

**משרד החקלאות - דו"ח מסכם לתוכניות מחקר
לקרן : המועצה לענף החלב**

קוד זיהוי	א. נושא המחקר (בעברית)
820 - 0273 - 10	גורמים פיזיולוגיים ותזונתיים המביאים לבקרת מסלולים מבוליים בעטין לסינתזה של חלבון, שומן ולקטוז.

ג. כללי			
מוסד מחקר של החוקר הראשי			
פקולטה לחקלאות			
סוג הדו"ח		תאריכים	
מסכם	תקופת המחקר עבודה מוגש הדו"ח	תאריך משלוח הדו"ח למקורות המימון	
		התחלה	
		סיום	
		שנה / חודש	שנה / חודש
		07 / 01	10 / 12

ב. צוות החוקרים		
חוקר ראשי	שם משפחה	שם פרטי
	מבג'יש	סמיר
חוקרים משניים		
1	שמאי	אבי
2		
3		
4		
5		
6		
7		

ד. מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח		
שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח בשקלים
	02-021	40
הנהלת ענף בקר		

<p>ה. תקציר שים לב - על התקציר להיכתב בעברית לפי סעיף ה' שבהנחיות לכתיבת דיווחים</p> <p>חלבון החלב קיבל את ההתייחסות החשובה ביותר מבין רכיבי החלב בגלל הסגולות התזונתיות שלו. מאידך, שומן החלב והלקטוז קיבלו חשיבותם משתנה בהתאם לביקוש בשוק הצרכים. לכן, אסטרטגיות תזונתיות המביאות לעליה בתכולת החלבון או כאלו שיכולות לאמוד ולשנות את תכולת השומן והלקטוז הנם מבורכות בתעשיית החלב. תכולות החלבון ולקטוז בחלב בעשור האחרון בארץ השתנתה במעט ואילו תכולת שומן נמצאת תחת שליטה טובה. תכולות הלקטוז והחלבון בחלב מוחלפות במהלך תקופת התחלובה מאידך שינויים תזונתיים וגם הורמונאליים (כמו העמסת אינסולין) מביאים לעליה בתנובה ותכולת החלבון בחלב. המסלולים המטבוליים להיסט בין לקטוז וחלבון לא נחקרו לעומק ואינם ברורים למדי על מנת לנצלן כאסטרטגיה לניתוב מסלולים מטבוליים בעטין לייצור והפרשה של תכולות רצויות. תוצאות הקדמיות, של השנה הראשונה, בעזרת איזוטופים יציבים (U-13C) הראו שסינתזה של חלבון, ולקטוז (גלקטוז) וחומצות אמינו לא הכרחיות ברקמת העטין עוברים דרך ראקציות אנאפלורוטיים (anaplerotic) וקטאפלוטיים (cataplerotic) של מעגל קריבס. כך שסינתזה של גלקטוז בלקטוז המופרש ברובה (<50%) בא ממקור של גליצרול וחומצות אמינו חיוניות ואילו סינתזה של חומצות אמינו בלתי חיוניות המופשרות בקזאין החלב מקורם כמעט באופן בלעדי ממקור של חומצות אמינו חיוניות. כמו כן, תוצאת אלו הראו כי ביטוי האנזים הן הציטוזולי (C) והן המיטוכונדריאלי (M) פוספ-אינול-פירובאט קרבוקסיקניאז (PEPCK), כלומר האנזים המווסת תהליכי האנאפלירוטיים ברקמת העטין של בקר, נמצאים בקורליה טובה בניתוב חומצות אמינו הכרחיות לבלתי הכרחיות וכך לסינתזה של חלבון החלב ברקמת העטין. כמו כן, נמצא שביטוי שני האיזואנזימים של PEPCK נבדל ברקמות של פרות יבשות, חולבות וחולבות בהריון. לכן, המסכנה מתוצאות אלו מצביעה שאיזואנזימים אלו מעורבים בתהליכי סינתזה של לקטוז, חלבון ושומן ברקמת העטין. לכן, בהצעה תלת שנתית זו אנו מניחים שסינתזה של חלבון, שומן ולקטוז מבוקרת על ידי השפעות אינסולין על האנזים PEPCK-c והאספקה היחסית של חומצות אמינו חיוניות ספציפיות, גליצרול וגלוקוז. בהצעה זו החלק הראשון בוצע על תרבויות רקמה מפרות. בשלב השני בוצע ניסוי על עזים חולבות אשר עורו בגלוקוז ואינסולין ונבדקה צריכת מזון, תנובות חלב, הרכב חלב, ריכוז אינסולין בפלזמה ויבדק הביטוי של האיזואנזימים PEPCK-M ברקמת העטין אשר יבוצע על רקמות שנלקחו בעזרת ביופסיה במהלך הניסוי.</p>
--

ו. אישורים

הנני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן

<p>תאריך (07) (07) (30)</p>	<p>רשות המחקר</p>	<p>אמרוסלות (רשות המחקר)</p>	<p>מנהל המכון (פקולטה)</p>	<p>פרופ' יאפ וון ריין מנהל המחלקה</p>	<p>זר סמיר מבג'יש חוקר ראשי</p>
---------------------------------	-----------------------	----------------------------------	--------------------------------	---	---

דו"ח מסכם לתוכנית 820-0237-10

המוגש לקרן: המועצה לענף החלב.

גורמים פיזיולוגיים ותזונתיים המביאים לבקרת מסלולים מטבוליים בעטין לסינתיזה של חלבון, שומן ולקטוז.

סמיר מבגיש- המחלקה לבעלי חיים, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית, ירושלים.

אבי שמאי – המכון לחקר בעלי חיים, מכון וולקני, בית דגן.

Sameer Mabjeesh, Dept Anim Sci, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem. Mabjeesh@agri.huji.ac.il

Avi Shamay, Institute of Animal Science, The Volcani Center.

23/12/2010

הממצאים בדו"ח זה ינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

* חתימת החוקר



רשימת פרסומים: איו

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר .

הערה : נא לציין הפנייה לדו " ח אם נכ ללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום .

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה
<p>ויסות סינתזת חלבון, לקטוז ושומן בבלוטת החלב נמצאת תחת בקרה של האיזואינזימים של PEPCK והשינוי בסינתזה והפרשת מרכיבי החלב תלויה בביטוי האנזימים הנ"ל ברקמה. ביטוי האיזופורמים הנ"ל מושפע מרמות אינסולין בדם, זמינות חומצות אמינו חיוניות ספציפיות, גליצרול וגלוקוז בדם המנותב לעטין. לכן, מטרות העבודה היתה לבדוק את השפעת רמות גבוהות אינסולין על הנ"ל בשתי מערכות: 1) תרביות רקמה ו 2) החיה השלמה</p>
עיקרי הניסויים והתוצאות
<p>ניסוי אחד בוצע במערכות של תרביות רקמה בנוכחות גלוקוז מסומן ב- ^{13}C בכל אטומי הפחמן שלו על מנת לבדוק את המסלולים המטבוליים של חומצות אמינו חיוניות, בלתי חיוניות ולקטוז ברקמת העטין ולתת אומדן כמותי של המסלולים השונים תחת השפעת אינסולין. המערך השני של ניסויים כלל ניסויים בעזים חולבות אשר השתמשו בטכניקת העמסת אינסולין תוך שמירה על רמות גלוקוז בדם קבועות. התוצאות של שני הסטים מצביעות על מעורבות של אינסולין על סינתזת והפרשת רכיבי החלב השונים. וכי אינסולין משפיע על ביטוי שני האיזואינזימים M/C-PRPCK.</p>
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו . האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח ?
<p>מטרות המחקר הושגו. לצערי המחקר לא מומן מעבר ל-3 שנים למרות הבקשה להמשיכו. המחקר יכול להיות יישומי בחלקו.</p>
בעיות שנתררו לפתרון ו / או שינויים (טכנולוגיים , שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבוד ; התייחסות המשך המחקר לגבי הן , האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר ?
לא רלוונטי למחקר זה
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטוט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי .
<p>מחקר זה הוליד שני מאמרים לפרסום בכתבי עת בינלאומיים. שני המאמרים בהכנה על שולחנו של מגיש הדוח.</p>
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות
✓ ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) לאחר פרסום המאמרים
חסוי - לא לפרסם
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי ? כן * - לא
לא רלוונטי לדוח זה

*יש לענות על שאלה זו רק בדוח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדוח שנה שניה במחקר

שאושר לשלוש שנים

מבוא:

חלבון החלב קיבל את ההתייחסות החשובה ביותר מבין רכיבי החלב בגלל הסגולות התזונתיות שלו. מאידך, שומן החלב והלקטוז חשיבותם משתנה בהתאם לביקוש בשוק הצרכנים. לכן, אסטרטגיות תזונתיות המביאות לעליה בתכולת החלבון או כאלו שיכולות לאמוד ולשנות את תכולת השומן והלקטוז הנם מבורכות בתעשיית החלב. תכולות החלבון ולקטוז בחלב בעשור האחרון בארץ השתנתה במעט ואילו תכולת שומן נמצאת תחת שליטה טובה. תכולות הלקטוז והחלבון בחלב מוחלפות (shift) ביניהם במהלך תקופת התחלובה מאידך שינויים תזונתיים וגם הורמונאליים (כמו העמסת אינסולין - insulin clump) מביאים לעליה בתנובה ותכולת החלבון בחלב. המסלולים המטבוליים להיסט בין לקטוז וחלבון לא נחקרו לעומק ואינם ברורים למדי על מנת לנצלן כאסטרטגיה לניתוב מסלולים מטבוליים בעטין לייצור והפרשה של תכולות רצויות.

בהצעה זו החלק הראשון בוצע על תרבויות רקמה מפרות ובשלב השני בוצע ניסוי על עזים חולבות אשר עורו באינסולין (העמסת אינסולין ועירוי בו זמנית של גלוקוז). הנוסף למדדים של ייצרנות העזים, ייבדק הביטוי של האנזימ PEPC-M/C ברקמת העטין אשר יבוצע על רקמות שנלקחו באמצעות ביופסיה במהלך הניסוי.

סקירת ספרות:

בספרות המקצועית יש שפע של מאמרים המתארים עליה קטנה אם בכלל בייצור החלב וחלבון החלב כתוצאה מטיפולים בתוספות חלבוניות או חומצות אמינו לפרות חלב הצורכות מנות העונות של הדרישות התזונתיות שלהן (1). עובדה זו מדגישה שהידע בנושא איננו מושלם על השפעת שינויים תזונתיים וניתוב נוטריינטים לכיוון סינתזה של החלב וחלבוני החלב. מאידך, עירוי של חומצות אמינו לפרות הצורכות מנות החסרות בחלבון ליצור חלב וחלבון החלב במתנו, מביא לעליה בייצור (2,3). יחד עם זאת, פרות הצורכות מנות חסרות חלבון ומקבלות תוספת חלבון או חומצות אמינו, רק 35% (תחום הנע בין 10-95%) מתוספת חומצות האמינו בדם העורקי (לאחר המעבר בכבד) מנותבות לכיוון העטין ומנצלות לסינתזה של חלבון החלב (3,4) כאשר הדרישה לקליטת חומצות אמינו על ידי העטין ממשיכה לעלות (5). לכן, במצב כזה ניתן להניח שחומצות אמינו מנותבות לכיוון העור, שרירים, כליות או רקמות שומן אשר עוברות תהליכי קטבוליזם או אגירה, או תהליכים קטבוליים מתרחשים ברקמת העטין. מצד שני מצב כזה יכול לקרות במצבים של חוסר התאמה בין הדרישות האמיתיות של חומצות אמינו חיוניות בעטין, הגבלה באנרגיה, חוסר איזון הורמונאלי אנבולי בעטין או מגבלות גנטיות של הפרה.

הבסיס להנחת מחקר זה מסתכם בשלוש עובדות כאשר הראשונה מראה שקליטה נטו של חומצות אמינו בעטיני פרות, כבשים ועזים של Arg, Lys, Leu, Thr, Val, Ileu ו-Arg גדולה מזו לדרישות סינתזה חלבוני החלב ואילו חומצות אמינו Glu, Gln, Ser ו-Prl נקלטות בחוסר (40-100%) יחסי מהדרישות (טבלה מס' 1). לכן, קבוצה זו של חומצות אמינו לא הכרחיות חייבת להיות מסונתזת בעטין de novo.

Table 1. Ratio of net uptake to milk output (U:O) of selected AA in mid-lactation goats before (control) and during an i.v. infusion of Phenylalanine (Bequette et al., 1999).

	Control		Phe Infusion		SED ^a	U:O = 1 ^a
	Blood	Plasma	Blood	Plasma		
His	0.59	0.65	0.81	0.73	0.224	<0.001
Thr	0.60	0.58	0.63	0.72	0.103	<0.001
Arg	1.83	2.07	2.52	2.79	0.685	<0.001
Pro	0.32	0.36	1.41	0.48	0.084	<0.001
Tyr	0.87	1.13	1.14	1.45	0.254	NS ^b
Val	1.38	1.42	1.67	1.74	0.181	<0.001
Met	0.76	0.87	0.99	1.06	0.146	0.11
Ile	1.75	1.75	1.99	2.04	0.226	<0.001
Leu	1.08	1.14	1.27	1.38	0.146	0.005
Phe	0.81	0.80	0.94	1.03	0.135	0.028
Lys	1.10	1.14	1.32	1.45	0.153	0.027

מעולם המחקרים בפרות חלב (6) ובני אדם (7,8) המראים שרק 50-70% מלקטוז החלב (גלוקוז + גלקטוז) מסונתז מגלוקוז שמקורו בפלזמה. בבני אדם שאירית הגלוקוז וגלקטוז מסונתזת בעטין de novo בתהליכי היקסוגניזה

מפרקורסורים כמו גליצרול וחומצות אמינו המספקות 3 עד 5 פחמנים (7). על מנת שמסלול זה יתקיים וייצור החלב יהיה מקסימאלי הדרישות הנ"ל חייבות לבוא בחשבון בבניית מנות לחולבות. כמו כן, מקור הפחמני הנ"ל לסנתזה של לקטוז חייב לבוא ממקור של חומצות אמינו חיוניות מכיוון שאלו הלא חיוניות אינם נקלטות בעטין בכמות מספקת וקטנה בהרבה מהדרישות לייצור.

עובדה שלישית מתבססת על עובדות ברמת האיבר. בכבד בקר (9) ובעטיני שרקנים (10) וחולדות (11) מבטאים האנזימים PEPCK-m ו- PEPCK-c. PEPCK-c מעודד ניתוב פרופיונאט וחומצות אמינו למעגל קריבס לכיוון גלוקוניוגניזה ואילו PEPCK-m מזרז קליטה (השקעה sequestration) של חומצות אמינו במטוכנדריון (במעגל קריבס). התהליך האחרון מתבסס על גליצרול ולקטאט לגלוקוניוגניזה. לאחרונה נתגלה באמצעות סריקה של בנק הגנים, שעטיני פרות יש בהם מידע גנטי לביטוי שני האיזו-אנזימים. נכון ליום לא בוצעו מחקרים שבדקו את מעורבות האיזו-אנזימים הנ"ל בעטין בתהליכי סנתזה של חלבון ולקטוז.

הורמונים כמו אינסולין, הורמון הגדילה, פרולקטין, קורטיזול, גלוקגון ו- IGF-1 מעורבים בתהליכי סנתזת החלב ומרכיביו והפרשתם. אינסולין והורמון הגדילה מעורבים בתהליכים מטבוליים של חומצות אמינו ואנרגיה. וכמו כן, משפיעים על ביטוי PEPCK בכבד ועל סוג הפרקורסור לוויסות תהליכי הגלוקוניוגניזה ההיפאטית על מנת לספק את הצרכים של העטין המייצר ומפריש לקטוז (12,13). הגן המבטא את PEPCK-c בכל המינים מושפע מהמזון והורמונים, ואילו PEPCK-m אינו מווסת ומושפע בצורה דרמטית כמו האיזואנזים c (12). כך שה- PEPCK-c בכבד מעוכב ע"י אינסולין (12) בדומה לכך גם המצב קורה בעטין חולדות והביטוי שלו קשור באופן הפוך לריכוז אינסולין בפלזמה (14). בשתי הרקמות בריכוזים גבוהים של אינסולין, נצפה לעליה במטבוליזם של חומצות אמינו דרך PEPCK-m במעגל קריבס. אם ההנחה שלנו נכונה, נצפה ש- PEPCK-m מעודד ניתוב חומצות אמינו הכרחיות לסנתזת חומצות אמינו בלתי הכרחיות וייצור קזאין והפרשתו. אזי שבעת קיום מצב של היפר-אנסולינמיה (עם שמירה על רמות גלוקוז בדם נורמליות; בפרות חלב 15,16,17 ובעזים 18,19) שבו יש

עליה בייצור חלבוני החלב והפרשתם, הדבר מצביע על מנגנון אפשרי המביא לדיכוי PEPCK-c לטובת PEPCK-m ולמסלולים מטבוליים של סינתזה של חומצות אמינו לא הכרחיות וקזאין.

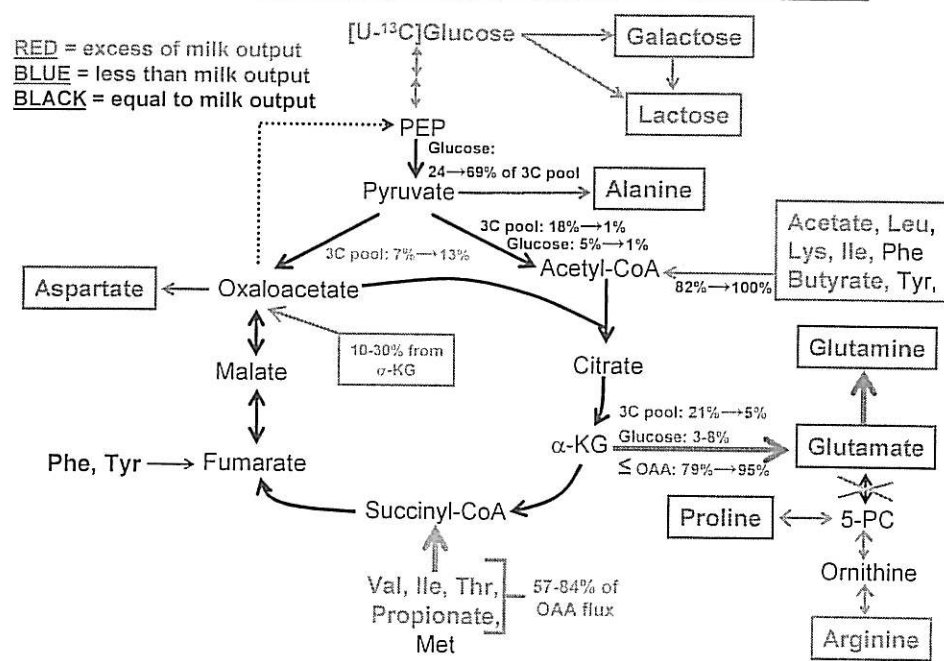
השערת המחקר:

אנו מניחים שויסות סינתזת חלבון, לקטוז ושומן נמצאת תחת בקרה של האיזואניזמים של PEPCK והשינוי בסינתזה והפרשת מרכיבי החלב תלויה בביטוי האניזמים הנ"ל ברקמה. ביטוי האיזופורמים הנ"ל מושפע מרמות אינסולין בדם, זמינות חומצות אמינו חיוניות ספציפיות, גליצרול וגלוקוז בדם המנותב לעטין.

תוצאות השלב הראשון:

תוצאות הקדמיות בעזרת איזוטופים יציבים [U-13C] הראו שסינתזה של חלבון, ולקטוז (גלקטוז) וחומצות אמינו לא הכרחיות ברקמת העטין עוברים דרך ראקציות אנאלופלוטיות (anaplerotic) וקטאפלוטיות (cataplerotic) של מעגל קריבס (תרשים מס' 1). כך שסינתזה של גלקטוז בלקטוז המופרש ברובה (<50%) באה ממקור של גליצרול וחומצות אמינו חיוניות ואילו סינתזה של חומצות אמינו בלתי חיוניות המופשרות בקזאין החלב מקורם כמעט באופן בלעדי ממקור של חומצות אמינו חיוניות. כמו כן, תוצאת אלו הראו כי ביטוי האנזים הציטוזולי (C) והן המיטוכונדריאלי (M) פוספו-אינול-פירובאט קרבוקסיקנאז (PEPCK) כלומר האנזים המווסת של תהליכי האנאפלירוסיס, מבוטאים ברקמת העטין של בקר. הביטוי של שני האיזופורמים PEPCK-PEPCK-m-ic ($PEPCK-m > PEPCK-c$) נמצאים בקורלציה טובה בניתוב חומצות אמינו הכרחיות לבלתי הכרחיות וכך לסינתזה של חלבון החלב ברקמת העטין. כמו כן, נמצא שביטוי שני האיזואניזמים של PEPCK נבדל ברקמות של פרות יבשות, חולבות וחולבות בהריון. לכן, המסקנה מתוצאות אלו מצביעה שאיזואניזמים אלו מעורבים בתהליכי סינתזה של לקטוז, חלבון ושומן ברקמת העטין.

Mammary Metabolism of Glucose, Amino Acids & the Krebs Cycle



תרגום מס' 1. התרשים מתאר את תוצאות העשרת המטבוליטים השונים במערכת ניסוי תרביות רקמה אשר הועשרה בגלוקוז $U-C^{13}$. כמו כן, התרשים מתאר את יחס קליטה להפרשת חומצות אמינו בעטין בהתבסס על מחקרים בחייה השלמה.

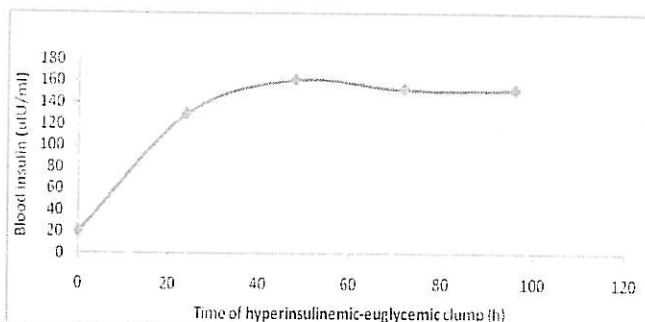
תוצאות השלב השני במחקר:

בשלב זה ארבע עזים חולבות בתחלובה ראשונה ושניה שימשו לניסויי העמסת אינסולין במתכונת cross over design על מנת לבדוק את השפעתו על ייצור חלב ורכיבי החלב והפרשתם. על מנת לאפשר הצלחת הניסוי הדבר מחייב שמירה של רמות גלוקוז בסיסיות בדם של העזים. לכן, במקביל לעירוי האינסולין עורה גלוקוז לווריד בכמויות משתנות בהתאם לצורך על מנת לשמור על הרמה הבזאלית. ניסויים מסוג, העמסת אינסולין עם שמירה על רמות גלוקוז נורמאליות, מביאים לעליה בהפרשת החלב ובסיננתזת חלבון החלב, ומאידיך לירידה בהפרשת שומן חלב. לכן, המודל ישמש לאמוד את השינוי ברמת הייצור והפרשת חלב ורכיבו ובביטוי הגנים של האיזואנזימים PEPCK ברקמת העטין של עיזים אשר תילקח באמצעות ביופסיה מהעזים הנמצאות בטיפול. השוואת העמסת אינסולין למצב הביקורת תאפשר למידת התהליכים ברמת החייה השלימה. בזמן כתיבה הדוח העבודה האנליטית לבדיקת ביטוי הגנים הנ"ל נמצאת בעיצומה ועדיין לא הושלמה. לכן, התוצאות לא מובאות בסיכום זה.

תוצאות, תיאור הניסוי ודיון בהעמסת אינסולין וגלוקוז לעיזים:

על מנת לאמוד את הצלחת הניסוי יש לבדוק ריכוזי הגלוקוז ואינסולין בפלזמה בעזים במהלך תקופת ההעמסה. העיזים הוחזקו בכלובים מטבוליים לאחר תקופה אדפטציה מתאימה (לפחות 10 ימים). העיזים צרכו את המנה שלהם ב-12 חלקים שווים כל שעתיים באמצעות אבוס אוטומטי. כל עז היה לה שתי תקופות ניסוי: האחת ללא עירוי להלן ביקורת ותקופה אחרת שבה בוצע עירוי ההעמסה להלן טיפול. בשתי תקופות הניסוי נאספו דגימות דם וחלב והעזים נחלבו פעמיים ביום (700 ו-1900). דגימות חלב נשלחו לאנליזה למעבדה המרכזית בקיסריה. בסוף כל תקופת ניסוי רקמת עטין נלקחה מהצד אחד של הבלוטה באמצעות ביופסיה לאחר הרדמה מלאה של העז. הניסוי תוכנן כך שהעירוי של אינסולין יהיה 1 מיקרוגרם של אינסולין ממקור של פרה לק"ג משקל גוף חיי לשעה במשך 4 ימים רצופים. העיזים צרכו את המנה באופן חופשי המורכבת מ-70% מזון מרוכז (תערובת חולבות מסחרית 16% חלבון) ובליל קיום (משואות יצחק 11% חלבון) על בסיס טרי. השאריות נשקלו בכל בוקר וכמות המזון תוקנה בהתאם לשאריות של 10% מצריכת המזון של היום הקודם. פינצילין G הוזרק לעיזים IM בכל תקופת העירוי במטרה למנוע הדבקות בגורמים מזהמים. קטטר הוכנס לוריד הצוואר לצורך העירוי לפחות יום אחד לפני תחילת העירוי. דגימות דם וורידי (מוריד הצוואר הקונטראטרלי או הרגל) נלקחו באופן תכוף על מנת לקבוע את רמות הגלוקוז בדם ולווסת את כמות התמיסה של הגלוקוז (תמיסה מסחרית של דקסטרוז 50%) המעורה על מנת לשמור של רמות בזליות של גלוקוז ($\pm 10\%$). לצורך ביצוע העירוי השתמשנו בשתי משאבות פרסטלטיות תוצרת Gilson, France שהאחת שימשה לעירוי הכמות הקבועה של אינסולין בקצב הרצוי ($1 \mu\text{g/kg.h}^{-1}$) והשנייה עזרה בה תמיסת דקסטרוז בקצב משתנה על מנת לשמור על רמות קבועות של גלוקוז בדם העיזים. שני צינורות העירוי חוברו במחבר ברז תלת כווני לפני הכניסה לווריד. בתחילת ההעמסה דגימות הדם היו בהפרשים של 15-30 דקות ולאחר התייצבות הדיגום נעשה כל שעה עד שעתיים.

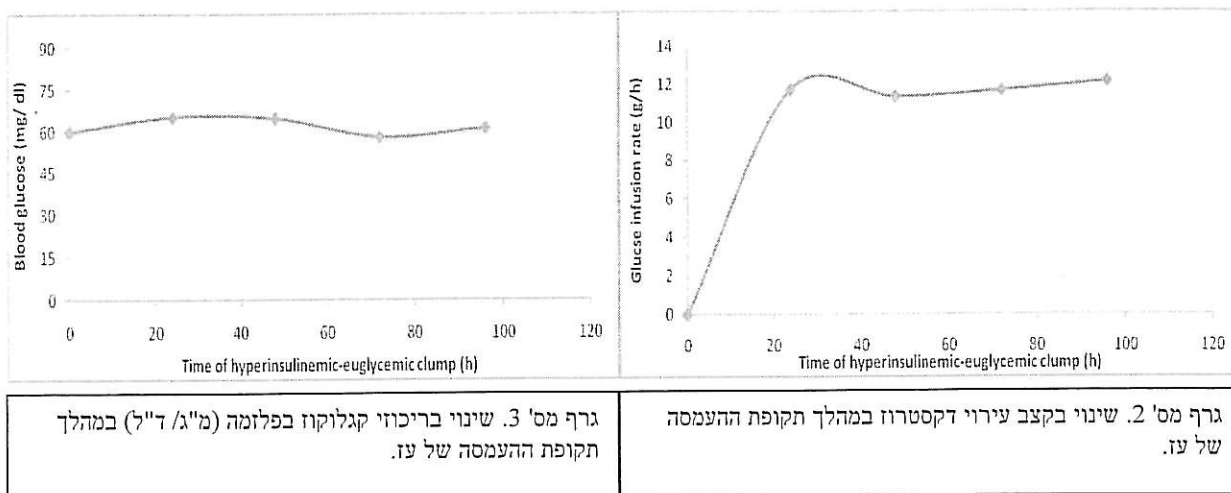
בגרף מס' 1, 2 ו-3 ניתן לראות התנהגות ריכוזי האינסולין בדם של עז (עז 133) והגלוקוז וקצת האינפוזיה של דקסטרוז. ניתן להסיק מהתוצאות הנ"ל שתקופת ההעמסה הצליחה לכל אורך הניסוי (4 ימים). בממוצע ההעמסה הצליחה לשמור של רמות אינסולין קבועה במשך ארבעת הימים שהייתה גבוהה



גרף מס' 1. שינוי בריכוזי אינסולין בפלזמה במהלך תקופת ההעמסה של עז. קצב עירוי אינסולין של 1 מיקרוגרם/ק"ג משקל גוף לשעה.

פי 3.3 בממוצע לכל העיזים יחסית לרמה הבסיסית שנמדדה לפני ביצוע ההעמסה (טבלה מס' 1).

גרפים 2 ו-3 מתארים את קצב האינפוזיה של דקסטרוז לווריד שבעזרתו נשמרו רמות גלוקוז זהות לאלו שנמדדו לפני ההעמסה. ריכוז הגלוקוז בפלזמה היה 63 מ"ג/ד"ל לכל אורך תקופת הניסוי (טבלה מס' 1) והיה דומה בין שני הטיפולים. ואילו עירוי הדקסטרוז בתקופת ההעמסה נע בין 5-20 גר' גלוקוז לשעה בהתאם לצרכים של העז בעת הניסוי.



טבלה מס' 1 מסכמת את תוצאות הניסוי כולל צריכות מזון, יצור חלב והרכבו. בתקופת העירוי הייתה ירידה משמעותית בצריכת המזון (ירידה ב-28% יחסית לתקופת הביקורת). הירידה בלטה במיוחד ביומיים האחרונים של הניסוי שבחלק מהעיונים הגיעה עד ל-50% מהצריכה הנורמאלית (תוצאות לא מוצגות). חישוב עירוי הגלוקוז הממוצע ליום היה 200 גר' ליום. בהנחה שרוב הלקטוז בחלב מגיע באופן מוחלט ממאגר הפלזמה יוצא איפה שהכמות שעורתה במהלך הניסוי סיפקה את ייצור והפרשת הלקטוז בחלב. מאידך, תנובות החלב בתקופת העירוי היו נמוכות באופן מובהק מאלו בתקופת הביקורת. תוצאה זו ניתן להסביר בהתבסס על הירידה בצריכת המזון ומחסור בחומרי גלם לייצור חלב ורכביו למשל חומצות אמינו חיוניות. ומצד שני תוצאה זו מחזקת את עצמאות הבלוטה לאינסולין בקליטת הגלוקוז וסינתזת והפרשת הלקטוז (17).

תכולת השומן בחלב היתה דומה בין שתי תקופות הניסוי. תוצאה זו מחזקת את טענתם של McGuire et al. (17) שהראו תוצאה דומה בפרות חלב שבעצם שוללת את התיאוריה מאחורי תופעת השומן הנמוך (low fat syndrome) שבעבר נחשבה לתלויה אינסולין, הנובעת בעקבות האבסה במנות עשירות פחמימות פריקות כרס. השלד הפחמני של סוכר בבלוטה החלב משמש לסינתזת שומנים de novo כשלד גלצרול בטריגליצרידים. לכן, ניתן לשער שחלק מהגלוקוז במאגר הפלזמה בתקופת העירוי נוצל למטרת סינתזת שומנים de novo בבלוטה דבר שאפשר ריכוז שומן חלב דומה בשתי תקופות הניסוי. מאידך, תנובות שומן (גר'/יום) היו נמוכות יותר בתקופת העמסת הגלוקוז בגלל הירידה בתנובות החלב. סיבה נוספת לשמירה על ריכוז שומן חלב גבוה הנה גירוי הנובע מרמות גבוהות של אינסולין לניצול אצטט ובטא-הידרוקסיבוטראר לסנתזת שומנים בבלוטה והפעלת ליפו פרוטאין ליפאז להגדלת קליטת חומצות שומן ממחזור הדם (17). כמו כן, אינסולין גבוהה גורם לדיכוי שינוע שומנים מרקמת השומן לניתובו לעטין (הקטנת ריכוז NEFA בפלזמה, תוצאה לא מוצגת). שלושת הגורמים הנ"ל כנראה הביא לתוצאה של שמירה של תכולת שומן דומה בתקופת ההעמסה של אינסולין.

טבלה מס' 1. השפעת עירוי אינסולין וגלוקוז על צריכת מזון, תנובות חלב והרכבו וריכוזי אינסולין וגלוקוז בדם של עזים. הממוצעים מוצגים כ-LSMeans \pm סטיית תקן.

מדד	ביקורת	טיפול	ערך של $P <$
צריכת מזון (ק"ג/יום)	2.75 \pm 0.09	1.97 \pm 0.1	0.0001
צריכת מזון (גר"/ק"ג משקל מטבולי)	147.4 \pm 4.7	109.6 \pm 5.1	0.0001
תנובת חלב (ק"ג/יום)	2.21 \pm 0.08	1.75 \pm 0.11	0.003
הרכב חלב (%)			
שומן	2.82 \pm 0.1	3.09 \pm 0.14	0.115
חלבון	3.27 \pm 0.05	3.71 \pm 0.07	0.0001
לקטוז	4.22 \pm 0.02	4.03 \pm 0.03	0.0001
תנובות רכיבי חלב (גר"/יום)			
שומן	60.8 \pm 2.48	51.5 \pm 3.51	0.039
חלבון	72.7 \pm 2.90	63.3 \pm 4.09	0.070
לקטוז	94.1 \pm 3.74	72.0 \pm 5.29	0.002
ריכוז גלוקוז בדם (מ"ג/ד"ל)	63.2 \pm 1.03	62.6 \pm 1.11	0.690
ריכוז אינסולין בדם (μ U/ml)	14.56 \pm 5.94	51.36 \pm 9.05	0.002

במהלך תקופת העמסת האינסולין תכולת (%) חלבון החלב היה גבוה יותר בתקופת הטיפול לעומת הביקורת (3.71 לעומת 3.27, בהתאמה). העליה בריכוז חלבון החלב יכולה להיות תוצאה ישירה של רמות אינסולין גבוהות בפלזמה שגרמו להגדלת קליטת וניתוב של חומצות אמינו לכיוון העטין. ומצד שני, השפעת ישירה או בלתי ישירה (למשל דרך ציר IGF-1) של אינסולין על רקמות פריפריות (18,19). הירידה בהפשרת חלבון החלב היומית (גר"/יום) נבעה מהירידה הכללית של תנובות החלב שכנראה היתה מושפעת מחוסר מזמינות נוטריינטים כתוצאה מהירידה הדרמטית בצריכת המזון. ברמת התיאורית ייצור החלב היומי לא היה אמור לרדת בגלל ההשערה שרקמות פריפריות יכלו להשתמש בגלוקוז העודף במחזור הדם לצרכי חמצון (קיום) ולאפשר ניתוב גדול יותר של חומצות אמינו לעטין, אך כנראה בפועל דבר זה לא התקיים בגלל מחסור רציני מהמזון.

סיכום והמשך עבודה:

ניתן לסכם שמטרות הניסוי שהוצגו במחקר זה הושגו. הוכחנו וחזקנו מסקנות של אחרים שבעזים חולבות השפעת העמסת אינסולין עם שמירה על רמות גלוקוז קבועות גורמות לעליה בסינתזה של חלבון החלב ועליה בקליטת חומצות אמינו. אינסולין גבוה איננו אחראי על סינדרום השומן הנמוך בפרות חלב. בימים אלו אנו מבצעים אנליזה של ביטוי האנזימים PEPCK-M/C בעטין על מנת להשלים את מטרות המחקר. כמוכן, מבוצעים אנליזות לפרופיל השומנים בחלב דבר שיחזק את המסקנות שלנו לגבי השפעת אינסולין על סינתזת חומצות שומן בחלב.

References

1. Bequette, B. J., F.R.C. Backwell, & L. A. Crompton. (1998) Current concepts of amino acid and protein metabolism in the mammary gland of the lactating ruminant. *J. Dairy Sci.* 81:2540–2559.
2. Metcalf, J.A., Crompton, L.A., Wray-Cahen, D., Lomax, M.A., Sutton, J.D., Beever, D.E., Bequette, B.J., Backwell, F.R.C., MacRae, J.C. & Lobley, G.E. (1996) Responses in milk constituents to intravascular administration of two mixtures of amino acids to dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79:1425-1429.
3. Reynolds, C., Crompton, L., Firth, K., Beever, D., Sutton, J., Lomax, M., Wray-Cahen, D., Metcalf, J., Chettle, E., Bequette, B., Backwell, C., Lobley, G. & MacRae, J.C. (1995) Splanchnic and milk protein responses to mesenteric vein infusion of 3 mixtures of amino acids in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 73 (Suppl. 1):274.
4. Berthiaume, R., Dubreuil, P., Stevenson, M., McBride, B.W. & Lapierre, H. (2001) Intestinal disappearance and mesenteric and portal appearance of amino acids in dairy cows fed ruminally protected methionine. *Journal of Dairy Science* 84, 194-203.
5. Guinard, J., H. Rulquin, & R. Verite. (1994) Effect of graded levels of duodenal infusions of casein on mammary uptake in lactating cows. 1. Major nutrients. *J. Dairy Sci.* 77:2221–2231.
6. Bickerstaffe, R., E. F. Annison, & J. L. Linzell. (1974) The metabolism of glucose, acetate, lipids and amino acids in lactating dairy cows. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 82:71–85.
7. Sunehag, A., Tigas, S., & Haymond, M.W. (2003) Contribution of plasma galactose and glucose to milk lactose synthesis during galactose ingestion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:225-229.
8. Tigas, S., Sunehag, A., & Haymond, M.W. (2002) Metabolic adaptation to feeding and fasting during lactation in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 302–307.
9. Agca, C., R.B. Greenfield, J.R. Hartwell, & S.S. Donkin (2002) Cloning and characterization of bovine cytosolic and mitochondrial PEPCK during transition to lactation. *Physiol. Genomics* 11: 53–63.
10. Jones, D.H., Raymer, D.M., & Schoelen, S.L. (1989) The activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase throughout the lactation cycle of the guinea pig mammary gland. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 192: 16–22.
11. Garcia-Ruiz, J.P., Lobato, M.F., Ros, M., & Moreno, F.J. (1983) Presence of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in rat mammary gland. *Enzyme* 30: 265-268.
12. Hanson, R.W., & Reshef, L. (1997) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 581-611.
13. Velez, J.C., & S. S. Donkin. (2004) Bovine somatotropin increases hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:1325–1335
14. Jones, D.H., Raymer, D.M., & Schoelen, S.L. (1989) The activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase throughout the lactation cycle of the guinea pig mammary gland. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 192: 16–22.
15. Griinari, J. M., M. A. McGuire, D. A. Dwyer, D. E. Bauman, D. M. Barbano, & W. A. House. (1997) The role of insulin in the regulation of milk protein synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2361–2371.

16. Mackle, T. R., D. A. Dwyer, K. L. Ingvarlsen, P. Y. Chouinard, J. M. Lynch, D. M. Barbano, & D. E. Bauman. (1999) Effects of insulin and amino acids on milk protein concentration and yield from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:1512–1524.
17. McGuire, M., J. M. Griinari, D. A. Dwyer, & D. E. Bauman (1995) The role of insulin in the regulation of mammary synthesis of fat and protein. *J. Dairy Sci.* 78:816–824.
18. Bequette, B.J., Kyle, C.E., Crompton, L.A. Buchan, V. & Hanigan, M.D. (2001) Insulin regulates mammary gland and hind-leg amino acid fluxes and blood flow in lactating goats. *J. Dairy Sci.* 84:241-255.
19. Bequette, B.J., Kyle, C.E., Crompton, L.A. Calder, A.G., & Hanigan, M.D. (2002) Protein metabolism in lactating goats subjected to the insulin clamp. *J. Dairy Sci.* 85: 1546-1555.