Funkcjonowanie wątroby i kontrola ketozy: jak wiele zależy od dodatku choliny?

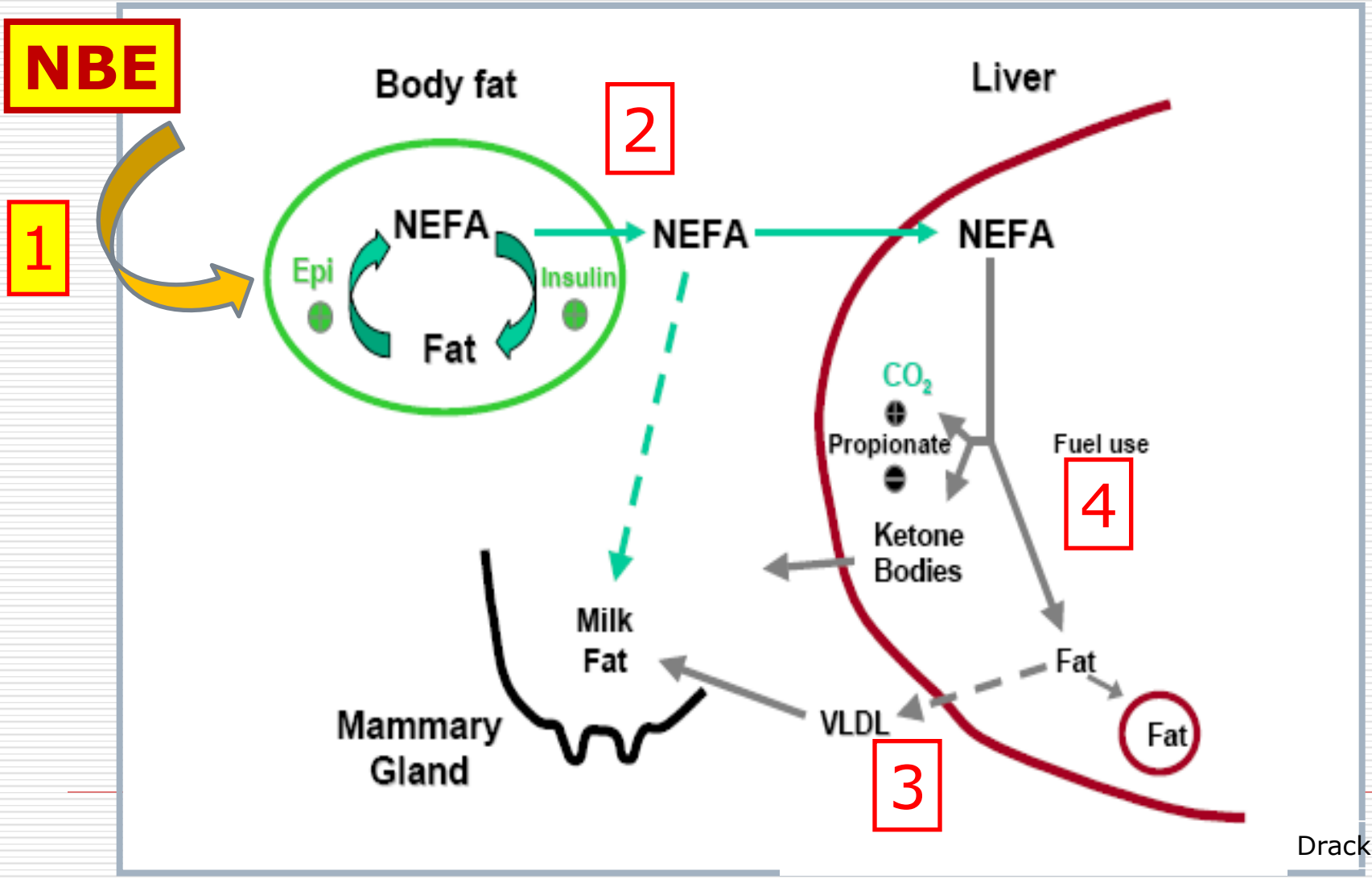
Sergio Calsamiglia
Dpt. Ciencia Animal y de los Alimentos
Universidad Autonoma de Barcelona
sergio.calsamiglia@uab.es

Wprowadzenie

- Cholina jest niezbędnym składnikiem odżywczym, który oprócz udziału w strukturze i aktywności komórek, pomaga w utrzymaniu prawidłowego metabolizmu tłuszczów w wątrobie.
- Zmniejsza negatywne skutki lipidozy wątroby u krów w okresie przejściowym.
- Brakuje go w większości dawek dla krów mlecznych.

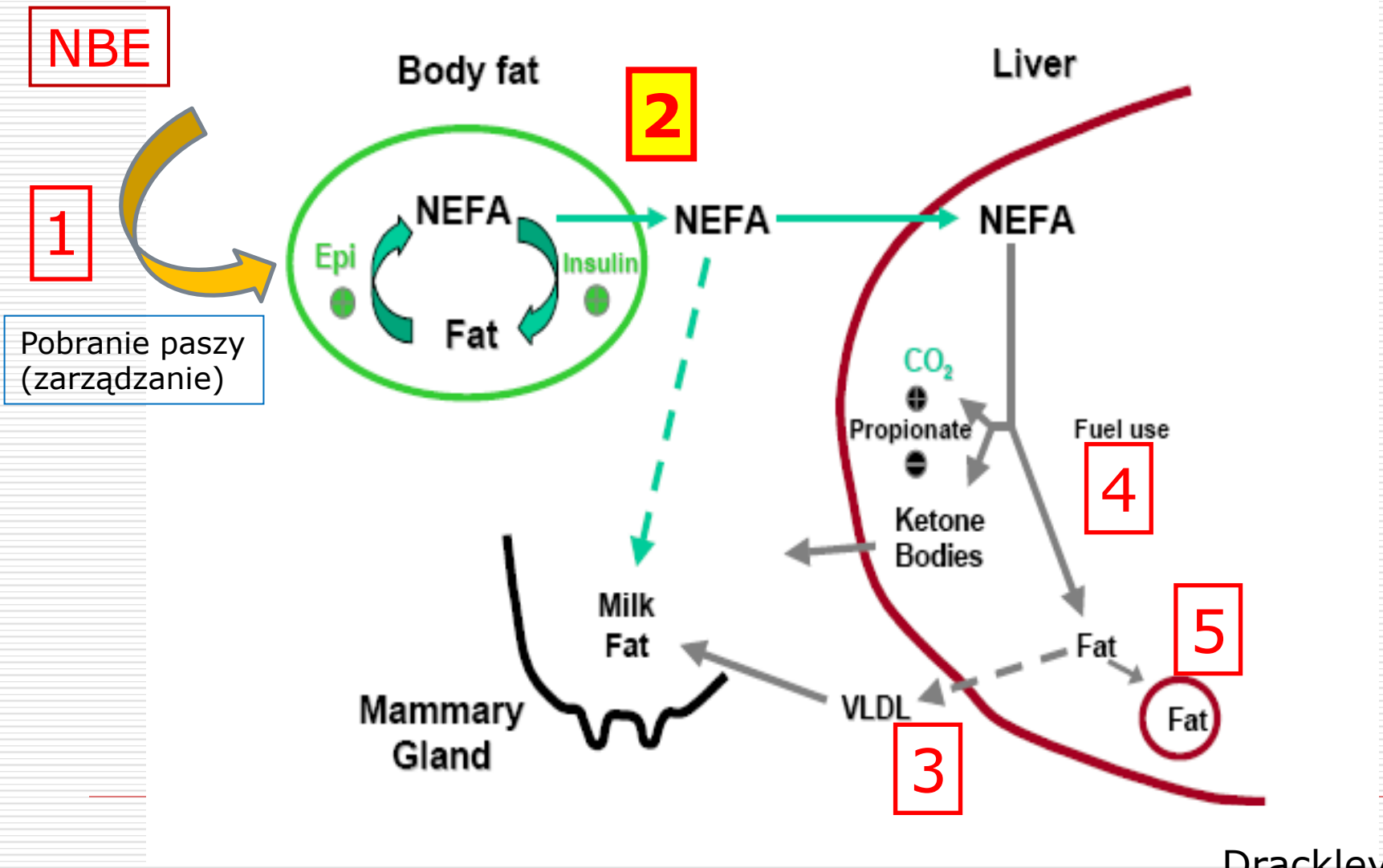
Shahsavari i in., 2016

Fizjologia negatywnego bilansu energii



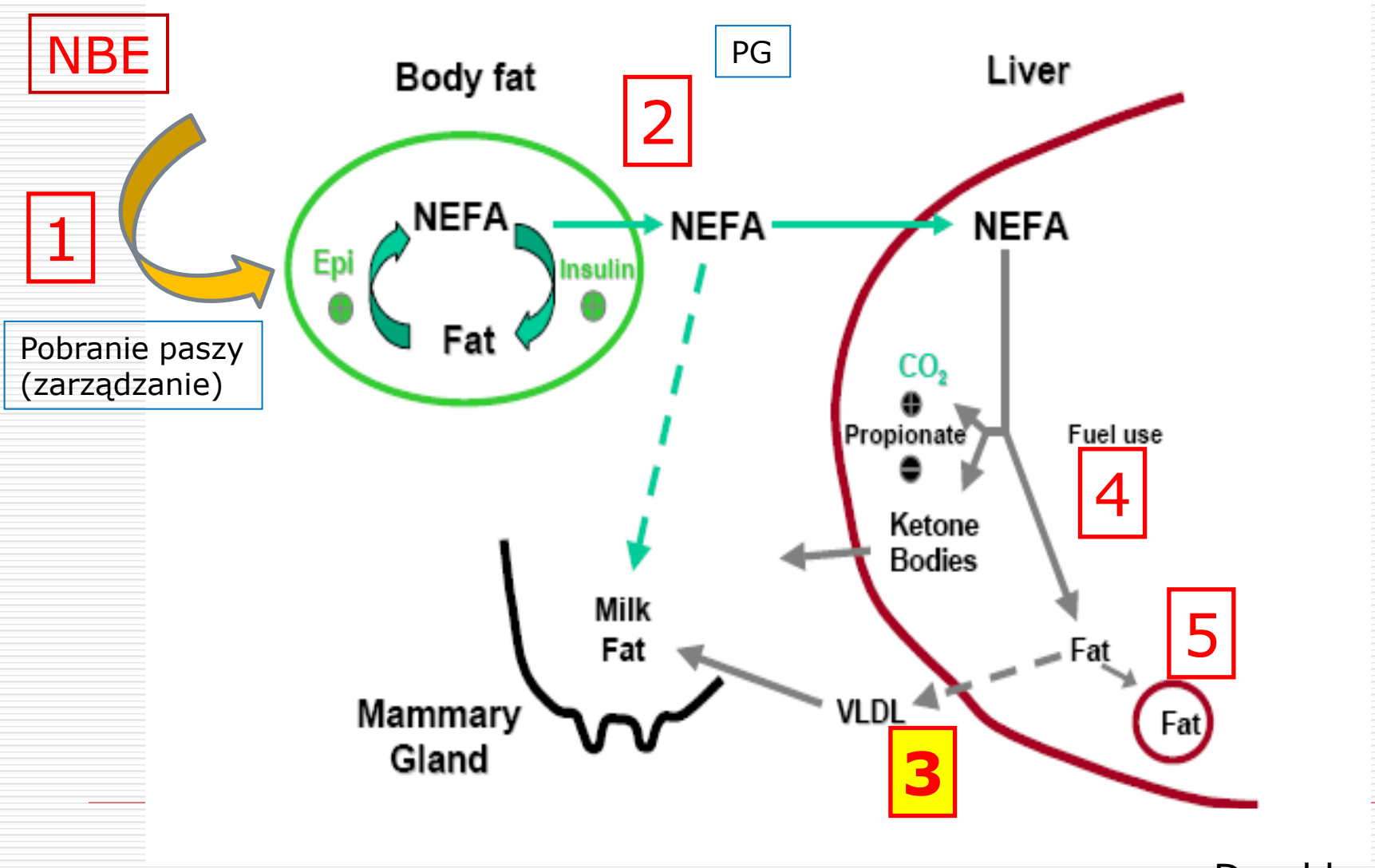
Drackley, 1999

Fizjologia negatywnego bilansu energii



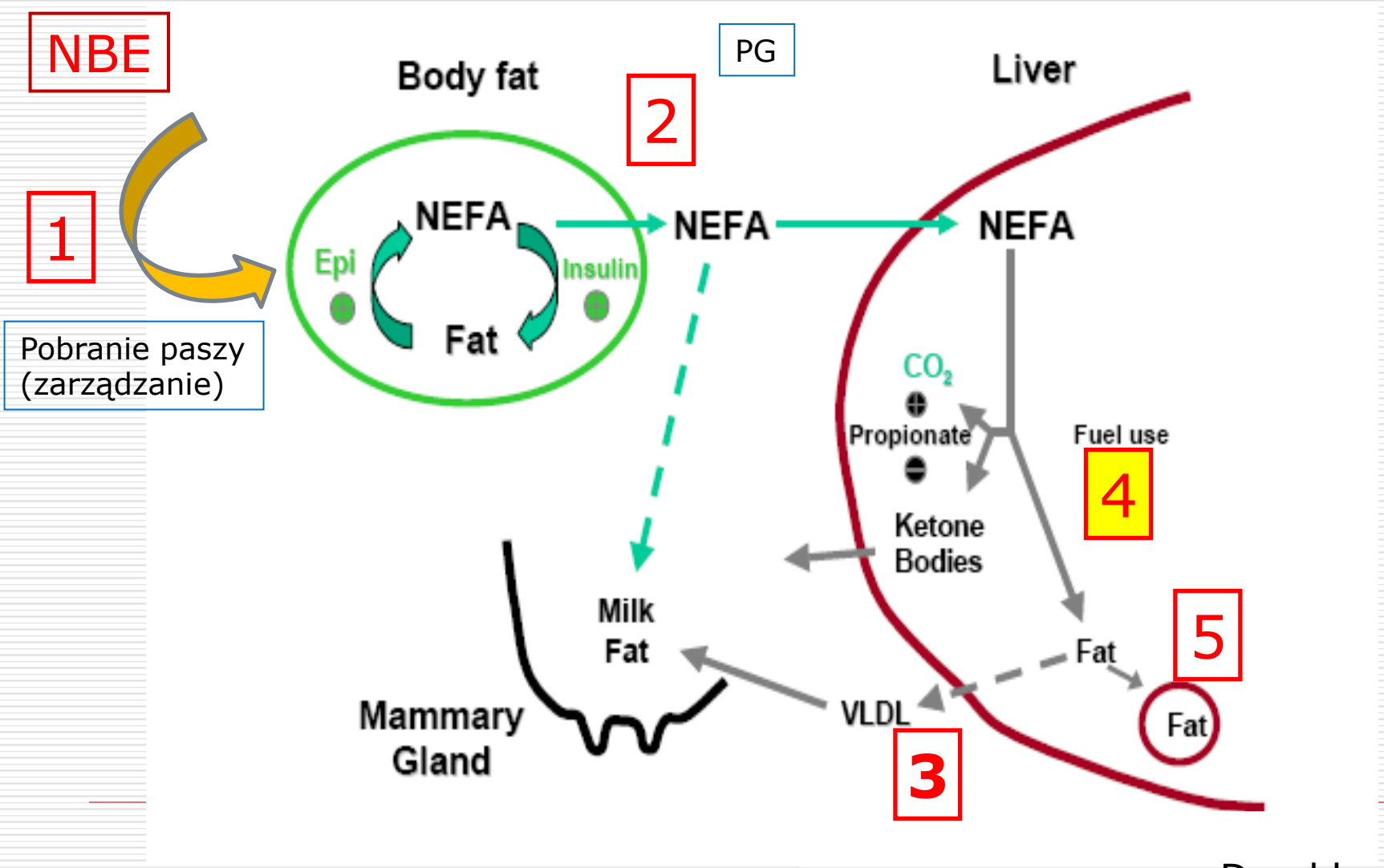
Drackley, 1999

Fizjologia negatywnego bilansu energii



Drackley, 1999

Fizjologia negatywnego bilansu energii



Drackley, 1999

Występowanie ketozy subklinicznej

S.No.	Autor	Kontynent	Ilość próbek	Częstotliwość występowania (%)
1	Dohoo and Martin, 1984	NA	2551	**12**
2	Al-Rawashdeh, 1999	Asia	1155	**25.6**
3	Sakha et al., 2007	Asia	90	**14.4**
4	Walsh et al., 2007	NA	1041	**46.3**
5	Voyvoda and Erdogan, 2010	A		**33.3**
6	Asl et al., 2011			**63.3**
7	McArt et al., 2012		171	**43.2**
8	Tehrani-Sharif et al., 2012	sia	190	**18.4**
9	Garro et al., 2014	SA	107	**10.3**
10	Ribeiro et al., 2013	NA	771	**35.4**
11	Samiei et al., 2013	ia	1002	**12.2**
12	Suthar et al., 2013	e	501	**6**
13	Berge and Vertenten, 2014			
14	Krempaský et al., 2014	Euro		**1**
15	Compton et al., 2014	Oceania		
16	Compton et al., 2015	Oceania		
17	Vanholder et al., 2015	Europe		
18	Sentürk et al., 2016	Asia		
19	Biswal et al., 2016	Asia		**9**
20	Santschi et al., 2016	NA	4	
21	Dubuc and Denis-Robichaud, 2017	NA	252	**3**
22	Vince et al., 2017	Europe	841	**15.8**
23	Tatone et al., 2017	NA	165,749	**21**
24	Daros et al., 2017	SA	658	**20.7**
25	Hejel et al., 2018	Europe	1667	**29.3**
26	Brunner et al., 2019	Europe	164	**39**
27	Vallejo-Timarán et al., 2020	SA	249	**46**

27 publikacji

Częstotliwość 9.6 to 63.3 %

Loiklung I in., 2022

Konsekwencje ketozy

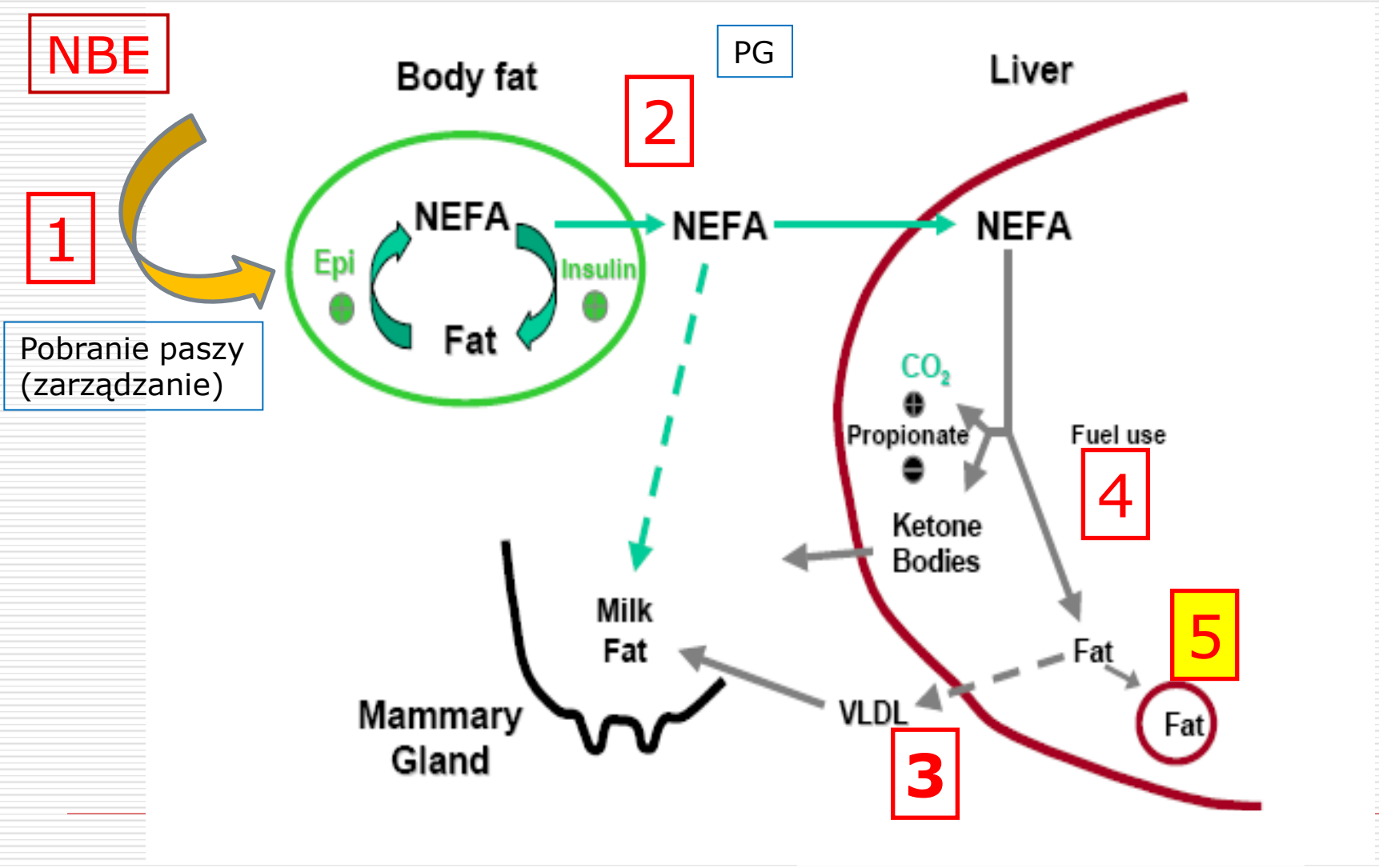
- ↓ 3 - 11% **produkcja mleka** (n=10 badań)
- ↓ 22 al 50% **płodność** (n=5 badań)
- ↑ ryzyko innych chorób
  - x6 Przemieszczenie trawieńca (n=11 badań)
  - x3,6 Kliniczna ketoza (n=8 badań)
  - x2,75 Metritis (n=4 badań)

DUŻE STRATY EKONOMICZNE

↓ 339€/przypadek

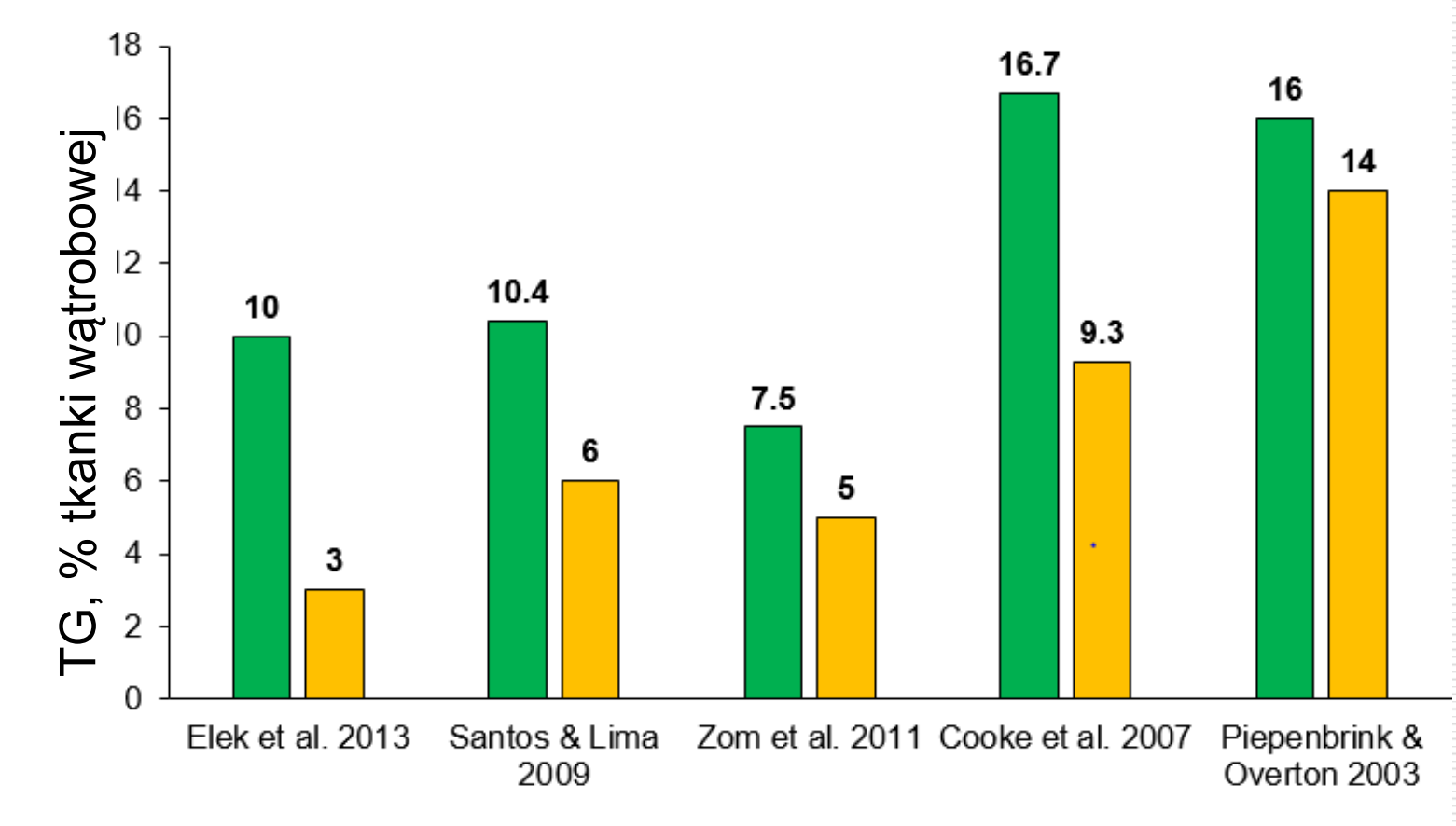
Marqués I in., 2019

Fizjologia negatywnego bilansu energii

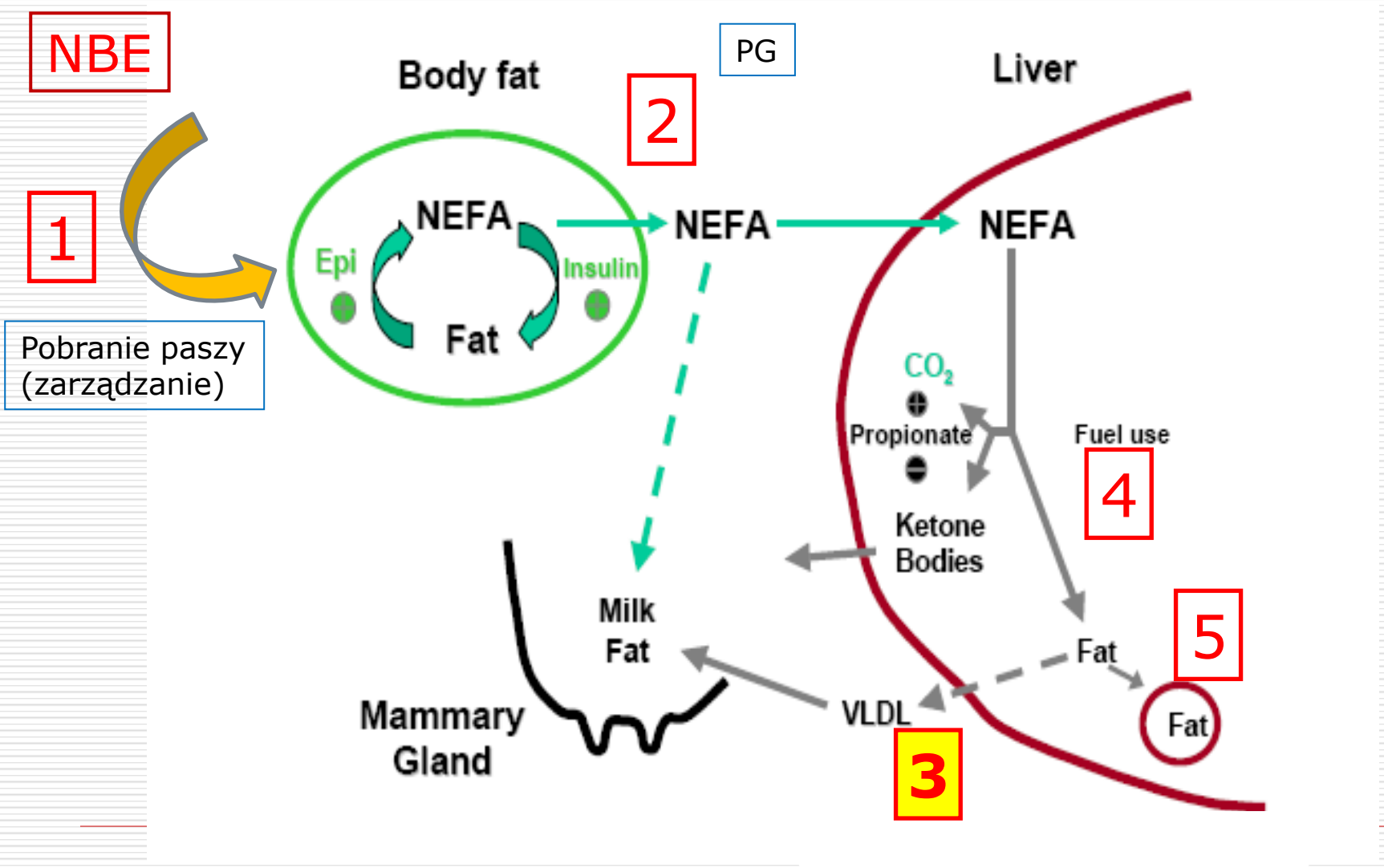


Drackley, 1999

Cholina zmniejsza obciążenie wątroby tłuszczem



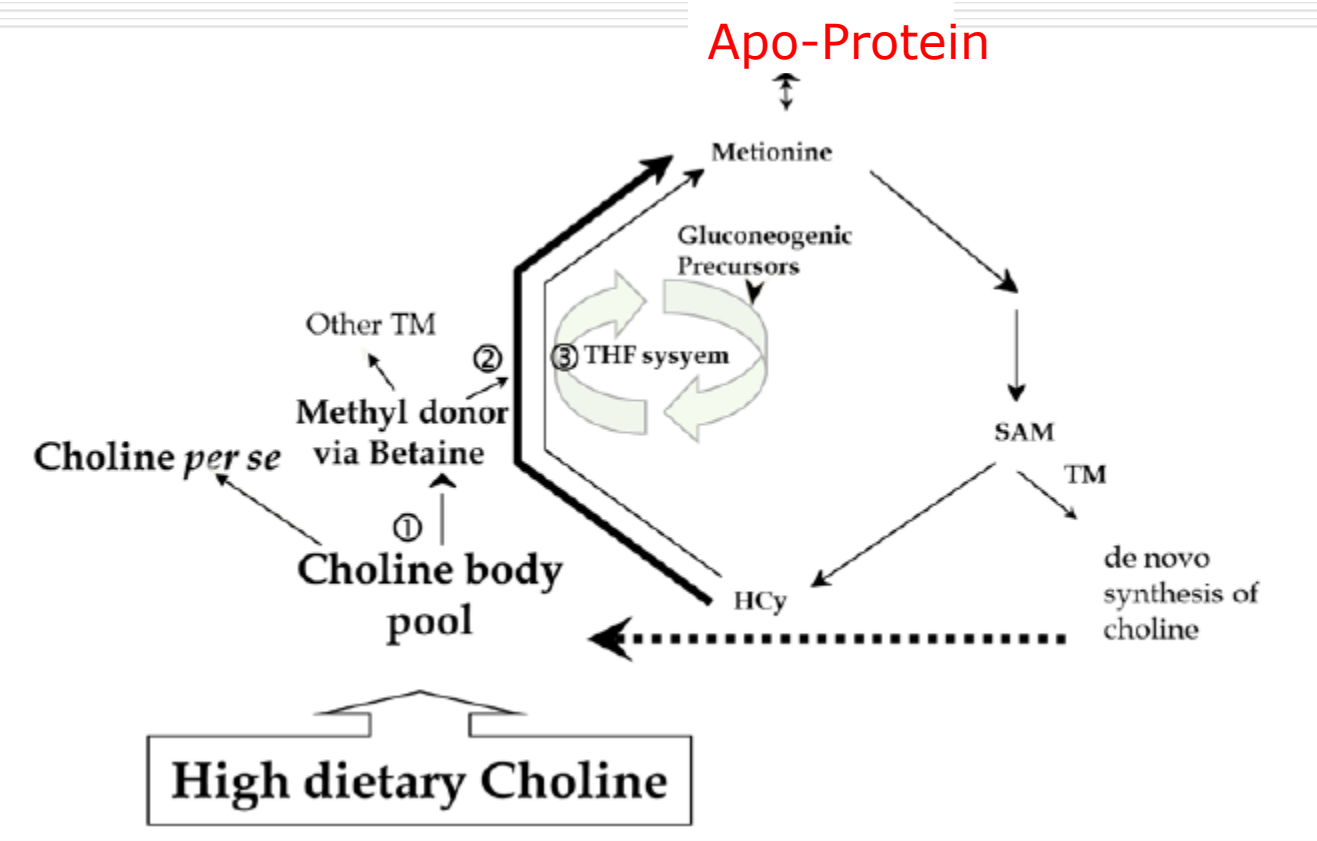
Fizjologia negatywnego bilansu energii



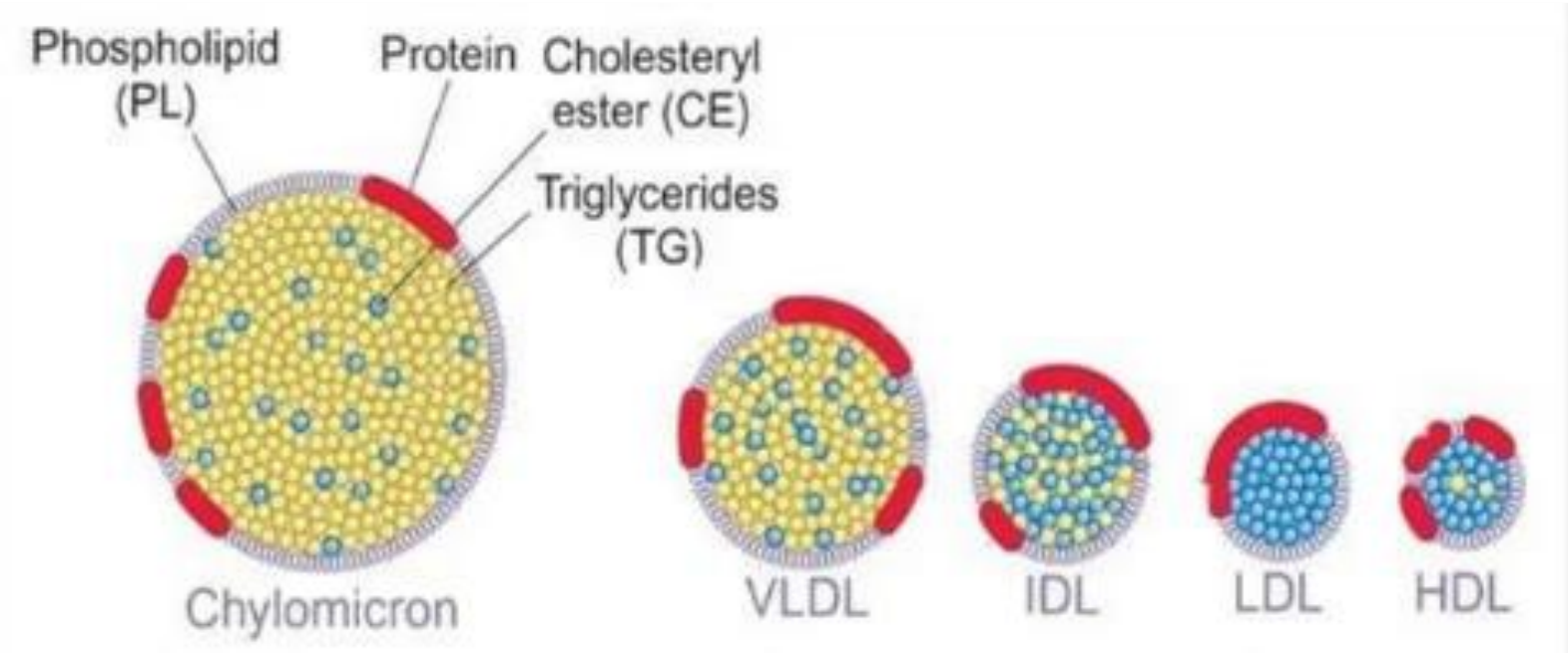
Drackley, 1999

Eksport wolnych kwasów tłuszczowych (NEFA) w postaci VLDL

- Donor grup metylowych: Cholina i Metionina



Lipoproteiny bardzo małej gęstości (VLDL)



Rodrigo-Fernández i in., 2018

Cholina poprawia wydajność

Parametr	Cholina (g/d)		Różnica	P-value
	0	12.9		
Mleko, kg/d	33.2	34.8	1.6	<0.001
ECM, kg/d	34.8	36.5	1.7	0.001
Tłuszcz mleka, kg/d	1.29	1.36	0.07	<0.001
Białko mleka, kg/d	1.06	1.11	0.05	<0.001
Laktoza, kg/d	1.65	1.66	0.01	0.003*
ECM / Pobranie SM	1.84	1.96	0.12	0.001

21 doświadczeń

66 grup żywieniowych

1313 krów wieloródek przed porodem

Dane badawcze od 1984 do 2018

Dawka RPC przed porodem średnio 22±6.0 g/dzień

Dawka RPC po porodzie średnio 57.5±42.2 g/dzień

Arshad i in., 2020

Podsumowanie 1

- Ujemny bilans energii jest istotnym elementem żywienia energetycznego po porodzie
- Niezdolność wątroby do radzenia sobie z nadmierną mobilizacją rezerw tłuszczowych może prowadzić do ketozy
- W gospodarstwach mlecznych ketoza jest bardzo rozpowszechniona i kosztowna
- Chociaż ketozie można zapobiegać, zmniejszając mobilizację tłuszczu, najbardziej efektywne jest wspomaganie wątroby w eksporcie NEFA
- Cholina odgrywa istotną rolę we wspomaganiu eksportu tłuszczu z wątroby do wymienia, poprawiając wydajność

Cholina potrzebuje ochrony

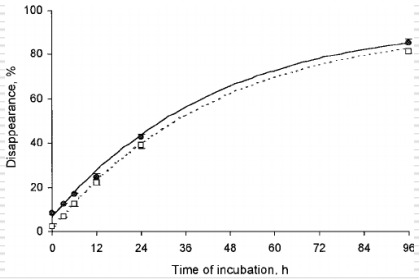
- Cholina jest w wysokim stopniu degradowana w żwaczu i musi być podawana w formie chronionej
- Duże zróżnicowanie wśród produktów

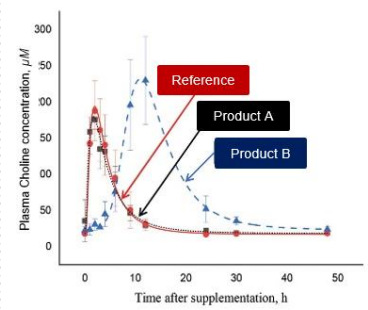
Zróżnicowanie wśród aminokwasów chronionych przed rozkładem w żwaczu (in situ - in vitro)

Biodostępność, %

Metody oceny biodostępności

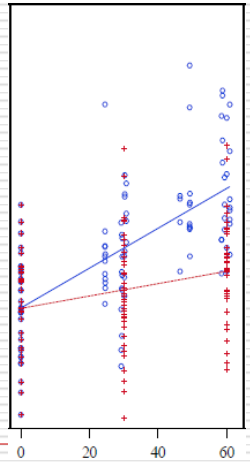
- In situ / in vitro (woreczki nylonowe)





- Cholina w osoczu - pole powierzchni pod krzywą

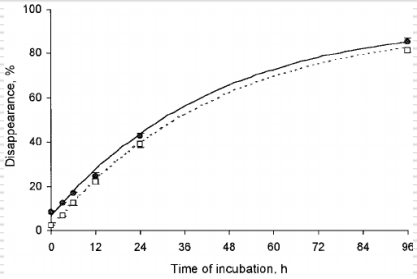
- Cholina w osoczu - technika dawka-odpowiedź



- Wydajność mleczna

Ocena metodami in situ / in vitro

- **Degradacja in situ w żwaczu i trawienie jelitowe in vitro**
- **Wolna cholina w osoczu** (Whitehouse i in., 2016)
- **Pole powierzchni pod krzywą (AUC)**
- **Wydajność mleczna**



Materiał i metody

- **Produkty**
  - Produkt A
  - Produkt B
  - *Produkt C

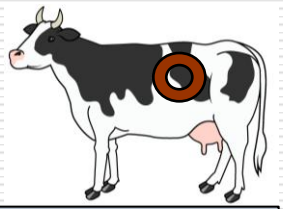
CholiGEM™, Kemin Animal Nutrition and Health

Materiał i metody

- **Procedura in situ (żwacz)**
  - Przetokowane krowy mleczne
  - 2.02 g/woreczek (2 powtórzenia)
  - Inkubacja przez 0-2-4-8-16-24-48 godziny
  - Dwa okresy

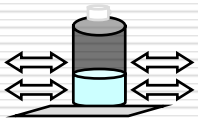
Strawność jelitowa

- 3-etapowe trawienie jelitowe (Calsamiglia i Stern, 1995; Gargallo I in., 2006).



12 h
Inkubacja
w żwaczu

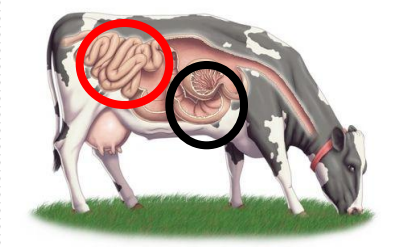
Wypłukać + Zamrozić



0.1 N HCl + 1 g/L pepsyna
(39ºC, pH 1.9, 1 h)

Wypłukać

0.5 M KH2PO4 + 50 ppm tymol + 3 g/L pankreatyna
(39ºC, pH 7.75, 24 h)



Wypłukać + Wysuszyć

Trawienie jelitowe

Obliczono względną biodostępność (RBV)
RBV = N niedegradowalny (%) * strawność (%)

Wyniki: Względna biodostępność

Product C

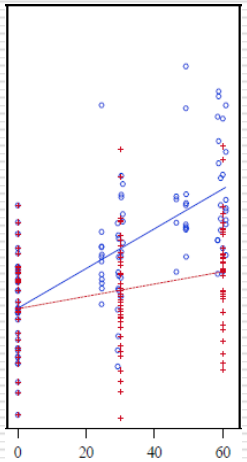
Product C

Podsumowanie 2

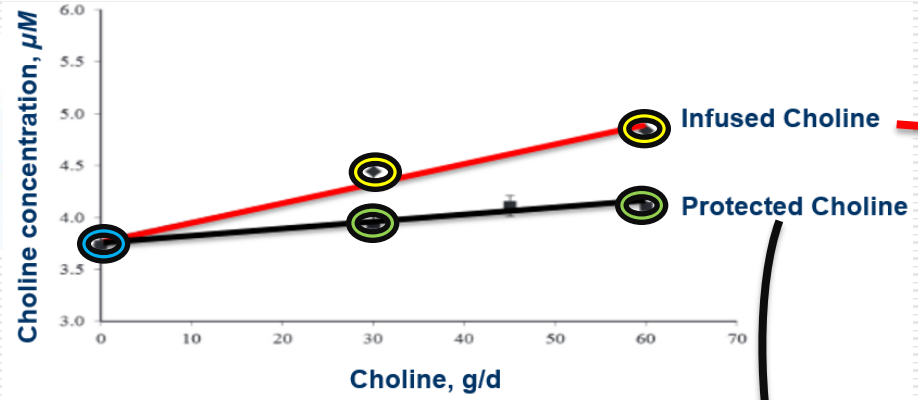
- Istnieją istotne różnice w degradacji w żwaczu i strawności jelitowej choliny pomiędzy różnymi produktami chronionymi w żwaczu, które mają istotny wpływ na ogólną biodostępność
- Ocena produktów chronionych w żwaczu wymaga oceny zarówno podatności na rozkład w żwaczu, jak i strawności jelitowej
- W porównaniu z Produkt C względna biodostępność Produktu A wynosi 11,2% (najniższa), a Produktu B 26,8% (średnia)

Badanie odpowiedzi na dawkę: Wolna cholina w osoczu

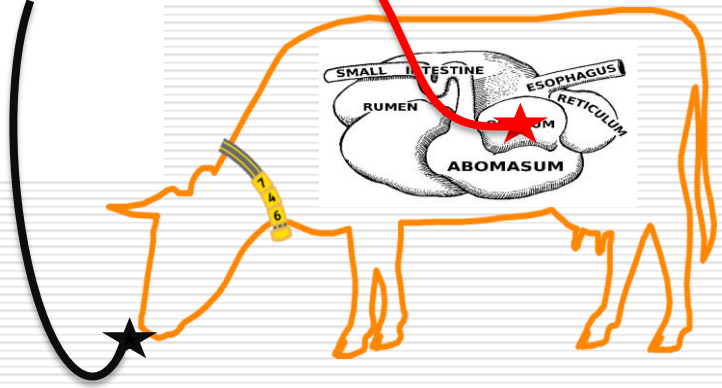
- Degradacja in situ w żwaczu i trawienie jelitowe in vitro
- **Badanie odpowiedzi na dawkę – zawartość wolnej choliny w osoczu krwi (Whitehouse i in., 2016)**
- Pole powierzchni pod krzywą (AUC)
- Wydajność mleczna



Wolna cholina w osoczu metoda dawka-odpowiedź



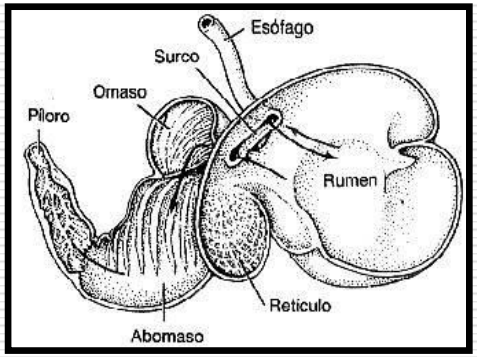
Stosunek nachyleń wskazuje na biodostępność



Whitehouse i in., 2017

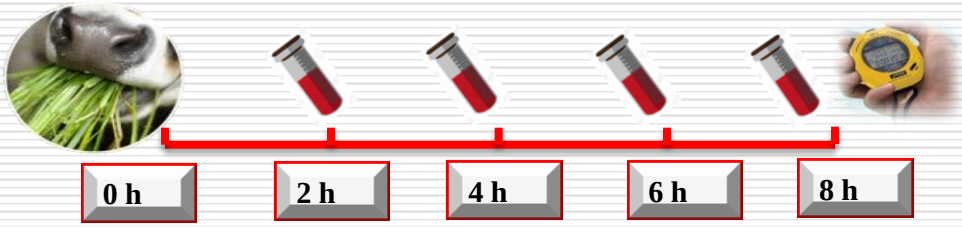
Narzędzie do infuzji do trawieńca (Gressley i in., 2006)

Narzędzie do infuzji do trawieńca (Gressley i in., 2006)



Próbki i analizy

3. Próbki krwi



- Wirowane przy 2000 × g przez 20 min w 4ºC w celu uzyskania osocza do oznaczania choliny
- Oznaczanie poziomu choliny w osoczu metodą HPLC

Dostępne dane

- Przeprowadzono trzy badania:
  - DeVeth i in., 2016
  - Potts, 2019
  - SNIBA-UAB, 2021
- Wspólne wnioski
  - Biodostępność określono na podstawie zawartości choliny i jej głównych metabolitów (betainy i P-choliny) jako markerów
  - Ogólna biodostepność jest niska
  - Metoda, będąca złotym standardem dla aminokwasów, nie sprawdza się w przypadku biodostępności choliny (niewłaściwe markery)

Biodostępność Cholina badana metodą AUC

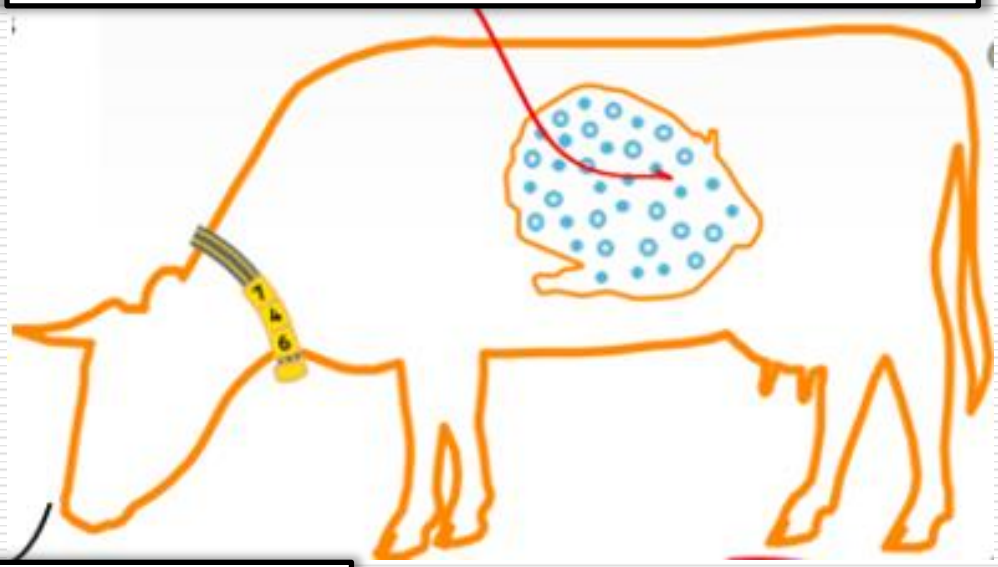
- Degradacja in situ w żwaczu i trawienie jelitowe in vitro
- Wolna cholina w osoczu (Whitehouse et al. 2016)
- **Pole powierzchni pod krzywą (AUC)**
- Wydajność mleczna

Materiał i Metody

- W badaniu wzięło udział 6 przetokowanych krów wieloródek w laktacji (603 kg MC; 215 dni laktacji; 32 kg/d mleka)
- Krowy losowo przydzielono do doświadczenia w układzie switchback (naprzemiennym) w celu oceny kinetyki w osoczu oraz względnej biodostępności dwóch form choliny chronionej (RPC)
- Każdy okres składał się z pojedyńczej dawki Produkt C i Produkt A, po którym następowało 3-dniowe pobieranie próbek

Metoda AUC – Pole pod krzywą

Wlej czysty chlorek choliny do jelita cienkiego jako referencję, aby sprawdzić stężenie choliny we krwi

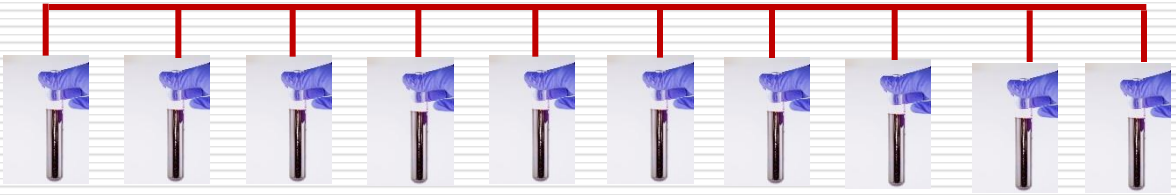


36 g/d

Podaj krowie kapsułkowany chlorek choliny i porównaj

Próbki i analizy

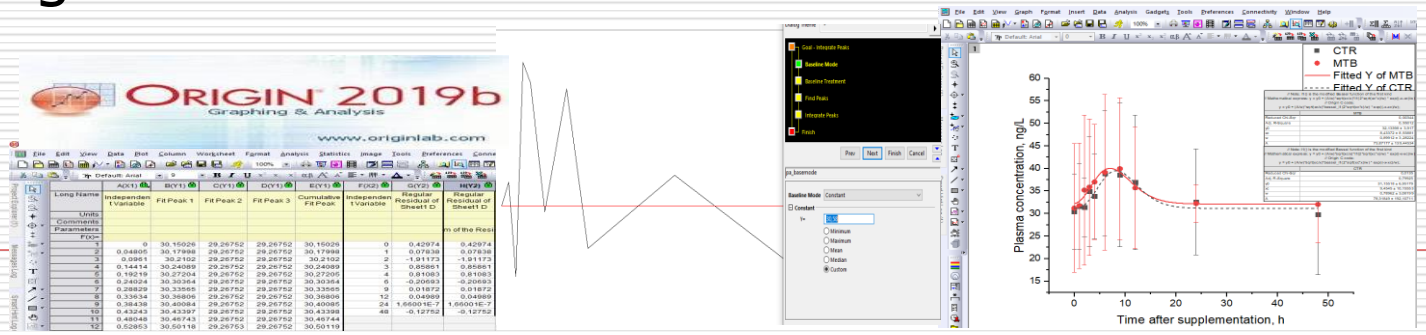
- Próbki krwi pobrano 0, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24, 30 i 48 h po podaniu czynnika doświadczalnego



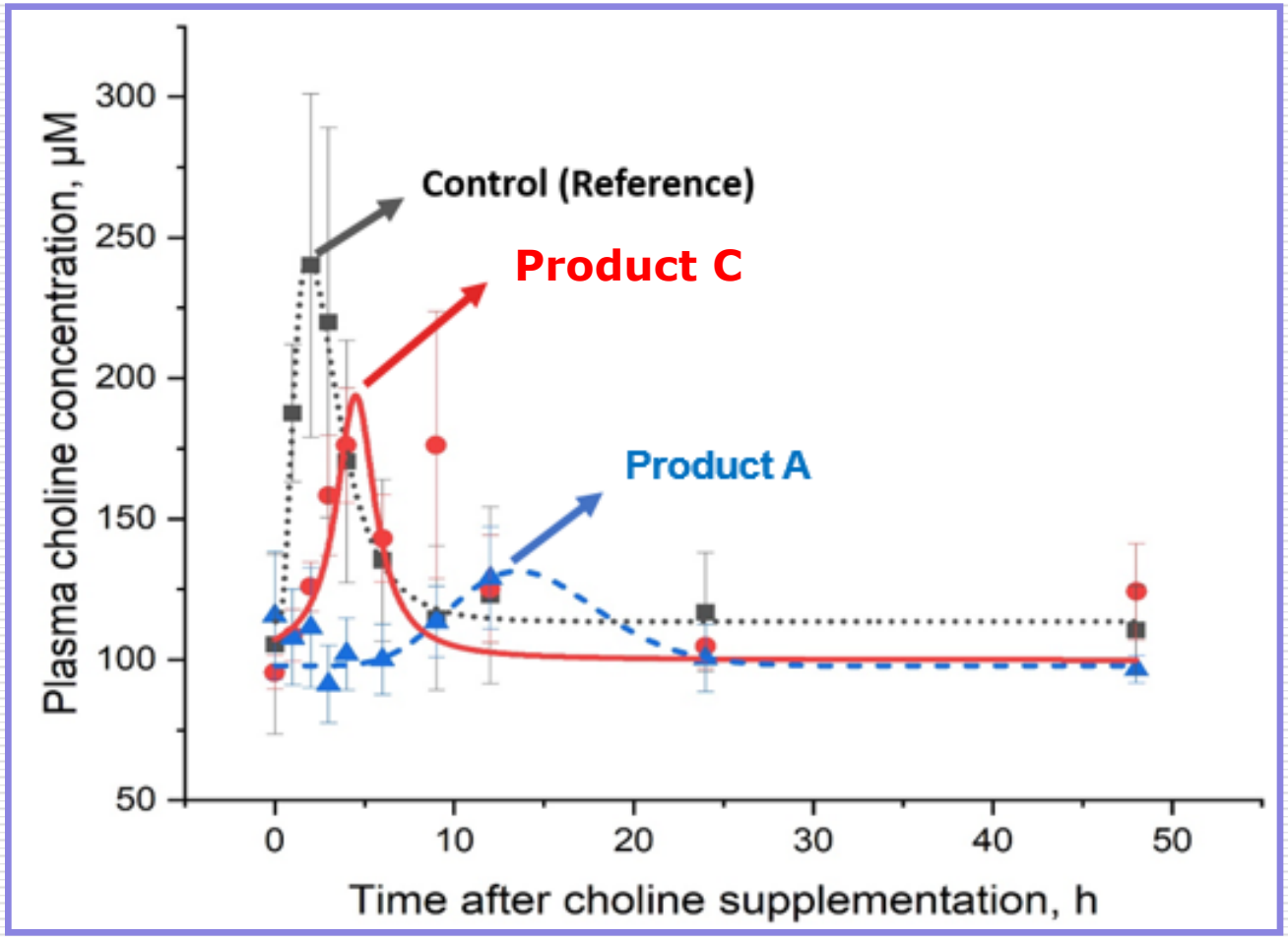
- Krew wirowano przy 2000 × g przez 20 min w 4 °C, aby uzyskać osocze
- Poziom choliny i betainy w osoczu analizowano przy użyciu HPLC

Próbki i analizy

- **Przetwarzanie i analiza danych**
  - Dane analizowano w oparciu o krzywe najlepszego dopasowania za pomocą oprogramowania OriginLab
  - Parametery kinetyczne: stężenie podstawowe (Cbasal), stężenie maksymalne (Cmax), czas przy stężeniu maksymalnym (Tmax) i pole pod krzywą (AUC)
  - Wyniki analizowano za pomocą modelu Glimmix programu SAS



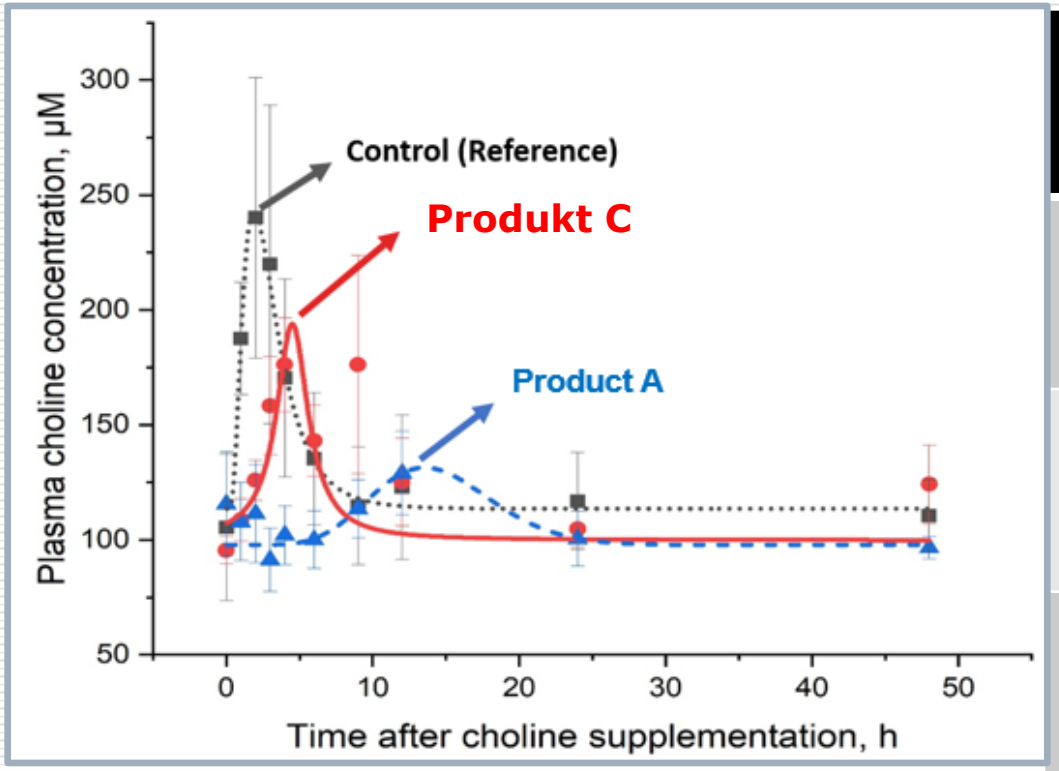
Wyniki


Plasma choline concentration, µM
300
250
200
150
100
50
0
10
20
30
40
50
Time after choline supplementation, h
Control (Reference)
Product C
Product A

Wyniki

Parametr	Produkt C	Produkt A	SEM	P-value
Cbasal, µM	96.8	90.7	0.57	0.09
Cmax, µM	227.1	155.2	10.11	0.22
Tmax, h	5.4	10.9	0.87	0.26
AUC, ^{5}AU	1279 [a]	503.3 [b]	33.10	> 0.05

Biodostępność



Źródło choliny	Biodostępność %
Infuzja czystej choliny	100
Produkt C	90
Produkt A	40

Wnioski końcowe

- Subkliniczna ketoza jest bardzo rozpowszechniona w stadach mlecznych
- Najlepszą strategią rozwiązania problemu i zwiększenia wydajności jest pomoc wątrobie w eksporcie NEFA
- Cholina odgrywa zasadniczą rolę we wspomaganiu eksportu NEFA jako VLDL do wymienia

Wnioski końcowe

- Cholina jest w wysokim stopniu degradowana w żwaczu i musi być chroniona przed tą degradacją, jednocześnie będąc strawną w jelicie cienkim
- Istnieją duże różnice między produktami handlowymi pod względem biodostępności: ocena degradacji w żwaczu i trawienia w jelitach jest niezbędna. Metoda AUC zapewnia rzetelną i obiektywną wartość prawdziwej względnej biodostępności choliny chronionej
- Suplementacja krów mlecznych choliną dobrze chronioną w żwaczu skutkuje odpowiednimi efektami produkcyjnymi (n=36; 2 kg/d)