

סינתזה של Bovine Serum Albumin בעטין של פרת חלב

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה של

האוניברסיטה העברית בירושלים

לשם קבלת התואר – "מוסמך למדעי החקלאות"

מאת

רחל הומנס

נובמבר 2004

רחובות

חשון תשס"ה

עבודה זו נעשתה בהדרכת :

דוקטור אבי שמאי מהמנהל למחקר חקלאי, מכון וולקני, המחלקה לחקר בעלי
חיים

דוקטור סמיר מבג"ש מהפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה,
המחלקה למדעי בעלי חיים

תודתי לכל אותם אנשים שליוו אותי במהלך עבודתי :

לדרי אבי שמאי שהדריך אותי בעבודה, סייע רבות בנכונות וברצון טוב ויעץ לי מניסיונו.

לדרי סמיר מבגייש על כל המאמצים שהשקיע עבורי.

ליונתן פוירמן שעודד, תמך, יעץ ועזר לי רבות.

ולבעלי, בני, שתמך בי ועמד לצידו לאורך כל הדרך.

עמוד מס'

1 **תקציר**

1. מבוא

1.1 הקדמה

1.2 בלוטת החלב

1.3 דלקת עטין בבקר

1.4 מערך ההגנה החיסוני של בלוטת החלב

1.5 תפקידו ההגנתי של אלבומין

1.6 עמידות בלוטת החלב בפני דלקת עטין

1.7 שינוי בהרכב החלב בזמן דלקת עטין

1.8 השפעות דלקת עטין על משק הבקר לחלב

1.9 מטרות המחקר

2. חומרים ושיטות

2.1 חומרים

2.2 תמיסות ובופרים

2.3 הכנת גיל ל cDNA

2.4 הפקת RNA

2.5 קביעה כמותית של RNA

2.6 RT-PCR

2.7 Real Time RT-PCR

2.8 רקמות ותאים

2.9 תרבית רקמה

2.9.1 הכנת שתלים

2.9.2 הכנת שתלים לתרבית איבר

2.10 תרבית תאים

2.10.1 הכנת תאים לתרבית תאים

2.11 ELISA

2.11.1 Blocking

2.11.2 נוגדן ראשון

2.11.3 נוגדן שני

עמוד מס'

..... Western Blot 2.12

..... Blocking 2.12.1

..... נוגדן ראשון 2.12.2

..... נוגדן שני 2.12.3

3. תוצאות

..... 3.1 התבטאות mRNA של BSA ברקמות פריפריאליות בבקר

..... 3.2 השפעת דלקת עטין על סינתזה והפרשה של BSA בעטין של פרת חלב

..... 3.3 השפעה של ליפופוליסכריד על סינתזה והפרשה של BSA בתאי אפיתל של בלוטת החלב

..... 3.4 השפעה של ליפופוליסכריד על סינתזה של BSA בעטין של פרת חלב

..... 3.5 השפעת ליפופוליסכריד על הצטברות BSA ברקמת עטין של פרת חלב

4. דיון

..... 4.1 התבטאות mRNA של BSA ברקמות פריפריאליות בבקר

..... 4.2 סינתזה והפרשה של BSA בעטין של פרת חלב

..... 4.3 השפעת ליפופוליסכריד BSA בעטין

סיכום

רשימת ספרות

תקציר באנגלית

אלבומין הוא חלבון בגודל של 585 חומצות אמינו המסונתז בעיקר על ידי הכבד. תפקידיו של אלבומין הם רבים וכוללים בין היתר שמירה על לחץ קולואיד אוסמוטי בפלסמה, הסעה של חומרים בדם וקשירת רדיקלים חופשיים. אלבומין מהווה את אחד מחלבוני החלב במי הגבינה ובזמן דלקת עטין נמצא כי ישנה עלייה בריכוזו בחלב.

המחקר בחן את ההתבטאות של Bovine Serum Albumin (BSA) ברקמת עטין של פרת חלב וברקמות פריפריאליות נוספות בבקר. כמו כן נבדקה השפעתה של דלקת עטין על רמת ההתבטאות וההפרשה של חלבון זה ברקמת עטין.

בחינת ההתבטאות של mRNA של BSA ברקמות פריפריאליות בבקר הראתה כי BSA מתבטא ברקמות שונות בגוף. בעבודה זו נמצא כי ברקמת עטין מפרת חלב הסובלת מדלקת עטין התבטאות mRNA של BSA גבוהה פי 4 בהשוואה להתבטאות ברקמת עטין מפרת חלב בריאה. בנוסף נמצא, כי הפרשת BSA מתרבית רקמה של רקמת עטין מפרת חלב הסובלת מדלקת עטין אל תוך המדיום גבוהה פי 3.5 בהשוואה להפרשה מתרבית רקמה של רקמת עטין מפרת חלב בריאה. על מנת לוודא כי אכן הדלקת היא זו אשר גורמת לעלייה בהתבטאות ובהפרשת BSA הוסף לתרבית תאים ולתרבות רקמה ריכוזים עולים של (0-10,000 ננוגרם למ"ל) ליפופוליסכריד (LPS) אשר מהווה אנדוטוקסין של החיידק E. coli. הגורם לדלקת עטין קלינית. נמצא כי ככל שעולה ריכוז ה-LPS ישנה עלייה בהתבטאות mRNA של BSA, הביטוי של BSA גבוה פי 7 בריכוז של 10,000 ננוגרם למ"ל LPS לעומת הביקורת ללא LPS. בנוסף נמצא כי בהפרשת BSA למדיום, ישנו הבדל של כבערך 1.5 בין הפרשת BSA בריכוז של 10,000 ננוגרם למ"ל LPS לבין הפרשת BSA בביקורת ללא LPS. נמצא גם כי ככל שעולה זמן החשיפה ל-LPS כך גם עולה ביטוי BSA, לאחר 48 שעות חשיפה ל-100 ננוגרם למ"ל LPS התבטאות mRNA של BSA עולה פי 6 לעומת הביקורת. LPS לא גרם להצטברות של BSA ברקמת עטין בטווח הריכוזים 0-10,000 ננוגרם/מ"ל.

מעבודה זו עולה כי ישנה סינתזה מקומית של BSA בבלוטת החלב וכי סינתזה זו מוגברת בזמן דלקת עטין תחת השפעתו של LPS, האנדוטוקסין של החיידק E. coli. לאור התוצאות שהתקבלו במחקר זה ניתן להסיק כי ל-BSA תפקיד חשוב בזמן דלקת עטין וכי הוא מהווה חלק ממנגנון ההגנה של הגוף במהלך תקופה זו.

1.1 הקדמה

- אלבומין הינו פוליפפטיד בעל 585 חומצות אמינו ומשקל מולקולרי של ≈ 66 kDa. לחלבון מיוחסים התפקידים הפיסיולוגיים הבאים (Peters, 1985):
1. שמירה על לחץ קולואיד אוסמוטי בדם – אלבומין אחראי על 80% - 75% מתוך הלחץ האוסמוטי בדם.
 2. קשירה והסעה – באלבומין קיימים ארבעה אתרי קשירה וכל אתר בעל ספציפיות שונה לחומרים.
 3. קשירת רדיקלים חופשיים – מהווה מקור עיקרי לקבוצות סולפידריל (SH) אשר קושרות רדיקלים חופשיים.
 4. שמירה על מאזן חומצה בסיס – זהו חלבון טעון במטען שלילי ונמצא בריכוז גבוה בפלסמה. הוא תורם ל "Anion gap" במטרה לשמור על המאזן בין אניונים לקטיונים בפלסמה.
 5. מונע קרישה – מדכא השקעה של טסיות דם ומעודד דיכוי של אנטיטרומבין III על פקטור Xa, אנזים המשתתף בתהליך הקרישה. עיכוב על פקטור Xa מונע תהליך יצירת טרומבין האחראי על ייצור קריש דם. פעילות זו נובעת, כנראה, מקשירת רדיקלים של ניטריט אוקסיד (NO) אשר גורמים לתהליך פיברינוליטי ארוך יותר ובכך מעכבים את שלב הקרישה.
 6. משפיע על חדירות כלי הדם – מניחים כי לאלבומין תפקיד בהגבלת דליפה מנימות הדם, מצב הנגרם כתוצאה מעליית חדירות כלי דם בזמן עקה. אלבומין מהווה מעין שסתום למניעת דליפה, כנראה, כתוצאה ממטענו השלילי.
- אלבומין מיוצר ברובו בכבד בקצב של 12 - 9 גרם ליום, באדם, ואינו נאגר בגוף. ריכוזו בפלסמת אדם הוא 50-35 גרם לליטר. מכיוון והוא מהווה מקור עיקרי ללחץ אוסקוטי, קצב הייצור נשלט, כנראה, על ידי שינויים בלחץ קולואיד אוסמוטי ובאוסמולליות של החלל החוץ וסקולארי של הכבד. בנוסף לכך, קצב הייצור של אלבומין תלוי במצב תזונתי ובריאותי. אלבומין נמצא בריכוז גבוה בדם בתקופות של בריאות תקינה ותזונה טובה ובתקופות של תת תזונה ומחלה ריכוזו יורד. חלבון זה מתפרק באותו הקצב בו הוא נוצר ותהליך זה מתבצע על ידי פינוציטוזה בתאים הסמוכים לאנדותרל. קיימים שני הורמונים אנאבוליים אשר מווסתים את הסינתזה של אלבומין בכבד ברמת השעתוק, אינסולין וסומטורופין (Peters, 1985).
- ביטוי mRNA וסינתזה של אלבומין נמצא גם ברקמות רבות מחוץ לכבד כמו ברקמות עובריות של כליות, לבלב, ריאות ולב בחולדה, בחולדה בוגרת בכליות ובלבלב (Nahon et al., 1988), ברטינת העין בעכבר (Dodson et al., 2001), בשריר שלד של עכבר (Wagatsuma et al.,

(Varricchio et al., 2001; Wagatsuma et al., 2002 ,
(1994) ובתאי סרוזה בקנה הנשימה בבקר (Jacquot et al., 1988).
Bovine Serum Albumin (BSA) הוא אלבוּמין של בקר ומהווה את אחד מחלבוני החלב
במי גבינה. המבנה המולקולרי של BSA בחלב זהה לזה הנמצא בסרום ולכן מניחים כי BSA אינו
מסוננתו בבלוטת החלב, אלא עובר לחלב במעבר פסיבי דרך Tight Junction מהדם (De Wit,
1998).

1.2 בלוטת החלב

בלוטת החלב משמשת ביונקים כאיבר להזנת הוולד על ידי ייצור חלב והפרשתו. התאמת
בלוטת החלב לצרכים אלו נעשית על ידי גדילה והתמיינות לקראת המלטה והתנוונות לאחר
גמילת הצאצאים או לחילופין הפסקת החליבה בבקר. את התפתחות בלוטת החלב ניתן לחלק
לארבעה שלבים מחזוריים (Lamote et al., 2004):

- א. שלב הגדילה – לאחר ההמלטה ניתן למצוא אצל הוולד בלוטת חלב מושלמת
בזעיר אנפין שלאחר כשבועיים מתנוונת. עד לבגרות המינית גדילת התאים
האפיתליאליים לבלוטת חלב הינה מינימאלית ומותאמת לקצב גדילת הגוף.
הבלוטה מכילה צינוריות (ducts), terminal end buds, ולבסוף אלביאולי. גדילה
אינטנסיבית יותר של התאים האפיתליאליים מתחילה עם הגעה לבגרות מינית,
נמשכת עם ההיריון ומאופיינת בהתארכות והסתעפות מהירה של מערכת
הצינוריות.
- ב. שלב ההתמיינות – תאי הצינוריות הסופיים והאלביאולי מתמיינים לתאים
מפרישי חלב. שינויים אלה מתרחשים בסוף ההיריון ונמשכים עד לאחר
ההמלטה.
- ג. שלב הלקטציה – בתחילת שלב זה הפעילות התאית מופנית לכיוון ייצור של חלב
ואילו גדילת תאים והתרבותם מועטת למינימום או מופסקת לחלוטין. שלב זה
מתחיל זמן קצר לאחר המלטה ונמשך לאורך תקופת היניקה או החליבה.
- ד. שלב ההתנוונות – שלב זה הינו שלב גרסיה של התאים המפרישים שמוביל
לאטרופיה של הבלוטה כולה. שלב זה מתחיל עם הפסקת יניקה או חליבה. לאחר
שלב זה שהוא תקופת "היובש" בפרות, המעגל חוזר על עצמו עם כניסה להיריון.

1.3 דלקת עטין בבקר

דלקת עטין בבקר מוגדרת כדלקת של בלוטת החלב ובעלת שני סוגים עיקריים, קליני ותת
קליני אשר מתפתחת לעיתים לקליני. החיידק *Escherichia coli* (E. coli) גורם לדלקת עטין

חמורה אשר מביאה למוות או לנזק רב לרקמת בלוטת החלב. לעומת זאת, הדבקה בחיידק *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) מתחילה, בדרך כלל, כאקוטית ומתפתחת לכרונית ותת קלינית. השפעות מנוגדות אלה הן, כנראה, תוצאה של מנגנוני פתוגניות שונים של שני החיידקים הנ"ל. ההבדל העיקרי בין מנגנוני הפתוגניות שלהם הוא בהצמדות בקטריאלית. הוצע כי הצמדות זו חשובה מאד לאלימות של *S. aureus* אך לא ל *E. coli*, אשר מכפיל את עצמו במהירות במדורי החלב בין החליבות. בנוסף, *S. aureus* מבטא מספר גורמי אלימות ספציפיים, אנטיפאגוציטים וטוקסינים אשר ממלאים תפקיד חשוב באלימותו. לעומתו, *E. coli* משחרר אנדוטוקסינים, Lipopolysaccharide (LPS) protein complexes, אשר מהווים מאתחלים ראשוניים של דלקת. האנדוטוקסין LPS משרה יצירה של מתווכים דלקתיים והם אלה אשר מווסתים תגובות ביולוגיות נגד LPS (Riollet et al., 2000).

1.4 מערך ההגנה החיסוני של בלוטת החלב

סלקציה גנטית והתפתחויות טכנולוגיות גורמות לכך כי בלוטת החלב מניבה כמות חלב העולה על זו לה נזקקת פרת החלב להזין את עגלה. ניהול אינטנסיבי של בקר לחלב יכול להשפיע באופן משמעותי על מערך ההגנה של בלוטת החלב ועל יכולתה להתמודד עם דלקת עטין. חסינותה של בלוטת החלב, המוגדרת כהגנה ועמידות בפני מחלות זיהומיות, נעזרת במגוון של גורמים חיסוניים ולא חיסוניים (Sordillo et al., 2002). מערכי הגנה של בלוטת החלב ניתנים לחלוקה לשתי קטגוריות:

א. תגובת חיסון מולדת – תגובה זו מופיעה בשלבים המוקדמים של הדלקת ומערכת ההגנה שלה מורכבת ממחסום פיזיקאלי בקצה הפטמה, מקרופאגים, נויטרופילים, תאי הרג טבעיים וגורמים מסיסים.

ב. תגובת חיסון נרכשת – במידה והפתוגן מצליח בכל זאת לחדור לתוך העטין תגובה זו מתחילה לפעול. מערכת ההגנה של תגובת החיסון הנרכשת מורכבת מ Major Histocompatibility Complex (MHC) אשר מונע תגובה אוטואימונית, מקרופאגים, לימפוציטים ונוגדנים.

על מנת לספק הגנה מירבית מפני דלקת עטין על תגובת החיסון המולדת והנרכשת לעבוד בשיתוף פעולה בבלוטת החלב.

באופן כללי תגובת החיסון של בלוטת החלב מורכבת משלושה גורמי הגנה: אנטומיים, תאיים ורכיבים מסיסים. קצה הפטמה מהווה גורם הגנה אנטומי ונחשב לקו ההגנה הראשון מפני דלקת עטין, כיון שדרכו חודרים פתוגנים. הפטמה מכילה שרירי sphincter אשר שומרים על סגירה חזקה בין חליבות ומעכבים חדירה בקטריאלית. פתיחה של שרירים אלו מעלה את הסיכוי לחלות בדלקת עטין (Sordillo et al., 2002). תעלת הפטמה תחומה בחומר שעוותי הקרוי קרטין, אשר מספק מחסום פיזיקאלי בפני בקטריות על ידי עיכוב הגירתם אל תוך הציסטרנה של הבלוטה (Nickerson et al., 1987). בתוך ריפוד הקרטין נמצאים גורמים אנטימיקרוביאליים:

חומצות שומן בקטריוסטטיות וחלבונים קטיוניים אשר קושרים באופן אלקטרוסטטי פתוגנים והופכים אותם לרגישים ללחץ אוסמוטי (Hogan et al., 1987; Treece et al., 1966).

הגנה תאית מורכבת בעיקר מארבעה סוגים של תאים: נויטרופילים, מקרופאגים, לימפוציטים ותאי הרג טבעיים (Natural killer cells). הנויטרופילים הם התאים העיקריים הנמצאים ברקמת ובהפרשות בלוטת החלב בשלביו המוקדמים של תהליך הדלקת הנגרמת על ידי זיהום בקטריאלי (Paape et al., 2000). בבלוטת חלב בריאה ישנו מספר נמוך של נויטרופילים (פחות מ 10^5 תאים למ"ל), אך בזמן דלקת עטין מספרם עולה ויכולים להוות יותר מ 90% מכלל אוכלוסיית תאי הדם הלבנים בבלוטת החלב (יותר מ 10^6 תאים למ"ל). הנויטרופילים מגיעים מהדם לבלוטת החלב בתגובה למגוון מתווכים דלקתיים על מנת לבצע פאגוציטוזה ולהרוג את הפתוגנים הבקטריאליים (Persson et al., 1993). הנויטרופילים הינם בעלי השפעות בקטריוצידיים ומהווים מקור לפפטידים אנטיבקטריאליים קטנים אשר הורגים מגוון של פתוגנים הגורמים לדלקת עטין (Heyneman et al., 1990; Selsted et al., 1993). לקראת ההמלטה, מספר תפקודים של הנויטרופילים משתנים או ניוקים (Cai et al., 1994; Heyneman et al., 1990; Kehrli et al., 1989; Zecconi et al., 1994). בזמן זה מספר הנויטרופילים הלא בוגרים עולה בדם הבקר ובאותה עת מספר הנויטרופילים הבוגרים בדם ובהפרשות בלוטת החלב יורד (Kehrli et al., 1989).

המקרופאגים הינם התאים הדומיננטיים בחלב וברקמות של בלוטת חלב בריאה בתקופת לקטציה. בזמן זיהום בקטריאלי, מקרופאגים מסייעים לתגובת החיסון המולדת והנרכשת. בדומה לנויטרופילים, הפעילויות הלא ספציפיות של המקרופאגים הם פאגוציטוזה של בקטריות והריסת בקטריות על ידי פרוטאזות וחמצן פעיל. מספר המקרופאגים בבלוטת החלב נוטה להיות נמוך בזמן דלקת דבר אשר גורם לירידה בקצב הפאגוציטוזה ביחס לנויטרופילים (Niemiłowski et al., 1988). לכן, פעילותם הפאגוציטית פחות חשובה מזו של הנויטרופילים. יכולתם להפריש חומרים אשר מסייעים להגירה ולפעילות בקטריוצידיים של נויטרופילים חשובה יותר למערך ההגנה הלא ספציפי של בלוטת החלב (Kehrli et al., 1999; Persson et al., 1993; Van Kampen et al., 1997). מקרופאגים משתתפים גם בפיתוח תגובות חיסון ספציפיות דרך עיבודו והצגתו של אנטגן עבור MHC (Fitzpatrick et al., 1992; Politis et al., 1992). לקראת ההמלטה מספר המקרופאגים הוא גבוה, אך יכולתם הפאגוציטי נמוך (Waller, 2000). בנוסף, ביטוי MHC על ידי מקרופאגים לפני ההמלטה יורד, דבר אשר מביא להצגה לקויה של אנטגנים וגורם להחלשות תגובת החיסון הספציפית של לימפוציטים של בלוטת החלב (Fitzpatrick et al., 1992; Mallard et al., 1998).

תאי הרג טבעיים הינם לימפוציטים לא חיסוניים אשר מפרישים חלבונים אנטיבקטריאליים. הם הורגים בקטריות גרם-חיובי וגרם-שלילי ולכן הינם חשובים למניעת זיהום בבלוטת החלב (Shafer-Weaver et al., 1996).

הגנה על ידי גורמים מסיסים מורכבת מחמישה סוגים של גורמים כאלה: נוגדנים, מערכת המשלים, ליזוזים, לקטופרין וציטוקינים. נוגדנים הינם הגורמים המסיסים העיקריים

בתגובת החיסון הספציפית והם מיוצרים על ידי לימפוציטים מסוג B. ישנם ארבעה סוגים כללים של נוגדנים אשר מגנים על בלוטת החלב מפני בקטריות: IgG₁, IgG₂, IgA, IgM. הנוגדנים קושרים אנטיגנים ומעלים פעילות פאגוציטית או הרג של האנטיגן על ידי העלאת כמות הנויטרופילים, מקרופאגים, מערכת המשלים או על ידי הפסקת פעילותו של האנטיגן באופן ישיר. בנוסף הנוגדנים מגבירים את פיניו של האנטיגן (Mallard et al., 1998). ריכוז הנוגדנים עולה בהפרשות בלוטת החלב בזמן יצירת הקולוסטרם (החלב הראשון) ובזמן דלקת (Guidry et al., 1986). לפני ההמלטה ישנם שינויים ברמות ובפעילות של הנוגדנים אשר תורמים לירידת יעילותו של המערך החיסוני דבר המעלה את הסבירות להופעת דלקת העטין (Mallard et al., 1998).

לקטופרין הוא חלבון בקטריוסטטי המיוצר על ידי תאי אפיתל ותאי דם לבנים. חלבון זה קושר יוני ברזל חופשיים בחלב ובכך מונע גדילה של בקטריות אשר זקוקות לברזל על מנת לגדול (Goodman et al., 1991; Schanbacher et al., 1993). בבלוטת החלב של בקר בזמן לקטציה, ריכוז הלקטופרין נמוך יותר מריכוזו בזמן התנוונות ודלקת. בנוסף, הפעילות הבקטריוסטטית של לקטופרין יורדת בנוכחות ציטראט, בופר המיוצר על ידי תאי אפיתל והופך את הברזל לזמין לבקטריות (Bishop et al., 1976). לקטופרין ממלא תפקיד חשוב בהגנת בלוטת החלב בפני זיהום חיידקי, בייחוד בזמן ניוון הבלוטה (Breton-Gorius et al., 1980).

מערכת המשלים הינה מצבור של חלבונים הנמצאים בסרום ובחלב אשר משפיעים על תגובת החיסון המולדת והנרכשת. החלבונים המרכיבים את מערכת המשלים מיוצרים בעיקר על ידי תאי הכבד וברמה נמוכה יותר על ידי מונוציטים ומקרופאגים. פעולות מערכת המשלים כוללות ליזיס של בקטריות, אופסוניזציה ומשיכת מקרופאגים לאזור בו מופעלת מערכת זו (Korhonen et al., 2000). בבלוטת חלב בריאה בזמן לקטציה מוצאים ריכוז נמוך של מערכת המשלים. לעומת זאת, בקולוסטרם, בחלב דלקתי ובהפרשות בלוטת החלב בזמן התנוונות מוצאים רמות גבוהות של מערכת המשלים, שכנראה, עוברת מהדם לחלב (Riollet et al., 2000). ליזוזים הינו חלבון בקטריוצידי אשר נמצא בחלב ותפקידו לבקע פפטידוגליקנים בדופן התא של בקטריה מסוג גרם-חיובי ובמברנה החיצונית של בקטריה מסוג גרם-שלילי. בחלב של מעלי גירה ריכוז הליזוזים מאד נמוך ולכן מקנה הגנה מועטה לבלוטת החלב (Sordillo et al., 1997).

ציטוקינים הם מתווכים דלקתיים המשפיעים על פעילותיהם של תאי דם לבנים (Daley et al., 1991; Sordillo et al., 1991; Sordillo et al., 1993). הקבוצות העיקריות של הציטוקינים הם אינטרלאוקינים (IL) המיוצרים בעיקר על ידי לימפוציטים מסוג T, colony-stimulating factors (CSF) אשר מיוצרים על ידי מגוון תאים, הכוללים פיברובלסטים, תאי אנדותל, מקרופאגים ולימפוציטים מסוג T, אינטרפרונים (IFN) אשר נוצרים בתאים שונים בתגובה לדלקת ויראלית, לתוצרים בקטריאליים ולתאים גידוליים ו-tumor necrosis factors (TNF) המיוצרים על ידי מונוציטים.

לציטוקינים תפקידים רבים אשר כוללים העלאת מספרם של נויטרופילים בחלב ובדם, של תאי פלסמה, של תאים חד גרעיניים בבלוטת החלב, של תאים סומאטיים בחלב ושל תאים

פאגוציטיים, הגברת פעילותם של נויטרופילים, מקרופאגים, לימפוציטים ותאי הרג טבעיים, אתחול הגירה או הורדת הגירה של נויטרופילים לתוך אזורים דלקתיים בבלוטת החלב, נטרול השפעותיהן המעכבות של הפרשות בלוטת החלב, העלאת תגובת החיסון בשלב האקוטי והעלאת ביטוי של מולקולות הצמדות לאנדותרל (Cullor et al., 1990; Daley et al., 1993; Sordillo et al., 1991; Sordillo et al., 1995; Sordillo et al., 1997). עבודה משותפת של כל הגורמים הנ"ל מביאה לתגובת חיסון מוצלחת בזמן דלקת עטין.

1.5 תפקידו ההגנתי של אלבומין

אלבומין קושר רדיקלים חופשיים ומתפקד כאנטי אוקסידנט בזכות קבוצות הסולפידריל (SH) אשר נמצאות במבנהו (Peters, 1985). שתי דוגמאות לפעילות זו; האחת במערכת הגנה אנדוגנית הנקראת "glutathione (GSH) antioxidant system" (Bounous, 2000) והשנייה בתרבויות תאים של מקרופאגים ותאי אפיתל של צינורות הכליה (Iglesias et al., 1999). המערכת האנטי אוקסידנטית של גלוטטיון (GSH) מונעת ו/או מטפלת בנזק שנגרם לתאים על ידי תוצרים מחמצנים שנוצרים בזמן מטבוליזם של התא. מסיבה זו GSH תאי הוא בעל תפקיד חשוב במערכת ההגנה של הגוף נגד זיהום, רדיקלים חופשיים וחומרים קרצינוגניים ובנוסף הוא מאד חשוב לשפעול של תאים רבים כולל לימפוציטים מסוג T ומסוג B. קבוצת הסולפידריל שנמצאת בציסטאין היא האחראית על התכונות הכימיות של מולקולת ה-GSH, הכוללות הריסת תרכובות של חמצן פעיל, שמירתם של ויטמין C ו E, אשר גם כן בעלי פעילות אנטי אוקסידנטית, בצורתם המחוזרת וניטרול תרכובות רעילות. לכן ציסטאין היא חומצת אמינו מאד חשובה ליצירתו של מולקולת ה-GSH. אלבומין ושאר חלבונים מי הגבינה הכוללים את β לקטוגלובולין, α לקטאלבומין ולקטופרין מכילים את חומצת האמינו ציסטאין במבנם, ויכולים לתרום ציסטאין לייצור של GSH ובכך לשפר את יעילות מערכת ההגנה שלו (Bounous, 2000).

בתרבויות תאים של מקרופאגים ותאי אפיתל של צינורות הכליה אלבומין מהווה פקטור הישרדות בפני אפופטוזיס (מוות תאים). הוא קושר רדיקלים חופשיים בעזרת קבוצות הסולפידריל וההידרוקסיל שלו (Iglesias et al., 1999).

1.6 עמידות בלוטת החלב בפני דלקת עטין

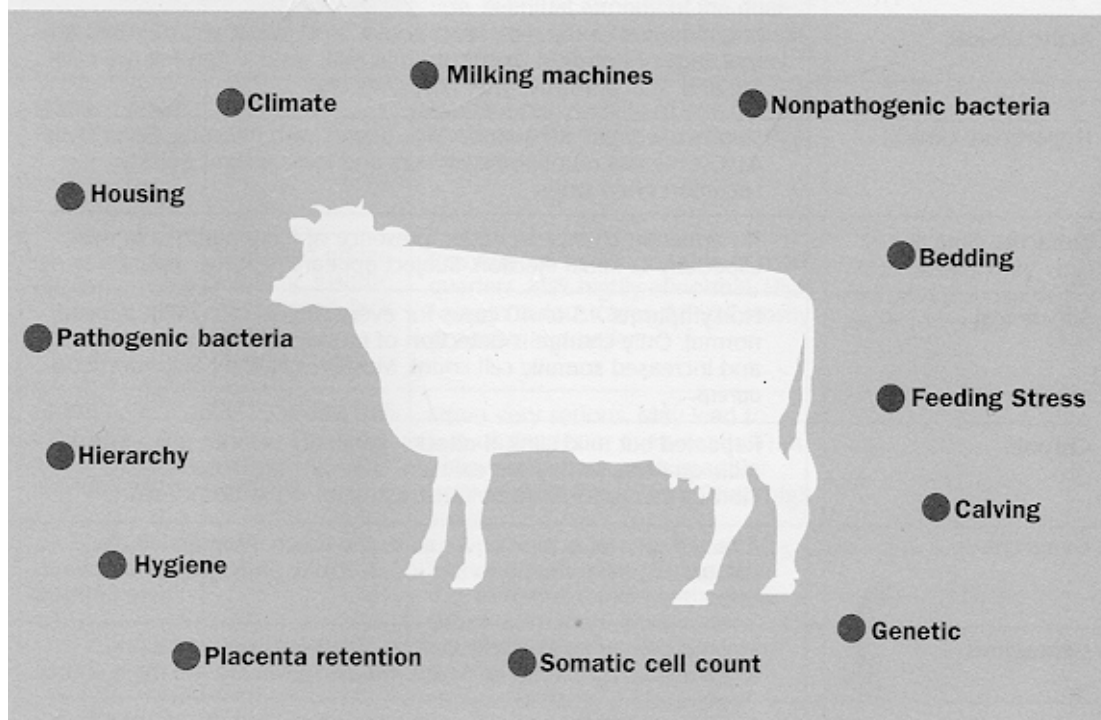
דלקת עטין מתרחשת כאשר מערכת ההגנה של בלוטת החלב נפגעת. הדלקת יכולה לגרום לנזק בלתי הפיך ברקמת הבלוטה וכתוצאה מכך לירידה תמידית בתפוקת החלב (Hogarth et al., 2004). בקר לחלב חשוף למספר רב של גורמים גנטיים, פיסיוולוגיים וסביבתיים אשר פוגעים במערך החיסוני ומגדילים את הסיכוי להופעת דלקת עטין. הדגש שהושם על סלקציה גנטית

להעלאת תפוקת החלב העלה מקרים של עקה מטבולית הקשורה לייצור ולהפרשת חלב. קיים מתאם שלילי בין תפוקת חלב לבין עמידות בפני דלקת עטין (Detilleux et al., 1995). לכן, סביר להניח כי העמידות לדלקת עטין תיפגע באוכלוסיות בקר לחלב אשר עוברות סלקציה לשיפור תפוקת החלב. חליבה באמצעות מכונות חליבה עלולה לגרום לטראומה ברקמות שבקצה הפטמה, דבר אשר מעודד התיישבות של אורגניזמים הגורמים לדלקת עטין. ריתוק מוחלט לרפת, צפיפות גבוהה של הפרות ושימוש בחומרי ריפוד אשר מעודדים גדילה בקטריאלית הם בעלי השפעה על רגישות בקר לחלב לדלקת עטין בכך שהם מכניעים את מנגנוני ההגנה המקומיים החשובים (Sordillo et al., 2002). אולם, אחד הגורמים העיקריים המשפיעים על יכולות מנגנוני ההגנה של בלוטת החלב הוא תקופת המעבר מלקטציה להתנוונות ומהתנוונות לתחילת לקטציה (Kehrli et al., 1989; Mallard et al., 1998; Shafer-Weaver et al., 1996).

זיהומים אשר מתפתחים בתחילת התנוונות הבלוטה, בדרך כלל, נמשכים לאורך תקופת היובש ומתפתחים לדלקת עטין קלינית בתקופת הלקטציה העוקבת, בייחוד בתחילתה. לא ברור מדוע בלוטת החלב רגישה לדלקת עטין בתחילת תקופת ההתנוונות. כמו שצוין קודם, פרות אשר מייצרות כמויות גדולות של חלב בלקטציה המאוחרת הינן רגישות יותר לדלקת עטין לעומת פרות אשר מייצרות כמויות מינימאליות. הפסקת חליבה בסוף שלב הלקטציה מביאה לעליית לחץ בתוך בלוטת החלב, דבר אשר עלול לגרום לנזילת חלב מהבלוטה ולעליה בחזרת בקטריות דרך הפטמה. בנוסף, הפרשות בלוטת החלב בזמן תפוקת חלב גבוהה בלקטציה מאוחרת עלולות להכיל ריכוזים נמוכים של גורמי הגנה טבעיים כמו תאים פאגוציטיים, לקטופרין ונוגדנים, אשר תפקידם לספק עמידות בפני דלקת עטין. לכן, עודף של נוזל בעטין בתחילת שלב ההתנוונות יכול לספק מדיום מצוין לגדילה בקטריאלית (Bushe et al., 1987). בבלוטת חלב מנוונת לגמרי ישנה עמידות בפני דלקת עטין ולקראת המלטה עמידות זו יורדת. בעטין מנוון לגמרי ניתן למצוא ריכוזים גבוהים של גורמי ההגנה הטבעיים ולקראת ההמלטה ישנה ירידה ביכולת החיסונית של בלוטת החלב (Kehrli et al., 1994; Sordillo et al., 1987).

שינויים במערכת החיסון בבקר לחלב אשר תורמים לירידה בכושר החיסוני מתחילים כשלושה שבועות לפני ההמלטה, מקסימאליים בהמלטה, ונמשכים כשלושה שבועות לאחר ההמלטה. כמו שנוכח בסעיף 1.4 פעילות הנויטרופילים ניזוקה לקראת ההמלטה דבר אשר תורם לעליית הסיכוי לחלות בדלקת עטין (Cai et al., 1994; Heyneman et al., 1990; Kehrli et al., 1989; Zecconi et al., 1994). בנוסף מוצאים ירידה ברמת הנוגדנים ובתגובתיות של לימפוציטים בתקופת ההמלטה (Mallard et al., 1998). שינויים אלה במרכיבי מערכת החיסון מגבירים את רגישות בלוטת החלב בפני דלקת עטין. תמונה 1 מסכמת את הגורמים אשר משפיעים על הסיכוי לחלות בדלקת עטין.

Figure 1. Factors influencing the incidence of mastitis.



תמונה 1: תאור המרכיבים אשר משפיעים על הסיכוי לחלות בדלקת עטין: מכוונות חליבה, בקטריות, ריפוד, עקה, תחלובה, גנטיקה, רמת תאים סומאטיים, היגיינה, מעמד ברפת ואקלים.

1.7 שינוי בהרכב החלב בזמן דלקת עטין

בזמן דלקת עטין ניתן למצוא מספר שינויים בהרכב החלב הכוללים, עליה במספר תאים סומאטיים ועליה בריכוז BSA בחלב. תאים סומאטיים מכילים סוגים רבים של תאים, כולל נייטרופילים, מקרופאגים, לימפוציטים ומגוון סוגים של תאי אפיתל של בלוטת החלב. בבלוטת חלב בריאה, רוב התאים הסומאטיים הם מקרופאגים ולימפוציטים ורמה נמוכה יותר של נייטרופילים ותאי אפיתל. כאשר בלוטת החלב נפגעת על ידי זיהום מיקרוביאלי, מספר התאים עולה. המעבר מהפרשת חלב בריאה בעלת מספר תאים סומאטיים נמוך להפרשה קלינית המכילה מספר גבוה של תאים סומאטיים לוקח רק מספר שעות ומהווה חלק מתגובת מנגנון ההגנה של בלוטת החלב (Kehrli et al., 1994).

העליה בריכוז BSA מוסברת על ידי עליה בחדירות מבנה הקרוי Tight Junction (TJ) ה - Tight Junction יושבים סביב התאים האפיתליאלים ומפרידים בין החלב לבין הדם של בלוטת החלב. בתקופת לקטציה, כאשר הצינוריות והאלבאולי מלאים בחלב, TJ – ניצבים בין שני סביבות שונות לגמרי: סביבה אחת היא של החלב, אשר מכיל לקטוז, חלבוני חלב ונתרן וכלור בריכוזים נמוכים, וסביבה שניה של נוזל הדם אשר מכיל חלבוני פלסמה

וריקוזים גבוהים של נתרן וכלור. על מנת למנוע מעבר חומרים בין שני הנוזלים הנ"ל על ה-TJ להיות אטום. בזמן לקטציה ה-TJ מהווה מחסום בלתי חדיר בין החלב לדם והינו בעל פוטנציאל אנרגטי גבוה, ובזמן התנוונות בלוטת החלב ובדלקת עטין המחסום האפיתליאלי נהפך לחדיר וישנה ירידה בפוטנציאל האנרגטי שלו. השינוי בפוטנציאל האנרגטי נובע משינוי בריכוזי יונים בחלב, בזמן דלקת עטין מוצאים בחלב עליה בריכוזי היונים נתרן וכלור דבר אשר מעלה את מוליכותו. ישנם שני גורמים עיקריים המביאים לעליה בחדירות ה-TJ. הגורם הראשון הוא תוצרי מערכת החיסון הכוללים את היסטאמין, TNF ואינטרפרון γ . נמצא כי תוצרים אלה מעלים את חדירותו של ה-TJ על מנת שמרכיבי מערכת החיסון יוכלו להגיע לאזור הזיהום. הגורם השני הוא הרס רקמתי המתרחש במהלך דלקת עטין. נזק תאי שכזה עלול לגרום ליצירת "חורים" באפיתל של בלוטת החלב דבר אשר עלול להוביל לשינויים בהרכב החלב אשר מורידים את הפוטנציאל האנרגטי ומביאים לפתיחת ה-TJ (Nguyen et al., 1998).

שינויים נוספים בהרכב החלב בזמן דלקת עטין הם ירידה בריכוזיהם של קזאין, לקטוז ושומן וכמו שנזכר עליה בריכוזיהם של נתרן, כלור. השינוי הזה במרכיבי החלב נובע גם כן מעליה בחדירות ה-TJ אשר מאפשר דליפה של אלמנטים מהסרום לתוך החלב של עטין מודלק (Fox et al., 1981).

1.8 השפעות דלקת עטין על משק הבקר לחלב

דלקת עטין היא הגורם העיקרי למוות בפרות לחלב בוגרות. זוהי המחלה החשובה ביותר בבקר לחלב מבחינה כלכלית. קשה להעריך את ההפסדים הקשורים לדלקת עטין קלינית, אשר נגרמים מעלויות טיפול, הפרדה מהעדר, מוות וירידה בתפוקת חלב. קשה אף יותר לכמת את ההפסדים שנובעים מדלקת עטין תת קלינית, הפסדים אשר עולים כתוצאה מטיפול, ירידה בתפוקת חלב, ירידה באיכות מרכיבי החלב ועליה באפשרות של הפרדה מהעדר. בנוסף להפסדים שצוינו לעיל, דלקת עטין קלינית ותת קלינית משפיעות על פוריות הפרה בהמשך חייה. פוריות גבוהה של פרות החלב חשובה לשמירה על תפוקת חלב גבוהה. ירידה בפוריות כתוצאה מדלקת עטין באה לידי ביטוי בכך שישנה עליה במרווח בין המלטות, ירידה בכושר התעברות ועליה בסיכוי למות עובר (Santos et al., 2004). היבט חשוב נוסף, מעבר להיבט הכלכלי, בנוגע לדלקת עטין, הינו בריאות הציבור. שימוש נרחב באנטיביוטיקות בטיפול ובמניעה של דלקת עטין הנו בעל השפעה על בריאות האדם. הסיכון לאדם הוא בכך שבקטריות יפתחו עמידות בפני האנטיביוטיקה ויחדרו לאדם דרך המזון. הסיכוי להתפשטות של אורגניזמים שמקורם מבעלי חיים דרך החלב, אף על נדירותו בגלל פסטור, מהווה סיכון בייחוד בחתכי שיווק של מוצרי חלב לא מפוסטרים וכאשר ישנם תהליכי פסטור לא מוצלחים (Bradley, 2002). לשימוש באנטיביוטיקות יש גם השפעה כלכלית שלילית בגלל ההוצאה הכספית על טיפול אנטיביוטי שלעיתים אינו יעיל (Pyorala, 2002).

1.9 מטרות המחקר

מטרות המחקר בעבודה זו הן:

- בדיקת סינתזה מקומית של BSA ברקמת עטין של פרת חלב.
- בדיקת ביטוי mRNA של BSA ברקמות שונות בבקר.
- בדיקת השפעת דלקת עטין על סינתזה והפרשה של BSA ברקמת עטין של פרת חלב.

2. חומרים ושיטות:

2.1 חומרים:

- Mouse , Bovine Serum Albumin, Guanidium Thiocyanate , Ethidium Bromide
Goat Anti-Mouse IgG Peroxidase , Monoclonal Anti-Bovine Serum Albumin
, Insulin , Lipopolysaccharide from E.coli (0111: B4G) , Conjugate
, Polyvinylpyrrolidone, Cortisol , Hyaluronidase (type 1-S; 300 U/mg)
, 2',2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
Sodium Orthovanadate , Aprotinin , Nonidet P-40 , Gelatin Blocking Buffer
Ethylene glycol-bis(2-aminethylether)- , Tris hydrochloride , (Na₂VO₃)
Phenylmethanesulfonyl fluoride , NaF , N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)
- ו Bromophenol blue , Glycerol , Sodium dodecyl sulfate (SDS) , (PMSF)
Sigma, St. Louis, Mo. USA. נרכשו מחברת , Ponceau staining solution
- פלטות ל Elisa - Immuno plate F96 maxisorp , נרכשו מחברת NUNC, Denmark
- DMEM/F-12 (HAM) 1:1 without , M-199 Earle's Salts Base with L-Glutamin
, Streptomycin , Penicillin , L – Glutamine , Fetal Calf Serum , L-Glutamin
Fungizone (amphotericin B) – ו Acrylamide/bis-acrylamde 29:1 נרכשו מחברת
תעשיות ביולוגיות ישראל בית העמק בע"מ
- Worthington Biochemical נרכש מחברת , Collagenase (type II; 135 U/mg)
Corp., Freehold, NY, USA

- מסנני Nitex, נרכשו מחברת Tetko Co., Elmsford, NY, USA
- אגר נרכש מחברת Difco laboratories, Detroit, MI, USA
- תערובת של נוקלאוטידים ל RT-PCR ו AMV Reverse Transcriptase נרכשו מחברת Promega, USA
- RNA Later נרכש מחברת Ambion inc., Austin, TX. USA
- כלורופורם, איזופרופנול, ביופנול, 2 Mercaptoethanol, נרכשו מחברת Bio Lab LTD. ירושלים, ישראל
- אמילאלכוהול נרכש מחברת May and Baker LTD., Dagenham, England
- Eurogentec נרכש מחברת qPCRTM Mastermix for SYBR[®] Green
- SuperSignal[®] West Pico chemiluminescent substrate - ו BCA protein assay kit נרכשו מחברת Pierce Inc., Rockford, Illinois, for detection of HRP
- ממברנות ניטרוצלולוז מסוג HybondTM ECLTM נרכשו מחברת Amersham Pharmacia biotech UK LTD., Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire England

2.2 תמיסות ובופרים:

התמיסות TAE X 50 ו PBS-T הוכנו לפי (Sambrook et al, 1989). בופרים ותמיסות להפקת RNA הוכנו לפי (Chomczynski, 1987).

2.3 הכנת ג'ל ל cDNA :

אגרוז 0.8-1% (w/v)

TAE 1x (v/v)

אתידיום ברומיד 0.8µg/ml

2.4 הפקת RNA :

הפקת RNA נעשתה לפי (Chomczynski, 1987). 0.5 גרם של רקמה הוכנסו לתוך 5 מ"ל תמיסת הפקה ונטחנה במהמגן תוך כדי קירור בקרח למשך 60 שניות. לתמיסה המהומגנת הוסף :

0.1 נפח 2M סודיום אצטאט

1 נפח פנול 4 pH

0.2 נפח כלורופורם-איזואמילאלכוהול

המבחנות עורבבו והודגרו על קרח למשך 15 דקות. בתום ההדגרה המבחנות סורכזו למשך 15 דקות ב $10,000 \times g$. בתום הסרכוז הופרדה הפאזה המימית ואליה הוסף נפח 1 של איזופרופנול. המבחנות הודגרו למשך 60 דקות בטמפרטורה של -20°C ולאחריהן סורכזו למשך 20 דקות ב $10,000 \times g$. בתום הסרכוז הורחקה הפאזה המימית והתקבל פלט של RNA אשר נשטף פעמיים באתנול 75%. לאחר השטיפה באתנול הפלט הורחף ב ddH₂O מטופלים ב - DEPC.

2.5 קביעה כמותית של RNA :

פלטי ה - RNA הורחפו ב ddH₂O מטופלים ב - DEPC ומהתמיסה נלקחה דגימה לקביעת ריכוז כלל ה - RNA. הצפיפות האופטית (O.D.) של הדגימות המהולות נקבעה באורך גל של 260nm. ריכוז ה-RNA חושב לפי הנוסחה :

$$\text{O.D.} \times 40 \times \text{dilution} = \text{RNA} \mu\text{g/ml}$$

יחידה אחת של O.D. שקולה ל 40 µg/ml של Total RNA.

:RT-PCR 2.6

cDNA הוכן מ 2 מיקרוגרם של RNA כללי שהופק מרקמות או תאי המטרה על ידי הדגרה עם אנזים AMV Reverse Transcriptase עם בופר שסופק עם האנזים (Reverse Transcription Buffer), 0.5 mM dNTP's, 0.5 mM Oligo (dT)₁₅ Primer, בנפח סופי של 20 מיקרוליטר למשך 60 דקות בטמפרטורה של 42 °C. תוצר ה- RT-PCR נמהל ל 100 מיקרוליטר.

ריאקציות ההגברה כללו את המרכיבים הבאים: פרימרים ספציפיים בריכוז של 0.4 μM, 1 יחידה של TAQ Polymerase, בופר PCR (10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM dNTP's, 20 mM Tris-HCl pH 8). הנפחים הושלמו ל 50-100 מיקרוליטר לפי הצורך.

תנאי הריאקציות ה- PCR היו כדלהלן: 2 דקות ב 94°C, 15-35 מחזורים של הגברה: 30 שניות ב 94°C, 30 שניות ב 46-56°C תלוי ב Tm של הפרימרים בהם השתמשנו ו 30 שניות ב 72°C. בתום המחזור האחרון הודגרו המבחנות לשלב נוסף של 7 דקות ב 72 °C. על מנת לוודא כי נבחנה כמות שווה של RNA, cDNA נבדק בשיטת RT-PCR למציאת ביטוי mRNA של גן המתבטא באופן קבוע בכל הרקמות, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

תוצרי ההגברה הופרדו על ידי אלקטרופורוזה על גבי ג'ל 1% של אגרוז. גודל התוצר הצפוי היה: 501 bp, BSA; 850 bp, GAPDH. הפרימרים בהם השתמשנו במהלך העבודה:

Albumin sense 5' TTC CTT CGT GAA ACC TAT GG 3'

Albumin anti sense 5' GCA GCA TTC CTT GTG GAC TT 3'

GAPDH sense 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3'

GAPDH anti sense 5' TGT TCC AGT ATG ATT CCA CCC 3'

:Real Time RT-PCR 2.7

ב Real Time RT-PCR נעשה שימוש בערכת qPCRTM Mastermix for SYBR[®] Green ובפרוטוקול על מנת להכין את הדוגמאות השונות לנפח סופי של 20 מיקרוליטר: 2 יחידות של Reaction buffer, פרימרים ספציפיים בריכוז של 100 pM, SYBR[®] green I stock מהול 1:2000 cDNA.

תנאי ריאקציה ה-PCR היו כדלהלן: 40 מחזורים של הגברה: דקה של 95°C, 2 דקות של 60°C ודקה של 72°C.

האנליזה נעשתה בשיטת $\Delta\Delta C_T$:

1. חושב ממוצע ה- C_T (מס' מחזורי ההגברה עד להתחלת השלב הליניארי של ה-PCR). לכל טיפול היו 3 חזרות.

2. יחוס רמת הביטוי של הגן הנבדק מול רמת הביטוי של GAPDH או 18S.

$$\Delta C_T = C_{T \text{ examinee gene}} - C_{T \text{ housekeeping gene}}$$

3. יחוס רמת הביטוי של הגן הנבדק ביחס לרקמת טיפול המקור

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Treated gene}} - \Delta C_{T \text{ examinee gene}}$$

4. תרגום תוצאות $\Delta\Delta C_T$ לרמת ביטוי- $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

העבודה נעשתה עם פרימרים בגודל 100 bp.

הפרימרים בהם השתמשנו במהלך העבודה:

Albumin sense 5' AGG GAG GTC TGG GCT ATC ATC 3'

Albumin anti sense 5' TTC GTG AAA CCT ATG GTG ACA TG 3'

GAPDH sense 5' TTG ACT GTG CCG TTG AAC TTG 3'

GAPDH anti sense 5' TTC TGG CAA AGT GGA CAT CGT 3'

18S sense 5' CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA 3'

18S anti sense 5' GGG CCT CGA AAG AGT CCT GT 3'

2.8 רקמות ותאים:

רקמות עטין, כבד ורקמות פריפריאליות נוספות נלקחו מפרות מזן Holstein מיד לאחר שחיטה בבית המטבחיים. לאחר הפרדת הרקמה מבעל החיים הוכנסו הרקמות למדיום או ל RNA Later והובאו למעבדה. הפרות לניסוי נבחרו בהתאם למצבם הגופני ושלב הזמן במחזור היצרנות שלהן.

2.9 תרבית רקמה:

הרקמות נלקחו מבית מטבחיים מרקמת עטין של פרת חלב בריאה בלקטציה, פרת חלב הסובלת מדלקת עטין ופרת חלב בריאה בתקופת יובש. הרקמות נשמרו במדיום מתאים או ב-RNA Later.

2.9.1 הכנת שתלים

רקמת עטין מפרות בשלבים פיסיולוגיים ו/או בריאותיים שונים שימשה להכנת שתלים. אזור רקמת העטין חוטא עם אלכוהול 70% ובעזרת סקלפל נחתכו באופן סטרילי חתיכות של רקמה בנות 3-5 גרם. החתיכות הללו הוכנסו למדיום שהכיל אינסולין (1 $\mu\text{g} / \text{ml}$) אנטיביוטיקה וקורטיזול והובאו למעבדה.

2.9.2 הכנת שתלים לתרבית איבר

הרקמה נחתכה ב Laminar air flow hood לפיסות של 2-5 מיליגרם לאחר שהורחקה ממנה מרבית רקמת השומן. השתלים נשטפו מס' פעמים במדיום M-199 והונחו על גבי נייר עדשות שעבר אימפרגנציה בסיליקון וצף על פני המדיום בצלחת פטרי מאווררת. השתלים שבצלחת הוכנסו לאינקובטור בטמפרטורה של 37°C ובאווירה של אויר: פחמן דו חמצני ביחס 5:95. המדיום שבכל צלחת הכיל את הטיפול ההורמונלי המתאים או ריכוזים משתנים של LPS. המדיום הוחלף כל 24 שעות.

2.10 תרבית תאים:

הרקמות להכנת התאים הובאו מבית המטבחיים מפרות בריאות בשלב הלקטציה. במדיום שהכיל אינסולין 1 מקי'ג/מ"ל ואנטיביוטיקה.

2.10.1 הכנת התאים לתרבית תאים:

רקמת עטין הובאה למעבדה מבית המטבחיים, נחתכה לחתיכות קטנות והונחה בבקבוק ארלנמאייר של 500 מ"ל במדיום M-199. למדיום זה הוסף קולאגנו (1 mg/ml), היאלורונידאז

(1 mg/ml) ואינסולין של בקר (1 µg/ml) ביחס של 10 מ"ל מדיום/ 1 גרם רקמה. הבקבוק עורבב באמבט מים גיראטורי ב 100 rpm ב 37°C במשך 3-4 שעות. במשך הזמן הזה חתיכות של רקמה עברו הפרדה נוספת על ידי מעבר מקרי דרך פיפטה של 10 מ"ל בעל פתח גדול. שעה לפני גמר העיכול האנזימטי, הוסף תמצית של 0.5 מ"ל 0.04% DNase /100 מ"ל. בתום האינקובציה, התרחיף הועבר דרך מסנן Nitrex (200 µm) והתאים נשטפו שלוש עד חמש פעמים במדיום M-199. התאים גודלו במדיום 1:1 DMEM F-12 (HAM) אשר הוסף לו 10% fetal calf serum (FCS), 1 מק"ג"מ"ל אינסולין, 10,000 יחידות פניצילין, 10 מיליגרם סטרפטומיציין, 0.025 מיליגרם פונגזון ו 0.5 מיליגרם של L-glutamine/ml באווירה של אויר: פחמן דו חמצני ביחס 5:95 בטמפרטורה של 37°C. המדיום הוחלף כל 48 שעות עד לתחילת הניסוי. מהתחלת הניסוי הצלחות הכילו מדיום ללא FCS ועם ריכוזים משתנים של LPS.

ELISA 2.11:

בשיטת ELISA נבדק מדיום אשר נאסף מתרבית רקמה של שתלי רקמת עטין מפרת חלב בריאה בלקטציה, פרת חלב הסובלת מדלקת עטין ופרת חלב בריאה בתקופת יובש ומדיום אשר נאסף מתרבית תאים של תאי בלוטת חלב. ה- ELISA ל- BSA נעשה ב Immuno plates עם 96 בארות בכל פלטה. 100 מיקרוגרם תמיסת ציפוי (10 µg/ml of BSA in 0.1 M carbonate buffer pH 9.6) הוסף לכל באר. הפלטה הוכנסה לאינקובציה ב- 37°C למשך שתיים ולאחר מכן הועברה לאינקובציה ב- 4°C במשך 24 שעות. בתום האינקובציה נשטפה הפלטה שלוש פעמים בבופר PBS-T.

Blocking 2.11.1

מטרתו לחסום קשירה לא ספציפית של הנוגדן. הוסף לפלטה 200 מיקרוליטר של תמיסת חסימה, ELISA diluent (polyvinylpyrrolidone 0.1% שהוכן ב- PBS-T). הפלטה הוכנסה לאינקובציה נוספת ב- 37°C למשך 24 שעות.

2.11.2 נוגדן ראשון

פלטה נוספת הוכנה עם עקומת סטנדרט ובה 100 מיקרוליטר נוגדן ראשוני ל BSA, Mouse Monoclonal Anti-Bovine Serum Albumin במיהול עבודה של 1:8000, עם 100 מיקרוליטר

תמיסת BSA במיהולים שונים בתחום בין 0-1600 ננוגרם למ"ל. בנוסף, לפלטה זו הוכנסו דוגמאות המדיום הנבדקות וגם להן הוסף נוגדן ראשון ל - BSA. פלטה זו הוכנסה גם כן לאינקובציה ב - 37°C למשך 24 שעות.

2.11.3 נוגדן שניוני

לאחר האינקובציה ב - 37 °C הוצאו הפלטות, הפלטה הראשונה בה נמצאת תמיסת החסימה נשטפה שלוש פעמים ב- PBS-T. 100 מיקרוליטר מכל באר מהפלטה שבה נמצאות הדוגמאות ועקומת הסטנדרט הועברו לפלטה הראשונה. פלטה זו הוכנסה לאינקובציה ב - 37°C למשך שעה וחצי. לאחר האינקובציה הוסף לבאות 100 מיקרוליטר נוגדן שניוני Goat anti-mouse IgG peroxidase conjugate במיהול עבודה של 1:2500 והפלטה הונחה לאינקובציה ב - 37°C למשך שעה וחצי.

לאחר האינקובציה הפלטה נשטפה שלוש פעמים בבופר PBS-T. לכל באר הוספו 100 מיקרוליטר azino -diethylbenzothiazoline - 2'2' - 0.1% בבופר סובסטרט (Citrate-Phosphate pH 4) המכיל 0.003% Peroxide.

עוצמת הצבע שהתפתח נקראה באורך גל 405nm. התוצאות בוטאו בננוגרם BSA למיליגרם רקמה או בננוגרם BSA לצלחת של 100 מ"מ.

Western Blot 2.12

חלבון משתלי רקמת עטין מפרת חלב בריאה הופק על ידי בופר תמס (ליזיס) אשר הכיל 50 mM 1 mM , 2 mM NaF , 1 mM EGTA , 1% Non-idet P-40 , 150 mM NaCl , Tris pH 7.4 1 mM PMSF , Na₃VO₄ ו 1 מ"מ אפרוטינין.

ריכוז החלבון נמדד בעזרת BCA protein assay kit. החלבון שהופק נמהל טרם ההרצה ביחס של 1:1 ב- 2 x sample buffer אשר הכיל 0.125 M Tris-HCl pH 6.8 , 4% SDS , 10% גליצרול, 5% - 2 מרקפטואנתול ו 0.02% ברומופנוול בלו. הדוגמאות הורתחו למשך 2 דקות ב - 94°C ועם סיום ההרתחה הועברו מיד לקרח.

הדוגמאות הורצו על גבי ג'ל אקרילאמיד בריכוז של 15% למשך 4 שעות במתח של 80v. על הגילים הוטענה כמות שווה של חלבון בכל נתיב. לשם קביעת גודלם של החלבונים, השתמשנו בסמן לגודל חלבון Rainbow Ladder מחברת סיגמה. בגמר ההרצה על הג'ל בוצעה העברה על גבי ממברנת ניטרוצלולוז בעזרת אלקטרופורוזה למשך שעתיים. לצורך בדיקת איכות העברה לממברנה היא נצבעה בריאגנט Ponceau אשר צובע באדום את כל החלבונים שעל גבי הממברנה.

Blocking 2.12.1

מטרתו למנוע קשירה לא ספציפית של הנוגדן. הממברנה טולטלה למשך הלילה בתמיסת ג'לטין בטמפרטורה של 4°C.

2.12.2 נוגדן ראשון

השתמשנו בנוגדן ל – BSA, Mouse Monoclonal Anti-Bovine Serum Albumin במיהול עבודה של 1:2000. 10 מיקרוליטר של נוגדן נמהלו בנפח סופי של 20 מ"ל ב PBS-T. הממברנה טולטלה עם הנוגדן למשך שעה.

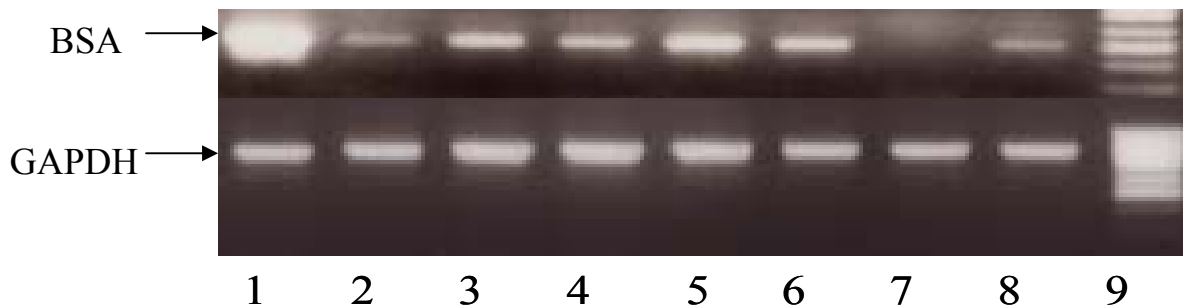
2.12.3 נוגדן שניוני

בתום 3 שטיפות בנות 10 דקות כל אחת עם PBS-T, הוסף נוגדן שניוני Goat Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate במיהול עבודה של 1:2500. כעבור שעה נשטפה הממברנה בשנית, 3 שטיפות בנות 10 דקות כל אחת.

בשלב האחרון הוסף לממברנה החומר ECL (Enhanced Chemiluminescent) מתוך ערכת ECL SuperSignal^R West Pico chemiluminescent substrate for detection of HRP מגיב עם HRP (Horseradish Peroxidase) הקשור לזנב הנוגדן השניוני וכתוצאה מכך משתחררים פוטונים המתורגמים לתמונה. הממברנה נחשפה במכשיר צילום גילים ImageMaster VDS-CL (מחברת רניום) למשך 5 שניות.

3.1 התבטאות mRNA של BSA ברקמות פריפריאליות בבקר

RNA כללי שהופק מרקמות פריפריאליות ומרקמת כבד של פרות (סעיף 2.5) שימש כתבנית לריאקציה RT-PCR (סעיף 2.6). משימוש בפריימרים ספציפיים לגן BSA התקבל תוצר יחיד בגודל צפוי של 501 bp מהכבד ומרוב הרקמות הפריפריאליות (מסלול 1 עד 6 ומסלול 8). פריימרים ל GAPDH שימשו להערכת הכמות והאיכות של RNA ובכל הקבוצות התקבל תוצר בגודל של 850 bp, תמונה 2. נמצא כי ישנו ביטוי של BSA ברקמות נוספות בגוף בנוסף לביטוי בכבד.



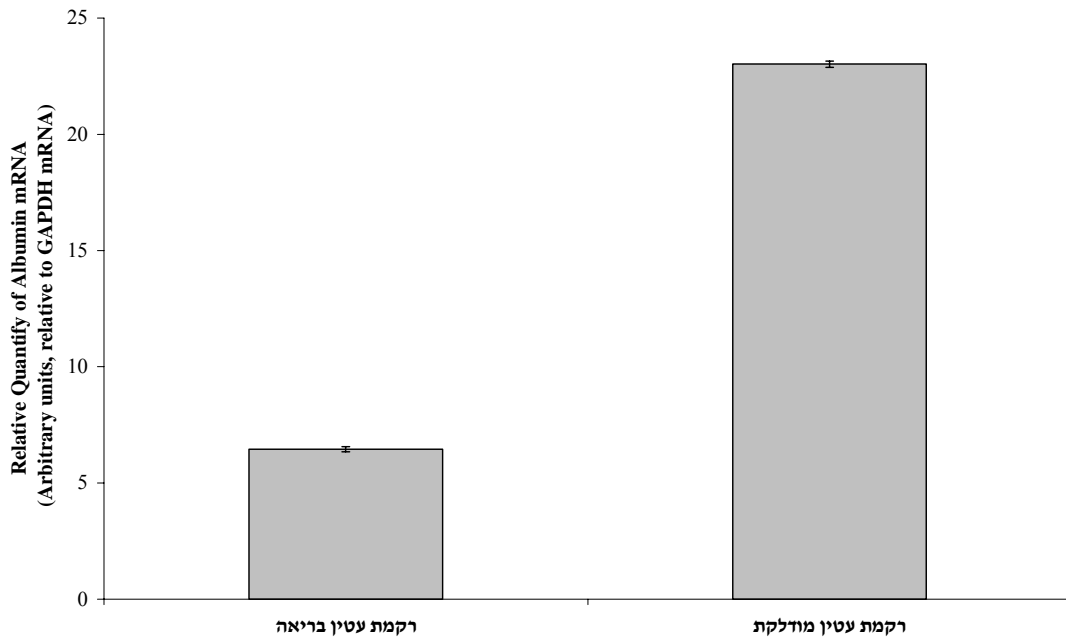
תמונה 2: ביטוי BSA ברקמות פריפריאליות בבקר.

ביטוי BSA ברקמות השונות נבדק בשיטת RT-PCR (סעיף 2.7). הרקמות נבדקות הן: 1. כבד 2. עטין 3. לשון 4. מעי 5. לימפה 6. אשך 7. שחלה 8. רחם 9. סמך של 100 bp. נבדק גם הביטוי של הגן GAPDH משמש ביקורת לאיכות וכמות ה-RNA. ניתן לראות כי ישנו ביטוי של BSA ברקמות פריפריאליות של בקר, למעט ברקמת השחלה, בנוסף לביטוי שנמצא ברקמת כבד.

3.2 השפעת דלקת עטין על סינתזה והפרשה של BSA בעטין של פרת חלב

רקמת עטין בריאה ומודלקת מפרות חלב הובאו מבית המטבחיים ומהם הוכנו שתלים לתרבית רקמה (סעיף 2.9.2). ביטוי mRNA של BSA ברקמות העטין נמדד בשיטת Real Time RT-PCR (סעיף 2.7).

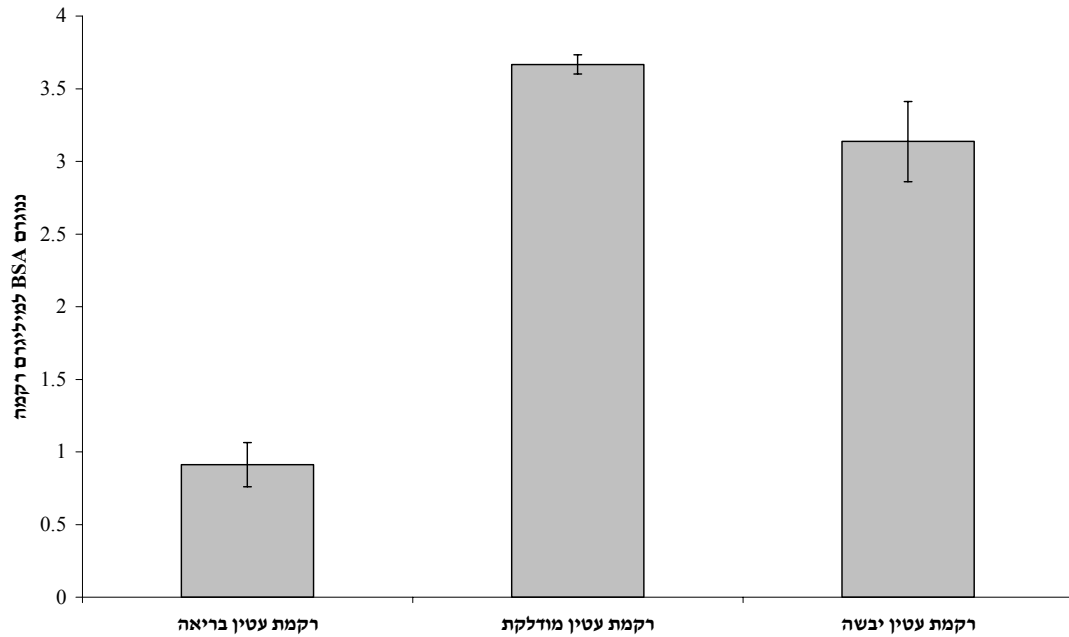
נמצא כי ביטוי mRNA של BSA הוא בקירוב גבוה פי 4 ברקמת עטין מפרת חלב הסובלת מדלקת עטין לעומת הביטוי ברקמת עטין מפרת חלב בריאה, גרף 1.



גרף 1: ביטוי mRNA של BSA ברקמת עטין מפרת חלב בריאה ומפרת חלב הסובלת מדלקת עטין.

התבטאות BSA נמדדה בשיטת Real Time RT-PCR (סעיף 2.7) וניתן לראות מגרף מס' 1 כי ישנו ביטוי BSA גבוה יותר ברקמת עטין מודלקת לעומת רקמת עטין בריאה. התוצאות הן ממוצע \pm שגיאת תקן ($n = 3$) (n – מספר החזרות).

שתלי עטין מפרת חלב בריאה, יבשה וסובלת מדלקת עטין הוחזקו שלושה ימים במדיום (סעיף 2.9.2). הפרשת BSA למדיום על ידי השתלים נבדקה בעזרת ELISA (סעיף 2.11). הפרשת BSA למדיום הייתה גבוהה פי 3.5 בשתלי עטין מודלק ופי שלוש בשתלי עטין יבש לעומת ההפרשה של שתלים מעטין בריא, גרף 2.

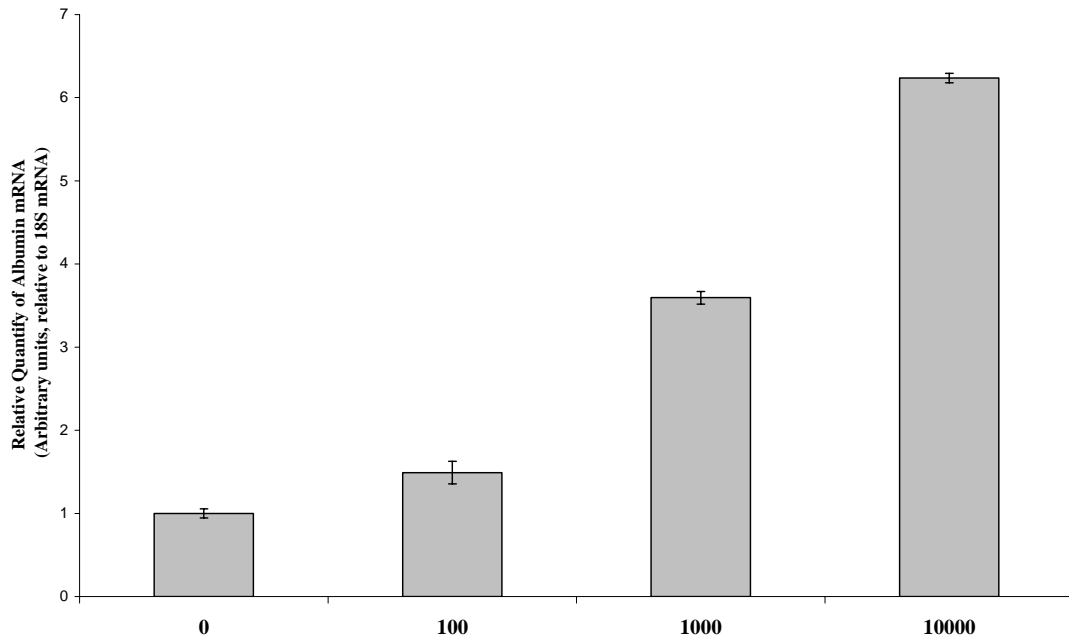


גרף 2: הפרשת BSA משתלי רקמת עטין מפרת חלב בריאה, פרת חלב הסובלת מדלקת עטין ופרת חלב בריאה בתקופת היובש.

הפרשת BSA למדיום מרקמות העטין השונות נמדדה בשיטת ELISA (סעיף 2.11) וניתן לראות מגרף 2 כי רקמת עטין מודלקת ורקמת עטין יבשה הפרישו יותר BSA למדיום בהשוואה לכמות ה BSA אשר הופרשה מרקמת עטין בריאה. התוצאות הן ממוצע \pm שגיאת תקן ($n = 3$).

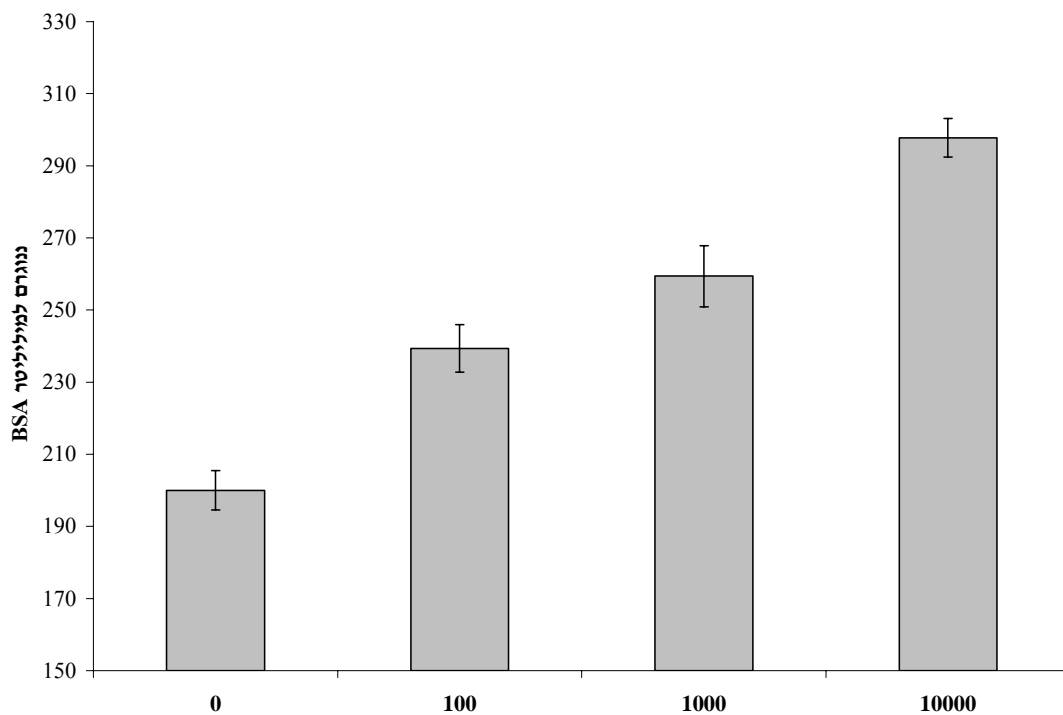
3.3 השפעה של ליפופוליסכריד על סינתזה והפרשה של BSA בתאי אפיתל של בלוטת החלב

תאי אפיתל של בלוטת החלב הוחזקו במשך 48 או 72 שעות במדיום אשר הכיל ארבעה ריכוזי ליפופוליסכריד (LPS): 0, 100, 1000 או 10,000 ננוגרם למ"ל (סעיף 2.10.1). ביטוי mRNA של BSA נבדקה בשיטת Real Time RT-PCR (סעיף 2.7) והפרשת BSA למדיום נבדקה על פי שיטת ELISA (סעיף 2.11) בדוגמאות המדיום שנאספו מכל טיפול. התוצאות הראו כי, ל-LPS ישנה השפעה תלוית ריכוז על ביטוי mRNA של BSA, גרף 3, ועל הפרשת BSA מתאי אפיתל של בלוטת החלב, גרף 4. עליה בריכוז LPS העלתה את ביטוי BSA ואת הפרשתו מהתאים.



גרף 3: ביטוי mRNA של BSA בתאי בלוטת חלב מתרבית תאים.

התאים הוחזקו במשך 48 שעות במדיום אשר הכיל 0, 100, 1000 או 10,000 ננוגרם למ"ל LPS (סעיף 2.10.1). ביטוי BSA נבדק בשיטת Real Time RT-PCR (סעיף 2.8). מגרף מס' 3 ניתן לראות כי ביטוי BSA עלה כתלות בריכוז LPS. התוצאות הן ממוצע \pm שגיאת תקן ($n = 3$).

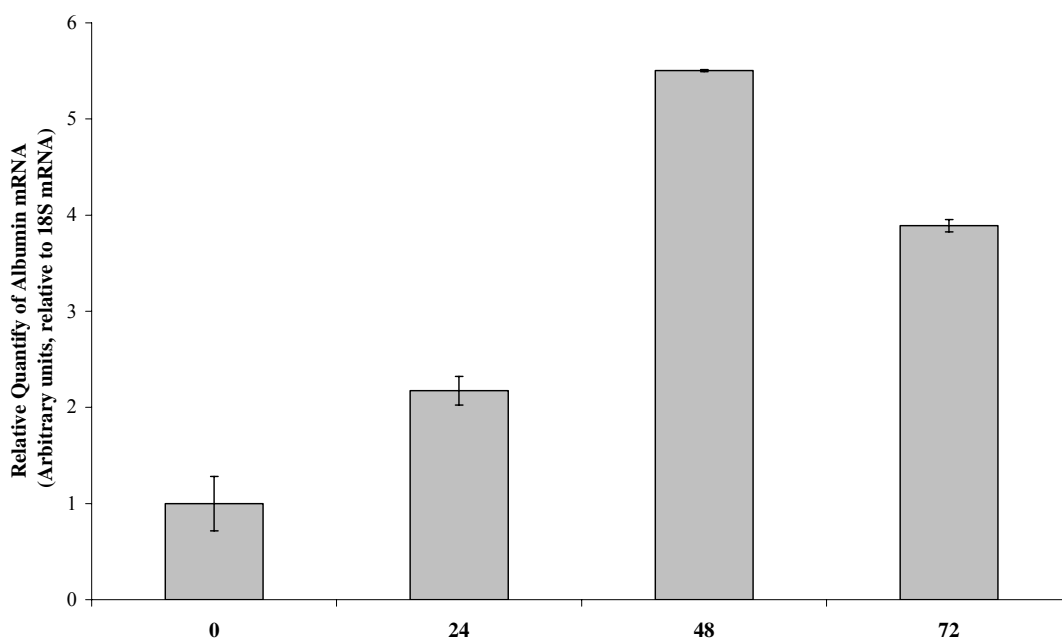


גרף 4: הפרשת BSA מתאי בלוטת חלב מתרבית תאים.

התאים הוחזקו במשך 72 שעות במדיום אשר הכיל 0, 100, 1000 או 10,000 ננוגרם למ"ל LPS (סעיף 2.10.1). הפרשת BSA מהתאים נמדד לפי שיטת ELISA (סעיף 2.11). מגרף מס' 4 ניתן לראות כי הפרשת BSA עלתה כתלות בריכוז LPS. התוצאות הן ממוצע \pm שגיאת תקן ($n = 9$).

3.4 השפעת ליפופוליסכריד על סינתזה של BSA בעטין של פרת חלב

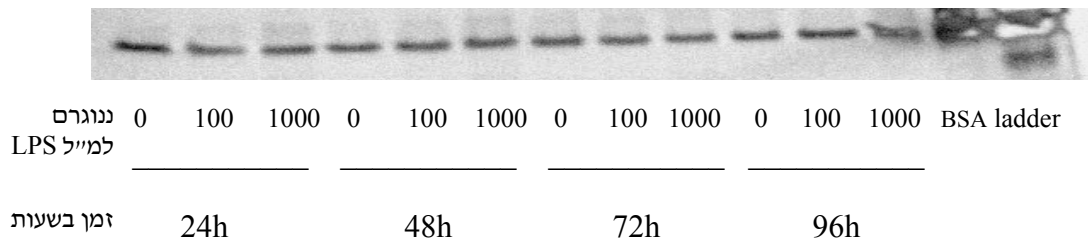
שתלי עטין מפרות חלב בלקטציה הוחזקו במדיום אשר הכיל 100 ננוגרם למ"ל LPS במשך 24, 48 ו72 שעות (סעיף 2.9.2). ביטוי BSA נמדד בשיטת Real Time RT-PCR (סעיף 2.8). מגרף 5 נראה כי, LPS הגביר את הביטוי של mRNA של BSA עד תקופה של 48 שעות, ולאחריה נמצאה ירידה בהתבטאות של BSA.



גרף 5: ביטוי של BSA mRNA בשתלים של רקמת עטין בריאה בתרבית איבר. השתלים הוחזקו במדיום אשר הכיל 100 ננוגרם למ"ל LPS (סעיף 2.9.2) במשך 24, 48 ו 72 שעות. ביטוי BSA נבדק בשיטת Real Time RT-PCR (סעיף 2.8). ניתן לראות לפי גרף מס' 5 כי התבטאות BSA עלתה לאורך זמן במשך 48 שעות. התוצאות הן ממוצע \pm שגיאת תקן ($n = 3$).

3.5 השפעת ליפופוליסכריד על הצטברות BSA ברקמת עטין של פרת חלב

שתלי עטין מפרות חלב בלקטציה הוחזקו במשך 24, 48, 72 ו 96 שעות במדיום אשר הכיל 0, 100 או 1000 ננוגרם למ"ל LPS (סעיף 2.9.2). הצטברות BSA נמדדה בשיטת Western Blot (סעיף 2.12). מתמונה 3 נראה כי ל – LPS אין כל השפעה על הצטברות BSA ברקמת עטין וכי BSA הצטבר באופן שווה בכל הריכוזים השונים ובזמני החשיפה השונים ל – LPS.



תמונה 3: הצטברות BSA בשתלים של רקמת עטין בריאה בתרבית איבר.

השתלים הוחזקו במשך 24, 48, 72 ו 96 שעות במדיום אשר הכיל 0, 100 או 1000 ננוגרם למ"ל LPS (סעיף 2.9.2). הצטברות BSA נמדדה בשיטת Western Blot (סעיף 2.12). ניתן לראות כי LPS לא גרם לשינוי בהצטברות BSA ברקמת העטין בטיפולים השונים.

על מנת לוודא כי הנוגדן הנבחר לקשירת BSA הינו ספציפי ערכנו בדיקה מקדימה ובה שלושה ריכוזים שונים, 125, 250 ו – 500 מק"ג למ"ל, של סטנדרט BSA. נמצא כי אכן נוגדן זה מתאים לעבודה עם BSA.



מק"ג למ"ל BSA 125 250 500

תמונה 4: בדיקה מקדימה לספציפיות של הנוגדן לBSA. הבדיקה נעשתה בשיטת Western Blot (סעיף 2.12) עם שלושה ריכוזים שונים 125, 250 ו – 500 מק"ג למ"ל של סטנדרט BSA.

4.1 התבטאות mRNA של BSA ברקמות פריפריאליות בבקר

Bovine Serum Albumin מבוטא כמעט בכל רקמה פריפריאלית אותה בחנו על ידי RT-PCR, למעט רקמת השחלה (סעיף 3.1, תמונה 2). ביטוי של אלבומין מחוץ לכבד נמצא במספר רקמות הכוללות את רטינת העין של העכבר, שריר השלד בעכבר, תאי אפיתל של בני אדם ותאי סרוזה בקנה הנשימה של בקר (Dodson et al., 2001; Jacquot et al., 1988; Varricchio et al., 1994; Wagatsuma et al., 2001; Wagatsuma et al., 2002). ביטוי של אלבומין מחוץ לכבד מרמז כי לחלבון זה חשיבות ברקמות הגוף. אלבומין הינו בעל זיקה לתרכובות שומניות (Baker, 1998) וכנראה מהווה "כיוור" לטוקסינים כמו ליפופוליסקרידים ותרכובות שומניות מוטאגניות ובכך מהווה מקור הגנה בגוף. הביטוי של BSA בעטין תואם לתוצאות שהתקבלו במעבדתנו שמראות כי BSA מסונתז על ידי תאי אפיתל של בלוטת החלב. עד כה הייתה מקובלת ההנחה כי אתר הסינתזה העיקרי של BSA הוא בכבד ועובר לחלב מהדם דרך מבנה ה Tight Junction (De Wit, 1998). מהממצאים הנ"ל ניתן להניח כי בנוסף ל – BSA אשר מגיע מהדם ישנה גם סינתזה מקומית בעטין.

4.2 סינתזה והפרשה של BSA בעטין של פרת חלב

סינתזה או ביטוי ה- mRNA של BSA ברקמת עטין נבחנה על ידי Real Time RT-PCR והפרשתו על ידי רקמת העטין לתוך מדיום נבחנה על ידי ELISA. מהממצאים שהתקבלו עולה כי בזמן דלקת עטין ישנה הגברה של סינתזת BSA ברקמת העטין והגברה בהפרשת BSA מהרקמה (סעיף 3.2, גרף 1 ו- 2). העלייה בריכוז BSA בחלב בזמן דלקת עטין נחשבה לרוב לתוצאה של עליית חדירות ה Tight Junction דבר המעלה את מעברו של BSA מהדם אל תוך החלב (Sordillo et al., 1987; Watanabe et al., 2000). עכשיו עולה האפשרות כי העלייה בריכוז BSA בזמן דלקת היא תוצאה של עלייה בסינתזה מקומית בבלוטת החלב והפרשה מוגברת לתוך החלב, בנוסף ל – BSA המגיע מהדם. מתוצאות אלה, אנו מציעים כי העלייה בסינתזה ובהפרשה של BSA בעטין מהווה חלק ממנגנון הגנה של העטין בפני דלקת. דלקת עטין מתאפיינת בהצטברות של נויטרופילים בבלוטת החלב. נויטרופילים הינם הכרחיים להגנת בלוטת החלב בפני גורמים מזהמים, אך הם גם מעורבים בפתולוגיה של מחלות דלקתיות בפני שהם משחררים מולקולות ציטוטוקסיות וגורמים לנזק רקמתי (Boulanger et al., 2002). המולקולות הציטוטוקסיות אותן משחררים הנויטרופילים הן פרוטנאזות כגון,

גילאטינאז, וסוגים שונים של חמצן פעיל (Reactive Oxygen Species (ROS)) כגון, סופראוקסיד (O_2^-), מימן פרוקסיד (H_2O_2) ורדיקלים של הידרוקסיל ($OH\cdot$). מולקולות אלה ממלאות תפקיד חשוב בדלקת ובנזק תאי. פעולותיהן כוללות חמצון חלבונים ושומנים, גרימת נזק ל-DNA ועיכוב מסלולים מטבולים בתאים (Cuzzocrea et al., 1998; Knaapen et al., 1999; Weiss, 1989). Kouoh et al., 1999. הראו כי אלבומין פועל נגד ה-ROS המופרשים מנויטרופילים כאנטי אוקסידנט ומנטרל את הפעילות המזיקה. הפעילות האנטי אוקסידנטית נובעת, כנראה, מאינטראקציה ישירה בין אלבומין ל-ROS דרך קבוצות הסולפידריל והאמין שלו. בנוסף נמצא כי אלבומין פועל כאנטי אוקסידנט בתרבויות תאים של מקרופאגים ותאי אפיתל של צינורות הכליה באמצעות קבוצות ההידרוקסיל וסולפידריל שלו ובכבד הוא מהווה מקור הגנה בפני ROS על ידי קשירה לא ספציפית ליוני מתכת אשר משתתפים בתגובות שתוצריהן הם רדיקלים של הידרוקסיל ורדיקלים חופשיים נוספים (Caraceni et al., 1994; Iglesias et al., 1994; Strubelt et al., 1994). אלבומין גם משתתף במערכת הגנה אנדוגנית של החלבון גלוטטין (GSH) הפועלת נגד רדיקלים חופשיים על ידי כך שהוא תורם לו את חומצת האמינו ציסטאין אשר חשובה לסינתזה שלו ובצורה זו מגביר את ריכוזו ואת יעילותו (Bounous, 2000). ייתכן כי BSA פועל כאנטי אוקסידנט בבלוטת החלב בזמן דלקת עטין ולכן עולה הסינתזה המקומית וההפרשה שלו בזמן זה, כאשר ישנו נזק רקמתי.

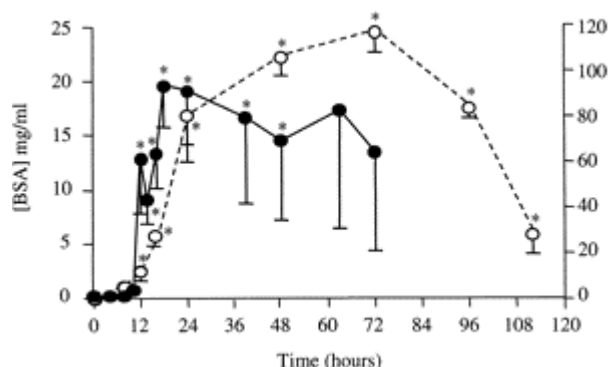
לחץ הנובע מהיריון והמלטה מגרה ייצור של הורמוני עקה אשר משפיעים על תגובת החיסון. אחת מקבוצות הורמוני עקה אשר מווסתים את הפעילות החיסונית היא הקורטיקוסטרואידים. נמצא כי הגלוקוקורטיקואיד הסינטיטי דקסאמטאזון מוריד את מספרם הכולל, את תפוצתם ואת פעילותם של תאי דם לבנים בבקר (Waller, 2000). בנוסף, נמצא כי גלוקוקורטיקואידים מורידים את רמת הלימפוציטים מסוג T בדם, את רמת IgM בהפרשות בלוטת החלב, את ביטוי MHC בתאים חד גרעיניים ומעכבים ייצור ציטוקינים (Burton et al., 1997; Doherty et al., 1995; Kehrl et al., 1999; Nonnecke et al., 1996). כמו שזכר בסעיף 1.1 אחד מתפקידיו של אלבומין הוא קשירה והסעה של חומרים שונים בגוף, ביניהם קורטיזול, אשר מהווה חלק מקבוצת הגלוקוקורטיקואידים (Peters, 1985). מכאן, עולה האפשרות כי בזמן דלקת עטין, כאשר ישנה עלייה בגלוקוקורטיקואידים, חלה סינתזה מקומית והפרשה מוגברת של BSA בבלוטת החלב על מנת לקשור את הגלוקוקורטיקואידים ולהוריד את ריכוזם במטרה למנוע את השפעתם השלילית על תגובת החיסון ובכך לעזור לבלוטת החלב להתגבר על הדלקת.

4.3 השפעת ליפופוליסכריד על BSA בעטין

על מנת לגלות את המנגנון שגורם לעלייה בסינתזה ובהפרשה של BSA בזמן דלקת עטין הוספו לשתלי עטין בריאים ולתרבויות תאי אפיתל של בלוטת החלב ליפופוליסכריד (LPS) מ *E. coli*, שהוא הגורם העיקרי לדלקת עטין ו LPS הוא האנדוטוקסין שלו (Bradley, 2002). הממצאים

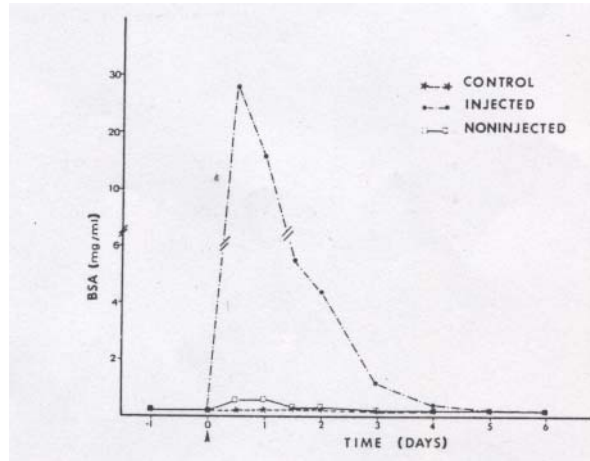
שהתקבלו מראים כי נוכחותו של LPS מגביר את הסינתזה והפרשה של BSA באופן תלוי ריכוז (סעיף 3.3, גרף 3 ו-4). בנוסף, הממצאים מראים כי ההשפעה של LPS מתגברת עם הזמן. עד 48 שעות נמצאה עלייה בביטוי של BSA, והירידה שנצפתה לאחר 72 שעות נובעת כנראה, מדגרדציה של השתלים (סעיף 3.4, גרף 5).

דלקת עטין ניסויית שבוצעה בפרות לחלב על ידי הזרקה של *E. coli*, שנעשתה על ידי Riollet וצוותו, הראתה כי ריכוז BSA בחלב עלה באופן משמעותי 12 שעות לאחר ההזרקה בהשוואה לריכוזי בסיס (Riollet et al., 2000). תמונה מספר 5 מראה באופן גרפי את התוצאות שהתקבלו על ידי Riollet וצוותו.



תמונה 5: ריכוז BSA (מ"ג למ"ל, נקודות שחורות) במי גבינה הנלקח מרבעים אשר אליהם הוזרק *E. coli*. נלקח מ Riollet et al., 2000.

Fox וצוותו הזריקו לרבעי עטין באופן אקראי 0.5 מיליגרם של LPS. לרבעים הנותרים לא הוזרק שום דבר והם לא טופלו בשום דבר. ריכוז BSA ברבעים אליהם הוזרק LPS הגיע לשיא 9 שעות לאחר ההזרקה ולאחר מכן ירד והגיע לריכוז בסיס ביום הרביעי. ריכוז ה- BSA היה גבוה באופן משמעותי ברבעים אליהם הוזרק LPS בהשוואה לרבעים אליהם לא הוזרק LPS ובהשוואה לרבעים אשר שימשו ביקורת (Fox et al., 1981). בנוסף, Fox וצוותו מצאו כי ריכוז BSA היה גבוה פי 2 ברבעים אליהם לא הוזרק LPS בהשוואה לבסיס ונשאר גבוה במשך יום אחד. תמונה מספר 6 מראה באופן גרפי את התוצאות שהתקבלו על ידי Fox וצוותו.



תמונה 6: ריכוזי BSA (מ"ג למ"ל) בחלב לפני ואחרי הזרקת 0.5 מיליגרם LPS ברבעי ביקורת (Control), ברבעים אליהם לא הוזרק LPS (No injected) ורבעים אליהם הוזרק LPS (Injected). נלקח מ Fox et al., 1981.

Fox וצוותו הניחו כי העלייה בריכוז BSA ברבעים אליהם לא הוזרק LPS נבע מעלייה בחדירות TJ, אך הם לא מצאו סיבה לשינוי בחדירות ברבעים אלה (Fox et al., 1981). בעבודה זו אנו מראים כי ישנה סינתזה מקומית של BSA בעטין וכי סינתזה זו עולה בתגובה ל - LPS. לכן, ההיפותזה שלנו היא ש - BSA מסוננת בעטין והסינתזה שלו עלתה לאחר הזרקת ה - LPS. אנו משערים כי הזרקת LPS לרבע אחד גרמה לתגובת חיסון חלשה יותר ברבעים האחרים, ולכן ריכוז BSA ברבעים שאליהם לא הוזרק LPS היה גבוה יותר מריכוז הבסיס.

תוצאות אלה מחזקות את השערתנו כי BSA הינו בעל תפקיד חשוב בזמן דלקת עטין וכי העלייה בריכוזו בזמן דלקת אינה נובעת רק מעלייה בחדירות TJ ומעבר מן הדם, אלא גם מסינתזה מקומית אשר מגורה, ככל הנראה, על ידי האנדוטוקסין של E. coli, LPS, אשר מופרש בזמן דלקת עטין.

לאחר בדיקת השפעת LPS על סינתזה והפרשת BSA בעטין נבדקה השפעתו על הצטברותו של BSA בעטין. לשתלי עטין בריאים הוסף LPS ונמצא כי LPS לא גרם להצטברות של BSA בטיפולים השונים. בנוסף נמצא כי לזמן החשיפה ל - LPS לא הייתה השפעה על הצטברות BSA בעטין (סעיף 3.5, תמונה 3). מן התוצאות האלה ומן התוצאות שהתקבלו ביחס להשפעת LPS על סינתזה והפרשת BSA (סעיף 3.4, גרף 3,4 ו - 5), תוצאות שבהן נמצא כי LPS מגביר את סינתזה והפרשת BSA וכי חשיפה ממושכת ל - LPS גם כן מגבירה את הסינתזה של BSA, אנו משערים כי BSA המסוננת בעטין מופרש אל החלב ואיננו מצטבר ברקמה, כפי שמוזכר במבוא (סעיף 1.1) שאלבומין איננו נאגר בגוף.

בעריכת השוואה בין BSA לבין קזאין שהינו חלבון חלב (DePeters et al., 1992), ניתן למצוא הבדלים בהתנהגותם בזמן דלקת עטין. בניסויים שנערכו על ידי Watanabe וצוותו בשנת 2000 ועל ידי Schmitz וצוותו בשנת 2004 נמצא כי בזמן דלקת עטין אין שינוי בסינתזה של

קזאין וישנה ירידה בהפרשתו לחלב. ממחקרים אלה ניתן להסיק כי הירידה בריכוז קזאין בזמן דלקת עטין אינה נובעת מירידה בסינתזה אלא, נובעת מפירוקו של הקזאין ברקמה. לעומת זאת, בעבודה זו נמצא כי בזמן דלקת עטין ישנה עליה בסינתזה של BSA ברקמת העטין (סעיף 3.3 גרף 3) ועליה בהפרשתו מן הרקמה לחלב (סעיף 3.3 גרף 4). בנוסף נמצא כי BSA אינו מצטבר ברקמת העטין (סעיף 3.5, תמונה 3) וכנראה מופרש לחלב מיד לאחר הסינתזה שלו.

הירידה בריכוז קזאין בחלב בזמן דלקת עטין פועלת לטובת מערכת ההגנה של בלוטת החלב מכיוון שקזאין בריכוזו בחלב בריא מדכא את פעילותם הבקטריוצידית של הנויטרופילים (Schmitz et al., 2004; Watanabe et al., 2000). בניגוד לקזאין, לא ידוע לנו על פעילות מזיקה של BSA בזמן דלקת עטין ואנו משערים, מתוך התוצאות שהתקבלו בעבודה זו, כי BSA פועל יחד עם שאר גורמי מערכת ההגנה של בלוטת החלב.

סיכום

אלבומין הינו חלבון אשר מסונתז ברובו בכבד ובעל תפקידים פיסיוולוגיים רבים הכוללים שמירה על לחץ אוסמוטי בפלסמה, שמירה על מאזן חומצה:בסיס, והסעה של חומרים רבים בדם. בעבודה זו נמצא כי ישנו ביטוי של BSA ברקמות פריפריאליות של בקר, כולל ברקמת עטין. ממצא זה ומעבודות נוספות שנערכו בנושא ניתן לראות כי אלבומין אינו מיוצר אך ורק בכבד וניתן להניח כי חלבון זה בעל חשיבות פיסיוולוגית בגוף.

- בבדיקת התבטאות והפרשת BSA ברקמת עטין נמצא כי בזמן דלקת ישנה עליה בסינתזה של BSA בעטין ועליה בהפרשתו לחלב. על סמך תוצאות אלה יש להניח כי BSA מעורב במנגנון הגנה של בלוטת החלב בזמן דלקת עטין.
- בבחינת התבטאות והפרשת BSA ברקמת עטין ובתאי אפיתל של בלוטת החלב בחשיפה ל - LPS נמצא קשר ישיר בין ריכוז LPS לבין רמת הביטוי ורמת ההפרשה של BSA. נתונים אלו מחזקים את השערה כי ל - BSA תפקיד בזמן דלקת עטין וכי העלייה בריכוז BSA בזמן דלקת נובעת מסינתזה מקומית מוגברת של BSA בבלוטת החלב.
- בדיקת השפעת זמן חשיפה ל - LPS על רמת התבטאות BSA ברקמת עטין הראתה כי ישנה עלייה בביטוי BSA ככל שעולה זמן החשיפה ל - LPS. תוצאה זו מהווה חיזוק נוסף להיפותזה כי בזמן דלקת עטין ישנה עלייה בסינתזה של BSA וכי ל - BSA ישנו תפקיד הגנתי בבלוטת החלב בזמן דלקת עטין.
- בבדיקת הצטברותו של BSA ברקמת עטין תחת השפעתו של LPS נמצא כי הוא אינו משפיע על הצטברות BSA. מתוצאה זו הסקנו כי ה- BSA שמסונתז על ידי העטין אינו מצטבר ברקמת העטין אלא, מופרש ישירות אל החלב. תוצאה זו מהווה חיזוק נוסף לכך כי בזמן דלקת עטין העליה בריכוז BSA נובעת מעליה בסינתזה של BSA ולא מהפרשה של BSA אשר הצטבר ברקמה.

1. Baker M.E. (1998) Albumin's role in steroid hormone action and the origins of vertebrates: is albumin an essential protein?. FEBS Lett. 439: 9-12.
2. Bishop J.G., Schanbacher F.L., Ferguson L.C. & Smith K.L. (1976). In vitro growth inhibition of mastitis-causing coliform bacteria by bovine apolactoferrin and reversal of inhibition by citrate and high concentrations of apolactoferrin. Infect. Immun. 14: 911-918.
3. Boulanger V., Zhao X. & Lacasse P. (2002). Protective effect of melatonin and catalase in bovine neutrophil-induced model of mammary cell damage. J. Dairy Sci. 85: 562-569.
4. Bounous G. (2000). Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. Anticancer Res. 20: 4785-4792.
5. Bradley A.J. (2002). Bovine mastitis: An evolving disease. Vet. J. 164: 116-128.
6. Breau W.C. & Oliver S.P. (1986). Growth inhibition of environmental mastitis pathogens during physiologic transitions of the bovine mammary gland. Am. J. Vet. Res. 47: 218-222.
7. Breton-Gorius J., Mason D.Y., Buriot D., Vilde J.L. & Griscelli C. (1980). Lactoferrin deficiency as a consequence of a lack of specific granules in neutrophils from a patient with recurrent infections. Detection by immunoperoxidase staining for lactoferrin and cytochemical electron microscopy. Am. J. Pathol. 99: 413-428.
8. Burton J.L. & Kehrl Jr. M.E. (1996). Effects of dexamethasone on bovine circulating T lymphocyte populations. J. Leukoc. Biol. 59: 90-99.
9. Bushe T. & Oliver S.P. (1987). Natural protective factors in bovine mammary secretions following different methods of milk cessation. J. Dairy Sci. 70: 696-704.
10. Cai T.Q., Weston P.G., Lund L.A., Brodie B., McKenna D.J. & Wagner W.C. (1994). Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. Am. J. Vet. Res. 55: 934-943.
11. Caraceni P., Gasbarrini A., Van thiel D.H. & Boole A.B. (1994). Oxygen free radical formation by rat hepatocytes during postanoxic reoxygenation: scavenging effect of albumin. Am. J. Physiol. 266: G451-G458.

12. Chomczynski P. & Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
13. Cullor J.S., Fairley N., Smith W.L., Wood S.L., Dellinger J.D., Inokuma M.S. & Souza I.M. (1990). Hemogram changes in lactating dairy cows given human recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Vet. Pathobiol.* 27: 311-316.
14. Cuzzocrea S., Zingarelli B., Hake P., Salzman A.L. & Szabo C. (1998). Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Rad. Biol. Med.* 24: 450-459.
15. Daley M.J., Williams T., Dougherty R., Furda G., Hayes P. & Coyle P. (1993). Prevention and therapy of *Staphylococcus aureus* infections with recombinant cytokines. *Cytokine* 5: 276-283.
16. DePeters E.J. & Ferguson J.D. (1992). Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *J. Dairy Sci.* 75: 3192-3209.
17. Detilleux J.C., Kehrli M.E., Stabel J.R., Freeman A.E. & Kelley D.H. (1995). Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44: 251-267.
18. De Wit J.N. (1998). Marschall rhone-poulenc award lecture. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.* 81: 597-608.
19. Dodson C.S., Rengarajan K., Gewant H.D., Stodulkova E., Nguyen H.T., Boatright J.H. & Nickerson J.M. (2001). Extra-hepatic expression of serum albumin mRNA in mouse retina. *Curr. Eye Res.* 22: 182-189.
20. Doherty M.L., Bassett H.F., Quinn P.J., Davis W.C. & Monaghan M.L. (1995). Effects of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle sensitized to *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Vet. Res.* 56: 1300-1306.
21. Fitzpatrick J.L., Cripps P.J., Hill A.W., Bland P.W. & Stokes C.R. (1992). MHC class II expression in the bovine mammary gland. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 32: 13-23.

22. Fox L.K., Heald C.W., Gwazdauskas F.C. & Vinson W.E. (1981). Concentrations of glucocorticoids, bovine serum albumin and somatic cells in mastitic milk. *J. Dairy Sci.* 64: 2258-2261
23. Goodman R.E. & Schanbacher F.L. (1991). Bovine lactoferrin mRNA: sequence, analysis, and expression in the mammary gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 75-84.
24. Guidry A.J. & Miller R.H. (1986). Immunoglobulin isotype concentrations in milk as affected by stage of lactation and parity. *J. Dairy Sci.* 69: 1799-1805.
25. Heyneman R., Burvenich C. & Vercauteren R. (1990). Interaction between the respiratory burst activity of neutrophil leukocytes and experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. *J. Dairy Sci.* 73: 985-994.
26. Hogan J.S., Pankey J.W. & Duthie A.H. (1987). Growth inhibition of mastitis pathogens by long-chain fatty acids. *J. Dairy. Sci.* 70: 927-934.
27. Hogarth C.J., Fitzpatrick J.L., Nolan A.M., Young F.J., Pitt A. & Eckersall P.D. (2004). Differential protein composition of bovine whey: a comparison of whey from healthy animals and from those with clinical mastitis. *Proteomics.* 4: 2094-2100.
28. Iglesias J., Abernethy V.E., Wang Z., Lieberthal W., Koh J.S. & Levine J.S. (1999). Albumin is a major serum survival factor for renal tubular cells and macrophages through scavenging of ROS. *Am. J. Physiol.* 277 (5 Pt 2): F711-F722.
29. Jacquot J., Goldstein G., Sommerhoff C., Benali R., Puchella E. & Basbaum C.B. (1988). Synthesis and secretion of an albumin-like protein by cultured bovine tracheal gland serous cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155 (2): 857-862.
30. Kehrli M.E. Jr., Nonnecke B.J. & Roth J.A. (1989) Alternations in bovine neutrophil function during periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* 50: 207-214.
31. Kehrli M.E. Jr. & Shuster D.E. (1994). Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 77: 619-627.
32. Kehrli M.E. Jr., Burton J.L., Nonnecke B.J. & Lee E.K. (1999). Effects of stress on leukocyte trafficking and immune responses: implications for vaccination. *Adv. Vet. Med.* 41: 61-81.

33. Knaapen A.M., Seiler F., Schilerman P.A.E.L., Nehls P., Bruch J., Schins R.P.F. & Borm P.J.A. (1999). Neutrophils cause oxidative DNA damage in alveolar epithelial cells. *Free Rad. Biol. Med.* 27: 234-240.
34. Korhonen H., Marnila P. & Gill H.S. (2000). Milk immunoglobulins and complement factors. *Br. J. Nutr.* 85: S75-S80.
35. Kouoh F., Gressier B., Luyckx M., Brunet C., Dine T., Cazin M. & Cazin J.C. (1999). Antioxidant properties of albumin: effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes. *Farmacol.* 54: 695-699.
36. Lamote I., Meyer E., Massart-Leen A.M. & Burvenich C. (2004). Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation and involution. *Steroids.* 69: 145-159.
37. Mallard B.A., Dekkers J.C., Ireland M.J., Leslie K.E., Sharif S., Vankampen C.L., Wagter L. & Wilkie B.N. (1998). Alternation in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J. Dairy Sci.* 81: 585-595.
38. Nahon J.L., Tratner I., Poliard A., Presse F., Poiret M., Gal A., Sala-Trepat J.M., Legres L., Feldmann G. & Bernunau D. (1988). Albumin and α -fetoprotein gene expression in various nonhepatic rat tissues. *J. Biol. Chem.* 263 (23): 11436-11442.
39. Nguyen D.A. & Neville M.C. (1998). Tight junction regulation in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 3 (3): 233-246.
40. Nickerson S.C. (1987). Resistance mechanisms of the bovine udder: New implications for mastitis control at the teat end. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191: 1484-1488.
41. Niemiatowski M., Nonnecke B.J. & Targowski S.P. (1988). Phagocytic activity of milk leukocytes during chronic staphylococcal mastitis. *J. Dairy Sci.* 71: 768-787.
42. Nonnecke B.J. & Smith K.L. (1984). Biochemical and antibacterial properties of bovine mammary secretion during mammary involution and at parturition. *J. Dairy Sci.* 67: 2863-2872.
43. Nonnecke B.J., Burton J.L. & Kehrl Jr. M.E. (1997). Associations between function and composition of blood mononuclear leukocyte populations from Holstein bulls treated with dexamethasone. *J. Dairy Sci.* 80: 2403-2410.

44. Paape M.J., Shafer-Weaver K., Capuco A.V., Van Oostveidt K. & Burvenich C. (2000). Immune Surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480: 259-277.
45. Persson K., Larsson I. & Hallen Sandgren C. (1993). Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37: 99-112.
46. Peters T. Jr. (1985). Serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 37: 161-245.
47. Politis I., Zaho X., McBride B.W. & Burton J.H. (1992). Function of bovine mammary macrophages as antigen presenting cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30: 399-410.
48. Pyorala S. (2002). New strategies to prevent mastitis. *Reprod. Dom. Anim.* 37: 211-216.
49. Riollet C., Rainard P. & Poutrel B. (2000). Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7: 161-167.
50. Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold spring harbor: cold spring harbor laboratory press.
51. Santos J.E.P., Cerri R.L.A., Ballou M.A., Higginbotham G.E. & Kirk J.H. (2004). Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* 80: 31-45.
52. Schanbacher F.L., Goodman R.E. & Talhouk R.S. (1993). Bovine mammary lactoferrin: implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. *J. Dairy Sci.* 76: 3812-3831.
53. Schmitz S., Pfaffi M.W., Meyer H.H.D. & Bruckmaier R.M. (2004). Short-term changes mRNA expression of various inflammatory factors and milk proteins in mammary tissue during LPS-induced mastitis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 26: 111-126.
54. Selsted M.E., Tang Y.Q., Morris W.L., McQuire P.A., Nonotny M.J., Smith W., Henschen A.H. & Cullor J.S. (1993). Purification, primary structures and antibacterial activities of the beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268: 6641-6644.

55. Shafer-Weaver K. & Sordillo L.M. (1996). Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 79: 1347-1352.
56. Sordillo L.M., Nickerson S.C., Akers R.M. & Oliver S.P. (1987). Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. *Int. J. Biochem.* 19: 1165-1170.
57. Sordillo L.M. & Babiuk L.A. (1991). Controlling acute *Escherichia coli* mastitis during the periparturient period with recombinant bovine interferon-gamma. *Vet. Microbiol.* 28: 189-198.
58. Sordillo L.M., Redmond M.J., Campos M., Warren L. & Babiuk L.A. (1991). Cytokine activity in bovine mammary gland secretions during the periparturient period. *Can. J. Vet. Res.* 55: 298-301.
59. Sordillo L.M., Pighetti G.M. & Davis M.R. (1995). Enhanced production of bovine tumor necrosis factor- α during the periparturient period. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 49: 263-270.
60. Sordillo L.M., Shafer-Weaver K. & DeRosa D. (1997). Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80: 1851-1865.
61. Sordillo L.M. & Streicher K.L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 7 (2): 135-146.
62. Strubelt O., Younes M. & Li Y. (1994). Protection by albumin against ischemia and hypoxia-induced hepatic injury. *Pharmacol. Toxicol.* 75: 280-284.
63. Treece J.M., Morese G.E. & Llevy C. (1966). Lipid analyses of bovine teat canal keratin. *J. Dairy Sci.* 49: 1240.
64. Van Kampen C. & Mallard B.A. (1997). Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59: 79-91.
65. Varricchio F. & Stromberg K. (1994). An albumin-like protein is the major secretory protein of ovarian epithelial cells in vivo and in vitro. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 4: 328-332.
66. Wagatsuma A., Yamazaki Y., Mizuno K. & Yamada S. (2001). Molecular properties and gene expression of albumin in the skeletal muscle following

- hindlimb immobilization in a shortened position. *Acta Neuropathol.* 101: 540-546.
67. Wagatsuma A., Fujimoto K. & Yamada S. (2002). Alteration in albumin level during modified muscular activity. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 12: 143-149.
68. Waller K.P. (2000). Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480: 231-245.
69. Watanabe A., Yagi Y., Shiono H. & Yokomizo. (2000). Effect of intramammary infusion of tumour necrosis factor- α on milk protein composition and induction of acute-phase protein in the lactating cow. *J. Vet. Med.* B47: 653-662.
70. Weiss S.J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320: 365-376.
71. Zecconi A., Bronzo V., Piccinini R., Spreafico G. & Ruffo G. (1994). Phagocytic activity of bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Dairy Res.* 61: 271-279.

This work has shown that BSA is synthesized in the mammary gland and that its synthesis is augmented by bovine mastitis under the influence of LPS, the endotoxin of *E. coli*. In light of the results shown here we conclude that BSA is a very important factor during mastitis and that this protein is part of the body's defense mechanism.

Abstract

Albumin is a single polypeptide with 585 amino acids and is synthesized mainly by the liver. Albumin has many functions including maintenance of the colloid osmotic pressure in the plasma, binding and transport and free radical scavenging. Albumin is a component of milk whey proteins and its concentration is elevated in milk during bovine mastitis.

The aim of this study was to characterize the expression of Bovine Serum Albumin (BSA) in the dairy cow udder tissue and in peripheral tissues of the cow. In addition, our aim was to explore the effect of bovine mastitis on the level of BSA expression and secretion from the udder tissue.

While characterizing the expression of BSA in peripheral tissues in the cow we found that there is an expression in several other tissues of the body, including the udder tissue. Because there is an increase in the level of BSA in the milk during bovine mastitis we explored the possibility that the increase is a result of local synthesis of BSA in the udder. In our study we performed tissue culture with an udder tissue from a mastitic dairy cow and from a healthy dairy cow. We discovered that the expression of BSA mRNA is 4 times higher in the mastitic udder tissue than in the healthy udder tissue. We also discovered that the secretion of BSA from the udder tissue to the medium was 3.5 times higher from the mastitic udder tissue when compared to the secretion from the healthy udder tissue. In order to insure that the increase in BSA expression and secretion was caused by mastitis we added to primary and tissue cultures different concentrations (0-10,000 $\eta\text{g/ml}$) of Lipopolysaccharide (LPS), which is an endotoxin of *E. coli* that causes clinical mastitis. This experiment resulted in the increase of BSA mRNA expression in a dose dependent manner, the expression in 10,000 $\eta\text{g/ml}$ LPS was found to be 7 times higher than the expression in the control group without LPS. An increase was also found in the secretion of BSA, the secretion was about 1.5 times higher with 10,000 $\eta\text{g/ml}$ LPS when compared to the secretion in the control group without LPS. In addition, we found that the length of exposure to LPS had an effect on BSA mRNA expression. After an exposure of 48 hours to 100 $\eta\text{g/ml}$ LPS the expression of BSA was 6 times higher than the expression at the beginning of the experiment. LPS did not affect the accumulation of BSA in the udder in different concentration that were examined.

**Synthesis of Bovine Serum Albumin in the Udder of a Dairy
Cow**

**Thesis Submitted to
The Faculty of Agriculture, Food and Environmental
Quality Sciences of the Hebrew University of Jerusalem
For the Degree "Master of Science"**

**By
Rachel Homans**

Rehovot

Israel

November 2004