

ד"ר מדעי סופי לתכנית מחקר מספר 362-0460

זיהוי סמנים מטבוליים ברקמת שומן ככלי לאיפיון תתי אוכלוסיות של פרות לאחר המלטה המצטיינות בהסתגלותן הפיזיולוגית ליצרנות גבוהה

ד"ר מאיה זכות - המחלקה לחקר בקר וצאן, המכון לחקר בע"ח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
mayak@volcani.agri.gov.il

1.4 תקציר

תחילת התחלובה הינה תקופה קריטית מבחינת ביצועי הפרה, כאשר בפרק זמן זה מתרחשים שינויים מטבוליים משמעותיים אשר משפיעים על היצרנות במהלך כלל התחלובה. קיימת שונות רבה בין פרות במאפיינים הפיזיולוגיים והמטבוליים לאחר ההמלטה, המשפיעים על יעילות צריכת המזון וייצור החלב בכלל התחלובה. בעבודה הקדמית בחנו את העברת הסיגנל של אינסולין ברקמות שומן של פרות לאחר ההמלטה, ונמצא כי רקמות השומן של מחצית מן הפרות הנבדקות לא הגיבו לאינסולין. תת קבוצה זו של פרות נבדלה בכמה מאפיינים מתת הקבוצה המגיבה לאינסולין; ראשית, הפרות שלא הגיבו ברקמת השומן איבדו משקל גוף רב יותר בחודש הראשון לאחר ההמלטה, והירידה במצב הגופני לאחר ההמלטה הייתה גדולה יותר. שנית, תנובות החלב והחמ"מ במהלך 100 הימים הראשונים בתחלובה היו נמוכים יותר בפרות שאיבדו משקל גוף רב לאחר ההמלטה. מכאן, נראה שישנו קשר בין תגובתיות רקמת השומן באיזור בסיס הזנב לאינסולין, לבין מידת הירידה במשקל גוף לאחר ההמלטה ולייצור החלב. אישוש של ממצא זה יאפשר בחינה של סמנים מטבוליים נוספים ברקמת השומן בעזרת שיטות ביואינפורמטיות מתקדמות, אשר מאפיינים תתי אוכלוסיות בעדר החלב ויוכל לשמש ככלי לסלקציה של הפרות המצטיינות בהסתגלותן הפיזיולוגית לייצור חלב. יעדי ושלבי המחקר: בשנת המחקר הראשונה ביצענו ניסוי בו השתתפו 12 פרות לפני ההמלטה ברפת ההזנה הפרטנית. נלקחו דגימות דם 3 פעמים בשבוע לריכוזי מטבוליטים והורמונים, נתוני צריכת מזון וייצור נאספו ומאזן האנרגיה חושב. ביופסיות מרקמות שומן מאזור בסיס הזנב נלקחו לפני ולאחר ביצוע מבחן העמסת גלוקוז בימים 14- ו-10 לאחר ההמלטה, בפרות אשר נבדלות במידת הירידה במשקל גוף לאחר ההמלטה. ביצענו אנליזות לריכוזי הורמונים ומטבוליטים וניתחנו את השונות בין הפרות בתגובה להמלטה. בשנת המחקר השנייה ביצענו אנליזות של דוגמאות הדם וכן אנליזה פרוטאומית לבחינת סמנים מטבוליים ברקמות שומן של פרות לאחר ההמלטה הנבדלות במידת הירידה במשקל גוף לאחר ההמלטה בשיטת Proteomics. כמו כן ניתחנו נתונים של 92 פרות בוגרות ברפת וולקני בכדי לבחון את האם מידת איבוד משקל גוף בכל תחלובה הינה תכונה פנימית אשר חוזרת על עצמה, ואת הקשר לביצועי פוריות של הפרות בכל תחלובה. בשנת המחקר השלישית ביצענו ניסוי עם 18 פרות ממליטות ברפת וולקני בהן בחנו את הקשר בין ביטוי סמנים ברקמת השומן בפרות לאחר ההמלטה ע"י אנליזה פרוטאומית לבין מדדים מטבוליים ומידת הירידה במשקל גוף לאחר ההמלטה.

ממצאי המחקר מראים כי ניתן לחלק פנוטיפית פרות חלב גבוהות תנובה ל-2 קבוצות הנבדלות בשיעור איבוד משקל גוף לאחר ההמלטה. איבוד משקל הגוף היה במתאם עם הירידה במצב הגופני. ממצא מעניין הוא שהמצב הגופני של הפרות בסוף ההיריון היה דומה בשתי הקבוצות, כך שלא ניתן היה לזהות מראש פרות שעתידות לרדת במידה ניכרת במשקלן. בבחינת ריכוזי הורמונים ומטבוליטים בדם, נראה כי פירוק מסיבי יותר של רקמת שומן בפרות ה-HWL מתבטא בעלייה בריכוזי ה-NEFA וה-MDA בדם לאחר ההמלטה. ממצא מעניין ביותר הינו התגובה הדיפרנציאלית ל-GTT בפרות ה-HWL, כאשר הפרשת האינסולין גבוהה במידה ניכרת בפרות אלו לפני ולאחר ההמלטה. משמעות ממצא זה היא עמידות גבוהה יותר לאינסולין ברמה הסיסטמית בפרות HWL. בנוסף, כאשר מחשבים את ה-revised quantitative insulin sensitivity check index (RQUICKI) עפ"י ריכוזי גלוקוז, NEFA ואינסולין בדם בתקופת המעבר, מגלים כי פרות ה-HWL נטו להיות עם ערכי RQUICKI נמוכים יותר לעומת ה-LWL ($P < 0.16$), דבר המצביע גם כן על רגישות נמוכה יותר לאינסולין בפרות אלו. סך ממצאים אלו מצביעים על כך שמידת הרגישות לאינסולין בפרות סביב ההמלטה הינה שונה משמעותית בין פרות ויש לכך חשיבות רבה מבחינת ההתאמות ההומאורטיות לתחילת התחלובה. כמו כן, ממצא זה עשוי להעיד על כך שפרות HWL מהוות קבוצת סיכון לתחלואה מטבולית וייתכן שגם תחול בהן גם פגיעה בביצועים בהמשך התחלובה. ממצאים אלו פורסמו במאמר: Zachut & Moallem, Journal of Dairy Science 2017.

בנוסף, בעבודה זו הראינו כי ישנו דפוס שחוזר על עצמו במידת הירידה במשקל הגוף לאחר ההמלטה בין פרות לאורך התחלובות, אשר קשור לביצועי הרבייה של הפרה, אך לא לתדירות התחלואה לאחר ההמלטה. ממצאי מחקר זה מעידים שמידת איבוד משקל הגוף לאחר ההמלטה זו תכונה פנימית בפרה אשר עשויה להיות עם בסיס גנטי. ההבדלים בין הקבוצות במידת הירידה במשקל הגוף נראו החל מתחלובה שנייה, מה שמעלה את האפשרות להגדיר את הפרה כאמ"ר או אמ"מ בתחלובה זו. פרות שאיבדו משקל רב (אמ"ר) הראו ביצועי רבייה פחותים לעומת פרות שמאבדות מעט משקל (אמ"מ) לאורך התחלובות. ממצאים אלו פורסמו גם כן במאמר (Zachut and Moallem, 2017).

לסיכום ממצאי האנליזה הפרוטאומית, אותרו מספר חלבונים ביומרקרים שביטויים שונה ברקמת השומן של פרות HWL לעומת LWL, מתוכם חלבונים שקשורים למטבוליזם השומן ולליפוליזה ברקמה, וכן לסטטוס החימצוני של רקמת השומן. אכן, האנליזה הביואינפורמטית תומכת בממצאים אלו ומצביעה על כך שהמסלולים העיקריים שהושפעו קשורים ליצירה של ROS ולפקטורים דלקתיים שונים אשר יכולים להיות קשורים לפירוק המסיבי של רקמת השומן בפרות HWL. על בסיס ממצאי מחקר זה ניתן להציע כי ישנם חלבונים ביומרקרים שונים ברקמת השומן של פרות סביב ההמלטה אשר מעידים על המצב הפיזיולוגי של הפרה בתקופת המעבר. יחד עם הממצאים ממחקר זה המראים כי שיעור איבוד משקל הגוף הינה תכונה פנימית בפרה וכי יש לכך השלכות פיזיולוגיות על מערכת הרבייה, אשר מתבטאת בשיעורי התעברות נמוכים יותר בפרות עם איבוד משקל גבוה (אמ"ר / HWL), מחקר זה ענה על מטרות המחקר והוסיף ידע על המעורבות של רקמת השומן בשינויים הפיזיולוגיים בתקופת המעבר, וכן הראינו לראשונה חלבונים ביומרקרים הקשורים לכך. עפ"י ממצאי המחקר ניתן להציע כי פרות שמאבדות מעט משקל לאחר ההמלטה הינן מצטיינות בהסתגלותן הפיזיולוגית לתחילת התחלובה, וישנם חלבונים שונים שמתבטאים ברקמת השומן התת עורית אשר מהווים ביומרקרים לתת אוכלוסיה זו בעדר החלב.

Abstract

The onset of lactation is a critical period in terms of cows' performance, during which significant metabolic changes occur that affect productivity during the whole lactation. There is a great deal of variance between cows in the physiological and metabolic characteristics after calving, which affect the efficiency of food consumption and milk production during lactation. In the preliminary work we examined the transmission of insulin signal in cow's adipose tissue (AT) after calving and found that the AT of half of the tested cows did not respond to insulin. This subset of cows differed in several characteristics from the subgroup of the insulin-responding group; First, those who did not respond to insulin in their AT lost more body weight in the first month after birth, and the decline in body condition after calving was greater. Second, the milk yield and the FCM during the first 100 days were lower in cows who lost a lot of body weight after calving, so there appears to be a link between the responsiveness of the AT to the base of the tail and the weight of the body after calving and milk production. The confirmation of this finding will enable the examination of additional metabolic markers in AT using advanced bioinformatics methods that characterize sub-populations in the dairy cows herd and can serve as a tool for selection of cows that excel in their physiological adaptation to milk production. Objectives and stages of the study: In the first year of the study, we performed an experiment in which 12 cows participated before calving in the individual feeding barn (Volcani center). Blood samples were taken 3 times a week for concentrations of metabolites and hormones, food intake and production data were collected and the energy balance was calculated. AT biopsies from the caudal base region were taken before and after a glucose tolerance test on days -14 and 10 after birth, in cows that differ in body weight loss after calving. We performed analyzes of concentrations of hormones and metabolites and analyzed the variability between cows in response to calving. In the second year we performed analyzes of blood samples and proteomic analysis of metabolic markers in cow's AT after calving, differentiated by postpartum weight loss. We also analyzed the data of 92 mature cows in the Volcani barn to examine whether the weight loss in each lactation is an internal trait that is repeated, and the link to the fertility performance of the cows at each lactation. In the third year of the study, we performed an experiment with 18 cows in the Volcani barn that examined the association between expression of AT markers in cows after calving by proteomic analysis and metabolic measures and the extent of weight loss after calving.

The findings show that high-yielding dairy cows can be divided into two groups that differ in body weight loss postpartum. Body weight loss was correlated with body condition score (BCS). An interesting finding is that the BCS of the cows at the end of pregnancy was similar in both groups, so it was not possible to identify cows that would significantly decrease in weight. A more massive lipolysis of adipose tissue in the HWL cows resulted in increased concentrations of NEFA and MDA in the blood postpartum. A most interesting finding is the differential response to GTT in HWL cows, with insulin secretion significantly higher in these cows before and after calving. The significance of this finding is greater resistance to insulin at the systemic level in HWL cows. In addition, when the revised quantitative insulin check index (RQUICKI) was calculated according to glucose, NEFA, and insulin concentration in the blood during the transition period, the HWL cows tended to have lower RQUICKI values than the LWL ($P < 0.16$), indicating that insulin sensitivity in cows around calving is significantly different between cows, and this may indicate that HWL is a risk group for metabolic diseases and may also affect performance in the future. These findings were published at: Zachut & Moallem, *Journal of Dairy Science*, 2017. In addition, we have shown that there is a repetitive pattern in the extent of weight loss postpartum between cows along lactations, which is related to reproductive performance of the cow, but not to the frequency of diseases postpartum. This indicates that the degree of body weight loss PP is an internal feature of the cow that may have a genetic basis. These findings were also published (Zachut and Moallem, 2017). To summarize the findings of the proteomic analysis, several biomarkers were found to have different abundance in the adipose tissue of HWL cows vs. LWL, including proteins related to fat metabolism and tissue lipolysis, as well as to the oxidative status of fat tissue. Indeed, the bioinformatics analysis supports these findings and indicates that the main pathways affected are related to the creation of ROS and various

inflammatory factors that can be associated with the massive dissolution of fat tissue in HWL cows. Based on the findings of this study it is possible to suggest that there are various biomarkers in the adipose tissue of cows around calving which indicate of the physiological condition of the cow during the transition period. In conclusion, in the present work we identified several biomarkers in AT by proteomic analysis that are correlated with metabolic stress in postpartum dairy cows, and characterized the degree of response according to body weight loss during the first month postpartum, showing that this trait has long term effects on cow's reproductive performance across lactations.

1.5. מבוא, תיאור בעיית המחקר ופערי הידע בנושא:

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 הגלוקונואוגנזה 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). מכאן, שיכולת ההסתגלות האינדיווידואלית של הפרה עם האתגרים המטבוליים לאחר ההמלטה תשפיע על ביצועי הפרה לאורך התחלובה.

קיימת שונות רבה בין פרות במאפיינים הפיזיולוגיים והמטבוליים לאחר ההמלטה, המשפיעים על יעילות צריכת המזון וייצור החלב (McNamara, 2012). ידוע כי פרות מאותו עדר הניזונות ממנה זהה מראות שונות גדולה בצריכת המזון, תנובת החלב, צבירת משקל גוף ומאזן אנרגיה (McNamara, 2012). כמו כן, נמצא כי בפרות מאותו עדר השונות בצריכת האנרגיה עבור מסלולים המטבוליים ברקמות השומן, השריר והכבד מגיעה ל-100% בין פרטים (Onken et al., 2011). חלק ניכר משונות זו אינו מוסבר: בכדי לבחון זאת יש לבדוק מסלולים מטבוליים ברקמות של פרטים בודדים ולבחון את הקשר למדדי ייצור ויעילות (McNamara, 2012). מובן שרקמות שונות כגון הכבד, העטין, השריר ורקמת השומן מעורבים במטבוליזם האנרגיה, אולם תוכנית מחקר זו מתמקדת ברקמת השומן אשר מהווה נדבך מרכזי בבקרה על המטבוליזם בפרות חלב.

בשנים האחרונות התברר כי רקמת השומן אינה משמשת רק כאיבר לאגירת אנרגיה, אלא איבר אנדוקריני חשוב שמעורב בבקרת ההומיאוסטאזיס בגוף (Peinado et al., 2012). רקמת השומן מייצרת מגוון רחב של מולקולות פעילות-ביולוגית הנקראות אדיפוקינים, אשר בעלי פעילות אנדוקרינית, פאראקרינית ואוטוקרינית (Peinado et al., 2012). חלבונים שונים שמעורבים במטבוליזם רקמת השומן משתתפים בשינויים המתרחשים בתחילת התחלובה בפרות חלב, והפעילות של חלק מהם הינה בהתאמה לרקע הגנטי של הפרה. לדוגמא, נמצא כי הפעילות של האנזים Hormone sensitive lipase (HSL) ושיעורי הליפוליזיס קשורים באופן משמעותי לרקע הגנטי ולייצור החלב בפועל של פרות (McNamara, 2010). יתרה מזאת, למרות ש-HSL מעורב בליפוליזיס, ניתן היה להסביר רק כ-12%-17% מהשונות

בליפוליזיס מושרה על ידי עלייה ב-mRNA של HSL וברמות הליפוליזיס הבזלי: מכאן, שמרבית הבקרה על פעילות HSL הינה לאחר התרגום או בקרה פיזיולוגית דרך הפעלת מערכת העצבים הסימפטטית והגברת זירחון חלבונים (Sumner and McNamara, 2007). בנוסף, נמצאו קשרים ספציפיים בין ביטוי גנים ברקמת השומן והייצור ברמת החיה (Koltjes and Spurlock, 2011). ממצאים אלו מדגימים שישנם מנגנונים חוץ-גנומיים האחראים לשונות בתפקוד רקמת השומן, וזהו כר נרחב למחקר עתידי.

אנליזה פרוטאומית הינה כלי חשוב לזיהוי אדיפוקינים חדשים ומרקרים מולקולאריים ברקמת השומן וברקמות אחרות (Peinado et al., 2012). לדוגמא, בשיטה זו נמצא כי ביטוי Hsp72, חלבון שמושרה במצבי עקה, עולה ברקמות שומן של פרטים הסובלים מעודף משקל ועמידות לאינסולין (Boden et al., 2008). כמו כן, בניסוי אחר השתמשו בפרוטאומיקה בכדי לאפיין את מפת החלבונים מרקמת שומן של נשים עם Polycystic ovary syndrome (Solomon, 1999). כפי שנקבע לאחרונה ע"י (Sauerwein et al., 2014), שיטות טרנסקריפטומיות קידמו את ההבנה שלנו לגבי פעילות רקמת השומן, אולם המגבלה הרצינית ביותר של שיטות אלו היא הקשר הרופף יחסית בין רמות ה-mRNA לביטוי חלבונים בפועל ברקמה: לכן יש צורך בשיטות שבודקות את ביטוי החלבונים (כדוגמת פרוטאומיקה) על מנת להבין את המסלולים המטבוליים ברקמת השומן.

אינסולין הינו הורמון מטבולי מרכזי בפרות חלב, כאשר ריכוזו בדם יורד מיד לאחר ההמלטה ומתחיל לעלות בשבועות שלאחר ההמלטה. רמות אינסולין נמוכות מאפשרות ליפוליזיס, וכן הגברת ביטוי האנזימים הגלוקונאוגנים בכבד. בעבודה הקדמית שביצענו נמצא כי בעקבות עלייה בריכוזי האינסולין בדם חלה עלייה בזרחון של הרצפטור לאינסולין ושל protein kinase B (PKB, Akt) בכבד הן לפני והן לאחר ההמלטה בכל הפרות. לעומת זאת, כאשר בחנו את העברת הסיגנל של אינסולין ברקמות השומן נמצאה תגובה דיפרנציאלית: כאשר במחצית מן הפרות (4 מתוך 8) הייתה עלייה בזרחון של Akt ברקמת השומן בעקבות גירוי של אינסולין, ואילו במחצית השנייה של הפרות לא חלה עלייה בזרחון אלמנט זה. תת הקבוצה אשר לא הגיבה לאינסולין ברקמת השומן נבדלה בכמה מאפיינים מתת הקבוצה המגיבה; ראשית, הפרות שלא הגיבו ברקמת השומן איבדו משקל גוף רב יותר בחודש הראשון לאחר ההמלטה (54.5 לעומת 11.8 ק"ג), והירידה במצב הגופני (BCS) לאחר ההמלטה הייתה גדולה יותר לעומת תת הקבוצה השנייה. שנית, תנובות החלב והחמ"מ במהלך 100 הימים הראשונים בתחלובה היו נמוכים יותר בפרות שאיבדו משקל גוף רב לאחר ההמלטה. כמו כן, תנובות החמ"ש 4% המתוקנות ל-305 יום, אשר מהוות אינדיקטור לפוטנציאל הייצור של הפרות, היו נמוכות יותר בפרות שאיבדו משקל גוף רב לאחר ההמלטה (טבלה 1). מכאן, נראה שיש קשר בין תגובתיות רקמת השומן מאזור בסיס הזנב לאינסולין לבין מידת הירידה במשקל גוף לאחר ההמלטה ולפוטנציאל הייצור. תוצאות אלו נתמכות בעבודה אחרת שבוצעה בגרמניה, שם חילקו פרות בדיעבד על סמך רמות השומן בכבד (liver fat content, LFC) לאחר ההמלטה: נמצא כי השונות במידת פירוק רקמות גוף, המתבטאת ברמות השומן בכבד, השפיעה באופן שונה על צריכת המזון, המצב הגופני, ועל מטבוליזם השומן והגלוקוז בפרות חלב גבוהות תנובה (Weber et al., 2013). למעשה, נמצא כי הפרות שהיו עם LFC נמוך לאחר ההמלטה היו עם צריכת המזון הגבוהה ביותר ועם מאזן האנרגיה החיובי ביותר, וכי הירידה בריכוזי הגלוקוז לאחר ההמלטה הייתה גדולה יותר בפרות שהיו עם LFC גבוה, בעוד שריכוזי האינסולין היו גבוהים בפרות עם LFC נמוך (Weber et al., 2013). מכאן, שההסתגלות של

פרות בודדות לדרישות האנרגטיות הגבוהות לאחר ההמלטה הינה שונה וישנו שימוש באסטרטגיות שונות במסגרת הבקרה ההומאורטית לייצור חלב. ההבדלים במידת פירוק רקמות השומן לאחר ההמלטה מהווים אמצעי מרכזי בהסתגלות האינדיווידואלית של פרות לייצור חלב לאחר ההמלטה (Zachut et al., 2013; Weber et al., 2013), אולם לא ידועים המנגנונים המאפשרים שונות זו בין פרטים ברמת הרקמה והתא. מכיוון שבעבודה ההקדמית (Zachut et al., 2013) הממצאים נבדקו במספר קטן של פרטים, יש צורך בבחינה נרחבת של מסלולי העברת הסיגנל של אינסולין ברקמות שומן מפרות לאחר ההמלטה, ולבדוק האם יש קשר לאיבוד משקל גוף, צריכת המזון הפרטנית, מאזן האנרגיה וייצור החלב. אישוש של ממצא זה יאפשר בחינה של סמנים מטבוליים נוספים ברקמת השומן בעזרת שיטות ביואינפורמטיות מתקדמות, אשר מאפיינים תתי אוכלוסיות בעדר החלב המצטיינות בהסתגלותן הפיזיולוגית לייצור חלב.

הנחות היסוד של המחקר המוצע: ישנה שונות גנטית בעדר הבקר לחלב, אשר מתבטאת ביכולת של פרות שונות להסתגל לשינויים המטבוליים הנרחבים הנדרשים לייצור חלב גבוה לאחר ההמלטה. אינסולין הינו הורמון מפתח במטבוליזם השומן בפרות, ולכן התגובתיות של רקמת השומן לאינסולין לאחר ההמלטה עשויה להוות אינדיקטור ליכולת של הפרה הבודדת לווסת את פירוק רקמת השומן, צריכת המזון וייצור החלב. אפיון סמנים מטבוליים ברקמות השומן הפריפריאליות בפרות אשר מסתגלות בצורה מיטבית לייצור חלב עשוי להוות בסיס לסלקציה של תת אוכלוסיה זו בכדי לשפר את ביצועי העדר הישראלי.

1.6. מטרות המחקר:

- א. בחינת הביטוי של אלמנטים במסלול העברת הסיגנל של אינסולין ברקמות שומן שייאספו מפרות בעלות פוטנציאל ייצור שונה בימים 14-ו-10 לאחר ההמלטה ברמת החלבון.
- ב. אפיון סמנים מטבוליים ברקמות שומן של פרות הנבדלות במדדי ייצור ובריידה במשקל גוף לאחר ההמלטה בשיטת Proteomics.
- ג. בחינת הקשר בין ביטוי סמנים מטבוליים נבחרים ברקמת השומן (שיקבעו לפי סעיף ב') בפרות לאחר ההמלטה, לבין ייצור החלב, מאזן האנרגיה ומידת הירידה במשקל גוף לאחר ההמלטה.

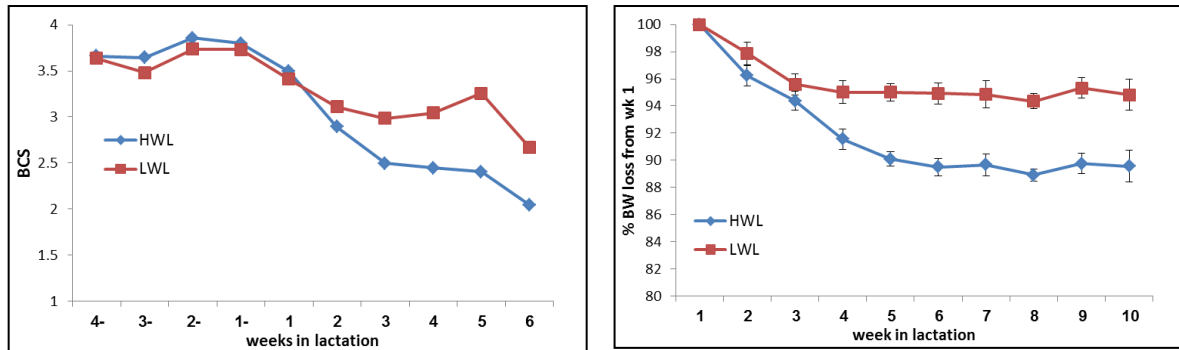
1.7. ד"ח ביצוע

בשנה הראשונה למחקר ביצענו ניסוי בו 12 פרות לפני ההמלטה השתתפו ברפת ההזנה הפרטנית במכון וולקני. נתוני ההזנה, משקלי גוף וייצור נאספו לצורך חישוב מאזן אנרגיה וצריכת חומר יבש. בניסוי השתתפו פרות מהמלטה שנייה ומעלה. ביום 14 לפני ההמלטה וביום 10 לאחר ההמלטה, לכל הפרות בוצע מבחן העמסת גלוקוז (Glucose tolerance test, GTT) בכדי לגרום לעלייה בריכוזי האינסולין בדם וכדי לקבל רקמות לפני ולאחר גירוי של אינסולין. מכל פרה נלקחו ביופסיות של רקמות שומן מאזור בסיס הזנב. מיד לאחר ביצוע הביופסיה הראשונה של רקמת השומן ניתנה אינפוזיה לוריד של גלוקוז (300 מ"ג לק"ג משקל גוף) במשך כ-3 דק'. דגימות דם נאספו לאחר מתן האינפוזיה בזמנים 0-45 דקות כל 5 דקות ולאחר מכן בזמנים 60 ו-75 דקות לאחר האינפוזיה, עבור בדיקות גלוקוז ואינסולין. לאחר מתן האינפוזיה, נלקחו ביופסיות נוספות מרקמות השומן. כל הרקמות הוקפאו מיידית בחנקן נוזלי והועברו למעבדה. ביום 10 לאחר ההמלטה, נערך מבחן העמסת הגלוקוז וביופסיות מרקמת השומן בפעם השנייה מאותן פרות כפי

שמתואר לעיל. דוגמאות דם נלקחו פעמיים בשבוע מ-14 יום לפני ההמלטה ועד 30 יום בתחלובה לבדיקות NEFA, אינסולין, גלוקוז ו-MDA (מרקר לעקה חימצונית). נאספו נתונים יומיים של משקל גוף וייצור חלב, ונתונים שבועיים של מצב גופני. לאחר הפקת החלבון מן הרקמות, נקבעו רמת הביטוי ומידת הזירחון של Akt בשיטת Western blot כפי שמתואר ב-Zachut et al. (2013).

תוצאות ניסוי א': לאחר ההמלטה, 12 הפרות סווגו לתתי קבוצות עפ"י מידת איבוד משקל גוף: **-HWL** איבוד משקל גוף רב (5 פרות) ו-**-LWL** איבוד משקל מועט לאחר ההמלטה (6 פרות: איור 1). פרה אחת הוצאה מאנליזה בגלל בעיות בריאותיות לאחר ההמלטה. בסוף תקופת היובש המצב הגופני של הפרות מ-2 הקבוצות היה זהה, אולם לאחר ההמלטה פרות **HWL** איבדו יותר יח' מצב גופני לעומת **LWL** (איור 1).

איור מס' 1 - מידת איבוד משקל הגוף ומצב גופני בשתי הקבוצות סביב ההמלטה:



צריכת המזון בסוף תקופת היובש הייתה גבוהה ב-5% בקבוצת **HWL** לעומת **LWL** (טבלה מס' 1), אולם צריכת המזון לאחר ההמלטה הייתה דומה ב-2 הקבוצות. תנובת החלב בחודש הראשון בתחלובה לא הייתה שונה בין הפרות, אך מאזן האנרגיה של פרות ה-**HWL** והשפל במאזן האנרגיה נטו להיות שליליים יותר לעומת ה-**LWL** (טבלה מס' 1). פרות מקבוצת ה-**HWL** היו עם ריכוזי NEFA גבוהים יותר בדם לאחר ההמלטה (טבלה מס' 1), אולם ריכוזי גלוקוז ואינסולין בדם לא היו שונים בין הקבוצות לפני ולאחר ההמלטה. ריכוזי מרקר לעקה חימצונית בדם, malondialdehyde (MDA), נטו להיות גבוהים יותר בקבוצת ה-**HWL** בתקופת המעבר (טבלה מס' 1).

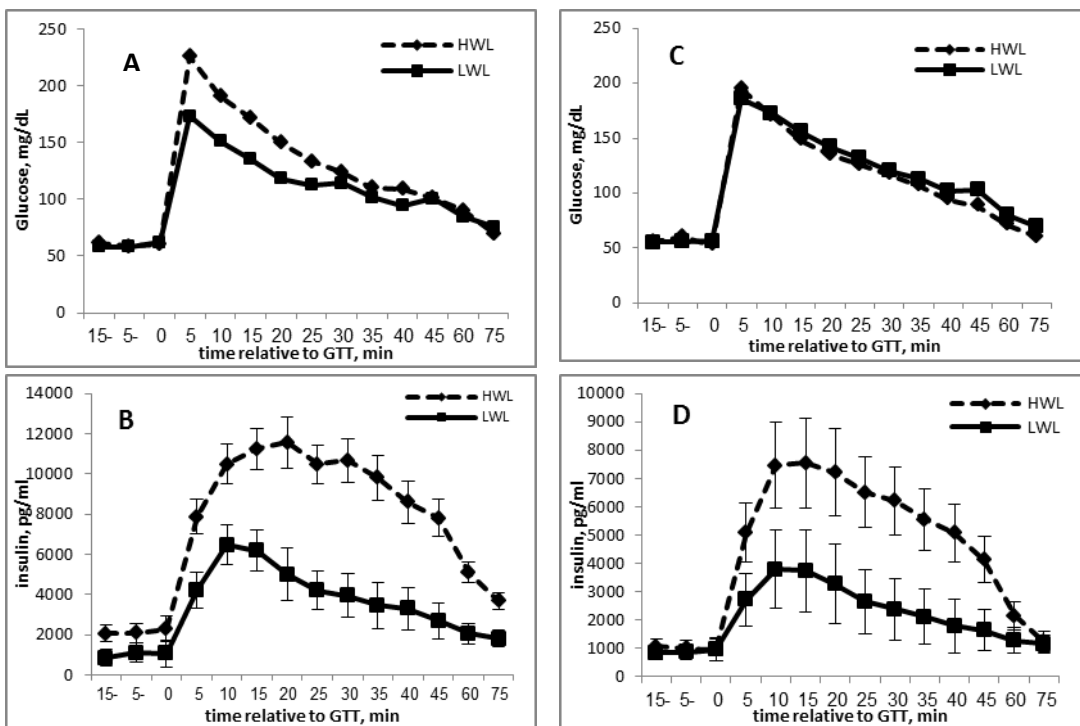
טבלה מס' 1 - צריכת מזון, תנובת חלב, מאזן אנרגיה וריכוזי מטבוליטים בדם בפרות שאיבדו משקל גוף רב (HWL) או מועט (LWL) לאחר ההמלטה

<i>P</i> <	SEM	LWL	HWL	
0.05	0.2	12.0	12.6	צריכת מזון לפני המלטה, ק"ג/יום
0.6	0.8	21.2	21.9	צריכת מזון 1-30 יום בתחלובה, ק"ג/יום
0.7	8.8	36.8	31.6	תנובת חלב עד 30 יום בתחלובה, ק"ג/יום
0.17	0.9	-2.5	-4.7	מאזן אנרגיה עד 30 יום בתחלובה, Mcal/d
0.19	2.2	-11.8	-16.3	שפל במאזן אנרגיה, Mcal/d

0.004	32.7	419.3	589.7	ריכוזי NEFA בדם בימים 1-21, $\mu\text{Eq/L}$
0.08	14.1	108.4	149.7	ריכוזי MDA בדם בימים 14- עד 14 בתחלובה, nM

תגובה ל-GTT: בתגובה למבחן העמסת סוכר, פרות HWL הראו הפרשה מוגברת משמעותית של אינסולין לעומת ה-LWL לפני המלטה ($P < 0.008$, איור 2), ונטו להפריש יותר אינסולין לאחר GTT ביום 10 בתחלובה ($P < 0.07$, איור 2). ריכוזי הגלוקוז בדם לאחר GTT לא נבדלו בין הקבוצות (איור מס' 2) בשני הזמנים. השטח מתחת לעקומת האינסולין (AUC) היה גבוה יותר ב-HWL לפני ההמלטה, ונטה להיות גבוה יותר לאחר ההמלטה ב-HWL לעומת ה-LWL. לא היו הבדלים במדדים קינטיים (glucose turnover rate and half life) או בשטח מתחת לעקומת הגלוקוז בשני הזמנים בין הקבוצות. בבחינת העברת הסינגל של אינסולין ברקמות השומן לא נמצא הבדל במידת הזירחון של Akt בין הפרות בשני המועדים.

איור מס' 2 – ריכוזי גלוקוז ואינסולין בדם לאחר GTT (A, B לפני המלטה, ו-C, D לאחר ההמלטה)



על בסיס ממצאים אלו, בשנת המחקר השנייה החלטנו לבצע בחינה של מידת החזרתיות של איבוד משקל גוף והקשר לתחלואה לאחר ההמלטה ולביצועי הרבייה של הפרות. לצורך כך, השתמשנו במאגר הנתונים של רפת וולקני. השתמשנו במאגר נתונים אוטומטי של משקלי גוף יומיים, אשר מהווים מדד אובייקטיבי וכמותי (לעומת מצב גופני), אשר זמין ברפתות רבות, ומאפשר ניתוח של תחלובות עוקבות לאורך שנים של פרות בעדר. מטרת העבודה הייתה לבחון את ההשערה שמידת איבוד משקל הגוף לאחר ההמלטה זו תכונה פנימית בפרה שחוזרת על עצמה בין תחלובות, באמצעות שימוש בנתוני שקילה

יומיים לאורך תחלובות, ובחינת הקשר בין מידת איבוד המשקל לתנובת החלב, בעיות בריאות לאחר ההמלטה, וביצועי רבייה.

שיטות וחומרים: הנתונים נאספו מרפת וולקני במינהל המחקר החקלאי (ראשון לציון), בה ישנם נתונים אוטומטיים יומיים של משקל גוף ותנובות חלב ב-15 השנים האחרונות. לכן, ניתן היה להשתמש במאגר נתונים זה כדי להוציא נתונים של תחלובות עוקבות בפרות בוגרות בעדר. בניתוח זה, בחרנו באופן אקראי 92 פרות בעדר שהיו עם לפחות 4 תחלובות מלאות בשנים האחרונות. הוצאנו מהניתוח נתונים של תחלובה חמישית ומעלה בגלל מיעוט של פרות עם מספר כזה של תחלובות.

כל הפרות ברפת נחלבו 3 פעמים ביום ונתוני התנובה ומשקל הגוף נמדדו אוטומטית במערכת אפמילק (קיבוץ אפיקים). רכיבי החלב נבדקו פעם בחודש במעבדה המרכזית של התאחדות מגדלי הבקר (קיסריה). משקלי הגוף נמדדו 3 פעמים ביום ביציאה ממכון החליבה, ומשקל הגוף הממוצע נקבע כל יום. אנו קבענו את משקל הגוף הממוצע של כל פרה בכל תחלובה בשבוע הראשון וכן בשבוע החמישי לאחר ההמלטה, ואז חישבנו את אחוז איבוד משקל הגוף משבוע 1 לשבוע 5. בחרנו בנקודות זמן אלו על בסיס מחקרנו הקודם שהראה כי ישנה חזרתיות במידת איבוד משקל הגוף בין שבוע 1 ל-5 בין תחלובות בשמונה פרות (Zachut et al., 2013). הפרות חולקו ל-2 קבוצות על סמך אחוז איבוד משקל הגוף בתחלובה האחרונה שלהן:

(1) איבוד משקל רב (אמ"ר) – בין 7-17% איבוד משקל גוף, $n = 55$.

(2) איבוד משקל מועט (אמ"מ) – בין 3-ל-6% איבוד משקל גוף, $n = 37$.

לאחר חלוקה זו של הפרות לקבוצות, בחנו את הנתונים של הפרות בכל התחלובות (החלוקה לקבוצות הייתה פעם אחת על סמך תחלובה אחרונה). יש לציין כי פוטנציאל הייצור של הפרות (עפ"י נתוני נעה) היה זהה בין שתי הקבוצות (212.8 ו-198.7 ק"ג חלב לפרות אמ"ר ואמ"מ, בהתאמה, $P < 0.8$). נתוני התחלואה וביצועי הרבייה (מספר ימים פתוחים, שיעורי התעברות) נלקחו מתוכנת נעה. הנתון של המצב הגופני לאחר ההמלטה נלקח מנתוני נעה.

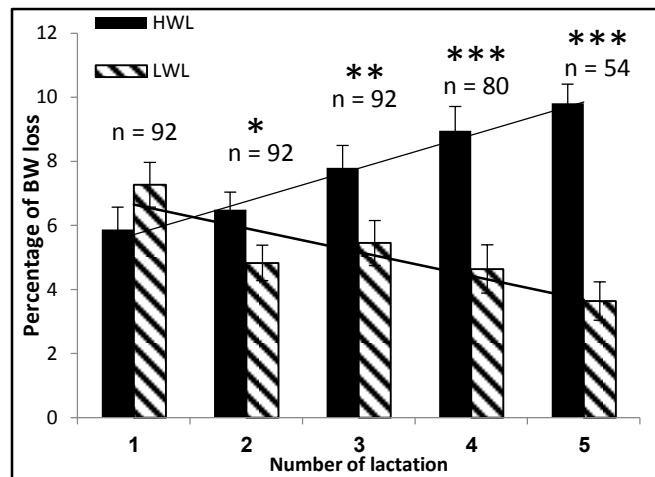
ניתוח סטטיסטי – אחוז איבוד משקל הגוף משבוע 1 לשבוע 5 ותנובות החלב נותחו ב-repeated measurements באמצעות Mixed model של SAS. נכללו במודל השפעת הקבוצה, הפרה, ומספר התחלובה. התפלגות בעיות הבריאות ושיעורי ההתעברות נותחו לכל התחלובות וכן עבור כל תחלובה בנפרד עם פרוצדורת GLIMMIX של SAS, כשמספר התחלובה משמש blocking factor במודל. המודל הסופי כלל את האפקט הקבוע של הקבוצה ומספר התחלובה, אך מספר התחלובה לא היה מובהק בשום מבחן ולכן הוצא המודל. עבור מבחני קורלציה השתמשנו ב-PROC REG של SAS.

תוצאות: מספר התחלובות הממוצע של הפרות היה 4.6 ± 0.1 ו- 4.5 ± 0.1 בקבוצות האמ"ר ואמ"מ, בהתאמה. משקל הגוף הממוצע בשבוע 1 לאורך התחלובות (1-5) והמצב הגופני לאחר ההמלטה היה דומה בין שתי הקבוצות. פרות האמ"ר איבדו בממוצע 49.9 ק"ג ופרות האמ"מ איבדו בממוצע 33.8 ק"ג עד שבוע 5 בתחלובה ($SEM = 2.3, P < 0.0001$), ואחוז איבוד המשקל בין שבוע 1 ל-5 בין התחלובות היה 7.6% בקבוצת האמ"ר ו-5.3% בקבוצת האמ"מ ($SEM = 0.3, P < 0.0001$).

כאשר ניתחנו את אחוז איבוד משקל הגוף בנפרד לכל תחלובה, לא היה הבדל בין הקבוצות בתחלובה הראשונה, הייתה נטייה להבדל באמ"ר לעומת האמ"מ בתחלובה השנייה ($P < 0.06$), והיה הבדל מובהק

בתחלובות 3,4,5 ($P < 0.0001$, איור מס' 3). יתרה מכך, בעוד שאחוז איבוד משקל הגוף הממוצע עלה בין תחלובה 1 לתחלובה 5 בפרות אמ"ר ($r = 0.99$, $P < 0.0005$), אחוז איבוד משקל הגוף ירד בין התחלובות בפרות אמ"מ ($r = -0.88$, $P < 0.05$, איור מס' 3).

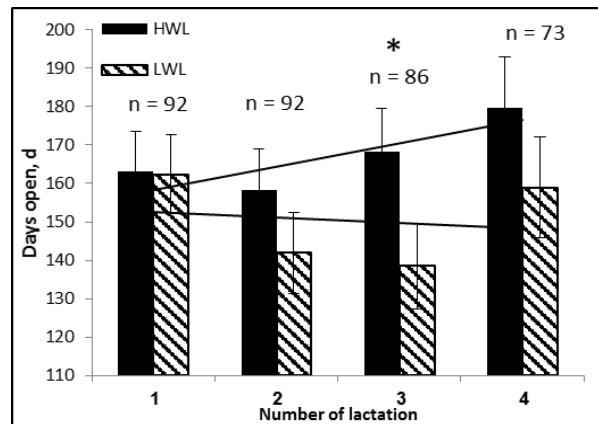
איור מספר 3 – אחוז איבוד משקל גוף בין תחלובות בפרות שמאבדות משקל רב (אמ"ר) או משקל מועט (אמ"מ) לאחר ההמלטה



במהלך החודש הראשון לאחר ההמלטה, תנובות החלב (33.6 לעומת 32.2 ק"ג ליום, $SEM = 0.4$, $P < 0.045$) והחמ"מ (35.4 לעומת 34.3 ק"ג ליום, $SEM = 0.28$, $P < 0.02$) בין תחלובות (1-5) היו גבוהות יותר בפרות אמ"ר לעומת פרות אמ"מ. לא היו הבדלים בין הקבוצות ברכיבי החלב, ותנובת החלב המתוקנת ל-305 יום בין התחלובות (1-5) הייתה דומה בשתי הקבוצות (38.9-39.3 ק"ג ליום), כמו גם תנובת החמ"מ המתוקנת ל-305 יום (36.0-35.7 ק"ג ליום).

נתוני הרבייה חושבו בתחלובות 1-4. לאורך התחלובות, מספר הימים הפתוחים היה ארוך ב-17 יום בקבוצת האמ"ר לעומת האמ"מ ($P < 0.045$), ונמצא דפוס של עלייה במספר הימים הפתוחים עם העלייה במספר התחלובה בפרות אמ"ר ($r = 0.84$, $P < 0.15$), אשר לא נמצא בפרות אמ"מ (איור מס' 4). המרווח בין ההמלטות היה ארוך ב-20 יום בפרות אמ"ר לעומת פרות אמ"מ (440 לעומת 420 יום, $P < 0.06$). מספר ההזרעות להתעברות בין התחלובות נטה להיות גבוה יותר בפרות אמ"ר לעומת אמ"מ (3.1 לעומת 2.7, $SEM = 0.17$, $P < 0.1$).

איור מספר 4 – מספר ימים פתוחים בין תחלובות בפרות שמאבדות משקל רב (אמ"ר) או משקל מועט (אמ"מ) לאחר ההמלטה



שיעורי ההתעברות מהזרעה ראשונה, שנייה ושלישית לאורך התחלובות מופיעים בטבלה מס' 1. שיעורי ההתעברות מהזרעה ראשונה היו דומים בין הקבוצות, ואילו שיעורי ההתעברות מהזרעה שנייה היו גבוהים ב-12% בפרות אמ"מ לעומת פרות אמ"ר לאורך התחלובות ($P < 0.1$). בתחלובות מספר 2-4, שיעורי ההתעברות מהזרעה שנייה היו גבוהים ב-18.7% בפרות אמ"מ לעומת פרות אמ"ר ($P < 0.06$). שיעורי ההתעברות מהזרעות 1-3 לאורך התחלובות היה גבוה ב-9.6% בפרות אמ"מ לעומת פרות אמ"ר ($P < 0.04$), ועבור תחלובות מספר 2-4 שיעורי ההתעברות היו גבוהים ב-14.3% בקבוצת האמ"מ ($P < 0.03$), טבלה מס' 2.

טבלה מספר 2 – שיעורי ההתעברות של פרות שמאבדות משקל רב (אמ"ר) או משקל מועט (אמ"מ) לאחר ההמלטה

P =	קבוצות		שיעורי התעברות מספר פרות כל התחלובות
	אמ"מ	אמ"ר	
	37	55	הזרעה ראשונה
0.61	39.8 % (55/138)	37.0 % (77/208)	הזרעה שנייה
0.10	37.3 % (31/83)	25.1 % (33/131)	הזרעה 1+2
0.16	38.9 % (86/221)	32.4 % (110/339)	הזרעות 1+2+3
0.04	42.1 % (115/273)	32.5 % (142/437)	תחלובות 2-4
0.67	35.6 % (36/101)	31.3 % (48/153)	הזרעה ראשונה
0.06	41.5 % (27/65)	22.8 % (24/105)	הזרעה שנייה
0.09	37.9 % (63/166)	27.9 % (72/258)	הזרעה 1+2
0.03	42.6 % (87/204)	28.3 % (96/339)	הזרעות 1+2+3

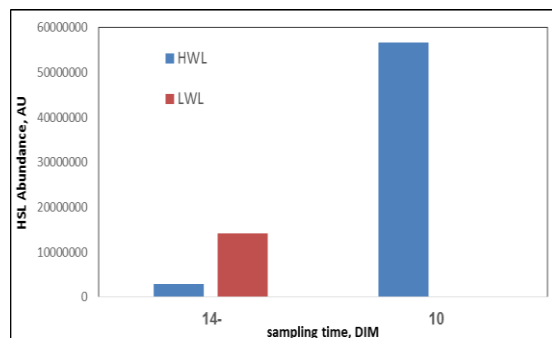
בניתוח תדירות התחלואה לאחר ההמלטה נמצא שתדירות הקטוזיס לאורך התחלובות לא הייתה שונה בין הקבוצות: 17.3% בקבוצת אמ"ר לעומת 12.8% בקבוצת האמ"מ. לא נמצאו הבדלים במחלות המלטה נוספות (קדחות חלב, דלקות רחם, ועצירות שליה) בין הקבוצות.

אנליזה פרוטאומית לאיתור ביומרקרים ברקמת השומן

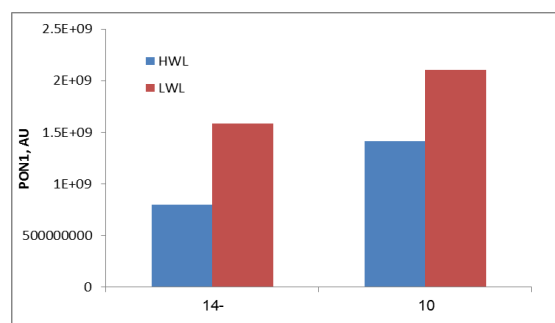
בהמשך המחקר, בהתבסס על ממצאי השנה הראשונה חלק מדוגמאות השומן משני תתי הקבוצות שמשו להפקת חלבון לביצוע אנליזת Proteomics לשם אפיון מסלולים מטבוליים שביטויים משתנה בפרות HWL ו-LWL ברקמת השומן. האנליזה התבצעה במכון לרפואה אישית במכון וייצמן למדע, רחובות. כמו כן נבצע אנליזה ביואינפורמטית (Ingenuity, Qiagen) לתוצאות האנליזה הפרוטאומית בכדי לאתר מסלולים ופונקציות על פי החלבונים שביטויים שונה ברקמת השומן של פרות משתי הקבוצות.

באנליזה הפרוטאומית נמצאו ברקמות השומן סך הכל 1838 חלבונים, אשר מתוכם הביטוי של 56 חלבונים (3% מסך החלבונים) היה שונה בפרות HWL לעומת LWL ($P < 0.05$). תוצאות האנליזה הפרוטאומית מראות כי הביטוי של hormone sensitive lipase (HSL) היה גבוה משמעותית ברקמת השומן של פרות HWL לעומת LWL ($P < 0.03$, Fold Change (FC) = 5228), ממצא המעיד על פירוק מסיבי של רקמת השומן בעיקר לאחר ההמלטה (איור מס' 5). כמו כן, הביטוי של החלבון PON1 (Paraoxonase 1) היה נמוך יותר ברקמת השומן של פרות HWL לעומת LWL ($P < 0.03$, FC = -1.84). חלבון זה הינו נוגד חימצון אשר קשור למטבוליזם של ליפידים ומשמש כמגן מפני חימצון של חומצות שומן. כמו כן PON1 מוגדר כ-negative acute phase protein. ניתן לראות שביטוי נמוך יותר ברקמת השומן של פרות HWL לפני וגם לאחר ההמלטה (איור מס' 6).

איור מספר 5 – ביטוי hormone sensitive lipase (HSL) ברקמת השומן של פרות HWL ו-LWL לפני ולאחר ההמלטה עפ"י אנליזה פרוטאומית

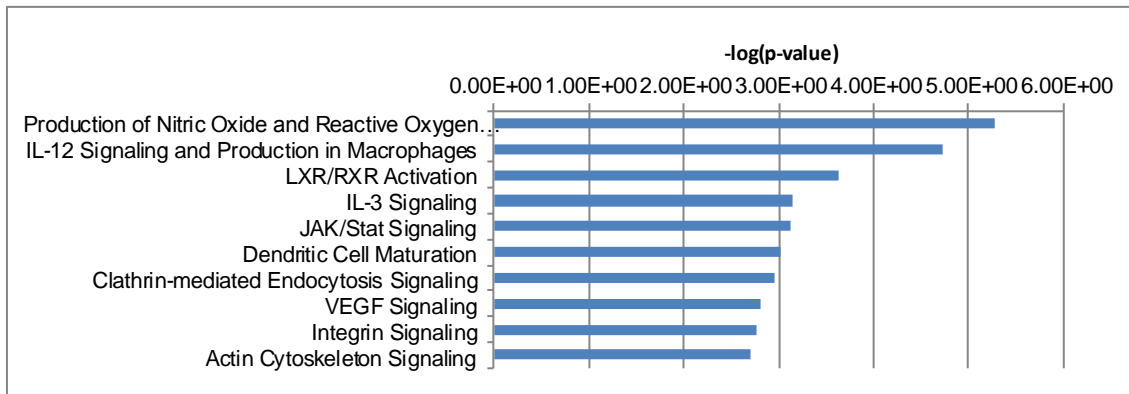


איור מס' 6 – ביטוי Paraoxonase 1 (PON1) ברקמת השומן של פרות HWL ו-LWL לפני ולאחר ההמלטה עפ"י אנליזה פרוטאומית



כאשר ביצענו אנליזה ביואינפורמטית (Ingenuity, Qiagen) לרשימת החלבונים שביטויים השתנה ברקמת השומן של פרות HWL לעומת LWL, מצאנו כי המסלולים העיקריים שהושפעו היו קשורים לייצור של nitric oxide ו-reactive oxygen species, לייצור והעברת סיגנל של IL-2 במקרופגים, להפעלה של מסלול LXR/RXR ועוד (איור מס' 7).

איור מס' 7 – מסלולים עיקריים על פי החלבונים שביטויים השתנה בפרות HWL לעומת LWL עפ"י Ingenuity



ניסוי ב' – בניסוי זה השתתפו 18 פרות שהמליטו ברפת וולקני. בדומה לניסוי א', דוגמאות דם נלקחו מהפרות פעמיים בשבוע מ-14 יום לפני ההמלטה ועד 30 יום בתחלובה לבדיקות NEFA, אינסולין, גלוקוז ו-MDA (מרקר לעקה חימצונית). נאספו נתונים יומיים של משקל גוף וייצור חלב, ונתונים שבועיים של מצב גופני. ביום 14 לפני ההמלטה וכן בימים 7 ו-30 לאחר ההמלטה, מכל הפרות נלקחו ביופסיות של רקמות שומן מאזור בסיס הזנב. כל הרקמות הוקפאו מיידית בחנקן נוזלי והועברו למעבדה. לאחר הפקת החלבון מן הרקמות, הדוגמאות נשלחו לאנליזה פרוטאומית במכון וייצמן כפי שתואר לעיל.

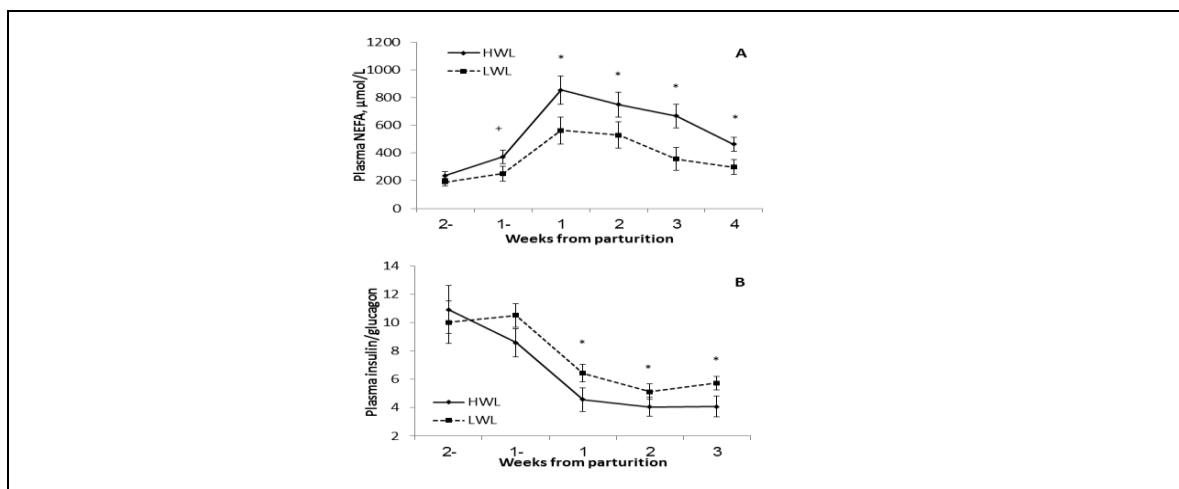
תוצאות הניסוי: פרות אופיינו בדיעבד כ- HWL או LWL בהתבסס על אחוז איבוד BW בין שבוע 1 לשבוע 5 PP, כפי שתואר לעיל. תשע פרות הוגדרו כ- HWL (בממוצע איבוד 8.5% BW, טווח 6.8-11.5%), ו 9 פרות היו LWL (בממוצע איבוד 2.9% BW הפסד, טווח 0.6%-6%). מספר התחלובה הממוצע היה דומה בין קבוצות: 3.6 תחלובות עבור HWL ו 3.7 תחלובות עבור פרות LWL (טווח 2-6 תחלובות). פרות HWL איבדו משמעותית יותר מאשר פרות LWL בשבועות 3 ($P < 0.037$), 4 ($P < 0.005$), 5 ($P < 0.02$), 6 ($P < 0.0007$), 7 ($P < 0.02$), 8 ($P < 0.06$), 9 ($P < 0.06$), ו-10 ($P < 0.07$). חשבו לציין שה- BW הממוצע ב-14 ימים לפני ההמלטה לא היה שונה בין הקבוצות (737.9 ו-719.1 ק"ג, עבור HWL ו- LWL בהתאמה, $SEM = 23.2$, $P < 0.6$). וגם בשבוע 1 PP הממוצע של BW היה דומה בין הקבוצות (698.0 ו-686.2 ק"ג, עבור HWL ו- LWL, בהתאמה, $SEM = 9.6$, $P < 0.4$).

המצב הגופני של הפרות (BCS), אינדיקטור לדרגת השומן שלהן, היה גבוה יותר ב- HWL בהשוואה לפרות LWL ב-14% לפני ההמלטה (3.9 לעומת 3.5 יחידות, $SEM, P < 0.13 = 0.2$). לא נצפו הבדלים ב- BCS בין קבוצות ביום 4 לאחר ההמלטה (3.4 ו-3.1 יחידות בפרות HWL ו-LWL בהתאמה, $SEM, P < 0.3 = 0.2$). עם זאת, ההפסד של יחידות BCS מ-14 d לפני ההמלטה ל-30 d PP היה גבוה יותר ב- HWL בהשוואה לפרות (1.4 לעומת 0.9 יחידות בפרות HWL ו-LWL בהתאמה, $SEM, P < 0.07 = 0.18$).

תפוקת החלב במהלך החודש הראשון לא נבדלה בין פרות HWL ו-LWL, וגם לא 4% FCM. בנוסף, תפוקת החלב במהלך 100 שנות הנקה הראשונות לא נבדלה בין פרות HWL (42.1) ו-LWL (41.6 kg/d, $SEM, P < 0.9 = 2.9$) ולא הפיקה 4% FCM (38.0 ו-39.2 ק"ג / $SEM = 3.1, P < 0.8$). מידע של צריכת פרות הכנסה חסר בשל דיור קבוצה של בעלי חיים בניסוי זה. במהלך המחקר, לפרה אחת של HWL ואחרת מקבוצת LWL היה קטוזיס שאובחנה וטופלה (לאחר הביופסיה).

ריכוז ההורמונים והמטבוליטים בדם נבדק מ-2 שבועות לפני המלטה עד 3 שבועות PP. בשבוע האחרון של ההריון, הריכוזים הממוצעים של ה-NEFA נטו להיות גבוהים יותר ב- HWL בהשוואה לפרות LWL, $P = 0.1$, איור 2 א). לא נמצאו הבדלים בריכוזי האינסולין, גלוקגון ו-MDA בדם בין פרות HWL ו-LWL (נתונים לא מוצגים). לאחר ההמלטה, רמות הפלסמה של NEFA היו גבוהות יותר באופן משמעותי ב- HWL בהשוואה לפרות LWL, $(P < 0.02)$. רמות הגלוקגון היו גם גבוהות יותר ב- HWL בהשוואה לפרות LWL לאחר ההמלטה. עם זאת, ריכוזי אינסולין לא נבדלו בין הקבוצות. מעניין לציין כי יחס האינסולין / גלוקגון היה נמוך משמעותית ב- HWL מאשר בפרות LWL לאחר ההמלטה (איור 2 ב). רמות מדדי של MDA, אינדיקטור לעקה חמצונית, נטו להיות גבוהים יותר ב- HWL בהשוואה לפרות LWL במהלך השבוע הראשון.

איור מס' 8 – ריכוזי NEFA ויחס אינסולין לגלוקגון בדם של פרות סביב ההמלטה



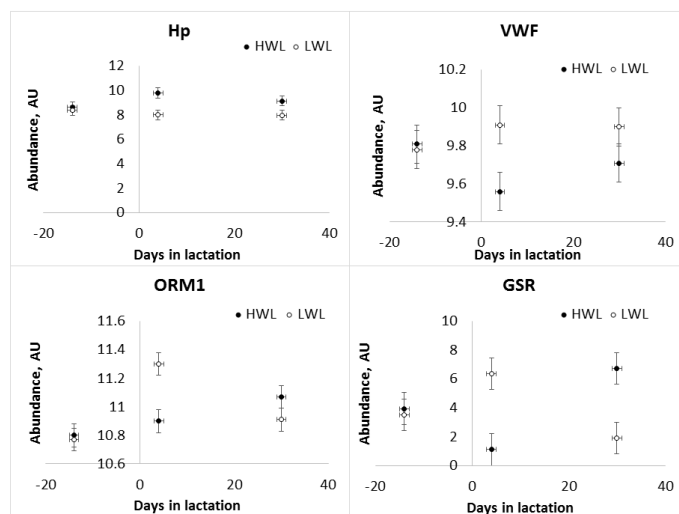
אנליזה פרוטאומית לרקמות שומן של פרות HWL ו-LWL בזמנים שונים לפני ולאחר ההמלטה

ערכנו ניתוח פרוטאומי על קבוצת משנה של דגימות רקמת שומן מפרות HWL ו LWL ($n = 5$ בכל אחד) ב 3 נקודות זמן עבור כל פרה: 14 יום לפני ההמלטה, יום 4 לאחר ההמלטה ויום 30 (בסך הכל 30 דגימות נותחו). בסך הכל זוהו 1,913 חלבונים ברקמות השומן. הכמות של 28 חלבונים הייתה שונה ($P < 0.05$) וקפל שינוי $(1.5 \pm)$ בין HWL ו LWL AT ביום 14 לפני ההמלטה, ואילו 176 חלבונים (9.2% מכלל החלבונים) נבדלו בין HWL ו LWL AT ביום 4 לאחר ההמלטה, ו- 35 חלבונים נבדלו בין HWL ו- LWL AT ביום - 30 לאחר ההמלטה.

אחד המסלולים שהועשרו ברקמת השומן של פרות HWL היה ה-acute phase response signaling. השכיחות של שלושה חלבונים ממסלול זה נבדלו ברקמת השומן של HWL בהשוואה לפרות LWL ב- 4 d (VWF,) ופקטור פון וילברנד (, PP: HP, alpha-1-acid glycoprotein (ORM1, $FC = -2.35$, $P < 0.007$), $FC = -2.33$, $P < 0.01$). ניתן לראות באיור מספר 9 את הדינמיקה של השינויים בכמות חלבונים אלו בזמנים השונים ברקמות השומן של פרות HWL ו-LWL.

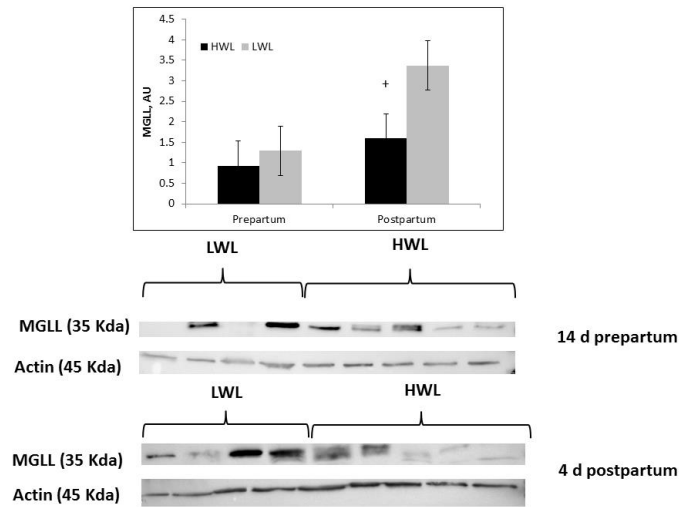
כמו כן נבדקו הכמויות של חלבונים הקשורים למטבוליזם חומצות שומן. כמות ה- fatty acid binding protein 4 (FABP4) הייתה נמוכה יותר ב- HWL מאשר ב- LWL ביום 4 ($FC = -2.56$, $P < 0.03$). הכמות של perilipin (PLIN) נטתה להיות נמוך יותר ב- HWL מאשר ב- LWL ($FC = -2.03$, $P < 0.09$). ממצא זה אושש על western blot, אשר הראה נטייה לביטוי נמוך יותר של PLIN ב- HWL מאשר LWL. הכמות של החלבון monoglyceride (MGLL) לא הייתה שונה בין HWL ו LWL בנקודות זמן שונות, עם זאת, כאשר משלבים את הנתונים מיום 14 לפני ההמלטה עם יום 4 לאחר ההמלטה הביטוי של MGLL היה נמוך יותר ב- HWL מאשר LWL ברקמת השומן ($P < 0.04$). ממצא זה אומת על ידי western blot, אשר הראה מגמה של ביטוי נמוך של MGLL ב- HWL מאשר ב LWL ($P < 0.17$, איור 10).

איור מס' 9 – ביטוי חלבוני Acute phase proteins ברקמות השומן של פרות בימים 14 לפני ההמלטה, ובימים 7 ו-30 לאחר ההמלטה עפ"י ממצאי אנליזה פרוטאומית



HP = haptoglobin; ORM1 = alpha-1-acid glycoprotein; VWF = von Willebrand factor; GSR = glutathione reductase.

איור מס' 10 – ביטוי החלבון MGLL ברקמת השומן של פרות לפני ולאחר ההמלטה



סיכום ודיון

ממצאי המחקר מראים כי ניתן לחלק פנוטיפי פרות חלב גבוהות תנובה ל-2 קבוצות הנבדלות בשיעור איבוד משקל גוף לאחר ההמלטה. איבוד משקל הגוף היה במתאם עם הירידה במצב הגופני. ממצא מעניין הוא שהמצב הגופני של הפרות בסוף ההיריון היה דומה בשתי הקבוצות, כך שלא ניתן היה לזהות מראש פרות שעתידות לרדת במידה ניכרת במשקלן. נמצא כי צריכת המזון בסוף תקופת היובש הייתה גבוהה יותר בקבוצת ה-HWL, אולם לאחר ההמלטה לא היו הבדלים בצריכת המזון או בתנובת החלב, אך מאזן אנרגיה היה שלילי יותר בפרות ה-HWL. הסבר אפשרי לכך הינו שיעילות ספיגת המזון בפרות אלו הינה נמוכה יותר.

בבחינת ריכוזי הורמונים ומטבוליטים בדם, נראה כי פירוק מסיבי יותר של רקמת שומן בפרות ה-HWL מתבטא בעלייה בריכוזי ה-NEFA וה-MDA בדם לאחר ההמלטה. צריכת המזון הדומה מסבירה את העדר ההבדלים בריכוזי הגלוקוז והאינסולין בדם בין הקבוצות בעונת החורף (ניסוי א'). בניסוי ב' אשר נערך בפרות שהמליטו בקיץ נמצא הבדל ביחס גלוקוגון-לאינסולין בדם של פרות HWL לעומת ה-LWL.

ממצא מעניין ביותר הינו התגובה הדיפרנציאלית ל-GTT בפרות ה-HWL, כאשר הפרשת האינסולין גבוהה במידה ניכרת בפרות אלו לפני ולאחר ההמלטה. משמעות ממצא זה היא עמידות גבוהה יותר לאינסולין ברמה הסיסטמית בפרות HWL. בנוסף, כאשר מחשבים את ה-revised quantitative insulin sensitivity check index (RQUICKI) עפ"י ריכוזי גלוקוז, NEFA ואינסולין בדם בתקופת המעבר, מגלים כי פרות ה-HWL נטו להיות עם ערכי RQUICKI נמוכים יותר לעומת ה-LWL ($P < 0.16$), דבר המצביע גם כן על רגישות נמוכה יותר לאינסולין בפרות אלו. העדר תגובה דיפרנציאלית במידת הזירחון של Akt ברקמת השומן עשוי לנבוע ממועד הדיגום ביחס להמלטה או שייתכן ואין הבדל ברגישות לאינסולין ברקמות השומן בפרות מניסוי זה, וכי ההבדל ברגישות לאינסולין הוא ברמה הסיסטמית. סך ממצאים אלו מצביעים על כך שמידת הרגישות לאינסולין בפרות סביב ההמלטה הינה שונה משמעותית בין פרות ויש לכך חשיבות רבה מבחינת ההתאמות ההומאורטיות לתחילת התחלובה. כמו כן, ממצא זה עשוי

להעיד על כך שפרות HWL מהוות קבוצת סיכון לתחלואה מטבולית וייתכן שגם תחול בהן גם פגיעה
 בביצועים בהמשך התחלובה. ממצאים אלו פורסמו במאמר: Zachut & Moallem, Journal of Dairy Science 2017.

בעבודה זו הראינו כי ישנו דפוס שחוזר על עצמו במידת הירידה במשקל הגוף לאחר ההמלטה בין פרות לאורך התחלובות, אשר קשור לביצועי הרבייה של הפרה, אך לא לתדירות התחלואה לאחר ההמלטה. ממצאי מחקר זה מעידים שמידת איבוד משקל הגוף לאחר ההמלטה זו תכונה פנימית בפרה אשר עשויה להיות עם בסיס גנטי. ההבדלים בין הקבוצות במידת הירידה במשקל הגוף נראו החל מתחלובה שנייה, מה שמעלה את האפשרות להגדיר את הפרה כאמ"ר או אמ"מ בתחלובה זו. פרות שאיבדו משקל רב (אמ"ר) הראו ביצועי רבייה פחותים לעומת פרות שמאבדות מעט משקל (אמ"מ) לאורך התחלובות. ממצאי מחקר זה מעידים כי השונות בין פרות בתגובה לעקה המטבולית לאחר ההמלטה משפיעה על תהליכים פיזיולוגיים ועל תפקוד מערכת הרבייה, ודרוש מחקר נוסף על מנת להבין את המנגנונים הקשורים לתכונות איבוד המשקל בפרות לאחר המלטה. ממצאים אלו פורסמו גם כן במאמר ב-Journal of Dairy Science (Zachut and Moallem, 2017).

לסיכום ממצאי האנליזה הפרוטאומית, אותרו מספר חלבונים ביומרקרים שביטויים שונה ברקמת השומן של פרות HWL לעומת LWL, מתוכם חלבונים שקשורים למטבוליזם השומן ולליפוליזה ברקמה, וכן לסטטוס החימצוני של רקמת השומן. אכן, האנליזה הביואינפורמטית תומכת בממצאים אלו ומצביעה על כך שהמסלולים העיקריים שהושפעו קשורים ליצירה של ROS ולפקטורים דלקתיים שונים אשר יכולים להיות קשורים לפירוק המסיבי של רקמת השומן בפרות HWL. על בסיס ממצאי מחקר זה ניתן להציע כי ישנם חלבונים ביומרקרים שונים ברקמת השומן של פרות סביב ההמלטה אשר מעידים על המצב הפיזיולוגי של הפרה בתקופת המעבר. יחד עם הממצאים ממחקר זה המראים כי שיעור איבוד משקל הגוף הינה תכונה פנימית בפרה וכי יש לכך השלכות פיזיולוגיות על מערכת הרבייה, אשר מתבטאת בשיעורי התעברות נמוכים יותר בפרות עם איבוד משקל גבוה (אמ"ר / HWL), מחקר זה ענה על מטרות המחקר והוסיף ידע על המעורבות של רקמת השומן בשינויים הפיזיולוגיים בתקופת המעבר, וכן הראינו לראשונה חלבונים ביומרקרים הקשורים לכך. עפ"י ממצאי המחקר ניתן להציע כי פרות שמאבדות מעט משקל לאחר ההמלטה הינן מצטיינות בהסתגלותן הפיזיולוגית לתחילת התחלובה, וישנם חלבונים שונים שמתבטאים ברקמת השומן התת עורית אשר מהווים ביומרקרים לתת אוכלוסיה זו בעדר החלב.

רשימת ספרות מצוטטת

- Bell A. W., and D. E. Bauman. 1997. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2:265-78.
- Boden, G., Duan, X., Homko, C., Molina, E. J. Song, W., Perez, O., Cheung, P., and Merali, S. 2008. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* 57:2438-2444.
- 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.
- Goff, J. P., and R. L. Horst. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80:1260-1268.

- Koltes, D. A., and D. M. Spurlock. 2011. Coordination of lipid droplet associated proteins during the transition period of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:1839–1848.
- Drackley, J. K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J. Dairy Sci.* 82:2259–2273.
- 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.
- McNamara, J. P. 2010. Integrating transcriptomic regulation into models of nutrient metabolism in agricultural animals. Page 27 in *Energy and Protein Metabolism and Nutrition*. EAAP Pub. No. 127. G. Matteo Cravetto, ed. Wageningen Academic Press, Wageningen, the Netherlands.
- McNamara, J. P. 2012. Ruminant Nutrition Symposium: a systems approach to integrating genetics, nutrition, and metabolic efficiency in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 90:1846–54.
- Onken, J., Hobgood, G., Shields, S. L., and J. P. McNamara. 2011. Use of a mechanistic, dynamic model of metabolism to investigate the biological basis for variation in genetics of feed conversion efficiency in lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94(E-Suppl. 1):509–510. (Abstr.)
- Peinado, J. R., Pardo, M., de la Rosa, O., and M. M. Malagón. 2012. Proteomic characterization of adipose tissue constituents, a necessary step for understanding adipose tissue complexity. *Proteomics.* 12:607–20.
- Sauerwein, H., E., Bendixen, L., Restelli, and Ceciliani, F. 2014. The adipose tissue in farm animals: a proteomic approach. *Curr. Protein Pept. Sci.* 15:146–55.
- Solomon, C. G. 1999. The epidemiology of polycystic ovary syndrome. Prevalence and associated disease risks. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 28:247–263.
- Sumner, J. M., and J. P. McNamara. 2007. Expression of lipolytic genes in the adipose tissue of pregnant and lactating Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 90:5237–5246.
- Weber, C., C., Hametner, A., Tuchscherer, B., Losand, E., Kanitz, W., Otten, S. P., Singh, R. M., Bruckmaier, F. Becker, W., Kanitz, and H. M. Hammon. 2013. Variation in fat mobilization during early lactation differently affects feed intake, body condition, and lipid and glucose metabolism in high-yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:165–80.
- Zachut, M., H., Honig, S., Striem, Y., Zick, S., Boura-Halfon, and U. Moallem. 2013. Periparturient dairy cows do not exhibit hepatic insulin resistance, yet adipose-specific insulin resistance occurs in cows prone to high weight loss. *J. Dairy Sci.* 96:5656–69.