

שם המחקר:

מתן לקטופרין להפחתת חדירות המעי לפתוגנים וכאמצעי אימונו-מודולטורי לשיפור ההתמודדות של פרות חלב עם עקה בתנאי עומס חום

הנהלת ענף בקר לחלב - ועדת פיסולוגיה ורבייה

שם החוקר: ד"ר מאיה זכות - המחלקה לבקר וצאן, המכון לחקר בע"ח, מנהל המחקר החקלאי, ראשל"צ.

mayak@volcani.agri.gov.il

תקציר מדעי

רקע מדעי: בפרות המצויות בתנאי עומס חום ישנה עלייה בעקה החמצונית ובמדדים דלקתיים בדם וכן עלייה בחדירות המעי לפתוגנים – המכונה בספרות "Leaky gut" - אשר פוגעים ברווחת החיה, בריאותה ובביצועיה. במצב של leaky gut בעקבות עומס חום ישנה פגיעה בתפקוד שכבת הגבול של המעי אשר מאפשרת חדירה של חיידקים משחירי LPS לדם, הגורמת לאנדו-טוקסמיה תת-קלינית. עלייה במעבר של LPS למערכת הדם הינה אחד מן הגורמים לעלייה בתחלואה של בע"ח. אפשרות שטרם נחקרה בישראל לשיפור ההתמודדות עם עומס חום היא ע"י שמירה על תפקוד תקין של המעי. במחקר זה נבחן אסטרטגיות חדשניות לשיפור יכולת ההתמודדות של פרות עם עומס חום באמצעות מתן נוגדי חמצון כגון המיקרו-נוטריינט לקטופרין או מתן נוגדי חמצון ממקור צמחי. לקטופרין הינו מרכיב בחלב פרה אשר ידוע ביכולתו לשפר את עמידות המעי לחדירת פתוגנים בבע"ח, וכן להפחית סימני עקה ודלקת, וטרם נחקר בבקר בישראל. לאור ניסויים הקדמיים שביצענו, אנו צופים כי מתן נוגדי חמצון כגון לקטופרין או נוגדי חמצון ממקור צמחי ישפרו את יכולת ההתמודדות של פרות גבוהות תנובה עם עומס חום. המחקר המוצע יתמקד בשני אספקטים פיזיולוגיים שנגרמים כתוצאה מעומס חום בבקר: עלייה בחדירות המעי המובילה לאנדו-טוקסמיה תת-אקוטית, ועלייה בעקה חימצונית ובמדדי דלקת תת-אקוטית. בשנים האחרונות ביססנו במעבדה ביומרקרים לעקה בדם אשר יכולים לשמש לניטור עקה ורווחת החיה בדם פרות בתנאי עומס חום (פירוט הביומרקרים בטבלה מס' 1). כמו כן באמצעות מדידת ריכוזי החלבון LPS-binding protein (LBP) בדם ניתן לבחון באופן עקיף את ה-Leaky gut ואת מידת חדירות המעי לפתוגנים.

מטרות המחקר: 1. לבחון האם מתן נוגד החמצון לקטופרין במנה יעלה את רמות הלקטופרין בדם של עגלות. 2. לבחון האם מתן נוגדי חמצון במנה של פרות בתנאי עומס חום בקיץ ישפיע על רמות מדדי עקה חימצונית, מדדי חדירות המעי לפתוגנים (LBP) ומדדי עקה בדם. 3. השפעת מתן נוגדי חמצון על הייצור, צריכת המזון, ומדדי רווחה של פרות חלב בתנאי עומס חום.

הפעלת המחקר: בשנה הראשונה בוצע ניסוי בו בחנו האם מתן אבקת קולוסטרומ מעלה את רמות הלקטופרין בדם עגלות. בניסוי השתתפו 15 עגלות בנות 6 חודשים ברפת וולקני שחולקו ל-2 טיפולים: (1) ביקורת – מנת העגלות הניתנת בעדר. (2) תוספת אבקת קולוסטרומ- 50 גרם ליום של אבקת קולוסטרומ, ניתן מעל המזון הרגיל מדי יום בשעת ההאבסה (10:00). הניסוי נמשך 7 ימים, ונלקחו דגימות דם בשעה 10:30 וכן בשעה 14:00 מוריד הצוואר בימים 1, 4, 7 לבחינת רמות לקטופרין בדם, וכן באבקת הקולוסטרומ. כמו כן, בחנו בדם את רמות העקה החימצונית. בעקבות קשיים טכניים בביצוע מחקר המשך עם תוסף לקטופרין, כפי שמוסבר בהמשך, קיבלנו את אישור הוועדה להמשיך את המחקר בביצוע ניסוי עם נוגדי חמצון ממקור צמחי לשם השלמת יעדי המחקר. לשם כך, ביצענו ניסוי בו השתתפו 18 פרות ברפת הפרטנית בוולקני למשך 3 שבועות בעונת הקיץ. הפרות חולקו ל-2 טיפולים: (1) ביקורת - מנת העדר הרגילה. (2) תוסף נוגדי חמצון (AXT) – מנת העדר בתוספת 150 ג'יום נוגדי חמצון ממקור צמחי (CCPA Axion Thermoplus, צרפת). נלקחו דגימות דם פעמיים בשבוע לבחינת רמות מדדי עקה ודלקת תת-אקוטית ומידת החדירות של המעי לפתוגנים (עפ"י ריכוזי LPS binding protein). כמו כן, נלקחו ביופסיות שומן ל-5 פרות מכל קבוצה לניתוח ביטוי גנים וחלבונים של עקה חימצונית ברקמת השומן. בסיים הניסוי נאספו נתוני ייצור, צריכת מזון וכן נתוני רווחה התנהגותיים (רביצה, העלאת גרה). בשנת המחקר השלישית בוצעו אנליזות פרוטאומיקה וביואינפורמטיקה לבחינת המסלולים העיקריים שהושפעו מהטיפול התזונתי ברקמת השומן וסוכמו ממצאי המחקר.

תוצאות: במהלך הניסוי הראשון, בבחינת ריכוזי הלקטופרין בפלסמה לא נמצאו הבדלים בין עגלות הביקורת לעגלות הטיפול באבקת קולוסטרומ. העדר העלייה הצפויה ברמתו עשויה לנבוע ממגוון גורמים כמו עיכול חלקי בכרס או זמן מחצית החיים של לקטופרין בדם. בניסוי השני עם נוגדי החמצון ממקור צמחי, נמצא כי תנובת החלב ו-4% FCM היו דומים בין הטיפולים במהלך הניסוי. לא נמצאו הבדלים בהרכב מוצקי החלב בין קבוצות הטיפול. אולם, נמצא שאחוז השעות שהטמפ' הוגינלית היה גבוה מ-39 מעלות צלסיוס היה נמוך יותר בטיפול AXT לעומת הביקורת. כמו כן, זמן הרומינציה וזמן הרביצה היו גבוהים יותר בטיפול AXT לעומת הביקורת. בבחינת מדדי עקה בדם, לא נמצאו הבדלים בין קבוצות הטיפול בריכוזי HP, קורטיזול, MDA, LBP, NEFA, ו-TNFa. ברקמת השומן, ביטוי הגן LBP נטה להיות גבוה יותר ברקמת השומן של פרות ה-AXT לעומת הביקורת. בבחינת ביטוי חלבונים ברקמת השומן, נמצא שביטוי הקולטן TRPV1 היה גבוה יותר ברקמת השומן של AXT לעומת הביקורת, וכן ביטוי החלבון LBP היה גבוה יותר ב-AXT לעומת הביקורת. תוצאות אנליזת הפרוטאומיקה של רקמת השומן הראו ביטוי של 2395 חלבונים, מתוכם 16 חלבונים היו שונים בביטויים ברקמת השומן של AXT לעומת הביקורת. מספר חלבונים שקשורים למסלולי עקה חימצונית היו עם ביטוי גבוה יותר ברקמת השומן של AXT לעומת הביקורת- microsomal glutathione S- peroxidase [fold change (FC) = 1.6, P = 0.05], and heme oxygenase 1 (FC = 3.6, P = 0.03) ו-transferase 2 (FC = 2.5, P = 0.05). בבחינת

המסלולים העיקריים שהועשרו על סמך החלבונים שנבדלו ברקמת השומן של פרות ה-AXT לעומת הביקורת, נמצא כי המסלולים העיקריים היו: Heme degradation, Xenobiotic metabolism general signaling pathway, Endothelin-1 signaling, Nrf2-mediated oxidative stress response, LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR function, Choline biosynthesis III, Leukotriene biosynthesis, Xenobiotic metabolism signaling and Glutathione redox reactions I. כמו כן, נמצא כי חלבונים הקשורים למסלול ה-Nrf2 oxidative stress response היו הרשת המרכזית שהושפעה מטיפול ה-AXT.

דין: ממצאי המחקר מראים כי מתן תוסף שמכיל נוגדי חמצון צמחיים המכיל פוליפנולים צמחיים מתה ירוק (Cammelia sinensis), צילי אדום (Capsicum) ו-fenugreek בכמות של 150 גרם ליום לפרות באמצע תחלובה בעומס חום בקיץ לא העלה את ייצור החלב, אבל גרם לשיפור רווחת החיה על ידי ירידה במספר השעות ביום שהפרות מצויות בטמפ' וגינלית של מעל 39 מעלות, ולשיפור במדדי עקה התנהגותיים לעומת הביקורת. זהו המחקר הראשון שבוחן את השפעת פוליפנולים צמחיים על ביטוי גנים וחלבונים ברקמת השומן בפרות חלב בתנאי עקת חום. מצאנו כי ביטוי הגן והחלבון LBP שהינו חלבון acute phase protein, היה גבוה יותר ברקמת השומן של פרות AXT לעומת הביקורת. עלייה ברמתו בניסוי זה יכולה להיות קשורה לתגובה אנטי-דלקתית ברקמה. בנוסף, שניים מהמסלולים המועשרים לפי האנליזה הפרוטאומית היו ה-acute phase signaling and LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR function, אשר תומכים בהשערה של תגובה אנטי-דלקתית ברקמת השומן בהשפעת טיפול ה-AXT. בנוסף, ברקמת השומן מצאנו עלייה בביטוי חלבונים ועלייה בהעשרת מסלולים הקשורים ל-Nrf2 oxidative stress response בפרות ה-AXT לעומת הביקורת. ממצאי המחקר תומכים בהנחה שתוספת של נוגדי חמצון ספציפיים שמקורם בצמח משפיעה על אלמנטים של תגובת עקה חמצונית ברקמתה שומן, אולי כחלק ממנגנון הגנה במהלך עקת חום בקיץ. לסיכום, תוצאות המחקר מעודדות ומצביעות לראשונה על תוסף תזונתי שיכול להועיל בהורדת טמפ' הגוף בפרות בתנאי עומס חום סביבתי, ולשפר מדדי רווחה התנהגותיים. אנו ממליצים להמשיך את המחקר ולבחון את ההשפעה של נוגדי חמצון צמחיים בפרות המצויות בעקה מטבולית, כגון פרות בתחילת התחלובה, וכן ברפתות מסחריות עם מספר פרטים גדול. כמו כן, יש להמשיך לחקור את המנגנונים המולקולריים בבסיס השפעות אלו בפרות בתנאי עומס חום.

מבוא ותיאור הבעיה

למרות השימוש הנרחב באמצעי צינון ממשקיים, עדיין ישנה עלייה במדדי עקה ופגיעה בפוריות ולרוב גם ביצרנות בבקר לחלב בתנאי עומס חום בישראל ובעולם. כמו כן, ממשק הצינונים האינטנסיבי מלווה בהוצאה כלכלית רבה עקב שימוש רב במים, חשמל וכוח אדם, ועומס גדול על פינוי השפכים אשר פוגע באיכות הסביבה. ההשפעות השליליות של עומס חום סביבתי צפויות להחמיר בעקבות ההתחממות הגלובלית, כאשר במקביל, עם העלייה בילודה והצפי למשבר מזון עולמי בעשורים הבאים קיימת דרישה הולכת ועולה לאספקת מקורות חלבון איכותיים (מוצרי חלב ובשר) להזנת האדם. פרות חלב גבוהות תנובה הינן רגישות במיוחד לעומס חום בגלל ייצור החום המטבולי המוגבר, והעלייה בתנובות החלב בשנים הבאות עלולה להחמיר את המצב. לאור זאת, ישנה חשיבות רבה לפיתוח אמצעים חדשניים לשיפור יכולת ההתמודדות של פרות חלב גבוהות תנובה עם עומס חום. בשנים האחרונות ביססנו במעבדה מספר ביומרקרים לעקה הניתנים למדידה בדם, אשר יכולים לשמש לניטור יכולת ההתמודדות של פרות עם עקה ורווחת החיה בתנאי עומס חום. פרט לשיפור ממשק הצינונים ברפת, האפשרות היישומית ביותר לשיפור ההתמודדות עם עקה בפרות חלב הינה באמצעות אספקת תוספי מזון בעלי מרכיבים פעילים למנה. ידוע כי בפרות המצויות בתנאי עומס חום ישנה עלייה בעקה החימצונית ובמדדים דלקתיים בדם, וכן עלייה בחדירות המעי לפתוגנים – מצב המכונה "Leaky gut" - אשר פוגעים ברווחת החיה, בריאותה ובביצועיה. אפשרות חדשנית שטרם נחקרה בישראל לשיפור ההתמודדות עם עומס חום היא ע"י שמירה על תפקוד תקין של המעי. עקת חום פוגעת בתפקוד שכבת הגבול במעי, עקב פגיעה באנתרוציטים ועלייה בחדירות המעי לפתוגנים (1). עלייה במעבר של מרכיבים מיקרוביאליים כגון LPS למערכת הדם הינה אחד מן הגורמים לעלייה בתחלואה של בע"ח בתנאי עקת חום. מכאן, שפיתוח אסטרטגיות לשמירה על תפקוד תקין של המעי ולהפחתת החדירה של LPS לגוף החיה עשויה לשפר באופן ניכר את היצרנות ורווחת בע"ח במצבי עומס חום סביבתי. עד כה לא נעשו בארץ עבודות מחקר שבחנו את האספקט של leaky gut.

ישנן עדויות רבות לכך שהזנת בע"ח והאדם במוצרי חלב משפרת את בריאות המעי (2-4), ומוצרי חלב הפחיתו את ההשפעה השלילית של עקת חום על תפקוד שכבת הגבול במעי בעכברים (5) ובאדם (6). המיקרו-נטריינט המרכזי במוצרי חלב אשר מתווך את ההשפעות החיוביות על תפקוד המעי הוא לקטופרין. לקטופרין הינו נוגד חמצון שידוע בסגולות אנטי-דלקתיות וכאנטי-מיקרוביאלי, עקב יכולתו לקשור ברזל מנוזלים ביולוגיים ולערער ממברנות של מיקרו-אורגניזמים. בנוסף, לקטופרין הוא אימונו-מודולטורי באמצעות פעולתו על ייצור ציטוקינים וכימוקינים, בקרה על ייצור reactive oxygen species וגיוס תאי חיסון (7). יתרה מכך, לקטופרין ידוע כקושר מולקולות LPS (8). חשוב לציין כי הקהילה המדעית סימנה את לקטופרין כמועמד מבטיח למלחמה בעמידות לאנטיביוטיקה לאור פעילותו האנטי-מיקרוביאלית,

ולאחרונה הוצע כי לקטופרין יכול לשמש כתוסף מזון לבע"ח אשר יפחית את השימוש באנטיביוטיקה ויחזק את מערכת החיסון (8). אכן, בניסוי ראשוני ביפן מתן 10 ג'יום של לקטופרין לפרות חלב לאחר ההמלטה (מצב בו חדירות המעי מוגברת, Leaky gut) הפחיתה את פעילות LPS בכרס וכן את רמות ה-LBP בדם (9). לאור זאת, אנו מציעים לבחון את השימוש בנוגד החמצון לקטופרין כאמצעי חדשני להפחתת עקה ושיפור רווחת בקר בתנאי עומס חום. המחקר יתמקד בשני אספקטים פיזיולוגיים שנגרמים כתוצאה מעומס חום בבקר: עלייה בעקה חמצונית ובמדדי דלקת תת-אקוטית, ועלייה בחדירות המעי המובילה לאנדו-טוקסמיה תת-אקוטית. אבקת קולוסטרומ הינה מקור ללקטופרין, כך שניתן לבחון את ההשפעה של העשרת המנה בלקטופרין ממקורות אלו על בתנאי עומס חום. כראיה, לאחרונה נמצא כי הזנת פרות לאחר ההמלטה במי גבינה שיפחה את יעילות הייצור ואת הפרופיל המטבולי (10). בסדרת ניסויים הקדמיים במעבדתנו, מצאנו כי רמות החלבון LBP בדם הוא גבוה יותר בפרות עם סימני דלקת גבוהים לאחר ההמלטה בעונת הקיץ לעומת עונת החורף ($P < 0.05$), כך שישנה עלייה באנדו-טוקסמיה תת קלינית הקשורה ל-LPS בפרות בקיץ (תזה של נטלי נבון, אוניברסיטת בר אילן, 2018). כמו כן, בפרוטאומיקה של רקמת השומן בקיץ נמצא ביטוי גבוה יותר של LBP לעומת החורף (11).

האפשרות השנייה לשיפור ההתמודדות עם עומס חום היא ע"י הפחתת עקה חמצונית ומדדי דלקת תת אקוטית, באמצעות מטבוליטים משניים מצמחים הידועים כנוגדי חימצון ובעלי השפעה אנטי-דלקתית. אכן, בעבודות במכרסמים ובצאן, מטבוליטים משניים צמחיים גרמו להפחתת עקה חמצונית והורדת ריכוזי ציטוקינים פרו-דלקתיים (12,13). בפרות חלב, מתן מטבוליטים משניים מצמחים הפחיתה עקה חמצונית, והוצע כי ההשפעה של מטבוליטים משניים תהיה יעילה יותר בבע"ח בעקה פיזיולוגית או אקלימית (14).

מטרות המחקר

1. לבחון האם מתן נוגד החמצון לקטופרין יעלה את רמות הלקטופרין בדם של עגלות.
2. לבחון האם מתן נוגדי חמצון ממקור צמחי במנה של פרות בתנאי עומס חום בקיץ ישפיע על רמות מדדי עקה חמצונית, מדדי חדירות המעי לפתוגנים (LBP) ומדדי עקה בדם.
3. השפעת מתן נוגדי חמצון על הייצור, צריכת המזון, ומדדי רווחה של פרות חלב בתנאי עומס חום.

מהלך המחקר

בשנת המחקר הראשונה ביצענו ניסוי בו בחנו האם מתן אבקת קולוסטרומ המכילה לקטופרין מעלה את רמות הלקטופרין בדם עגלות. בניסוי השתתפו 15 עגלות בנות 6-7 חודשים ברפת וולקני שחולקו לטיפולים:

(1) ביקורת – 5 עגלות קיבלו את מנת העגלות המקובלת בעדר.

(2) אבקת קולוסטרומ – 10 עגלות קיבלו 50 גרם ליום של אבקת קולוסטרומ (Saskatoon colostrum Company Ltd, Calfs Choice Total).

התוסף ניתן באופן פרטני ועורבב בחלק העליון של הבלייל מדיי יום, לאחר הרחקת בליל העגלות מדיי בוקר בשעה 07:00 ולאחר מכן מתן אבקת הקולוסטרומ באופן פרטני לכל עגלה בקבוצה לאחר ערבוב עם כמות קטנה של בליל עגלות. בימים 4 ו-8 נתנו כמות כפולה של אבקת קולוסטרומ לעגלות הטיפול, על ידי מתן מנה נוספת של 50 גרם אבקה בשעה 13:30 לפני לקיחת הדם השנייה. העגלות חולקו לקבוצות מאוזנות לפי גילן שבוע לפני התחלת טיפול ההזנה לשם הרגלה לקבוצה החדשה.

מתן תוסף הקולוסטרומ נמשך 8 ימים, ומכל העגלות נלקחו דגימות דם בימים 1,4,8 לניסוי לבחינת רמות הלקטופרין בדם באמצעות קיט ELISA. הדגימות נלקחו בשעה 10:00 ובשני מועדים גם בשעה 14:00. במעבדה, בחנו את רמות הלקטופרין בדם ובאבקת הקולוסטרומ באמצעות ELISA.

תוצאות ניסוי א': במהלך הניסוי עקבנו אחר אכילת התוסף הפרטנית על ידי העגלות והן אכלו את אבקת הקולוסטרומ מיד עם הגשת המזון. אולם, בבחינת ריכוזי הלקטופרין בפלסמה לא נמצאו הבדלים בין עגלות הביקורת לעגלות הטיפול באבקת קולוסטרומ (22.7 לעומת 18.2 ng/ml, SEM = 4.5, P = 0.5). בניסוי זה גם בחנו את ריכוז הלקטופרין באבקת הקולוסטרומ מכיוון שלא היה קיים מידע על נתון זה אצל היצרן. נמצא כי אבקת הקולוסטרומ הכילה לקטופרין בריכוז של 132.3 ng/ml, כך שמתן 50 גרם אבקת קולוסטרומ ליום היה אמור לספק 2.81 גרם לקטופרין ליום לכל עגלה. העדר העלייה הצפויה ברמתו עשויה לנבוע ממגוון גורמים כמו עיכול חלקי בכרס או זמן מחצית החיים של לקטופרין בדם.

דין ביניים: בתוכנית המחקר המקורית תכננו לבצע את המחקר בשנה השנייה עם תוסף של לקטופרין מוגן. אולם שילוב של הממצאים הלא מעודדים מניסוי א' בנוסף לכך שהחברה האוסטרלית שאמורה הייתה לספק את המוצר הייחודי של לקטופרין מוגן לצערנו בעקבות הקורונה הודיעה כי חל עיכוב עד להודעה חדשה על ייצור המוצר הנ"ל, ולמעשה ניתק הקשר עימם. לכן נאלצתי שלא להמשיך את המחקר עם תוסף זה. במקום זאת, החלטתי להמשיך את המחקר (באישור הוועדה) באמצעות שימוש בנוגד חמצון אחר

אשר עונה על מטרות המחקר, המכיל נוגדי חמצון ממקור צמחי ולבחון כיצד תוסף זה ישפיע על מדדי עקת חום ו-leaky gut בפרות חלב.

ניסוי ב' - בשנה השנייה של המחקר ביצענו ניסוי בו השתתפו 28 פרות ברפת הפרטנית בוולקני למשך 3 שבועות בעונת הקיץ. הפרות חולקו ל-2 טיפולים (n = 14):

(1) ביקורת - מנת העדר הרגילה.

(2) נוגדי חמצון ממקור צמחי (AXT) – תוסף 150 גרם ליום של Axion Thermoplus (CCPA, France). תוסף ה-AXT מכיל פוליפנולים צמחיים מתה ירוק (Cammelia sinensis), צ'ילי אדום (Capsicum), fenugreek וכן מקרונוטריינטים (Na, K).

התוסף עורבב יומית באופן פרטני לכל פרה עם מתן הבלייל בעת ההאכלה. בסיום הניסוי נאספו נתוני ייצור, צריכת מזון, בריאות וכן נתוני רווחה התנהגותיים (רביצה, העלאת גרה). הפרות צוננו 5 פעמים ביום ע"י מקלחות ואוורור כמקובל ברפת וולקני. בשבועיים הראשונים, כל הפרות קיבלו את טיפולי ההזנה וצוננו 5 פעמים ביום כמקובל ברפת וולקני. לאחר מכן, מחצית מהפרות בכל טיפול תזונתי לא צוננו כלל, והמחצית השנייה של הפרות קיבלו 5 צינונים ליום. לאחר שבועיים, החלפנו את הקבוצות כך שמי שלא צוננה כעת צוננה 5 פעמים ביום, ולהיפך, למשך שבועיים נוספים.

דוגמאות דם נאספו מהפרות מוריד הזנב פעם בשבועיים במהלך הניסוי לבחינת מדדי עקה (טבלה מס' 1). דיגום חלב לבחינת הרכב החלב ותאים סומטיים נעשה אחת לשבועיים במהלך הניסוי. בסיום הניסוי אספו נתוני ייצור, צריכת מזון, ונתוני רווחה התנהגותיים (רביצה, העלאת גרה). במהלך הניסוי נקבעו טמפ' רקטלית וקצב נשימה אחת לשבוע. כמו כן, בכל סבב בחנו את הטמפרטורה הוגינלית של 24 פרות באמצעות סנסור למשך 3 ימים ברציפות. טמפ' ולחות נמדדו בתוך הסככה באמצעות סנסורים.

ביופסיות של רקמות השומן נלקחו מ-5 פרות בכל טיפול ביום האחרון של סבב אי-צינון, הוקפאו ונשמרו במינוס 80 עד לאנליזה. אנו הפקנו RNA לשם בחינת ביטוי גנים של עקה חימצונית וכן חלבון לבחינת ביטוי חלבונים שקשורים לעקה חימצונית ברקמות השומן ונבחנו את השפעת הטיפול על מדדים אלו. בנוסף, בוצעה אנליזה פרוטאומית לבחינת מכלול החלבונים שהתבטאו ברקמה ואנליזה של המסלולים העיקריים שהושפעו מטיפול ההזנה ברקמת השומן.

ניתוח הנתונים נעשה באמצעות תוכנת PROC MIXED או GLM של SAS, והמודל כלל את האפקט של הטיפול התזונתי, אפקט הצינון, והאינטראקציה ביניהם. ניתוח ביטוי הגנים והחלבונים נעשה ב-GLM. ניתוח האנליזה הפרוטאומית בוצע ב-T-test ($P \leq 0.05$ and fold change ± 1.5). מטרת המחקר הייתה לבחון את האפקט של טיפולי ההזנה, לכן אנו נתמקד בהצגת הממצאים באפקט התזונתי.

טבלה מס' 1 – ביומרקרים בדם לעקה בפרות חלב גבוהות תנובה

סימוכין	שיטת האנליזה	מדיום הבדיקה	הקשר ביולוגי	ביומרקר
Zachut et al. (2017)	TBARS, פלורוסנטי	פלסמה	מדד לעקה חמצונית	Malondialdehyde (MDA)
Zachut et al. (2017)	ELISA	פלסמה	מדד לעקה	קורטיזול
מסטר נטלי נבון, אוני' בר אילן 2018	ELISA	פלסמה	ציטוקין פרו-דלקתי	Tumor necrotizing factor alpha (TNF- α)

תוצאות ניסוי ב':

במהלך הניסוי שרר עומס חום סביבתי, כפי שהתבטא ברמות ה-THI היומיות שהיו גבוהות מ-72 לפי נתוני הסנסורים שמדדו באופן רציף בתוך הסככה הפרטנית. כפי שמוצג בטבלה מספר 2, לא נמצאו הבדלים בתנובות החלב או בהרכב מוצקי החלב בין קבוצות הטיפול (טבלה מספר 2). כמו כן, לא נמצא הבדל בצריכת המזון, או במאזן האנרגיה המחושב. לפי חישובי היעילות הייתה נטייה ליעילות גבוהה יותר בקבוצת ה-AXT לעומת הביקורת (תנובת FCM או ECM לצריכת מזון, טבלה מס' 2).

טבלה מספר 2 – ייצור חלב והרכבו, צריכת מזון, מאזן אנרגיה וחישוב יעילות בפרות הניסוי

P =	SEM	AXT	ביקורת	
0.23	0.74	40.3	39.0	חלב, ק"ג ליום
0.66	0.16	3.7	3.6	שומן, %
0.43	0.07	3.2	3.2	חלבון, %
0.29	0.05	4.9	4.9	לקטוז, %
0.08	0.88	39.5	37.1	FCM 4%, ק"ג ליום
0.13	0.91	40.0	38.0	ECM, ק"ג ליום
0.29	0.58	28.7	27.8	צריכת מזון, ק"ג ליום
0.77	0.59	11.7	11.5	מאזן אנרגיה, Mcal ליום
0.21	0.06	1.5	1.4	יעילות, תנובת חלב לח", ק"ג לק"ג
0.08	0.05	1.5	1.3	יעילות, FCM לח", ק"ג לק"ג
0.10	0.05	1.5	1.3	יעילות, ECM לח", ק"ג לק"ג

מדדי עומס חום: לא נמצאו הבדלים בטמפ' הרקטלית או בקצב הנשימה בין הטיפולים (טבלה מספר 3). אולם, בבחינת הטמפ' הוגינלית אשר נמדדה עם סנסורים שהעבירו מספר גדול של נתונים, למרות שלא היה הבדל בטמפ' הממוצעת בין הטיפולים, נמצא שאחוז השעות שהטמפ' הוגינלית היה גבוה מ-39 מעלות צלסיוס היה נמוך יותר בטיפולי ה-AXT לעומת הביקורת: 79.6% בקבוצת הביקורת, לעומת 74.9%

בקבוצת ה-AXT ($P < 0.0001$). בבחינת מדדי רווחה התנהגותיים, נמצא שזמן הרומינציה ומשך הרביצה היו גבוהים יותר ב-150AXT לעומת הביקורת (טבלה מספר 3).

טבלה מספר 3 – ממוצעי טמפ' רקטלית, קצב נשימה, טמפ' וגינלית, רומינציה וזמן שכיבה בפרות הניסוי

P =	SEM	AXT	ביקורת	
0.44	0.21	38.6	38.9	טמפ' רקטלית, צלסיוס
0.61	2.45	71.6	73.5	קצב נשימה, נשימות לדקה
0.20	0.09	39.4	39.6	טמפ' וגינלית, צלסיוס
0.02	7.03	491.8	467.7	רומינציה, דקות ליום
0.005	7.40	591.9	558.7	זמן רביצה, דקות ליום

מדדי עקה בדם: בבחינת מדדי עקה בדם, לא נמצאו הבדלים בין קבוצות הטיפול: ריכוזי ה-HP, קורטיזול, MDA, LBP, NEFA, ו-TNF α לא היו שונים באופן מובהק בין הטיפולים (טבלה מספר 4).

טבלה מספר 4 – ממוצע ריכוזי ביומרקרים בדם של פרות במהלך הניסוי

	ביקורת	AXT	SEM	P =
Haptoglobin, ng/ml	83.3	114.9	37.5	0.63
Cortisol, ng/ml	26.2	20.9	3.15	0.25
Malondialdehyde, uM	3.78	3.70	0.29	0.86
LPS-binding protein, ng/ml	15.06	12.89	1.14	0.20
Tumor necrosis factor alpha, pg/ml	71.09	60.68	20.96	0.84
Non esterified fatty acids, uEq/L	127.63	127.22	12.69	0.71

ביטוי גנים ברקמת השומן

כפי שניתן לראות בטבלה מספר 5, ביטוי הגן *LBP* נטה להיות גבוה יותר ברקמת השומן של פרות ה-AXT לעומת הביקורת, אולם ביטוי יתר הגנים הקשורים לעקה חימצונית לא היה שונה בין הרקמות של פרות משני הטיפולים.

טבלה מספר 5 – ביטוי גנים ברקמת השומן

RQ	Control	AXT	SEM	P =
<i>HSPA1A</i>	1.00	2.09	0.54	0.19
<i>UBE2K</i>	1.00	1.79	0.39	0.19
<i>GSTM1</i>	1.00	2.80	0.76	0.13

<i>LBP</i>	1.00	3.96	1.06	0.08
<i>GPx</i>	1.00	1.45	0.42	0.47
<i>STIP1</i>	1.00	0.99	0.17	0.98
<i>TRPV1</i>	1.00	0.83	0.19	0.56
<i>HPX</i>	1.00	0.88	0.21	0.69
<i>GSTM3</i>	1.00	1.06	0.15	0.79

HSPA1A = Heat shock protein family A1 70 KDa, *UBE2K* = Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K, *GSTM1* = glutathione S-transferase Mu 1, *LBP* = Lipopolysaccharide binding protein, *GPx* = Glutathione peroxidase 1, *STIP1* = Stress induced phosphoprotein-1, *TRPV1* = Transient receptor potential vanilloid 1, *HPX* = Hemopexin, and *GSTM3* = Glutathione S-transferase M3.

ביטוי חלבונים ברקמת השומן

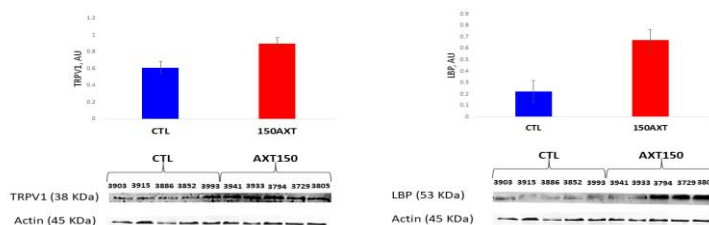
ביטוי החלבונים הממוצע מופיע בטבלה מספר 6 ובאיור מספר 3. נמצא כי ביטוי הקולטן TRPV1 היה גבוה יותר ברקמת השומן של AXT לעומת הביקורת, וכן ביטוי החלבון LBP היה גבוה יותר ב-AXT לעומת הביקורת.

טבלה מספר 6 – ביטוי חלבונים ברקמת השומן של פרות שקיבלו AXT או ביקורת בתנאי עומס חום

AU	Control	AXT	SEM	P =
GSTM1	0.65	0.61	0.087	0.72
STIP1	1.00	0.79	0.092	0.15
TRPV1	0.61 ^b	0.90 ^a	0.079	0.04
MEK1	0.94	0.64	0.106	0.08
PON1	0.48	0.40	0.069	0.48
LBP	0.22 ^b	0.67 ^a	0.132	0.04

^{a,b}Values different at $P < 0.05$: *GSTM1* = glutathione S-transferase Mu 1, *STIP1* = Stress induced phosphoprotein-1, *TRPV1* = Transient receptor potential vanilloid 1, *MEK1* = Mitogen-activated protein kinase kinase, *PON1* = Paraoxonase 1, *LBP* = Lipopolysaccharide binding protein.

איור מספר 3 -



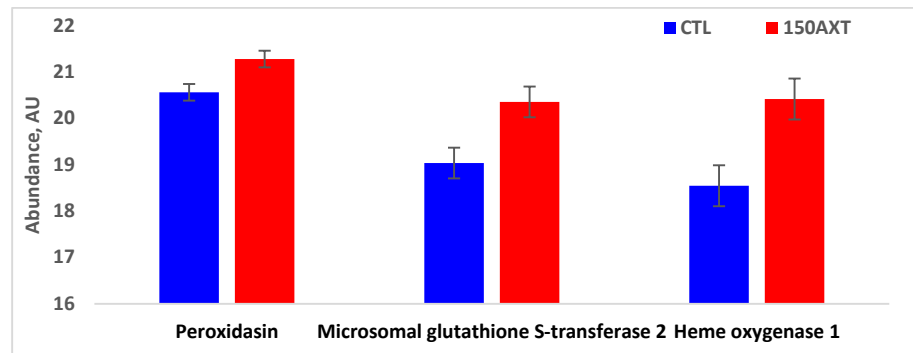
פרוטאומיקה של רקמת השומן

תוצאות אנליזת הפרוטאומיקה של רקמת השומן הראו ביטוי של 2395 חלבונים, מתוכם 16 חלבונים היו שונים בביטויים ברקמת השומן של AXT לעומת הביקורת (טבלה מספר 7). כפי שניתן לראות באיור מספר 3, מספר חלבונים שקשורים למסלולי עקה חימצונית היו עם ביטוי גבוה יותר ברקמת השומן של AXT לעומת הביקורת- microsomal glutathione S-transferase 2 (FC = 2.5, P = 0.05) and heme oxygenase 1 (FC = 3.6, P = 0.03).

טבלה מספר 7 – חלבונים שביטויים היה שונה ($P \leq 0.05$ and Fold change ± 1.5) ברקמת השומן של פרות שקיבלו תוסף AXT לעומת הביקורת

Protein name	Genename	P-value AXT vs. CTL	Fold Change AXT vs. CTL
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D like	HNRPDL	0.05	1.5
Down syndrome critical region protein 3	DSCR3	0.05	1.6
ZFAND2B protein	ZFAND2B	0.00	1.6
Vacuolar protein-sorting-associated protein 36 O	VPS36	0.05	1.6
Peroxidasin	PXDN	0.05	1.6
Uncharacterized protein	LOC1008471 19	0.05	1.6
Tenascin XB	TNXB	0.05	1.8
Vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog	VPS16	0.02	2.3
Microsomal glutathione S-transferase 2	MGST2	0.05	2.5
Protein Hikeshi	HIKESHI	0.04	3.0
Growth factor receptor-bound protein 2	GRB2	0.02	3.0
Fatty acid-binding protein	FABP7	0.03	3.6
Heme oxygenase 1	HMOX1	0.03	3.6
Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1	0.05	6.7
CD34 molecule	CD34	0.01	9.3
SLIT and NTRK like family member 5	SLITRK5	0.05	11.2

איור מספר 4 – חלבונים עיקריים הקשורים לעקה כימצונית שביטויים היה שונה ברקמת השומן של פרות שקיבלו AXT לפי פרוטאומיקה

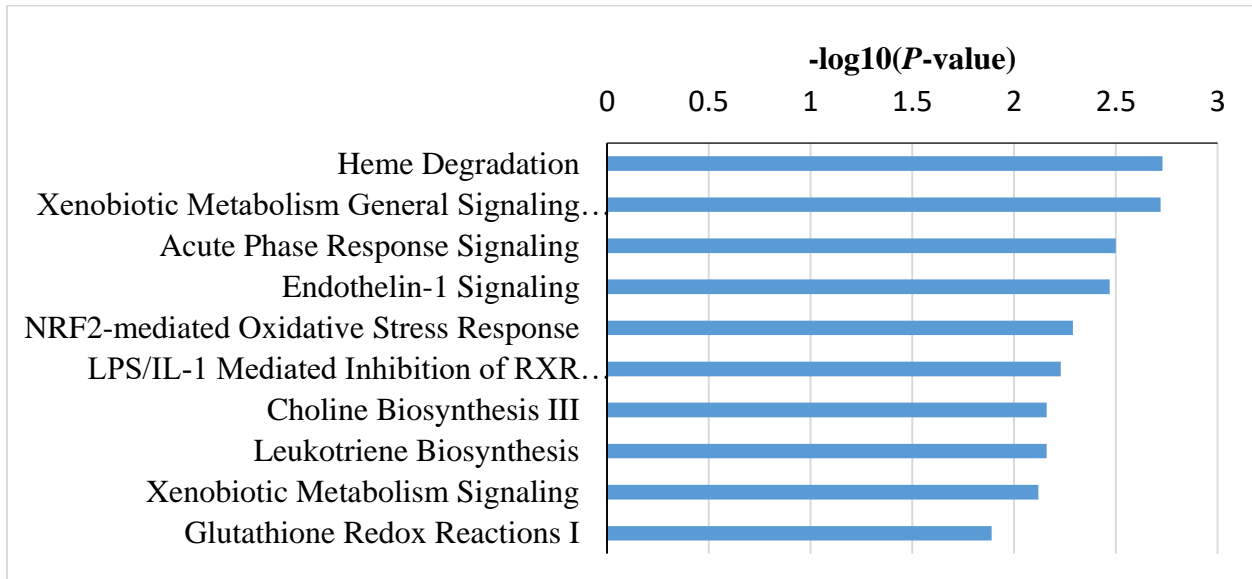


Pathway analysis

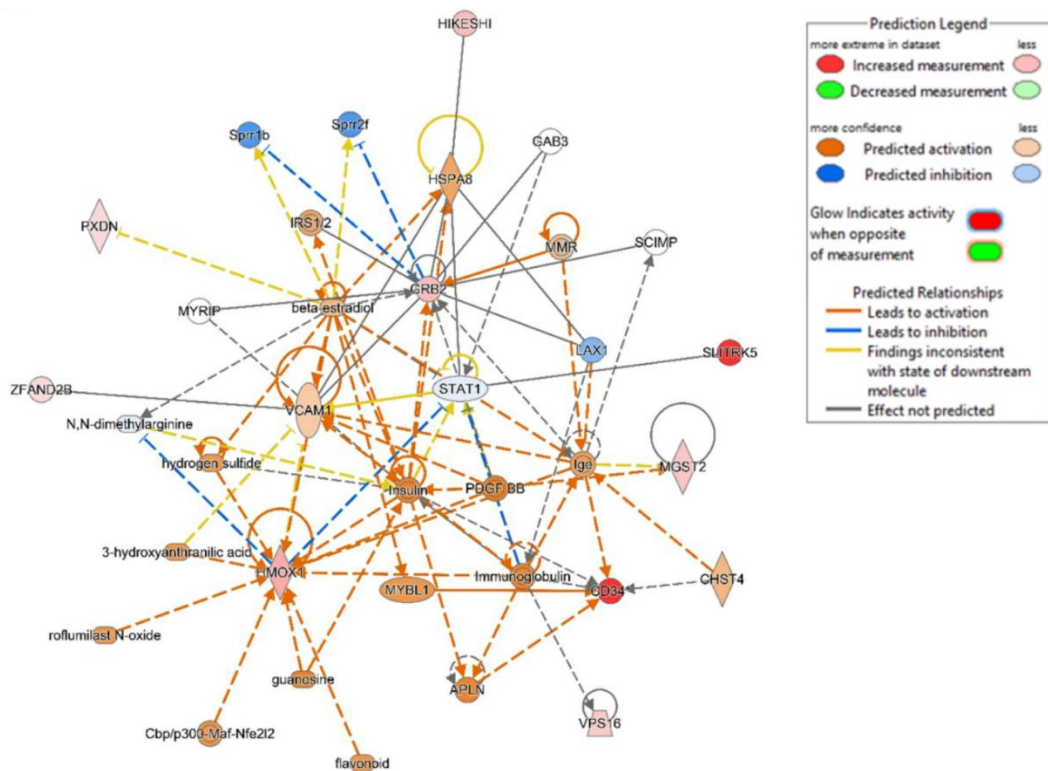
בבחינת המסלולים העיקריים שהועשרו על סמך החלבונים שנבדלו ברקמת השומן של פרות ה-AXT לעומת הביקורת (איור מספר 6), באמצעות תוכנת Ingenuity pathway analysis (Qiagen), נמצא כי המסלולים העיקריים היו: Heme degradation, Xenobiotic metabolism general signaling pathway, Endothelin-1 signaling, Nrf2-mediated oxidative stress response, LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR function, Choline biosynthesis III, Leukotriene biosynthesis, Xenobiotic metabolism signaling and Glutathione redox reactions I.

כמו כן, בבחינת הרשת המולקולרית על סמך החלבונים הנבדלים נמצא כי חלבונים הקשורים למסלול ה-Nrf2 oxidative stress response היו הרשת המרכזית שהושפעה מטיפול ה-AXT (איור מספר 7). רשת החלבונים קשרה בין החלבון HMOX1 שמעכב את STAT1 ואת גורם הגדילה growth factor receptor bound protein 2 (GRB2) לעיכוב SPRR1B, SPRR2F, אשר כולם קשורים למסלול ה-Nrf2 oxidative stress response.

איור מספר 6 – מסלולים עיקריים הקשורים לחלבונים השונים ברקמת השומן של פרות שקיבלו AXT



איור מספר 7 – רשת חלבונים ברקמת השומן של פרות שקיבלו AXT



© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

דין

ממצאי המחקר מראים כי מתן תוסף שמכיל נוגדי חמצון צמחיים המכיל פוליפנולים צמחיים מתה ירוק (*Cammelia sinensis*), צ'ילי אדום (*Capsicum*) ו-fenugreek בכמות של 150 גרם ליום לפרות באמצע תחלובה בעומס חום בקיץ לא העלה את ייצור החלב, אבל גרם לשיפור רווחת החיה על ידי ירידה במספר השעות ביום שהפרות מצויות בטמפ' וגינלית של מעל 39 מעלות, ולשיפור במדדי עקה התנהגותיים לעומת הביקורת.

תוצאות המחקר מעודדות ומצביעות לראשונה על תוסף תזונתי שיכול להועיל בהורדת טמפ' הגוף בפרות ושיפור מדדי עקה התנהגותיים בתנאי עומס חום סביבתי. במחקר שנערך בברזיל נמצא כי מתן תמצית תה ירוק לא השפיע על תנובת החלב אבל גרם להורדה של פליטת המתאן בפרות (6). ההבדל בתוצאות עשוי לנבוע מגזע הפרות, תנובות החלב והרכב המנה אשר שונה לחלוטין מן המנה הישראלית, ממשק שונה וכמות התוסף. בניסוי זה נמצא שמתן תוסף של נוגדי חמצון צמחיים העלה את זמן הרביצה של הפרות, דבר המעיד על שיפור ברווחתן. זמן רביצה ממושך יותר עשוי להיות קשור לטמפ' גוף נמוכה יותר (נמצא כי מתן התוסף הוריד את אחוז הזמן שהפרות היו עם טמפ' של מעל 39 מעלות), כיוון שפרות עם טמפ' גוף נמוכה חשות טוב יותר ולכן רובצות יותר ומעלות יותר גרה. בניסוי זה לא נבחנה הנעילות של המנה, ולכן אין לנו מידע בהיבט הזה. ייתכן והייתה נעילות נמוכה יותר בקבוצת הטיפול, אשר גרמה לעלייה בצריכת המזון, אולם יש לבצע מחקרים נוספים בכדי לבחון השערה זו. תוסף ה-AXT הכיל גם נתרן (19.2% מהח"י של התוסף). בחישוב כמות הנתרן במנת החולבות הבסיסית בניסוי זה, אשר עמד על 49 גרם ליום על בסיס צריכת המזון בפועל של הפרות, מתן תוסף ה-AXT בכמות של 150 גרם ליום הוסיפה לפרות כ-29 גרם ליום נתרן. ידוע בספרות כי העלאת שיעור הנתרן במנה מעלה את צריכת המזון (NRC, 2021), אולם אנו לא מצאנו הבדל בצריכת המזון של פרות ה-AXT לעומת הביקורת, וייתכן ונושא זה דורש מחקר נוסף.

במחקר הנוכחי לא נמצאו הבדלים בריכוזי מדדי עקה שונים בדם, אולם יש להתחשב בכך שזהו ניסוי עם מספר מוגבל של פרטים ובפרות באמצע התחלובה, אשר אינן נמצאות בעקה מטבולית. על בסיס הממצאים האחרים בניסוי, אנו משערים כי ייתכן ומדדי העקה היו משופרים אילו המחקר בוצע בפרות בתחילת התחלובה אשר מצויות בעקה מטבולית, וכדאי לבצע מחקר נוסף בכדי לבחון סוגיה זו. אכן, במחקר שנעשה לאחרונה בברזיל נמצא כי מתן תמצית תה ירוק לפרות מגזע ג'רזי בתקופת המעבר לא השפיע על צריכת המזון, אבל השפיע על מדדי עקה חימצונית וחיסון לאחר ההמלטה (7). מחקר נוסף מסין הראה כי מתן תוסף של פוליפנולים ממקור תה ירוק גרם לשיפור בתנובת החלב ובמדדי דלקת ועקה חימצונית בפרות לאחר ההמלטה שהיו עם היפרקטונמיה (8). בניסוי שנערך בשוויץ עם מתן תמצית תה ירוק בפרות עם קטוזיס תת קליני לאחר ההמלטה לא מצאו הבדלים ברמות מטבוליטיים בדם, אך תנובת החלב שלהן

הייתה גבוהה יותר (9). יחד, ממצאים אלו תומכים בהשערה כי תמצית תה ירוק צפויה להועיל לפרות המצויות בעקה מטבולית, וככל הנראה על בסיס הממצאים ממחקרינו תהיה תועלת בעיקר לפרות שממליטות בקיץ בתנאי עומס חום. דרוש מחקר נוסף כדי לבחון זאת בפרות חלב בארץ.

זהו המחקר הראשון שבוחן את השפעת פוליפנולים צמחיים על ביטוי גנים וחלבונים ברקמת השומן בפרות חלב בתנאי עקת חום. מצאנו כי ביטוי הגן והחלבון LBP שהינו חלבון acute phase protein, היה גבוה יותר ברקמת השומן של פרות AXT לעומת הביקורת. LBP נקשר ל-LPS מחיידקים גרם-שליליים ומפעיל תגובה דלקתית דרך CD14 והפעלת מקרופגים באמצעות ה-toll like receptor 4 (15). הוצע כי רמת ביטוי נמוכה של LBP ברקמת השומן קשורה לעלייה בתגובה הדלקתית ברקמת השומן (16), ולכן עלייה ברמתו בניסוי זה יכולה להיות קשורה לתגובה אנטי-דלקתית ברקמה. בנוסף, שניים מהמסלולים המועשרים לפי האנליזה הפרוטאומית היו ה- acute phase signaling and LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR function, אשר תומכים בהשערה של תגובה אנטי-דלקתית ברקמת השומן בהשפעת טיפול ה-AXT. אולם, במחקר אחר בו נתנו לפרות תמצית תה ירוק לאחר ההמלטה, לא נמצאה השפעה על חלבונים דלקתיים או נוגדי חמצון בכבד (17). מכיוון שלא מצאנו הבדלים במדדי עקה חימצונית או דלקת ברמה הסיסטמית בדם בניסוי זה, אנו מניחים כי התגובה ברקמת השומן היא פריפרית בלבד, וייתכן והתרחשה באיברים נוספים בגוף הפרה אשר לא נבחנו בניסוי זה. אנו משערים כי ייתכן והתגובה האנטי-דלקתית ברקמת השומן קשורה לירידה במדדי עקה חימצונית שנמצאה ברקמת השומן, וזאת בהתאם להנחה שהועלתה על ידינו בעבר (16).

אכן, ברקמת השומן מצאנו עלייה בביטוי חלבונים ועלייה בהעשרת מסלולים הקשורים ל-Nrf2 oxidative stress response בפרות ה-AXT לעומת הביקורת. ידוע כי בעקבות עקת חום יש הפעלה של מסלולי עקה חימצונית ברקמות, וייתכן כי השינוי בביטוי שנמצא קשור ביכולת של הרקמה להגיב לעומס החום בהשפעת טיפול ההזנה. התפקיד של Nrf2 ועקה חימצונית בתפקוד רקמת השומן מורכב ותלוי בגורמים רבים, כמו המקורות השונים לעקה החמצונית, מועד ביטוי Nrf2 בהתמיינות רקמת השומן, והגיל והרקע הגנטי של בעל החיים. במחקר קודם שלנו הראינו כי ניתוח פרוטאומי של רקמת השומן של פרות הרות בעומס חום בקיץ העשיר את הרקמה בחלבונים של מסלולי ה-Nrf2 oxidative stress response בהשוואה לאלו שהמליטו בעונת החורף (11). באופן מסקרן, תוסף תזונה יכול לשנות את פעילות Nrf2 מכיוון שאחד המחקרים הראה כי תוספי מתיונין הפחיתו את ביטוי החלבון Nrf2 ברקמת השומן של פרות לאחר ההמלטה בהשוואה לביקורת (18). יחד, ממצאי המחקר הנוכחי תומכים בהנחה שתוספת של נוגדי חמצון ספציפיים ממקור צמחי משפיעה על אלמנטים של תגובת העקה החימצונית ברקמת השומן, אולי כחלק ממנגנון הגנה במהלך עקת חום בקיץ.

הביטוי של TRPV1, קולטן רגיש לפלפל ולחום, היה גבוה יותר ברקמת השומן של AXT בהשוואה לביקורת. TRPV1 הרגיש לחום הוא ligand-gated ion channel, הממלא תפקיד מפתח בהעברת סיגנל הכאב והיפראלגיה תרמית (19). לאחרונה, הדגמנו שביטוי ה-mRNA של TRPV1 היה נמוך יותר ברקמת השומן של פרות לאחר ההמלטה שהמליטו בעומס חום הקיץ בהשוואה לחורף, וביטוי החלבון TRPV1 נטה להיות נמוך יותר ברקמת השומן של פרות באמצע תחלובה שלא צוננו לעומת פרות שצוננו (20). אנו מציעים שיתכן וההפעלה של הקולטן TRPV1 הן על ידי פלפלים מתוסף המזון, ואולי על ידי עומס החום הסביבתי, עשויה להיות חלק מהאטיולוגיה שמסבירה את ההשפעות של תוספת זו על פרות בתנאי עומס חום.

לסיכום, תוצאות המחקר מעודדות ומצביעות לראשונה על תוסף תזונתי שיכול להועיל בהורדת טמפרטורת הגוף בפרות בתנאי עומס חום סביבתי, וכנראה גם לשפר מדדי רווחה התנהגותיים. אנו ממליצים להמשיך את המחקר ולבחון את ההשפעה של נוגדי חמצון צמחיים בפרות המצויות בעקה מטבולית, כגון פרות בתחילת התחלובה, וכן ברפתות מסחריות עם מספר פרטים גדול. כמו כן, יש להמשיך ולחקור את המנגנונים המולקולריים בבסיס השפעות אלו בפרות בתנאי עומס חום.

רשימת ספרות מצוטטת

1. Hall DM, Baumgardner KR, Oberley TD, Gisolfi CV. 1999. Splanchnic tissues undergo hypoxic stress during whole body hyperthermia. *Am J Physiol* 276:G1195-203.
2. Playford RJ, Floyd DN, Macdonald CE, Calnan DP, Adenekan RO, Johnson W, Goodlad RA, Marchbank T. 1999. Bovine colostrum is a health food supplement which prevents NSAID induced gut damage. *Gut* 44:653-8.
3. Playford RJ, MacDonald CE, Calnan DP, Floyd DN, Podas T, Johnson W, Wicks AC, Bashir O, Marchbank T. 2001. Co-administration of the health food supplement, bovine colostrum, reduces the acute non-steroidal anti-inflammatory drug-induced increase in intestinal permeability. *Clin Sci (Lond)*; 100:627-33.
4. Khan Z, Macdonald C, Wicks AC, Holt MP, Floyd D, Ghosh S, Wright NA, Playford RJ. 2002. Use of the 'nutriceutical', bovine colostrum, for the treatment of distal colitis: results from an initial study. *Aliment Pharmacol Ther* 16:1917-22.
5. Prosser C, Stelwagen K, Cummins R, Guerin P, Gill N, Milne C. 1985. Reduction in heat-induced gastrointestinal hyperpermeability in rats by bovine colostrum and goat milk powders. *J Appl Physiol* 2004; 96:650-4.
6. Marchbank T, Davison G, Oakes JR, Ghatei MA, Patterson M, Moyer MP, Playford RJ. 2011. The nutraceutical bovine colostrum truncates the increase in gut permeability caused by heavy exercise in athletes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 300:G477-84.
7. de la Rosa G, Yang D, Tewary P, Varadhachary A, Oppenheim JJ. 2008. Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses. *J Immunol* 180: 6868-76.
8. Siqueiros-Cendón T, Arévalo-Gallegos S, Iglesias-Figueroa BF, García-Montoya IA, Salazar-Martínez J, Rascón-Cruz Q. 2014. Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacol Sin*. 35(5):557-66.

9. Kushibiki S. 2017. Rumen lipopolysaccharide activity is decreased by lactoferrin feeding in lactating dairy cows. 8th International conference on Animal health & Veterinary medicine, Toronto, Canada.
10. Caputo Oliveira R, Sailer KJ, Holdorf HT, Seely CR, Pralle RS, Hall MB, Bello NM, White HM. 2019. Postpartum supplementation of fermented ammoniated condensed whey improved feed efficiency and plasma metabolite profile. *J Dairy Sci.* 102(3):2283-2297.
11. 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 Proteomics.* 31;158:52-61.
12. Gladine, C., Rock E., Morand C., Bauchart D., Durand D. 2007. Bioavailability and antioxidant capacity of plant extracts rich in polyphenols, given as a single acute dose, in sheep made highly susceptible to lipoperoxidation. *Br J Nutr.* 98(4):691-701.
13. Jain S. K, Rains J., Croad J., Larson B. and K. Jones. 2009. Curcumin supplementation lowers TNF α , IL-6, IL-8 and MCP-1 secretion in high glucose-treated cultured monocytes and blood levels of TNF α , IL-6 MCP-1, glucose and glycosylated hemoglobin in diabetic rats. *Antioxidants & Redox signaling*, 11:2: 241.
14. Gobert, M., Martin B., Ferlay A., Chilliard Y., Graulet B., Pradel P., Bauchart D., Durand D. 2009. Plant polyphenols associated with vitamin E can reduce plasma lipoperoxidation in dairy cows given n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Dairy Sci.* 92(12):6095-104.
15. Ceciliani, F., J.J. Ceron, P.D. Eckersall, and H. Sauerwein. 2012. Acute phase proteins in ruminants. *J. Proteomics* 75:4207–4231.
16. Zachut, M., and G.A. Contreras. 2022. Symposium review: Mechanistic insights into adipose tissue inflammation and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 105 (4): 3670-3686.
17. Gessner, D.K., C. Brock, L.M. Hof, E. Most, C. Koch, and K. Eder. 2020. Effects of supplementation of green tea extract on the milk performance of periparturient dairy cows and the expression of stress response genes in the liver. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 11:1–12.
18. Liang, Y., F. Batistel, C. Parys, and J.J. Loo. 2019. Glutathione metabolism and nuclear factor erythroid 2-like 2 (NFE2L2)-related proteins in adipose tissue are altered by supply of ethyl-cellulose rumen-protected methionine in periparturient Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 102:5530–5541.
19. Gavva, N.R., R. Tamir, L. Klionsky, M.H. Norman, J.-C. Louis, K.D. Wild, and J.J.S. Treanor. 2005. Proton activation does not alter antagonist interaction with the capsaicin-binding pocket of TRPV1. *Mol. Pharmacol.* 68:1524–1533.
20. Kra, G., J.R. Daddam, U. Moallem, H. Kamer, M. Ahmad, A. Nemirovski, G.A. Contreras, J. Tam, and M. Zachut. 2022. Effects of environmental heat load on endocannabinoid system components in adipose tissue of high yielding dairy cows. *Animals* 12:795.

Abstract

Environmental heat load due to elevated ambient temperature and humidity has adverse effects on the physiology of livestock, eliciting a reduction in feed intake and production, and increased inflammation and oxidative stress. One option to improve the response of cows to heat stress is by providing cows with lactoferrin, a milk component that is known for its anti-inflammatory and anti-oxidant properties. Alternatively, many plant derived polyphenols are known for their anti-oxidative properties, and several studies have examined the effects of supplementation of plant polyphenols to ruminants. In the first trial we examined supplementing dairy heifers with lactoferrin from colostrum powder that is rich in lactoferrin. Blood samples were examined for lactoferrin but it was not detected. Due to technical difficulties with obtaining a rumen-protected lactoferrin supplement for dairy cows, we continued the study by examining the effects of plant polyphenols on heat stressed dairy cows. We examined the effects of a supplement of plant polyphenols extracts of green tea, capsicum and fenugreek, and electrolytes [(Na⁺, K⁺), AXT; Axion ThermoPlus, CCPA, France] during summer heat load on production, welfare, and oxidative stress proteins in adipose tissue (AT) of dairy cows. Twenty eight multiparous mid-lactation cows were divided into 2 groups during summer, and were fed for 2 wks either a standard milking cows' diet (CTL, n = 14), or supplemented with 150 g/d of AXT (AXT, n = 14), while being cooled 5 times a day; then, half of the cows from each dietary treatment were cooled (CL) or not-cooled (NCL) for 2 wks, after which the CL/NCL were switched for additional 2 wks. Cows were milked 3 times a day and milk composition was analyzed at the end of each 2 wk period. Vaginal temperature (VT) was measured for 3 consecutive days in each period. Biopsies of subcutaneous AT were taken from 10 NCL cows (five CTL and five AXT) at the end of the period, and examined by LC-MS/MS proteomics analysis. Data were analyzed with PROC MIXED of SAS; the model included the effects of dietary treatment, cooling regimen, period, and their interactions. Protein and mRNA abundances and proteomic data [$P \leq 0.05$ and fold change (FC) ± 1.5] were analyzed by t-test. Milk yields, 4% FCM, DMI and milk components were not different between AXT and CTL. The proportion of time that VT was $>39^{\circ}\text{C}$ was lower in AXT than in CTL. Daily rumination time was higher in AXT than in CTL, and lying time was higher in AXT vs. CTL. Proteomics of AT demonstrated that AXT had increased abundances of peroxidase (FC = 1.6), microsomal glutathione S-transferase 2 (FC = 2.5) and heme oxygenase 1 (FC = 3.6) compared to CTL. Top enriched canonical pathways included acute phase response signaling, Nrf2-mediated oxidative stress response, and LPS/IL-1-

mediated inhibition of RXR function. Immunoblots of AT showed a higher abundance of the transient-receptor-potential-vanilloid-1 and of lipopolysaccharide-binding protein in AT of AXT vs. CTL. Supplementation of AXT lowered VT, improved welfare indices, and enriched the AT with Nrf2-oxidative stress response and acute phase response proteins in heat-stressed dairy cows. These findings suggest that plant polyphenols could exert positive effects on heat stressed cows, possibly via improving the oxidative stress response in tissues, as demonstrated by the nutri-proteomic effects in AT. Further studies should examine this supplementation in large herds or in transition dairy cows.