

**תרביית תאי עטין בקר כמודל לבחינת פונקציונאליות העטין בחשיפה לאנטיביוטיקה ופיתוח  
טיפולים לשיפור ההתאוששות**

מוגש להנהלת ענף בקר

ע"י

איתמר ברש, המכון לחקר בע"ח, מנהל המחקר החקלאי, מכון וולקני בית דגן.

מאי 2006

תקציר

מטרת העבודה הינה בחינת ההשפעה של אנטיביוטיקות ממשפחות שונות על גדילה, התמינות ופונקציונליות של תאים אפיתליאליים מבלוטת העטין של בקר. כמודל לניסויים שמשו תאים אפיתליים מקו תאים יחודי אשר פותח מבלוטת עטין של פרה המכונה L-1. לקו תאים זה יכולת פרוליפרציה וכן דפרנציאציה על מטריקס ויצור חלבון חלב. על מנת לקבוע במדויק את השפעת האנטיביוטיקות השונות על כושר היצור של התאים נעשה שימוש בחלבון חלב היברידי הבנוי מהפרומוטר של הגן לביתא לקטוגלובולין הקשור לגן המדווח לוציפרז אותו נתן לקבוע באופן מדויק בלומינומטר. בעבודה זו נבחנה השפעת האנטיביוטיקות מהמשפחות הבאות על קצב חלוקת התאים האפיתליאליים וכושר יצור החלבון. משפחת הביתא לקטם: אמפיצילין ופניצילין G. משפחת האמינוגליקוזידים: ג'נטמיצין. משפחת המקרולידיים: אריתרומיצין. משפחת הטטרציקלינים: כלורוטראציקלין ודוקסיציקלין. הממצאים העקריים: בריכוז גבוה לכל האנטיביוטיקות, פרט ל אריתרומיצין השפעה שלילית על קצב חלוקת התאים. לריכוזים גבוהים השפעה שלילית גם על פעילות רצפי הבקרה של הגן ביתא לקטוגלובולין. יכולת ההתאוששות של התאים תלויה בריכוז האנטיביוטיקה. בריכוזים נמוכים נמצאה לחלק מהאנטיביוטיקות ובמיוחד לאמפיצילין השפעה מזרזת על קצב חלוקת התאים.

## Abstract

We aimed to test the effects antibiotics of several families on growth, differentiation and production of epithelial cells in the bovine mammary gland. The in vitro model system was based on epithelial cells from a unique cell line (L-1) of bovine mammary origin which was developed in our lab. These cells proliferate on plastic. Upon culturing on Matrigel in the presence of lactogenic hormones they differentiate and produce milk proteins. In order to accurately determine the effect of the various antibiotics on milk protein expression, we have used a chimeric milk protein composed of regulatory sequences from the  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) gene linked to the luciferase reporter gene. Luciferase activity driven by the BLG regulatory sequences was measured in Luminometer.

Individual antibiotics of the following families were chosen:

$\beta$ -lactams – ampicillin and penicillin G; Aminoglycosides - gentamycin. Macrolides - erythromycin. Tetracyclins: chlorotetracyclin and doxycillin.

Major findings: At high concentrations, all antibiotics except erythromycin exerted a negative effect on epithelial cell proliferation and all of them had a negative effect on BLG promoter activity. Dose-dependent recovery has been demonstrated for cell proliferation. At low doses, some antibiotics, especially ampicillin had a promoting effect on cell proliferation which in the case of the latter reached over 30% induction. These results suggest that caution should be exerted when choosing the type of antibiotic used. Low doses of ampicillin could be used for long term treatment at the dry period to induce cell number before lactation.

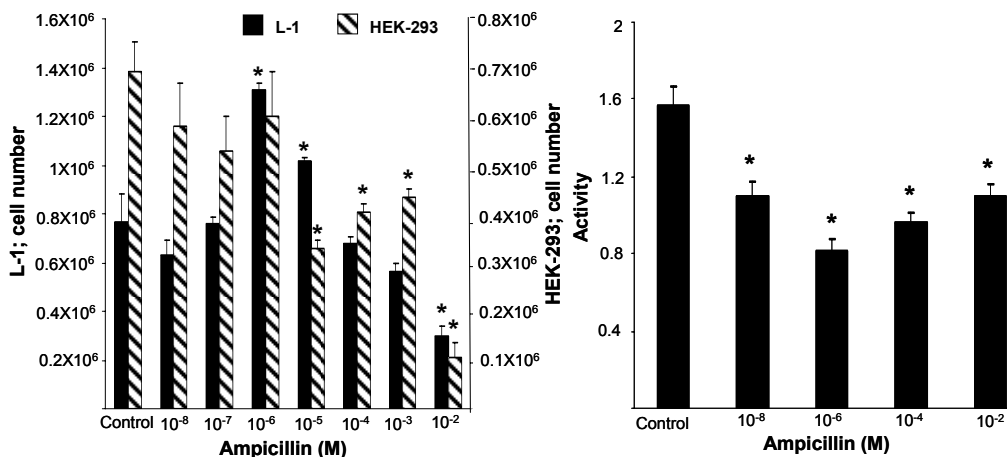
מטרת העבודה הינה בחינת ההשפעה של אטיביוטיקות ממשפחות שונות על גדילה, התמינות ופונקציונליות של תאים אפיתליאליים מבלוטת העטין של בקר. כמודל לניסויים משמשים תאים אפיתליים מקו תאים יחודי אשר פותח מבלוטת עטין של פרה המכונה L-1. לקו תאים זה יכולת פרוליפרציה וכן דפרנציאציה על מטריקס ויצור חלבון חלב. על מנת לקבוע במדויק את השפעת האנטיביוטיקות השונות על כושר היצור של התאים נעשה שימוש בחלבון חלב היברידי הבנוי מהפרומטר של הגן לביתא לקטוגלובולין הקשור לגן המדווח לוציפרו אותו נתן לקבוע באופן מדויק בלומינומטר. בעבודה זו נבחנה השפעת האנטיביוטיקות מהמשפחות הבאות על קצב חלוקת התאים האפיתליאליים וכושר יצור החלבון:

1. משפחת הביתא לקטם: אמפיצילין ופניצילין G.
2. משפחת האמינוגליקוזידים: ג'נטמיצין.
3. משפחת המקרולידים: אריתרומיצין.
4. משפחת הטטראציקלינים: כלורוטטריצקלין ודוקסיציקלין.

תוצאות

#### משפחת הביתא לקטם:

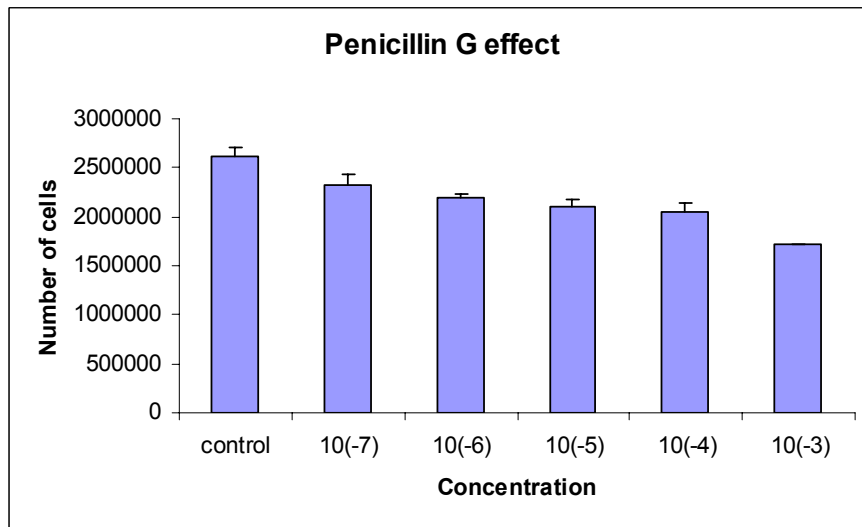
אמפיצילין: יותר מעשרה נסיונות נפרדים הועמדו בהקשר לאפקט של אנטיביוטיקה זו על הפרוליפרציה של תאי L-1. נבחנה השפעת ריכוזי אמפיצילין החל מ  $10^{-8}$  M ועד ל  $10^{-2}$  M למשך עד חמישה ימים. התקבלה עקומת פעמון. באופן בלתי צפוי, אינדוקציה של עד 60% בקצב הפרוליפרציה נקבעה בריכוז של  $10^{-6}$  M (תמונה 1). האינדוקציה בקצב הפרוליפרציה ספציפית לתאי בלוטת עטין. ירידה בפרוליפרציה בריכוזים החל מ-  $10^{-5}$  M נצפתה גם בתאים פיברובלסטיים HEK293.



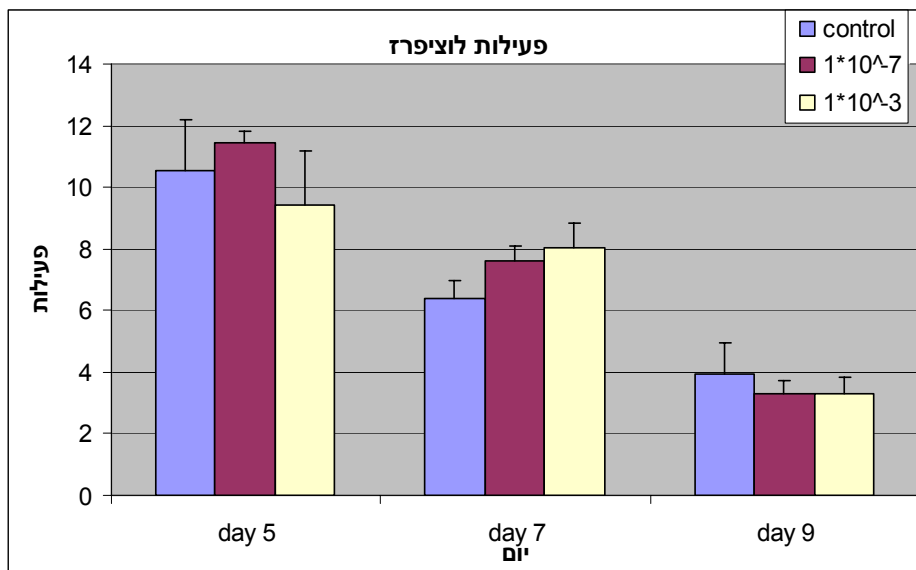
תמונה 1. אמפיצילין בריכוז  $10^{-6}$  M משפר קצב גדילת תאי L-1. ימין, פעילות רצפי הבקרה לביתאלקטוגלובולין. שמאל ריכוז תוצאות לחלוקת תאים ביום המישי לניסוי.

בריכוזים שבין  $10^{-2}$  ל  $10^{-6}$  אמפיצילין דיכא את פעילות הפרומוטר לביתא לקטוגלובולין אשר נקבעה ע"פי פעילות הגן המדווח לוציפרז.

פניצילין G: דיכוי של עד 30% (dose dependent) בקצב חלוקת התאים התקבל בטיפול בפניצילין G בריכוזים עולים של עד  $10^{-3}$  M (תמונה 3). בשום מקרה לא נצפתה עליה בקצב חלוקת התאים כפי שנמצא לגבי בן המשפחה – אמפיצילין. לא נמצאה לפניצילין G השפעה על פעילות הפרומוטר לביתא לקטוגלובולין עד לריכוז של  $10^{-3}$  M (תמונה 4), כלומר, אין השפעה על יצרנות התאים.



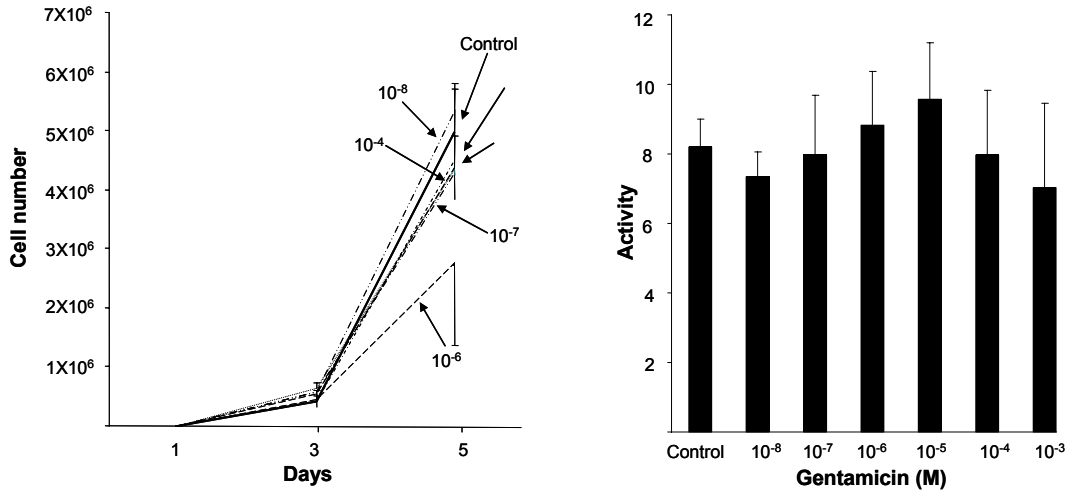
תמונה 3. השפעת פניצילין G על גדילת תאי L-1 משך 5 ימים בתרבית. העקומה מיצגת של 8 נסיונות. הריכוזים במולרים.



תמונה 4. לפניצילין G אין השפעה על יצרנות התאים האפיתליאליים בתרבית כפי שמשקפת מקביעת פעילות הפרומוטר לביתא לקטוגלובולין.

**משפחת האמינוגליקוזידים:**

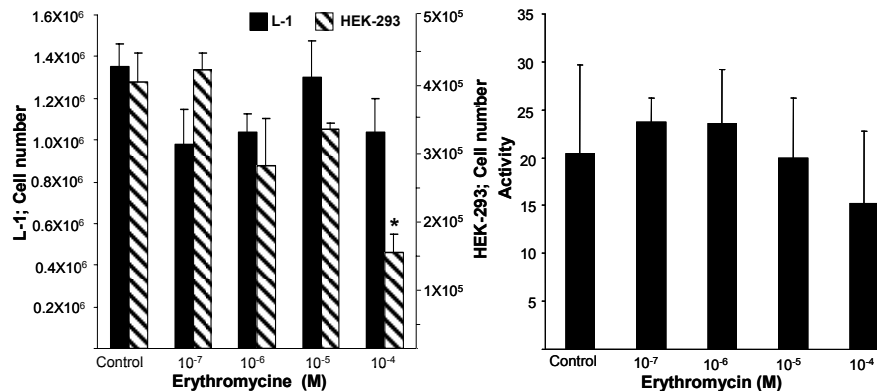
ג'נטמיצין. בניסויים שנערכו לא נמצאה השפעה לאנטיביוטיקה זו על קצב חלוקת התאים או פעילות הפרומוטר לביתא לקטוגלובולין בריכוזים שבין  $10^{-8}$  M ל  $10^{-3}$  M (תמונת מס' 5).



**תמונה 5.** לגנטמיצין אין השפעה על קצב חלוקת התאים האפיתליאליים ופעילות הפרומוטר לביתא לקטוגלובולין בתרבית. ריכוזי האנטיביוטיקה במולרים.

**משפחת המקרולידיים:**

אריתרומיציין. בריכוזים שבין  $10^{-8}$  M ל  $10^{-4}$  M לא נמצאה השפעה לאריתרומיציין על קצב חלוקת תאי L-1. ירידה חריפה נקבעה בריכוז של  $10^{-3}$  M (לא מוראה). בבדיקה שנערכה בתאי HEK293 נמצאה ירידה של 50% בקצב הפרוליפרציה גם בריכוז של  $10^{-4}$  M. בבחינת פעילות הפרומוטר לביתא לקטובולין לא נמצאו שינויים בריכוזים שבין  $10^{-8}$  M ל  $10^{-4}$  M (תמונה 6).



**תמונה 6.** הבדלים מסוימים לאפקט של אריתרומיציין על חלוקת תאים בין תאים אפיתליאליים ופיברובלסטים. הריכוזים במולר.

### משפחת הטטרציקלינים.

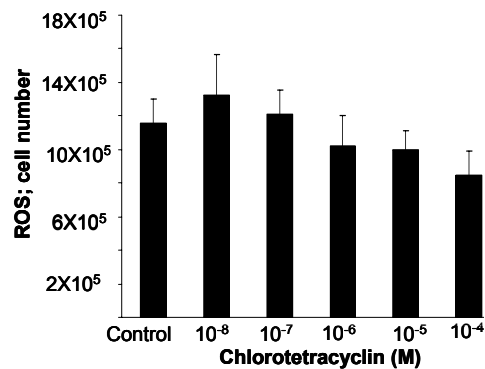
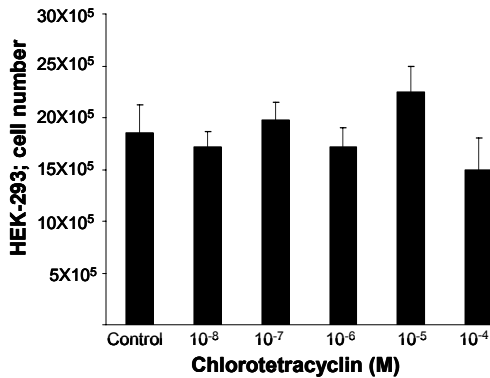
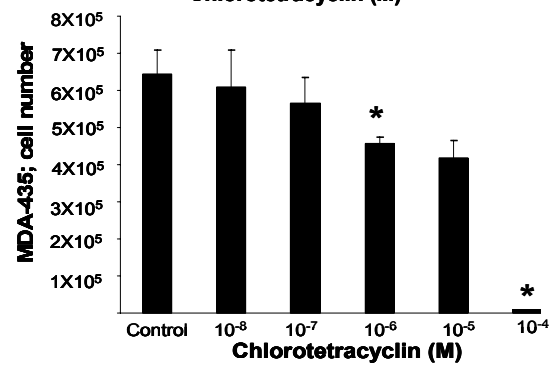
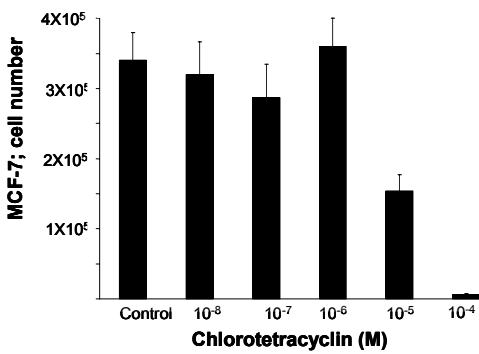
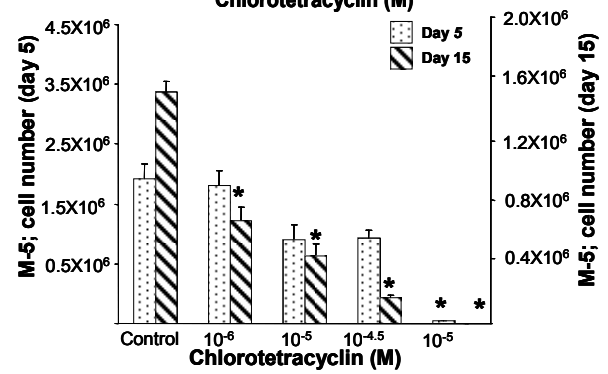
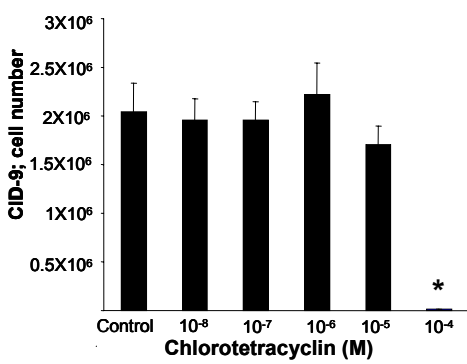
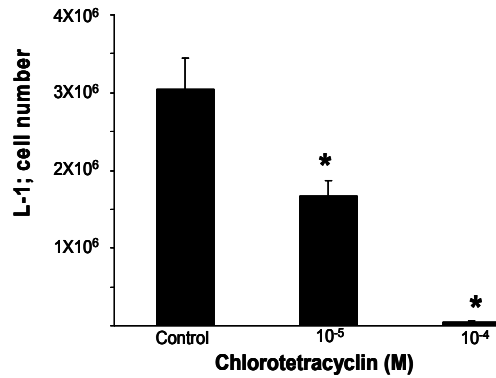
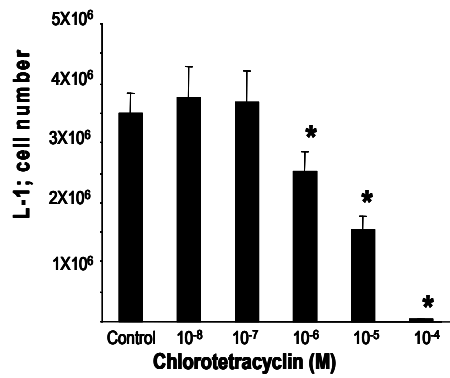
כלורוטטרציקלין: כ 30 נסויים נערכו לקביעת ההשפעה הספציפית של אנטיביוטיקה זו על פרמטרים הקשורים לגדילה ויצרנות של התאים האפיתליאליים L-1 שמקורם מבקר. **גדילה.** נערכו ניסויים לקביעת השפעתה של אנטיביוטיקה זו על גדילת תאים אפיתליאליים בטווח הריכוזים שבין  $10^{-8}M$  ל  $10^{-4}M$ . בריכוז של  $10^{-5}M$  קצב הפרוליפרציה של התאים ירד ל 60% מרמת הביקורת. בריכוז של  $10^{-4}M$ , התאים האפיתליאליים כמעט ולא שינו את מספרם בהשוואה ליום הזריעה. האפקט המדכא של כלורוטטרציקלין על הפרוליפרציה של תאי L-1 נמצא ספציפי לתאים אפיתליאליים ממקור עטין (או שד). אכן, ירידה מקבילה התקבלה בתאי עטין אפיתליאליים נורמאליים ממקור עכבר CID-9 (אם כי בריכוז  $10^{-5}M$  תאי הבקר היו רגישים יותר).

נבחנה גם השפעת כלורוטטרציקלין על גדילת תאים סרטניים ממקור עטין עכבר (M5) אשר פותחו במעבדתנו. לאחר 5 ימי חשיפה נמצאה השפעה דומה לזו שנקבעה על תאי L-1. כלומר, בריכוז של  $10^{-4}M$  אין עליה במספר התאים בהשוואה ליום הזריעה ואילו בריכוז של  $10^{-5}M$  קימת פרוליפרציה, אולם רק ברמה של 50% בהשוואה לביקורת לא מטופלת. אפקטים דומים להשפעת כלורוטטרציקלין התקבלו על הפרוליפרציה של תאים הומניים ממקור שד: MDA435 ו MCF-7.

בניגוד לכך, לא התקבלה לכלורוטטרציקלין השפעה סיגנפיקנטית על קצב חלוקת תאים ממקור עצם (ROS), תאים פיברובלסטיים (HEK293), או תאי כבד (HepG2).

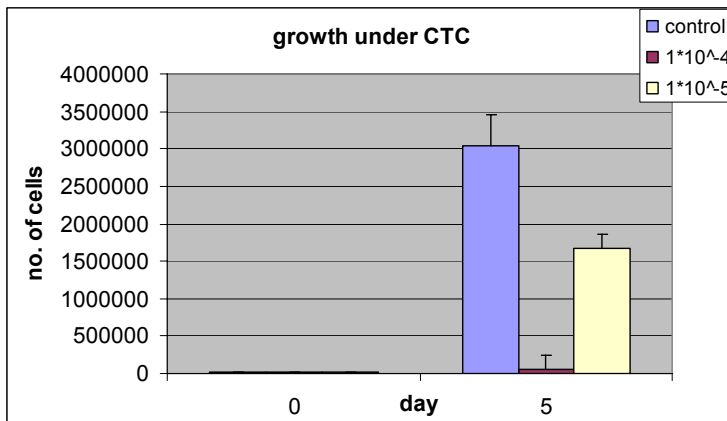
בהמשך, נמצא כי חשיפה מתמשכת לכלורוטטרציקלין תומכת בטיפולים בריכוז נמוך יותר כאמצעי לדיכוי גדילת תאי M5 (דוגמאות בתמונה 7).

**תמונה 7. (בעמוד הבא) דוגמא להשפעה הסלקטיבית של כלורוטטרציקלין על חלוקת תאים אפיתליאליים. השפעה קיימת ב- (פנל עליון L-1, פנל אמצעי CID-9), בעוד שתאים פיברובלסטים (HEK293) לא מושפעים.**

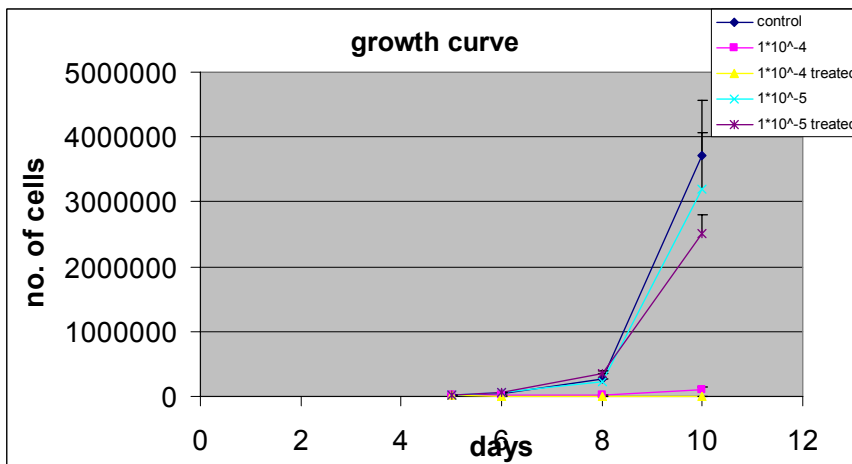


מבחינת ההתאוששות מהאפקט המדכא של הכלורוטריציקלין, נמצא כי יש ביכולתם של תאי L-1 להתאושש מטיפול בן חמישה ימים של כלורוטריציקלין בריכוז של  $10^{-5}M$ , אם כי לאחר 5 ימי התאוששות הגיע מספרם ל 50% מרמת הביקורת התואמת. תאים שטופלו בריכוז של  $10^{-4}M$  כלורוטריציקלין לא הגדילו את

מספרם במשך חמשת ימי ההתאוששות.

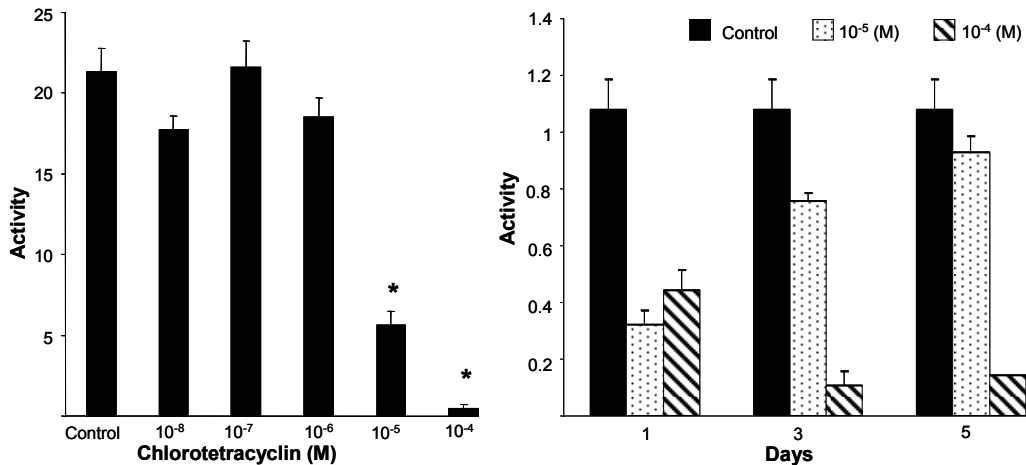


**תמונה 8. השפעת כלורוטריציקלין על מספר תאים אפיתליאליים מבקר ביום 5 (פנל עליון) ועל יכולת ההתאוששות לאחר שנזרע מספר שווה של תאים (פנל תחתון).**



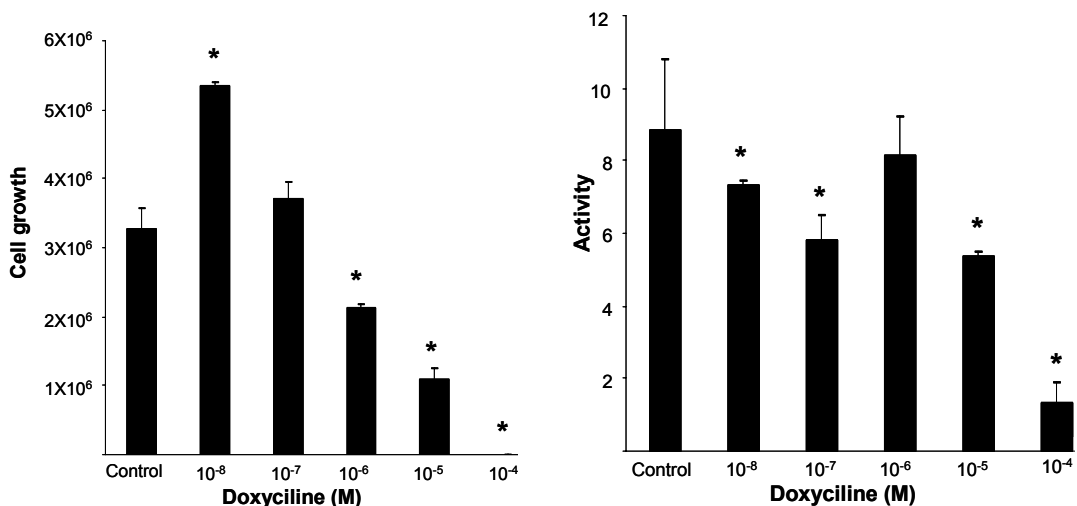
**פעילות היצרנות:** רמת הפעילות של הפרומוטר ל ביתא לקטוגלובולין (המיוחסת לרמת חלבון שווה) אשר מעידה על סינתיזה של חלבוני חלב ירדה ב 75% בתאים שטופלו בכלורוטריציקלין בריכוז של  $10^{-5}M$  ונעלמה כמעט לחלוטין בתאים שטופלו בריכוז של  $10^{-4}M$  (תמונה 9).

כאשר נבחנה יכולת ההתאוששות של התאים מהטיפול בכלורוטריציקלין מבחינת שימור כושר היצרנות, נמצא כי תאים שטופלו בריכוז של  $10^{-4}M$  לא התאוששו לאחר טיפול של יותר מיום אחד. לעומת זאת, תאים שטופלו בריכוז של  $10^{-5}M$  גילו יכולת התאוששות, ובמפתיע קצב הקומפנסציה גבר בהתאמה למשך הטיפול.



**תמונה 9. השפעת כלורוטטריציקלין על פעילות הפרומוטר ל ביתא לקטוגלובולין.**

דוקסיציקלין: אנטיביוטיקה נוספת שנבחנה הינו דוקסיציקלין. אנטיביוטיקה זו הינה איזומר חצי סינתתי של משפחת הטטראציקלינים. יוחסו לה חדירה טובה לתאי החידקים ופעילות אנטיבקטריאלית משופרת. נערך מספר מצומצם של ניסיונות לבחינת ההשפעה של אנטיביוטיקה זו. בהקשר להשפעה על הפרוליפרציה של תאים אפיתליאליים, נמצא כי לאנטיביוטיקה זו השפעה חזקה יותר מאשר זו שיוחסה לטטראציקלין. ירידה סיגנפיקנטית במספר התאים לאחר חמישה ימי טיפול התקבלה כבר בריכוז של 10<sup>-6</sup>M. השפעה משמעותית על פעילות הבלוטה מבחינת ביטוי הפרומוטר לבטא לקטוגלובולין (יצרנות) נמצאה רק בריכוז אנטיביוטיקה מכסימלי של 10<sup>-4</sup>M.



**תמונה 10. השפעת דוקסיציקלין על קצב חלוקת תאים ופעילות הפרומוטר לביתא-לקטוגלובולין בתאי עטין.**

בטבלה מס 1 מובא סיכום ההשפעות של סוגי האנטיביוטיקה השונים על קצב חלוקת התאים ויצרנותם.  
 בנוסף לנסיונות המסוכמים בטבלה זו

השפעה על התחלקות התאים		משפחה		סוג האנטיביוטיקה	
השפעה על פעילות רצפי הבקרה של הגן לחלבון החלב ביתא-לקטוגלובולין		ריכוז גבוה	ריכוז נמוך	ריכוז גבוה	ריכוז נמוך
↓	—	↓	↑	ביתא לקטם	אמפצילין
↓	↓	↓	↓	ביתא לקטם	פניצילין G
↓	↑	—	—	מקרולידים	אריתרומיצין
↓	—	↓	— ↑	טטרציקלינים	כלורוטטרציקלין
↓	—	↓	↑	טטרציקלינים	דאקסיצילין

טבלה מס 1. ריכוז השפעת סוגי האנטיביוטיקה השונים על חלוקת תאים ויצרנותם כפי שבאה לידי ביטוי בפעילות הפרומוטר לביתאלקטוגלובולין. ריכוזי האנטיביוטיקות:  $10^{-3}M - 10^{-8}M$  (ריכוז גבוה  $10^{-3}-10^{-5} M$ )