

ד"ח מדעי סופי תוכנית מס' 362-0552-20תוכן העניינים

1.1	תוכן העניינים
1.2	שם ההצעה.....1
1.3	שמות כלל השותפים למחקר, שטח הפעולה של כל משתתף וחלקו במחקר.....1
1.4	תקציר מדעי של תכנית המחקר.....1
1.5	מבוא ותיאור הבעיה כולל סקירת ספרות.....2
1.6	מטרות המחקר.....4
1.7	תיאור קצר וממוקד של הפעלת המחקר.....4
1.8	התאמת המחקר ליעדי הנהלת ענף בקר.....5
1.9	החידוש המדעי והתועלת לחקלאות הצפויים מביצוע התכנית.....5
1.10	תקציב המחקר שאושר ופירוט לכל חוקר.....5
1.11	רשימת ספרות מצוטטת6
1.12	רשימת 5 פרסומים אחרונים של כל חוקר הרלוונטיים לנושא המחקר.....7

1.2. שם ההצעה: בחינת שיפור הסטטוס החיסוני של פרות בוגרות ויונקים באמצעות מתן חומצות שומן מסוג אומגה-3

The effects of omega-3 fatty acids supplementation on the immune status of transition cows and young calves

3. שמות השותפים למחקר ושטח הפעולה של כל משתתף:

- פרופ' עוזי מועלם - המחלקה לחקר בקר וצאן, המכון לחקר בע"ח, מינהל המחקר החקלאי, uzim@volcani.agri.gov.il – אחראי על נושא ההזנה והיונקים, ביצוע הניסויים וניתוח הנתונים.
- ד"ר מאיה זכות - המחלקה לחקר בקר וצאן, המכון לחקר בע"ח, מינהל המחקר החקלאי, mayak@volcani.agri.gov.il – אחראית על בחינת תפקוד מערכת החיסון, ביצוע הניסויים והאנליזות וניתוח הנתונים.

1.4 תקציר

התדירות ומידת החומרה של תחלואה מטבולית וזיהומית הינה גבוהה ביותר בתקופת המעבר. אחת הסיבות לכך הינה שינויים בתפקוד מערכת החיסון, כאשר תגובה דלקתית לא מבוקרת מהווה גורם מקשר בין מספר מחלות מטבוליות וזיהומיות. לתחלואה בתחילת התחלובה יש השלכות על רווחת החיה ועל הביצועים במשך כל התחלובה. תפקוד מערכת החיסון בתקופת המעבר מהווה תחום חדש בהבנת הפיזיולוגיה של פרות חלב גבוהות תנובה. ניתן לשער כי החלמה מהירה מהמצב דלקתי תאפשר הסתגלות אופטימלית לתחילת התחלובה. במספר עבודות שרובן נעשו *in vitro* נמצא כי חומצות שומן מסוג אומגה-3 משפרות את פעילות המערכת החיסונית, אולם חסר בספרות מידע מניסויים *in vivo* על ההשפעות של אומגה-3 על פעילות מערכת החיסון בפרות חלב סביב ההמלטה. בניסוי שערכנו לאחרונה ברפת מסחרית נמצא כי הזנה באומגה-3 שיפרה מדדי בריאות בפרות לאחר ההמלטה אשר הייתה עשויה לנבוע משיפור במדדי חיסון, אולם אספקט זה לא נבחן בניסוי. יתרה מכך, בעבודה קודמת שביצענו הראינו כי הזנה של פרות בסוף ההיריון עם חומצות מסוג אומגה-3 העלתה את שיעורן של חומצות שומן אלו בדם הוולדות מיד לאחר ההמלטה. לכן, בעבודה זו בחנו גם את השפעת הזנת הפרה ההרה באומגה-3 על מדדי הבריאות של היונקים בתקופת הינקות. במסגרת מחקר זה נעשה ניסוי אינטנסיבי במהלך חורף 2018-2019 ברפת ההזנה הפרטנית עם 42 פרות ממליטות. הניסוי החל באוקטובר 2018 והסתיים בסוף מרץ 2019. בניסוי זה ניתנו 3 סוגי שומן מוגן, קבוצת שומן רווי (CTL), קבוצת הפשתה (FLX) עשירה ב-ALA, וקבוצת שמן דגים (FO) עשירה ב-DHA ו-EPA. דגמנו דם מהאימהות והוולדות, ובהן קבענו ריכוזם של פרמטרים רבים, וביניהם גלוקוז, NEFA, טריגליצרידים, AST ועוד. כמו כן, נערך מעקב אחר מדדי חיסון שונים (ריכוזי ציטוקינים בדם והרכב אוכלוסיות תאי דם לבנים). במהלך הניסוי ביצענו ביופסיות ממספר רקמות, על מנת לבחון את תפקוד מערכת החיסון ברקמות אלה. ביצענו ביופסיות מרקמת השומן, רקמת הכבד, וכן מרירית הרחם. בנוסף בצענו ACTH challenge ל-8 פרות מכל טיפול ובדקנו הפרשת קורטיזול. כמו כן דגמנו דם מן הוולדות מיד לאחר ההמלטה ולאחר 3 ימים.

תוצאות הייצור לא הראו הבדלים בתנובות החלב, חמ"ש (FCM) או תפוקת האנרגיה בחלב (ECM) בין הטיפולים השונים, ורק אחוז השומן היה גבוה יותר בקבוצת ה-FLX לעומת ה-SFA. צריכת המזון לאחר ההמלטה הייתה נמוכה בקבוצת ה-FLX וגרמה למאזן אנרגיה נמוך יותר בקבוצה זו. לא ברורה לנו הסיבה לירידה בצריכת המזון בקבוצה זו, תוצאה שלא נצפתה אצלנו בניסויים קודמים. למרות מאזן האנרגיה השונה בין הקבוצות, לא נמצאו הבדלים בין הטיפולים בריכוזם בדם של גלוקוז, BHBA ו-NEFA אחרי המלטה, מטבוליטים אשר מהווים אינדיקציה לסטטוס המטבולי של הפרות. כמו כן לא מצאנו הבדלים מובהקים בריכוז של מספר ציטוקינים בפלסמה בין הטיפולים כמו: IL2, IL6 ו-TNF α . יחד עם זאת, נראית ירידה מספרית בריכוזם של IL6 ו-TNF α בשני טיפולי האומגה-3, כאשר בקבוצת ה-FO הריכוזים היו נמוכים מאשר בקבוצת ה-FLX. תוצאות פרופיל חומצות השומן בפלסמה לפני המלטה ואחרי המלטה מראות כי יש העשרה בחומצות מסוג אומגה 3 בקבוצת ה-FLX וה-FO, וכן ירידה משמעותית ביחס n6/n3, ללא הבדלים בין הקבוצות בריכוז החומצות מסוג אומגה-6. שינויים אלה בפרופיל חומצות השומן נחשבים כחיוביים למספר מערכות בגוף, וביניהם מערכת החיסון. יש לציין כי גם לחומצות מסוג אומגה-6 יש תפקיד במערכת החיסון, אבל שיעור חומצות שומן אלה לא ירד עם מתן תוספי האומגה-3. ברקמת הכבד נמצא כי הביטוי היחסי של הגן ל-IL6 היה נמוך יותר בקבוצת ה-FLX. ברירת הרוחם נמצא כי הביטוי של הגן הדלקתי TNF α היה נמוך יותר בקבוצת ה-FLX לעומת ה-FO, ואילו הביטוי של הגן האנטי-דלקתי IL-10 ברוחם היה גבוה יותר בקבוצת ה-FLX לעומת הביקורת. בדקנו גם את הביטוי לגנים דלקתיים ברקמת השומן. לאחר ההמלטה, הביטוי היחסי של הגן הפרו-דלקתי TNF α היה נמוך יותר ברקמת השומן של קבוצת ה-FO לעומת הביקורת. בבחינת פרופיל חומצות השומן ביונקים מיד לאחר ההמלטה וכן ביום 3 לאחר מתן הקולוסטריום, מצאנו כי ריכוז ה-DHA וה-DPA עלה בדם היונקים מפרות ה-FO מיד לאחר ההמלטה, מה שמעיד על מעבר שלהן דרך השיליה, ואילו ה-ALA שהינה חומצה קצרה יותר אינה עוברת ברוחם. לאחר מתן הקולוסטריום נמצאה העשרה ב-ALA גם בדם היונקים שנולדו לאימהות ה-FLX.

ביצענו ניתוח פרוטיאומי של מקטע מתאי הדם הלבנים בהשפעת הטיפולים. בחלק זה של העבודה הפרדנו את תאי peripheral blood mononuclear cells (PBMC) מדוגמאות הדם בשבוע הראשון. קבוצת תאים זו כוללת את הלימפוציטים והמונוציטים שהם בעלי גרעין עגול, והם כוללים בין היתר תאי T ותאי B, וה-Natural Killer. ביצענו אנליזה פרוטיאומית של 18 דוגמאות PBMC (6 מכל טיפול) שהוכנו במעבדה שלנו לצורך אנליזה פרוטיאומית ביחידה לרפואה מותאמת אישית במכון וייצמן. באנליזה זו נמצאו 3807 חלבונים. ביצענו ניתוח השוואתי בין פרות הביקורת לפרות ה-FLX ופרות ה-FO. בחנו חלבונים שהיו שונים באופן מובהק ($P \leq 0.05$) ומקדם הכפלה ± 1.5 (fold change - FC). כאשר בחנו את טיפול הביקורת ביחס לטיפול ה-FLX נמצאו 44 חלבונים שונים, ביקורת ביחס ל-FO נמצאו 42 חלבונים שונים, ו-FLX ביחס ל-FO נמצאו 65 חלבונים שונים, לפי הקריטריונים שנקבעו לעיל. כאשר בחנו את אפקט הטיפולים על חלבונים תאי ה-PBMC הספציפיים, נמצאו כמה רכיבים של המערכת החיסונית, כמו p65-subunit-of-transcription-factor NF- κ B, רכיבים של מערכת המשלים, וכן מרכיבים של acute-phase-response signaling. שינויים בחלבונים אלה מעידים ככל הנראה על אפקט של ההזנה באומגה-3 על התפקודיות של מערכת החיסון. לסיכום, עבודה זו מראה כי להזנה באומגה-3 יש השפעה על רבדים שונים של המערכת החיסונית, ברקמת הדם וברקמות השונות, אשר חלקן פרו-דלקתיות וחלקן אנטי-דלקתיות. ממצאים אלה תואמים תוצאות מעבודות אחרות שנעשו in-vitro, ובהן בחנו השפעות של חומצות שומן ייחודיות אלה על המערכת החיסונית, וכן על מדדי בריאות ופוריות בניסויי שדה גדולים.

The effects of omega-3 fatty acids supplementation on the immune status of transition cows and young calves

Abstract

The transition period, from 3 weeks prepartum to 3 weeks postpartum (**PP**) in dairy cows, is characterized by several changes in immune function to prepare the cow for parturition and lactation. First, cows experience a variable degree of systemic subacute inflammation, which involves a mild increase in pro-inflammatory mediators and may contribute to chronic and progressive changes in tissue function. Dietary fats, and specifically omega-3 (n-3) fatty acids (FA), can moderate the immunological effect caused by parturition through improvements in immune function. Flaxseed oil (FLX) is one of the richest sources of the essential n-3 FA alpha-linolenic acid (ALA), and fish oil are rich in eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids, two important long-chain omega-3 FA. Therefore, the objectives of this research were to determine the effects of various n-3 FA supplemented to peripartum dairy cows on the immune function and inflammatory state. Forty-two 255-day pregnant multiparous cows were supplemented until 60 d postpartum (PP) with encapsulated fats, in treatments designated as i) SFA – saturated fat at 255 and 640 g/d/cow, prepartum and PP, respectively; ii) FLX – flaxseed oil at 300 and 750 g/d/cow prepartum and PP, respectively; and iii) FO – fish oil at 300 and 700 g/d/cow prepartum and PP, respectively. Blood samples were taken twice weekly from 21 d prepartum to 21 d PP for metabolites and cytokines, and once weekly for analysis of subpopulations of white blood cells (WBC) by flow cytometry and gene expression in WBC. Biopsies of the adipose tissue, liver and uterus were taken from subgroups of cows for expression of pro-inflammatory genes. Blood samples were also taken from calves immediately after parturition, before colostrum supply, and at 3 d of age. Milk and 4% FCM yields until 60 DIM were not different among groups, but DMI was lower in FLX than in other groups. The n-3 FA content in plasma were higher in dams and calves in FLX and FO than in CTL animals. No differences were observed among groups in blood concentrations of glucose, NEFA, BHBA and TG. During weeks -2 to 3 PP, the average blood concentration of cortisol was lower in FLX ($P = 0.04$) and tended to be lower in FO than in CTL ($P = 0.08$). Concentrations of plasma IL-2 and IL-6 were not different among groups. The average TNF- α concentrations from week 1 prepartum to 2 wks PP tended to be lower in FO than in CTL ($P = 0.1$). At week 1 PP, the average percentages of CD25 cells and gamma-delta T-cells (WC1) in blood were lower in FLX and FO compared to CTL ($P = 0.009$ and $P = 0.01$, respectively) and the percentage of CD8 in blood tended to be lower in CTL than in FO ($P = 0.1$). The relative gene expression of NF κ B in WBC at week 1 PP was lower in FLX and FO than CTL ($P = 0.02$). The relative mRNA expression of TNF- α in the uterus was lower in FO ($P = 0.006$) and tended to be lower in FLX than in CTL ($P = 0.1$), and the relative expression of IL-1 β tended to be lower in FO than in CTL ($P = 0.07$). The immune cells in the blood include the peripheral blood mononuclear cells (**PBMC**), which consist of lymphocytes and monocytes (T-cells, B cells, natural killer cells and dendritic cells), and polymorphonuclear cells. In the current study, we also examined the effects of dietary n-3 fatty acids on the proteome of PBMC. In PBMC, 3807 proteins were quantified; 44, 42 and 65 were differently abundant in FLX vs. CTL, FO vs. CTL and FLX vs. FO, respectively. In FLX vs. CTL, the abundance of the p65-subunit-of-transcription-factor NF- κ B was higher, whereas albumin, C4b-binding protein and complement factor H levels were lower. In FLX vs. FO, complement factors B and H and hemopexin were higher. The top canonical pathway enriched in FLX compared to other groups was acute-phase-response signaling. In conclusion, this research demonstrates the effects of dietary omega-3 fatty effects on several aspects of the immune system in blood and specific tissues; some of them are pro- and others are anti-inflammatory. These findings are in accordance with other research that examined the effects of these unique FA on the immune system *in-vitro*, and on health and reproduction in sophisticated small studies and large field experiments.

1.5 מבוא ותיאור הבעיה

התדירות ומידת החומרה של תחלואה מטבולית וזיהומית הינה גבוהה ביותר בראשית התחלובה (Sordillo, 2016). אחת הסיבות לכך הינה שינויים בתפקוד מערכת החיסון, כאשר תגובה דלקתית לא מבוקרת מהווה גורם מקשר בין מספר מחלות מטבוליות וזיהומיות בעלות משמעות כלכלית רבה כגון קטוזיס, היסט קיבה, דלקת עטין וצליעות (Sordillo, 2016). לתחלואה בתחילת התחלובה יש השלכות על רווחת החיה ועל הביצועים במשך כל התחלובה. למעשה, אין זה נדיר ש-50% מהתמותה של פרות ברפת מתרחשת בשבועיים הראשונים לאחר ההמלטה (Bradford et al., 2015). בחינת תפקוד מערכת החיסון בתקופת המעבר מהווה תחום חדש בהבנת הפיזיולוגיה של פרות חלב גבוהות תנובה. מספר עבודות מן השנים האחרונות הראו כי פרות לאחר ההמלטה נמצאות במצב דלקתי בהעדר תחלואה נראית לעין (Bionaz et al., 2007; Akbar et al., 2015). לאחר ההמלטה מתפתחות תגובות דלקתיות בכבד (Loor et al., 2005) וברקמת השומן (Sadri et al., 2010) אשר תורמות להיווצרות דלקת סיסטמית. בניגוד לתגובה דלקתית שמאפיינת דלקת אקוטית, התגובה הדלקתית לאחר ההמלטה הינה לעיתים קרובות בדרגה נמוכה ללא הסימנים הקלאסיים של דלקת, וזאת בהתאם לתפיסה של דלקת מטבולית (Hotamisligil, 2006). שיווי המשקל העדין בין אספקטים דלקתיים נחוצים לבין אלו שפוגעים בהסתגלות לתחילת התחלובה מרמז כי ייתכן ועוצמת התגובה הדלקתית ותזמון ההחלמה מהמצב הדלקתי הם גורמי מפתח חשובים יותר מאשר עצם היווצרות הדלקת לאחר ההמלטה. אכן, דחיית ההחלמה מהמצב הדלקתי הינה גורם באטיולוגיה של השמנת יתר וסינדרום מטבולי (Monteiro and Azevedo, 2010). מכאן, ניתן לשער כי החלמה מהירה מהמצב הדלקתי תאפשר הסתגלות אופטימלית לתחילת התחלובה.

בניסוי הקדמי בו נאספו ביופסיות של רקמת שומן ביום 4 לאחר ההמלטה ($n = 10$) מפרות שהמליטו בקיץ, ביצענו אנליזה פרוטאומית של רקמות השומן. ממצאי האנליזה הראו כי ברקמת השומן מתבטאים חלבונים רבים של מע' החיסון. כמו כן, הביטוי של חלבוני חיסון היה שונה בפרות שעברו ליפוליזה מסיבית ברקמת השומן (HL – high lipolysis) לעומת פרות שעברו פחות ליפוליזה (LL – low lipolysis): ביטוי ה-acute phase protein הפטוגלובין (HP) היה גבוה יותר ברקמת שומן של HL לעומת פרות LL ($P < 0.03$); לעומת זאת, נמצאה ירידה בביטוי חלבונים אנטי-דלקתיים: CD163 ($P < 0.06$) ו-CD59 ($P < 0.004$) ברקמות שומן של פרות HL לעומת LL. אנליזה ביואינפורמטית הראתה השפעה נרחבת על מגוון פונקציות של תגובה דלקתית ברקמת השומן של ה-HL לעומת פרות LL. ממצאים אלו מצביעים על כך שרקמת השומן מעורבת בשפעול מערכת החיסון, וכי מידת הליפוליזה ברקמת השומן עשויה להשפיע על התהליך הדלקתי בפרות לאחר ההמלטה. בנוסף לכך, תוצאות פרלימינריות שאספנו במעבדה תומכות בכך שיש עלייה בתגובה החיסונית בפרות לאחר ההמלטה (ראו תוצאות פרלימינריות).

שינויים בהרכב חומצות השומן בתאי חיסון משפיעים ישירות על תפקוד תאי החיסון במספר דרכים. ראשית, סוג חומצת השומן בממברנת הפוספוליפידים יכול להשפיע על הנזילות והתפקוד של תאי החיסון (Raphael and Sordillo, 2013). כמו כן, Clarke (2004) ו-Lee et al. (2010) מצאו כי חומצות שומן אומגה 3 מסוג EPA ו-DHA גרמו להשפעות אנטי-דלקתיות דרך מנגנונים ישירים ועקיפים להפחתת התגובה הדלקתית. נראה כי ההשפעות של חומצות שומן ספציפיות על דלקת הינן באמצעות שינוי בביטוי גנים מרכזיים הנחוצים לתגובה הדלקתית (Lee et al., 2010). התכונות התפקודיות של לימפוציטים ותאים מונוקלאריים בפרות מעבר גם כן הושפעו כאשר הפרות הוזנו בתוספת של אומגה-3 במנה מונוקלאריים (Lessard et al., 2004). בנוסף, Contreras et al. (2012a,b) השתמש בתאי אנדומטריום מבקר בתרבית והראה

כי תגובות דלקתיות הופחתו בתגובה לאספקה רבה של חומצות שומן, מצב המדמה פירוק של רקמת שומן בפרות בתקופת המעבר. מחקרי *in vitro* אלו היו הראשונים שסיפקו מידע על כך שירידה בתגובה הדלקתית יכולה להיות תוצאה של שינויים בפרופיל חמצון חומצות השומן בעקבות הזנה באומגה-3 (Contreras et al., 2012a).

בניסוי שערךנו ברפת מסחרית בחנו את ההשפעה של תוסף המכיל חומצות אומגה-3 על הבריאות של פרות ממליטות: נמצא כי שיעור הפרות ללא דלקת רחם היה נמוך ב-2.3 יחידות אחוז בקבוצת הטיפול (ל"מ), ואילו שיעור הפרות עם דלקת חמורה היה גבוה ב-8.3 יחידות אחוז (פי 4.1) בקבוצת הביקורת לעומת קבוצת הטיפול (15.0). כמו כן, נרשמו 11 אירועי מוות מסיבות שונות במהלך הניסוי של פרות מקבוצת הביקורת לעומת 2 אירועים בלבד בקבוצת הטיפול ($P < 0.005$). בנוסף, שיעור הפרות עם דלקת רחם חריפה היה גבוה יותר ב-40% בקבוצת הביקורת מאשר בקבוצת הטיפול, מה שיכול להעיד אולי על כושר החלמה גבוה יותר של פרות קבוצת הטיפול. קטוזיס הינה מחלה הקשורה באופן ישיר לממשק ההזנה. שיעור הפרות שלקו בקטוזיס היה גבוה יותר ב-10% (6.7 יחידות אחוז) בקבוצת הביקורת מאשר בקבוצת הטיפול, ולעומת זאת שיעור הפרות עם קטוזיס חריף היה נמוך יותר בקבוצת הטיפול. תוצאה זו מעידה על סטטוס מטבולי טוב יותר של פרות קבוצת הטיפול מאשר בקבוצת הביקורת. גם שיעור הופעת אירועים אחרים כמו בצקות עטין היה נמוך יותר באופן מובהק בקבוצת הטיפול מאשר בקבוצת הביקורת. לסיכום, כמעט בכל הפרמטרים שבחנו את בריאות הפרות נמצאה השפעה מטיבה להזנה באומגה-3.

הזנת הפרות ההרות באומגה-3 יכולה להשפיע באופן חיובי גם על בריאות היונק בימיו הראשונים. בעבודה קודמת שביצענו הראינו כי הזנה של פרות בסוף ההיריון עם חומצות מסוג אומגה-3 העלתה את האחוז של חומצות שומן אלו בדם הוולדות מיד לאחר ההמלטה (Moallem & Zachut, 2012). לכן, בעבודה זו נבחן גם את השפעת הזנת הפרה ההרה באומגה-3 על מדדי הבריאות של היונקים בתקופת הינקות.

הנחות היסוד של המחקר המוצע:

הנחת המחקר הינה שחומצות שומן מסוג אומגה-3 שנמצאו כמשפיעות על תפקוד מערכת החיסון בבעלי חיים שונים, יהיו בעלי השפעה חיובית על מדדי חיסון בפרות חלב וביונקים וישפיעו לטובה על עמידותן ובריאותן.

1.6 מטרות המחקר:

- א. לבחון את השפעת מתן חומצות שומן מסוג אומגה-3 על מדדי חיסון בפרות חלב סביב ההמלטה.
- ב. לבחון את המעבר של חומצות שומן מסוג אומגה-3 באמצעות הקולוסטרם ליונקים והשפעתו על מדדי חיסון.
- ג. לבחון השפעת מתן אומגה-3 ליונקים באמצעות המזון על תפקוד מערכת החיסון.

ד"ח ביצוע שנה א' + ב'

במהלך חורף 2018-2019 ביצענו ניסוי ברפת ההזנה הפרטנית עם 42 פרות ממליטות. הניסוי החל באוקטובר 2018 והסתיים בסוף מרץ 2019.

לניסוי זה קדמו הכנות רבות, וביניהן הזמנו באופן מיוחד 3 סוגי שומן מוגן בעזרת שימוש בטכניקה של מיקרופסולציה מחברת SILA (ונציה, איטליה). שומנים אלה אינם מוצרי מדף והושקע מאמץ רב על מנת שנוכל לקבלם לצורך ניסוי זה.

שנה א'+ב': 42 פרות מתחלובה שנייה 42 פרות חולקו ל- 3 קבוצות 3 שבועות לפני מועד ההמלטה הצפוי על פי נתוני תחלובה קודמת, מספר תחלובה ומשקל גוף, והוכנסו לרפת הפרטנית. הפרות קיבלו הזנת יובש סטנדרטית כפי המקובל ברפת וולקני - שחת דגן חופשי + כ- 5 ק"ג ח"י בליל חולבות. בתקופת היובש הפרות חולקו ל- 3 טיפולי הזנה:

1. קבוצת ביקורת (SFA) – מנת בסיס + 255 גר' ליום שומן רווי מוגן.
 2. קבוצת הפשתה (FLX) – מנת בסיס + 300 גר' ליום שמן פשתה מוגן.
 3. קבוצת שמן דגים (FO) – מנת בסיס + 300 גר' ליום שמן דגים מוגן.
- תכולת השומן בתוספים הייתה שונה, ולכן כמות השומן בכל טיפול הייתה שונה. לאחר ההמלטה הפרות המשיכו עם אותם טיפולים כדלהלן:
1. קבוצת ביקורת (SFA) – מנת בסיס + 640 גר' ליום שומן רווי מוגן.
 2. קבוצת הפשתה (FLX) – מנת בסיס + 750 גר' ליום שמן פשתה מוגן.
 3. קבוצת שמן דגים (FO) – מנת בסיס + 750 גר' ליום שמן דגים מוגן.
- התוספים נשקלו וניתנו באופן פרטני לכל פרה באבוסים של רפת ההזנה הפרטנית, ועורבבו עם הבליל. התוספים ניתנו עד 60 יום לאחר ההמלטה.
- דגימות דם נלקחו מן מהוריד הצווארי פעמיים בשבוע משלושה שבועות לפני המלטה ועד 21 יום לאחר המלטה. נלקחו 3 מבחנות מכל פרה.

1. מבחנה אחת שימשה לבדיקת אוכלוסיות תאי דם לבנים בדם טרי.
2. מבחנה נוספת שימשה לבדיקת מטבוליטים וציטוקינים שונים.
3. מבחנה שלישית שימשה להפקת RNA ולמבחן LPS in-vitro.

במהלך הניסוי ביצענו ביופסיות ממספר רקמות, על מנת לבחון את תפקוד מערכת החיסון ברקמות אלה:

1. ביצענו ביופסיות של רקמת השומן ב- 6 פרות מכל טיפול כשבוע לפני ההמלטה ופעם נוספת כשבוע לאחר ההמלטה – סה"כ 18 פרות.
2. ביצענו ביופסיות כבד מ- 5 פרות מכל טיפול כ- 10 ימים לאחר ההמלטה – סה"כ 15 פרות. עד כה הפקנו RNA מן הרקמות ובדקנו מספר גנים המעורבים במערכת החיסון.
3. כמו כן ביצענו ביופסיות מרירית הרחם מ- 10 פרות מכל טיפול כ- 40 יום לאחר ההמלטה = סה"כ 30 פרות. עד כה הפקנו RNA מן הרקמות ונבדקו מספר גנים.
4. כמו כן ביצענו ACTH challenge ל- 8 פרות מכל טיפול ובדקנו הפרשת קורטיזול.

BCS נקבע אחת לשבוע מ- 3 שבועות לפני המלטה ועד 60 יום לאחר ההמלטה. הפרות נשקלו אחת לשבוע בתקופת היובש, ולאחר המלטה 3 פעמים ביממה ע"י משקל בהליכה של AFIMILK. בדגימות הדם בדקנו פרמטרים רבים, וביניהם גלוקוז, NEFA, טריגליצרידים, AST ועוד כפי שמובא בפרק התוצאות.

כמו כן, נערך מעקב אחר מדדי חיסון שונים in vivo (ריכוזי ציטוקינים בדם והרכב אוכלוסיות תאי דם לבנים) in vitro (הפרשת IFN γ בעקבות גירוי LPS) בדם של הפרות.

יונקים

דגימות דם נלקחו מן היונקים (סה"כ – 29 יונקים) מיד לאחר ההמלטה ולפני מתן קולוסטריום ראשון, ביום 4 לאחר ההמלטה, ביום 7 וביום 14 לבדיקת פרופיל חומצות השומן בפלסמה. נערך מעקב אחר בריאות היונקים.

אספנו קולוסטריום מכל האמהות ואנו נעשה מאמץ לבדוק את הרכב חומצות השומן בקולוסטריום וכן את איכותו.

הקולוסטריום של האימהות ניתן לוולדות שלהן במשך 3 ימים ראשונים, וייערך מעקב אחר פרופיל חומצות השומן בפלסמה של היונקים.

אספנו קוטלדונים משליות (15) ונבדוק האם קיימים טרנספורטרים לחומצות שומן ארוכות שרשרת בשילייה.

תוצאות

טבלה מס' 1 – נתוני ייצור וצריכת מזון של הפרות עד 60 יום בתחלובה

P<	SEM	FO	FLX	SFA	
0.74	1.8	43.2	42.5	44.5	חלב, ק"ג ליום
0.04	0.11	3.99 ^{ab}	4.19 ^a	3.77 ^b	שומן, %
0.47	0.04	3.21	3.28	3.23	חלבון, %
0.81	0.03	4.92	4.89	4.90	לקטוז, %
0.93	2.0	41.1	41.3	40.6	חמ"ש (%), ק"ג ליום
0.99	1.5	31.4	31.3	31.4	אנרגיה בחלב, מק"ל ליום
0.30	0.2	12.1	12.4	12.7	צריכת מזון יובש, ק"ג ליום
0.0001	0.4	^a 26.9	24.1 ^b	27.1 ^a	צריכת מזון חולבות, ק"ג ליום
0.006	0.58	^a 1.10	-2.85 ^b	^a 2.14	מאזן אנרגיה, מק"ל ליום

פרות חולבות הוזנו מ- 21 יום לפני מועד ההמלטה הצפוי ועד 60 יום לאחר ההמלטה מנה שהכילה שומן

רוויי (SFA), או שמן פשתה (FLX) או שמן דגים (FO).

מטבלה מס' 1 נראה כי לא היו הבדלים בתנובות החלב בין הטיפולים. אחוז השומן בקבוצת ה- FLX היה גבוה יותר מקבוצת הביקורת, ללא הבדלים באחוז החלבון או הלקטוז בין הטיפולים. כמו כן לא נמצאו הבדלים בתנובת חמ"ש (4%) או תפוקת אנרגיה בחלב.

לא נמצאו הבדלים בצריכת מזון בין הטיפולים בתקופת היובש, ואילו לאחר ההמלטה הפרות בקבוצת ה-FLX צרכו כ- 10% פחות. מאזן האנרגיה בקבוצה זו ה-FLX היה נמוך יותר מאשר בשאר הקבוצות. תוצאה זו שונה ממה שקבלנו בעבר, ואנו מתכוונים לנתח באופן פרטני את הסיבה לירידה בצריכת מזון בקבוצה זו יחסית לאחרות, שלמעשה גרם גם למאזן אנרגיה שלילי יותר.

ריכוזי מטבוליטים, ציטוקינים ומדדי עקה בפלסמה

טבלה מס' 2 – ריכוזי מטבוליטים, ציטוקינים ומדדי עקה בפלסמה

P =	SEM	FO	FLX	SFA	
לפני המלטה					
					גלוקוז
0.93	0.89	64.5	68.9	65.5	
0.57	48.1	271.5	281.4	338.6	¹NEFA
0.62	1.04	25.5	26.8	25.5	²TG
0.95	24.5	830.8	823.7	820.1	³AST
0.86	42.5	310.7	330.8	296.4	⁴IL2
0.93	71.1	383.4	411.6	418.0	⁴IL6
0.16	13.9	74.5	90.2	113.6	⁵TNFα
0.10	0.02	0.31 ^{ab}	^b 0.30	^a 0.35	⁶BHBA
0.28	1.33	7.07	6.52	9.56	Cortisol
אחרי המלטה					
					גלוקוז
0.50	1.0	57.9	59.6	59.0	
0.74	50.4	471.4	462.1	513.6	NEFA
0.38	0.61	11.8	12.4	11.2	TG
0.97	27.3	964.3	965.0	956.3	AST
0.85	57.0	333.6	287.8	307.5	IL2
0.30	68.5	295.0	337.2	440.5	IL6
0.29	12.08	79.9	96.1	107.4	TNFα
0.44	0.07	0.62	0.70	0.57	BHBA
0.30	1.09	9.30	9.35	11.5	Cortisol

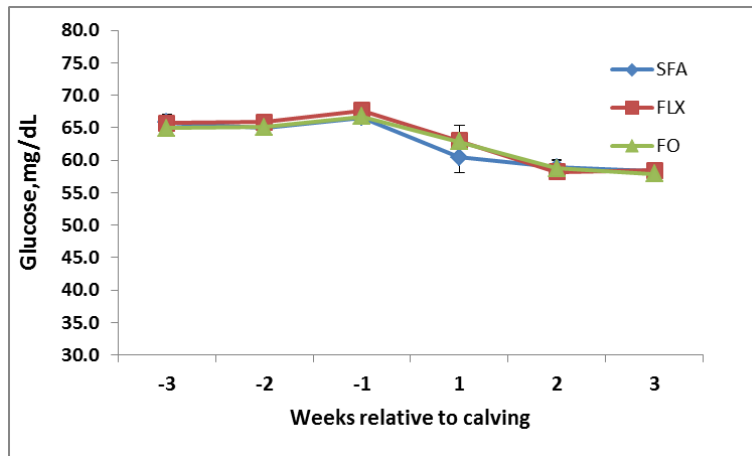
פרות חולבות הוזנו מ- 21 יום לפני מועד ההמלטה הצפוי ועד 60 יום לאחר ההמלטה מנה שהכילה שומן

רוויי (SFA), או שמן פשתה (FLX) או שמן דגים (FO).

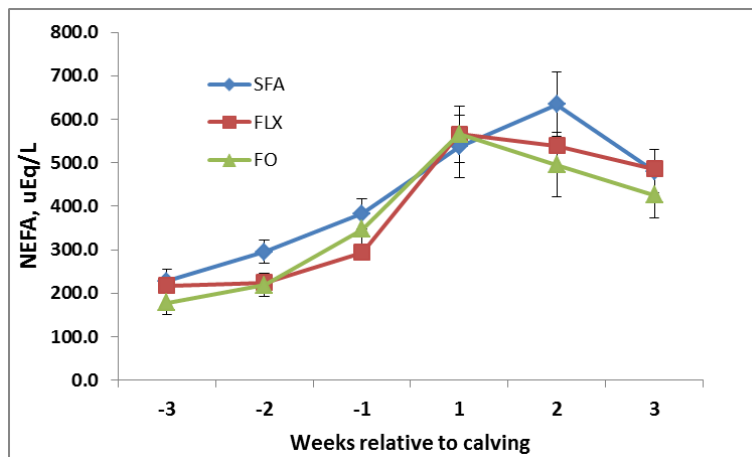
¹None-esterified fatty acids; ²Triglycerides; ³Asparatate aminotransferase; ⁴Interleukin 2; ⁵

Tumor necrosis factor α ; ⁶ β -Hydroxybutyrate acid.

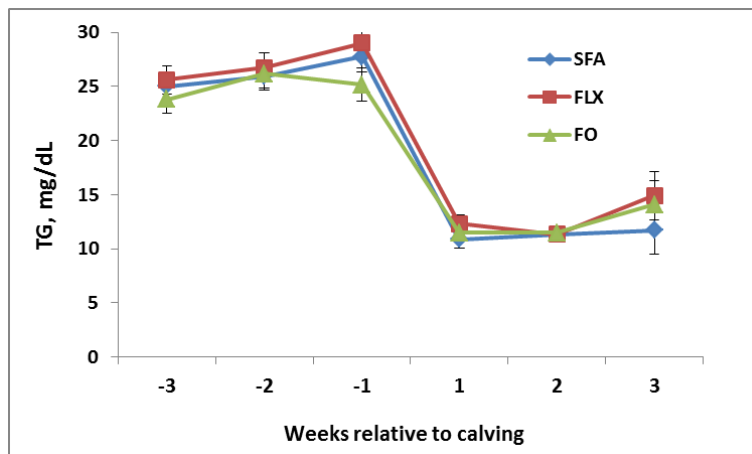
תרשים מס' 1. ריכוז גלוקוז בפלסמה בתקופת המעבר לפי טיפולים



תרשים מס' 2. ריכוז NEFA בפלסמה בתקופת המעבר לפי טיפולים



תרשים מס' 3. ריכוז טריגליצרידים בפלסמה בתקופת המעבר לפי טיפולים



למרות ההבדלים במאזן האנרגיה בין הקבוצות, ההבדלים בריכוזי הגלוקוז לא היו מובהקים (טבלה מספר 2). נראה כי טיפולי האומגה-3 תרמו להתמתנות בעלייה בריכוזי ה- NEFA לפני המלטה יחסית לביקורת, אבל הבדלים אלה לא נשמרו לאחר ההמלטה. נראית ירידה דרמטית בריכוזי ה- TG בפלסמה עם ההמלטה, ללא הבדלים בין הטיפולים. ירידה זו נובעת ממעבר מסיבי של TG לרקמת העטין. כמו כן, לא נמצאו הבדלים בריכוז הציטוקינים בפלסמה בין הטיפולים.

פרופיל חומצות השומן בפלסמה

טבלה מספר 3: פרופיל חומצות שומן בפלסמה לפני המלטה מדגימות דם שנלקחו מפרות שקיבלו שומן רווי (SFA), שומן בלתי רווי מגרעיני פשתה (FLX) או שומן בלתי רווי משמן דגים (FO)

FA (%)	SFA	FLX	FO	SEM	P-Value
C14:0	1.55	1.39	1.49	0.08	0.11
C16:0	21.1 ^a	19.1 ^b	19.7 ^{ab}	0.56	0.02
C16:1	0.96 ^a	0.62 ^b	0.60 ^b	0.10	0.02
C16:2	1.79	1.17	1.71	0.14	0.005
C16:3	1.57	1.88	1.90	0.19	0.68
C18:0	15.9 ^b	18.0 ^a	16.3 ^b	0.57	0.01
C18:1n-9	7.97	7.06	6.04	1.6	0.64
C18:1n-7	4.75	4.15	5.99	1.65	0.73
C18:2n-6	33.4	33.5	34.8	0.90	0.40
C18:3n-6	1.11	1.21	1.03	0.07	0.18
C18:3n-3	2.05 ^b	3.40 ^a	2.22 ^b	0.15	<0.0001
C20:1n-9	0.14	0.23	0.19	0.04	0.13
C20:2n6	1.04	1.11	1.21	0.09	0.58
C20:3n6	1.76	1.74	1.57	0.09	0.28
C20:4n-6	2.42	2.61	2.35	0.10	0.20
C20:4n-3	0.29 ^c	0.45 ^a	0.37 ^b	0.03	0.0009
C20:5n-3	0.30 ^b	0.47 ^a	0.53 ^a	0.30	<0.0001
C22:5n-3	0.25	0.30	0.23	0.03	0.14
C22:6n-6	0.17	0.19	0.22	0.03	0.56
C22:6n-3	0.08 ^b	0.17 ^a	0.21 ^a	0.02	0.0009
C24:1n-9	1.37	1.28	1.30	0.33	0.88
Total n-3 ¹	2.97 ^c	4.79 ^a	3.56 ^b	0.20	<0.0001
Total n-6 ²	39.9	40.4	41.2	0.90	0.46
Saturated	38.6	38.5	37.5	0.81	0.59
MUFA ³	15.2 ^a	13.3 ^b	14.1 ^b	0.47	0.01
PUFA ⁴	42.8	45.1	44.7	0.94	0.09
n-6/n-3 ⁵	13.8 ^a	8.7 ^c	11.7 ^b	0.64	<0.0001

פרות חולבות הוזנו מ- 21 יום לפני מועד ההמלטה הצפוי ועד 60 יום לאחר ההמלטה מנה שהכילה שומן רווי (SFA), או שמן פשתה (FLX) או שמן דגים (FO).

¹Total omega-3 fatty acids; ²Total omega-6 fatty acids; ³mono unsaturated fatty acids; ⁴Poly unsaturated fatty acids; ⁵omega-6/omega-3 ratio.

טבלה מספר 4: פרופיל חומצות שומן בפלסמה אחרי המלטה מדגימות דם שנלקחו מפרות שקיבלו שומן רווי (SFA), שומן בלתי רווי מגרעיני פשתה (FLX) או שומן בלתי רווי משמן דגים (FO)

FA (%)	SFA	FLX	FO	SEM	P-Value
C14:0	1.07	0.90	0.98	0.06	0.48
C16:0	17.3	17.4	16.7	0.69	0.75
C16:1	0.59	0.42	0.67	0.07	0.07
C16:2	1.53	1.47	1.48	0.10	0.99
C16:3	1.81	1.52	1.58	0.15	0.42
C18:0	12.9 ^b	14.0 ^a	13.67 ^b	0.48	0.12
C18:1n-9	8.3	7.24	5.58	1.07	0.23
C18:1n-7	2.23	3.04	4.88	1.0	0.17
C18:2n-6	43.8	41.4	42.6	1.7	0.35
C18:3n-6	0.69	0.70	0.60	0.06	0.42
C18:3n-3	1.80 ^b	3.84 ^a	2.36 ^b	0.13	<0.0001
C20:1n-9	0.18	0.20	0.17	0.03	0.61
C20:2n6	1.16	1.05	1.12	0.10	0.89
C20:3n6	1.43	1.28	1.41	0.10	0.58
C20:4n-6	2.06	2.06	2.02	0.11	0.92
C20:4n-3	0.25	0.29	0.31	0.03	0.08
C20:5n-3	0.26 ^c	0.44 ^b	0.59 ^a	0.03	<0.0001
C22:5n-3	0.26	0.26	0.19	0.02	0.11
C22:6n-6	0.16	0.25	0.24	0.05	0.37
C22:6n-3	0.09 ^b	0.11 ^b	0.37 ^a	0.02	<0.0001
C24:1n-9	2.12	2.14	2.51	0.40	0.78
Total n-3 ¹	2.67 ^c	4.92 ^a	3.82 ^b	0.16	<0.0001
Total n-6 ²	49.3	46.7	48.0	1.6	0.31
Saturated	31.2	32.3	31.3	1.10	0.55
MUFA ³	13.4	13.0	13.8	0.64	0.68
PUFA ⁴	52.0	51.6	51.8	1.54	0.83
n-6/n-3 ⁵	24.1 ^a	9.8 ^b	12.9 ^{ab}	4.3	0.04

פרות חולבות הוזנו מ- 21 יום לפני מועד ההמלטה הצפוי ועד 60 יום לאחר ההמלטה מנה שהכילה שומן רווי (SFA), או שמן פשתה (FLX) או שמן דגים (FO).

¹Total omega-3 fatty acids; ²Total omega-6 fatty acids; ³mono unsaturated fatty acids; ⁴ Poly unsaturated fatty acids; ⁵omega-6/omega-3 ratio.

תוצאות פרופיל חומצות השומן בפלסמה לפני המלטה (טבלה 3) ואחרי המלטה (טבלה 4) מראות כי יש העשרה בחומצות מסוג אומגה 3 בקבוצת ה- FLX וה- FO, וכן ירידה משמעותית ביחס n6/n3. יש לציין כי לא היו הבדלים בין הקבוצות בריכוז החומצות מסוג אומגה-6.

ביטוי גנים דלקתיים בכבד

כפי שדווח לעיל, נלקחו ביופסיות מרקמת הכבד מ-5 פרות מכל טיפול כ-10 ימים לאחר ההמלטה. בדוגמאות אלה קבענו את הביטוי היחסי של גנים דלקתיים. התוצאות מוצגות הטבלה מס' 5. כפי שניתן לראות, הביטוי היחסי (RQ) של הגן הפרו-דלקתי אינטרלוקין-6 (IL6) היה נמוך יותר בכבד בקבוצת ה-FLX לעומת הביקורת, ואילו ביטוי יתר הגנים לא היה שונה בין הטיפולים.

טבלה מס' 5 – ביטוי גנים דלקתיים בכבד

P=	SEM	FO	FLX	SFA	RQ
0.55	0.79	3.34	3.95	2.70	¹ TNF α
0.8	0.4	1.76	1.50	1.39	² IL1 β
0.06	0.08	0.72 ^{ab}	0.62 ^b	0.95 ^a	³ IL6
0.51	0.30	2.00	2.49	2.10	⁴ NFkB
0.31	0.15	0.63	0.91	0.93	⁵ IL10

פרות חולבות הוזנו מ-21 יום לפני מועד ההמלטה הצפוי ועד 60 יום לאחר ההמלטה מנה שהכילה שומן רווי (SFA), או שמן פשתה (FLX) או שמן דגים (FO).

¹Tumor necrosis factor α ; ²Interleukin 1 β ; ³Interleukin 6; ⁴Nuclear Factor Kappa B; ⁵Interleukin 10.

ביטוי גנים דלקתיים ברירית הרחם

כפי שנראה בטבלה מספר 6, הביטוי של הגן הדלקתי TNF α ברירית הרחם היה נמוך יותר בקבוצת ה-FLX לעומת ה-FO, ואילו הביטוי של הגן האנטי-דלקתי IL-10 ברחם היה גבוה יותר בקבוצת ה-FLX לעומת הביקורת (P = 0.02), ונטה להיות גבוה יותר לעומת קבוצת ה-FO (P = 0.07).

טבלה מס' 6 – ביטוי גנים דלקתיים ברירית הרחם

P=	SEM	FO	FLX	SFA	RQ
0.84	0.13	1.09	1.15	1.18	¹ NFkB
0.71	0.09	0.29	0.23	0.36	² IL1 β
0.02	0.12	1.47 ^a	0.63 ^b	0.94 ^{ab}	³ TNF α
0.57	0.51	3.07	3.4	2.62	⁴ IL6
0.05	0.61	3.25 ^{ab}	4.87 ^a	2.69 ^b	⁵ IL10

פרות חולבות הוזנו מ-21 יום לפני מועד ההמלטה הצפוי ועד 60 יום לאחר ההמלטה מנה שהכילה שומן רווי (SFA), או שמן פשתה (FLX) או שמן דגים (FO).

¹Nuclear Factor Kappa B; ²Interleukin 1 β ; ³Tumor necrosis factor α ; ⁴Interleukin 6; ⁵Interleukin 10.

ביטוי גנים דלקתיים ברקמת השומן

כפי שניתן לראות בטבלה מספר 7, לא נמצאו הבדלים בביטוי גנים דלקתיים ברקמת השומן שנדגמה לפני ההמלטה בין הטיפולים. אולם לאחר ההמלטה, הביטוי היחסי של הגן הפרו-דלקתי TNF α היה נמוך יותר ברקמת השומן של קבוצת ה-FO לעומת הביקורת.

טבלה מס' 7 – ביטוי גנים דלקתיים ברקמת השומן

P=	SEM	FO	FLX	SFA	RQ
לפני המלטה					
0.56	0.14	0.4	0.55	0.59	¹ TNF α
0.99	0.15	1.38	1.37	1.37	² IL6
אחרי המלטה					
0.94	0.13	0.33	0.35	0.39	³ IL1 β
0.11	0.14	0.75 ^b	0.82 ^{ab}	1.18 ^a	TNF α
0.5	0.46	2.35	2.77	1.95	⁴ NF κ B
0.25	0.08	0.88	0.84	1.04	IL6
0.52	0.29	1.12	1.46	0.96	⁵ IL10

פרות חולבות הוזנו מ-21 יום לפני מועד ההמלטה הצפוי ועד 60 יום לאחר ההמלטה מנה שהכילה שומן רווי (SFA), או שמן פשתה (FLX) או שמן דגים (FO).

¹Tumor necrosis factor α ; ²Interleukin 6; ³Interleukin 1 β ; ⁴Nuclear Factor Kappa B;

⁵Interleukin 10.

פרופיל חומצות השומן בדם היונקים

בטבלה מספר 8 מוצגים תוצאות פרופיל חומצות השומן מדוגמאות דם שנלקחו מיד לאחר ההמלטה, וביום 3 לאחר מתן הקולוסטריום. כל וולד הוגמע בקולוסטריום מאמו בלבד. נראה כי בדומה לתוצאות מניסוי מקדים, חומצת ה-ALA ממקור של FLX לא עברה דרך השיליה, וביונקים שנולדו לאימהות שקיבלו FLX לא נמצאה רמה גבוהה יותר של חומצה זו בדמם במועד ההמלטה. לעומת זאת בעגלות שנולדו לאימהות שקיבלו FO נמצא ריכוז גבוה יותר של DHA בדמם, וכן של DPA. כאשר בדקנו את פרופיל חומצות השומן ביום 3 לאחר מתן הקולוסטריום מצאנו עלייה בריכוז ה-ALA ביונקים שנולדו לאימהות ה-FLX, שכנראה מקורו בקולוסטריום.

טבלה 8. פרופיל חומצות השומן ביונקים מיד לאחר ההמלטה (יום 0) או לאחר מתן קולוסטריום (יום 3)

Fatty acid	מיד לאחר ההמלטה (יום 0)					לאחר מתן קולוסטריום (יום 3)				
	SFA	FLX	FO	SEM	P =	SFA	FLX	FO	SEM	P =
C14:0	2.8	2.5	2.8	0.2	0.24	6.8	5.7	5.7	0.82	0.58
C16:0	30.0	30.5	31.1	0.75	0.38	36.6	31.5	31.4	1.2	0.37
C16:1	1.96	2.15	2.17	0.23	0.79	1.5	1.5	1.1	0.22	0.52
C16:2	6.55	4.81	4.86	0.62	0.10	4.3	4.4	4.0	0.3	0.77
C16:3	5.46	5.89	8.60	1.30	0.24	1.5	1.8	1.5	0.4	0.90
C18:0	10.1	11.0	14.5	0.54	0.51	8.9	9.0	9.7	0.4	0.35
C18:1n-9	22.0	20.9	18.8	1.5	0.33	23.1	24.7	21.7	0.7	0.24
C18:1n-7	2.7	3.11	2.66	0.35	0.62	2.1 ^{ab}	2.6 ^a	1.8 ^b	0.2	0.10
C18:2n-6	3.9	4.38	3.49	0.3	0.16	11.5	11.7	11.9	1.4	0.27
C18:3n-6	0.41	0.48	0.44	0.06	0.80	0.23	0.31	0.32	0.03	0.12
C18:3n-3	0.38	0.36	0.44	0.11	0.88	0.41 ^b	0.66 ^a	0.58 ^a	0.03	0.002
C20:1n-9	0.20	0.32	0.34	0.06	0.26	0.19	0.26	0.14	0.06	0.49
C20:2n-6	3.46	3.93	4.64	0.70	0.54	0.90	1.10	0.95	0.22	0.78
C20:3n-6	1.23	1.41	0.96	0.15	0.17	0.98	1.15	1.17	0.10	0.34
C20:4n-6	3.04 ^{ab}	3.63 ^a	2.27 ^b	0.35	0.04	2.4	2.70	2.84	0.30	0.59
C20:4n-3	0.48	0.49	0.47	0.08	0.99	0.13	0.20	0.16	0.04	0.52
C20:5n-3	0.25	0.23	0.31	0.06	0.59	0.14 ^b	0.20 ^{ab}	0.24 ^a	0.02	0.05
C22:5n-3	0.33 ^b	0.45 ^{ab}	0.57 ^a	0.08	0.14	0.24	0.24	0.23	0.03	0.99
C22:6n-3	0.26 ^b	0.30 ^b	0.48 ^a	0.5	0.006	0.14 ^b	0.13 ^b	0.19 ^a	0.01	0.02
C22:6n-6	0.37	0.33	0.57	0.08	0.12	0.09	0.11	0.10	0.03	0.90
C24:1n-9	2.10	2.82	3.60	0.76	0.43	0.87	1.13	1.26	0.28	0.63
SFA ¹	44.9	44.0	44.3	0.95	0.79	49.3	46.2	46.7	1.5	0.31
MUFA ²	29.0	29.3	27.6	1.5	0.69	27.7 ^a	29.2 ^a	26.0 ^{ab}	0.9	0.12
PUFA ³	26.1	26.7	28.1	1.5	0.65	23.0	24.7	27.2	1.9	0.35
Total n-3 ⁴	1.66	1.82	2.3	0.3	0.36	1.01 ^b	1.40 ^a	1.31 ^{ab}	0.1	0.07
Total n-6 ⁵	12.4	14.2	12.4	0.64	0.11	16.1	17.1	20.4	1.8	0.31
n-6/n-3 ⁶	8.5	8.2	6.7	1.02	0.44	16.1	12.3	15.5	1.4	0.22

פרות חולבות הוזנו מ- 21 יום לפני מועד ההמלטה הצפוי ועד 60 יום לאחר ההמלטה מנה שהכילה שומן

רוויי (SFA), או שמן פשתה (FLX) או שמן דגים (FO).

¹Saturated fatty acids; ²Monounsaturated fatty acids; ³Poly-unsaturated fatty acids; ⁴Total

omega-3 fatty acids; ⁵Total omega-6 fatty acids; ⁶omega-6/omega-3 ratio

ביטוי גנים דלקתיים בשלייה

כפי שמוצג בטבלה מספר 9 הביטוי היחסי של הגנים הפרו-דלקתיים IL1 β ו-IL6 היה גבוה יותר, והביטוי של TNF α נטה להיות גבוה יותר בשלייה של פרות מקבוצת ה-FO לעומת הביקורת. הביטוי של הגן האנטי דלקתי IL10 נטה להיות גבוה יותר בשליות של FO לעומת הביקורת. הביטוי היחסי של הטרנספורטר לחומצות שומן ארוכות שרשרת, FABP4 נטה להיות גבוה יותר בשליות מקבוצת ה-FO לעומת הביקורת. כמות ה-RNA בדוגמא הוכנסה למודל הסטטיסטי מכיוון שהייתה שונות בכמות ה-RNA מכל דוגמא וזאת עקב הריכוז הגבוה של ה-RNA שנמצא בחלק מהדוגמאות. האפקט של ה-RNA עצמו לא היה מובהק לאף גן ולכן הוצא מן המודל.

טבלה מס' 9 – ביטוי גנים דלקתיים וכן טרנספורטרים לחומצות שומן ארוכות שרשרת בשלייה

TRT*RNA	P TRT	SEM	FO	FLX	SFA	RQ
0.09	0.52	0.41	1.7	1.12	0.71	¹ TNF α
0.006	0.26	1.39	6.8	2.46	1.11	² IL1 β
0.007	0.44	1.28	5.74	2.34	0.81	³ IL6
0.39	0.74	0.48	1.06	1.22	0.66	⁴ NF κ B
0.09	0.10	2.07	10.0	2.49	0.79	⁵ IL10
0.11	0.3	1.13	3.67	2.61	0.64	⁶ FABP4

פרות חולבות הוזנו מ-21 יום לפני מועד ההמלטה הצפוי ועד 60 יום לאחר ההמלטה מנה שהכילה שומן רווי (SFA), או שמן פשתה (FLX) או שמן דגים (FO).

¹Tumor necrosis factor α ; ²Interleukin 1 β ; ³Interleukin 6; ⁴Nuclear Factor Kappa B;

⁵Interleukin 10; ⁶Fatty Acid Binding Proteins 4.

סיכום התוצאות עד כה

תוצאות הייצור מראות כי לא היו הבדלים בתנובות החלב, חמ"ש (FCM) או תפוקת האנרגיה בחלב (ECM) בין הקבוצות, ורק אחוז השומן היה גבוה יותר בקבוצת ה-FLX לעומת ה-SFA. צריכת המזון לאחר ההמלטה הייתה נמוכה בקבוצת ה-FLX וגרמה למאזן אנרגיה נמוך יותר בקבוצה זו. לא ברורה לנו הסיבה לירידה בצריכת המזון בקבוצה זו, תוצאה שלא נצפתה אצלנו בניסויים קודמים. למרות מאזן האנרגיה השונה בין הקבוצות, לא נמצאו הבדלים בין הטיפולים בריכוזם בדם של גלוקוז, BHBA ו-NEFA אחרי המלטה, מטבוליטים אשר מהווים אינדיקציה לסטטוס המטבולי של הפרות. כמו כן לא מצאנו הבדלים מובהקים בריכוז של מספר ציטוקינים בפלסמה בין הטיפולים כמו: IL2, IL6 ו-TNF α . יחד עם זאת, נראית ירידה מספרית בריכוזם של IL6 ו-TNF α בשני טיפולי האומגה-3, כאשר בקבוצת ה-FO הריכוזים היו נמוכים מאשר בקבוצת ה-FLX.

תוצאות פרופיל חומצות השומן בפלסמה לפני המלטה ואחרי המלטה מראות כי יש העשרה בחומצות מסוג אומגה 3 בקבוצת ה-FLX וה-FO, וכן ירידה משמעותית ביחס $n6/n3$, ללא הבדלים בין הקבוצות בריכוז החומצות מסוג אומגה-6. שינויים אלה בפרופיל חומצות השומן נחשבים כחיוביים למספר מערכות בגוף, וביניהם מערכת החיסון. יש לציין כי גם לחומצות מסוג אומגה-6 יש תפקיד במערכת החיסון, אבל שיעור חומצות שומן אלה לא ירד עם מתן תוספי האומגה-3.

ברקמת הכבד נמצא כי הביטוי היחסי של הגן ל-IL6 היה נמוך יותר בקבוצת ה-FLX. ברירית הרחם נמצא כי הביטוי של הגן הדלקתי $TNF\alpha$ היה נמוך יותר בקבוצת ה-FLX לעומת ה-FO, ואילו הביטוי של הגן האנטי-דלקתי IL-10 ברחם היה גבוה יותר בקבוצת ה-FLX לעומת הביקורת. בדקנו גם את הביטוי לגנים דלקתיים ברקמת השומן. לאחר ההמלטה, הביטוי היחסי של הגן הפרו-דלקתי $TNF\alpha$ היה נמוך יותר ברקמת השומן של קבוצת ה-FO לעומת הביקורת. לסיכום נראה כי הביטוי של מספר גנים הקשורים במערכת החיסון השתנה במספר רקמות עם מתן האומגה-3.

בבחינת פרופיל חומצות השומן ביונקים מיד לאחר ההמלטה וכן ביום 3 לאחר מתן הקולוסטריום, מצאנו כי ריכוז ה-DHA וה-DPA עלה בדם היונקים מפרות ה-FO מיד לאחר ההמלטה, מה שמעיד על מעבר שלהן דרך השיליה, ואילו ה-ALA שהינה חומצה קצרה יותר אינה עוברת ברחם. לאחר מתן הקולוסטריום נמצאה העשרה ב-ALA גם בדם היונקים שנולדו לאימהות ה-FLX.

בשנת המחקר השלישית השלמנו חלק מעבודת המעבדה, וביצענו ניתוח פרוטיאומי של מקטע מתאי הדם הלבנים בהשפעת הטיפול. בחלק זה של העבודה הפרדנו את תאי peripheral blood mononuclear cells (**PBMC**) מדוגמאות הדם בשבוע הראשון. קבוצת תאים זו כוללת את הלימפוציטים והמונוציטים שהם בעלי גרעין עגול, והם כוללים בין היתר תאי T ותאי B, וה-Natural Killer. מדוגמאות דם מ-24 פרות שנדגמו בימים 2.5 ± 7.1 לאחר ההמלטה בודדנו את תאי ה-PBMC ובדקנו את מידת ההעשרה של תאי דם לבנים אלה בחומצות מסוג אומגה-3 שניתנו במזון. התוצאות מופיעות בטבלה מספר 10. לפי הנראה בטבלה 10, שני טיפולי ההזנה העשירו את רמת האומגה-3 בתאי ה-PBMC, ורצינו לבחון כיצד העשרה בחומצות אלה תשפיע על ביטוי החלבונים ומסלולים רלבנטיים למערכת החיסון.

טבלה 10. פרופיל חומצות השומן ב- PBMC

FA (%)	Treatment ¹			SEM	P-value
	SFA	FLX	FO		
C14:0	1.32	1.19	1.23	0.28	0.95
C16:0	24.02	21.93	22.28	1.10	50.3
C16:1	0.39	0.36	0.56	0.13	40.5
2C16:	1.64	1.42	2.51	1.10	0.76
3C16:	0.60	0.69	0.51	0.16	40.7
C18:0	26.78	23.26	24.45	1.46	50.2
C18:1n-9	16.85	13.97	14.37	2.32	30.6
C18:1n-7	1.81	2.14	1.46	0.47	30.6
C18:2n-6	10.48	13.21	12.99	1.03	0.13
C18:3n-6	0.13	0.35	0.18	0.07	0.16
C18:3n-3	1.53	2.10	1.68	0.20	50.1
C20:4n-6	12.24	15.92	13.89	1.61	90.2
C20:5n-3	0.31b	0.97a	0.86b	0.22	0.10
C22:5n-3	1.46	2.00	1.98	0.24	0.20
C22:6n-3	0.46	0.50	1.04	0.24	0.20
Saturated FA	52.12a	46.38b	48.96a	1.83	0.10
MUFA ¹	19.04	16.47	16.39	2.40	0.66
PUFA ²	26.30 ^b	34.08 ^a	31.77 ^b	2.66	0.13
Total n-3 ³	3.75 ^b	5.57 ^a	5.57 ^a	0.56	0.05
Total n-6 ⁴	22.85	29.48	27.06	2.44	0.17
n-6:n-3 ⁵	6.89	5.51	4.91	0.84	0.25

פרות חולבות הוזנו מ- 21 יום לפני מועד ההמלטה הצפוי ועד 60 יום לאחר ההמלטה מנה שהכילה שומן רווי (SFA), או שמן פשתה (FLX) או שמן דגים (FO).

¹Mono unsaturated fatty acids; ²poly unsaturated fatty acids; ³total omega-3 fatty acids; ⁴Total omega-6 fatty acids; ⁵omega-6/omega-3 fatty acids.

ביצענו אנליזה על 18 דוגמאות PBMC (6 מכל טיפול) שהוכנו במעבדה שלנו לצורך אנליזה פרוטיאומית ביחידה לרפואה מותאמת אישית במכון וייצמן.

באנליזה זו נמצאו 3807 חלבונים. ביצענו ניתוח השוואתי בין פרות הביקורת לפרות ה- FLX ופרות ה- FO. בחנו חלבונים שהיו שונים באופן מובהק ($P \leq 0.05$) ומקדם הכפלה (FC - fold change) ± 1.5 . כאשר בחנו את טיפול הביקורת ביחס לטיפול ה- FLX נמצאו 44 חלבונים שונים, ביקורת ביחס ל- FO נמצאו 42 חלבונים שונים, ו- FLX ביחס ל- FO נמצאו 65 חלבונים שונים, לפי הקריטריונים שנקבעו לעיל.

Table 11. Top ontology functions according to differential protein abundance in PBMC of cows supplemented with omega-3 from flaxseed oil (FLX)¹ compared to control (CTL) during the transition period.

Ontology functional group	P-value	Proteins
Aggregation of blood platelets	1.63E-07	ALB, CFH, GC, GPX3, KNG1, SERPIND1, THBS1
Inflammation of organ	1.68E-06	ALB, APCS, APOH, CD5L, CFH, DHFR, GC, GLMP, IFI44, JCHAIN, KNG1, LRG1, RELA, THBS1, VSIR
Phagocytosis of neutrophils	3.84E-06	APCS, CD5L, CFH, THBS1
Inflammation of body cavity	9.2E-06	ALB, APCS, APOH, CFH, DHFR, GC, GLMP, IFI44, LRG1, RELA, THBS1, VSIR
Adhesion of phagocytes	1.47E-05	APCS, APOH, CFH, KNG1, RELA
Inflammation of absolute anatomical region	5.58E-05	ALB, APCS, APOH, CFH, DHFR, GC, GLMP, IFI44, LRG1, RELA, THBS1, VSIR
Degranulation of blood platelets	7.19E-05	ALB, APOH, KNG1, THBS1
Binding of professional phagocytic cells	8.03E-05	APCS, APOH, CFH, KNG1, RELA
Immune response of phagocytes	0.000115	APCS, CD5L, CFH, RELA, THBS1
Adhesion of blood platelets	0.000121	APOH, KNG1, THBS1
Activation of macrophages	0.000208	APCS, APOH, GC, KNG1, THBS1
Activation of phagocytes	0.000244	APCS, APOH, CFH, GC, KNG1, THBS1
Activation of leukocytes	0.000305	APCS, APOH, CFH, GC, KNG1, RELA, THBS1, VSIR
Adhesion of neutrophils	0.000864	APCS, CFH, KNG1
Complement activation	0.00106	CFH, JCHAIN, KNG1
Inflammatory response	0.00116	APCS, APOH, CFH, GC, KNG1, RELA, THBS1, VSIR
Phagocytosis of cells	0.00141	APCS, CD5L, CFH, THBS1, WASHC5

¹Dairy cows at 257 days of pregnancy were divided into three nutritional groups supplemented with (i) CTL ($n = 6$) – encapsulated saturated fat, (ii) FLX ($n = 6$) – encapsulated flaxseed oil providing ALA, or (iii) FO ($n = 6$) – encapsulated fish oil providing EPA and DHA.

סיכום המחקר

במסגרת מחקר זה נעשה ניסוי אינטנסיבי במהלך חורף 2018-2019 ברפת ההזנה הפרטנית עם 42 פרות ממליטות. הניסוי החל באוקטובר 2018 והסתיים בסוף מרץ 2019. לניסוי זה קדמו הכנות רבות, משום שעשינו שימוש בשומנים שאינם מוצרי מדף ויוצרו באופן מיוחד לניסוי זה. בניסוי זה ניתנו 3 סוגי שומן מוגן, קבוצת שומן רווי (SFA), קבוצת הפיתה (FLX) עשירה ב-ALA, וקבוצת שומן דגים (FO) עשירה ב-DHA ו-EPA. במסגרת ניסוי זה נלקחו דוגמאות דם מהאימהות והוולדות, ובהן קבענו ריכוזם של פרמטרים רבים, וביניהם גלוקוז, NEFA, טריגליצרידים, AST ועוד, כפי שמובא בפרק התוצאות. כמו כן, נערך מעקב אחר מדדי חיסון שונים (ריכוזי ציטוקינים בדם והרכב אוכלוסיות תאי דם לבנים). במהלך הניסוי ביצענו ביופסיות ממספר רקמות, על מנת לבחון את תפקוד מערכת החיסון ברקמות אלה. ביצענו ביופסיות

ברקמת השומן ב- 6 פרות מכל טיפול כשבוע לפני ההמלטה ופעם נוספת כשבוע לאחר ההמלטה, ביופסיות כבד מ- 5 פרות מכל טיפול כ- 10 ימים לאחר ההמלטה, כמו כן ביצענו ביופסיות מרירית הרחם מ-10 פרות מכל טיפול כ- 40 יום לאחר ההמלטה = סה"כ 30 פרות. בנוסף ביצענו ACTH challenge ל- 8 פרות מכל טיפול ובדקנו הפרשת קורטיזול. כמו כן דגמנו דם מן הוולדות מיד לאחר ההמלטה ולאחר 3 ימים.

תוצאות הייצור לא הראו הבדלים בתנובות החלב, חמ"ש (FCM) או תפוקת האנרגיה בחלב (ECM) בין הטיפולים השונים, ורק אחוז השומן היה גבוה יותר בקבוצת ה- FLX לעומת ה- SFA. צריכת המזון לאחר ההמלטה הייתה נמוכה בקבוצת ה- FLX וגרמה למאזן אנרגיה נמוך יותר בקבוצה זו. לא ברורה לנו הסיבה לירידה בצריכת המזון בקבוצה זו, תוצאה שלא נצפתה אצלנו בניסויים קודמים. למרות מאזן האנרגיה השונה בין הקבוצות, לא נמצאו הבדלים בין הטיפולים בריכוזם בדם של גלוקוז, BHBA ו- NEFA אחרי המלטה, מטבוליטים אשר מהווים אינדיקציה לסטטוס המטבולי של הפרות. כמו כן לא מצאנו הבדלים מובהקים בריכוז של מספר ציטוקינים בפלסמה בין הטיפולים כמו: IL2, IL6 ו- TNF α . יחד עם זאת, נראית ירידה מספרית בריכוזם של IL6 ו- TNF α בשני טיפולי האומגה-3, כאשר בקבוצת ה- FO הריכוזים היו נמוכים מאשר בקבוצת ה- FLX.

תוצאות פרופיל חומצות השומן בפלסמה לפני המלטה ואחרי המלטה מראות כי יש העשרה בחומצות מסוג אומגה 3 בקבוצת ה- FLX וה- FO, וכן ירידה משמעותית ביחס n6/n3, ללא הבדלים בין הקבוצות בריכוז החומצות מסוג אומגה-6. שינויים אלה בפרופיל חומצות השומן נחשבים כחיוביים למספר מערכות בגוף, וביניהם מערכת החיסון. יש לציין כי גם לחומצות מסוג אומגה-6 יש תפקיד במערכת החיסון, אבל שיעור חומצות שומן אלה לא ירד עם מתן תוספי האומגה-3.

ברקמת הכבד נמצא כי הביטוי היחסי של הגן ל- IL6 היה נמוך יותר בקבוצת ה- FLX. ברירית הרחם נמצא כי הביטוי של הגן הדלקתי TNF α היה נמוך יותר בקבוצת ה- FLX לעומת ה- FO, ואילו הביטוי של הגן האנטי-דלקתי IL-10 ברחם היה גבוה יותר בקבוצת ה- FLX לעומת הביקורת. בדקנו גם את הביטוי לגנים דלקתיים ברקמת השומן. לאחר ההמלטה, הביטוי היחסי של הגן הפרו-דלקתי TNF α היה נמוך יותר ברקמת השומן של קבוצת ה- FO לעומת הביקורת. לסיכום נראה כי הביטוי של מספר גנים הקשורים במערכת החיסון השתנה במספר רקמות עם מתן האומגה-3.

בבחינת פרופיל חומצות השומן ביונקים מיד לאחר ההמלטה וכן ביום 3 לאחר מתן הקולוסטריום, מצאנו כי ריכוז ה- DHA וה- DPA עלה בדם היונקים מפרות ה- FO מיד לאחר ההמלטה, מה שמעיד על מעבר שלהן דרך השיליה, ואילו ה- ALA שהינה חומצה קצרה יותר אינה עוברת ברחם. לאחר מתן הקולוסטריום נמצאה העשרה ב- ALA גם בדם היונקים שנולדו לאימהות ה- FLX.

ביצענו ניתוח פרוטיאומי של מקטע מתאי הדם הלבנים בהשפעת הטיפולים. בחלק זה של העבודה הפרדנו את תאי peripheral blood mononuclear cells (PBMC) מדוגמאות הדם בשבוע הראשון. קבוצת תאים זו כוללת את הלימפוציטים והמונוציטים שהם בעלי גרעין עגול, והם כוללים בין היתר תאי T ותאי B, וה- Natural Killer. ביצענו אנליזה פרוטיאומית של 18 דוגמאות PBMC (6 מכל טיפול) שהוכנו במעבדה שלנו לצורך אנליזה פרוטיאומית ביחידה לרפואה מותאמת אישית במכון וייצמן.

באנליזה זו נמצאו 3807 חלבונים. ביצענו ניתוח השוואתי בין פרות הביקורת לפרות ה- FLX ופרות ה- FO. בחנו חלבונים שהיו שונים באופן מובהק ($P \leq 0.05$) ומקדם הכפלה (FC - fold change) ± 1.5 . כאשר בחנו את טיפול הביקורת ביחס לטיפול ה- FLX נמצאו 44 חלבונים שונים, ביקורת ביחס ל- FO נמצאו 42

חלבונים שונים, ו-FLX ביחס ל-FO נמצאו 65 חלבונים שונים, לפי הקריטריונים שנקבעו לעיל. כאשר בחנו את אפקט הטיפולים על חלבונים תאי ה-PBMC הספציפיים, נמצאו כמה רכיבים של המערכת החיסונית, כמו $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65-subunit-of-transcription-factor, רכיבים של מערכת המשלים, וכן מרכיבים של *acute-phase-response signaling*. שינויים בחלבונים אלה מעידים ככל הנראה על אפקט של ההזנה באומגה-3 על התפקודיות של מערכת החיסון. לסיכום, עבודה זו מראה כי להזנה באומגה-3 יש השפעה על רבדים שונים של המערכת החיסונית, ברקמת הדם וברקמות השונות, אשר חלקן פרו-דלקתיות וחלקן אנטי דלקתיות. ממצאים אלה תואמים מעבודות שנעשו *in-vitro* אשר בחנו השפעות של חומצות שומן ייחודיות אלה על המערכת החיסונית, וכן על מדדי בריאות ופוריות בניסויי שדה גדולים.

1.11 רשימת ספרות מצוטטת

- Akbar, H., T. M. Grala, M. Vailati Riboni, F. C. Cardoso, G. Verkerk, J. McGowan, K. Macdonald, J. Webster, K. Schutz, S. Meier, L. Matthews, J. R. Roche, and J. J. Loor. 2015. Body condition score at calving affects systemic and hepatic transcriptome indicators of inflammation and nutrient metabolism in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:1019–1032.
- Bionaz, M., E. Trevisi, L. Calamari, F. Librandi, A. Ferrari, and G. Berton. 2007. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1740–1750.
- Bradford, B. J., Yuan, K., Farney, J. K., Mamedova, L. K., and Carpenter, A. J. 2015. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *J Dairy Sci.* 98(10):6631-50.
- Clarke, S. D. 2004. The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: Polyunsaturated fats as nutrient sensors. *Curr. Opin. Lipidol.* 15:13–18.
- Contreras, G. A., S. A. Mattmiller, W. Raphael, J. C. Gandy, and L. M. Sordillo. 2012a. Enhanced n-3 phospholipid content reduces inflammatory responses in bovine endothelial cells. *J. Dairy Sci.* 95:7137–7150.
- Contreras, G. A., W. Raphael, S. A. Mattmiller, J. Gandy, and L. M. Sordillo. 2012b. Nonesterified fatty acids modify inflammatory response and eicosanoid biosynthesis in bovine endothelial cells. *J. Dairy Sci.* 95:5011–5023.
- Hotamisligil, G. S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860–867.
- Lee, J. Y., L. Zhao, and D. H. Hwang. 2010. Modulation of pattern recognition receptor-mediated inflammation and risk of chronic diseases by dietary fatty acids. *Nutr. Rev.* 68:38–61.
- Lessard, M., N. Gagnon, D. L. Godson, and H. V. Petit. 2004. Influence of parturition and diets enriched in n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on immune response of dairy cows during the transition period. *J. Dairy Sci.* 87:2197–2210.
- Loor, J. J., H. M. Dann, R. E. Everts, R. Oliveira, C. A. Green, N. A. J. Guretzky, S. L. Rodriguez-Zas, H. A. Lewin, and J. K. Drackley. 2005. Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiol. Genomics* 23:217–226.
- Moallem, U. and M. Zachut (2012). *Short communication*: The effects of supplementation of various omega-3 fatty acids to late pregnant dairy cows on plasma fatty acids composition of the newborn calves. *Journal of Dairy Science*, 95:4055-4058.
- Monteiro, R., and I. Azevedo. 2010. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2010:289645.
- Raphael, W., and L. M. Sordillo. 2013. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammation: The role of phospholipid biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 14:21167–21188.
- Sadri, H., R. M. Bruckmaier, H. R. Rahmani, G. R. Ghorbani, I. Morel, and H. A. Van Dorland. 2010. Gene expression of tumour necrosis factor and insulin signalling-related factors in subcutaneous adipose tissue

during the dry period and in early lactation in dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 94:e194–e202.

Sordillo, L. M. 2016. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *J Dairy Sci.* [Epub ahead of print].

1.12 פרסומים של החוקרים

Uzi Moallem

- M. Zachut, A. Arieli and **U. Moallem**. (2011). Incorporation of dietary n-3 fatty acids into ovarian compartments in dairy cows, and the effects on hormonal and behavioral patterns around estrus. *Reproduction* 141: 833-840.
- U. Moallem** and M. Zachut (2012). *Short communication*: The effects of supplementation of various omega-3 fatty acids to late pregnant dairy cows on plasma fatty acids composition of the newborn calves. *Journal of Dairy Science*, 95:4055-4058.
- U. Moallem**, D. Vyas, B. B. Teter, P. Delmonte, M. Zachut, R. A. Erdman (2012). Transfer rate of α -linolenic acid from abomasal infused flaxseed oil into milk fat and the effects on milk fatty acids composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95:5276-5284.
- U. Moallem**, A. Shafran, M. Zachut, I. Dekel and A. Arieli. (2013). Dietary alpha-linolenic acid (ALA) from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF performance in dairy cows, similarly to eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids from fish oil. *Reproduction*, 146 (6) 603-614.
- Moallem U**, Neta N, Zeron Y, Zachut M, Roth Z. (2015). Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alter fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 83:1110-1120.

Maya Zachut

- Zachut M**, Sood P, Levin Y, Moallem U. (2016). Proteomic analysis of preovulatory follicular fluid reveals differentially abundant proteins in less fertile dairy cows. *J Proteomics*. 29;139:122-9 .
- Zachut M**, G. Kra, Y. Portnik, F. Shapiro and N. Silanikove. (2016). Milk glucose-6- phosphate dehydrogenase activity and glucose-6-phosphate are associated with oxidative stress and serve as indicators of energy balance in dairy cows. *RSC Adv.*, 6:65412-65417.
- Zachut, M** (2015). Defining the Adipose Tissue Proteome of Dairy Cows to Reveal Biomarkers Related to Peripartum Insulin Resistance and Metabolic Status. *J Proteome Res*. 2;14(7):2863-71.
- Zachut, M** (2015). Short Communication: Concentrations of the mammalian lignan enterolactone in pre-ovulatory follicles and the correlation with intrafollicular estradiol in dairy cows fed extruded flaxseed. *J Dairy Sci*. 98(12):8814-7.
- Moallem U, Neta N, Zeron Y, **Zachut M**, Roth Z. (2015). Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alter fatty acid composition and characteristics of fresh and frozenthawed bull semen. *Theriogenology*. 83(7):1110-20.
- Zachut, M**, Honig, H, Striem, S, Zick, Y, Boura-Halfon, S, and U. Moallem. (2013). Periparturient dairy cows do not exhibit systemic insulin resistance, yet adipose specific insulin resistance occurs in cows prone to high weight loss. *J. Dairy Sci*. 96:5656-69.