

תקציר מדעי לתוכנית 20-04-0060 **הגדלת מספר תאי הגזע בבלוטת החלב של בקר על ידי החדרת**

רפמיצין דרך הפטמה לתקופה מוגבלת כדרך לשיפור התפתחות ויצרנות הבלוטה

הצגת הבעיה: תאי גזע אפיתליאליים בבלוטת החלב מתמיינים לתאים בזאליים ולומינליים שהם המרכיב הבסיסי של מערכת הסינתיזה וההובלה של החלב בבלוטה. ההיפותיזה בבסיס המחקר היא שמספר תאי גזע נמצא בקורולציה להתמדה בתחלובה גבוהה בבקר, שכן תאים אלה ממשיכים להתמייין לתאים יצרניים אשר מחליפים את אלו שמתים משך התחלובה ומפסיקים לתרום ליצור החלב ומרכיביו. בעגלות בנות 3 חודשים, בחנו מתודולוגיה של החדרת רפמיצין דרך הפטמה למערכת הולכת החלב לעיכוב בי פאזי של פעילות mTOR בתאים הגובלים בלומן. זאת במטרה להגביר את קצב החידוש העצמי של תאי הגזע האפיתליאליים שתוצאתו הצפויה הינה שיפור בהתפתחות ופעילותה היצרנית של הבלוטה.

שיטות העבודה: מיסדנו שיטה לחשיפת הפרנכימה בבלוטה לרפמיצין על ידי החדרת הרפמיצין למערכת הובלת החלב המתפתחת. בחנו את השפעת הטיפול על חידוש עצמי של תאי גזע אפיתליאליים ב flow cytometry, באנליזת חלוקת תאים לאורך זמן ובאנליזת ביטוי גנים. את מורפולוגית הרקמה וביטוי חלבונים בחנו על ידי הגבה על hematoxylin & eosin, immunofluorescence ו immunohistochemistry. השפעות הרפמיצין על חלוקת תאים נבחנו על ידי הגבה עם PCNA. בנוסף, השתמשנו באורגנואידים בתרבית לבחינת השפעת רפמיצין על ביטוי חלבוני חלב במנותק מהרקמה.

תוצאות עקרויות: פעילות mTOR דוכאה בכ- 50% לאחר טיפול בן שלשה שבועות ברפמיצין שהוחדר פעם ביומיים. זאת ללא השפעה על סינתיזת β -casein או מורפולוגית הרקמה. כתוצאה, גדל מספר תאי הגזע הלא ממוינים כפי שעולה מאנליזת קיום תאים בתרבית וביטוי סמנים. לאחר טיפול בן ארבעה ימים באסטרוגן ופרוגסטרוגן לדימוי הריון, נקבע קצב פרוליפרציה מוגבר בבלוטות שטופלו ברפמיצין. לטיפול ברפמיצין היתה השפעה מגברת על חלוקת תאים בזאליים ובמיוחד על תאים לומינליים בצינוריות קטנות הקרובות לאזור החדירה לסטרומה. זאת בהשוואה לצינוריות גדולות בהן לרפמיצין נמצאה השפעה חיובית על חלוקת תאים לומינליים בלבד. הטיפול ברפמיצין גם גרם לשיפור בביטוי חלבוני חלב, אשר נמצא בקורולציה הפוכה לרמת הביטוי האנדוגנית של חלבונים אלה.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: החדרת רפמיצין לבלוטת החלב של בקר למשך 3 שבועות הינה שיטה אפקטיבית לדיכוי פעילות mTOR בתאים אפיתליאליים ולהגברת קצב החידוש העצמי של תאי הגזע. בהמשך לטיפול זה צפויה הגברה לאורך זמן בקצב חלוקת תאים אפיתליאליים בבלוטה ויצור גבוה יותר של חלבוני חלב, במיוחד בחיות בהן פוטנציאל היצור נמוך יחסית. בהתייחס לתוצאות שהתקבלו במחקר זה ובמחקר קודם שהתמקד במודל עכברי, אנו ממליצים לבחון את יעילות הטיפול ברפמיצין על יצור החלב ומאפייניו במבכירות על ידי טיפול בן 3 שבועות בסוף ההריון ובפרות על ידי טיפול בתקופת היובש שלפני ההמלטה.

**הגדלת מספר תאי הגזע בבלוטת החלב של בקר על ידי החדרת רפמיצין דרך הפטמה לתקופה מוגבלת
כדרך לשיפור התפתחות ויצרנות הבלוטה**

Intra-mammary rapamycin administration for enhancing stem cell self-renewal and consequent improvement in mammary development and production

שנת המחקר: 1 מתוך 1 שנים

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

חוקרים שותפים: חן הניג, מאיה רוס ושמאי יעקובי, המכון לחקר בעלי חיים מכון וולקני, מינהל המחקר החקלאי

בשל יציאתו של איתמר ברש לגמלאות במהלך שנת המחקר, יובל צינמון הפך לחוקר האחראי

רשימת פרסומים והרצאות:

Kosenko A, Jacoby S, Salame TM, Ross M and Barash I. 2022. Intramammary rapamycin administration to calves induces epithelial cell self-renewal and latent cell proliferation and production. Summited.

עמוד

4.....מבוא

5.....שיטות וחומרים

7.....תוצאות

15.....דיון ומסקנות

18.....רשימת פרסומים

18.....רשימת ספרות מצוטטת

שני מאפיינים של בלוטת החלב ביונקים: הפרשת חלב וחשיפה לסרטן השד קידמו את חקר התפתחות ופעילות בלוטת החלב לשני כוונים נפרדים העוסקים בשיפור התחלובה במעלי גירה ובקידום הרפואה האנושית. לשני כוונים אלה גורם משפיע משותף – תאי הגזע הנמצאים בראש ההיררכיה התאית בבלוטה. למרות העדר אפיון מורפולוגי וחילוקי דעות בדבר יכולתם המולטיפוטנטית של כלל תאי הגזע בבלוטת החלב של העכבר (1) לאחר הלידה ((אך לא ההומנית (2)), אין ספק כי תאים אלה הינם המקור להתפתחות השכבות הבזאלית והלומינלית של האפיתליום בבלוטה. הם גם מאפשרים את התחדשותה בין תחלובות.

התקדמות רבה נרשמה בחקר תאי גזע בבלוטת החלב העכברית מאז פריצת הדרך שהראתה את יכולתו של תא גזע אחד או תאים בודדים ליצור בלוטה שלמה ומתפקדת לאחר השתלה לסטרומה השומנית (4, 3): הפרדה טובה יותר מתאי אב דווחה (5), סמנים חדשים נקבעו (6, 7), אוכלוסיות תאים חדשות אופינו (6, 7) ואולי החשוב מכל - אוכלוסית תאי גזע אוניפוטנטיים בעלי כושר חידוש עצמי התגלתה בבלוטה הבוגרת אשר ביחד עם אוכלוסית תאי גזע בי-פוטנטיים משמרת את המורפוגנזה וההומאוסטזיס בבלוטת החלב בוגרת של העכבר (8). לעומת זאת, ההתקדמות בחקר תאי גזע בבלוטת החלב של הבקר הינה איטית הרבה יותר. אוכלוסיה קטנה ויחודית זו אמנם ניתנת להעשרה ב Flow cytometry (9) וסמנים להתמינותה אופיינו (10), אך בפועל לא ניתן לעקוב אחריה ב Linage tracing. רק לאחרונה הדגמנו את יכולתה ליצור מבנים מיצגים של בלוטת חלב מבקר לאחר השתלה לסטרומה מבקר המקוימת בתוך הסטרומה של הבלוטה העכברית בחיות מדוכאות חיסונית (11).

בהקשר לשיפור יצור החלב בבקר, ההיפותיזה העומדת בבסיס מחקר זה הינה כי הגדלת מספרם של תאי גזע מתמיינים בתחילת התחלובה עשויה לפצות מבחינה מספרית על מותם של התאים הלומינלים היצרניים אשר אינם מתחדשים (12) ובכך למתן את הירידה בתנובת החלב ההגרמת בשל כך. נסיונות ראשוניים בחיות משק להגדיל את מספר תאי הגזע בוצעו ב USDA על ידי החדרה תוך עטינית של קסנתוזין למשך לעגלות משך 5 ימים (13). החוקרים דווחו על במספרם של ה- BrdU-labelled retaining cells ובפעילות טלומרזות בבלוטה כהוכחה לשיפור בחידוש העצמי של תאי גזע. עם זאת, במעבדתנו לא הצלחנו לשחזר את התוצאות שדווחו במודל עכברי ובפיסות פרנכימה מבקר אשר קוימו בסטרומה העכברית. זאת, תוך שימוש בשיטות מתקדמות יותר של אפיון תאי גזע (14). בנסיונות אלה גם גילינו שהקסנתוזין גורם לדיכוי משמעותי בחלוקת תאים אפיתליאליים בבלוטה כנראה בגלל עיכוב פעילות IMPDH – אנזים חיוני ליצירת Guanine. הגבלת אספקת אנרגיה (Calorie restriction, CR) מביאה לעליה במספר תאי הגזע במעי (15). תאים אלה אינם מסוגלים לחוש באופן ישיר את הירידה באספקת האנרגיה ומגיבים לסיגנל פאראקרני ששלח אליהם מתאי פנט השכנים. התנאי ליצירת הסיגנל בתאי פנט הוא ירידה בפעילות mTOR אשר גורמת להפרשת cADP ribose אשר בתורו משפיע על תאי גזע לחידוש עצמי. עם זאת חשוב לציין כי עיכוב מוחלט של פעילות mTOR בתאי הגזע עצמם על ידי רפמיצין מדכאת חידוש עצמי (16).

בעבודת מחקר קודמת, בחנו דרך אמינה להגברת החידוש העצמי של תאי גזע בבלוטת החלב. על בסיס תוצאות המחקר במעי, חקרנו את תוצאות אדמניסטרציה של ברפמיצין (מעכב mTOR) משך 3 שבועות על שיפור החידוש העצמי של תאי גזע בבלוטה העכברית ובשתלים (implants) של רקמת פרנכימה מעטין בקר שקוימה בסטרונה עכברית. הנסיונות הדגימו שיפור בהתפתחות הבלוטה ובמידה מסוימת גם בביטוי חלבוני חלב (17). על בסיס ממצאים אלה הצענו במחקר הנוכחי לבצע scale up של המערכת הנסיונית לבלוטת החלב של בקר. בהתאם, נקבעה מטרת המחקר: בחינת השפעת החדרה יומית של רפמיצין למערכת הובלת החלב בבלוטת החלב של עגלה משך 21 ימים על השינויים במספר תאי הגזע ועל התפתחותה ופעילותה היצרנית של הבלוטה. לאור מגבלות אדמניסטרטביות הנובעות מיציאתו של החוקר הראשי לגמלאות, הותאם פרויקט המחקר לשנה. אנו מדווחים כי החדרת רפמיצין דרך הפטמה לעטין של עגלות בנות 3 חדשים (אחת ליומיים, משך 3 שבועות) אכן השפיעה על התאים הלומינליים והבזאליים בבלוטה, גם באזורים המרוחקים מהפטמה. התקבלה ירידה של כ- 50% בזרחון S6 המהווה סמן לפעילות mTOR. זאת ללא השפעה על המורפולוגיה של הבלוטה או על ביטוי חלבון החלב β -casein. בהמשך נמצא בעגלות שטופלו באסטרוגן ופרוגסטרוגן לחיקוי מצב של הריון שיפור בקצב חלוקת התאים האפיתליאליים באופן מותנה בסוג התא ובריחוקו מאזור חדירת הצינורית לסטרומה (Terminal ductal lobulo alveolar unit, TDLU). לרפמיצין נמצאה גם השפעה חיובית על יצור חלבוני חלב וזאת במתאם הפוך לכושרה האנדוגני של הבלוטה לבטא חלבונים אלה.

עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

שיטות וחומרים:

עגלות אשר שימשו במחקר ואופן הטיפול ברפמיצין: בניסוי שמשו עגלות בנות 3 חודשים מזן הולשטיין. בסיום הניסויים, בלוטות שטופלו סומנו והעגלות טושטשו ונקטלו על ידי החדרה תוך ורידית של T-61. העטין כולו הוסר. החומרים שהוחדרו לבלוטות החלב (להלן עטין) הומסו ב- PBS סטרילי שהכיל 10% פוליאיתילן גליקול ו 10% Tween 80. החדרת הממס בנפח של 2 מ"ל התבצעה תוך שימוש בקטטר פוליאיתילן 22G שנחתך לאורך של 1.5 ס"מ ללא הרדמה או טשטוש. הטיפול ברפמיצין התבצע על ידי החדרתו לשתי בלוטות, קידמית ואחורית בצד אחד של העטין והחדרת הממס לבלוטות אלה בצד השני.

טיפול באסטרוגן ופרוגסטרוגן: אסטרוגן הוזרק מתחת לעור במשך 4 ימים. האסטרוגן הומס באתנול ונמהל ב- 10% Tween-80 ו- 10% PEG-400 לפני ההזרקה. נפח ההזרקה היה 2 מ"ל והריכוז הסופי של האסטרוגן היה 0.1 mg/kg per day. פרוגסטרוגן הוזרק מתחת לעור במשך 4 ימים. הפרוגסטרוגן הומס בשמן שומשום והוזרק בריכוז של 0.25mg/kg/day. נפח ההזרקה היה 2 מ"ל.

הפקת אורגנואידים מבלוטת חלב בקר: לאחר הוצאתן מן החיות, הרקמות נקצצו ועוכלו אנזימתית על ידי טריפסין. הרקמה המעוכל חלקית הוקפאה ב 10%DMSO ב FBS.

אנליזת חלוקת תאים בזמן מוגבל בתרבית: תאים בודדים נזרעו בריכוז של 10,000 תאים/באר בפלטה של 96 בארות. התאים גודלו ב mammary medium באינקובטור בטמפרטורה של 37°C, בתנאי לחות של 95% ו-5% CO₂.

הפקת RNA מרקמה ותגובת Real Time PCR: הופק מהאזור הפרנכימטי של בלוטת החלב 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.

הפקת חלבון ו immunoblot: חלבונים הופקו מרקמה קבועה תוך שימוש ב RIPA buffer. כמות קבועה עברה אנליזת SDS-PAGE. החלבונים הועברו לממברנה והוגבו על הנוגדנים המתאימים. סיגנל התקבל בריאקציה על סובסטרט כימולומיניסנטי.

קיבוע רקמות: שתלי בקר ובלוטות חלב עכבריות קובעו בתמיסת Bouin למשך לילה ב-4°C. הוצאת המים מהרקמה בוצעה על ידי סדרת שטיפות בריכוזים עולים של אתנול. הרקמות הוצללו על ידי קסילן וקובעו בבולק פרפין. הדוגמאות בפרפין נחתכו לחתכים בעובי 5µm במיקרוטום.

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.

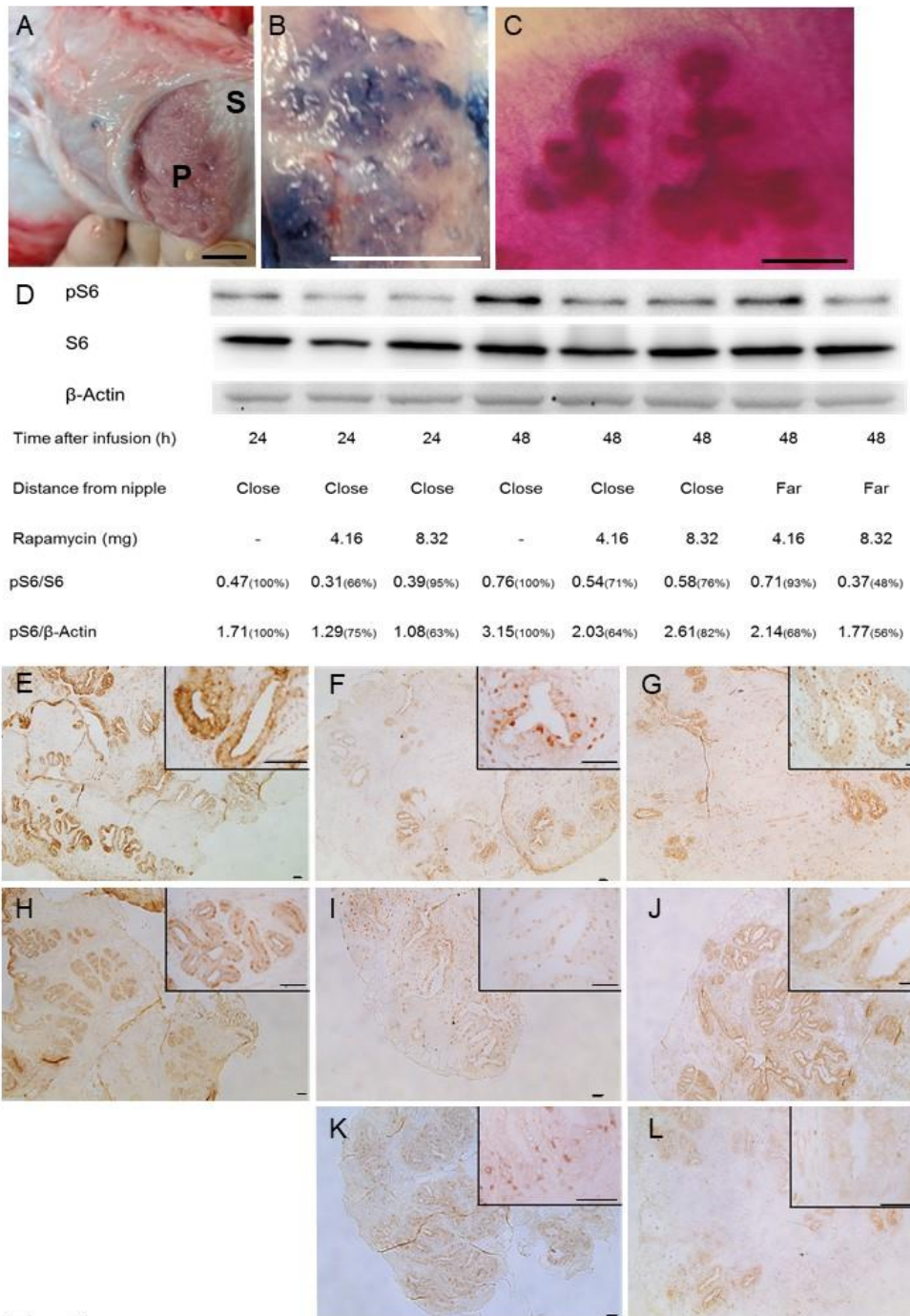
קביעת ביטוי חלבונים בשיטות Immunohistochemistry ו- Immunofluorescence: שיטות אלו נועדו לזיהוי מיקום, ביטוי ופעילות חלבונים נבחרים ברקמה ובתרביות תאים על סמך תגובתם עם נוגדנים ספציפיים. בשיטת Immunohistochemistry, לאחר הסרת הפרפין מהרקמה, עוכבה פעילות פרוקסידאזות אנדוגניות ונחשפו האנטיגנים. חסימת קישור 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 Diaminobezidine (DAB). 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.

אנליזה מורפולוגית של whole mounts: פיסות רקמה שגודלן של כ- 0.5 mm³ עברו פיקסציה על זכוכית נושא והוגבו עם Carmine red. הרקמה נסקרה בבינוקולר וצולמה.

אנליזת Flow cytometry: קביעת מיקום התאים בהיררכיה התאית והשפעת הטיפולים על מספרם היחסי של התאים בכל אוכלוסיה בוצע באנליזת Flow cytometry במכשיר Aria III במחלקה לשירותים ביולוגים של מכון ויצמן. להפרדת האוכלוסיות השונות השתמשנו בנוגדנים ממבאנליים מסומנים פלורוסנטיים. Lin בוצע תוך שימוש בקיט Mouse mammary enrichment, על פי המלצות היצרן. המידע הנאסף נותח והוצג בעזרת התוכנה FlowJo.

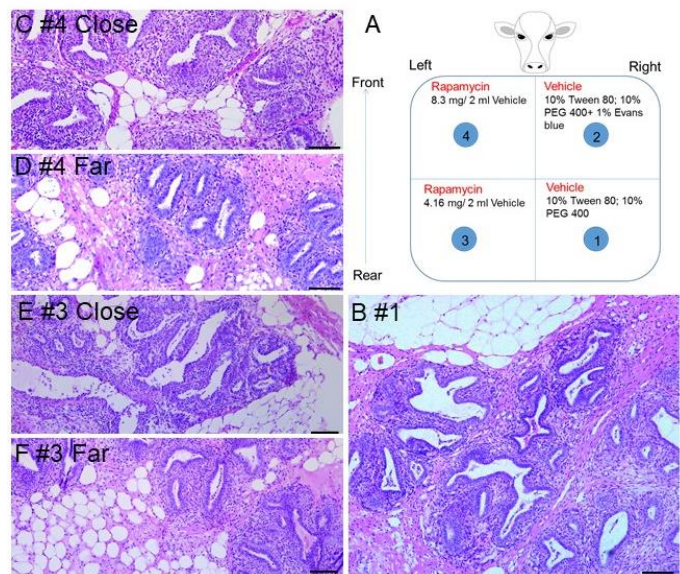
תוצאות

ביסוס השיטה של החדרה תוך פיטמטית של רפמיצין לעטין עגלות. עגלות בנות שלשה חודשים מהרפת הנסיונות בבית דגן נבחרו לקביעת השפעת רפמיצין על חידוש עצמי של תאי גזע פרנכימתיים. שיטה ההחדרה התוך פיטמטית מבוססת על חשיפת התאים הפרנכימתיים לממס הליפופילי (המכיל את החומר הפעיל) אשר מוחדר דרך צינוריות החלב. אלה משמשות כתחליף לצינוריות ונימי הדם בטיפול סיסטמי. שיטה החדרה זו ממוקדת יותר, חוסכת בחומרים המוחדרים בהשוואה לטיפול סיסטמי ואינה חושפת את החיה ל side effects הנובעים מהשפעת הטיפול על איברים אחרים. הבעיה העיקרית הינה חשיפת כלל הרקמה הפרנכימטית (תמונה 1A) והתאים האפיתיליאליים שבתוכה לחומר המוחדר. לאישור, השתמשנו בסמן הכחול Evans blue אשר הומס בממס והוחדר בנפח של 2 מ"ל דרך הפטמה. שלוש שעות לאחר ההחדרה, הוקרבה החיה, העטין הוסר ורקמת הפרנכימה צבועה בכחול התגלתה לאחר חיתוך מתאים (תמונה 1B). Wholemounts מפיסות רקמה זו שהוגבו עם Carmine red הציגו מבנים אפיתיליים אשר לתוכם חדר הצבע הכחול כהוכחה לכך שאכן החדרת חומר המומס בממס הליפופילי מגיע לאפיתל הנמצא בקצה הצינורית (תמונה 1C). בהמשך, נבחנה השפעת רפמיצין על עיכוב פעילות mTOR. רפמיצין הומס הממס הליפופילי והוחדר לבלוטת החלב של שתי חיות בשני ריכוזים למשך 24 או 48 שעות (לפרוצדורה - תמונה 2A). בסיום, נקטלו החיות והעטין הוסר להמשך האנליזות. לטיפול ברפמיצין לא נמצא אפקט על מורפולוגית הרקמה (תמונות 2B-F). פוספורילציה של S6 (מדד לפעילות mTOR) נבחנה בשיטות immunoblot ו-immunohistochemistry (תמונה 1D ותמונות 1E-L), בהתאמה. מתמונות (1D, E-L) ניתן לראות ירידה בביטוי pS6 באזורים הקרובים והרחוקים מהפטמה, אשר נקבעה לאחר החדרת רפמיצין ברמה של 8.28 mg/2ml. זאת ללא אפקט על מורפולוגית הרקמה (תמונה 2). יש לציין כי חשוב היה להמנע מירידה מוחלטת בביטוי-pS6 כדי שלא לדכא פעילות החידוש העצמי בתאי הגזע עצמם. על בסיס אינפורמציה זו הועמד ניסוי חדש לקביעת השפעת טיפול בן 3 שבועות ברפמיצין (8.28 mg/day every other day) לקביעת השפעת דיכוי בפעילות mTOR על חידוש עצמי של תאי גזע בבלוטת החלב (תמונה 3). בכל עגלה משתי העגלות שהשתתפו בניסוי טופלו שני רבעים של העטין (קדמי ואחורי) בממס בלבד והשניים האחרים טופלו ברפמיצין. בתום הטיפול אכן התקבלה ירידה של 53% בזרחון S6 (תמונה 3AB) ללא שינוי בסינתיזת חלבון החלב β -casein (תמונה 3C) או במורפולוגיה של הרקמה (תמונה 3D). אנליזה אימונוהיסטוכימית אישרה כי הירידה בפעילות mTOR אכן מתרחשת בתאים האפיתיליאליים של רקמת הפרנכימה ללא שינוי בסינתיזת הקזאין (תמונות 3EF). מסיבות טכניות, לא ניתן היה לבצע אנליזת Flow cytometry לקביעת שינויים במספר תאי הגזע מיד לאחר קטילת העגלות. לכן, רקמת הפרנכימה מכל אחת מהבלוטות עוכלה לאורגנואידים אשר הוקפאו ב -80°C עד להפקת תרחיף תאים וסימונם ב- CD24 ו- CD49f הקשורים לפלאורופורים שונים. רמת שרידות נמוכה יחסית של התאים לאחר ההקפאה ונדירות של אוכלוסיית תאי הגזע (<1%) אשר איננה ממוקמת באזור נפרד באנליזה גרמו לכך שלא ניתן היה לזהות שינוי משמעותי במספר תאי בגזע בהשפעת הטיפול ברפמיצין (תמונה 4). לכן, בחרנו לקבוע את השינויים במספר תאי הגזע בשיטה עקיפה שהוכיחה עצמה כאמינה ביותר בעבודות קודמות (9, 17).

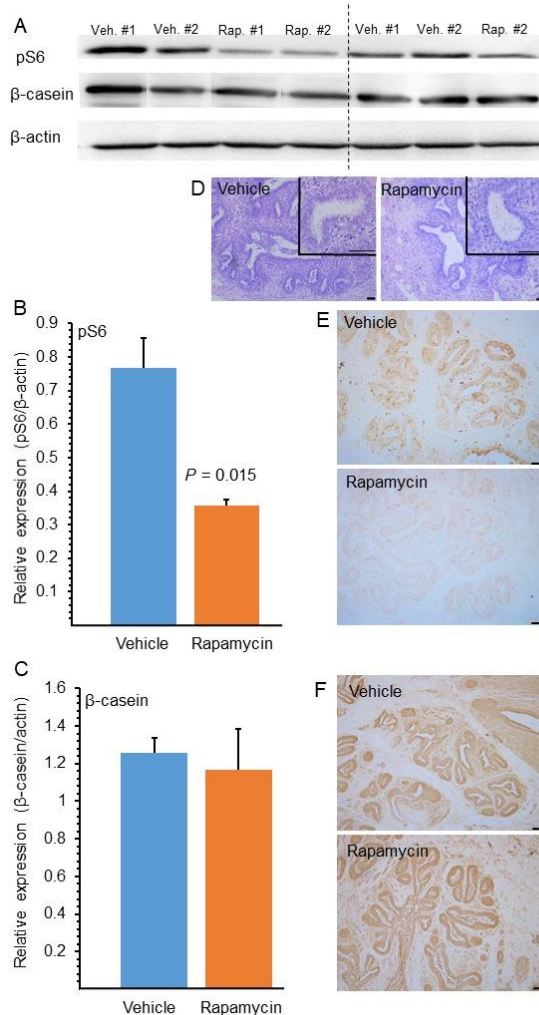


תמונה 1. החדרת רפמיצין דרך הפיטמה לתוך העטין מדכאת זרחון S6 באזור הפרנכימתי. A. מורפולוגית הרקמה. B. התפשטות Evans blue דרך צינוריות החלב ברקמה. C) Wholemounts מפיות רקמה בהן ניתן לקבוע את חדירת Evans blue לתוך המבנים האפיתליאליים בקצה הצינורית כבר לאחר שתי שעות מההזרקה. D. אימונובלוט המדגים ירידה בביטוי pS6 24 או 48 שעות לאחר הטיפול ברפמיצין. E-G. אנליזה אימונוהיסטוכימית של ביטוי pS6 ברקמת הפרנכימה 24 שעות לאחר הטיפול באזורים הקרובים לפטמה. E. לאחר טיפול בממס בלבד. F לאחר החדרת רפמיצין (4.16 mg). G. לאחר החדרת רפמיצין (8.32 mg). H-L. אנליזה אימונוהיסטוכימית לביטוי pS6 48 שעות לאחר הטיפול באזורים קרובים ורחוקים מהפטמה. H. לאחר טיפול בממס בלבד. I. לאחר החדרת רפמיצין (4.16 mg). J. לאחר החדרת רפמיצין (8.32 mg). K. לאחר החדרת רפמיצין (4.16 mg). L. אזור רחוק מהפטמה. אזור רחוק מהפטמה.

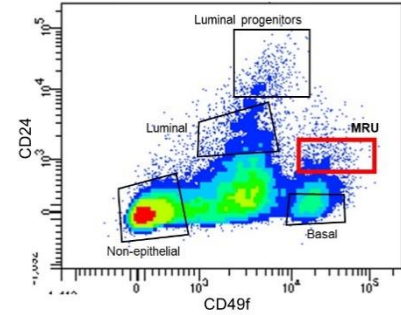
תמונה 2. טיפול ברפמיצין משך 48 שעות אינו משפיע על מורפולוגית בלוטת החלב. A. אופן הטיפול בבלוטות השונות. B-F. לטיפול ברפמיצין משך 48 שעות אין השפעה על מורפולוגית הרקמה באזורים קרובים ורחוקים מהפטמה. Bar = 50µm.



תמונה 3. טיפול בן שלשה שבועות ברפמיצין מדכא פעילות mTOR ללא השפעה על המורפולוגיה של הרקמה. A-C. אימונובלוט ופיענוכו המראה כי טיפול ברפמיצין מדכא ביטוי pS6 ללא השפעה על ביטוי β-casein. D. לא אובחנה השפעה לטיפול ברפמיצין על מורפולוגית הרקמה. E-F. אנליזה אימונוהיסטוכימית המאשרת כי את דיכוי הפוספורילציה של S6 בתאים אפיתליאליים ללא השפעה על סינתזת קזאין, בהתאמה. Bar = 50 µm.



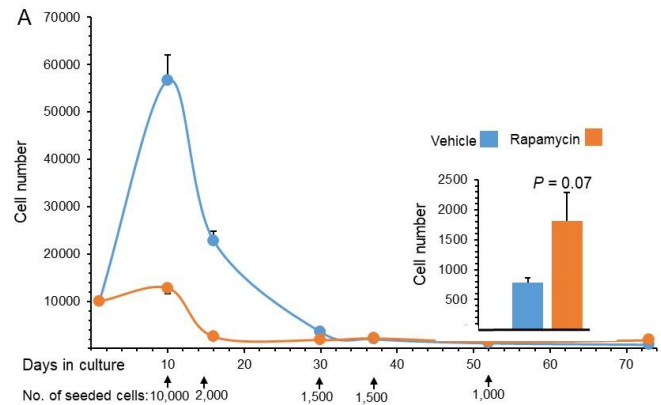
**תמונה 4. אנליזת flow cytometry לקביעת תאי גזע אפיתליאליים
בבלוטת החלב של בקר. MRU – תאי גזע.**



שיטה זו מבוססת על הקשר בין מספר תאי בגזע ברקמה ושרידות תרבית שהוכנה מרקמה זו. כפי שניתן לראות מתמונה 5A, בתחילת התרבית נקבעה עליה משמעותית בתאים מבלוטות הביקורת אשר משקפת חלוקת תאים מומינים או ממוינים חלקית. עליה זו נמנעה על ידי הטיפול ברפמיצין. ביום 30 לתרבית, מספר התאים מבלוטות הביקורת ואלו שטופלו ברפמיצין השתווה ובהמשך התהפכה המגמה לעליה במספר התאים מהבלוטות שטופלו ברפמיצין (פי 1.15 ו 1.4 בימים 37 ו 52 לתרבית, בהתאמה) ועד לעליה של פי 2.6 בסיומה. עליה זו משקפת מספר גדול יותר של תאי גזע ברקמה המטופלת.

לצערנו, לא נקבע סמן יחידי לתאי גזע בבלוטת החלב (9, 10). עם זאת בעבודות קודמות דווח על מספר מוגבל של גנים אשר ביטויים גבוה יותר בתאי גזע מבקר ומרקמה הומנית בהשוואה לאוכלוסיות תאים יותר ממוינות (10, 11, 18). כל הסמנים הללו אכן התבטאו ברמה גבוהה יותר (8-20%) בבלוטות המטופלות ברפמיצין (תמונה 5B). זאת בניגוד ל Stat5a אשר הינו סמן לתאי אב לומינליים ואשר התבטא ברמה נמוכה יותר. בגלל השונות הגבוהה בין הביטוי בבלוטת הבדלים סטטיסטיים ברמה של ($P < 0.05$) לא נקבעו.

**תמונה 5. טיפול ברפמיצין משך 3 שבועות
מגביר מאפייני חידוש עצמי של תאי גזע
אפיתליאליים מבלוטת חלב של בקר. A.
אנליזת חלוקת תאים בתרבית מבלוטות
מטופלות ברפמיצין ושאינן מטופלות. Inset:
אנליזה ביום האחרון לתרבית. B. אנליזת ביטוי
סמנים לתאי גזע, (notch1, Jagged1, Delta1,
(Stat5a), LGR4, LGR5) ולתאי אב לומינליים.**



B

	Relative gene expression (%)	
	Vehicle	Rapamycin
Stat5	100±45	80±43
Notch1	100±49	108±48
Jagged1	100±54	110±75
Delta1	100±34	115±44
LGR4	100±36	120±69
LGR5	100±15	110±20

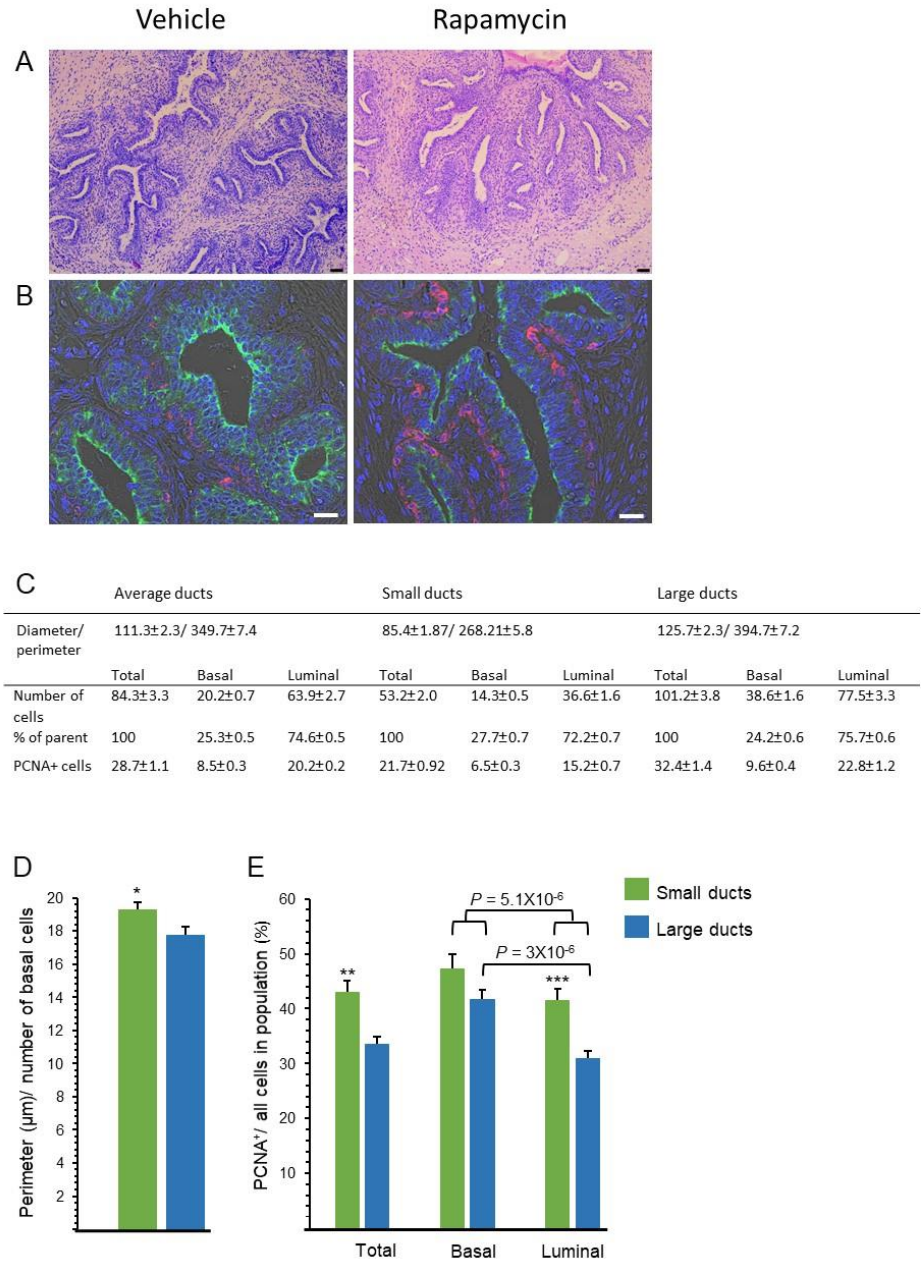
תוצאות העליה במספר תאי הגזע שנקבעה בתום הטיפול ברפמיצין בניסויים שהוזכרו לעיל נבחנה בניסוי המשך. לניסוי זה נבחרו 3 עגלות בנות 3 חודשים. בכל עגלה, טופלו שתי בלוטות ברפמיצין ושתיים בממס בלבד. בתום 3 שבועות של טיפול (אחת ליומיים) ולאחר פסק זמן של 5 ימים, טופלו החיות משך 4 ימים נוספים באסטרוגן ופרוגסטרון לדימוי מצב הריון. תקופת הטיפול בסטרואידים אלו הוגבלה על ידי הועדה לניסויים בבעלי חיים והטיפול בוסס על דווח שארבעה ימי טיפול בסטרואידים אלה מספק להשראת חלקת תאים בבלוטה (19). בסיום הניסוי החיות נקטלו והעטין הוסר להמשך בדיקות.

אנליזות היסטולוגית ואימונופלורוסנטית הדגימו מבנה אופיני של רקמת פרנכימה בבלוטות חלב המטופלות ברפמיצין ומקבוצת הביקורת. נראו צינורות ממוצא אפיתליאלי בגדלים שונים, כאשר שכבת התאים הבזאלית מגיבה עם α SMA והשכבות הלומינליות עם CK18. לא נראה הבדל מורפולוגי בין שתי בלוטות מטופלות לשאינן מטופלות (תמונת 6AB). אנליזה סטטיסטית (Tuckey Kramer, means comparison) אישרה כי אין השפעה לגורם החיה אינדיוידואלית או הבלוטה אינדיוידואלית על מספר התאים ברקמה או היקף הצינוריות (לא מודגם), ממצא זה אפשר הכללתם באנליזה כוללת. אפיון מדויק יותר של הבלוטה הנחקרת בוצע על מנת להבין את השפעת הטיפול ברפמיצין. מסיבות אבחנתיות נסקרו צינוריות בקוטר 51.35-191.8 מיקרומטר. אנליזה זו הראתה כי רקמת הפרנכימה של בלוטת החלב של עגלה בת 3 חודשים מכילה צינוריות המורכבות בממוצע מ 84 תאים אפיתליאליים/ מיואפיתליאליים אשר ביחד מרכיבים צינורית בהקף ממוצע של 350 מיקרון (תמונה 6C). מרבית התאים בצינורית הינם תאים לומינליים ואילו התאים המיואפיתליאליים/ בזאליים מהווים רק כ 25% מכלל התאים המקיפים את הצינורית. מבחינה מורפולוגית התאים המיואפיתליאליים קרובים יותר אחד לשני בהקף הצינורית הגדולה בהשוואה לצינורית קטנה (צינורית קטנה קרובה יותר לאזור הגדילה וקוטר הוגדר כקטן מ 100 מיקרון. ההפך נכון ביחס לצינורית גדולה, תמונה 6D). לקביעת קצב התחלקות, חתכים מדגימות בלוטות החלב השונות הוגבו עם PCNA (תמונה 7AB). כ 45% מכלל התאים הלומינליים/בזאליים נמצאו בחלוקה. קצב החלוקה של התאים הבזאליים היה גבוה ב 26% מזה של התאים הלומינליים (תמונה 6E).

אנליזות נפרדות בוצעו עבור צינוריות גדולות וקטנות (תמונה 6E). קצב חלוקת התאים היה גבוה ב 28% בצינוריות הקטנות בהשוואה לגדולות, בעיקר בגלל קצב חלוקה גבוה יותר של התאים הלומינליים שהיה גבוה ב 31%. יש לציין כי בצינוריות הקטנות לא נמצא הבדל סיגניפיקנטי בין קצב החלוקה של תאים בזאליים ולומינליים, בעוד שבצינוריות הגדולות קצב החלוקה של התאים הבזאליים היה גבוה ב 37% בהשוואה לקצב החלוקה של התאים הלומינליים. טיפול ברפמיצין גרם לעליה לטנטית של 20% במספר התאים שהגיבו ל-PCNA בעיקר בגלל תגובתם של התאים בצינוריות הגדולות (תמונה 7C). נמצא גם כי תאים בזאליים הושפעו חיובית רק בצינוריות הקטנות בעוד שתאים לומינליים הושפעו ללא קשר למיקומם.

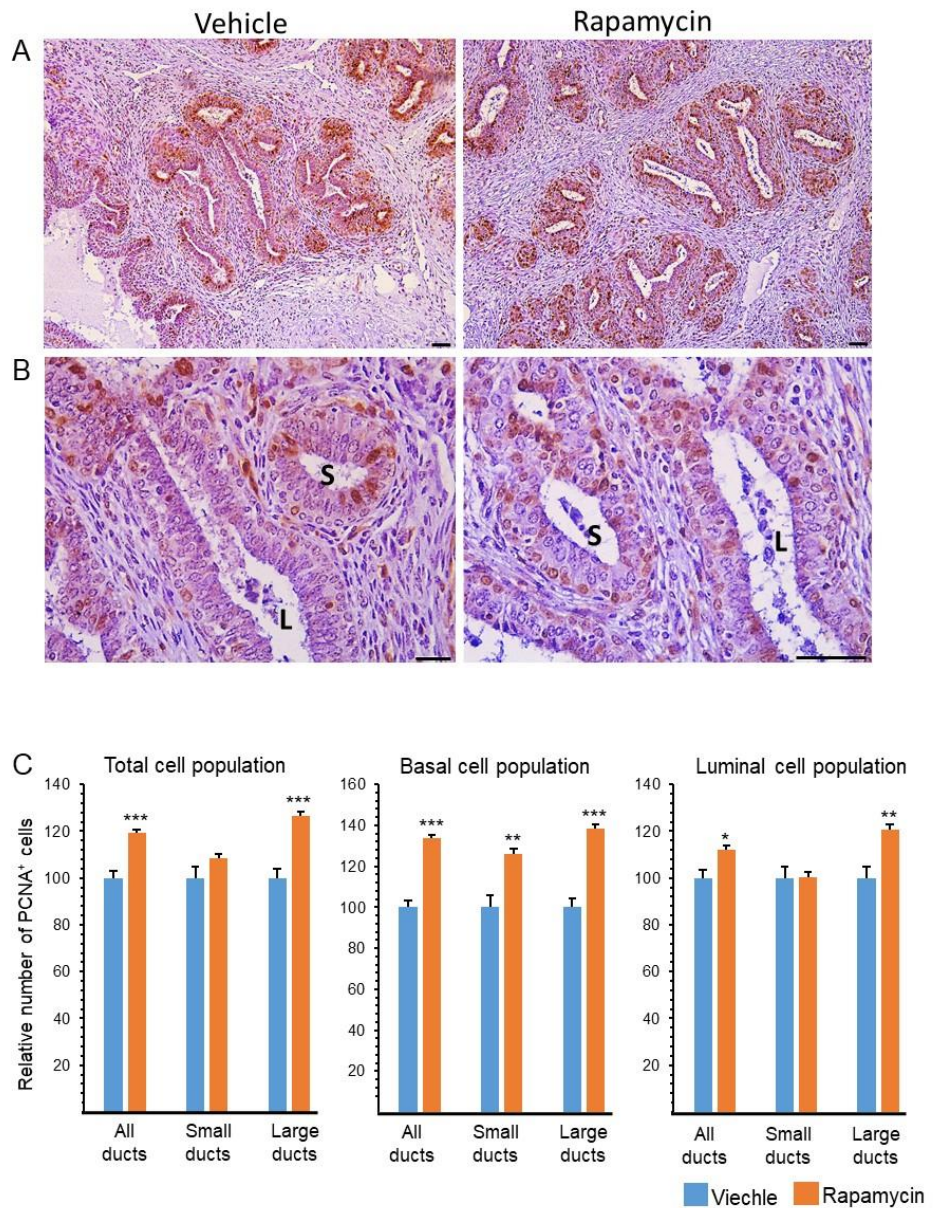
בהמשך, נקבעה השפעת הטיפול ברפמיצין על ביטוי חלבוני חלב והסינתיזה שלהם (תמונה 8). זאת על בסיס אנליזה אימונופלורוסנטית שאישרה ומקמה את ביטויים של β -casein ו- β -lactalbumin (BLG) בתאים הלומינליים של בלוטת החלב מהעגלות בנות 3 חודשים (תמונה 8A). לאור השונות הגדולה בביטוי חלבוני החלב

תמונה 6. אפיון מורפולוגי והתפתחותי של בלוטת החלב של עגלה בת שלשה חודשים לאחר טיפול בן 4 ימים באסטרוגן ופרוגסטרון. A. מורפולוגית הרקמה לאחר תגובה עם H&E. Bar = 50µm. **B.** הגבה עם CK18 (ירוק) ו αSMA (אדום) מראה רב שכבתיות של תאים לומינליים ושכבה אחת של תאים בזאליים. **C.** מאפייני מורפולוגית הרקמה. צינורית קטנה - קוטר קטן מ 100 מיקרון. צינורית גדולה – קוטר גדול מ 100 מיקרון. **D.** צפיפות התאים הבזאליים גבוהה יותר בצינוריות גדולות. **E.** מספר התאים PCNA+ גבוה יותר בצינוריות קטנות בהשוואה לגדולות כתוצאה מהבדל סיגנפיקנטי בקצה בתחלקות התאים הלומינליים.



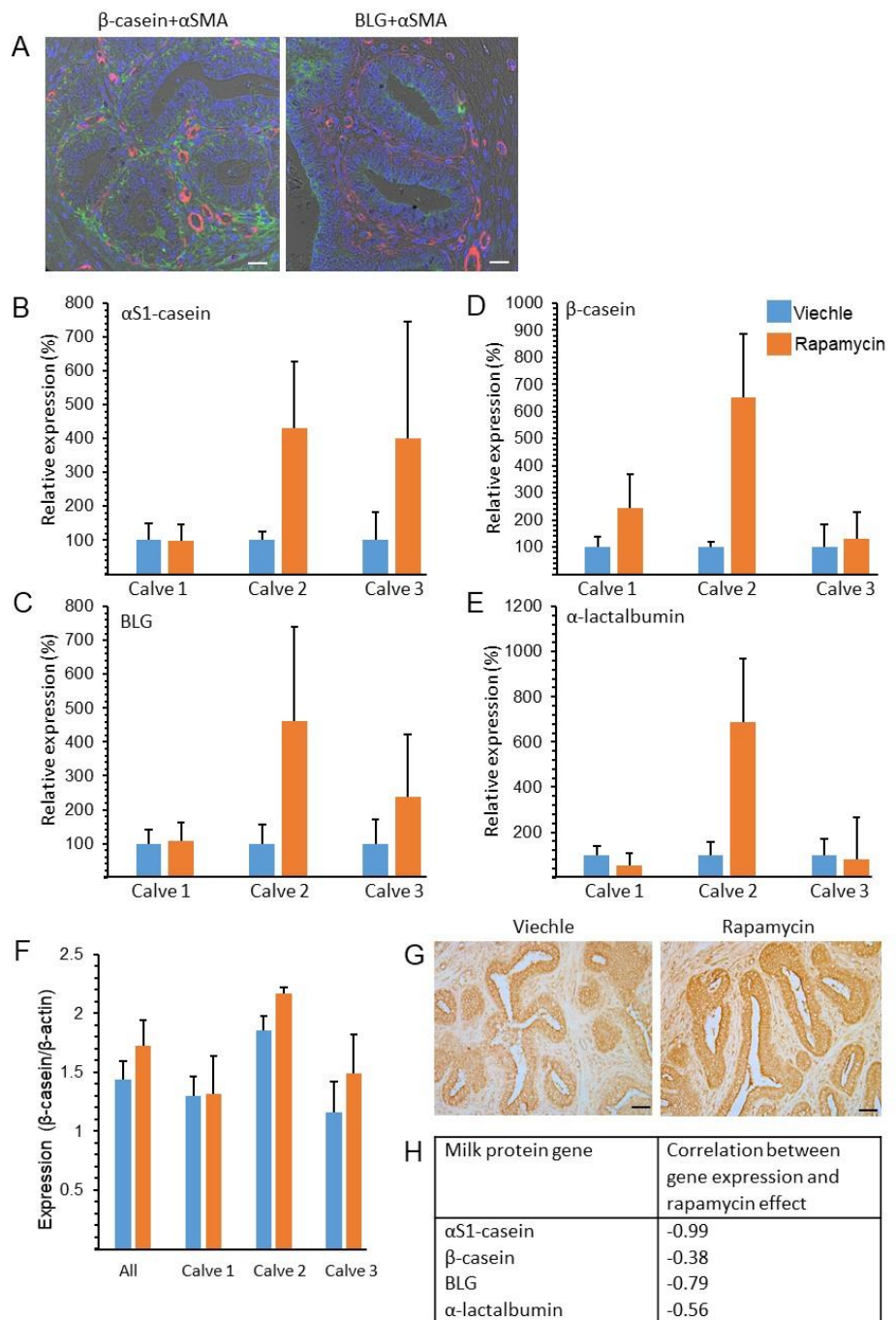
בין החיות, יוחסה השפעת הרפמיצין לביקורת המטופלת בממס בלבד בכל חיה בנפרד. בעגלה מס. 2 נמצאה עליה של פי 4.5-6 בביטוי כל ארבעת חלבוני החלב שנבדקו (תמונה 8B-E). אפקט חיובי זה אושר ב immunoblot (תמונה 8F) ובאנליזה אינוהיסטוכימית של ביטוי β-casein בתאים (תמונה 8G). השפעה חיובית מתונה יותר על ביטוי αS1-casein ו BLG נקבעה בעגלה מס. 3 בעוד שעגלה מס. 1 לא הושפעה כלל. חשוב לציין שביטוי חלבוני החלב בעגלות מס 2 ו-3 היה נמוך מזה שנקבע בעגלה מס. 1 (0.4 – 12% מהביטוי בעגלה מס 1). בהתאם, נקבעה קורולציה שלילית של עד 99% בין הביטוי האנדוגני של חלבוני החלב בבלוטות הביקורת לבין פוטנציאל השיפור של הטיפול ברפמיצין (תמונה 8G).

תמונה 7. טיפול מוקדם ברפמיצין גורם לשיפור תלוי-אזור וסוג תא בקצב חלוקת תאים בבלוטת שלשה חודשים. לאחר טיפול בן 4 ימים באסטרוגן ופרוגסטרוגן חתכים מהרקמה הוגבו עם PCNA תוך counterstaining עם אאוזין. AB. חתכים היסטולוגיים מבלוטות מטופלות או לא מטופלות ברפמיצין תאים PCNA+ בחתכים ההסטולוגיים נסרקו באוכלוסיית התאים הבזאליים והלומינליים המאכלסות את הצינוריות הקטנות (S) והגדולות (L) מבלוטות שטופלו או לא טופלו ברפמיצין. הגדלות קטנות וגדולות של הרקמה. מוצגות. C. ששה שדות מיקרוסקופיים (הגדלה 10X) מכל אחת מהבלוטות נסרקו לתאים PCNA+. מוצגת אנליזה של השפעת רפמיצין על חלוקת תאים בזאליים ולומינלים בצינוריות קטנות וגדולות.

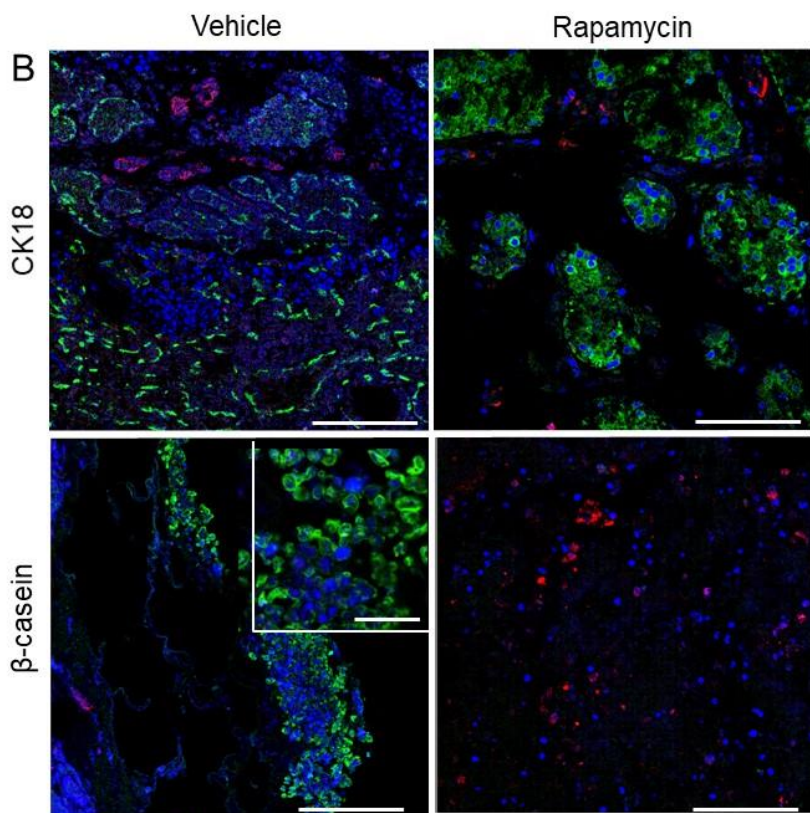
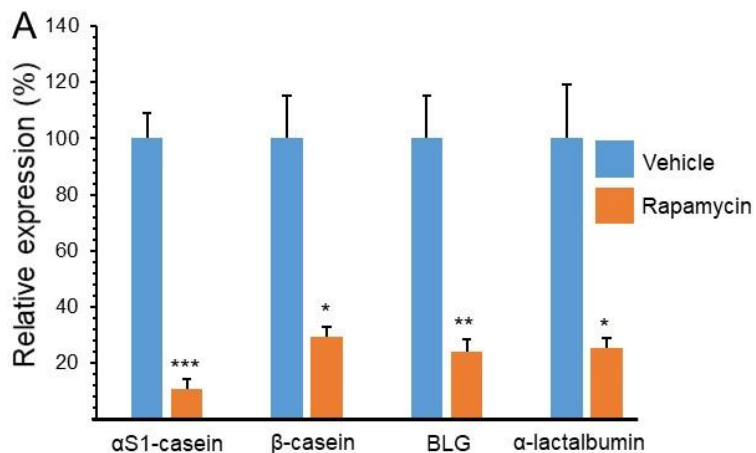


בתרבית אורגנואידים (פיסות רקמת פרנכימה מעוכלות חלקית על ידי רפמיצין לצברי תאים שגודלו על inserts בבאריות) חקרנו את השפעת רפמיצין על ביטוי חלבוני החלב במנותק מההשפעה הסביבתית הכוללת המאפשרות, בין השאר, התארכות הצינוריות בבלוטת החלב של העגלה (תמונה 9). אורגנואידים בתרבית טופלו (פעם ביומיים) משך שלשה שבועות ברפמיצין ב mammary medium המכיל סרום. לאחר שבוע ללא טיפול, הוחלף המדיום למדיום התמינות ויצור המכיל רק הורמונים לקטוגניים: אינסולין, הידרוקורטיזון ופרולקטין. נמצא כי במנותק מהשפעה סביבתית מלאה מורפולוגיה תקינה והשפעה סיסטמית, לרפמיצין השפעה לטנטית שלילית חזקה על ביטוי חלבוני החלב בתאים האפיתליאליים בתנאים המעודדים דיפרנציאציה וסינתזת חלבוני חלב. זאת, למרות קיומם של תאים ממוינים המבטאים CK18.

תמונה 8. השפעה שונה
לרפמיצין על ביטוי וסינתזה
של חלבוני חלב בעגלות
השונות. A. ביטוי החלבונים
 β -casein ו- β -lactoglobulin
 (BLG, ירוק) נקבע
 באימונופלוורוסנציה בבלוטת
 החלב. Bar = 20 μ m. B-F.
 אפקט הטיפול ברפמיצין על
 ביטוי חלבוני חלב בכגלות
 השונות. כל עמודה מיצגת
 ממוצע \pm טווח של שתי
 בלוטות. F. immunoblot
 לביטוי β -casein (המיוחס
 לאקטין). G. אנליזה
 אימונוהיסטוכימית מייצגת
 המאשרת את תוצאות אנליזת
 ביטוי הגנים להשפעת רפמיצין
 על ביטוי β -casein. Bar =
 50 μ m. H. יחס שלילי בין
 רמת הביטוי האנדוגנית של
 חלבוני החלב ובין פוצנציאל
 שיפור הביטוי על ידי טיפול
 ברפמיצין.



תמונה 9. טיפול ברפמיצין דיכא ביטוי חלבוני חלב באורגנואידים מבלוטת חלב בתרבית. אורגנואידים מבלוטת החלב טופלו (או לא) ברפמיצין משך שלשה שבועות. לאחר הפסקה בת שבוע בטיפול ברפמיצין, טופלו האורגנואידים במדיום שהכיל רק הורמונים לקטוגניים: אינסולין הידרוקורטיזון ופרולקטין. A. טיפול ברפמיצין דכא ביטוי חלבוני חלב. B. אנליזה אימונופלורוסנטית מאשרת ירידה דרסטית בביטוי β -casein בהשפעת רפמיצין ללא שינוי משמעותי בביטוי CK18. ירוק- β -casein ו- CK18. אדום- α SMA.



דיון ומסקנות

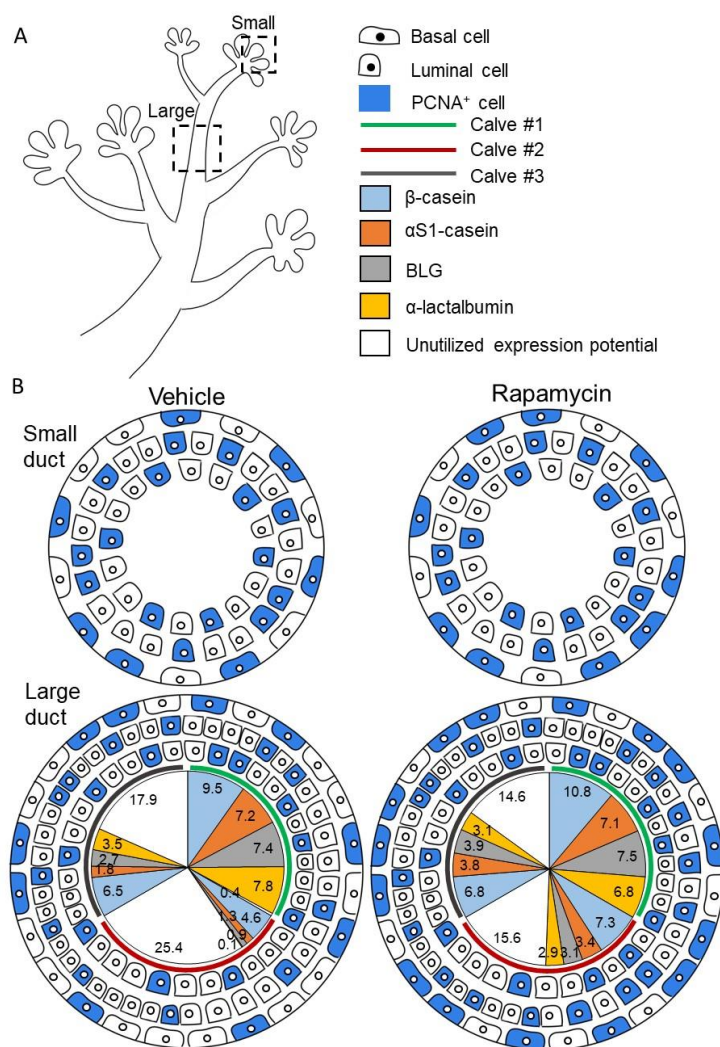
מחקרים פרמקולוגיים בחיות משק מוגבלים בהקפם בגלל גודלה של החיה. בעבודה זו הראינו שבלוטת החלב של עגלה בת 3 חודשים הינה מפותחת מספיק על מנת לאפשר Scale up של ממצאים ממודלים עכבריים (17) לקביעת השפעת דיכוי מסוים בפעילות mTOR על חידוש עצמי של תאי גזע בבלוטת החלב וההשלכות ההתפתחותיות והפרודוקטיביות. תוך שימוש בסמן הכחול Evans blue הדגמנו כי החדרת חומרים המומסים בממס ליפולילי דרך צינוריות החלב משמשת אלטרנטיבה זולה ויעילה לטיפול סיסטמי. הראינו גם כי החומר המוחדר מגיע אף לאזורים מרוחקים

מאזור ההחדרה בפטמה. רפמיצין, אשר שמש לדיכוי פעילות mTOR מאושר על ידי ה FDA לטיפול שונים ובכללם טיפול בחולי סרטן (20, 21). הוא גם מוכר בגורם המשפיע חיובית על משך החיים (22). עם זאת יש לקחת בחשבון דווחים כי בטיפולים ארוכי טווח הוא מדכא פעילות קומפלקס מספר 2 של mTOR ועלול לגרום לסכרת בעקבות פגיעה בכבד (23-25). מכאן התוספת הבטיחותית של ההתמקדות בעטין על ידי ההחדרה התוך פטמתית של רפמיצין.

המתודולוגיה וריכוז החומר המוחדר נבחרו על מנת לענות ל 3 הבטים שחלקם מנוגדים. א. השגת עיכוב מספק של פעילות mTOR על מנת לקיים סיגנל לחידוש עצמי מתאי niche (15) ותוצאות שלא פורסמו ממעבדתנו) לתאי הגזע האפיתליאליים. ב. קיום רמה מספקת של פעילות mTOR בתאי הגזע עצמם שתאפשר את החידוש העצמי. ג. מניעת זיהומים בתוצאה מהטיפול. אכן, לאחר 3 שבועות של טיפול (אחת ליומיים) ברפמיצין ירדה רמת פעילות ה mTOR ל47% בהשוואה לביקורת, ללא שינוי מורפולוגי ברקמה או שינוי בסינתזת β -casein. בעכברים, דיכוי פעילות mTOR בתקופה של הריון-לקטציה גורמת לדיכוי בקצב חלוקת תאים וסינתזת β -casein (26). תגובה דומה נרשמה גם בפעילות עודפת של mTOR כתוצאה מדיכוי TSC1 (27). על בסיס תוצאות אלה אנו מניחים שהכמות המוחדרת של רפמיצין והמתודולוגיה שהשתמשנו בה אינם גורמים לדיכוי משמעותי ביצור חלבונים או לתוצאות פתולוגיות, אך היו מספקים להשגת המטרה העיקרית בניסוי זה והיא הסטת שווי המשקל בחלוקת תאי גזע לכוון החידוש העצמי במקום להתמינות. הנחה זו מתבססת על ההשפעה הלטנטית החיובית על קיום תאים בתרבות לאורך זמן ועל ביטוי מוגבר של קבוצת סמנים לתאי הגזע. תוצאות אלה תואמות את אלו שהתקבלו במודל עכברי בו רקמת הפרנכימה האנדוגנית או רקמת פרנכימה מבלוטת חלב של עגלות בוגרות שהושתלה בעכבר. ((בעכבר ניתן היה לקבוע עחיה במספר תאי הגזע גם ב flow cytometry (17)).

ארבעה ימי טיפול באסטרוגן ופרוגסטרון מספיקים להשרות פרוליפרציה בבלוטת חלב של בקר (19). בהיותנו מוגבלים במשך הטיפול בסטרואידים אלה על ידי הועדה המוסדית לניסויים בבעלי חיים, הסתפקנו בטיפול זה לדמות השפעת טיפול ברפמיצין בתקופת ההריון בבקר (תמונה 10). מבחינה מורפולוגית, המרחק מה-TDLU, אזור ההתארכות של הצינורית (כפי שנקבע על ידי קוטר הצינורית) נמצא בקורולציה הפוכה לקצב חלוקת התאים ומשקף ירידה משמעותית בקצב חלוקת התאים הלומינליים לאורך הצינורית הנוצרת. בבלוטת החלב של העכבר, חלוקת תאים עיקרית מתבצעת בתאים בזאליים ובתאי אב לומינליים (28). גם בשד ההומני תאים בי-פוטנטים בעלי כושר שחזור עצמי (תאי גזע) קיימים לאורך הצינורית, בעוד שתאים מתחלקים נמצאים בעיקר בקצה החודר את הסטרומה (29). אם נקיש מכך לבקר, ניתן לקבוע כי אכן תאים בזאליים מתחלקים (המכילים את פרקציית תאי הגזע) קיימים לאורך הצינורית ללא קשר למרחק מהקצה (יתכן ועל מנת לשמר את מבנה הצינורית). לעומת זאת תאים אב לומינליים מתחלקים בעיקר באזור ה TDLU. יתכן השונות בקצב החלוקה בין תאים בזאליים ולומינליים נובעת מהקירבה בין הבזאליים ל niche חיצוני דוגמת מקרופזים (30), זאת בהשוואה לתאים הלומינליים המבוקרים יותר ברמת האסוציאציה ביניהם.

תמונה 10. סכימה המסכמת את האפקט הלנטני של השפעת רפמיצין על חלוקת תאים בבלוטת החלב של עגלות בנות 3 חודשים ועל ביטוי חלבוני חלב. A הגדרת האזור המורפולוגי של הצינוריות הקטנות והגדולות בבלוטת החלב המתפתחת. B חלוקת תאים בזאליים ולומינליים בצינוריות חלב קטנות וגדולות מוצגת בשלשת העיגולים החיצוניים. מוצגת צפיפות נמוכה יותר של תאים בזאליים בצינוריות הקטנות בהשוואה לגדולות. כמו כן מוצגת השפעה אינדוקטיבית של רפמיצין על קצב חלוקת תאים בזאליים ולומינליים בצינוריות הקטנות בעוד שבצינוריות הגדולות – רק התאים הלומינליים הושפעו. הסכימה הינה ביטוי מדויק של האנליזות. ביטוי חלבוני חלב מוצג בעגלות האינדיוידואליות מוצג בפילוח בעיגול הפנימי (ב large ducts). (N=1) בעגלה #1 נקבע הביטוי הגבוה ביותר של חלבוני חלב. בעגלה זו נקבעה גם ההשפעה הנמוכה ביותר של הטיפול ברפמיצין. עם זאת, הביטוי הכולל של ארבעת חלבוני החלב בבלוטות החלב המטופלות ברפמיצין של עגלה #1 היה הגבוה ביותר בהשוואה לכל שאר הבלוטות בעגלות השונות ומייצג את מלוא הפוטנציאל של הבלוטה. השפעה גדולה יותר של הטיפול ברפמיצין מוצג בעגלה #2 ואף יותר בעגלה #3 בה נקבע הביטוי הנמוך ביותר של חלבוני החלב ומכאן, לדעתנו, השיפור הגבוה ביותר בטיפול ברפמיצין. עם זאת, בעגלות #2,3 עדיין לא מוצה פוטנציאל השיפור עד תומו. (N=1) Log2 חושב על מנת לאפשר הצגה מתאימה של ערכי ביטוי שונים בשני סידרי גודל, אשר



חלקם נמוך מ – 1.

טיפול ברפמיצין שיפר את קצב הפרוליפרציה בתאים אפיתליאליים מבלוטת החלב של עגלות בנות 3 שבועות. אם לוקחים בחשבון את רמת ביטוי הקזאין שלא השתנתה לאחר 3 שבועות טיפול ואת משך הזמן שעבר מסיום הטיפול ברפמיצין ועד קטילת החיה (9 ימים), ניתן להניח כי טיפול זה אינו מהווה קומפנסציה לדיכוי כל שהוא, אלא מהווה תוצאה של הגדלת מספר התאים הלא ממונים בבלוטה. אכן במודל של שתלי פרנכימה ממקור בקר בעכבר נמצאה הגדלה במספר הצינוריות ובמיוחד הקטנות לאחר טיפול דומה (17). עם זאת חשוב לציין כי השפעתו של רפמיצין על קצב חלוקת התאים היתה סלקטיבית, מבדילה בין צינוריות קטנות, המהוות את אזור ההתארכות, בהן נמצאה השפעה חיובית לטיפול ברפמיצין על חלוקת תאים בזאליים ולומינליים לבין צינוריות גדולות, בהן רפמיצין השפיע רק על התחלקות תאים לומינליים. יתכן ובמידה מסוימת הבדלים אלה קשורים בצפיפות הרבה יותר של תאים בזאליים מיואפיתליאליים בצינוריות הגדולות. לרפמיצין היתה גם השפעה חיובית על סינתיזת חלבונים בבלוטת החלב כיחס הפוך לפוטנציאל הביטוי האנדוגני. אנו מניחים שהדבר קשור להגדלת

היחס בין תאים אפיתליאליים לתאי סטרומה בפרנכימה המתפתחת של העגלות ובעיקר אלו שבן מספר התאים האפיתליים נמוך יחסית.

המסקנות העולות מעבודת מחקר זו הן כי הפרוצדורה של החדרת חומרים מומסים בממס ליפופילי דרך הפטמה להשפעה על תאי האפיתל בבלוטת החלב של בקר היא יעילה וזולה יחסית לטיפול סיסטמי. פרוצדורת הטיפול ברפמיצין שכללה החדרת החומר אחת ליומיים מאפשרת השפעה בי פאזית: מצד אחד יצירת סיגנל פאראקריני לחידוש עצמי ומצד שני אפשרות לסינתיזת חלבונים הדרושים לחידוש העצמי של תאי הגזע. השיפור בקצב ההתחלקות ובאופן סלקטיבי גם ביצור חלבוני החלב אינו מהווה כנראה פיצוי לדיכוי קודם אלא הינו בעיקר פונקציה של הגדלת מספר התאים הלא ממוינים בבלוטה. אשר לאפליקציה של הנתונים לטיפול בפרות בוגרות, תוצאות מחקר זה מאששות את ההנחה שמועד הטיפול היעיל ביותר הינו תקופת ה"יובש" בסיום ההריון. לאור שיפור התפתחות בלוטת החלב (כפונקציה) גם היצור, כדאי לדעתנו לבחון את יעילות הטיפול ברפמיצין בעדר פרות בוגרות. אכן, לטיפול זה עשויה להיות השפעה גדולה יותר על מבכירות בהן פוטנציאל התפתחות הבלוטה לא מומש במלואו.

רשימת פרסומים

Kosenko A, Jacoby S, Salame T.M, Ross M and Barash I. 2022. Intramammary rapamycin administration to calves induces epithelial stem cell self-renewal and latent cell proliferation and milk protein expression. Summited.

ספרות מצוטטת

- 1 Van Keymeulen A, Rocha AS, Ousset M, Beck B, Bouvencourt G, Rock J, et al. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature*. 2011;479(7372):189-93.
- 2 Cristea S, Polyak K. Dissecting the mammary gland one cell at a time. *Nature communications*. 2018;9(1):2473.
- 3 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.
- 4 Stingl J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*. 2006;439(7079):993-7.
- 5 Rauner G, Kudinov T, Gilad S, Hornung G, Barash I. High Expression of CD200 and CD200R1 Distinguishes Stem and Progenitor Cell Populations within Mammary Repopulating Units. *Stem cell reports*. 2018;11(1):288-302.
- 6 Fu NY, Nolan E, Lindeman GJ, Visvader JE. Stem Cells and the Differentiation Hierarchy in Mammary Gland Development. *Physiological reviews*. 2020;100:523-489;(2)0
- 7 Watson CJ, Khaled WT. Mammary development in the embryo and adult: new insights into the journey of morphogenesis and commitment. *Development*. 2020;147(22).
- 8 Rios AC, Fu NY, Lindeman GJ, Visvader JE. In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature*. 2014;506(7488):322-7.
- 9 Rauner G, Barash I. Cell hierarchy and lineage commitment in the bovine mammary gland. *PloS one*. 2012;7(1):e30113.
- 10 Rauner G, Barash I. Enrichment for Repopulating Cells and Identification of Differentiation Markers in the Bovine Mammary Gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2016;21(1-2):41-9.
- 11 Kosenko A, Salame TM, Fridlander G, Barash I. Newly characterized bovine mammary stromal region with epithelial properties supports representative epithelial outgrowth development from transplanted stem cells. *Cell Tissue Res*. 2021.

- 12 Capuco AV, Ellis SE, Hale SA, Long E, Erdman RA, Zhao X, et al. Lactation persistency: insights from mammary cell proliferation studies. *Journal of animal science*. 2003;81 Suppl 3:18-31.
- 13 Capuco AV, Evock-Clover CM, Minuti A, Wood DL. In vivo expansion of the mammary stem/ progenitor cell population by xanthosine infusion. *Experimental biology and medicine*. 2009;234(4):475-82.
- 14 Rauner G, Barash I. Xanthosine administration does not affect the proportion of epithelial stem cells in bovine mammary tissue, but has a latent negative effect on cell proliferation. *Experimental cell research*. 2014;328(1):186-96.
- 15 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.
- 16 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.
- 17 Kfir SH, Barash I. Calorie restriction and rapamycin administration induce stem cell self-renewal and consequent development and production in the mammary gland. *Experimental cell research*. 2019;382(2):111477.
- 18 Lim E, Wu D, Pal B, Bouras T, Asselin-Labat ML, Vaillant F, et al. Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways. *Breast cancer research : BCR*. 2010;12(2):R21.
- 19 Woodward TL, Beal WE, Akers RM. Cell interactions in initiation of mammary epithelial proliferation by oestradiol and progesterone in prepubertal heifers. *The Journal of endocrinology*. 1993;136(1):149-57.
- 20 Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell metabolism*. 2014;19(3):373-9.
- 21 Feng Y, Chen X, Cassady K, Zou Z, Yang S, Wang Z, et al. The Role of mTOR Inhibitors in Hematologic Disease: From Bench to Bedside. *Frontiers in oncology*. 2020;10:611690.
- 22 Blagosklonny MV. Rapamycin for longevity: opinion article. *Aging*. 2019;11(19):8048-67.
- 23 Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012;149(2):274-93.
- 24 Meng D, Frank AR, Jewell JL. mTOR signaling in stem and progenitor cells. *Development*. 2018;145(1).
- 25 Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science*. 2012;335(6076):1638-43.
- 26 Jankiewicz M, Groner B, Desrivieres S. Mammalian target of rapamycin regulates the growth of mammary epithelial cells through the inhibitor of deoxyribonucleic acid binding Id1 and their functional differentiation through Id2. *Molecular endocrinology*. 2006;20(10):2369-81.
- 27 Qin Z, Zheng H, Zhou L, Ou Y, Huang B, Yan B, et al. Tsc1 deficiency impairs mammary development in mice by suppression of AKT, nuclear ERalpha, and cell-cycle-driving proteins. *Scientific reports*. 2016;6:19587.
- 28 Girardi RR, Shehata M, Gallardo M, Blasco MA, Simons BD, Stingl J. Stem and progenitor cell division kinetics during postnatal mouse mammary gland development. *Nature communications*. 2015;6:8487.
- 29 Villadsen R, Fridriksdottir AJ, Ronnov-Jessen L, Gudjonsson T, Rank F, LaBarge MA, et al. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *The Journal of cell biology*. 2007;177(1):87-101.
- 30 Dawson CA, Pal B, Vaillant F, Gandolfo LC, Liu Z, Bleriot C, et al. Tissue-resident ductal macrophages survey the mammary epithelium and facilitate tissue remodelling. *Nature cell biology*. 2020;22(5):546-58.