

ד"ח מדעי סופי לתוכנית מספר 16-0499-362

2.1 הקטנת תדירות החליבה בחודש הראשון לתחלובה כאמצעי לשיפור מאזן האנרגיה והשפעתו על

תנובת החלב מטבוליזם וביצועי הפוריות

**Decreasing the milking frequency during the first month of lactation as a means to
improve energy balance, metabolic status and fertility performance**

מגיש:

ד"ר עוזי מועלם – רבייה והזנה של בקר, המחלקה לבקר וצאן, מכון לבע"ח, מינהל המחקר החקלאי

בית דגן - uzim@volcani.agri.gov.il

הקטנת תדירות החליבה בחודש הראשון לתחלובה כאמצעי לשיפור מאזן האנרגיה והשפעתו על

תנובת החלב מטבוליזם וביצועי הפוריות

תקציר

בניתוח הגורמים לירידה להתעברות בעולם, ולאור העובדה כי שיעור ההתעברות של עגלות נותר יציב באופן יחסי, נראה כי הגורם העיקרי לירידה בשיעורי ההתעברות הוא מאזן האנרגיה השלילי ההולך ומחריף. הקשר בין מאזן האנרגיה לפוריות נחקר רבות בעבר. במספר עבודות נמצא כי אצל פרות עתירות תנובה יש עיכוב בהופעת ביוץ ראשון לאחר ההמלטה ושינויים בריכוזי ופרופיל הורמוני המין. בעבודת מחקר שנעשתה בארץ ובה השרינו מאזן אנרגיה שלילי באופן מבוקר נמצא עיכוב בשיעור הופעת הייחום ההתנהגותי אצל פרות במאזן אנרגיה שלילי חריף, ונמצאו הבדלים משמעותיים באיכותו וכושרו הסטרואיידוגני של הזקיק הפרהאובולטורי עם ההחרפה במאזן האנרגיה. ממצאים אלה ואחרים מבססים את השפעתו השלילית של מאזן האנרגיה השלילי על ביצועי הפוריות של הפרות. נעשו מספר ניסויים תזונתיים לשיפור מאזן האנרגיה של הפרות לאחר ההמלטה, והתוצאות היו חלקיות. בעבודה שנעשתה במדיסון ויסקונסין בשנת 2005, הקטנת משך תקופת היובש עד כדי ביטולה הביאה לירידה בתנובת החלב בראשית התחלובה, שיפור משמעותי במאזן האנרגיה, וכן שיפור בכל המדדים המטבוליים ומדדי הפוריות. בעבודת מחקר הנוכחית הצענו להוריד את תדירות החליבה בחודש הראשון לפעמיים ביום על מנת לשפר את מאזן האנרגיה. בצענו ניסוי רחב היקף ברפת ההזנה הפרטנית של מכון וולקני, ובו 42 פרות מתחלובה שנייה ואילך חולקו ל-2 קבוצות: קבוצת הביקורת נחלבה 3 פעמים ביום, וקבוצת הטיפול שנייה נחלבה פעמיים ביום (בהפרש של 12 שעות) עד 30 יום לאחר המלטה ולאחר מכן 3 פעמים ביום עד תום הניסוי. נערך מעקב אחר צריכת מזון ומאזן האנרגיה, מטבוליטים בדם, אירועים קליניים והפעילות השחלתית. כמו כן בצענו ביופסיות מרקמת הכבד מ-5 פרות מכל טיפול, ושארנו זקיקים פרהאובולטוריים מ-8 פרות מכל טיפול. הניסוי ברפת הפרטנית נמשך כ-7 חודשים. ניתוח הנתונים התבצע ל-30 יום ראשונים בנפרד (תקופת הטיפול), ומ-31 ועד 100 לבחון השפעות ארוכות טווח. תנובות החלב היו גבוהות יותר ב-3 חליבות במהלך החודש הראשון ב-3.8 ק"ג ליום (9.4%), ואילו אחוז השומן היה גבוה יותר ב-2 חליבות. תנובת ה-FCM (4%) הייתה זהה בין הקבוצות עד 30 יום, ואף גבוהה יותר ב-2 חליבות מ-31 עד 100 יום. צריכת המזון הייתה זהה בין 2 הקבוצות לאורך כל תקופת הניסוי. מאזן האנרגיה בחודש הראשון היה גבוה יותר בקבוצת ה-2 חליבות ואילו מ-30 עד 100 יום 2 הקבוצות היו במאזן אנרגיה חיובי, אך הוא היה גבוה יותר בקבוצת ה-3 חליבות. ריכוזי הגלוקוז בפלסמה עד 30 יום היו גבוהים יותר בקבוצת ה-2 חליבות, ואילו ריכוזי ה-BHBA היו נמוכים יותר בקבוצה זו, מה שמעיד על סטטוס מטבולי טוב יותר לפרות ה-2 חליבות. בניתוח נתוני הייצור עד 100 יום בתחלובה, נמצא כי לא היו הבדלים מובהקים בתנובת החלב, FCM וחמ"מ בין 2 הקבוצות, אחוז השומן היה גבוה יותר בקבוצת ה-2 חליבות, אחוז החלבון היה זהה, ואילו אחוז הלוקטוז היה גבוה יותר בקבוצת ה-3 חליבות. כמו כן, היעילות הייתה גבוהה יותר לייצור FCM בקבוצת ה-2 חליבות. לא נמצא הבדל בדינמיקה של

התפתחות הזקיקים בשחלה בין הקבוצות, וכמו כן לא נמצא הבדל באיכותם של הזקיקים הפרואובולטוריים שנשאבו בין 60 ל-80 יום לאחר ההמלטה. הפרות שנחלבו פעמיים ביום הקדימו לבייק, וניתוח נתוני הפוריות (בגלל גודל המדגם - ללא מבחן סטטיסטי) מראים אפקט חיובי ל-2 חליבות. בסמני עקה שנבחנו, קורטיזול ו-MDA נמצאו ריכוזים נמוכים יותר בפרות ה-2ML לעומת 3ML, שנמצא במתאם עם הבדלים בין הטיפולים באחד המסלולים שנמצא בפרוטיאומיקה של הכבד, NRF2-mediated Oxidative Stress Response.

לסיכום, 2 חליבות ביממה במהלך החודש הראשון לתחלובה שיפר את הסטטוס המטבולי ומערכת הרבייה של הפרות. כמו כן, ההבדלים בתנובות החלב היו מינוריים, ולא נמצא אפקט שלילי ל-2 חליבות בחודש הראשון על התנובות בהמשך התחלובה.

תיאור הבעיה

שיטות קלאסיות לטפוח גנטי של בע"ח ושיטות ממשק מודרניות הביאו את ענף הבקר לחלב להישגים רבים, ואכן בשלושת העשורים האחרונים תנובת החלב עלתה באופן משמעותי. במקביל לכך, נצפתה ירידה מתמשכת בשיעורי ההתעברות של פרות חלב גבוהות תנובה. לפי נתוני ספר העדר, שיעורי ההתעברות מהזרעה ראשונה של פרות בוגרות בישראל ירד משנת 2000 עד שנת 2014 בכ- 5-6%. מגמה דומה של ירידה מתמשכת בשיעורי ההתעברות נמצאה גם בארה"ב (Butler and Smith, 2003; Rajala-Schultz and Frazer, 2005) ובהולנד (Van Knegsel et al., 2005). הירידה הדרסטית התרחשה משנות החמישים עד שנות השבעים של המאה הקודמת, ולאחר מכן הירידה נמשכה אך קצב הירידה התמתן. ההידרדרות הנמשכת בפוריות פוגעת ברווחיות הענף באופן קשה עקב הגדלת המרווח בין ההמלטות, ריבוי ההזרעות, הפחתת מספר הוולדות ותחלופת פרות גדולה יותר.

למאזן האנרגיה השלילי של פרת החלב גבוהת התנובה השפעות שליליות רבות (Butler and Smith, 1989; Westwood et al., 2002). מאזן אנרגיה שלילי (NEB) מגביר את תדירות הפרעות המטבוליות לאחר ההמלטה, פוגע בהתאוששות הפרות ממחלות המלטה ובהמשך גם בביצועי הפוריות. עבודות רבות מעידות על קשר בין העלייה בתנובות החלב לבין הירידה בשיעורי ההתעברות, ומייחסים זאת להחרפה ב-NEB.

בניתוח הגורמים לירידה להתעברות בעולם, ולאור העובדה כי שיעור ההתעברות של עגלות נותר יציב באופן יחסי, נראה כי הגורם העיקרי לירידה בשיעור ההתעברות אצל פרות חלב הוא NEB ההולך ומחריף ככל שעולות תנובות החלב (Butler and Smith, 1989; Pryce et al., 1999). הקשר בין מאזן האנרגיה לפוריות נחקר רבות בעבר. אצל פרות עתירות תנובה נמצא עיכוב בהופעת ביוץ ראשון לאחר ההמלטה, וזה יכול להשפיע לרעה על סיכויי התעברות (Stevenson and call, 1983). כמו כן נמצא קשר בין מועד השפל ב-NEB לבין מועד הופעת ביוץ ראשון, ואצל פרות רבות מתרחש הביוץ הראשון רק לאחר מועד זה. במקרים רבים פירוק מסיבי של רקמות שומן לאחר ההמלטה יגרום

להתפתחות כבד שומני, ולזה נמצא קשר לתדירות גבוהה יותר של תחלואה של מערכת הרבייה ועיכוב בהופעת ביוץ ראשון (Reid et al., 1979).

בעבודות אחרות נמצא קשר ישיר בין השינויים במשקל גוף לאחר ההמלטה, לריכוזי ופרופיל הורמוני המין (Butler et al., 1981). כמו כן בעבודה נוספת נמצא קשר בין ריכוזי הפרוגסטרון בפלסמה במחזור לאחר הזרעה, והשינויים במשקל גוף בתקופה שקדמה להזרעה זו. בעבודת מחקר שנעשתה בארץ ובה השרינו NEB באופן מבוקר, לא נמצאה השפעה ל- NEB על מועד חידוש המחזוריות המינית לאחר ההמלטה, ונראה כי הציר היפותלמוס – היפופיזה – שחלה המעורב בחידוש המחזוריות המינית חוזר לתפקוד נורמאלי לאחר ההמלטה, גם בתנאים של עומס מטבולי מוגבר (Moallem et al., 1999). למרות זאת, נמצא עיכוב בשיעור הופעת הייחום ההתנהגותי אצל פרות ב- NEB חריף. עבודה נוספת של הראתה ירידה במשך ובאינטנסיביות של הייחום עם העלייה בתנובות חלב (Lopez et al., 2004). כמו כן לא נמצאו הבדלים משמעותיים בריכוזי הורמוני המין בפלסמה במחזור הייחום בין פרות במאזני אנרגיה שונים. בעבודה זו נמצאו הבדלים משמעותיים באיכותו וכושרו הסטרואידוגני של הזיקי הפרהאובולטורי אצל פרות במאזני אנרגיה שונים, ובמועדים שונים לאחר ההמלטה (Moallem et al., 1997, 1999, 2000). אצל פרות ב- NEB נמצא עיכוב משמעותי בשיעור הופעתם של זקיקים פעילי אסטרדיול לאחר ההמלטה. כמו כן, נמצאה פגיעה בכושר הסטרואידוגני של זקיקים פרהאובולטוריים אצל פרות שהיו במאזן אנרגיה שלילי יותר. ממצא נוסף מעניין מעבודת מחקר זו, הוא הגדלת שיעור הופעתם של זקיקים פרהאובולטוריים פעילי אסטרדיול עם ההתרחקות ממועד ההמלטה. כמו כן ריכוז הסטרואידים עלה באופן משמעותי עם ההתרחקות מן ההמלטה, דבר המעיד על כושר סטרואידוגני משופר של זקיקים פרהאובולטוריים המתפתחים בתנאים של מאזן אנרגיה חיובי. ממצאים אלה ואחרים מבססים את השפעתו השלילית של מאזן האנרגיה השלילי על ביצועי הפוריות של הפרות.

מספר עבודות בארץ ובעולם בחנו מניפולציות תזונתיות שונות לשיפור מאזן האנרגיה של הפרות לאחר ההמלטה. במספר עבודות שעשינו בארץ נמצא כי העלאת ריכוזי האנרגיה באמצעים הוספת שומן מוגן למנה גרמה לעלייה בתנובות החלב עקב צריכה גבוהה יותר של נוטריאנטים, ולמעשה לא התקבל שיפור במאזן האנרגיה (Sklan et al., 1991, 1994). עבודה נוספת של Beam and Butler (1998) בחנה מתן תוספת שומנית למנה כמקור אנרגיה ונבחנו ההשפעות על הדינמיקה של ההתפתחות השחלתית מיד לאחר ההמלטה. גם בניסוי זה ההשפעות על מערכת הרבייה היו מינוריות. בחלק מן העבודות התקבל שיפור בתפקוד מערכת הרבייה בעקבות הזנה ברכיבי מנה ספציפיים, כגון: חומצות שומן בלתי רוויות מסוג אומגה-3 (Zachut et al., 2010, Moallem et al., 2013).

בעבודה שנעשתה במדיסון ויסקונסין נבחנו השפעת צמצום משך תקופת היובש עד כדי ביטולה על ביצועי הפרות, מטבוליטים בדם, מאזן האנרגיה ונתוני פוריות (Rastani et al., 2005; Gumen et al., 2005). בניסוי זה היו שלושה טיפולי יבש: (1) סטנדרטי – 60 יום, (2) מקוצר – 28 יום, (3) ללא תקופת

יובש (בפועל 5 ימי יובש). תנובת החלב בקבוצה ללא יובש ירדה במהלך 70 יום הראשונים לתחלובה בכ- 25% לעומת משך ייבוש סטנדרטי, ואילו מאזן האנרגיה שלהן היה חיובי יותר. הירידה בתנובת החלב הביאה לשיפור משמעותי במדדים מטבוליים הקשורים במאזן האנרגיה, כגון: עלייה בריכוז גלוקוז וירידה בריכוז NEFA בפלסמה, וכן ירידה בריכוז TG בכבד (Rastani et al., 2005). השיפור במאזן האנרגיה הביא להקדמה משמעותית במועד ביוץ ראשון (13.2 לעומת 31.9 יום), וכן להקטנת שיעור הפרות עם ביוץ כפול. התקבל שיפור בכל מדדי הפוריות: שיעור גבוה של התעברות מהזרעה ראשונה (55% לעומת 20%), וצמצום משמעותי בימי ריק (93.8 לעומת 145.4 יום; Gumen et al., 2005). בעבודה זו לא דווח על השפעת הטיפולים בתקופת היובש על תנובת החלב לאורך כל התחלובה.

היות והשיפור במאזן האנרגיה ובאפקטים הנלווים לו כתוצאה ממניפולציות תזונתיות היה מוגבל, והממצאים מן העבודה בויסקונסין המראים כי ירידה בתנובת החלב כתוצאה מביטול תקופת היובש תרמה באופן משמעותי לשיפור בכל המדדים המטבוליים ובמדדי הפוריות, בעבודת מחקר זו אנו מציעים גישה אחרת לשיפור מאזן האנרגיה לאחר ההמלטה והיא הפחתה במיצוי הפוטנציאל הגנטי לתנובת חלב גבוהה לזמן המוגבל (3-4 שבועות ראשונים לתחלובה) באמצעות צמצום תדירות החליבה. אנו מציעים לחלוב את הפרות פעמיים ביום במהלך החודש הראשון, ולאחר מכן לעבור לממשק רגיל של 3 חליבות ביממה עד תום התחלובה. הקטנת תדירות החליבה מ-3 ל-2 אמורה לגרום לירידה של 15-17% בתנובת החלב בתקופה קריטית זו (Erdman and Varner, 1995). אנו מצפים לראות שיפור במאזן האנרגיה של הפרות בראשית התחלובה, ולבחון את השפעתו על ריכוזי המטבוליטים בדם, הפעילות השחלתית וביצועי הפוריות של הפרות.

2.3. מטרת המחקר

כללי - לבחון את ההשפעה של צמצום תדירות החליבה בחודש הראשון של התחלובה על תנובת החלב, הסטטוס המטבולי ומערכת הרבייה.

מטרות ספציפיות:

לבחון את השפעת הקטנת תדירות החליבה לפעמיים ביום בחודש הראשון לתחלובה על:

- 1) תנובת החלב ורכיביו לאורך כל התחלובה.
- 2) צריכת מזון, מאזן האנרגיה, ריכוז המטבוליטים בפלסמה ותדירות הופעת הפרעות מטבוליות ומחלות המלטה אחרות.
- 3) הפעילות השחלתית לאחר ההמלטה, מועד ביוץ ראשון וביצועי הפוריות של הפרות.

2.4. חשיבותו וייחודו של המחקר

שיעור ההתעברות בפרות חלב הינו כמעט המדד היחיד בו קיימת הדרדרות רציפה ב- 15 השנים האחרונות. עד כה, ניסויים תזונתיים הציגו תוצאות חלקיות בלבד. עבודת המחקר הנוכחית בוחנת לראשונה באופן מבוקר את השפעת צמצום תנובת החלב בחודש הראשון לאחר ההמלטה באמצעים ממשקיים על תנובת החלב לאורך כל התחלובה, הסטטוס המטבולי ומערכת הרבייה. באם ימצא כי

תנובת החלב לאורך כל התחלובה לא תושפע באופן דרמטי, ויחד עם זאת נקבל שיפור במדדי הבריאות הרבייה השונים, אנו מעריכים שתוצאות מחקר זה יניבו המלצות חיוניות לשיפור מאזן האנרגיה של הפרות, שיפור בהתמודדות עם מחלות מטבוליות ושיפור בביצועי הפוריות.

2.5. כלי מדידה כמותיים לבחינת הצלחת המחקר

בעבודת מחקר זו אנו מציעים שיטה ממשקית העשויה לשפר את מאזן האנרגיה של הפרות בראשית התחלובה ואנו מצפים לשיפור במדדים בריאות ומערכת הרבייה. להערכתנו הפסדי החלב בחודש הראשון של התחלובה ואולי גם לאחר מכן יפוצו ע"י שיפור בסטטוס המטבולי של הפרות, צמצום במספר האירועים של הפרעות מטבוליות ושיפור בביצועי הרבייה. כל המדידה הכמותיים יהיו: (1) מאזן האנרגיה חיובי יותר אצל פרות הטיפול, (2) ריכוזים נמוכים יותר של NEFA ו-BHB וגבוהים יותר של גלוקוז בדם אצל פרות הטיפול, (3) שיעור היארעות נמוך יותר של מחלות מטבוליות, (4) פעילות שחלתית תקינה וביוץ מוקדם לאחר ההמלטה בקבוצת הטיפול.

2.6. דו"ח ביצוע

כללי

ביצענו ניסוי ברפת ההזנה הפרטנית בבית דגן שנמשך מספטמבר 2016 ועד מרץ 2017. 42 פרות מתחלובה שנייה ואילך חולקו ל- 2 קבוצות טיפול על פי מספר תחלובה, מועד ההמלטה הצפוי, תנובת החלב בתחלובות קודמות ומשקל גוף. הפרות הוכנסו לרפת ההזנה הפרטנית כ- 3 שבועות לפני מועד ההמלטה הצפוי. מיד לאחר ההמלטה קבוצת הביקורת נחלבה 3 פעמים ביום, וקבוצת הטיפול נחלבה פעמיים ביום בלבד עד 30 יום לאחר המלטה, ולאחר מכן 3 פעמים ביום עד תום הניסוי. נערך מעקב אחר צריכת מזון יומית, וכן נלקחו דגימות דם 3 פעמים בשבוע עד 45 יום בתחלובה, על מנת לבחון את השפעת הטיפול על ריכוז המטבוליטים בפלסמה במהלך הטיפול ולאחר הפסקתו, וכן לקבוע את מועד הביוץ הראשון על פי ריכוז הפרוגסטרון בפלסמה. כמו כן נערך מעקב אחר כל האירועים הקליניים. עד 30 יום נלקחו דגימות חלב מ- 3 חליבות רצופות פעמיים בשבוע ונשלחו למעבדה בקיסריה, ומיום 30 ועד 45 יום בתחלובה פעם בשבוע. הפרות שהו ברפת הפרטנית עד 100 יום בתחלובה על מנת לעקוב אחר האפקט המתמשך (carryover effect).

דגימות כבד נלקחו מ- 5 פרות מכל קבוצה ביום 14-17 לאחר ההמלטה, ובדוגמאות כבד אלה בוצעה אנליזה פרוטיאומית ביחידה לרפואה מותאמת אישית במכון וויצמן על מנת לבחון את השינויים בביטוי של חלבונים שונים המעורבים במטבוליזם לאחר ההמלטה. ביצענו סקירות של השחלות באולטרסאונד פעמיים בשבוע מיום 10 עד לקבלת ביוץ ראשון על מנת לעקוב אחר דינמיקת התפתחות הזקינים בשחלה. כמו כן שאבנו זקינים קדם-ביוציים ב- 60-80 יום לאחר ההמלטה מ- 8 פרות מכל טיפול כדי לבחון השפעות על מערכת הרבייה. נערך מעקב אחר מועד ביוץ ראשון על פי פרוגסטרון בפלסמה, ייחום התנהגותי ראשון, מועד הזרעה ראשונה וכן אחר כל מדדי הפוריות כגון: ימי ריק ושיעור הרות.

בדוגמאות הדם קבענו את ריכוז הגלוקוז, NEFA, BHBA, AST, טריגליצרידים, קורטיזול ו-MDA. כמו כן קבענו את ריכוז הפרוגסטרוגן על מנת לקבוע את מועד הביוץ הראשון.

פירוט של חומרים ושיטות

הזנה

בתקופת היובש הזנת הפרות התבססה על מנה שכללה בליל חולבות ושחת דגן מקוצץ (15 ס"מ לערך) ביחס של 1/3 שחת דגן ו-2/3 בליל חולבות, על בסיס חומר רטוב. לאחר ההמלטה הפרות הוזנו במנת חולבות סטנדרטית בריכוז של 1.78 מק"ל אנרגיה נטו לחלב לק"ג ח"י ו-16.5% חלבון כללי. הרכבי המנות מוצגים בטבלה מספר 1. הפרות הוזנו אחת ליום בשעה 10:00 בבוקר לעמדות פרטניות שמאפשרות גישה חופשית לכל פרה לאבוס אחד בלבד. כמות המזון היומית שחולקה לכל פרה וכמות השאריות נשקלו ונרשמו בכל יום. כל הפרות נקשרו בעולים ארבע פעמים ביממה (כ-20 דקות): לאחר חלוקת המזון ולאחר כל חליבה (פרות שנחלבו פעמיים נקשרו בו זמנית לפרות שנחלבו שלוש פעמים ביציאה מחליבת הצהריים).

קבוצת הניסוי היו כדלקמן:

1. קבוצת הביקורת (3ML): 21 פרות שנחלבו שלוש פעמים ביממה החל ממועד ההמלטה ועד תום הניסוי. החליבות התבצעו בשעות: 05:00, 13:00, 20:00.
2. קבוצת הטיפול (2ML): 21 פרות נחלבו פעמיים ביממה החל ממועד ההמלטה ועד 30 יום בתחלובה, בשעות: 07:00 ו-19:00. לאחר 30 יום הפרות הועברו לקבוצת הביקורת ונחלבו שלוש פעמים ביממה עד תום הניסוי. שתי הקבוצות הוזנו באותה מנת חולבות שחולקה פעם ביום בשעה 10:00.

איסוף נתונים

איסוף הנתונים החל כשלושה שבועות לפני מועד ההמלטה הצפוי ועד יום 100 בתחלובה. המעקב לאחר תקופת הניסוי נערך על מנת לבחון האם היו השפעות ארוכות טווח בטיפול 2 החליבות.

נתוני חלב והרכב החלב

במכון החליבה מותקנת מערכת Afimilk (צח"מ אפיקים, קיבוץ אפיקים) וכמות החלב נמדדה באופן אוטומטי. ביקורת חלב בוצעה פעמיים בשבוע החל מיום 4 לאחר ההמלטה ועד יום 30 בתחלובה, ומיום 31 עד יום 45 נערכה ביקורת חלב אחת לשבוע. מיום 45 ועד 100 יום בתחלובה, נערכה ביקורת חלב אחת לחודש. דגימות החלב נעשו מ-3 חליבות רצופות, ועד 30 יום מ-2 חליבות רצופות בקבוצת ה-2ML. הדגימות הועברו למעבדה המרכזית של התאחדות מגדלי הבקר בקיסריה.

בדוגמאות החלב נקבעו ריכוזי שומן, חלבון, לקטוז ואוראה. האנליזה בוצעה במכשירי ספקטרופוטומטר הפועל בתחום האור האינפרא-אדום, שמודד את רכיבי החלב, ע"י בדיקה של יכולת רכיבי החלב לבלוע אור אינפרא-אדום באורכי גל מסוימים אופייניים לכל רכיב. הפעלת המכשירים נעשית בהתאם לנוהלי ארגון החלב העולמי International Dairy Federation Standard 141C, (IDF) כמו כן נקבע מספר התאים הסומטיים בדוגמאות החלב.

מצב גופני (BCS) ומשקל גוף

הפרות נשקלו בתקופת היובש אחת לשבוע, והערכת המצב הגופני (BCS) שלהן נקבעה אחת לשבוע על פי סקלה של 1-5 (Edmonson et al., 1989), שבוצעה ע"י אותו אדם לאורך כל הניסוי. ממועד ההמלטה ועד תום הניסוי ה- BCS נקבע אחת לשבוע. משקל הפרות לאחר ההמלטה נקבע ביציאה ממכון החליבה ע"י משקל בהליכה תוצרת צח"מ אפיקים, שמוצב בשבילי היציאה ממכון החליבה, פעמיים עד שלוש פעמים ביום (לפי קבוצת הניסוי).

דגימות דם

דגימות דם נלקחו שלוש פעמים בשבוע: בימים ראשון, שלישי וחמישי החל משלושה שבועות לפני ההמלטה ועד 45 יום לאחר ההמלטה. הדגימות נלקחו לאחר חליבת בוקר, בשעה 07:30 בערך. דגימות הדם נלקחו מוריד הזנב למבחנות ואקום המכילות (BD- Plymouth, UK) lithium heparin, ונשמרו בקרח עד הגעתם למעבדה, שם הפלסמה נאספה לאחר צנטריפוגה ב- $1500 \times g$ במשך 20 דקות, וחולקה לארבע מבחנות אפנדורף, שאחת מהן נשמרה ב- $20^{\circ}C$ ושלושה ב- $80^{\circ}C$. בדוגמאות דם אלה נקבעו ריכוזי גלוקוז, טריגליצרידים, AST, NEFA, BHB, פרוגסטרון, אסטרוידול ואנדרוסטדיון.

קביעת ריכוזי מטבוליטים בפלסמה

קביעת גלוקוז, טריגליצרידים ו AST נעשתה אוטומטית ע"י מכשיר ה- Roche) Cobas c 111 (Diagnostics, USA

קביעת גלוקוז

לקביעת גלוקוז המכשיר ביצע שתי תגובות אנזימטיות עוקבות: בריאקציה הראשונה גלוקוז הופך לגלוקוז 6 פוספט ע"י האנזים הקסוקינאז לפי התגובה הבאה:

HK



בריאקציה השנייה גלוקוז-6- פוספט הופך לגלוקונאט-6- פוספט בנוכחות NADP שהופך ל NADPH

:-

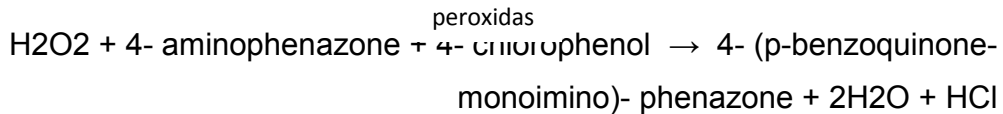
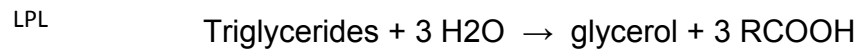
G-6-PDH



קצב יצירת NADPH פרופורציונאלי ישירות לריכוז הגלוקוז כתוצאה מריאקציה זו נפלטת קרינת UV באורך גל של 340 nm שניתנת למדידה ולקביעה של ריכוז הגלוקוז הפלסמה.

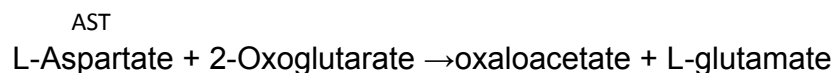
קביעת טריגליצרידים

בדיקת ריכוז הטריגליצרידים מבוססת על שיטה מעבודתו של וולפלד שהשתמש בליפופרוטאין ליפאז ממיקרואורגניזמים שמבצע הידרוליזה של טריגליצרידים לגליצרול שבעקבות חמצון הופך לדיהידרוקסיאצטון פוספט ומימן על חמצני. המימן העל חמצני מגיב עם 4 - אמינופנאזון + 4- כלורופנול ביחד עם האנזים הקטליטי פראוקסידאז ליצירת חומר בעל צבע אדום. עוצמת הצבע האדום שנוצר פרופורציונלית ישירות לריכוז הטריגליצרידים וניתן למדידת עוצמת האור שעוברת דרך הנוזל הצבוע. להלן תיאור התגובות הכימיות שבוצעו:



(AST) Aspartate aminotransferase

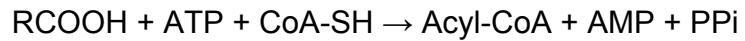
AST משמש כאנזים שמעביר קבוצת אמינו בין L-aspartate ו- 2-oxoglutarate ליצירת אוקסלואצטאט שמשתתף בריאקציה נוספת במהלכה הוא מגיב עם NADH בנוכחות האנזים מלאט-דהידרוגנאז ליצירת NAD⁺. קצב החמצון של NADH פרופורציונאלי ישירות לקצב פעילות ה-AST והוא נקבע ע"י קריאה של קרינת UV באורך גל של 340nm שנפלטת בעקבות הריאקציה. להלן תגובות כימיות של הראקציות:



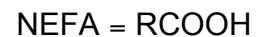
קביעת ריכוז NEFA בפלסמה

קביעת ריכוז ה-NEFA בפלסמה נעשתה בעזרת kit ל-NEFA (Wako NEFA C test kit, Wako) NEFA-NEFA kit (Chemicals GmbH, Japan). ריכוז ה-NEFA שווה לריכוז RCOOH שבתגובה עם האנזים

ACS הופך לאצטיל קו- A בתגובה השנייה אצטיל קו- A יוצר תגובה עם חמצן וע"י האנזים ACOD נוצר חמצן על פחמני. חמצן על פחמני בתגובה עם 4 אמינופנאזון יוצר חומר בעל צבע שנקרא קווינונימין להלן סטוכיומטריה של שלושת הריאקציות האנזימטיות העוקבות:



כאשר:



הריאקציה הראשונה בוצעה על ידי האנזים ACS (Acyl-CoA-Synthetase).

הריאקציה השנייה בוצעה על ידי האנזים ACOD (Acyl-CoA-Oxidase).

הריאקציה השלישית בוצעה על ידי האנזים POD (Peroxidase).

בסיום הריאקציה השלישית נוצר Quinoneimine-color אשר פולט קרינת UV באורך גל של 550

nm ולכן על ידי השוואה של הדוגמאות לעקומת סטנדרט של NEFA נקבע ריכוז ה-NEFA

בפלסמה. עקומת הסטנדרט נבנתה בערכים של 62.5 עד 1000 $\mu\text{Eq/L}$ NEFA.

קביעת BHBA

קביעת ריכוז ה-BHBA בפלסמה בוצעה בעזרת kit ל-BHBA (RANBUT D-3-)

(Hydroxybutyrate, Randox, Crumlin, UK). ריכוז ה-BHBA נקבע בעזרת ריאקציה אנזימטית

בה BHBA הופך לאצטואצטט ע"י האנזים 3-hydroxybutyrate dehydrogenase, ואת NAD

ל-NADH. כתוצאה מריאקציה זו נפלטת קרינת UV באורך גל של 340 nm, ולכן על ידי השוואה

של הדוגמאות לעקומת סטנדרט של BHBA נקבע ריכוז ה-BHBA בפלסמה. עקומת הסטנדרט

נבנתה בערכים של 0 עד 10.4 mg/dl BHBA.

דינמיקה של התפתחות זקיקים בשחלות

ביצענו מעקב אחר התפתחות הזקיקים בשחלות של 20 פרות - 10 פרות מכל טיפול - החל מיום 10

לאחר ההמלטה ועד להופעת גוף צהוב. הסריקה בוצעה פעמיים בשבוע, בימים שני וחמישי החל

משעה 16:00. הפרות הוכנסו לחדר טיפולים ייעודי ורוסנו בעולים. נערכה סריקה באולטראסאונד

על (MylbFive®, Netherland) עם פרוב ליניארי 7.5 MHz. נערך תיעוד של הזקיקים לפי מיקומם על

פני השחלה וגודלם כפי שנמדד במכשיר האולטראסאונד. בתום ימי המעקב סווגו הזקיקים לשלוש

קטגוריות על פי קוטרם: 2- 5 מ"מ, 6- 9 מ"מ, גדול מ- 10 מ"מ. זקיקים שקוטרם היה מעל 24 מ"מ ושרדו על השחלה במשך 3 בדיקות עוקבות סווגו כציסטות.

סנכרון מחזור הייחום ושאבת נוזל פוליקולרי

החל מ- 50 ימים בתחלובה נבדקה תקינות השחלות ל- 8 פרות מכל טיפול מהן נשאב נוזל פוליקולרי מזקיקים קדם ביוציים.

כשבועיים לפני תאריך השאיבה הפרות עברו סריקה לבדיקת תקינות מערכת המין והפעילות השחלתית בעזרת מכשיר אולטראסאונד (Aquila, Pie Medical, Maastracht, theNetherlands). לפרות שמצאנו בשחלותיהן גוף צהוב הזרק אנלוג ל- $PGF_{2\alpha}$ (2.5 מ"ל אסטרופלאן, בריכוז 250 מק"ג/ כלופרוסטנול /מ"ל, ESTROplan, Pamell Manufacturing PTY Ltd. Australia), ונערך מעקב להופעת ייחום התנהגותי. לאחר 14 יום מהופעת ייחום התנהגותי הזרק PG נוסף והזקיקים הקדם ביוציים נשאבו לאחר 48 שעות (תרשים 1).

תרשים מס' 1



לפרות שלא נמצא בשחלותיהן גוף צהוב אבל עם פעילות שחלתית נורמלית הזרקנו אנלוג של GnRH (2 מ"ל גונבריד, GONABreed, Parrnll PTY, Ltd, Australia), ולאחר כ- 10 ימים בוצעה סריקה שחלתית נוספת בעזרת מכשיר האולטראסאונד לקביעת נוכחות גוף צהוב. לפרות עם גוף צהוב הזרקנו PG ונערך מעקב להופעת ייחום. לאחר 14 ימים מהופעת הייחום ההתנהגותי הזרקנו PG נוסף ולאחר 48 שעות שאבנו את הזקיקים הקדם ביוציים (תרשים 2).

תרשים מס' 2



את הנוזל הפוליקולרי שאבנו מזקיקים שקוטרם גדול מ- 7 מ"מ, תחילה משחלה ימין ואח"כ משחלה שמאל, על ידי שימוש בטכניקה הדומה לזו של שאיבת ביציות בבקר תחת הרדמה אפידוראלית. לפני

פעולת השאיבה הפרות קיבלו זריקה לטטטוש של כ- 1 מ"ל סדקסילאן (Xylazine 20 mg/ml, Eurovet Animal Health, Holand) לשריר הצוואר, ובהמשך קיבלו הרדמה אפידוראלית בין החוליה האחרונה של הסקרום לבין החוליה הראשונה של הזנב ע"י הזרקה של 5 מ"ל עזרקאין 2% (Lidocaine 20mg/ml, Rafa Laboratories Ltd, Jerusalem) HCl. הזקיקים בגודל מתאים נשאבו טראנס-ואגינאלית במקביל לסריקת השחלות בעזרת מכשיר אולטראסאונד. בעת השאיבה הוחדר מתמר וגינאלי אשר דרכו עובר מוביל ובקצהו מחט חד פעמית בקוטר G18, דרכה נאסף הנוזל הפוליקולרי לתוך מבחנה בעזרת משאבת ואקום (50 מ"מ כספית). כל זקיק נשאב למבחנה נפרדת. הנוזל הפוליקולרי יסורכז במשך 25 דקות ב- 3000g מיד לאחר השאיבה, הופרד והוקפא מיד ב- 31°C עד לביצוע האנליזות.

הורמונים בנוזל הפולקולרי

בנוזל הפולקולרי קבענו את ריכוזי ההורמונים הבאים: פרוגסטרון, אסטרדיול ואנדרוסטנדיון. דוגמאות דם נלקחו ביום הזרקת ה- PG וביום השאיבה, ונקבע ריכוז הפרוגסטרון.

פרוגסטרון

ריכוזי הפרוגסטרון נקבעו באמצעות (RIA- Radioimmunoassay) בעזרת קיט לפרוגסטרון (PROGEST-RIA, Cisbio Bioassays, France) הוספת 125 I בכמות קבועה שמתחרה באתרי הקשירה של הפרוגסטרון תוך כדי אינקובציה ב- 37°C למשך שעתיים ולאחר מכן שטיפה של הטיובות. בוצע מיהול פי 100 של הנוזל הפוליקולרי על מנת להתאימו לעקומת הסטנדרט. המיהול בוצע בסדרה של שני מיהולים (פי 10 ופי 100) בעזרת Saline 0.85%. מדידת ריכוז הפרוגסטרון נלקח מעקומת הסטנדרט שנבנתה בריכוזים שבין 0 ננוגרם/מ"ל ל- 36 ננוגרם/מ"ל.

אסטרדיול

ריכוזי האסטרדיול נבדקו באמצעות קיט לאסטרדיול (ESTRA-CTRIA, Cisbio Bioassays, France) שיטת הבדיקה דומה לשיטת הבדיקה של הפרוגסטרון. עקומת הסטנדרט הייתה בערכים שבין 0 פיקוגרם/מ"ל ל- 5000 פיקוגרם/מ"ל ומיהול הנוזל הפוליקולרי נעשה בשימוש בסליין 0.85% למיהול פי 500 ע"י סדרה של 3 מיהולים (10X, 100X, 500X) כדי להתאים את תוצאות הבדיקה לעקומת הסטנדרט.

אנדרוסטנדיון

ריכוז האנדרוסטנדיון נבדק באמצעות קיט – Radioimmunoassay RIA (ActiveAndrostenedione DSL3800, Immunotech, Prague, Czech Republic). הוכנה

עקומת סטנדרט בריכוזים שבין 0 ul - ל- 150 ul ובוצע מיהול של פי 30 לנוזל הפולקולרי. שיטת המדידה הייתה דומה לשיטה שבוצעה על הפרוגסטרוגן וקריאה במונה גמא במשך כדקה.

ביופסיית כבד

הפרות רוסנו בעולים בחדר אולטרסאונד ייעודי. ניתנה זריקת טשטוש לפרה - XYLASIN (Sedaxylan veterinary®, Eurovet animal Health, Netherland) בהזרקה תוך שרירית (IM) במינון של 0.02 מ"ג/ק"ג עם מחט של G18. האזור של קו אמצע PARALOMBAR FOSSA או בקו החלק התחתון של ה- TOBER COXAE, בין צלע 11 ו-12 (הרווח ה- 11), בצד הימני האזור גולח ונוקה עם סבון (septal scrub® teva medical, Israel) וחוטא עם PVP, medica brus, 1% iodine detergent (medica, netherland) ואתנול 70% (bio-lab, Israel). לאזור הוזרק lidocain HCL® (Bimeda, USA). כחמש דקות לאחר מכן נעשה חתך בעור של כ- 4 מ"מ באזור המורדם, והוחדרה מחט G12 בעזרת מכשיר (Bard inc, USA) Bard® Magnum® לכוון קראניאלי-וונטרלי (ראש המחט לכוון הכתף הנגדית). הדגימה נלקחה ברובה מהאונה הימנית. בכדי להימנע מכניסה או פגיעה בכלי דם גדולים הביופסיה נערכה תחת הדמיית אולטרסאונד (MylbFive®, Netherland) עם פרוב ליניארי 7.5 MHz. מכל פרה נלקחו עד חמש דגימות. לאחר מכן האזור נסגר בעזרת אקדח סיכות (Lookmed® china) וחוטא עם ספרי (Alamycin Aerosol Veterinary). הדוגמאות הועברו למבחנות אפנדורף והוכנסו להקפאה מיידית עם חנקן נוזלי.

הפקת חלבון מרקמת כבד

דגימת רקמת הכבד הקפואה הוכנסה למבחנה ייעודית (Benchmark), ניו ג'רזי, ארה"ב, מק"ט D1033-28) המכילה 2 חרוזי מתכת בעובי של 3 mm וכן 1 ml של תמיסת פירוק. הרקמה עברה הומוגניזציה באמצעות הומוגניזייר לרקמות (DanyeLBiotech BeadBug, רחובות, ישראל) למשך דקה והונחה בקרח לדקה נוספת. לאחר עוד שני סיבובים נוספים במכשיר, הועברה המבחנה למכשיר המסתובב 360° למשך שעה ב-4°C. בשלב הבא הוצא הנוזל בשלמותו מהמבחנה באמצעות מחט 18G (PIC solution, מילאנו, איטליה, מק"ט 03.070520.300.800) והועבר למבחנת אפנדורף נקייה ומשם לסרכז של 20,000g למשך 15 דקות בטמפרטורה 4°C. הנוזל נאסף באמצעות מחט 18G ללא המשקע. ריכוז החלבון נקבע באמצעות קיט (CYANAGN) BCA, בולוניה, איטליה, מק"ט (PRTD2,0050) ולפי הגדרות היצרן. החלבון הועבר ל-80°C עד להכנת הדוגמא ל- Western Blot.

תמיסת פירוק-PMSF 1% (SIGMA-ALDRICH, רחובות, ישראל, מק"ט P-7626), protease inhibitor cocktail 1% (SIGMA-ALDRICH, רחובות, ישראל, מק"ט P8340), phosphatase

SDS cocktail 1% (SIGMA-ALDRICH, רחובות, ישראל, מק"ט P5726), כולם נמהלו בתמיסת SDS (SIGMA-ALDRICH, רחובות, ישראל, מק"ט L-3771).

תמיסת SDS 5% (SIGMA-ALDRICH, רחובות, ישראל, מק"ט L-3771) שהורחפו ב- (SIGMA-ALDRICH, רחובות, ישראל, מק"ט I6504) HCL .100mM Tris/HCL (PH=7.6) (Bio Lab, ירושלים, ישראל, 1004871) Tris.

Western blot 2.15

דוגמת החלבון נמהלה ב-sample buffer פעיל (bio-red, קליפורניה, ארה"ב, מק"ט 1610747) ובנוזל להפקת חלבון על מנת להגיע לריכוז של 35µg לכל דגימה. הדוגמאות חוממו בטמפרטורה של 95°C למשך 8 דקות ולאחר מכן הן הוטענו על גבי ג'ל (SDS-PAGE) המורכב משכבה עליונה של 4% Acrylamide ושכבה תחתונה של 12% Acrylamide. בתהליך ההפרדה הורץ במקביל לדוגמאות סמן לגודל החלבונים (ladder) (Thermo Fisher Scientific, פייסלי, בריטניה, מק"ט K1622). בתום שלב האלקטרופורזה הועברו החלבונים אל ממברנת ניטרוצלולוזה (bio-red) 0.45µm, קליפורניה, ארה"ב, מק"ט 1620115) באמצעות מכשיר Trans-Blot Turbo יבש (bio-red, קליפורניה, ארה"ב) למשך חצי שעה על פי תוכנית הרצה סטנדרטית למכשיר זה. לאחר מעבר החלבונים מהג'ל אל ממברנת הניטרוצלולוזה הודגרה הממברנה בפונסו (SIGMA-ALDRICH, רחובות, ישראל, מק"ט P3504) למשך 5 דקות לוודוא העברה מלאה של החלבונים לממברנה. הממברנה נשטפה היטב באמצעות Tris-buffered saline Tween (TBST) והודגרה למשך שעה בתמיסת חסימה (Blocking). בסיום השעה הממברנה נשטפה 3 פעמים, תחת טלטול, למשך 5 דקות. הממברנה הועברה להדגרה בנוגדן הראשוני הרצוי (טבלה 2) ב-4°C למשך הלילה. לאחר מכן, הממברנה נשטפה 3 פעמים, בטלטול למשך 5 דקות בכל פעם והודגרה בנוגדן שניוני GaR מצומד לאנזים HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, בולטימור, ארה"ב, מק"ט 111-035-003, מיהול 1/1000) למשך שעה. הממברנה נשטפה 3 פעמים, בטלטול למשך 5 דקות בכל פעם, והודגרה ב-ECL 2ml (Thermo Fisher Scientific, פייסלי, בריטניה, מק"ט 34080) למשך 5 דקות. הממברנה פותחה באמצעות מצלמת UV (Syngene, בנגלור, הודו). הבנדים שהתקבלו כומתו תוך שימוש בתוכנת image-j. הנוגדנים שנבחנו היו P85, actin.

TBST 36gr NaCl (SIGMA-ALDRICH, רחובות, ישראל, מק"ט 39H1373), 40ml של 1M Tris-HCL (PH=7.6) (SIGMA-ALDRICH, רחובות, ישראל, מק"ט I6504),

DDW 4L -Tris (Bio Lab, ירושלים, ישראל, 1004871) ו-4ml של tween20 בנפח סופי של 4L DDW (SIGMA-ALDRICH, רחובות, ישראל, מק"ט p1379).

תמיסת חסימה – Blocking solution - 1% BSA המהול ב-DDW. (SIGMA-ALDRICH, רחובות, ישראל, מק"ט A7906).

בדוגמאות כבד אלה בוצעה אנליזה פרוטיאומית ביחידה לרפואה מותאמת אישית במכון וויצמן על מנת לבחון את השינויים בביטוי של חלבונים שונים המעורבים במטבוליזם לאחר ההמלטה.

תוצאות

תוצאות הייצור נותחו לפי 2 תקופות: תקופה ראשונה מ-0 עד 30 יום, ותקופה שנייה מ-31 ועד 100 יום, על מנת לבחון את ההשפעה ארוכת הטווח של הטיפול עד 30 יום. בטבלה מספר 1 מוצגות התוצאות עד לפי 2 התקופות. תנובת החלב בקבוצת ה-3 חליבות (3ML) בתקופה הראשונה (0-30 יום בתחלובה) הייתה גבוהה ב-3.8 ק"ג חלב ליום מאשר בקבוצת ה-2 חליבות (2ML), שהם כ-9.4% יותר חלב, ללא הבדלים בתנובת החלב בתקופה השנייה (100-31 יום בתחלובה). כפי שניתן לראות בתרשים מספר 1, לאחר המעבר ל-3 חליבות פרות ה-2ML הדביקו את הפער בתנובת החלב תוך מספר ימים. אחוז השומן בחלב בתקופה הראשונה היה גבוה ב-0.33 יחידות האחוז בקבוצת ה-2ML, וגם בתקופה השנייה הוא היה גבוה ב-0.24 יחידות אחוז (תרשים מס' 2). אחוז החלבון היה זהה בין הטיפולים ב-2 התקופות, ואילו אחוז הלקטוז היה גבוה יותר בקבוצת ה-3ML בתקופה השנייה. תנובת השומן, חלבון ולקטוז הייתה גבוהה יותר בתקופה הראשונה בקבוצת ה-3ML, ואילו בתקופה השנייה תנובת השומן הייתה גבוהה יותר בקבוצת ה-2ML, ללא הבדלים בתנובת שאר המוצקים. תנובת החמ"ש (4%) הייתה זהה בתקופה הראשונה, ואילו בתקופה השנייה היא הייתה גבוהה יותר ב-5% בקבוצת ה-2ML.

טבלה מספר 1: ייצור חלב ורכיביו לפי 2 תקופות

	0-30 DIM				31-100 DIM			
	Treatments				Treatments			
	3ML	2ML	SEM	P value	3ML	2ML	SEM	P value
Milk, Kg/d	44.3	40.5	1.0	0.01	56.9	56.9	0.4	0.96
Fat, %	4.12	4.45	0.07	0.003	3.58	3.82	0.08	0.03
Protein, %	3.35	3.36	0.04	0.96	3.07	3.08	0.04	0.84
Lactose, %	4.95	4.88	0.03	0.12	5.00	4.92	0.03	0.04
Fat, kg/d	2.07	1.93	0.03	0.04	2.05	2.16	0.04	0.08
Protein, kg/d	1.68	1.46	0.03	<0.001	1.77	1.73	0.03	0.31
Lactose, kg/d	2.51	2.14	0.05	<0.001	2.87	2.81	0.05	0.40
FCM 4%, kg/d	42.6	42.2	1.33	0.83	52.5	55.2	0.48	0.001
ECM, kg/d	34.9	32.9	0.80	0.09	39.9	40.7	0.29	0.09
MUN, kg/dL	15.7	17.3	0.4	0.009	16.0	15.0	0.8	0.64

בטבלה מספר 2 מוצגים נתוני צריכת מזון ויעילות. צריכת המזון הייתה זהה בין הקבוצות בשתי התקופות (תרשים מספר 3). מאזן האנרגיה היה חיובי יותר בתקופה הראשונה בקבוצת ה-2ML, ואילו בתקופה השנייה הוא היה חיובי יותר בקבוצת ה-3ML (תרשים מספר 4). היעילות לייצור חלב

הייתה גבוהה יותר בתקופה הראשונה בקבוצת ה-3ML, ואילו בתקופה השנייה, לא היו הבדלים בין הקבוצות. היעילות לייצור חמ"ש הייתה זהה בתקופה הראשונה, וגבוהה יותר בקבוצת ה-2ML בתקופה השנייה.

טבלה מספר 2: צריכת מזון ונתוני יעילות לפי 2 תקופות

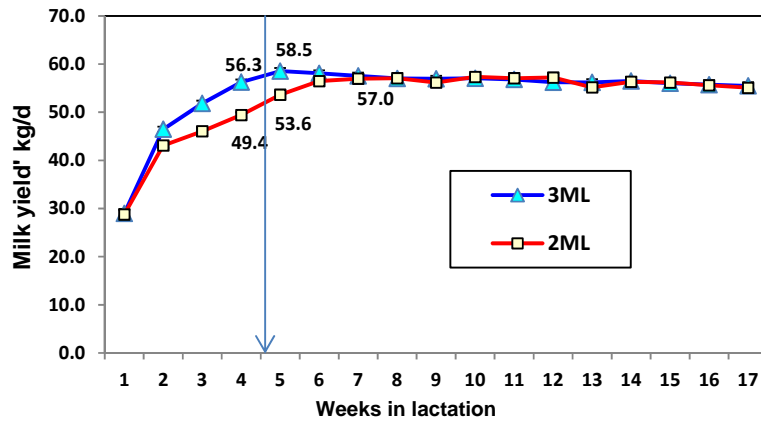
	0-30 DIM				31-100 DIM			
	Treatments ¹		SEM	P <	Treatments ¹		SEM	P value
	3ML	2ML			3ML	2ML		
DMI, kg/d	25.9	26.1	0.37	0.70	32.0	31.6	0.30	0.30
EB, Mcal/d	-0.55	2.08	0.70	0.01	6.94	4.78	0.45	0.002
MILK/DMI, kg/kg	1.80	1.65	0.04	0.01	1.81	1.83	0.01	0.33
FCM 4%/DMI, kg/kg	1.75	1.74	0.04	0.77	1.67	1.78	0.02	0.001
ECM/DMI, Mcal/kg	1.41	1.34	0.03	0.11	1.26	1.32	0.01	0.001
Rumination time, min/d	462.4	449.6	15.0	0.57	524.2	535.4	4.8	0.10
Lying time, min/d	571.2	596.0	12	0.15	580.5	623.7	5.9	<0.001

בטבלה מספר 3 עשינו ניתוח של כל התקופה על מנת לבחון את ההשפעה הכוללת על התנובות. לא נמצא הבדל מובהק בתנובת החלב, כמו כן אחוז השומן היה גבוה יותר בקבוצת ה-2ML, אחוז החלבון היה זהה, ואילו אחוז הלקטוז היה גבוה יותר בקבוצת ה-3ML. תנובת החמ"ש והאנרגיה הכוללת בחלב הייתה דומה זה בין הקבוצות. כמו כן תנובת החמ"מ לא הייתה שונה בין הקבוצות: 51.3 בקבוצת ה-3ML לעומת 51.9 ק"ג בקבוצת ה-2ML. ב-2 בקבוצות הייתה ירידה במשקל הגוף מהמלטה ועד 100 יום, כאשר בקבוצת ה-2ML הירידה הייתה כמחצית מקבוצת ה-3ML. לא נמצא ביעילות לייצור חלב, אבל היעילות לייצור חמ"ש הייתה גבוהה יותר ב-4% בקבוצת ה-2ML מאשר בקבוצת ה-3ML. לא נמצא הבדל בזמן העלאת גירה, אבל בקבוצת ה-2ML הפרות רבצו במוצע יותר 38 דקות ביממה.

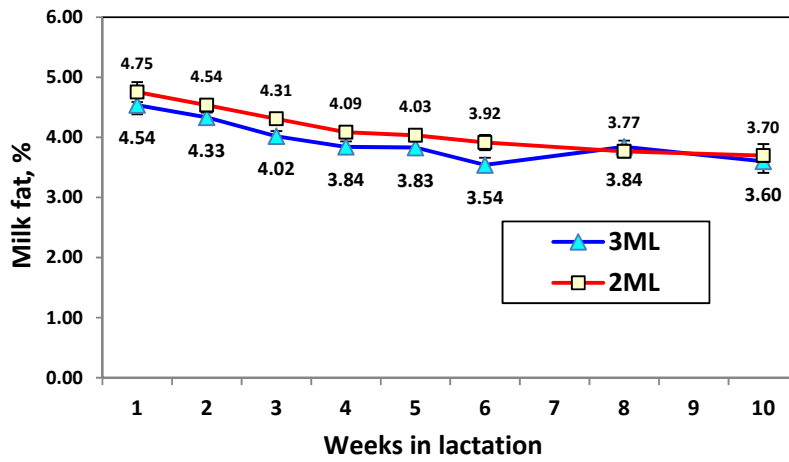
טבלה מספר 3. נתוני ייצור ויעילות לכל התקופה (100 יום בתחלובה)

	0-100 DIM			
	Treatments		SEM	P value
	3ML	2ML		
Milk, kg/d	51.5	50.6	0.8	0.44
Fat, %	3.91	4.21	0.06	0.001
Protein, %	3.30	3.29	0.05	0.96
Lactose, %	4.96	4.89	0.02	0.04
Fat, kg/d	2.04	2.02	0.03	0.64
Protein, kg/d	1.70	1.57	0.02	0.001
Lactose, kg/d	2.56	2.38	0.06	0.03
FCM 4%, kg/d	47.9	49.7	0.98	0.20
ECM, kg/d	37.4	37.5	0.59	0.89
DMI, kg/d	29.8	29.9	0.3	0.92
EB, Mcal/d	4.59	3.84	0.39	0.19
BW gain from 0 to 100 DIM, kg	-27.9	-14.9	5.9	0.12
Milk/DMI, kg/kg	1.81	1.77	0.02	0.20
FCM 4%/DMI, kg/kg	1.69	1.76	0.02	0.01
ECM/DMI, Mcal/kg	1.30	1.33	0.01	0.22
Rumination time, min/d	501.6	507.4	6.6	0.54
Lying time, min/d	578.0	616.0	5.4	0.001

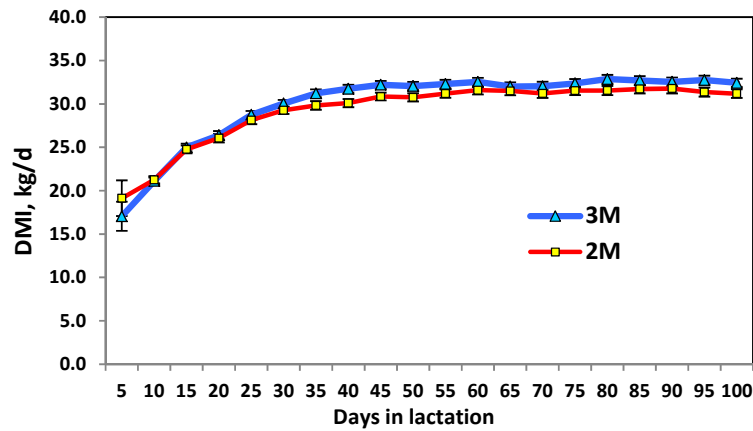
תרשים מספר 1 – תנובת החלב עד 100 יום בתחלובה.



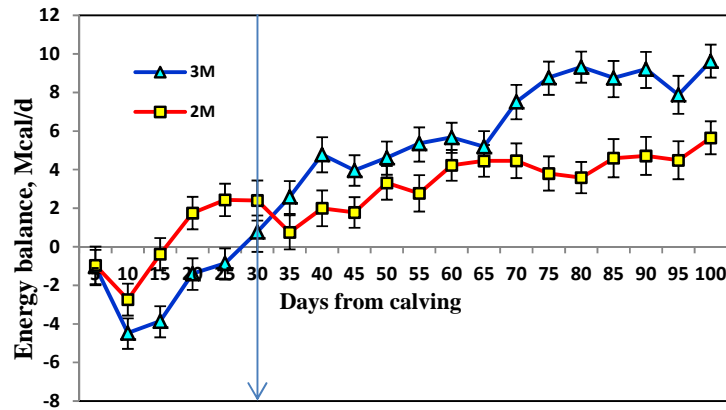
תרשים מספר 2 – אחוז שומן בחלב עד 100 יום



תרשים מספר 3 – צריכת מזון של הפרות עד 100 יום בתחלובה



תרשים מספר 4. – מאזן האנרגיה עד 100 יום



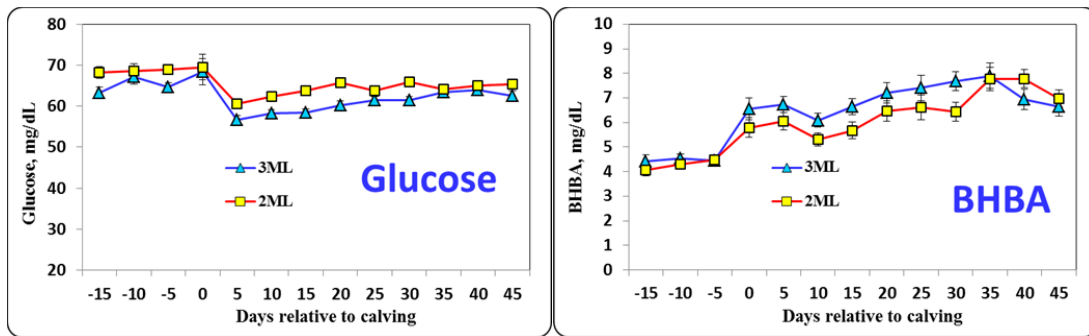
מטבוליטים בדם

בטבלה מס' 3 מוצגים נתוני המטבוליטים בפלסמה ל- 2 תקופות: עד 30 יום בתחלובה, ומ- 31 ועד 50 יום בתחלובה. ריכוזי הגלוקוז היו גבוהים בכ- 9% בקבוצת ה- 2ML בתקופה הראשונה, ונטו להיות גבוהים יותר בקבוצה זו גם בתקופה השנייה (תרשים מס' 5). ריכוזי ה- BHBA היו נמוכים יותר בקבוצת ה- 2ML בתקופה הראשונה, ללא הבדלים בתקופה השנייה (תרשים מס' 5). בניגוד לצפוי, ריכוזי ה- NEFA היו גבוהים יותר בקבוצת ה- 2ML, ואילו ריכוזי ה- AST לא היו שונים.

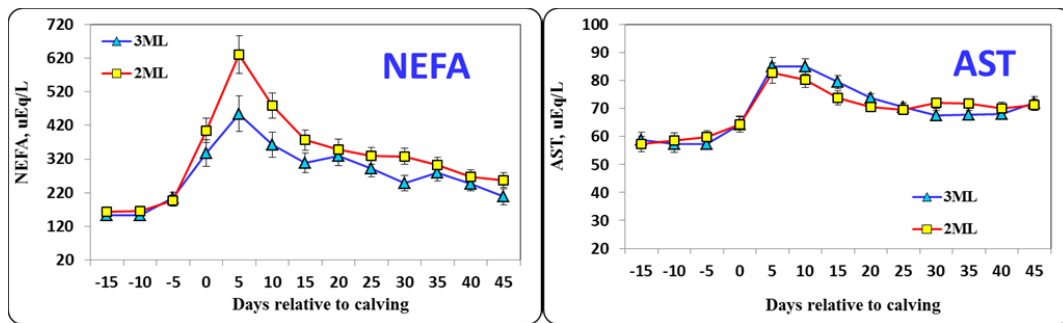
טבלה מס' 4. ריכוזי מטבוליטים בדם לפי שתי תקופות: עד 30 יום, ומ- 31-50 יום בתחלובה.

	0-30 DIM				31-50 DIM			
	Treatments ¹				Treatments ¹			
	3ML	2ML	SEM	P value	3ML	2ML	SEM	P value
Glucose, mg/dL	58.6	63.8	0.90	0.001	62.4	64.8	1.0	0.11
BHBA, mg/dL	7.21	6.28	0.25	0.02	7.3	7.3	0.34	0.90
NEFA, uEq/L	327.0	439.1	22.6	0.002	248.3	290.7	18.2	0.11
TG, mg/dL	7.58	8.0	0.16	0.12	8.6	8.4	0.21	0.52
AST, u/L	75.9	74.0	2.2	0.53	68.8	71.8	2.2	0.35

תרשים מספר 5. ריכוזי גלוקוז ו- BHBA בפלסמה



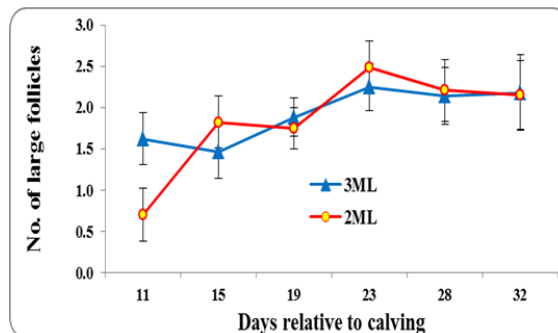
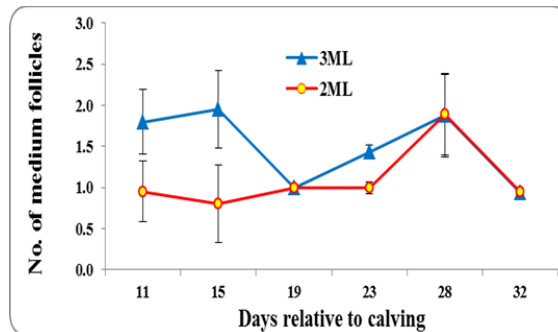
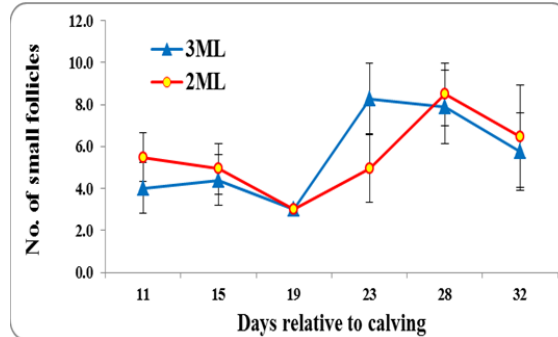
תרשים מספר 6. ריכוזי NEFA ו- AST בפלסמה



מערכת הרבייה

בצענו סריקה של התפתחות זקימים בשחלה באולטרסאונד פעמיים בשבוע מיום 10 ועד לקבלת ביוץ ראשון, או יום לאחר המלטה. התוצאות מוצגות בתרשים מספר 7. הזקימים נותחו לפי 3 קבוצות: (1) זקימים קטנים שקוטרם 2-5 מ"מ, (2) זקימים בינוניים – שקוטרם 6-9 מ"מ, (3) זקימים גדולים – שקוטרם מעל 9 מ"מ. כפי שנראה מהתרשים לא נמצאו הבדלים משמעותיים בדינמיקה של התפתחות הזקימים בשחלה.

תרשים מספר 6. דינמיקה של התפתחות זקיקים בשחלה



בנוסף קבענו את ריכוזי הפרוגסטרון בדם מיום 10 לאחר ההמלטה ועד לקבלת ביוץ ראשון. נמצא כי 10% מן הפרות בקבוצת ה- 3ML בייצו עד יום 15 לאחר ההמלטה, לעומת 40% בקבוצת ה- 2ML ($P < 0.03$). כמו כן 5% מן הפרות בקבוצת ה- 2ML בייצו לאחר 30 יום מהמלטה, לעומת 20% בקבוצת ה- 3ML ($P < 0.1$).

בנוסף שאבנו זקיקים פרהאובלוטוריים מ- 16 פרות, 8 מכל טיפול, על מנת לקבוע את איכותו של הזקיק המבייץ בהשפעת הטיפולים. התוצאות מוצגות בטבלה מספר 5. כפי הנראה מן הטבלה, לא נמצאו הבדלים בגודלם של הזקיקים בין הטיפולים, וכן לא נמצאו הבדלים בריכוז ההורמונים הסטרואידים.

טבלה מספר 5. קוטר וריכוז הורמונים סטרואידים בזקיקים פרהאובולוטוריים לפי הטיפולים

	Treatments ²		SEM	P value
	3ML	2ML		
Cows, n	8	8		
Follicles aspirated, n	21	19		
Atretic follicles, n	8	11		
E2-Active follicles, n	13	9		
Diameter, mm	12.9	11.4	0.88	0.82
Volume, mL	1.55	1.61	0.30	0.93
Progesterone, ng/mL	49.4	55.1	14.1	0.78
Androstenedione, ng/mL	55.9	70.5	17.5	0.56
Estradiol, ng/mL	1509.4	1948.5	265.0	0.26
Estradiol:Progesterone ratio	56.9	45.6	12.5	0.53
Total estradiol content, µg	2.57	3.78	1.1	0.46
Total progesterone content, µg	0.14	0.10	0.07	0.70
Total androstenedione content, µg	0.08	0.16	0.05	0.23

למרות המדגם הקטן, אנו מציגים את ביצועי הפוריות של הפרות ללא ניתוח סטטיסטי.

טבלה מספר 6. ביצועי פוריות של הפרות (ללא מבחן סטטיסטי)

	Treatments	
	3ML	2ML
Day to first heat	69.4	68.0
Conception rate first AI	44.4	50
Conception rate second AI	40	50
Conception rate 1+2 AI	42.9	50
Rest days	82	79
Days from first AI to conception	27	21
Days open	109	100

נראה שהיה שיפור (מספרי) בשיעורי ההתעברות, בימי הסרק ובימי הריק בקבוצת ה-2 חליבות.

מרקרים לעקה

בדוגמאות הדם אספנו בדקנו את ריכוזי קורטיזול וה- (MDA) malondialdehyde, שהינו מרקר לעקה חמצונית. ריכוזי ה- MDA יותר נמוכים ב-44% בפרות ה-2ML ($P < 0.05$), וריכוזי הקורטיזול נטו להיות נמוכים יותר בקבוצה זו בשבועיים הראשונים לאחר ההמלטה ($P < 0.1$).

פרויטאומיקה של חלבונים ברקמת הכבד

נותחו דוגמאות כבד של ארבע פרות מקבוצת 2ML (פרה אחת הוצאה מהניתוח עקב מחלה) וחמש פרות מקבוצת 3ML. ממצאי האנליזה הפרוטאומית הראו ביטוי של 2489 חלבונים ברקמות הכבד. מתוכם, הכמות של 38 חלבונים (1.5%) הייתה גבוהה יותר בכבד של פרות הטיפול לעומת הביקורת (Fold $P < 0.05$, change ± 1.5). רשימת החלבונים שכמותם הייתה שונה מופיעה בטבלה מספר 7 .

טבלה מספר 7: רשימת החלבונים שכמותם הייתה שונה בכבד של פרות שנחלבו 2 או 3 פעמים ביממה

Entry name	Protein name	Trt/Control FC	P-value
TRIM56	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56	122763.1	0.00
ITGAL	Integrin alpha-L	1.7	0.00
TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha	-1.6	0.00
ADSSL1	Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	-1.5	0.01
HACD3	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	-1.6	0.01
NDUFB5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5	1.6	0.01
MAN2A1	Alpha-mannosidase	1.7	0.01
PIK3R1	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha	125801.7	0.01
ITGB3	Integrin beta	1.7	0.01
ABCB10	ATP-binding cassette sub-family B member 10	-1.7	0.02
SNTB1	Beta-1-syntrophin	-1.5	0.02
TGFBI	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3, Beta ig-h3	1.5	0.02
SERPINF2	Alpha-2-antiplasmin, Alpha-2-AP	1.7	0.02
TSFM	Elongation factor Ts	-1.8	0.02
PYCR3	Pyrroline-5-carboxylate reductase 3	2.0	0.02
SERPINF1	Pigment epithelium-derived factor	1.5	0.02
CARKL	Carbohydrate kinase-like	-1.9	0.02
ACTB	Actin, cytoplasmic 1	-1.5	0.02
LOC100298868	Uncharacterized protein	2.3	0.03
S100A10	Protein S100-A10	1.5	0.03
SLC29A1	Equilibrative nucleoside transporter 1	1.7	0.03
IGJ	Immunoglobulin J chain	1.8	0.03
SORD	Sorbitol dehydrogenase	-1.9	0.03
RPL4	60S ribosomal protein L4	1.5	0.03
GC	Vitamin D-binding protein	4	0.03
NQO2	Ribosyldihydronicotinamide dehydrogenase	-1.7	0.03
PF4	Platelet factor 4	1.6	0.04
ASXL3	ASXL transcriptional regulator 3	-2.1	0.04
SORT1	Sortilin	1.7	0.04
CKM	Creatine kinase M-type	82.2-	0.04
KARS	Lysine--tRNA ligase	-1.8	0.04
NEDD8	NEDD8	1.6	0.04

GPLD1	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	1.8	0.04
CATHL6	Cathelicidin-6	1.5	0.04
RPL14	60S ribosomal protein L14	-5.0	0.04
PSMB5	Proteasome subunit beta type-5	-2.3	0.05
ACOX2	Acyl-coenzyme A oxidase	-1.5	0.05
PSMD7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	1.6	0.05

ביצענו ניתוח ביואינפורמטי באמצעות תוכנת Ingenuity (Qiagen) לרשימת המסלולים העיקריים שהשתנו עפ"י החלבונים שכמותם השתנתה בכבד של פרות הטיפול לעומת הביקורת. עשרים ושמונה מתוך החלבונים זוהו ע"י התוכנה, ולגבי כל אחד מהם מופיע המיקום של החלבון בתא וסוג החלבון (טבלה מספר 8)

טבלה מספר 8: המיקום של החלבון בתא וסוג החלבון שזוהו ע"י Ingenuity בכבד של פרות שנחלבו 2ML או 3ML ביממה

Symbol	Location	Type(s)
ABCB10	Cytoplasm	transporter
ACTB	Cytoplasm	Other
ADSSL1	Cytoplasm	enzyme
GC	Extracellular Space	transporter
GPLD1	Cytoplasm	enzyme
HACD3	Cytoplasm	enzyme
ITGAL	Plasma Membrane	Transmembrane receptor
ITGB3	Plasma Membrane	Transmembrane receptor
JCHAIN	Extracellular Space	other
MAN2A1	Cytoplasm	enzyme
NDUFB5	Cytoplasm	enzyme
NEDD8	Nucleus	enzyme
NQO2	Cytoplasm	enzyme
PF4	Extracellular Space	Cytokine
PIK3R1	Cytoplasm	Kinase
PSMB5	Cytoplasm	Peptidase
PSMD7	Cytoplasm	Other
PYCR3	Cytoplasm	Enzyme
RPL14	Cytoplasm	Other
SHPK	Cytoplasm	Kinase
SLC29A1	Plasma Membrane	transporter
SNTB1	Plasma Membrane	Other
SORD	Cytoplasm	Enzyme
SORT1	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
TCP1	Cytoplasm	Other
TGFBI	Extracellular Space	Other
TRIM56	Cytoplasm	Enzyme
TSFM	Cytoplasm	Translation regulator

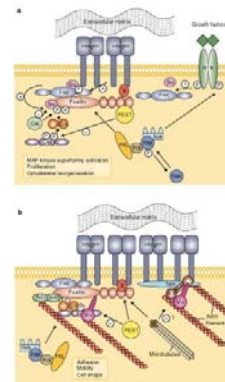
המסלולים העיקריים שהשתנו בין הטיפולים מופיעים בטבלה מספר 9. כפי שניתן לראות, 4 חלבונים מהמסלולים: Integrin ,NRF2-mediated Oxidative Stress Response , Paxillin signaling , Signaling ,Caveolar-mediated Endocytosis Signaling , 3 חלבונים מהמסלולים: Fcy Receptor- mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes ,ILK Signaling ,Granulocyte Adhesion and Diapedesis היו שונים וחלבון אחד מהמסלול Sorbitol Degradation I היה שונה בין קבוצת הטיפול לביקורת.

טבלה מספר 9: רשימת מסלולים עיקריים שבהם נראה שינוי בביטוי החלבונים

Ingenuity Canonical Pathways	Log (p- value)	Molecules
Paxillin Signaling	4.57	PIK3R1, ACTB, ITGAL, ITGB3
Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	3.84	ACTB, ITGAL, ITGB3
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	3.74	ACTB, PIK3R1, NQO2, HACD3
Integrin Signaling	3.57	PIK3R1 ACTB, ITGAL, ITGB3
Fcy Receptor- mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes	3.49	ACTB, PIK3R1, GPLD1
Sorbitol Degradation I	2.83	SORD
Granulocyte Adhesion and Diapedesis	2.8	PF4, ITGAL, ITGB3
ILK Signaling	2.57	ACTB, PIK3R1, ITGB3

מסלול ה-Paxillin signaling היה שונה בכבד של פרות שנחלבו פעמיים או 3 ביממה. החלבון Paxillin הינו multi-domain adaptor אשר נמצא בממשק שבין הממברנה של התא לבין השלד התוך-תאי, שם הוא מספק פלטפורמה לאינטגרציה ועיבוד של אותות הקשורים להידבקות ולפקטורי גידול (Turner, 2000). כפי שמוצג בתרשים מספר 7, החלבונים האינטגרניים מהווים חלק ממסלול הפעולה של חלבון ה-Paxillin, ואכן בממצאים הפרוטאומיים נמצא כי חלבוני ITGAL, ITGB1 נבדלו בביטויים בכבד של פרות שנחלבו פעמיים או 3 ביממה, ומסלול ה- Integrin Signaling היה גם כן שונה באופן מובהק בכבד של פרות אלו (טבלה מס' 7).

תרשים מספר 7 - מסלול Paxillin signaling (מתוך Turner, 2000):



בנוסף, בעבודה זו נמצא כי מסלול ה- nrf2-mediated oxidative stress response היה שונה בכבד של פרות שנחלבו פעמיים או שלוש ביממה. זהו מסלול מרכזי שמשותף בהגנה התאית מפני עקה חימצונית, ו-Nrf2 הינו גורם שיעתוק אשר מבקש את הביטוי של מספר חלבונים נוגדי-חימצון ו-cytoprotective כגון FTL ו-CBR1 NADPH-dependent (Nyuyen et al., 2009; Wu et al., 2011). בעבודה קודמת נמצא כי בפרות שממליטות בעונת הקיץ בה יש עקה חימצונית גבוהה יותר, ישנו שפעול של מסלול ה-Nrf2 oxidative stress response (Zachut et al., 2017). בעבודה זו נמצאו ריכוזים נמוכים יותר של MDA בפלסמה של פרות שנחלבו פעמיים לעומת 3, מה שיכול להתקשר לממצאים לגבי מסלול זה בכבד. כמו כן, במחקר בו בחנו את ההשפעה של עקת חום על ביטוי חלבונים בכבד של פרות לאחר ההמלטה נמצא כי מסלול ה-Nrf2 oxidative stress response היה שונה בפרות שצוננו או לא צוננו בסוף ההיריון, ממצא המעיד על החשיבות הרבה שיש למסלול זה בהתאמת התגובה של הכבד לעקה חימצונית (Skibiell et al., 2018). חשוב לציין כי גם עקה חימצונית קלה עשויה להביא לתוצאות הרסניות על בריאות הכבד, על חיות ההפטוציטים ועל מבנה ותפקוד הרקמה (Nicholls, 2004). כמו כן, ייצור של רמות גבוהות של ROS נמצא בקשר ישיר בפתוגנזה של מספר מחלות (Lin and Beal, 2006; Rezaie et al., 2007).

דיון

לתדירות חליבה יש אפקט משמעותי על תנובת החלב, ובעיקר בראשית התחלובה. בעבודת מחקר זו הראינו כי ניתן לחלוב פרות פעמיים ביממה בחודש הראשון עם פגיעה מינורית בתנובות, אבל עם שיפור בסטטוס המטבולי של הפרות, מועד ביוץ ראשון ואינדיקציות לשיפור בביצועי הפוריות. ממצא נוסף חשוב מעבודה זו הוא שלא היה אפקט שלילי מתמשך על תנובת חלב בהמשך התחלובה כתוצאה מכך שפרות אלה נחלבו רק פעמיים ביממה בחודש הראשון.

בעבודה של Erdman and Varner משנת 1995, נסקרו 19 עבודות עם 2 או 3 חליבות, ונמצא כי העלייה בתנובת החלב מ-3 חליבות (3X) בהשוואה ל-2 חליבות (2X) הייתה קבועה – 3.5 ק"ג ליום – ללא קשר לרמת התנובה היומית של הפרות. באופן מעניין, גם בעבודה הנוכחית תנובת החלב עלתה ב-3.8 ק"ג ליום, מאוד דומה לסקירה של Erdman and Varner, למרות שתנובת החלב של הפרות בעבודה הנוכחית הייתה כפולה. כלומר באחוזים, העלייה בתנובת החלב בעבודה שלנו כתוצאה מחליבה נוספת הייתה 9.4%, לעומת 18.3% במאמר הסקירה, ללא השפעה שלילית על המשך התחלובה. המשמעות היא שככל שתנובת החלב של הפרות תעלה, ההפרש באחוזים בין 2 ל-3 חליבות ילך ויצטמצם. יש לכך משמעות חשובה מבחינה כלכלית, וכן על המנגנון הגורם לעלייה בתנובת החלב עם הגברת תדירות החליבה.

מספר עבודות בארץ ובעולם בחנו את העלאת תדירות החליבה בראשית התחלובה, ומצאו עלייה בתנובת החלב עם אפקט מתמשך חיובי על שאר התחלובה. תנובת החלב נקבעת לפי כמות התאים המפרישים ברקמת העטין ופעילות התאים (Capuco et al., 2001). למרות עבודות רבות שנעשו בנושא, לא ברור לגמרי המנגנון שגורם לעלייה בתנובת החלב עם הגברת תדירות החליבה. עבודה מאוד מעניינת של Wall and McFadden משנת 2007, הראתה שהמנגנון הינו מקומי ולא סיסטמי. בעבודה זו 2 רבעים נחלבו פעמיים, ו-2 רבעים נחלבו 4 פעמים ביממה. נמצא שתנובת החלב עלתה רק ברבעים שנחלבו 4 פעמים, ולא על אלה שנחלבו פעמיים, מה שמעיד על מנגנון מקומי ברקמת העטין. בעבודה נוספת של Hale et al. משנת 2003 נמצאה עלייה בתנובת החלב עם הגברת תדירות החליבה, אבל לא נמצאו הבדלים במידת השגשוג של התאים המפרישים. ברוב העבודות, ההפרש בתדירות החליבה שבחנו מנגנונים היה לפחות 2 ולעיתים אף 3. בעבודה שלנו ההפרש היה חליבה אחת, ויכול להיות שזו אחת הסיבות לכך שלא היה אפקט שלילי ל-2 חליבות בחודש הראשון, והפרות סגרו את הפער תוך מספר ימים.

לחץ תוך עטיני הוצע כאחד מן הגורמים המווסתים את תנובת החלב (Wall and McFadden, 2012). בנוסף, ההפרש הקבוע בכמות (ק"ג חלב) במעבר מ-2 ל-3 חליבות (Erdman and Varner, 1995) יכול להעיד על הלחץ התוך עטיני כפקטור דומיננטי בקביעת תנובת החלב.

מוצקים בחלב - אחוז השומן בחלב היה גבוה ב- כ 7% בקבוצת 2ML מאשר בקבוצת ה- 3ML. עבודות נוספות הראו ירידה באחוז השומן עם העלאת תדירות החליבה (Hale et al., 2003;)

(Soberon et al., 2011), אבל לא בעבודה של Wall and McFadden (2007). כמו כן בעבודה שלנו, גם לאחר המעבר ל-3 חליבות, אחוז השומן בקבוצת ה-2ML היה גבוה יותר, מה שנמצא גם בעבודתם של Hale et al. (2003). בחודש הראשון ניתן להסביר את אחוז השומן הגבוה בקבוצת ה-2ML בתנובת החלב הנמוכה יותר, ואולם לאחר מכן תנובות החלב היו זהות, ובכל זאת אחוז השומן היה גבוה יותר בקבוצת ה-2ML – מה שמעיד אולי על השפעה חיובית ארוכת טווח על אחוז השומן בחלב. לא נמצאו הבדלים באחוז החלבון בין הטיפולים, בדומה לעבודות אחרות.

למרות ההבדלים בתנובת החלב, תנובות החמ"ש (4%) היו דומות בתקופה הראשונה, ומ-31 עד 100 יום היו אף גבוהות יותר ב-5.1% בקבוצת ה-2ML. תנובת האנרגיה בחלב (ECM) נטתה להיות גבוהה יותר בקבוצת ה-3ML בתקופה הראשונה, אבל בתקופה השנייה נטתה להיות גבוהה יותר בקבוצת ה-2ML. ממצאים אלה לא דווחו בעבודות אחרות, למרות שיש להם חשיבות מבחינת המנגנון: האם ההשפעה היא רק על נפח החלב, או על פוטנציאל הייצור, הכולל את החמ"ש והפרשת אנרגיה בחלב. תוצאות העבודה הנוכחית מראות כי ההשפעה היא בעיקר על נפח החלב, ופחות על פוטנציאל הייצור כפי שמתבטא בתנובות החמ"ש וה-ECM.

בניתוח תוצאות הייצור לכל התקופה (100 יום, טבלה מספר 3), לא נמצאו הבדלים בתנובת חלב, חמ"ש ו-ECM. כמו כן נמצא כי אחוז ותנובת השומן היו גבוהים יותר בקבוצת ה-2ML, ואילו תנובת החלבון והלקטוז היו גבוהים יותר בקבוצת ה-3ML. גם בניתוח תנובת החמ"ש עד 100 יום לא נמצאו הבדלים בין הקבוצות. היעילות לייצור חמ"ש, הייתה גבוהה יותר בקבוצת ה-2ML. תוצאות אלה מעידות על השפעה מינורית על הייצור כאשר חולבים פעמיים ביום בחודש הראשון, ובהתחשב בגורמים נוספים כמו כוח עבודה ובלאי של הציוד, מבחינה כלכלית נראה כי יש יתרון לחלוב פעמיים ביום בחודש הראשון.

הסטטוס המטבולי של הפרות - המטרה העיקרית של עבודה זו הייתה שיפור הסטטוס המטבולי של פרות, ואכן, ריכוז הגלוקוז היה גבוה יותר, וריכוז ה-BHBA היה נמוך יותר בקבוצת ה-2ML. כמו כן מאזן האנרגיה בחודש הראשון היה חיובי יותר בקבוצת ה-2ML. בעבודה של Bar-Peled et al (1998), העלאת תדירות החליבה (מ-3 ל-6) פגעה במאזן האנרגיה של הפרות. בעבודה הנוכחית, כפי שהובא לעיל, השיפור במאזן האנרגיה לווה באופן יחסית בירידה מינורית בייצור.

באופן מעניין, למרות הירידה בריכוזי ה-BHBA בקבוצת ה-2ML, ריכוזי ה-NEFA היו גבוהים יותר בקבוצה זו. ריכוזי NEFA גבוהים יכולים להעיד על פירוק רקמות מוגבר, אבל לא נמצאו עדויות לכך בבדיקה של משקלי הגוף. ריכוזי ה-NEFA בדם הוא מאזן בין פירוק רקמות, ניצולם בכבד ופינוי מן הדם. אנו משערים שריכוזים גבוהים אלה של NEFA בקבוצת ה-2ML נובעים בין היתר מתדירות פינוי נמוכה יותר מן הדם לרקמת העטין.

מאזן האנרגיה מ- 30 ועד 100 יום בתחלובה היה חיובי בשתי הקבוצות, אבל גבוה יותר בקבוצת ה-3ML. זה נבע בעיקר מכך שבתקופה השנייה הייתה עלייה ב- 23.7% בתנובת ה-ECM בקבוצת ה-2ML, לעומת 14.3% בקבוצת ה-3ML. לעומת זאת העלייה צריכת המזון הייתה זהה. בעבודה של Capuco et al. משנת 2001, נמצא כי העלייה בתנובת החלב עד לשיא תחלובה נובעת בעיקרה מעלייה בפעילות של התאים ולא משגשוג נוסף של תאים מייצרים. ניתן לשער שהעלייה בתנובה בקבוצת ה-2ML לאחר המעבר ל-3 חליבות נבעה בעיקרה כתוצאה מהגברת פעילות התאים ולא משגשוג נוסף של תאים. יכול להיות שמערכת העיכול הייתה במקסימום תפוקה בשתי הקבוצות, ולכן העלייה בתנובה בקבוצת ה-2ML ללא עלייה מקבילה בצריכת המזון גרמה למאזן שלילי נמוך יותר בתקופה השנייה בקבוצה זו.

השפעות על מערכת הרבייה – עבודות רבות בחנו את הקשר בין תנובת החלב, מאזן האנרגיה ומערכת הרבייה, ואחד האפקטים השליליים של מאזן האנרגיה השלילי לאחר המלטה הוא עיכוב במועד הביוץ הראשון (Butler and Smith, 1989). ביוץ מוקדם נמצא כמספר את ביצועי הפוריות (Galvao et al., 2010). בעבודה הנוכחית 2 חליבות ביממה שיפרו את מאזן האנרגיה ותרמו להופעת ביוץ ראשון מוקדם יותר. למרות זאת לא נמצא שיפור באיכותם של הזקיקים הפראובולטוריים שנשאבו בין 70 ל-80 יום לאחר ההמלטה. יכול להיות שהדבר נבע בין היתר מכך שמאזן האנרגיה בתקופה השנייה היה אף טוב יותר בקבוצת ה-3ML. למרות זאת, הייתה אינדיקציה לביצועי פוריות טובים יותר בקבוצת ה-2ML לעומת 3ML.

מרקרים לעקה ופרוטיאומיקה של הכבד - 2 סמנים שנבחנו, קורטיזול ו-MDA היו בריכוזים נמוכים יותר בפרות ה-2ML לעומת 3ML. תוצאות אלה תואמות עם אחד המסלולים שנמצא בפרוטיאומיקה של הכבד, NRF2-mediated Oxidative Stress Response, שהיה שונה בין הטיפולים. תוצאות אלה מראות כי הפרות שנחלבו פעמיים ביממה, היו תחת עקה נמוכה יותר, ויכול להיות שזה מתקשר גם לכך שהן רבצו כ-38 דקות יותר ביממה מאשר פרות שנחלבו 3 חליבות.

סיכום ומסקנות

תוצאות עבודה זו מראות כי ל-2 חליבות בחודש הראשון יש השפעה חיובית על מאזן האנרגיה והסטטוס המטבולי של הפרות, עם השפעה מינורית על הייצור. בחודש הראשון תנובת החלב אכן הייתה יותר גבוהה בפרות ה-3ML, אבל אחוז השומן היה נמוך יותר ולכן תנובת החלב הייתה זהה, ואף גבוהה יותר בתקופה השנייה בקבוצת ה-2ML. מסקנה חשובה נוספת היא שאין השפעה שלילית ארוכת טווח על התנובות בהמשך התחלובה כתוצאה מ-2 חליבות בחודש הראשון. הממצאים מעבודה זו מאששים תוצאות סקירה משנות ה-90 המראה שהפרש בין 2 ל-3 חליבות הינו קבוע ועומד על 3-4 ק"ג חלב ליום, ללא קשר לרמת התנובה. המשמעות היא שככל שתנובת החלב תעלה, ההפרש בתנובה בין 2 ל-3 חליבות ירד פרופורציונאלית.

הפרות עם 2 חליבות הקדימו לבייץ, אבל לא נמצא הבדל בדינמיקה של התפתחות הזקינים בשחלה, או באיכותו של הזקיק המבייץ. ואולם, נמצאה אינדיקציה לביצועי פוריות טובים בקבוצה ה- 2 חליבות.

בסמני עקה שנבחנו, קורטיזול ו-MDA נמצאו בריכוזים נמוכים יותר בפרות ה- 2ML לעומת 3ML, שנמצא במתאם עם הבדלים בין הטיפולים באחד המסלולים שנמצא בפרוטיאומיקה של הכבד, NRF2-mediated Oxidative Stress Response.

לסיכום, 2 חליבות ביממה במהלך החודש הראשון לתחלובה שיפר את הסטטוס המטבולי ומערכת הרבייה של הפרות, עם הבדלים מינוריים בתנובות.

הערה: עבודת מחקר זו הינה עבודת המסטר של הדר קמר.

מעבודת מחקר התקבל מאמר לפרסום ב- **Journal of dairy Science**

2.7. רשימת ספרות מצוטטת

Beam S. W. and W. R. Butler. 1998. Energy Balance, Metabolic Hormones, and Early Postpartum Follicular Development in Dairy Cows Fed Prilled Lipid. J Dairy Sci 81:121–131

Butler, W. R., R. W. Everett, and C. E. Coppock. 1981. The relationships between energy balance, milk production and ovulation in postpartum Holstein cows. J. Anim. Sci. 53:742.

Butler W. R. and R. D. Smith. 1989. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. J. Dairy Sci. 72:767-783

Erdman R. and M Varner. 1995. Fixed Yield Responses to Increased Milking Frequency. J Dairy Sci. 78:1199-1203

Gumen, A., R. R. Rastani, R. R. Grummer, and M. C. Wiltbank. 2005. Reduced Dry Periods and Varying Prepartum Diets Alter Postpartum Ovulation and Reproductive Measures. J. Dairy Sci. 88:2401–2411

Lin, M. T., and M. F. Beal. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature 443:787–795.

- Lopez**, H., L.D. Satter, M.C. Wiltbank. 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 81 (2004) 209–223.
- Moallem**, U., A. Bor, A. Arav, Y. Folman, and D. Sklan. 1999. Effect of calcium soaps of fatty acids and administration of somatotropin on milk production, preovulatory follicular development and plasma and follicular fluid lipid composition in high yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:2358–2368.
- Moallem**, U., M. Kaim, Y. Folman, and D. Sklan. 1997. Effect of calcium soaps of fatty acids and administration of somatotropin in early lactation on productive and reproductive performance of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2127–2136.
- Moallem**, U., Y. Folman and D. Sklan. 2000. Effects of Somatotropin and Dietary Calcium Soaps of Fatty Acids in Early Lactation on Milk Production, Dry Matter Intake, and Energy Balance of High-yielding Dairy Cows. *J Dairy Sci* 83:2085–2094
- Moallem** U, Shafran A, Zachut M, Dekel I, Portnick Y, Arieli A. 2013. Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF performance in dairy cows, similar to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil. *Reproduction* 146(6):603-14.
- Nguyen**, T., P. Nioli, and C. B. Pickett. 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 284:13291–13295.
- Nicholls**, D. G. 2004. Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* 3:35–40.
- Rajala-Schultz** PJ, Frazer GS. Reproductive performance in Ohio dairy herds in the 1990s. *Anim Reprod Sci* 2003, 76: 127–142.
- Rastani**, R. R., R. R. Grummer, S. J. Bertics, A. Gumen, M. C. Wiltbank, D. G. Mashek, and M. C. Schwab. 2005. Reducing dry period length to simplify feeding transition cows: Milk production, energy balance, and metabolic profiles. *J. Dairy Sci.* 88:1004–

1014.

Reid, I. M., C. J. Roberts, and R. Monston. 1979. Reduced fertility associated with fatty liver in high yielding dairy cows. *Vet. Sci. Commun.* 3:231.

Rezaie, A., R. D. Parker, and M. Abdollahi. 2007. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: An epiphenomenon or the cause? *Dig. Dis. Sci.* 52:2015–2021.

Sklan, D., M. Kaim, U. Moallam, and Y. Folman. 1994. Effect of dietary calcium soaps on milk yield, body weight, reproductive hormones, and fertility in first parity and older cows. *J. Dairy Sci.* 77:1652.

Sklan, D., U. Moallem, and Y. Folman. 1991. Effects of feeding calcium soaps of fatty acids on production and reproduction responses in high production lactating cows. *J. Dairy Sci.* 74:510.

Stevenson J.S. and E.P. Call. 1983. Influence of early estrus ovulation and insemination on fertility in postpartum Holstein cows. *Theriogenology* 19:367.

Van Arendonk JAM, Hovenier R, De Boer W. Phenotypic and genetic association between fertility and production in dairy cows. *Livest Prod Sci* 1989, 21: 1–12.

Westwood CT, Lean IJ, Garvin JK. Factors influencing fertility of Holstein dairy cows: a multivariate description. *J Dairy Sci.* 2002, 85:3225–3237.

Zachut M, Dekel I, Lehrer H, Arieli A, Arav A, Livshitz L, Yakoby S, Moallem U. 2010. Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality. *J Dairy Sci.* 93(2):529-45.

Zachut, M., G. Kra, L. Livshitz, Y. Portnick, S. Yakoby, G. Friedlander, and Y. Levin. 2017. Seasonal heat stress affects adipose tissue proteome toward enrichment of the Nrf2-mediated oxidative stress response in late-pregnant dairy cows. *J. Proteomics* 158:52–61.

Wu, K. C., J. Y. Cui, and C. D. Klaasen. 2011. Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption. *Toxicol. Sci.* 123:590–600.

Moallem, U., A. Bor, A. Arav, Y. Folman, and D. Sklan. 1999. Effect of calcium soaps of fatty acids and administration of somatotropin on milk production, preovulatory follicular development and plasma and follicular fluid lipid composition in high yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:2358–2368.

Moallem, U., M. Kaim, Y. Folman, and D. Sklan. 1997. Effect of calcium soaps of fatty acids and administration of somatotropin in early lactation on productive and reproductive performance of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2127–2136.

Moallem, U., Y. Folman and D. Sklan. 2000. Effects of Somatotropin and Dietary Calcium Soaps of Fatty Acids in Early Lactation on Milk Production, Dry Matter Intake, and Energy Balance of High-yielding Dairy Cows. *J Dairy Sci* 83:2085–2094

Moallem U, Shafran A, Zachut M, Dekel I, Portnick Y, Arieli A. 2013. Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF performance in dairy cows, similar to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil. *Reproduction* 146(6):603-14.

Sklan, D., M. Kaim, U. **Moallam**, and Y. Folman. 1994. Effect of dietary calcium soaps on milk yield, body weight, reproductive hormones, and fertility in first parity and older cows. *J. Dairy Sci.* 77:1652.

Sklan, D., U. **Moallem**, and Y. Folman. 1991. Effects of feeding calcium soaps of fatty acids on production and reproduction responses in high production lactating cows. *J. Dairy Sci.* 74:510.

Zachut M, Dekel I, Lehrer H, Arieli A, Arav A, Livshitz L, Yakoby S, **Moallem** U. 2010.
Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality.
J Dairy Sci. 93(2):529-45.