

השפעת רמת חלבון החלב אלפא-לקטאלבומין וקיפולו על תפוקת החלב בפרות
 Effects of the milk protein α -lactalbumin levels and folding on milk
 production in dairy cows

שמות השותפים למחקר

ד"ר רוני רק PhD; המחלקה לחקר בקר וצאן, מינהל המחקר החקלאי - מכון וולקני

פרופ' עוזי מועלם, המחלקה לחקר בקר וצאן, מינהל המחקר החקלאי - מכון וולקני

תוכן עניינים

1.....	שמות השותפים למחקר	
1.....	תוכן עניינים	
2.....	תקציר	
2.....	רקע	
5.....	תוצאות המחקר	
5.....	1 פיתוח שיטות ומדידת ריכוזי α -LA	
5.....	1.1 מדידת ריכוז כלל החלבון	
5.....	1.2 מדידת α -LA בשיטת ELISA תחרותית	
7.....	1.3 מדידת ריכוז α -LA בדגימות אינדיבידואליות	
8.....	2 בדיקת חיות תאי אפיתל בנוכחות חלב	
8.....	2.1 בדיקת חיות תאי A549 בנוכחות חלב	
9.....	2.2 בדיקת חיות תאי A549 ו-L1 בריכוזי חלב שונים	
10.....	2.3 בדיקת חיות תאי A549 ו-L1 בנוכחות דגימות חלב אינדיבידואליות	
11.....	2.4 בדיקת חיות התאים בנוכחות דגימות חלב סוף ותחילת תחלובה של אותן פרות	
12.....	3 כימות אפופטוזיס	
	3.1 פיתוח שיטת מדידת השפעת הוספת חלב על רמת אפופטוזיס באמצעות קריאת FACS של Annexin V/PI	12
13.....	3.2 בדיקת אפופטוזיס בתאי A549 ו-L1 בנוכחות דגימות חלב אינדיבידואליות	
14.....	דין ומסקנות	

תקציר

תאי אפיתל בבלוטת החלב הם האחראיים על הפרשת החלב. לאורך תקופת התחלובה, לאחר תקופת ייצור השיא, תנובת החלב יורדת בקורלציה עם עליה בתמותת תאים המאופיינת ברמות גבוהות של אפופטוזיס של תאי האפיתל הנמצאים בקשר ישיר עם החלב עצמו, ולכן יתכן שיש קשר אסוציאטיבי ישיר בין הרכב החלב לרקמה המייצרת אותו שמביאים לכך שאפיתל הבלוטה יעבור מוות תלוי אפופטוזיס. החלבון אלפא-לקטאלבומין (α -LA) הוא רכיב מרכזי בחלב פרה, ובחלב יונקים בכלל, המהווה כ-3.5% מסך החלבון הכללי, וכ-17-20% מחלבוני מי הגבינה. תפקידו הפיזיולוגי העיקרי הוא ויסות האנזים לקטוז סינתאז בתהליך ייצור הלקטוז בעטין. מעבר לתפקידו המטבולי, נמצא גם כי לחלבון α -LA יש יכולת לעבור שינוי קונפורמציה, אשר במצבים מסוימים הופך אותו לחלבון פעיל ביולוגית בעל תכונות ציטוטוקסיות כלפי תאים סרטניים. צורתו הנטיבית של α -LA שומרת על מבנה גלובולרי יציב, אך בתנאי סביבה מסוימים, כגון, שינוי pH, ריכוז יוני סידן או אינטראקציה עם שומנים, הוא עשוי להתקפל בצורה שונה וליצור קומפלקס הידוע כ- HAMLET/BAMLET (Human/Bovine Alpha-Lactalbumin Made Lethal to Tumor cells) המעודד אפופטוזיס (מוות תאי מתוכנת) בתאי סרטן.

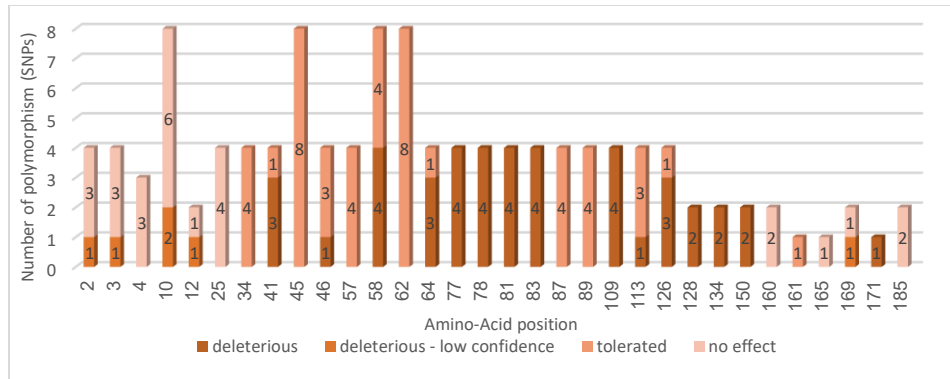
מה הקשר בין רמת החלבון α -LA וקיפולו לתפוקת החלב? מצד אחד, עליה ברמת החלבון התקינה יכולה לגרום לעליה בכמות החלבון בחלב ואיכותו. מצד שני, עליה בצורת הקיפול הלא תקינה יכולה לגרום למוות תאי אפיתל וכך לירידה בתפוקת החלב לאורך זמן. במחקר זה בחנו את ההשערה כי בחלב של פרות הנמצאות בסוף תקופת התחלובה קיימות רמות גבוהות יותר של α -LA בצורתו הלא נטיבית, לעומת חלב של פרות בתחילת התחלובה. האם יתכן כי חלבונים אלו מעודדים אפופטוזיס בתאי אפיתל העטין, וכך גורמים לירידה בתפוקת החלב בסוף תקופת התחלובה? מטרת המחקר הייתה לפתח שיטות אמינות למדידת α -LA ולבחון את השפעת דגימות חלב מתחילת ומסוף התחלובה על חיות תאי אפיתל העטין.

רקע

משק החלב הינו גורם מרכזי וחשוב בתעשיית המזון העולמית והמקומית. תפוקת החלב ואיכותו הינם גורמים מכריעים המעצבים את משק החלב בישראל.

תאי אפיתל בבלוטת החלב הם האחראיים על הפרשת החלב ולפיכך חשיבותם תפקודם הפיזיולוגי התקין מהווים גורם מכריע ליצור חלב איכותי ולמען שמירה על בריאות הפרה היצרנית. ראשית התחלובה מאופיינת בעליה מתמדת בתנובת החלב עד לשלב יצור מקסימלי. לאחר תקופת ייצור השיא, תנובת החלב יורדת, וירידה זו נמצאת בקורלציה עם עליה בתמותת תאים המאופיינת ברמות גבוהות של אפופטוזיס - מוות תאי מתוכנן בתאי האפיתל (Boutinaud et al., 2004). תאי האפיתל נמצאים בקשר ישיר עם החלב עצמו, ולכן יתכן שיש קשר אסוציאציה ישירה בין הרכב החלב לרקמה המייצרת אותו הגורמים לכך שתאי אפיתל הבלוטה יעברו מוות תלוי אפופטוזיס. אלפא-לקטאלבומין הינו גורם אפשרי בחלב היכול לגרום לאפופטוזיס. חלבון זה הוא חלבון עיקרי בחלב, ומהווה כ-17% מחלבוני ה-Whey בחלב בקר, ואחוז גבוה יותר בחלב אדם. החלבון בצורתו התקינה מעורב בייצור לקטוז, ועליה ברמתו מעלה את רמת ייצור החלב (Wheeler, 2003). גורמים כגון חום או חומציות משפיעים על קיפולו של החלבון, וחלבון בצורתו החדשה יכול להשרות מוות בתאים (Svanborg et al., 2003). באדם, קומפלקס הנוצר מאלפא-לקטאלבומין וחומצה אולאית גורם למוות תאי מתוכנן של תאי סרטן (Hallgren et al., 2006), ובעכבר הוכח כי הקומפלקס גורם גם למוות של תאי אפיתל בלוטת החלב (Baltzer et al., 2004). לפיכך, השערת המחקר המוצע היא כי החלבון אלפא-לקטאלבומין עלול להשרות מוות תאי ברקמת העטין, דבר שגורם לירידה בייצור החלב ו/או לקיצור משך תקופת התנובה המקסימאלית.

קיפול משני של החלבון יכול להיות מושפע מגורמים גנטיים או סביבתיים. הגורמים הסביבתיים שיכולים להשפיע על הקיפול הינם שינויים ברמת חומציות החלב, רמת סידן, או נוכחות חומצות שומן מסוימות (Svensson et al., 2000). שינויים ברצף החלבון קיימים בין גזעי פרות שונים, וידועים כמשפיעים על הרכב החלב וכמותו (Bleck and Bremel, 1993). ידועים פולימורפים רבים באזור המקודד בגן (איור 1). גורמים גנטיים נוספים אשר מעורבים בקיפול חלבונים הינם גנים הקשורים לתרגום חלבונים (initiation factors, elongation factors, ribosome genes), וגנים המנטרים את יציבות החלבונים (Heat-shock proteins, Chaperon).



איור 1: שינויים גנטיים ידועים בגנום הפרה עבור הגן LALBA המקודד לחלבון אלפא-לקטאלבומין. עבור כל חומצה אמינית ברצף החלבון מופיע מספר השינויים הגנטיים הידועים (SNPs). שינויים אלו מסומנים לפי השפעתם החזויה על החלבון, ויכולים לגרום לשינוי בחומצה אמינית, הכנסת קודון-עצירה, או יציאה ממסגרת קריאה.

מעבר למעורבותו במוות תאי ובבקרת יצור החלב, חלב העשיר באלפא-לקטאלבומין הינו מיטבי לתזונה. אלפא-לקטאלבומין מספק חלבון עשיר בטריפטופן, המשפיע על התפתחות נוירולית בתינוקות ועל שינה במבוגרים. חומצות שומן נוספות מעלות את הערכים התזונתיים של החלב ומסייעות ביצירת שריר, ובפעילות אנטי-חיידיקית (Layman et al., 2018).

מה הקשר בין רמת החלבון אלפא-לקטאלבומין וקיפולו לתפוקת החלב? מצד אחד, עליה ברמת החלבון הנטיבית יכולה לגרום לעליה בכמות החלבון בחלב ואיכותו. מצד שני, עליה בצורת הקיפול המשנית יכולה לגרום למוות תאי אפיתל וכך לירידה בתפוקת החלב לאורך זמן. לפיכך, מטרת הצעת המחקר הנוכחית הינה למאפיין את תכולת חלבון זה בחלב, והשפעתו על ייצור החלב.

היכולת למדוד ולהעריך את רמת החלבון ואת קיפולו תאפשר לחקור האם יש קשר בין גורמים אלו לתפוקת החלב ולאיכותו. מדידה בפרות לאורך תקופת התחלובה תחשוף האם רמה גבוהה יותר של החלבון או חלבון הנוטה יותר לשינוי קונפורמציה גורם לירידה בתפוקת החלב. דבר זה יכול להוביל ליצירת מדד נוסף לבחירת פרות בהתאם לכמות והנטייה לשמור על הקונפורמציה הנטיבית של החלבון, אשר תאפשר ייצור חלב מוגדל וייצור חלב מיטבי יותר לתזונה. בנוסף ליכולת לשפר את תפוקת החלב, יתרונות נוספים של המחקר המוצע הינם זיהוי גורמים בחלב המעודדים הפסקת ייצור חלב, דבר היכול להגביר את יעילות ייבוש החלב באמצעים טבעיים (בדומה לנעשה בעבר (Shamay et al., 2003), והכנה למחזור תחלובה חדש.

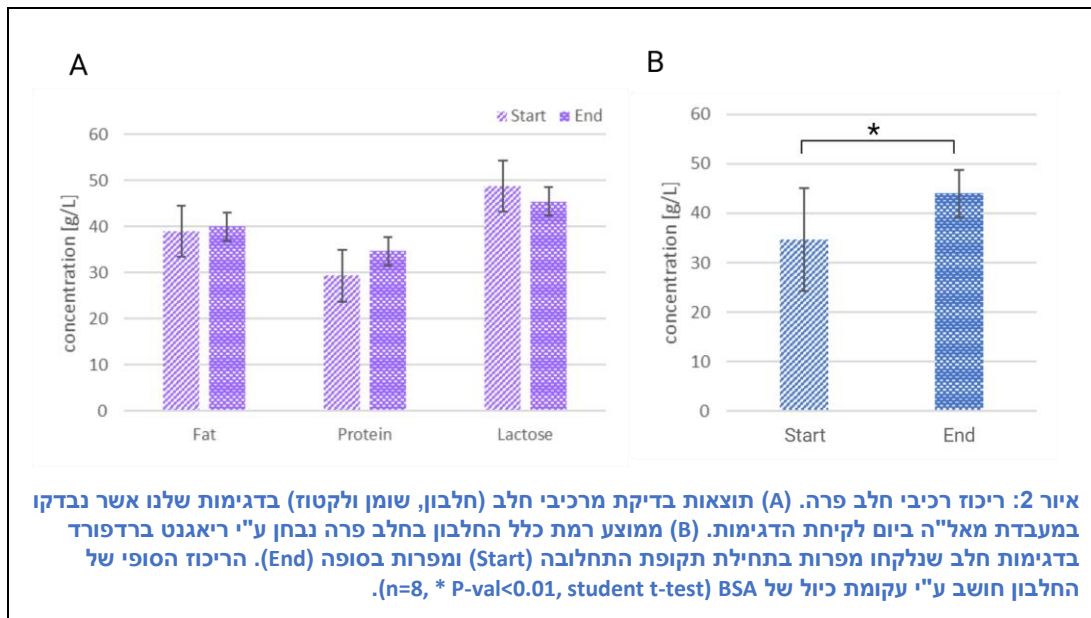
תוצאות המחקר

1 פיתוח שיטות ומדידת ריכוזי α -LA

במהלך המחקר פותחה שיטה הדירה למדידת רמת החלבון α -LA ולהערכתו במצבו הנטיבי. המחקר התבסס על דגימות חלב מפרות מגזע הולשטיין, אשר נלקחו בתחילת התחלובה (ימים בחלב 45-65) ובסוף תקופת התחלובה (ימים בחלב 350-450). הדגימות סורכזו בשביל להפריד ולהסיר את השומן ולאחר מכן יובשו בהקפאה ונשמרו בהקפאה עד לביצוע הניסויים. ביום הדגימה, החלב הועבר גם לבדיקת רכיבי חלב (חלבון, שומן ולקטוז) במעבדת מאל"ה.

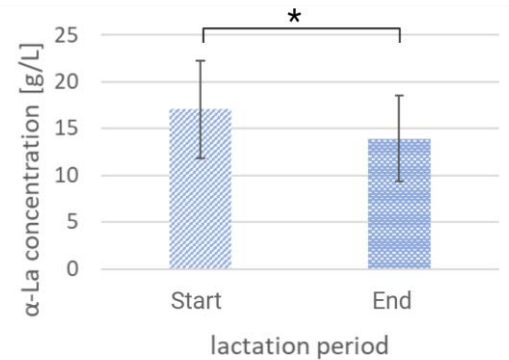
1.1 מדידת ריכוז כלל החלבון

מדידת כלל החלבונים בחלב בוצעה באמצעות שיטת ברדפורד, בעזרת עקומת כיוול של BSA. נבחנו 8 דוגמאות מתחילת התחלובה ו-8 דוגמאות מסוף התחלובה. נמצא כי רמת החלבון הכללי גבוה באופן מובהק בפרות שבסוף תקופת התחלובה לעומת תחילתה (איור 1, סטיית תקן \pm ממוצע בתחילת ובסוף התחלובה, 34.67 ± 10.3 g/L לעומת 43.98 ± 4.8 g/L, $PV < 0.01$, $DF = 14$, $T = -$ 2.64). כמו כן, תוצאות המדידה שלנו תאמו את התוצאות שהתקבלו ממעבדת מאל"ה. רמות השומן ולקטוז נשארו ללא שינוי משמעותי בסוף התחלובה לעומת תחילתה.



1.2 מדידת α -LA בשיטת ELISA תחרותית

בכדי למדוד את ריכוז α -LA השתמשנו בערכת ELISA תחרותית, הרגישה לקונפורמציה הנטיבית של החלבון. לאחר כיוול המערכת, בחנו חלב של 14 פרות מתחילת התחלובה (ממוצע ימים בחלב

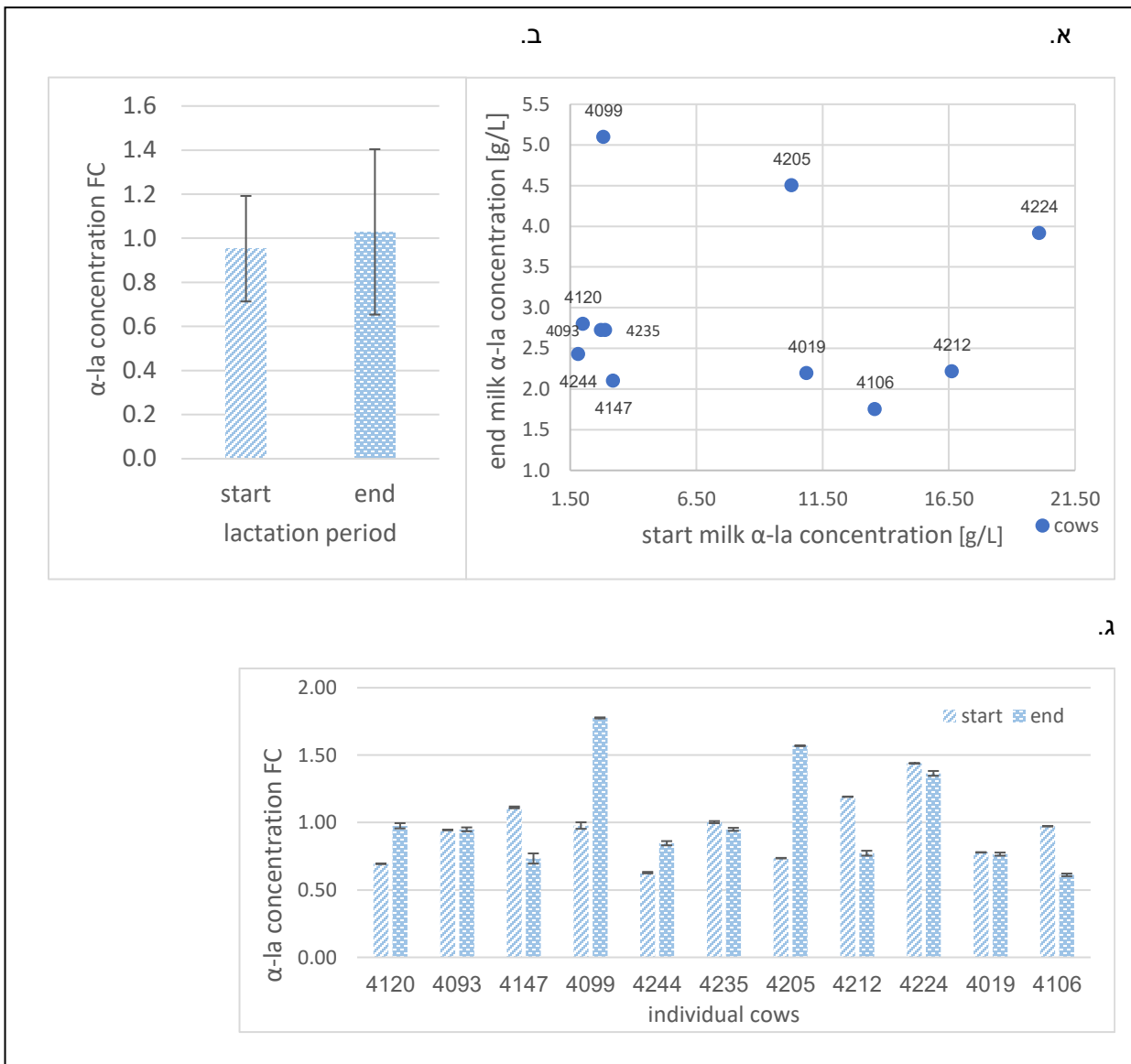


איור 3: ריכוז החלבון אלפא- לקטאלבומין בחלב פרה. (א.) ממוצע ריכוז החלבון אלפא- לקטאלבומין מ-14 פרות בתחילת תקופת התחלובה (start) ומ-15 פרות בסופה (end) נבחן בעזרת ELISA תחרותית. הריכוז הסופי של החלבון חושב ע"י עקומת כיוול של אלפא- לקטאלבומין סינטטי שהגיע יחד עם ערכת ה-ELISA. ממוצע של שני ניסויים. (n=15, *p-val=0.09, student t-test)

55 ו-15 פרות מסוף התחלובה (ממוצע ימים בחלב 400) בשני ניסויים נפרדים, אשר תוצאותיהם אוחדו. המדידות נעשו בדוגמאות חלב שנאספו מהפרות השונות ויובשו בתהליך ליאופוליזציה לאחר הפרדת השומן. לאחר הייבוש הרחפנו את אבקת החלב של הדגימות השונות ב-PBS לריכוז של 0.05 גרם למ"ל וערכנו את מדידת ה-ELISA. נמצא כי בפרות הנמצאות בתחילת התחלובה רמת α-LA גבוהה יותר באופן מובהק (איור 2, $17.02 \pm 5.2 \text{ mg/ml}$ בפרות בתחילת תחלובה לעומת $13.9 \pm 4.6 \text{ mg/ml}$ בפרות בסוף תחלובה, two tail t-test, $P=0.09$, $DF=27$, $T=-$), (2.08).

1.3 מדידת ריכוז α -LA בדגימות אינדיבידואליות

לאור השונות הגבוהה בריכוז החלבון בתוך שתי קבוצות החלב, החלטנו לדגום שוב את הפרות שנדגמו בתחילת התחלובה ולאסוף מהן חלב מסוף תקופת התחלובה שלהן. הדגימות מסוף תקופת התחלובה נלקחו 7 חודשים לאחר הדגימות הראשונות. בוצעה מדידה נוספת של ריכוז- α LA באמצעות ELISA תחרותית על החלב מתחילת וסוף התחלובה של אותן 11 פרות. הדגימות נבחנו בשני ניסויי ELISA נפרדים, מכיוון שהיה הבדל גדול יחסית בריכוזים בין שני הניסויים התוצאות נורמלו לדוגמא ספציפית שהייתה בשני הניסויים כדי שנוכל להשוות ביניהם (איור 3). התוצאות לא תאמו למדידות הקודמות - ריכוז החלבון α -LA היה מעט גבוה יותר בסוף התחלובה לעומת תחילתה, אך ללא מובהקות סטטיסטית (paired t-test, P=0.57, DF=10, T=-0.58). בנוסף לכך, נמצאה שונות גדולה בין הפרות: היו פרות ללא הבדל בריכוז החלבון בחלב מתחילת לעומת סוף התחלובה, פרות בהן היה יותר חלבון בחלב בתחילת התחלובה, ופרות בהן דווקא בחלב מסוף התחלובה היה יותר חלבון.



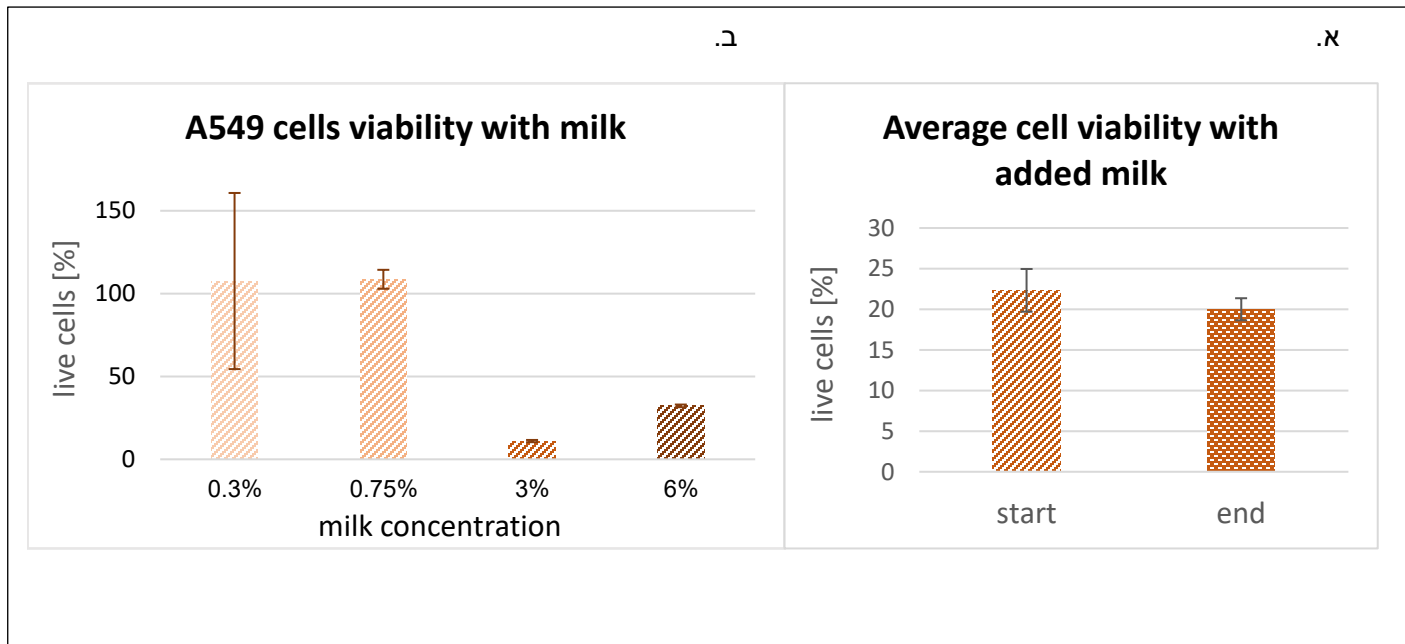
איור 3: ריכוז α -LA בחלב פרה נמדד בעזרת ערכת ELISA. א. הצגה של ריכוז החלבון בחלב מסוף התחלובה לעומת הריכוז בתחילת התחלובה. המספרים ליד הדגימות הם סימוני הפרות השונות. ב. ממוצע ריכוז החלבון בפרות מתחילת (start) ומסוף (end) תחלובה. הדגימות מנורמלות לדוגמא שנמדדה בשני ניסויי ELISA. ג. דגימות אינדיבידואליות, ריכוז אלפא רקאלבומין בחלב סוף והתחלה מאותה הפרה. הדגימות מנורמלות לדוגמא שנמדדה בשני ניסויי ELISA.

2 בדיקת חיות תאי אפיתל בנוכחות חלב

בחנו את השפעת החלב על חיות התאים, בהנחה שחלב מסוף תחלובה עשוי להכיל רכיב המעודד אפופטוזיס. השווינו את השפעת החלב מתחילת התחלובה לעומת חלב מסוף התחלובה על תאי האפיתל מרקמת בלוטות החלב של פרה (L1), ועל תאי אפיתל סרטניים (A549).

2.1 בדיקת חיות תאי A549 בנוכחות חלב

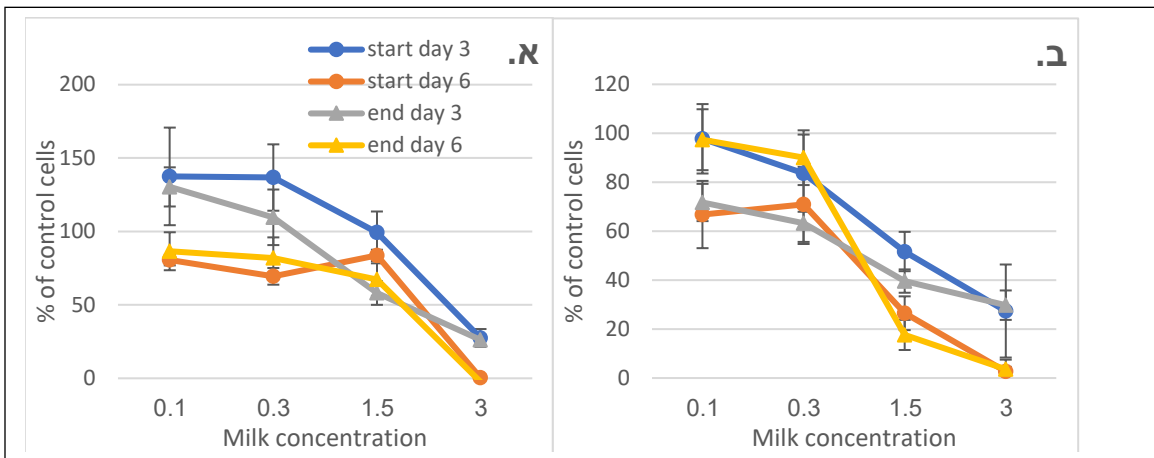
מכיוון שהראו בניסויים קודמים ש- α -LA בקונפורמציה המשנית שלו גרם לתמותה של תאי A549, תאים שבודדו מסרטן ריאות ממקור אפיתליאלי. התחלנו בגידול תאי A549 בנוכחות דגימות חלב משני שלבי התחלובה, ובדיקת חיות התאים בעזרת התבחין Alamar Blue. נמצא כי חלב מסוף תחלובה הפחית את חיות התאים בהשוואה לחלב מתחילת תחלובה (איור 4, סטיית תקן \pm ממוצע בהתחלה לעומת סוף התחלובה, 2.6 ± 22.33 לעומת 1.36 ± 20 , $p < 0.005$, $DF = 14$, $T = 3.34$). בבדיקת ריכוזים שונים של חלב (0.3%–6%) נמצא כי ריכוזים נמוכים עודדו פרוליפרציה קלה, בעוד שריכוזים גבוהים גרמו לעיכוב משמעותי בגידול.



איור 4: הערכת חיות תאי אפיתל בנוכחות חלב מתחילת וסוף תחלובה. הערכים בשני הגרפים מנורמלים לכמות התאים שגדלו בבאריות קונטרול ללא תאים (א). ממוצע חיות התאים בנוכחות חלב בריכוז 3% מתחילת וסוף תחלובה. (ב) כימות חיות התאים בנוכחות חלב מתחילת התחלובה בריכוזי חלב שונים.

2.2 בדיקת חיות תאי A549 ו-L1 בריכוזי חלב שונים

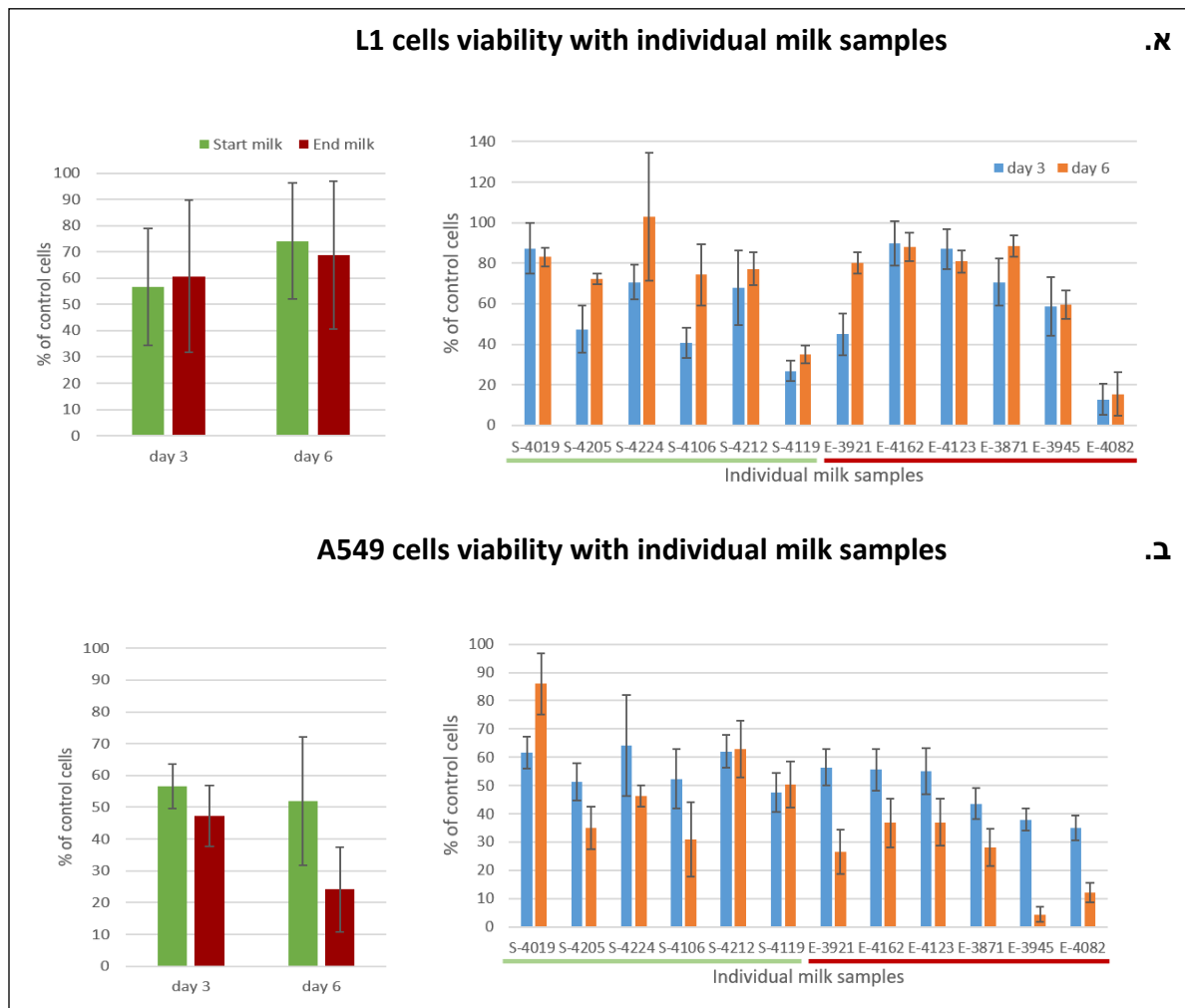
תאי A549 ו-L1 גודלו במשך 3 ו-6 ימים בנוכחות חלב מתחילת ומסוף תחלובה בארבעה ריכוזים שונים. נצפתה ירידה כללית בחיות התאים ככל שריכוז החלב עלה, ללא הבדל מובהק בין שלבי התחלובה בתאי L1 (איור 5, Anova, $p=0.13$ ביום 3, $p=0.98$ ביום 6) ובתאי A549 (Anova, $p=0.069$ ביום 3, $p=0.11$ ביום 6). עם זאת, בריכוזים נמוכים של חלב נצפתה עלייה קלה בפרוליפרציה של תאי L1 לעומת תאי הקונטרול.



איור 5: תוצאות של מבחני חיות עם התבחין Alamar blue, תחת ריכוזים שונים של חלב, מוצגים ביחס לחיות תאי קונטרול שגודלו ללא חלב. א. רמת חיות תאי L1 אשר גודלו במשך שלושה ושישה ימים בארבעה ריכוזים שונים של חלב מסוף ומתחילת תחלובה. ב. רמת חיות תאי A549 אשר גודלו במשך שלושה ושישה ימים בארבעה ריכוזים שונים של חלב מסוף ומתחילת תחלובה ביחס לתאי הקונטרול.

2.3 בדיקת חיות תאי A549 ו-L1 בנוכחות דגימות חלב אינדיבידואליות

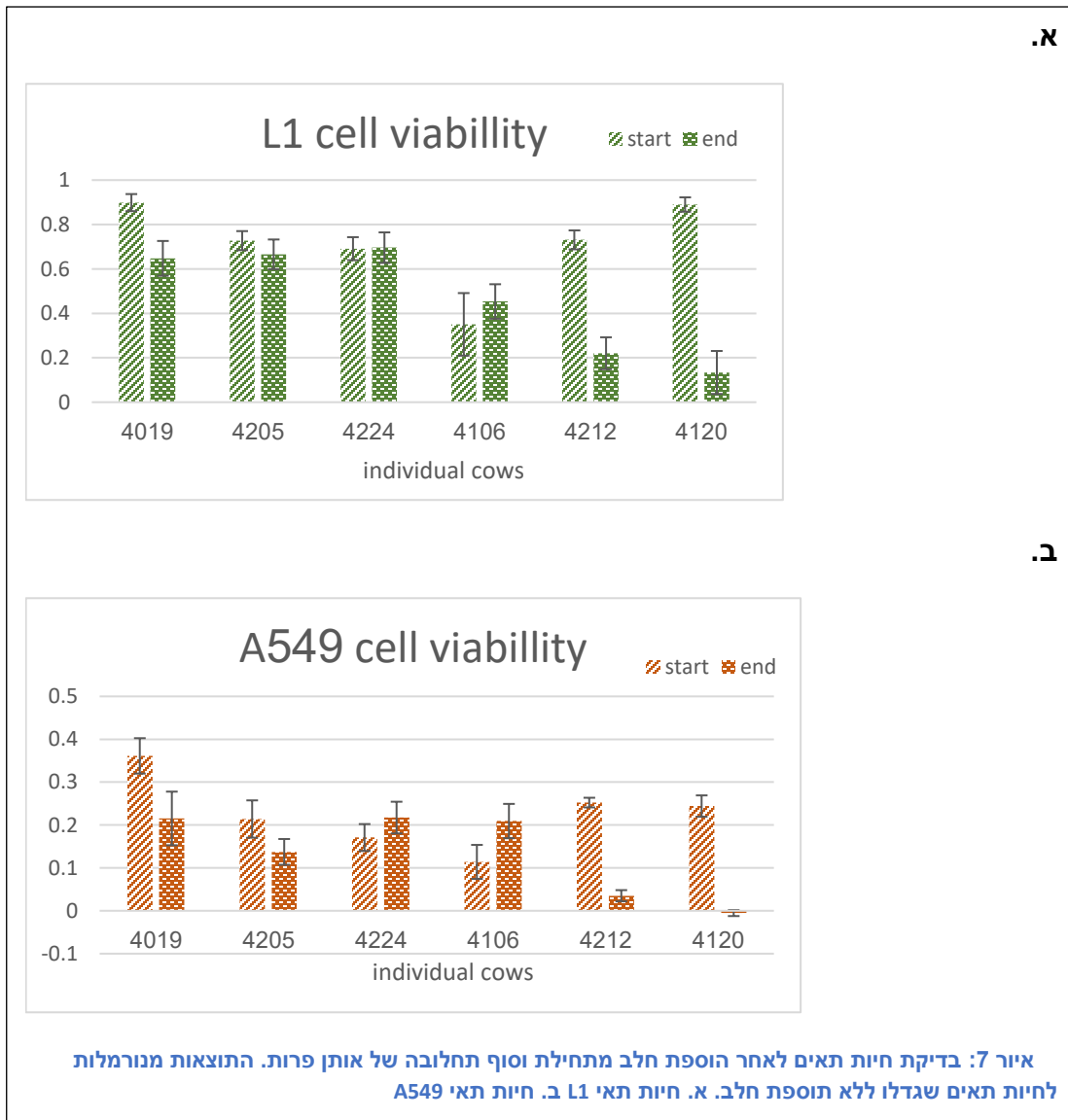
עד כה, בעת הוספת החלב לתאים, השתמשנו בחלב שהורכב מערבוב של דגימות של פרות מתחילת התחלובה ומערבוב של דגימות של פרות מסוף התחלובה. כדי לבדוק שמיצוע הדגימות לא משפיע על התוצאות, בחנו דגימות חלב אינדיבידואליות מ-12 פרות (6 מתחילת תחלובה ו-6 מסופה, איור 6). בתאי A549 נצפה הבדל מובהק לאחר 6 ימים – חיות התאים הייתה נמוכה יותר בנוכחות חלב מסוף תחלובה (t-test, ביום השלישי $p=0.08$, ביום השישי $p=0.02$). בתאי L1 לא נצפה הבדל מובהק (t-test, ביום השלישי $p=0.8$, ביום השישי $p=0.7$).



איור 6: תוצאות של מבחני חיות עם התבחין Alamar blue. התאים גודלו בנוכחות חלב מ-12 פרות שונות (6 מתחילת תחלובה ו-6 מסוף התחלובה), במשך שישה ימים, רמת חיות התאים נבחנה כעבור שלושה ושישה ימים. התוצאות מוצגות ביחס לחיות תאי קונטרול שגודלו ללא חלב. א. רמת חיות תאי L1. מימין תוצאות חיות לדוגמאות אינדיבידואליות, משמאל ממוצע חיות בנוכחות חלב מתחילת ומסוף התחלובה. ב. רמת חיות תאי A549 בדוגמאות אינדיבידואליות מימין, וממוצע לחלב סוף ותחילת תחלובה משמאל.

2.4 בדיקת חיות התאים בנוכחות דגימות חלב סוף ותחילת תחלובה של אותן פרות

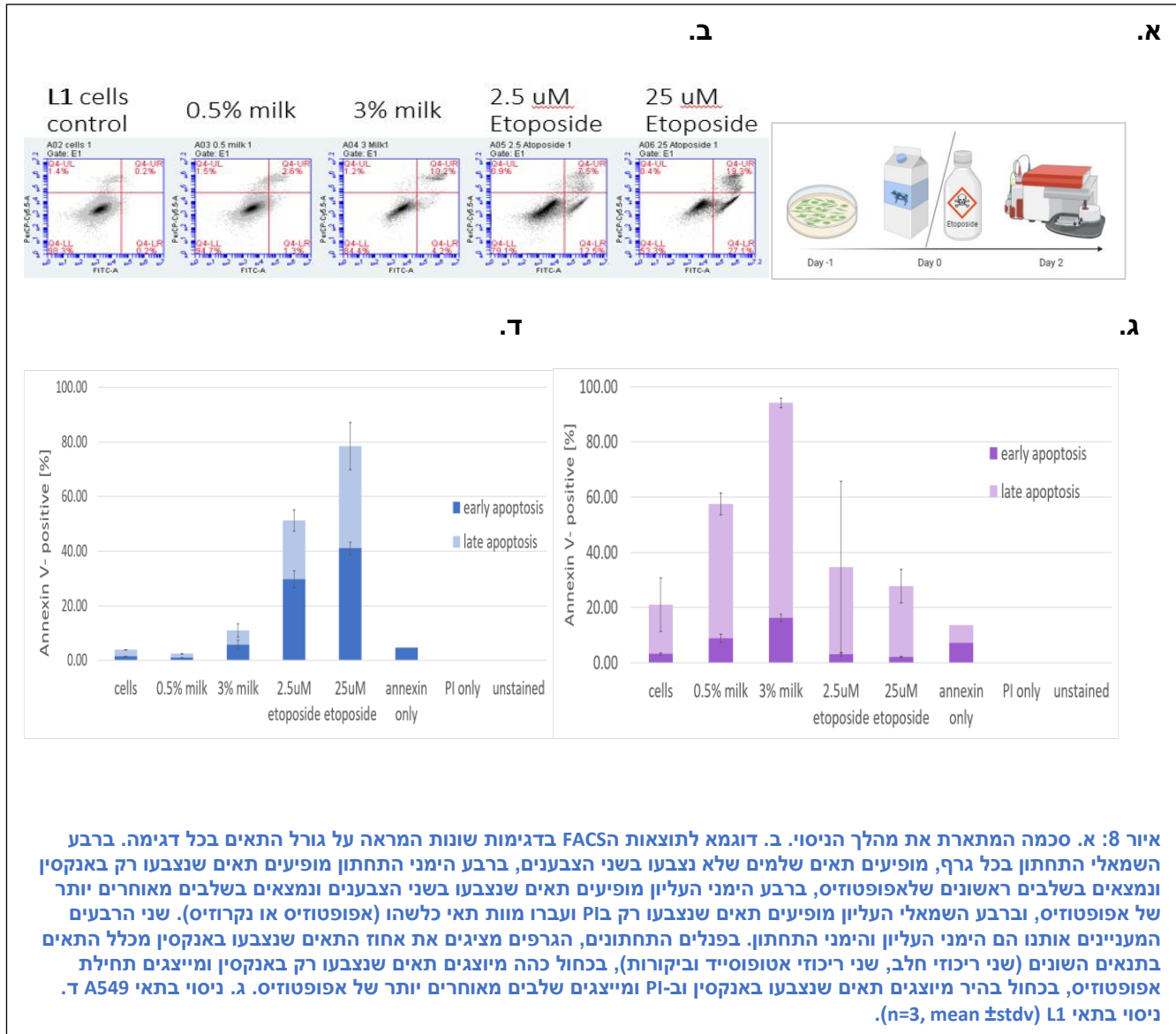
בהשוואה של השפעת הדוגמאות אינדיבידואליות על התאים נצפתה שונות גבוהה בין פרטים. בשל כך, כעבור 7 חודשים אספנו דגימות חלב מסוף התחלובה של פרות שכבר דגמנו בתחילת התחלובה, בכדי שנוכל להשוות השפעת חלב של סוף ותחילת תחלובה של אותה פרה. בתאי L1 ב-3 פרות נמצאו הבדלים בחיות התאים - בנוכחות חלב מסוף התחלובה היה מובהק פחות תאים וב-3 פרות נוספות לא היה הבדל מובהק (איור 7, t -test, 3 cows $p < 0.0001$, 3 cows $p > 0.08$). בתאי A549 היו הבדלים מובהקים בחיות התאים בנוכחות שני סוגי החלב אבל ב-2 מתוך 6 הפרות דווקא בנוכחות חלב מסוף התחלובה כמות התאים הייתה גבוהה יותר. בתאי L1 היו יותר תאים יחסית לתאי A549.



3.1 פיתוח שיטת מדידת השפעת הוספת חלב על רמת אפופטוזיס באמצעות קריאת FACS של Annexin V/PI

פיתוח שיטה חדשה לזיהוי וכימות אפופטוזיס בתאים שטופלו בחלב. ביצענו צביעות Annexin V/PI לשני סוגי התאים, יומיים לאחר הוספת דגימות חלב. שיטת Annexin V-PI משמשת בציטומטריית זרימה (FACS) לכימות מדויק של אפופטוזיס (מוות תאי מתוכנת) על ידי שימוש בשני סמנים פלואורסצנטיים **Annexin V**: נקשר לליפיד פוספטידילסרין (PS) שעבר היפוך לשכבה החיצונית של קרום התא בתהליך **אפופטוזיס מוקדם**, בעוד ש **Propidium Iodide (PI)** צבע DNA שאינו חודר קרום תקין, חודר וצובע את הגרעין רק כאשר שלמות הקרום נפגעת בשלבי **אפופטוזיס מאוחר או נמק**. על ידי ניתוח דו-ממדי של עוצמת הפלואורסצנציה של שני הסמנים, ניתן להבחין בארבע אוכלוסיות עיקריות: תאים חיים (Annexin V-/PI-), אפופטוזיס מוקדם (Annexin V+/PI-), ואפופטוזיס מאוחר/נמק (Annexin V+/PI+). נמצא כי ריכוז גבוה יותר של חלב גורם לרמה גבוהה יותר של אפופטוזיס בשני סוגי התאים. תאי A549 היו רגישים יותר להוספת החלב והראו יותר אפופטוזיס יחסית לתאי L1 (איור 8). לעומת זאת, תאי L1 היו רגישים לאטופוסייד, תרופה כימותרפית חזקה המשרה אפופטוזיס ומשמשת לטיפול בסוגים רבים של סרטן. תאים אלו, אשר אינם סרטניים, הראו רגישות תלויית מינון. תאי A549, תאים סרטניים בעלי עמידות לתרופה, היו רגישים פחות לאטופוסייד והריכוז הגבוה יותר לא גרם ליותר אפופטוזיס. התאים שלא תוספו בחלב או בחומר גורם לאפופטוזיס הצביעו על הרמה הבסיסית של המוות

התאי בתרבית שהיה נמוך יותר לעומת התנאים עם החלב או האטופוסטייד. הביקורות לצביעות הראו שהשיטה שלנו התבצעה בצורה תקינה.

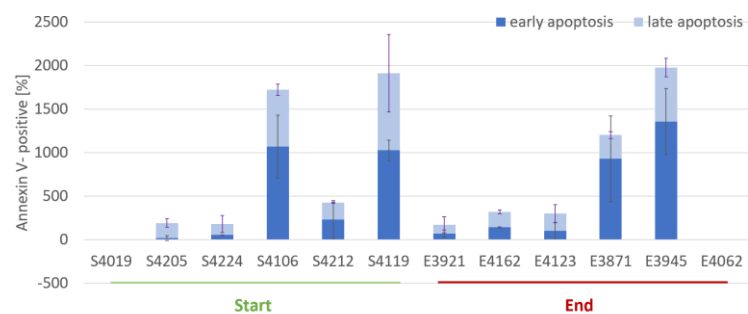


3.2 בדיקת אפופטוזיס בתאי A549 ו-L1 בנוכחות דגימות חלב אינדיבידואליות

בבחינת הדגימות האינדיבידואליות לאחר הוספת חלב מתחילת וסוף תחלובה בריכוז 3%, הדבר שהכי ניכר הוא השונות ברמת האפופטוזיס בשני סוגי התאים ובתגובה לשני סוגי החלב. אין הבדל מובהק בהשפעת חלב מתחילת ומסוף התחלובה על שני סוגי התאים (איור 9, t-test, תאי L1: אפופטוזיס ראשוני $p=0.89$, אפופטוזיס מאוחר $p=0.53$; תאי A549: אפופטוזיס ראשוני $p=0.32$, אפופטוזיס מאוחר $p=0.98$). בנוסף, ניכרה שונות רבה בין פרטים שונים.

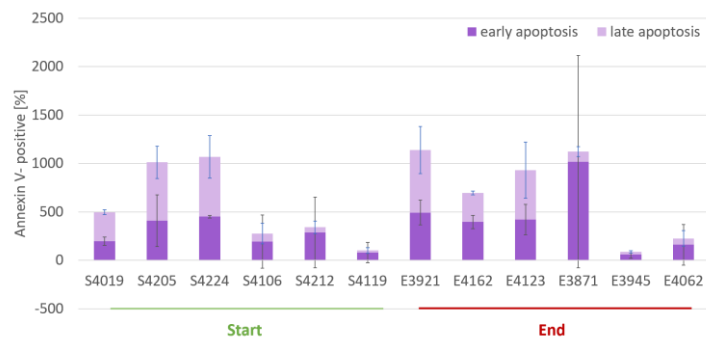
א.

Apoptosis rates of L1 cells, induced by Start and End milk



ב.

Apoptosis rates of A549 cells, induced by Start and End milk



איור 9: הגרפים מציגים את אחוז התאים שנצבעו באנקסין (הצובע תאים בתחילת אפופטוזיס) ובPI (צובע תאים הנמצאים בשלבים מאוחרים יותר של האפופטוזיס). א. השוואת רמות אפופטוזיס בתאי L1 בתגובה לחלב מתחילת וסוף תחלובה של פרות אינדיבידואליות. בכחול כהה מיוצגים תאים שנצבעו רק באנקסין, בכחול בהיר מיוצגים תאים שנצבעו באנקסין ו-PI. ב. השוואת רמות אפופטוזיס בתאי A549. סגול כהה- תאים שנצבעו באנקסין, סגול בהיר- תאים שנצבעו ב-annexinV ובPI (n=3, mean \pm stdv).

המחקר הביא לפיתוח מוצלח של שיטות כימות מדויקות הן לרמת החלבון α -LA בחלב והן למדידת חיות ואפופטוזיס בתאי אפיתל. בניסויים הראשונים התוצאות תאמו את ההיפותזה שלנו - הראינו שריכוז האלפא לקטאלבומין בחלב מתחילת התחלובה גבוה יותר מאשר בסופה, מה שהיה יכול להצביע על כך שחלק מהחלבון שינה את צורתו ולכן ריכוז החלבון התקין ירד. אבל בבדיקות שביצענו על חלב מסוף ותחילת תחלובה של אותן פרות, גילינו שונות רבה בין הפרטים. היו פרות ללא הבדל בריכוז החלבון בחלב מתחילת לעומת סוף התחלובה, היו פרות בהן היה יותר חלבון בחלב מתחילת התחלובה והיו פרות בהן דווקא בחלב מסוף התחלובה היה יותר חלבון.

בבחינת השפעת החלב על חיות התאים גם כן ראינו שונות גדולה בין הפרות. אומנם בניסוי הראשון נמצא כי חלב מסוף תחלובה הפחית את חיות התאים בהשוואה לחלב מתחילת תחלובה בתאי A549. בניסוי העוקב, שבוצע שוב על תאי A549 וגם על תאי L1, לא היה הבדל מובהק בחיות התאים בהשוואת השפעת חלב מסוף ותחילת תחלובה. בשני הניסויים נמצא כי חלב בריכוזים גבוהים פוגע בחיות תאים, ובמיוחד בתאי A549. בניסויים הבאים השונו השפעת חלב של פרות אינדיבידואליות ועדיין נצפתה שונות – בניסוי הראשון בתאי A549 חיות התאים הייתה נמוכה יותר בנוכחות חלב מסוף תחלובה כעבור 6 ימים בתרבית, בתאי L1 לא נצפה הבדל מובהק. ואילו בניסוי הבא, בו השונו השפעת חלב של פרות אינדיבידואליות ספציפיות לא היה הבדל מובהק בהשפעת שני סוגי החלב על שני סוגי התאים.

גם בבחינת רמות האפופטוזיס ראינו שונות רבה בין הפרות. לא ראינו הבדל בהשפעה של חלב מתחילת לעומת סוף תחלובה על שני סוגי התאים. נמצא כי ריכוז גבוה יותר של חלב גורם לרמה גבוהה יותר של אפופטוזיס בשני סוגי התאים. תאי A549 היו רגישים יותר להוספת חלב, בעוד שתאי L1 הגיבו בצורה מתונה יותר.

לא מצאנו קשר בין ריכוז החלבון α -LA בחלב לבין כמות מוות תאי ולכן לא הצלחנו להוכיח את ההיפותזה שלנו. אבל מצאנו שריכוזים גבוהים יותר של חלב גורמים ליותר אפופטוזיס ושתאי A549 רגישים יותר מתאי אפיתל עטין לנוכחות החלב. יתכן וריכוז α -LA בצורתו התקנית אינו מדד טוב להערכת כמות החלבון בצורתו האפופטוטית, ויתכן והגורם לאפופטוזיס הוא מרכיב אחר בחלב.

Baltzer, A., Svanborg, C., and Jaggi, R. (2004). Apoptotic cell death in the lactating mammary gland is enhanced by a folding variant of alpha-lactalbumin. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 1221–1228.

Bleck, G.T., and Bremel, R.D. (1993). Correlation of the α -Lactalbumin (+15) Polymorphism to Milk Production and Milk Composition of Holsteins. *J. Dairy Sci.* **76**, 2292–2298.

Boutinaud, M., Guinard-Flament, J., and HélèneJammes (2004). The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reprod. Nutr. Dev.* **44**, 499–508.

Brinkmann, C. R., Thiel, S., Larsen, M. K., Petersen, T. E., Jensenius, J. C. & Heegaard, C. W. Preparation and comparison of cytotoxic complexes formed between oleic acid and either bovine or human α -lactalbumin. *J. Dairy Sci.* **94**, 2159–2170 (2011).

Hallgren, O., Gustafsson, L., Irjala, H., Selivanova, G., Orrenius, S., and Svanborg, C. (2006). HAMLET triggers apoptosis but tumor cell death is independent of caspases, Bcl-2 and p53. *Apoptosis* **11**, 221–233.

Layman, D.K., Lönnerdal, B., and Fernstrom, J.D. (2018). Applications for α -lactalbumin in human nutrition. *Nutr. Rev.* **76**, 444–460.

Shamay, A., Shapiro, F., Leitner, G., and Silanikove, N. (2003). Infusions of casein hydrolyzates into the mammary gland disrupt tight junction integrity and induce involution in cows. *J. Dairy Sci.* **86**, 1250–1258.

Svanborg, C., Agerstam, H., Aronson, A., Bjerkvig, R., Düringer, C., Fischer, W., Gustafsson, L., Hallgren, O., Leijonhuvud, I., Linse, S., et al. (2003). HAMLET kills tumor cells by an apoptosis-like mechanism--cellular, molecular, and therapeutic aspects. *Adv. Cancer Res.* **88**, 1–29.

Svensson, M., Håkansson, A., Mossberg, A.K., Linse, S., and Svanborg, C. (2000). Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4221–4226.

Wheeler, M.B. (2003). Production of transgenic livestock: promise fulfilled. *J. Anim. Sci.* **81 Suppl** **3**, 32–37.