

## דו"ח מדעי מסכם לתכנית מחקר 20-0590-362

המחקר מומן על ידי קרן המחקר של מועצת החלב

אורך טלומרים בפרות חלב ובעגלי פיתום מגזע הולשטיין: סיבה או מסובב

מגיש: ד"ר אריאל שבתאי

### מבוא

דאגה מרכזית בארץ ובעולם היא כיצד לשמור על הבריאות, הפוריות ורווחת בעלי החיים בתנאים של יצרנות גבוהה. בשונה מהטיפוח ליצרנות, הטיפוח לתכונות בריאותיות אינו פשוט בשל התורשתיות הנמוכה ובגלל שנתונים בריאותיים ונתוני התמודדות עם עקה אינם נרשמים באופן עקבי. פיתוח תכונות קלות למדידה, בעלות תורשתיות גבוהה, הקשורות באופן ישיר לבריאות וליכולת ההתמודדות עם מצבי עקה, יקלו על המאמצים לשפר את ניהול משק הבקר באמצעות טיפוח גנטי. בהתייחס לכך, אורך טלומרים הינה דוגמה לתכונה מבטיחה שכזאת. טלומרים הינם רצפי דנ"א חוזרנים הממוקמים בקצוות הכרומוזומים, מגנים עליהם מפני איחוי זה עם זה ומונעים איבוד של חומר גנטי במהלך הרפליקציה (Zakian, 1995; Bandaria et al., 2016). הזדקנות תאים ואפופטוזיס מתרחשים לאחר שהטלומרים מתקצרים מעבר לסף קריטי (He et al., 2014). קומפלקס הטלומראז מוסיף את חזרות הבסיסים TTAGGG לקצוות הטלומרים כדי להרחיק אותם מהסף הקריטי, אולם הוא פעיל ברמה נמוכה עד לא פעיל ברוב התאים הסומטים (Zakian, 1995; Lin and Yan, 2005), מה שמוביל להתקצרות הטלומרים עם הגיל (Boccardi and Paolisso, 2014).

טלומרים קצרים נמצאו באסוציאציה לסכרת, מחלות נשימה, כשל כלייתי ומחלות נוירודגנרטיביות (Bojesen, 2013; Boccardi and Paolisso, 2014), ומשמשים כסמן ביולוגי לסיכון גבוה למוות (Bojesen, 2013). גם קצב ההתקצרות של הטלומרים נמצא באסוציאציה לאריכות ימים (Bize et al., 2009; Boccardi and Paolisso, 2014), כפי שהדבר בא לידי ביטוי במחקרים על תאומים, אשר הראו כי לתאום עם הטלומרים הארוכים סיכויים גבוהים פי 3 לשרוד מאשר לתאום עם הטלומרים הקצרים (Bakaysa et al., 2007). המסקנה המתבקשת ממחקרי התאומים, היא כי לטלומרים קצרים יותר השפעה גורמית (causative effect) ולא רק אסוציאציה הנובעת מגנטיקה משותפת או אירועים בשלב מוקדם של החיים. האסוציאציה בין אורך טלומרים נתון לבין אירועים עתידיים מציעה כי התקצרות טלומרים הינה ה"סיבה" הגורמת להשפעות על השרידות והבריאות בהמשך החיים.

טלומרים קצרים מצויים באסוציאציה עם אורח חיים לא בריא (Bojesen, 2013; Boccardi and Paolisso, 2014), למשל: רמות גבוהות של עקה (Epel et al., 2004), הדרה נשית (Humphries et al., 2013), עייפות ותשישות תעסוקתית (Bendix et al., 2014; Ahola et al., 2012), עקה כרונית ודיכאון (Wikgren et al., 2012) ועקה במהלך ההיריון ולאחר הלידה (Entringer et al., 2011; Price et al., 2013). בנוסף, טלומרים קצרים נמצאו באסוציאציה לרמות תת-נורמליות של קורטיזול הנובעות מעקה כרונית ודיכאון (Wikgren et al., 2012).

2012). הקשר הזה בין אורך טלומרים לאירועים מוקדם בחיים מציעים כי אורך הטלומרים עשוי לשמש גם כ"מסובב" (סמן) לאירועי עקה בהסטוריית האינדיבידואל.

מטה-אנליזה של 6 קוהורטים גדולים ובלתי תלויים הראתה תורשתיות (עקבית בכל הקוהורטים) לאורך טלומרים של 0.70 (Broer et al., 2013). מיפוי גנוטיפים בקנ"מ רחב (GWAS) מציע כי השונות באורך הטלומרים הינו כמותי וכי ההשפעות של SNP בודד כלשהו הן קטנות (Prescott et al., 2011).

נכון להיום, העיסוק המחקרי באורך טלומרים זכה לתשומת לב מועטה יחסית בחיות משק. פטימים שגודלו בצפיפות גבוהה אופיינו בטלומרים קצרים באופן משמעותי (Beloor et al., 2010; Sohn et al., 2012).

תרנגולות מטילות בלול היו בעלות טלומרים ארוכים יותר משל מטילות שהוחזקו בכלובים (Sohn et al., 2011). בני בקר נגועים בוירוס ה-BLV היו בעלי טלומרים קצרים משמעותית בהשוואה לקבוצת הביקורת (Szcotka and Kuzmak, 2012). ממצאים מהשנים האחרונות הצביעו על אסוציאציה בין בריאות ואריכות חיים של פרות לבין אורך הטלומרים (Brown et al., 2012). בנוסף, Laubenthal וחבריו (2016) דיווחו על קיצור הטלומרים בתאי הדם וברקמת העטין של פרות מגזע הולשטיין, עם ההתקדמות בשלב התחלובה, ומצאו מתאם חיובי מובהק בין אורך הטלומרים ותנובת החלב.

אורך טלומרים משתנה בין רקמות. בפרות הולשטיין הטלומרים הארוכים ביותר נמצאו ברקמת השומן, בעוד ברקמת העטין הם היו הקצרים ביותר. בתאי הדם נמצאו טלומרים באורך ממוצע (Laubenthal et al., 2016).

מאחר ואורך הטלומרים בין הרקמות השונות נמצא במתאם מובהק, הסיקו החוקרים כי תאי דם לבנים יכולים לייצג את אורך הטלומרים גם ברקמות אחרות. Asghar וחבריו (2016) הדביקו ציפורים במלריה של עופות ותיעדו התקצרות טלומרים מקבילה בתאי דם, כבד, ריאות, טחול, לב ומוח. כך, תאי הדם הלבנים, שהם רקמה נגישה לדיגום, היא הרקמה שנבחרה ברוב המחקרים העוסקים באורך טלומרים, אולם, יש לקחת בחשבון כי היא מכילה מגוון תאים שהפרופורציה שלהם יכולה להשתנות בהתאם לסטטוס האימונולוגי של בעה"ח

(O'Callaghan and Fenech, 2011). אף על פי כן, מתאמים חיוביים מובהקים דווחו בין אורך הטלומרים בתאים הלבנים השונים ובין תאי הגזע של מערכת הדם (Cohen et al., 2013; Kimura et al., 2010). בהינתן מתאם חזק זה, כמו גם האסוציאציה החזקה, שנמצאה במספר מחקרים, בין אורך טלומרים מכלל תאי הדם הלבנים לבין הבריאות הפיסית והמנטלית, נראה כי לא צריך להעריך את אורך הטלומרים בקווים ספציפיים של תאי דם לבנים, אלא ניתן להשתמש בכלל אוכלוסיית התאים הלבנים.

נכון להיום, עמידות למחלות אינה חלק ממדיניות הטיפול הלאומית בארץ, בארה"ב ובמדינות נוספות. הערכת עמידות למחלות יכולה לספק הזדמנויות בעלות ערך לטיפול, אולם ההתקדמות הגנטית תהיה מוגבלת בגלל התורשתיות הנמוכה של תכונות אלה. יתרה מזאת, נתוני בריאות אינם מתועדים באופן עקבי (Zwald et al., 2004), ורבים מהאירועים הבריאותיים מתועדים רק ע"י הווטרינר (Emanuelson et al., 1988). אם ימצא כי גם בבקר התורשתיות לאורך הטלומרים היא גבוהה, וכי מתקיים מתאם חזק בין אורך טלומרים לאירועי בריאות, ניתן יהיה להשתמש בו כפרוקסי לעמידות למחלות. יתרה מכך, כיום לא קיימות תכונות המהוות אינדיקציה ישירה בבקר ליכולת התמודדות עם עקה; זיקה אפשרית בין מדד אורך הטלומרים לבריאות ועקה, תהפוך אותו מועמד חזק לשילוב באינדקס הטיפול.

### ההיפותזות העומדות בבסיס המחקר הנוכחי הן:

1. ניתן למדוד אורך טלומרים בבקר בצורה פשוטה ואמינה באמצעות qPCR.
2. קיימת אסוציאציה בין אורך הטלומרים של הפרה והעגלה/ה שלה בהמלטה: מדידה של אורך טלומרים בפרות ממליטות יכולה להוות אינדיקציה לאורך טלומרים של עגליהן בלידה, ולמדדים הורמונליים ותזונתיים במהלך החיים.
3. קיימת אסוציאציה בין אורך הטלומרים בעגלים במהלך החיים לבין מדדים הורמונליים ותזונתיים.

### בהתאם לכך, מטרתיו של המחקר הן:

1. לבסס שיטה למדידת אורך טלומרים בתאי דם של בקר באמצעות qPCR.
2. לבחון את הקשר בין אורך טלומרים ומדדים הורמונליים בפרות חלב ובין מדדים אלה בעגלים שלהן.
3. לבחון את הקשר בין אורך טלומרים, בעגל ובאם, ובין מדדים הורמונליים, תזונתיים ויצרניים בעגלי הולשטיין מהמלטה עד גמילה.
4. לבחון את הקשר בין אורך הטלומרים למדדים הורמונליים, תזונתיים ויצרניים בעגלי הולשטיין לפיטום, במהלך התקופה הקודמת לשיווק.
5. קביעת אסוציאציה וסיבתיות (causality) בין אורך טלומרים לבין בריאות, עקה ויצרנות בפרות ועגלי הולשטיין.

### מהלך העבודה

קביעת אורך הטלומרים נעשתה בתאי הדם. דם נדגם מכל פרות ועגלי הניסוי ביום ההמלטה. אורך הטלומרים נקבע ע"י qPCR, שיטה אשר דרשה כיוולים רבים, לאחר בחינתה במתאם עם "תקן הזהב" לקביעת אורך טלומרים, Southern blot.

לצורך קבלת מקטעי הטלומרים הרצויים, בוצעה ריאקציה qPCR. לאחר שבוצעה אנליזת southern blot של אורך הטלומרים של העגלים, נבחר עגל עם טלומר ארוך בתור דוגמא שתשמש להכנת עקום כוול.

עיבוד התוצאות נעשה באמצעות תוכנת step one plus (Rhenium). אחרי הרצת הפלטה מתקבלים ערכי ההגברה עבור הטלומר (T) ועבור הגן המנרמל (S) של כל דוגמא. ערכים נורמלו מול דוגמת הכוול לעיל. תחילה מתקבל עקום כוול עבור כל גן בנפרד ו-threshold ולאחר שאלו תקינים, בודקים ב-melt curve כי העקומה סטנדרטית. לאחר מכן, עבור כל דוגמא מתקבלים ערך T וערך S (טלומר וגן מנרמל, בהתאמה), מהקריאה של הפלטה בתחום הליניארי. הערך ה-T/S מייצג את אורך הטלומרים הממוצע.

לצד דיגום הדמים לאנליזת אורך טלומרים, נלקח גם שיער מבסיס הזנב של עגלים סמוך (לאחר) המלטה ובגיל חודשיים, חמישה ושמונה חודשים. בנוסף, נלקח שיער גם מבסיס הזנב של אימהות העגלים סמוך (לאחר) ההמלטה. מן השיער הופקו ההורמונים קורטיזול וטסטוסטרון שריכוזם נקבע בקיטים ייעודיים של אלייזה (DRG diagnostics, USA). לצד קבוצות הניסוי, נדגמו דם ושיער גם מפרות חלב והעגלים שלהן לאחר ההמלטה, מרפתות יזרעאל ובית דגן. על כן, התקבלו שני מדגמים עיקריים, מדגם של 28 עגלים ונאספו מהם דוגמאות דם ודוגמאות שיער, ומדגם גדול יותר, הכולל דגימות דם ודגימות שיער מ-133 פרות חלב ו-133 עגלים, שמתוכן, לאחר סינון, התקבלו נתונים מ-113 פרות חלב ומ-127 עגלים.

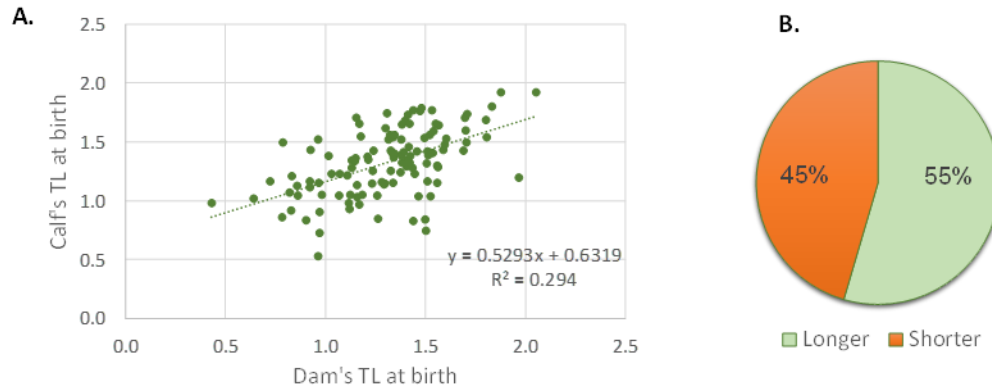
חמישים עגלים גודלו באחת משתי מערכות גידול: א. **במשטר הגידול הקבוצתי**, שוכנו 20 עגלי הולשטיין זכרים שהועברו ממקום לידתם ברפת המחקרית של מנהל המחקר החקלאי, בקבוצה, ביונקיה המדייקת בנוה יער, והיו חופשיים לנוע בחצר ששטחה 200 מ"ר, עם הקצאה מתוכננת של תחליף חלב וגישה חופשית לתערובת יונקים (שנוטרו באופן ממוחשב) ולמים, עד לגמילתם מחלב בגיל 70 יום.

ב. **במשטר הגידול היחידני**, שוכנו 30 עגלים במלונות פרטניות (218x118 ס"מ), עד לגמילתם בגיל 70 יום, והוגמעו תחליף חלב מבקבוקים, עם גישה חופשית לתערובת יונקים ולמים. 30 עגלי ההולשטיין הועברו ממקום לידתם ברפת המחקרית של מנהל המחקר החקלאי, סמוך למועד ההמלטה ( $2 \pm 7$  יום) במשקל ( $44 \pm 7$  ק"ג), לנווה יער. המלונות הפרטניות סודרו בשורה, כך שעגלים יכלו להיות במגע עם שכניהם. הגידול במלונות נמשך עד גיל 89 יום של כל עגל. פעם ביום, העגלים קיבלו 700 גרם תחליף חלב מומסים ב-3 ליטר מים בטמפרטורה של 40 צלסיוס. כמות החלב המוגש פחתה למחצית בגיל 60 יום, והופסקה כליל עם גמילת העגלים ביום 70. תערובת סטרטר (מרכז מזון, כפר יהושע) ניתנה לצריכה ללא הגבלה. בכל בוקר במהלך הניסוי נשקלו ונרשמו שאריות יום האתמול וחולקה תערובת חדשה. צריכת המזון חושבה בצורה ידנית על ידי שקילה ידנית של המזון הניתן ושל השארית ביום למחרת, כך חושבה הצריכה של העגלים בכל יום. מים טריים הוחלפו בכל יום והיו זמינים כל הזמן, מלבד בעת מתן תחליף החלב. העגלים נשקלו בכניסה וביציאה מהניסוי ופעם בשבוע לאורך הניסוי. בתום 89 הימים של הגידול היחידני, חולקו העגלים לשתי קבוצות בנות 10 עגלים כ"א, על בסיס מדד נצילות המזון. בקבוצה אחת קובצו עגלים בעלי יחס ה-G:F הנמוך ביותר ובקבוצה השנייה, הגבוה ביותר. בגיל 8 חודשים אוחדו שתי הקבוצות במפטמה הפרטנית לבחינת יעילות ניצול המזון על פי מדד ה-RFI, שהוא ההפרש בין צריכה בפועל לבין צריכה צפויה, בהתבסס על גודל ומשקל. ככל שערך זה נמוך יותר, כך בעל החיים נחשב יעיל יותר.

## תוצאות ודיון

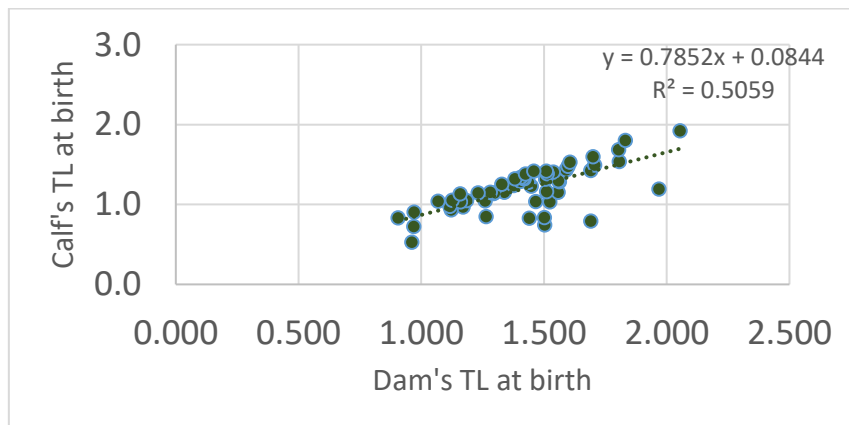
### הקשר בין אורך הטלומרים של הפרה והעגל ביום ההמלטה

פרוטוקול "תקן הזהב", המצוי בשימוש נרחב להערכת אורך טלומרים (telomere length; TL) במינים שונים, היה Southern blot. בשנים האחרונות חל מעבר לשיטת תפוקה גבוהה, כלומר qPCR. פרוטוקול זה נבדק, ביחס ל-Southern blot, וחשף מתאם גבוה. במחקר זה השתמשנו בשיטת qPCR הבסיסית, עם כמה התאמות. המטרה הראשונה שלנו הייתה להעריך אם ה-TL של העגל עשוי להיות מושפע מההיסטוריה של הפרה האם ובכך לספק אינדיקציה לתורשתיות של TL. לשם כך, ביצענו מתאם בין TL של 118 פרות והעגלים הנולדים שלהם, ביום הלידה. כפי שניתן לראות באיור 1A, המתאם הכללי היה חיובי, אך לא גבוה ( $R^2=0.294$ ). התבוננות מדוקדקת בנתונים הראתה שהקשר בין פרות לעגליהן ביום ההמלטה ב TL מתחלק לשתי קבוצות - גבוה (Longer; 55%), או נמוך יותר (Shorter; 45%) בילודים (איור 1B).

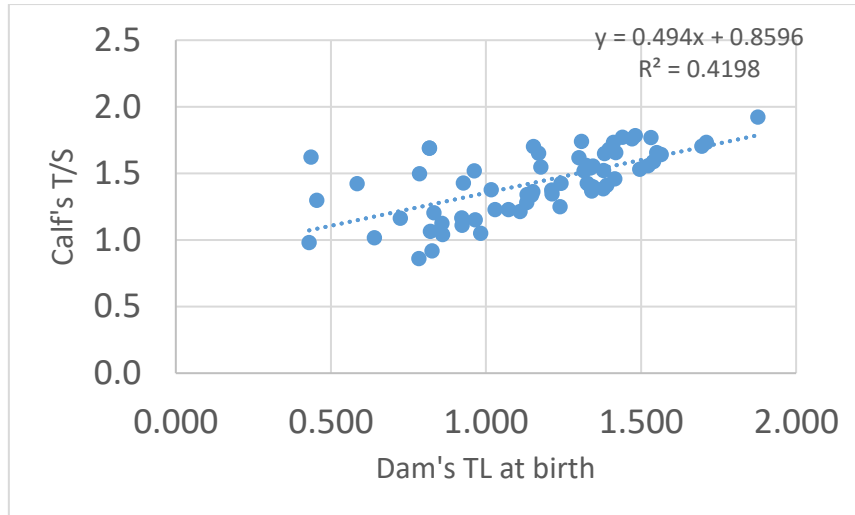


**איור 1. A.** הקשר בין TL של פרות והעגלים שלהן ביום ההמלטה (n=118). **B.** התפלגות TL של פרות לעומת עגלים, בלידה.

בחינת מתאמי TL של הפרות כנגד עגליהן ע"פ המגמות (קרי, מתאמים חיוביים או שליליים בנפרד), חשפה מקדמי מתאם גבוהים יותר (0.42 ו-0.51, בהתאמה,  $P < 0.001$ ) (איורים 2, 3), מה שמרמז על השפעות אפשריות של היסטוריית הפרות, באירועי חיים מוקדמים יותר, או במהלך ההיריון ו/או הלידה הספציפיים, כמו גם על תרומה גנטית של ההורים.

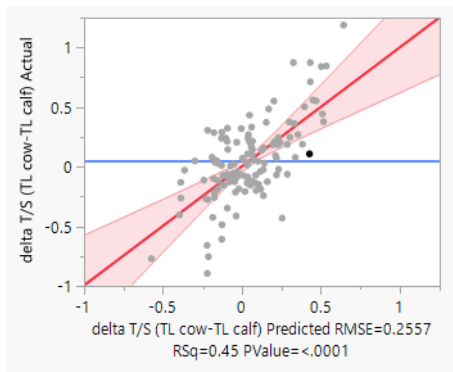


**איור 2.** קשר לינארי שלילי בין TL של פרות והעגלים שלהן ביום ההמלטה (n=55).



**איור 3.** קשר לינארי חיובי בין TL של פרות והעגלים שלהן ביום ההמלטה (n=65).

אירועים אפשריים שהם בבחינת השפעות אפשריות של היסטוריית הפרות עשויים להיות קשורים, בתנאים של הארץ, לעומס החום שחוותה השושלת המשפחתית של אם הוולד. כדי לספק רמז לכך, שיתפנו פעולה עם ד"ר מורן גרשוני, כדי לבחון בעזרת מודל הטמפרטורה שהוא פתח, השפעות אפיגנטיות, עד לדור הסבתא של הפרה (Weller et al., 2021). מודל זה בוחן השפעות בין-דוריות של חשיפה לעומס חום בטרימסטר האחרון של ההיריון על פנוטיפים (במקרה שלנו אורך טלומרים) של הצאצאים (דור F3). לפיכך, רק פנוטיפים שהתקבלו בדור השלישי יוכלו להיחשב כתוצרי הורשה בין-דורית, בהיותם לא מיוחסים לגורמים סביבתיים או גנטיים. המודל הסטטיסטי היה רגרסיה רב-גורמית, והוא כלל את גיל הפרה (האם) בהמלטה, הערך הטיפוחי של הפרה לשרידות (מצוי באסוציאציה עם אריכות ימים), קיץ במהלך הסמסטר השני של ההיריון של האם (קטגוריאלי; מציין חשיפה לעקת חום), קיץ במהלך הסמסטר השני של ההיריון של הסבתא (אם הפרה; קטגוריאלי; מציין חשיפה לעקת חום), ונוכחות דלקת רחם לאחר ההמלטה (קטגוריאלי; מציין עקה אפשרית בשל דלקת), כמשתנים בלתי תלויים. כמשתנה התלוי שימש ההפרש אורך טלומרים וולד מינוס אורך טלומרים של האם ( $T_{calf} - T_{cow}$ ). בעוד שתוצאות מבחן ה-F לא היו מובהקות ( $P=0.095$ ), גיל הפרה בעת ההמלטה היה מובהק ( $P=0.005$ ). לכן, בוצעה רגרסיה לינארית בין גיל האם בהמלטה לבין הפרש אורכי הטלומרים. תוצאות המבחן מציעות כי גיל האם בהמלטה יכול להסביר 5% מהשונות בהפרש אורך הטלומרים ( $R^2=0.0533$ ,  $P=0.01$ ). ובאמת, ניכר כי פרות צעירות יותר (גיל ממוצע 1642 יום) ממליטות עגלים עם טלומרים קצרים משלהן, ביום ההמלטה, בהשוואה לפרות מבוגרות יותר (גיל ממוצע 1887 יום) ( $P=0.041$ ), אשר ממליטות עגלים עם טלומרים ארוכים משלהן, זאת בשונה מהמצופה מהשפעת הגיל על אורך הטלומרים. כאשר הוספנו למודל הרגרסיה הרב-גורמית משתנים בלתי תלויים נוספים, קרי, אורך הטלומרים של הפרה ביום ההמלטה והמלטה קשה (קטגוריאלי; ערך טיפוחי של הפרה), התקבל מודל מובהק ( $P<0.0001$ ; איור 4), אשר לפיו, השונות בהפרש אורך הטלומרים מוסבר בצורה הטובה ביותר, באופן טבעי (בגלל היותו מובנה במשתנה עצמו) ע"י אורך הטלומרים של הפרה ביום ההמלטה ( $P<0.00001$ ), גיל הפרה בעת ההמלטה ( $P=0.021$ ) והערך הטיפוחי להמלטה קשה ( $P=0.027$ ).



#### איור 4. מודל רגרסיה רב-גורמית לבחינת הגורמים המשפיעים על הפרש אורך הטלומרים בהמלטה.

בכדי לנטרל את השפעת המשתנה הבלתי תלוי, אורך הטלומרים של הפרה ביום ההמלטה, מהמשתנה התלוי, הפרש אורך הטלומרים, בצענו אנליזה דומה, בה המשתנה התלוי היה אורך הטלומרים של העגל ביום ההמלטה. גם כאן, התקבל מודל מובהק ( $P < 0.0001$ ) בו הגורמים המשפיעים על השונות באורך הטלומרים של הוולד בהמלטה היו: אורך הטלומרים של הפרה בעת ההמלטה ( $P < 0.0001$ ), גיל הפרה ( $P = 0.019$ ) והערך הטיפוחי של הפרה להמלטה קשה ( $P = 0.026$ ). השרידות (אומדני הורשה; מצוי באסוציאציה עם תוחלת חיים), עונת השנה של לידת הפרה (תרומה אפיגנטית אפשרית), דלקת רחם (עקה אינפלמטורית בזמן ההיריון) ותנובת חלב, שגם הן נלקחו בחשבון במודל הנוכחי, לא תרמו מובהקות. התוצאות המתוארות בזאת, לא מאפשרות לקבוע מה גודל התרומה הגנטית ו/או הסביבתית לשונות באורך הטלומרים של הוולד. לכן, בשלב זה אנו מציעים להשתמש באורך הטלומרים של הפרה כפרוקסי לסך כל המשתנים המשפיעים על מצבה של הפרה, ותרומתה לאורך הטלומרים של הוולד בעת ההמלטה, עד לצבירת ידע נוסף שיסייע בהרכבת מודל חיזוי. יחד עם זאת, מאנליזה רב-גורמית (מודל לא מובהק;  $P = 0.37$ ) לבחינת השפעות גנטיות (שרידות בעדר, תמותת וולדות, המלטה קשה), אפיגנטיות (עונת השנה בהריון של הפרה ואם הפרה) וסביבתיות (עקה/בריאות; קטוזיס ודלקת רחם) על אורך הטלומרים של הפרה בהמלטה, עולה כי רק להמלטה קשה השפעה מובהקת ( $P = 0.048$ ) על השונות באורך הטלומרים של הפרה בהמלטה.

בנוסף למצוין לעיל, יש לקחת בחשבון גם את תרומתו של אבי העגל, הכוללת בתוכה את אומדני ההורשה (בדומה לתכונות המצוינות עבור האם) ואורך הטלומרים בעת ההזרעה. בעוד שאת תרומת אומדני ההורשה של האב ניתן להשלים בעתיד, מתוך נתוני ספר העדר, אורך הטלומרים של אבי העגל הוא נתון מורכב יותר לקביעה, זאת משום שקשיות הזרמה בעת לקיחתן אינן מתוארכות ליום הדיגום שלהן (בהתייחס לגיל הפר).

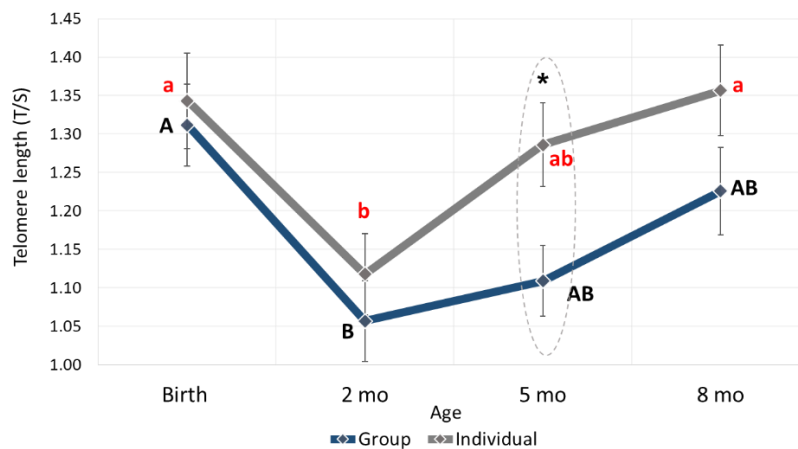
רמז לתרומה אפשרית של האב (sire) לאורך הטלומרים של צאצאיו ניתן לקבל ממצאים שהתקבלו במסגרת תוכנית קמ"ח (שנושאה Genotypes and phenotypes of telomere length in Holstein cattle: Actors or reporters genomic estimated breeding values;). במחקר זה מצאו שותפינו האמריקאים מתאם מובהק בין אורך הטלומרים של פרה שנקבע בסמיכות להמלטה ובמהלך התחלובה ובין אומדני ההורשה הגנטיים (gEBV), אשר חושבו במודל אוכלוסייתי עבור עדר הפרים האמריקאי. מתאמים מובהקים התקבלו בין היתר עבור תכונות הישרדות ובריאות, ביניהן Productive life, Cow livability, דלקת עטין, דלקת רחם, היסט קיבה,

עצירת שלייה, קטוזיס ועוד. מתאמים מובהקים נמצאו גם לתכונות נוספות דוגמת שיעור התעברות בנות (Daughter pregnancy rate) וסת"ס.

ללא קשר לאופי המתאם של LT בין הפרה לעגל ביום ההמלטה (חיובי או שלילי), ממוצע נתוני LT של 50 מתוך 118 העגלים שנבחנו, מדגים את הדינמיקה של מדד זה והשתנותו עם הגיל. כפי שעולה מאיור 5, LT חווה התקצרות מובהקת מההמלטה לגיל חודשיים, ואח"כ עליה מובהקת בגיל 5 חודשים והמשך עליה בגיל 8 חודשים, עד לערך הדומה ליום ההמלטה.

### השתנות אורך הטלומרים

על פי הדוגמה המקובלת, הטלומרים עשויים להתקצר עם הגיל. כדי לבחון דוגמה זאת, עקבנו אחר השינוי באורך הטלומרים החל מיום ההמלטה ועד גיל 8 חודשים, בשני משטרי גידול, קבוצתי (group) ויחידני (מלוות פרטניות; individual). באופן מעניין, בשני משטרי הגידול, חלה התקצרות מובהקת של הטלומרים מיום ההמלטה ועד גיל חודשיים, ולאחריה התארכות עד גיל 8 חודשים, אז נמדדו טלומרים הדומים באורכם לאלה שנקבעו במועד ההמלטה. על אף דינמיקת ההשתנות הדומה של אורך הטלומרים בשני משטרי הגידול, ניכר כי הטלומרים של העגלים אשר גודלו באופן פרטני היו ארוכים יותר משל העגלים אשר גודלו בקבוצה, בעיקר בגיל 5 חודשים ( $P=0.04$ ) (איור 5).



**איור 5.** השתנות אורך הטלומרים של עגלים ממשטר הגידול הקבוצתי ( $N=20$ ; קו כחול מלא) והיחידני ( $N=30$ ; קו אפור מלא) מהמלטה (birth) ועד גיל 8 חודשים. אורך הטלומרים נקבע באנליזת qPCR וחושב כפרמטר T/S. הבדלים מובהקים באורכי הטלומרים של עגלים ממשטר הגידול הקבוצתי והיחידני התקבלו בגיל 5 חודשים ומצויינים בכוכבית ( $P=0.04$ ). שגיאות התקן מוצגות.

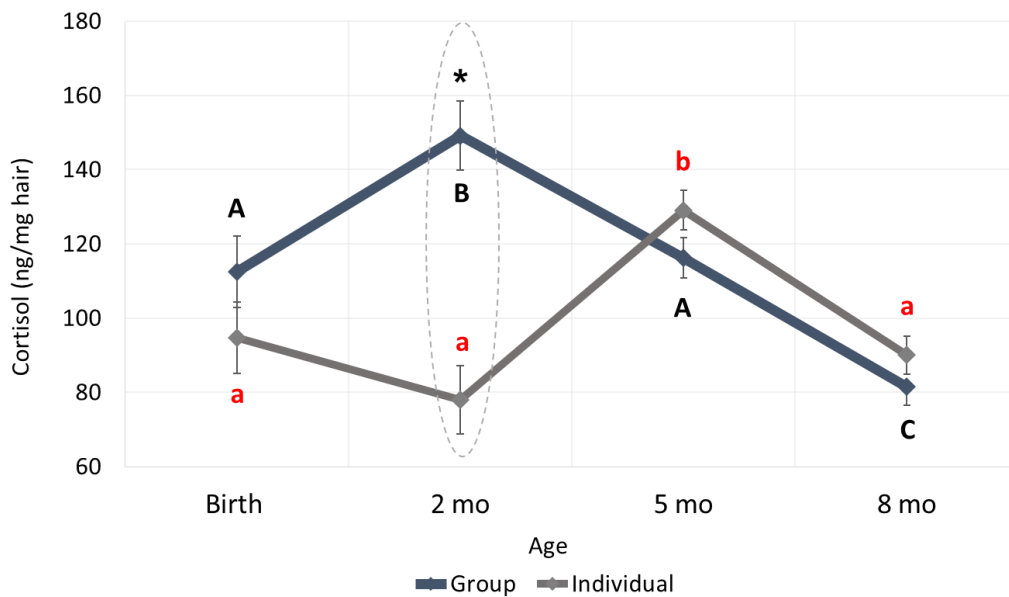
### השתנות הפרופיל ההורמונלי בשיער עגלים: קורטיזול וטסטוסטרון.

בעוד שריכוז ההורמונים, בעיקר קורטיזול, בנוזלי הגוף (דם, רוק) משתנה במהירות בתגובה לגירויים שונים, הצטברותם בשיער מייצגת תמונת מצב ההורמונלית תקופתית. מכיוון שכך, ומאחר ועשוי להתקיים לכאורה קשר בין



רמתם של הורמונים אלה לאורך הטלומרים, עקבנו אחר הצטברותם של הורמוני הקורטיזול והטסטוסטרון בשיער העגלים כפונקציה של הגיל.

ניתן לראות כי בעוד שביום ההמלטה ריכוז הקורטיזול בשיער היה דומה בשני משטרי הגידול, ריכוזו בגיל חודשיים היה גבוה באופן מובהק בקרב עגלים אשר גדלו במשטר קבוצתי, כפי הנראה לנוכח ריבוי העקות החברתיות המאפיינות את הגידול בקבוצות. בגיל חמישה חודשים, חלה ירידה ברמות הקורטיזול בשערם של עגלי הגידול הקבוצתי בהשוואה לגיל חודשיים, בעוד שרמות הקורטיזול בקבוצה היחידנית עלו באופן מובהק. ייתכן כי מקורה של עליה זו בריכוז הקורטיזול בעקה חברתית שחוו העגלים עם המעבר מגידול במלונה (יחידני) לגידול קבוצתי (איור 6).



**איור 6.** ריכוזי הורמון הקורטיזול של עגלים מהניסוי הקבוצתי (group; N=20) והיחידני (individual; N=30) מהמלטה (birth) ועד גיל 8 חודשים. הבדלים מובהקים בין ריכוזי הקורטיזול בשני הניסויים מצוינים בכוכבית (2 mo;  $P < 0.0001$ ). שינויים מובהקים בערכי הקורטיזול בין הגילאים (המלטה - 8 חודשים) מיוצגים באותיות לועזיות גדולות, בצבע שחור, עבור משטר הגידול הקבוצתי ( $P < 0.0001$ ), ובאותיות לועזיות קטנות בצבע אדום עבור משטר יחידני ( $P < 0.0001$ ).

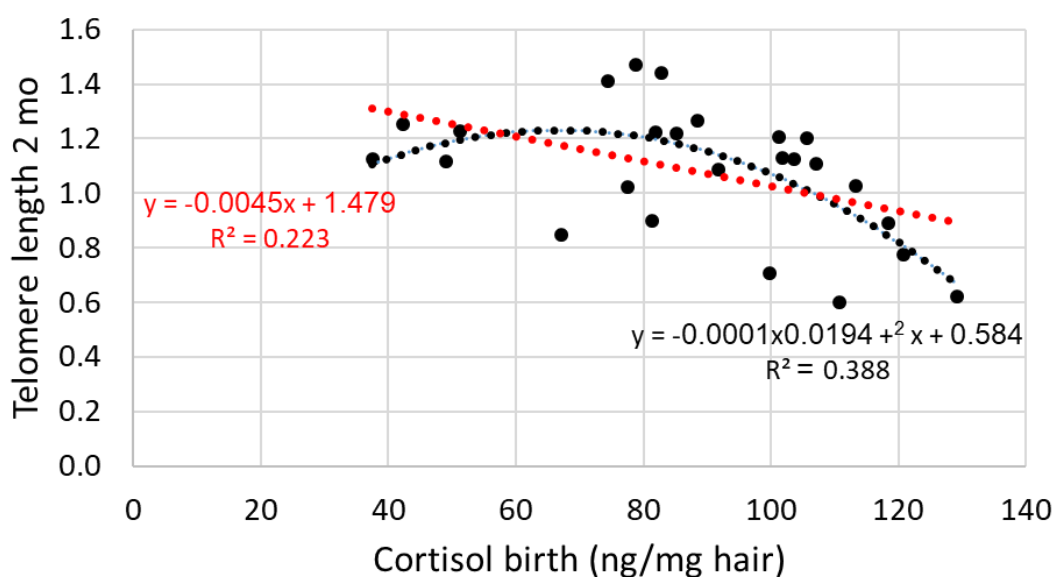
באופן כללי, ניתן להבחין כי השינוי ברמות הקורטיזול בשיערם של העגלים, בגידול הקבוצתי משתקף כתמונת ראי של השתנות אורך הטלומרים, כפונקציה של הגיל. ספציפית לגיל חודשיים, נראה כי נקודת השפל באורך הטלומרים הינה נקודת השיא בריכוז הקורטיזול. לא מן הנמנע, אם כך, לבחון את המתאם בין השניים, בעיקר לאור העובדה כי לעקה מיוחסת השפעה על אורך הטלומרים. במצב שכזה, בו עקה מהווה גורם סיבתי בקביעת אורך הטלומרים, נצפה כי לריכוז הקורטיזול בגיל הצעיר תהיה השפעה עתידית על אורך טלומרים (בגיל מתקדם של העגלים). על מנת לבחון ולאפיין את הקשר המתואר לעיל, גידלנו כאמור 50 מתוך 118 העגלים שנבחנו בעבודתי זו באחת משתי מערכות גידול, במשטר גידול קבוצתי או במשטר גידול יחידני. בשל ההבדל בין שני הניסויים בתנאי משטר

הגידול בשלב הינקות, נבחן הקשר בין ריכוז הקורטיזול לאורך הטלומרים עבור כל אחת מהקבוצות בנפרד, כאשר שאלת המבחן הייתה האם לריכוז הקורטיזול בשיער ביום ההמלטה (משקף הצטברות של ההורמון במהלך ההיריון)  $(P=0.19)$ , בגיל 5 חודשים הייתה נטייה למובהקות  $(P=0.06)$  ובגיל 8 חודשים המתאם היה מובהק  $(P=0.04)$ . יחד עם זאת, הקשר בין המשתנים בניגוד למצופה נמצא חיובי.

יתכן כי האינטראקציות הסביבתיות הכרוכות בגידול קבוצתי ממסכות על הקשר, וכי גורמים אחרים, אשר לא נלקחו בחשבון (ביניהם מצבם הבריאותי של העגלים בתחילת חייהם), לוקחים חלק בקביעת אורך הטלומרים. במידה והנחת עבודה שכזאת אכן מתקיימת, אזי צפוי להימצא קשר בין ריכוז הקורטיזול בגיל חודשיים (תקופת החיים הראשונה של עגלים יונקים, ובעיקר של אלה החיים בקבוצה) ובין אורך הטלומרים בגילאים מתקדמים יותר. אולם, גם במקרים אלה לא נמצאו מתאמים בין ריכוז הקורטיזול בגיל חודשיים לאורך הטלומרים של העגלים בגיל 5 או 8 חודשים.

במשטר הגידול היחידני לעומת זאת, בו גודלו העגלים במלונות פרטניות, ולא היו חשופים לעקה חברתית ולהידבקויות, נמצא קשר הפוך ומובהק בין ריכוז הקורטיזול בשיער בלידה לבין אורך הטלומרים בגיל חודשיים, במודל לינארי  $(R^2=0.22, P=0.017)$  ופולינומי  $(R^2=0.39, P<0.01)$  (איור 7).

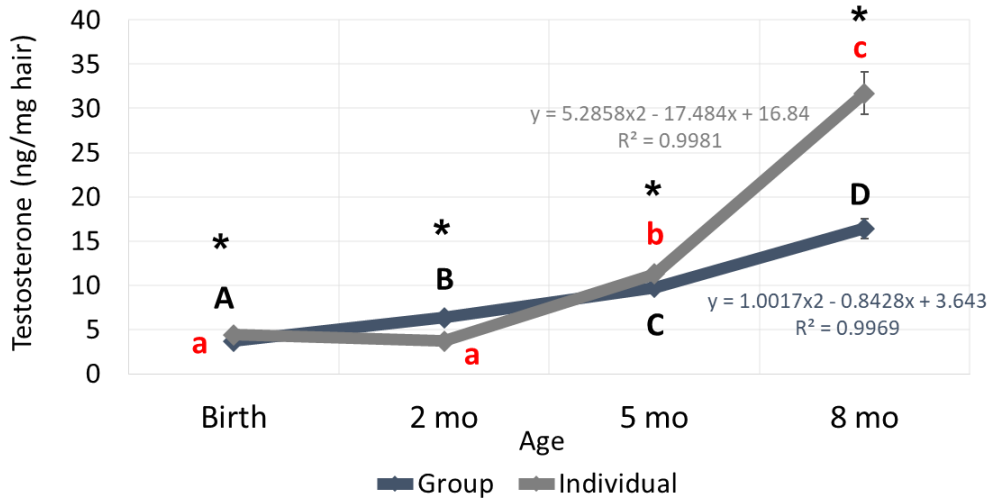
אחת משאלות המחקר הבסיסיות שהוגדרו בעבודתי הייתה האם ניתן להתייחס לאורך הטלומרים של העגלים כסיבה או כמסובב. על פי המתואר לעיל ניתן לשער, לפחות במשטר הגידול היחידני, כי אורך הטלומרים של העגלים הינו מסובב וכי ריכוזי קורטיזול במועד ההמלטה הם המשפיעים על אורך הטלומרים בהמשך החיים.



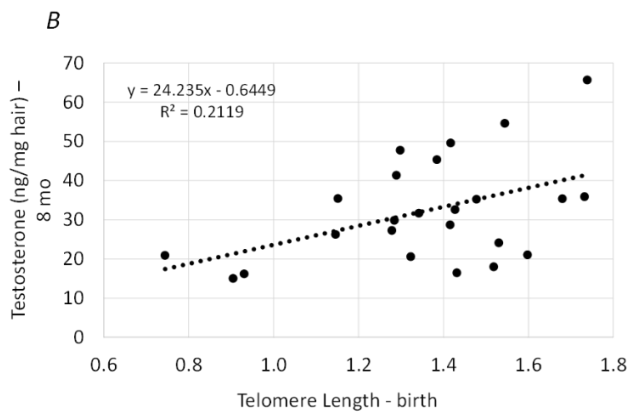
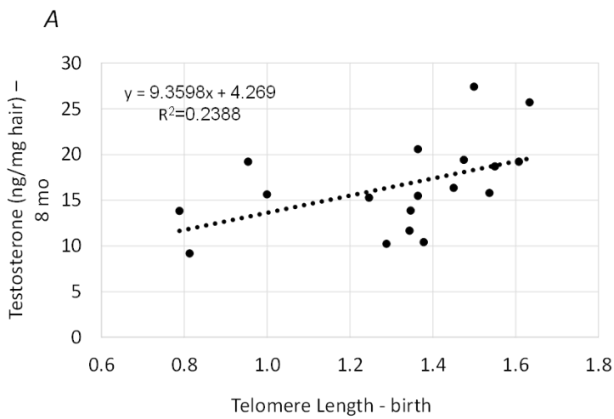
**איור 7.** גידול יחידני. מתאם שלילי בין ריכוז הקורטיזול בשיער של עגלים בהמלטה לבין אורך הטלומרים בגיל חודשיים. המתאמים מוצגים כקשר לינארי  $(R^2=0.22; P=0.017)$  ופולינומי  $(R^2=0.39; P<0.01)$ .

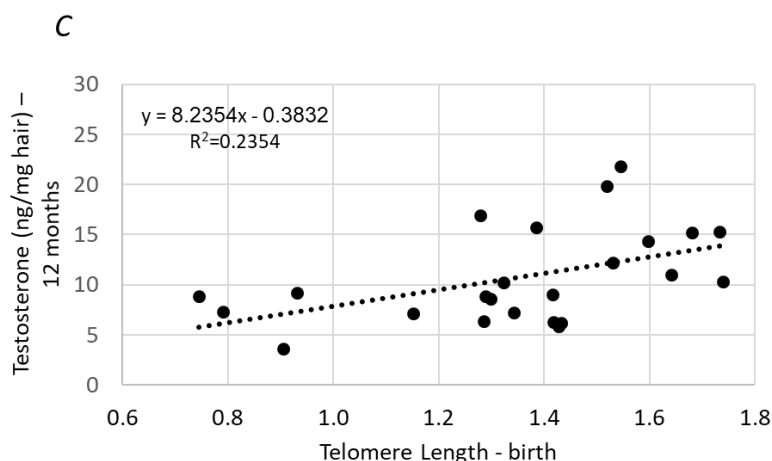
בשונה מהורמון הקורטיזול, תבנית ההצטברות של ההורמון הטסטוסטרון בשיערם של עגלים, בין אם במשטר הגידול היחידני ובין אם במשטר הגידול הקבוצתי, הראתה עליה עם הגיל (איור 8). בעוד שקצב ההצטברות בעגלי הגידול

הקבוצתי היה מתון אם כי מובהק במשך כל תקופת הגידול, החל משלב הלידה, ריכוז הטסטוסטרון בשיערם של עגלי הגידול היחידני התאפיין בעליה תלולה ומובהקת החל מגיל חודשיים לאחר "השהייה" ממועד ההמלטה ועד גיל זה.



**איור 8.** ריכוז הורמון הטסטוסטרון של עגלים ממשטר הגידול הקבוצתי (N=20; קו כחול מלא) והיחידני (N=30 קו אפור מלא) מהמלטה (birth) ועד גיל 8 חודשים. הבדלים מובהקים בריכוזי הטסטוסטרון בין שני הניסויים מצוינים בכוכבית. שינויים מובהקים ( $P < 0.05$ ) בערכי הטסטוסטרון בין הגילאים (המלטה - 8 חודשים) מיוצגים באותיות לועזיות גדולות בצבע שחור עבור הניסוי הקבוצתי ובאותיות לועזיות קטנות בצבע אדום עבור הניסוי היחידני.





**איור 9.** מתאם בין ריכוז טסטוסטרון בשיער של עגלים בהמלטה לבין אורך הטלומרים בגיל 8 חודשים, במשטר גידול יחידני (A), קבוצתי (B), ובגיל 12 חודשים במשטר גידול יחידני (C).

לאור הקשר שנמצא בין ריכוז הקורטיזול בהמלטה לאורך הטלומרים בגיל חודשיים (איור 7), ביקשנו לבחון את הקשר בין אורך הטלומרים להצטברות הורמון הטסטוסטרון בשיער. ההיגיון הנלווה לכך הוא הקשר הקיים בין רמות הורמון זה לבין הטמפרמנט של בעל החיים.

מאחר ולא נמצא קשר מנבא להשפעת ריכוז הטסטוסטרון על אורך הטלומרים, בדקנו האם אורך הטלומרים בהמלטה יכול לנבא את ריכוז הטסטוסטרון בהמשך החיים. ואכן, נמצא מתאם חיובי בין אורך הטלומרים במועד ההמלטה וריכוז ההורמון בשיערם של עגלים בני 8 חודשים, ממשטר הגידול הקבוצתי (איור 9A;  $P=0.04$ ) והיחידני (איור 9B;  $P=0.05$ ). מתאם בין מדדים אלה נמצא גם במשטר הגידול היחידני בגיל 12 חודשים (איור 9C;  $P=0.01$ ).

#### הקשר בין אורך הטלומרים, מדדים הורמונליים ויעילות ניצול המזון

יעילות ניצול המזון בעגלים (Gain to Feed; G:F) מחושבת כחס בין שינוי משקל הגוף וכמות המזון הנצרכת בפרק זמן נתון. בחיות משק בכלל ובבקר בפרט, קיימת חשיבות כלכלית רבה למדד זה, שכן המזון מהווה את הרכיב היקר ביותר בהוצאות הגידול של בעלי החיים.

בטבלה 1 מתוארים המתאמים בין אורך הטלומרים וריכוזי ההורמונים קורטיזול וטסטוסטרון, בהמלטה ובגיל חודשיים, ובין מדד יעילות ניצול המזון (G:F) של העגלים בגיל 89 ימים. בנוסף, מצוין המתאם בין אורך הטלומרים של הפרה (אמא) במועד ההמלטה ובין מדד זה. ניתן לראות, כי במועד ההמלטה לא נמצא מתאם בין אורך הטלומרים ובין מדד יעילות ניצול המזון. בגיל חודשיים, לעומת זאת, נטה המתאם החיובי למובהקות ( $R^2=0.18$ ;  $P=0.07$ ). בשונה מכך, אורך הטלומרים של האמהות ביום ההמלטה הציג מתאם שלילי ( $P=0.07$ ). ככלל, המתאם בין ריכוזי ההורמונים בהמלטה ובגיל חודשיים לבין יעילות ניצול המזון נמצא שלילי ומובהק, למעט ריכוז טסטוסטרון במועד ההמלטה (טבלה 1).

**טבלה 1.** אנליזה סטטיסטית (Standard Least Squares) לבחינת המתאמים בין אורך טלומרים ומדדים הורמונליים (ריכוזי קורטיזול וסטוסטרון) לבין מדד יעילות ניצול המזון (G:F) של העגלים בגיל 89 ימים במשטר הגידול הקבוצתי.

תכונה	R <sup>2</sup>	P-value
עגל – אורך טלומרים בהמלטה	אין מתאם	0.98
עגל – אורך טלומרים בגיל חודשיים	0.18	0.07
עגל - ריכוז קורטיזול בהמלטה	-0.15	0.04
עגל - ריכוז קורטיזול בגיל חודשיים	-0.41	<0.01
עגל - ריכוז סטוסטרון בהמלטה	אין מתאם	0.40
עגל - ריכוז סטוסטרון בגיל חודשיים	-0.57	0.0003
פרה - אורך טלומרים בהמלטה	-0.17	0.07

התכונות אשר נמצאו מובהקות או נטו למובהקות, נבחנו בהמשך באנליזת stepwise, לקביעת מדרג ההשפעה שלהם על מדד היעילות (טבלה 2). כפי שעולה מהטבלה, עוצמת ההשפעה על התכונה הייתה על פי הסדר הבא: סטוסטרון בגיל חודשיים < קורטיזול בגיל חודשיים < אורך טלומרים בגיל חודשיים < פרה – אורך טלומרים בהמלטה.

**טבלה 2.** משטר גידול קבוצתי. הגורמים המשפיעים על יעילות ניצול המזון (G:F) של העגלים בגיל 89 ימים. בין הגורמים הנבחנים, אורך טלומרים של העגל והפרה וריכוז קורטיזול וסטוסטרון. אנליזה בשלבים (stepwise).

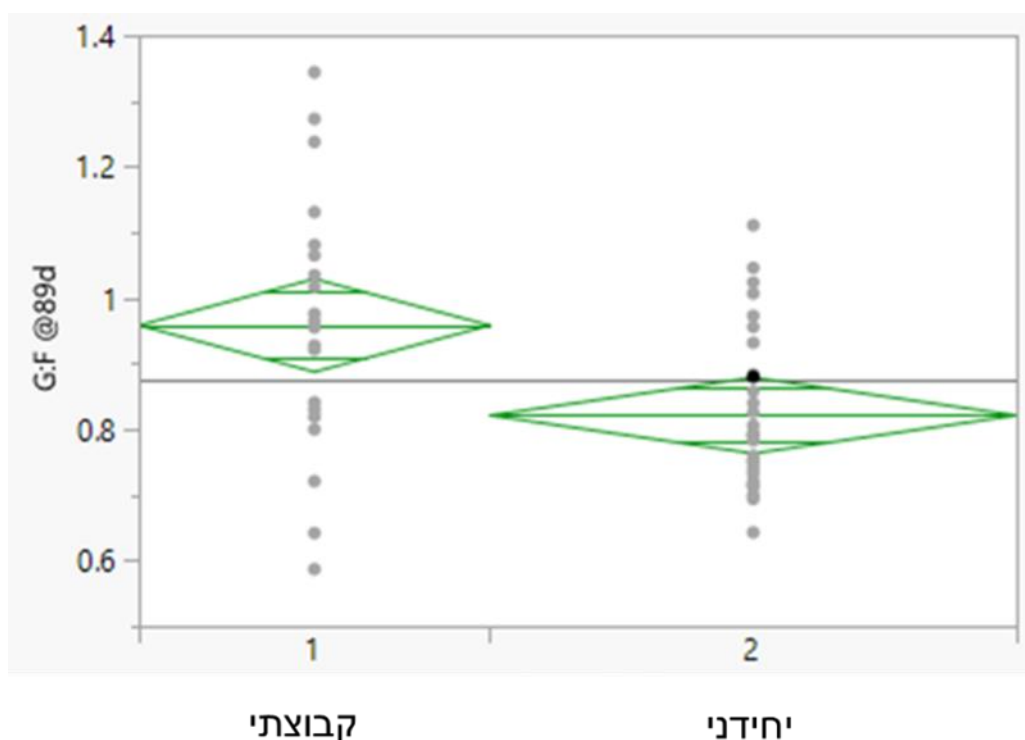
תכונה	P-value
עגל - סטוסטרון בגיל חודשיים	0.0007
עגל - קורטיזול בגיל חודשיים	0.006
עגל - אורך טלומרים בגיל חודשיים	0.11
פרה - אורך טלומרים בהמלטה	0.12
פרה - אורך טלומרים בהמלטה X עגל - אורך טלומרים בגיל חודשיים	0.44
עגל - אורך טלומרים בגיל חודשיים X קורטיזול בגיל חודשיים	0.45
פרה - אורך טלומרים בהמלטה X עגל - קורטיזול בגיל חודשיים	0.73
פרה - אורך טלומרים בהמלטה X עגל - סטוסטרון בגיל חודשיים	0.81
עגל - אורך טלומרים בגיל חודשיים X סטוסטרון בגיל חודשיים	0.82
עגל - קורטיזול בגיל חודשיים X סטוסטרון בגיל חודשיים	0.98

המתאמים בין אורך הטלומרים וריכוזי ההורמונים קורטיזול וסטוסטרון לבין מדד יעילות ניצול המזון (G:F) של העגלים בגיל 89 ימים, נבחנו גם במשטר הגידול היחידני (טבלה 3). ניתן לראות, כי המתאם (השלילי) המובהק היחיד היה בין ריכוז הקורטיזול בהמלטה ליעילות ניצול המזון. ראוי לציין כי נטייה למובהקות התקבלה במתאם שבין ריכוז הקורטיזול בגיל חודשיים למדד היעילות.

**טבלה 3.** משטר גידול יחידני. מתאמים בין אורך טלומרים ומדדים הורמונליים (ריכוזי קורטיזול וטסטוסטרון) לבין מדד יעילות ניצול המזון (G:F) של העגלים בגיל 89 ימים. אנליזת Standard Least Squares.

P-value	<sup>2</sup> R	תכונה
0.83	אין מתאם	עגל - אורך טלומרים בהמלטה
0.24	אין מתאם	עגל - אורך טלומרים בגיל חודשיים
0.04	-0.15	עגל - ריכוז קורטיזול בהמלטה
0.08	-0.11	עגל - ריכוז קורטיזול בגיל חודשיים
0.38	אין מתאם	עגל - ריכוז טסטוסטרון בהמלטה
0.7	אין מתאם	ריכוז טסטוסטרון בגיל חודשיים
0.2	אין מתאם	אורך טלומרים אמא בהמלטה

חוסר העקביות של המתאמים בין אורך הטלומרים (שלא נמצא במתאם עם מדד היעילות בניסוי היחידני) ליעילות ניצול המזון בשני הניסויים, הוליד את הצורך לבדוק את השפעת ממשק הגידול על יעילות ניצול המזון. לצורך כך, בחנו תחילה את מדד G:F בשני ממשקי הגידול. ובאמת, יעילות ניצול המזון הייתה גבוהה יותר ( $P=0.016$ ) במשטר הגידול הקבוצתי ( $0.96 \pm 0.20$ ) בהשוואה למשטר הגידול היחידני ( $0.83 \pm 0.12$ ). הבדל זה, מקורו בעליות משקל גבוהות יותר ( $P=0.007$ ) של העגלים אשר גדלו בקבוצה ( $63.3 \pm 13.6$  ק"ג), בהשוואה לאלה של עגלים ממשטר הגידול הפרטני ( $53.5 \pm 7.3$  ק"ג). צריכת המזון הכללית (ק"ג) היתה דומה בין עגלי שתי הקבוצות ( $66.9 \pm 11.2$  ו  $65.8 \pm 12.8$  עבור הניסוי הקבוצתי והיחידני, בהתאמה).



**איור 10.** השוואה בין שני משטרי גידול, יחידני ופרטני, בפרמטר יעילות ניצול המזון (G:F) בגיל 89 ימים. הבדלים מובהקים התקבלו בין שני משטרי הגידול ( $P=0.016$ ).

בשלב הבא נבחנה מידת ההשפעה של שיטת הגידול, יחידני מול קבוצתי, על פרמטר יעילות ניצול המזון של העגלים ביום 89, יחד עם גורמים נוספים אשר נמצאו במתאם עם פרמטר זה לפחות באחד משני הניסויים. בין מדדים אלה נמצאו אורך הטלומרים ורמות ההורמונים (קורטיזול וטסטוסטרון) של העגל בהמלטה ובגיל חודשיים, וכן אורך הטלומרים של האמא (פרה) בהמלטה.

**טבלה 4.** השוואה בין משטר גידול קבוצתי ויחידני, לקביעת מידת ההשפעה של משטר הגידול על יעילות ניצול המזון של העגלים (G:F) בגיל 89 ימים. אנליזה בשלבים (stepwise).

תכונה	P-value
שיטת גידול (יחידני בהשוואה לקבוצתי)	0.0035
עגל - אורך טלומרים בהמלטה	0.33715
עגל - אורך טלומרים בגיל חודשיים	0.60075
עגל - קורטיזול בהמלטה	0.51393
עגל - קורטיזול בגיל חודשיים	0.86137
עגל - טסטוסטרון בהמלטה	0.09327
עגל - טסטוסטרון בגיל חודשיים	0.31244
פרה - אורך טלומרים בהמלטה	0.04942

ובאמת, ניכר כי למשטר הגידול האפקט הגבוה ביותר ( $P=0.0035$ ) על מדד ניצול המזון. באופן מעניין, נמצאה השפעה גם לאורך הטלומרים של האמא, ונטיה למובהקות במקרה של ריכוז הטסטוסטרון בהמלטה. בתום 89 יום של גידול במשטר הגידול היחידני, קובצו העגלים לשתי קבוצות בנות 10 עגלים כ"א, על בסיס מדד ניצול המזון. בקבוצה אחת קובצו עגלים בעלי ה G:F הנמוך ביותר ובקבוצה השנייה, הגבוה ביותר. בגיל 8 חודשים אוחדו שתי הקבוצות במפטמה הפרטנית לבחינת יעילות ניצול המזון על פי מדד ה RFI. טבלה 5 מציגה את תוצאותיה של אנליזה רב גורמית בהתייחס למדד ה RFI.

**טבלה 5.** ניסוי 2 גידול משולב\* – אנליזה רב גורמית (multivariate) לקביעת המתאם בין אורך טלומרים\*\* וריכוזי הורמונים (קורטיזול וטסטוסטרון<sup>†</sup>) לבין מדד יעילות ניצול מזון שאריתי (residual feed intake; RFI) של העגלים בגיל 12 חודשים.

תכונה	P-value	R <sup>2</sup>
פרה - אורך טלומרים בהמלטה	0.09	-0.42
עגל - אורך טלומרים בהמלטה	0.84	אין מתאם
עגל - אורך טלומרים בגיל חודשיים	0.56	-0.15
עגל - אורך טלומרים בגיל 5 חודשים	0.75	אין מתאם
עגל - אורך טלומרים בגיל 8 חודשים	0.56	-0.15
עגל - אורך טלומרים בגיל 12 חודשים	0.004	-0.66
עגל - הפרש אורך טלומרים 0-2 חודשים	0.85	אין מתאם
עגל - הפרש אורך טלומרים 0-5 חודשים	0.6	0.13
עגל - הפרש אורך טלומרים 0-8 חודשים	0.95	אין מתאם
עגל - הפרש אורך טלומרים 0-12 חודשים	0.08	-0.42
עגל - הפרש אורך טלומרים 5-8 חודשים	0.49	-0.17
עגל - הפרש אורך טלומרים 5-12 חודשים	0.07	-0.43
עגל - ריכוז קורטיזול בהמלטה	0.08	-0.41
עגל - ריכוז קורטיזול בגיל חודשיים	0.21	-0.3
עגל - ריכוז קורטיזול בגיל 5 חודשים	0.97	אין מתאם
עגל - ריכוז קורטיזול בגיל 8 חודשים	0.49	-0.17
עגל - ריכוז קורטיזול בגיל 12 חודשים	0.06	0.44
עגל - ריכוז טסטוסטרון בהמלטה	0.41	-0.2
עגל - ריכוז טסטוסטרון בגיל חודשיים	0.37	0.22

\*יחידני עד גיל 89 ימים; קבוצתי מגיל 3 חודשים ואילך. \*\* נקבע באמצעות qPCR, אנליזת (T/S); † נונגרם/מיליגרם שיער.

מכלל הפרמטרים שנבחנו ומתוארים בטבלה 5, דורגו המובהקים שביניהם בטבלה 6. המתאם הגבוה ביותר מתקבל בין RFI ואורך טלומרים בגיל 12 חודשים ( $P=0.004$ ). אורך הטלומרים בגיל 12 חודשים מושפע ונקבע על בסיס היסטורית האירועים שחוהה העגל במהלך התקופה. כנ"ל לגבי קורטיזול ( $P=0.06$ ), הנדגם מהשיער ומסכם את כלל אירועי העקה שחוהה העגל במהלך חייו. המתאם בין RFI לשינוי באורך הטלומרים בין 5-12 חודשים ( $P=0.045$ ) נמצא מובהק יותר מהמתאם בין תכונה זו לשינוי באורך הטלומרים בין 0 ל 12 חודשים ( $P=0.08$ ). ניכר כי המעבר בין גידול פרטני לקבוצתי השפיע לחיוב על מצבם התחושתי של העגלים.



**טבלה 6.** אנליזה בשלבים (Stepwise) – פרמטרים מובהקים / נוטים למובהקות עם RFI (נלקחו מטבלה 5).

פרמטר	F Ratio	Prob>F
אורך טלומרים עגל בגיל 12 חודשים	11.528	0.004
הפרש אורך טלומרים 0-12	3.519	0.08027
הפרש אורך טלומרים 5-12	4.749	0.04567
קורטיזול בלידה	2.562	0.13032
קורטיזול בגיל חודשיים	1.348	0.26372
קורטיזול בגיל 12 חודשים	3.939	0.06578

#### רשימת ספרות מצוטטת

Ahola K, Sirén I, Kivimäki M, Ripatti S, Aromaa A, Lönnqvist J, Hovatta I. Work-related exhaustion and telomere length: a population-based study. *PLoS One*. 2012;7(7): e40186.

Asghar M, Palinauskas V, Zaghdoudi-Allan N, Valkiūnas G, Mukhin A, Platonova E, Färnert A, Bensch S, Hasselquist D. Parallel telomere shortening in multiple body tissues owing to malaria infection. *Proc Biol Sci*. 2016;283(1836).

Bakaysa SL, Mucci LA, Slagboom PE, Boomsma DI, McClearn GE, Johansson B, Pedersen NL. Telomere length predicts survival independent of genetic influences. *Aging Cell*. 2007;6(6):769-74.

Bandaria JN, Qin P, Berk V, Chu S, Yildiz A. Shelterin Protects Chromosome Ends by Compacting Telomeric Chromatin. *Cell*. 2016; 164(4):735-46.

Beloor J, Kang HK, Kim YJ, Subramani VK, Jang IS, Sohn SH, Moon YS. The effect of stocking density on stress related genes and telomeric length in broiler chickens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. 2010; 23:437-43.

Bendix L, Thinggaard M, Kimura M, Aviv A, Christensen K, Osler M, Avlund K. Association of leukocyte telomere length with fatigue in nondisabled older adults. *J Aging Res*. 2014; 2014:403253.

Bize P, Criscuolo F, Metcalfe NB, Nasir L, Monaghan P. Telomere dynamics rather than age predict life expectancy in the wild. *Proc Biol Sci*. 2009; 276(1662):1679-83.

Boccardi V, Paolisso G. Telomerase activation: A potential key modulator for human healthspan and longevity. *Ageing Res Rev*. 2014;15C:1-5.

- Bojesen SE. Telomeres and human health. *J Intern Med.* 2013; 274(5):399-413.
- Broer L, Codd V, Nyholt DR, Deelen J, Mangino M, Willemsen G, Albrecht E, Amin N, Beekman M, de Geus EJC, Henders A, Christopher P Nelson CP, Steves CJ, Wright MJ, Craen AJM, Isaacs A, Matthews M, Moayyeri A, Montgomery GW, Oostra BA, Vink JM, Spector TD, P Slagboom E, Martin NG, Samani NJ, van Duijn CM, and I Boomsma D. (2013) Meta-analysis of telomere length in 19713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *European Journal of Human Genetics* 2013; 21: 1163–1168.
- Brown DE, Dechow CD, Liu WS, Harvatine KJ, Ott TL. Hot topic: association of telomere length with age, herd, and culling in lactating Holsteins. *J Dairy Sci.* 2012; 95(11):6384-7.
- Cohen S, Janicki-Deverts D, Turner RB, Casselbrant ML, Li-Korotky HS, Epel ES, Doyle WJ. Association between telomere length and experimentally induced upper respiratory viral infection in healthy adults. *JAMA.* 2013;309(7): 699-705.
- Eitam H, Vaya J, Brosh A, Orlov A, Khatib S, Izhaki I, et al. Differential stress responses among newly received calves: variations in reductant capacity and Hsp gene expression. *Cell Stress Chap.* 2010; 15 (6): 865–876.
- Emanuelson U, Danell B, Philipsson J. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts, and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood. *J Dairy Sci.* 1988; 71(2): 467-76.
- Entringer S, Epel ES, Kumsta R, Lin J, Hellhammer DH, Blackburn EH, Wüst S, Wadhwa PD. Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(33): E513-8.
- Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(49): 17312-5.
- Humphreys J, Epel ES, Cooper BA, Lin J, Blackburn EH, Lee KA. Telomere shortening in formerly abused and never abused women. *Biol Res Nurs.* 2012; 14(2): 115-23.
- Kimura M, Gazitt Y, Cao X, Zhao X, Lansdorp PM, Aviv A. Synchrony of telomere length among hematopoietic cells. *Exp Hematol.* 2010; 38(10): 854-9.
- Laubenthal L, Hoelker M, Frahm J, Dänicke S, Gerlach K, Südekum KH, Sauerwein H, Häussler S. Short communication: Telomere lengths in different tissues of dairy cows during early and late lactation. *J Dairy Sci.* 2016; 99(6): 4881-5.
- Lin KW, Yan J. The telomere length dynamic and methods of its assessment. *J Cell Mol Med.* 2005; 9(4): 977-89.
- Lipkin E, Strillacci MG, Eitam H, Yishay M, Schiavini F, Soller M, Bagnato A, Shabtay A. 2016. The use of kosher phenotyping for mapping QTL affecting susceptibility to Bovine Respiratory Disease. *Plos One*, 11(4): e0153423.
- O'Callaghan NJ, Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online.* 2011; 13:3.

Prescott J, Kraft P, Chasman DI, Savage SA, Mirabello L, Berndt SI, Weissfeld JL, Han J, Hayes RB, Chanock SJ, Hunter DJ, De Vivo I. Genome-wide association study of relative telomere length. *PLoS One*. 2011; 6(5): e19635. doi:

Price LH, Kao HT, Burgers DE, Carpenter LL, Tyrka AR. Telomeres and early-life stress: an overview. *Biol Psychiatry*. 2013; 73(1): 15-23.

Sohn SH, Jang IS, Son BR. Effect of Housing Systems of Cage and Floor on the Production Performance and Stress Response in Layer. *Korean Journal of Poultry Sci*. 2011 38.

Sohn SH, Subramani VK, Moon YS, Jang IS. Telomeric DNA quantity, DNA damage, and heat shock protein gene expression as physiological stress markers in chickens. *Poult Sci*. 2012; 91(4):829-36.

Szczotka M, Kuzmak J. Telomerase activity and telomere length in cattle infected with Bovine Leukemia Virus (BLV). *ESVP/ECVP Proceedings* 2012; 148: 1.

Weller, J.I., Ezra, E. Gershoni, M. (2021). Broad phenotypic impact of the effects of transgenerational heat stress in dairy cattle: a study of four consecutive generations. *Genet Sel Evol* (2021) 53:69.

Wikgren M, Maripuu M, Karlsson T, Nordfjäll K, Bergdahl J, Hultdin J, Del-Favero J, Roos G, Nilsson LG, Adolfsson R, Norrback KF. Short telomeres in depression and the general population are associated with a hypocortisolemic state. *Biol Psychiatry*. 2012; 71(4):294-300.

Zakian VA. Telomeres: beginning to understand the end. *Science*. 1995; 270(5242): 1601-7. Review.

Zwald NR, Weigel KA, Chang YM, Welper RD, Clay JS. Genetic selection for health traits using producer recorded data. I. Incidence rates, heritability estimates, and sire breeding values. *J Dairy Sci*. 2004; 87(12): 4287-94.