu přibližně dvanácti hodin, počínaje 24 hodin po začátku říje. Z tohoto důvodu musí být dárkyně inseminována minimálně dvakrát. Poprvé 12 hodin po začátku říje, podruhé 12 hodin po první inseminaci (Curtis 2015). Selk (2002) doporučuje provádět inseminaci dárkyň celkem třikrát a to 12, 24 a 36 hodin od začátku estru.

V závislosti na kvalitě zmrazeného/sexovaného spermatu lze pro každou inseminaci použít dávku s vyšší koncentrací spermií nebo dokonce dávku dvojnásobnou (Ciornei 2021).

Sedmý den po inseminaci se ještě před odběrem embryí stanovuje počet žlutých tělísek na vaječnicích. Tento krok se provádí, aby byla vyloučena zvířata, která nereagovala na superovulační léčbu (žádné corpus luteum). U takových zvířat se výplach neprovádí. Před samotným zákrokem dárkyním bývá podána epidurální anestezie, poté se u nich myje a dezinfikuje oblast konečníku a vulvy. K výplachu embryí se používá vyplachovací katetr s latexovým balónkem. Katetr se zavádí přes krček a tělo děložní až do děložního rohu, kde je roh utěsněn balónkem a provádí se výplach vyplachovacím médiem. Výplach se provádí opakovaně až do spotřeby 300–800 ml média. Poté jsou embrya přefiltrována a hodnotí se jejich vývoj a kvalita. Přenosuschopná embrya jsou obvykle co nejdříve přenesena do příjemkyň (Ciornei 2021).

Bezprostředně před přímým přenosem se jednotlivá embrya odsají do sterilní 0,25ml pejety, tak jsou připravena k samotnému přenosu do příjemkyně. Pro přenos embrya u dojníc je preferována nechirurgická metoda. Příjemkyně jsou zafixovány, je u nich navozena epidurální anestezie, jsou omyty v oblast vulvy a konečníku a dezinfikovány. Embrya krav se přenáší podobným způsobem jako při provádění umělé inseminace s tím rozdílem, že jsou přenesena až do jednoho z děložních rohů podle toho, na které straně se nachází žluté tělísko na vaječniku (Ciornei 2021).

3.7 Hodnocení vývoje a kvality embryí

Jedním z nejdůležitějších faktorů spojených s úspěchem a širokou aplikací embryotransferu je hodnocení embryí před zmrazením nebo přenosem do příjemkyně. Embrya jsou obvykle klasifikována na základě systému číselných kódů podle stádia vývoje (1 až 9) a podle kvality (1 až 4) (Bó & Mapletoft 2013).

Je důležité umět rozpoznat různá stádia vývoje embryí a porovnat je s vývojovou fází, ve které by se měla embrya nacházet v den estrálního cyklu, kdy jsou dárkyni odebírána (tj. obvykle 7. den po říji). Rozhodnutí, zda je embryo hodno transferu nebo zmrazení a jestli je embryo způsobilé pro export, závisí na odbornosti a zkušenostech osoby, která embrya hodnotí (Bó & Mapletoft 2013).

Standardizované číselné kódy pro popis stadia vývoje a kvality embrya jsou uvedeny v kapitole 9 a znázorněny v příloze D příručky IETS. Kód pro stádium vývoje je číselný, v rozsahu od 1 (neoplozený oocyt nebo jednobuněčné embryo) až po 9 (expandující vylíhnutá blastocysta) (Bó & Mapletoft 2013).

Mezi hlavní kritéria hodnocení kvality obecně patří pravidelnost tvaru embrya, kompaktnost blastomer, změny velikosti buněk, barva a struktura cytoplazmy, celkový průměr embrya, přítomnost extrudovaných buněk, tloušťka a pravidelnost zóny pellucidy a přítomnost vezikul (Mebratu et al. 2020).

U superovulových krav existuje značný rozsah vývojových stádií embryí v jakýkoliv konkrétní den po říji. Sedmý den po estru se mohou ve stejném výplachu vyskytovat např. stádia moruly a líhnoucí se blastocysty, zároveň mohou existovat embrya vynikající kvality nebo také neoplozená či degenerovaná embrya. Obecně platí, že velké rozdíly v kvalitě embryí a fázích vývoje jsou signálem pro nižší míru zabřezávání. Embrya vynikající a dobré kvality ve vývojových stádiích kompaktní moruly až blastocysty poskytují nejvyšší míru březosti (Bó & Mapletoft 2013).

Hodnocení bovinních embryí se běžně provádí stereomikroskopem při 50 až 100násobném zvětšení s embryem v malé zadržovací misce. Embryo je nutné umístit na dno misky, tak aby bylo vidět embryo a zóna pellucida z různých perspektiv. Průměr embrya je 150 až 190 μm , včetně tloušťky zóny pellucidy, která má 12 až 15 μm . Celkový průměr embrya zůstává prakticky nezměněn od jednobuněčného stadia až do stadia blastocysty. Nejlepším prediktorem životaschopnosti embrya je dosažený stupeň vývoje vzhledem k tomu, jaký by měl být v daný den po ovulaci. Ideální embryo je kompaktní a kulovité. Blastomery by měly být stejnobarevné a mít podobnou velikost a strukturu. Cytoplazma by neměla obsahovat řádná granula nebo vezikuly. Perivitellinní prostor by měl být čistý a neměl by obsahovat žádné buněčné zbytky. Zona pellucida by měla být jednotná bez prasklin, prohlubní a povrchových nečistot (Bó & Mapletoft 2013).

Vývojová stádia

Stádium 1 1 (neoplozený oocyt)

Stádium 2 (fragmentované embryo): 2 až 12 buněk

Stádium 3 (morula): Má alespoň 16 buněk, jednotlivé blastomery jsou od sebe obtížně rozeznatelné. Buněčná hmota embrya zabírá většinu perivitellinního prostoru.

Stádium 4 (kompaktní morula): Jednotlivé blastomery se spojují a tvoří kompaktní hmotu. Hmota embrya zabírá 60 až 70 % perivitellinního prostoru.

Stádium 5 (časná blastocysta): Vytváří se blastocéla naplněná tekutinou uvnitř blastocysty. Embryo zabírá 70 až 80 % perivitellinního prostoru. Na počátku této fáze je hodnocení kvality obtížné, protože nelze odlišit vnitřní buněčnou hmotu od buněk trofoblastu.

Stádium 6 (blastocysta): V této fázi je patrná výrazná diferenciací vnější vrstvy trofoblastu a tmavší, kompaktnější buněčné hmoty uvnitř blastocely. Embryo zabírá většinu perivitellinního

prostoru. V této fázi vývoje je možná vizuální diferenciaci mezi trofoblastem a vnitřní buněčnou hmotou.

Stádium 7 (expandovaná blastocysta): Celkový průměr embrya se dramaticky zvětšuje, současně dochází ke ztenčení zóny pellucidy na přibližně jednu třetinu její původní tloušťky.

Stádium 8 (vylíhnutá blastocysta): U embryí za optimálních podmínek v této vývojové fázi dochází k degradaci a zániku zóny pellucidy. Vylíhlé blastocysty kulovitého tvaru s dobře definovanou blastocélou mohou nidovat a dále se adekvátně vyvíjet. A však deformované vylíhnuté blastocysty mohou podléhat vývojovým vadám

Stádium 9 (expandující vylíhnutá blastocysta) (Bó & Mapletoft 2013).

Stupně kvality

Stupeň 1 (výborná): Embrya jsou symetrická, kulovitého tvaru, jednotlivé blastomery mají stejnou velikost, barvu a hustotu jednotlivých buněk. Alespoň 85 % buněčného materiálu by měla tvořit intaktní, životaschopná embryonální hmota s relativně malými nepravidelnostmi. Zóna pellucida by měla být hladká.

Stupeň 2 (dobrá): Tato embrya mají více nepravidelností, než embrya výborné kvality (tvar embryonální hmoty, velikost, barva a hustota jednotlivých buněk). Nejméně 50 % embryonální hmoty by mělo být neporušeno. Přežitelnost těchto embryí při zmrazení a rozmrazení je nižší než u embryí 1. stupně, ale míra zabřezávání je adekvátní za předpokladu, že jsou embrya přenesena čerstvá a do vhodných příjemců. Proto se tato embrya často nazývají „přenosuschopná“, ale nikoli „zmrazitelná“.

Stupeň 3 (dostatečná): Ve tvaru embryonální hmoty, velikosti, barvě a hustotě jednotlivých buněk vykazují tato embrya velké nepravidelnosti. Minimálně 25 % hmoty embrya musí být neporušených. Dostatečná embrya nelze použít pro kryokonzervaci, protože ji nepřežijí, ale lze je využít čerstvá. Míra zabřezávání těchto embryí je ale nižší než u embryí dobré kvality.

Stupeň 4 (nevyhovující): Mohou to být oocyty, jednobuněčná, degenerující nebo mrtvá embrya, která nejsou životaschopná a měla by být vyřazena (Bó & Mapletoft 2013).

4 Materiály a metody

4.1 Popis ustájení a podmínek prostředí

Pokus byl proveden na jedné farmě dojeného skotu ve Středočeském kraji. Tento podnik je situován v suché, mírně teplé bramborářské oblasti. Do hodnocení bylo zahrnuto 59 krav holštýnského skotu (22 krav na první laktaci, 15 krav na druhé laktaci, 13 krav na třetí laktaci, 7 krav na čtvrté laktaci a 2 krávy na páté laktaci) v průměru 81,05 dnů po otelení (intervalu 32 až 123 dnů po otelení). Dojnice byly ustájeny v halách s volným boxovým systémem ustájení, které bylo doplněno krytým venkovním krmištěm. Boxová lože byla stlána separátem z kejdy. Podle užitkovosti a fáze reprodukce byly dojnice vybrány z několika skupin (po cca 100 kusech z celkového počtu dojnic na farmě). Dojení v podniku probíhalo 2x denně. Krmivo bylo dojnícím předkládáno 2x denně, po ranním a večerním dojení. Během dne bylo krmivo pravidelně přihrnováno. Složení krmné dávky bylo upravováno v závislosti na výši mléčné užitkovosti a fázi reprodukčního cyklu.

4.2 Sběr dat

Sledování výtěžnosti embryí probíhalo v šesti různých turnusech, a to v období od března do listopadu v rámci jednoho kalendářního roku (embya nebyla vyplachována v nejteplejších měsících roku – tedy v červenci a srpnu, pro eliminaci vlivu teplot).

Všechna vybraná zvířata byla před zahájením přípravy na embryotransfer sonograficky vyšetřena a v případě nálezu žlutého tělíska (CL) byla zařazena do schématu hormonálního ošetření. V případě pozitivního nálezu a zařazení do pokusu byla u těchto plemenic nejprve injekčním podáním analogu PGF2 α – Oestrophanu (Bioveta a.s., Ivanovice na Hané, CZE) v dávce 0,5 μ g PGF2 α provedena synchronizace říje (0. den).

Následně byla 3. den provedena kontrola vývoje CL a všechny dárkyně, které se nacházely v 13. až 16. dni pohlavního cyklu byly superovulovány aplikací preparátu FSH – Pluset® (Laboratorios Callier, Barcelona, ESP) a to podáváním vždy ráno a večer po dobu čtyř dnů, přičemž dávka se postupně snižuje a 4. den aplikace probíhá už pouze ráno. 15. den od zahájení superovulačního ošetření byl za účelem detekce říje znovu podán Oestrophan (Cloprostenol).

Příznaky říje všech donorek se projeví 16. až 17. den od začátku pokusu. 12 hodin po zjištění říjí se všechny dárkyně inseminovaly předem rozmraženou inseminační dávkou. Následně u každé ošetřené krávy proběhly tři reinseminace v intervalu 12 hodin. K reinseminaci každé dárkyně byla vždy použita dávka od stejného býka, vyrobená ve stejné šarži jako při první inseminaci. Rovněž samotné inseminace a reinseminace prováděl vždy stejný technik.

Výplach kraniální části děložních rohů za účelem zisku embryí byl proveden 7. den od první inseminace. K výplachu jednoho rohu bylo použito 300 ml klasického výplachového média doplněného o Krebs–Ringer fosfát s 1 % inaktivovaného bovinního séra (Bioniche, Ontario, CAN). Vypláchnutá vajíčka a embrya byla izolována a přenesena do kultivačního média pufrovaného fosfátem (PBS) s přísadkou 20 % fetálního telecího séra (FCS, Gibco BRL, USA).

Získaná embrya byla následně za použití stereomikroskopu morfologicky hodnocena. Hodnocena byla reakce vaječníků samostatně na levém a pravém vaječniku, počty jednotlivých

fází embryí – nediferenciované (Ne), fragmentované (Fr), morula (Mo), velmi časná blastocysta (VcBl), blastocysta (Bl), dále pak celkový počet vypláchnutých a přenosuschopných embryí. Pro hodnocení metabolického stavu bylo provedeno hodnocení tělesné kondice s využitím 5–ti bodové stupnice s odchylkou na 0,25 bodů. Průměrná tělesná kondice u hodnocených plemenic byla 2,84 bodu (rozpětí hodnot 2 až 5 bodů). Dále byla v rámci hodnocení využita data z kontroly mléčné užitkovosti a provozní data z „in line real time“ mléčných analyzérů (Afilab, Afifarm, Israel). Sledován byl denní nádoj v kg a obsah pevných složek (především tuk a bílkovina v %), ze kterých byl následně vypočítán poměr tuk/bílkovina. Průměrný nádoj u krav se v době provozního sledování pohyboval okolo 30,44 kg s rozpětím 16,7 kg až 48,3 kg.

Poměr tuk/bílkovina v mléce byl hodnocen ve třech časech, 25 dnů před výplachem, 11 dnů před výplachem a 3 dny po výplachu. Mezi zvířaty byla v rámci tohoto ukazatele energetické bilance, resp. úrovně metabolismu poměrně velká variabilita 0,79 až 1,83. Nejvyšší průměrná hodnota 1,2 byla pozorována v čase 25 dnů před výplachem. Tato hodnota postupně klesala, přes 1,18 v čase 11 dnů před výplachem až po 1,12 v čase 3 dny po výplachu.

4.3 Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení výsledků byl použit program SAS 9.3 (SAS/STAT® 9.3, 2011). Pro stanovení základních parametrů souborů byla využita procedura UNIVARIATE. Pro stanovení vzájemných korelací byla využita procedura CORR. Pro vlastní vyhodnocení bylo uvažováno, že všechny proměnné mají normální rozdělení.

Pro vlastní vyhodnocení efektů byla použita procedura GLM, s následným detailním vyhodnocením pomocí Tukey–Kramerova testu. Modelová rovnice pro vyhodnocení obsahovala fixní efekty pořadí laktace, skupiny poměru tuk/bílkovina v mléce 11 dnů před výplachem, skupinu velikosti vaječníků, lineární regresy na dny v mléce a nádoj. Efekt pořadí laktace byl nastaven na tři hladiny (1 laktace, $n = 22$; 2 laktace, $n = 15$; 3 a další laktace, $n = 22$). Poměr tuk/bílkovina v mléce 11 dnů před výplachem (nejblíže odpovídá metabolickému stavu zvířat) byl rozdělen na skupiny do 1,1 ($n = 16$); 1,1 – 1,3 ($n = 25$) a nad 1,3 ($n = 18$). Velikost vaječníků byla rozdělena do skupin – malé (do 2 cm, $n = 18$), středně velké (3–4 cm, $n = 29$) a velké (5 a více cm, $n = 12$).

5 Výsledky

V tabulce č.3 jsou uvedeny základní statistické charakteristiky proměnných.

Z tabulky je patrné, že levý vaječník vykazoval mírně nižší počty žlutých tělísek v porovnání s pravým vaječníkem. Z vývojových stádií embryí byl nejvyšší podíl morul ($\bar{x} = 1,97$), druhá nejvyšší hodnota byla pozorována u počtu fragmentovaných embryí ($\bar{x} = 1,14$). Průměrné hodnoty ostatních fází embryí byly významně nižší. Při výplachu bylo průměrně získáno 3,98 embryí od jedné dojnice a z toho bylo 2,78 schopných přenosu.

Tabulka 3 Základní statistické charakteristiky proměnných

proměnná	n	\bar{x}	s	min.	max.	s.e.	V (%)
BCS	59	2,84	0,67	2	5	0,09	23,51
laktace	59	2,19	1,17	1	5	0,15	53,36
CLPv	59	3,66	2,55	0	10	0,33	69,66
CLLv	59	3,41	2,50	0	10	0,33	73,36
N	59	0,31	0,59	0	2	0,08	194,91
Fr	59	1,14	2,07	0	12	0,27	182,43
Mo	59	1,97	1,99	0	9	0,26	101,27
VcBl	59	0,34	0,73	0	3	0,10	216,43
Bl	59	0,24	0,80	0	4	0,10	335,13
Σ embryí	59	3,98	4,36	0	24	0,57	109,58
DIM	59	81,05	19,79	32	123	2,58	24,42
nádoj	59	30,44	7,86	16,7	48,3	1,02	25,83
KU100	59	3323,32	705,39	1914	4891	91,83	21,23
FPR1	59	1,20	0,19	0,85	1,83	0,02	15,67
FPR2	59	1,18	0,17	0,81	1,48	0,02	14,27
FPR3	59	1,12	0,17	0,79	1,43	0,02	15,45
výplach	59	3,95	4,35	0	24	0,57	110,12
přenosu	59	2,78	2,75	0	10	0,36	98,88

BCS = body condition score; laktace = pořadí laktace; CLPv = počet corpus luteum na pravém vaječníku; CLLv = počet corpus luteum na levém vaječníku; N = počet získaných nediferencovaných embryí; Fr = počet získaných fragmentovaných embryí; Mo = počet získaných embryí ve stádiu moruly; VcBl = počet získaných embryí ve stádiu časných blastocyst; Bl = počet získaných blastocyst; Σ embryí = celkový počet embryí; DIM = days in milk; nádoj = denní nádoj; KU100 = 100 denní užitkovost v kontrole mléčné užitkovosti; FPR1 = poměr tuk/bílkoviny 25 dnů před výplachem; FPR2 = poměr tuk/bílkoviny 11 dnů před výplachem; FPR3 = poměr tuk/bílkoviny 3 dny po výplachu; výplach = počet vypláchnutých embryí; přenosu = počet přenosuschopných embryí; n = počet případů; min. = minimum; max. = maximum; \bar{x} = aritmetický průměr; s = standardní odchylka; s.e. = standardní chyba aritmetického průměru; V (%) = variační koeficient

Jak je patrné z tabulky č.4 skupina velikosti vaječníků kladně koreluje s DIM ($P < 0,05$) a s počtem vypláchnutých a přenosuschopných embryí ($P < 0,001$). Negativně korelována je skupina velikosti vaječníků s nádojem, FPR2 a FPR3 ($P < 0,05$).

Počty CLPv a CLLv kladně korelují s DIM ($r = 0,387$; resp. $r = 0,415$, $P < 0,05$) a s počtem vypláchnutých ($r = 0,574$; resp. $r = 0,648$, $P < 0,001$) a přenosuschopných embryí ($r = 0,491$; resp. $r = 0,550$, $P < 0,001$), dále je množství CL negativně korelováno s FPR2 ($P < 0,05$). CLPv vykazuje negativní vztah k nádoji ($P < 0,05$), stejně jako CLLv ($r = -0,445$, $P < 0,001$). CLPv záporně koreluje s FPR3 ($r = -0,467$, $P < 0,001$) a také CLLv negativně koreluje s FPR3 ($P < 0,05$).

Počet nediferenciovaných embryí vykazuje průkaznou kladnou korelaci pouze s počtem vypláchnutých embryí ($r = 0,453$, $P < 0,001$).

Počet Fragmentovaných embryí vykazuje pozitivní vztah s počtem vypláchnutých a přenosuschopných embryí ($r = 0,868$; resp. $r = 0,563$, $P < 0,001$). Dále kladně koreluje s DIM ($r = 0,462$, $P < 0,001$).

Počty morul stejně jako fragmentovaných embryí pozitivně korelují s DIM a s počtem vypláchnutých a přenosuschopných embryí ($r = 0,511$; $r = 0,884$; $r = 0,878$, $P < 0,001$). Negativní vztah je pozorován u morul k FPR2 ($r = -0,428$, $P < 0,001$) a FPR3 ($P < 0,05$).

Množství velmi časných blastocyst vykazuje kladnou korelaci s DIM ($P < 0,05$) a s počtem vypláchnutých a přenosuschopných embryí ($r = 0,519$; resp. $r = 0,636$, $P < 0,001$). Dále mají počty velmi časných blastocyst negativní vztah s nádojem a FPR2 ($P < 0,05$). Počty blastocyst vykazují pouze negativní korelaci k FPR3 ($P < 0,05$).

Celkový počet embryí má kladný vztah k DIM a k počtu vypláchnutých a přenosuschopných embryí ($r = 0,569$; $r = 0,996$; $r = 0,851$, $P < 0,001$). Naopak vykazuje zápornou korelaci k FPR2 a FPR3 ($P < 0,05$).

Tabulka 4 Hodnoty korelací a průkaznosti sledovaných parametrů

		BCS	laktace	DIM	nádoj	KU100	FPR1	FPR2	FPR3	výplach	přenosu
skvelvaj	r	0,038	-0,143	0,279	-0,338	-0,207	-0,144	-0,284	-0,369	0,561	0,526
	P	0,778	0,28	0,032	0,009	0,116	0,277	0,03	0,004	<0,001	<0,001
	n	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
CLPv	r	0,051	-0,042	0,387	-0,422	-0,146	-0,235	-0,331	-0,467	0,574	0,491
	P	0,702	0,751	0,003	0,001	0,271	0,073	0,01	0,001	<0,001	<0,001
	n	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
CLLv	r	0,218	0,039	0,415	-0,445	-0,24	-0,164	-0,283	-0,334	0,648	0,55
	P	0,097	0,772	0,001	0,001	0,067	0,214	0,03	0,01	<0,001	<0,001
	n	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
N	r	-0,07	-0,083	0,07	0,168	0,025	-0,132	-0,127	-0,163	0,453	0,221
	P	0,601	0,53	0,596	0,204	0,848	0,319	0,34	0,216	<0,001	0,092
	n	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
Fr	r	-0,056	0,096	0,462	-0,052	-0,006	-0,104	-0,159	-0,045	0,868	0,563
	P	0,676	0,468	0,001	0,696	0,966	0,433	0,23	0,733	<0,001	<0,001
	n	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
Mo	r	0,061	0,025	0,511	-0,133	-0,016	-0,209	-0,428	-0,354	0,884	0,878
	P	0,648	0,851	<0,001	0,316	0,905	0,112	0,001	0,006	<0,001	<0,001
	n	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
VcBl	r	-0,01	0,167	0,381	-0,313	-0,214	-0,154	-0,344	-0,127	0,519	0,636
	P	0,941	0,207	0,003	0,016	0,104	0,245	0,008	0,339	<0,001	<0,001
	n	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
Bl	r	0,025	-0,011	0,233	-0,085	-0,036	-0,049	-0,183	-0,257	0,173	0,253
	P	0,854	0,932	0,076	0,52	0,789	0,71	0,167	0,05	0,19	0,053
	n	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
Σ embryí	r	-0,005	0,072	0,569	-0,131	-0,049	-0,198	-0,379	-0,273	0,996	0,851
	P	0,968	0,589	<0,001	0,325	0,713	0,134	0,003	0,036	<0,001	<0,001
	n	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59

BCS = body condition score; laktace = pořadí laktace; DIM = days in milk; nádoj = denní nádoj; KU100 = 100 denní užitkovost v kontrole mléčné užitkovosti; FPR1 = poměr tuk/bílkoviny 25 dnů před výplachem; FPR2 = poměr tuk/bílkoviny 11 dnů před výplachem; FPR3 = poměr tuk/bílkoviny 3 dny po výplachu; výplach = počet vypláchnutých embryí; přenosu = počet přenosuschopných embryí; skvelvaj = skupina velikosti vaječnicku; CLPv = počet corpus luteum na pravém vaječnicku; CLLv = počet corpus luteum na levém vaječnicku; N = počet získaných nediferencovaných embryí; Fr = počet získaných fragmentovaných embryí; Mo = počet získaných embryí ve stádiu moruly; VcBl = počet získaných embryí ve stádiu časné blastocysty; Bl = počet získaných blastocyst; Σ embryí = celkový počet embryí; r = korelační koeficient; P = parametr P; n = počet případů

Tabulka č. 5 uvádí vzájemné korelace mezi jednotlivými vývojovými fázemi embryí, počty žlutých tělísek na vaječnicích a celkovým počtem embryí.

CLPv kladně koreluje s počtem morul, celkovým počtem embryí ($r = 0,517$; resp. $r = 0,576$, $P < 0,001$), počtem fragmentovaných embryí a počtem velmi časných blastocyst ($P < 0,05$).

CLLv vykazuje pozitivní vtahy k počtu fragmentovaných embryí, morul, k celkovému počtu embryí ($r = 0,532$; $r = 0,585$; $r = 0,646$, $P < 0,001$) a k počtu velmi časných blastocyst ($P < 0,05$).

Počet nediferenciovaných embryí kladně koreluje s celkovým počtem embryí ($r = 0,440$, $P < 0,001$), počtem fragmentovaných embryí a morul ($P < 0,05$).

Patrné jsou také kladné korelace mezi počty fragmentovaných embryí a počtem morul, celkovým počtem embryí ($r = 0,628$; resp. $r = 0,862$, $P < 0,001$) a velmi časných blastocyst ($P < 0,05$).

Počty morul vykazují pozitivní korelace s celkovým počtem embryí ($r = 0,883$, $P < 0,001$) a počtem velmi časných blastocyst ($P < 0,05$).

Počet velmi časných blastocyst má kladné vztahy s celkovým počtem embryí ($r = 0,513$, $P < 0,001$).

U počtu blastocyst nebyla zjištěna žádná průkazná korelace ($P > 0,05$).

Tabulka 5 Hodnoty korelací a průkaznosti CL a vývojových fází a množství embryí

		CLLv	N	Fr	Mo	VcBl	Bl	Σ embryí
CLPv	r	0,669	0,206	0,472	0,517	0,348	0,159	0,576
	P	<0,001	0,118	0,001	<0,001	0,007	0,228	<0,001
	n	59	59	59	59	59	59	59
CLLv	r		0,147	0,532	0,585	0,441	0,176	0,646
	P		0,266	<0,001	<0,001	0,001	0,182	<0,001
	n		59	59	59	59	59	59
N	r			0,344	0,315	-0,044	0,027	0,440
	P			0,008	0,015	0,743	0,842	0,001
	n			59	59	59	59	59
Fr	r				0,628	0,310	0,012	0,862
	P				<0,001	0,017	0,931	<0,001
	n				59	59	59	59
Mo	r					0,433	0,071	0,883
	P					0,001	0,596	<0,001
	n					59	59	59
VcBl	r						0,037	0,513
	P						0,781	<0,001
	n						59	59
Bl	r							0,230
	P							0,080
	n							59

CLPv = počet corpus luteum na pravém vaječniku; CLLv = počet corpus luteum na levém vaječniku; N = počet získaných nediferenciovaných embryí; Fr = počet získaných fragmentovaných embryí; Mo = počet získaných

embryí ve stádiu moruly; VcBl = počet získaných embryí ve stádiu časně blastocysty; Bl = počet získaných blastocyst; Σ embryí = celkový počet embryí; r = korelační koeficient; P = parametr P; n = počet případů

Tabulka č. 6 udává vyhodnocení modelové rovnice.

Modelová rovnice pro hodnocení počtu CLPv byla průkazná ($r^2 = 0,569$; $P < 0,001$). V rámci modelové rovnice byl k CLPv průkazný pouze efekt skupiny velikosti vaječnicku ($P < 0,001$). K ostatním parametrům byl efekt CLPv neprůkazný.

Modelová rovnice pro hodnocení CLLv byla statisticky průkazná ($r^2 = 0,651$; $P < 0,001$). Stejně jako v předchozím případě byl pro toto hodnocení průkazný pouze efekt skupiny velikosti vaječnicků ($P < 0,001$) a navíc také efekt nádoje ($P < 0,05$).

Pro počet nediferenciováných embryí byla modelová rovnice neprůkazná ($P > 0,05$).

V případě počtu fragmentovaných embryí byla modelová rovnice průkazná ($r^2 = 0,433$; $P < 0,05$). Průkaznost se potvrdila pro efekt skupiny velikosti vaječnicků a DIM ($P < 0,05$).

K počtu embryí ve fázi moruly byla modelová rovnice průkazná ($r^2 = 0,538$; $P < 0,001$). Pro počet morul byl průkazný vliv skupiny velikosti vaječnicků, FPR2 a DIM ($P < 0,05$).

Modelová rovnice pro hodnocení počtu velmi časných blastocyst byla průkazná ($r^2 = 0,331$; $P < 0,05$). Počet velmi časných blastocyst byl průkazný pouze pro vliv nádoje ($P < 0,05$).

Pro počet embryí ve fázi blastocysty nebyla modelová rovnice průkazná ($P > 0,05$).

K celkovému počtu embryí byla modelová rovnice průkazná ($r^2 = 0,600$; $P < 0,001$). Průkaznost byla potvrzena pro efekty skupiny velikosti vaječnicků, FPR2 a DIM ($P < 0,05$).

Modelová rovnice pro hodnocení počtu přenosuschopných embryí byla průkazná ($r^2 = 0,558$; $P < 0,001$). Pro počet přenosuschopných embryí byla potvrzena průkaznost pro vlivy skupiny velikosti vaječnicků a DIM ($P < 0,05$).

Tabulka 6 Hodnocení modelové rovnice

hodnocené parametry	model		pořadí laktace		sk. velikosti vaječnicku		FPR 2		DIM		nádoj	
	r^2	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
CLPv	0,569	<0,001	2,08	0,135	13,48	<0,001	0,46	0,632	0,96	0,333	3,83	0,056
CLLv	0,651	<0,001	1,47	0,240	12,23	<0,001	3,06	0,056	1,01	0,321	9,43	0,004
N	0,220	0,106	1,46	0,243	2,16	0,126	0,73	0,488	0,06	0,809	3,40	0,071
Fr	0,433	0,001	0,95	0,393	5,28	0,008	2,17	0,125	5,76	0,020	0,11	0,745
Mo	0,538	<0,001	1,56	0,220	4,17	0,021	3,48	0,038	7,28	0,010	0,19	0,661
VcBl	0,331	0,007	2,65	0,081	1,83	0,171	1,48	0,238	0,55	0,460	5,08	0,029
Bl	0,141	0,426	1,15	0,324	1,03	0,366	0,07	0,934	2,25	0,140	0,09	0,760
celkem embryí	0,600	<0,001	1,15	0,324	7,74	0,001	3,60	0,035	10,82	0,002	0,12	0,732
přenosuschopné	0,558	<0,001	0,91	0,408	4,49	0,016	3,05	0,056	8,28	0,006	0,10	0,753

sk. velikosti vaječnicku = skupina velikosti vaječnicku; FPR2 = poměr tuk/bílkoviny 11 dnů před výplachem; DIM = days in milk; nádoj = denní nádoj; CLPv = počet corpus luteum na pravém vaječnicku; CLLv = počet corpus luteum na levém vaječnicku; N = počet získaných nediferenciováných embryí; Fr = počet získaných fragmentovaných embryí; Mo = počet získaných embryí ve stádiu moruly; VcBl = počet získaných embryí ve stádiu časně blastocysty; Bl = počet získaných blastocyst; celkem embryí = celkový počet embryí; přenosuschopné = počet přenosuschopných embryí

Tabulka č. 7 prezentuje detailní vyhodnocení pro efekt pořadí laktace.

Nejvyšší počet žlutých tělísek na pravém vaječniku byl pozorován u dojnic na 2. laktaci, zatímco prvotelky měly počet žlutých tělísek nejnižší. Naopak počet žlutých tělísek na levém vaječniku byl u krav na 2., 3. a další laktaci vyšší, než počet žlutých tělísek na 1. laktaci.

Největší množství nediferenciovaných embryí bylo v závislosti na pořadí laktace pozorováno u prvotelek (0,48), zatímco nejnižší množství vykazovaly krávy na 2. laktaci (0,15).

Nevyšší počet fragmentovaných embryí byl zaznamenán u krav na 3. a další laktaci (1,69), přičemž na 2. laktaci (1,11) byl počet těchto embryí vyšší než u prvotelek (0,85).

Počet embryí ve fázi moruly byl nejvyšší u dojnic na 2. laktaci (2,54), nižší byl u krav na 3. a další laktaci (1,85) a nejnižší počet morul vykazovaly krávy na 1. laktaci (1,68).

Množství velmi časných blastocyst se v testu zvyšovalo se stoupajícím pořadím laktace.

Nejnižší počty embryí ve fázi blastocysty byly zaznamenány u krav na 3. a vyšší laktaci (0,07), zatímco nejvyšší počet blastocyst vykazovaly dojnice na 2. laktaci (0,48).

Vyšší celkové množství embryí bylo získáno u dojnic na 2. laktaci, 3. a další laktaci (4,67; 4,55) v porovnání s prvotelkami (3,27), podobné rozdíly byly pozorovány u celkového počtu přenosuschopných embryí.

Tabulka 7 Vyhodnocení efektu pořadí laktace

laktace	CLPv	CLLv	N	Fr	Mo	VcBl	Bl	celkem embryí	přenosu schopné
	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM
1.	3,28 ± 0,403	2,86 ± 0,356	0,48 ± 0,126	0,85 ± 0,376	1,68 ± 0,326	0,13 ± 0,145	0,13 ± 0,178	3,27 ± 0,665	2,36 ± 0,440
2.	4,48 ± 0,498	3,58 ± 0,439	0,15 ± 0,156	1,11 ± 0,464	2,54 ± 0,403	0,38 ± 0,178	0,48 ± 0,219	4,67 ± 0,821	3,15 ± 0,544
3. a další	4,22 ± 0,477	3,76 ± 0,421	0,27 ± 0,150	1,69 ± 0,445	1,85 ± 0,386	0,67 ± 0,171	0,07 ± 0,210	4,55 ± 0,787	3,16 ± 0,521

laktace = pořadí laktace; CLPv = počet corpus luteum na pravém vaječniku; CLLv = počet corpus luteum na levém vaječniku; N = počet získaných nediferenciovaných embryí; Fr = počet získaných fragmentovaných embryí; Mo = počet získaných embryí ve stádiu moruly; VcBl = počet získaných embryí ve stádiu časných blastocyst; Bl = počet získaných blastocyst; celkem embryí = celkový počet embryí; přenosuschopné = počet přenosuschopných embryí

Tabulka č. 8 ukazuje detailní vyhodnocení pro efekt poměru tuku k bílkovinám v mléce 11 dní před výplachem.

Jak můžeme vidět v tabulce se stoupajícím poměrem tuku a bílkovin, klesá počet corpus luteum na pravém ovariu (od 4,37 do 3,63). Zatímco na levém vaječniku je počet corpus luteum nejvyšší při poměru tuku k bílkovinám 1,1 – 1,3 (4,18) a nejnižší u poměru nad 1,3 (2,88).

Při poměru tuku a bílkovin od 1,1 do 1,3 bylo zjištěno nejvyšší množství nediferenciovaných a fragmentovaných embryí (0,44; 1,88), naopak nad či pod tento interval se počty embryí obou skupin snižovaly.

Bylo prokázáno, že nejvíce morul bylo získáno při poměru tuku k bílkovinám 1,1 – 1,3 (2,77) oproti poměru pod 1,3, kde jich bylo získáno nejméně (1,3) ($P < 0,05$).

Množství velmi časných blastocyst vykazovalo nejvyšší hodnoty u poměru pod 1,1 (0,58) a s rostoucím poměrem tuku a bílkovin počet velmi časných blastocyst klesal.

Nejnižší počet embryí ve fázi blastocysty byl pozorován při poměru 1,1 – 1,3 (0,17), v případě vyššího či nižšího poměru tuku a proteinu počet blastocyst mírně stoupal.

Celkové množství vypláchnutých a přenosuschopných embryí bylo získáno průkazně více při poměru tuku k proteinu od 1,1 do 1,3 (5,74; 3,66), než při poměru nad 1,3 ($P < 0,05$).

Tabulka 8 Vyhodnocení pro efekt poměru tuku k bílkovinám v mléce 11 dní před výplachem

FPR	CLPv	CLLv	N	Fr	Mo	VcBl	Bl	celkem embryí	přenosu schopné
	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM
pod	4,37 ±	3,13 ±	0,29 ±	0,79 ±	2,00 ±	0,58 ±	0,24 ±	3,89 ±	3,32 ±
1,1	0,523	0,461	0,164	0,487	0,423	0,187	0,231	0,862	0,570
1,1-	3,96 ±	4,18 ±	0,44 ±	1,88 ±	2,77 ±	0,49 ±	0,17 ±	5,74 ±	3,66 ±
1,3	0,404	0,357	0,127	0,377	0,327 ^a	0,145	0,178	0,666 ^a	0,441 ^a
nad	3,63 ±	2,88 ±	0,18 ±	0,99 ±	1,30 ±	0,11 ±	0,26 ±	2,84 ±	1,69 ±
1,3	0,533	0,470	0,167	0,496	0,430 ^b	0,191	0,234	0,878 ^b	0,581 ^b

T/P = poměr tuk/bílkoviny v mléce; CLPv = počet corpus luteum na pravém vaječniku; CLLv = počet corpus luteum na levém vaječniku; N = počet získaných nediferencovaných embryí; Fr = počet získaných fragmentovaných embryí; Mo = počet získaných embryí ve stádiu moruly; VcBl = počet získaných embryí ve stádiu časně blastocysty; Bl = počet získaných blastocyst; celkem embryí = celkový počet embryí; přenosuschopné = počet přenosuschopných embryí; ^{a, b} = hladina významnosti 0,05

Tabulka č. 9 uvádí detailní vyhodnocení pro efekt skupiny velikosti vaječníků.

Počet žlutých tělísek na pravém vaječniku ve skupině malé (2,08) byl průkazně nižší než počet na velkém vaječniku (6,08) ($P < 0,001$). A na velkém pravém vaječniku je významně vyšší počet žlutých tělísek na rozdíl od středně velkého ovaria (3,81) ($P < 0,001$). Nižší počet corpus luteum na malém vaječniku oproti středně velkému byl také průkazný ($P < 0,05$).

Počet žlutých tělísek na levém vaječniku ve skupině malých (1,56) byl průkazně nižší než ve skupině středních (3,74) a velkých vaječníků (4,89) ($P < 0,001$).

Množství nediferencovaných embryí stoupá s velikostí vaječníků od 0,07 do 0,57.

Nižší počet fragmentovaných embryí byl prokázán u skupiny malých vaječníků (0,33) v porovnání se skupinou velkých (2,51) a stejný výsledek byl pospán u skupiny středně velkých vaječníků (0,82) oproti skupině velkých ($P < 0,05$).

Množství morul bylo prokazatelně vyšší u skupiny velkých (2,94), než u skupiny malých ovarii (1,13) ($P < 0,05$).

U skupiny velkých vaječníků bylo získáno větší množství velmi časných blastocyst (0,68) ve srovnání se skupinami malých a středních vaječníků (0,28; 0,23).

Nejvíce blastocyst se nacházelo u skupiny středně velkých ovarii (0,46) a nejméně jich bylo nalezeno ve skupině malých ovarii (0,07).

Vyšší celkový počet vypláchnutých embryí byl prokázán u velkých vaječníků (6,83) ve srovnání s malými (1,88) ($P < 0,001$) a dále byl prokázán vyšší počet embryí ve skupině velkých oproti skupině středních ovarii (3,77) ($P < 0,05$).

U skupiny malých vaječníků bylo prokazatelně méně přenosuschopných embryí (1,7), než ve skupině velkých vaječníků (4,22) ($P < 0,05$).

Tabulka 9 Vyhodnocení efektu velikosti vaječníků

skvel vaj	CLPv	CLLv	N	Fr	Mo	VcBl	Bl	celkem embryí	přenosu schopné
	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM	LSM ± SELSM
M	2,08 ± 0,497 ^{A,a}	1,56 ± 0,439 ^A	0,07 ± 0,156	0,33 ± 0,463 ^a	1,13 ± 0,402 ^a	0,28 ± 0,178	0,07 ± 0,219	1,88 ± 0,819 ^A	1,70 ± 0,543 ^a
S	3,81 ± 0,390 ^{C,b}	3,74 ± 0,344 ^B	0,27 ± 0,122	0,82 ± 0,364 ^a	2,00 ± 0,315	0,23 ± 0,140	0,46 ± 0,172	3,77 ± 0,643 ^a	2,75 ± 0,426
V	6,08 ± 0,567 ^{B,D}	4,89 ± 0,500 ^B	0,57 ± 0,178	2,51 ± 0,529 ^b	2,94 ± 0,458 ^b	0,68 ± 0,203	0,14 ± 0,250	6,83 ± 0,935 ^{B,b}	4,22 ± 0,619 ^b

skvelvaj = skupina velikosti vaječnicku; CLPv = počet corpus luteum na pravém vaječnicku; CLLv = počet corpus luteum na levém vaječnicku; N = počet získaných nediferencovaných embryí; Fr = počet získaných fragmentovaných embryí; Mo = počet získaných embryí ve stádiu moruly; VcBl = počet získaných embryí ve stádiu časně blastocysty; Bl = počet získaných blastocyst; celkem embryí = celkový počet embryí; přenosuschopné = počet přenosuschopných embryí; M = malé; S = střední; V = velké; ^{a, b} = hladina významnosti 0,05; ^{A, B, C, D} = hladina významnosti 0,01

6 Diskuze

V diplomové práci byly posuzovány faktory ovlivňující energetickou bilanci dojnic s následným vlivem na kvantitu a kvalitu embryí.

Účinky NEB na reprodukční systém dojnic byly prokázány a jsou obecně známy (Westwood et al. 2002; Britt 2008; Fenwick et al. 2008; Leroy et al. 2008).

BCS je relativní skóre každé dojnice, které odráží její tělesné zásoby dostupné pro metabolismus, růst, laktaci a aktivitu a může ovlivnit reprodukční úspěšnost.

Velmi nízké BCS může dokonce vést k nesprávné funkci ovariální aktivity ve formě cystické atrezie ovariálních folikulů. Zatímco krávy s nadměrným BCS vykazují vyšší pravděpodobnost snížené aktivity ovarii než krávy s nižším BCS (Nazhat et al. 2021).

Stanovení BCS není příliš vhodné pro hodnocení okamžitých změn energetické bilance, jelikož se změny BCS projevují až s časovým odstupem (Friggens et al. 2007).

To může být důvodem proč Vacek a Kubešová (2009) tvrdí, že ne všem autorům se podařilo prokázat signifikantní vliv poklesu BCS na úroveň reprodukčních ukazatelů.

Ke stejnému výsledku jsem došla ve své práci, kdy ve vytvořeném modelu nebyl vztah mezi hodnotou BCS a počtem vypláchnutých a přenosuschopných embryí průkazný.

Proto jsem došla k závěru, že je vhodnější pozorovat metabolické změny, které je možné detekovat změnou koncentrací BHBA, FPR, močoviny v krvi nebo mléce laktujících krav, které se mohou projevit v řádech hodin na rozdíl od hodnot BCS, kde se následek projevuje až později v čase.

Další možnou příčinou toho, proč hodnoty BCS v experimentu nekorelovaly s počtem vypláchnutých a přenosuschopných embryí je následující. Jak uvádí Britt (2008), než folikul a jeho oocyt dosáhnou zralé ovulační fáze trvá odhadem 100 dní. Po celou tuto dobu je vývoj ovlivněn průběžným stavem energetické bilance a s ním spojenými koncentracemi metabolitů, jak v krvi, tak ve folikulární tekutině, které hodnoty BCS, stanovené v řádech dní před výplachem nemohly indikovat.

Kromě toho metabolické změny (vyvolané NEB) mohou ovlivnit endokrinní a biochemické složení folikulární tekutiny, tedy mikroprostředí vyvíjejícího se oocyty. Zrající oocyt je velmi citlivý na jakoukoli změnu ve svém prostředí a modely zrání in vitro ukázaly, že některé z těchto metabolických změn snižují vývojovou kompetenci oocyty.

Studie prokázaly, že změny mikroprostředí během fáze růstu a zrání oocytů (tj. před početím) jsou dostatečné k tomu, aby způsobily významné negativní účinky na plodnost (Leroy et al. 2012).

Jinými slovy, i když došlo k dokonalému oplodnění, nepříznivé folikulární podmínky během růstu a zrání oocytů mohou později ovlivnit životaschopnost embrya (Farman et al. 2016).

Korelace mezi pořadím laktace a počtem vypláchnutých a přenosuschopných embryí nebyla průkazná. Pořadí laktace nemělo výrazný vliv na počty vypláchnutých embryí. Zjistila jsem však mírně stoupající tendenci počtu embryí získaných výplachem i embryí přenositelných u krav na 2. a vyšší laktaci oproti prvotelkám.

Ali et al. (2020) došel k opačným výsledkům, že parita má významný vliv na množství a kvalitu oocytů, kdy ovaria krav poskytují nižší počet oocytů než ovaria jalovic.

Stejně tak Ferraz et al. (2016) uvádí negativní vliv pořadí laktace krav holštýnského skotu na celkovou produkci embryí, procento oplodněných a životaschopných embryí.

Hodnoty poměru tuku a bílkovin 11 dnů před výplachem negativně korelují s počtem žlutých tělísek na pravém i levém vaječniku, s vývojovými stadii embryí morula a velmi časná blastocysta a celkovým množstvím embryí. Při hodnocení vlivu poměru tuku a bílkovin bylo dosaženo nejlepších výsledků pro skupinu FPR 1,1 – 1,3 kdy množství žlutých tělísek na levém vaječniku a počet vývojových stadií embrya až do stadia moruly byl vyšší než ve skupinách FPR < 1,1 a FPR > 1,3. Množství embryí vývojového stadia moruly, celkového množství embryí a počtu přenosuschopných embryí bylo prokazatelně vyšší ve skupině FPR 1,1 – 1,3 než u FPR > 1,3.

To odpovídá sdělení od Cabezas–Garcia et al. (2021), že FPR v mléce mezi 1,0 a 1,5 je obecně považována za „standardní hodnotu“, s adekvátní energetickou bilancí.

Nižší počet vypláchnutých a přenosuschopných embryí ve skupině FPR > 1,3 může být vysvětlen metabolickými změnami u dojnic, jako jsou zvýšené koncentrace NEFA a BHBA a s nimi související snížené plazmatické koncentrace inzulinu, IGF–I a glukózy, které jsou hlavními indikátory hluboké negativní energetické bilance. Takové změny koncentrací metabolitů a hormonů nepříznivě ovlivňují kvalitu oocytů a následně vývoj a kvalitu embryí (Leroy et al. 2006; Britt 2008; Bisinotto et al. 2012; Maillo et al. 2012)

Vysvětlení lepších výsledků ve skupině FPR < 1,1 než ve skupině FPR > 1,3 lze nalézt u van Knegsel et al. (2005; 2007); Cabezas–Garcia et al. (2021). U krav s FPR nižším než 1,0 bylo zjištěno zvýšené riziko subakutní bachorové acidózy, která je způsobena zvýšeným přísunem energie (prostřednictvím snadno fermentovatelných sacharidů) v krmné dávce (Cabezas–Garcia et al. 2021). A však takové složení krmné dávky snižuje koncentrace mléčného tuku, zřejmě i plazmatické koncentrace NEFA a BHBA a zvyšuje koncentrace inzulinu a glukózy, čímž dochází ke zlepšení energetické bilance (van Knegsel et al. 2007).

Van Knegsel et al. (2005) uvádí, že glykogenní krmivo má potenciál snížit závažnost ketózy a steatózy jater, ale má tendenci zvýšit výskyt acidózy.

Cabezas–Garcia et al. (2021) ve své studii napsal, že krávy s FPR > 1,5 měly vždy hlubší negativní energetickou bilanci, než ty s FPR < 1,0.

Skupina velikosti vaječníků měla významný vliv na počty žlutých tělísek na vaječnicích, počty vývojových stadií embryí, celkový počet embryí a počet přenosuschopných embryí. Se stoupající velikostí vaječníků rostly počty detekovaných žlutých tělísek a vývojových fází embryí. Celkový počet získaných embryí u skupiny velkých vaječníků byl 3,6krát vyšší oproti skupině malých vaječníků. Další významný výsledek byl pozorován v počtu přenosuschopných embryí, kde bylo získáno u velkých vaječníků 2,5krát více embryí ve srovnání s malými ovarii. Ke stejným výsledkům došel Palubinskas et al. (2016), který ve své studii uvádí, že největší počet embryí byl získán od dárkyň s velkými vaječnicemi, a že počet přenosuschopných embryí byl 3,2krát vyšší u skupiny velkých ovarii v porovnání se skupinou malých.

Ve skupině velkých ovarii byl počet žlutých tělísek 2,3krát vyšší ve srovnání se skupinou malých ovarii a 1,6krát vyšší ve srovnání se skupinou středně velkých ovarii (Palubinskas et al. 2016).

To také souhlasí s výsledky práce, kdy byl počet žlutých tělísek na velkých vaječnicích 2,8krát vyšší ve srovnání se skupinou malých vaječníků a 1,3krát vyšší oproti vaječnicům střední velikosti.

Dále Palubinskas et al. (2016) uvedl, že v jeho pokusu nebyl stanoven žádný statisticky významný vztah mezi velikostí vaječníků a počtem žlutých tělísek.

Toto tvrzení je ale v rozporu s mými výsledky, kde byly zjištěny průkazné rozdíly v počtu žlutých tělísek v závislosti na velikosti vaječníků.

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo vyhodnotit vztah mezi vybranými indikátory energetické bilance dojnic po porodu a kvalitou jejich embryí při výplachu, resp. embryotransferu. Hypotézou byl předpoklad, že vyšší úroveň negativní energetické bilance snižuje počet vypláchnutých, resp. přenosuschopných embryí.

Výsledky diplomové práce potvrdily hypotézu, že prohlubující se negativní energetické bilance má vliv na množství získaných i přenosuschopných embryí.

Ukázalo se, že hodnoty FPR, které lze velmi snadno získat, vyjadřují okamžitý energetický stav dojnice na rozdíl od BCS, kde se změna projeví až se zpožděním. Adekvátní metabolický stav a tedy i stav energetické bilance reprezentovaný skupinou FPR 1,1 – 1,3 odpovídal nejlepšímu výsledku s nejvyšším počtem vypláchnutých a přenosuschopných embryí, kde byl počet významně vyšší než u skupiny FPR > 1,3, reprezentující krávy s výraznou negativní energetickou bilancí.

Počet laktací neměl ve statistickém vyhodnocení významný vliv na počty vypláchnutých a přenosuschopných embryí, přesto jsem zaznamenala určitou tendenci k vyšším hodnotám u krav se stoupající paritou.

Vliv velikosti vaječníků byl naopak významný. Dojnice ve skupině s velkými vaječníky dosahovaly výrazně lepších výsledků než ty, které disponovaly malými ovarii.

Z výsledků vyplývá, že pro získání životaschopných a přenosuschopných embryí, je nutné věnovat velkou pozornost zvládnutí a zmírnění stavu negativní energetické bilance dojnic pomocí správného managementu, optimalizace krmné dávky, sledování příjmu sušiny, zkracování suchostojného období, udržování dobrého zdravotního stavu a welfare.

Domnívám se však, že zakládat úspěšnost zabřezávání a embryotransferu pouze na základě aktuálního stavu energetické bilance před oplodněním nemůže vysvětlit celou problematiku produkce kvalitních a přenosuschopných embryí dojného skotu.

Protože předpokladem kvalitního a přenosuschopného embrya nejsou pouze optimální okolnosti při jeho vzniku a vývoji, ale také faktory působící po celou dobu růstu a vývoje folikulů a jejich oocytů, který probíhá dlouho před samotným zapouštěním dojnice. V případě, že je kráva v tomto období v nepříznivé energetické bilanci může být kvalita vyvíjejícího se oocytu ohrožena.

Došla jsem tedy k závěru, že pro získání embryí hodných embryotransferu, je nezbytné sledovat stav energetické bilance dojnic průběžně, a to nejen v období okolo porodu.

8 Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát
BCS	body condition score
BHBA	β -hydroxybutyric acid, kyselina beta-hydroxymáselná
CIDR	Controlled Internal Drug Release, hormonální přípravek $\text{PGF}_{2\alpha}$
CL	corpus luteum, žluté tělísko
EB	energetická bilance
FPR	fat to protein ratio, poměr tuku k bílkovinám v mléce
FSH	folikuly stimulující hormon
GH	růstový hormon
GnRH	gonadotropiny uvolňující hormon
IETS	International Embryo Transfer Society
IGF-I	Inzulin-like Growth Factor 1
LH	luteinizační hormon
NEB	negativní energetická bilance
NEFA	Non Esterified Fatty Acids, neesterifikované mastné kyseliny
TMR	Total Mixed Ration, celková smíšená dávka

9 Literatura

Abbas Z, Sammad A, Hu L, Fang H, Xu Q, Wang Y. Glucose Metabolism and Dynamics of Facilitative Glucose Transporters (GLUTs) under the Influence of Heat Stress in Dairy Cattle. *Metabolites* **10**:1–19.

Abdisa T. 2018. Review on the Reproductive Health Problem of Dairy Cattle. *Journal of Dairy and Veterinary Sciences* **5**:1–12.

Ali S, Lemma A, Degefa T, Jemal J. 2020. Effect of breed, parity and frequency of collection on quality and quantity of OPU derived oocytes. *World News of Natural Sciences* **34**:88–97.

Barletta RV. et al. 2017. Association of changes among body condition score during the transition period with NE FA and BHBA concentrations, milk production, fertility, and health of Holstein cows. *Journal theriogenology* **104**:30–36.

Bastin C, Gengler N. 2013. Genetics of body condition score as an indicator of dairy cattle fertility. *Biotechnology Agronomy and Society and Environment* **7**:64–75.

Beever DE. 2006. The impact of controlled nutrition during the dry period on dairy cow health, fertility and performance. *Animal Reproduction Science* **96**:212–226.

Berry DP, Buckley F, Dillon P, Evans RD, Rath M, Veerkamp RF. 2003. Genetic Relationships among Body Condition Score, Body Weight, Milk Yield, and Fertility in Dairy Cows. *Journal Dairy Science* **86**:2193–2204.

Bertoni G, Trevisi E, Lombardelli R. 2009. Some new aspects of Nutrition, Health conditions and fertility of intensively reared dairy cows. *Italian Journal Animals Science* **8**:491–518.

Bicalho MLS, Marques EC, Gilberta RO, Bicalho RC. 2016. The association of plasma glucose, BHBA, and NEFA with postpartum uterine diseases, fertility, and milk production of Holstein dairy cows. *Theriogenology* **88**:270–282.

Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, Martinez N, Lima FS, Staples CR, Thatcher WW, Santos JEP. 2012. Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. *Animal Reproduction* **9**:260–272.

Bó GA, Mapletoft RJ. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction* **10**:344–348.

Britt JH. 2008. Oocyte development in cattle: physiological and genetic aspects. *Revista Brasileira de Zootecnia* **37**:110–115.

Burdych V, Kocmánek J, Holásek R, Andrlíková A, Kořínek D, Kučera J. 2021. Reprodukce skotu. Družstvo pro kontrolu užítkovosti skotu v ČR. Hradištko.

Butler WR. Cornell University 2012. The role of energy balance and metabolism on reproduction of dairy cows. Life Sciences at Cornell University. Ithaca. Available from www.ansci.cornell.edu/dm/proceedings_orders.html (accessed march 2022).

Cabezas–Garcia EH, Gordon AW, Mulligan FJ, Ferris C.P. 2021. Revisiting the Relationships between Fat-to-Protein Ratio in Milk and Energy Balance in Dairy Cows of Different Parities, and at Different Stages of Lactation. *Animals* **11**:1–31.

Carvalho PD. et al. 2014. Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows. *Journal Dairy Science* **97**:3666–3683.

Českomoravská společnost chovatelů, a.s. 2020. Available from www.cmsch.cz (accessed january 2022).

Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi G. 2002. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction* **124**:675–681.

Ciornei SG. 2021. EmbryoTransfer. Intechopen. Available from www.researchgate.net/publication/354061500 (accessed march 2022).

Córdova-Izquierdo A, Guerra Liera JE, Mancera EAV, Crispín RH, Mosqueda MLJ, Vázquez AG, Arroyo GC, Pérez JO, Cervantes RE. 2017. Reproductive disorders and low fertility in cows. *International Journal of Recent Scientific Research* **8**:16900–16902.

Crowe MA, Hostens M, Opsomer G. 2018. Reproductive management in dairy cows-the future. *Irish Veterinary Journal* **71**:1–13.

Curtis JL. 2015. Cattle Embryo Transfer. Procedure. Agtech, Inc. Manhattan, USA.

Dale E, Bauman W, Currie B. 1980. Distribution of nutrients during pregnancy and lactation: An overview of mechanisms. Includes homeostasis and homeoresis. *Journal Dairy Science* **63**:1514–1529.

Drackley JK, Donkin SS, Reynolds CK. 2006. Major Advances in Fundamental Dairy Cattle Nutrition. *Journal of Dairy Science* **89**:1324–1336.

Drackley JK, Janovick–Guretzky NA, Dann HM. 2007. New Approaches to Feeding Dry Cows. 17–28. Tri-State Dairy Nutrition Conference. University of Illinois USA.

Drackley JK, Cardoso FC. 2014. Prepartum and postpartum nutritional management to optimize fertility in high-yielding dairy cows in confined TMR systems. *Animal* **8**:5–14.

- Farman M, Nandi S, Girish Kumar V, Tripathi SK, Gupta PSP. 2016. Effect of metabolic stress on ovarian activity and reproductive performance of dairy cattle. *Iranian Journal of Applied Animal Science* **6**:1–7.
- Fenwick MA, Fitzpatrick R, Kenny DA, Diskin MG, Patton J, Murphy JJ. 2008. Interrelationship between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domestic animal endocrinology* **34**:31–44.
- Ferraz PA, Burnley C, Karanja J, Viera-Neto A, Santos JEP, Chebel RC, Galvão KN. 2016. Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. *Theriogenology* **86**:1834–1841.
- Friggens N.C, Ridder C, Løvendahl P. 2007. On the Use of Milk Composition Measures to Predict the Energy Balance of Dairy Cows *Journal Dairy Science* **90**:5453–5467.
- Global Ag Network. 2000. The cattle site. Global Ag Media, United Kingdom. Available from www.thecattlesite.com/breeds/dairy/ (accessed march 2022).
- Grant RJ. 1991. Evaluating the Feeding Value of Fibrous Feeds for Dairy Cattle. University of Nebraska. Lincoln. Available from www.digitalcommons.unl.edu/extensionhist/437/ (accessed february 2022).
- Garnsworthy PC, Lock A, Mann GE, Sinclair KD, Webb R. 2008. Nutrition, Metabolism, and Fertility in Dairy Cows: 2. Dietary Fatty Acids and Ovarian Function. *Journal Dairy Science* **91**:3824–3833.
- Heinrich J, Jones CM, Ishler VA. 2016. Body condition scoring as a tool for dairy herd management. The Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA. Available from www.extension.psu.edu/body-condition-scoring-as-a-tool-for-dairy-herd-management (accessed February 2022).
- Heuer C, Van Straalen W.M, Schukken Y.H, Dirkwager A, Noordhuizen J.P.T.M. 2000. Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation: model development and precision. *Dairy Science* **90**:5453–5467.
- Huszenicza GY, Kulcsar M, Rudas P. 2002. Clinical endocrinology of thyroid gland function in ruminants. *Veterinary Medicine– Czech* **47**:199–210.
- Charni-Natan M, Grinstein RA, Osher E, Rotter V. 2019. Liver and Steroid Hormones—Can a Touch of p53 Make a Difference? *Frontiers endocrinology* **10**:1–9.
- Kawashima CH, Matsui M, Munakata M, Shimizu T, Miyamoto A, Kida K. 2016. Relationship between the degree of insulin resistance during late gestation and postpartum performance in

dairy cows and factors that affect growth and metabolic status of their calves. *Journal Veterinary Medicine Science* **78**:739–745.

Klopčič M, Hamoen A, Bewley J. 2011. Body condition scoring of dairy cows. University of Ljubljana, Domžale, Slovinsko.

Kok A, Chen J, Kemp B, van Knegsel ATM. 2019. Dry period length in dairy cows and consequences for metabolism and welfare and customised management strategies. *Animal* **13**:42–51.

Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, Dewulf J, de Kruif A. 2004. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology* **62**:1131–43.

Leroy JLMR, Vanholder T, Opsomer G, Van Soom A, de Kruif A. 2006. The In Vitro Development of Bovine Oocytes after Maturation in Glucose and β -Hydroxybutyrate Concentrations Associated with Negative Energy Balance in Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals* **41**:119–123.

Leroy JLMR, Vanholder T, Van Knegsel ATM, Garcia-Ispierto I, Bols PEJ. 2008. Nutrient Prioritization in Dairy Cows Early Postpartum: Mismatch Between Metabolism and Fertility? *Reproduction in Domestic Animals* **43**:96–103.

Leroy JLMR, Langbeen A, Van Hoeck V, Bols PEJ, 2010. Effect of Energy Balance on Oocyte and Embryo Quality in Modern Dairy Cows. *Advances in Dairy Technology* **22**:71–79.

Leroy JLMR Rizos D, Sturmey R, P. Bossaert P, A. Gutierrez-Adan A, Van Hoeck V, Valckx S, Bols PEJ. 2012. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: a focus on dairy cow fertility. *Reproduction, Fertility and Development* **24**:1–12.

Maillo V, Rizos D, Besenfelder U, Havlicek V, Kelly AK, Garrett M, Lonergan P. 2012. Influence of lactation on metabolic characteristics and embryo development in postpartum Holstein dairy cows. *Journal Dairy Science* **95**:3865–3876.

Mann S. 2022. The role of adipose tissue in transition dairy cows: Current knowledge and future opportunities. *Journal of Dairy Science* **105**:3687–3701.

Mebratu B, Fesseha H, Goa E. 2020. Embryo Transfer in Cattle Production and Its Principle and Applications. *International Journal Pharmacy & Biomedical Research*. **7**:40–54.

Meikle A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilbroste P. 2004. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Society for Reproduction and Fertility* **127**:727–737.

- Mishra S, Kumari K, Dubey A. 2016. Body Condition Scoring of Dairy Cattle. *Journal of Veterinary Sciences* **2**:58–65.
- Motyčka et al. 2005. Šlechění holštýnského skotu. Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR Praha.
- Nazhat S, Aziz A, Zabuli J, Rahmati S. 2021. Importance of Body Condition Scoring in Reproductive Performance of Dairy Cows: A Review. *Open Journal of Veterinary Medicine* **11**:272–288.
- Nigussie T. 2018. A review on the role of energy balance on reproduction of dairy cow. *Journal of Dairy Research and Technology* **1**:1–9.
- Nowicki A. 2020. Embryo transfer as an option to improve fertility in repeat breeder dairy cows. *Journal Veterinary Research* **65**:231–237.
- O'Hara EA, Båge R, Emanuelson U, Holtenius K. 2019. Effects of dry period length on metabolic status, fertility, udder health, and colostrum production in 2 cow breeds. *Journal Dairy Science* **102**:595–606.
- Paiano RB, Becker Birgel D, Birgel Junior EH. 2019. Uterine Involution and Reproductive Performance in Dairy Cows with Metabolic Diseases. *Animals* **9**:1–10.
- Palubinskas G, Žilaitis V, Juozaitienė V, Laučienė L, Juodžentis V, Gavelis A, Sederevičius A. 2016. Superovulatory response in relation to the size and side of ovary location in high yielding dairy cows on the first day of treatment protocol. *Veterinary archives* **86**: 65–76.
- Pavlata L, Pechová A. 2014. Hepatopatie skotu, diagnostika diferenciální diagnostika, zásady terapie a prevence. *Veterinářství* **64**: 440–448.
- Plaizier J.C. Krause D.O. Gozho G.N. McBride B.W. 2009. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *The Veterinary Journal* **176**:21–31.
- Rodney RM, Celi P, Scott W, Breinhild K, Lean IJ. 2015. Effects of dietary fat on fertility of dairy cattle: A meta-analysis and meta-regression. *Journal of Dairy Science* **98**:5601–5620.
- Santos JEP, Ribeiro ES. 2014. Impact of animal health on reproduction of dairy cows. *Animal Reproduction* **11**:254–269.
- Selk G. Embryotransfer en cattle. 2002. Division of Agricultural Sciences and Natural Resources. Oklahoma state university. Available from www.shareok.org/bitstream/handle/11244/49938/oksd_ansi_3158_2002-09.pdf?sequence=1 (accessed february 2022).

Senthilkumar V, Safiullah AM, Kathiravan G, Subramanian M, Mani K. 2013. Economic Analysis of Metabolic Diseases in Bovines: A Review. *International Journal of Advanced Veterinary Science and Technology* **2**:64–71.

Sláma P, Pavlík A, Tančín V. 2015. *Morfologie a fyziologie hospodářských zvířat*. Mendelova univerzita v Brně.

Soulat J, Knapp E, Moula N, Hornick JL, Purnelle C, Dufrasne I. 2020. Effect of Dry-Period Diet on the Performance and Metabolism of Dairy Cows in Early Lactation. *Animals* **10**:1–19.

Schröder UJ, Staufienbiel R. 2006. Methods to Determine Body Fat Reserves in the Dairy Cow with Special Regard to Ultrasonographic Measurement of Backfat Thickness. *Journal Dairy Science* **89**:1–14.

Štolcová L, Bartoň M. 2019. Využití indikátorů negativní energetické bilance v managementu chovu dojeného skotu. Available from <https://www.ctpz.cz/vyzkum/vyuziti-indikatoru-negativni-energeticke-bilance-v-managementu-chovu-dojeneho-skotu-867> (accessed february 2022).

Sun Y. 2012. Effects of feeding a high-fiber byproduct feedstuff as a substitute for barley grain in the diets of dairy cows in early lactation. Press University of Alberta Libraries, Edmonton, Alberta.

Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z.s. 2020. Available from www.holstein.cz. (accessed february 2022).

Thalkar MG. 2018. Embryo transfer technology in cattle. *Indian Farmer* **5**:984–987.

Toni F, Vincenti L, Grigoletto L, Ricci A, Schukken YH. 2011. Early lactation ratio of fat and protein percentage in milk is associated with health, milk production, and survival. *Journal Dairy Science* **94**:1772–1783.

Vacek M, Kubešová M. 2009. Využití BCS při řízení reprodukce u holštýnských krav. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhřetěves. Available from www.vuzv.cz/ (accessed march 2022).

van Knegsel ATM, van den Brand H, Dijkstra J, Tamminga S, Kemp B. 2005. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reproduction Nutrition Development* **45**:665–688.

van Knegsel ATM, van den Brand H, Graat EAM, Dijkstra J, Jorritsma R, Decuypere E, Tamminga S, Kemp B. 2007. Dietary Energy Source in Dairy Cows in Early Lactation. Metabolites and Metabolic Hormon. *Journal Dairy Science* **90**:1477–1485.

Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows **123**:127–138.

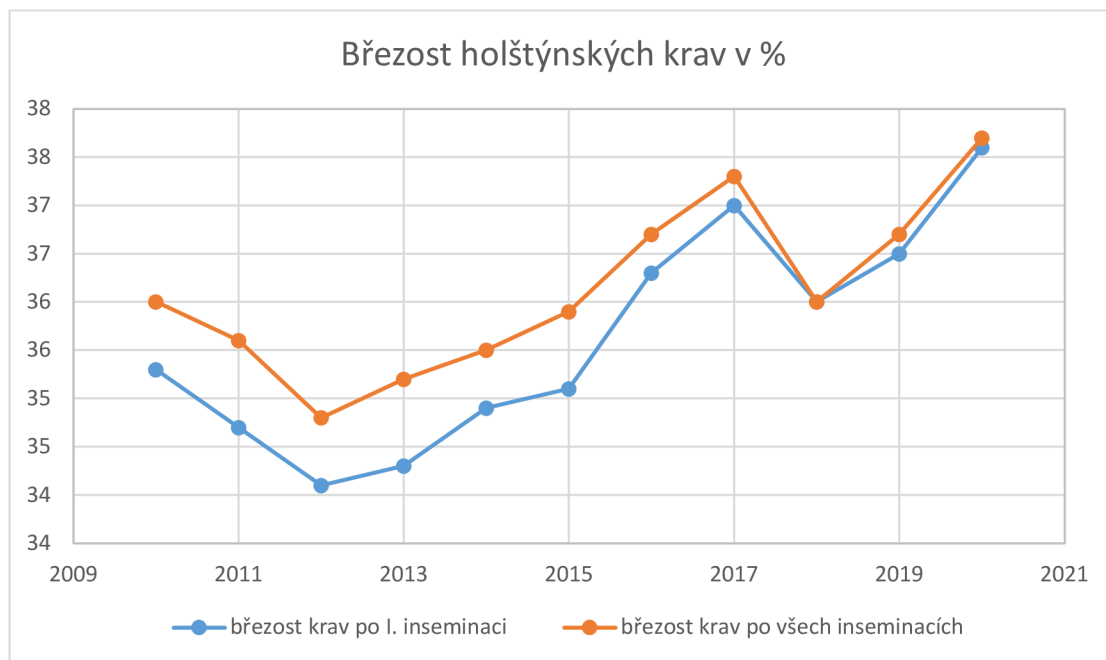
Wankhade PR, Manimaran A, Kumaresan A, Jeyakumar S, Ramesha KP, Sejian V, Rajendran D, Varghese MR. 2017. Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review. *Veterinary World* **10**:1367–1377.

Wathes C, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris DG, Kenny D, Murphy J, Fitzpatrick R. 2007. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology* **68**:232–241.

Westwood CT, Lean IJ, Garvin JK. 2002. Factors Influencing Fertility of Holstein Dairy Cows: A Multivariate Description *Journal Dairy Science* **85**:3225–3237.

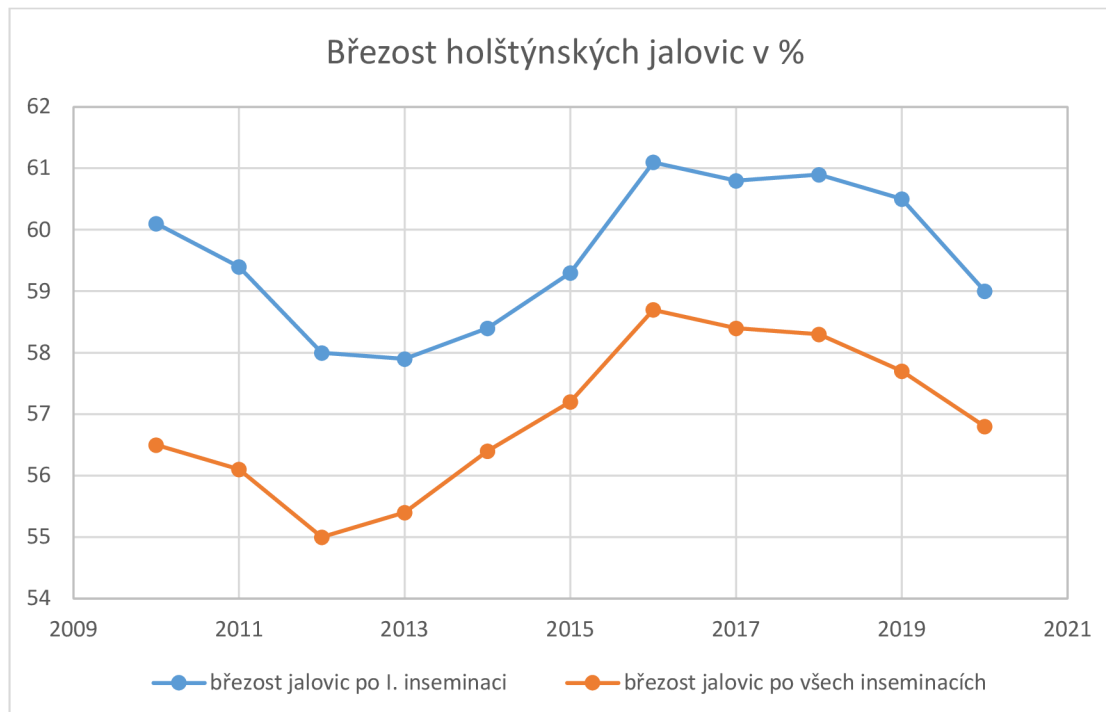
10 Samostatné přílohy

Obrázek 1 Březost holštýnských krav 2010–2020



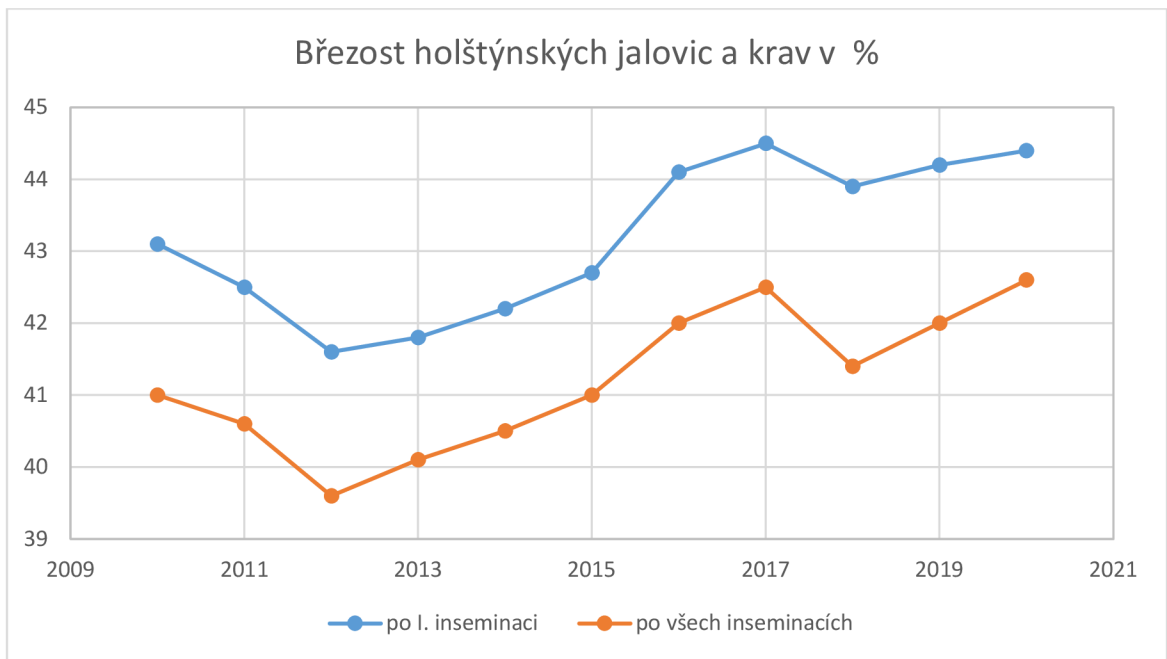
ČMSCH, a.s. 2022

Obrázek 2 Březost holštýnských jalovic 2010–2020



ČMSCH, a.s. 2022

Obrázek 3 Březost holštýnských krav a jalovic 2010–2020



ČMSCH, a.s. 2022