

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Úloha leptinu a inzulínu při regulaci energetického a tukového metabolismu mléčných krav v období negativní energetické bilance

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Miroslav Joch

Vedoucí práce: MVDr. Helena Härtlová, CSc.

2012

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Úloha leptinu a inzulínu při regulaci energetického a tukového metabolismu mléčných krav v období negativní energetické bilance“ vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne: .....

.....

## **Poděkování**

Děkuji vedoucí diplomové práce MVDr. Heleně Härtlové, CSc. za cenné rady, připomínky a metodické vedení práce. Děkuji také Ing. Štěpánce Švecové za pomoc při statistickém zpracování. V neposlední řadě děkuji rodičům za podporu během celého studia.

## Souhrn

Dojnice v prvních týdnech laktace nejsou schopny přijmout potřebné množství živin pro krytí produkce mléka a dostávají se do negativní energetické bilance (NEB). Přes tento deficit energie, je metabolismus dojnice přednostně nasměrován na produkci mléka. Některé studie naznačují, že na koordinaci změn energetického a tukového metabolismu na začátku laktace se podílejí také hormony leptin a inzulin.

Cílem práce bylo potvrdit vztahy mezi krevními hladinami leptinu, inzulinu a vybranými metabolity energetického a tukového metabolismu v průběhu tranzitního období. V pokusu bylo sledováno 15 dojnic holštýnského a českého strakatého skotu. Vzorky krve byly dojnicím odebírány v období 60 dnů před porodem až 100 dnů po porodu (-60, -25, -7, +3, +10, +25, +40, +55, +70, +85, +100). Hladiny leptinu a inzulinu byly stanoveny enzymoimunoanalýzou (ELISA), neesterifikované mastné kyseliny (NEMK),  $\beta$ -hydroxybutyrát (BHB) a glukóza spektrofotometricky.

Průměrné hladiny leptinu, u dojnic v tranzitním období se pohybovaly v rozmezí  $0,39\text{--}1,28\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Nejvyšší hodnoty byly zjištěny v předporodním období (-60). Po porodu se hladiny leptinu snížily, ale díky individuální variabilitě, nebyly rozdíly statisticky významné. Průměrné hladiny inzulinu se pohybovaly v rozmezí  $0,37\text{--}1,28\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Nejvyšší průměrná hodnota byla naměřena 25 dnů před porodem. Po porodu došlo ke statisticky významnému poklesu průměrných hladin inzulinu. Zároveň po porodu u námi sledovaných dojnic významně vzrostly průměrné hladiny NEMK a BHB a klesla glykémie, tyto změny jsou typické pro dojnice v negativní energetické bilanci. Hladiny inzulinu pozitivně korelovali s hladinami glukózy a negativně s hladinami NEMK. Hladiny leptinu nekorelovaly s hladinami inzulinu ani s hladinami NEMK, BHB a glukózy.

Na závěr možno konstatovat, že u dojnic v průběhu tranzitního období měl inzulin těsnější vztah k energetickému a tukovému metabolismu než leptin. Očekávaný vztah byl tedy do určité míry prokázán pouze u inzulinu.

Klíčová slova: leptin, inzulin, energetický metabolismus, tranzitní období, dojnice

## Summary

Dairy cows in the first weeks of lactation are not able to take enough nutrients for the coverage of milk production and get into a negative energy balance. Despite this energy deficit maternal metabolism is primarily directed to the cow milk production. Some studies suggest that hormones leptin and insulin are also involved in the coordination of changes in energy and fat metabolism in early lactation of dairy cow.

The aim of the study was to confirm the relationship between levels of leptin, insulin and selected metabolites of energy and fat metabolism during transition period in dairy cow. In study was involved 15 Holstein and Fleckvieh dairy cow. Blood samples were collected in the period between 60 days before parturition and 100 days after parturition (-60, -25, -7, +3, +10, +25, +40, +55, +70, +85, +100). Blood levels of leptin and insulin were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), non-esterified fatty acid (NEFA),  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) and glucose by spectrophotometric method.

Mean levels of leptin in dairy cows in transition period ranged from 0,39 to 1,28  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . The highest values were found in 60 days before parturition. After parturition, leptin levels decreased, but due to individual variability the differences were not statistically significant. Mean levels of insulin in dairy cows in transition period ranged from 0,37 to 1,28  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . The highest mean insulin level was measured 25 days before parturition. After parturition there was a statistically significant decrease in mean insulin levels. Simultaneously after parturition in cows we observed significantly increased NEFA and BHB mean levels and decreased glucose mean levels, these changes are typical for cows in negative energy balance. Insulin levels positively correlated with blood glucose levels and negatively with the NEFA levels. Leptin levels correlated neither insulin levels nor NEFA, BHB and glucose levels.

Results of this work indicate that in dairy cows during the transition period insulin more likely than leptin has a closer relationship to the energy and fat metabolism. The expected relationship was demonstrated to some extent only for insulin.

Keywords: leptin, insulin, energy metabolism, transition period, dairy cow

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	1
<b>2 Cíl práce a hypotéza</b> .....	2
<b>3 Literární rešerše</b> .....	3
3.1 Vybrané hormony a metabolity se vztahem k energetické bilanci.....	3
3.1.1 Leptin .....	3
3.1.2 Inzulin .....	6
3.1.3 Neesterifikované mastné kyseliny (NEMK) .....	8
3.1.4 Ketolátky ( $\beta$ -hydroxybutyrát).....	11
3.1.5 Glukóza .....	12
3.2 Tranzitní období dojnic .....	14
3.2.1 Negativní energetická bilance .....	15
3.2.2 Změny metabolismu.....	16
3.2.3 Hormonální změny.....	18
<b>4 Materiál a metodika</b> .....	23
4.1 Zvířata .....	23
4.2 Design experimentu .....	23
4.3 Vzorky.....	24
4.4 Laboratorní analýza .....	25
4.5 Statistická analýza .....	25
<b>5 Výsledky</b> .....	26
<b>6 Diskuse</b> .....	29
<b>7 Závěr</b> .....	33
<b>8 Seznam literatury</b> .....	34
<b>9 Přílohy</b> .....	41

# 1 Úvod

Chov mléčného skotu patří mezi základní odvětví živočišné výroby v České republice. Mléko, hovězí a telecí maso hrají nezastupitelnou úlohu ve výživě člověka. V posledních letech zaznamenáváme výrazný nárůst užitkovosti mléčného skotu spojený se snahou chovatelů přizpůsobovat se novým ekonomickým podmínkám. Mléčná užitkovost je zvyšována genetickým pokrokem v chovech a zlepšením podmínek prostředí (výživa, ustájení, zdravotní péče atd.). Se zvýšením mléčné užitkovosti však často dochází k výraznému snížení úrovně reprodukčních ukazatelů. Jedním z důležitých faktorů, je skutečnost, že dojnice selektované na vysokou mléčnou produkci nejsou schopny udržet vyrovnanou homeostázu na počátku laktace, za což je především odpovědný metabolický a endokrinní systém organismu.

Nejdůležitějším obdobím z hlediska výskytu metabolických poruch, je relativně krátký časový úsek kolem porodu, který zahrnuje zhruba tři týdny před porodem a tři týdny po porodu. Toto období je nazýváno tranzitní (přechodné), dojnice „přechází“ ze stavu březosti do laktace. Vlivem mnohých fyziologických změn není v tomto období dojnice schopna přijmout dostatečné množství energie pro pokrytí záchovné potřeby a mléčné produkce, zvířata se tak dostávají do negativní energetické bilance. Prioritu v tomto období má produkce mléka a ostatní funkce jako je reprodukce či imunita jsou upozaděny.

Za významné ukazatele energetické bilance jsou považovány koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK),  $\beta$ -hydroxybutyrátu (BHB) a glukózy (Páleník a kol., 2011). Do metabolických změn v tranzitním období jsou zapojeny i hormony leptin a inzulin a proto by jejich hladiny v krvi mohly být ukazateli energetického stavu organismu. Studium těchto hormonů a jejich vztahu k negativní energetické bilanci se zabývá řada autorů (Kadokawa et al., 2000; Block et al., 2001; Soliman et al., 2002; Liefers et al., 2003; Accorsi et al., 2005; Konigsson et al., 2008).

Cílem práce je prokázat vliv změn koncentrací hormonů leptinu a inzulinu na vybrané parametry energetického a tukového metabolismu (neesterifikované mastné kyseliny,  $\beta$ -hydroxybutyrát, glukóza) u dojnic v tranzitním období.

## 2 Cíl práce a hypotéza

### Cíl práce

Cílem práce bylo potvrdit vzájemné vztahy mezi hladinou leptinu, inzulinu a vybranými metabolity energetického a tukového metabolismu před porodem a v časném poporodním období.

### Hypotéza

Tranzitní období zvyšuje u dojnic mléčných plemen požadavky zvláště na krytí energetických potřeb. Tyto požadavky nejsou dostatečně kompenzovány výživou a dojnice se dostávají do negativní energetické bilance (NEB), která je charakterizována změnami v endokrinní regulaci, energetickém a tukovém metabolismu. **Z hormonů hrají významnou úlohu v koordinaci těchto metabolismů zvláště leptin a inzulin.** Objasnění jejich úlohy v energetickém a tukovém metabolismu je důležité pro pochopení změn vnitřního prostředí organismu dojnic a jeho dopady do produkce a reprodukce.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Vybrané hormony a metabolity se vztahem k energetické bilanci

Energetický metabolismus skotu je charakterizován metabolismem sacharidů a lipidů. Mezi nejdůležitější ukazatele sacharidového metabolismu u skotu patří **glukóza**, celkové a oxidované **ketolátky** krve. Nejčastěji sledovanými ukazateli lipidového metabolismu jsou **neesterifikované mastné kyseliny (NEMK)**, triacylglyceroly a cholesterol (Pechová a kol., 2009). Páleník a kol. (2011) se domnívají, že za významné ukazatele energetické bilance u skotu lze považovat koncentrace NEMK,  $\beta$ -hydroxybutyrátu (BHB) a glukózy v krvi. Při energetickém deficitu zpravidla nejprve dochází ke zvýšení koncentrace NEMK, které je způsobeno mobilizací zásobního tuku, teprve později stoupá koncentrace ketolátek v krvi v důsledku nedostatku oxalacetátu a jako poslední se většinou snižuje koncentrace glukózy v krvi (Pechová a kol., 2003). Hladiny NEMK a BHB v krvi jsou jako ukazatelé energetické bilance organismu užívány již od 60. let (Wylie et al., 2008).

Krevní hladiny hormonů jako **leptin**, insulin-like growth factor I (IGF-I) či **inzulin** se mění s výživovým statutem organismu. Některé (nebo všechny) tyto hormony, mohou tedy být potenciálními ukazateli energetické bilance (Wylie et al., 2008).

#### 3.1.1 Leptin

Leptin je peptidový hormon o molekulové velikosti 16 kDa. Je složen ze 167 aminokyselin. Prvních 21 aminokyselin slouží jako signální peptid a jsou odštěpeny ještě před tím než je zbývající protein (146 aminokyselin) uvolněn do krevního oběhu. Sekvence aminokyselin je u různých živočichů (člověk, gorila, šimpanz, orangutan, pes, skot, prase, krysa a myš) identická z 67 %. Leptin je produktem ob genu (podle ob = obézní). Tento gen je u lidí lokalizován na 7. chromozómu (7q31), u skotu na 4. chromozómu (4q32) (Liefers, 2004). V těle je leptin tvořen převážně bílou tukovou tkání (adipocyty). U přežvýkavců byla prokázána tvorba také (daleko menších množství než v adipocytech) v hnědé tukové tkáni, placentě, mléčné žláze, bacheru, slezu, dvanáctníku a hypofýze (Agarwal et al., 2009).

Leptin reguluje příjem krmiva, energetický metabolismus a uložení energetických rezerv (Agarwal et al., 2009). Hladiny leptinu jsou přímo úměrné množství bílé tukové tkáně. (Konigsson et al., 2008; Liefers et al., 2003). Leptin není pouze signálem o aktuálních tělesných zásobách tuku v těle pro mozek (a pravděpodobně i pro jiné tkáně), ale je také citlivým senzorem aktuální energetické bilance. Dlouhodobé ale také aktuální změny ve

složení krmné dávky či krmná restrikce způsobují u přežvýkavců změny v plazmatické koncentraci leptinu (Agarwal et al., 2009). Kompletní krmná deprivace způsobuje rapidní pokles plazmatických hladin leptinu (Marie et al., 2001), dlouhodobá krmná restrikce snižuje plazmatické koncentrace leptinu u ovcí (Delavaud et al., 2000). U březích ovcí po dvou dnech a dospělých beranů po pěti dnech stoupla plazmatická hladina leptinu, poté kdy byl zvýšen příjem krmiva (Blache et al., 2000). U dojnic byl prokázán vztah mezi zásobami tělního tuku, příjmem krmiva a plazmatickými hladinami leptinu. Během hladovění, u skotu koncentrace leptinu v krvi klesá (Konigsson et al., 2008; Liefers et al., 2003). U přežvýkavců hraje leptin důležitou roli v regulaci tělesné hmotnosti a růstu (Agarwal et al., 2009). Někteří autoři se domnívají, že právě prostřednictvím leptinu jsou regulovány neuroendokrinní mechanismy zodpovědné za přerozdělování energie v těle (Konigsson et al., 2008; Liefers et al., 2003).

Předpokládá se, že leptin také reguluje období spojená s požadavky na vyšší přísun energie do organismu jako je začátek puberty, správná funkce ovarií, správný rozvoj mléčné žlázy či správná funkce imunitního systému. Vyšší hladiny leptinu jsou také signálem pro organismus, že energetické zásoby jsou adekvátní pro zahájení (znovuobnovení) reprodukčních funkcí (Chehab et al., 1997). Nižší hladina leptinu během negativní energetické bilance v období po porodu má vliv na prodloužení doby návratu normálního estrálního cyklu (Liefers, 2004).

Účinnost leptinu je aktivována po navázání na Ob-receptor. Leptinový receptor je glykoprotein (je podobný glykoproteinu 130 a proto je leptin řazen mezi cytokiny), který má šest isoform (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re, Ob-Rf) (Tab. 1). Největší význam má receptor Ob-Rb (hojně zastoupen v hypotalamu), který je zodpovědný za hlavní biologické funkce leptinu. Ostatní isoformy receptorů jsou zastoupeny v mnoha tělesných tkáních (tuková tkáň, placenta, srdce, vaječník, varlata), jejich hlavní význam je však jako tzv. vazebné (binding) proteiny a slouží k transportu leptinu (Agarwal et al., 2009). Kinetické studie na krysách ukázaly, že volný leptin (nenavázaný na protein) má poločas rozpadu 3,4 minuty, zatímco vázaný poločas rozpadu 71 minut. To naznačuje, že vázaný leptin je chráněn proti proteolytické degradaci (Hill et al., 1998). U lidí je poločas rozpadu leptinu (vázaného i nevázaného) asi 25 minut (Klein et al., 1996). U žádného hospodářského zvířete dosud nebyl potvrzen poločas rozpadu volného ani vázaného leptinu (Liefers, 2004).

**Tabulka 1.** Šest isoformů leptinového receptoru, jejich lokalizace a funkce

Receptor	Tkáň	Funkce
Ob-Ra	Mozek, tuková tkáň, placenta	Transport leptinu přes HB <sup>1</sup> a placentu
Ob-Rb	Hypotalamus, placenta	Přenos signálu
Ob-Rc	Mozek, tuková tkáň	Transport leptinu přes HB <sup>1</sup>
Ob-Rd	Tuková tkáň	Dosud neznáma
Ob-Re	Srdce, tuková tkáň, placenta	Vazebný protein pro leptin, transport k plodu
Ob-Rf	Mozek (malé množství)	Dosud neznáma

<sup>1</sup> HB = Hematoencefalická bariéra

(Liefers, 2004)

Hlavním místem účinku leptinu je hypotalamus, konkrétně ta místa, která jsou spjata s energetickým metabolismem jako obloukovitá, ventromediální a dorsomediální jádra hypotalamu (Konigsson et al. 2008). Hypotalamus pod vlivem leptinu neurální odpovědí ovlivňuje několika cestami další procesy v organismu. Jednou z důležitých látek, kterou leptin v hypotalamu ovlivňuje je neuropeptid Y (NPY). Neuropeptid Y je protein, který stimuluje příjem krmiva a snižuje termogenezi hnědé tukové tkáně. Po podání leptinu je NPY inhibován a tím se snižuje příjem krmiva a zvyšuje výdej energie. Dále leptin přes GnRH (gonadotropin-releasing hormon) stimuluje produkci LH a FSH (luteinizační a folikulostimulační hormon). Přes GHRH (growth hormone-releasing hormon) stimuluje sekreci STH (růstový hormon). Produkci těchto tří hormonů LH, FSH a STH leptin stimuluje, také přímo působením na hypofýzu (Liefers, 2004). Leptin také snižuje produkci inzulinu a glukokortikoidů, zvyšuje produkci katecholaminů a thyroïdních hormonů a tím zvyšuje výdej energie, lipolýzu v tukové tkáni a naopak snižuje jaterní lipogenezi (Chilliard et al., 2005). Leptin kromě centrálního působení na mozek a periferní tkáň, působí také autokrinně/parakrinně tzn. v místě své sekrece a v nejbližším okolí (Agarwal et al., 2009).

Leptin také ovlivňuje imunitní systém a naopak imunitní systém ovlivňuje sekreci leptinu. Leptin zvyšuje proliferaci T-lymfocytů a jejich následnou schopnost reakce s antigeny. Prozánětlivé cytokiny jako TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) a interleukiny zvyšují sekreci leptinu a tím mohou snižovat příjem potravy (Vernon and Houseknecht, 2000).

Leptin může být měřen jak v séru, tak i v EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) plazmě či plazmě heparinizované, přičemž absolutní měřené koncentrace v těchto typech vzorků se podstatně neliší. Na rozdíl od jiných bílkovinných hormonů, které jsou relativně citlivé a náročné na odběr a skladování vzorků, je leptin velmi stabilní analyt. Opakované

rozmrazování séra nebo plazmy dlouhodobě skladované při teplotě alespoň  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  koncentrace leptinu neovlivňuje. Za zlatý standard měření koncentrací leptinu je považována souprava RIA od firmy Linco Research, Inc. (Haluzík, 2002). Průměrné hodnoty leptinu u skotu, stanovené kitem double-antibody ovine RIA, se pohybují v rozmezí  $5,9\text{--}9,2\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Liefers et al., 2003). U dojnic stojících na sucho měsíc před porodem se průměrné hodnoty krevního leptinu pohybují od 5 do  $9\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  a u dojnic týden po porodu od 3 do  $6\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Chilliard et al., 2005).

### 3.1.2 Inzulin

Inzulin je polypeptidový hormon, jeho molekulová hmotnost je 6 kDa. Je složen ze dvou řetězců ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) spojených dvěma disulfidovými vazbami (můstky) (Martin and Crump, 2003). Řetězec  $\alpha$  se skládá z 21 a řetězec  $\beta$  z 30 aminokyselin. Rozdíly v chemické struktuře inzulinu u savců jako je skot, ovce, prase jsou pouze malé. Inzulin je produkován  $\beta$ -buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní (Hayirli, 2006). Inzulin je ústředním regulačním hormonem intermediárního metabolismu, podílí se na regulaci metabolismu sacharidů, tuků i proteinů. Udržuje hladinu živin a je potenciálním regulátorem příjmu krmiva. Stimuluje utilizaci glukózy v periferních tkáních organismu, podporuje syntézu a skladování zásobních látek a stimuluje proteosyntézu (má anabolický účinek). U přežvýkavců působí obdobně jako u monogastrických zvířat, avšak v nižším rozsahu (Skřivánek, 2001; Hayirli, 2006).

Sekrece inzulinu je ovlivňována mnoha faktory. Vzhledem k odlišnostem ve způsobu trávení mezi přežvýkavci a ostatními savci jsou některé rozdíly také v ovlivňování sekrece inzulinu. Hlavním stimulatorem sekrece inzulinu u nepřežvýkavých savců je hladina glukózy v krvi (glykémie). Přežvýkavci mají nižší krevní hladiny glukózy, díky degradaci sacharidů v předžaludcích a jejich přeměně na těkavé mastné kyseliny. Následně mastné kyseliny s 3 až 8 uhlíky stimulují sekreci inzulinu. Tyto kyseliny mají u přežvýkavců větší potenciál zvyšovat sekreci inzulinu než glukóza (Hayirli, 2006). Hlavním stimulatorem sekrece inzulinu u přežvýkavců je kyselin propionová (Skřivánek, 2001). Mezi stimulatory patří také další živiny (monosacharidy, aminokyseliny, draslík, vápník), hormony gastrointestinálního traktu (glukagon, pankreatický polypeptid, gastrický inhibiční peptid, sekretin, cholecystokinin), parasimpatikus (acetylcholin) a některé léky (sulfonamidy). Naopak mezi faktory tlumící sekreci inzulinu patří fyziologické podmínky (hladovění, fyzická aktivita), některé hormony (růstový hormon, katecholaminy, kortizol, somatostatin), sympatické stimuly a některé další látky (např. interleukin-1, prostaglandin  $F_{2\alpha}$ ) (Hayirli, 2006).

Metabolická odpověď buňky je zahájena, když se inzulin naváže na receptor její buněčné membrány, receptor inzulinu je protein složený ze čtyř řetězců. Dvou řetězců  $\alpha$  a dvou  $\beta$ . Řetězce  $\alpha$  jsou na vnější straně membrány buňky a jsou na nich vazebná místa pro inzulin. Řetězce  $\beta$  prostupují buněčnou membránou a na vnitřní straně membrány vykazují tyrosinkinázovou aktivitu. Po navázání inzulinu na receptor se zvyšuje aktivita tyrosinkinázy, která fosforyluje OH skupiny tyrozinu. Tím zvyšuje permeabilitu membrán pro vstup glukózy. Ve svalech a tukové tkáni se po navázání inzulinu na receptor zvyšuje propustnost membrány pro glukózu až 20krát. Inzulin také usnadňuje buněčnou absorpci aminokyselin, draslíku, fosfátů a hořčíku (Martin and Crump, 2003).

Inzulin působí v rámci akutního a velmi citlivého mechanismu, zajišťujícího zvýšení skladovacích kapacit živinových zásob v jaterní, tukové a svalové tkáni. Přijímané živiny jsou uplatňovány v bazálním metabolismu buněk (při jejich růstu a diferenciaci) anebo jsou pouze uloženy. Intracelulární změny v citlivosti buněk k inzulinu jsou ovlivňovány řadou dalších hormonů a regulačních faktorů. Inzulin je jediným hormonem, který snižuje hladinu glukózy v krevní plazmě, zatímco na jejím zvyšování se podílí více hormonů. Svým působením na buněčné enzymatické procesy snižuje inzulin jaterní glukoneogenezi. Inzulin také snižuje množství kyseliny mléčné a glycerolu vstupujícího do jater a jejich využití v glukoneogenezi. Na rozdíl od glukózy není inzulinem (a zřejmě ani žádnými jinými hormony) ovlivňováno využití kyseliny propionové a to ani v průběhu jednotlivých reakčních sledů glukoneogeneze. Inzulin sám neovlivňuje vychytávání aminokyselin játry, navozuje však pokles plazmatické koncentrace aminokyselin tlumením jejich mobilizace z kosterního svalstva a stimulací jejich využití v proteosyntéze (Skřivánek, 2001). Inzulin snižuje jaterní absorpci NEMK tím že, stimuluje lipogenezi a inhibuje lipolýzu v tukové tkáni. Mění aktivitu enzymů a dostupnost substrátů, které jsou součástí ketogeneze v játrech (Hayirli, 2006). Tím, že zvyšuje metabolismus glukózy cestou pentózového cyklu, navozuje v tukové tkáni vyšší dostupnost NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat redukovaný). To umožňuje zvýšit inkorporaci acetátu do mastných kyselin, během lipogeneze. Tak může být u přežvýkavců v tukové tkáni, kontrolována intenzita lipogeneze inzulinem, prostřednictvím řízení transportu glukózy. Inzulin zvyšuje využití i dalších energetických substrátů v lipogenezi např. NEMK a ketolátek. Inzulin snižuje samotnou produkci ketolátek tím, že snižuje absorpci a přeměnu NEMK v játrech, také snižuje hladinu ketolátek ve tkáních podporou jejich utilizace. Samotné zvyšující se hladiny NEMK a ketolátek stimulují sekreci inzulinu. V rámci fyziologicky probíhající regulace energetického metabolismu u dojnice, navozuje vzestup koncentrace NEMK, následný růst hladin ketolátek v krvi, který vede ke zvýšení krevní hladiny inzulinu,

jenž svým následným účinkem naopak uvolňování (a celkovou koncentrací) NEMK v organismu tlumí. Účinek inzulínu je přitom regulován receptory (GLUT 4), které se nacházejí ve tkáních, zejména v játrech, adipocytech, kosterní svalovině a kostní tkáni. Při nízkém příjmu krmiva je produkce inzulínu v pankreatu omezená. Narušení tohoto regulačního systému u vysokoprodukčních dojnic (metabolickou zátěží až nepřiměřeně vysoké úrovně laktace přetíženého), vede velmi často (a relativně snadno) k narušení jejich energetického metabolismu a prakticky vždy k poruchám laktace. Inzulín je rovněž velmi důležitý pro regulaci rovnováhy proteinů ve svalech. V kosterní svalovině inzulín zvyšuje příjem glukózy do buněk a stimuluje v nich syntézu glykogenu, glykolýzu, oxidační dekarboxylaci pyruvátu, příjem a esterifikaci mastných kyselin, odběr acetátu, příjem aminokyselin. Zvyšuje v nich proteosyntézu a brzdí degradaci proteinu (Skřivánek, 2001).

Při stanovení hladin inzulínu je nutno brát na zřetel, že pankreatická sekrece inzulínu stoupá po příjmu krmiva (Skřivánek, 2001; Wylie et al., 2008). V období okolo porodu a na začátku laktace jsou hladiny inzulínu na nižších úrovních než během březosti (van Kneysel et al., 2007). Základní rozpětí plasmatické hladiny inzulínu u skotu je 15–50  $\mu\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$  (0,6–2,0  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) (Trenkle, 1972).

### 3.1.3 Neesterifikované mastné kyseliny (NEMK)

Jako neesterifikované mastné kyseliny jsou označovány mastné kyseliny, které nejsou vázány esterovou vazbou na glycerol či jiné alkoholy (Bell, 1995). V literatuře se také vyskytují ekvivalentní termíny UFA (unesterified fatty acids), NEFA (nonesterified fatty acids) či volné mastné kyseliny (free fatty acids, FFA). V plasmě jsou NEMK navázány na albumin a v buňce na vazebný protein pro mastné kyseliny, tzv. protein Z, takže ve skutečnosti mastné kyseliny nejsou nikdy „volné“ (Mayes, 1998).

Neesterifikované mastné kyseliny se do krevního oběhu uvolňují štěpením triacylglycerolů tukové tkáně tzv. lipolýzou. Pro vysokoužitkové dojnice v tranzitním období je typická masivní mobilizace NEMK. V tomto období slouží ke kompenzaci negativní energetické bilance (NEB). Neesterifikované mastné kyseliny mohou sloužit jako energetický zdroj pro mnoho tkání, především pro periferní jako např. svaly. Nicméně v nadbytku působí toxicky. Játra skotu mají pouze omezenou kapacitu metabolizace NEMK na triacylglyceroly (TAG). Množství uvolněných NEMK z tukové tkáně, je rozdílem mezi lipogenezí a lipolýzou (Adewuyi et al., 2005). Bell (1995) popsal čtyři způsoby, jakými vzrůstá mobilizace NEMK, u přežvýkavců v období kolem porodu:

1. Potlačení *de novo* syntézy či vstřebávání a poté esterifikace mastných kyselin (tzn. potlačení lipogeneze).
2. Zintenzivnění lipolýzy.
3. Redukce intracelulární reesterifikace mastných kyselin uvolněných při lipolýze.
4. Kombinace výše popsaných možností (Bell, 1995).

Hlavním endokrinním mechanismem ovlivňujícím lipolýzu a tedy produkci NEMK je poměr inzulín-glukagon. Do tohoto mechanismu je zapojen také růstový hormon (STH), který je zodpovědný za inzulínovou resistenci periferních tkání, ta je následována zvýšenou lipolýzou a oxidací mastných kyselin (Adewuyi, 2005). Naopak zvýšená hladina inzulínu (např. při zvýšené hladině propionátu v krvi) vede k potlačení mobilizace NEMK (Drackley, 1999).

Uvolněné NEMK z tukové tkáně jsou transportovány krví do jater. Při nízkých koncentracích jsou NEMK v jaterních buňkách esterifikovány na acylglyceroly (nejznámější triacylglycerol) a jsou transportovány z jater navázány na lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL) (Mayes, 1998). Nicméně v období relativního nadbytku NEMK (např. u dojnic v NEB) následuje několik alternativ jejich metabolismu:

- Mitochondriální  $\beta$ -oxidace až na acetyl-CoA, který je zpracován v Krebsově cyklu.
- Mitochondriální  $\beta$ -oxidace až na acetyl-CoA. Při nedostatku oxalacetátu je acetyl-CoA transformován na ketolátky (acetoacetát,  $\beta$ -hydroxybutyrát, aceton) (Čech a Doležel, 2006).
- Peroxizomální  $\beta$ -oxidace, která je podobná mitochondriální (vzniká acetyl-CoA) avšak s některými výjimkami, spíše než redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), je produkován peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ). Vzniká větší množství tepla. Peroxizomy nejsou spojeny s dýchacím řetězcem a produkcí ATP (Drackley, 1999). Lze předpokládat, že v peroxizomech dochází k oxidaci přibližně 50 % NEMK, bez omezení nedostatkem karnitinu, nezbytného pro vstup NEMK do mitochondrií (Gorrieri a Persona, 2011).
- Zakomponování NEMK do mléčného tuku a to buď přímo, či nepřímo přes esterifikaci na VLDL. Výsledkem je vzestup obsahu dlouhořetězcových mastných kyselin v mléce (van Knegsel et al., 2007). Během prvních dnů laktace jsou NEMK zdrojem asi 40 % mléčného tuku (Adewuyi, 2005).

- Esterifikace NEMK na triacylglyceroly (TAG) a uložení TAG v játrech. To může způsobit jaterní steatózu (van Knegsel et al., 2007).

Význam stanovení NEMK spočívá ve vymezení lipomobilizační zátěže jater u vysokoprodukčních dojnic (Pechová a kol., 2009). Množství cirkulujících NEMK a BHB mohou být měřítkem úspěšnosti adaptace na negativní energetickou bilanci. Sérové či plasmatické hladiny NEMK, měřené týden před porodem, jsou jedním z vhodných nástrojů odhadu zdravotního stavu po porodu. Bohužel však v současnosti neexistují vhodné testy (rychlé, přesné, levné) k měření hladin NEMK přímo na farmě (LeBlanc, 2010). NEMK nejsou pouze ukazatelem lipolýzy, ale k jejich zvýšení dochází rovněž při narušení jejich užití. Snížená koncentrace NEMK v krvi nemá diagnostický význam. Referenční rozmezí NEMK v krvi dojnic je  $0,1\text{--}0,35\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Pechová a kol., 2009; Kováč a Podmanický, 2001). Hladiny NEMK se mohou stanovovat ze séra i plazmy. Při hemolýze vzorku je možné, že hladiny NEMK mohou být falešně zvýšené. Stejně tak mohou být falešně zvýšené, pokud není sérum odděleno během 12–24 hodin, nebo pokud není uchováváno v chladu (LeBlanc, 2010). Overton and Waldron (2004) tvrdí, že sérová hladina NEMK může být vhodným nástrojem pro vyhodnocení krmné dávky během období stání na sucho.

Plasmatická koncentrace NEMK začíná vzrůstat několik dní před porodem, vrcholu dosahuje ve dnech okolo porodu. Vyšší hladiny NEMK, než předporodní, přetrvávají asi dva týdny po porodu (Adewuyi, 2005). Podle Drackleye (2000) jsou normální hladiny NEMK pro skot v pozitivní energetické bilanci menší než  $0,2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ke konci období stání na sucho hladiny NEMK vzrůstají a během posledního týdne před porodem se pohybují mezi  $0,5\text{--}1,0\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Drackley, 2000). Naproti tomu Bertics et al. (1992) udávají v tomto období širší rozpětí a to od  $0,5$  do  $2,0\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vrcholu hodnoty dosahují v den porodu a to  $0,8\text{--}1,2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  jako důsledek stresu a hormonálních změn. Po porodu hladiny NEMK opět klesají, hodnoty přesahující  $0,7\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  naznačují závažnější NEB. Šest týdnů po porodu hodnoty nejsou vyšší než  $0,3\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Drackley, 2000).

Vyšší hladiny NEMK než  $0,4\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  sedm až deset dní před porodem jsou spojeny s: dvakrát až čtyřikrát větším rizikem přetočení slezu; dvakrát větším rizikem zadržení placenty; dvakrát větším rizikem redukce dojivosti před 60 dnem po porodu; 1,5krát vyšším rizikem menšího nádoje za celou laktaci a o  $1,1\text{ kg}/\text{den}$  nižší dojivosti během prvních 4 měsíců laktace (LeBlanc, 2010).



### 3.1.4 Ketolátky ( $\beta$ -hydroxybutyrát)

Ketolátky jsou produkty intermediárního metabolismu mastných kyselin a některých aminokyselin. Mezi oxidované ketolátky se řadí acetoacetát a aceton, naopak zástupcem redukovaných ketolátek je  $\beta$ -hydroxybutyrát (BHB). Ketolátky vznikají v jaterní tkáni při metabolizaci tuků a ve stěně předžaludků (Pechová a kol., 2009). V játrech vznikají ketolátky především za podmínek spojených s vysokým stupněm oxidace mastných kyselin (Mayes, 1998). Tato situace je typická pro dojnice v poporodním období, kdy zvýšené energetické požadavky po zahájení laktace, vedou k mobilizaci tukových zásob (Adewuyi, 2005). Zvýšená hladina BHB však nemusí přímo odrážet mobilizaci tukových zásob, protože BHB je také produktem metabolismu kyseliny máselné. Její produkce v bachoru vzrůstá při zkrmování siláží a některých doplňkových krmiv. Bachorový epitel přemění 75 % a játra 60 % kyseliny máselné na BHB (Wylie et al, 2008).

Při negativní energetické bilanci jsou mobilizovány tukové zásoby a vzrůstá hladina NEMK a glycerolu v krvi. NEMK v játrech podléhají mitochondriální  $\beta$ -oxidaci, která vede k produkci acetyl-CoA (Suriyasathaporn et al., 2000). Acetyl-CoA může být oxidován v Krebsově cyklu na  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , nebo je při vysokém stupni oxidace mastných kyselin zapojen do procesu ketogeneze, která představuje alternativní cestu využití acetyl-CoA. Oxidace acetyl-CoA v Krebsově cyklu probíhá pouze při dostatku oxalacetátu pro kondenzaci acetyl-CoA na citrát. Oxalacetát vzniká z propionátu a je přednostně využíván pro glukoneogenezi. Při jeho nedostatku se omezuje vstup acetyl-CoA do Krebsova cyklu a stoupá ketogeneze, kdy je acetyl-CoA metabolizován přes acetoacetyl-CoA na acetoacetát a  $\beta$ -hydroxybutyrát (Pechová, 2009). Acetoacetyl-CoA, který je výchozí látkou pro ketogenezi vzniká buď přímo při  $\beta$ -oxidaci, nebo kondenzací dvou acetyl-CoA. Enzymy zodpovědné za tvorbu ketolátek se nacházejí hlavně v mitochondriích. Acetoacetát a BHB jsou navzájem přeměňovány mitochondriálním enzymem  $\beta$ -hydroxybutyrátdehydrogenazou; poloha reakční rovnováhy je určována poměrem mitochondriální  $[\text{NAD}^+]$  k  $[\text{NADH}]$ , čili redox stavem. Poměr BHB/acetoacetát v krvi kolísá mezi 1:1 a 10:1. Acetoacetát také podléhá spontánní dekarboxylaci za vzniku acetonu (Mayes, 1998).

Výsledná koncentrace ketolátek v krvi je dána poměrem mezi produkcí ketolátek v játrech a jejich utilizací periferními tkáněmi, kde mohou sloužit jako zdroj energie. K vyššímu využití ketolátek dochází při pohybu zvířat, proto při volném ustájení bývají zjišťovány nižší koncentrace ketolátek než ve vazných ustájeních (Pechová a kol., 2009). BHB je také substrát pro *de novo* syntézu mastných kyselin v mléčné žláze (Wylie et al., 2008). Ketolátky jako produkty kyselé povahy při dlouhodobé zvýšené produkci způsobují

ketoacidózu (Mayes, 1998). Zvýšená koncentrace ketolátek je také patognomická pro primární i sekundární ketózu, které vznikají při energetickém deficitu organismu, dále při katabolických procesech, a při různých typech hepatopatií (Pechová a kol., 2009).

Všechny tři ketolátky se nachází v mléku, krvi, moči a v těchto tekutinách mohou být také měřeny. Avšak acetoacetát je těkavý a nestálý, jeho měření je relativně obtížné. Obvykle se v polních podmínkách ke stanovení nepoužívá. BHB je nejstabilnější a nejvíce zastoupenou ketolátkou v krvi. Vzhledem k diurnálním rytmům hladin BHB a jejich vztahu k době krmení, by měli odběry vzorků probíhat zhruba ve stejnou denní dobu (LeBlanc, 2010).

Koncentrace ketolátek v krvi je považována za citlivější indikátor energetické bilance než koncentrace glukózy. Referenční hodnoty pro BHB jsou do  $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Pechová a kol., 2009). U dojnic v období stání na sucho by hladina BHB v krvi neměla přesáhnout  $0,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . U dojnic v laktaci je optimální hladina BHB v krvi do  $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Hladina BHB odráží rozsah mobilizace tukové tkáně, jako energetického zdroje. Vyšší hladiny signalizují vyšší stupeň NEB. Hodnoty v rozmezí  $0,6\text{--}1,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  naznačují akceptovatelný rozsah mobilizace. U dojnic s hodnotami BHB nad  $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  je zvýšená pravděpodobnost zdravotních komplikací či snížení užitkovosti (Whitaker, 2004). Enjalbert et al. (2001), uvádějí hranici BHB v krvi mezi zdravými a nemocnými (subklinická ketosa)  $1,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . LeBlanc (2010) uvádí podobné hodnoty pro subklinickou ketosu a to  $1,2\text{--}1,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Snížená koncentrace ketolátek v krvi nemá diagnostický význam (Pechová a kol., 2009).

### 3.1.5 Glukóza

Glukóza představuje transportní formu sacharidů. Glukóza je důležitým zdrojem energie pro výživu buněk, je prekurzorem pro tvorbu laktózy a fruktózy (Pechová a kol., 2009). Většina tkání má alespoň minimální potřebu glukózy. V některých případech, např. v mozku je tato potřeba podstatná, a v jiných např. erythrocytech, je téměř naprostá. Hlavní metabolickou drahou pro utilizaci glukózy je glykolýza, probíhající v cytosolu všech buněk. Aerobní glykolýza (za přístupu kyslíku) vede k tvorbě acetyl-CoA a jeho následné oxidaci v Krebsově cyklu. Klíčový význam glykolýzy spočívá v tom, že je schopna poskytovat ATP i v nepřítomnosti kyslíku a proto umožňuje kosternímu svalu vysokou výkonnost i v situaci, kdy se aerobní oxidace stává nedostatečnou (Mayes, 1998).

Vstup glukózy do buněk je zprostředkován glukózovými transportéry (GLUT). Existuje několik typů glukózových transportérů (GLUT 1 až GLUT 5). GLUT 1 je ve větší míře zastoupen v mozku, placentě, mléčné žláze a erythrocytech, GLUT 2 v játrech, ledvinách

a slinivce břišní, GLUT 3 v mozku a placentě, GLUT 4 v tukové tkáni, kosterním a srdečním svalovině, GLUT 5 v tenkém střevě. Z těchto pěti je pouze GLUT 4 inzulin dependentní, což znamená, že pro vstup glukózy do buňky je nutný inzulin (Hayirli, 2006).

Přežvýkavci velkou část potřeby glukózy pokrývají glukoneogenezí (Bell and Bauman, 1997), u dospělých přežvýkavců je to více než 90 % (Young, 1977). Glukoneogeneze je proces, který zahrnuje všechny metabolické dráhy zodpovědné za přeměnu necukerných sloučenin na glukózu a následně glykogen (Mayes, 1998). Hlavním orgánem glukoneogeneze jsou játra, v menším rozsahu probíhá také v ledvinách (Bell and Bauman, 1997). Hlavním energetickým zdrojem přežvýkavců jsou těkavé mastné kyseliny. Ty se tvoří ze sacharidů mikrobiální činností v batoru. Pouze menší část živin prochází batorem beze změn a je trávena v dalších částech trávicího traktu (Pechová a kol., 2009). Proto je jen velmi malé množství glukózy absorbováno v tenkém střevě (Bell and Bauman, 1997).

V metabolismu glukózy, je primární adaptací na zahájení laktace současný vzestup jaterní glukoneogeneze a pokles oxidace glukózy periferní tkáni. Velká část glukózy v tomto období je absorbována mléčnou žlázou a využita pro tvorbu mléčného cukru (laktózy) (Overton and Waldron, 2004). Reynolds et al. (2003) zjistili, že endogenní produkce glukózy mezi 9. dnem před porodem a 21. dnem po porodu vzrostla o 267 % (naprostá většina této endogenní glukózy pocházela z jaterní glukoneogeneze). Hlavními substráty pro jaterní glukoneogenezi jsou kyselina propionová (z batorové fermentace), kyselina mléčná (z Coriho cyklu), aminokyseliny (z katabolismu proteinů) a glycerol (z lipolýzy tukové tkáně). Tyto substráty se na tvorbě glukózy v játrech v tranzitním období dojníc podílí takto: kyselina propionová 50–60 %, aminokyseliny 20–30 %, kyselina mléčná 15–20 %, glycerol 2–4 % (Reynolds et al., 2003).

Hladinu glukózy lze stanovit z krve, séra i plazmy. S ohledem na energetickou bilanci se zdá být nejvhodnější plasma. Glukózu v krvi začínají po odběru rozkládat glykolytické enzymy. Je tedy nutné, aby analýza byla provedena co nejdříve po odběru či aby zkumavky pro odběr krve obsahovaly antiglykolytika (např. fluorid sodný) (Whitaker, 2004).

Koncentrace glukózy v krvi je ukazatelem schopnosti dojníc dosáhnout rovnováhy mezi úrovní produkce, příjmem energie a mírou tukové mobilizace. Ke snížení koncentrace glukózy dochází při nedostatku pohotové energie v krmné dávce, při nedostatku energie vzhledem k dusíkatým látkám v krmné dávce, při nízké tvorbě kyseliny propionové v batoru, při ketózách a při těžkém narušení funkce jater. Zvýšení koncentrace glukózy v krvi krav je poměrně vzácné a dochází k němu především při stresu zvířat nebo v souvislosti

s aplikací některých léčiv. Referenční rozmezí koncentrace glukózy v krvi skotu je 2,5–4,16 mmol·l<sup>-1</sup> (Kováč a Podmanický, 2001); 1,8–3,8 mmol·l<sup>-1</sup> (Tluchoř, 2003); 2,5–4,1 mmol·l<sup>-1</sup> (Doubek a kol., 2007); 3,0–4,0 mmol·l<sup>-1</sup> (Pechová a kol., 2009). Koncentrace glukózy v krvi, je pod přísnou homeostatickou kontrolou, proto ačkoli glukóza hraje důležitou roli v energetickém metabolismu, není příliš vhodným analytem pro monitorování a vyšetřování problémů stáda (LeBlanc, 2010).

Plasmatická hladina glukózy se snižuje v období okolo porodu a drží se na nižších koncentracích první týden po porodu (Stengärde, 2010). Block et al. (2001) naměřili (glukosaoxidázovým testem) u holštýnských dojnic v tranzitním období tyto hladiny glukózy: 4 týdny ante partum (a.p.) 3,05 mmol·l<sup>-1</sup> (v originále 55 mg·dl<sup>-1</sup>), 1 týden a.p. 3,05 mmol·l<sup>-1</sup> (55 mg·dl<sup>-1</sup>), 1 týden post partum (p.p.) 2,77 mmol·l<sup>-1</sup> (50 mg·dl<sup>-1</sup>), 3 týden p.p. 2,61 mmol·l<sup>-1</sup> (47 mg·dl<sup>-1</sup>), 8 týden p.p. 3,05 mmol·l<sup>-1</sup> (55 mg·dl<sup>-1</sup>).

### **3.2 Tranzitní období dojnic**

Tranzitní (přechodné) nebo také peripartální období se u dojnic považuje za nejkritičtější z pohledu výskytu zdravotních poruch, ale také z pohledu produkce a užitkovosti. Časové ohraničení tohoto významného období je podle různých autorů odlišné. Představuje konečnou fázi gravidity a začátek laktace, zpravidla tři týdny před porodem a tři týdny po porodu (Kováč a kol., 2011; Drackley, 1999). Nordlund (2010) toto období vymezuje od ukončení předchozí laktace do 40. dne po porodu. Dále uvádí, že více než 80 % nemocí dojnic je spojeno právě s touto fází reprodukčního cyklu. Onemocnění vázané na tranzitní období lze shrnout, a to na základě časové souslednosti a vzájemné provázanosti jejich vzniku, dopadů na organismus dojnice a na možnosti prevence, pod pojem „syndrom peripartální krize dojnic“. Jeho patognomickým faktorem je kombinovaná environmentální, energetická, vápníková, bachorová a imunitní stresová reakce. Ta se rozvíjí v organismu vysokoprodukční dojnice, které nebyly zajištěny všechny potřebné předpoklady. Chovatelé znají projevy uvedeného syndromu. Jedná se o známé problémy s obézními zvířaty před porodem a jejich hubnutím po porodu, s vysokým výskytem zadržení lůžka, s metritidami, mastitidami, kulhavostí, s omezeným příjmem potravy a špatným „nasazováním“. Typickými projevy tohoto syndromu jsou i ulehnutí, ketóza, ztučnění jater a dislokace slezu (Skřivánek, 2010). Velké množství těchto chorob je spojeno s nástupem laktace a nedostatečnou adaptací organismu na tyto změny. Je to situace, kdy jsou regulační mechanismy organismu

nedostatečné a to vede k většímu riziku trávicích, metabolický či infekčních chorob (Ingvartsen, 2006).

### 3.2.1 Negativní energetická bilance

Po porodu se každá dojnice ocitá před náhlým a pro organismus nečekaným zvýšením energetických nároků (Slavík a kol., 2010). V období pozdní březosti je tento nárůst zapříčiněn rychlejším růstem plodu. Kalkulovaná energetická potřeba pro růst plodu v závěru březosti (250. den březosti, hmotnost plodu 35 kg) je u holštýnského skotu 2,3 Mcal (9,6 MJ) NEL (netto energie laktace) na den. Plod ke svému růstu využívá především glukózu a aminokyseliny. Glukóza pokrývá asi 35–40 % a aminokyseliny asi 55 % energetických požadavků. Zbývajících 5–10 % kryje převážně kyselina octová. S nástupem laktace roste potřeba živin velmi dramaticky. Dojnice s dojivostí 50 kg mléka za den vyloučí denně zhruba 2 kg mléčného tuku, 1,6 kg mléčných bílkovin, 2,5 kg laktózy, 65 g vápníku, 50 g fosforu a asi 8 g hořčíku. Všechny tyto vyloučené látky pochopitelně navyšují potřebu energie, bílkovin a minerálů (Ingvartsen, 2006). Příčinou vzniku energetického deficitu je to, že v poporodním období, kdy dojnice potřebuje takto velké množství energie pro produkci mléka, není schopna přijmout dostatečné množství krmiva. Vrchol dojivosti je za 4–7 týdnů po porodu, zatímco vrchol spontánního příjmu krmiva, je za 8–10 týdnů po porodu. Dochází proto k mobilizaci tělesných rezerv a hubnutí zvířat (Pechová, 2009). Čím jsou úbytky hmotnosti vyšší, tím horší jsou následky na zdravotním stavu. Fyziologický je pokles maximálně 5 % živé hmotnosti dojnice, tj. asi 30 kg. Úbytek 1 kg hmotnosti dojnice poskytuje energii asi na 3,5 kg mléka (Suchý a kol., 2009).

Negativní energetická bilance (NEB) může začít již několik dnů před porodem, protože příjem krmiva v posledních dnech gravidity a v den porodu je velmi nízký zvláště u jalovic. Negativní energetická bilance přetrvává několik týdnů po porodu, přičemž nejvýraznější bývá v prvním a druhém týdnu laktace. Záleží na kondici krávy před porodem a na její schopnosti zvyšovat příjem sušiny krmné dávky v poporodním období a na výši produkce kolostra a mléka (Illek a Kudrna, 2010).

Možnosti jak bránit vzniku NEB u vysokoprodukčních dojnic, jsou známé, ale v praxi se nedaří vědecké poznatky vždy realizovat. Základním předpokladem je zabezpečení optimálních fermentačních pochodů v předžaludku, vysoká tvorba těkavých mastných kyselin a mikrobiálního proteinu i optimální trávení a resorpce živin ve střevě. To vyžaduje vyrovnanou krmnou dávku s optimálním zastoupením potřebných živin, hygienickou nezávadnost, vhodnou strukturu a chutnost krmné dávky. Vysoká koncentrace živin v krmné

dávce založená na sacharidových krmivech je velmi riziková, protože je příčinou akutní nebo chronické acidózy bachorového obsahu. Osvědčenou metodou, jak zvýšit koncentraci energie v krmné dávce a tím i omezit vznik NEB, je zařazení tuku a některých glukogenních látek, jako je propionát vápenatý, propylenglykol, laktóza a glycerol do krmné dávky. Zařazení upravených tuků do krmné dávky snižuje stav NEB a z toho důvodu se dříve obnovuje ovarialní činnost a nástup ovulace i říje. Je prokázáno, že krávy s vyšším příjmem tuku mají vyšší koncentraci cholesterolu a progesteronu v krvi a nižší embryonální mortalitu (Illek a Kudrna, 2010).

Mezi novější metody (ne však dostatečně ověřené) omezení NEB patří zkracování doby stání na sucho. V pokusu Watterse et al. (2008), kdy byla doba stání na sucho u pokusné skupiny dojnic zkrácena z 55 na 34 dní, byla negativní energetická bilance po porodu (hodnocena podle koncentrace NEMK v plasmě) méně výrazná než u kontrolní skupiny dojnic (doba stání na sucho 55 dní).

### **3.2.2 Změny metabolismu**

Přerozdělování živin mezi tělní tkáně organismu zahrnuje dva typy regulace homeostázu a homeorhézu. Homeostatická kontrola zahrnuje procesy, které udržují stálé vnitřní prostředí ve fyziologickém rozmezí (např. stála teplota, pH, koncentrace iontů). V oblasti metabolismu se homeostáza uplatňuje například v usměrňování živin při a po jejich absorpci. Typickým příkladem je příjem potravy a poté vzestup metabolitů v krvi. Ten je následován vzestupem poměru inzulínu ke glukagonu. Výsledkem jsou anabolické procesy jako glykogeneze a lipogeneze (Bauman and Currie, 1980). Homeorhéza je druhý typ kontroly přerozdělování živin. Bauman and Currie (1980) popsaly homeorhézu jako organizaci změn podporující organismus dle aktuálních potřeb tj. usměrňování živin pro jednotlivé tkáně v organismu podle jejich momentálních fyziologických priorit. Tyto adaptace jsou obvykle zahájeny ke konci březosti a zesilují v době porodu nebo krátce po porodu. Probíhají v mnoha tkáních, nejlépe jsou však popsány v tukové tkáni a játrech (Bell, 1995). Primární homeorhetickou adaptací glukózového metabolismu na zahájení laktace je vzestup jaterní glukoneogeneze a pokles oxidace glukózy periferní tkání. Většina glukózy v tomto období je využívána mléčnou žlázou pro tvorbu laktózy. Primární homeorhetickou adaptací lipidového metabolismu na zahájení laktace je mobilizace tukových zásob organismu na pokrytí zvýšených energetických požadavků organismu. Tukové zásoby se do krevního oběhu uvolňují ve formě NEMK (Overton and Waldron, 2004).

Porod je spojen se sérií změn, které se snaží synchronizovat metabolické a endokrinní pochody. Tyto změny jsou zahájeny během posledních tří týdnů březosti a pokračují po první čtyři týdny laktace (Bauman and Currie, 1980). Hlavní roli v regulaci metabolické adaptace v tranzitním období hraje endokrinní systém, na regulaci se také podílí nervový a imunitní systém (Ingvarstsen, 2006). Hormony jako tzv. endokrinní mediátory jsou mj. nepostradatelné v rozdojovacím období dojnice při řízení (regulaci) průběhu procesů adaptace jejího organismu k nastupující negativní energetické bilanci (Skřivánek, 2001).

Přehled nejdůležitějších biologických procesů a metabolických změn spojených se zahájením laktace přežvýkavců je uveden v tabulce 2.

**Tabulka 2.** Nejdůležitější biologické procesy a metabolické změny spojené se zahájením laktace u přežvýkavců

Fyziologická funkce	Metabolická změna	Tkáň
Syntéza mléka	↑ syntetická kapacita ↑ průtok krve ↑ absorpce a využití živin	Mléčná žláza Mléčná žláza Mléčná žláza
Metabolismus lipidů	↓ <i>de novo</i> syntéza tuku ↓ absorpce mastných kyselin ↓ esterifikace mastných kyselin ↑ lipolýza ↑ využití lipidů jako zdroje energie	Tuková tkáň Tuková tkáň Tuková tkáň Tuková tkáň Periferní tkáň
Metabolismus glukózy	↑ velikost jater ↑ průtok krve ↑ glukoneogeneze ↓ využití glukózy	Játra Játra Játra Periferní tkáň
Metabolismus proteinů	↑ mobilizace proteinů	Svalová tkáň
Metabolismus minerálů	↑ absorpce ↑ mobilizace	Střevo Kosti
Příjem	↑ využití živin	CNS
Trávení	↑ hypertrofie trávicího traktu ↑ kapacita pro absorpci živin ↑ metabolická aktivita	Trávicí trakt Trávicí trakt Trávicí trakt
Krevní oběh	↑ průtok krve ↑ průtok krve	Srdce Trávicí trakt

↑ vzrůst; ↓ pokles

(Bauman and Currie, 1980; Ingvarstsen, 2006)

### 3.2.3 Hormonální změny

Block et al. (2001) sledovali změny plasmatické koncentrace leptinu, inzulinu, IGF-I a některých metabolitů u dojnic v průběhu tranzitního období. Do pokusu bylo zahrnuto 8 dojnic v období 35 dní před až 56 dní po porodu (-35 až +56). Dojnice byly krmeny *ad libitum* směsnou krmnou dávkou. Složení krmné dávky se měnilo v závislosti na potřebách zvířat během březosti a laktace. Krávy byly dojeny tři krát denně (9:00, 16:00, 23:00 hod.). Vzorky krve byly odebírány z *vena coccygea*, vždy před krmením, třikrát týdně mezi dny -28 až -9, denně mezi dny -9 až +7, poté odběry variovaly. Byly stanoveny koncentrace glukózy (glukoso oxidázová metoda), NEMK (acyl-CoA syntetázo oxidázová metoda), leptin („double-antibody bovine“ RIA), inzulin (RIA), IGF-I (RIA). Plasmatická koncentrace leptinu se během březosti příliš neměnila. Začala mírně klesat až těsně před porodem. Během laktace leptinémie klesla zhruba na 50 % předporodních hodnot. Přes postupné zlepšování energetické bilance dojnic od třetího týdne laktace zůstávaly koncentrace leptinu na nižší úrovni ještě v 8. týdnu laktace (Tab. 3) (Block et al., 2001).

**Tabulka 3.** Změny plasmatických koncentrací metabolitů a hormonů v tranzitním období

	Týden před a po porodu				
Látka	-4	-1	1	3	8
NEMK ( $\mu\text{M}$ )	107	121	546	293	144
Glukóza ( $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ )	55	55	50	47	55
Leptin ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	5,8	5,5	3,0	3,2	2,9
Inzulin ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	0,8	0,7	0,3	0,5	0,8
IGF-I ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	124	77	40	36	40

(Block et al., 2001)

Liefers et al. (2003) sledovali vztah plasmatické koncentrace leptinu k energetické bilanci, mléčné užitkovosti, příjmu krmiva, živé hmotnosti a nástupu říje. V pokusu bylo sledováno 304 prvotek holštýnského skotu v období 4 týdny před porodem až 15 týdnů po porodu. V tomto období byly odebírány vzorky krve (14 denní interval, pravidelný čas před krmením) a měřen příjem sušiny, množství nadojeného mléka a živá hmotnost zvířat. Koncentrace leptinu, stanovené metodou RIA, byly vysoké v závěrečné fázi březosti a začaly klesat s blížícím se porodem. Nejnižších hodnot dosáhly právě v den porodu. Krátce po porodu koncentrace opět mírně stouply, avšak nižší hladiny než před porodem přetrvávaly



ještě 70. den po porodu. Hladiny leptinu nebyly ovlivněny věkem dojnice při otelení. Krávy, které během laktace přijímaly 17 kg sušiny na den, měli prokazatelně ( $p < 0,05$ ) nižší koncentrace leptinu než krávy které konzumovali 20 kg sušiny na den. Krávy s nižší živou hmotností po porodu (488 kg) měli nižší koncentrace leptinu než krávy s vyšší hmotností (572 kg). Koncentrace leptinu byla ovlivněna také množstvím nadojeného mléka. Kdy krávy s nádojem 36 kg za den měli nižší koncentrace leptinu ( $p < 0,05$ ) než krávy s nádojem 27 kg za den, tento rozdíl byl však statisticky významný až od 25. dne laktace. Dále koncentrace leptinu byla ovlivněna energetickou bilancí. Krávy s průměrnou energetickou bilancí po porodu  $-14$  MJ/den měli v laktaci nižší koncentrace leptinu než krávy s průměrnou energetickou bilancí  $+9$  MJ/den. Před porodem nebyl statisticky významný rozdíl mezi koncentracemi leptinu v těchto skupinách (Liefers et al., 2003).

Soliman et al. (2002) sledovali změny sérové hladiny leptinu v tranzitním období u 22 holštýnských dojnic. Vzorke odebíraly v období 7 týdnů, toto období zahrnovalo i porod. Sérová hladina leptinu byla měřena metodu „multi-species leptin“ RIA. Průměrné hladiny leptinu se pohybovaly v rozmezí  $5,9-9,2$  ng·ml<sup>-1</sup>. U jednotlivých dojnic hladiny leptinu mírně kolísaly jak v předporodním tak poporodním období, avšak toto kolísání nevykazovalo jednoznačný trend. Mezi sérovými hladinami leptinu v předporodním a poporodním období nebyl statisticky významný rozdíl (Soliman et al, 2002).

Kadokawa et al. (2000) v pokusu s 20 vysokoužitkovými dojnicemi holštýnského plemene měřili („recombinant bovine leptin“ RIA) plasmatické koncentrace leptinu v tranzitním období. Průměrné koncentrace leptinu v období 14 dnů před porodem byly  $1,81 \pm 0,31$  ng·ml<sup>-1</sup>, v poporodním předovulačním období  $1,32 \pm 0,21$  ng·ml<sup>-1</sup>, v poporodním poovulačním období  $1,61 \pm 0,24$  ng·ml<sup>-1</sup>. Rozdíly mezi hladinami leptinu v těchto třech obdobích byly statisticky významné ( $p < 0,01$ ). Průměrný interval od porodu do první ovulace byl  $25,9 \pm 2,0$  dny. Nejnižší průměrné koncentrace ( $0,74 \pm 0,17$  ng·ml<sup>-1</sup>) byly naměřeny přibližně 10 dnů po porodu ( $10,1 \pm 2,2$  dne) (Kadokawa et al., 2000).

Falkenberg et al. (2008) porovnávali sérové hladiny IGF-I ve třech skupinách dojnic po porodu a jejich vztah k reprodukčním funkcím. V pokusu bylo zahrnuto 417 holštýnských dojnic na 2 až 7 laktaci. Vzorke krve byly odebírány 1., 4., 10., 20. a 40. den po porodu ve stejný čas po ranním dojení. Sérové koncentrace IGF-I byly stanoveny chemiluminiscenční imunoanalýzou. Dojnice byly rozděleny do tří skupin podle zabřezávání, zabřezlé po první inseminaci (33,0 %), po druhé a vyšší inseminaci (46,3 %) a nezabřezlé do 200. dne po porodu (20,7 %). Ve všech třech skupinách sérové hladiny IGF-I stoupaly od porodu do 4. dne po porodu. Od 4. do 10. dne po porodu klesaly a od 10. do 40. dne stoupaly kontinuálně.

Průměrné hodnoty sérové hladiny IGF-I kolísaly mezi  $57,0 \pm 18,9 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  (1. den po porodu) a  $74,0 \pm 19,9 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  (40. den po porodu). Podle autorů má předpověď úspěšnosti reprodukce podle hladiny IGF-I poporodním obdobím pouze omezené využití (Falkenberg et al., 2008).

Leon et al. (2004) sledovali vztah mezi plazmatickými koncentracemi leptinu, IGF-I, inzulinu a změnami tělesné kondice u jalovic. 19 kříženek plemen zebu a švýcarského hnědého skotu s tělesnou kondicí (BCS)  $2,6 \pm 0,11$  (na 9 bodové škále), bylo krmeno dávkou na úrovni 60 % jejich potřeby (období snižování BCS) a poté plnohodnotnou krmnou dávkou (období zvyšování BCS). Vzorke krve byly, odebírány dvakrát týdně před ranním krmením. Koncentrace leptinu a inzulinu byly měřeny metodou RIA, koncentrace IGF-I metodou IRMA (sendvičová radioimunoanalýza). Během poklesu BCS, klesala i hladina leptinu (BCS 3 =  $1,53 \pm 0,05 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ , BCS 2 =  $1,17 \pm 0,04 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ , BCS 1 =  $0,69 \pm 0,09 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Při růstu hmotnosti se hladina leptinu zvyšovala s každým postupným nárůstem BCS (BCS 1 =  $0,69 \pm 0,41 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  až BCS 6 =  $8,22 \pm 0,13 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). S poklesem BCS klesala koncentrace IGF-I a při zvyšování BCS stoupala také koncentrace IGF-I až do BCS 4. Poté, i přes zvyšování BCS, už hladina IGF-I nevzrůstala. Na rozdíl od leptinu a IGF-I, hladina inzulinu během restriktce neklesala. Na začátku zvýšení dotace živin (BCS 1) hladina inzulinu prudce vzrostla. Při dalším zvyšování tělesné kondice mezi BCS 2 a BCS 3 byly hladiny inzulinu vyrovnané, ale nižší než při BCS 1. Mezi BCS 4 a BCS 6 hladina inzulinu opět vzrůstala. Při zvyšování tělesné kondice hladina leptinu pozitivně korelovala s hladinou IGF-I ( $r = 0,36$ ;  $p < 0,01$ ) a s hladinou inzulinu ( $r = 0,18$ ;  $p < 0,01$ ). V tomto období také pozitivně korelovala hladina inzulinu a IGF-I ( $r = 0,60$ ;  $p < 0,01$ ). Při krmné restriktci hladina leptinu pozitivně korelovala pouze s hladinou IGF-I ( $r = 0,34$ ;  $p < 0,01$ ). V tomto období naopak nebyla nalezena statisticky významná korelace mezi hladinou inzulinu a IGF-I ( $r = 0,07$ ), inzulinu a leptinu ( $r = -0,05$ ) (Leon et al., 2004).

Accorsi et al. (2005) stanovovali u dojnic hladiny leptinu, inzulinu a vybraných metabolických parametrů v tranzitním období dojnic. Do pokusu bylo zahrnuto 23 vysokoužitkových dojnic italsko-fríského skotu. Dojnice byly na  $2,25 \pm 0,11$  laktaci, v průměru nadojily  $11785,68 \pm 1612,63 \text{ kg}$  mléka za laktaci. Vzorke byly odebrány 30. a 5. den před očekávaným porodem, 10. a 30. den po porodu, a poté každých 30 dní až do 9. měsíce laktace. Leptin byl stanoven „multispecies“ RIA, inzulin komerční sadou (Diagnostic Product Corp.). Plazmatické hladiny leptinu i inzulinu začaly klesat již 30. den před porodem. Ihned po porodu zůstávaly hladiny inzulinu na nízké úrovni. Nejnižších hodnot dosahovaly 10. den po porodu. Na nižších hodnotách než před porodem zůstaly až do 7. měsíce laktace poté rostly. Hladina leptinu dosahovala nejnižších hodnot v období těsně okolo porodu. Poté

vytrvale rostla až do 30. dne po porodu kdy dosahovala podobných hodnot jako 30 dnů před porodem. Nejvyšších hodnot dosahovaly 4. až 6. měsíc laktace. Hladiny leptinu pozitivně korelovaly s hladinami inzulínu ( $r = 0,32$ ;  $p < 0,03$ ), s teplotou prostředí ( $r = 0,77$ ;  $p < 0,05$ ) a také se světelnou délkou dne ( $r = 0,58$ ;  $p < 0,05$ ). Negativně korelovaly s hladinami NEMK ( $r = -0,37$ ;  $p < 0,01$ ). Nejvýraznější NEB byla zaznamenána 10. den po porodu. V tomto období byly nejvyšší plasmatické hladiny NEMK a nejnižší plasmatické hladiny glukózy (Accrosi et al., 2005).

Konigsson et al. (2008) sledovali vztah energetické bilance, plazmatických hladin leptinu, NEMK a IGF-I v tranzitním období k znovuoobnovení ovariální aktivity po porodu. Pokus byl proveden na 12 prvotelkách švédského červenobílého skotu. Roční dojivost byla okolo 9000 kg mléka na dojnici. Energetická bilance byla odhadována na základě měření hmotnosti, příjmu sušiny (příjmu energie) a produkce mléka (jednotlivých složek). Vzorčky byly odebírány jednou týdně v období týden před porodem až 7. týden po porodu. Ke stanovení leptinu byla využita „multispecies“ RIA, ke stanovení IGF-I modifikovaná RIA a ke stanovení NEMK enzymaticko-kolorimetrická metoda. Reprodukční funkce byly hodnoceny na základě sonografického vyšetření a množství progesteronu v krvi. Dojnice byly rozděleny do skupin podle ovariální aktivity v prvních 7 týdnech laktace. Skupina A s ovariální aktivitou a skupina B bez ovariální aktivity. Nejvýraznější NEB byla u obou skupin v průběhu prvního týdne po porodu. Negativní energetická bilance byla výraznější ve skupině B, avšak trvala pouze do třetího týdne po porodu, zatímco u skupiny A byla méně výrazná, ale přetrvávala déle (čtvrtý týden po porodu). Koncentrace leptinu, IGF-I a NEMK v průběhu tranzitního období, jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tabulka 4.** Plasmatické koncentrace leptinu, IGF-I a NEMK v tranzitním období

Látka	Skupina	Týden před a po porodu							
		-1	1	2	3	4	5	6	7
Leptin ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	A	3,5	3,2	3,4	3,6	3,4	3,3	3,4	3,4
	B	3,3	3,5	4,4	4,2	4,4	4,3	3,8	3,8
IGF-I ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	A	128	86	66	94	69	90	86	86
	B	106	37	19	56	42	52	57	52
NEMK ( $\text{mEq}\cdot\text{l}^{-1}$ )	A	155	299	255	244	214	236	144	134
	B	119	328	319	138	142	134	160	130

(Konigsson et al., 2008)

Rozdíly v hladinách leptinu nebyly statisticky významné ani mezi skupinami ani v jednotlivých skupinách v průběhu tranzitního období. Plasmatické hladiny IGF-I byly nižší ve skupině bez ovariální aktivity (B) a to v průběhu celého sledovaného období. Avšak pouze druhý a třetí týden po porodu byly tyto rozdíly statisticky významné. Hladiny NEMK byly u obou skupin nejvyšší první týden po porodu, ve skupině B byly v tomto období naměřeny vyšší hodnoty než ve skupině A (Konigsson et al., 2008).

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Zvířata

Experiment byl proveden ve spolupráci s Výzkumným ústavem živočišné výroby, v. v. i. Praha Uhřetěves a probíhal v období červenec 2010 až únor 2011. Do experimentu bylo postupně zařazeno 15 dojnic holštýnského a českého strakatého skotu. Všechny dojnice byly na 2. a vyšší laktaci. V době zařazení do experimentu netrpěla zvířata žádnou zjevnou zdravotní komplikací. Zvířata byla ustájena volně, byla dojena dvakrát denně (s intervalem mezi dojeními 12 hodin). Krmivo bylo podáváno *ad libitum*. V průběhu pokusu byly dojnice krmeny třemi druhy komplexních směsných krmných dávek (TMR 1, TMR 2 a TMR 3) podle fáze reprodukčního cyklu. TMR 1 byla podávána od začátku stání na sucho (od 60. dne před porodem). TMR 2 byla podávána od 21. dne před porodem. Po otelení byla podávána TMR 3 (Tab. 5). V krmných dávkách byla zastoupena tato krmiva: kukuřičná siláž, vojtěšková siláž, kukuřice LKS, čerstvé pivovarské mláto, luskovino-obilná směs, vojtěškové seno, luční seno, doplňková směs jadrných krmiv, sláma a premixy. Živinové složení jednotlivých krmných dávek je uvedeno v tabulce 5.

### 4.2 Design experimentu

Úroveň energetického stavu jednotlivých dojnic v tranzitním období byla sledována pomocí laboratorní analýzy hormonů (leptin, inzulin) a metabolitů (NEMK, BHB, glukóza) v krevním séru a plazmě. Sérum a plazma byly odebírány v 11 různých dnech v průběhu tranzitního období a to 60. den před porodem až 100. den po porodu (-60, -25, -7, +3, +10, +25, +40, +55, +70, +85, +100). U jednotlivých parametrů byly sledovány a porovnávány změny v průměrných hladinách ve sledovaných dnech. Také byly porovnávány změny hladin jednotlivých parametrů v předporodním a poporodním období. Do předporodního období byly zahrnuty všechny naměřené hodnoty za dny -25 a -7. Do poporodního období byly zahrnuty všechny naměřené hodnoty za dny +3, +10 a +25. Dále byly zjišťovány korelační vztahy mezi hormony a metabolity a mezi leptinem a inzulinem.

**Tabulka 5.** Zastoupení živin a minerálů v jednotlivých krmných dávkách, a období podávání krmných dávek

	Krmná dávka		
	TMR 1	TMR 2	TMR 3
<b>KD podávána</b> (den od porodu)	-60 až -22	-21 až 0	+1 až + 100
<b>Sušina</b> (g/1 kg KD)	434,0	484,6	499,0
<b>Dusíkaté látky</b> (g/1 kg KD)	60,0	84,7	87,9
<b>NEL</b> (MJ/1 kg KD)	2,4	3,0	3,3
<b>Tuk</b> (g/1 kg KD)	8,0	16,1	23,0
<b>Škrob</b> (g/1 kg KD)	23,5	82,8	93,3
<b>ADF</b> (g/1 kg KD)	153,7	124,1	114,9
<b>NDF</b> (g/1 kg KD)	211,2	192,5	186,1
<b>Ca</b> (g/1 kg KD)	5,5	4,8	5,7
<b>P</b> (g/1 kg KD)	1,2	1,8	2,0
<b>Mg</b> (g/1 kg KD)	1,2	1,5	1,7
<b>Na</b> (g/1 kg KD)	0,7	1,2	1,3
<b>K</b> (g/1 kg KD)	7,0	6,7	6,9

KD - Krmná dávka; NEL - netto energie laktace; ADF - acidodetergentní vláknina; NDF - neutrálně detergentní vláknina

### 4.3 Vzorky

**Sérum** – Krev určená ke zpracování na sérum byla odebírána z *vena coccygea* do odběrové zkumavky HEMOS. Poté byla ve stojáku převezena na Katedru veterinárních disciplín (KVD) České zemědělské univerzity v Praze, zde byla ponechána 60 minut v termostatu při 38 °C. Poté byla sražená krev centrifugována při 2700 otáčkách po dobu 10 minut, v případě gelové zátky v séru byl postup opakován. Pasteurovou pipetou bylo sérum rozděleno do 3–4 mikrozkuvek typu Eppendorf (EPPI), a dáno zmrazit do -20 °C, 2. den přeloženo do hlubokomrazícího boxu (-70 °C).

**Plazma** – Krev určená pro zpracování na plazmu byla také odebírána z *vena coccygea* do zkumavky HEMOS. Poté byly odlity cca 2 ml do 1 mikrozkuvky EPPI s heparinem (protisrážlivé činidlo). Dále byla krev centrifugována (miniodstředivka) 10 minut při 2700 otáčkách. Poté byla plazma rozdělena Pasteurovou pipetou do několika mikrozkuvek EPPI a tyto byly uloženy do ledové tříště a převezeny na KVD. Zde byly mikrozkuvky uloženy do mrazáku (-20 °C), druhý den podobně jako u séra, byly přeloženy do hlubokomrazícího

boxu (-70 °C). Po ukončení odběru všech vzorků (únor 2011) byla provedena laboratorní analýza.

#### 4.4 Laboratorní analýza

Jednotlivé analýzy byly prováděny v laboratořích KVD České zemědělské univerzity v Praze. Hladiny **leptinu** byly stanoveny enzymatickou imunoanalýzou (ELISA) za použití ELISA kitu pro bovinní leptin od firmy Usen Life Science, Inc. Analýza hladin **inzulinu** byla provedena obdobně s využitím ELISA kitu pro bovinní inzulin od firmy Mercodia, Uppsala, Sweden. Hladiny **NEMK** byly analyzovány kolorimetrickou metodou a **BHB** enzymaticko-kinetickou metodou pomocí analytických souprav RANDOX NEFA a RANDOX RANBUT od firmy RANDOX Laboratories Ltd., UK. Hladiny **glukózy** byly analyzovány pomocí analytických souprav GLU L 500 S od firmy PLIVA – Lachema diagnostika s.r.o. na principu enzymatického fotometrického stanovení.

#### 4.5 Statistická analýza

Statistické hodnocení získaných výsledků bylo provedeno v programech STATISTICA verze 10 (StatSoft, Inc. 1984 – 2011) a Microsoft Office Excel verze 2007. U každého sledovaného dne byly stanoveny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky vybraných metabolitů a hormonů. Při analýze významnosti rozdílů průměrů mezi sledovanými dny byl použit Kruskalův-Wallisův neparametrický test. V případě, že byly rozdíly v průměrných hladinách látek mezi jednotlivými dny statisticky významné, byl pro podrobnější vyhodnocení využit Neményiho *post-hoc* test. Pro porovnání významnosti rozdílů mezi předporodním a poporodním obdobím byl použit Wilcoxonův test (neparametrický párový t-test). Korelační vztahy mezi hladinami sledovaných ukazatelů, byly hodnoceny vypočítáním Spearmanova korelačního koeficientu ( $r_s$ ) a stanovením významnosti korelace. U všech statistických měření byla zvolena hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 5 Výsledky

### Leptin

Nejvyšší průměrná hladina leptinu byla zjištěna 60 dnů před porodem (-60) a to  $1,28 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Nejnižší průměrné hladiny leptinu byly u dojnic 40 dnů po porodu (+40)  $0,39 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  a 55 dnů po porodu (+55)  $0,41 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Tab. 6, Graf 1). Rozdíly mezi průměrnými hladinami leptinu ve sledovaných dnech v průběhu tranzitního období, stejně jako rozdíly mezi koncentracemi leptinu v předporodním (-25 a -7) a poporodním období (+3, +10 a +25), nebyly statisticky významné (Tab. 7). Korelace mezi leptinem a ostatními sledovanými parametry (inzulin, NEMK, BHB, glukóza) v průběhu tranzitního období nebyly statisticky významné (Tab. 8).

### Inzulin

Nejvyšší průměrná hladina inzulinu byla zjištěna 25 dnů před porodem (-25) a to  $1,28 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a nejnižší pak 10 dnů po porodu (+10)  $0,37 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ve všech sledovaných dnech před porodem byly průměrné hladiny inzulinu vyšší než  $0,80 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , naopak ve všech sledovaných dnech po porodu byly průměrné hladiny inzulinu nižší a to od  $0,37$  do  $0,74 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (Tab. 6, Graf 2). 25. den před porodem (-25) byly hladiny inzulinu statisticky významně vyšší než 3. až 70. den po porodu (+3, +10, +25, +40 a +70) (Tab. 6). V předporodním období (-25 a -7) byly hladiny inzulinu statisticky významně vyšší než v poporodním období (+3, +10 a +25) (Tab. 7). V průběhu tranzitního období hladiny inzulinu pozitivně korelovaly s hladinami glukózy ( $r_s = 0,21$ ;  $p < 0,05$ ) a negativně s hladinami NEMK ( $r_s = -0,27$ ;  $p < 0,05$ ) (Tab. 8).

### Neesterifikované mastné kyseliny (NEMK)

Nejvyšší průměrná hladina NEMK byla zjištěna 10 dnů po porodu (+10) a to  $1,19 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Nejnižší průměrné hladiny NEMK byly u dojnic 85 dnů po porodu (+85)  $0,28 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 100 dnů po porodu (+100)  $0,29 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Tab. 6, Graf 3). Tři dny po porodu (+3) byly hladiny NEMK statisticky významně vyšší než 40., 55., 70., 85., a 100. den po porodu. 10. den po porodu (+10) byly hladiny NEMK statisticky významně vyšší než 85. a 100. den po porodu (Tab 6). V předporodním období (-25 a -7) byly hladiny NEMK statisticky významně nižší než v období poporodním (+3, +10 a +25) (Tab. 7). V průběhu tranzitního období hladiny NEMK negativně korelovaly s hladinami inzulinu ( $r_s = -0,27$ ;  $p < 0,05$ ) (Tab. 8).



### **$\beta$ -hydroxybutyrát (BHB)**

Nejvyšší průměrná hladina BHB byla zjištěna 60 dnů před porodem (-60) a to  $1,16 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , nejnižší pak 85 dnů po porodu (+85)  $0,49 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Tab. 6, Graf 4). 60. den před porodem (-60) byly hladiny BHB statisticky významně vyšší než 7. den před porodem (-7) a 40., 55., 85. den po porodu (+40, +55, +85) (Tab. 6). V předporodním období (-25 a -7) byly hladiny BHB statisticky významně nižší než v období poporodním (+3, +10 a +25) (Tab. 7). Korelace mezi hladinami BHB a hladinami hormonů (leptin, inzulin) v průběhu tranzitního období nebyly statisticky významné (Tab. 8).

### **Glukóza**

Nejvyšší průměrná hladina glukózy byla zjištěna 40 dnů po porodu (+40) a to  $6,51 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , nejnižší pak 10 dnů po porodu (+10)  $5,36 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Tab. 6, Graf 5). Rozdíly mezi naměřenými hladinami glukózy ve sledovaných dnech v průběhu tranzitního období nebyly statisticky významné (Tab. 6). V předporodním období (-25 a -7) byly hladiny glukózy statisticky významně vyšší než v období poporodním (+3, +10 a +25) (Tab. 7). V průběhu tranzitního období hladiny glukózy pozitivně korelovaly s hladinami inzulinu ( $r_s = 0,21$ ;  $p < 0,05$ ) (Tab. 8).

**Tabulka 6.** Průměrné hladiny leptinu, inzulinu, neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK),  $\beta$ -hydroxybutyrátu (BHB) a glukózy v průběhu tranzitního období

Skupina zvířat (n = 15)	Leptin průměr $\pm$ SD (ng·ml <sup>-1</sup> )	Inzulin průměr $\pm$ SD ( $\mu$ g·l <sup>-1</sup> )	NEMK průměr $\pm$ SD (mmol·l <sup>-1</sup> )	BHB průměr $\pm$ SD (mmol·l <sup>-1</sup> )	Glukóza průměr $\pm$ SD (mmol·l <sup>-1</sup> )	
Tranzitní období (dny před a po porodu)	-60	1,28 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>	0,83 $\pm$ 0,43 <sup>a,b</sup>	0,50 $\pm$ 0,49 <sup>a, b, c</sup>	1,16 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	6,41 $\pm$ 1,52 <sup>a</sup>
	-25	0,62 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	1,28 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	0,35 $\pm$ 0,17 <sup>a, b, c</sup>	0,61 $\pm$ 0,26 <sup>a, b</sup>	6,45 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup>
	-7	0,83 $\pm$ 1,27 <sup>a</sup>	0,86 $\pm$ 0,54 <sup>a,b</sup>	0,52 $\pm$ 0,29 <sup>a, b, c</sup>	0,52 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	6,10 $\pm$ 1,31 <sup>a</sup>
	+3	0,42 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	0,40 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	1,14 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	0,71 $\pm$ 0,38 <sup>a, b</sup>	5,61 $\pm$ 1,34 <sup>a</sup>
	+10	0,44 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	0,37 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	1,19 $\pm$ 0,91 <sup>a, b</sup>	1,05 $\pm$ 0,94 <sup>a, b</sup>	5,36 $\pm$ 1,04 <sup>a</sup>
	+25	0,60 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	0,50 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	0,86 $\pm$ 0,71 <sup>a, b, c</sup>	0,74 $\pm$ 0,68 <sup>a, b</sup>	5,66 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup>
	+40	0,39 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	0,51 $\pm$ 0,68 <sup>b</sup>	0,34 $\pm$ 0,21 <sup>b, c</sup>	0,64 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>	6,51 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>
	+55	0,41 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	0,54 $\pm$ 0,32 <sup>a,b</sup>	0,38 $\pm$ 0,26 <sup>b, c</sup>	0,54 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>	6,34 $\pm$ 2,09 <sup>a</sup>
	+70	0,71 $\pm$ 0,97 <sup>a</sup>	0,50 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	0,34 $\pm$ 0,18 <sup>b, c</sup>	0,60 $\pm$ 0,31 <sup>a, b</sup>	6,15 $\pm$ 1,63 <sup>a</sup>
	+85	0,68 $\pm$ 1,02 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,65 <sup>a,b</sup>	0,28 $\pm$ 0,16 <sup>c</sup>	0,49 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	6,17 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup>
	+100	0,73 $\pm$ 1,12 <sup>a</sup>	0,62 $\pm$ 0,40 <sup>a,b</sup>	0,29 $\pm$ 0,12 <sup>c</sup>	0,61 $\pm$ 0,38 <sup>a, b</sup>	6,16 $\pm$ 1,75 <sup>a</sup>

Statisticky významně rozdílné průměry hodnot ( $p < 0,05$ ) se liší v indexu <sup>a, b, c</sup> (po sloupcích)  
SD = směrodatná odchylka

**Tabulka 7.** Porovnání hladin leptinu, inzulinu, neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK),  $\beta$ -hydroxybutyrátu (BHB) a glukózy v předporodním (-25) a poporodním (+25) období

	Leptin	Inzulin	NEMK	BHB	Glukóza
Období	předporodní <sup>a</sup>	předporodní <sup>a</sup>	předporodní <sup>b</sup>	předporodní <sup>b</sup>	předporodní <sup>a</sup>
	poporodní <sup>a</sup>	poporodní <sup>b</sup>	poporodní <sup>a</sup>	poporodní <sup>a</sup>	poporodní <sup>b</sup>

Statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi obdobími označeny rozdílnými indexy <sup>a, b</sup> (po sloupcích). <sup>a</sup> = vyšší; <sup>b</sup> = nižší

**Tabulka 8.** Korelační vztahy mezi hladinami hormonů a metabolitů v tranzitním období

	NEMK	BHB	Glukóza	Leptin
Leptin	-0,12	0,03	0,15	-
Inzulin	-0,27 <sup>a</sup>	-0,07	0,21 <sup>a</sup>	0,05

<sup>a</sup> Horním indexem jsou označeny statisticky významné korelace ( $p < 0,05$ )

## 6 Diskuse

Průměrné hladiny leptinu u dojnic v tranzitním období se pohybovaly v rozmezí 0,39–1,28 ng·ml<sup>-1</sup>, což koresponduje s hodnotami, které uvádí Kadokawa et al. (2000). V řadě dalších studií jsou uváděny hodnoty vyšší a to 2,9–5,8 ng·ml<sup>-1</sup> (Block et al., 2001), 5,9–9,2 ng·ml<sup>-1</sup> (Soliman et al., 2002), 3,3–5,0 ng·ml<sup>-1</sup> (Liefers et al., 2003), 3,0–9,0 ng·ml<sup>-1</sup> (Chilliard et al., 2005), 1,7–3,5 ng·ml<sup>-1</sup> (Accorsi et al., 2005) a 3,2–4,4 ng·ml<sup>-1</sup> (Konigsson et al., 2008). Možným vysvětlením těchto rozdílů může být použití odlišné metody analýzy vzorků. Pro stanovení hladin leptinu námi sledovaných dojnic byla použita enzymoimunoanalýza (ELISA), zatímco v ostatních studiích radioimunoanalýza (RIA). Haluzík (2002) však prokázal, že tyto metody jsou srovnatelné. Tyto diference mohly také být způsobeny rozdílnými podmínkami pokusu, především rozdíly ve výživě, dojivosti nebo plemeni a věku zvířat.

Porovnáním průměrných koncentrací leptinu ve sledovaných dnech předporodního a poporodního období byla patrna tendence k poklesu koncentrací leptinu po porodu, bez statisticky průkazného rozdílu. Podobné výsledky uvádí také Soliman et al. (2002) a Konigsson et al. (2008). Další autoři naměřili statisticky významně vyšší hladiny leptinu v období před porodem, než po porodu (Kadokawa et al., 2000; Block et al., 2001; Liefers et al., 2003; Accorsi et al., 2005). Porovnáním průměrných koncentrací leptinu 7 dnů před porodem (0,83 ng·ml<sup>-1</sup>) a 3 dny po porodu (0,42 ng·ml<sup>-1</sup>) je patrné, že hladiny leptinu poklesly až na 50 % hodnoty před porodem, ale i tento rozdíl byl statisticky nevýznamný. Jedním z možných důvodů statistické neprůkaznosti může být variabilita hodnot mezi jednotlivými dojnicemi. Přesto jsou tato zjištění ve shodě se závěry Block et al. (2001), který prokázal, že hladiny leptinu jsou u dojnic na začátku laktace přibližně o 50 % nižší než v období pozdní březosti. V naší práci nebyly zjištěny statisticky významné korelace mezi leptinem a inzulinem ani mezi leptinem a metabolity (NEMK, BHB, glukóza), tyto výsledky jsou v rozporu s dřívějšími pracemi Blocka et al. (2001) a Accorsiho et al. (2005). Block et al. (2001) prokázali významné pozitivní korelace mezi leptinem a inzulinem, leptinem a glukózou a negativní korelaci mezi leptinem a NEMK. Accorsi et al. (2005) prokázali pozitivní korelaci mezi leptinem a inzulinem a negativní korelaci mezi leptinem a NEMK.

Průměrné hladiny inzulinu námi sledovaných dojnic se pohybovaly v rozmezí, která jsou v souladu s řadou jiných autorů (Block et al., 2001; Leury et al., 2003; Accorsi et al.,

2005). Nejvyšší průměrné hladiny inzulínu byly zjištěny u dojnic 25 dní před porodem což je v souladu s hodnotami zjištěnými Block et al. (2001). Accorsi et al. (2005) poukazuje na fakt, že jím sledované dojnice měly maximální koncentrace inzulínu již 60 dní před porodem. Po porodu došlo ke statisticky významnému poklesu průměrných hladin inzulínu, až téměř 50 %, v porovnání s obdobím před porodem. Vyšší hladiny inzulínu před porodem než po porodu byly prokázány v několika studiích (Block et al., 2001; Leury et al., 2003; Accorsi et al., 2005; Illek a kol., 2010). Snížená hladina inzulínu po porodu je spojena s energetickým deficitem, který je typický pro dojnice na začátku laktace (Pechová, 2009; Illek a kol., 2010). Mezi hlavní stimulatory syntézy inzulínu u přežvýkavců patří kyselina propionová (Skřivánek, 2001), vlivem nižší dostupnosti kyseliny propionové a glukózy při nedostatečném příjmu krmiva po porodu klesá syntéza inzulínu (León et al., 2004). Haiyrlí (2006) uvádí, že jedním z hlavních faktorů které tlumí sekreci inzulínu je hladovění. Block et al. (2001) tvrdí, že hladiny inzulínu se po porodu vrací nad předporodní hodnoty během 8 týdnů. S tím nekorespondují naše výsledky, kdy hladiny inzulínu nedosahovaly předporodních hodnot ani 100. den po porodu. Podobné výsledky potvrdil také Accorsi et al. (2005). Příčiny přetrvávající snížené hladiny inzulínu i přes zlepšující se energetickou bilanci zůstávají nejasné. V průběhu sledovaného období hladiny inzulínu statisticky významně pozitivně korelovali s hladinami glukózy ( $r_s = 0,21$ ;  $p < 0,05$ ). Tato hodnota je v souladu se zjištěním Trenkle (1972) který tvrdí, že u přežvýkavců jsou korelace mezi hladinami inzulínu a glukózy nízké. Avšak krevní koncentrace glukóza má podstatný vliv na plazmatickou koncentraci inzulínu, protože intravenózní podání glukózy zvyšuje hladiny inzulínu u ovcí i skotu (Trenkle, 1972). Dále hladiny inzulínu negativně korelovali s hladinami NEMK ( $r_s = -0,27$ ;  $p < 0,05$ ).

Průkazem úrovně NEB je míra mobilizace tukové složky, která je vyjádřena hladinami NEMK a BHB. Masivní mobilizace NEMK z tukové tkáně je tedy typická pro tranzitní období u vysokoužitkových dojnic (Adewuyi et al., 2009), kdy lze, vzhledem k negativní energetické bilanci doprovázené lipomobilizací, tento stav předpokládat (Páleník a kol., 2011). Také u námi sledovaných dojnic na začátku laktace pokles hladin inzulínu byl doprovázen zvýšenými hladinami NEMK a mezi oběma parametry byla prokázána negativní korelace ( $r_s = -0,27$ ;  $p < 0,05$ ), podobné výsledky uvádí také van Kneysel et al. (2007). Vlivem snížené hladiny inzulínu je potlačena aktivita lipoproteinové lipázy a proto vzrůstá koncentrace NEMK v krvi (Hayirli, 2006). Nárůst hladin NEMK krátce po porodu naměřili také Block et al. (2001) a Konigsson et al., (2008). Accorsi et al. (2005) zaznamenali zvýšené

hladiny NEMK již několik dní před porodem. Nejvyšší průměrné hladiny NEMK měly námi sledované dojnice 3. a 10. den po porodu ( $1,11 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $1,19 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). To by poukazovalo na vyšší mobilizaci tukových rezerv, protože Drackley (2000) uvádí, že hladiny NEMK přesahující  $0,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  svědčí právě o závažnější NEB a zvýšené lipomobilizaci. Zvýšené hladiny NEMK po porodu, u námi sledovaných dojnic, by mohli svědčit o nevhodném krmném režimu dojnic v období stání na sucho, protože překrmované dojnice ukládají větší množství tuku, který po otelení mobilizují (Pechová, 2009).

Průměrné hladiny BHB se v našem pokusu pohybovali v rozmezí  $0,49\text{--}1,16 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Horní hranice referenčního rozmezí BHB u skotu je  $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Pechová a kol., 2009; Doubek a kol., 2007). Podle Whitakera (2004) by horní hranice BHB u dojnic v období stání na sucho neměla přesáhnout  $0,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . My jsme však na začátku období stání na sucho (60. den před porodem) naměřili nejvyšší průměrnou hodnotu BHB za celé sledované období ( $1,16 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Vysvětlením takto netypicky vysoké hodnoty by mohl být doznívající vliv laktace, kdy dojnice dostatečně nepokrývají energetickou potřebu z přijatého krmiva a jsou nuceny ji hradit mobilizací tuku, který je v játrech přeměňován na ketolátky. Avšak negativní energetická bilance na konci laktace nebývá běžná. Dalším množným vysvětlením je zkrmování siláží s vyšším obsahem kyseliny máselné (ketogenní mastná kyselina) nebo krmných dávek s vysokým obsahem tuku (Wylie et al., 2008; Doubek a kol., 2007). Vyšší průměrné hodnoty BHB jsme dále naměřili 10. den po porodu, a to  $1,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tato hodnota jen mírně překračuje hodnotu  $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , která naznačuje akceptovatelný rozsah tukové mobilizace na pokrytí NEB (Whitaker, 2004). Někteří autoři uvádějí ještě vyšší hranici mezi zdravými a nemocnými zvířaty a to  $1,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Enjalbert et al., 2001; LeBlanc 2010). Vyšší průměrná hodnota BHB 10. den po porodu je také v souladu se zvyšováním hladin NEMK od 3. dne po porodu, které jako prekurzor BHB předchází jejich zvýšení (Mayes, 1998). V ostatních sledovaných dnech (-25, -7, +3, +25, +40, +55, +70, +85, +100) průměrné hladiny BHB nepřekračovaly referenční rozmezí (Pechová a kol., 2009; Doubek a kol., 2007).

Námi naměřené průměrné hladiny glukózy se pohybovali v rozmezí  $5,36\text{--}6,51 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Takto vysoké hladiny glukózy jsou pro přežvýkavce velmi netypické a přesahují všechna referenční rozmezí glukózy v krvi skotu udávaná různými autory:  $2,5\text{--}4,16 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Kováč a Podmanický, 2001),  $1,8\text{--}3,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Tluchoř, 2003),  $2,5\text{--}4,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Doubek a kol., 2007),  $3,0\text{--}4,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Pechová a kol., 2009). Možným vysvětlením těchto hodnot může být stres zvířat v okamžiku odběru vzorku krve. Podle

Whitakera (2004) mohou hodnoty glukózy v krvi odběrem stresovaných zvířat prudce stoupnout i nad  $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . To by odpovídalo námi naměřeným hodnotám, které přesahovaly  $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ve všech sledovaných obdobích. Dalším možným vysvětlením je zvyšování hladin glukózy po nakrmení tj. postrandiálně (Doubek a kol., 2007). Hladiny glukózy u námi sledovaných dojnic byly vyšší v předporodním období než v období poporodním. Podobné výsledky zjistili také Block et al. (2001) a Stengärde (2010). Snížená hladina glukózy po porodu je typickým znakem NEB v tomto období (Páleník a kol., 2011).

## 7 Závěr

Sledování provedená u vysokoužitkových dojnic v průběhu tranzitního období prokázala, že:

- průměrné hladiny leptinu byly vyšší v období před porodem a po porodu klesaly, avšak rozdíly byly statisticky nevýznamné,
- průměrné hladiny inzulinu byly statisticky významně vyšší v období před porodem než po porodu, průměrné hladiny inzulinu po porodu nedosahovaly předporodních hodnot až do konce sledování (100. den po porodu),
- průměrné hladiny NEMK byly významně vyšší v období po porodu než v období před porodem, nejvyšší hodnoty byly naměřeny 3. a 10. den po porodu,
- průměrné hladiny BHB byly nevyšší 60. den před porodem, s blížícím se porodem klesaly, poté dosahovaly vyšších hodnot 10. den po porodu, v předporodním období byly průměrné hladiny BHB významně nižší než v období poporodním,
- průměrné hladiny glukózy v poporodním období byly statisticky významně nižší než v období předporodním,
- ve sledovaném období se nepotvrdil vztah leptinu k energetickému stavu organismu, hladiny leptinu nekorelovaly s inzulinem ani s metabolity (NEMK, BHB, glukóza),
- ve sledovaném období se potvrdil vztah inzulinu k energetickému stavu organismu, hladiny inzulinu pozitivně korelovaly s hladinami glukózy a negativně s hladinami NEMK.

Celkově výsledky práce naznačují, že u dojnic v průběhu tranzitního období má inzulin těsnější vztah k energetickému a tukovému metabolismu než leptin. Očekávaný vztah byl tedy do určité míry prokázán pouze u inzulinu.

## 8 Seznam literatury

- Accorsi, P. A., Govoni, N., Gaiani, R., Pezzi, C., Seren, E., Tamanini, C. 2005.** Leptin, GH, PRL, insulin and metabolic parameters throughout the dry period and lactation in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 40 (3): 217–223.
- Adewuyi, A. A., Gruys, E., van Eerdenburg, F. J. C. M. 2005.** Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Veterinary Quarterly*, 27 (3): 117–126.
- Agarwal, R., Rout, P. K., Singh, S. K. 2009.** Leptin: A biomolecule for enhancing livestock produktivity. *Indian Journal of Biotechnology*, 8 (2): 169–176.
- Bauman, D. E., Currie, W. B. 1980.** Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A Review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, 63 (9): 1514–1529.
- Bell, A. W. 1995.** Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, 73 (9): 2804–2819.
- Bell, A. W., Bauman, D. E. 1997.** Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2 (3): 265–278.
- Bertics, S. J., Grummer, R. R., Cadornigavalino, C., Stoddard E. E. 1992.** Effect of prepartum dry-matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. *Journal of Dairy Science*, 75 (7): 1914–1922.
- Blache, D., Tellam, R. L., Chagas, L. M., Blackberry, M. A., Vercoe, P. E., Martin, G. B. 2000.** Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *Journal of Endocrinology*, 165 (3): 625–637.
- Block, S. S., Butler, W. R., Ehrhardt, R. A., Bell, A. W., Van Amburgh, M. E., Boisclair, Y. R. 2001.** Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *Journal of Endocrinology*, 171 (2): 339–348.
- Čech, S., Doležel, R. 2006.** Energetický metabolismus a plodnost u dojnic. *Veterinářství*, 56 (11): 700–703.
- Delavaud, C., Bocquier, F., Chilliard, Y., Keisler, D. H., Gertler, A., Kann, G. 2000.** Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *Journal of Endocrinology*, 165 (2): 519–526.



**Doubek, J., Šlosárková, S., Řeháková, K., Scheer, P., Beránková, J. 2007.** Interpretace základních biochemických a hematologických nálezů u zvířat. Noviko a. s. Brno. 78 s. ISBN: 8086542165.

**Drackley, J. K. 1999.** Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *Journal of Dairy Science*, 82 (11): 2259–2273.

**Enjalbert, F., Nicot, M. C., Baourthe, C., Moncoulon, R. 2001.** Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science*, 84 (3): 583–589.

**Falkenberg, U., Haertel, J., Rotter, K., Iwersen, M., Arndt, G., Heuwieser, W. 2008.** Relationships between the concentration of insulin-like growth factor-1 in serum in dairy cows in early lactation and reproductive performance and milk yield. *Journal of Dairy Science*, 91 (10): 3862–3868.

**Gorrieri, F., Persona, P. G. 2011.** Použití přípravku Hepagen u dojnic v přechodném období: praktické zkušenosti. *Veterinářství*, 61 (5): 287–288.

**Haluzík, M. 2002.** Poruchy výživy a leptin. 1. vydání. Grada Publishing, spol. s r. o. Praha. 188 s. ISBN: 8071699721.

**Hayirli, A. 2006.** The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Veterinary Research Communications*, 30 (7): 749–774.

**Hill, R. A., Margetic, S., Pegg, G. G., Gazzola, C. 1998.** Leptin: its pharmacokinetics and tissue distribution. *International Journal of Obesity*, 22 (8): 765–770.

**Chehab, F. F., Mounzih, K., Lu, R. H., Lim, M. E. 1997.** Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science*, 275 (5296): 88–90.

**Chilliard, Y., Delavaud, C., Bonnet, M. 2005.** Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domestic Animal Endocrinology*, 29 (1): 3–22.

**Illek, J., Kudrna, V. 2010.** Výživa dojnic s vysokou užitkovostí a její nedostatky. *Krmivářství*, 14 (2): 28–29.

**Illek, J., Kumprechtová, D., Kudrna, V. 2010.** Výživa a poruchy metabolismu dojnic, a jejich kondice v peripartálním období. *Krmivářství*, 14 (5): 8–12.

- Ingvartsen, K. L. 2006.** Feeding- and management - related diseases in the transition cow. Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding - related diseases. *Animal Feed Science and Technology*, 126 (3-4): 175–213.
- Kadokawa, H., Blache, D., Yamada, Y., Martin, G. B. 2000.** Relationships between changes in plasma concentrations of leptin before and after parturition and the timing of first post-partum ovulation in high-producing Holstein dairy cows. *Reproduction Fertility and Development*, 12 (7-8): 405–411.
- Klein, S., Coppack, S. W., MohamedAli, V., Landt, M. 1996.** Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes*, 45 (7): 984–987.
- Konigsson, K., Savoini, G., Govoni, N., Invernizzi, G., Prandi, A., Kindahl, H., Veronesi, M. C. 2008.** Energy balance, leptin, NEFA and IGF-I plasma concentrations and resumption of post partum ovarian activity in Swedish red and white breed cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50 (3): DOI: 10.1186/1751-0147-50-3.
- Kováč, G., Podmanický, D. 2001.** Diagnostika chorôb a kontrola zdravia v chovech zvierat. In: Kováč, G. (ed.). *Choroby hovädzieho dobytku*. M & M vydavateľstvo. Prešov. s. 745-755. ISBN: 8088950147.
- Kováč, G., Tóthová, C., Nagy, O., Seidel, H. 2011.** Proteíny akútnej fázy a energetický metabolizmus u dojnic po pôrode. *Veterinárství*, 61 (5): 268–273.
- LeBlanc, S. 2010.** Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development*, 56 (S): S29–S35.
- Leon, H. V., Hernandez-Ceron, J., Keisler, D. H., Gutierrez, C. G. 2004.** Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in relation to changes in body condition score in heifers. *Journal of Animal Science*, 82 (2): 445–451.
- Leury, B. J., Baumgard, L. H., Block, S. S., Segole, N., Ehrhardt, R. A., Rhoads, R. P., Bauman, D. E., Bell, A. W., Boisclair, Y. R. 2003.** Effect of insulin and growth hormone on plasma leptin in periparturient dairy cows. *American Journal of Physiology-regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 285 (5): R1107–R1115.
- Liefers, S. C. 2004.** Physiology and genetics of leptin in periparturient dairy cows. Wageningen University. Wageningen. p. 135. ISBN: 9058089983.
- Liefers, S. C., Veerkamp, R. F., Pas, M. F. W. T., Delavaud, C., Chilliard, Y., van der Lende, T. 2003.** Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight, and estrus in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86 (3): 799–807.

- Marie, M., Findlay, P. A., Thomas, L., Adam, C. L. 2001.** Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake. *Journal of Endocrinology*, 170 (1): 277–286.
- Martin, C. A., Crump, M. H. 2003.** The Endocrine Pancreas. In: Pineda, M. H., Dooley, M. P. (eds.). *McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 5th edition. Blackwell Publishing Company. Iowa. p. 141-164. ISBN: 0813811066.
- Mayes, P. A. 1998.** Bioenergetika a metabolismus sacharidů a lipidů. In: Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. (eds.). *Harperova biochemie*. 2. vydání. Nakladatelství a vydavatelství H&H. Jinočany. s. 111-299. ISBN: 8085787385.
- Nordlund, K. 2010.** Managing the dairy cow in transition: monitoring programs of the herd Multiplex SIVAR. *Large Animal Review*, 16 (4): 196–199.
- Overton, T. R., Waldron, M. R. 2004.** Nutritional Management of Transition Dairy Cows: Strategies to Optimize Metabolic Health. *Journal of Dairy Science*, 87 (ES): E105–E119.
- Páleník, T., Čech, S., Zajíc, J., Doležel, R. 2011.** Biochemické a hematologické ukazatele krve ve vztahu k zánětům dělohy u krav. *Veterinářství*, 61 (9): 509–513.
- Pechová, A. 2009.** Poruchy energetického metabolismu. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a. s. Brno. s. 668-673. ISBN: 9788086542195.
- Pechová, A., Dvořák, R., Pavlata, L. 2003.** Diagnostika a výskyt hepatopatií u dojnic. In: Dvořák, R. (ed.). *Zdravotní problematika přežvýkavců - produkční a metabolické choroby skotu*. Sborník referátů z odborného semináře. *Klinika chorob přežvýkavců FVL VFU; Česká buiatrická společnost*. Brno. s.52–59.
- Pechová, A., Hofírek, B., Pavlata, L., Dvořák, R. 2009.** Metabolické profilové testy. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a. s. Brno. s. 1039-1048. ISBN: 9788086542195.
- Reynolds, C. K., Aikman, P. C., Lupoli, B., Humphries, D. J., Beaver, D. E. 2003.** Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *Journal of Dairy Science*, 86 (4): 1201–1217.
- Skřivánek, M. 2001.** Vliv hormonů na energetický a dusíkový metabolismus dojnic. *Farmář*, 7 (1): 75–76.
- Skřivánek, M. 2010.** Biochemická kontrola porodního období dojnic. *Náš chov*, 70 (10): 46–48.

- Slavík, P., Švecová, Š., Illek, J., Rajmon, R. 2010.** Negativní energetická bilance krav po porodu - využijeme nové parametry? *Náš chov*, 70 (9): 63–64.
- Soliman, M., Ishioka, K., Yoshida, R., Komabayashi, K., Hatai, H., Matsui, Y., Hirai, T., Katagiri, S., Takahashi, Y., Kawakita, Y., Abe, H., Kitamura, H., Kimura, K., Saito, M. 2002.** Serum leptin levels during the periparturient period in cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64 (11): 1053–1056.
- Stengärde, L. 2010.** Displaced Abomasum and Ketosis in Dairy Cows - Blood Profiles and Risk Factors. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 76 p. ISBN: 9789157674692.
- Suchý, P., Straková, E., Herzig, I. 2009.** Základy výživy skotu. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a. s. Brno. s. 75-96. ISBN: 9788086542195.
- Suriyasathaporn, W., Heuer, C., Noordhuizen-Stassen, E. N., Schukken, Y. H. 2000.** Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Veterinary Research*, 31 (4): 397–412.
- Tlučhoř, V. 2003.** Hodnocení biochemických výsledků ve veterinární medicíně z pohledu jedince a stáda prostřednictvím výpočetní techniky. In: Dvořák, R. (ed.). *Zdravotní problematika přežvýkavců - produkční a metabolické choroby skotu*. Sborník referátů z odborného semináře. *Klinika chorob přežvýkavců FVL VFU; Česká buiatrická společnost*. Brno. s. 68–76.
- Trenkle, A. 1972.** Radioimmunoassay of plasma hormones: Review of plasma insulin in ruminants. *Journal of Dairy Science*, 55 (8): 1200–1211.
- van Knegsel, A. T. M., van den Brand, H., Dijkstra, J., Kemp, B. 2007.** Effects of dietary energy source on energy balance, metabolites and reproduction variables in dairy cows in early lactation. *Theriogenology*, 68 (S1): S274–S280.
- Vernon, R. G., Houseknecht, K. L. 2000.** Adipose Tissue: Beyond an Energy Reserve. In: Cronjé, P. B. (ed.). *Ruminant physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction*. CABI Publishing. Wallingford. p. 171-186. ISBN: 0851994636.
- Watters, R. D., Guenther, J. N., Brickner, A. E., Rastani, R. R., Crump, P. M., Clark, P. W., Grummer, R. R. 2008.** Effects of dry period length on milk production and health of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 91 (7): 2595–2603.
- Whitaker, D. A. 2004.** Metabolic Profiles. In: Andrews, A. H., Blowey, R. W., Boyd, H., Eddy, R. G (eds.). *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle*. 2nd edition. Blackwell Publishing Company. Iowa. p. 804-817. ISBN: 0632055960.

**Wylie, A. R. G., Woods, S., Carson, A. F., McCoy, M. 2008.** Periprandial changes in metabolite and metabolic hormone concentrations in high-genetic-merit dairy heifers and their relationship to energy balance in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 91 (2): 577–586.

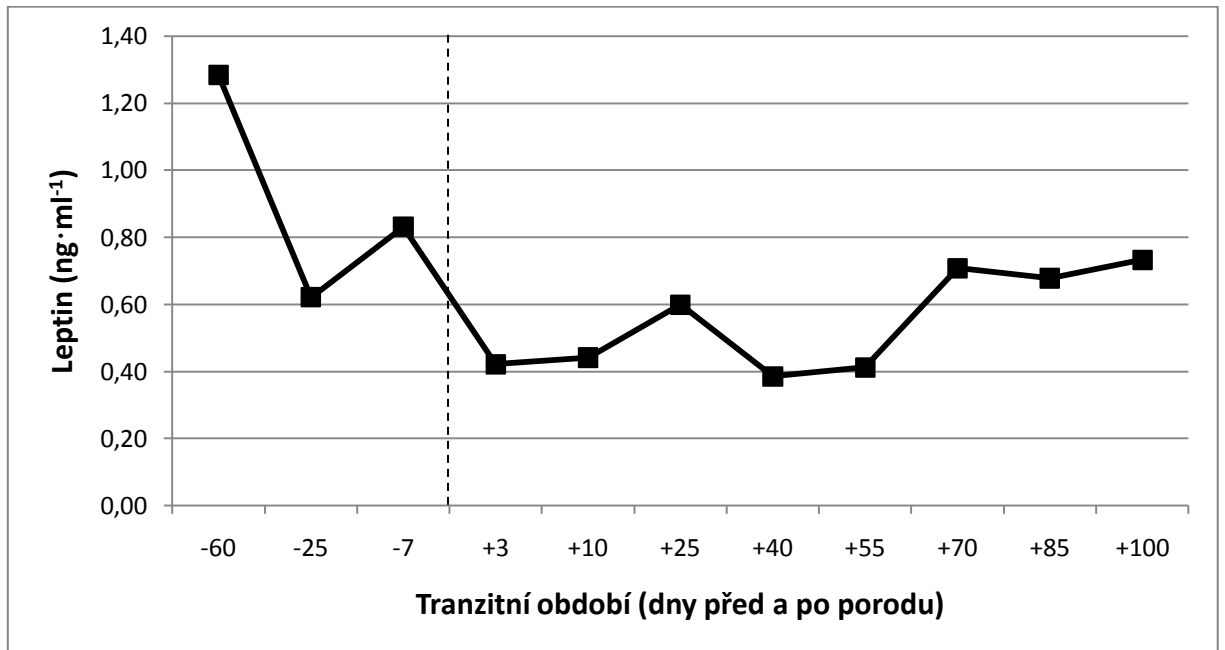
**Young, J. W. 1977.** Gluconeogenesis in cattle - Significance and methodology. *Journal of Dairy Science*, 60 (1): 1–15.

## **Elektronické zdroje**

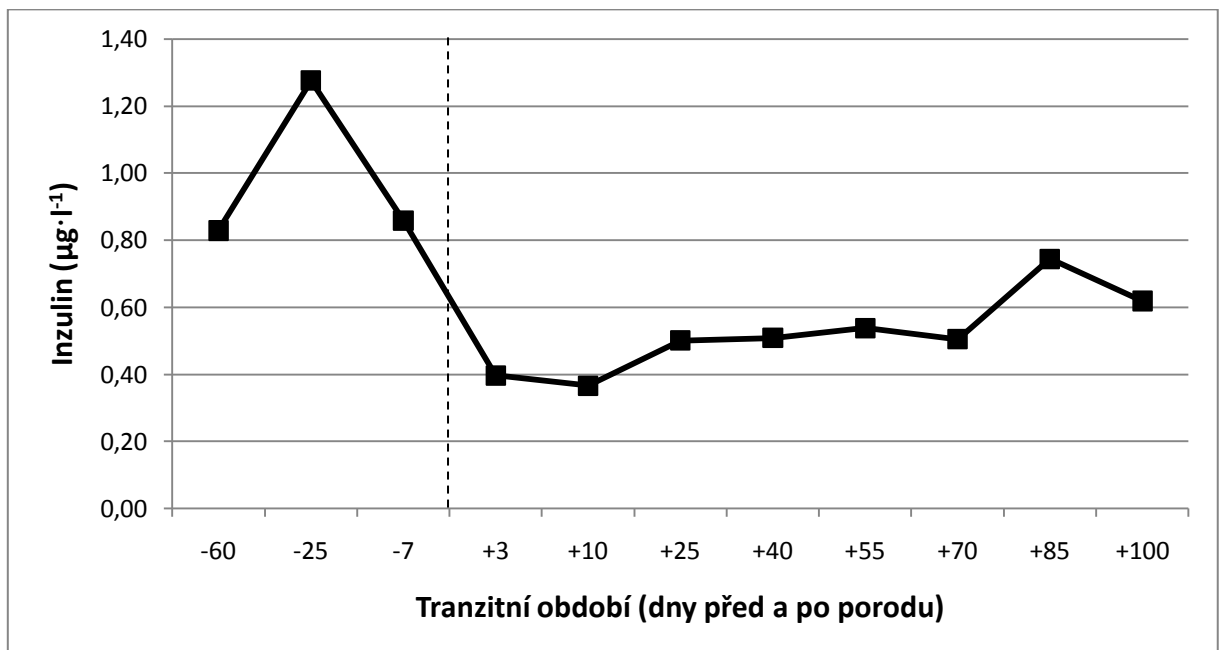
**Drackley, J. K.** Use of NEFA as a Tool to Monitor Energy Balance in Transition Dairy Cows [online]. University of Illinois Extension. 12. 4. 2000 [cit. 2011-12-25]. Dostupné z <http://www.livestocktrail.illinois.edu/dairynet/paperDisplay.cfm?ContentID=330>.

## 9 Přílohy

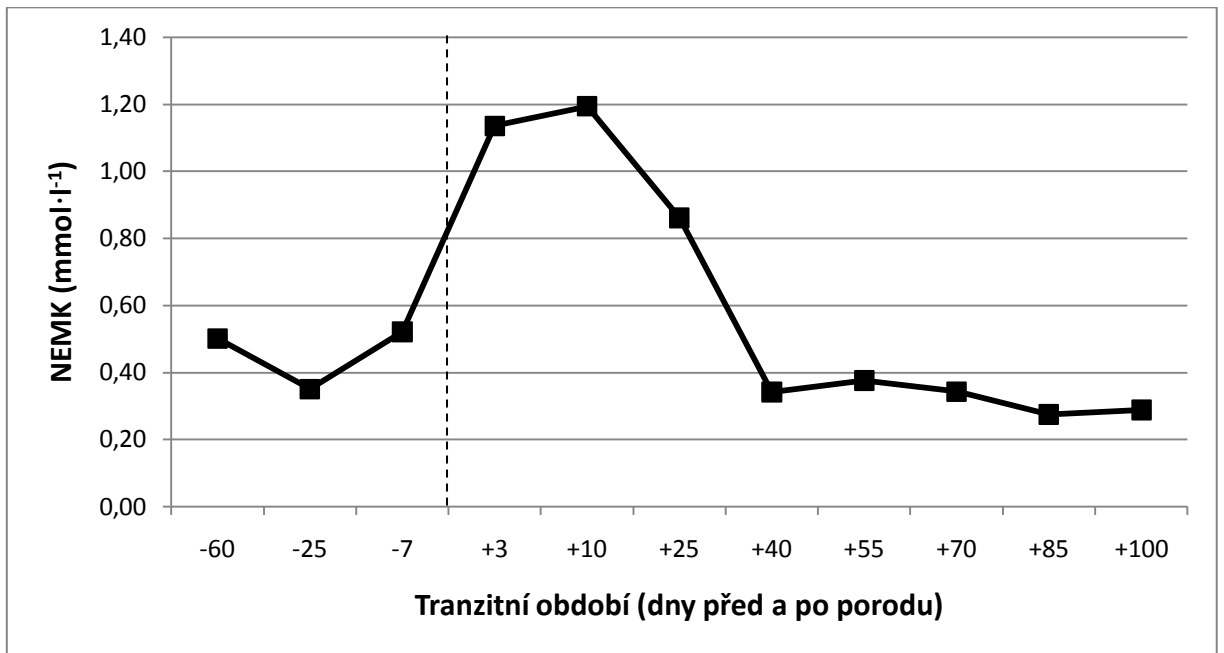
**Graf 1.** Průměrné hladiny leptinu v tranzitním období



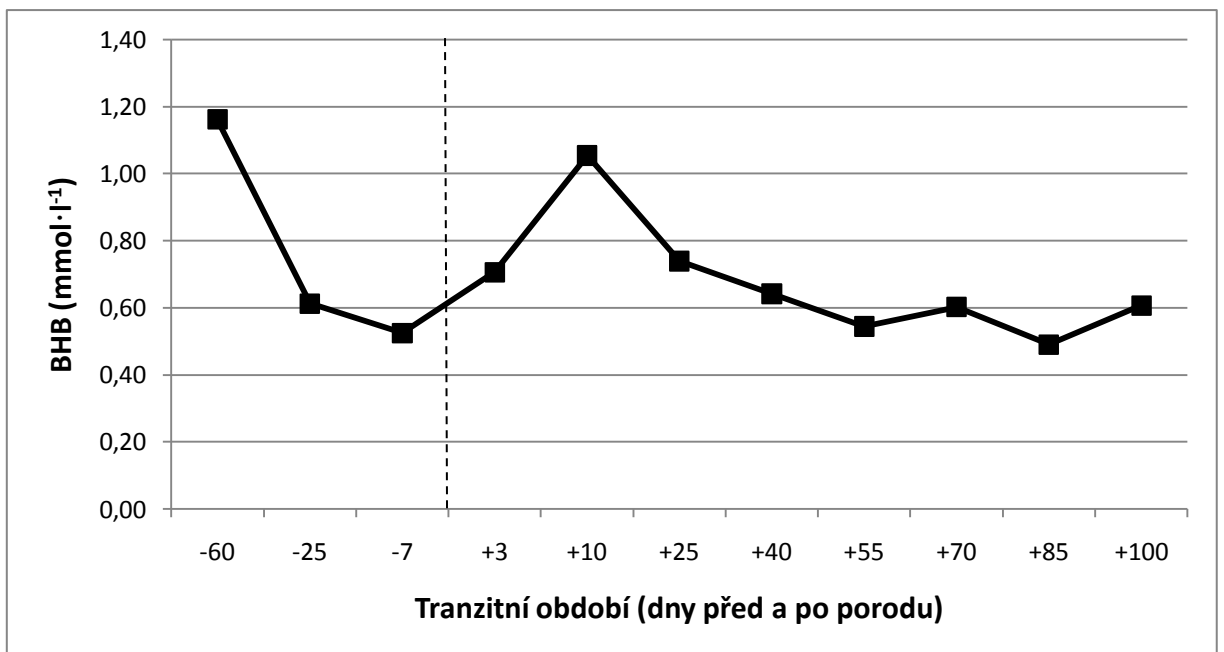
**Graf 2.** Průměrné hladiny inzulínu v tranzitním období



**Graf 3.** Průměrné hladiny neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) v tranzitním období

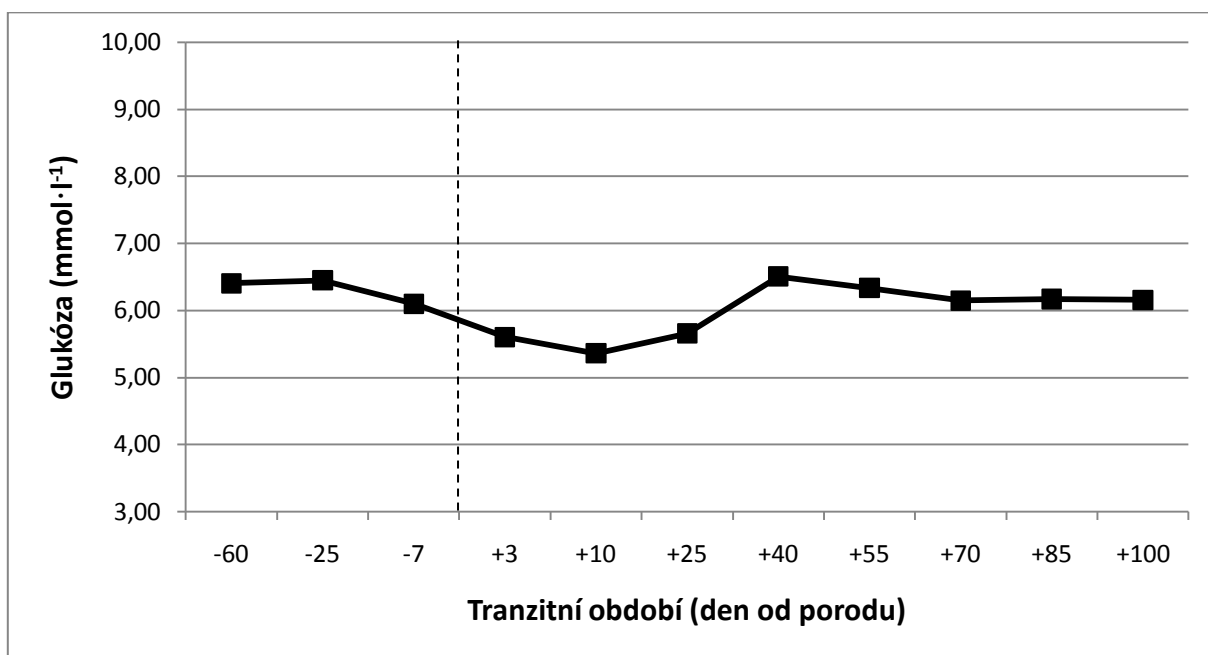


**Graf 4.** Průměrné hladiny  $\beta$ -hydroxybutyrátu (BHB) v tranzitním období





**Graf 5.** Průměrné hladiny glukózy v tranzitním období



## Seznam příloh

1. **Graf 1.** Průměrné hladiny leptinu v tranzitním období
2. **Graf 2.** Průměrné hladiny inzulínu v tranzitním období
3. **Graf 3.** Průměrné hladiny neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) v tranzitním období
4. **Graf 4.** Průměrné hladiny  $\beta$ -hydroxybutyrátu (BHB) v tranzitním období
5. **Graf 5.** Průměrné hladiny glukózy v tranzitním období