

מעורבות המיטוכונדריה בקביעת הרכב וריכוז הפוספוליפידים בחלב.

Mitochondria regulation of composition and concentration of phospholipids in milk

חוקר : נורית ארגוב- ארגמן, מטבוליזם שומן בבלוטת החלב, הזנת מעלי גירה. הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה של האוניברסיטה העברית. argov.nurit@mail.huji.ac.il

תקציר מדעי של תוכנית המחקר:

חומצות השומן בחלב מופרשות כחלק ממולקולות מורכבות הנקראות טריגליצרידים ופוספוליפידים הנבדלים אלה מאלה במבנה ובמנגנונים המטבוליים אשר מופעלים כתגובה לצריכתם בדיאטה. דיאטות עתירות בפוספוליפידים קשורות למגוון השפעות בריאותיות חיוביות אולם רק אחוזים בודדים משומן החלב מופרשים כפוספוליפידים ולכן ישנה חשיבות בריאותית ותעשייתית להבנת המנגנונים השולטים בריכוז הפוספוליפידים בחלב. בעבודות מוקדמות ראינו כי באמצעות שינוי ריכוז שומן החלב משתנה גם הרכב וריכוז הפוספוליפידים. הפוספוליפיד העיקרי שריכוזו ותנובתו משתני כתגובה לטיפולים הוא פוספטידילאתנולאמין, אשר מסונטז מדהקרבוקסילציה של פוספטידילסרין, המתרחשת במיטוכונדריה. מספר המיטוכונדריות בתא מבוקר על ידי PGC1 אשר נמצא כי בשריר ובכבד פעילותו מבוקרת על ידי חומצות שומן רוויות ובלתי רוויות, בהתאמה. עדיין לא ידוע מה מבקר את ה-PGC1 בבלוטת החלב. מטרת מחקר זה היא בחינת הקשר בין פעילות מספר מיטוכונדריות לבין ריכוז והרכב הפוספוליפידים בחלב ובירור תפקיד הרכב הפוספוליפידים בקביעת גודל בועית שומן החלב. במהלך המחקר התחלנו לבדוד את התהליך המיטוכונדריאלי המאפשר שליטה ביציבות הממברנה באמצעות שינוי הרכב הפוספוליפידים בממברנת התא. כמו כן, בחנו את האפשרות להפחית את מידת ההתמרה של פוספטידילסרין לפוספטידילאתנולאמין באמצעות עיכוב פעילות האנזים המיטוכונדריאלי PSD, ובכך לגרום לייצוב ממברנת התא, להפחית את מידת איחוי בועיות השומן זו עם זו ובהתאם להקטין את קוטר בועיות השומן. לצורך כך, תאי אפיתל בלטת החלב נחשפו לרעלן סודיום אזיד, אשר נמצא בעבר, בתאי כבד, כמעכב מעבר של פוספטידילסרין לתוך המיטוכונדריה. בהתאם, השתמשנו בסודיום אזיד בריכוזים ובטווחי זמן שהוכחו כי אינם לטאליים לתרבית התאים ובחנו את השפעתו על תאים שנחשפו לחומצת שומן אולאית על מנת לעורר ייצור בועיות שומן גדולות. שימוש ברעלן זה בתרבית הראשונית של תאי אפיתל בלוטת החלב שינה לגמרי את פנוטיפ הגודל של בועיות השומן, ובעצם "העלים" מתרבית התאים את הפנוטיפ של בועיות שומן גדולות. כמו כן, מצאנו כי היחס המשקלי בין פוספטידילכולין לפוספטידילאתנולאמין עלה בתאים שטופלו בסודיום-אזיד, מה שאכן הצביע על ממברנה יציבה יותר, הנוטה לעכב איחוי של אברונים, בכללם בועיות שומן בתוך התא. התוצאות ממצביעות על יכולת המיטוכונדריה לייצר פוספטידילאתנולאמין כגורם מפתח

בשליטה בגודל בועית שומן החלב. בפרק השני של התכנית פרות חלב נחשו לשתי רמות אנרגיה במנה עשירה ועני במזון מרוכז (HCLF ו-LCHF, בהתאמה). הניסוי נערך במודל crossover של חודש בכל טיפול עם הפסקה של שבועיים בין הטיפולים. מטרת הטיפולים היתה לשנות את שטף חומצות השומן החופשיות לעטין ובכך את הרכב הממברנה וגודל בועיות השומן. נמצא כי במנה הגסה היתה ירידה בריכוז אינסולין וגלוקוז, ועליה בריכוז חומצה אולאית בפלסנמה. כמו כן היתה עליה בריכוז השומן. נמצאה נטיה לעליה בפעילות המיטוכונדרי בתא, שהתבטא ביחס גבוה יותר של PC-LPE, מה שמצביע על ממברנה פחות יציבה, שהתבטא גם בגודל בועית שומן גדולה יותר.

מבוא:

שומן החלב מופרש בצורה של בועית שומן המורכבת מגרעין של טריגליצרידים מוקף בשלוש שכבות של פוספוליפידים. בחלב עצמו ניתן למצוא בועיות שומן בקטרים שונים, מלמעלה מ-15 מיקרומטר ועד פחות מ-200 ננומטרים. בעבר הוכחנו כי קוטר בועית שומן החלב קשור ביחס ישר ליחס טריגליצרידים/פוספוליפידים, כך שבועיות קטנות מאופיינות ביחס נמוך יותר בהשוואה לבועיות גדולות (1). למרות ההבטחה הגלומה בהמצאות הפוספוליפידים בחלב באופן טבעי בגלל השפעתם החיובית על בריאות הצרכן, רק כ-1 עד 2% משומן החלב מופרש כפוספוליפידים בעוד ש-95% מופרש כטריגליצרידים. לכן, ישנה חשיבות בריאותית ותעשייתית להבנת המנגנונים השולטים בהרכב שומן החלב ובעיקר ביחס בין הטריגליצרידים לפוספוליפידים בו.

הפוספוליפידים בחלב:

נראה כי מספר תהליכים מטבוליים משפיעים על ריכוז והרכב הפוספוליפידים בחלב. מרביתם של תהליכים אלו קשורים לריכוז שומן החלב. כך שתחת תנאים המשנים את ריכוז שומן החלב, ישתנה גם היחס בין טריגליצרידים/פוספוליפידים בחלב. באופן עקרוני, עליה בריכוז שומן החלב ילווה בעליה בגודל בועיות השומן, מה שיוריד את השיעור היחסי של פוספוליפידים בשומן החלב. בנוסף, נמצא שעם המרחק מההמלטה וההתקדמות בתחלובה, משתנה ריכוז הפוספוליפידים בחלב ביחס הפוך לריכוז שומן החלב (2). בין התהליכים המטבוליים המשתנים במהלך תחלובה נכלל גם מאזן האנרגיה השלילי בתחילת תחלובה שהולך ומתאזן ואף הופך לחיובי כעבור מספר שבועות מההמלטה. השינוי במאזן האנרגיה מתבטא בשינוי ריכוזי אינסולין וחומצות שומן חופשיות בדם הפרות. בעת מאזן אנרגיה שלילי ריכוזי האינסולין נמוכים, מה שמגביר פירוק שומן מרקמת השומן ועליה בריכוז חומצות השומן החופשיות בדם, בעוד שבעת מאזן אנרגיה חיובי ההיפך הוא הנכון (3). בניסויי in vivo קודמים הראינו שריכוזי אינסולין שונים, בין אם מתקיימים באופן טבעי באוכלוסיות שונות של פרות חלב (1) ובין אם מושרים באמצעים ניסויים (4), משפיעים על ריכוז שומן החלב, הרכב חומצות השומן בחלב,

ריכוז הפוספוליפידים והרכבם. כמו כן, בניסוי *in vitro* בהם השתמשנו בקו תאים של אפיתל בלוטת החלב מעכברה, ראינו כי אינסולין משפיע על הרכב הפוספוליפידים (5).

במעבדתנו מצאנו כי ריכוזם של שני פוספוליפידים עיקריים, פוספטידילסרין ופוספטידילאתנולאמין, משתנה בהתאם לריכוזם של הפוספוליפידים בחלב. תוצאות אלו התקבלו גם במודלים ניסויים של החיה השלמה (*in vivo*) וגם במודלים של קו תאים (*in vitro*). בליפוזמים סנטטיים מעבדה נמצא כי שינויים בריכוזם של פוספטידילסרין ופוספטידילאתנולאמין משפיעים על קוטר חלקיקים שומניים (6). אותה תופעה נמצאה גם בחלקיקים שומניים המופרשים לדם על ידי הכבד (7). לפיכך נראה כי לשני פוספוליפידים אלו תפקיד מפתח בקביעת גודל חלקיקים המופרשים על ידי רקמות אנימאליות למערכות מימיות, ומאפיין זה יכול להקשר בבבלוטת החלב לבקרת קוטר בועיות שומן ויחס הטריגליצרידים\פוספוליפידים בחלב.

פוספטידילאתנולאמין מסונתז במיטוכונדריה מפוספטידילסרין ע"י האנזים פוספטידילסרין-דקרבוקסילז. לפיכך שינויים מטבוליים הקשורים לשינוי מספר\פעילות מיטוכונדריות בבלוטת החלב עשויים גם להשפיע על יצירת הפוספטידילאתנולאמין בתאי הבלוטה וכפועל יוצא על גודל בועית השומן וריכוז הפוספוליפידים בחלב.

מטרת העבודה היתה לבחון את השפעתן של חומצות שומן מסויימות הזמינות לתאי בבלוטת החלב על הרכב הפוספוליפידים, דרך השפעה על פעילות המיטוכונדריות בתא, במודל *in vitro* של תרבית ראשונית של תאי אפיתל בלוטת החלב ובמודל *in vivo*

שיטות חלק *in vitro*:

מבית מטבכיים נלקחה רקמת עטין בריאה על פי קביעת הוטרנר, והועברה למעבדה בפקולטה לחקלאות במדיום DMEM/F12 בתוספת אנטיביוטיקה. במעבדה הרקמה עוכלה באמצעות תמיסת עיכול שתוכן מ 100 מ"ג היאלורונידז ו-100 מ"ג קולגנאז ומעבר דרך פילטר 0.2 מיקרון. התאים הודגרו ב-3 מ"ל DNAse 0.04% חמים (37°) ולאחר מכן סוננו שוב דרך פילטר 100 מיקרון. התאים נזרעו בריכוז של מיליון תאים (10 מ"ל) בצלחת 100 מ"מ. התאים נחשפו לחומצת שומן חופשיות (100 מיקרומולר) אשר יורחפו במדיום המכיל BSA מולארי של 1:6. חומצות השומן שייבחנו הן: חומצה קפרית (C10:0), חומצת שומן פלמיטית (C16:0) וחומצת שומן אולאית (C18:1n9). הביקורת תהיה חשיפת התאים ל-BSA ללא חומצות שומן.

לבחינת ביטוי גנים באמצעות Real Time PCR הופק RNA מהתאים לאחר שעתיים חשיפה לטיפול. לקביעת ריכוז והרכב שומן השומן מוצה ממדיום הגידול או מהתאים לאחר 24 שעות

טיפול ועבר אנליזה ב-HPLC. כמות המיטוכונדריות נקבעה באמצעות דנסיטומטריה לאחר סימון המיטוכונדריות ב-Mitotracker.

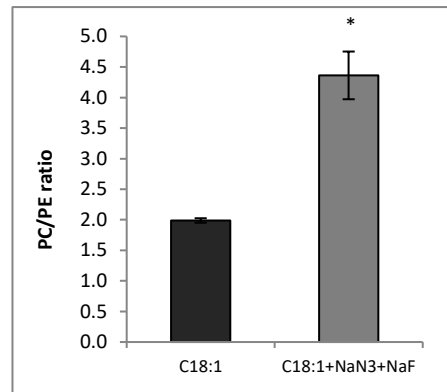
תוצאות:

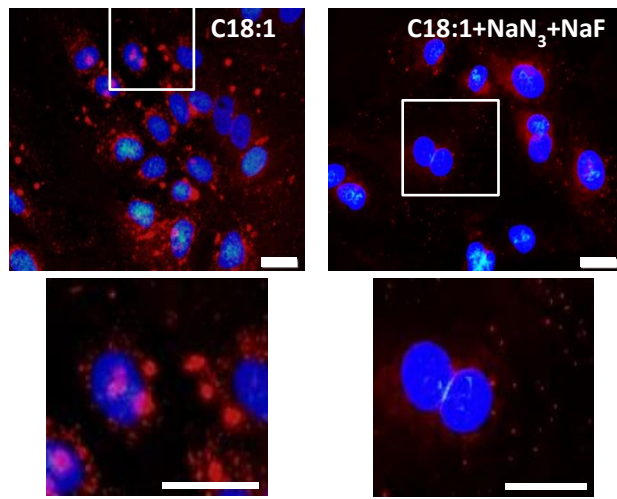
כדי לבחון אין ההנחה כי המיטוכונדריה מעורבת בקביעת הרכב הממברנה, בצענו שורה של ניסויים בהם השתמשנו במעכבים ביוכימיים אשר אמורים לפגוע בתהליך ההתמרה של פוספטידילסרן לפוספטידילאתנולאמין המתבצע במיטוכונדריה. כאמור, מעבר להיותה מרכז של ייצור אנרגיה (ATP) ופקטורים מחזרים (NADPH), המיטוכונדריה מהווה מרכז התמרה של שני פוספוליפידים; באמצעות אנזים הפועל בין ממברנות המיטוכונדריה הנקרא PSD, מתבצעת דהקרבווקסילציה של פוספטידילסרין ומתקבל פוספטידילתנולאמין, מה שכאמור יכול להשפיע באופן מהותי על יציבות הממברנה ולפיכך על יכולת בועיות שומן לגדול בקוטרן באמצעות איחוי. בספרות ידוע כי סודיום אזיד הינו בעל השפעה מעכבת על מעבר של פוספטידילסרין לתוך המיטוכונדריה. בהתאם, בחלק זה של עבודת המחקר חשפנו את התאים לסודיום אזיד במטרה להפחית את כמות הפוספטידילאתנולאמין המיוצרת בתא. במקביל, השתמשנו במדיום ללא אתנולאמין על מנת למנוע את יכולתו של התא לייצר פוספטידילאתנולאמין במסלול האלטרנטיבי, *de novo*. הטיפול ניתן על רקע של חשיפת התאים לחומצה אולאית חופשית, מה שאמור היה לעורר את התא לייצור מוגבר של בועיות שומן גדולות באמעות ערעור הממברנה על ידי העשרתה בפוספטידילאתנולאמין (Cohen et al., 2015).

נמצא כי עם הוספת הסודיום אזיד, התאים שינו את הרכב הפוספוליפידים בממברנה, דבר שהתבטא ביחס גבוה יותר של שני פוספטידילכולין/פוספטידילאתנולאמין (איור 1). יחס זה הינו מאפיין של יציבות ממברנלית וככל שהוא נמוך יותר, ממברנת התא נחשבת לפחות יציבה. לאור השינוי ביציבות הממברנה כתוצאה מחשיפת התאים לסודיום אזיד, בחנו את קוטר בועיות השומן בתוך תא (איור 2). נצפו שינויים ברורים בגודל בועיות השומן בתוך התא. התאים אשר היו חשופים למדיום הביקורת (שכלל חומצה אולאית), ייצרו כצפוי בועיות שומן גדולות. אולם, התאים אשר היו חשופים למדיום שהכיל חומצה אולאית וסודיום אזיד ייצרו בועיות שומן קטנות. למעשה, הטיפול בסודיום אזיד העלים כמעט לגמרי את הפנוטיפ של בועיות שומן גדולות בתאי הטיפול (איור 3).

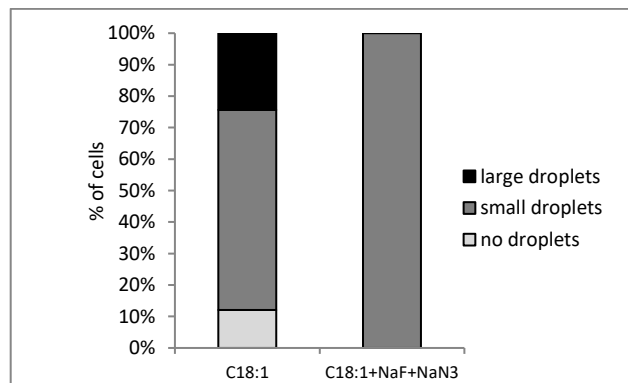
באופן מעניין, למרות השינויים הגדולים והברורים בגודל בועיות השומן כתוצאה מהטיפול ביחס לביקורת, ריכוז הטריגליצרידים בתוך התא לא השתנה כעבור שעתיים או ארבע שעות מתחילת הטיפול (איור 4).

איור 1: היחס המשקלי בין פוספטידילכולין לפוספטידילאתנולאמין בתאי אפיתל בלוטת החלב שנחשפו לחומצה אולאית (C18:1) או לחומצה אולאית בנוכחות סודיום אזיד (C18:1+NaN3+NaF). (* $P \leq 0.05$)

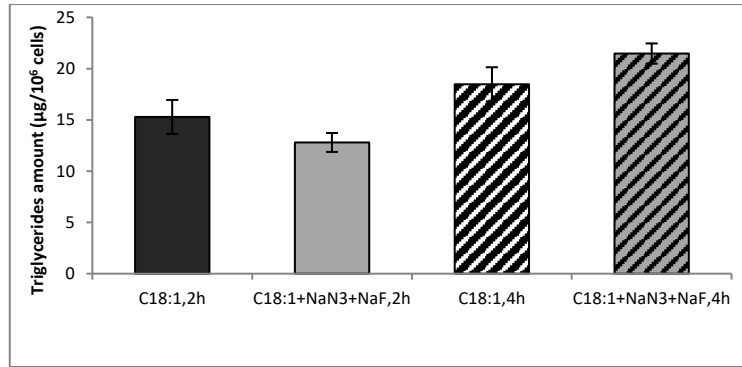




איור 2: גודל בוועיות שומן בתאי אפיתל בלוטת החלב שנחשפו לחומצה אולאית (C18;1) או לחומצה אולאית בנוכחות סודיום אזיד (C18;1+NaN₃+NaF). לאחר 24 שעות של טיפול התאים קובעו ונצבעו ב-DAPI (כחול) וב-nile red (אדום) וצולמו במיקרוסקופ פלואורוסנטי. ניתן לראות כי הטיפול בחומצה אולאית עודד ייצור של טיפות שומן גדולות בתא (התמונה התחתונה היא הגדלה של המסגרת הלבנה בתמונה מעליה) בעוד שהוספת סודיום אזיד למדיום הטיפול השאירה את טיפות השומן קטנות (פנל ימין).



איור 3: התפלגות תאי אפיתל בלוטת החלב בתרבית לפי פנוטיפ של גודל של טיפת שומן. תאי אפיתל בלוטת החלב שנחשפו לחומצה אולאית (C18;1) או לחומצה אולאית בנוכחות סודיום אזיד (C18;1+NaN₃+NaF). לאחר 24 שעות של טיפול התאים קובעו ונצבעו ב-DAPI (כחול) וב-nile red (אדום) וצולמו במיקרוסקופ פלואורוסנטי. טיפות השומן בכל תא נמדדו. תא שלפחות אחת מטיפות השומן בו היצה גדולה מ-2 מיקרומטרים נכנס לקטגוריית של large droplets. תא ללא טיפות שומן גדולות נכנס לקטגוריית small droplets, ותא ללא טיפות שומן כלל נכנס לקטגוריית no droplets. הטיפול בסודיום אזיד ביטל לחלוטין את פנוטיפ ה-large droplets התרבית התאים ($P < 0.05$).



איור 4: כמות הטריגליצרידים בתאי אפיתל בלוטת החלב שנחשפו לחומצה אולאית (C18;1) או לחומצה אולאית בנוכחות סודיום אזיד (C18;1+NaN₃+NaF). התאים נקצרו אחרי שעתיים (שחור או אפור) או ארבע שעות (מפוספס) ונקבע בהם ריכוז הטריגליצרידים. הטיפול לא הוריד את ריכוז הטריגליצרידים בשתי נקודות הזמן שנבחנו.

מסקנה: באמצעות פגיעה במעבר פוספטידילאטנולאמין מהציטופלסמה אל המיטוכונדריה נפגעה יכול התא לייצר פוסטידילאטנולאמין מה שגרם לממברנת התא להיות יציבה יותר. כפועל יוצא, ככל הנראה נפגעה יכול טיפות השומן לעבור איחוי זו עם זו, ובעיות השומן בתא נשארו קטנות.

דיווח על חלק ב' in vivo של המחקר:

שיטות

פרות חלב מזן הולשטיין ישראלי (n=24) עם מס' ימי חליבה ממוצע של 181±4, חולקו לשתי קבוצות טיפול בשני סבבים. בסבב ההזנה הראשון מנת ההזנה של אחת הקבוצות הכילה 35% מזון מרוכז ו65% מזון גס (LCHF) בעוד שהקבוצה השנייה קיבלה מנה המכילה 65% מזון מרוכז ו35% מזון גס (HCLF). כל סבב נמשך כ- 4 שבועות, ובתום החודש הקבוצות החליפו מנות ההזנה. הפרות נשקלו פעם?? בשבוע ביציאה ממכון החליבה וכמו כן צריכת מזון קבוצתית נקבעה פעמיים בשבוע. שלוש דגימות חלב מחליבות עוקבות של בוקר, צהריים וערב, שימשה להכנת דוגמה המייצגת את שלושת החליבות לפי הכמות היחסית של כל אחת מהן מנפח החליבה הסופי של אותה יממה. הדוגמה המייצגת שימשה לקביעת קוטרן הממוצע של בועיות השומן בחלב. בנוסף שימשה הדוגמה לקביעת ריכוז שומן, חלבון, לקטוז ומספר תאים סומטיים שנבדקו במעבדת החלב המרכזית בקיסריה. בדוגמאות החלב נקבע פרופיל חומצות השומן, פוספוליפידים וכולסטרול. נאספו דוגמאות דם פעמיים בשבוע לקביעת ריכוזי non esterified fatty acids (NEFA), גלוקוז ואינסולין.

תוצאות:

התוצאות מצביעות על הבדלים בסטטוס מטבולי בין שתי הקבוצות שהתבטאו בריכוזי גלוקוז ואינסולין גבוהים בקבוצת ה-HCLF ביחס לקבוצת ה-LCHF (טבלה 1). יחד עם זאת, כצפוי, נצפתה עליה בריכוז ה-NEFA בקבוצת ה-LCHF.

טבלה 1: צריכת מזון, ריכוזי הורמונים ומטבוליטים בפלסמה

P	LCHF ²	HCLF ¹	
0.0004	26.5 ± 0.4	27.9 ± 0.44	צריכת חומר יבש ³
<0.0001	5.9 ± 0.5	9.3 ± 0.5	אינסולין (microUI/ml)
0.02	66.4 ± 1.8	70.4 ± 1.8	גלוקוז (mg/dL)
<0.0001	305.9 ± 13.1	172.8 ± 13.2	חומצות שומן חופשיות (μEL/L)

¹ מנת הזנה מרוכזת, ² מנת הזנה גסה. ³ צריכת חומר יבש יומי נמדד באופן קבוצתי וחולק למספר הפרות בקבוצה ומוצג כק"ג לפרה ליום. הנתונים מוצגים כממוצעים ± סטיית תקן.

בנוסף לריכוז חומצות השומן החופשיות בדם, נבדק הרכב חומצות השומן בפלסמת הפרות ונמצא כי הוא הושפע מהטיפולים (טבלה 2). עיקר ההבדלים נמצאו בחומצות שומן ארוכות שרשרת (<16 פחמנים). לדוגמא נמצא כי ריכוזה של חומצת השומן אולאית (C18;1) היה גבוה יותר בקבוצת ה-LCHF. כמו כן, נמצא כי חומצת שומן מסוג לינולאית (C18;2 n6) היה גבוה יותר בקבוצת ה-HCLF, ככל הנראה כתוצאה מתכולה גבוהה יותר של גרעינים במנה.

טבלה 2: הרכב חומצות השומן בפלסמה

P	LCHF ²	HCLF ¹	חומצות שומן (אחוז מולרי)
0.95	1.31 ± 0.02	1.29 ± 0.25	c6:0
0.13	3.63 ± 0.39	4.3 ± 0.38	c8:0
0.5	0.39 ± 0.1	0.3 ± 0.1	c10:0
0.77	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	c12:0

0.44	1.13 ± 0.08	1.06 ± 0.08	c14:0
0.51	15.48 ± 0.72	14.96 ± 0.71	c16:0
<0.0001	0.65 ± 0.03	0.4 ± 0.03	c16:1 n7
0.12	16.85 ± 0.56	17.8 ± 0.55	c18:0
0.0001	7.54 ± 0.36	5.97 ± 0.35	c18:1n9c
0.001	37.34 ± 1.29	40.98 ± 1.27	c18:2n6 cis 9-12
0.46	0.89 ± 0.05	0.85 ± 0.05	c18:3n6
<0.0001	1.34 ± 0.05	0.93 ± 0.05	c18:3n3 cis 9,12,15
<0.0001	2.71 ± 0.07	2.2 ± 0.07	c20:4n6
<0.0001	0.23 ± 0.01	0.18 ± 0.01	c20:5n3
<0.0001	0.47 ± 0.03	0.55 ± 0.03	c22:4n6

¹מנת הזנה מרוכזת, ² מנת הזנה גסה. נבדקו ריכוזי חומצות שומן בפלסמה של שבוע שני ושלישי משני הסבבים עבור כל אחת מהפרות. הערכים מוצגים כממוצע ריכוז ± שגיאת תקן.

מבחינת ההשפעה על יצרנות, נמצאה ירידה בתנובות החלב עם העליה בשיעור המזון הגס במנה (טיפול ה-LCHF) (טבלה 3), מה שלווח בעליה בריכוזי השומן. יחד עם זאת, מבחינת ריכוז החלבון נצפתה ירידה בטיפול זה, מה שהוביל לעליה ביחס בין שומן החלבון, המאפיינת מאזן אנרגיה שלילי. הטיפולים גם השפיעו על גודל טיפות השומן בחלב, אשר עלה בטיפול ה-LCHF בכ-7%. בעבר, תואר קשר הפוך בין יצרנות הבלוטה לבין גודל בועיות השומן (9) מה שעולה בקנה אחד עם ממצאינו הנוכחיים אשר מצביעים על קוטר קטן יותר של בועיות שומן בחלב בקבוצת ה-HCLF אשר התאפיינה בתנובות גבוהות יותר של חלב, חלבון, שומן ולקטוז.

טבלה 3: תנובה וריכוז חלב, מוצקי החלב וקוטר בועית השומן

P	LCHF ²	HCLF ¹	
<0.0001	33.37 ± 1.16	40.77 ± 1.65	תנובת חלב (ק"ג ליום)
<0.0001	3.97 ± 0.12	3.5 ± 0.12	שומן (%)
<0.0001	3.17 ± 0.06	3.30 ± 0.06	חלבון (%)
<0.0001	4.8 ± 0.04	4.90 ± 0.04	לקטוז (%)

<0.0001	1.31 ± 0.04	1.43 ± 0.04	תנובת שומן (ק"ג ליום)
<0.0001	1.07 ± 0.03	1.37 ± 0.03	תנובת חלבון (ק"ג ליום)
<0.0001	1.62 ± 0.06	2.04 ± 0.06	תנובת לקטוז (ק"ג ליום)
0.025	3.51 ± 0.08	3.3 ± 0.08	גודל בועית שומן (מיקרומטר)

¹ מנת הזנה מרוכזת, ² מנת הזנה גסה. הערכים מוצגים כממוצע ± שגיאת תקן. ממוצעי תנובת חלב, שומן, חלבון ולקטוז, ואחוזי שומן, חלבון, ולקטוז, חושבו על בסיס שבועי.

בהתאם לשינוי בגודל בועית שומן החלב וריכוז השומן הכללי, נמצאה נטיה להבדל בריכוז הפוספוליפידים הכללי בחלב (טבלה 4). מי שתרם להבדלים אלו היו בעיקר הפוספטידילסרין (PS) שהיה גבוה בכ-30% וכן PE אשר נטה להיות גבוה בכ-17% בקבוצת ה-LCHF ביחס לקבוצת ה-HCLF.

טבלה 4: השפעת מנת ההזנה על ריכוז הפוספוליפידים, הספינגוליפידים בחלב.

P	LCHF ²	HCLF ¹	ריכוז פוספוליפידים (mg/ml)
0.59	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	CHOL
0.42	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	PI
0.15	0.19 ± 0.01	0.17 ± 0.01	PE
0.026	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.01	PS
0.36	0.25 ± 0.02	0.23 ± 0.02	PC
0.14	0.25 ± 0.01	0.22 ± 0.01	SM
0.14	0.97 ± 0.06	0.86 ± 0.06	TOTAL PL
0.24	1.1 ± 0.07	1 ± 0.07	TOTAL MEM

¹ מנת הזנה מרוכזת, ² מנת הזנה גסה. זיהוי וכימות הרכיבים השומניים העיקריים של מעטפת בועית שומן החלב, נעשה עבור כל הדוגמאות של השבוע השני והשלישי של כל סבב. הערכים מוצגים כממוצעים \pm שגיאת תקן. ריכוז הליפידים הממברנלים (מ"ג/מ"ל) שימש אותנו גם לחישוב של הרכב הליפידים הממברנלים (אחוז משקלי) בטבלה 13, וגם עבור תנובת הליפידים הממברנלים (מ"ג/יום) בטבלה n=23.14.

השינויים בהרכב החלב ובתנובתו, הובילו גם לשינוי בתנובת הליפידים הפולאריים אשר באופן כללי עלתה בכ-16% במנה המרוכזת לעומת הגסה (HCLF מול LCHF, בהתאמה, טבלה 5). תוצאות אלו עולות בקנה אחד עם תוצאותיו ל Courviour וחובריו (9) אשר הראו ריכוזי פוספוליפידים גבוהים יותר בפרות המייצרות בועיות שומן גדולות מול קטנות מבחינת הפוספוליפידים, עיקר ההבדלים בניסוי הנוכחי היו בתנובת פוספטידילאטנולאמין (PE) אשר היו גבוהים יותר בטיפול במנה המרוכזת.

טבלה 5: תנובת יומית של הליפידים הממברנלים בחלב

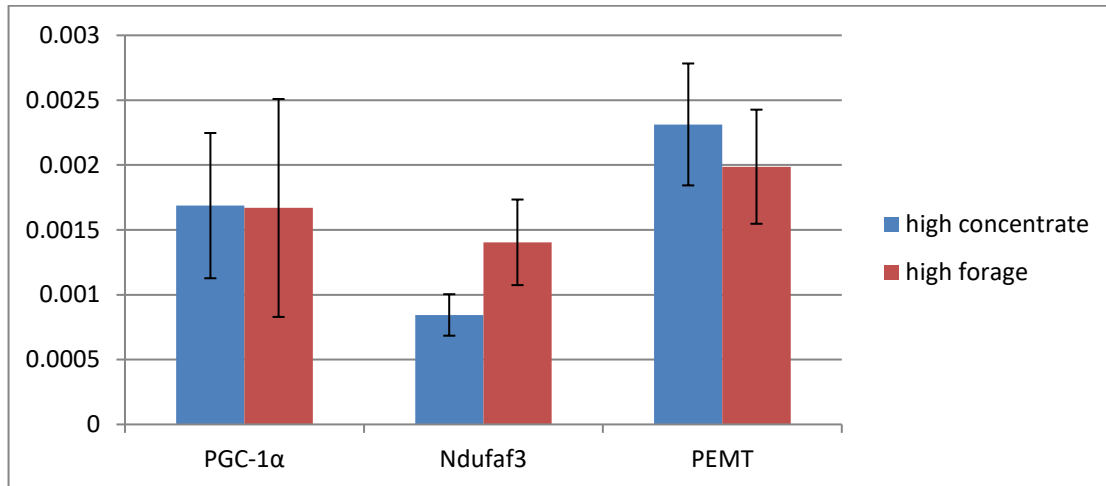
P	LCHF ²	HCLF ¹	תנובה (g/day)
0.009	4.22 \pm 0.41	5.65 \pm 0.4	CHOL
0.19	6.06 \pm 0.52	6.89 \pm 0.51	PI
0.1	6.21 \pm 0.39	6.99 \pm 0.38	PHE
0.78	3.43 \pm 0.42	3.29 \pm 0.42	PS
0.14	8.32 \pm 0.73	9.69 \pm 0.72	PC
0.052	8 \pm 0.60	9.38 \pm 0.59	SM
0.09	31.12 \pm 2.3	35.99 \pm 2.2	PL TOTAL
0.06	35.32 \pm 2.63	41.6 \pm 2.53	TOTAL MEM

¹ מנת הזנה מרוכזת, ² מנת הזנה גסה. הערכים מוצגים כממוצע \pm שגיאת תקן. n=23 (מספר פרות).

אחד המאפיינים המובהקים ביותר של ממברנות ביולוגיות היא היציבות. בספרות מצויין כי יציבות הממברנה נקבעת על פי היחס בין פקטורים מייצבים (דוגמת PC) לעומת פקטורים מערערים (כגון PE). לכן, פעמים רבות, שינויים ביציבות הממברנה מתבטאים בשינוי יחס בין PE לבין PC, כך שכל שהיחס גבוה יותר ממברנה פחות יציבה. בהקשר לבועיות שומן, שינויים ביציבות הממברנה יכולים להצביע על סיכוי רב יותר לאיחוי בין בועיות שומן במהלך נדידתן, מאיזור יצורן בתא לאיזור הפרשתן. בהתאם, בניסוי זה נמצא כי יחס המשקל בין PE ל-PC היה כגבוה יותר בטיפול ב-LCHF, מה שיכול להסביר את הממצא כי בועיות שומן היו גדולות יותר בטיפול זה.

ייצור ה-PE מתרחש בשני נתיבים- ייצור de novo המתרחש במיטוכונדריה, או ייצור מ-PS אשר מתרחש במיטוכונדריה. בחלק הראשון של תכנית זו, הראינו כי טיפות שומן גדולות, מתאפיינות

בממברנה בה ביחס בין PE ל- PC הוא גבוה יותר, וכן בכמות גבוהה יותר של מיטוכונדריות אשר ככל הנראה מהוות את הגורם לייצור מוגבר של PE. גם בחלק הנוכחי של התכנית, בדקנו את רמות ביטוי אחד מהגנים המשמש סמן לפעילות מיטוכונדרילית, NDUFAF. התוצאות מצביעות על עליה מספרית, שלא הגיעה למובהקות סטטיסטית, ברמת הביטוי של NDUFAF, שכאמור מצביע על פעילו או מספר מיטוכונדרילי מוגבר בטיפול ה- LCHF (איור 6).



איור 6: רמות ביטוי של שלושה גנים המשתתפים בבקרה על מטבוליזם התא, בתאי בלוטת החלב מעטין של פרות חלב משני טיפולים תזונתיים: Low - high concentrate (HCLF) ו- concentrate (LCHF).

סיכום:

התוצאות מצביעות על מעורבות הממברנה בקביעת גודל בועית שומן החלב. בעיקר, היחס בין פקטורים מייצבים לפקטורים מערערים, ככל הנראה יכולים להשפיע על מידת האיחוי בין בועיות שומן, המתרחשת בתוך תא האפיתל של בלוטת החלב, לפני הפרש בועית השומן לחללי החלב, ובכך להשפיע על גודל בועית השומן. בין שלל התהליכים הקובעים את הרכב הממברנה, נראה כי להתהליך המתרחש במיטוכונדריה אשר מתמיר PS ל-PE, השפעה ניכרת על הרכב ויציבות הממברנה. כך שמנגנונים מטבוליים השולטים כמות או במספר המיטוכונדריות בתא, אפשרות להשפיע בסופו של דבר על גודל בועית השומן. ממצאי עבודה זו, הן במודל תאי (שלב א') והן במודל אנימאלי (שלב ב') תומכים בהשערת מחקר זו.

1. Mesilati-Stahy, R., Mida, K. and Argov-Argaman, N. (2011) Size-dependent lipid content of bovine milk fat globule and membrane phospholipids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; 59:7427-7435.
2. Jensen, R.G. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*. 85 (2002) 295-350.
3. Duffield T. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2000;16:231–253.
4. Argov-Argaman, N., Mbogori, T., Sebastian, K. and Mabeesh, S.. (2012). Hyperinsulinemic clamp modulates milk fat globule lipid composition in goats. *Journal of Dairy Science*. 95(10): 5776-5787.
5. Mida, K., Shamay, A. and Argov-Argaman, N. (2012). Regulation of fat and membrane synthesis and composition by insulin, prolactin and hydrocortisone in mammary gland epithelial cells. *Agriculture and Food Chemistry*. DOI:10.1021/jf302757j.
6. Cohen, F.S., Akabas, M.H., Zimmerberg, J., Finkelstein, A. Parameters affecting the fusion of unilamellar phospholipid vesicles with planar bilyer membranes, *The Journal of Cell Biology*, 1984, 98, 1054-1062.
7. Hamilton RL, Fielding PE (1989) Nascent very low density lipoproteins from rat hepatocytic Golgi fractions are enriched in phosphatidylethanolamine. *Biochem Biophys Res Commun* 160: 162-173.
8. Cohen, B., Shamay, A. and Argov-Argaman, N. (2015) Regulation of lipid droplet size in mammary epithelial cells by remodeling of membrane lipid composition—a potential mechanism. *PLoS One*. DOI 10.1371/journal.pone.0121645.
9. Courvreur, S., Hartaud, C., Marnet, P.G., Faverdin, P. and Peyrad, J.L. Composition of milk fat from cows selected for milk fat globule size and offered either fresh pasture or a corn silage-based diet. 2007. *J Dairy Sci*. ;90(1):392-403.
10. Argov-Argaman, N. and Mather, I. (2016) Mammary gland, milk biosynthesis and secretion: Secretion of Milk Constituents. *Encyclopedia of Dairy Sciences*-3e.