

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Somatické buňky v kozím mléce

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Jana Hrubá

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.

Konzultantka: Ing. Klára Podhorecká

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Somatické buňky v kozím mléce" jsem vypracovala 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 autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce Ing. Matyášovi Orsákovi, Ph.D., odborným konzultantům Ing. Kláře Podhorecké a Ing. Filippovi Georgijevičovi Savvulidimu, Ph.D., za cenné rady, připomínky, ochotu, inspiraci, vstřícnost a čas, který věnovali přípravě i realizaci práce a konzultacím. Dále bych ráda poděkovala Ing. Martinovi Bájecnému, MSc. za vstřícnost a možnost ověření metody. Svě rodině děkuji za trpělivost, podporu a motivaci.

Somatické buňky v kozím mléce

Souhrn

Mléko je potravina živočišného původu, jejíž konzumace může být pro lidské zdraví prospěšná, protože představuje nejen významný zdroj bílkovin, ale i dalších látek (CLA, bioaktivních peptidů, vápníku aj.), které mohou mít pozitivní vliv na zdraví člověka. Mléko určené k lidské výživě musí splňovat legislativní podmínky, týkající se mikrobiologické kvality mléka, které zajišťují, že jeho konzumací nedojde k poškození zdraví konzumenta.

Vedle mléčných bílkovin a tuku, které mají význam při zpeněžování mléka, je sledován i výskyt nežádoucích látek – např. reziduí antibiotik a sanitačních prostředků, toxinů. Ukazatelem kvality mléka, zejména v mléce kravském, je i tzv. počet somatických buněk (PSB), který je vyjadřován jako obsah somatických buněk v 1 ml mléka. PSB je monitorován zejména v souvislosti s možným výskytem onemocnění mléčné žlázy – mastitidy. Příznakem tohoto zánětlivého onemocnění může být zvýšený počet PSB. Mastitida je způsobena patogenními mikroorganismy, např. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* a *Streptococcus dysgalactiae*.

Kozí mléko má, v porovnání s mlékem kravským, přirozeně vyšší PSB. Tento jev je přisuzován apokrinní sekreci mléka. Zvýšený PSB v mléce může ovlivňovat jak technologické, tak sensorické vlastnosti mléka, působením enzymů somatických buněk, které mohou tyto vlastnosti ovlivňovat.

V této práci byl u 57 vzorků mléka, od plemene koza bílá krátkosrstá, stanoven celkový PSB (přístrojem DeLaval®) a pomocí průtokové cytometrie diferenciální počet somatických buněk, tj. zastoupení jednotlivých buněčných subpopulací: epiteliálních buněk a leukocytů, konkrétně lymfocytů, makrofágů a polymorfonukleárních neutrofilů. Dále byl pomocí přístroje DairySpec^{FT} stanoven obsah bílkovin, pomocí HPLC s DAD detektorem byl stanoven obsah kaseinových frakcí: α 1-kaseinu, α 2-kaseinu, β -kaseinu a κ -kaseinu.

Bylo potvrzeno, že celkový i diferenciální PSB v kozím mléce je rozdílný v závislosti na individuálních vzorcích mléka. Ze stanovených buněčných subpopulací vykazovaly nejvyšší výskyt i nejmenší proměnlivost v zastoupení polymorfonukleární neutrofilů. Největší vliv PSB na obsah bílkovin byl pozorován ve skupině s nejvyšším naměřeným PSB 1 500–3 000 $\times 10^3$ buněk/ml mléka.

Klíčová slova: diferenciální počet somatických buněk, HPLC, lymfocyty, kaseinové bílkoviny, polymorfonukleární neutrofilů, průtoková cytometrie

Somatic Cells in Goat Milk

Summary

Milk is food of an animal origin whose consumption could be beneficial for human 's health, not only for an important source of protein, but also for other substances (e.g. CLA, bioactive peptides, calcium etc), that could have a positive effect on human 's health. Milk which is intended for human consumption must meet legislative conditions, regarding the microbiological quality of milk, which declares that its consumption does not harm the health of consumer.

In addition to milk proteins and fat, which are important in the monetarization of milk, the occurrence of undesirable substances is also monitored – e.g. residues of antibiotics and sanitizing agents, toxins. An indicator of milk quality, especially in cow 's milk, is somatic cell count (SCC). SCC is expressed as the content of somatic cells in 1 ml of milk. SCC is monitored especially in connection with the possible occurrence of disease of the mammary gland – mastitis. An increased number of SCC can be a symptom of this inflammatory disease. Mastitis may be caused by pathogenic microorganisms such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Streptococcus dysgalactiae*. Goat 's milk has a naturally higher SCC compared to cow 's milk. This phenomenon is connected to the apocrine secretion of milk. Increased SCC in milk could affect both technological and sensory properties of milk, through the action of somatic cell 's enzymes. These enzymes could affect these properties.

In this work were analysed 57 milk samples by the short-haired white goat breed. The total SCC and the differential of somatic cells, i.e. representation of individual cell subpopulations: epithelial cells and leukocytes, specifically lymphocytes, macrophages and polymorphonuclear neutrophils, were analyzed by flow cytometry. The content of protein was determined by DairySpec^{FT} and the content of casein fractions: α 1-casein, α 2-casein, β -casein and κ -casein was determined using HPLC with DAD detector.

Both total and differential SCC in goat milk were confirmed to be different depending on individual milk samples. In representation of all determined cell 's subpopulations, polymorphonuclear neutrophils showed the highest incidence and the lowest variability. The greatest effect of SCC on protein content was observed in the group with highest measured SCC $1\,500\text{--}3\,000 \times 10^3$ cells/ml milk.

Keywords: differential of somatic cells, HPLC, lymphocytes, casein proteins, polymorphonuclear neutrophils, flow cytometry

Obsah

1. Úvod	7
2. Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3. Literární rešerše.....	9
3.1 Mléko ve výživě člověka	9
3.2 Stručný popis mléčné žlázy	9
3.3 Proces tvorby kozího mléka	10
3.3.1 Apokrinní sekrece mléka	10
3.4 Chemické složení kozího mléka	11
3.4.1 Sacharidy	12
3.4.2 Lipidy.....	12
3.4.3 Bílkoviny	14
3.4.3.1 Polymorfismus bílkovin.....	14
3.4.3.2 Alergie na bílkoviny kozího mléka.....	15
3.4.3.3 Syntéza mléčných bílkovin.....	15
3.5 Somatické buňky	18
3.5.1 Role somatických buněk v zánětlivých procesech	18
3.5.2 Leukocyty	18
3.5.2.1 Lymfocyty.....	18
3.5.2.2 Polymorfonukleární neutrofilý	19
3.5.2.3 Makrofágy.....	19
3.5.3 Epiteliální buňky.....	19
3.5.4 Enzymy somatických buněk	20
3.5.5 Faktory ovlivňující PSB v mléce	20
3.5.6 Mastitida	22
3.5.7 Vliv obsahu somatických buněk na vlastnosti mléka	22
3.5.8 Diferenciál somatických buněk	22
3.6 Vybrané metody stanovení somatických buněk v mléce	23
3.6.1 Stanovení metodou přímého mikroskopického vyšetření.....	23
3.6.2 Průtoková cytometrie.....	23
3.6.3 Stanovení metodou ELISA	26
3.6.4 Metody založené na specifické reakci s DNA	26
3.6.5 Stanovení pomocí testů Califonia Mastitis Test® a Somaticell®	26
4. Metodika	27
4.1 Odběr vzorků mléka	27
4.2 Stanovení diferenciálního počtu somatických buněk	28
4.2.1 Přístroje a chemikálie	28
4.2.2 Schéma aplikace barviv a protilátek	29

4.3	Analýza mléčných bílkovin.....	30
4.3.1	Celkový obsah bílkovin a kaseinů	30
4.3.2	Zastoupení kaseinových frakcí	30
4.3.2.1	Přístroje a chemikálie.....	31
5.	Výsledky	32
5.1	Hodnocení obsahu somatických buněk	32
5.1.1	Celkové hodnocení	32
5.1.2	Rozdělení do vzorků do skupin	32
5.1.3	Hodnocení jednotlivých skupin	33
5.2	Mikrobiologický rozbor	37
5.3	Obsah bílkovin v kozím mléce	39
5.3.1	Celkové hodnocení	39
5.3.2	Hodnocení jednotlivých skupin dle PSB	40
5.3.3	Vliv jednotlivých typů SB na obsah bílkovin.....	41
5.4	Zastoupení kaseinových bílkovin.....	42
5.4.1	Celkové hodnocení	42
5.4.2	Statistické vyhodnocení – korelace obsahu kaseinů a PSB	44
6.	Diskuze	45
7.	Závěr.....	47
8.	Literatura.....	49
9.	Samostatné přílohy	I

1. Úvod

Mléko je první potravou, se kterou se, nejen člověk, ale i ostatní savci, setkávají po narození. Je důležitou součástí jídelníčku člověka – ať v podobě nápoje, nebo jako surovina pro mléčné výrobky (smetanu, máslo, sýry, jogurty, mražené smetanové krémy) či přísada pro výrobu jiných potravin (těst pro pekařské a cukrářské výrobky, náplní pro cukrářské výrobky, čokolád, karamelky apod.).

Mezi nejčastěji konzumovaná mléka v Evropské unii je zařazováno mléko kravské. Nicméně, vzrůstající pozornost konzumentů je věnována i jiným druhům mléka, například kozímu nebo ovčímu.

V jiných zeměpisných oblastech, například v Asii nebo Africe, kde mohou být podmínky, z hlediska dostatku potravy pro chov skotu náročnější, jsou v porovnání s turem domácím častěji chovány kozy. Důsledkem toho je v těchto zemích vyšší konzumace kozího mléka a výrobků z něj. Chov koz a produkce kozího mléka se nicméně v současné době stává aktuálním tématem, především v souvislosti s rozvojem povědomí konzumentů o biopotravinách a potravinách z lokální produkce. Stoupá zájem nejen o původ potravin, ale i jejich kvalitu.

Kvalita a zdravotní nezávadnost mléka mohou být charakterizovány několika parametry. Z hlediska zpeněžování mléka má význam především obsah bílkovin a tuku. Bezpečnost a zdravotní nezávadnost je dávana do souvislosti s mnoha faktory, mezi které můžeme zařadit například: výskyt patogenních mikroorganismů a s tím související zvýšený počet somatických buněk, nežádoucí kontaminaci v podobě obsahu antibiotik a dezinfekčních prostředků a jejich reziduí (souhrnně nazývanými inhibiční látky), kontaminaci součástmi výrobního zařízení.

Somatické buňky jsou buňky, které mají svůj původ v organismu samice a při laktaci přirozeně přechází do mléka. Jsou to buňky imunitního systému (leukocyty) a buňky epitelu, které mají svůj původ v epitelu mléčné žlázy. Nicméně, jejich zvýšený počet může signalizovat onemocnění zvířete, nejčastěji zánět vemene – mastitidu. Předpokládá se, že vyšší obsah somatických buněk v mléce může mít negativní vliv na složení mléka a mléčnou užitkovost.

Pro kozí mléko je, v porovnání s mlékem kravským, charakteristický přirozeně vyšší obsah somatických buněk. Předpokládá se, že tento jev je dán rozdílným typem sekrece mléka. Kravské mléko vzniká sekrecí merokrinní, zatímco pro kozy je typická sekrece apokrinní. Mezi faktory, které mohou ovlivňovat obsah somatických buněk v kozím mléce lze zařadit například zdravotní stav a věk zvířete, stádium laktace, počet mlád'at, hygienické podmínky v chovu.

Vzhledem k odlišné fyziologii koz je důležité zabývat se kromě celkového počtu somatických buněk (PSB) i vlivem jednotlivých typů buněčných populací, tedy diferenciálním počtem somatických buněk. Významné je vyhodnocení PSB vzejmána v souvislosti se změnami kvalitativních parametrů mléka, například obsahem bílkovin, což se může negativně projevit při technologickém zpracování mléka.

Stěžejním cílem této práce byla dále optimalizace metody stanovení diferenciálního počtu somatických buněk v kozím mléce a prohloubení znalostí a souvislostí s kvalitou mléka.

2. Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotézy:

- 1) Zvolená metoda pro stanovení diferenciálního počtu somatických buněk v kozím mléce pomocí průtokové cytometrie je vhodně optimalizována.
- 2) Celkový i diferenciální PSB v kozím mléce je rozdílný v závislosti na individuálních vzorcích mléka.
- 3) Obsah a zastoupení mléčných bílkovin souvisí s obsahem jednotlivých typů somatických buněk.

Cíle práce:

- 1) Byla navržena a optimalizována metoda pro stanovení diferenciálního počtu somatických buněk v kozím mléce s využitím průtokové cytometrie.
- 2) Byly zhodnoceny rozdíly v počtu a zastoupení jednotlivých typů somatických buněk mezi individuálními vzorky kozího mléka.
- 3) Byly sledovány změny ve složení mléčných bílkovin v souvislosti s celkovým a diferenciálním počtem somatických buněk přítomných v mléce.

3. Literární rešerše

3.1 Mléko ve výživě člověka

Codex Alimentarius uvádí, že mléko je sekretem mléčné žlázy savců, který byl získán během jednoho či více dojení a nebyly z něj odebrány, ani do něj přidány žádné cizí složky. Petrotos et al. (2014) dodává že mléko je tekutina fyziologického původu, která zajišťuje živiny a bioaktivní látky pro správný vývoj novorozenců. Fox et al. (2015) popisuje mléko jako tekutinu, která je vyučována samicemi všech savců a zajišťuje kompletní přísun živin pro mláďata.

Podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady ES č. 853/2004 (oddíl IX: Syrové mléko, mlezivo, mléčné výrobky a výrobky z mleziva) musí syrové mléko a mlezivo pocházet od zvířat:

a) která nevykazují žádný příznak nakažlivé choroby přenosné mlékem a mlezivem na člověka;

b) která jsou v celkově dobrém zdravotním stavu, nevykazují známky nákazy, která by mohla mít za následek kontaminaci mléka a mleziva, a zejména netrpí žádnou infekcí pohlavního ústrojí doprovázenou výtokem, ani enteritidou s průjemem, doprovázenou horečkou, nebo viditelným zánětem vemene;

c) která nevykazují žádné zranění vemene, jež by mohlo mít vliv na mléko a mlezivo;

d) kterým nebyly podány nepovolené látky či přípravky a která nebyla protiprávně ošetřena ve smyslu směrnice 96/23/ES;

e) u nichž byla v případě podání povolených přípravků či látek dodržena ochranná lhůta stanovená pro tyto přípravky a látky.

U zvířat se rovněž sleduje výskyt tuberkulózy a brucelózy, alimentárních onemocnění, která mohou být přenosná na člověka. Z dalších původců zoonóz lze jmenovat r. *Coxiella* (původce onemocnění Q-fever) a prvoka *Toxoplasma gondii* (původce toxoplazmózy) (Silanikove et al. 2010). Mléko těchto zvířat nesmí být využíváno k lidské výživě. Mléko rovněž nesmí obsahovat rezidua inhibičních látek, antibiotik, která jsou využívána pro léčení zánětu mléčné žlázy, například spiramycin nebo spectinomycin (Raynal-Ljutovac et al. 2005).

Lidské zdraví může negativně ovlivnit i konzumace mléka, které obsahuje toxiny – sekundární metabolity plísní. V mléce byl zaznamenán například výskyt aflatoxinů, metabolitů plísně r. *Aspergillus*. Aflatoxiny jsou zařazovány mezi karcinogeny. Do mléka se mohou dostat z nevhodně skladovaného krmiva, které bylo napadeno plísní (Silanikove et al. 2010).

3.2 Stručný popis mléčné žlázy

Hlavní součástí mléčné žlázy jsou alveoly, dutinky, které jsou obklopeny epiteliálními buňkami, které vytváří mléko. Epiteliální buňky jsou obklopeny myoepiteliálními buňkami, které se kontrahují vlivem hormonu oxytocinu. Kontrakcí dochází k uvolnění mléka z lumenu alveolu do kanálku. Alveoly se vyskytují ve skupinách – lalůčkách. Každý lalůček má mléčný kanálek, který ústí do strukové kanálu Alhussien & Dang (2018).

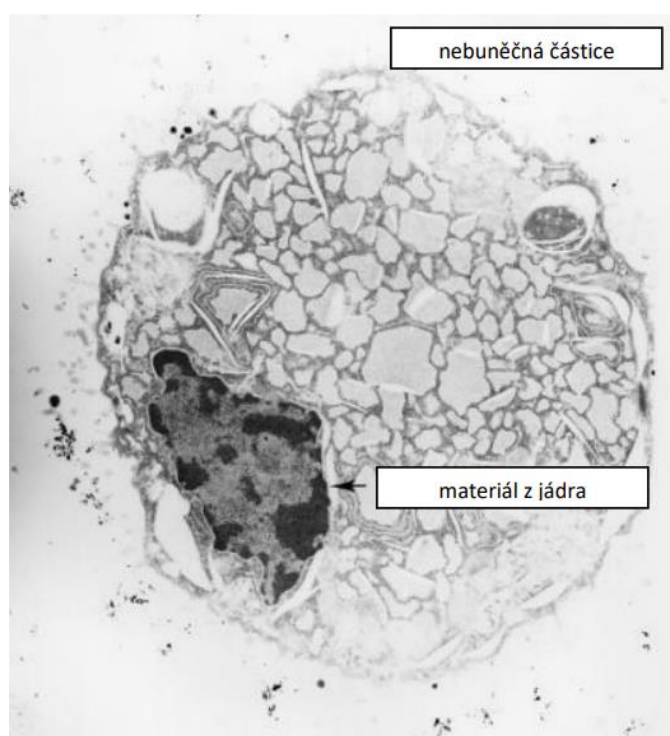
Fox et al. (2015) uvádí, že mléčné žlázy všech savců mají stejnou základní strukturu a jsou umístěny mimo tělní dutinu. Jednotlivé složky mléka jsou syntetizovány z molekul, které jsou absorbovány z krve samice. V mléčné žláze dochází k jejich úpravě a vzniku finální molekuly.

Dan et al. (2016) uvádí, že mléčná žláza je složitý systém, ve kterém dochází k procesu tvorby proteinů. Weaver & Hernandez (2015) uvádějí, že regulace tvorby mléka má důležitý dopad na zdraví zvířete i člověka, stejně tak na samici a mládě. Dále uvádí, že proces tvorby mléka je řízen laktogenními hormony, mezi kterými zmiňují inzulín, prolaktin a glukokortikoidy.

3.3 Proces tvorby koziho mléka

3.3.1 Apokrinní sekrece mléka

Na rozdíl od merokrinní sekrece mléka, která je charakteristická například pro kravské mléko, vzniká kozi mléko sekrecí apokrinní (Dulin et al. 1982; Shah et al. 2017), díky čemuž obsahuje větší množství nebuněčných částic, které mohou zkreslovat stanovení somatických buněk (Alhussien & Dang 2018). Paape & Capuco (1997) shodně uvádí, že díky apokrinní sekreci obsahuje kozi mléko částice, které se svojí velikostí podobají somatickým buňkám a některé z nich dokonce obsahují jaderný materiál, a mohou tak být chybně identifikovány jako buňky, tuto částici ilustruje Obrázek č. 1.



Obrázek č. 1: Nebuněčná částice obsahující materiál z jádra buňky (Paape & Capuco 1997).

Vlastní proces sekrece mléka

Proces probíhá v sekrečních buňkách epitelu, přesněji řečeno v jejich endoplazmatickém retikulu. Sekreční buňky jsou seskupeny okolo centrálního prostoru – lumenu – kde dochází k tvorbě kulovitých tělísek zvaných alveoly. Mléko je vylučováno z těchto buněk, přes apikální membránu, do lumenu alveol. Když je lumen naplněn, myoepiteliální buňky, které obklopují každý alveol, se smrští vlivem hormonu oxytocinu, a mléko je odváděno systémem kanálků do dutinek, které jsou sběrnými místy mezi sáním nebo dojením. Dutinky ústí do strukového kanálu (Fox et al. 2015), odkud je mléko sáno mládětem nebo dojeno člověkem.

3.4 Chemické složení kozího mléka

Složení kozího mléka se může lišit, a to v závislosti na četnosti porodů, krmivu, životním prostředí, podmínkách chovu zvířat, ročním obdobím, fázi laktace a lokalitě chovu (Amigo & Fontecha 2011, Park et al. 2017). Fox et al. (2015) zmiňuje dále zdraví zvířete (negativně ovlivněno mastitidou – zánět mléčné žlázy), věk a dobu, která uplyne mezi dojeními.

Park et al. (2017) uvádí, že délka laktace u plemen šlechtěných na produkci mléka, se pohybuje v rozmezí 200 až 305 dní. Dále zmiňuje, že dojivost může být ovlivněna mnoha faktory, například genetickými předpoklady, věkem zvířat, počtem mláďat, dobou narození kůzlat.

Mléko je složeno z vody, tuku, bílkovin (převážně kaseinových micel a syrovátkových proteinů), sacharidů (převážně laktózy) a dalších složek – minerálních látek, vitaminů a enzymů (Jensen 1995). Průměrné složení kozího mléka ilustruje Tabulka č. 1.

Konzumace kozího mléka může mít pozitivní vliv na lidské zdraví (Petrotos et al. 2014). Mléko může být pro lidský organismus zdrojem vitaminů, lipofilních: A, D, E, i hydrofilních: C a skupiny B a minerálních prvků jako jsou vápník, fosfor, hořčík, zinek, měď, selen a draslík (Pereira 2014).

Pozornost je v současné době věnována bioaktivním peptidům, jejichž prekurzory jsou mléčné bílkoviny. Tyto peptidy vykazují zajímavé vlastnosti, například antimikrobiální, ovlivňující imunitní nebo nervový systém, což je mimochodem důvod, proč je před spaním doporučována sklenice mléka (Petrotos et al. 2014).

Pro pacienty, kteří trpí intolerancí nebo nesnášenlivostí na některou ze složek kravského mléka, může být kozí mléko, díky svým hypoalergenním vlastnostem, využíváno jako alternativa (Park et al. 2017).

Tabulka č. 1: Chemické složení kozího mléka (upraveno podle Ceballos et al. 2009).

Složka (%)	Kozí mléko
Sušina	13,57
Bílkoviny	3,48
Tuk	5,23
Popeloviny	0,75
Laktóza	4,11

3.4.1 Sacharidy

Laktóza

Hlavní sacharidem v mléce je disacharid laktóza. Její molekula je složena z galaktózy a glukózy, monosacharidů, které jsou spojeny β -1,4 glykosidickou vazbou. Laktóza je, díky volné poloacetalové skupině, zařazována mezi redukující cukry. Může se vyskytovat ve formě α - nebo β -anomeru. Jednotlivé anomery vykazují rozdílnou rozpustnost ve vodě.

K syntéze laktózy dochází v mléčné žláze z glukózy, která je absorbována z krve (Fox et al. 2015). Fox et al. (2015) dále uvádí, že laktóza, společně s ionty sodíku, draslíku a chloru napomáhá udržení správného osmotického tlaku v mléčné žláze. Obsah laktózy v mléce může klesat, například v pozdějších stádiích laktace nebo v přítomnosti zánětlivého onemocnění mléčné žlázy – mastitidy (Fox et al. 2015). Lad et al. (2017) uvádí, že má významnou roli při absorpci vápníku, hořčíku a fosforu i při utilizaci vitamínu D. Dále uvádí, že obsah laktózy v kozím mléce je, v porovnání s mlékem kravským, nižší, a proto může být vhodnou alternativou pro pacienty trpící laktózovou intolerancí.

Ostatní sacharidy (například glukóza, glukosamin, galaktosamin) se v mléce nacházejí pouze ve stopových množstvích (Fox et al. 2015).

Oligosacharidy

Mléčné oligosacharidy, ačkoliv se v mléce nachází v relativně nízkých koncentracích, mají důležitou úlohu pro své probiotické a protizánětlivé vlastnosti (Lad et al. 2017). Amigo & Fontecha (2011) zmiňují, že oligosacharidy se mohou podílet na příznivém rozvoji střevní mikrobioty u mláďat, podporovat růst bifidobakterií a účastnit se na ochraně střevní stěny proti patogenním mikroorganismům.

3.4.2 Lipidy

Lipidy v mléce se vyskytují nejčastěji v podobě triacylglycerolů, esterů vyšších mastných kyselin a trojsytného alkoholu – glycerolu (Fox et al. 2015; Bernard et al. 2018). Vyšší obsah volných mastných kyselin může být indikátorem počínajícího rozkladu triacylglycerolů. Volné mastné kyseliny se mohou do mléka uvolňovat rovněž rozpadem membrány tukových kuliček. (Fox et al. 2015).

Mastné kyseliny v mléce mohou vznikat dvěma způsoby:

- Lipogenezi v epiteliálních buňkách mléčné žlázy
- Vychytáváním z organismu

V epiteliálních buňkách může proběhnout jejich desaturace (za přítomnosti enzymů desaturáz) a následná esterifikace s glycerolem, za vzniku triacylglycerolů, které jsou vylučovány do lumenu alveol v podobě tukových kuliček (Bernard et al. 2018).

Mléčný tuk je pro mláďata zdrojem energie a také se podílí na senzoričkových a fyzikálně-chemických vlastnostech mléka (Fox et al. 2015). Lad et al. (2017) popisuje, že tuk je mléce přítomen v podobě emulze typu “olej ve vodě“.

Tuk se v mléce nachází převážně v podobě tukových kuliček. Tukové kuličky obsažené v kozím mléce jsou menší (velikost 1,5–2 μm) než tukové kuličky, které obsahuje mléko kravské (velikost 2,5–3,5 μm) (Park 2009; Lad et al. 2017). Amigo & Fontecha nicméně

uvádí průměrnou velikost kuliček 2,76 μm u kozího a 3,51 μm u kravského mléka. Park et al. (2017), zmiňuje průměrné velikosti tukových kuliček: 3,5 μm u kozího a 4,5 μm u kravského mléka. Bernard et al. (2018) popisuje, že velikost se může pohybovat v rozmezí 0,1–20 μm . Výhodou menší velikosti může být snazší stravitelnost tuku (Park et al. 2007; Raynal-Ljutovac et al. 2008).

Mléko dále obsahuje mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým řetězcem (C4:0–C12:0), které mají bioaktivní funkce pro trávení a metabolismus lipidů a jsou využívány při léčbě pacientů, kteří trpí poruchou vstřebávání lipidů nebo jinými gastrointestinálními potížemi (Park 2009; Amigo & Fontecha 2011; Lad et al. 2017; Turkmen 2018; Bernard et al. 2018). Amigo & Fontecha (2011) zmiňují kyseliny: kapronovou (C6:0), kaprylovou (C8:0) a kaprinovou (C10:0). Zmíněné kyseliny se spolupodílí na typických sensorických vlastnostech kozího mléka (Silanikove et al. 2010; Amigo & Fontecha 2011, Park et al. 2017). Mohou tvořit 15–18 % z celkového obsahu mastných kyselin v kozím mléce (Bernard et al. 2018).

Předpokládá se, že celkový profil mastných kyselin v mléce může být ovlivněn příjmem vhodného krmiva. Mléko by tak bylo možné obohatit o nenasycené mastné kyseliny (konjugovanou kyselinu linolovou, kyselinu α – linolenovou), které mohou mít pozitivní vliv na zdraví člověka (Bernard et al. 2018).

Sloučeniny lipidů – sfingomyeliny, gangliosidy a glykosfingolipidy, mohou podporovat imunitu a podílet se na ochraně organismu proti zánětlivým onemocněním (Wang et al. 2021).

Tukové kuličky

Jsou charakterizovány jako útvary, které jsou složeny z jádra (obsahující nepolární lipidy, převážně triacylglyceroly) a vnějšího obalu – membrány. Ta je utvořena z polárních lipidů, fosfolipidů, glykolipidů a minoritních bílkovin a může být zdrojem bioaktivních molekul (Bernard et al. 2018).

Membrána tukových kuliček se skládá z plazmatické membrány sekrečních buněk, dále obsahuje proteinové složky, z nichž některé jsou enzymy (Amigo & Fontecha 2011). Bernard et al. (2018) poznamenává, že obsah této proteinové frakce tvoří přibližně 1–4 % celkových mléčných bílkovin. Dále se na membráně mohou nacházet také fosfolipidy, cerebrosidy a gangliosidy (Amigo & Fontecha 2011). Zmínění autoři také uvádějí, že přibližně 60 % celkových fosfolipidů kozího mléka se nachází v membráně tukových kuliček. Podle Fox et al. (2015) se membrána tukových kuliček skládá z fosfolipidů, bílkovin a stopového množství lipidů. Autor dále uvádí, že přesné kvantitativní zastoupení jednotlivých lipidových frakcí doposud nebylo zcela přesně stanoveno.

Gallier et al. (2020) uvádí, že nejen mléčný tuk, ale i další složky, ze kterých je tvořena membrána tukových kuliček, se svojí chemickou strukturou podobají složení mléčného tuku mateřského mléka. Z tohoto důvodu se předpokládá, že tuk z kozího mléka může mít na kojence podobné fyziologické účinky jako mateřské mléko. Mezi tyto účinky lze zařadit například pozitivní vývoj střev a jejich mikrobioty, optimální vývoj mozku a kognitivních funkcí (Gallier et al. (2020).

Mechanismus vzniku tukových kuliček

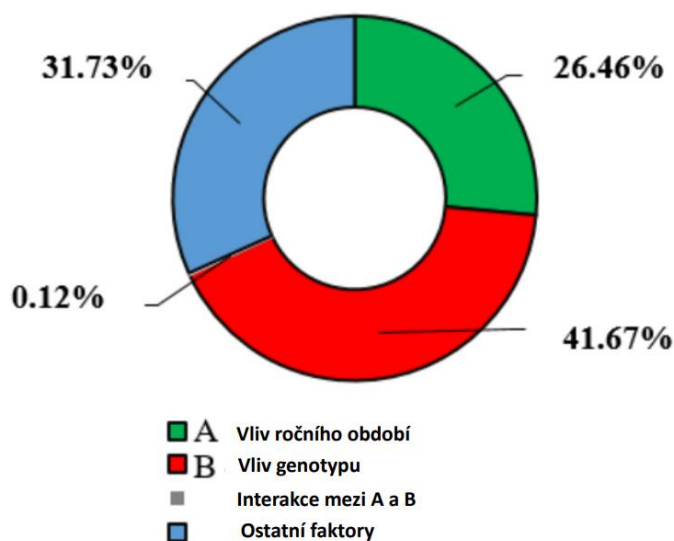
Wooding (1971) popisuje pravděpodobný mechanismus vzniku tukových kuliček. Uvádí, že tukové kapénky jsou rozptýleny v cytoplazmě sekreční buňky. Postupně putují buňkou a vznikají z nich tukové kuličky, které přestupují do alveolu.

Fox et al. (2015) rovněž popisuje vznik tukových kuliček:

- Tukové kapénky se formují z triacylglycerolů, které jsou syntetizovány na povrchu nebo uvnitř sarkoplasmatického retikula.
- Z kapének se postupně utváří tuková kulička.
- Vytvořená kulička je z buňky vyloučena do lumenu alveolu.

3.4.3 Bílkoviny

Park et al. (2017) uvádí, že bílkoviny z kozího mléka jsou snadněji stravitelné a aminokyseliny, kterými jsou tvořeny, jsou lidským organismem vstřebávány efektivněji. Almaas et al. (2006) ve své studii uvádí, že bílkoviny kozího mléka jsou při trávení degradovány rychleji než bílkoviny mléka kravského. Obsah bílkovin v kozím mléce může být ovlivněn několika faktory, například ročním obdobím (až z 26 %) nebo genotypem (až z 41 %), jak ilustruje Graf č. 1 (Kyselov et al. 2022).



Graf č. 1: Vliv ročního období a genotypu na obsah bílkovin v kozím mléce (Kyselov et al. 2022).

3.4.3.1 Polymorfismus bílkovin

Polymorfismus může nastat, pokud pro jednu vlastnost (znak) organismu existují v jeho genetické výbavě alespoň dvě varianty téhož genu (alely) (Formaggioni et al. 1999). Kaseinové bílkoviny, které se nachází v kozím mléce mohou vykazovat rozsáhlý polymorfismus, který může ovlivňovat složení i kvalitu mléka (Marletta et al. 2007). Martin et al. (2002) zmiňuje, že polymorfismus může ovlivňovat sensorické i technologické vlastnosti mléka (průběh srážení, synerze sýřeniny).

3.4.3.2 Alergie na bílkoviny kozího mléka

Alergii lze obecně charakterizovat jako nepřiměřenou odpověď imunitního systému organismu na určitou látku – alergen. Podle Pereira (2014) se tato alergie může rozvinout již v útlém věku a je mnohem častější u dětí než u dospělých jedinců. Mezi symptomy se mohou objevit trávicí a dýchací potíže, u těžších případů může nastat anafylaktický šok, projevy alergie jsou však individuální a závisí na citlivosti daného organismu.

Kozí mléko obsahuje méně alergenních bílkovin, zejména α 1-kaseinu, který je u kravského mléka považován za hlavní bílkovinnou frakci vyvolávající alergickou reakci (Dan et al. 2016; Lad et al. 2017, Gallier et al. 2020). Stelwagen (2011) nicméně uvádí, že bílkoviny kozího mléka jsou lidskému organismu stejně cizí, jako bílkoviny mléka kravského. Nelze tedy jednoznačně tvrdit, že kozí mléko je vhodné pro alergiky a alergie nemůže vyvolat (Restani et al. 1999)

Alergie na kravské mléko se nejčastěji objevuje u pacientů v dětském věku (Restani et al. 1999). Děti jsou nejčastěji citlivé na druhově specifické proteiny (Tavares et al. 2007). Ah-Leung et al. (2006) zmiňuje, že většina dětí, které jsou alergické na kravské mléko, je rovněž citlivá na syrovátkové proteiny, případně i kaseinovou frakci, kterou obsahuje kozí nebo ovčí mléko. Alergie na kozí a ovčí mléko, které nejsou spojeny s křížovou alergií na kravské mléko jsou vzácné (Ah-Leung et al. 2006). První případ zaznamenali Wunthrich & Johansson v roce 1995. Křížová alergie se projevuje v případě, kdy imunitní systém organismu reaguje (díky vysoké sekvenční homologii molekul) na jinou bílkovinu, než je alergen (Ah-Leung 2006, Tavares et al. 2007).

Mezi hlavní bílkoviny mléka jsou zařazovány kaseinové a syrovátkové bílkoviny. Kozí mléko obsahuje, v porovnání s mlékem kravským, méně α s-kaseinu, ale je bohatší na obsah β -kaseinu (Lat et al. 2017, Park et al. 2017). Toho je využíváno při alergiích na kravské mléko, kde potenciálním alergenem může být α s-kasein. Kvantitativní zastoupení hlavních bílkovin ilustruje Tabulka č. 2.

Bílkoviny nacházející se v membráně tukových kuliček mohou být, pro své pozitivní účinky na zdraví člověka, využívány jako součást kojenecké výživy (Gallier et al. 2020). Bernard et al. (2018) uvádí, že v membráně tukových kuliček se může nacházet až 520 různých bílkovin, například mucin 1, xanthin dehydrogenáza, xanthinoxidáza, glykoprotein 4, butyrofilin, perilipin 2, protein vázající mastné kyseliny, mucin 15 a laktadherin.

Pro výrobu kojenecké výživy je využíváno především čerstvé kozí mléko bez sníženého obsahu mléčného tuku, s obsahem syrovátkových a kaseinových bílkovin v přibližném poměru 20:80 (Gallier et al. 2020). Nicméně, na trhu jsou například i instantní výrobky se sníženým obsahem mléčného tuku (u těchto výrobků je jako zdroj lipidů využíván přídatek rostlinného oleje), nebo s jinak upraveným obsahem bílkovin, například, s obsahem syrovátkových a kaseinových bílkovin v poměru 60:40 (Gallier et al. 2020).

3.4.3.3 Syntéza mléčných bílkovin

K tvorbě hlavních mléčných bílkovin dochází v mléčné žláze procesem proteosyntézy. Výjimku tvoří sérový albumin a imunoglobuliny, které jsou transportovány přímo z krve.

Syntéza se realizuje na ribozomech, které jsou umístěny na povrchu drsného endoplazmatického retikula (Fox et al. 2015).

Tabulka č. 2: Zastoupení bílkovinných frakcí v g/100 g bílkovin (Ceballos et al. 2009).

Bílkovina	Kozí mléko
Kaseinové bílkoviny	82,70
α 1-kasein ¹	18,92
α 2-kasein ¹	8,52
β - a κ -kasein ¹	55,26
Syrovátkové bílkoviny	17,30

3.4.3.3.1 Kaseinové bílkoviny

Mezi kaseinové bílkoviny jsou zařazovány: α 1-kasein, α 2-kasein, β -kasein, κ -kasein a γ -kasein (Amigo & Fontecha 2011). Kasein je fosfoprotein, který v mléce vytváří komplexy nazývané micely. Fox et al. (2015) uvádí, že až 95 % kaseinu se v mléce nachází v podobě těchto micel. Struktury micel se skládají z jednotlivých molekul kaseinu a vápníku, nicméně obsahují i fosfátové a citrátové ionty (Petrotos et al. 2014). Micely, které se nacházejí v kozím mléce (o průměrné velikosti 100–200 nm), jsou v porovnání s mlékem kravským (60–80 nm) větší (Silanikove et al. 2010). Díky obsahu fosforu mají kaseiny schopnost vázat ionty vápníku, což pozitivně ovlivňuje jeho nutriční hodnotu (Fox et al. 2015). Pokud dojde ke snížení pH (na hodnotu 4,6), dojde k vysrážení kaseinových bílkovin (Fox et al. 2015), čehož se využívá například při výrobě některých mléčných výrobků.

3.4.3.3.2 Syrovátkové bílkoviny

Do této skupiny jsou zařazovány: β -laktoglobulin, α -laktalbumin, sérový albumin a imunoglobuliny (Amigo & Fontecha 2011). Pokud dojde ke snížení hodnoty pH na 4,6, syrovátkové bílkoviny zůstávají rozpuštěny v roztoku – nedochází k jejich precipitaci, na rozdíl od kaseinů (Fox et al. 2015). Autor dále uvádí, že syrovátkové proteiny obsahují, v porovnání s kaseinovými proteiny, vyšší množství sirných aminokyselin, jejichž změny, po zahřátí mléka, způsobují některé změny vlastností mléka (vařivá příchuť, prodloužení času srážení).

3.4.3.3.3 Minoritní bílkoviny a dusíkaté látky nebílkovinné povahy

Bílkoviny, které se mléce nacházejí v relativně nízkém množství jsou nazývány minoritní bílkoviny. Do této skupiny mohou být zařazovány imunoglobuliny – bílkoviny, které se pomocí specifických protilátek podílejí na obraně organismu, a vytváří tak humorální imunitu (Alhussien & Dang 2018).

¹ Číselné hodnoty jednotlivých typů kaseinů jsou tvořeny z celkových kaseinových bílkovin.

Dusíkaté látky nebílkovinné povahy jsou charakterizovány jako látky, které obsahují ve své molekule atom dusíku, avšak nejsou bílkovinami, například močovina, močová kyselina, rotová kyselina, amoniak, nukleotidy a další sloučeniny (Fox et al. 2015).

3.4.3.3.4 Enzymy

Fox et al. (2015) do skupiny těchto látek zařazuje například laktoferin, transferin, ceruloplasmin. Clark & García (2017) zmiňují lysozym, xanthinoxidázu, plasmin. Autoři Clark & García (2017) dále uvádí, že plasmin, je nejdůležitější proteázou kozího mléka, protože z velké části ovlivňuje kvalitu sýrů. Hamed et al. (2008) dodává superoxid dismutázu, katalázu a glutathion peroxidázu. O' Mahony et al. (2013) uvádí, že enzymy v mléce mohou pocházet za čtyř hlavních zdrojů:

- Krevní plazmy
- Cytoplasmy sekrečních buněk
- Membrány tukových kuliček (milk fat globules – MFG)
- Somatických buněk.

Podle změny obsahu enzymů v mléce lze indikovat například tepelné ošetření mléka (alkalická fosfatáza), antimikrobiální aktivitu (lysozym), zánět (kataláza) (O' Mahony et al. 2013).

3.5 Somatické buňky

Jsou charakterizovány jako různorodá skupina buněk imunitního systému (lymfocytů, polymorfonukleárních neutrofilů a makrofágů) a buněk, které se podílejí na tvorbě mléka (epiteliální buňky mléčné žlázy) (Boutinaud & Jammes 2002; Silanikove et al. 2010; Alhussien & Dang 2018; Halasa & Kirkeby 2020). Leukocyty – bílé krvinky (Alhussien & Dang 2018), do mléka přestupují z krve, zatímco epitheliální buňky odlupováním z epitelu. Přítomnost těchto buněk v mléce je přirozený jev, který je nezbytný pro správnou regeneraci epitelu (Alhussien & Dang 2018; Albenzio et al. 2019).

Ačkoliv byla snaha navrhnout legislativní limit pro PSB v kozím mléce, Evropská unie doposud žádnou hodnotu nestanovila (Novac & Andrei 2020; Kuchtík et al. 2021). Rozdílný mechanismus laktogeneze a fyziologie mléčné žlázy u těchto zvířat (v porovnání s kravským mlékem) znesnadňuje zvolit a určit tyto limitní hodnoty (Novac & Andrei 2020).

3.5.1 Role somatických buněk v zánětlivých procesech

Albenzio et al. (2019) popisuje, že většinu somatických buněk tvoří leukocyty, které jsou součástí přirozeného obranného mechanismu. Zahrnují lymfocyty, makrofágy a polymorfonukleární buňky. Rovněž je přítomno menší množství epitheliálních buněk, ačkoliv se nejedná o somatické buňky v pravém slova smyslu.

Během zánětu mléčné žlázy jsou aktivovány obranné mechanismy, tak, aby eliminovaly patogenní mikroorganismy. Tyto mikroorganismy mohou uvolňovat metabolity, které působí na leukocyty jako atraktanty. (Albenzio et al. 2019).

Paape & Capuco (1997) i Alhussien & Dang (2018) shodně doplňují, že somatické buňky představují druhou linii obrany proti škodlivým mikroorganismům. Za první ochrannou linii jsou považovány anatomické bariéry struku a mléčné kanálky.

3.5.2 Leukocyty

Tyto buňky, které se podílejí na obraně organismu, jsou také nazývány bílými krvinkami (Alhussien & Dang 2018). Malik et al. (2018) i Halasa & Kirkeby (2020) do skupiny leukocytů zařazují lymfocyty, polymorfonukleární neutrofilů a makrofágy. Bagnicka et al. (2011) předpokládá, že jejich obsah v mléce se s věkem zvířete zvyšuje. Při zánětlivých onemocněních (například mastitidě) přestupují z krve do mléka (proto se jejich počet v mléce zvyšuje). Jejich úkolem je bojovat s infekcí a opravit poškozenou tkáň (Alhussien & Dang 2018).

3.5.2.1 Lymfocyty

Jsou charakterizovány jako buňky s pravidelným tvarem jádra, podílející se na specifické imunitě organismu (Malik et al. 2018). Autor rovněž uvádí, že napomáhají k likvidaci poškozených buněk vlastního organismu. Sordillo et al. (1997) zmiňuje, že lymfocyty jsou jediné buňky imunitního systému, které rozpoznávají antigeny prostřednictvím membránových receptorů, které jsou specifické pro patogeny, které napadají

organismus. Lymfocyty lze rozdělit do dvou podskupin na B-lymfocyty a T-lymfocyty (Sordillo et al. 1997; Riedel-Caspari 2001). Skupiny buněk se navzájem liší funkcí (Sordillo et al. 1997).

B-lymfocyty

Jejich primární úlohou je produkce protilátek proti patogenům, které napadají organismus. K jejich rozpoznání využívají své povrchové receptory (Sordillo et al. 1997).

T-lymfocyty

Tuto skupinu lze dále rozdělit na ab T-lymfocyty (zahranují CD4+ a CD8+ lymfocyty) a gd T-lymfocyty (Sordillo et al. 1997). CD4+ buňky, díky schopnosti vylučovat citokiny, se podílí na aktivaci B-lymfocytů, makrofágů a dalších buněk, které se účastní imunitní odpovědi. CD8+ buňky rozpoznávají a eliminují změněné buňky vlastního organismu, působí jako lapáče odstraňující staré nebo poškozené buňky, jejichž přítomnost by mohla zvýšit náchylnost mléčné žlázy k infekcím (Sordillo et al. 1997).

3.5.2.2 Polymorfonukleární neutrofil

Název těchto buněk je odvozen od vlastností jejich jádra, jehož tvar je popisován jako laločnatý. Důležitou vlastností makrofágů je schopnost fagocytózy – intracelulárního zneškodnění patogenního organismu (Li et al. 2014; Malik et al. 2018). Rovněž mohou produkovat antibakteriální faktory, látky, které se mohou podílet na ochraně organismu (Malik et al. 2018). U koz tvoří hlavní složku leukocytů (Boutinaud & Jammes 2002; Shah et al. 2017).

3.5.2.3 Makrofágy

Tato skupina buněk je, v porovnání s ostatními buňkami, morfologicky charakterizována výskytem velkého jádra (Malik et al. 2018). Funkčními vlastnostmi se podle Malik et al. (2018) podobají polymorfonukleárním neutrofilům. Alhussien & Dang (2018) a Li et al. (2014) shodně uvádí, že jsou to právě makrofágy, které při zjištění přítomnosti patogenního organismu signalizují potenciální nebezpečí ostatním leukocytům.

3.5.3 Epiteliální buňky

Tyto buňky mají svůj původ v tkáni mléčné žlázy, odkud se během laktace vylučují do mléka odlupováním epitelů (Boutinaud & Jammes 2002; Albenzio et al. 2019). Ve zmíněných buňkách se mohou vyskytovat bílkoviny, lipidy a kaseinové micely. Neobsahují celé jádro, nicméně bylo dokázáno, že v některých se nacházejí jaderné fragmenty (Boutinaud & Jammes 2002). Autoři dále podotýkají, že epitheliální buňky mohou přispívat k přenosu imunoglobulinů z mateřského organismu do organismu mláďete.

3.5.4 Enzymy somatických buněk

SB jsou důležitým zdrojem enzymů. Po rozkladu SB se do mléka uvolňuje množství enzymů, například lipázy, katalázy, laktoperoxidázy, lysozym, elastázy, kolagenázy a dalších (Li et al. 2014).

Klíčové vlastnosti mléčných výrobků, textura a chuť, jsou závislé zvláště na obsahu a chování mléčných bílkovin, převážně kaseinových. Mléko obsahuje dva proteinázové systémy, oba pocházejí z krve. Jeden se podílí na rozpouštění krevních sraženin (obsahuje plasmin), druhý zajišťuje obranu organismu proti patogenním mikroorganismům (zahrnuje lysozomální proteinázy somatických buněk). Oba systémy se podílí na hydrolyze kaseinových bílkovin, jejich regulace je složitá a jejich aktivita je závislá na mnoha faktorech, například na fázi laktace nebo zdravotním stavu zvířete (Kelly et al. 2006).

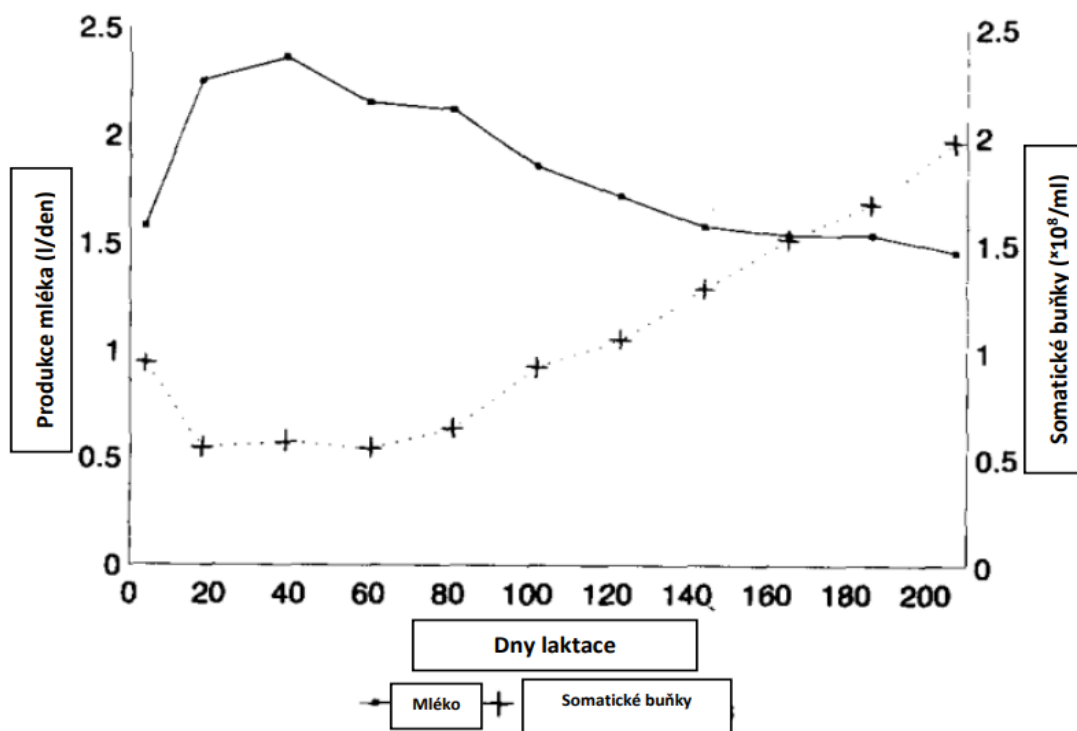
Proteinázy polymorfonukleárních buněk, například katepsin G, elastáza a proteináza 3 mají antimikrobiální aktivitu a během fagocytózy napomáhají zneškodnění patogenních mikroorganismů (Li et al. 2014). O' Mahony et al. (2013) zmiňuje navíc plasmin.

3.5.5 Faktory ovlivňující PSB v mléce

Přítomnost somatických buněk v mléce může nepřímo indikovat přítomnost patogenních mikroorganismů (Raynal-Ljutovac et al. 2005; Li et al. 2014; Alhussien & Dang 2018). PSB (PSB) je ovlivněn stádiem laktace a paritou, předpokládá se, že s každou další paritou se počet buněk zvyšuje.

Podle studie Gecaj et al. (2021) nebyl prokázán rozdíl PSB v závislosti na fázi laktace, nicméně Gomes et al. (2006) zmiňuje, že PSB v kozím mléce se s postupující laktací zvyšoval.

Ke zvýšenému obsahu somatických buněk může docházet i v pozdějších stádiích laktace a na jejím konci v důsledku klesající mléčné užitkovosti (Boutinaud & Jammes 2002). Tento případ ilustruje Graf č. 2.



Graf č. 2: Laktační křivky produkce koziho mléka a počtu somatických buněk (Rota et al. 1993).

Sutera et al. (2018) zmiňuje, že zvýšený PSB může souviset se zhoršenou dojivostí a změnami složení mléka. Alhussien & Dang (2018) a Malik et al. (2018) uvádí, že na obsah somatických buněk v mléce může mít vliv:

- Zdravotní stav zvířete
- Stádium laktace
- Četnost dojení
- Věk zvířete
- Počet mláďat
- Sezónní vlivy
- Nehygienické podmínky chovu
- Změna krmiva

3.5.6 Mastitida

Za nejčastější příčinu zvýšeného počtu somatických buněk v mléce se považuje mastitida – zánětlivé onemocnění mléčné žlázy (Malik et al. 2018; Novac & Andrei 2020). Je doprovázena fyzikálními, chemickými a mikrobiologickými změnami mléka a rovněž patologickými změnami mléčné žlázy (Malik et al. 2018).

Onemocnění je iniciováno vstupem dostatečného množství (infekční dávky) patogenního mikroorganismu strukovým kanálkem do vemene. Následuje rozmnožení patogenu, doprovázené případně produkcí toxinů a dalším rozvojem onemocnění (Malik et al. 2018). Mezi nejčastější původce zařazují Alhussien & Dang (2018) následující mikroorganismy: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* a *Streptococcus dysgalactiae*. Gocmen et al. (2019) dodává *Bacillus* spp. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* a další.

Legislativní požadavky na celkový počet mikroorganismů (CPM) v mléce se mezi jednotlivými státy liší. Pasterované kozí mléko určené pro potravinářské výrobky nesmí překročit $1\,500 \times 10^3$ KTJ/ml CPM (EU 2004). De Crémoux et al. (1996) navrhol hodnotu 750×10^3 buněk/ml pro minoritní patogeny a $1\,750 \times 10^3$ buněk/ml pro majoritní patogeny.

Předpokládá se, že somatické buňky se ve zvýšených počtech podílí nejen na ochraně mléčné žlázy při mastitidě, ale rovněž i na opravných mechanismech poškozené tkáně (Alhussien & Dang 2018).

Poutrel et al. (1997) uvádí, že onemocnění může být úspěšně léčeno podáváním antibiotik a zmiňuje, že struky by po dojení měly být dezinfikovány.

3.5.7 Vliv obsahu somatických buněk na vlastnosti mléka

Zvýšený PSB je spojen s biochemickými změnami složení mléka, může docházet ke zvyšování obsahu rozpustných bílkovin a minerálních látek. Zvýšená koncentrace sodných a chloridových iontů může poukazovat na změněnou filtrační funkci vemene při infekci mléčné žlázy. Důsledkem toho mohou být ztráty mléčné užitkovosti, a to až 15–20 % na kozu za den (Raynal-Ljutovac et al. 2005). Ve studii Min et al. (2007) byla pozorována negativní korelace mezi zvýšeným počtem somatických buněk a denní dojivostí, obsahu mléčného tuku, laktózy a celkové sušiny. Podle studie Barrón-Bravo et al. (2013), byla u zvířat produkujících mléko s vyšším obsahem somatických buněk zaznamenána zhoršená mléčná užitkovost a nižší obsah tuku, na rozdíl od obsahu bílkovin, který byl vyšší. Novac & Andrei (2020) rovněž poukazují na zvýšenou koncentraci proteinů, převážně syrovátkových bílkovin a albuminů.

3.5.8 Diferenciál somatických buněk

Užitečnou metodou k hodnocení kvality mléka je stanovení diferenciálního počtu buněk v mléce. Lze zhodnotit podíl jednotlivých typů somatických buněk a také role různých buněčných komponent. To může být důležité při studiu fyziologického nebo zánětlivého vývoje mléčné žlázy. Většina výzkumů v této oblasti byla doposud zaměřena především na třídy a typy leukocytů (Albenzio et al. 2019).

3.6 Vybrané metody stanovení somatických buněk v mléce

3.6.1 Stanovení metodou přímého mikroskopického vyšetření

Vzorek mléka je nanesen na podložní sklíčko, poté je vysušen a obarven. Následuje mikroskopické pozorování v prostředí imerzního oleje (Subcommittee on Screening Tests, National Mastitis Council. 1968). Zjišťování počtu buněk v mléce tímto způsobem bylo využíváno spíše v minulosti, ačkoliv někteří autoři (Hanuš et al. 2010; Boulaaba et al. 2011) jej stále využívají, převážně pro porovnání výsledků s ostatními metodami. V dnešní době je stanovení nahrazováno modernějšími a rychlejšími metodami, z nichž některé jsou zmíněny níže.

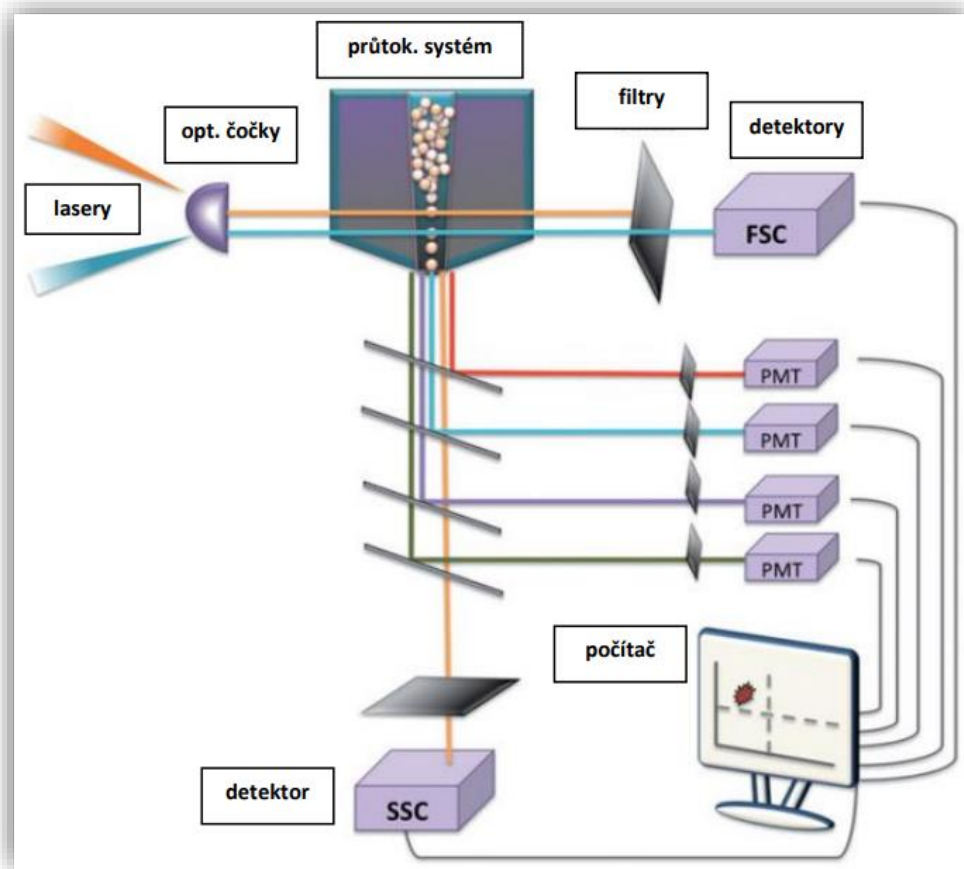
3.6.2 Průtoková cytometrie

Metoda je založena na měření rozptylu světla a případně fluorescence pozorovaných objektů. Podstatou analýzy a diferenciaci buněk je měření jejich relativní rozdílné velikosti, granularity a přítomnosti fluorescenční molekuly ve formě protilátky nebo barviva. (Macey 2010).

Metoda byla původně vyvinuta pro rozlišování buněčných populací v imunologii, aby bylo možné určit funkce jednotlivých buněk imunitního systému (Macey 2010). Autorka dále uvádí, že Wallace Coulter poprvé popsal přístroj, pro počítání buněk a měření jejich velikosti. Byl založen na průtoku buněk vodivou kapalinou, přičemž měřícím bodem procházela vždy jedna buňka. Toto zařízení bylo základem pro budoucí průtokový analyzátor. V následujících letech se metoda zdokonalovala, roku 1983 byly představeny první průtokové cytometry pro klinické měření (Macey 2010).

V současné době je průtoková cytometrie využívána v různých aplikacích založených na detekci membránových, cytoplazmatických nebo jaderných antigenů. Analýze lze podrobovat nejen celé buňky, ale i jejich organely, včetně jádra, chromozomů, DNA i RNA (Adan et al. 2016, Wilkerson 2012).

Wilkerson (2012) definuje průtokovou cytometrii jako metodu, která měří charakteristiky buněk nebo jiných částic, při průchodu průtokovou komorou v proudu kapaliny přes světelný zdroj. Zdrojem světla je obvykle laser (z anglického Light Amplification by Stimulated Emission or Radiation), který prochází buňkami. Optika (složená z filtrů a zrcadel) usměrňuje rozptyl světla nebo fluorescenci zkoumané částice do světelného detektoru. Poté je signál, vznikající průchodem světelného paprsku analyzovanou částicí, převeden z detektoru na digitální data, která analyzuje počítač. Výstupem mohou být histogramy, bodové grafy či grafy hustoty (Wilkerson 2012). Zjednodušené schéma průtokového cytometru představuje Obrázek č. 2.



Obrázek č. 2: Zjednodušené schéma průtokového cytometru (Adan et al. 2016).

Mezi hlavní součásti průtokového cytometru jsou řazena: média pro separaci buněk (většinou kapaliny), optika (pro excitaci a sběr), detektor a počítač (Adan et al. 2016, Wilkerson 2012). Jednotlivé systémy jsou detailněji popsány níže.

Systém průtokový

Tato část přístroje je složena ze zásobníku fyziologického roztoku a součástí, které zajišťují potřebný tlak a vstříkují roztok do průtokové komory, kde na buňky vzorku působí laserové paprsky. Macey (2010) uvádí, že tato průtoková komora může obsahovat kyvetu s plochými stranami pro minimalizaci nežádoucích odrazů světla.

Pro většinu aplikací je využíván vysoký (rychlejší) průtok kapaliny (například pro analýzu fenotypu savčích buněk), nízký (pomalejší) průtok je nicméně využíván například při kvantifikaci obsahu DNA v buňkách, protože zvyšuje rovnoměrnost a přesnost osvětlení jader laserem (Wilkerson 2012).

Systém optický

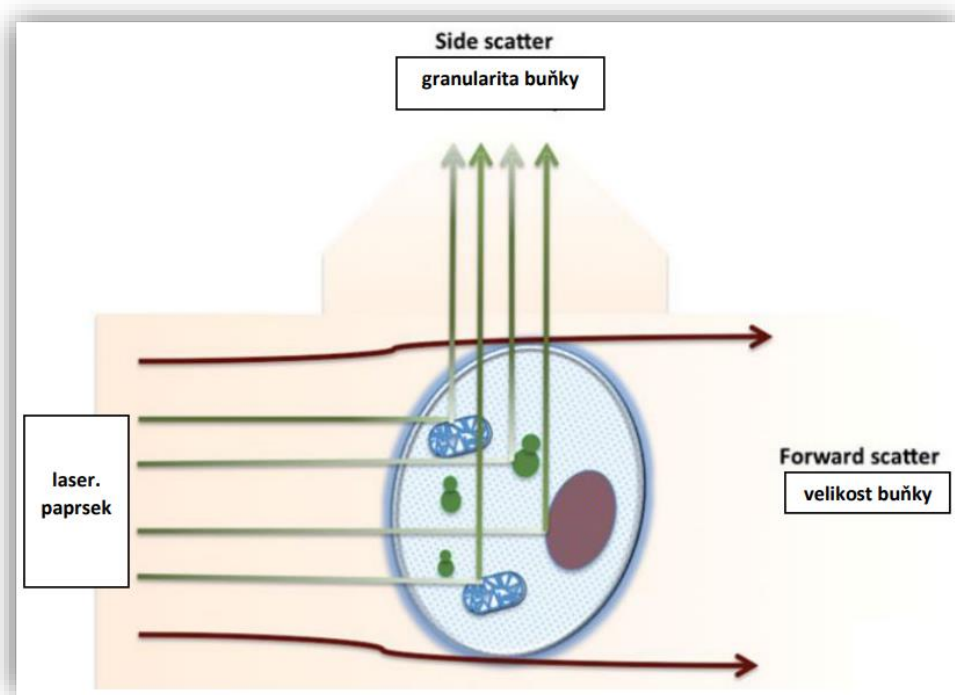
Optická část přístroje je složena z jednoho nebo více laserů (excitační optika) a sady čoček a filtrů (sběrná optika). Laser zajišťuje zdroj světla (Macey 2010, Wilkerson 2012, Adan et al 2016). Podle Macey (2010) výhoda laseru spočívá v produkci monochromatického světla, které může být využito v různých vlnových délkách. Lasery, které jsou v průtokové

cytometrii využívány nejčastěji jsou argonové lasery, které produkují světlo o vlnové délce od 351 nm do 630 nm. Mezi ostatní využívané lasery lze jmenovat UV lasery, kryptonové lasery a heliové lasery s neonem nebo kadmíem. Čočky a filtry zachycují úhlový rozptyl a fluorescenční signály excitovaných fluorochromů (Wilkerson 2012).

Příjem signálu a jeho zpracování

Když dojde ke kontaktu buňky s laserovým paprskem, světlo se rozptýlí dvěma způsoby: částečně se „odrazí“ od vnitřní struktury buňky (side – angle scatter, tedy boční rozptyl charakterizuje vnitřní složitost – zrnitost, tedy granularitu buňky, stav cytosolu, buněčné inkluze apod.), částečně se „ohne“ kolem buňky (forward – angle scatter, tedy přímý rozptyl charakterizuje velikost buňky) (Wilkerson 2012). Děj popisuje Obrázek č. 3.

Některé průtokové cytometry rozlišují buněčné parametry pomocí fluorescenčně značených protilátek proti povrchovým antigenům a vnitřním strukturám (například nukleovým kyselinám) ke stanovení obsahu DNA nebo životaschopnosti buněk (Wilkerson 2012).



Obrázek č. 3: Rozptyl světla buňkou (Adan et al. 2016).

Signály rozptylu světla a fluorescenční emise z excitace fluorescenčních barviv jsou pomocí elektronické sítě převedeny na elektronické impulsy. Tato síť obsahuje fotodiodu pro převod forward scatter (přímého rozptylu světla) a fotonásobič pro převod side – scatter (bočního rozptylu světla) a fluorescenčního světla. Impulsy jsou převedeny na digitální výstup a přeneseny do počítače, kde mohou být analyzovány (Wilkerson 2012).

3.6.3 Stanovení metodou ELISA

Zkratka ELISA vychází z anglického pojmenování: Enzyme – linked immunosorbent assay (Butler 2000). Základy této analytické metody byly podle Aydin (2015) položeny již roku 1941 Coonsem (Coons et al. 1941). Metoda prošla dlouhým vývojem, především v 70. letech minulého století, a v dnešní době patří k často využívaným laboratorním analýzám (Aydin 2015).

ELISA je považována za imunologický test, kde je hlavním principem tvorba specifické interakce mezi antigenem a protilátkou za použití vhodného enzymu (Butler 2000). Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu na produkt, který je barvený. Enzymy, které mohou být použity zahrnují například: β -galaktosidázu, glukózooxidázu, peroxidázu a alkalickou fosfatázu. Reakce mezi enzymem a substrátem probíhá obvykle 30–60 minut. K zastavení reakce dochází přidáním hydroxidu sodného, kyseliny chlorovodíkové nebo kyseliny sírové. Výsledky se vyhodnocují spektrofotometricky, při vlnové délce, která je závislá na vlastnostech použitých činidel nebo na základě fluorescence (Aydin 2015).

3.6.4 Metody založené na specifické reakci s DNA

Stanovení pomocí přístroje FOSSOMATIC®

Fossomatic je přístroj využívající specifické vazby DNA, kdy je měření založeno na principu optické fluorescence. Barvivo pronikne dovnitř buňky a vytvoří fluorescenční komplex navázáním jaderné DNA. Detektor za pomoci fotonásobiče spočítá obsah somatických buněk v mililitru analyzovaného vzorku (Albenzio et al. 2019).

Stanovení pomocí přístroje DeLaval® Cell Counter

Kawai et al. (2013) popisuje stanovení tak, že jádra somatických buněk jsou obarvena speciálním činidlem, specifickým pro DNA. Díky obarvení jader lze buňky pomocí optického zařízení spočítat, případně vyfotografovat i jejich snímky. Výhodou metody může být, v porovnání s ostatními metodami, nižší pořizovací cena zařízení, velká přesnost a možnost provádět měření přímo na místě odběru (Kawai et al. 2013).

3.6.5 Stanovení pomocí testů California Mastitis Test® a Somaticell®

Obě metody byly vyvinuty pro rychlá orientační měření vzorků, která mohou probíhat přímo v místě odběru vzorků. Testy mohou být využity k detekci subklinické mastitidy ve stádu nebo jako předběžný test při kontrole mléka z cisteren, tedy zda splňuje platné legislativní limity (Perrin et al. 1996; McDougall et al. 2001; Langoni et al. 2012).

California Mastitis Test®

Test je založen na chemické reakci mezi činidlem (obsahující bromkresol) a DNA, která se nachází v buňkách (Perrin et al. 1996). Vznikne gel různé konzistence, která je závislá na obsahu somatických buněk (McDougall et al. 2001).

Somaticell® test

Po přidání činidla je oddělen přebytečný roztok a ze stupnice je odečtena hodnota odpovídající počtu somatických buněk (Ferronato et al. 2018).

4. Metodika

4.1 Odběr vzorků mléka

Individuální vzorky koziho mléka plemene koza bílá krátkosrstá byly odebrány na ekologické biofarmě ve dnech 20.6. a 22.6. 2022 v rámci večerních nádojů.

Příprava i analýzy vzorků byly realizovány následně. Bylo odebráno mléko od 57 zvířat (+ 1 bazénový vzorek), při prvním odběru 29 vzorků a při druhém odběru 28 vzorků. Zvířata byla vybírána podle stáří, parity a stádia laktace.

Nejprve byla mléčná žláza omyta, struky byly otřeny jednorázovou utěrkou s dezinfekčním roztokem. První odstříky mléka byly odděleny a následovala dezinfekce hrotu struku lihovou utěrkou a ruční odběr vzorku, při kterém byl zároveň změřen PSB pomocí přístroje DeLaval.

Bezprostředně po odběru byly vzorky zchlazeny na 4–6 °C a přepraveny do laboratoře.

Koza bílá krátkosrstá

Toto plemeno bylo vyšlechtěno na jižní Moravě v 1. polovině 20. století. Vzniklo křížením původních českých plemen se švýcarským sánským plemenem a německým bílým ušlechtilým (proto je zařazována mezi tzv. sánská plemena). Zvířata jsou charakterizována středním tělesným rámcem, hmotnost samic se pohybuje v rozmezí 50–60 kg. Srst je krátká, bílá, bez pigmentu, přiléhavá, viz Obrázek č.4. Průměrná dojivost je 800–1000 kg mléka, délka laktace je přibližně 280 dní (Sambraus 2006).



Obrázek č. 4: Koza bílá krátkosrstá (Sambraus 2006).

4.2 Stanovení diferenciálního počtu somatických buněk

Příprava vzorků byla provedena dle modifikovaného postupu vycházejícího ze studie Li et al. (2015).

Vzorky mléka byly zhomogenizovány a převedeny do centrifugačních zkumavek. Pomocí několika centrifugačních kroků byly získány samotné pelety buněk. Vzorek byl centrifugován ve dvou různých režimech, vždy při teplotě 4 °C. Celkem 100 ml vzorku mléka bylo centrifugováno při rychlosti 200 rpm (rpm=otáček za minutu) po dobu 20 minut. Po odstředění obou podílů byl manuálně oddělen tuk i supernatant a ze dna zkumavky byl odebrán pelet. Poté byl dvakrát odstředěn s 30 ml fyziologického roztoku, pro zajištění co největší čistoty vzorku (450 rpm po dobu 10 minut, při teplotě 4 °C, s centrifugační brzdou).

Část suspenze buněk byla odebrána do zkumavek a následně proběhla aplikace barviv a specifických protilátek. Po uplynutí doby inkubace byl vzorek důkladně promyt a suspenze přenesena na vzorkovací destičku průtokového cytometru a poté byla provedena samotná analýza.

Při prvních testech bylo zjištěno, že pravděpodobně dochází ke zkreslení výsledků analýzy v důsledku obarvení tukových kuliček použitými barvivy (která byla ale určena pouze pro buňky). Podobný případ popisuje ve své studii i Schultz-Pernice et al. (2020) a zmiňuje, že rozlišení tukových kuliček a somatických buněk v mléce, může být problematické. Proto byly výsledky stanovení průtokovou cytometrií ověřeny pomocí zobrazovacího cytometru.

4.2.1 Přístroje a chemikálie

- Průtokový cytometr (NovoCyt, model iQue, IntelliCyt Corporation, USA)
 - Mikrotitrační destička (nesterilní) pro cytometrické stanovení (Gama Group a.s., Česká republika)
 - Centrifuga (Univerzal 320 R, typ 1406, Hettich, Německo)
 - Centrifuga (Univerzal, typ 1420, Hettich, Německo)
 - Vortex (vířivá míchačka) (BioCote, UK)
 - Chladnička (Gorenje, Slovinsko)
-
- Fyziologický roztok pro průtokovou cytometrii (PBS, pH 7,4, Thermo Fisher Scientific, USA)
 - Barvivo Zombie NIR (BioLegend, USA)
 - Barvivo Hoechst 33342 (ThermoFisher)
 - Protilátka anti CD 18 (BIO-RAD spol. s.r.o.)
 - Protilátka anti CD 11b (BioLegend, USA)
 - Protilátka anti CD 14 (BioLegend, USA)
 - Sekundární protilátka (BIO-RAD spol. s.r.o.)

4.2.2 Schéma aplikace barviv a protilátek

Protílátka CD45 byla původně zamýšlena jako hlavní panleukocytární marker (látka, která rozliší jednotlivé typy leukocytů), ale při prvních testech se potvrdilo, že nebyly obarveny všechny typy těchto buněk (výrobce tvrdil, že na kozí mléko bude fungovat tzv. cross reaktivitou, ale nepotvrdilo se to). Proto byla tato látka nahrazena CD18. Cílem barvení bylo odlišit živé a mrtvé buňky a stanovit celkový počet somatických buněk a diferencíál somatických buněk. Vyhodnocení a identifikace jednotlivých buněčných subpopulací bylo provedeno dle: Schwarz et al. (2011).

Postup barvení:

- A) Vyloučit částice nebuněčného původu (pomocí Hoechst 33342 barviva, protože buňky obsahující DNA budou Hoechst 33342+ (pozitivní).
- B) Vyloučit mrtvé buňky (pomocí Zombie dye); živé jsou Zombie- (negativní).
- C) Hoechst+/Zombie-/CD18- = živé epiteliální buňky
- D) Hoechst+/Zombie-/CD18+ = mrtvé epiteliální buňky
- E) Hoechst+/Zombie- /CD18+ /SSC a FSC typical SCATTERING PARAMETERS = veškeré živé lymfocyty
- F) Hoechst+/Zombie-/CD18+/CD14 low positive/CD11b+ = polymorfonukleární neutrofilny
- G) Hoechst+/Zombie-/CD18+/CD14 highly positive / CD11b+ = makrofágy

Popis barvení

Pelet buněk ve zkumavce, jehož objem činil 200 μ l, byl promíchán opětovným nasátím vypuštěním automatické pipety. Poté bylo k tomuto objemu bylo přidána směs protilátek. Vzorek byl ponechán při pokojové teplotě, ve tmě, a to po dobu 30 minut.

Po uplynutí času byl ke vzorku přidán chlazený (4 °C) fyziologický roztok (PBS 7,4) a vše bylo promícháno na vířivé míchačce. Následovalo odstředění na centrifuze Univerzal, typ 1420: při rychlosti 690 rpm, po dobu 3 minut.

Po odstředění byl odstraněn supernatant a k peletu byla přidána barviva a směs sekundárních protilátek.

Vzorek byl ponechán při pokojové teplotě, ve tmě, po dobu 20 minut. Po uplynutí času byl ke vzorku přidán chlazený (4 °C) fyziologický roztok a vše bylo promícháno na vířivé míchačce. Následovalo odstředění na centrifuze Univerzal, typ 1420: při rychlosti 690 rpm, po dobu 3 minut, za účelem odstranění supernatantu (zůstane pouze peleta (suspenze) buněk).

Poté byl k suspenzi přidán chlazený (4 °C) fyziologický roztok (PBS 7,4).

Suspenze buněk byla přenesena na mikrotitrační destičku průtokového cytometru. Po vložení destičky do cytometru a nastavení parametrů v softwaru NovoExpress 1.3.0® byla provedena analýza vzorku průtokovou cytometrií. Získaná data byla analyzována v programech Excel (Microsoft®) a Statistica 12 (StatSoft® Inc.).

Analýzu jednotlivých subpopulací buněk ve vzorku kozího mléka ilustruje *Obrázek č. 5* v příloze.

4.3 Analýza mléčných bílkovin

4.3.1 Celkový obsah bílkovin a kaseinů

Celkový obsah bílkovin a kaseinů byl stanoven pomocí přístroje DairySpec^{FT} (Bentley Instruments, Inc.) kalibrovaného na kozí mléko dle zavedených referenčních metod.

4.3.2 Zastoupení kaseinových frakcí

Příprava vzorků

Do zkumavky (Thermo Fisher Scientific, USA) bylo odebráno přibližně 10 ml syrového kozího mléka. Následně bylo odstředěno na centrifuze Eppendorf 5810R rychlostí 12 000 rpm/min (při teplotě 4 °C) po dobu 10 minut. Poté bylo odstředěné mléko ponecháno 5 minut v mrazicím boxu (-20 °C) a následně oddělena mléčná plazma, tzv. supernatant. Následně bylo odebráno 0,5 ml mléčné plazmy a přidáno 2 ml pufru (6M guanidin-HCl, 20mM dithiothreitol a 5mM citran sodný). Analyt byl poté naředěn 7,5 ml deionizované vody.

Dále byly vzorky krátce promíchány na vířivé míchačce a ponechány přibližně 60 minut při pokojové teplotě. Poté byly vzorky znovu krátce promíchány a následně přefiltrovány přes membránový mikrofiltr (acetát celulózy; 0,45 µm) přímo do vialek.

Poté byly vzorky analyzovány pomocí metody HPLC s DAD (diod array detector) detekcí dle metodiky Bordina et al. (2001), která byla pro tuto práci vhodně modifikována.

Chromatografické podmínky

- Kapalinový chromatograf: (Waters e2695, Waters Corporation, USA) s DAD detektorem (996, Waters Corporation, USA)
- Složení mobilní fáze A: H₂O:acetonitril (90:10), (v/v) s podílem 0,1 % trifluoroctové kyseliny (TFA)
- Složení mobilní fáze B: H₂O:acetonitril (10:90), (v/v) s podílem 0,1 % TFA
- Typ eluce: gradientová
- Průtok MF: 0,25 ml/min
- Teplota kolony: 40 °C
- Objem nástřiku: 20 µl
- Doba analýzy: 71 min
- Detekce: PDA, 218 nm
- Kolona: bioZenTM C4, 3,6 µm, 150 x 4,6 mm (Phenomenex, USA)

Kalibrace pro stanovení bílkovin

- α-CN (lyof. prášek, ≥ 70 %, Sigma-Aldrich, USA)
- β-CN (lyof. prášek, BioUltra, ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, USA)
- κ-CN (lyof. prášek, ≥ 70 %, Sigma-Aldrich, USA)

4.3.2.1 Přístroje a chemikálie

- Centrifuga Eppendorf 5810 R (Merci s. r. o., Německo)
- Millipore zásobník na demineralizovanou vodu (18 $\mu\Omega$)
- Vortex (BioCote, UK)
- Membránový mikrofiltr (acetát celulózy; 0,45 μm)
- Zkumavky (50 ml) (Thermo Fisher Scientific, USA)

- Trifluoroctová kyselina (ReagentPlus®, čistota $\geq 99\%$, Merck, Německo)
- Citran sodný ($\geq 99\%$)
- Dithiotreitol (BioUltra, p.a.)
- Guanidin hydrochlorid ($\geq 99,5\%$)

Statistické vyhodnocení dat

Data z průtokového cytometru byla změřena a uložena do softwaru NovoExpress 1.3.0®. Pro statistické vyhodnocení byly využity programy Excel (Microsoft®) a Statistica 12 (StatSoft® Inc.), na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5. Výsledky

5.1 Hodnocení obsahu somatických buněk

5.1.1 Celkové hodnocení

Pro celkový soubor vzorků ($n = 57$) byl stanoven průměrný počet somatických buněk (PSB) $869 \pm 759,48 \times 10^3$ buněk/ml mléka, který se pohyboval v rozmezí hodnot 91–3 728 $\times 10^3$ buněk/ml s variačním koeficientem 87,35 %.

Dále byly pomocí metody průtokové cytometrie vzorky podrobně analyzovány jednotlivých buněčných populací, tedy epiteliálních a neepiteliálních buněk (leukocytů), které byly dále rozděleny na subpopulace lymfocytů (LY), makrofágů (MA) a polymorfonukleárních neutrofilů (PMNL). Bylo prokázáno, že vzorky obsahovaly v průměru 48,14 % epiteliálních buněk, 51,85 % leukocytů a z toho tvořily 9,99 % lymfocyty, 10,43 % makrofágy a 74,40 % polymorfonukleární neutrofilů. Výsledky jsou znázorněny v Tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Zastoupení somatických buněk v kozím mléce pro všechny skupiny.

Proměnná	x	Med	Min	Max	Sm.odch.	Var.k.
PSB (tis./ml)	869,43	644,00	91,00	3728,00	759,48	87,35
Epiteliální b. (%)	48,14	45,40	9,87	97,29	26,01	54,04
Leukocyty (%)	51,85	54,60	2,71	90,13	26,01	50,16
LY (%)	9,99	7,06	0,87	46,56	8,89	88,95
MA (%)	10,43	8,20	0,36	34,71	8,41	80,63
PMNL (%)	74,40	77,99	35,09	96,34	13,96	18,76

x-průměr, Med-medián, Min-minimum, Max-maximum, Sm.odch.-směrodatná odchylka, Var.k.-variační koeficient, LY-lymfocyty, MA-makrofágy, PMNL-polymorfonukleární neutrofilů

5.1.2 Rozdělení do vzorků do skupin

Vzorky byly pro statistické zpracování rozděleny na základě počtů somatických buněk do čtyř skupin (A, B, C a D), viz Tabulka č. 4.

Tabulka č. 4: Rozdělení vzorků do skupin podle počtů somatických buněk (PSB).

Skupina	n	Obsah buněk (tis./ml mléka)
A	25	0–500
B	12	500–1 000
C	14	1 000–1 500
D	6	1 500–3 000

n-počet vzorků

Průměrný obsah SB ve skupině A byl $304 \pm 113,12 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Hodnoty obsahu PSB se pohybovaly v rozmezí $91-494 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Průměrný obsah SB ve skupině B byl $727 \pm 137,92 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Hodnoty obsahu PSB se pohybovaly v rozmezí $536-925 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Průměrný obsah SB ve skupině C byl $1\,220 \pm 148,81 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Hodnoty obsahu PSB se pohybovaly v rozmezí $1\,042-1\,495 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Průměrný obsah SB ve skupině D byl $2\,692 \pm 566,19 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Hodnoty obsahu PSB se pohybovaly v rozmezí $2\,161-3\,728 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Výsledky shrnuje Tabulka č. 5.

Tabulka č. 5: Obsah somatických buněk v rámci jednotlivých skupin vzorků mléka.

Skupina	x PSB (tis./ml)	Med (tis./ml)	Min (tis./ml)	Max (tis./ml)	Sm. odch.	Var.k. (%)
A	304	288,00	91	494	113,12	37,21
B	727	671,00	536	925	137,92	18,97
C	1 220	1 173,50	1 042	1 495	148,81	12,20
D	2 692	2 567,50	2 161	3 728	566,19	21,03

x-průměr, Med-medián, Min-minimum, Max-maximum, Sm. odch.-směrodatná odchylka, Var.k.-variační koeficient

5.1.3 Hodnocení jednotlivých skupin

Ve skupině A bylo hodnoceno 25 vzorků. Průměrný obsah SB v této skupině byl $304 \pm 113,12 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Hodnota variačního koeficientu byla stanovena na 37,21 %. Vzorky dále obsahovaly v průměru: 36,92 % epiteliálních buněk, 63,08 % leukocytů, 14,00 % lymfocytů, 7,50 % makrofágů a 74,71 % polymorfonukleárních neutrofilů. Výsledky pro skupiny jsou znázorněny v Tabulkách č. 6-9.

Tabulka č. 6: Zastoupení somatických buněk v kozím mléce pro skupinu A.

Skupina A							
Proměnná	n	x	Med	Min	Max	Sm.odch.	Var.k.
PSB (tis./ml)	25	304,04	288,00	91,00	494,00	113,12	37,21
Epiteliální b. (%)	25	36,92	33,44	98,70	78,65	21,24	57,53
Leukocyty (%)	25	63,08	66,56	21,35	90,13	21,24	33,67
LY (%)	25	14,00	11,24	2,99	46,56	10,43	74,51
MA (%)	25	7,50	7,72	2,23	15,86	3,61	48,06
PMNL (%)	25	74,71	80,49	39,87	87,45	13,76	18,42

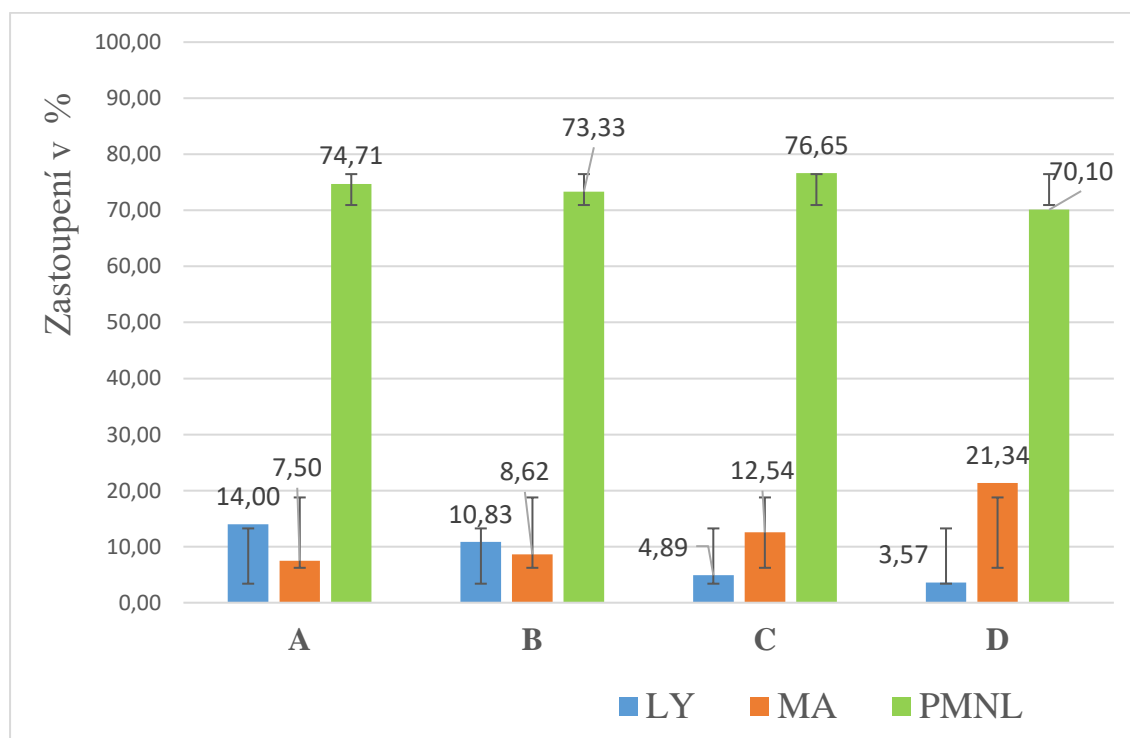
n-počet vzorků, x-průměr, Med-medián, Min-minimum, Max-maximum, Sm. odch.-směrodatná odchylka, Var.k.-variační koeficient, LY-lymfocyty, MA-makrofágy, PMNL-polymorfonukleární neutrofily

Ve skupině B (n = 12) bylo hodnoceno 12 vzorků. Průměrný obsah SB v této skupině byl $727 \pm 137,92 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Hodnota variačního koeficientu byla stanovena na 18,97 %. Vzorky dále obsahovaly v průměru: 42,91 % epiteliálních buněk, 57,09 % leukocytů, 10,83 % lymfocytů, 8,62 % makrofágů a 73,33 % polymorfonukleárních neutrofilů. Zastoupení jednotlivých typů somatických buněk ve skupinách A–D ilustruje Graf č. 3. Úsečky v grafu zobrazují směrodatnou odchylku.

Tabulka č. 7: Zastoupení somatických buněk v kozím mléce pro skupinu B.

Skupina B							
Proměnná	n	x	Med	Min	Max	Sm.odch.	Var.k.
PSB (tis./ml)	12	726,83	671,00	536,00	925,00	137,92	18,97
Epiteliální b. (%)	12	42,91	45,37	12,97	79,20	25,55	59,53
Leukocyty (%)	12	57,09	54,64	20,80	87,03	25,55	44,75
LY (%)	12	10,83	10,00	0,97	21,81	6,14	56,66
MA (%)	12	8,62	6,65	0,36	34,71	8,99	104,24
PMNL (%)	12	73,33	77,01	35,09	96,34	18,21	24,84

n-počet vzorků, x-průměr, Med-medián, Min-minimum, Max-maximum, Sm. odch.-směrodatná odchylka, Var.k.-variační koeficient, LY-lymfocyty, MA-makrofágy, PMNL-polymorfonukleární neutrofilů



LY-lymfocyty, MA-makrofágy, PMNL-polymorfonukleární neutrofilů

Graf č. 3: Zastoupení jednotlivých typů somatických buněk ve skupinách A–D.

Ve skupině C (n = 14) bylo hodnoceno 14 vzorků. Průměrný obsah SB v této skupině byl $1\,220 \pm 148,81 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Hodnota variačního koeficientu byla stanovena na 12,20 %. Vzorky dále obsahovaly v průměru: 58,71 % epitelálních buněk, 41,29 % leukocytů, 4,89 % lymfocytů, 12,54 % makrofágů a 76,65 % polymorfonukleárních neutrofilů.

Tabulka č. 8: Zastoupení somatických buněk v kozím mléce pro skupinu C.

Skupina C							
Proměnná	n	x	Med	Min	Max	Sm.odch.	Var.k.
PSB (tis./ml)	14	1220,07	1173,5	1042,00	1495,00	148,81	12,20
Epiteliální b. (%)	14	58,71	59,21	12,52	97,37	0,25	42,57
Leukocyty (%)	14	41,29	40,82	2,73	88,21	0,25	60,54
LY (%)	14	4,89	2,92	0,94	16,40	4,86	99,38
MA (%)	14	12,54	11,00	2,11	33,78	8,63	68,77
PMNL (%)	14	76,65	75,61	57,80	95,26	11,16	14,56

n-počet vzorků, x-průměr, Med-medián, Min-minimum, Max-maximum, Sm. odch.-směrodatná odchylka, Var.k.-variační koeficient, LY-lymfocyty, MA-makrofágy, PMNL-polymorfonukleární neutrofilů

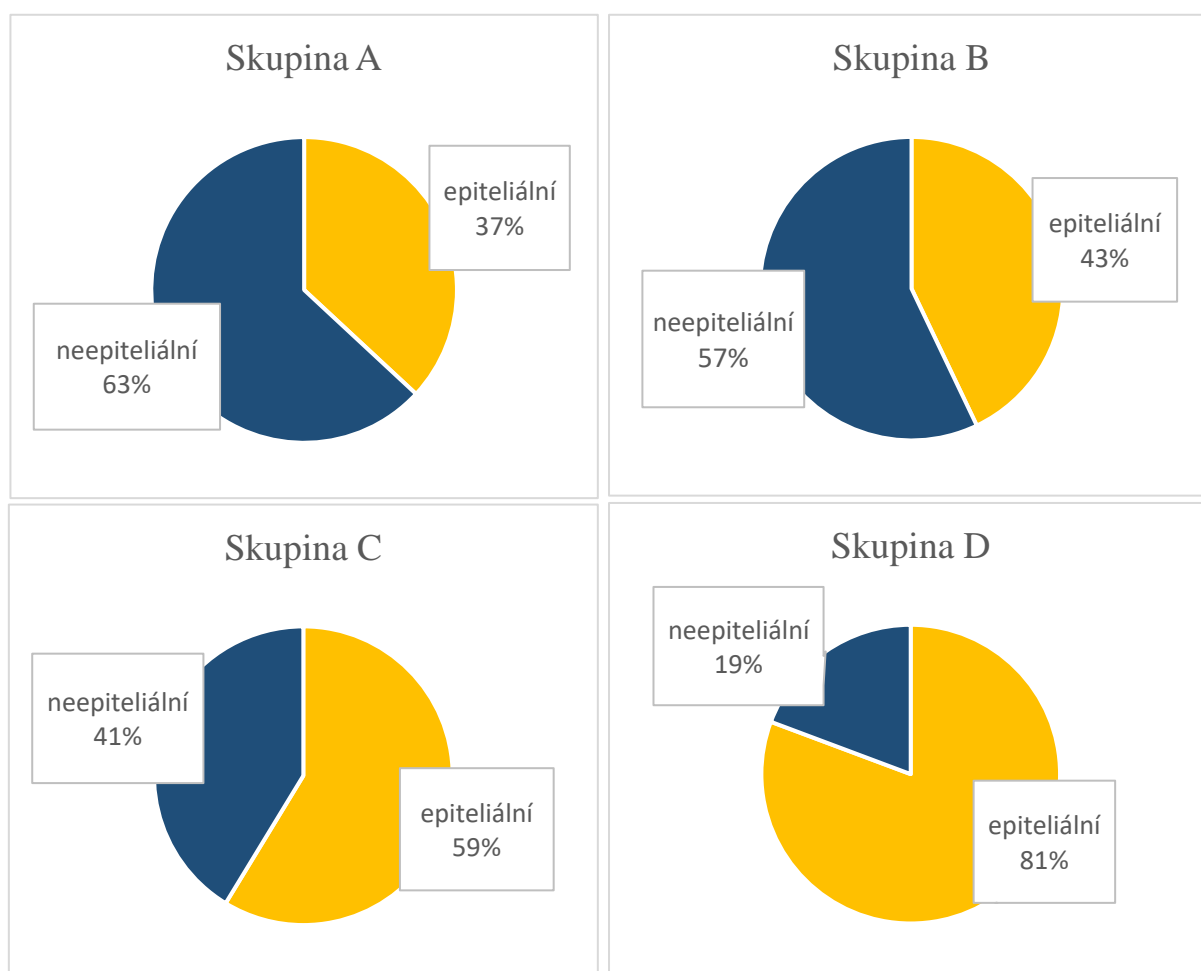
Ve skupině D (n = 6) bylo hodnoceno 6 vzorků. Průměrný obsah SB v této skupině byl $2\,692 \pm 566,19 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Hodnota variačního koeficientu byla stanovena na 21,03 %. Vzorky dále obsahovaly v průměru: 80,70 % epitelálních buněk, 19,30 % leukocytů, 3,57 % lymfocytů, 21,34 % makrofágů a 70,10 % polymorfonukleárních neutrofilů.

Tabulka č. 9: Zastoupení somatických buněk v kozím mléce pro skupinu D.

Skupina D							
Proměnná	n	x	Med	Min	Max	Sm.odch.	Var.k.
PSB (tis./ml)	6	2692,33	2567,50	2161,00	3728,00	566,19	21,03
Epiteliální b. (%)	6	80,70	80,20	71,31	90,51	8,63	10,70
Leukocyty (%)	6	19,30	19,84	9,51	29,00	8,63	44,73
LY (%)	6	3,57	2,56	0,90	11,25	3,89	108,76
MA (%)	6	21,34	22,3	3,62	34,56	12,37	57,98
PMNL (%)	6	70,10	70,01	53,21	85,85	13,47	19,22

n-počet vzorků, x-průměr, Med-medián, Min-minimum, Max-maximum, Sm. odch.-směrodatná odchylka, Var.k.-variační koeficient, LY-lymfocyty, MA-makrofágy, PMNL-polymorfonukleární neutrofilů

Z Grafů č. 4-7 a vyplývá, že nejvyšší obsah epitelálních buněk měla skupina A. Se vzrůstajícím počtem somatických buněk klesal obsah leukocytů (neepitelálních buněk). Obsah epitelálních buněk se naopak zvyšoval. Skupina D (nejvyšší počty SB) vykazovala nejvyšší obsah epitelálních buněk. Zastoupení PSB pro všechny skupiny znázorňuje *Graf č. 8* v příloze.



Grafy č. 4-7: Průměrný obsah epitelálních a neepitelálních buněk v jednotlivých skupinách dle intervalu PSB.

Podle stanovených rozdílů v rámci skupin byla dále sledována limitní hodnota PSB, která vychází z publikací Boutinaud & Jammes (2002) a Raynal-Ljutovac et al. (2005). Tato hodnota je autory vnímána jako hranice, kdy dochází k výrazným změnám ve vztahu ke kvalitě kozího mléka (Boutinaud & Jammes 2002; Raynal-Ljutovac et al. 2005). Vzorky byly rozděleny do dvou skupin, na skupinu, jejíž vzorky měly PSB menší než $1\,000 \times 10^3$ buněk/ml mléka a na skupinu, jejíž vzorky měly PSB vyšší než $1\,000 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Průměrný obsah zkoumaných buněk v těchto skupinách zobrazuje Tabulka č. 10. Všechny vzorky byly tedy testovány dle stanovené limitní hodnoty PSB $1\,000 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Bylo testováno, zda existuje statisticky významný rozdíl v zastoupení jednotlivých typů SB mezi těmito skupinami. Pro sledované parametry byl zvolen t-test pro nezávislé vzorky. Byl proveden na hladinách významnosti $\alpha = 0,05$, $\alpha = 0,01$ a $\alpha = 0,001$.

Bylo zjištěno, že na hladinách významnosti $\alpha = 0,05$ a $\alpha = 0,01$ existoval statisticky významný rozdíl (barevně označeno v tabulce) u epiteliálních buněk, leukocytů, LY a MA. Na hladině významnosti $\alpha = 0,001$ existoval statisticky významný rozdíl u epiteliálních buněk, leukocytů a LY, u MA neexistoval. U PMNL neexistoval na žádné z testovaných hladin významnosti statisticky významný rozdíl, viz Tabulka č. 11.

Tabulka č. 10: Průměrné hodnoty obsahu buněk u skupin s $PSB < 1\,000 \times 10^3$ buněk/ml a $PSB > 1\,000 \times 10^3$ buněk/ml.

	PSB < 1 000 × 10 ³ /ml	PSB > 1 000 × 10 ³ /ml
n	37	20
Epiteliální b. (%)	38,86	65,31
Leukocyty (%)	61,14	34,69
LY (%)	12,97	4,50
MA (%)	7,87	15,18
PMNL (%)	74,26	74,69

n-počet vzorků, LY-lymfocyty, MA-makrofágy, PMNL-polymorfonukleární neutrofil

Tabulka č. 11: Shrnutí výsledků t-testu pro jednotlivé typy somatických buněk.

Typ buněk	p-hodnota		
Epiteliální b.	0,000*	0,000**	0,000***
Leukocyty	0,000*	0,000**	0,000***
LY	0,000*	0,000**	0,000***
MA	0,001*	0,001**	0,002***
PMNL	0,913*	0,913**	0,913***

* $\alpha = 0,05$, ** $\alpha = 0,01$, *** $\alpha = 0,001$

5.2 Mikrobiologický rozbor

Mikrobiologickému hodnocení bylo podrobena celkem 57 vzorků. CPM (celkový počet mikroorganismů) bylo stanoveno pomocí GTK-M agaru, kultivace proběhla při teplotě 30 °C za aerobních podmínek. Obsah stafylokoků byl stanoven pomocí Baird-Parker agaru/*Staphylococcus* agaru, kultivace proběhla při 37 °C za aerobních podmínek. Do statistického zpracování byl zahrnuto pouze 39 vzorků, u kterých byl jasně prokázán obsah CPM a stafylokoků. Za vzorky s mikrobiologickým nálezem byly považovány vzorky, u kterých byl prokázán obsah CPM vyšší než 100 KTJ/ml a zároveň obsah stafylokoků vyšší než 40 KTJ/ml. Limity byly stanoveny na základě odborné literatury.

Z Grafu č. 9 vyplývá, že nejvíce sterilních vzorků se nacházelo ve skupině A. Od skupiny B již nebyl rozdíl v zastoupení sterilních vzorků a vzorků s nálezem, lze tedy předpokládat, že limitní hodnota PSB 500×10^3 buněk/ml mléka pravděpodobně značí zhoršení kvality



Graf č. 9: Zastoupení sterilních vzorků a vzorků s mikrobiologickým nálezem.

Dále bylo testováno, zda existuje statisticky významný rozdíl v zastoupení jednotlivých typů buněk mezi sterilními vzorky a vzorky s nálezem. Vzorky byly rozděleny do dvou skupin, na skupinu, jejíž vzorky měly PSB menší než $1\,000 \times 10^3$ buněk/ml mléka a na skupinu, jejíž vzorky měly PSB vyšší než $1\,000 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Průměrný obsah zkoumaných buněk v těchto skupinách zobrazuje Tabulka č. 12. Pro sledované parametry byl zvolen t-test pro nezávislé vzorky. Byl proveden na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka č. 12: Průměrné hodnoty obsahu buněk u skupin s PSB $< 1\,000 \times 10^3$ buněk/ml a PSB $> 1\,000 \times 10^3$ buněk/ml.

	PSB $< 1\,000 \times 10^3$ /ml	PSB $> 1\,000 \times 10^3$ /ml
n	23,00	16,00
Epiteliální b. (%)	38,28	63,32
Leukocyty (%)	61,72	36,68
LY (%)	12,96	3,86
MA (%)	8,07	16,00
PMNL (%)	73,93	75,83

n-počet vzorků, LY-lymfocyty, MA-makrofágy, PMNL-polymorfonukleární neutrofilů

Bylo zjištěno, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistoval statisticky významný rozdíl v zastoupení jednotlivých typů buněk mezi sterilními vzorky a vzorky s nálezem, viz Tabulka č. 13.

Tabulka č. 13: Shrnutí výsledků t-testu.

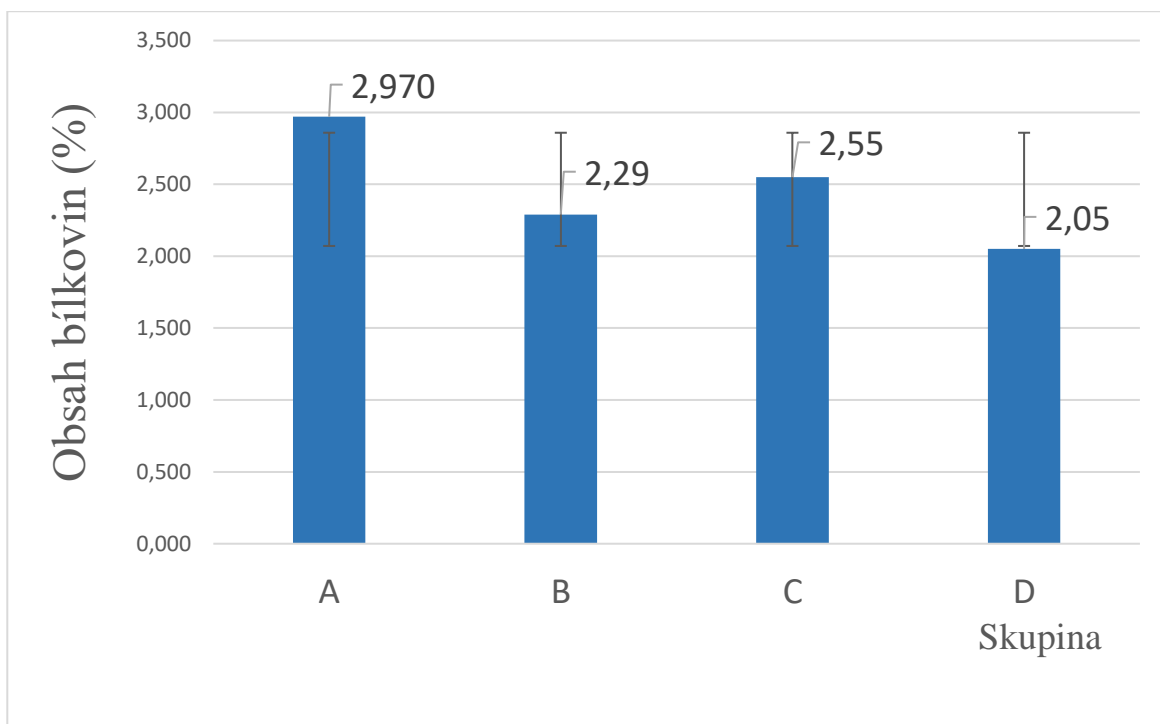
Typ buněk (%)	p-hodnota
Epiteliální b.	0,786*
Leukocyty	0,786*
LY	0,501*
MA	0,346*
PMNL	0,412*

* $\alpha = 0,05$

5.3 Obsah bílkovin v kozím mléce

5.3.1 Celkové hodnocení

Bylo hodnoceno 57 vzorků. Průměrná hodnota obsahu bílkovin byla 2,63 % a hodnoty se pohybovaly v rozmezí $2,57-3,96 \pm 1,19$ %. Z Grafu č. 10 vyplývá, že nejvíce bílkovin obsahovaly vzorky ve skupině A (PSB = $0-500 \times 10^3/\text{ml}$), průměrně 2,98 % bílkovin. Nejméně bílkovin obsahovaly vzorky ve skupině D (PSB = $1\ 500-3\ 000 \times 10^3/\text{ml}$), průměrně 2,05 % bílkovin. Úsečky v grafu zobrazují směrodatnou odchylku.



Graf č. 10: Zastoupení bílkovin v jednotlivých skupinách (%).

Bylo testováno, zda existuje statisticky významná závislost obsahu bílkovin na PSB. Pro sledované parametry byla zvolena regresní analýza. Testování bylo provedeno na hladinách významnosti $\alpha = 0,05$, $\alpha = 0,01$ a $\alpha = 0,001$. Bylo zjištěno, že na žádné hladině významnosti neexistovala statisticky významná závislost obsahu bílkovin na PSB.

5.3.2 Hodnocení jednotlivých skupin dle PSB

Skupina A ($n = 25$) charakteristická rozsahem PSB $0-500 \times 10^3$ buněk/ml mléka vykazovala medián obsahu bílkovin (3,03 %). Ve skupině B je průměrná hodnota je téměř shodná s hodnotou ve skupině C (2,99 vs. 3,01 %). Významný pokles bílkovin byl sledován ve skupině D, tedy vzorky s obsahem PSB vyšším než $1\,500 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Nicméně je nutné vzít v potaz, že ve skupině D byl k dispozici nižší počet vzorků ($n = 6$), výsledky shrnuje Tabulka 14.

Tabulka č. 14: Obsah bílkovin u jednotlivých skupin.

Skupina	n	Med (%)	Var.k. (%)
A	25	3,03	23,28
B	12	2,99	60,71
C	14	3,01	55,49
D	6	2,71	79,82

n-počet vzorků, Med-medián, Var.k.-variační koeficient

Bylo testováno, zda existuje statisticky významný rozdíl v zastoupení bílkovin mezi jednotlivými skupinami. Pro sledované parametry byl zvolen t-test pro nezávislé vzorky. Byl proveden na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Bylo zjištěno, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistoval statisticky významný rozdíl v zastoupení bílkovin mezi jednotlivými skupinami. Výsledky shrnuje Tabulka č. 15.

Tabulka č. 15: Shrnutí výsledků t-testu – obsah bílkovin ve skupinách.

Skupina	p-hodnota
A vs. B	0,670*
A vs. C	0,219*
A vs. D	0,864*
B vs. C	0,144*
B vs. D	0,932*
D vs C	0,441*

* $\alpha = 0,05$

5.3.3 Vliv jednotlivých typů SB na obsah bílkovin

Epiteliální buňky a leukocyty

Mezi obsahem epiteliálních buněk a zastoupením celkových bílkovin a kaseinů, včetně jednotlivých kaseinových frakcí byla zjištěna pozitivní korelace. Středně silná závislost byla zaznamenána u obsahu bílkovin ($r = 0,342$) a obsahu kaseinu ($r = 0,359$). Oproti tomu, mezi obsahem leukocytů a obsahem bílkovin, kaseinů, jednotlivých kaseinových frakcí byla zjištěna negativní korelace. Středně silná závislost byla zaznamenána u obsahu bílkovin a obsahu kaseinu. Výsledky znázorňuje Tabulka č. 16.

Tabulka č. 16: Výsledky regresní a korelační analýzy obsahu bílkovin a zastoupení jednotlivých typů SB.

Proměnná	r	
	Epiteliální b.	Leukocyty
α 1-CN (%)	0,186*	-0,185*
α 2-CN (%)	0,156*	-0,156*
β -CN (%)	0,211*	-0,211*
κ -CN (%)	0,146*	-0,146*
Bílkoviny (%)	0,342*	-0,341*
Kasein (%)	0,359*	-0,359*

* $\alpha = 0,05$, r-korelační koeficient, CN-kasein

Lymfocyty, makrofágy a polymofronukleární neutrofilly

Mezi obsahem lymfocytů a celkovým obsahem bílkovin, kaseinů včetně jednotlivých kaseinových frakcí byla zjištěna pozitivní korelace, s výjimkou kaseinové frakce α 2-kaseinu, kde byla korelace negativní. Mezi obsahem makrofágů a obsahem bílkovin, kaseinů, jednotlivých kaseinových frakcí byla zjištěna pozitivní korelace, s výjimkou kaseinových frakcí α 1-kaseinu a κ -kaseinu, kde byla zjištěna negativní korelace. Středně silná závislost byla zjištěna u obsahu bílkovin, kaseinu a β -kaseinu.

Mezi obsahem polymorfonukleárních neutrofilů a obsahem bílkovin, kaseinů, jednotlivých kaseinových frakcí byla zjištěna negativní korelace. Středně silná závislost byla zaznamenána u obsahu bílkovin, kaseinu a β -kaseinu. Výsledky shrnuje Tabulka č. 17.

Tabulka č. 17: Výsledky regresní a korelační analýzy obsahu bílkovin a zastoupení jednotlivých typů SB.

Proměnná	r		
	LY	MA	PMNL
α 1-CN (%)	0,230*	-0,148*	-0,122*
α 2-CN (%)	-0,164*	0,201*	-0,061*
β -CN (%)	0,130*	0,398*	-0,430*
κ -CN (%)	0,198*	-0,024*	-0,194*
Bílkoviny (%)	0,344*	-0,344*	-0,328*
Kasein (%)	0,332*	0,332*	-0,333*

* $\alpha=0,05$, r-korelační koeficient, CN-kasein, LY-lymfocyty, MA-makrofágy, PMNL-polymorfonukleární neutrofilů

5.4 Zastoupení kaseinových bílkovin

5.4.1 Celkové hodnocení

Bylo hodnoceno 57 vzorků. Průměrná hodnota obsahu kaseinu byla 1,76 %. Skupina A (n = 25) charakteristická rozsahem PSB 0–500 tis./ml vykazovala průměrný obsah kaseinu (2,13 %). Ve skupině B byl pozorován nižší obsah kaseinu (1,62 %), než ve skupině C (1,83 %). Významný pokles obsahu kaseinu byl zaznamenán u skupiny D (1,46 %), tedy u vzorků s nejvyšším obsahem SB. Skupina D nicméně obsahovala nižší počet vzorků (n = 6). Obsah jednotlivých kaseinových frakcí u skupin A–D ilustruje Tabulka č. 18.

Tabulka č. 18: Celkový obsah kaseinu v jednotlivých skupinách dle PSB.

Skupina	n	Obsah kaseinu (%)	Sm.odch. (%)	Var.k. (%)	s ²
A	25	2,13	0,50	23,88	0,26
B	12	1,62	0,94	60,82	1,04
C	14	1,83	0,98	55,75	1,04
D	16	1,46	1,07	80,05	1,37

n-počet vzorků, Sm.odch.-směrodatná odchylka, Var.k.-variační koeficient, s²-rozptyl

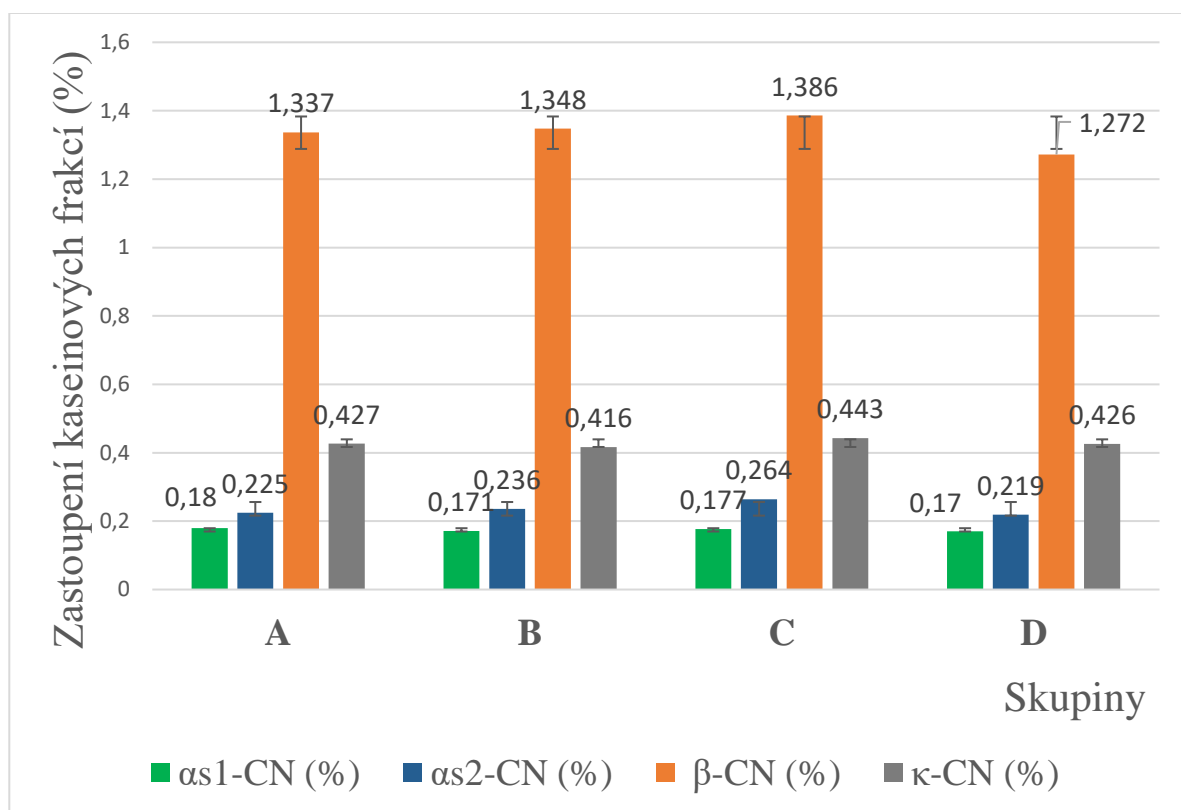
Bylo testováno, zda existuje statisticky významný rozdíl v zastoupení kaseinu mezi jednotlivými skupinami. Pro sledované parametry byl zvolen t-test pro nezávislé vzorky. Byl proveden na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Bylo zjištěno, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistoval statisticky významný rozdíl v zastoupení kaseinu mezi jednotlivými skupinami. Výsledky shrnuje Tabulka č. 19. Obsah jednotlivých kaseinových frakcí u skupin A–D ilustruje Graf č. 11. Úsečky v grafu zobrazují směrodatnou odchylku.

Tabulka č. 19: Shrnutí výsledků t-testu – obsah kaseinu ve skupinách.

Skupina	p-hodnota
A vs. B	0,558*
A vs. C	0,243*
A vs. D	0,861*
B vs. C	0,121*
B vs. D	0,849*
D vs. C	0,446*

* $\alpha=0,05$



Graf č. 11: Zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí ve skupinách.

Podle Tabulky č. 20 byl obsah α 1-kaseinu vyšší u skupin A a C, než u skupin B a D. Nejméně α 2-kaseinu obsahovaly vzorky ve skupině D, nejvíce ve skupině C. Nejvyšší obsah β -kaseinu byl naměřen u skupiny C, nejnižší u skupiny D. Obsah κ -kaseinu byl u všech skupin přibližně vyrovnaný.

Tabulka č. 20: Zastoupení kaseinových frakcí u jednotlivých skupin.

Skupina	n	Obsah kaseinu (%)	Kaseinové frakce			
			α 1-CN (%)	α 2-CN (%)	β -CN (%)	κ -CN (%)
A	23	2,13	0,18	0,23	1,34	0,43
B	12	1,62	0,17	0,24	1,35	0,42
C	13	1,83	0,18	0,26	1,39	0,44
D	5	1,46	0,17	0,22	1,27	0,43

n-počet vzorků, CN-kasein

5.4.2 Statistické vyhodnocení – korelace obsahu kaseinů a PSB

Pozitivní korelace byla zaznamenána u α 2-kaseinu, hodnota r byla 0,047, závislost obsahu α 2-kaseinu na PSB byla velmi slabá. Pozitivní korelace byla zaznamenána rovněž u κ -kaseinu, hodnota r byla 0,021, závislost obsahu κ -kaseinu na PSB byla velmi slabá. Negativní korelace byla zaznamenána u α 1-kaseinu, hodnota r byla -0,038, závislost obsahu α 1-kaseinu na PSB byla velmi slabá. Negativní korelace byla zaznamenána rovněž u β -kaseinu, hodnota r byla -0,056. Závislost obsahu β -kaseinu na PSB byla velmi slabá. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce č. 21.

Tabulka č. 21: Výsledky regresní a korelační analýzy – kaseinové frakce vs. PSB.

Kaseinová frakce	r
α 1-CN (%)	-0,038*
α 2-CN (%)	0,047*
β -CN (%)	-0,056*
κ -CN (%)	0,021*

* $\alpha=0,05$, r -korelační koeficient, CN-kasein

6. Diskuze

Vzorky byly rozděleny do čtyř skupin (A, B, C a D), podle počtu somatických buněk (PSB). Skupina A charakterizovaná PSB $0\text{--}500 \times 10^3$ buněk/ml mléka, obsahovala průměrně $304 \pm 113,12 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Skupina B s PSB v rozmezí $500\text{--}1\,000 \times 10^3$ buněk/ml mléka, obsahovala v průměru $727 \pm 137,92 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Skupina C s PSB $1\,000\text{--}1\,500 \times 10^3$ buněk/ml mléka obsahovala průměrně $1\,220 \pm 148,81 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Skupina D charakterizovaná PSB $1\,500\text{--}3\,000 \times 10^3$ buněk/ml mléka, obsahovala v průměru $2\,692 \pm 566,19 \times 10^3$ buněk/ml mléka. Naměřené výsledky se shodují s výsledky Boutinaud & Jammes (2002), kteří uvádí hodnotu PSB $1\,100 \times 10^3$ buněk/ml mléka, i s výsledky Raynal-Ljutovac et al. (2005), kteří uvádí PSB $1\,000 \times 10^3$ buněk/ml mléka.

Díky provedenému mikrobiologickému rozboru bylo možné vybrat ke statistickému vyhodnocení pouze vzorky bez mikrobiologického nálezu, které byly charakterizovány obsahem CPM nižším než 100 KTJ/ml a zároveň obsahem stafylokoků nižším než 40 KTJ/ml. Bylo tedy možné jednoznačně zhodnotit vliv PSB, bez zkreslení případným zánětlivým onemocněním. Ve skupině vzorků mlék obsahující nejvýše 500×10^3 buněk/ml mléka bylo téměř 90 % vzorků bez bakteriálního nálezu. Kvalita mléka zkoumaného stáda byla z mikrobiologického hlediska na velmi dobré úrovni.

Leitner et al. (2016) uvádí, že hodnoty PSB: $1\,500 \times 10^3\text{--}3\,500 \times 10^3$ buněk/ml mohou být spojeny s výskytem infekce, a to s rizikem vyšším, než je 50 %. Mléko, u kterého byly zjištěny hodnoty vyšší než $3\,500 \times 10^3$ buněk/ml není považováno za bezpečné pro zdraví člověka a nemělo by být využíváno k jeho výživě (Leitner et al. 2016). Hodnota $3\,500 \times 10^3$ buněk/ml byla při našem měření překročena pouze u jednoho vzorku. V porovnání s hodnotami, které uvádí Min et al. (2007): $2\,000 \times 10^3\text{--}4\,000 \times 10^3$ buněk/ml byly naše naměřené hodnoty spíše nižší.

Ma et al. (2000) podotýká, že zvýšený PSB může mít negativní vliv na kvalitu mléka, například zhoršovat jeho chuť a zkracovat dobu trvanlivosti. Změny jsou pravděpodobně způsobeny rozkladem mléčných bílkovin a tuku (Ma et al. 2000). V rámci našeho výzkumu bylo zjištěno, že mezi obsahem epiteliálních buněk a zastoupením celkových bílkovin a kaseinů, včetně jednotlivých kaseinových frakcí byla pozitivní korelace. Středně silná závislost byla zaznamenána u obsahu bílkovin ($r = 0,342$) a obsahu kaseinu ($r = 0,359$). Oproti tomu, mezi obsahem leukocytů a zastoupením bílkovin, kaseinů i jednotlivých kaseinových frakcí byla zjištěna negativní korelace. Pokles obsahu bílkovin (2,71 % vs. 3,03 %) byl sledován u skupiny s nejvyšším obsahem PSB, což je souladu se studií Ma et al. 2000.

Podle studie Sánchez-Macías et al. (2013) mohou somatické buňky, pomocí svých endogenních enzymů, pozitivně ovlivňovat složení a technologické vlastnosti mléčných výrobků a podílet se tak na výsledné kvalitě těchto výrobků. Intenzita lipolýzy probíhající v sýrech, byla přímo závislá na počtu somatických buněk (Chen et al. 2010; Sánchez-Macías et al. 2013). Rovněž průběh proteolýzy, zvláště u kaseinových bílkovin, mohou tyto buňky ovlivňovat. Předpokládá se, že účinky buněk jsou závislé na tom, jak bylo mléko tepelně ošetřeno (Sánchez-Macías et al. 2013). Podle studie Gautam et al. (2023) aktivita proteolytických enzymů v kozím mléce významně pozitivně koreluje se stádiem laktace, PSB

($r = 0,966$) a hodnotou pH ($r = 0,812$). Negativní korelace byla zaznamenána u obsahu bílkovin ($r = -0,231$). Výsledky byly vyhodnoceny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Gautam et al. 2023).

Boulaaba et al. (2011) stanovovali diferenciál somatických buněk metodou průtokové cytometrie. Z výsledků studie vyplývá, že obsah lymfocytů (LY) představoval 9,88 %, obsah makrofágů (MA) 10,53 % a obsah polymorfonukleárních neutrofilů (PMNL) 76,85 %. Námi stanovené hodnoty 9,99 % LY, 10,43 % MA a 74,40 % PMNL jsou srovnatelné s výsledky Boulaaba et al. (2011), ačkoliv pro stanovení využili jiná barviva a specifické protilátky.

Jednotlivé typy SB byly rovněž zkoumány ve studii Albenzio et al. (2015). Dle autorů byly vzorky rozděleny do skupin s nízkým, středním a vysokým PSB. Skupina s nízkým PSB ($<700 \times 10^3$ buněk/ml) obsahovala: 51,03 % LY, 4,66 % MA a 42,03 % PMNL. S touto skupinou byly porovnány hodnoty naměřené u skupiny A (průměrný PSB: 14,00 % LY, 7,50 % MA a 74,71 % PMNL). V porovnání s Albenzio et al. (2015) byl obsah LY nižší, obsah MA vyšší a obsah PMNL vyšší. Skupina se středním PSB ($701-1\ 500 \times 10^3$ buněk/ml) obsahovala: 37,05 % LY, 5,72 % MA a 58,07 % PMNL. S touto skupinou byly porovnány hodnoty naměřené u skupiny C: 4,89 % LY, 12,54 % MA a 76,65 % PMNL. V porovnání s Albenzio et al. (2015) byl obsah LY nižší, obsah MA vyšší a obsah PMNL vyšší. Skupina s vysokým obsahem PSB ($>1\ 500 \times 10^3$ buněk/ml) obsahovala: 33,06 % LY, 7,26 % MA a 60,28 % PMNL. S touto skupinou byly porovnány hodnoty naměřené u skupiny D: 3,57 % LY, 21,34 % MA a 70,10 % PMNL. V porovnání s Albenzio et al. (2015) byl obsah LY nižší, obsah MA vyšší a obsah PMNL vyšší. Rozdíly mezi hodnotami naměřenými ve studii Albenzio et al. (2011) a našimi hodnotami mohou být způsobeny dalšími vlivy – například zdravotním stavem zvířat, vlivem fáze a pořadí laktace, vlivem prostředí, působením stresu nebo že autor použil k identifikaci buněčných populací odlišnou protilátku (CD5). Dle studie Kljajevic et al. (2018) obsahovalo kozí mléko 2,70–2,84 % bílkovin. V porovnání s naměřenými hodnotami 2,57–3,96 % jsou tyto hodnoty přibližně shodné.

Čobanović et al. (2019) realizovali měření obsahu bílkovin pomocí přístroje MilcoScan^{FT}, výsledkem bylo rozmezí hodnot: 1,88–4,70 %. V porovnání s naměřenými hodnotami 2,57–3,96 % jsou tyto hodnoty přibližně shodné.

Kyselov et al. (2022) stanovili obsah bílkovin v průběhu celého kalendářního roku v rozmezí 3,16–3,46 % bílkovin. Tyto hodnoty jsou v porovnání s naměřenými hodnotami $2,57-3,96 \pm 1,19$ % přibližně shodné.

Ve studii Ye et al. (2019) stanovili obsah kaseinových frakcí: 15,8 % α_2 -kaseinu, 50,8 % β -kaseinu a 8,2 % κ -kaseinu. Obsah α_1 -kaseinu nebyl stanoven. Výsledky studie Ye et al. (2019) byly porovnány s hodnotami obsahu vybraných kaseinových frakcí, které byly naměřeny u skupin A (PSB $0-500 \times 10^3$ buněk/ml) a D (PSB $1\ 500-3\ 000 \times 10^3$ buněk/ml). Kaseinové frakce ve vzorcích skupiny A dosahovaly následujících hodnot, a to 0,23 % α_2 -kaseinu, 1,34 % β -kaseinu a 0,43 % κ -kaseinu. Hodnoty naměřené u skupiny D pak 0,22 % α_2 -kaseinu, 1,27 % β -kaseinu a 0,43 % κ -kaseinu. V porovnání se studií Ye et al. (2019) jsou naměřené hodnoty rozdílné. Rozdíly mohou být způsobeny například polymorfismem kaseinových bílkovin, působením proteolytických enzymů nebo využitím rozdílné metody pro stanovení kaseinových frakcí.

7. Závěr

Cílem teoretické části dané diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši o somatických buňkách v kozím mléce. V praktické části byl v kozím mléce stanoven celkový počet somatických buněk pomocí přístroje DeLaval® a průtokovou cytometrií diferenciální počet somatických buněk, tj. zastoupení jednotlivých typů buněk (epiteliálních buněk a leukocytů). U leukocytů bylo rozlišeno zastoupení jednotlivých buněčných subpopulací, tj. obsah lymfocytů, makrofágů a polymorfonukleárních neutrofilů. Dále bylo provedeno mikrobiologické vyšetření vzorků. Ve skupině vzorků mlék obsahující nejvýše 500×10^3 buněk/ml mléka bylo téměř 90 % vzorků bez bakteriálního nálezu. Kvalita mléka zkoumaného stáda byla tedy z mikrobiologického hlediska na velmi dobré úrovni. Pomocí přístroje MilcoScan (DairySpec^{FT}) byl stanoven obsah bílkovin. Metodou kapalinové chromatografie s využitím detektoru DAD bylo u vzorků mléka stanoveno zastoupení vybraných kaseinových frakcí.

Hypotéza 1: Zvolená metoda pro stanovení diferenciálního počtu somatických buněk v kozím mléce pomocí průtokové cytometrie je vhodně optimalizována.

Metoda pro stanovení somatických buněk v kozím mléce průtokovou cytometrií byla optimalizována tak, aby během přípravy vzorku bylo odděleno co nejvíce mléčného tuku, avšak, aby docházelo k co nejmenší destrukci buněk. Proto byl opakovaně upravován režim odstředování i promývání fyziologickým roztokem. Pro obarvení buněk byla využita barviva Hoechst 33342 a Zombie NIR. Pro stanovení jednotlivých buněčných subpopulací byly využity protilátky: anti CD11b, anti CD14, anti CD18. Pro stanovení diferenciálního počtu buněk byla sice původně zamýšlena protilátka CD45, ale při testech se potvrdilo, že nebyly obarveny všechny typy buněk. Proto byla tato látka nahrazena protilátkou CD18. Další úskalí představovaly MFG částice (částice mléčného tuku), které se svou velikostí mohli zaměnit za buňky. Nicméně, díky ověření na zobrazovacím průtokovém cytometru bylo potvrzeno, že se nejedná o částice nebuněčného původu. Tato hypotéza byla **potvrzena**.

Hypotéza 2: Celkový i diferenciální PSB v kozím mléce je rozdílný v závislosti na individuálních vzorcích mléka.

Skupina s PSB $0-500 \times 10^3$ buněk/ml mléka obsahovala průměrně 304×10^3 buněk/ml mléka, v porovnání se skupinou s PSB $1\ 500-3\ 000 \times 10^3$ buněk/ml mléka, která obsahovala $2\ 692 \times 10^3$ buněk/ml mléka je celkový PSB rozdílný. Se vzrůstajícím počtem somatických buněk klesal obsah leukocytů (neepiteliálních buněk). Obsah epitheliálních buněk se naopak zvyšoval. Skupina s PSB $0-500 \times 10^3$ buněk/ml mléka obsahovala průměrně: 14,00 % lymfocytů (LY), 7,50 % makrofágů (MA) a 74,71 % polymorfonukleárních neutrofilů (PMNL). V porovnání se skupinou vzorků s PSB $1\ 500-3\ 000 \times 10^3$ buněk/ml mléka, která obsahovala průměrně: 3,57 % LY, 21,34 % MA a 70,10 % PMNL, je zastoupení buněčných subpopulací rozdílné, s výjimkou obsahu PMNL. Všechny vzorky byly testovány dle stanovené limitní hodnoty PSB $1\ 000 \times 10^3$ buněk/ml mléka, zda existuje statisticky významný rozdíl v zastoupení jednotlivých typů SB. Bylo zjištěno, že na hladinách

významnosti $\alpha = 0,05$ a $\alpha = 0,01$ existoval statisticky významný rozdíl u epiteliálních buněk, leukocytů, LY a MA. Na hladině významnosti $\alpha = 0,001$ existoval statisticky významný rozdíl u epiteliálních buněk, leukocytů a LY, u MA neexistoval. U PMNL neexistoval na žádné z testovaných hladin významnosti statisticky významný rozdíl. Tato hypotéza byla **potvrzena**.

Hypotéza 3: Obsah a zastoupení mléčných bílkovin souvisí s obsahem jednotlivých typů somatických buněk.

Se vzrůstajícím počtem somatických buněk klesal obsah bílkovin a naopak, mezi obsahem epiteliálních buněk a zastoupením celkových bílkovin a kaseinů, včetně jednotlivých kaseinových frakcí byla zjištěna pozitivní korelace. Nicméně, u vzorků s PSB $1\ 000$ – $1\ 500 \times 10^3$ buněk/ml mléka tento trend potvrzen nebyl, což může být zapříčiněno menším počtem vzorků ve skupině nebo vyšší variabilitou. Trend u zmíněné skupiny by se mohl dokázat například během skladování mléka a následném zpracování. V této problematice je třeba dalších výzkumů. Dále bylo zjištěno, že mezi obsahem leukocytů a obsahem bílkovin, kaseinů, jednotlivých kaseinových frakcí byla zjištěna negativní korelace. Tato hypotéza byla **částečně potvrzena**.

Ačkoliv u kozího mléka nelze PSB jednoznačně vnímat jako ukazatel hygienické kvality mléka, je třeba jej monitorovat, protože zvýšený PSB v mléce může ovlivňovat jak technologické, tak senzorické vlastnosti mléka. Také je třeba zabývat se detailněji zastoupením jednotlivých subpopulací buněk, které mohou přinést informace o imunologické odpovědi organismu na onemocnění a zároveň vysvětlovat zhoršení technologických vlastností vzhledem k jejich proteolytické aktivitě.

8. Literatura

- Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. 2016. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. **37** (2): 163-176. DOI: 10.3109/07388551.2015.112887.
- Ah-Leung, Bernard H, Bidat E, Paty E, Rancé F, Scheinmann P, Wal JM. 2006. Allergy to goat and sheep milk without allergy to cow's milk. *Allergy*. **61**:1358-1365. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2006.01193.x
- Albenzio M, Figliola L, Caroprese M, Marino R, Sevi A, Santillo A. 2019. Somatic cell count in sheep milk. *Small Ruminant Research*. **176**:24-30. Elsevier.
- Albenzio M, Santillo A, Kelly AL, Caroprese M, Marino R, Sevi A. 2015. Activities of indigenous proteolytic enzymes in caprine milk of different somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*. **98**(11):7587-7594.
- Alhussien MN, Dang AK. 2018. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Veterinary World*. **11**(5):562-577.
- Almaas H, Cases AL, Devold TG, Holm H, Langsrud T, Aabakken L, Aadnoey T, Vegarud GE. 2006. In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *International Dairy Journal*. **16**:961-968. Elsevier.
- Amigo L, Fontecha J. 2011. Goat Milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Ed.:484-493.
- Aydin S. 2015. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>. (accessed January 2023).
- Bagnicka E, Winnicka A, Jóźwik A, Rzewuska M, Strzalkowska N, Kościuczuk E, Prusak B, Kaba J, Horbańczuk J, Krzyżewski J. 2011. Relationship between somatic cell count and bacterial pathogens in goat milk. *Small Ruminant Research*. **100**:72-77. Elsevier.
- Barrón-Bravo OG, Gutiérrez-Chávez AJ, Ángel-Sahagún CA, Montaldo HH, Shepard L, Valencia-Posadas M. 2013. Losses in milk yield, fat and protein contents according to different levels of somatic cell count in dairy goats. *Small Ruminant Research*. **113**:421-431. Elsevier.
- Bernard L, Bonnet Muriel, Delavaud C, Delosière M, Ferlay A, Fougère H, Graulet B. 2018. Milk fat globule in ruminant: major and minor compounds, nutritional regulation

and differences among species. *European Journal of Lipid Science and Technology*. DOI 10.1002/ejlt.201700039.

Bordin G, Cordeiro Raposo F, de la Calle B, Rodriguez AR. 2001. Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **928**: 63-76. Elsevier.

Boulaaba A, Grabowski N, Klein G. 2011. Differential cell count of caprine milk by flow cytometry and microscopy. *Small Ruminant Research*. **97**:117-123. Elsevier.

Boutinaud M, Jammes H. 2002. Potential uses of milk epithelial cells: a review. *Reproduction Nutrition Development*. **42**:133-147.

Butler JE. 2000. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Immunoassay*. **21**(2, 3): 165-209.

Ceballos LS, Morales ER, de la Torre Adarve G, Castro JD, Martínez LP, Sanz Sampelayo MR. 2009. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*. **22**:322-329. Elsevier.

Clark S, Mora García MB. 2017. A 100 –Year Review: Advances in goat milk research. *Journal of Dairy Science*. **100**:10026-10044.

Coons AH, Creech HJ, Jones RN. 1941. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Experimental Biology and Medicine*. **47**(2):200-202. DOI:10.3181/00379727-47-13084p.

Čobanović K, Krstović S, Štrbac L, Šaran M, Kasalica A, Popović M. 2019. Relationship between milk urea level and milk parameters in the Saanen dairy goat. *Contemporary Agriculture*. **68** (3-4):88-91.

Dan Ch, Na Z, Xue-mei N, Qing-zhang L, Xue-jun G. 2016. Potential Genes for Regulation of Milk Protein Synthesis in Dairy Goat Mammary Gland. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*. **23**:50-56. ScienceDirect.

De Crémoux R, Poutrel B, Pillet R, Perrin G, Ducellier M, Heuchel V. 1996. Cell counts for diagnosing caprine bacterial mammary infections. Pages: 35-39 *Somatic Cells and Milk of Small Ruminants*. Pudoc: Wageningen, The Netherlands.

Dulin AM, Paape MJ, Wergin WP. 1982. Differentiation and Enumeration of Somatic Cells in Goat Milk. *Journal of Food Protection*. **45**(5):435-439.

Evropský parlament a Rada. 2004. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Brusel.

FAO. 1999. Codex Alimentarius. General Standard For The Use Of Dairy Terms. CXS 206.

Ferronato JA, Ferronato TC, Schneider M, Pessoa LF, Blagitz MG, Heinemann MB, Della Libera AMMP, Souza FN. 2018. Diagnosing mastitis in early lactation: use of Somaticell®, California mastitis test and somatic cell count. Italian Journal of Animal Science. **17**(3): 723-729. DOI: 10.1080/1828051X.2018.1426394.

Formaggioni P, Summer A, Malacarne M, Mariani P. 1999. Milk protein polymorphism: Detection and diffusion of the genetic variants in Bos genus. Annali della Facolta di Medecina Veterinaria **XIX**. Universiti degli Studi Parma.

Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PLH, O' Mahony JA. 2015. Dairy Chemistry and biochemistry: Second Edition. Springer.

Gallier S, Tolenaars L, Prosser C. 2020. Whole Goat Milk as a Source of Fat and Milk Fat Globule Membrane in Infant Formula. Nutrients. **12**(11): 3486.

Gautam PB, Sharma R, Atbhaiya Y, Gandhi K, Mann B. 2023. Activities of indigenous proteases in cow, buffalo and goat milk of Indian subcontinent and their correlation with somatic cell count. International Dairy Journal. **139**. 105567.

Gecaj RM, Ajazi, FC, Bytyqi H, Mehmedi B, Çadraku H, Ismaili M. 2021. Somatic Cell Number, Physicochemical, and Microbiological Parameters of Raw Milk of Goats During the End of Lactation as Compared by Breeds and Number of Lactations. Frontiers in Veterinary Science. **8**. Available from:<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.694114>.

Gocmen H, Darbaz I, Ergene O, Esendal OM, Aslan S. 2019. The relationships between somatic cell count, total bacterial count and intramammary infection in milk samples of Damascus goats during postpartum days. Small Ruminant Research. **180**:1-5. ScienceDirect.

Gomes V, Della Libera AMMP, Paiva M, Madureira KM, Araújo WP. 2006. Effect of the stage of lactation on somatic cell counts in healthy goats (*Caprae hircus*) breed in Brazil. Small Ruminant Research. **64**:30-34.

Halasa T, Kirkeby C. 2020. Differential Somatic Cell Count: Value for Udder Health Management. Frontiers in Veterinary Science. **7**. 609055.

Hamed H, El Feki A, Gargouri A. 2008. Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with antioxidant factors. *Comptes Rendus Biologies*. **331**: 144-151. Elsevier.

Hanuš O, Sojková K, Hanušová K, Samková E, Hronek M, Hyšpler R, Kopecký J, Jedelská R. 2011. An experimental comparison of methods for somatic cell count determination in milk of various species of mammals. *Acta Universitatis Agriculturae Et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. **LIX** (1):67-82.

Chen SX, Wang JZ, Van Kessel JS, Ren FZ, Zeng SS. 2010. Effect of somatic cell count in goat milk on yield, sensory quality, and fatty acid profile of semisoft cheese. *Journal of Dairy Science*. **93**: 1345-1354.

Jensen RG. 1995. Chapter I. Pages 1-3 in Jensen RG, editor. *Handbook of Milk Composition*. Academic Press, San Diego, CA.

Kawai K, Tomohito H, Yoshio K, Tomoyuki C, Hajime N, Hidetoshi H, Tetsu O, Seigo I, Ken O, Sachiko A, Reiichiro S, Toshio O. 2013. Reliability in somatic cell count measurement of clinical mastitis milk using DeLaval cell counter. *Animal Science Journal*. **84**(12):805–807. DOI:10.1111/asj.12136.

Kelly AL, O'Flaherty F, Fox PF. 2006. Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge. *International Dairy Journal*. **16**:563-572. Elsevier.

Kljajevic NV, Tomasevic IB, Miloradovic ZN, Nedeljkovic A, Miocinovic JB, Jovanovic ST. 2018. Seasonal variations of Saanen goat milk composition and the impact of climatic conditions. *Journal of Food Science and Technology*. **55**:299-303. DOI:10.1007/s13197-017-2938-4.

Komise Evropských Společenství. 2006. Nařízení komise (ES) č. 1662/2006 ze dne 6. listopadu, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Brusel.

Kuchtík J, Šustová K, Sýkora V, Kalhotka L, Pavlata L, Konečná L. 2021. Changes in the somatic cell counts and total bacterial counts in raw goat milk during lactation and their relationships to selected milk traits. *Italian Journal of animal Science*. **20**(1): 911-917.

Kyselov O, Mykhalko O, Bondarchuk L, Levchenko I, Prihodko M, Popsuy V. 2022. Influence of the season and genotype of goats on the qualitative composition of their

milk. Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development. **22**(4): 343–358.

Lad SS, Aparnathi KD, Bhavbhuti M, Velpula S. 2017. Goat Milk in Human Nutrition and Health – A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **6**: 1781-1792.

Langoni H, da Silva Penachio D, Nóbrega DB, de Freitas Guimarães F, Lucheis SB. 2012. Somaticcell® as a screening method for somatic cell count from bovine milk. *Ciência Rural*. **42** (6): 1095-1101.

Leitner G, Lavon Y, Matzrafi Z, Benun O, Bezman D, Merin U. 2016. Somatic cell counts, chemical composition and coagulation properties of goat and sheep bulk tank milk. *International Dairy Journal*. **58**:9-13. Elsevier.

Li N, Richoux R, Boutinaud M, Martin P, Gagnaire V. 2014. Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. *Dairy Science and Technology*. **94**: 517-538.

Li N, Richoux R, Perruchot M-H, Boutinaud M, Mayol J-F, Gagnaire V. 2015. Flow Cytometry Approach to Quantify the Viability of Milk Somatic Cell Counts after Various Physico-Chemical Treatments. *Plos One* **10**(12): e0146071. DOI:10.1371/journal.pone.0146071.

Ma Y, Ryan C, Barbano DM, Galton DM, Rudan MA, Boor KJ. 2000. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*. **83**:264-274.

Macey MG. 2010. Principles of flow cytometry. Pages 1-15 in Macey MG, editor. *Flow cytometry: principles and applications*. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Malik TA, Mohini M, Mir SH, Ganaie BA, Singh D, Varun TK, Howal S, Thakur S. 2018. Somatic cells in Relation to Udder Health and Milk Quality-A Review. *Journal of Animal Health and Production*. **6** (1):18-26.

Marletta D, Criscione A, Bordonaro S, Guastella AM, D' Urso G. 2007. Casein polymorphism in goat' s milk. *Lait*. **87**:491-504.

Martin P, Szymanowska M, Zwierzchowski L, Leroux Ch. 2002. The impact of genetic polymorphisms on protein composition of ruminant milks. *Reproduction Nutrition Development*. **42**:433-459. INRA, EDP Sciences.

McDougall S, Murdough P, Pankey W, Delaney C, Barlow J, Scruton D. 2001. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research*. **40**(3):245-254. Elsevier. DOI:10.1016/s0921-4488(01)00185-7.

Min BR, Tomita G, Hart SP. 2007. Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts and chemical composition of goats' milk. *Journal of Dairy Research*. **74**:204-210.

Novac CS, Andrei S. 2020. The Impact of Mastitis on the Biochemical Parameters, Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Goat's Milk: A Review. *Pathogens*. **9** (11): 882. Available from: <https://doi.org/10.3390/pathogens9110882>.

O' Mahony JA, Fox PF, Kelly AL. 2013. Indigenous Enzymes of Milk. Pages 337-385 in McSweeney PLH, Fox PF, editors. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*. Fourth Edition. Springer Science+Business Media. New York.

Paape MJ, Capuco AV. 1997. Cellular Defense Mechanisms in the Udder and Lactation of Goats. *Journal of Animal Science*. **75**:556-565.

Park YW. 2009. Bioactive components in Goat Milk. Pages 43-83 in Park YW, editor. *Bioactive components in milk and dairy products: First Edition*. Wiley-Blackwell.

Park YW. 2017. Goat milk: Goat milk-chemistry and nutrition. Pages 42-83 in *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals: Second Edition*. Wiley Blackwell.

Pereira PC. 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* **30**:619-627. Elsevier. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>.

Perrin GG, Mallereau MP, Lenfant D, Baudry C. 1997. Relationships between California mastitis test (CMT) and somatic cell counts in dairy goats. *Small Ruminant Research*. **26**(1-2): 167-170. DOI:10.1016/s0921-4488(96)00990-x.

Petrotos K, Tsakali E, Goulas P, D' Alessandro AG. 2014. Casein and Whey Proteins in Human Health. Pages 94-146 in Kanekian A, editor. *Milk and Dairy Products as Functional Foods: First Edition*. John Wiley & Sons, Ltd.

Poutrel B, de Crémoux R, Ducelliez M, Verneau D. 1997. Control of Intramammary Infections in Goats: Impact on Somatic Cell Counts. *Journal of Animal Science*. **75**:566-570.

Raynal-Ljutovac K, Gaborit P, Lauret A. 2005. The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. *Small Ruminant Research*. **60**(1,2):167-177. Elsevier. Available from <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.06.010>.

Raynal-Ljutovac K, Lagriffoul G, Paccard P, Guillet I, Chilliard Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*. **79**:57-72. Elsevier. Available from <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.07.009>.

Restani P, Gaiaschi A, Plebani A, Beretta B, Cavagni G, Fiocchi A, Poiesi C, Veloná T, Ugazio AG, Galli CL. 1999. Cross-reactivity between mil proteins from different animal species. *Clinical and Experimental Allergy*. **29**:997-1004.

Riedel-Caspari G. 2001. Chapter 14 The Antimicrobial and Immunomodulating Actions of Milk Leukocytes. Pages 287-307 in Woodward B, Draper HH, editors. *Advances in Nutritional Research*. Springer, Boston, MA.

Rota AM, Gonzalo C, Rodriguez PL, Rojas, AI, Martin L, Tovar JJ. 1993. Effects of stage of lactation and parity on somatic cell counts in milk of Verata goats and algebraic models of their lactation curves. *Small Ruminant Research*. **12**:211-219.

Sambraus HH. 2006. Plemena koz. Page 157 in *Atlas plemen hospodářských zvířat: First edition*. Brázda.

Sánchez-Macías D, Morales-delaNuez A, Torres A, Hernández-Castellano LE, Jiménez-Flores R, Castro N, Argüello A. 2013. Effects of addition of somatic cells to caprine milk on cheese quality. *International Dairy Journal*. **29**(2): 61–67. DOI:10.1016/j.idairyj.2012.10.010.

Shah A, Darzi MM, Kamil SA, Mir MS, Maqbool R, Ali R, Kashani B, Wani H, Bashir A, A Dar A, Qureshi S. 2017. Somatic cell alteration in healthy and mastitic milk of sheep and goats. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. **5**(6):27-33.

Schultz-Pernice I, Engelbrecht LK, Petricca S, Scheel CH, Twigger AJ. 2020. Morphological Analysis of human Milk Enclosed Structures Reveals Diverse Cells and Cell-like Milk Fat Globules. *Journal Of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. **25**:397-408.

Schwarz D, Diesterbeck US, König S, Brügemann K, Schlez K, Zschöck, Wolter W, Czerny CP. 2011. Flow cytometric differential cells counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*. **94**. DOI: 10.3168/jds.2011-4348.

Silanikove N, Leitner G, Merin U, Prosser CG. 2010. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research*. **89**:1010-124. Elsevier.

Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. 1997. Immunobiology of the Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*. **80**:1851-1865.

Stelwagen K. 2011. Mammary Gland, Milk Biosynthesis and Secretion/Milk Protein. Pages 359-366 in Fuquay JW, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences: Second edition. Elsevier Ltd.

Subcommittee on Screening Tests, National Mastitis Council. 1968. Direct microscopic somatic cell count in milk. *Journal of Milk and Food Technology*. **31**(11): 350-354.

Sutera AM, Portolano B, Di Gerlando R, Sardina MT, Mastrangelo S, Tolone M. Determination of milk production losses and variations of fat and protein percentages according to different levels of somatic cell count in Valle del Belice dairy sheep. *Small Ruminant Research*. **162**:39-42. Elsevier.

Tavares B, Pereira C, Rodrigues F, Loureiro G, Chieira C. 2007. Goat's milk allergy. *Allergologia et Immunopathologia*. **35**(3):113-116.

Turkmen N. 2018. Chapter 35 The nutritional value and health benefits of goat milk components. Pages 441-449 in Watson RR, Collier RJ, Preedy VR, editors. *Nutrients in Dairy and Their Implications for Health and Disease*. Academic Press.

Wang X, Wang Y, Xu J, Xue C. 2021. Sphingolipids in food and their critical roles in human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **61**(3):462-491. DOI:10.1080/10408398.2020.1736510.

Weaver SR, Hernandez LL. 2015. Autocrine-paracrine regulation of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*. **98**:1-12.

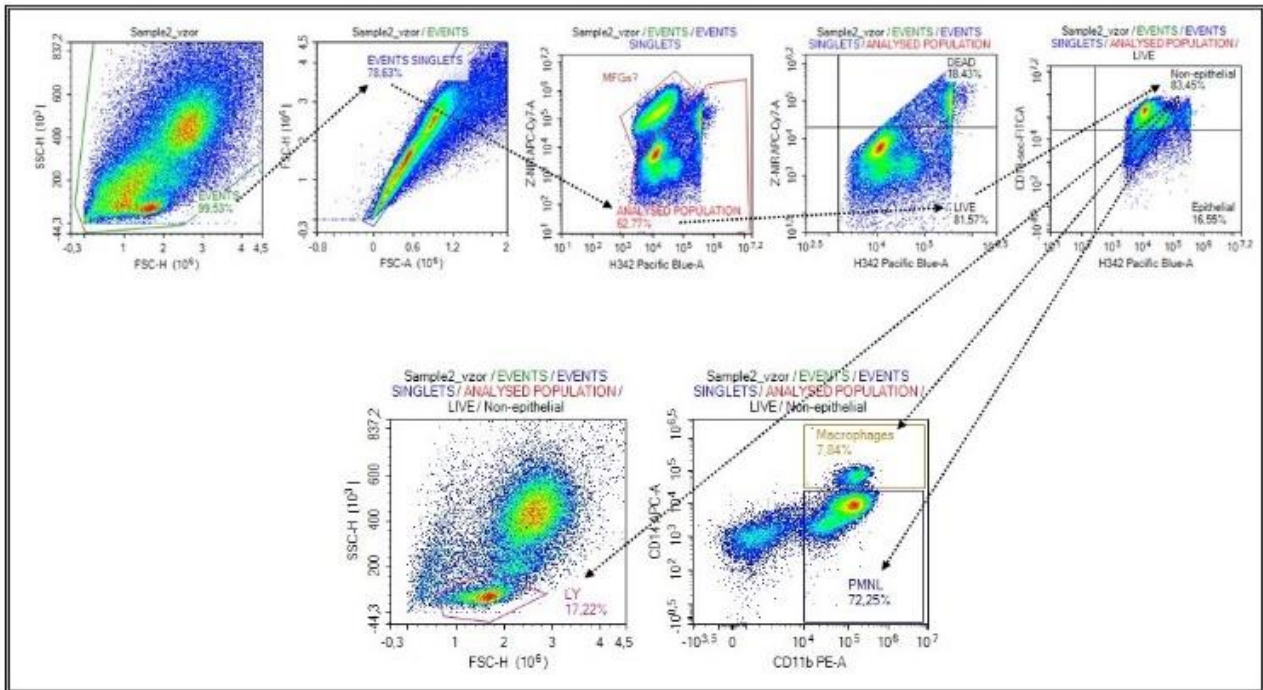
Wilkerson MJ. 2012. Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*. **42**:53-71. DOI:10.1016/j.cvsm.2011.09.012.

Wooding FBP. 1971. The Mechanism of Secretion of The Milk Fat Globule. *Journal of Cell Science*. **9**:805-821.

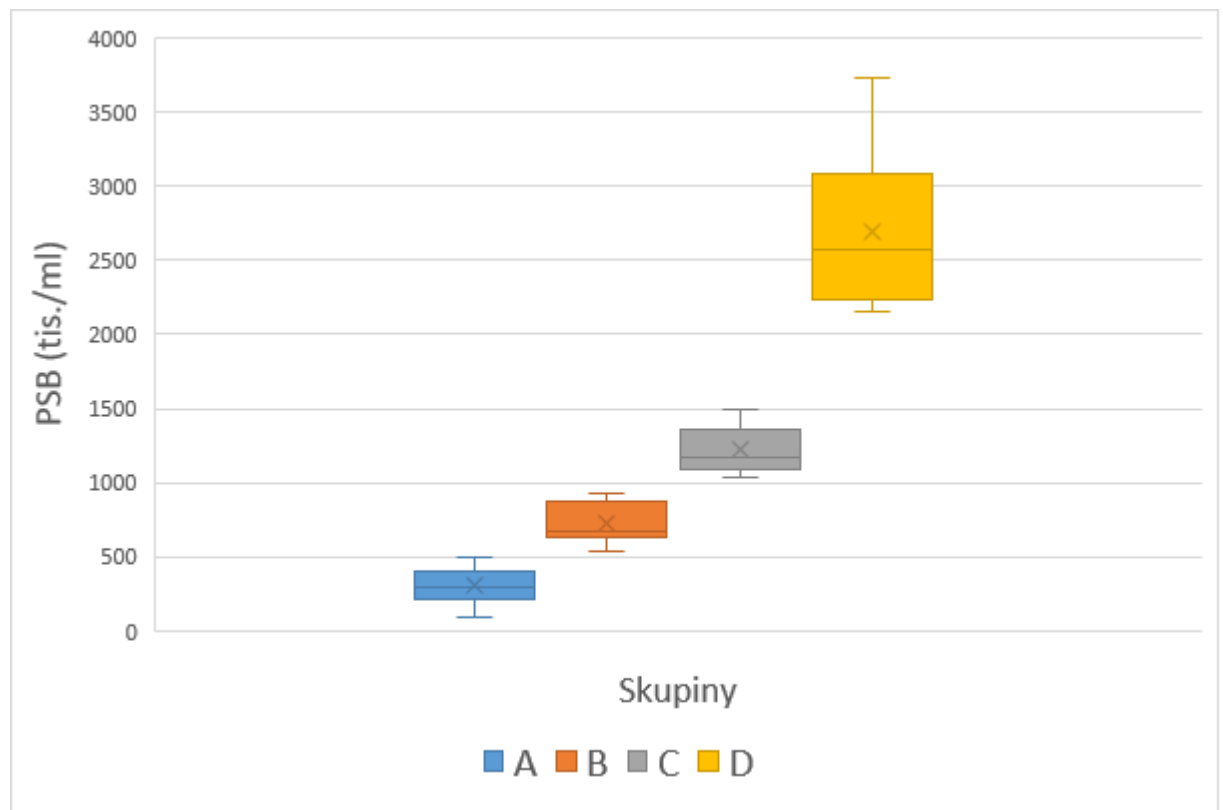
Wüthrich B, Johansson SGO. 1995. Allergy to cheese produced from sheep's and goat's milk but not to cheese produced from cow's milk. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **96**(2):270-273. Elsevier.

Ye A, Cui J, Carpenter E, Prosser C, Singh H. 2019. Dynamic in vitro gastric digestion of infant formulae made with goat milk and cow milk: Influence of protein composition. *International Dairy Journal*. **97**: 76-85.

9. Samostatné přílohy



Obrázek č. 5: Analýza jednotlivých subpopulací buněk ve vzorku koziho mléka – výstup ze softwaru NovoExpress 1.3.0® (vyhotovil Ing. F.G. Savvulidi, Ph.D.)



Graf č. 8: Zastoupení počtů somatických buněk v jednotlivých skupinách.