

קוד זיהוי : 354-0136-00

נושא המחקר: הקשר בין ריכוז סידן יוני בחלב לדלקת עטין והתנוונות הרקמה היצרנית בבלוטת החלב בפרות.

סוג דו"ח : דו"ח מדעי שנת

חוקר ראשי : סליניקוב ניסים

חוקרים משניים: שמאי אבי  
שפירו פירה



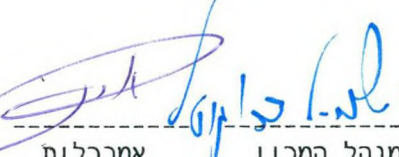
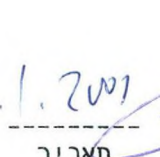
מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח:

המועצה לענף החלב

תקציר הדו"ח:

לחבורים הדוקים (TIGHT JUNCTION; להלן ח"ה) בין תאים תפקיד חיוני בתפקוד תאים אפיתליאלים ככלל ותפקוד התאים המפרישים בבלוטת החלב בפרט. ניתוק הח"ה בין התאים הנו השלב הראשון בתהליך ההתנוונות של בלוטת החלב. ידוע היטב שריכוז חוץ תאי תקין של סידן (כ 3 מילימולר) במצבו היוני (CA++) הנו חיוני לשלמות הח"ה בין תאים אפיתליאלים ככלל ותאי בלוטת החלב המפרישים חלב בפרט. החלב של פרות עתיר בסידן (כ 70 מילימולר), עובדה ההופכת אותו למקור חשוב להספקת סידן לצאצאים. רובו של הסידן בחלב קשור למולקולות הקזאין ורק מעוטו (כ 3 מילימולר) במצבו היוני. החלב מכיל מערכת אנזימטית רבת עוצמה (פלזמין אקטיבטור-פלזמינוגן-פלזמין) לפרוק קזאין. כ-1/3 מהחלבונים במסע מי הגבינה מורכבים מתוצרי פרוק של קזאין. פלזמין הנו האנזים העיקרי המצוי בחלב פרות ויונקים אחרים. לפלזמין זיקה למולקולת הקזאין והוא חותך את הקזאינים סמוך למולקולות סרין תוך שחרור פפטידים (דהיינו, חלבונים קצרים) עתירי זרחן (פוספופפטידים). פוספופפטידים הנם בעלי כושר מרובה לקשור סידן, עד כדי 20 מולקולות סידן על כל מולקולת פוספופפטיד. עקב כך זוכים פפטידים אלו להתעניינות רבה לשימושים כגון הגברת הספקת ויעילות ספיגת סידן (שהינה חשובה ביותר במצבים המלווים בבריחה מוגברת של סידן, אוסטיאופוריס), והוספתן למשחות שיניים כדי למנוע יצירת אבן שן. הפלזמין מצוי בחלב במצב בלתי פעיל (זימוגן) כפלזמינוגן. ההפיכה של פלזמינוגן לפלזמין פעיל מבוקרת ע"י פלזמין אקטיבטורים, שהם בעצמם אנזימים, החותכים את הפלזמינוגן באתר ספציפי ומשחררים מתוכו פלזמין פעיל. בעבודות שנעשו בשנים האחרונות נמצא שבמצבים של הפסקת חליבה ודלקת חלב יש שחרור מואץ של פלזמין אקטיבטור לחלב ולעליה דרמטית (פי 5) בפעילות הפלזמין החופשי בחלב. המנגנון המקשר בין העלייה בפעילות הפלזמין להשריית תהליך ההתנוונות של בלוטת החלב אינו ברור. בעבודה זו היה כוונתנו לבדוק את ההשערה כי פוספופפטידים המשתחררים לחלב עקב פעילות פלזמין על מולקולות קזאין מורידים את ריכוז הסידן היוני בחלב ועקב כך גורמים לפתיחת הח"ה בין התאים. הפרות של תוכנית זו עשויות לספק כלי רב ערך לוטרינרים בהקטנת הנזקים של ירידה בייצור החלב במצב של דלקת ולמגדלים כאמצעי אפקטיבי לבקרה של אורך תקופת התחלובה. תוצאות העבודה הראו שפוספופפטידים שמקורם בקזאין אומנם משרים תהליך של מוות מתוכנן מראש בתאים (אפופטוזיס) המפרישים ולהתנוונות הרקמה היצרנית (אנוולוציה) בבלוטה. יחד עם זאת, תוצאות העבודה הראו שתכונה זו של הפוספופפטידים אינם קשורה ליכולתם לקשור סידן.

חתימות ואישורים:

חוקר ראשי:   
מנהל המחלקה:   
מנהל המכון:   
אמרכלות:   
תאריך: 4.1.2001

## הקשר בין ריכוז סידן יוני בחלב לדלקת עטין והתנוונות הרקמה היצרנית בבלוטת החלב בפרות

תכנית 354-136-00

נ. סילניקוב, א. שמאי, פ. שפיר

### תקציר

לחבורים הדוקים (tight junctions; להלן ח"ה) בין תאים תפקיד חיוני בתפקוד תאים אפיתליאלים ככלל ותפקוד התאים המפרישים בבלוטת החלב בפרט. ניתוק הח"ה בין התאים הנו השלב הראשון בתהליך ההתנוונות של בלוטת החלב. ידוע היטב שריכוז חוץ תאי תקין של סידן (כ 3 מילימולר) במצבו היוני ( $\text{Ca}^{++}$ ) הנו חיוני לשלמות הח"ה בין תאים אפיתליאלים ככלל ותאי בלוטת החלב המפרישים חלב בפרט. החלב של פרות עתיר בסידן (כ 70 מילימולר), עובדה ההופכת אותו למקור חשוב להספקת סידן לצאצאים. רובו של הסידן בחלב קשור למולקולות הקזאין ורק מעוטו (כ 3 מילימולר) במצבו היוני. החלב מכיל מערכת אנזימטית רבת עוצמה (פלזמין אקטיבטור-פלזמינוגן-פלזמין) לפרוק קזאין. כ- 1/3 מהחלבונים במקטע מי הגבינה מורכבים מתוצרי פרוק של קזאין. פלזמין הנו האנזים העיקרי המצוי בחלב פרות ויונקים אחרים. לפלזמין זיקה למולקולת הקזאין והוא חותך את הקזאינים סמוך למולקולות סרין תוך שחרור פפטידים (דהיינו, חלבונים קצרים) עתירי זרחן (פוסטופפטידים). פוסטופפטידים הנם בעלי כושר מרובה לקשור סידן, עד כדי 20 מולקולות סידן על כל מולקולת פוסטופפטיד. עקב כך זוכים פפטידים אלו להתעניינות רבה לשימושים כגון הגברת הספקת ויעילות ספיגת סידן (שהינה חשובה ביותר במצבים המלווים בבריחה מוגברת של סידן, אוסטיאופוריסם), והוספתן למשחות שיניים כדי למנוע יצירת אבן שן. הפלזמין מצוי בחלב במצב בלתי פעיל (זימוגן) כפלזמינוגן. ההפיכה של פלזמינוגן לפלזמין פעיל מבוקרת ע"י פלזמין אקטיבטורים, שהם בעצמם אנזימים, החותכים את הפלזמינוגן באתר ספציפי ומשחררים מתוכו פלזמין פעיל. בעבודות שנעשו בשנים האחרונות נמצא שבמצבים של הפסקת חליבה ודלקת חלב יש שחרור מואץ של פלזמין אקטיבטור לחלב ולעליה דרמטית (פי 5) בפעילות הפלזמין החופשי בחלב. המנגנון המקשר בין העלייה בפעילות הפלזמין להשריית תהליך ההתנוונות של בלוטת החלב אינו ברור. בעבודה זו היה בכוונתנו לבדוק את ההשערה כי פוסטופפטידים המשתחררים לחלב עקב פעילות פלזמין על מולקולות קזאין מורידים את ריכוז הסידן היוני בחלב ועקב כך גורמים לפתיחת הח"ה בין התאים. הפרות של תוכנית זו עשויות לספק כלי רב ערך לוטרנירים בהקטנת הנזקים של ירידה בייצור החלב במצב של דלקת ולמגדלים כאמצעי אפקטיבי לבקרה של אורך תקופת התחלובה. תוצאות העבודה הראו שפוסטופפטידים שמקורם בקזאין אומנם משרים תהליך של מוות מתוכנן מראש בתאים (אפופטוזיס) המפרישים ולהתנוונות הרקמה היצרנית (אנופלוציה) בבלוטה. יחד עם זאת, תוצאות העבודה הראו שתכונה זו של הפוסטופפטידים אינם קשורה ליכולתם לקשור סידן.

## רקע

לחבורים הדוקים (*tight junctions*; להלן ח"ה) בין תאים תפקיד חיוני בתפקוד תאים אפיתליאלים ככלל ותפקוד התאים המפרישים בבלוטת החלב בפרט. ניתוק הח"ה בין התאים הנו השלב הראשון בתהליך ההתנוונות של בלוטת החלב (1). ידוע היטב שריכוז חוץ תאי תקין של סידן (כ 3 מילימולר) במצבו היוני ( $\text{Ca}^{++}$ ) הנו חיוני לשלמות הח"ה בין תאים אפיתליאלים ככלל ותאי בלוטת החלב המפרישים חלב בפרט (2). החלב של פרות עתיר בסידן (כ 70 מילימולר), עובדה ההופכת אותו למקור חשוב להספקת סידן לצאצאים. רובו של הסידן בחלב קשור למולקולות הקזאין ורק מעוטו (כ 3 מילימולר) במצבו היוני. החלב מכיל מערכת אנזימטית רבת עוצמה (פלזמין אקטיבטור-פלזמינוגן-פלזמין) לפרוק קזאין (3-1). כ- 1/3 מהחלבונים במקטע מי הגבינה מורכבים מתוצרי פרוק של קזאין. פלזמין הנו האמים העיקרי המצוי בחלב פרות ויונקים אחרים. לפלזמין זיקה למולקולת הקזאין והוא חותך את הקזאינים סמוך למולקולות סרין תוך שחרור פפטידים (דהיינו, חלבונים קצרים) עתירי זרחן (פוספופפטידים). פוספופפטידים הנם בעלי כושר מרובה לקשור סידן, עד כדי 20 מולקולות סידן על כל מולקולת פוספופפטיד. עקב כך זוכים פפטידים אלו להתעניינות רבה לשימושים כגון הגברת הספקת ויעילות ספיגת סידן (שהינה חשובה ביותר במצבים המלווים בבריחה מוגברת של סידן, אוסטיאופוריס), והוספתן למשחות שיניים כדי למנוע יצירת אבן שן. הפלזמין מצוי בחלב במצב בלתי פעיל (זימוגן) כפלזמינוגן. ההפיכה של פלזמינוגן לפלזמין פעיל מבוקרת ע"י פלזמין אקטיבטורים, שהם בעצמם אנזימים, החותכים את הפלזמינוגן באתר ספציפי ומשחררים מתוכו פלזמין פעיל. בעבודות שנעשו בשנים האחרונות נמצא שבמצבים של הפסקת חליבה ודלקת חלב יש שחרור מואץ של פלזמין אקטיבטור לחלב ולעליה דרמטית (פי 5) בפעילות הפלזמין החופשי בחלב. המנגנון המקשר בין העלייה בפעילות הפלזמין להשריית תהליך ההתנוונות של בלוטת החלב אינו ברור (6). בעבודה זו יש בכוונתנו לבדוק את ההשערה כי פוספופפטידים המשתחררים לחלב עקב פעילות פלזמין על מולקולות קזאין מורידים את ריכוז הסידן היוני בחלב ועקב כך גורמים לפתיחת הח"ה בין התאים. הפרות של תוכנית זו עשויות לספק כלי רב ערך לוטרינרים בהקטנת הנזקים של ירידה בייצור החלב במצב של דלקת ולמגדלים כאמצעי אפקטיבי לבקרה של אורך תקופת התחלובה.

## מטרת העבודה

מטרת העבודה לבחון את ההשערה שמוצרי פרוק של קזאין גורמים בשלב ראשון לפתיחה של ח"ה בין תאים ובשלב שני משרים אנוולוציה בעמים ופרות.

## חומרים ושיטות

קזאין מסחרי יעבור טפול אנזימטי כפי שפותח במעבדתנו (בקשה לפטנט אמריקאי מס.). הדרוליזט בריכוז חלבון של כ- 20 מ"ג/ל מ"ל יוזרק בנפח של 15 מ"ל לשני רבעים של עטין פרה. ההזרקה תהיה בארבע טפולים עוקבים בסיום כל חליבה ב 4 פרות. הזרקות נפח זהה של תמיסת קזאין בלתי מטופלת למחצית העטין, או 2 הרבעים הקונטרה לטרלים תשמש כביקורת. יצור החלב ודגימות חלב להרכבו מכל 2 רבעים בפרות יחל שבוע לפני הטיפול וימשך עד כשבוע לאחר תום הטיפול האחרון. בנוסף תילקחנה דגימות ביום 14 ו-21 לאחר הטיפול. תיערך אנליזה להרכב חלבון כללי, קזאין, חלבוני מי גבינה, פרוטאז פפטון, לקטוז, מינרלים (נתרן, אשלגן, כלור, סידן וזרחן מגניום וסידן), והפעילות של פלזמין אקטיבטור, פלמינוגן ופלזמין. המבנה הניסויי,

השיטות האנליטיות ואופן ניתוח התוצאות בנסיבות דומות דווחו לאחרונה בשורת פרסומים של קבוצת מחקר זו (4-6).

#### תוצאות ודיון

ארבע הזרקות רצופות של הדדווליזט אנזימטי של קזאין גרמו להתייבשות מהירה של הבלוטה (גרף 1) ולשינויים דרמטיים בהרכב ההפרשה של בלוטת החלב (גרפים 2-5) כגון העלמות לקטוז ושומן מההפרשות, השתוות בריכוז הנתרן והאלבומין בחלב לרמתם בפלזמה, ירידה בריכוזי האשלגן והסידן, עליה בריכוז חלבוני מי גבינה ותוצרי פרוק של קזאין (פרוטאז פפטונים) ועליה בפעילות הפלזמין אקטיבטור והפלזמין. שינויים אלו הנם אופייניים לתהליכים המתרחשים בבלוטה. אך בניגוד לתהליך הטבעי התרחש במשך שלושה שבועות, אנו הגענו לניוון הבלוטה במשך 4 ימים. עובדה זו ניתנת להסברה בכך שהבאנו את החומר הפעיל לריכוז קריטי בבלוטה ע"י פירוקו האנזימטי של הקזאין במבחנה. מכל בחינה אחרת, אנו מחקים את התהליך הטבעי.

כאשר הקזאין שטופל היה חסר זרחן, התוצר האנזימטי ששימש כביקורת לא היה פעיל. מכאן המסקנה שנוכחות ח. סרין מזרחנת בפפטיד הנה חיונית לגבי פעילותו.

כאשר הזרקנו קזאין מטופל בתמיסה שהכילה 1.5 מולר של סידן דיכלורי ומנענו ירידה בריכוז סידן יוני בבלוטה, החומר עדין היה פעיל וגרם לאינוולוציה של הבלוטה. המסקנה הנובעת מכך שהחומר אינו עובד כקלטור באמצעות יכולתו להוריד את רמת הסידן בבלוטה.

#### ספרות שצוטטה

1. Capuco, A.V. & Akers, R.M. 1999. Mammary involution in dairy animals. *J. Gland Biol. Neoplasia* 4: 137-144.
2. Neville, M.C. & Peaker, M. 1981. Ionized calcium in milk and the integrity of the mammary epithelium in goats. *J. Physiol. Lond.* 313: 561-570.
3. Olivier, S.P & Sordillio, L.M. 1989. Approaches to the manipulation of mammary involution. *J. Anim. Sci.* 72:1647-1664.
4. Shamay, A., Mabjeesh, S.J., Shapiro, F. & Silanikove N. 2000. Effect of dexamethasone on milk yield and composition in dairy cows. *Ann. Zootech.*, 49: 343-352.
5. Shamay, A., Mabjeesh, S.J., Shapiro, F. & Silanikove N. 2000. ACTH and dexamethasone failed to affect milk yield in dairy goats: comparative aspects. *Small Ruminant. Res.*, 38: 255-259.
6. Silanikove N Shamay, A., Mabjeesh, S.J., Shapiro, F. 2000. Stress down regulate milk yield in cows by plasmin induced  $\beta$ -casein product that blocks  $k^+$  channels on the apical membranes, *Life Sciences* 67: 2201-2212.

Figure 4

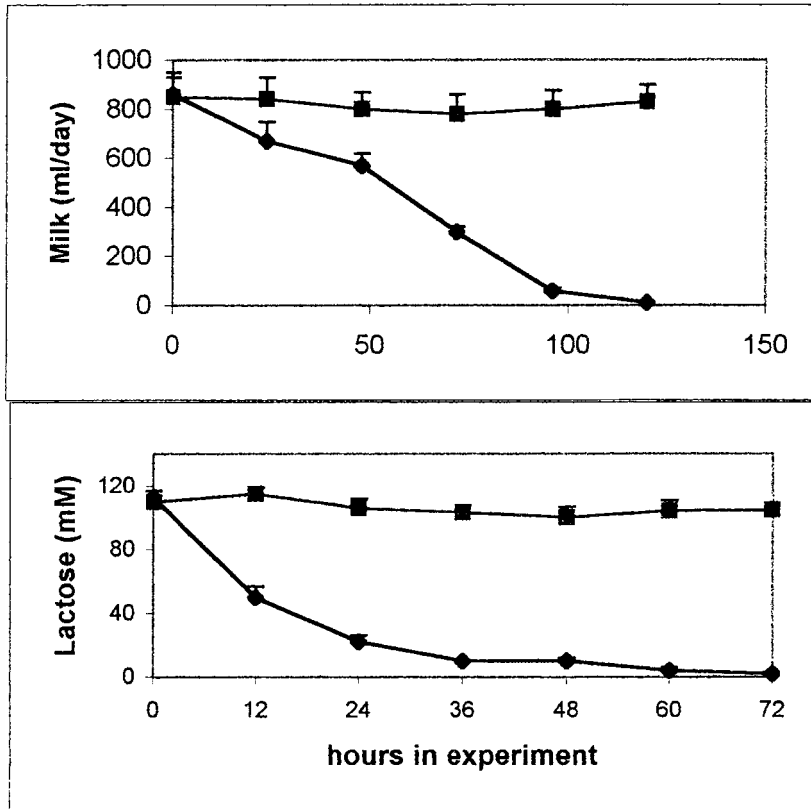


Figure 5

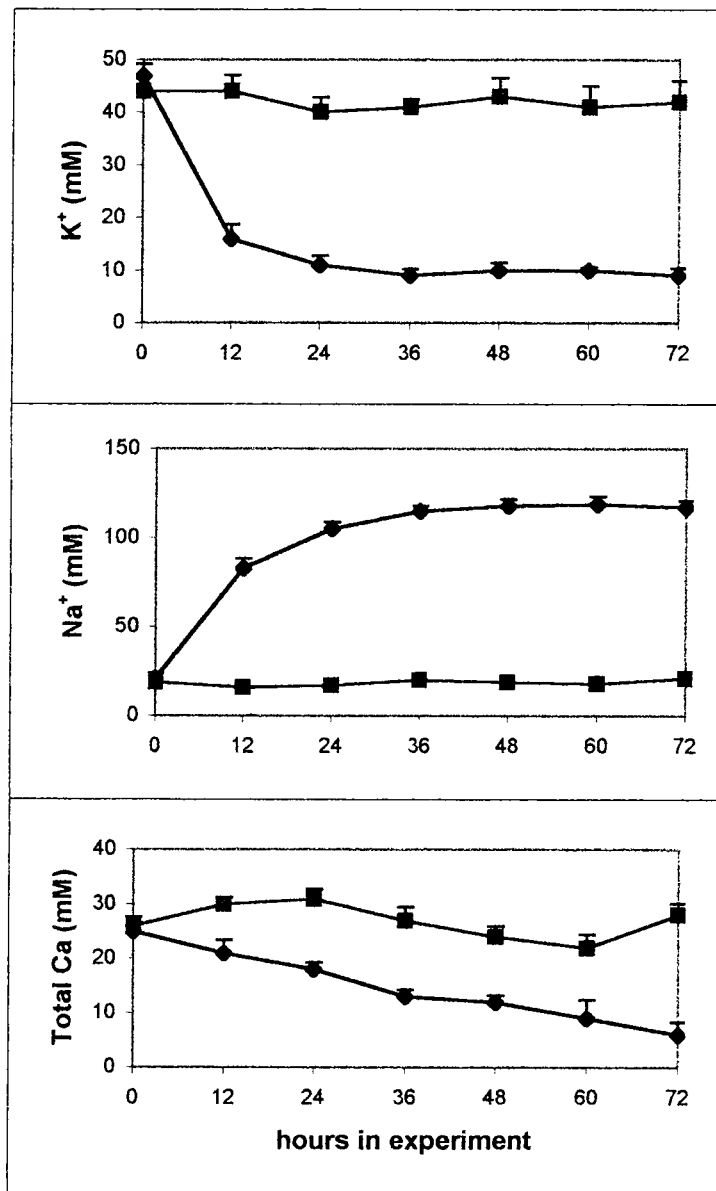


Figure 6

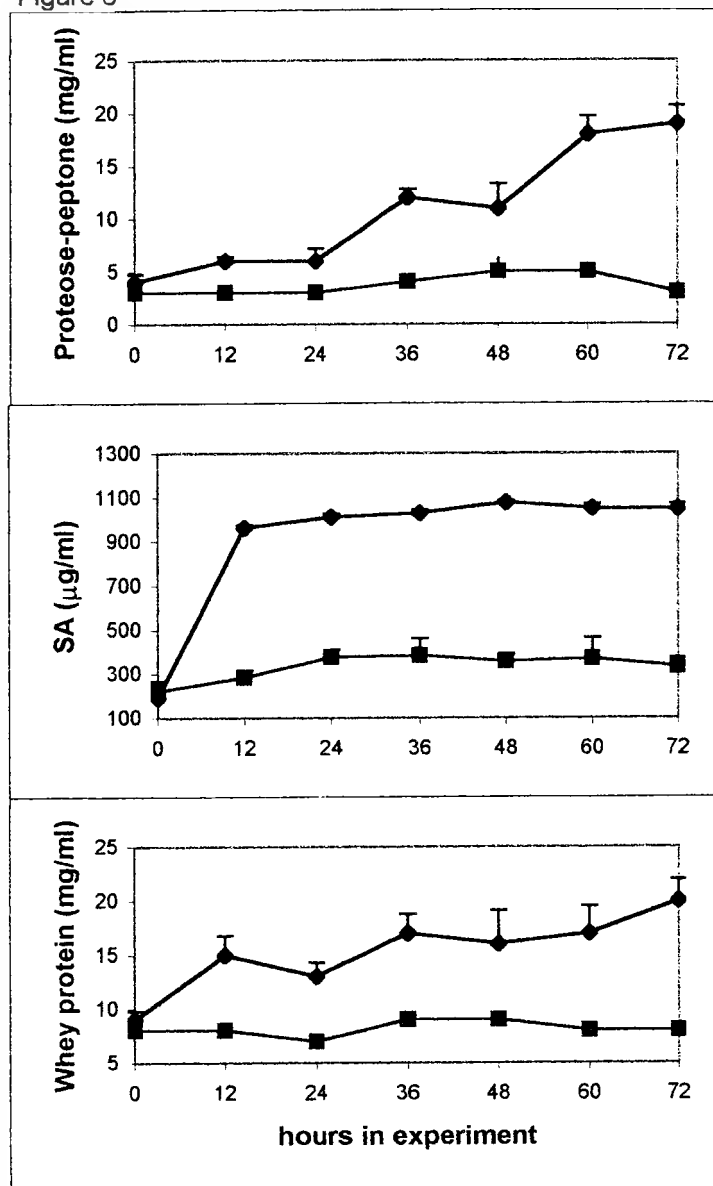


Figure 7

