

דוח סופי לתכנית מחקר מס' 362-0496

זיהוי ביומרקרים בחלב ככלי לאבחון הסטטוס המטבולי של פרות לאחר המלטה

חוקרת ראשית: ד"ר מאיה זכות - המחלקה לבקר וצאן, המכון לבע"ח, מינהל המחקר החקלאי, mayak@volcani.agri.gov.il

חוקר שותף: ד"ר ניסים סילניקוב ז"ל - המחלקה לבקר וצאן, המכון לבע"ח, מינהל המחקר החקלאי.

עבודה זו מוקדשת לזכרו של ניסים סילניקוב ז"ל

1. תקציר

תחילת התחלובה הינה תקופה קריטית מבחינת ביצועי הפרה, כאשר בפרק זמן זה מתרחשים שינויים מטבוליים משמעותיים אשר משפיעים על היצרנות במהלך כלל התחלובה. מיד לאחר ההמלטה, הפרה נכנסת למאזן אנרגיה שלילי מכיוון שצריכת האנרגיה מהמזון אינה מספקת את הדרישות הגבוהות של אנרגיה לייצור חלב. כתוצאה מכך, מתרחש פירוק של רקמות אגירה כדי לספק את האנרגיה לעטין הדרושה לייצור חלב. פירוק רקמת השומן מלווה באיבוד משקל גוף ומצב גופני לאחר ההמלטה. מידת החומרה של מאזן האנרגיה השלילי קשור לביצועי הפרה בהמשך התחלובה, לתחלואה ואף לפוריות. בנוסף, ידוע כי עקה חימצונית (oxidative stress) הנובעת מפרוק מוגבר של רקמת השומן משפיעה הן על תהליכים מטבוליים מרכזיים והן ברמת בלוטת החלב. כיום, חישוב מאזן האנרגיה נעשה באופן ישיר באמצעות מדידת צריכת המזון הפרטנית – מדידה אשר אינה ישימה בתנאי משק. לכן, איתור של ביומרקרים בחלב שקשורים לחומרת העקה החימצונית ולמאזן אנרגיה עשויים לשמש ככלי רב ערך ולא פולשני להערכת הסטטוס המטבולי של הפרה. מחקרים שערכנו לאחרונה הראו כי הריכוזים של מטבוליטים הקשורים לפעילות הגליקוליטית בתאים האפיתליאלים בעטין קשורים ישירות לתנובת החלב ולמטבוליזם בעטין. גלוקוז הינו מטבוליט מרכזי בתאי האפיתל המפרישים בבלוטת העטין, וכ-85% מכלל הייצור (whole body turnover) של גלוקוז מנוצל ע"י תאים אלו בפרות חלב גבוהות תנובה. ריכוזי הגלוקוז בחלב משקפים את ריכוזו בציטופלסמה של התאים המפרישים, ועלייה ביחס בין גלוקוז-6-פוספט לגלוקוז מצביעה על שינויים במטבוליזם הביניים ובעיקר על הפניית גלוקוז-6-פוספט למסלול הפנטוז-פוספט על חשבון מעבר גלוקוז במסלול הגליקוליזה. מטרת המחקר הנוכחי הייתה זיהוי של ביומרקרים בחלב אשר נמצאים בקורלציה עם מאזן האנרגיה וריכוזי מטבוליטים בדם על מנת לבסס את השימוש במדדים אלו כביומרקרים אובייקטיביים לאפיון מאזן האנרגיה והסטטוס המטבולי של פרות לאחר ההמלטה. יעדי ושלבי המחקר: שנה א': בחינת הקשר בין ריכוזי ביומרקרים בחלב (גלוקוז, גלוקוז-6-פוספט, פעילות G6PDH) לבין מאזן האנרגיה בפרות לאחר המלטה. שנה ב': ביצוע ניסוי נרחב לבחינת

הקשר בין ביומרקרים מטבוליים בחלב למאזן האנרגיה של פרות לאחר ההמלטה. שנה ג': ביסוס ואופטימיזציה של שימוש בביומרקרים נבחרים בחלב לאפיון פרטני של מאזן האנרגיה, וריכוזי מטבוליטים בדם בפרות לאחר המלטה.

בשנת המחקר הראשונה ביצענו ניסוי בו אספנו דוגמאות חלב פעם בשבוע מ-12 פרות לאחר ההמלטה למשך 5 שבועות ברפת וולקני. בחנו את הקשר בין ריכוזי מטבוליטים שונים בחלב למאזן האנרגיה ולמצב המטבולי. תוצאות המחקר: נמצא כי ריכוזי הגלוקוז בחלב עלו משבוע 1 לאחר ההמלטה לשבוע 3 ואז נשארו קבועים עד שבוע 6 בתחלובה. לעומת זאת, ריכוזי ה-G6P בחלב היו הגבוהים ביותר בשבוע ה-1 לאחר ההמלטה, נותרו גבוהים בשבוע השני ואז ירדו בשבוע ה-3 לאחר ההמלטה, והמשיכו לרדת עד שבוע 5 לאחר ההמלטה. היחס בין G6P לגלוקוז היה הגבוה ביותר בשבוע 1 בתחלובה והגיע לשפל בשבוע 5 לאחר ההמלטה. בנוסף, בחנו את פעילות האנזים glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) בחלב, ונמצא כי פעילותו היתה גבוהה ביותר בשבועות 1-2 לאחר ההמלטה, ואז ירדה, עד לשבוע 5 בתחלובה. כמו כן, פעילות ה-G6PDH היה בקורלציה עם ריכוזי ה-G6P בחלב ועם היחס G6P לגלוקוז. פעילות ה-G6PDH היתה במתאם שלילי עם הימים בתחלובה, צריכת המזון של הפרות ומאזן האנרגיה. מתוצאות המחקר עד כה נראה כי בהתאם להיפותזת המחקר שלנו, בתחילת התחלובה G6P בתאי העטין מופנה למעגל הפנטוז-פוספט כחלק מהתאמה הומאוסטטית שמטרתה לאזן את עודפי העקה החימצונית בעטין בתחילת התחלובה בפרות חלב. תוצאות ניסוי זו פורסמו ב-Zachut et al. (2016).

בשנת המחקר השנייה ביצענו ניסוי בו 40 פרות לאחר ההמלטה חולקו ל-2 קבוצות: (1) נחלבו 3 פעמים ביממה כמקובל ($n = 20$), (2) נחלבו פעמיים ביממה למשך 30 יום לאחר ההמלטה ($n = 20$). דוגמאות דם וחלב נאספו 3 פעמים בשבוע, כאשר דוגמאות החלב נאספו שלוש פעמים ביממה, עד 30 יום בתחלובה. דוגמאות החלב נשלחו הן לבדיקות רכיבי חלב והרכב חומצות שומן בחלב במעבדה המרכזית לחלב (קיסריה), והן שימשו לאנליזות של מטבוליטים שונים במעבדה. בדוגמאות הדם בחנו את ריכוזי הקורטיזול, מדד לעקה חימצונית (MDA), גלוקוז, TNF-alpha ו-NEFA. האנליזות לריכוזי מטבוליטים שונים בחלב בוצעו בדוגמאות חלב של 26 פרות, כך שסה"כ נבחנו 266 דוגמאות חלב משבועות 1-6 בתחלובה. בכל דוגמאות החלב בחנו את ריכוזי המטבוליטים: G6P, Glucose, Lactic acid, Malic acid, פעילות האנזים G6PDH וכן את רמות ה-MDA ו-ORAC שמהוות ביומרקרים לעקה חימצונית בחלב. התוצאות נותחו בשני אופנים. א. בנייתו הראשוני בחנו את ההשפעה של תדירות החליבות (2 או שלוש חליבות בחודש הראשון לאחר ההמלטה) על ריכוזי המטבוליטים בחלב. ב. בנייתו השני התייחסנו לשונות בין הפרות במאזן האנרגיה הפרטני, ולכן חילקנו את הפרות לפי מאזן האנרגיה המחושב עד 21 יום לפי: (1) פרות עם מאזן אנרגיה שלילי (NEB) – קטן מ-6 Mcal/d, (2) פרות עם מאזן אנרגיה חיובי (PEB) – גדול מ-3.5 Mcal/d.

מניתוח התוצאות עולה כי ריכוזי ה-G6P בחלב היו גבוהים בכל הפרות בשבוע הראשון לאחר ההמלטה, אולם לא היה הבדל בין פרות שנחלבו פעמיים או שלוש ביממה לגבי ריכוזו בחלב. עם זאת, בשבוע השלישי לאחר ההמלטה ריכוזי ה-G6P נטו להיות נמוכים יותר בחלב של פרות שנחלבו

3 פעמים ביממה לעומת פעמיים ($P < 0.09$). לא היה הבדל בין פרות עם מאזן אנרגיה חיובי או שלילי בריכוז ה-G6P בחלב. הריכוז של גלוקוז בחלב היה נמוך בכל הפרות בשבועות הראשונים לאחר ההמלטה, אך לא נראה הבדל בין פרות שנחלבו פעמיים או שלוש ביממה לגבי ריכוז הגלוקוז בחלב, אולם, בשבוע ה-3 לאחר ההמלטה ריכוזי הגלוקוז בחלב היו גבוהים יותר בפרות שנחלבו 3 פעמים ביממה לעומת פעמיים. לא היה הבדל בריכוזי הגלוקוז בחלב בין פרות עם מאזן אנרגיה שלילי או חיובי. פעילות של האנזים G6PDH בחלב הייתה גבוהה בכל הפרות בשבועיים הראשונים לאחר ההמלטה, ונמצא כי פעילותו הייתה גבוהה יותר בפרות שנחלבו 3 פעמים ביממה לעומת פעמיים בשבועות 3-4 בתחלובה ($P < 0.03$), ונטתה להיות גבוהה יותר בשבוע 2 בתחלובה ($P < 0.08$). כמו כן, פעילותו הייתה גבוהה יותר בפרות עם מאזן אנרגיה שלילי (NEB) לעומת פרות עם מאזן אנרגיה חיובי (PEB) בשבועות 1-4 בתחלובה ($P < 0.05$). רמות ה-MDA בחלב נטו להיות נמוכות יותר בפרות שנחלבו 3 פעמים ביום לעומת פעמיים בשבועות 2-3 לאחר ההמלטה ($P < 0.09$). כמו כן, רמות ה-MDA נטו להיות נמוכות יותר בפרות NEB לעומת PEB בין שבועות 2-5 בתחלובה ($P < 0.1$). הריכוזים של Lactic acid, Malic acid בחלב לא נבדלו בין פרות שנחלבו פעמיים או שלוש ביממה בחודש הראשון לאחר ההמלטה או בין פרות עם מאזן אנרגיה שלילי או חיובי.

מסקנות: מתוצאות ניסוי א' נראה כי בהתאם להיפותזת המחקר שלנו, בתחילת התחלובה G6P בתאי העטין מופנה למעגל הפנטוז-פוספט כחלק מהתאמה הומאוסטטית שמטרתה לאזן את עודפי העקה החימצונית בעטין בתחילת התחלובה בפרות חלב. בניסוי א' גילינו כי ריכוזי ה-G6P והיחס G6P לגלוקוז בחלב יכולים לשמש כביומרקרים אובייקטיביים, מדויקים ולא-חודרניים למאזן האנרגיה של הפרה בתחילת התחלובה. כמו כן, אנו משערים כי הפעילות המוגברת של G6PDH בתחילת התחלובה מייצגת עלייה בהפנייה של G6P למעגל הפנטוז-פוספט. עם זאת, הניסוי נערך עם מספר קטן של פרטים והיה צורך לבסס את התוצאות בניסוי ב'.

מתוצאות ניסוי ב' עולה כי ריכוזי ה-G6P בחלב אינם רגישים מספיק בכדי לאבחן פרות במאזן אנרגטי שלילי לאחר ההמלטה. לעומת זאת, נמצא כי הייתה עלייה בפעילות G6PDH בחלב של פרות עם מאזן אנרגטי שלילי (NEB) לעומת אלו עם מאזן אנרגטי חיובי ב-21 יום בתחלובה, וזאת בהתאמה לתוצאות של ניסוי א', כך שפעילות G6PDH יכולה להוות ביומרקר חדשני למאזן אנרגיה בפרות חלב. בניסוי זה, ריכוזי המטבוליטים חומצה מאלית וחומצה לקטית לא השתנו באופן מובהק בפרות שנבדלו במאזן האנרגיה, ולכן נראה כי השיעור שלהם בחלב אינו רגיש מספיק בכדי לייצג את הפרופיל המטבולי של תאי העטין בהתאם למצב הפיזיולוגי של הפרה. לעומת זאת, נמצא כי הרכב חומצות השומן בחלב היה במתאם עם מאזן האנרגיה של הפרות, כאשר שיעור החומצה האולאית בחלב היה גבוה יותר בפרות עם מאזן אנרגטי שלילי לעומת כאלו במאזן חיובי. בנוסף, נמצא כי שיעור חומצות השומן החד-בלתי רוויות (MUFA) והבלתי רוויות (USFA) היו גבוהות יותר, ואילו שיעור חומצות השומן הרוויות (SFA) נטה להיות נמוך יותר, בפרות עם מאזן אנרגטי שלילי לעומת פרות במאזן אנרגיה חיובי ב-21 יום בתחלובה.

לסיכום, במחקר זה בחנו לראשונה מספר מדדים בחלב של פרות לאחר ההמלטה, אשר עשויים להוות ביומרקרים חדשניים למאזן האנרגיה של הפרה. על אף שבניסוי א' נראה כי רמות ה-G6P עשויות לשקף את מאזן האנרגיה, כאשר בחנו זאת בניסוי נרחב נמצא כי רגישותו אינו גבוהה מספיק ולכן הוא אינו מתאים כביומרקר למאזן אנרגיה בחלב. לעומת זאת, ממצאי המחקר מראים לראשונה כי פעילות האנזים G6PDH בחלב מהווה מדד חדיש למאזן האנרגיה של פרות לאחר ההמלטה, ויש להמשיך ולחקור את האפשרות לבחון את פעילותו בחלב כמדד לא חודרני ל-NEB בפרות חלב. כמו כן, מצאנו כי הרכב חומצות השומן בחלב, ובפרט רמות החומצה האולאית, מהוות גם כן ביומרקר למאזן האנרגיה של הפרות לאחר ההמלטה, ואנו ממליצים לבחון ברמה הארצית את שיעור חומצות השומן בחלב ככלי יישומי שייתן מידע חשוב לרפתנים על מאזן האנרגיה של הפרות.

Abstract

Early lactation in high-producing dairy cows is associated with negative energy balance (EB) and with massive lipolysis in adipose tissue in order to support the energy demands for milk production. The large influx of free fatty acids and glycerol increases oxidative stress in the mammary gland. The objectives of the present study were to identify objective biomarkers of EB in milk of postpartum dairy cows. Specifically, we aimed to examine the relationship between metabolites concentrations in milk (glucose, glucose-6-phosphate (G6P), lactate, malate) and EB as well as the correlation to blood metabolites in postpartum cows. In experiment 1, milk concentrations of glucose and G6P, activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), as well as the levels of the oxidative stress marker malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity of milk (ORAC), calculated EB and plasma nonesterified fatty acids and insulin concentrations were measured in 12 high-yielding dairy cows in early lactation, once a week for 5 weeks. Weekly averages of milk glucose concentration increased from 81 to 184 mM, and of milk G6P decreased from 223 to 81 mM. The activity of milk G6PDH decreased, so that the G6P/glucose ratio in milk decreased from 3.5 to 0.5. A significant correlation between milk G6PDH activity and milk G6P concentration, and an inverse relationship between milk MDA concentration and days in lactation suggest that G6P is shunted to the pentose phosphate pathway in the mammary gland in early lactation, as part of a homeostatic adaptation to counterbalance the excess oxidative stress during early lactation in dairy cows. These results were published in Zachut et al., (2016).

In experiment 2, 40 multiparous cows were divided into 2 groups: the control cows were milked 3 times a day, and the treated cows were milked twice a day until 30 days in milk (DIM), and then 3 times a day, in order to affect their EB by reducing milking frequency postpartum. Milk samples were taken twice a week from 2 or 3 consecutive milkings until 45 DIM for analysis of milk biomarkers. Individual dry matter intake (DMI), milk yields, and body weights were recorded daily. Blood samples were taken 3 times weekly from 14 d prepartum until 45 DIM. The milk samples were sent for detection of milk components and fatty acid composition in the Central Dairy Laboratory (Caesarea). In the blood samples, we examined cortisol concentrations, MDA, ORAC, glucose, TNF-alpha and NEFA. Analysis of metabolites in milk was performed in samples of 26 cows, so a total of 266 samples of milk from

weeks 1-6 were examined for: G6P, glucose, lactic acid, malic acid and G6PDH activity, as well as MDA and ORAC. The results were analyzed in two ways: A. the effect of the frequency of milking (2 or 3 milkings in the first month postpartum). B. according to the differences between the individual EB up to 21 days: 1) cows with a negative energy balance (NEB) - less than -6 Mcal/d, 2) (PEB) - greater than 3.5 Mcal/d. Analysis of the results showed that the G6P concentrations in milk were high in all cows during the first week in milk, but there was no difference between cows milked 2 or 3 times a day in milk G6P. The concentration of glucose in milk was low in all cows during the first few weeks postpartum, but there was no difference between cows milked 2 or 3 times a day for the concentration of glucose in milk. There was no difference in glucose concentrations in milk between cows with negative or positive EB. The activity of the enzyme G6PDH in milk was high in all cows during the first two weeks postpartum and was found to be higher in cows milked 3 times a day ($P < 0.03$). In addition, its activity was higher in NEB cows compared to PEB in weeks 1-4 ($P < 0.05$). Levels of MDA in milk tended to be lower in cows milked 3 times a day ($P < 0.09$). In addition, MDA levels tended to be lower in NEB cows compared to PEB between weeks 2-5 in the lactation ($P < 0.1$). The concentrations of lactic acid and malic acid in milk did not differ between cows milked 2 or 3 times a day in the first month postpartum, or between cows with a negative or positive EB.

CONCLUSIONS: According to our hypothesis, it seems that G6P in mammary epithelia cells is directed to the pentose phosphate cycle as part of a homeostatic adjustment aimed at balancing the excess oxidative stress in the udder at the onset of lactation. In experiment 1 we found that the G6P concentrations and the G6P/glucose ratio in milk can be used as objective and non-invasive biomarkers for the cow's EB at the onset of lactation. We hypothesized that the increased activity of G6PDH postpartum represents an increase in the G6P referred to the pentose phosphate cycle. However, the experiment was conducted with a small number of individuals and it was necessary to validate the results in experiment 2.

The results of experiment 2 show that the concentrations of G6P in milk are not sensitive enough to diagnose cows in a negative EB. On the other hand, there was an increase in G6PDH activity in cows' milk with NEB compared to those with a positive EB, in accordance with the results of experiment 1, so that G6PDH activity can be an innovative biomarker for EB in dairy cows. In this experiment, the concentrations of malic acid and lactic acid metabolites did not differ significantly according to EB, so they appear to be insufficiently sensitive. On the other hand, it was found that the composition of fatty acids in milk was correlated with the EB of the cows: the ratio of oleic acid in milk was higher in cows with NEB than in positive balance. In addition, the proportion of monounsaturated fatty acids (MUFA) and unsaturated (USFA) was higher, while the saturated fatty acids (SFA) tended to be lower, in cows with NEB. In conclusion, this study examined for the first time a number of metabolites in cows' milk postpartum, which may be novel biomarkers to the cow's EB. These findings demonstrate for the first time that the activity of the enzyme G6PDH is a biomarker of the EB in postpartum cows. In addition, the composition of fatty acids in milk, especially the percentage of oleic acid, is a biomarker of EB, and we recommend testing the composition of fatty acids in milk as a practical tool that will provide important information to dairy farmers concerning the individual EB of cows.

מבוא ותיאור הבעיה:

תחילת התחלובה הינה תקופה קריטית מבחינת ביצועי הפרה, כאשר בפרק זמן זה מתרחשים שינויים מטבוליים משמעותיים אשר משפיעים על היצרנות במהלך כלל התחלובה. מכיוון שצריכת המזון של פרות לאחר ההמלטה אינה מספקת את הדרישות האנרגטיות העצומות של העטין לצורך ייצור חלב, ישנו שינוע נרחב של מטבוליטים מרקמות השומן במקביל לעלייה משמעותית בקצב הגלוקונאוגנזה בכבד (Bell and Bauman, 1997). תקופת המעבר מסוף ההיריון לתחילת התחלובה מאופיינת בדיכוי של מערכת החיסון (Mallard et al., 1998), מאזן אנרגיה שלילי (Goff and Horst, 1997; Drackley, 1999) ועלייה בשיעור הפרעות מטבוליות ותחלואה (Goff and Horst, 1997; Mallard et al., 1998). בנוסף, מאזן האנרגיה השלילי לאחר ההמלטה משפיע באופן שלילי על פוריות הפרה (Butler and Smith, 1989). כמו כן, ידוע כי עקה חימצונית (oxidative stress) הנובעת מפרוק מוגבר של רקמת השומן משפיעה הן על תהליכים מטבוליים מרכזיים (פעילות הכבד) והן ברמת בלוטת החלב.

מחקרים שערכנו לאחרונה הראו כי הריכוזים של מטבוליטים הקשורים לפעילות הגליקוליטית בתאים האפיתליאלים בעטין קשורים ישירות לתנובת החלב ולמטבוליזם בעטין (Silanikove et al., 2014a). בעבודות אלו נמצא שהגברת תהליכי גליקוליזה על חשבון מטבוליזם מיטוכונדריאלי הינו מנגנון עיקרי בבלוטת החלב להקטנת ייצור החלב ע"י ירידה בייצור ATP והעברת סיגנלים להפחתת ייצור החלב בעטין (Silanikove et al., 2014a). ריכוזי מטבוליטים שנוצרים בתהליך הגליקוליזה, כגון לקטט ומלאט, עשויים לחזות שינויים בפעילות התאים המפרישים בבלוטה. ניתן לחשב אינדקס MRM/CI (mitochondrial/cytosol index) בחלב ע"י חישוב היחס: ציטראט / לקטט + מלאט. אינדקס זה משקף את הכיווניות של בלוטת העטין מבחינת תהליכי הגליקוליזה ומטבוליזם מיטוכונדריאלי.

תאי אפיתל בעטין אינם יכולים לסנטז גלוקוז בגלל חוסר באנזים גלוקוז-6-פוספטאז (Scott et al., 1976). לכן, ריכוז הגלוקוז בחלב תלוי בכמות הגלוקוז הנספג מן הדם לתוך העטין. ישנם מסלולים מטבוליים שונים לגלוקוז הנמצא בתאי האפיתל בעטין: 1) כ-80% מהגלוקוז הנספג משמש לסינטזת לקטוז (Annison, 1983). ייצור הלקטוז מבקר את הפרשת החלב מן העטין בגלל האוסמולריות הגבוהה ולכן ריכוזו בחלב קורלטיבי לנפח החלב המיוצר. לחילופין, הגלוקוז בעטין יכול: 2) להפוך לגלוקוז-6-פוספט (G6P) בכדי לייצר UDP-galactose, או 3) להיכנס למעגל הפנטוז-פוספט לשם ייצור אלמנטים מחזרים כ- NADPH₂, או 4) לעבור חמצון מלא לאנרגיה במעגל החומצה הציטרית, או 5) להפוך לגליצרול לשם ייצור טריגליצרידים (Bauman, 1970; Scott et al., 1976). מכאן, ש-G6P הינה מולקולת ביניים בייצור לקטוז וכמו כן נמצאת בשלב הראשון למסלולי גליקוליזה ומעגל הפנטוז-פוספט.

המשמעות של ריכוזי הגלוקוז החופשי וה-G6P בחלב המופרש מן העטין אינה ברורה. התפיסה המקובלת והמבוססת ביותר היא שריכוזיהם בחלב משקפים את הרמות התוך-תאיות בזמן ההפרשה מתאי האפיתל (Kuhn and White, 1975). עלייה ביחס בין גלוקוז-6-פוספט לגלוקוז מצביעה על

שינויים במטבוליזם הביניים ובעיקר על הפניית גלוקוז-6-פוספט למסלול הפנטוזות המזורחנות (pentose phosphate pathway) על חשבון מעבר גלוקוז במסלול הגליקוליזה. למעבר זה אין השפעה על זמינות של ATP כיוון שבסוף המעגל נוצרים מטבוליטים (גליצרול-6-פוספט ופרוקטוז-6-פוספט) היכולים לחדור למיטוכונדריה או לשמש מקור להזנת מעגל קרבס. החשיבות של תיעול גלוקוז למסלול הפנטוזות המזורחנות בתחילת התחלובה קשורה לייצור הקו-פקטור NADPH. NADPH חיוני לחיזור גלוטטיון (glutathione) לגלוטטיון מחוזר (glutathione reductase) באמצעות האנזים גלוטטיון פראוקסידאז (glutathione peroxidase). תהליך זה מוצמד לפירוק מי חמצן הנוצרים במצב עקה באופן מוגבר למים, ומהווה את אחד ממנגנוני האנטי-אוקסידציה החשובים ביותר בתא. לסיכום, כיום אין שיטה כמותית מדויקת, לא חודרנית ואובייקטיבית לקביעת הסטטוס המטבולי של פרות לאחר המלטה. לכן, זיהוי של ביומרקרים בחלב אשר קשורים למידת איבוד מצב גופני ומשקל גוף וריכוזי מטבוליטים בדם יוכלו לשמש ככלי לאפיון פרטני של הסטטוס המטבולי של פרות לאחר ההמלטה.

הנחות היסוד של המחקר המוצע: על סמך מחקרים קודמים שביצענו וכן התוצאות ההקדמיות למחקר זה, אנו מניחים כי ריכוזי מטבוליטים בחלב (גלוקוז, גלוקוז-6-פוספט, לקטט, מלאט) יהיו קשורים למידת איבוד משקל גוף ומצב גופני וכן לריכוזי מטבוליטים בדם. אנו מניחים שביומרקרים אלו יוכלו לשמש ככלי אובייקטיבי לאפיון הסטטוס המטבולי של פרות לאחר ההמלטה.

יעדי ושלבי המחקר:

שנה א': בחינת הקשר בין ריכוזי ביומרקרים בחלב (גלוקוז, גלוקוז-6-פוספט, לקטט, מלאט) לבין מידת איבוד משקל גוף ומצב גופני בפרות לאחר המלטה.

שנה ב': ביצוע ניסוי לבחינת הקשר בין ביומרקרים מטבוליים בחלב למאזן האנרגיה של פרות לאחר ההמלטה.

שנה ג': ביסוס ואופטימיזציה של שימוש בביומרקרים נבחרים בחלב לאפיון פרטני של מאזן האנרגיה, וריכוזי מטבוליטים בדם בפרות לאחר המלטה.

שיטות וחומרים

ניסוי א' – בניסוי זה אספנו דוגמאות חלב פעם בשבוע מ-12 פרות לאחר ההמלטה למשך 5 שבועות ברפת וולקני. בחנו את הקשר בין ריכוזי מטבוליטים שונים בחלב למאזן האנרגיה ולמצב המטבולי. תיאור מפורט של מהלך הניסוי והאנליזות מופיעים במאמר Zachut et al. (2016).

ניסוי ב' – 40 פרות לאחר ההמלטה חולקו ל-2 קבוצות: (1) נחלבו 3 פעמים ביממה כמקובל ($n = 20$), (2) נחלבו פעמיים ביממה למשך 30 יום לאחר ההמלטה ($n = 20$). דוגמאות דם וחלב נאספו 3 פעמים בשבוע, כאשר דוגמאות החלב נאספו שלוש פעמים ביממה, עד 30 יום בתחלובה. הפרות נשקלו 3 פעמים ביום ביציאה ממכון החליבה (צח"מ אפיקים).

דוגמאות החלב נשלחו הן לבדיקות רכיבי חלב והרכב חומצות שומן בחלב במעבדה המרכזית לחלב (קיסריה), והן שימשו לאנליזות של מטבוליטים שונים במעבדה. בדוגמאות הדם בחנו את ריכוזי הקורטיזול, מדד לעקה כימצונית (MDA), גלוקוז ו-NEFA.

האנליזות לריכוזי מטבוליטים שונים בחלב בוצעו בדוגמאות חלב של 26 פרות, כך שסה"כ נבחנו 266 דוגמאות חלב משבועות 1-6 בתחלובה. בכל דוגמאות החלב בחנו את ריכוזי המטבוליטים: G6P, Glucose, Lactic acid, Malic acid, פעילות האנזים G6PDH וכן את רמות ה-MDA ו-ORAC שמהוות ביומרקרים לעקה כימצונית בחלב.

התוצאות נותחו בשני אופנים. א. בניתוח הראשוני בחנו את ההשפעה של תדירות החליבות (2 או שלוש חליבות בחודש הראשון לאחר ההמלטה) על ריכוזי המטבוליטים בחלב. ב. בניתוח השני התייחסנו לשונות בין הפרות במאזן האנרגיה הפרטני, ולכן חילקנו את הפרות לפי מאזן האנרגיה המחושב עד 21 יום לפי: 1) פרות עם מאזן אנרגיה שלילי (NEB) – קטן מ-6 Mcal/d, 2) פרות עם מאזן אנרגיה חיובי (PEB) – גדול מ-3.5 Mcal/d.

הרכב מנה: החל מההמלטה, הפרות הוזנו במנת הרפת הסטנדרטית (טבלה 1) ad libitum. נתוני ההזנה הפרטניים נשמרו ושומשו לחישוב מאזן האנרגיה של כל פרה. נתוני תנובת החלב ורכיביו ומשקל הגוף היומי נאספו בתוכנת אפיפארם (אפיקים).

טבלה מספר 1 – הרכב המנה

אחוז מחומר יבש (%)	
9.2	תירס גרוס
2.2	שעורה לחוצה
4.7	חיטה
7.1	כוספת לפתית
1.1	כוספת חמניות
14.5	גלוטן פיד
17.8	תחמיץ חיטה
5.9	תחמיץ תירס
11	שחת דגן
8.8	גולדן ¹ DDG
1.8	מי לקטוז
1.4	שומן מוגן
0.3	אוריאה
1.0	ביקרבונט
4	סידנית
1.1	מלח

0.1	ויטמינים ומינרלים
	הרכב כימי
1.78	אנרגיה נטו, מק"ל לק"ג ח"י ³
16.5	חלבון (%)
34.7	מזון גס (%)
32.1	NDF ² (%)
17.7	NDF ² גס (%)
4.7	שומן (%)

1. Dried Distillers Grain – גרעינים שעברו עיבוד וייבוש לצורך הארכת חיי המדף ושיפור הנעילות.
2. Neutral Detergent Fiber – סיבים אלו כוללים: ליגנין, המיצולוז וצולוז.
3. מגה קלוריות לקילוגרם חומר יבש.

איסוף דמים: דגימות דם נלקחו שלוש פעמים בשבוע בשעה 7:30 בבוקר החל מ-3 שבועות לפני ההמלטה המיועדת ועד ארבעים וחמישה ימים לאחר ההמלטה. דגימות הדם נאספו מעורק הזנב בעזרת מחט 20G (BD Vacutainer, ניו ג'רזי, ארה"ב) לתוך מבחנת ואקום המכילה הפרין בנפח של 10ml (BD Vacutainer, ניו ג'רזי, ארה"ב). המבחנות הונחו בקרח. במעבדה, הדם סורכז (3000RPM, 15 דקות, 4°C) לאחר מכן הועברה הפלסמה המופרדת לאפנדורפים.

איסוף חלב: דגימות חלב נאספו פעמיים בשבוע, במשך שלוש חליבות רצופות או במשך שתי חליבות רצופות (בפרות שנחלבו פעמיים ביום) החל מ-4 ימים לאחר ההמלטה ועד 50 יום בתחלובה.

סט אחד מדגימות החלב שנאספו נשלחו אחת לשבוע למעבדה המרכזית של תנובה, קיסריה ישראל. בדגימות נבדק: אחוז שומן, אחוז חלבון, אחוז לקטוז, אוריאה, קזאין, וספירת תאים סומטיים. כמו כן נבדקו בדגימות אחוז חומצות השומן הבאות: חד בלתי רוויות, רב בלתי רוויות, שומן רוויות, בלתי רוויות, פלמיטית, סטארית, ואולאית. סט שני מדגימות החלב נאספו יחד למבחנות 50 (Greiner bio-one, גרמניה) ליצירת מאגר (פול) יומי. המאגר הורכב מאיחוד של שלושת החליבות בהתאם לכמותם היחסית מסך כל החליבות. לאחר יצירת המאגר הדגימות הוקפאו ב-40 C^o – להמשך טיפול.

אנליזה לקביעת ריכוזי (NEFA) Non Esterified Fatty acids – ריכוזי ה-NEFA בפלסמה נקבעו באמצעות קיט לפי הוראות היצרן NEFA C Test kit- Wako Chemicals GmbH (נס, גרמניה).

אנליזה לקביעת ריכוזי MDA - MDA הינו תוצר לוואי בתהליך חמצון חומצות השומן (פראוקסידציה) אשר נבחן בשיטת TBARS.

אנליזה לריכוזי קורטיזול בדם – באמצעות קיט ELISA (DRG, גרמניה, מק"ט EIA-1887-38).

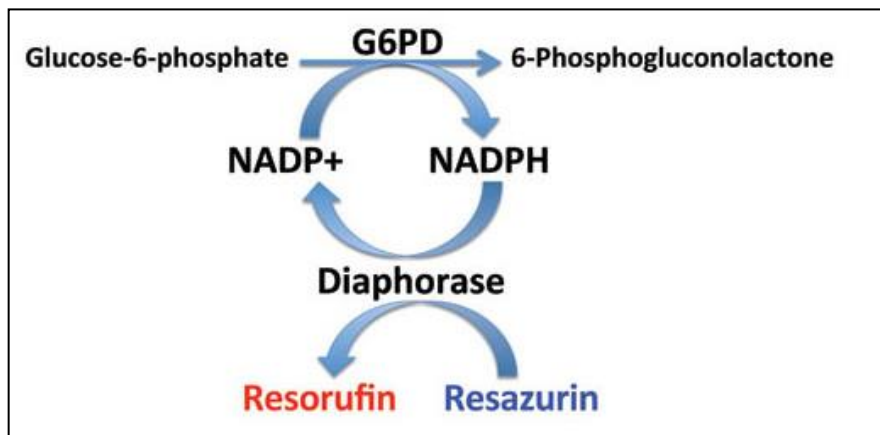
אנליזה לריכוזי TNF α בדם: בעזרת קיט ELISA (R&D Systems, USA).

טיפול בחלב במעבדה: הפרדת שומן מחלב – יום לפני ביצוע האנליזה, דוגמאות החלב הקפואות הועברו למקרר לשם הפשרה איטית במקרר. ביום הטיפול, הועברו הדגימות המופשרות לאמבט

שחומם לטמפרטורה של 40°C למשך חצי שעה. בתום חצי שעה, הדגימות סורכזו למשך חצי שעה ב- $10,000\text{ rpm}$ בטמפרטורה של 8°C . לאחר מכן הופרד הנוזל משכבת השומן העליונה, עורבב היטב והועבר לאפנדורפים והוקפא ל- 20°C עד להמשך טיפול.

בדיקת פעילות Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PDH) - לפי המפורט ב- Zachut et al., (2016).

בדיקת Glucose ו-Glucose-6-Phosphate - הריכוזים של גלוקוז וגלוקוז-6-פוספט בחלב נקבעים ע"י ריאקציה אנזימטית פשוטה שמשמשת ביצירת NADPH מ-NADP⁺. Diaphorase משתמש ב-NADPH שנוצר ובעזרתו הופך רזוזורין לרזוזורופין, חומר אשר פולט אור וניתן לכמת אותו במונוכרומטור.



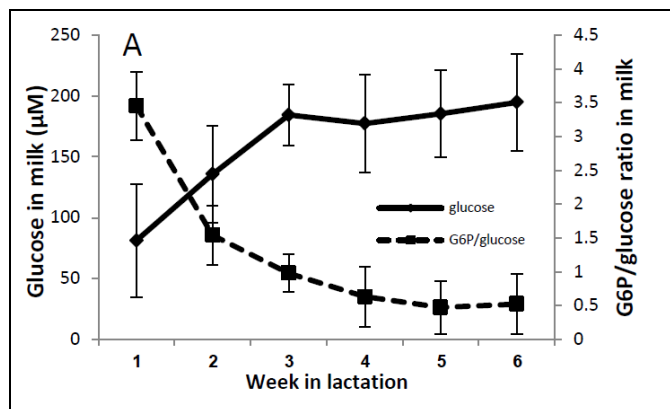
בדיקת Malic Acid - ריכוזי ה- Malic Acid בחלב נקבעו בריאקציה פלואורימטרית. בדיקת Lactic Acid - ריכוזי Lactic Acid נקבעו באמצעות ריאקציה אנזימטית במרכז האנזים Diaphorase שמשמש באותן מולקולות NADH לצורך הפיכת רזוזורין לרזוזורופין. שיטה לבדיקת Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) - כפי שמפורט ב- Zachut et al., (2016).

חישוב מאזן האנרגיה: לאחר ההמלטה, מאזן האנרגיה היומי של כל פרה חושב על ידי שימוש בנתוני צריכת המזון, נתוני ייצור החלב והרכבו, ומשקל גוף הפרה כפי שמפורט ב-NRC (2001). אנליזה סטטיסטית: נתוני משקל הגוף, הייצור, מאזן האנרגיה, מדדי העקה והמטבוליטים בדם ובחלב נבחנו באמצעות פרוצדורת repeated measurements PROC MIXED של SAS (גרסא 9.2, 2003). הנתונים המוצגים הם ערכים ממוצעים \pm שגיאת תקן ממוצעת. ערך של $P < 0.05$ הוגדר כשונה באופן מובהק, וערכים בין 0.05 ל-0.1 הוגדרו כנטייה סטטיסטית.

תוצאות

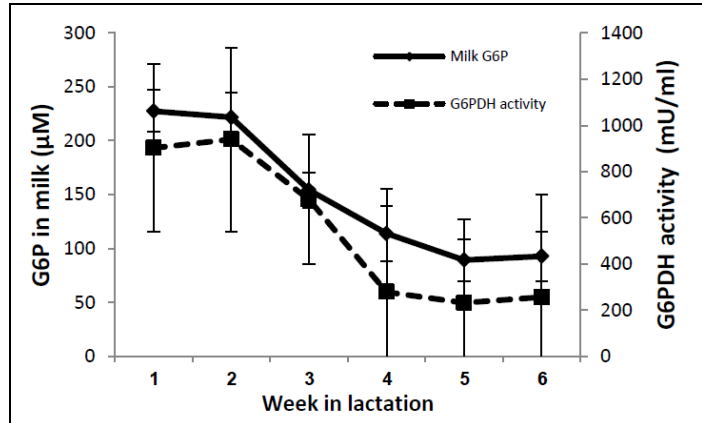
ניסוי א' – נמצא כי ריכוזי הגלוקוז בחלב עלו משבוע 1 לאחר ההמלטה לשבוע 3 ($P < 0.01$) ואז נשארו קבועים ($\sim 180 \mu\text{M}$) עד שבוע 6 בתחלובה. ריכוזי הגלוקוז בחלב היו בקורלציה חיובית עם הימים בתחלובה ($P < 0.0001$). לעומת זאת, ריכוזי ה-G6P בחלב היו הגבוהים ביותר בשבוע ה-1 לאחר ההמלטה ($223.2 \pm 29.2 \mu\text{M}$), נותרו גבוהים בשבוע השני ואז ירדו בשבוע ה-3 לאחר ההמלטה ($P < 0.02$), והמשיכו לרדת עד שבוע 5 לאחר ההמלטה ($81.0 \pm 23.2 \mu\text{M}$; $P < 0.01$). כתוצאה מכך, ריכוזי ה-G6P היו בקורלציה שלילית עם הימים בתחלובה. היחס בין G6P לגלוקוז היה הגבוה ביותר בשבוע 1 בתחלובה (3.5 ± 0.5 , $P < 0.02$) והגיע לשפל בשבוע 5 לאחר ההמלטה (0.5 ± 0.4 , $P < 0.04$). היחס G6P לגלוקוז היה במתאם שלילי אקספוננציאלי עם הימים בתחלובה (טבלה מס' 1, איור מס' 1).

איור מס' 1 – ריכוזי גלוקוז והיחס גלוקוז/גלוקוז-6-פוספט בחלב של פרות לאחר ההמלטה



בנוסף, בחנו את פעילות האנזים glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) בחלב, ונמצא כי פעילותו היתה גבוהה ביותר בשבועות 1-2 לאחר ההמלטה, ואז ירדה, בדומה לריכוזי ה-G6P בחלב עד לשבוע 5 בתחלובה. כמו כן, פעילות ה-G6PDH היתה בקורלציה עם ריכוזי ה-G6P בחלב ($P < 0.0001$) ועם היחס G6P לגלוקוז. פעילות ה-G6PDH היתה במתאם שלילי עם הימים בתחלובה, צריכת המזון של הפרות ומאזן האנרגיה (טבלה מס' 1).

איור מס' 2 – ריכוזי גלוקוז-6-פוספט ופעילות האנזים G6PDH בחלב של פרות לאחר ההמלטה



ריכוזי malondialdehyde (MDA) בחלב, אשר הינו מדד לעקה חמצונית, היו הגבוהים ביותר בתחילת התחלובה ואז ירדו באופן אקספוננציאלי (טבלה מס' 1). ריכוזי MDA בחלב היו בקורלציה שלילית עם הימים בתחלובה. הקיבולת האנטי-חמצונית בחלב (ערכי ORAC) נטו להיות בקורלציה שלילית עם הימים בתחלובה ועם מאזן האנרגיה (טבלה מס' 1). ריכוזי ה-G6P בחלב היו במתאם חיובי עם ריכוזי ח.שומן חופשיות (NEFA) בדם (טבלה מס' 1), והיחס G6P לגלוקוז היה במתאם עם ריכוזי ה-NEFA בדם. נמצא קשר שלילי בין ריכוזי ה-G6P בחלב וצריכת המזון של הפרות, וקשר שלילי בין היחס G6P לגלוקוז למאזן האנרגיה, ובין ריכוזי ה-G6P למאזן האנרגיה (טבלה מס' 1). כמו כן, היחס G6P לגלוקוז היה במתאם שלילי עם ריכוזי האינסולין בדם. ממצאי ניסוי זו פורסמו ב-Zachut et al. (2016).

טבלה מס' 1 – קשר בין מטבוליטים בחלב למאזן אנרגיה, מדדי עקה חמצונית ומטבוליטים בדם

Table 1 Interrelationships among key measures reflecting response to oxidative stress, dynamic changes of those measures in early lactation, and their relationship to energy balance and the indices that reflect it (N (cows) = 12, n (individual measures) = 48)

Y	Range	X	Range	Type ^a	r =	P <
Milk G6P (µM)						
Milk G6P	51.6–338.7	Days in lactation	3–57	E	-0.50	0.0003
Milk G6P	51.6–338.7	Milk ORAC (µM)	418.8–901.6	L	0.25	0.1
Milk G6P	51.6–338.7	Dry matter intake (kg per day)	4.8–35.9	L	-0.51	0.01
Milk G6P	51.6–338.7	Milk G6PDH activity (mU ml ⁻¹)	38.8–4250.4	E	0.68	0.0001
Milk G6P	51.6–338.7	Plasma NEFA (µeq. l ⁻¹)	190.2–1489.1	L	0.60	0.02
Milk G6P	51.6–338.7	EB (Mcal per day)	-30.3–20.7	L	-0.45	0.02
Milk G6P:glucose						
Milk G6P:glucose	0.3–8.9	Dry matter intake (kg per day)	4.8–35.9	L	-0.65	0.0007
Milk G6P:glucose	0.3–8.9	Milk G6PDH activity (mU ml ⁻¹)	38.8–4250.4	E	0.55	0.0001
Milk G6P:glucose	0.3–8.9	Days in lactation	3–57	E	-0.69	0.0001
Milk G6P:glucose	0.3–8.9	Plasma NEFA (µeq. l ⁻¹)	190.2–1489.1	L	0.81	0.0003
Milk G6P:glucose	0.3–8.9	EB (Mcal per day)	-30.3–20.7	L	-0.52	0.0045
Plasma insulin (pg ml ⁻¹)	162.7–2416.5	Milk G6P:glucose	0.3–8.9	L	-0.68	0.02
Milk G6PDH activity (mU ml⁻¹)						
Milk G6PDH activity	38.8–4250.4	Dry matter intake (kg per day)	4.8–35.9	E	-0.57	0.0003
Milk G6PDH activity	38.8–4250.4	EB (Mcal per day)	-30.3–20.7	E	-0.50	0.001
Milk G6PDH activity	38.8–4250.4	Milk G6P:glucose	0.3–8.9	L	0.53	0.0003
Milk G6PDH activity	38.8–4250.4	Days in lactation	3–57	E	-0.37	0.01
Additional oxidative stress and metabolic status indicators						
Milk MDA ^a (nM)	101.3–948.5	Days in lactation	3–57	E	-0.36	0.01
Milk glucose (µM)	16.6–439.4	Days lactation	3–57	E	0.56	0.0001
Milk ORAC ^a (µM)	418.8–901.6	Days in lactation	3–57	E	-0.29	0.06
Milk ORAC (µM)	418.8–901.6	EB (Mcal per day)	-30.3–20.7	E	-0.30	0.07
Plasma insulin (pg ml ⁻¹)	162.7–2416.5	Milk glucose (µM)	16.6–439.4	L	0.49	0.06

^a E, exponential interrelationship, γ values transformed to their natural log form; L, linear interrelationship; MDA, malondialdehyde; ORAC, oxygen radical antioxidant capacity.

ניסוי ב' – כאמור, התוצאות נותחו בשני אופנים:

א. **בניתוח הראשוני** בחנו את ההשפעה של תדירות החליבות: 2 או 3 חליבות ביממה בחודש הראשון לאחר ההמלטה, על ריכוזי המטבוליטים בחלב.

ב. **בניתוח השני** התייחסנו לשונות בין הפרות במאזן האנרגיה הפרטני, ולכן חילקנו את הפרות לפי מאזן האנרגיה עד 21 יום לפי: (1) פרות עם מאזן אנרגיה שלילי (**NEB**) – קטן מ-6 Mcal/d, (2) פרות עם מאזן אנרגיה חיובי (**PEB**) – גדול מ-3.5 Mcal/d.

חלק א': ניתוח תוצאות המחקר לפי תדירות החליבות

1.א תנובת חלב ורכיביו

תנובת החלב עד 45 יום של קבוצת הפרות שנחלבו 3 פעמים ביום נטתה להיות גדולה יותר מאשר קבוצת הפרות שנחלבו פעמיים ביום ($P = 0.08$). לעומת זאת אחוז השומן בקבוצת הפרות שנחלבו פעמיים ביום היה גבוה יותר באופן מובהק מקבוצת הפרות שנחלבו 3 פעמים ביום ($P = 0.0004$), טבלה מס' 2). תנובת החלבון (ק"ג ליום) הייתה גבוהה יותר ב- 12.5% ($P < 0.0001$) והלקטוז ב- 12.2% ($P = 0.0002$) בקבוצת ה-3X מאשר בקבוצת ה-2X. כמו כן כמות האוריאה בחלב בקבוצת הפרות שנחלבו פעמיים ביום הייתה גבוהה יותר מקבוצת הביקורת ($P = 0.05$, טבלה מס' 2).

טבלה מס' 2 – נתוני תנובת חלב, רכיביו, צריכת מזון ומאזן אנרגיה לפי חלוקה לתדירות חליבות

0-45 ימים בתחלובה				
P =	SEM	2X	3X	
0.08	0.9	45	48	חלב, ק"ג/יום
0.0004	0.06	4.3	3.9	שומן, %
0.2	0.04	1.1	2.0	שומן, ק"ג/ליום
0.9	0.04	3.3	3.3	חלבון, %
<0.0001	0.02	1.5	1.7	חלבון, ק"ג/יום
0.1	0.02	4.8	4.9	לקטוז, %
0.0002	0.04	2.3	2.6	לקטוז, ק"ג/יום
0.6	0.12	2.1	2.2	קזאין, %
0.05	0.4	16	15	MUN ¹ , mg/dl
0.6	1.22	46.6	45.6	חמ"ש ² 4%, ק"ג/יום
0.9	0.59	37.5	37.4	ECM ³ , מק"ל ליום
0.7	0.35	27.8	27.7	צריכת מזון, ק"ג/יום
0.2	0.6	1.06	-0.07	מאזן אנרגיה, מג"ק/יום

Milk Urea Nitrogen -MUN¹
 חמ"ש – חומר מושווה שומן²
 ECM³ – תנובת אנרגיה יומית בחלב

א.2 נתוני צריכת מזון ומאזן אנרגיה

לא היו הבדלים בצריכת המזון בין קבוצת הפרות שנחלבו 3 פעמים ביום לפרות שנחלבו פעמיים ביום. בקבוצת הפרות שנחלבו פעמיים ביום אומנם המאזן האנרגטי היה גבוה יותר מקבוצת הפרות שנחלבו 3 פעמים ביום, אך ללא מובהקות סטטיסטית ($P = 0.2$).

א.3 ריכוזי מטבוליטים בחלב

כפי שנראה בטבלה מספר 3, בשבועות 1-7 לאחר ההמלטה, ריכוזי החומצה המאלית בחלב נטו להיות גבוהים יותר בקבוצת ה-2x מאשר בקבוצת ה-3x ($P = 0.09$). לעומת זאת, ריכוזי הגלוקוז נטו להיות נמוכים יותר בקבוצת ה-2x מאשר בקבוצת ה-3x ($P = 0.1$). הריכוזים של G6P בחלב, פעילות האנזים G6PDH ומדדי העקה החימצונית בחלב- MDA ו-ORAC לא נבדלו בין שני הטיפולים (טבלה מספר 3).

טבלה מס' 3 - ריכוזי מטבוליטים בחלב, פעילות אנזימים ומדדי עקה בשבועות 1-7 בתחלובה בפרות שנחלבו 2 או 3 פעמים ביום בחודש הראשון לאחר ההמלטה

0-45 ימים בתחלובה				
P =	SEM	2X ²	3X ¹	
0.1	12.6	74.7	103.2	Mμ ,Glucose
0.6	14.7	237.7	226.7	Mμ , ³ G-6-p
0.3	3.0	26.5	30.9	, ⁴ G6PDH activity mU/ml
0.09	15.2	353.0	314.4	Mμ ,Malic Acid
0.9	21.7	235.3	236.1	Mμ ,Lactic Acid
0.3	94.4	301.8	155.4	nM , ⁵ MDA
0.6	4.5	211.0	214.8	Mμ , ⁶ ORAC

¹ קבוצת הפרות שנחלבו 3 פעמים ביום

² קבוצת הפרות שנחלבו פעמיים ביום

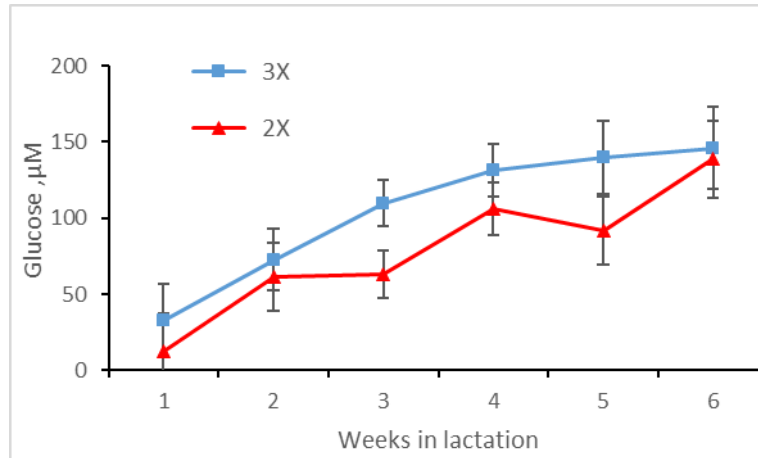
³ Glucose 6 phosphate

⁴ Glucose 6 phosphate Dehydrogenase activity

⁵ Malondialdehyde

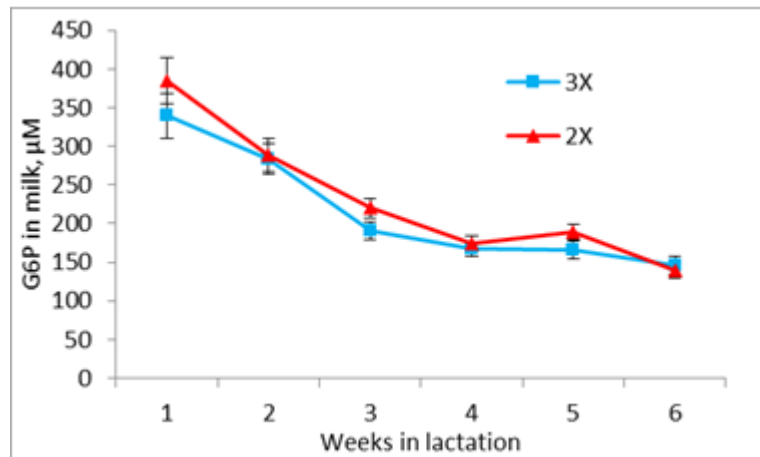
⁶ Oxygen radical absorbance capacity

איור מס' 3 – ריכוזי גלוקוז ממוצעים בחלב של פרות שנחלבו 3 פעמים ביום או פעמיים ביום



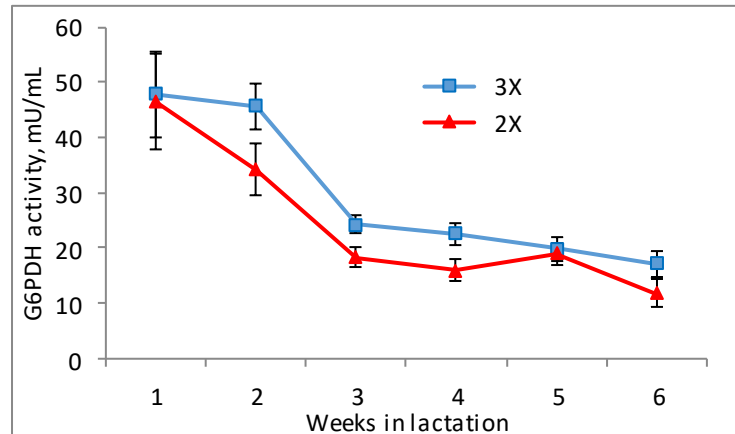
כפי שניתן לראות באיור מס' 3, בשני הטיפולים חלה עלייה הדרגתית בריכוז הגלוקוז בחלב עם התקדמות התחלובה. לאורך כל התקופה ניתן להבחין שבקבוצת הטיפול עם 2 החליבות ביום היה ריכוז הגלוקוז בחלב נמוך יותר. בין שבוע 4 ל-5 ישנה ירידה קלה בריכוז הגלוקוז בקבוצת 2X אך לאחר מכן ריכוז הגלוקוז עולה ומשתווה לריכוז הגלוקוז של קבוצת הביקורת (3X). בשבוע מס' 3 ההבדל בין ריכוז הגלוקוז ב-2 קבוצות הניסוי היה מובהק ($P = 0.04$).

איור מספר 4 – ריכוזי G6P ממוצעים בחלב של פרות שנחלבו 3 פעמים או פעמיים ביום (2X):



לאורך כל תקופת המחקר ריכוז ה-G6P בקבוצת 2X היה גבוה יותר למעט שבוע 6. כמו כן ניתן לראות ירידה בריכוזי ה-G6P בשתי קבוצות הניסוי לאורך התחלובה. לא ניכרו הבדלים בין 2 קבוצות הניסוי מלבד שבוע 3, שם ניתן היה לראות נטייה סטטיסטית ($P = 0.1$).

איור מספר 5 – פעילות האנזים G6PDH בחלב של פרות שנחלבו 3 פעמים ביום (3X) או פעמיים ביום (2X)



ניתן לראות בשתי קבוצות הניסוי ירידה בריכוזי ה-G6PDH לאורך תקופת התחלובה, כאשר הריכוז בקבוצת הפרות 3X גבוה יותר במשך כל התקופה. כמו כן, בשבועות 3 ו-4 ריכוז ה-G6PDH היה גבוה יותר בקבוצת 3X מאשר בקבוצת 2X באופן מובהק ($P = 0.03$). בשבוע 2 ריכוז ה-G6PDH נטה להיות גבוה יותר בקבוצת 3X מאשר בקבוצת 2X ($P = 0.1$).

א.4 מדדי עקה בדם

ריכוזי המדדים בדם: גלוקוז, NEFA, BHBA, קורטיזול, MDA, והצטוקין Tumor necrosis factor α (TNF α) נבחנו החל מההמלטה ועד שבועיים בתחלובה (טבלה מספר 4). ריכוז הגלוקוז בדם אצל הפרות שנחלבו פעמיים ביום הייתה גבוהה יותר באופן מובהק מכמות הגלוקוז שנתנו הפרות שנחלבו 3 פעמים ביום ($P = 0.002$). בנוסף – ריכוז ה-NEFA בקבוצת הניסוי (2X) היה גבוה יותר באופן מובהק מקבוצת 3X ($P = 0.005$). באשר ל-BHBA, ריכוזו בקבוצת הפרות שנחלבו 3 פעמים ביום היה גבוה יותר באופן מובהק מקבוצת הפרות שנחלבו פעמיים ביום ($P = 0.02$). כמו כן ניתן לראות שריכוזי ה-MDA היו גבוהים יותר באופן מובהק בפרות שנחלבו 3 פעמים ביום לעומת הפרות בקבוצת 2X ($P = 0.04$; טבלה מספר 4). עם זאת, ריכוזי הקורטיזול בדם היו נמוכים יותר בקבוצת הפרות שנחלבו פעמיים ביום מאשר בקבוצת 3X והיו קרובים לנטייה ($P = 0.15$; טבלה 4). לא נמצא הבדל בריכוזי ה-TNF α בין הטיפולים (טבלה מספר 4).

טבלה מס' 4 – ריכוזי מטבוליטים בדם בפרות שנחלבו 2 או 3 פעמים ביום בשבועיים הראשונים לאחר ההמלטה

0-14 ימים בתחלובה				
<i>P</i> =	SEM	2X	3X	
0.002	1.2	62.6	56.6	גלוקוז, mg/dL
0.005	36.5	523.3	336.1	mEq/L, NEFA
0.02	0.3	5.9	7.0	mg/dL, BHBA
0.04	63.3	212.9	412.3	nM, MDA
0.15	0.9	7.2	9.3	קורטיזול, pg/ml
0.6	36.1	392.2	368.4	pg/ml, TNF α

א.5. הרכב חומצות השומן בחלב עפ"י תדירות החליבות

כאשר בחנו את הרכב ח. השומן ב-3 השבועות הראשונים להמלטה (טבלה 5) נמצא כי ריכוזי החומצה האולאית נטו להיות גבוהים יותר בקבוצה 2X מאשר בקבוצה 3X ($P = 0.05$). לעומת זאת, ריכוז ח. השומן החד בלתי רוויות (MUFA) וריכוז ח. השומן הבלתי רוויות (USFA) בקבוצת הפרות 2X היו באופן מובהק גבוהים יותר מאשר בקבוצת הפרות שנחלבו 3 פעמים ביום ($P = 0.04$). לא התקבלו הבדלים בשאר ח. השומן בתקופה של 0 עד 3 שבועות בתחלובה (טבלה 5).

טבלה מס' 5 - ריכוזי ח. השומן בחלב ב-3 השבועות הראשונים להמלטה

<i>P</i> =	SEM	2X	3X	gr/100 ml
0.05	0.04	1.1	0.9	Oleic acid (C18:1)
0.5	0.03	1.2	1.1	Palmitic acid (C18:0)
0.3	0.01	0.42	0.41	stearic acid (C16:0)
0.3	0.07	2.8	2.7	¹ SFA
0.04	0.06	5.1	1.3	² MUFA
0.5	0.01	0.25	0.24	³ PUFA
0.04	0.06	1.7	1.5	⁴ USFA

Saturated fat¹

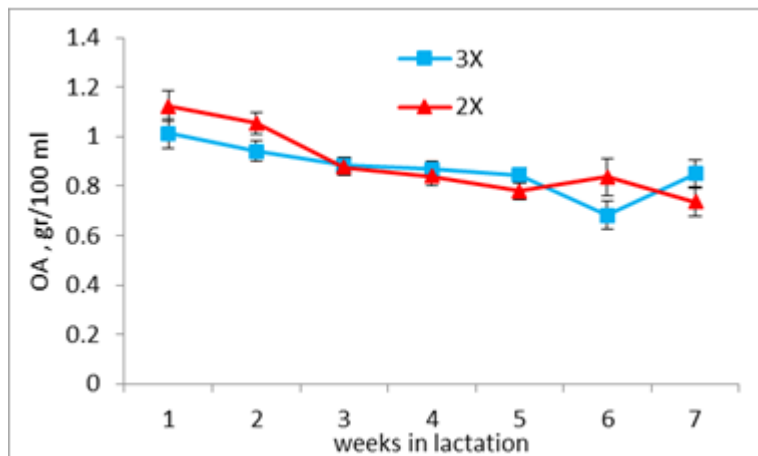
Monounsaturated fat ²
 Polyunsaturated fatty acid ³
 Unsaturated Fatty Acid ⁴

כאשר בחנו את התוצאות ב-7 השבועות הראשונים להמלטה, הרכב ח. השומן החד בלתי רוויות (MUFA) וריכוז ח. השומן הבלתי רוויות (USFA) בקבוצת הפרות 2X נטו להיות גבוהות יותר מקבוצת הפרות 3X ($P = 0.08$ ו- $P = 0.07$ בהתאמה ; טבלה מספר 6). כמו כן אחוז החומצה האולאית בחלב בקבוצת ה-2X נטה להיות גבוה יותר מאשר בקבוצת ה-3X ($P = 0.1$; טבלה 6). לא נמצא הבדל בין הקבוצות בריכוזי ח. שומן הפלמיטית, הסיטרית, ח. השומן הרוויות והרב בלתי רוויות (טבלה 6).

טבלה מס' 6 - ריכוזי ח. השומן בחלב ב-7 השבועות הראשונים להמלטה

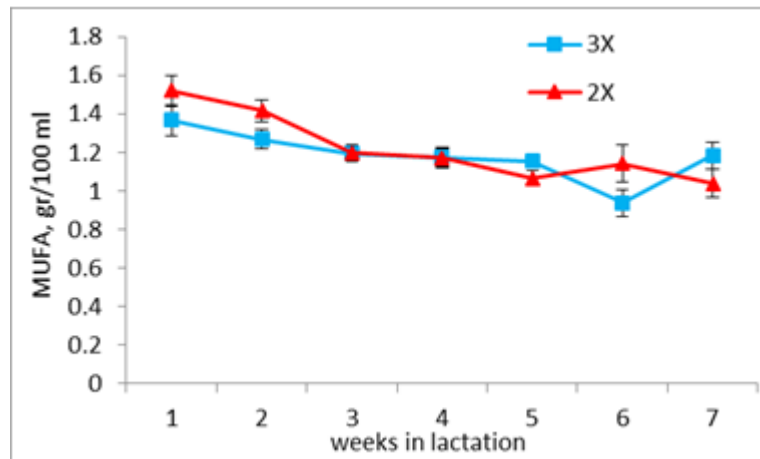
<i>P</i> =	SEM	2X	3X	gr/100 ml
0.1	0.02	0.95	0.90	Oleic acid (C18:1)
0.4	0.02	1.14	1.11	Palmitic acid (C18:0)
0.4	0.01	0.404	0.400	stearic acid (C16:0)
0.2	0.06	2.7	2.6	SFA
0.08	0.03	1.3	1.2	MUFA
0.7	0.01	0.233	0.230	PUFA
0.07	0.04	1.5	1.4	USFA

איור מספר 6 - ריכוז ח. השומן האולאית בחלב של פרות שנחלבו 3 או 2 ביום



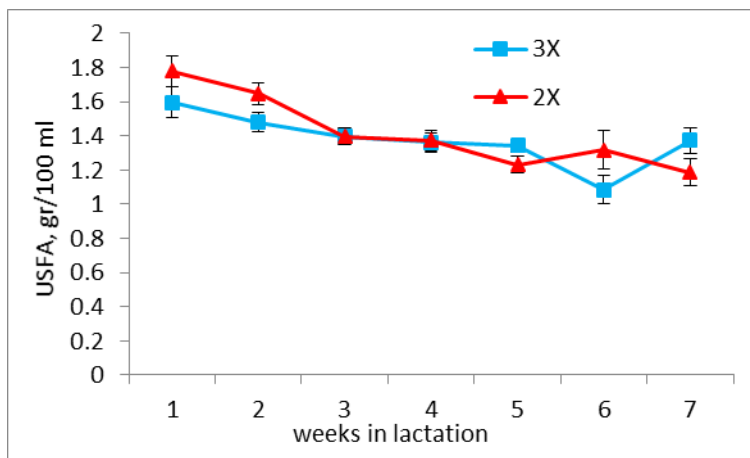
ניתן לראות באיור מס' 6 כי בשתי קבוצות הניסוי ירידה בריכוזי ח.השומן האולאית לאורך תקופת התחלובה, כאשר הריכוז בקבוצת הפרות 2X גבוה יותר במשך 3 השבועות הראשונים ($P = 0.05$).

איור מספר 7 – ריכוז ח. השומן החד בלתי רוויות (MUFA) בחלב של פרות שנחלבו 3 פעמים ביום (3X) או פעמיים ביום (2X)



ניתן לראות באיור מס' 7 כי בשתי קבוצות הניסוי ירידה בריכוזי ח. השומן החד בלתי רוויות (MUFA) לאורך תקופת התחלובה, כאשר הריכוז בקבוצת הפרות 2X גבוה יותר במשך 3 השבועות הראשונים ($P = 0.04$).

איור מספר 8 – אחוז ח. השומן הבלתי רוויות (USFA) בחלב של פרות שנחלבו 3 פעמים ביום (3X) או פעמיים ביום (2X)



ניתן לראות באיור מס' 8 כי בשתי קבוצות הניסוי ירידה בריכוזי ח.השומן הבלתי רוויות לאורך תקופת התחלובה, כאשר הריכוז בקבוצת הפרות 2X גבוה יותר במשך 3 השבועות הראשונים ($P = 0.04$).

חלק ב': ניתוח תוצאות המחקר לפי חלוקה למאזן אנרגיה

ב.1 תנובת חלב ורכיביו

כפי שמוצג בטבלה מס' 7, קבוצת הפרות עם מאזן אנרגטי שלילי (NEB) נתנה יותר חלב באופן מובהק מקבוצת הפרות עם מאזן האנרגיה החיובי ($P = 0.001$). כמו כן, אותה קבוצת הפרות (NEB) נטתה להניב יותר לקטוז ליום מאשר קבוצת הפרות PEB ($P = 0.07$). קבוצת הפרות PEB הניבה יותר אחוזי חלבון וקזאין בחלב באופן מובהק מאשר קבוצת NEB ($P = 0.0006$) לחלבון ו $P = 0.05$ לקזאין). מבחינת תנובת האנרגיה היומית בחלב (ECM), קבוצת הפרות NEB נטו להשקיע יותר אנרגיה בחלב מאשר קבוצת הפרות PEB ($P = 0.06$).

טבלה מס' 7 - נתוני תנובת חלב, רכיביו, צריכת מזון ומאזן אנרגיה לפי חלוקה למאזן אנרגיה

0-45 ימים בתחלובה				
P =	SEM	² PEB	¹ NEB	
0.001	0.92	44.9	49.6	חלב, ק"ג/יום
0.2	0.06	4.2	4.1	שומן, %
0.2	0.04	1.99	2.06	שומן, ק"ג/ליום
0.0006	0.03	3.4	3.2	חלבון, %
0.9	0.03	1.601	1.606	חלבון, ק"ג/יום
0.3	0.02	4.95	4.91	לקטוז, %
0.07	0.05	2.3	2.5	לקטוז, ק"ג ליום
0.05	0.07	2.5	2.3	קזאין, %
0.1	0.4	16	15	MUN mg/dl
0.4	1.2	45.4	47.0	חמ"ש 4%, ק"ג/יום
0.06	0.6	36.7	38.4	ECM, מק"ל ליום
<0.0001	0.3	28.9	26.7	צריכת מזון, ק"ג/יום
<0.0001	0.4	4.1	-3.9	מאזן אנרגיה, מג"ק/יום

Negative Energy Balance ¹
Positive Energy Balance ²

ב.2 נתוני צריכת מזון ומאזן אנרגיה

כפי שמוצג בטבלה מס' 7, קבוצת הפרות PEB צרכה יותר מזון ליום מקבוצת הפרות NEB ($P < 0.0001$). כמו כן, קבוצת הפרות PEB הייתה במאזן אנרגטי גבוה יותר באופן מובהק מאשר קבוצת הפרות NEB ($P < 0.0001$).

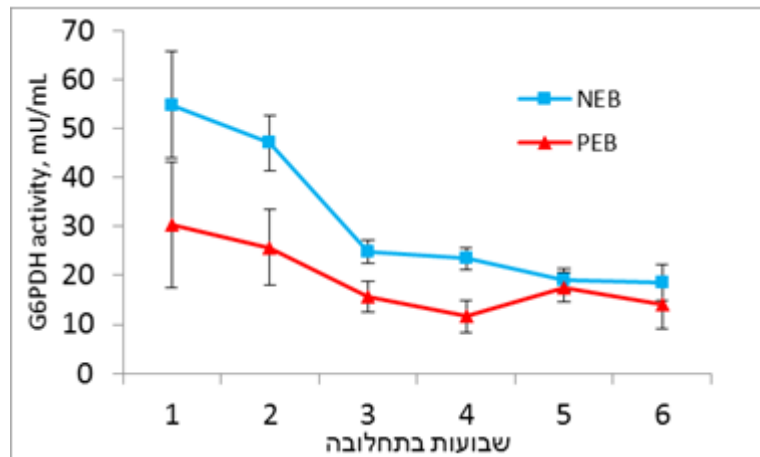
ב.3 ריכוזי מטבוליטים בחלב לפי חלוקה למאזן אנרגיה

בכל התקופה, פעילות האנזים G6PDH בחלב הייתה גבוהה יותר באופן מובהק בקבוצת ה-NEB לעומת קבוצת ה-PEB ($P = 0.04$). כמו כן, יכולת נוגדי החמצון (ORAC) להתמודד עם רדיקלים חופשיים בדגימות החלב מקבוצה NEB הראתה נטייה גבוהה יותר מאשר קבוצת PEB ($P = 0.13$); טבלה 8). לאורך כל התקופה לא היו הבדלים בריכוז ה-MDA בחלב בין הקבוצות (טבלה מס' 8), אולם כאשר בדקנו את ריכוז ה-MDA בשבועות 1 עד 5 בתחלובה נמצא כי ריכוזי ה-MDA בקבוצת PEB נטו להיות גבוהים יותר מאשר קבוצת NEB (503.7 לעומת 160.5; $P = 0.07$).

טבלה מס' 8 - ריכוזי מטבוליטים בחלב, פעילות אנזימים ומדדי עקה בשבועות 1-7 בתחלובה לפי חלוקה למאזן אנרגטי

0-45 ימים בתחלובה				
P =	SEM	PEB	NEB	
0.3	13.8	108.3	88.3	μM ,Glucose
0.8	12.3	229.1	224.5	μM ,G-6-p
0.04	2.9	22.9	32.3	פעילות , G6PDH mU/mL
0.3	17.4	323.7	347.2	μM ,Malic Acid
0.8	21.7	231.8	237.7	μM ,Lactic Acid
0.3	123.8	338.7	212.3	nM ,MDA
0.13	4.5	206.3	217	μM ,ORAC

איור מספר 9 – פעילות G6PDH בחלב של פרות עם מאזן אנרגיה חיובי או שלילי (NEB)



כפי שמוצג באיור מס' 9, לאורך כל התקופה פעילות האנזים G6PDH הייתה גבוהה יותר בקבוצת הפרות NEB לעומת קבוצת הפרות PEB ($P = 0.04$). בין שבועות 2 ל-4 פעילות האנזים הייתה גבוהה יותר באופן מובהק בקבוצת NEB, כאשר בשבוע 4 הנטייה הסטטיסטית הייתה הגבוהה מכולן ($P = 0.008$).

ב.4 מדדי עקה בדם בפרות לפי חלוקה למאזן אנרגיה

כאשר בדקנו מדדי עקה בדם לפי חלוקה למאזן אנרגיה (טבלה מס' 9), נמצא כי בקבוצת הפרות PEB ריכוז הגלוקוז בדם היה גבוה יותר מקבוצת ה-NEB ($P = 0.004$). כמו כן ריכוזי ה-BHBA בדם היו גבוהים יותר בקבוצת הפרות עם מאזן האנרגיה השלילי ($P < 0.0001$). שאר המדדים שנבדקו לא נבדלו בין הקבוצות.

טבלה מס' 9- ריכוזי המטבוליטים בדם החל מהמלטה עד שבועיים בתחלובה

0-14 ימים בתחלובה				
P =	SEM	PEB	NEB	
0.004	1.3	62.1	56.2	גלוקוז, mg/dL
0.2	41.1	411.3	481.9	NEFA, mEq/L
>0.0001	0.25	5.7	7.6	BHBA, mg/dL
0.8	70.1	311.9	330.4	MDA, nM
0.7	0.9	8.1	8.6	קורטיזול, pg/ml
0.28	35.3	399.3	337.0	TNF α , pg/ml

ב.5 הרכב חומצות השומן בחלב לפי חלוקה למאזן אנרגיה

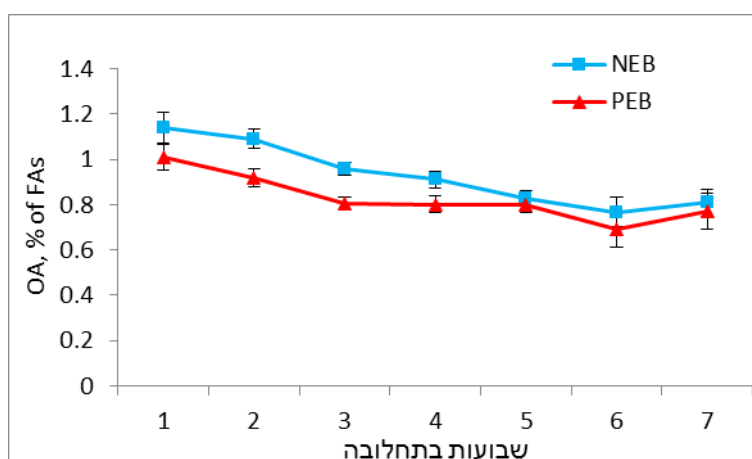
תוצאות מעניינות התקבלו בין קבוצות NEB ו-PEB מבחינת הרכב ח. השומן שנבדקו בחלב: אחוז החומצה האולאית (OA) היה גבוה יותר באופן מובהק בקבוצת NEB לעומת קבוצת PEB ($P = 0.001$, טבלה מספר 10). ריכוז ח. השומן החד בלתי רוויות (MUFA) היה גבוה יותר באופן מובהק בקבוצת NEB מאשר PEB ($P = 0.02$). בנוסף, ריכוז ח. השומן הבלתי רוויות (USFA) היה גבוה יותר באופן מובהק בקבוצת NEB ($P = 0.03$). ריכוז ח. השומן הרוויות (SFA) נטו להיות נמוכים יותר בקבוצת NEB מאשר PEB ($P = 0.13$, טבלה מס' 10).

טבלה מס' 10 – הרכב ח. השומן בחלב בפרות במאזן אנרגיה חיובי או שלילי בשבועות 1-7 בתחלובה

<i>P</i> =	SEM	PEB	NEB	gr/100 ml
0.001	0.02	0.8	0.9	Oleic acid (C18:1)
0.1	0.03	1.15	1.10	Palmitic acid (C18:0)
0.4	0.01	0.40	0.40	stearic acid (C16:0)
0.13	0.06	2.7	2.5	¹ SFA
0.02	0.03	1.2	1.3	² MUFA
0.4	0.01	0.22	0.24	³ PUFA
0.03	0.04	1.4	1.5	⁴ USFA

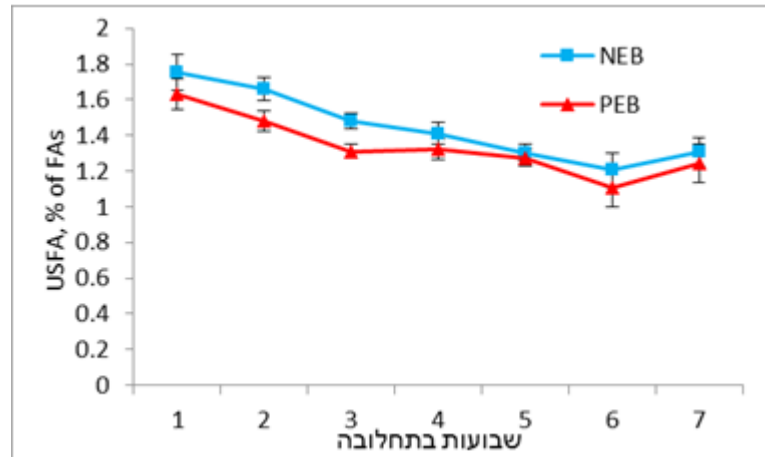
Saturated fat ¹
 Monounsaturated fat ²
 Polyunsaturated fatty acid ³
 Unsaturated Fatty Acid ⁴

איור מספר 10 – אחוז ח. השומן האולאית בקבוצות עם מאזן אנרגיה חיובי או שלילי (NEB)



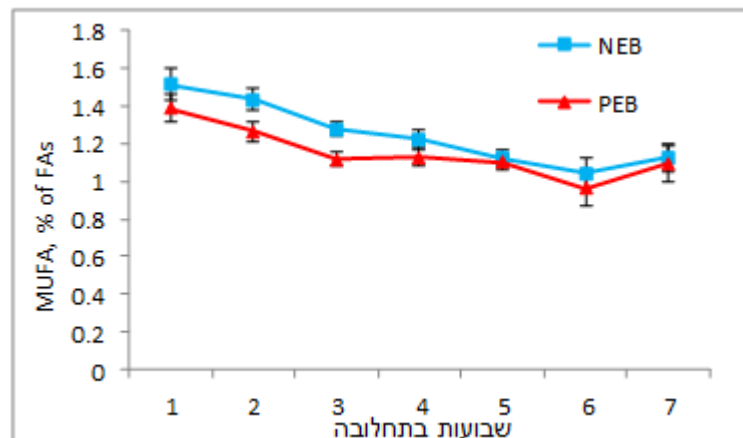
כפי המוצג באיור מס' 10, לאורך כל התקופה אחוז ח. השומן האולאית היה גדול יותר באופן מובהק בקבוצת הפרות עם מאזן האנרגיה השלילי לעומת קבוצת הפרות עם מאזן האנרגיה החיובי ($P = 0.001$). בין שבועות 2 ל-4 אחוז ה-OA היה גבוה יותר באופן מובהק בקבוצת NEB מאשר בקבוצת PEB, כאשר בשבוע 3 המובהקות הסטטיסטית עמדה על $P = 0.0004$.

איור מספר 11 – אחוז ח. השומן הבלתי רוויות בקבוצות עם מאזן אנרגיה חיובי או שלילי (NEB)



כפי שמוצג באיור מס' 11, לאורך כל התקופה אחוז ח. השומן בלתי רוויות היו גדולות יותר באופן מובהק בקבוצת הפרות עם מאזן האנרגיה השלילי לעומת קבוצת הפרות עם מאזן האנרגיה החיובי ($P = 0.03$). בשבועות 2 ו-3 אחוז ה-USFA היו גבוהות יותר באופן מובהק בקבוצת NEB מאשר בקבוצת PEB, כאשר בשבוע 2 המובהקות הסטטיסטית עמדה על $P = 0.04$ ובשבוע 3 המובהקות הסטטיסטית עמדה על $P = 0.007$.

איור מספר 12 – אחוז ח. השומן החד בלתי רוויות בקבוצות עם מאזן אנרגיה חיובי או שלילי

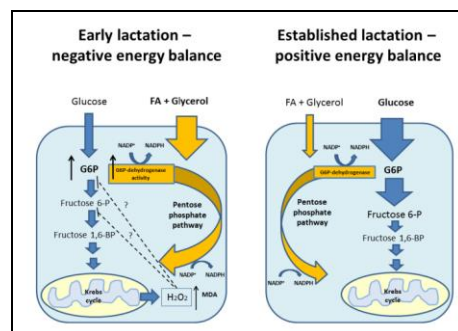


כפי שנראה באיור מס' 12, לאורך כל התקופה אחוז ח. השומן החד בלתי רוויות היה גבוה יותר בקבוצת הפרות עם מאזן האנרגיה השלילי לעומת קבוצת הפרות עם מאזן האנרגיה החיובי ($P = 0.02$). בין שבועות 1 ל-3 אחוז ה-MUFA בחלב היה גבוה יותר בקבוצת NEB מאשר בקבוצת PEB.

מסקנות

מתוצאות ניסוי א' נראה כי בהתאם להיפותזת המחקר שלנו, בתחילת התחלובה G6P בתאי העטין מופנה למעגל הפנטוז-פוספט כחלק מהתאמה הומאוסטטית שמטרתה לאזן את עודפי העקה החימצונית בעטין בתחילת התחלובה בפרות חלב. באופן כללי, ייצור חלב בעטין קשור בהיווצרות עקה חימצונית (Silanikove et al., 2014b). אולם, תוצאות ניסוי זה תומכות בהשערתנו כי עודף של עקה חימצונית בעטין בתחילת התחלובה, הנובעת מפירוק רקמות שומן, מפנה גלוקוז הנכנס לתאי האפיתל בעטין למעגל הפנטוז-פוספט. בניסוי זה גילינו כי ריכוזי ה-G6P והיחס G6P לגלוקוז בחלב יכולים לשמש כביומרקרים אובייקטיביים, מדויקים ולא-חודרניים למאזן האנרגיה של הפרה בתחילת התחלובה, וייתכן גם ביונקים אחרים הנמצאים במאזן אנרגיה שלילי ובעקה חמצונית לאחר ההמלטה (איור מס' 13). ממצאי המחקר תואמים לתוצאות של Larsen & Moyes (2015) אשר הראו בתנאי רפת מסחרית כי רמות ה-G6P בחלב גבוהות בתחילת התחלובה ולאחר מכן יורדות עם התקדמות התחלובה.

איור מס' 13 – סיכום השינויים במטבוליזם בעטין בתחילת התחלובה עפ"י ממצאי המחקר



Zachut et al., 2016

רק מחקרים בודדים בחנו את הפעילות של G6PDH בחלב: מתוכם, Mellenberger & Bauman (1974) מצאו כי פעילות G6PDH בחלב של ארנבות עולה במחצית ההיריון ולקראת ההמלטה. באדם, האנזים G6PDH מיוצר בבלוטת החלב בתגובה לגירוי הורמונלי במהלך ההיריון וייצור החלב (Shahani et al., 1980). פעילותו של G6PDH נבחנה בחלב של סוסות, חולדות וארנבים, והוסק כי פעילותו בחלב מייצגת את רמת הפעילות של האנזים בעטין (Grigor & Hartmann, 1985), וזאת בהתאם להשערת המחקר שלנו. על סמך ממצאינו, אנו משערים כי הפעילות המוגברת של G6PDH בתחילת התחלובה מייצגת עלייה בהפנייה של G6P למעגל הפנטוז-פוספט. מכיוון ש-G6P מיוצר מגלוקוז, ההסברים האפשריים היחידים לעלייה ביחס G6P/גלוקוז < 1 בחלב בתחילת התחלובה (עד שבוע 2, ראו איור מס' 1) הינם: 1. עיכוב במעבר של G6P בתהליך הגליקוליזה בתאי האפיתל בעטין, או 2. מחזור של fructose-6-phosphate אשר נוצר במעגל הפנטוז-פוספט ל-G6P (Stincone et al., 2015). העלייה ב-G6P בציטוזול של תאי האפיתל בעטין מביאה ככל הנראה לשיפור ה-Km של האנזים G6PDH. העלייה בהפנייה של G6P

למעגל הפנטוז-פוספט, ובהתאמה הירידה במעבר שלו בתהליך הגליקוליזה, כנראה מתפוגגת עם התקדמות התחלובה, כך שהיחס G6P/גלוקוז עומד מיד בתחילת התחלובה על ~3.5 ולאחר מכן יורד ל-0.5 עם התבססות התחלובה (ומאזן האנרגיה נהיה חיובי).

במחקר זה, המעבר של G6P למעגל הפנטוז פוספט גרם ליצירת NADPH אשר איזן במידת מה את העקה החימצונית בתאי העטין בתחילת התחלובה, כפי שנראה ביחס החיובי בין ה-G6P למדד ה-ORAC (טבלה מס' 1). אולם, הדבר לא הספיק בכדי למנוע את העלייה ב-MDA מכיוון שיצירה של רדיקלים חופשיים הינה מהירה מאוד (מאיות השנייה), ולכן הייתה בכל זאת עלייה בעקה החימצונית בתחילת התחלובה (איור מס' 13). בהתאמה למודל המוצע, ידוע כי הבקרה על מעגל הפנטוז-פוספט במהלך התגובה לעקה חימצונית הינה התאמה ששמורה במגוון רחב של אורגניזמים, החל משמרים ועד ליונקים, על ידי חיזור של NADP⁺ ל-NADPH (Stincone et al., 2015). התגובה המהירה לעקה חימצונית אפשרית על ידי עיכוב של פעילות אנזימים גליקוליטיים באמצעות post-translational modifications אשר מעלים את פעילות G6PDH (Stincone et al., 2015). מכאן, שהעלייה בפעילות האנזים וביחס G6P/גלוקוז בתחילת התחלובה והקשר לעקה חימצונית תואמים את התגובה ההומאוסטטית הבסיסית.

תחילת התחלובה מאופיינת במאזן אנרגטי שלילי ובלפוליזה נרחבת ברקמות השומן, אשר גורמים לעלייה בעקה החימצונית הן סיסטמית והן ברקמות הפריפריאליות. רקמת העטין הינה הפעילה ביותר בפרות חלב, ולכן היא חשופה לעקה חימצונית מוגברת אשר מביאה לייצור H₂O₂ בתאי האפיתל (Bradford et al., 2015). כאשר ה-H₂O₂ מגיבים עם מינרלים כדוגמת Fe או Cu, ישנה תגובה עם פראוקסידים ונוצרים רדיקלים חופשיים אשר יכולים להגיע לרמות רעילות בתאים. גלוטטיון הינו נוגד-חימצון חשוב אשר מונע פגיעה במרכיבי התא על ידי רדיקלים חופשיים, פרא-אוקסידים ומתכות כבדות (Pompella et al., 2003). המרה של גלוטטיון מחומצן לגלוטטיון מחוזר על ידי גלוטטיון-רדוקטאז הינה תגובה מרכזית לפירוק של H₂O₂ (Stincone et al., 2015). תגובה זו דורשת שימוש ב-NADPH כקו-פקטור, דבר הגורם לעלייה בצורך של התאים ב-NADPH במהלך עקה חימצונית (Stincone et al., 2015). הממצא שלנו ושל Bouwstra et al. (2008) בדבר קשר שלילי בין רמות ה-MDA בחלב והימים בתחלובה תומכים במודל זה. למעשה, שתי מולקולות של NADPH מיוצרות פר מולקולה אחת של G6P אשר מוסט למעגל הפנטוז-פוספט. בתנאים ללא עקה חימצונית, מרבית ה-G6P עובר מטבוליזם בתהליך הגליקוליזה, אשר ככל הנראה מצביע על Km נמוך יותר של האנזימים הגליקוליטיים הראשונים בתהליך לעומת ה-Km של האנזים G6PDH, אשר אחראי על שינוע ה-G6P למעגל הפנטוז פוספט. לכן, ההפנייה של G6P למעגל הפנטוז-פוספט עשויה להתגבר על ידי עיכוב של אנזימי הגליקוליזה, וצבירתו של G6P בתא, כך שהוא יפנה לפנטוז-פוספט. אנו מציעים כי המעבר ההדרגתי של הפרה למאזן אנרגיה חיובי עם התקדמות התחלובה מגבירה על הזרימה של G6P לתהליך הגליקוליזה בתאי העטין. עם זאת, הניסוי נערך עם מספר קטן של פרטים ויש צורך לבסס את תוצאות ניסוי זה עם נתונים שיידגמו באופן אינטנסיבי ממספר גדול של פרות, כפי שנעשה בניסוי ב'.

מתוצאות ניסוי ב' עולה כי שינוי תדירות החליבה בחודש הראשון לאחר ההמלטה, מ-3 ל-2 חליבות ביממה, הורידה את תנובת החלב, העלתה את אחוז השומן בחלב, אך ללא פגיעה בייצור ה-ECM. נמצא כי צריכת המזון של הפרות וכן מאזן האנרגיה לא השתנו בין הקבוצות, וזאת שלא בהתאמה עם הנחת המחקר כי הפחתת תדירות החליבות תשפר את מאזן האנרגיה של הפרות לאחר ההמלטה. הסבר אפשרי לכך הוא השונות הרבה הקיימת בין הפרות, אשר ממסכת את ההשפעה המטיבה של הורדת תדירות החליבה לאחר ההמלטה על מאזן האנרגיה. כאשר בחנו את רמות מדדי העקה בדם הפרות, נמצא כי פרות עם מאזן אנרגיה שלילי היו עם ריכוזי גלוקוז נמוכים יותר בדם, ריכוזי BHBA גבוהים יותר לעומת פרות במאזן אנרגטי חיובי, וזאת בהתאם למאזן האנרגטי השלילי והירידה בצריכת המזון בפרות אלו. עם זאת, נראה כי מדד ה-MDA לא היה רגיש מספיק בכדי לאבחן הבדל ברמת העקה החימצונית בפרות ה-NEB.

כאשר בחנו את ההבדלים בריכוזי המטבוליטים בחלב בין הפרות שנחלבו 2 או 3 פעמים ביממה בחודש הראשון לאחר ההמלטה, נמצא כי ריכוזי הגלוקוז בחלב, אך לא ה-G6P, היו גבוהים בפרות ה-3 לעומת ה-2 חליבות. כמו כן, לא נמצא הבדל ברמות ה-MDA וה-ORAC בין הקבוצות, דבר המעיד על העדר הבדל מובהק ברמת העקה החימצונית בתאי העטין של הפרות משתי הקבוצות. ניתן לייחס זאת להעדר ההבדל המובהק במאזן האנרגטי בין הקבוצות, וייתכן שהדבר גרם לכך שלא נמצאו הבדלים ברמות ה-G6P בחלב בין שתי הקבוצות כפי שציפינו לקבל בעבודה זו.

יש לציין כי פעילות האנזים G6PDH אומנם לא הייתה מובהקת בכל התקופה (1-5 שבועות בתחלובה), אך הייתה גבוהה יותר באופן משמעותי בשבועות 2-4 בפרות שנחלבו 3 פעמים ביממה, וזאת בהתאמה לתוצאות של ניסוי א', דבר העשוי להצביע על כל שפעילות G6PDH יכולה להוות ביומרקר חדשני למאזן אנרגיה בפרות חלב. אכן, כאשר ניתחנו את התוצאות על פי מאזן האנרגיה בפועל של הפרות, נמצא כי הייתה עלייה בפעילות G6PDH בחלב של פרות עם מאזן אנרגטי שלילי (NEB) לעומת אלו עם מאזן אנרגטי חיובי ב-21 יום בתחלובה. על בסיס ממצאים אלו, אנו מציעים אפשרות לפתח ערכה מסחרית לבחינת פעילות G6PDH בחלב כמדד לא-חודרני למאזן אנרגיה בפרות חלב.

בניסוי זה, ריכוזי המטבוליטים חומצה מאלית וחומצה לקטית לא השתנו באופן מובהק בפרות שנבדלו במאזן האנרגיה, ולכן נראה כי השיעור שלהם בחלב אינו רגיש מספיק בכדי לייצג את הפרופיל המטבולי של תאי העטין בהתאם למצב הפיזיולוגי של הפרה. לעומת זאת, נמצא כי הרכב חומצות השומן בחלב היה במתאם עם מאזן האנרגיה של הפרות, כאשר שיעור החומצה האולאית בחלב היה גבוה יותר בפרות עם מאזן אנרגטי שלילי לעומת כאלו במאזן חיובי. ממצא זה מוכר בספרות, ונובע מהליפוליזה ברקמת השומן אשר משחררת לזרם הדם חומצה אולאית אשר מגיעה לעטין ומשתלבת בשומן החלב (Gross et al., 2011). בנוסף, נמצא כי שיעור חומצות השומן החד-בלתי רוויות (MUFA) והבלתי רוויות (USFA) היו גבוהות יותר, ואילו שיעור חומצות השומן הרוויות (SFA) נטה להיות נמוך יותר, בפרות עם מאזן אנרגטי שלילי לעומת פרות במאזן אנרגיה חיובי ב-21

יום בתחלובה. תוצאות המחקר הנוכחי תומכות בכך שניתן להשתמש בשיעור החומצה האולאית בחלב, ולשינויים נוספים בהרכב שומן החלב, כמדד לא חודרני למאזן האנרגיה של פרות לאחר ההמלטה, ולכן אנו מעודדים את המשך ביצוע הבדיקה של הרכב חומצות השומן בחלב, ככלי אשר יכול לשמש את הרפתן לזיהוי פרות עם מאזן אנרגטי שלילי לאחר ההמלטה.

לסיכום, במחקר זה בחנו לראשונה מספר מדדים בחלב של פרות לאחר ההמלטה, אשר עשויים להוות ביומרקרים חדשניים למאזן האנרגיה של הפרה. על אף שבניסוי א' נראה כי רמות ה-G6P עשויות לשקף את מאזן האנרגיה, כאשר בחנו זאת בניסוי נרחב נמצא כי רגישותו אינו גבוהה מספיק ולכן הוא אינו מתאים כביומרקר למאזן אנרגיה בחלב. לעומת זאת, ממצאי המחקר מראים לראשונה כי פעילות האנזים G6PDH בחלב מהווה מדד חדיש למאזן האנרגיה של פרות לאחר ההמלטה, ויש צורך להמשיך ולחקור את האפשרות לבחון את פעילותו בחלב כמדד לא חודרני ל-NEB בפרות חלב. כמו כן, מצאנו כי הרכב חומצות השומן בחלב, ובפרט רמות החומצה האולאית, מהוות גם כן ביומרקר למאזן האנרגיה של הפרות לאחר ההמלטה, ואנו ממליצים לבחון ברמה הארצית את שיעור חומצות השומן בחלב ככלי יישומי שייתן מידע חשוב לרפתנים על מאזן האנרגיה של הפרות.

רשימת ספרות

- Annison, E. F. 1983. Metabolite utilization by the ruminant mammary gland. In *Biochemistry of lactation* (ed. TB Mepham), pp. 399–436. Elsevier, Amsterdam, New York.
- Bauman, D. E., Brown, R. E. and Davis, C. L. 1970. Pathways of fatty acid synthesis and reducing equivalents generating in mammary gland of rat, sow, and cow. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 140, 237–244.
- Bell, A. W. and D. E. Bauman. 1997. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2:265-78.
- Bradford, B. J., K. Yuan, J. K. Farney, L. K. Mamedova and A. J. Carpenter. 2015. *J. Dairy Sci.*, 98, 6631–6650.
- Bouwstra, R. J., R. M. A. Goselink, P. Dobbelaar, M. Nielen, J. R. Newbold and T. van Werven. 2008. *J. Dairy Sci.*, 91, 977–987.
- Butler, W. R. and R. D. Smith. 1989. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 723:767-83.
- Drackley, J. K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J. Dairy Sci.* 82:2259–2273.
- Goff, J. P. and R. L. Horst. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80:1260–1268.
- Grigor, M. R. and P. E. Hartmann. 1985. *J. Dairy Res.*, 52, 501–506.
- Gross, J., van Dorland H. A., Bruckmaier R. M., and Schwarz F. J. 2011. Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows. *J Dairy Res.* 78(4):479-88.
- Kuhn, N. J. and White A. 1975. Milk glucose as an index of the intracellular glucose concentration of rat mammary gland. *Biochemical Journal* 152, 153–155.

- Larsen, T., and K. M. Moyes. 2015. Are free glucose and glucose-6-phosphate in milk indicators of specific physiological states in the cow? *Animal*, 9:1, 86-93.
- Mallard, B. A., J. C. Dekkers, M. J. Ireland, K. E. Leslie, S. Sharif, C. Lacey Vankampen, L. Wagter, and B. N. Wilkie. 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J. Dairy Sci.* 81:585–595.
- Mellenberger, R. W. and D. E. Bauman. 1974. *Biochem. J.*, 138,373–379.
- Pompella, A., A. Visvikis, A. Paolicchi, V. Tata and A. F. Casini. 2003. *Biochem. Pharmacol.*, 66, 1499–1503.
- Scott, R. A., Bauman, D. E. and Clark J. H. 1976. Cellular gluconeogenesis by lactating bovine mammary tissue. *Journal of Dairy Science* 59, 50–56.
- Shahani, K. M., A. J. Kwan and B. A. Friend. 1980. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, 1861–1868.
- Silanikove, N., Merin U., Shapiro F., and Leitner G. 2014a. Milk metabolites as indicators of mammary gland functions and milk quality. *J Dairy Res.* 81(3):358-63.
- Silanikove, N., U. Merin and G. Leitner. 2014b. *RSC Adv.*, 4, 26476–26486.
- Stincone, A., A. Prigione, T. Cramer, M. M. C. Wamelink, K. Campbell, E. Cheung, V. Olin-Sandoval, N. M. Gruning, A. Kruger and M. T. Alam. 2015. *Biol. Rev.*, 90, 927–963.
- 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.