

#### הצגת הבעיה

תקופה קצרה לאחר ההמלטה יורדת תנובת החלב של הפרות. ירידה זו נובעת מתמותה ואי התחדשות של התאים האפיתליאליים היצרניים. ההנחה בבסיס המחקר היא כי קיום מספר גדול יותר של תאי גזע בתקופה זו, אשר יתמיינו למרכיבי היררכיה התאית האפיתליאלית ובכללם התאים הלומינלים היצרניים, ימתנו את הירידה ביצור החלב משך התחלובה. לכן, מטרת העל של המחקר היתה לפתח דרכים לשיפור מספר תאי הגזע בבלוטת החלב.

#### שיטות העבודה

במחקר השתמשנו בשיטות הבאות: השתלה וקיום רקמה פרנכימתית מבלוטת חלב בקר בסטרומה (חסרת המרכיב האפיתליאלי) של בלוטת חלב מעכבר מדוכא חיסונית; הפרדת אוכלוסיות תאים ב flow cytometry; תרביות מסוגים שונים לאפיון אוכלוסיות התאים השונות בבלוטה; אנליזות של ביטוי גנים וחלבונים; אנליזות היסטולוגיות ואימונוהיסטוכימיות.

#### תוצאות עקריות לתקופת הדו"ח

בדו"ח מסכם זה אנו מתארים את הצלחנו לשפר את מספר תאי הגזע בבלוטת החלב של בקר (במודל שתלים המתקיימים בסטרומה העכברית) ובבלוטה האנדוגנית של עכבר על ידי הגבלת אספקת אנרגיה. תוצאות אלה אומתו במגוון שיטות. על מנת להמנע מהעקה של הגבלת אספקת האנרגיה, התערבנו במגוון המתווך והראינו כי עיכוב פעילות mTOR על ידי הזרקה יומית של רפמיצין, לחלק מהיממה, מאפשר אף שיפור מובהק יותר במספר תאי הגזע. לאחר הפסקת הטיפול ברפמיצין, נקבע שיפור בהתפתחות בלוטת החלב ובביטוי הכמותי של גנים לחלבוני חלב ושל החלבונים עצמם.

#### מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות

לאור השיפור בהתפתחות וביצרנות בלוטת החלב שהתקבל לאחר הטיפול ברפמיצין, חשוב לדעתי לבחון את השפעתו ע"י החדרה לתוך הפיטמה בתקופת ה"יובש". בנוסף, הממצאים הראו שונות מסוימת בפרטי המנגנון המושרה על ידי רפמיצין, בהשוואה להגבלת אספקת אנרגיה, רצוי להשקיע באפיון מנגנון זה.

2. דו"ח לתוכנית מחקר מספר 20-11-0001

שנת המחקר: 3 מתוך 3 שנים

**הגדלת מאגר תאי הגזע בבלוטת החלב של בקר על ידי הגבלה זמנית של אספקת האנרגיה**

**או טיפול ברפמיצין - פוטנציאל לשיפור התפתחות ופעילות הבלוטה**

**Calorie restriction and rapamycin administration: potential improvement of bovine mammary gland development and production by augmenting stem/ progenitor cell pool**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

איתמר ברש המכון לחקר בעלי חיים. מכון וולקני. מינהל המחקר החקלאי. ראשון לציון

Itamar Barash, Institute of Animal Science. ARO. The Volcani Center. P.O. Box 15159

Rishon LeZiyyon 7528809. E-mail: [Itamar.barash@mail.huji.ac.il](mailto:Itamar.barash@mail.huji.ac.il)

רשימת פרסומים והרצאות

שנהב כפיר , טניה קודינוב ואיתמר ברש. 2017. הגבלה זמנית של אספקת אנרגיה וטיפול ברפמיצין מגדילים את מאגר תאי הגזע בבלוטת החלב של בקר. הכנס השנתי למדעי הבקר. ירושלים. (במסגרת קבלת מילגת הצטינות לשנהב כפיר)

Kfir, S. and Barash.I. 2018. Does "metabolic regulation" of mammary epithelial cell number involves niche effect? Gordon Research Conference on Tissue Niches and Resident Stem Cells in Adult Epithelia. Waterville Valley. USA.

יולי 2018

עמוד

4.....מבוא

6.....שיטות וחומרים

8.....תוצאות

21.....דיון

22.....רשימת פרסומים

22.....רשימת ספרות מצוטטת

מבוא

בבלוטת החלב של בקר קימת התאמה מלאה בין מספר התאים האפיתליאליים היצרניים ותנובת החלב. העדר חלוקת תאים ומוות מבוקר והדרגתי של תאים אפיתליאליים יצרניים הינם הגורמים היחידים לירידה בתנובת החלב במשך התחלובה (1). האתגר המובנה במחקר זה הינו הגדלת מאגר התאים הלא ממוינים (תאי גזע, או תאי אב) בבלוטת החלב של בקר. ההנחה היתה כי אלו יתמיינו במהלך התחלובה לכלל התאים האפיתליאליים בבלוטה ובכללם התאים היצרניים ויאטו את הירידה ביצור. בכך, ניתן יהיה לחקות את הפנוטיפ הטבעי הנדיר של "הפרה המתמידה" המאופיין בנתוני יצור ויעילות יצור גבוהים מאד. גם להתפתחות מוגברת של המערכת הפרנכימתית בעת ההריון, בזכות מספר רב יותר של תאי גזע מתמיינים, השלכה חיובית לשיפור יצור החלב העתידי. מחקר זה בחן את השפעתה של מניפולציה באספקת אנרגיה על הגדלת מאגר תאי הגזע ושיפור התפתחות הבלוטה ואת היכולת לחקות תוצאה זו על ידי טיפול פרמקולוגי מקומי.

מערכת יצור החלב והפרשתו בבלוטת החלב של הבקר מתפתחת ממורפולוגיה בסיסית של רשת צינוריות אפיתליאליות המסתיימות במבנים מפוצלים (Terminal ductal lobulo-alveolar units, TDLUs) החודרים את רקמת הסטרומה הפיברוטית בבלוטת החלב של העגלה. הסטרומה מכילה את המטריקס החוץ תאי, ובנוסף אדיפוציטים, פיברובלסטים, תאים אנדותליאליים ותאי מערכת החיסון החיוניים להתפתחות ופעילות בלוטת החלב. בתקופת ההריון, הצינוריות ממשיכות להתפצל ובקצותיהן מתפתחים מבנים לובולואלואולריים, ההופכים למבנים אלואולריים מיצרי ומפרישי חלב מיד לאחר ההמלטה. מורפולוגיה דינמית זו, אשר מסונכרנת היטב עם התפתחות העובר בעת ההריון, נתמכת על ידי היררכיה תאית. היררכיה זו מאופיינת על ידי אוכלוסיות תאים אפיתליאליים המחויבות ברמות שונות למסלולי התמיינות מוגדרים. אוכלוסיות אלו מתחלקות ומתמיינות באופן מבוקר על מנת ליצור ולהתאים את המורפולוגיה של בלוטת החלב למצבים הריון, תחלובה, התנוונות (לעיתים חלק ממצבים אלה קיימים ביחד) וההתחדשות לאחר הכניסה להריון חדש (2-4). היררכיה תאית ברקמה האפיתליאלית של בלוטת החלב בוססה לאחרונה בעכברים (כחיות מודל, נסקר ע"י (5)), ברזולוציה פחותה בשד ההומני (נסקר ע"י (6)) ולאחרונה, במחקרים שהמתקדם בהם בוצע במעבדה שלנו, גם בבלוטת החלב של בקר (7, 8).

כיום ידוע כי בלוטת החלב מתפתחת ומתחדשת מתאי גזע אפיתליאליים בעלי כושר חידוש עצמי הנמצאים במצב בלתי ממוין בבלוטה. בהתבסס על המודל של המערכת ההמטופואטית ועל ידי שימוש בשיטות הפרדת תאים המבוססות על Fluoresce activated cell sorting (FACS) והשתלות של אוכלוסיות תאים נפרדות ומוגדרות לרקמת השומן בבלוטת החלב של עכברים מדוכאים חיסונית, נקבע קיומם של תאי גזע ברקמת בלוטת החלב הבוגרת. תאים אלה מתמיינים באופן רציף לתאים לומינליים או בזאליים דרך שורה של תאים במצבי ביניים הניתנים לזיהוי על ידי קביעת ביטוי סמנים חלבוניים שונים. הודגם כי על ידי השתלה של תא גזע אחד ניתן ליצור בעכבר בלוטת חלב מתפקדת (4, 9). הגישה הקלאסית להיררכיה התאית מבססת כיום את קיומם של

תאי גזע מולטיפוטנטים ברקמת בלוטת החלב הבוגרת לצידם של תאי אב (progenitors) מאריכי חיים בעלי כוון התפתחותי יחיד המתמיינים בחלוקה א-סימטרית ליצירת מגוון אוכלוסיות התאים בבלוטה (10). חשוב לציין כי תגובתן של אוכלוסיות תאים מוגדרות בבלוטה החלב למניפולציות באספקת האנרגיה לא נחקרה מעולם, למיטב ידיעתנו, הן במודלים של מכרסמים, או בחיות משק.

מטרת הצעת המחקר הנוכחית הינה אפיון השפעת הגבלה מבוקרת וזמנית של אספקת אנרגיה (Calorie restriction, CR) או טיפול ברפמיצין על השינויים בפרופורציות של אוכלוסיות התאים השונות והגדלת מאגר תאי בגזע בבלוטה החלב של בקר ותרומת שינויים אלה לשיפור בהתפתחות בלוטת החלב בבקר ופעילותה. Mammalian (or mechanistic) target of Rapamycin (mTOR) הינו קינאז המזרחן חלבונים על שאריות סרין/ תראונין. mTOR מתווך השפעת הורמונים, אספקת אנרגיה, חומרי מזון, ופוטנציאל חימצון/ חיזור על גדילת תאים, פרוליפרציה והישרדות (11-14). המקרוליד רפמיצין מעכב את פעילות mTORC1. מתאם חיובי הודגם בין פעילות mTORC1 והתמיינות תאי גזע עובריים (15). בהתאמה, גם ברקמה בוגרת, הגבלת אספקת אנרגיה (CR) ל – 60% מהצריכה *ad libitum* הפחיתה את המספר היחסי של תאים ממוינים במעי והגבירה את קצב הרגנרציה והעלתה את מספרם היחסי של תאי הגזע (16). הגבלת צריכת האנרגיה וטיפול במעכב mTORC1 רפמיצין, הביאו במעי לתוצאות זהות של עליה במספר תאי הגזע על ידי עיכוב פעילות mTOR בתאי פנט (Peneth cells) הסמוכים לתאי הגזע. בהתאמה, גם במערכת ההמטופואטית הגברת פעילות mTORC1 נקשרה לירידה במספר תאי גזע (17), ועיכוב פעילותו של mTOR על ידי רפמיצין הביאה לשחזור פעילותה האופטימאלית בעכברים זקנים (18).

הנחות היסוד של המחקר: הגבלה מבוקרת וזמנית של אספקת אנרגיה בבלוטה החלב תגרום להסטה של חלוקת התאים בבלוטה לחלוקה סימטרית והגדלת מאגר תאי הגזע. תהליך זה עשוי לשפר את התפתחות והתחדשות בלוטת החלב (לאחר הסרת ההגבלה) ובעקיפין לתרום למיתון הירידה בתנובת החלב בתהליך ההתמיינות לתאים יצרניים בעת התחלובה. להנחת יסוד זו מצורפת השערה המבוססת על מחקרים במעי ובמערכת הדם, כי השיפור במאגר תאי הגזע מערב את דיכוי פעילותו של מסלול ה mTOR בתאי הגזע או בתאים הסמוכים (niche) אשר קובעים ומשמרים את מצבם הבלתי ממוין של תאי הגזע, וכי ניתן יהיה להגדיל את מאגר תאי הגזע גם על ידי טיפול זמני ברפמיצין- מעכב הפעילות של mTOR.

#### מטרות המחקר הן:

1. אפיון השפעת משטרי הגבלת אספקת אנרגיה על שינוי הפרופורציות בהיררכיה התאית בבלוטה החלב של בקר וקביעת התנאים לשיפור במספרם של התאים הלא ממוינים הנמצאים בראש ההיררכיה התאית.
2. קביעת מעורבותו של מסלול ה mTOR באפקט של הגבלת אספקת האנרגיה, וחקיוי השפעתו של משטר זה על ידי טיפול ברפמיצין – מעכב הפעילות של mTOR.
3. לאחר החזרת הזנה מלאה, קביעת השפעה של ההגדלה המצופה במספר תאי הגזע על התפתחות הבלוטה.

#### פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

## שיטות וחומרים (בקצרה)

**עכברים אשר שימשו במחקר:** עכברות מזן C57Black ועכברות מדוכאות חיסונית מזן NOD-SCID נרכשו מחברת אינוויגו (Jerusalem, Israel). בנוסף, מושבה של עכברים מזן C57Black GFP גודלו עצמאית בבית החיות. מרבית התאים בגופן של חיות אלו ביטאו את הסמן הפלורסנטי (Green fluorescence protein (GFP). העכברים גודלו במחזורי יום/ לילה שווים והזנה ad libitum. למטרת ההליך הכירורגי החיות הורדמו ב- isoflurane (Abbott Laboratories, Maidenhead, England) המעורבב עם חמצן בעזרת מכונת הרדמה וטרינרית.

### השתלת רקמה פרנכימתית מעטין עגלה ל De-epithelized fat pad של עכברה מדוכאת חיסונית:

בעכברות נקבות בנות 3 שבועות מדוכאות חיסונית מזן NOD SCID בלוטת החלב #4 נחשפה והרקמה שבין הפטמה לבלוטת הלימפה, בה מתפתחות צינוריות החלב הוסרה. אל תוך כיס שנוצר ברקמת השומן הנותרת (Fat pad) הושתלה חתיכה בגודל של כ-3 מ"מ<sup>3</sup> שמקורה ברקמה פרנכימתית של עגלה מזן הולשטיין אשר הובאה מבית המטבחים בחיפה.

**הגבלת אספקת אנרגיה:** הגבלת אספקת אנרגיה בוצעה על ידי הגבלת מזון לקבוצת הטיפול של 60% מזה שנצרך על ידי קבוצת הביקורת ביום הקודם. החיות המטופלות קיבלו תוספת ויטמינים למזון.

**טיפול ברפמיצין:** רפמיצין הוזרק IP במשך 21 ימים. 100 מיקרוליטר בריכוז של 2.08ug/ul.

**טיפול באסטרוגן ופרוגסטרוגן:** אסטרוגן הוזרק IP במשך 10 ימים. האסטרוגן הומס באתנול ונמהל ב 10% Tween-80 ו-10% PEG-400 לפני ההזרקה. נפח ההזרקה היה 50µl והריכוז הסופי של האסטרוגן היה 0.05µg/µl. פרוגסטרוגן הוזרק IP במשך 10 ימים. הפרוגסטרוגן הומס בשמן שומשום לריכוז של 0.02µg/µl. נפח ההזרקה היה 50µl.

**הפקת תאים משתלי בקר ומרקמת עכבר:** לאחר הוצאתן מן החיות הרקמות נקצצו ועוכלו אנזימתית (8).

התאים נשטפו, הורחפו, סוננו דרך חרירים בגודל 40µm ונספרו בהמציטומטר.

**אנליזת קלונים (מושבות) בתרבית:** תאים בודדים נזרעו בריכוז של 5000 תאים/באר בפלטה של 24 בארות.

התאים גודלו במשך 3 ימים ב DMEM-F12 אשר הכיל 5% FBS, הידרוקורטיזון, אינסולין hEGF, hFGF, כולרה טוקסין, הפרין ו B27. מדיום זה נקרא "Mammary medium" (8). התאים גודלו באינקובטור

בטמפרטורה של 37°C, בתנאי לחות של 95% ו-5% CO<sub>2</sub>. לאחר התפתחותם, הקלונים קובעו ב 4% paraformaldehyde שהכיל 0.03M sucrose.

**אנליזת ממוספרות צפות בתרבית:** תאים בודדים נזרעו בריכוז של 10,000 תאים/באר בפלטה של 96 בארות

אשר אינה מאפשרת את היצמדות התאים. התאים גודלו ב- "mammary medium" באינקובטור בטמפרטורה של 37°C, בתנאי לחות של 95% ו-5% CO<sub>2</sub> למשך 20 יום ולאחר מכן הממוספרות נספרו.

**אנליזת חלוקת תאים בזמן מוגבל בתרבית:** תאים בודדים נזרעו בריכוז של 10,000 תאים/באר בפלטה של 6

בארות. התאים גודלו ב mammary medium באינקובטור בטמפרטורה של 37°C, בתנאי לחות של 95% ו-

CO<sub>2</sub> 5%. כאשר ריכוז התאים בבאר הגיע ל 80% מהצפיפות המרבית, התאים נאספו בעזרת trypsin-EDTA solution, נספרו ונזרעו מחדש במספר שווה של תאים לכל באר.

**זריעת התאים ב Matrigel וטיפול בפרולקטין בתרבית:** תאים בודדים נזרעו בריכוז של 000,4006 תאים/באר בפלטה של 6 בארות. התאים גודלו ב- mammary medium. לאחר 6 ימים, התאים מכל באר נאספו בעזרת Trypsin-EDTA solution, נספרו ונזרעו מחדש בתוך טיפת Matrigel. מטריקס זה הינו תמצית תאים סרטניים עשירה בחלבון למינין אשר יוצרת סביבה המדמה את המטריקס החוץ תאי (ECM) ויחד עם הורמונים לקטוגנים גורמת לתאים לעבור לשלב ההתמיינות. כל טיפה הורכבה מ Matrigel ו- DMEM-F12 ביחס של 1:1. ריכוז התאים בטיפה היה 1000 cells/μl. התאים ב Matrigel נזרעו בפלטה של 24 בארות וגודלו ב- "mammary medium" למשך לילה. למחרת, הוחלף המדיום למדיום על בסיס DMEM-F12 המכיל: 5% insulin (5μg/ml), hydrocortisone (1μg/ml), prolactin (3μg/ml), gentamycin (50μg/ml), FBS streptomycin and penicillin (100 mg/ml and 100,000 U/ml, respectively). לאחר יומיים הוחלף המדיום למדיום זהה המכיל FBS 1%.

**השתלת תאים:** תאים בודדים שמקורם בעכברות מזן C57Black GFP ומזן C57Black (חיות תורמות) הורחפו ב- Matrigel ו-HF ביחס של 1:1 והוזרקו אל De-epithelized fat pad של חיות מזן C57Black (חיות מאכסנות) בעזרת מזרק המילטון בנפח של 20μl. לכל De-epithelized fat pad הוזרקו 120,000 תאים. לאחר ההשתלה החיות גודלו בבית החיות במשך 6 שבועות. בתום הניסוי נקטלו החיות, הוסר ה- fat pad ונבחנה התפתחות רשת הצינוריות המחודשת. בניסוי בו הוזרקו לחיות אסטרוגן ופרוגסטרון, החיות גודלו שבועיים בבית החיות ולאחר מכן הוזרקו ההורמונים למשך 10 ימים. יום לאחר סיום ההזרקות הוסר ה- fat pad ונבחנה התפתחות רשת הצינוריות המחודשת תחת בינוקולר. מדידת שטח הבלוטה ושטח רשת הצינוריות המחודשת נעשתה בעזרת התוכנה cellSens Standart (Olympus corporation, Tokyo, Japan).

**ולידציה (אישור) להתפתחות רשת צינוריות לאחר השתלת תאים:** על מנת לאשר את התפתחות רשת צינוריות חדשה לאחר השתלה של תאים שמקורם בחיות מזן C57Black GFP, הוסר ה- Fat pad ונלקח להסתכלות תחת בינוקולר. בנוסף, בוצעה אנליזת whole mount וצביעה ב- Carmine alum. **הפקת RNA מרקמה ותגובת Real Time PCR:** RNA הופק משתלים או בלוטה אנדוגנית ונהפך לDNA. כימות רמת ביטוי הגנים בוצע בשיטת Quantitative Real Time PCR. בשיטה זו, כימות ה-DNA המוגבר בריאקציית ה- PCR נעשה העזרת פרימרים מתאימים על ידי קריאת כמות צבע פלורסנטי המצטבר ב- DNA הדו גדילי במהלך הריאקציה. כימות תוצרי ה-PCR נעשה ביחס לגן הביקורת eIF4E.

**אנליזת חלבונים, הפרדתם וזיהוים:** שתלי בקר ובלוטות עכבריות הוצאו ורוסקו בהומוגניזר בתוך תמיסת RIPA buffer. קביעת ריכוז החלבונים בדוגמאות השונות נעשתה בעזרת ריאגנט Bradford. דגימה של 60 μg חלבון עברה דנטורציה. החלבונים הוטענו והופרדו בג'ל במתח חשמלי בתום ההפרדה הועברו החלבונים לממברנת ניטרולולוז והממברנה עם נוגדן ראשוני משך לילה ולאחר מכן הוגבה עם נוגדן שני מתאים הקשור לאנזים Horseradish peroxides (HRP). הסיגנל נחשף לאחר תגובה עם Super signal.

**קיבוע רקמות:** שתלי בקר ובלוטות חלב עכבריות קובעו בתמיסת Bouin למשך לילה ב-4°C. הוצאת המים הקיימים ברקמה בוצעה על ידי סדרת שטיפות בריכוזים עולים של אתנול. הרקמות הוצללו על ידי קסילן ולאחר מכן קובעו בבלוק פרפין. הדוגמאות בפרפין נחתכו לחתכים בעובי 4µm במיקרוטום.

**צביעת Carmine:** בלוטות חלב עכבריות קובעו ב-4% PFA והוכנסו לתמיסת Carmine-aluminum למשך שלושה לילות בטמפרטורת החדר. הוצאת המים הקיימים ברקמה בוצעה על ידי סדרת שטיפות בריכוזים עולים של אתנול. הצללה בוצעה בעזרת Histoclear במשך לילה.

**קיבוע תאים בתרבית:** קיבוע תאים בוצע בבאר בה גדלו התאים באמצעות תמיסת 4% PFA המכילה 0.03M סוכרוז. האנטיגן נחשף על ידי טיפול ב-0.5% Triton X-100 במשך 5 דקות.

**צביעת Hematoxylin & Eosin (H&E):** שיטה זו שימשה להדגמת מורפולוגית הרקמה. לאחר הסרת הפרפין נצבעו החתכים ב-Hematoxylin למשך דקה, נשטפו במי ברז ולאחר מכן נשטפו ב-Acid alcohol. החתכים נצבעו ב-Eosin במשך דקה וחצי, נשטפו ב-אתנול וקסילן, כוסו בדבק dPX על בסיס קסילן וזכוכית מכסה.

**קביעת ביטוי חלבונים בשיטות Immunohistochemistry ו-Immunofluorescence:** שיטות אלו נועדו לזיהוי מיקום, ביטוי ופעילות חלבונים נבחרים ברקמה ובתרביות תאים על סמך תגובתם עם נוגדנים ספציפיים. בשיטת Immunohistochemistry, לאחר הסרת הפרפין מהרקמה, עוכבה פעילות פרוקסידאזות אנדוגניות ונחשפו האנטיגנים. חסימת קישור בלתי ספציפי ברקמות נעשה על ידי הגבה עם Goat serum. הרקמות עברו אינקובציה למשך לילה עם נוגדן ראשוני, נשטפו והוגבו עם נוגדן שניוני. בשיטת Immunohistochemistry זיהוי הנוגדן הראשון בוצע על ידי הגבת הרקמה עם ריאגנט N-Histifine המכיל נוגדן שניוני המוצמד ל-HRP. הסיגנל נוצר לאחר תגובה עם הסובסטרט (DAB) Diaminobezidine. בשיטת Immunofluorescence זיהוי הנוגדן הראשון בוצע על ידי הגבת הקומפלקס אנטיגן-נוגדן ראשוני עם נוגדן שניוני מתאים המוצמד לצבע פלורסנטי. גרעיני התאים הוגבו עם DAPI.

**אנליזת Flow cytometry:** קביעת מיקום התאים בהיררכיה התאית והשפעת הטיפולים על מספרם היחסי של התאים בכל אוכלוסיה בוצע באנליזת Flow cytometry במכשיר LSR II במחלקה לשירותים ביולוגים של מכון ויצמן. תאים בודדים שהופקו מבלוטות חלב עכבריות עברו Negative selection על מנת שבתרחיף ישארו רק תאים אפיתליאליים ולאחר מכן סומנו בנוגדנים מתאימים, CD49f ו-CD24, באמצעות הקיט EasySep mouse mammary enrichment, על פי המלצות היצרן. המידע הנאסף נותח והוצג בעזרת התוכנה FACSDiva ובעזרת התוכנה Cyflogic.

## תוצאות

את השלבים הראשונים של המחקר הקדשנו לאפיון השפעת הגבלת אספקת אנרגיה על גדילת עכברים (הן מדוכאים חיסונית הנושאים שתלי בלוטת חלב בקר והן "נורמליים"). בהמשך, בוצעו נסיונות לבחינת השפעת הגבלת אספקת אנרגיה על שינויים בפרופורציות התאים המרכיבים את ההיררכיה התאית בבלוטה, ובאופן ספציפי על מספרם של תאי גזע ותאי האב. זאת מתוך כוונה לבחון את הנחת העבודה כי הגבלת אספקת



האנרגיה תגרום: (I) לאינדוקציה בחלוקה הסימטרית של תאי גזע להגדלת מספרם, ו- (II) תדכא את החלוקה האסימטרית המגדילה את מספר תאי האב או את התאים הממוינים הפונקציונליים. על מנת לבחון אספקטים רבים ככל האפשר הרחבנו את מצבת הניסויים על מנת שתכלול לא רק ניסויים בבלוטת חלב מושתלת מבקר אלא גם ניסויים בבלוטת חלב אנדוגנית מעכברים "רגילים" ועכברים טרנסגניים שכל התאים שלהם מסומנים ב GFP (לכך יתרון בניסויים מקיפים בתחום של השתלת תאים). לבסוף, בחנו את השפעת המניפולציה במספר תאי הגזע על התפתחות ויצרנות הבלוטה.

### **בחינת השפעת הגבלת אספקת אנרגיה על על משקלם של עכברים מדוכאים חיסונית ועל מדדים פיזיולוגיים המאפיינים שתלים מבלוטת חלב של בקר המקוימים ברקמת השומן של בלוטת החלב של עכברים אלה**

בעכברים הנושאים שתלים מבלוטת חלב של בקר הראינו כי הגבלת אספקת אנרגיה ל 60% מרמת הביקורת גרמה לירידה של עד 25% במשקל העכברים. משקלם של השתלים (בביקורת ובטיפול) ירד בכ- 30% משך התקופה ששהו בבלוטה העכברית ללא השפעה לטיפול (תמונה 1). לא נצפתה להגבלת מזון השפעה על פרמטרים פיזיולוגיים הקשורים בבלוטה דוגמת מספר הצינוריות ושיטחן (טבלה מס 1).

באנליזת ביטוי גנים, נבחנה השפעת הגבלת אספקת אנרגיה על גנים המהווים סמנים לאינדיקציות שונות ובכללן ההיררכיה התאית. באנליזה זו הודגמה עליה בביטוי גנים המשמשים סמנים לתאי גזע דוגמת JAGGED LGR4 (תמונה 2). חשוב לציין את העליה בביטוי Bst1 אשר במעי משפעל את הסיגנל הפרקריני מתאי ה niche לחלוקה סימטרית של תאי הגזע. עם זאת בגלל שהאנליזות נערכו על אוכלוסית תאים כללית, היה כנראה מיוסך רב על השינויים שחלו באוכלוסיות התאים האינדיקציות (ובמיוחד באוכלוסית תאי הגזע שהינה קטה מאד יחסית).

בתום תקופת הגבלת המזון הוצאו שתלי הבקר והרקמה עוכלה לתאים בודדים אשר נזרעו לתרבית. נערכו אנליזות המעידות רטרופקטיבית על השפעת הגבלת המזון על מדדים אינדיקטיביים להיררכיה התאית: הגברה ביצירת ממוספרות צפות בתנאי חוסר קשר עם הסביבה, ושיפור במספר התאים הנותרים בתרבית (לפרק זמן מוגבל) (תמונה 3). אלו העידו על שיפור במספר תאי הגזע בהשפעת הגבלת אספקת האנרגיה. בהתאם, נצפתה ירידה במספר הקלונים אשר מהווים מדד לתאי אב (ונמצאים במורד ההיררכיה התאית). הירידה התקבלה הן במספר הקלונים הבזאליים ובמיוחד במספר הקלונים הלומינליים (תמונה 3).

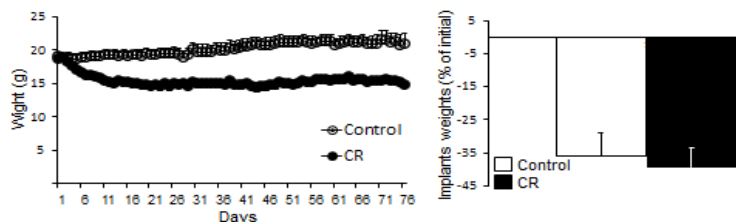
הנסינות שבוצעו בשתלים מבלוטת החלב של בקר הושלמו באנליזות שבוצעו בבלוטת החלב האנדוגנית של העכברים. שלוש סיבות לכך:

1. מגבלת הגודל של השתל מבקר ומספר העכברות המדוכאות חיסונית המושתלות בשתלים מבקר.

2. העדר היכולת של תאים מושתלים מבלוטת חלב של בקר לפתח רקמה מייצגת ברקמת השומן העכברית (מתפתחים רק מבנים לובולואלויאולריים ולא צינוריות).
3. נלקחה בחשבון גם חשיבות העבודה בסוגי יונקים שונים ל"הכללה" של התוצאות.

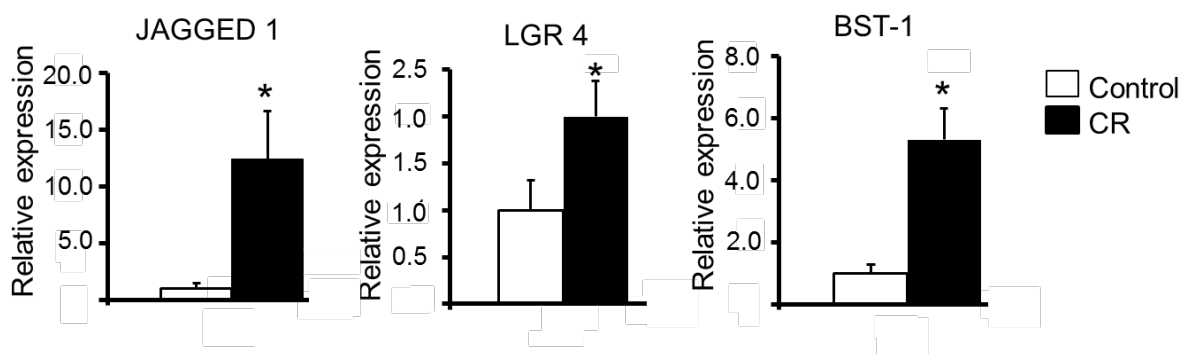
תמונה 1. הגבלת אספקת אנרגיה גורמת לירידה של עד 25% במשקל העברים (שמאל) אך אינה משפיעה על משקל השתל שירד בכ 35% (ימין).

CR- calorie restricted



טבלה 1. הגבלת אספקת אנרגיה אינה משפיעה באופן סיגנפיקנטי על פרמטרים הקשורים במורפולוגיה של בלוטת החלב.

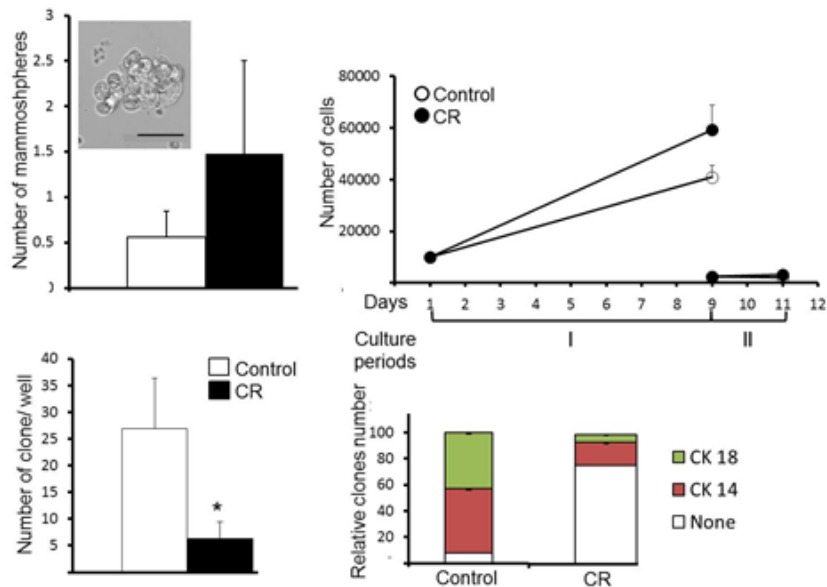
	Control (n=3)	CR (n=5)	p- value
Total section area (mm)	1± 0.23	1.37± 0.29	0.46
Number of ducts	1± 0.38	0.4 ± 0.14	0.13
Total ducts area (mm)	1± 0.33	0.41± 0.09	0.11
Average duct area (mm)	1± 0.01	0.10± 0.011	0.33
Stroma area (mm)	1± 0.26	1.55± 0.35	0.13
Ratio of total ducts area/ total section area (%)	1± 0.13	0.63± 0.05	0.13
Ratio of total ducts area/ stroma area (%)	1± 0.49	0.32± 0.14	0.15
Ratio of stroma area/ total section (%)	1± 0.08	1.12± 0.03	0.13



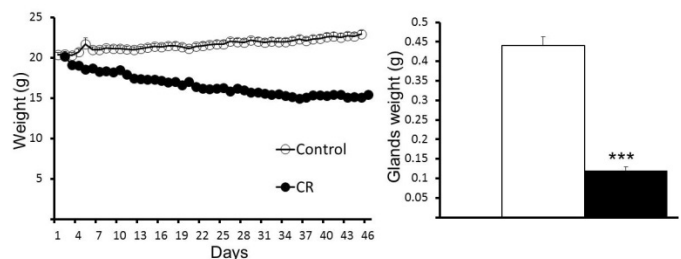
תמונה 2. הגבלת אספקת אנרגיה משפרת ביטוי סמנים לתאי גזע בשתלים פרמכימיים של בלוטת חלב מבקר.

**בחינת השפעת הגבלת אספקת אנרגיה על עכברים שאינם מדוכאים חיסונית ובלוטת החלב האנדוגנית העכברית**

השפעת הגבלת אספקת אנרגיה על ההרכייה התאית בבלוטת החלב האנדוגנית של עכברות C57 black הביאה לירידה דומה של עד 25% במשקל העכברות לאחר כחודש וחצי (תוצאה דומה התקבלה בניסיונות שארכו 80 יום). בניגוד לחוסר ההשפעה על שתלים מבקר, הגבלת אספקת אנרגיה גרמה לירידה במשקל הבלוטה העכברית לרבע ממשקלה (תמונה 4). זאת כנראה כתוצאה מירידה בנפח תאי השומן שבה, בניגוד להרכב הפיברוטי של הבלוטה מבקר.



תמונה 3. הגבלת אספקת אנרגיה גורמת לעלייה במספר ממוספרות צפות בתנאי חוסר קשר עם הסביבה (שמאל למעלה), חלוקת תאים בזמן מוגבל (ימין למעלה). לעומת זאת היא גורמת לירידה במספר הקלונים הנוצרים מתאים בודדים ובמיוחד בקלונים הלומינליים המבטאים CK18 (פנלים תחתונים). כוכבית –  $P < 0.05$ .

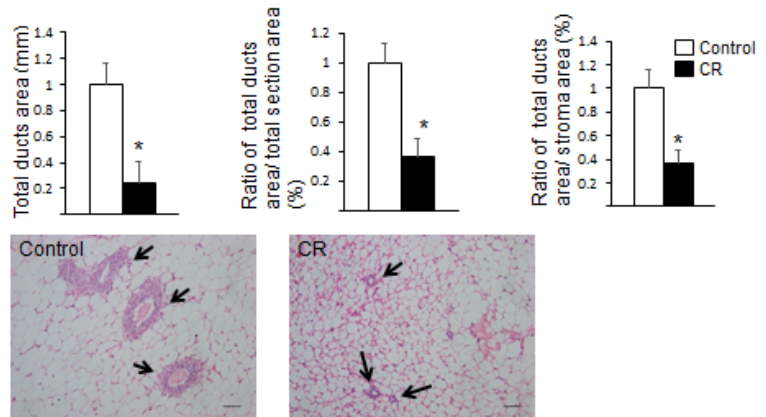


תמונה 4. הגבלת אספקת אנרגיה גורמת לירידה במשקל של עכברים (שמאל) וכן לירידה במשקל הבלוטה האנדוגנית (ימין). שלש כוכביות –  $P < 0.001$ .

בניגוד לחוסר ההשפעה בבלוטת החלב של בקר, הגבלת אספקת אנרגיה גרמה גם לירידה מובהקת בשטח המוחלט והיחסי של הצינוריות האפיתילאליות החודרות את הסטרומה השומנית בעכבר (אך לא במספרן)

(תמונה 5). שוני זה נובע כנראה מההבדל המורפולוגי בין שתי הבלוטות וההרכב השומני של בלוטת החלב העכברית.

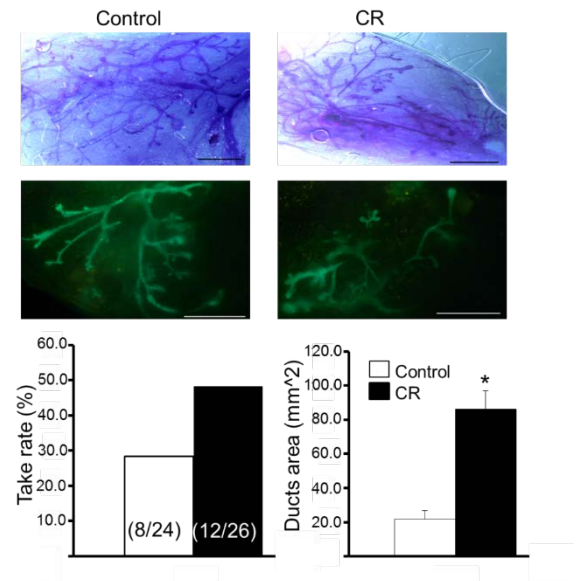
	Control (n=3)	CR (n=3)	p- value
Total section area (mm)	1 ± 0.06	0.68 ± 0.34	0.22
Number of ducts	1 ± 0.19	0.50 ± 0.30	0.12
Average duct area (mm)	1 ± 0.39	0.30 ± 0.06	0.1
Stroma area (mm)	1 ± 0.08	0.64 ± 0.31	0.19



תמונה 5. הגבלת אספקת אנרגיה גורמת לירידה מובהקת בשטח צינוריות החלב בבלוטה העכברית. חיצים מכונים לצינוריות. CR- Calorie Restriction.

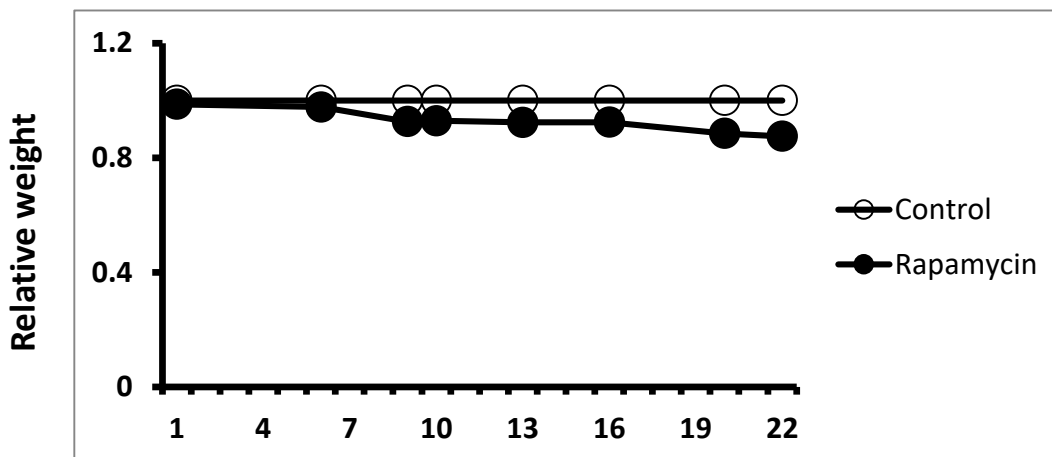
בהמשך, נערכו מספר ניסויים בהם הושתלה אוכלוסית תאים כללית (הכוללת תאי גזע) מחיות שהוגבלו אנרגטית וחיות ביקורת שאכלו ad lib. לפרקציה השומנית של בלוטת החלב חסרת המרכיב הפרנכימתי של חיות מקבלות. התוצאות מסוכמות בתמונה מספר 6. נראה הגבלת אספקת אנרגיה שיפרה משמעותית את מספר הבלוטות בהן התפתחה רשת צינוריות חדשה ( $p < 0.07$ ) וכן את שטח מערכת הצינוריות המתפתחת. מדד אחרון זה חיוני להערכת מספר תאי הגזע, שכן גם לתאי אב קיימת פעילות מולטיפוטנטית מסוימת, אולם ללא self-renewal היא מוגבלת ביצירת רקמה חדשה.

תמונה 6. הגבלת אספקת אנרגיה גורמת לעליה בשטח של רקמה אפיתליאלית חדשה לאחר השתלה. למעלה תביעה בקרמין. למטה ביטוי GFP.  $P < 0.05$ .



בחינת השפעת הגבלת אספקת אנרגיה על בקרת ביטוי גנים: נבחנה השפעת הגבלת אספקת אנרגיה על ביטוי גנים בבלוטת החלב העכברית האנדוגנית. נמצא כי הגבלת אספקת אנרגיה גורמת לעליה בסמנים לתאי גזע (Lgr4) אך, במפתיע גם לסמן של תאי אב אב לומינליים (Stat5a) (לא מוראה בגלל מגבלת מקום). חשוב לציין כי גם בבלוטת החלב העכברית נרשמה עליה מובהקת בביטוי Bst-1, עדות לסיגנל פארקריני מתאי niche היפוטטיים לתאי הגזע.

**השפעת טיפול ברפמיצין על השינוי בפרופורציות אוכלוסיית התאים האפיתיליאליים של בלוטת החלב מבקר רפמיצין הינו מעכב פעילות mTOR. הנחת העבודה היא כי הגבלת אספקת אנרגיה גורמת לעיכוב פעילות מסלול מטבולי מרכזי זה בתאים שכנים לתאי הגזע (niche), אשר מעבירים סיגנל פארקריני מתאים לאינדוקציה במספר תאי הגזע הדרך של הגברת החלוקה הסימטרית של תאים אלה.** לכן, בשלב ראשון נבחנה השפעת הזרקה יומית של רפמיצין (208 ug/mouse) למשך 21 ימים על שינויים בהרכיב התאית ובהתפתחות השתלים מבקר אשר קוימו בסטרומה העכברית.

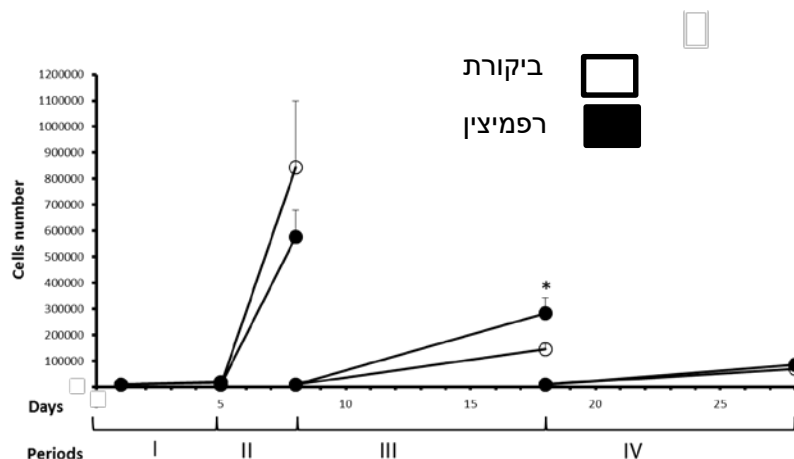


תמונה 7. השפעת הזרקות יומיות של רפמיצין על משקל העכברת המאכסנות.

נמצא כי טיפול יומי ברפמיצין לא גרם לשינוי מובהק במשקל העכברים NOD-SCID המטופלים (תמונה 7). ירידה של כ 10% (ובלתי מובהקת) התקבלה במשקל השתל (לא מודגם). מבחינה מורפולוגית, לא נמצאו שינויים מובהקים במספר או שטח הצינוריות בהשראת הטיפול ברפמיצין (לא מודגם)

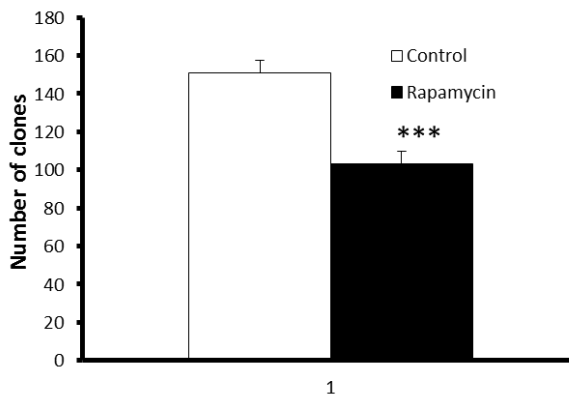
ניסויים בתרבויות תאים: בדומה להשפעת הגבלת אספקת אנרגיה, טיפול ברפמיצין גרם לעליה בקצב חלוקת התאים בזמן מוגבל, אך לאחר זמן רב יותר בהשוואה להשפעת הטיפול בהגבלת אספקת אנרגיה (15 ימים בהשוואה ל 9 ימים)(תמונה 8). במקביל התרחשה ירידה מובהקת של כ 30% במספר הקלונים שנוצרו מתאים

בודדים כשבוע לאחר הזריעה (תמונה 9). ירידה זאת מראה על דיכוי יצירת תאי האב ונקבעה גם בתגובה להגבלת אספקת אנרגיה.



תמונה 8. טיפול ברפמיצין משך 21 ימים בחיות, גורם להגדלת האינדקס הפרוליפטיבי של תאים אפיתליאליים בתרבית לאחר 18 ימים. כוכבית  $P < 0.05$ .

תמונה 9. טיפול ברפמיצין בחיות גורם לירידה ביכולת ליצור קלונים בתרבית. שלש כוכביות  $P < 0.001$ .



בקרת ביטוי גנים: עליה בביטוי סמנים לתא גזע (בכללם Lgr4, Lgr6, NOTCH), התקבלה בהשפעת רפמיצין. זו לוותה גם בעליה בסמן לתאי אב לומינליים (Stat5a) וירידה בסמן לתאים ממוינים (ER) וללא שינוי בקצב הפרוליפרציה של התאים כפי שניתן לקבוע מביטוי Ccnd1 ו ki67. בגלל שונות בהשפעת הטיפול, שגיאת התקן לא אפשרה במקרים רבים תוצאות מובהקות סטטיסטית, אך מאחר והנטייה של כל הסמנים היתה לכוון אחיד, ניתן לקבל את השפעת הרפמיצין על מספר תאי הגזע בהשפעה משמעותית. חשוב מאד לציין כי בהשפעת רפמיצין לא התקבל שינוי בביטוי הגם ל Bst-1 (המשפיע סיגמל פאראקרני, כפי שנמצא בהגבלת מזון).

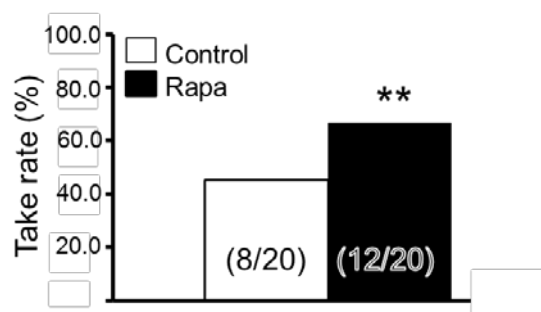
### השפעת טיפול ברפמיצין על ההיררכיה התאית בבלוטת החלב האנדוגנית בעכבר

לטיפול יומי ברפמיצין משך 21 יום חיות לא היתה השפעה סיגינפיקנטית על משקל החיות (לא מודגם) ועל המורפולוגיה של הבלוטה (לא מודגם, בגלל מגבלת מקום).

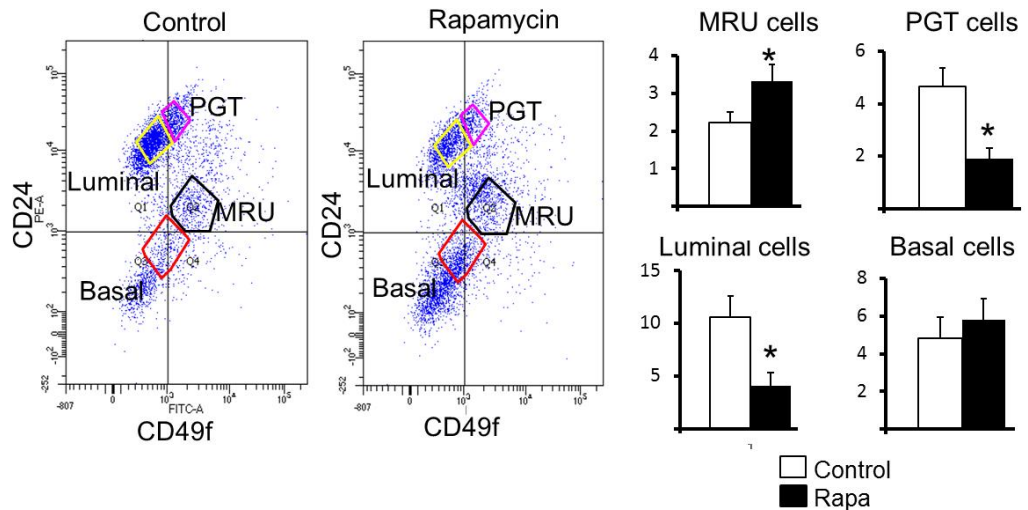
מבחינת בקרת ביטוי גנים נקבעה עליה סטטיסטית בביטוי סמנים לתאי גזע: בסמנים לתאי גזע (LGR6, Delta1) אך שוב גם בסמן שנחשב לומינלי Stat5. חשוב לציין כי גם במודל זה, כמו גם במודל השתלים שטופלו ברפמיצין, לא התקבל שינוי בביטוי הגן ל Bst-1 המזרז את הסיגנל הפארקריני מהסביבה לתאי הגזע במעי.

השפעת הטיפול ברפמיצין על התפתחות רקמה אפיתליאלית לאחר השתלת תאים ל cleared fat pad: הושתלו 120,000 תאים שהופקו מבלוטות של עכברים אשר טופלו או לא טופלו ברפמיצין. תמונה 10 מדגימה השפעה חיובית לטיפול ברפמיצין בחיות מסומנות ב GFP וכן בחיות לא מסומנות על מספר הבלוטות בהן התפתחו .outgrowths.

תמונה 10. לטיפול ברפמיצין השפעה מובהקת על מספר הבלוטות המושתלות, אשר פיתחו רקמת אפיתל חדשה. שתי כוכביות-  $P < 0.01$ .



אנליזות ב Flow cytometer לקביעת השפעת הרפמיצין על השינויים בשווי המשקל בין אוכלוסיות התאים האפיתליאליים: Flow cytometry, הינה אנליזה המאפשרת זיהוי והפרדה של 4 אוכלוסיות העיקריות המרכיבות את הבלוטה. לאחר הפקת תאים בודדים וביצוע Negative selection, הוצאת התאים שאינם שייכים לאוכלוסיית התאים האפיתליאליים, מסומנים התאים האפיתליאליים בנוגדנים לחלבונים CD24 ו- CD49f אשר משמשים מרקרים לאוכלוסיות השונות בבלוטת החלב: אוכלוסיית תאי הגזע מאופיינת ברמת ביטוי גבוהה של CD49f ורמה נמוכה של CD24. אוכלוסיית תאי האב מאופיינת ברמה גבוהה של CD24 ורמה נמוכה של CD49f. אוכלוסיית התאים הבזאליים מאופיינת ברמת ביטוי בינונית של CD49f והעדר/רמה נמוכה ביטוי של CD24 ואוכלוסיית התאים הלומינלים מאופיינת ברמת ביטוי נמוכה של CD24 והעדר ביטוי של CD49f (תמונה 11). באנליזה זו נבחנה השפעת הטיפול ברפמיצין על השינוי היחסי בפרופורציות אוכלוסיית התאים האפיתליאליים בבלוטת החלב וזאת משום שטיפול ברפמיצין ישים יותר בהשוואה לטיפול בהגבלה אנרגטית ומכיוון שהתוצאות המקדימות הראו כי לרפמיצין השפעה חזקה יותר על השינוי היחסי בפרופורציות אוכלוסיית התאים האפיתליאליים. מתמונה 11 ניתן לראות כי בהשפעת הטיפול ברפמיצין חלה עליה מובהקת ( $P \leq 0.05$ ) במספרם היחסי של תאי הגזע וירידה מובהקת ( $P \leq 0.05$ ) במספרם היחסי של תאי האב והתאים הלומינלים.

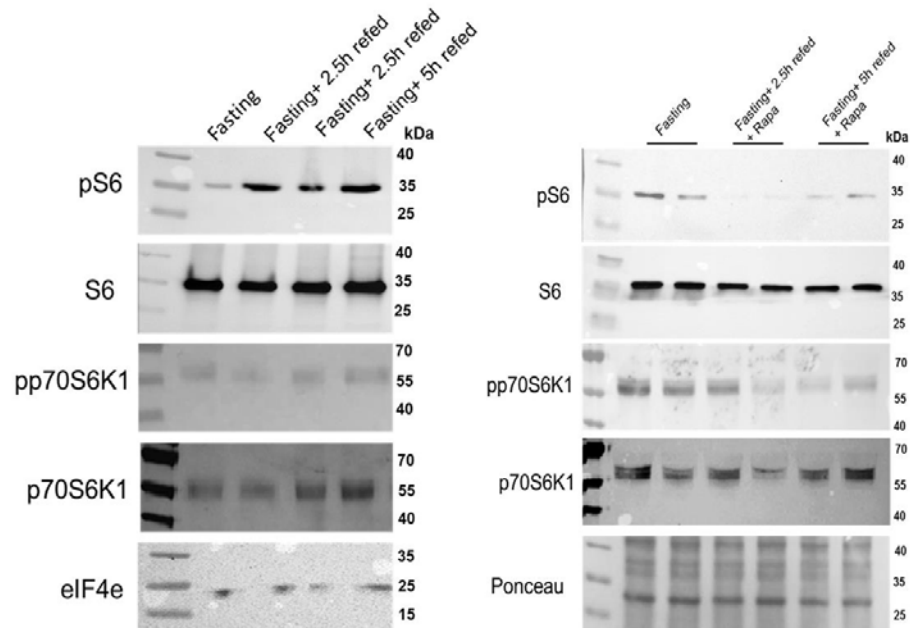


תמונה 11. טיפול ברפמיצין משפר את פרופורצית תאי הגזע בבלוטת החלב ומדכא את המספר היחסי של תאים המאוכלוסיות היותר ממוינות.

### בחינת המנגנון והמוערבות של mTOR בתוך השפעת הגבלת אספקת אנרגיה

בהמשך, בחנו את מסלול ה mTOR כמנגנון המוצע להשפעת הגבלת אספקת אנרגיה. קובענו את רמת התצורה המזורחנת של החלבון S6 כגורם מדווח על פעילותו של mTOR. ועוד לפני כן את פעילותו של האנזים במזרחן p70S6k1.

תמונה 12. שמאל החזרת מזון מגבירה את זרחון החלבון S6. נוכחות רפמיצין (אשר הוזרק שעה לפני החזרת המזון) מונעת זאת (ימין). זרחון מסויים של S6 נקבע בהחזרת מזון וטיפול ברפמיצין לטווח ארוך (5 שעות בהשוואה לטיפול בן 2.5 שעות). רפמיצין הוזרק שעה לפני החזרת המזון).

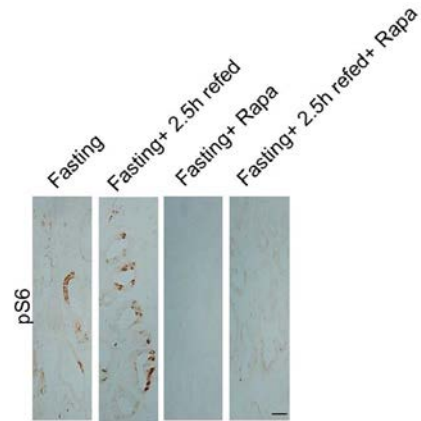


מתמונה 12 ניתן לראות כי החזרת מזון לחיות מוגבלות אנרגטית (משך 24 שעות) הביאה לעליה בזרחון החלבון S6 לאחר 2.5 ו-5 שעות. החזרת המזון ביחד עם טיפול ברפמיצין (מעכב פעילות mTOR), לא התגברה לגמרי על הירידה בזרחון חלבוני המטרה, אם כי נראה כי לאחר 5 שעות השפעתו של הרפמיצין פגה



במידה מסוימת. התוצאות שהודגמו בעכבר בהקשר לפעילותו של האנזים המזרחן p70S6K1 תאמו כללית את אלו שנקבעו עבור החלבון המזרחן S6. התוצאות המודגמות מיצגות את השפעת הטיפולים בשתלים מבקר (תמונה 13. האימונובלוט אילא מודגם).

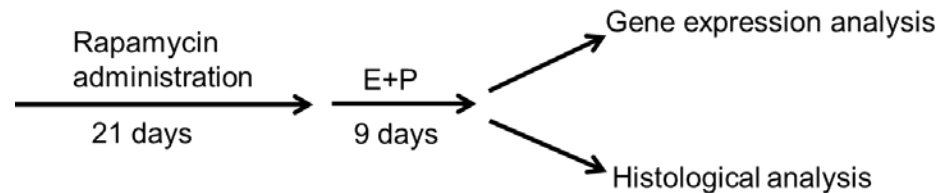
תמונה 13. טיפול ברפמיצין מונע רק לזמן מוגבל את השפעת החזרת המזון לחיות המוגבלות באספקת אנרגיה על ביטוי החלבון S6 (אנליזת שתלים מבקר).



תוצאות ניסויים אלה מוכיחות כי האפקט של הגבלת מזון על ההיררכיה התאית אכן מתבצע דרך מסלול ה mTOR.

### השפעת השיפור במספר תאי הגזע בהשפעת טיפול ברפמיצין על התפתחות ופעילות בלוטת החלב במודל שתיים מבלוטת חלב של בקר המתקימים בסטרומה העכברית

לאחר שהראינו כי הזרקות יומיות של רפמיצין, גורמות לשינוי בפרופורציה האוכלוסיות בבלוטת החלב: לאינדוקציה במספרם של תאי הגזע ולירידה במספרם היחסי של התאים היותר ממוינים, הגענו לשלב האחרון ולבחינת הקשר בין השיפור במספר תאי הגזע ושיפור בהתפתחות ופעילות בלוטת החלב. רפמיצין (208ug) הוזרק IP מידי יום במשך 3 שבועות מול חיות ביקורת. לאחר 3 שבועות כלל החיות טופלו מידי יום באסטרוגן (2mg/ml) ופרוגסטרון (20mg/ml) למשך 9 ימים (סכימה 1). מטרת הטיפול בהורמונים הייתה לדמות מצב של הריון בחיות במטרה לגרום לביטוי חלבוני חלב ולבחון את התפתחות הבלוטה במצב זה. אסטרוגן משפיע על התפתחות הצינוריות ופרוגסטרון משפיע על הסתעפותן.



סכימה 1: מודל הניסוי לבחינת השפעת הטיפול ברפמיצין והשיפור במספר תאי הגזע על התפתחות הבלוטה וייצור חלבוני חלב בשתלי בלוטת חלב של בקר.

לאחר 21 ימים בהם חיות הנושאות שתלי בלוטת חלב של בקר טופלו ברפמיצין, טופלו החיות במשך 9 ימים נוספים באסטרון ופרוגסטרוון. בסיום הטיפול הוצאו השתלים והשפעת הטיפול ברפמיצין נבחנה באנליזה היסטולוגית ובאנליזת ביטוי גנים לחלבוני חלב.

### **טיפול מקדים ברפמיצין משפר פרמטרים מורפולוגיים בשתל מבלוטת חלב של בקר**

לטיפול ברפמיצין לא נמצאה השפעה על משקל החיות ומשקל השתל (לא מודגם בגלל מכבלת מקום). שינויים מורפולוגיים כתוצאה מהטיפול ברפמיצין ובהורמונים סטרואידים נבחנו באנליזה היסטולוגית (H&E) של חתכים מבלוק פרפין. בהשפעת רפמיצין שיפור מובהק ( $P \leq 0.05$ ) בשטח הצינוריות הכללי המהווה מדד למספר התאים בצינורית. עבור יתר הפרמטרים ובכללם מספר הצינוריות הכללי לא נמצא הבדל מובהק ( $P \geq 0.05$ ). אנליזה נוספת בוצעה באותם החתכים, הראתה כי מספר הצינוריות גדול יותר בקבוצת הטיפול, אך שטח שטח קטן יותר. מכאן הסקנו כי מספר הצינוריות בעלות השטח הקטן (המייצגות את ה TDLU, האזור שבו נוצרת הרקמה האפיתיליאלית) גדול יותר בקבוצת הטיפול. ממצא זה מרמז על התחדשות/ היווצרות של צינוריות חדשות כתוצאה מן הטיפול. על מנת לאשר ההשערה זו, נספרו ונמדדו הצינוריות הקטנות בלבד, צינוריות סגורות ששטחן המקסימלי עמד על  $0.002 \text{ מ}^2$ . מתמונה 14 ניתן לראות כי בהשפעת הטיפול ברפמיצין חל שיפור מובהק ( $P \leq 0.05$ ) במספר הצינוריות הקטנות ושטחן.

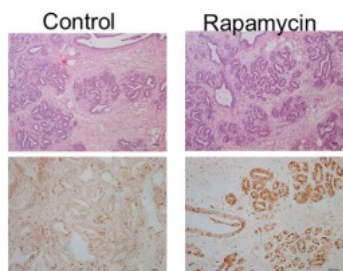
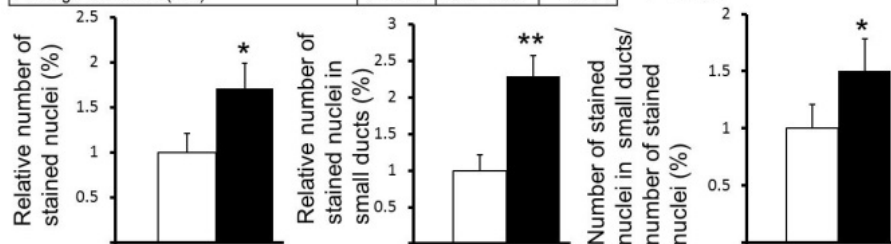
במטרה לבחון האם קיים הבדל במספר התאים המתחלקים בכלל הצינוריות בחתך ובצינוריות הקטנות בפרט, נערכה אנליזה אימונוהיסטוכימית והחתכים הוגבו עם הנוגדן לחלבון PCNA המשמש סמן גרעיני לחלוקת תאים. נספרו כלל הגרעינים בתאים שהגיבו לצביעה, הגרעינים בתאים שהרכיבו את הצינוריות הקטנות וחושב היחס בניהם. מתמונה 14 ניתן לראות כי לטיפול ברפמיצין השפעה חיובית מובהקת על כל אחד מפרמטרים אלה, תוצאה המהווה אינדיקציה לשיפור בקצב חלוקת התאים בצינוריות ובמיוחד בצינוריות הקטנות המהוות מדד לחידוש הרקמה.

### **השפעת הטיפול ברפמיצין על ביטוי הגנים לחלבוני החלב העיקריים בחלב בקר**

במטרה לבחון האם הגידול היחסי שנצפה באוכלוסיית תאי הגזע הביא בסופו של דבר לעלייה בכמות חלבוני החלב בקבוצה המטופלת בהשוואה לקבוצת הביקורת, הופק RNA מן השתלים למטרת אנליזת ביטוי גנים. נבחן ביטוי הגנים לחלבוני החלב העיקריים בחלב הבקר:  $\alpha$ -casein S1,  $\beta$ -casein S2 ו-  $\beta$  lactoglobulin. במודל זה לא נמצאה השפעה לטיפול ברפמיצין על ביטוי הגנים לחלבוני חלב.

תמונה 14. טיפול ברפמיצין גורם לשיפור במספר הצינוריות הקטנות ושטחן (טבלה) וכן במספר (מוחלט) ויחסי של גרעיני תאים המבטאים PCNA (עמודות אמצעיות). פנל תחתון: אנליזה היסטולוגית הראתה השפעה חיובית לטיפול המקדים ברפמיצין על התפתחות צינוריות קטנות. ביטוי PCNA באנליזה אימונוהיסטוכימית. כוכבית  $P < 0.05$ . שתי כוכביות  $P < 0.01$ .

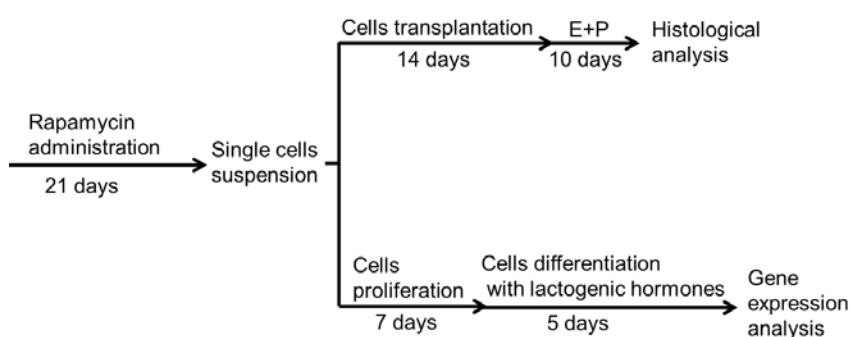
	Control (n=4)	Rapamycin (n=4)	p-value
Number of ducts	1± 0.32	3.56± 0.92	<b>0.031</b>
Total ducts area (mm)	1± 0.41	2.06± 0.34	<b>0.05</b>
Average duct area (mm)	1± 0.18	0.56± 0.05	0.064



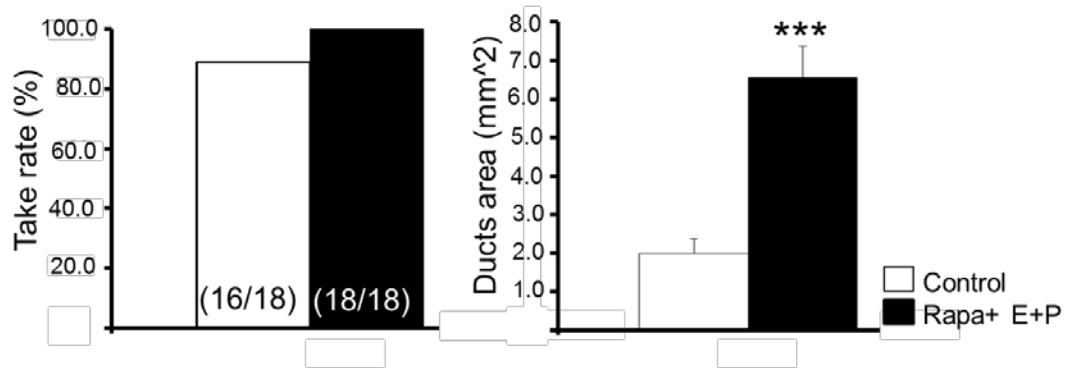
### הקשר בין השיפור המספר תאי הגזע בהשפעת טיפול ברפמיצין על פעילות בלוטת החלב בעכבר. טיפול מקדים ברפמיצין משפר את פעילות בלוטת החלב של העכבר

נסיונות בבלוטת החלב האנדוגנית של העכבר נערכו על פי המתואר בסכימה 2.

סכימה 2. תאור המסיונות שבוצעו לבחינת השפעת טיפול מוקדם ברפמיצין על התפתחות ופעילות בלוטת החלב האנדוגנית של העכבר.



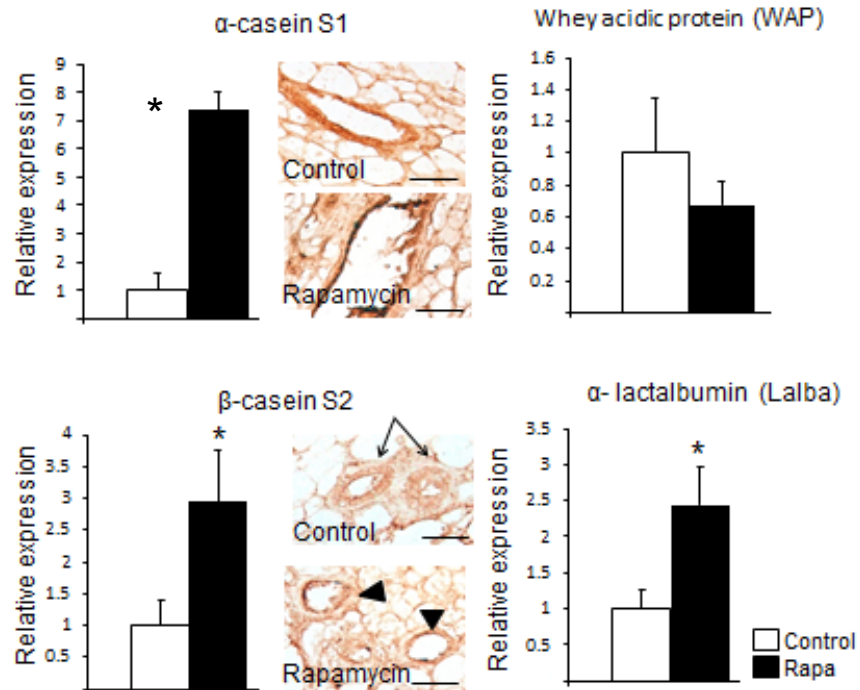
במטרה לבחון כיצד משפיע הטיפול ברפמיצין על ייצור חלבוני חלב ועל מורפולוגית הבלוטה, הושטל מספר שווה של תאים בודדים אשר הופקו מחיות ביקורת ומחיות מטופלות ברפמיצין ל- De epithelialized fat pad של עכברות מסוג C57 Black (חיות מקבלות). שבועיים לאחר ההשתלה כלל החיות טופלו באסטרון (2mg/ml) ופרוגסטרון (20mg/ml) למשך 10 ימים. מטרת הטיפול הייתה לדמות מצב של הריון. מתמונה 15 ניתן לראות כי כנראה בגלל השתלת תאים בעודף, לא נמצאה השפעה לטיפול ברפמיצין על אחוז הבלוטות בהן נצפתה צמיחה מחודשת של רשת צינוריות (n=18). עם זאת, נקבע הבדל מובהק ( $P \leq 0.05$ ) נעבור שטח רשת הצינוריות המחודשת מכלל הבלוטה שהיה גדול יותר בבלוטות שהושטלו בתאים שמקורם בחיות מטופלות.



תמונה 15. טיפול מקדים ברפמיצין גורם להתפתחות טובה יותר של רקמה פרנקימתית מתאים מושתלים (פנל ימני). שלש כוכביות – הבדל מובהק  $P < 0.001$ .

השפעת הטיפול ברפמיצין נבחנה על ביטוי הגנים לחלבונים לקטוגנים בתרבית ועל ביטוי החלבונים ברקמה שהתפתחה לאחר ההשתלה. תמונה 16 מציגה שיפור מובהק בכמות ה-RNA לחלבוני החלב  $\beta$ -casein ו-LALBA ( $\alpha$ -lactalbumin) בהשראת הטיפול המקדים ברפמיצין. באנליזה אימוהיסטוכימית של רקמה מתפתחת מתאי גזע אשר טופלה ברפמיצין, נראה גם שיפור בביטוי החלבונים של הפרקציה הקזאינית.

תמונה 16. טיפול ברפמיצין מגביר את כמות ה-RNA לחלבוני חלב ורמת ביטויים בבלוטת החלב העכברית. חיצים מכוונים לצינוריות החלב.



בעבודה זו בחנו רעיון, אשר מקורו בעבודות מחקר במעי, כי הגבלת אספקת אנרגיה בבלוטת החלב לתקופה מוגבלת תגרום להגברת חלוקה סימטרית של תאי גזע והגדלת מספרם. זאת על חשבון דיפרנציאציה והתפתחות תאים הנמצאים במורד ההיררכיה התאית.

מטרת העבודה היתה כמובן שיפור פעילות בלוטת החלב של בקר אשר "תהנה" ממספר גדול יותר של תאי גזע בתחילת התחלובה. עם זאת מאחר ולא ניתן היה לבחון את כל הפרמטרים בשתלי בלוטת חלב מבקר ועל מנת להכליל את הממצאים, בוצעו חלק מהנסיונות, ובעיקר השתלות התאים לבלוטה חסרת המרכיב האפיתליאלי, בבלוטת החלב העכברית האנדוגנית.

נקודה חשובה נוספת החיונית להבנת העבודה הינה ההפרדה בין הנסיונות שבוצעו על מנת להגדיל את מספר תאי הגזע (הגבלת אספקת אנרגיה, ולאחר מכן ההתערבות במנגנון בדרך של טיפול ברפמיצין) לבין הנסיונות שנועדו לבחון השפעה זו על התפתחות ויצרנות הבלוטה. האחרונים בוצעו לאחר הפסקת הטיפול ברפמיצין ובמצב מדמה הריון (בחיה עצמה או in vitro).

התוצאות במודל השתלים ובמודל בלוטת החלב בעכברית משלימות אחת את השניה ומדגימות כי הגבלת אספקת אנרגיה בבלוטת החלב (הן מבקר והן מעכבר) גורמת לשיפור במספרם של תאי הגזע דרך מנגנון המערב עיכוב בפעילות mTOR. בעבודה זו לא חקרנו את משמעות עיכוב זה, אולם בעבודות שבוצעו במעי הוכח כי עיכוב בפעילות mTOR גורם להפרשה פרקרינית של Cyclic ADP Ribose מתאי niche הנמצאים בסביבתם של תאי הגזע. גורם זה משפיע על תאי הגזע לחלוקה סימטרית והגדלת מספרם (16). לאחרונה דווח כי פעילותו של mTOR חיונית דוקא לפעילות תאי גזע (19). ההסבר שלנו לדיכוי הוא שאכן הזרקה חד יומית של רפמיצין הוכחה כמעכבת mTOR, אך רק לפרק זמן מוגבל המאפשר הפרשת הסיגנל לחלוקה סימטרית. לאחר דעיכת העיכוב (כ 5 שעות), מתאפשרת פעילות mTOR בתאי הגזע החיונית לשכפול העצמי והגדלת מספרם.

בהשוואה להגבלת אספקת אנרגיה, עיכוב זמני של פעילות mTOR על ידי הזרקה ישירה וחד יומית של רפמיצין הביא לתוצאות מובהקות יותר בפרמטרים המדגימים חידוש העצמי והגדלת מספרם של תאי הגזע בבלוטה. תוצאות אלה התקבלו אף בפרק זמן קצר יותר מאלו שהתקבלו בהשפעת הגבלת אספקת אנרגיה, וללא העקה שהתבטאה בירידה במשקל הגוף ובנפח הסטרומה השומנית (האחרונה רק בעכבר). חשוב מאד לציין את העובדה שבניגוד לעליה בביטוי Bst-1 (המשפעל את הסיגנל הפרקריני) אשר התקבלה בהשפעת הגבלת אספקת אנרגיה, הרי שטיפול ברפמיצין לא השפיע על הביטוי של גן זה. אנו משערים שגן אחר מאותה משפחה (CD38) שהינו אף פעיל יותר בהשוואה ל Bst-1, מעורב בהעברת הסיגנל. זאת יש לבחון בעבודת המשך.

הפרק המשלים בעבודה, התמקד במשמעות של הגדלת מספר תאי הגזע בבלוטה על התפתחותה ופעילותה. בפרק זה בחנו רק את השפעת הטיפול ברפמיצין, אשר אינו גורם עקה לחיה. בשתלים מבקר הראינו השפעה חיובית משמעותית לטיפול המקדים ברפמיצין על התפתחות הבלוטה, אולם הטיפול הקצר בהורמונים

סטרואידים, אשר אינם תורמים ישירות לפעילותה היצרנית, לא הספיק כנראה להביא את הבלוטה, שמקורה מעגלה, לשיפור בפעילות היצרנית. לעומת זאת, את הבלוטה העכברית שטופלה ברפמיצין, חשפנו בהמשך להשפעות לקטוגניות ישירות על התאים בתרבית. במצב זה זיהינו השפעה חיובית מובהקת לטיפול המקדים ברפמיצין והגדלת מספר תאי הגזע, על ביטוי וסינתיזה של חלבוני חלב.

### **פרסומים מדעיים**

שנהב כפיר, טניה קודינוב ואיתמר ברש. 2017. הגבלה זמנית של אספקת אנרגיה וטיפול ברפמיצין מגדילים את מאגר תאי הגזע בבלוטה החלב של בקר. הכנס השנתי למדעי הבקר. ירושלים. (במסגרת קבלת מילגת הצטינות לשנהב כפיר)

Kfir, S. and Barash.I. 2018. Does “metabolic regulation” of mammary epithelial cell number involves niche effect? Gordon Research Conference on Tissue Niches and Resident Stem Cells in Adult Epithelia. Waterville Valley. USA.

1. Capuco AV, Wood DL, Baldwin R, McLeod K, Paape MJ. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. *J Dairy Sci.* 2001;84(10):2177-87.
2. Wagner KU, Boulanger CA, Henry MD, Sgagias M, Hennighausen L, Smith GH. An adjunct mammary epithelial cell population in parous females: its role in functional adaptation and tissue renewal. *Development.* 2002;129(6):1377-86.
3. Smith GH. Experimental mammary epithelial morphogenesis in an in vivo model: evidence for distinct cellular progenitors of the ductal and lobular phenotype. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;39(1):21-31.
4. Stingl J, Raouf A, Eirew P, Eaves CJ. Deciphering the mammary epithelial cell hierarchy. *Cell Cycle.* 2006;5(14):1519-22.
5. Visvader JE, Smith GH. Murine mammary epithelial stem cells: discovery, function, and current status. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(2).
6. Visvader JE. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev.* 2563-77:(22)23;2009
7. Martignani E, Eirew P, Accornero P, Eaves CJ, Baratta M. Human milk protein production in xenografts of genetically engineered bovine mammary epithelial stem cells. *Plos One.* 2010;5(10):e13372.
8. Rauner G, Barash I. Cell hierarchy and lineage commitment in the bovine mammary gland. *Plos One.* 2012;7(1):e30113.
9. Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature.* 2006;439(7072):84-8:
10. Rios AC, Fu NY, Lindeman GJ, Visvader JE. In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature.*506(7488):322-7.
11. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 1991;253(5022):905-9.
12. Andre C, Cota D. Coupling nutrient sensing to metabolic homeostasis: the role of the mammalian target of rapamycin complex 1 pathway. *Proc Nutr Soc.* 2012;71(4):502-10.
13. Laplante M, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 8):1713-9.
14. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(1):21-35.
15. Easley CA, Ben-Yehudah A, Redinger CJ, Oliver SL, Varum ST, Eisinger VM, et al. mTOR-mediated activation of p70 S6K induces differentiation of pluripotent human embryonic stem cells. *Cell Reprogram.* 2010;12(3):263-73.
16. Yilmaz OH, Katajisto P, Lamming DW, Gultekin Y, Bauer-Rowe KE, Sengupta S, et al. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature.* 2012;486(7404):490-5.
17. Ochocki JD, Simon MC. Nutrient-sensing pathways and metabolic regulation in stem cells. *J Cell Biol.* 2013;2.23-33:(1)03
18. Chen C, Liu Y, Liu Y, Zheng P. mTOR regulation and therapeutic rejuvenation of aging hematopoietic stem cells. *Sci Signal.* 2009;2(98):ra75.
19. Igarashi M, Guarente L. mTORC1 and SIRT1 Cooperate to Foster Expansion of Gut Adult Stem Cells during Calorie Restriction. *Cell.* 2016;166(2):436-50.