

דוח מדעי מסכם לתכנית מחקר מספר 362-0580-21

האם אנדוקנבינואידים הינם ביומרקרים לעקה בפרות חלב?

Are endocannabinoids stress biomarkers in dairy cows?

מוגש למועצת החלב

שמות השותפים למחקר:

- ד"ר מאיה זכות - המחלקה לבקר וצאן, המכון לבע"ח, מינהל המחקר החקלאי, ראשל"צ.
mayak@volcani.agri.gov.il – מרכזת הפרויקט ואחראית על הניסויים בפרות חלב, ביצוע האנליזות, ניתוח הנתונים וסיכום התוצאות (חוקרת ראשית).
- פרופ' יוסי תם - המכון למדעי התרופה, בית הספר לרוקחות, הפקולטה לרפואה של האוניברסיטה העברית, ירושלים – אחראי על אנליזות האנדוקנבינואידים, ניתוח הנתונים וסיכום התוצאות.



חתימת החוקרת הראשית:

תקציר

ישנם שני גורמי עקה עיקריים בפרות חלב גבוהות תנובה: עקה לאחר ההמלטה הנובעת מהדרישות האנרגטיות לייצור חלב וכן מהשינויים הפיזיולוגיים, התזונתיים והחברתיים, ועקת חום בחודשי הקיץ. קיים צורך אמיתי לאפיין סמנים (ביומרקרים) אמפיריים לעקה בפרות חלב, בעדיפות לכאלו שאינם חודרניים (לדוגמה כאלו הניתנים לזיהוי בחלב). מטרת המחקר הנוכחי היא לבחון לראשונה את האפשרות כי אנדוקנבינואידים (**Endocannabinoids, eCBs**), הליגנדים האנדוגניים של המערכת האנדוקנבינואידית (**Endocannabinoid system, ECS**), ישמשו כביומרקרים חדשניים בפרות הנמצאות בעקה לאחר ההמלטה ובתנאי עקת חום. כיום אין מידע בספרות על רמות ה-eCBs בדם או בחלב של פרות חלב לאחר ההמלטה.

ה-ECS הינה בעלת השפעה נרחבת על המטבוליזם ומאזן האנרגיה ביונקים וכן על התגובה לעקה מטבולית, והיא מורכבת מ-3 אלמנטים מרכזיים: הליגנדים האנדוגניים הינם ה-eCBs (העיקריים שבהם הם 2-AG, AEA), הקולטנים שלהם (CB1, CB2) והאנזימים המרכזיים שאחראים לסינטזה ולפירוק שלהם ברקמות (MGLL, NAPEPLD, FAAH, DAGL). בשנים האחרונות ישנה עלייה משמעותית במחקר על ה-ECS בבני אדם ובחיות מודל; אולם, נכון להיום אין מידע בספרות המקצועית על תפקידי ה-ECS בפרות חלב; לכן, במחקר זה אנו מציעים לבחון לראשונה את מעורבות ה-ECS בפרות חלב בתנאי עקה מטבולית ואקלימית. על פי הממצאים הראשוניים שברשותנו, נראה כי ה-ECS קשורה להתמודדות עם עקה בפרות לאחר ההמלטה, אולם נדרש מחקר מקיף בנושא. יתרה מכך, אין כמעט עדויות בספרות לגבי השפעת עקת חום על ה-ECS; לכן במחקר המוצע נבדוק את ההשפעה של עקת חום בעונת הקיץ על שפעול ה-ECS בפרות לאחר ההמלטה. רמות ה-eCBs ייבחנו בדם, בחלב וברקמת השומן. מכיוון שה-eCBs מקורם בחומצות שומן, רקמת השומן מהווה מרכיב מרכזי ב-ECS הן כמקור ל-eCBs והן כרקמה המבטאת את הקולטן CB1 ולכן נבחן אלמנטים של ה-ECS ברקמת השומן של פרות לאחר ההמלטה בתנאי עקה.

לסיכום, במחקר זה נבחן לראשונה האם eCBs הינם ביומרקרים חדשניים לעקה בדם ובחלב של פרות חלב לאחר ההמלטה ובתנאי עקת חום, וכן את הקשר בין מרכיבי ה-ECS ברקמת השומן לרמות ה-eCBs בדם ובחלב ולמדדים פיזיולוגיים ומדדי עקה חימצונית.

מטרות המחקר: א. לבחון האם ה-eCBs מהווים ביומרקרים לעקה ע"י בחינת רמתם בדם ובחלב של פרות לאחר ההמלטה בתנאים איזותרמיים ובתנאי עקת חום. ב. לבחון את מרכיבי ה-ECS (ביטוי הרצפטורים והאנזימים ורמות eCB) ברקמת השומן של פרות לאחר ההמלטה בתנאים איזותרמיים ובתנאי עקת חום, ולבחון את הקשר בין מדדים פיזיולוגיים ומדדי עקה חימצונית לרמות eCBs בדם ובחלב של פרות לאחר ההמלטה. ג. לבחון את השפעת מידת עקת החום על רמות ה-eCBs בדם כאמצעי לביסוסם כביומרקרים לעקה. יעדי ושלבי המחקר: שנה א': ביצוע ניסוי ברפת וולקני לבחינת רמות eCB בדם ובחלב של פרות לאחר ההמלטה בעונת החורף והקיץ, איסוף דמים, חלב וביופסיות רקמת שומן. שנה ב': ביסוס אנליזה לבחינת eCB ברקמת השומן, דם וחלב פרה, ביצוע אנליזות

למרכיבי ה-ECS ברקמת השומן של פרות לאחר ההמלטה, ביצוע אנליזות למדדי עקה ומדדים פיזיולוגיים בדם. שנה ג': בחינת רמות ה-eCBs בדם של פרות אשר נבדלו בעוצמת עומס החום כאמצעי לביסוסם כביומרקרים לעקה.

סיכום ממצאי המחקר - בשנת המחקר הראשונה ביצענו ניסוי א' ברפת וולקני בה השתתפו 24 פרות בסוף ההיריון, כאשר מחציתן המליטו בעונת הקיץ (יולי-ספטמבר) ומחציתן בחורף (ינואר-מרץ). בעונת הקיץ, הפרות צוננו לאחר ההמלטה 5 פעמים ביום כפי שמקובל ברפת וולקני. במהלך הניסוי נמדדה צריכת המזון הפרטנית של הפרות, וכן נאספו נתוני ייצור חלב ומשקל גוף. פעם בשבועיים בוצעו ביקורות חלב לבחינת רכיבי החלב, ומאזן האנרגיה היומי חושב לכל פרה. דוגמאות דם נאספו פעמיים בשבוע משבועיים לפני מועד ההמלטה הצפוי ועד 21 יום בתחלובה לבחינת המדדים הבאים: ריכוזי חומצות שומן NEFA, ריכוזי אינסולין, מדד לעקה חימצונית – ריכוזי MDA, ריכוזי קורטיזול וריכוזי הציטוקין TNF- α . דוגמאות חלב נלקחו מ-5 פרות בכל עונה לאחר ההמלטה לצורך בחינת רמות אנדוקנבינואידים. ביום 7 לאחר ההמלטה ביצענו ביופסיה של רקמת שומן תת עורית מ-18 פרות (9 בכל עונה). ברקמות השומן בחנו את ביטוי הגנים: CNR1, CNR2, MGLL, fatty acid amide hydrolase (FAAH), N-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D (NAPEPLD). אנליזה סטטיסטית: ריכוזי מטבוליטים והורמונים בדם, ייצור חלב, צריכת מזון ומאזן האנרגיה נותחו באמצעות PROC MIXED. ביטוי הגנים נותח באמצעות GLM (SAS), ורמות אנדוקנבינואידים נותחו ע"י two-tailed Student's t-test.

תוצאות: צריכת המזון של הפרות בחודש הראשון לאחר ההמלטה הייתה נמוכה יותר בקיץ מאשר בחורף ($P < 0.0001$), תנובת החלב הייתה גבוהה מספרית אך לא באופן מובהק בחורף לעומת הקיץ ($P = 0.11$), ותנובת ה-FCM 4% הייתה גבוהה יותר בחורף מאשר בקיץ ($P = 0.02$). מאזן האנרגיה המחושב היה נמוך יותר בקיץ לעומת החורף ($P = 0.01$). בבחינת מדדים בדם, נמצא כי ריכוזי ה-NEFA היו דומים בין העונות במהלך תקופת המעבר, ואילו ריכוזי האינסולין היו נמוכים יותר בפרות שהמליטו בקיץ לעומת החורף ($P = 0.0008$). ריכוזי ה-TNF- α היו גבוהים פי 3.4 בפרות שהמליטו בקיץ לעומת החורף ($P = 0.0006$), ולא נמצאו הבדלים בריכוזי ה-MDA בין העונות. בבחינת ביטוי הגנים ברקמת השומן, נמצא כי ביטוי הקולטן CB1 (CNR1) היה נמוך בקיץ לעומת החורף ($P = 0.01$), וכן הביטוי היחסי של CB2 (CNR2) היה נמוך בקיץ לעומת החורף ($P = 0.009$). ביטוי האנזים MGLL היה נמוך בקיץ לעומת החורף ($P = 0.03$), ולא נמצאו הבדלים בביטוי הגנים FAAH, N-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D (NAPEPLD), PPAR α בין העונות. ביטוי הגן לקולטן ה-TRPV1 היה נמוך יותר בקיץ לעומת החורף ($P = 0.001$), ואילו ביטוי הגנים הדלקתיים TNF- α , CD68, NFkB לא היה שונה בין העונות. הביטוי היחסי של הגן MAP2K אשר שייך למסלול ה-Nrf2 oxidative stress response היה גבוה יותר ברקמת השומן של הפרות שהמליטו בקיץ לעומת החורף ($P = 0.009$), אולם הביטוי של הגנים SOD1, NRF2, STIP1, GSTM1 לא היה שונה בין העונות. לא נמצאו הבדלים בריכוזי האנדוקנבינואידים בפלסמה או ברקמת השומן ביום 7 לאחר ההמלטה בין פרות שהמליטו בחורף או

בקיץ. כאשר השווינו את ריכוזי האנדוקנבינואידים בפלסמה לעומת רקמת השומן בשתי העונות יחד, נמצא כי ריכוזי ה-*AEA* וריכוזי ה-*PEA* היו גבוהים בפלסמה לעומת רקמת השומן. לעומת זאת, ריכוזי ה-*OEA*, ה-*2-AG* וה-*AA* היו גבוהים ברקמת השומן מאשר בפלסמה.

בשנת המחקר השנייה בחנו את הביטוי של חלבונים שונים ברקמות השומן של פרות שהמליטו בחורף או בקיץ. הביטוי של הציטוקין הפרו-דלקתי *TNF-α* היה גבוה יותר ברקמת השומן של הפרות שהמליטו בקיץ, ואילו הביטוי של *PPARα* היה נמוך יותר ברקמת השומן בקיץ לעומת החורף. לא נמצאו הבדלים בביטוי חלבוני ה-*CB1*, *CB2*, *MGLL*, *FAAH* ברקמת השומן בקיץ או החורף. כמו כן, ביצענו ניסוי ב' ברפת וולקני בעונת הקיץ, בו פרות היו בשני משטרי צינון שונים בכדי לבחון האם *eCB* מהווים ביומרקרים לעומס החום בפרות חלב. בניסוי השתתפו 24 פרות באמצע התחלובה ברפת הפרטנית. מחצית מהפרות צוננו כמקובל ברפת וולקני (5 צינונים ליום), והמחצית השנייה של פרות לא צוננו כלל למשך 10 ימים. במהלך הניסוי נמדדו טמפרטורה רקטלית וקצב נשימה פעמיים ביום, ודגימות דם נלקחו באותם הימים. נלקחו ביופסיות מרקמת השומן של 5 פרות מכל טיפול לבחינת מרכיבי המערכת האנדוקנבינואידית ברמת הגן והחלבון.

תוצאות הניסוי: הפרות שלא צוננו היו עם צריכת מזון נמוכה יותר, תנובת חלב נמוכה יותר ותנובת *FCM* 4% נמוכה יותר לעומת הפרות המצוננות. נמצא כי הטמפרטורה הרקטלית הייתה גבוהה יותר הן בבוקר והן אחר הצהריים בפרות שלא צוננו לעומת הפרות המצוננות ($P < 0.0001$). קצב הנשימה של הפרות שלא צוננו היה גם כן גבוה יותר בבוקר ($P = 0.005$), ונטה להיות גבוה יותר בצהריים ($P = 0.08$) לעומת הפרות שצוננו. כמו כן, משך הרביצה נטה להיות נמוך יותר בפרות שלא צוננו לעומת הפרות המצוננות ($P = 0.11$). לא נמצאו הבדלים ברמות האנדוקנבינואידים ברקמת השומן או בפלסמה בין הטיפולים. עם זאת, כאשר בדקנו לראשונה את רמות האנדוקנבינואידים בחלב נמצא כי הריכוזים של האנדוקנבינואיד המרכזי *2-AG* נטו להיות גבוהים יותר בפרות שלא צוננו לעומת המצוננות ($P = 0.06$). בבחינת ביטוי גנים וחלבונים ברקמת השומן, לא נמצאו הבדלים בביטוי הגנים, אולם ביטוי החלבון *PPAR-α* היה נמוך יותר ברקמת השומן של הפרות שלא צוננו ($P = 0.02$), והביטוי של *TRPV1* נטה להיות נמוך יותר ברקמת השומן של הפרות שלא צוננו לעומת המצוננות. בנוסף, ביצענו מידול של מבנה הקולטנים של ה-*ECS* בבקר ואיששנו את קשירתם של אנדוקנבינואידים אליהם. לסיכום, ממצאי עבודה זו מראים כי המערכת האנדוקנבינואידית עשויה להיות קשורה לתגובה של בקר לעומס חום סביבתי, ייתכן בהקשר של צריכת המזון הנמוכה יותר בעומס חום, ונמצאו ממצאים מעניינים בבחינת רמות האנדוקנבינואידים בחלב. נדרש מחקר נוסף בכדי להמשיך ולבחון את השימוש באנדוקנבינואידים כביומרקרים לעקה בבקר לחלב.

Abstract

Environmental heat load (HL) adversely affects the performance of dairy cows. The endocannabinoid system (ECS) regulates metabolism and the stress response, thus we hypothesized that HL may affect the ECS of dairy cows. Our objective was to determine the levels of endocannabinoids (eCBs) and gene and protein expressions of the ECS components in adipose tissue (AT) and plasma of early postpartum (PP) and late-lactation cows. In addition, we examined eCBs in milk, and studied the interaction of eCBs with bovine cannabinoid receptors CB1 and CB2. In the first experiment, plasma and AT were sampled from cows calving during summer (S, $n = 9$) or winter (W, $n = 9$). Dry matter intake (DMI) and energy balance (EB) were lower in S vs. W, and relative gene expressions of transient-receptor-potential-cation-channel-subfamily-V-member-1 (*TRPV1*), the cannabinoid receptors *CNR1* (CB1) and *CNR2* (CB2), and monoglyceride lipase (*MGLL*) were decreased in AT of S compared to W. Protein abundance of peroxisome proliferator-activated-receptor-alpha (PPAR- α) was decreased, while tumor-necrosis factor- α (TNF- α) was increased in AT of S vs. W. Other components of the ECS were not different between S and W calving cows. To study whether the degree of HL may affect the ECS, we performed a second experiment with 24 late-lactation cows that were either cooled (CL) or not cooled (heat-stressed; HS) during summer. DMI was lower in HS vs. CL, AT protein abundance of PPAR- α was lower, and TRPV1 tended to be lower in HS vs. CL, but other components of the ECS were not different between groups. Milk levels of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) tended to increase in HS vs. CL. Additionally, modeling of the bovine cannabinoid receptors demonstrated their binding to anandamide and 2-AG. Environmental HL, possibly via lower intake, is associated with limited alterations in ECS components in AT of dairy cows.

תיאור הבעיה הנחקרת ופערי ידע בנושא

המערכת האנדוקנבינואידית (**ECS**, Endocannabinoid system) הינה בעלת השפעה נרחבת על המטבוליזם ומאזן האנרגיה ביונקים (Di Marzo et al., 2011; Silvestri et al., 2011; Lipina et al., 2012; Cable et al., 2014) וכן על התגובה לעקה מטבולית. אולם, נוכחות ומעורבות מערכת זו במצבים פיזיולוגיים בפרות חלב לא נחקרה כלל עד היום. במחקר זה אנו מציעים לבחון לראשונה את מעורבות ה-ECS בפרות חלב בתנאי עקה מטבולית ואקלימית. ה-ECS מורכבת מהליגנדים האנדוגניים, הנקראים אנדוקנבינואידים (**eCBs**), העיקריים: *N*-arachidonoyl ethanolamide (anandamide, **AEA**) ו-2-arachidonoylglycerol (**2-AG**) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995), אשר התגלו כבקרי-על של התגובה המהירה (הלא-גנומית) לעקה שמתבטאת בבקרת צריכת האנרגיה, בזכות מנגנון הבקרה המהיר והאדפטיבי של אופן הייצור והשחרור שלהם (Cristino et al., 2014). מרכיב נוסף של ה-ECS הוא הרצפטורים הקנבינואידים **CB1** (*CNR1*) ו-**CB2** (*CNR2*). הרצפטור **CB1** מתבטא ברמה גבוהה במערכת העצבים המרכזית ומבקר את האכילה והוצאת האנרגיה. כמו כן, הוא מצוי ברקמות פריפריאליות רבות אשר חיוניות למאזן המטבולי הכללי, כדוגמת רקמת השומן (Silvestri and Di Marzo, 2013). הרצפטור **CB2** מתבטא בעיקר בתאי מערכת החיסון, בהתאמה לתפקידו כבקר מרכזי של התפקוד החיסוני (Howlett, 1995; Pertwee and Ross, 2002). המרכיב השלישי של ה-ECS הינו האנזימים **MGLL** (monoglycerol lipase) ו-**FAAH** (fatty acid amide hydrolase) אשר אמונים על פירוק ה-eCBs, וכן האנזימים **NAPE-PLD** (phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D) ו-**DAGLs** (Diacylglycerol lipases) אשר אמונים על יצירתם של ה-eCBs. יחד, אנזימים אלה אחראיים לבקרה על כמות הליגנדים האנדוגניים של ה-ECS. חומר המוצא ותוצר הפירוק של ה-eCBs העיקריים הינו **AA** (arachidonic acid) אשר לו תפקיד מרכזי בבניית ממברנות התאים. ככלל, הפעלת ה-ECS מעודדת צבירת אנרגיה, וזאת כמנגנון המאזן ומבקר הוצאת אנרגיה ואת העקה החימצונית המלווה בכך (Nunn et al., 2010). ה-ECS פועלת בתווך הבין-תאי המקומי בהתבסס על רמות ה-eCBs אשר נקבעות ע"י בקורות שונות, ולעיתים סותרות, ברמה ההורמונלית והאנזימית, שמבקרות את רמות הייצור והפירוק שלהם (Jo et al., 2005; Kano et al., 2009; Cristino et al., 2014). מעבר להשפעות החשובות של ה-ECS על המטבוליזם, לאחרונה נמצא כי למערכת זו יש תפקיד חיוני בבקרת התגובה לעקה, בכך שה-ECS פועלת להחזרת המאזן ההורמונלי לאחר תגובה לעקה (Riebe and Wotjak, 2011). נמצא כי הפרשה טונית של eCBs והעברת הסיגנל התוך תאי בעקבות הפעלת הקולטן **CB1**, משמש כמעכב של ה-**HPA**-axis (hypothalamic-pituitary-adrenal) שמופעל בתגובה לעקה. לכן, הפחתת העברת הסיגנל של eCBs עשויה להיות מרכיב חשוב בתגובה ההורמונלית לעקה (Riebe and Wotjak, 2011). לרקמת השומן תפקיד מרכזי בהתאמות המטבוליות הנדרשות בכדי לתמוך בתחילת התחלובה בפרות חלב גבוהות תנובה (Bell and Bauman, 1997; Drackley, 1999). בתקופת המעבר מסוף ההיריון לתחילת התחלובה, הפרה עוברת ממצב של

צבירת אנרגיה להוצאה רבה של אנרגיה לייצור חלב, המוביל לליפוליזה מסיבית של רקמות השומן. בנוסף, לאחר ההמלטה מתפתחת ברקמת השומן תגובה דלקתית (Sadri et al., 2010), אשר תורמת להיווצרות דלקת סיסטמית תת-אקוטית (Bradford et al., 2015). בבני אדם ובמכרסמים הראו כי הרצפטור CB1 מתבטא באדיפוציטים של רקמת השומן הלבנה (Bensaid et al., 2003; Cota et al., 2006; Roche et al., 2003), ותאים אלו גם מבטאים את האנזימים הקשורים לסינטזה ופירוק של eCBs (Blüher et al., 2006). שפעול ה-ECS גורם להשפעות פרו-דלקתיות ברקמת השומן (Kempf et al., 2007), ואכן חסימה של הרצפטור CB1 ברקמת השומן גורמת לירידה בהפרשת ציטוקינים פרו-דלקתיים (Ge et al., 2013).

שני גורמי העקה המשמעותיים ביותר לפרת החלב גבוהת התנובה הינם: **(1) עקה ביוטית מטבולית** לאחר ההמלטה אשר קשורה במאזן האנרגיה השלילי שנוצר ממחסור באנרגיה זמינה לייצור חלב, וכן לשינויים הומאורטיים והורמונליים המאפיינים פרות לאחר ההמלטה (Drackley, 1999). **(2) עקה א-ביוטית סביבתית** בחודשי הקיץ עקב תנאי טמפרטורה ולחות גבוהים היוצרים עקת חום. כיום, למרות שהרפתות בארץ מפעילות משטרי צינון קפדניים בתקופת הקיץ, עקת החום עדיין גורמת לפגיעה ביעילות הייצור, ברווחיות, ובביצועי הפוריות של הפרות. עקת החום משפיעה על הפרה בכל שלבי התחלובה, אולם התקופה לאחר ההמלטה בה הפרה נמצאת בעקה מטבולית הינה רגישה במיוחד. בעבודה ראשונית שביצענו בחנו לראשונה את רמות ה-eCBs וביטוי הרצפטורים CB1, CB2 ברקמות שומן תת-עורי מביופסיות שנלקחו ביום 14 לפני ההמלטה ($n = 10$) וביום 4 לאחר ההמלטה, של פרות שאיבדו משקל רב (high weight loss, **HWL**, $n = 5$) או מועט (low weight loss, **LWL**, $n = 5$) לאחר ההמלטה. בבחינת רמות ה-eCBs ברקמות השומן, מצאנו כי כמות ה-AEA ו-2-AG היו גבוהות פי 2 ברקמות השומן של פרות HWL לעומת LWL לאחר ההמלטה, ואילו הרמות של AA ושל חומרים דמויי eCBs כגון oleoylethanolamide, palmitoylethanolamide, עלו לאחר ההמלטה ברקמות השומן של כל הפרות (**איור 1**). בנוסף, ביטויי ה-mRNA של CB1 ושל CB2 נטו להיות גבוהים יותר ברקמות השומן של HWL לעומת LWL ($P < 0.1$, **איור 2**). כמו כן, רמות החלבון של האנזים MGLL, שמפרק את 2-AG היו נמוכות יותר ברקמת השומן של HWL לעומת LWL לאחר ההמלטה (**איור 3**). בניסוי מקביל נמצאו בדם ריכוזי tumor-necrosis factor α (TNF- α) גבוהים יותר בפרות HWL לעומת LWL ($P < 0.05$). **ממצאים חדשניים אלו מראים כי עלייה בטון האנדוקנבינואיד ברקמת השומן נמצאת בהתאמה חיובית עם עלייה בפקטורים פרו-דלקתיים בפרות עם ליפוליזה מוגברת לאחר ההמלטה.**

בשנים האחרונות ישנה עלייה משמעותית במחקר של ה-ECS בבני אדם ובחיות מודל; אולם, נכון להיום אין כלל מידע בספרות המקצועית על תפקידי ה-ECS בפרות חלב בהקשר לעקה בתחילת התחלובה. על פי הממצאים הראשוניים, נראה כי eCBs קשורים להתמודדות עם עקה, אולם נדרש מחקר מקיף בנושא. פן חדשני נוסף במחקר המוצע הוא בחינת ההשפעה האפשרית של עקה אקלימית, עקת חום בעונת הקיץ, על שפעולה של ה-ECS בפרות לאחר ההמלטה. אין כמעט עדויות בספרות

לגבי השפעת עקת חום על ה-ECS, פרט למחקר בו נמצא כי eCBs קשורים לתגובה לעקת חום בלב של חולדות (Joyeux et al., 2002), ומחקר בעופות בו נמצא כי עקת חום אקוטית משנה את רמות eCBs בכבד (Jastrebski et al., 2017). עם זאת, ידוע כי AEA יכול להקשר לרצפטור TRPV1, הרגיש לשינויי טמפרטורה (Gavva, 2008), ומכיוון שה-ECS חשובה בתגובה של האורגניזם לעקה, ייתכן ותהיה לעקת חום השפעה ייחודית על הטון האנדוקנבינואידי בפרות הנמצאות בעקה מטבולית לאחר ההמלטה. יתרה מכך, במחקר זה נבחן לראשונה את רמות ה-eCBs בדם ובחלב של פרות לאחר ההמלטה. בסקירת הספרות המקצועית נראה כי אין מידע כלל על רמות ה-eCBs בדם של פרות לאחר ההמלטה, וכי שני מחקרים בלבד בחנו את רמות ה-eCBs בחלב פרה (Gouveia-Figueira and Nording, 2014; Wu et al., 2016), וזאת רק לשם ביסוס השיטה וללא קשר למצב הפיזיולוגי של הפרה. מכאן, שיש כר נרחב למחקר בנושא.

הנחות היסוד של המחקר המוצע: על פי התוצאות הראשוניות נראה כי ה-ECS מעורבת בתגובה לעקה מטבולית בפרות סביב ההמלטה. לכן, אנו מניחים כי מרכיבי ה-ECS, ובעיקר רמות ה-eCBs, עשויים להוות ביומרקרים חדשניים לעקה בבקר. כמו כן, יש עדויות ספורות בספרות כי עקת חום עשויה להשפיע על ה-ECS. מכאן אנו מניחים כי השילוב של עקת חום ועקה מטבולית עשוי להשפיע באופן ייחודי על ה-ECS והדבר יתבטא ברמות האנדוקנבינואידיים בדם וברקמות. אנו מניחים כי רמות ה-eCBs בדם יהיו בקשר עם רמתם בחלב ויכללו לשמש כביומרקרים חדשניים לעקה בפרות חלב.

מטרות המחקר:

- א. לבחון את האם eCBs מהווים ביומרקרים לעקה ע"י בחינת רמתם בדם ובחלב של פרות לאחר ההמלטה בתנאים איזותרמיים ובתנאי עקת חום.
- ב. לבחון את מרכיבי ה-ECS (ביטוי הרצפטורים והאנזימים ורמות eCBs) ברקמת השומן של פרות לאחר ההמלטה בתנאים איזותרמיים ובתנאי עקת חום ולבחון את הקשר בין מדדים פיזיולוגיים ומדדי עקה כימצונית לרמות eCBs בדם של פרות לאחר ההמלטה
- ג. לבחון את השפעת מידת עומס החום על רמות ה-eCBs בדם כאמצעי לביסוסם כביומרקרים לעקה.

תמצית תוכנית המחקר והתוצאות

בשנת המחקר הראשונה ביצענו ניסוי א' ברפת וולקני בו השתתפו 24 פרות (מספר תחלובה 2-7, בממוצע 3.5) בסוף ההיריון, כאשר מחציתן המליטו בעונת הקיץ (יולי-ספטמבר) ומחציתן בחורף (ינואר-מרץ). בעונת הקיץ, הפרות צוננו לאחר ההמלטה 5 פעמים ביום כפי שמקובל ברפת וולקני. נתוני טמפרטורה ולחות יחסית נאספו מהתחנה המטאורולוגית בבית דגן, ועומס החום חושב באמצעות Thermal Heat Index, THI. במהלך הניסוי נמדדה צריכת המזון הפרטנית של הפרות, וכן נאספו נתוני ייצור ומשקל גוף (אפיפארם, צח"מ אפיקים). פעם בשבועיים בוצעו ביקורות חלב

לבחינת רכיבי החלב במעבדה לחלב (התאחדות מגדלי הבקר, קיסריה), ומאזן האנרגיה היומי חושב לכל פרה ע"י המשוואה מ-NRC (2001). דוגמאות חלב נאספו מ-5 פרות בכל עונה לאחר ההמלטה לבחינת ריכוזי אנדוקנבינואידים בחלב. דוגמאות דם נאספו פעמיים בשבוע משבועיים לפני מועד ההמלטה הצפוי ועד 21 יום בתחלובה בשעה 07:00 למבחנת ואקום עם הפריין, וסורכזו מיידית להפרדת הפלסמה. בדוגמאות נבחנו המדדים הבאים: ריכוזי חומצות שומן NEFA, ריכוזי אינסולין (ע"י RIA), מדד לעקה חימצונית – ריכוזי MDA (בשיטת TBARS), ריכוזי קורטיזול בדם (ע"י ELISA) וריכוזי הציטוקין TNF- α (ע"י ELISA). כמו כן, ביום 7 לאחר ההמלטה נבחנו ריכוזי אנדוקנבינואידים בפלסמה. לאחר ההמלטה, כל הפרות נבדקו ע"י הוטרנר של הרפת וכל אירוע נרשם וטופל בהתאם לממשק ברפת.

ביופסיית רקמת שומן - ביום 7 לאחר ההמלטה ביצענו ביופסיה של רקמת שומן תת עורית כפי שמפורט ב-Zachut et al. (2013) מ-18 פרות (9 בכל עונה). מכל פרה נאספו 4 דוגמאות שומן והוקפאו מיידית בחנקן נוזלי, ואחר מכן נשמרו ב-80- עד לביצוע אנליזות.

בחינת ביטוי גנים ברקמת השומן – הפקת ה-RNA נעשתה באמצעות קיט ייעודי (RNeasy lipid tissue mini kit, Qiagen, Hilden, Germany) ואיכות ה-RNA נבחנה ביחס 260/280 מעל 1.85. יצירת cDNA נעשתה באמצעות קיט (Applied Biosystems, Foster City, CA). ביטוי הגנים נבחן באמצעות real-time PCR using a StepOnePlus instrument (Applied Biosystems) בחנו את הביטוי היחסי של הגנים הבאים: CNR1, CNR2, MGLL, fatty acid amide hydrolase (FAAH), N-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D (NAPEPLD) הפריימרים עברו ולידציה לפני שימוש, וביטוי הגנים תוקן לביטוי הגן BRPS2 ברקמת השומן. לצורך ניתוח סטטיסטי, חישבנו את ה-delta-delta CT (relative quantity, RQ) לכל גן, וביצענו נרמול של ה-RQ לפי הערכים של פרה רנדומלית בעונת החורף.

בחינת ריכוזי אנדוקנבינואידים ברקמת השומן ובדם: רמות האנדוקנבינואידים: AEA, 2-AG, oleoylethanolamide (OEA), palmitoylethanolamide (PEA), and arachidonic acid (AA) נבחנו באמצעות stable isotope dilution LC-MS/MS method לאחר הפקתם מרקמת השומן והפלסמה ביום 7 לאחר ההמלטה.

אנליזה סטטיסטית: ריכוזי מטבוליטים והורמונים בדם, ייצור חלב, צריכת מזון ומאזן האנרגיה נותחו באמצעות PROC MIXED. ביטוי הגנים וחלבונים נותחו באמצעות GLM (SAS), ורמות אנדוקנבינואידים נותחו ע"י two-tailed Student's t-test.

תוצאות ניסוי א':

במהלך הניסוי, ערכי ה-THI הממוצעים בעונת הקיץ היו 77.5 לעומת 57.0 בעונת החורף. ל-4 פרות שהמליטו בקיץ הייתה דלקת רחם אשר טופלה פעם אחת ולאחר מכן הן החלימו, ופרה אחת בעונת

הקיץ אובחנה עם קטוזיס, היא טופלה עם אינפוזיית דקסטרוז ונמצאה בריאה לאחר 4 ימים. מקרי תחלואה אלו התרחשו לאחר יום דיגום רקמת השומן (יום 7 לאחר המלטה).

כפי שניתן לראות בטבלה מס' 1, צריכת המזון של הפרות בחודש הראשון לאחר ההמלטה הייתה נמוכה יותר בקיץ מאשר בחורף ($P < 0.0001$), תנובת החלב הייתה גבוהה מספרית אך לא באופן מובהק בחורף לעומת הקיץ ($P = 0.11$), ותנובת ה-FCM 4% הייתה גבוהה יותר בחורף מאשר בקיץ ($P = 0.02$). מאזן האנרגיה המחושב היה נמוך יותר בקיץ לעומת החורף ($P = 0.01$).

בבחינת מדדים בדם, נמצא כי ריכוזי ה-NEFA היו דומים בין העונות במהלך תקופת המעבר, ואילו ריכוזי האינסולין היו נמוכים יותר בפרות שהמליטו בקיץ לעומת החורף ($P = 0.0008$, טבלה מס' 1). ריכוזי ה-TNF- α היו גבוהים פי 3.4 בפרות שהמליטו בקיץ לעומת החורף ($P = 0.0006$), ולא נמצאו הבדלים בריכוזי ה-MDA בין העונות (טבלה מס' 1).

טבלה מס' 1 – צריכת מזון, תנובת חלב, מאזן אנרגיה ומדדים בדם בפרות שהמליטו בחורף או בקיץ

P =	SEM	קיץ	חורף	
				נתוני ייצור ומאזן אנרגיה לאחר ההמלטה
<0.0001	0.8	18.5 ^b	25.0 ^a	צריכת מזון עד 30 יום בתחלובה, ק"ג/יום
0.11	1.7	37.5	41.7	תנובת חלב 30 יום, ק"ג ליום
0.02	1.9	34.0 ^b	40.7 ^a	חלב מושווה שומן 4% עד 30 יום, ק"ג/יום
0.01	1.7	-4.5 ^b	0.6 ^a	מאזן אנרגיה עד 30 יום, Mcal/d
				פרמטרים בדם בתקופת המעבר
0.74	47.7	437.0	414.0	NEFA, $\mu\text{Eq/L}$
0.06	2.0	14.2	20.1	Insulin, pg/ml
0.69	1.8	6.8	7.8	Cortisol, ng/ml
0.25	91.6	388.2	224.3	MDA, μM
0.001	161.6	1289.3 ^a	375.8 ^b	TNF- α , pg/ml

ביטוי גנים ברקמת השומן ביום 7 לאחר ההמלטה

בבחינת ביטוי הגנים ברקמת השומן, נמצא כי הביטוי של הקולטן CB1 (CNR1) היה נמוך ב-46% בקיץ לעומת החורף ($P = 0.01$, טבלה מס' 2), והביטוי היחסי של CB2 (CNR2) היה נמוך ב-48% בקיץ לעומת החורף ($P = 0.009$). ביטוי האנזים MGLL היה נמוך ב-46% בקיץ לעומת החורף ($P = 0.03$), ולא נמצאו הבדלים בביטוי הגנים FAAH, NAPLEPLD, PPAR α בין העונות (טבלה מס' 2). ביטוי הגן לקולטן ה-TRPV1 היה 58% נמוך יותר בקיץ לעומת החורף ($P = 0.001$), ואילו ביטוי הגנים הדלקתיים TNF- α , CD68, NFKB לא היה שונה בין העונות. הביטוי היחסי של הגן MAP2K אשר שייך למסלול ה-Nrf2 oxidative stress response היה גבוה יותר ברקמת השומן של הפרות שהמליטו בקיץ לעומת החורף ($P = 0.009$), אולם הביטוי של הגנים SOD1, NRF2, STIP1, GSTM1 לא היה שונה בין העונות (טבלה מס' 2).

טבלה מס' 2 – ביטוי גנים ברקמת השומן של פרות שהמליטו בחורף או בעומס חום בקיץ

RQ	חורף	קיץ	SEM	P =
<i>ECS genes</i>				
CB1	2.4 ^a	1.3 ^b	0.3	0.01
CB2	2.5 ^a	1.3 ^b	0.3	0.009
MGLL	3.5 ^a	1.9 ^b	0.4	0.03
FAAH	4.5	3.6	1.1	0.6
NAPEPLD	2.9	2.3	0.5	0.4
PPAR- α	1.1	1.5	0.3	0.4
<i>Inflammatory genes</i>				
TRPV1	3.1 ^a	1.3 ^b	0.3	0.001
TNF- α	3.8	4.0	1.0	0.9
CD68	2.7	1.4	0.5	0.1
NFKB	1.8	3.1	0.7	0.2
<i>Oxidative stress genes</i>				
SOD1	1.3	1.4	0.2	0.8
NRF2	1.7	2.7	0.8	0.4
STIP1	0.7	0.6	0.06	0.2
MAP2K	0.7 ^b	0.9 ^a	0.06	0.009
GSTM1	3.0	2.0	0.7	0.3

רמות אנדוקנבינואידיים ברקמת השומן ובדם ביום 7 לאחר ההמלטה

ריכוזי האנדוקנבינואידיים בפלסמה וברקמת השומן ביום 7 לאחר ההמלטה מופיעים בטבלה מס' 3. כפי שניתן לראות, לא נראו הבדלים בריכוזי האנדוקנבינואידיים בפלסמה או ברקמת השומן בין פרות שהמליטו בחורף או בקיץ. בשתי העונות יחד, הריכוזים הממוצעים של האנדוקנבינואידיים בפלסמה היו: 376.3 fmol/mL for AEA, 15.4 nmol/mL for 2-AG, 64 pmol/mL for OEA, 1442.5 pmol/mL for PEA, and 256.2 nmol/mL for AA. כאשר השווינו את ריכוזי האנדוקנבינואידיים בפלסמה לעומת רקמת השומן בשתי העונות יחד, נמצא כי ריכוזי ה-AEA היו גבוהים פי 134 ($P < 0.0001$) וריכוזי ה-PEA היו גבוהים פי 18.5 ($P = 0.001$) בפלסמה לעומת רקמת השומן. לעומת זאת, ריכוזי ה-OEA היו גבוהים פי 3.6 ($P = 0.01$), ריכוזי ה-2-AG היו גבוהים פי 13.9 ($P < 0.0001$), וריכוזי ה-AA היו גבוהים פי 5 ($P < 0.0001$) ברקמת השומן לעומת הפלסמה.

טבלה מספר 3 – ריכוזי האנדוקנבינואידים ברקמת השומן ובפלסמה של פרות ביום 7 לאחר ההמלטה בחורף וקיץ

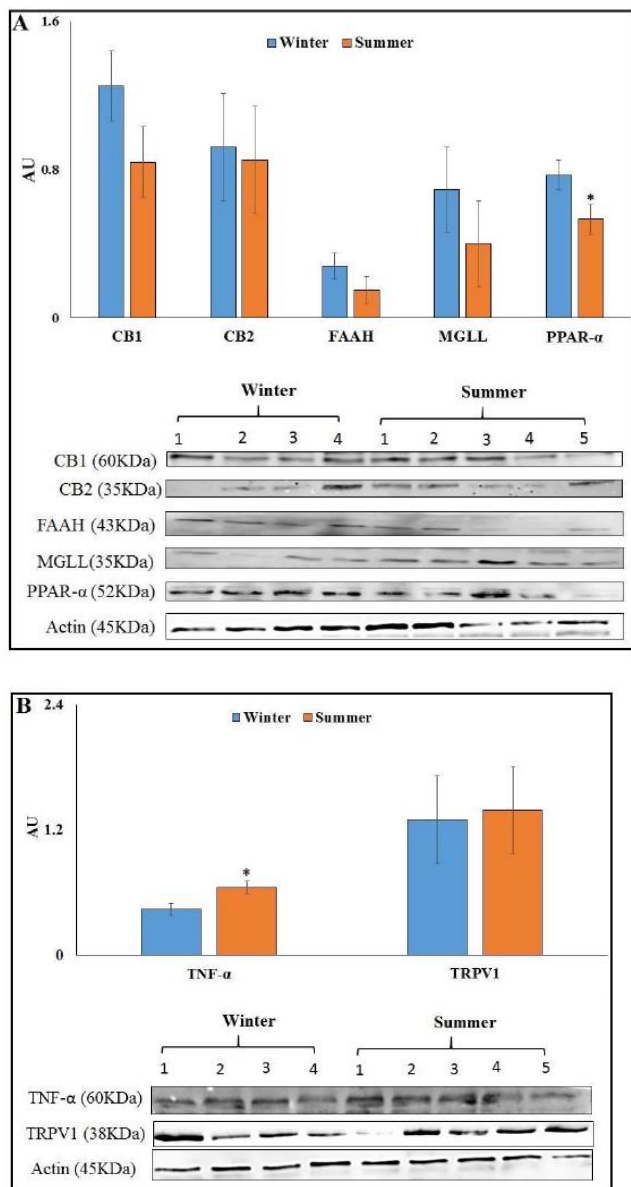
	חורף	קיץ	SEM	P =
רקמת השומן				
AEA, fmol/mg	1.6	3.3	1.5	0.4
2-AG, nmol/mg	199.7	199.0	49.0	0.9
OEA, pmol/mg	148.2	238.6	84.5	0.5
PEA, pmol/mg	34.3	66.7	21.2	0.3
AA, nmol/mg	1097.0	1023.2	176.7	0.8
פלסמה				
AEA, fmol/mL	308.6	443.9	67.9	0.2
2-AG, nmol/mL	16.8	13.9	2.1	0.3
OEA, pmol/mL	65.4	62.4	5.4	0.7
PEA, pmol/mL	1698.9	1186.1	579.9	0.5
AA, nmol/mL	251.5	260.8	28.2	0.8

בשנת המחקר השנייה בחנו את הביטוי של חלבונים שונים ברקמות השומן של פרות שהמליטו בחורף או בקיץ (טבלה מספר 4). כפי שניתן לראות, הביטוי של הציטוקין הפרו-דלקתי TNF- α היה גבוה יותר ברקמת השומן של הפרות שהמליטו בקיץ לעומת החורף, ואילו הביטוי של PPAR α היה נמוך יותר ברקמת השומן בקיץ לעומת החורף ($P = 0.04$). לא נמצאו הבדלים בביטוי חלבוני ה-CB1, CB2, MGLL, FAAH ברקמת השומן בקיץ או החורף (טבלה מס' 4).

טבלה מספר 4 – ביטוי חלבונים הקשורים למערכת האנדוקנבינואידית ולדלקת ברקמת השומן של פרות לאחר ההמלטה בחורף או בקיץ

AU	חורף	קיץ	SEM	P =
CB1	1.25	0.84	0.19	0.15
CB2	0.92	0.85	0.29	0.85
FAAH	0.28	0.15	0.07	0.22
MGLL	0.69	0.40	0.23	0.38
PPAR- α	0.77 ^a	0.53 ^b	0.08	0.04
TNF- α	0.44 ^b	0.65 ^a	0.06	0.04

איור מספר 1 - ביטוי חלבונים ברקמת השומן



ניסוי ב' - בחינת מרכיבי ה-ECS בפרות מצוננות או לא מצוננות בקיץ

בניסוי ב' השתתפו 24 פרות באמצע התחלובה ברפת הפרטנית של מכון וולקני. מחצית מהפרות צוננו כמקובל ברפת וולקני (5 צינונים ליום), והמחצית השנייה של פרות לא צוננו כלל למשך 10 ימים. בימים 0, 5, ו-10 בניסוי נמדדו טמפרטורה רקטלית וקצב נשימה פעמיים ביום (בוקר ואחה"צ), ודגימות דם נלקחו באותם הימים מכל הפרות. אספנו נתוני צריכת מזון, תנובה, ורווחה (משך רביצה, העלאת גרה). בנוסף, לקחנו ביופסיות מרקמת השומן של 5 פרות מכל טיפול לבחינת מרכיבי המערכת האנדוקרינית ברמת הגן והחלבון.

תוצאות ניסוי ב'

כפי שמוצג בטבלה מספר 5, הפרות שלא צוננו היו עם צריכת מזון נמוכה יותר ($P = 0.0005$), תנובת חלב נמוכה יותר ($P = 0.02$) ותנובת FCM 4% נמוכה יותר ($P = 0.05$) לעומת הפרות המצוננות. בבחינת מדדי עומס חום, נמצא כי הטמפרטורה הרקטלית הייתה גבוהה יותר הן בבוקר והן אחר הצהריים בפרות שלא צוננו לעומת הפרות המצוננות ($P < 0.0001$). קצב הנשימה של הפרות שלא צוננו היה גם כן גבוה יותר בבוקר ($P = 0.005$), ונטה להיות גבוה יותר בצהריים ($P = 0.08$) לעומת הפרות שצוננו (טבלה מספר 5). כמו כן, משך הרביצה נטה להיות נמוך יותר בפרות שלא צוננו לעומת הפרות המצוננות ($P = 0.11$).

טבלה מספר 5 – מדדי תנובה, צריכת מזון ומדדי עומס חום בפרות שצוננו או לא צוננו בקיץ

P =	SEM	לא מצוננות	מצוננות	
0.0005	0.6	24.8 ^b	28.7 ^a	צריכת מזון, ק"ג/יום
0.02	0.9	28.9 ^b	32.3 ^a	תנובת חלב, ק"ג ליום
0.05	1.4	24.0 ^b	28.1 ^a	חלב מושווה שומן 4%, ק"ג/יום
<0.0001	0.08	38.5 ^a	37.8 ^b	טמפ' רקטלית, בוקר
<0.0001	0.08	39.1 ^a	38.4 ^b	טמפ' רקטלית, אחה"צ
0.005	3.2	43.1 ^a	28.6 ^b	קצב נשימה, נשימות ל-30 שני, בוקר
0.08	3.8	58.6	48.6	קצב נשימה, נשימות ל-30 שני, אחה"צ
0.11	18.7	543.2	586.7	זמן רביצה, דקות ליום

רמות האנדוקנבינואידים ברקמת השומן, בפלסמה ובחלב של פרות שצוננו או לא צוננו בקיץ מופיעות בטבלה מספר 6. כפי שניתן לראות, לא נמצאו הבדלים ברמות האנדוקנבינואידים ברקמת השומן או בפלסמה בין הטיפולים. עם זאת, כאשר בדקנו לראשונה את רמות האנדוקנבינואידים בחלב נמצא כי הריכוזים של האנדוקנבינואיד המרכזי 2-AG נטו להיות גבוהים יותר בפרות שלא צוננו לעומת המצוננות ($P = 0.06$). הרמות של יתר האנדוקנבינואידים בחלב לא נבדלו בין הטיפולים (טבלה מס' 6).

טבלה מספר 6 - רמות אנדוקנבינואידים ברקמת השומן, בפלסמה ובחלב בפרות שצוננו או לא צוננו בקיץ

	לא מצוננות	מצוננות	SEM	P =
רקמת שומן				
AEA, fmol/mg	0.2	0.3	0.06	0.27
2-AG, nmol/mg	159.6	164.2	35.6	0.93
OEA, pmol/mg	25.6	32.3	6.5	0.48
PEA, pmol/mg	6.8	5.2	1.9	0.57
AA, nmol/mg	0.5	0.5	0.1	1.00

פלסמה				
AEA, fmol/mL	99.8	95.2	12.4	0.80
2-AG, nmol/mL	5.1	4.7	0.5	0.57
OEA, pmol/mL	28.8	25.4	6.4	0.71
PEA, pmol/mL	3.1	1.3	1.2	0.31
AA, nmol/mL	186.0	178.8	21.1	0.81
חלב				
AEA, fmol/mL	18.3	13.4	5.6	0.55
2-AG, nmol/mL	50.3*	29.2	7.5	0.06
OEA, pmol/mL	5.6	5.3	0.8	0.80
PEA, pmol/mL	11.0	14.4	1.8	0.20
AA, nmol/mL	58.7	61.6	8.4	0.81

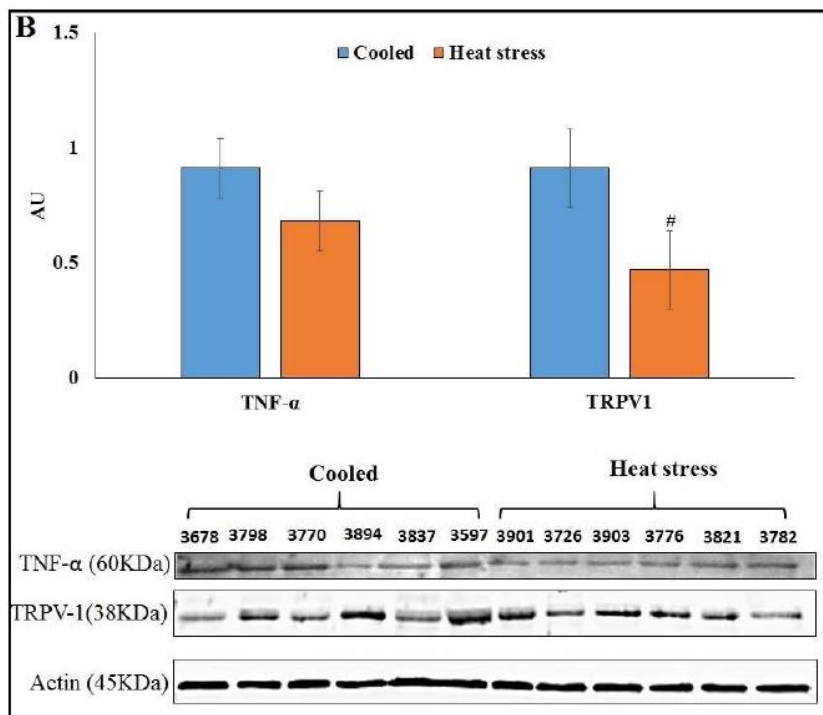
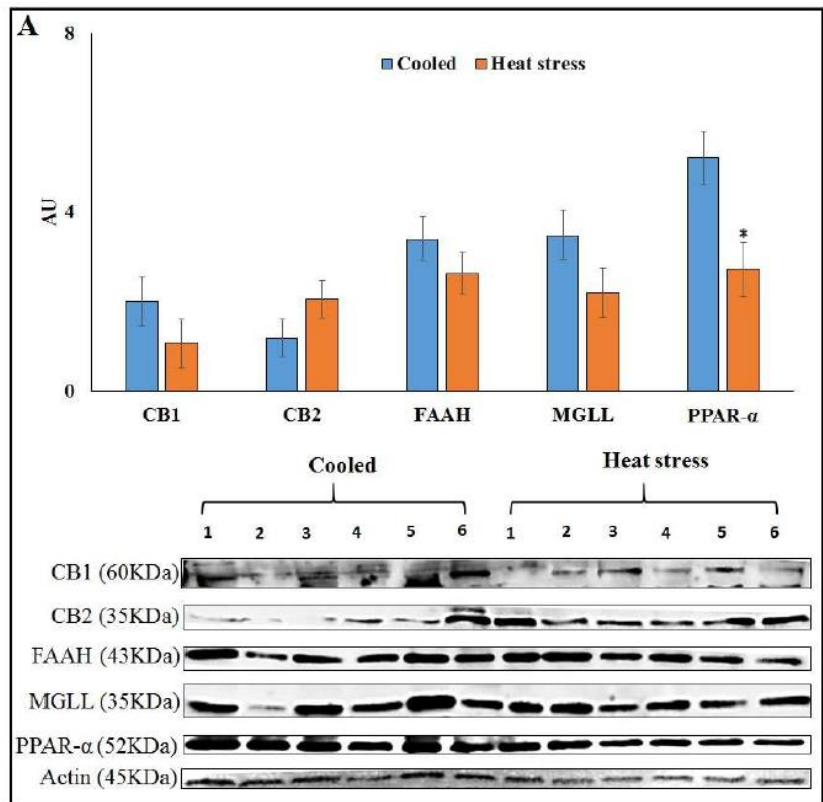
ביטוי גנים וחלבונים ברקמת השומן – ניסוי ב'

בבחינת ביטוי גנים הקשורים ל-ECS, לדלקת ולעקה כימיונית לא נמצאו הבדלים בביטויים ברקמת השומן של פרות שצוננו או לא צוננו (טבלה מספר 7). בבחינת ביטוי חלבונים הקשורים ל-ECS ולדלקת ברקמת השומן, נמצא כי הביטוי של PPAR- α היה נמוך יותר ברקמת השומן של הפרות שלא צוננו לעומת המצוננות ($P = 0.02$), והביטוי של TRPV1 נטה להיות נמוך יותר ברקמת השומן של הפרות שלא צוננו לעומת המצוננות ($P = 0.10$: איור מספר 2). הביטוי של יתר החלבונים לא היה שונה בין רקמות השומן של המצוננות לעומת הלא מצוננות (איור מס' 2).

טבלה מס' 7 – ביטוי גנים ברקמת השומן של פרות שצוננו או לא צוננו בקיץ

RQ	מצוננות	לא מצוננות	SEM	P =
<i>ECS genes</i>				
CB1	0.033	0.030	0.007	0.80
CB2	0.303	0.283	0.038	0.71
MGLL	0.286	0.149	0.091	0.31
FAAH	0.007	0.007	0.002	0.94
NAPEPLD	0.028	0.017	0.007	0.30
PPAR- α	0.096	0.059	0.027	0.38
<i>Inflammatory genes</i>				
TRPV1	0.091	0.080	0.015	0.63
TNF- α	0.004	0.005	0.001	0.73
NFKB	0.045	0.038	0.012	0.68
<i>Oxidative stress genes</i>				
STIP1	0.670	0.691	0.064	0.81
MAP2K	1.116	0.746	0.204	0.23

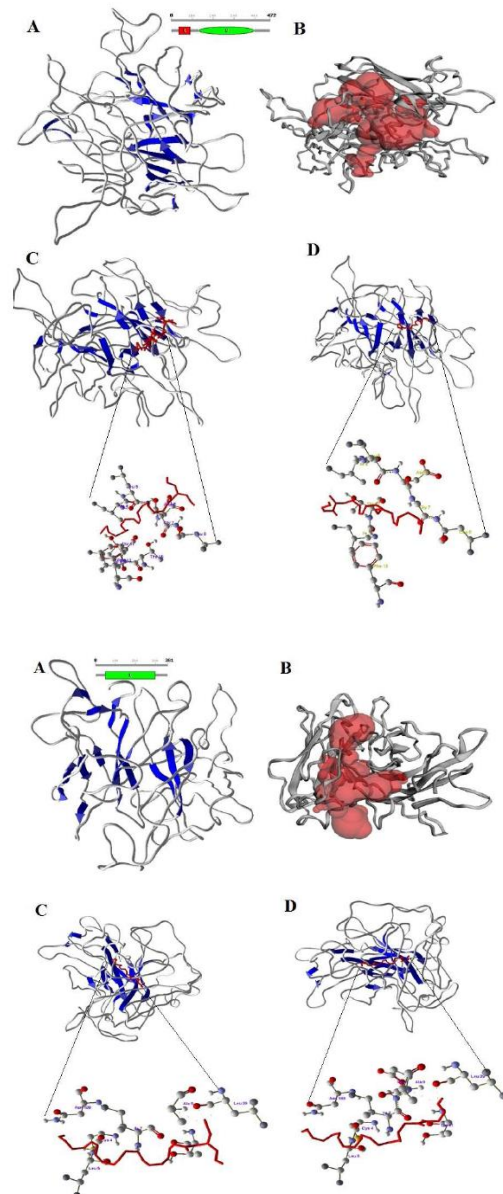
איור מספר 2 – ביטוי חלבונים ברקמת השומן של פרות שצוננו או לא צוננו בקיץ



בחינת הומולוגיה של קולטני ה-ECS בבקר וקשירת אנדוקנבינואידים אליהם

מכיוון שהמבנה התלת מימדי של הקולטנים CB1 ו-CB2 אינו מתואר בבקר, ביצענו מידול של מבנה הקולטנים באמצעות תוכנות Ramachandranplot באמצעות שרת PROCHECK. אתרי הקשירה הצפויים בקולטנים אלו מתוארים באיור מספר 3. כמו כן, בחנו את הקישור הצפוי של האנדוקנבינואידים 2-AG, AEA לקולטנים אלו, כפי שמופיע באיור מספר 3. נמצא כי חומצת האמינו LYS2 ו-ILE16 יצרו קשר מימן חזק עם אנדוקנבינואידים אלו. על סמך ממצאים אלו ניתן לקבוע כי קולטני ה-ECS בבקר אכן קושרים באינטראקציה חזקה את האנדוקנבינואידים 2-AG, AEA.

איור מספר 3 – מודל של קולטני ה-ECS בבקר וקשירת אנדוקנבינואידים אליהם



דין

ממצאי המחקר נראה כי עומס חום בקיץ עשוי להשפיע על מרכיבי ה-ECS בפרות חלב כיוון שנמצאה ירידה בביטוי הקולטנים CB1, CB2, TRPV1 וכן בביטוי האנזים MGLL ברקמת השומן של פרות שהמליטו בקיץ לעומת החורף בניסוי א'. עם זאת, רמות האנדוקנבינואידים וביטוי החלבונים של ה-ECS לא היו שונים כך שנראה שהשפעה זו הינה מוגבלת בחשיבותה. בניסוי ב', בו בחנו את רקמת השומן, הדם והחלב של פרות באמצע התחלובה שהיו בתנאי עומס חום (ע"י הפסקת צינונים) לעומת פרות מצוננות, הראינו כי הפסקת הצינונים בהחלט הגבירה את עומס החום אולם לא נמצאו השפעות על רמות האנדוקנבינואידים בדם וברקמת השומן כתוצאה מכך. עם זאת, נמצאו הבדלים מסוימים בביטוי חלבונים שקשורים ל-ECS ברקמת השומן של פרות שלא צוננו. ממצא מעניין וחדשני הוא האפשרות לשינוי ברמות ה-2-AG בחלב של פרות בעומס חום. תוצאות מחקר זה פורסמו לאחרונה (Kra et al., Animals, 2022).

בניסוי הראשון, פרות שהמליטו במהלך עומס חום בקיץ היו עם צריכת מזון נמוכה בחודש הראשון לאחר ההמלטה לעומת פרות שהמליטו בחורף, דבר שיכול להסביר את מאזן האנרגיה השלילי שלהן. תגובה זו של צריכת מזון נמוכה ומאזן אנרגטי שלילי התבטאה גם בניסוי השני עם פרות באמצע התחלובה שהיו לא מצוננות. ידוע כי עומס חום גורם לירידה בצריכת המזון (Shwartz et al., 2009). אחת המגבלות של הניסוי הנוכחי היא שאנחנו לא יכולים לדעת האם השינויים שהבחנו בהם במרכיבי ה-ECS קשורים לירידה בצריכת המזון, או ישירות לעומס החום, או לשניהם יחד. לכן, נדרשים מחקרים נוספים ושימוש במודלים כגון pair feeding בכדי לבחון סוגיה זו. עם זאת, ממצאי מחקר זה מראים כי נראה שיש קשר בין גורמים סביבתיים לבין פעילות מערכת ה-ECS בפרות חלב (Kra et al., 2022). מצאנו ביטוי נמוך של הגן CNR1 (CB1) ברקמת השומן של פרות שהמליטו בקיץ לעומת החורף, אולם לא היו הבדלים בביטוי בפרות לא מצוננות באמצע התחלובה אשר גם ירדו בצריכת המזון לעומת הביקורת. נמצא כי אנטגוניסטים לקולטן CB1 אשר פועלים ברקמות פריפריאליות (ללא מעבר למוח) מורידים צריכת מזון ומשקל גוף במכרסמים (Tam et al., 2010, 2012). ניסוי שנערך בתרנגולות בתנאי עומס חום הראה שיש ירידה ברמות האנדוקנבינואידים בכבד במתאם עם ירידה בצריכת המזון, כיוון שאנדוקנבינואידים המגיעים למוח מעודדים צריכת מזון (Jastrebski et al., 2007). אנו מצאנו ירידה בצריכת המזון בפרות שהמליטו בקיץ, שהיו עם ביטוי נמוך של הקולטן ברקמת השומן אך ללא שינויים ברמות האנדוקנבינואידים בפלסמה או ברקמת השומן: וכן לא מצאנו שינויים בביטוי הקולטן בפרות באמצע התחלובה. ניתן להסביר ממצאים אלו בכך שמדידת האנדוקנבינואידים נעשתה רק במועד אחד בדם וברקמת השומן, וייתכן וזה לא מספיק בכדי למצוא הבדלים בהשפעת עומס חום. כמו כן, ייתכן ופרות בתחילת התחלובה יותר רגישות לשינויים בתפקוד ה-ECS כחלק מההתאמות לתחילת התחלובה, וזאת לעומת פרות באמצע התחלובה. ייתכן וממצאים אלו מצביעים על כך שרמות האנדוקנבינואידים אינם בקשר ישיר וחזק לצריכת המזון בבקר, אולם נדרש מחקר נוסף בנושא.

העדר ההבדל ברמות ה-NEFA וה-MDA בשני הניסויים יכול להצביע על כך שדרגת הליפוליזה ברקמת השומן הייתה מוגבלת בתנאי עומס חום. הנטייה לרמות אינסולין נמוכות יותר בפרות שהמליטו בקיץ הינה במתאם עם צריכת המזון הנמוכה יותר. לא נמצאו הבדלים ברמות הקורטיזול, וממצא זה אינו במתאם עם מחקר קודם בו מצאנו עלייה בקורטיזול בתנאי עומס חום (Zachut et al., 2017). בעבודה קודמת מצאנו כי ביטוי החלבון NQO1 אשר חשוב למסלול ה-Nrf2 oxidative stress response היה גבוה יותר ברקמת השומן של פרות בקיץ לעומת החורף (Zachut et al., 2017), וזה יכול לתמוך בביטוי המוגבר של הגן MAP2K שמצאנו ברקמת השומן בקיץ. יחד, נראה כי היו הבדלים מינוריים ברמת העקה החימצונית בפרות שהמליטו בקיץ, וייתכן וזו סיבה להעדר ההבדל ברמות הקורטיזול.

עומס חום קשור לעלייה במדדי דלקת (Tao et al., 2013, Zhang et al., 2014). במחקר זה מצאנו עלייה בריכוזי ה-TNF α בפלסמה של פרות שהמליטו בקיץ לעומת החורף, וברקמת השומן מצאנו עלייה בביטוי וכן ירידה בביטוי החלבון האנטי-דלקתי PPAR α בקיץ לעומת החורף. אולם, ברמת הגנים לא מצאנו הבדלים בביטוי גנים דלקתיים ברקמת השומן. השינויים ברמת החלבון מצביעים על כך שעומס חום מעלה את רמת הדלקת ברקמת השומן. ייתכן והירידה בביטוי הגנים של מרכיבי ה-MGLL, ECS, TRPV1, CNR1, הינם חלק מההתאמות הפיזיולוגיות של רקמת השומן לתחילת התחלובה, אולם דרוש מחקר נוסף בנושא. במחקר אחר נמצא ביטוי גבוה יותר של IL-1 β , IL-6, TNF α יחד עם עלייה בביטוי CB2 ו-NAPEPLD וביטוי נמוך יותר של FAAH ברקמת השומן של פרות שהיו עם ליפוליזה מוגברת לעומת פרות שפירקו פחות שומן לאחר ההמלטה (Dirandeh et al., 2020). ממצא זה הינו במתאם עם מחקרנו הקודם בו מצאנו נטייה לביטוי גבוה יותר של מרכיבי ECS בפרות שאיבדו יותר משקל לאחר ההמלטה והיו עם רמות TNF α גבוהות יותר (Zachut et al., 2018). מכאן, שיש לבצע מחקר נוסף בכדי לאשש את התפקיד של ה-ECS במצבי דלקת בבקר לחלב, ובפרט במצבי עומס חום. במחקר זה, מצאנו ירידה בביטוי הגן לקולטן TRPV1 ברקמת השומן של פרות שהמליטו בקיץ לעומת החורף. הקולטן TRPV1 בעל תפקיד בהעברת תחושת חום חיצוני (Gavva et al., 2005), והוא מבוטא ברקמת השומן. ידוע כי בנוסף לגירוי של חום, גם האנדוקנבינואיד AEA נקשר לקולטן זה (Szallasi et al., 2007), ולכן ייתכן והוא מהווה צומת בקשר בין מערכת ה-ECS למצבי עומס חום סביבתי. לכן, יש לבצע מחקר נוסף ולבחון את הקשר של הקולטן TRPV1 למערכת ה-ECS במצבי עקה בבקר.

כדי לבחון את האינטראקציה של האנדוקנבינואידים 2-AG ו-AEA עם הקולטנים CB1 ו-CB2 בבקר, השתמשנו בשיטת *in silico* למידול ובחינת הקשירה שלהם לקולטנים. ממצאינו מראים לראשונה כי קולטני ה-ECS אכן קושרים אנדוקנבינואידים אלו בבקר, ומספקים מידע על חומצות האמינו הספציפיות שמעורבות בקשירה זו. נדרש מחקר נוסף בכדי לבחון את התפקוד של הקולטנים לאחר קשירת אנדוקנבינואידים אליהם בבקר.

במחקר הנוכחי בחנו את רמות האנדוקנבינואידים בפלסמה, ברקמת השומן ובחלב. למרות שלא מצאנו הבדלים משמעותיים ברמות האנדוקנבינואידים בין הטיפולים, מחקר זה הינו הראשון בזיהוי

אנדוקנבינואידים בחלב, פלסמה ורקמת שומן של פרות חלב בעונת הקיץ. במחקר קודם זהו אנדוקנבינואידים בחלב של פרות מזנים שונים (Gouveia-Figueira et al., 2015), וברקמות לב וכבד של עגלות לאחר שחיטה (Gouveia-Figueira et al., 2016), בשיטות אנליטיות דומות לאלו שביצענו במחקר זה. לאחרונה תוארו רמות אנדוקנבינואידים בפלסמה בפרות סביב ההמלטה (Kuhla et al., 2020), והן דומות לערכים שמצאנו במחקר זה. במחקר הנוכחי לא מצאנו הבדל ברמות ה-AEA ברקמת השומן של פרות בעומס חום, למרות שריכוזי ה-AEA היו כפולים ברקמת השומן בקיץ לעומת החורף. מעניין במיוחד לציין כי רמות ה-2-AG בחלב נטו להיות גבוהות יותר בפרות שלא צוננו לעומת המצוננות, דבר המעיד שיש לבחון את רמות האנדוקנבינואידים בחלב ודם במחקרים נוספים בכדי לבחון את תפקידם כביומרקרים בבקר (Kra et al., 2022).

מסקנות

ממצאי מחקר זה מראים כי עומס חום סביבתי, באופן ישיר או דרך ירידה בצריכת המזון, משפיע באופן מוגבל על מרכיבי ה-ECS ברקמת השומן של פרות, וייתכן והקולטן TRPV1 מעורב בקשר בין מערכת ה-ECS ועומס חום. ממצאי המחקר תומכים בכך שאנדוקנבינואידים ניתנים לבחינה בדם, ברקמות ובחלב, ואנו ממליצים על המשך המחקר על מנת לבסס את תפקידם כביומרקרים אפשריים בפרות חלב, בפרט במצבי עקה.

רשימת ספרות

- Bell, A.W., and D.E. Bauman. 1997. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2:265–78.
- Bensaid, M., M. Gary-Bobo, A. Esclançon, J.P. Maffrand, G. Le Fur, F. Oury-Donat, and P. Soubrié. 2003. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol. Pharmacol.* 63:908–14.
- Blüher, M., S. Engeli, N. Klötting, J. Berndt, M. Fasshauer, S. Bátkai, P. Pacher, M.R. Schön, J. Jordan, and M. Stumvoll. 2006. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes* 55:3053–60.
- Bradford, B.J., K. Yuan, J.K. Farney, L.K. Mamedova, and A.J. Carpenter. 2015. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *J. Dairy Sci.* 98:6631–50.
- Cable, J.C., G.D. Tan, S.P. Alexander, and S.E. O Sullivan. 2014. The effects of obesity, diabetes and metabolic syndrome on the hydrolytic enzymes of the endocannabinoid system in animal and human adipocytes. *Lipids Health Dis.* 13:43.
- Cota, D., G. Marsicano, M. Tschöp, Y. Grübler, C. Flachskamm, M. Schubert, D. Auer, A. Yassouridis, C. Thöne-Reineke, S. Ortman, F. Tomassoni, C. Cervino, E. Nisoli, A.C.E. Linthorst, R. Pasquali, B. Lutz, G.K. Stalla, and U. Pagotto. 2003. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J. Clin. Invest.* 112:423–31.
- Cristino, L., T. Becker, and V. Di Marzo. 2014. Endocannabinoids and energy homeostasis: An update. *BioFactors* 40:389–397.
- Dirandeh, E.; Ghorbanalinia, M.; Rezaei-Roodbari, A.; Colazo, M.G. 2020. Relationship between body condition score loss and mRNA of genes related to fatty acid metabolism and the endocannabinoid system in adipose tissue of periparturient cows. *Animal*, 14, 1724–1732.
- Drackley, J.K. 1999. ADSA Foundation Scholar Award. *Biology of dairy cows during the transition*

- period: the final frontier?. *J. Dairy Sci.* 82:2259–73.
- Gavva, N.R. 2008. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. *Trends Pharmacol. Sci.* 29:550–557.
- Ge, Q., E. Maury, L. Rycken, J. Gérard, L. Noël, R. Detry, B. Navez, and S.M. Brichard. 2013. Endocannabinoids regulate adipokine production and the immune balance of omental adipose tissue in human obesity. *Int. J. Obes. (Lond)*. 37:874–80.
- Gouveia-Figueira, S., and M.L. Nording. 2014. Development and Validation of a Sensitive UPLC-ESI-MS/MS Method for the Simultaneous Quantification of 15 Endocannabinoids and Related Compounds in Milk and Other Biofluids. *Anal. Chem.* 86:1186–1195.
- Gouveia-Figueira, S.; Nording, M.L. 2014. Development and validation of a sensitive UPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of 15 endocannabinoids and related compounds in milk and other biofluids. *Anal. Chem.* 86, 1186–1195.
- Gouveia-Figueira, S.; Nording, M.L. 2015. Validation of a tandem mass spectrometry method using combined extraction of 37 oxylipins and 14 endocannabinoid-related compounds including prostamides from biological matrices. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 121, 110–121.
- Howlett, A.C. 1995. Pharmacology of Cannabinoid Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35:607–634.
- Jastrebski, S.F., S.J. Lamont, and C.J. Schmidt. 2017. Chicken hepatic response to chronic heat stress using integrated transcriptome and metabolome analysis. *PLoS One* 12:e0181900.
- Jo, Y.-H., Y.-J.J. Chen, S.C. Chua, D.A. Talmage, and L.W. Role. 2005. Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit. *Neuron* 48:1055–66.
- Joyeux, M., C. Arnaud, D. Godin-Ribuot, P. Demenge, D. Lamontagne, and C. Ribuot. 2002. Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc. Res.* 55:619–25.
- Kano, M., T. Ohno-Shosaku, Y. Hashimoto-dani, M. Uchigashima, and M. Watanabe. 2009. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* 89:309–80.
- Kempf, K., J. Hector, T. Strate, B. Schwarzloh, B. Rose, C. Herder, S. Martin, and P. Algenstaedt. 2007. Immune-mediated Activation of the Endocannabinoid System in Visceral Adipose Tissue in Obesity. *Horm. Metab. Res.* 39:596–600.
- Kra G, Daddam JR, Moallem U, Kamer H, Ahmad M, Nemirovski A, Contreras GA, Tam J, Zachut M. 2022. Effects of Environmental Heat Load on Endocannabinoid System Components in Adipose Tissue of High Yielding Dairy Cows. *Animals (Basel)*.12(6):795.
- Kuhla, B.; Kaefer, V.; Tuchscherer, A.; Kuhla, A. 2020. Involvement of Plasma Endocannabinoids and the Hypothalamic Endocannabinoid System in Increasing Feed Intake after Parturition of Dairy Cows. *Neuroendocrinology*, 110, 246–257.
- Lipina, C., W. Rastedt, A.J. Irving, and H.S. Hundal. 2012. New vistas for treatment of obesity and diabetes? Endocannabinoid signalling and metabolism in the modulation of energy balance. *Bioessays* 34:681–91.
- Di Marzo, V., F. Piscitelli, and R. Mechoulam. 2011. Cannabinoids and endocannabinoids in metabolic disorders with focus on diabetes. *Handb. Exp. Pharmacol.* 75–104.
- Mechoulam, R., S. Ben-Shabat, L. Hanus, M. Ligumsky, N.E. Kaminski, A.R. Schatz, A. Gopher, S. Almog, B.R. Martin, and D.R. Compton. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50:83–90.
- Nunn, A.V.W., G.W. Guy, and J.D. Bell. 2010. Endocannabinoids, FOXO and the metabolic syndrome: Redox, function and tipping point – The view from two systems. *Immunobiology* 215:617–628.
- Pertwee, R.G., and R.A. Ross. 2002. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* 66:101–121.
- Riebe, C.J., and C.T. Wotjak. 2011. Endocannabinoids and stress. *Stress* 14:384–397.
- Roche, R., L. Hoareau, S. Bes-Houtmann, M.-P. Gonthier, C. Laborde, J.-F. Baron, Y. Haffaf, M. Cesari, and F. Festy. 2006. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem. Cell Biol.* 126:177–87.
- Sadri, H., R.M. Bruckmaier, H.R. Rahmani, G.R. Ghorbani, I. Morel, and H.A. Van Dorland. 2010. ORIGINAL ARTICLE: Gene expression of tumour necrosis factor and insulin signalling-related

- factors in subcutaneous adipose tissue during the dry period and in early lactation in dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 94:e194–e202.
- Shwartz, G.; Rhoads, M.L.; VanBaale, M.J.; Rhoads, R.P.; Baumgard, L.H. 2009. Effects of a supplemental yeast culture on heat-stressed lactating Holstein cows¹. *J. Dairy Sci.* 2009, 92, 935–942.
- Silvestri, C., and V. Di Marzo. 2013. The Endocannabinoid System in Energy Homeostasis and the Etiopathology of Metabolic Disorders. *Cell Metab.* 17:475–490. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.001.
- Silvestri, C., A. Ligresti, and V. Di Marzo. 2011. Peripheral effects of the endocannabinoid system in energy homeostasis: adipose tissue, liver and skeletal muscle.. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 12:153–62. doi:10.1007/s11154-011-9167-3.
- Sugiura, T., S. Kondo, A. Sukagawa, S. Nakane, A. Shinoda, K. Itoh, A. Yamashita, and K. Waku. 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain.. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:89–97.
- Szallasi, A.; Cortright, D.N.; Blum, C.A.; Eid, S.R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. 2007. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 357–372.
- Tam, J.; Vemuri, V.K.; Liu, J.; Bátkai, S.; Mukhopadhyay, B.; Godlewski, G.; Osei-Hyiaman, D.; Ohnuma, S.; Ambudkar, S.V.; Pickel, J.; et al. 2010. Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J. Clin. Investig.* 120, 2953–2966.
- Tam, J.; Cinar, R.; Liu, J.; Godlewski, G.; Wesley, D.; Jourdan, T.; Szanda, G.; Mukhopadhyay, B.; Chedester, L.; Liow, J.-S.; et al. 2012. Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing leptin resistance. *Cell Metab.* 16, 167–179.
- Tao, S.; Dahl, G.E. Invited review: Heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves. 2013. *J. Dairy Sci.* 96, 4079–4093.
- Wu, J., S. Gouveia-Figueira, M. Domellöf, A.M. Zivkovic, and M.L. Nording. 2016. Oxylipins, endocannabinoids, and related compounds in human milk: Levels and effects of storage conditions. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 122:28–36.
- Zachut, M.; Kra, G.; Livshitz, L.; Portnick, Y.; Yakoby, S.; Friedlander, G.; Levin, Y. 2017. Seasonal heat stress affects adipose tissue proteome toward enrichment of the Nrf2-mediated oxidative stress response in late-pregnant dairy cows. *J. Proteom.* 158, 52–61.
- Zachut, M.; Kra, G.; Moallem, U.; Livshitz, L.; Levin, Y.; Udi, S.; Nemirovski, A.; Tam, J. 2018. Characterization of the endocannabinoid system in subcutaneous adipose tissue in periparturient dairy cows and its association to metabolic profiles. *PLoS ONE* 13, e0205996.
- Zhang, F.J.; Weng, X.G.; Wang, J.F.; Zhou, D.; Zhang, W.; Zhai, C.C.; Hou, Y.X.; Zhu, Y.H. 2014. Effects of temperature-humidity index and chromium supplementation on antioxidant capacity, heat shock protein 72, and cytokine responses of lactating cows. *J. Anim. Sci.* 92, 3026–3034.