דו"ח מדעי סופי לתכנית מחקר מספר 362-0461

בחינת מתן Resveratrol להעלאת פעילות Sirtuin-1 ברקמת השומן כאמצעי לשיפור הסטטוס המטאבולי והייצור של פרות חלב בתנאי עקת חום

ד"ר מאיה זכות - המחלקה לחקר בקר וצאן, המכון לחקר בע"ח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.
אי-מייל: mayak@volcani.agri.gov.il

1.4. תקציר תוכנית המחקר

עקת חום הינו גורם העקה הא-ביוטי המשמעותי ביותר בפרות חלב גבוהות תנובה. מרבית הירידה בתנובת החלב מיוחסת כיום לשינויים במטבוליזם האנרגיה בעקבות עקת החום, כגון ירידה בפירוק השומן ועלייה במטבוליזם הפחמימות. החלבון sirtuin-1 (**SIRT-1**) הינו NAD+ dependant protein deacetylase שמהווה סנסור מטבולי מרכזי בתאים. בתגובה לגירוי סביבתי, SIRT-1 מתווך ישירות בין המצב המטבולי של התא למבנה הכרומטין ולבקרת ביטוי גנים, ובכך משפיע על מטבוליזם האנרגיה והתגובה לעקה. הפעלת SIRT-1 מעודדת ליפוליזה ברקמת השומן ומבקרת את מטבוליזם הפחמימות והשומן בכבד. החומר Resveratrol (**RSV**) הינו פוליפנול המצוי בצמחים שונים ובקליפות ענבים, ומשפעל את SIRT-1. אין בספרות מידע על פעילותו ברקמות שומן בבקר. הנחת העבודה היא שבמידה ו-RSV מעלה את פעילות SIRT-1 ברקמת השומן בבקר, ניתן יהיה בעתיד לספקו במזון כאמצעי להגברת הליפוליזה ולשיפור הסטטוס המטבולי וייצור החלב של פרות בתנאי עקת חום.

יעדי ושלבי המחקר: בשנת המחקר הראשונה גייסנו סטודנטית לתואר שני לביצוע פרויקט זה. השקענו מאמצים רבים בפיתוח שיטות להפקת תאים מרקמות שומן מבית המטבחיים, והקמת מערך לעבודה in vitro עם אדיפוציטים בבקר. לאחר מכן, ביצענו סדרת ניסויים לכיול ריכוזי ה-RSV ומשך החשיפה בתאים, וכן בחנו את ההשפעה של RSV על חיוניות התאים. בהמשך המחקר בחנו האם RSV מגביר את ביטוי הגן SIRT-1 באדיפוציטים של בקר בתנאי in vitro, ואת השפעת RSV על אדיפוציטים בתנאים איזותרמיים ובתנאי עקת חום על ביטוי גנים שונים וכן על מרקרים לעקה חמצונית, וביטוי חלבונים הקשורים למטבוליזם השומן בבקר.

תוצאות: בעבודה זו פיתחנו מערך לגידול אדיפוציטים של בקר לחלב מגזע הולשטיין ישראלי בתנאי תרבית ראשונית. כיילנו את המערכת ובחנו את השפעת ה-RSV במינונים של 0μM ו-100μM בתנאי טמפרטורה איזותרמיים (37˚C) ובתנאי עקת חום (41.2 ˚C) קצרה (שעה) וארוכה (16 שעות). בבחינת השפעת RSV על גנים הקשורים למטבוליזם השומן, נמצא כי הוא מעלה ביטוי

הגן הליפוליטי HSL (hormone sensitive lipase) ומוריד את ביטוי הגן הליפוגני FASN (fatty acid synthase). כמו כן, חלה עלייה בביטוי PLIN (perilipin) בהשפעת RSV. כמו כן, נצפתה השפעה של ה-RSV בקידום אפופטוזיס באדיפוציטים באמצעות הגברת ביטוי הגן האפופטוטי BAX והורדה בביטוי הגן הפרוליפרטיבי PCNA. הוספת RSV לא העלתה את הביטוי של הגן Sirt1, אולם ברמת החלבון נצפתה עלייה בביטויו (ללא ניתוח סטטיסטי). בנוסף, נמצא כי RSV הפחית את העקה החימצונית על ידי הורדת רמות הרדיקלים החופשיים במדיום, וסייע בהתמודדות עם עקה על ידי העלאת ביטוי הגן STIP1 (stress induced phosphoprotein 1).

במחקר זה גם נמצאו השפעות ישירות של טיפולי החום על ביטוי גנים באדיפוציטים. בבחינת גנים הקשורים למטבוליזם השומן חלה ירידה בביטוי הגנים HSL ו-MGLL (monoglyceride lipase) בטיפול החום הארוך לעומת הביקורת האיזותרמית. כמו כן נמצאה השפעה של טיפולי החום על ביטוי הגן האפופטוטי BAD וירידה בביטוי הגן הפרוליפרטי PCNA בטיפולי החום הארוך לעומת הביקורת האיזותרמית. בנוסף, בטיפול החום הקצר הייתה עלייה בביטוי HSP70 לעומת הקבוצה האיזותרמית וקבוצת החום הארוך והביטוי של STIP1 היה גבוה בטיפול החום הארוך בלבד לעומת הביקורת האיזותרמית. מרבית האינטראקציות בין ה-RSV לטיפולי החום לא היו מובהקות, כלומר עקת החום לא פגעה ביכולת השפעתו של RSV על האדיפוציטים ביחס לתנאים איזותרמיים.

<u>דיון ומסקנות</u>: בעבודה זו פיתחנו לראשונה מערך לגידול אדיפוציטים של בקר לחלב מגזע הולשטיין ישראלי בתנאי תרבית ראשונית. הממצאים העיקריים של עבודה זו הינם שהוספת RSV לאדיפוציטים של בקר גרמה לעלייה בביטוי הגן הליפוליטי HSL ולירידה בביטוי הגן הליפוגני FASN. בנוסף נמצאה עלייה בסמנים לאפופטוזיס (עלייה בביטוי BAX וירידה בביטוי PCNA), כך שבהתאם להשערת המחקר RSV קידם ליפוליזה ודיכא ליפוגנזה באדיפוציטים, השרה אפופטוזיס ועיכב את הפרוליפרציה. בהתאמה לתפקידו של RSV כנוגד חמצון, מצאנו ירידה בריכוזי ה-MDA וכן עלייה ברמות ה-ORAC במדיום של האדיפוציטים שטופלו ב-RSV לעומת הביקורת. אמנם לא נמצאה השפעה של RSV על ביטוי הגן Sirt1 אולם בידינו ממצאים ראשוניים המראים כי ייתכן וביטויו של Sirt1 עלה ברמת החלבון. מאחר וה-RSV עובד במספר מסלולים, ולא רק דרך Sirt1, ייתכן שהשפעתו על האדיפוציטים הייתה שלא באמצעות שינוי בביטוי Sirt1. ממצא נוסף הוא שעקת החום גרמה לירידה בביטוי הגנים הליפוליטיים HSL ו-MGLL באדיפוציטים, וזאת בהתאמה לכך שידוע כי פרות בתנאי עקת חום אינם מפרקות את רקמת השומן. בבחינת האינטראקציות בין טיפולי החום לטיפולי ה-RSV נמצא כי מרבית האינטראקציות בין ה-RSV לטיפולי החום לא היו מובהקות, כלומר עקת החום לא פגעה ביכולתו של RSV להשפיע על ביטוי הגנים ביחס להשפעתו בתנאים איזותרמיים.

Abstract

Heat stress is the most significant abiotic stress factor in high yielding dairy cows. Most of the decline in milk production is attributed to changes in energy metabolism due to heat stress, such as decreased lipid breakdown and increased carbohydrate metabolism. The protein sirtuin-1 (SIRT-1) is an NAD + dependent protein deacetylase, which is a major metabolic sensor in cells. In response to environmental stimulation, SIRT-1 mediates directly between the cell's metabolic state and the chromatin structure and controls gene expression, thus affecting energy metabolism and stress response. Activation of SIRT-1 promotes lipolysis in the adipose tissue and controls the metabolism of carbohydrates and lipids in the liver. Resveratrol (RSV) is a polyphenol found in various plants and grape shells, and activates SIRT-1. The literature has no information on its activity in adipose tissue in cattle. The working assumption is that if RSV increases SIRT-1 activity in adipose tissue in cattle, food can be supplied in the future as a means of increasing lipolysis and improving the metabolic status and milk production of cows under stress conditions. Objectives and stages of the study: In the first year of research we recruited a graduate student to carry out this project. We have invested great efforts in developing methods for producing cells from adipose tissue from the slaughterhouse, and setting up an array to work in vitro with adipocytes in cattle. We then performed a series of experiments to calibrate RSV concentrations and duration of cell exposure, and also examined the effect of RSV on cell vitality. The study further examined whether RSV increases the expression of SIRT-1 gene in the adipocytes of cattle in vitro conditions, and the effect of RSV on adipocytes under isothermic conditions and heat stress on different gene expression as well as on markers of oxidative stress and protein expression. Results: In this work, we developed a system for the cultivation of the Holstein Israeli dairy cattle adipocytes under primary culture conditions. We calibrated the system and tested the effect of RSV at doses of 0µM and 100µM in isothermic temperature (37C) and under heat stress (41.2 C) short (hour) and long (16 hours). In examining the effect of RSV on genes associated with lipid metabolism, it was found to increase the mRNA expression of hormone sensitive lipase (HSL) gene and reduce the expression of the lipogenic gene FASN (fatty acid synthase). There was also an increase in the expression of PLIN (perilipin) under the influence of RSV. In addition, the effect of RSV on promoting apoptosis in adipocytes was observed by increasing the expression of the apoptotic gene BAX and lowering the expression of the PCNA gene. Adding RSV did not increase the expression of the Sirt1 gene, but the protein level showed an increase in expression (without statistical analysis). In addition, RSV was found to reduce oxidative stress by lowering the levels of free radicals in the medium and to help combat stress by increasing the expression of STIP1 (stress induced phosphoprotein 1) gene. This study also found direct effects of heat treatments on gene expression in adipocytes. In the study of genes associated with fat metabolism, there was a decrease in the expression of genes HSL and monoglyceride lipase in long-term heat treatment compared with isothermic control. The effect of heat treatments on the expression of the apoptotic gene (BAD) and decreased PCNA gene expression in the long-term heat treatments compared to the isothermic control was also found. In addition, the short heat treatment had an increase in HSP70 compared with the isothermic group and the long heat group, and the expression of STIP1 was high in the long heat treatment only compared to the isothermic control. Most interactions between RSV and heat treatments were not significant, i.e heat stress did not impair RSV's effect on adipocytes relative to isothermic conditions. Discussion and Conclusions: In this work, we developed for the first time a system for the cultivation of adipocytes of Israeli Holstein cattle in primary culture. The main findings of this work are that the addition of RSV to the adipocytes of cattle resulted in an increase in the expression of the HSL lipolytic gene and a decrease in the expression of the lipogenic gene FASN. In addition, there was an increase in markers of apoptosis (increase in BAX expression and decrease in PCNA

expression), so that according to the hypothesis RSV promoted lipolysis and suppressed lipogenesis with adipocytes, induced apoptosis, and delayed proliferation. Consistent with the role of RSV as an antioxidant, we found a decrease in MDA concentrations as well as increased ORAC levels in the medium of the RSV-treated adipocytes compared to the control. Although no RSV effect was found on Sirt1 gene expression, we have preliminary findings showing that Sirt1 expression may have increased at the protein level. Because RSV works in several routes, and not only through Sirt1, its effect on adipocytes may have been altered not by altering Sirt1. Another finding was that heat stress caused a decrease in the expression of lipolytic genes (HSL and MGLL) in adipocytes, in line with the fact that cows under heat stress are not known to lipolyze adipose tissue. The interactions between RSV and heat treatments showed that most interactions between RSV and heat treatments were not significant, i.e heat stress did not impair RSV's ability to influence gene expression relative to its effect in isothermic conditions.

1.5 תיאור בעיית המחקר ופערי הידע בנושא:

עקת חום הינו גורם העקה הא-ביוטי המשמעותי ביותר בפרות חלב גבוהות תנובה. עקת החום בעונת הקיץ גורמת להפסדים כספיים נרחבים לענף החלב בעולם כולו בגלל ירידה בתנובות החלב (Collier et al., 2006). הירידה בתנובת החלב בעקת חום נובעת רק בחלקה מירידה בצריכת המזון, ומרבית הירידה בתנובה מיוחסת להשפעה ישירה של עקת החום על מטבוליזם האנרגיה בפרה (Baumgard and Rhoads, 2012). השינויים ההומאורטיים העיקריים בתנאי עקת חום בפרות חלב הינם ירידה בפירוק רקמות שומן, אשר גורמת לירידה בחמצון חומצות שומן וברגישות לאינסולין, ובמקביל חלה עלייה במטבוליזם הפחמימות וברמות האינסולין (Baumgard and Rhoads, 2012). בתנאי עקת חום ישנה הגברה בביטוי ה-heat shock proteins (**HSP**) אשר מגנים על התא מפני נזקי העקה (Yahav et al., 1997) וכן עלייה בייצור reactive oxygen species (**ROS**) שמגבירים את העקה החמצונית ועשויים להשפיע על פעילות HSP וגורמי שעתוק שונים (Sahin et al., 2012).

גישות תזונתיות מסורתיות הניבו הצלחה מסוימת בשיפור תנובת החלב של פרות בעקת חום, לדוגמא באמצעות הקטנת שעור המזון הגס (Miron et al., 2008) או ע"י הוספת שומן מוגן במנה (Moallem et al., 2010) כאמצעים להורדת ייצור החום המטבולי בקיץ. גישה חדשנית אשר עשויה להביא תועלת רבה בחקר המנגנונים המטבוליים המעורבים בבקרת ייצור החלב בפרות בתנאי עקת חום הינה הגישה הנוטרי-גנומית (nutrigenomics). על פי גישה זו, ניתן להשפיע ישירות על ביטוי גנים ברקמות באמצעות הזנה בנוטריינטים ייחודים. מכיוון שפרות בתנאי עקת חום אינן מנצלות באופן מלא את האנרגיה האצורה ברקמת השומן לייצור חלב, תוכנית מחקר זו בוחנת את האפשרות להשפיע על ביטוי חלבון שמהווה סנסור מטבולי מרכזי ברקמת השומן, באמצעות מתן נוטריינט ספציפי כאמצעי להגברת הליפוליזה ולשינויים פיזיולוגיים נוספים שיגרמו לשיפור הסטטוס המטבולי ותנובות החלב של פרות בתנאי עקת חום.

החלבון sirtuin-1 (SIRT-1) הינו NAD+ dependant protein deacetylase השמור ביותר ביונקים, שמהווה סנסור מטבולי מרכזי בתאים (Li, 2013). בתגובה לגירוי סביבתי, SIRT-1

מתווך ישירות בין המצב המטבולי של התא למבנה הכרומטין ולבקרת ביטוי גנים, ובכך משפיע על מטבוליזם האנרגיה והתגובה לעקה (Li, 2013). החלבון SIRT-1 מעודד ליפוליזה ברקמת השומן, מבקר את הפרשת האינסולין בלבלב ואת מטבוליזם הפחמימות והשומן בכבד, והפעלת SIRT-1 מביאה להעלאת חמצון חומצות שומן וירידה בייצור ROS (Li, 2013). בנוסף, נמצא כי SIRT-1 משפיע על התגובה לעקת חום ע"י הארכת הקשירה של heat shock factor 1 (HSF-1) לפרומוטור של HSP-70 (Westerheide et al., 2009).

החומר Resveratrol (RES) הינו פוליפנול המצוי בצמחים שונים ובקליפות ענבים ומשפעל את SIRT-1 (Baur et al., 2006). במחקר שבוצע במכרסמים נמצא כי מתן RES במזון גרם לירידה בצבירת השומן באדיפוציטים באמצעות שפעול SIRT-1 (Bruckbauer et al., 2012). הוספת RES למזון של מכרסמים בתנאי עקת חום הפחיתה את חומרת הפגיעה בכבד שנבעה מעקת החום (Das, 2011), ומחקר אחר הראה כי בשלווים שנחשפו לעקת חום מתן RES הפחית את העקה החמצונית באמצעות שינוי בביטוי HSP וגורמי שעתוק בכבד (Sahin et al., 2012).

המחקר הנוכחי מציע כי ניתן להשתמש בתוסף המכיל RES כמקור להזנה ייעודית של פרות חלב בקיץ. בהתאם לגישה הנוטרי-גנומית, מתן RES כמשפעל של SIRT-1, יהווה שיטה חדשנית לשיפור הסטטוס המטבולי של פרות בעקת חום, וזאת בכמה דרכי פעולה: 1) ירידה בעקה החמצונית הנובעת מעקת החום (ייצור ROS). 2) שינוי התגובה לעקת החום ע"י השפעה על הביטוי של HSP ו-HSF-1 ברקמות. 3) הגברת חמצון חומצות שומן ופירוק רקמת שומן.

הנחת היסוד של מחקר זה הינה ששימוש ב-RES יעלה את פעילות SIRT-1 בתאי שומן בבקר. החלבון SIRT-1 משמש סנסור מרכזי לסטטוס המטבולי של התא, ולכן אנו מניחים שהגברת פעילותו תוביל לעלייה בביטוי אנזימים ליפוליטיים ברקמת השומן ולהגברת הליפוליזה, וכן לירידה בעקה החמצונית בתאים ולשינוי ביטוי ה-HSP. שינויים פיזיולוגיים אלו, אשר יתרחשו בעקבות אספקת RES לתאי השומן, עשויים להשפיע באופן חיובי על הסטטוס המטבולי של פרות בתנאי עקת חום, ובעקבות כך להביא לעלייה בייצור החלב.

1.6. מטרות המחקר:

א. הקמת מערך עבודה עם אדיפוציטים בבקר בתנאי in vitro cell culture, וביצוע ניסוי שייבחן האם RES מעלה את ביטוי SIRT-1 באדיפוציטים בבקר. כמו כן, נבחן השפעת מתן RES על מרקרים לעקה חמצונית ועל ביטוי גנים וחלבונים הקשורים למטבוליזם השומן בבקר.

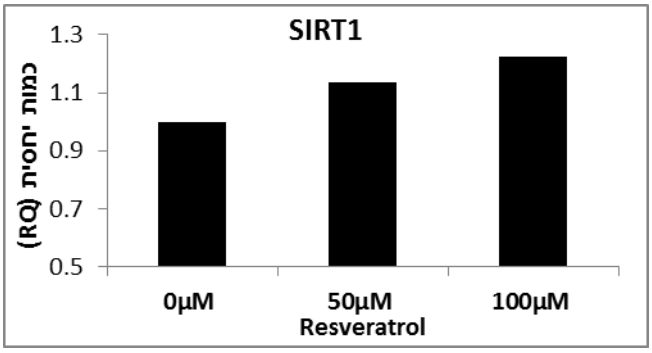
ב. לבחון כיצד RES משפיע על ביטוי גנים באדיפוציטים בתנאים איזותרמיים ובתנאי עקת חום in vitro. בנוסף, נבחן את השפעת RES על מרקרים לעקה חמצונית וביטוי חלבונים הקשורים למטבוליזם השומן בבקר באדיפוציטים בעקת חום.

דו"ח ביצוע ותוצאות המחקר:

לצורך ביצוע מחקר זה, קלטנו בשנת המחקר הראשונה סטודנטית לתואר שני (גב' הדר גבאי) שעסקה בפרויקט. בשנת המחקר האחרונה הדר סיימה את התואר על סמך ממצאי מחקר זה. במהלך שנת המחקר הראשונה עסקנו בהקמת מערך לעבודה בתרביות תאים של אדיפוציטים בבקר. אדיפוציטים הם תאים קשים לגידול מבחינה טכנית, ואנו הראשונים שביססנו שיטה לגידול אדיפוציטים מבקר בתרבית בארץ. לפיכך השקענו מאמצים רבים בהבאת רקמות שומן מבתי מטבחיים, פיתוח שיטה ייחודית להפקת התאים ולגידולם בתרבית במעבדה. בשנת המחקר הראשונה ייצבנו את השיטות לגידול התאים בתרבית, וביצענו 2 ניסויים in vitro בהם נבחנה הקינטיקה של מתן RSV.

בקצרה, רקמות שומן מפרות נאספו מבית מטבחיים והושמו מידית במדיום איסוף. במעבדה, אדיפוציטים הופרדו מן הרקמה באמצעות סרכוז ועיכול אנזימתי עם קולגנאז. התאים הועברו לפלסקים ושהו באינקובטור (37 מעלות). התאים חולקו ל-3 קבוצות טיפול אשר אליהן יתווסף RSV בכמויות שונות (0,50,100 µM). לאחר הדגרה של 24 או 48 שעות עם RSV, התאים הועברו למבחנה והוקפאו עד לאנליזה. במהלך השנה ביצענו אנליזות לבחינת ביטוי mRNA של מס' גנים שקשורים לפעילות SIRT-1 על מנת לבחון את השפעת RSV על האדיפוציטים. תוצאות ניסוי זה אפשרו בחירת ריכוז RSV של 100 µM אשר הינו אפקטיבי להעלאת ביטוי SIRT-1 (איור מס' 1).

<u>איור מס' 1</u> - ביטוי mRNA של Sirtiun-1 (SIRT-1) באדיפוציטים שטופלו ב- Resveratrol בריכוזים שונים למשך 48 שעות.

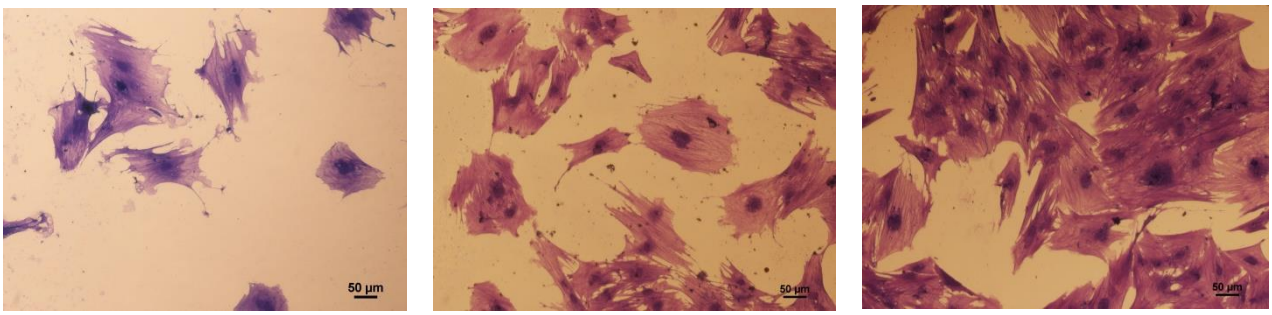


בנוסף, ביצענו צביעות של אדיפוציטים שגודלו בתרבית במעבדה ב-3 סוגי צביעות: צביעה ע"י commassie brilliant blue R-250, צביעה פלורסנטית, של הגרעינים, בכחול ע"י Dapi וצביעת ייעודית לתאי שומן שנקראת ORO (Oil Red O) – ראה **איור מס' 2**.

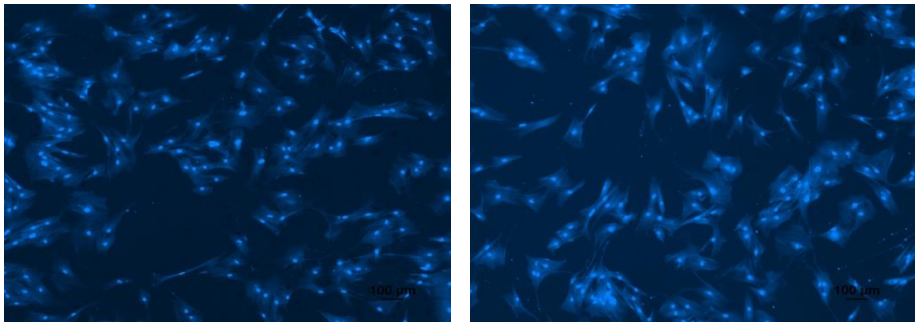
<u>איור מס' 2 – צביעות של אדיפוציטים שגודלו בתרבית במעבדה</u>

Commassie:

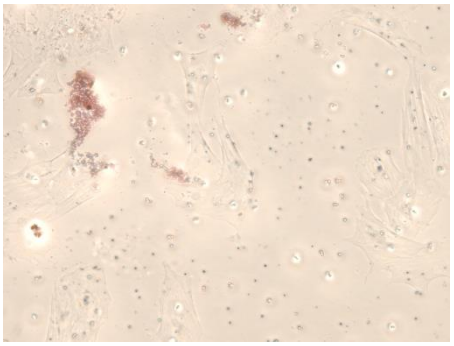
*באריות שהודגרו למשך **48** שעות. ריכוזים משמאל לימין – 0μM 50μM, 100μM



Dapi:

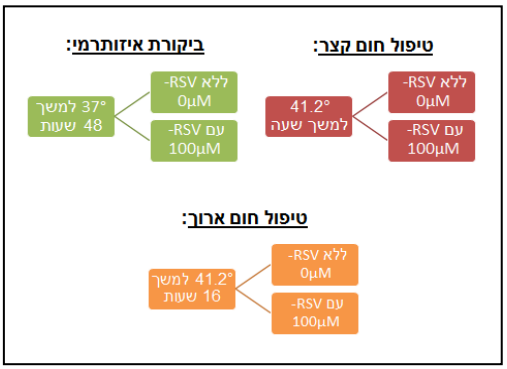


צביעה ב- ORO –



בהמשך המחקר ביצענו סדרת ניסויים בהם בחנו את ההשפעה טיפול ב- RSV במינון 100 μM למשך 48 שעות ב-3 טיפולי חום: א. עקת חום קצרה (1 שעה ב-41.2°C), ב. עקת חום ארוכה (16 שעות ב-41.2°C) או ג. תנאים איזותרמיים (ב-37°C). מכל ניסוי הפקנו RNA לבחינת ביטוי גנים באדיפוציטים בהשפעת הטיפולים, וכן הפקנו חלבון ובדקנו את הביטוי של חלבונים שונים בהשפעת הטיפולים.

בהצגת התוצאות אשתמש בראשי תיבות להצגת הטיפולים באופן הבא:



C-ISO – קבוצת ביקורת - ללא רזברטרול בתנאים איזותרמיים.

RSV-ISO - טיפול ברזברטרול בתנאים איזותרמיים.

C-SH – תנאי חום קצר, ללא רזברטרול.

RSV-SH – תנאי חום קצר, טיפול ברזברטרול.

C-LH – תנאי חום ארוך, ללא רזברטרול.

RSV-LH – תנאי חום ארוך, טיפול ברזברטרול

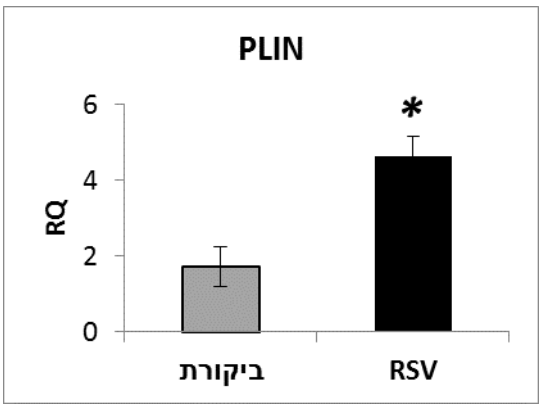
תוצאות אלו מבוססות על חזרות מ-5 פרות שונות ב-5 ניסויים. כל ניסוי נערך בדופליקט.

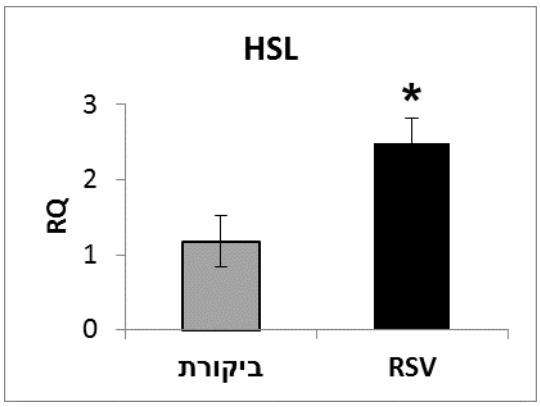
<u>השפעת RSV על ביטוי גנים ללא תלות בטיפולי חום</u>

בבחינת השפעת ה-RSV על ביטוי גנים הקשורים למטבוליזם השומן: HSL, MGLL, PLIN ו-FASN, נמצא כי RSV העלה באופן מובהק את הביטוי של HSL (P = 0.02) (טבלה 1 ואיור 3) ו-PLIN (P < 0.05) (טבלה 1 ואיור 4), והוריד את ביטויו של הגן הליפוגני FASN (P < 0.0001) (טבלה 1 ואיור 5). לא נמצאה השפעה של RSV על הביטוי של MGLL (טבלה מס' 1).

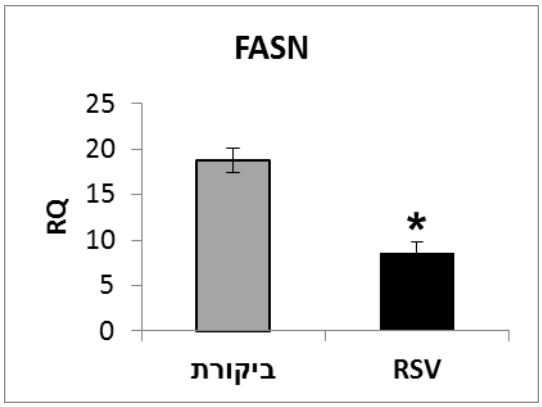
<u>טבלה 1 - השפעת RSV על ביטוי גנים הקשורים במטבוליזם השומן</u>

שם הגן	ביקורת	RSV	SEM	P Value
HSL	1.17	*2.48	0.34	0.02
MGLL	4.37	5.05	0.78	NS
PLIN	1.73	*4.62	0.53	0.05
FASN	18.74	*8.53	1.30	0.0001





<u>איורים 3 ו-4</u> – השפעת ה-RSV על ביטוי הגנים HSL ו-PLIN באדיפוציטים מבקר. כוכבית (*) מייצגת הבדל מובהק (P < 0.05) בין הקבוצות.



איור 5 - השפעת ה-RSV על ביטוי הגן FASN באדיפוציטים מבקר. כוכבית (*) מייצגת הבדל מובהק (P < 0.05) בין הקבוצות.

בבחינת ביטוי גנים הקשורים למסלול העברת הסיגנל של Sirt1: Sirt1, FOXO1, FOXO3 ו-PPARγ, נראה כי טיפול ה-RSV לא העלה את ביטוי Sirt1 ברמת ה-mRNA. כמו כן לא נמצאה השפעה של RSV על הביטוי של FOXO1 ו-PPARγ . עם זאת, טיפול ה-RSV נטה להוריד את ביטוי הגן FOXO3 (P < 0.06) (טבלה מס' 2).

טבלה 2 _ השפעת RSV על הביטוי הממוצע (RQ) של גנים הקשורים במסלול של Sirt1

שם הגן	ביקורת	RSV	SEM[1]	P value
Sirt1	7.61	6.75	1.07	NS
FOXO1	13.80	13.98	2.08	NS
FOXO3	10.40	6.61*	1.21	0.06
PPARγ	15.79	14.21	3.44	NS

[1] SEM = standard error mean

בבחינת ביטוי גנים הקשורים לאפופטוזיס ופרוליפרציה: BAD, BAX ו-PCNA, נמצא כי ה-RSV העלה באופן מובהק את הביטוי של הגן האפופטוטי BAX (P < 0.0001) (טבלה 3) וכן הוריד את הביטוי של הגן PCNA (P < 0.0001) (טבלה 3). לא נמצאה השפעה של RSV על ביטוי הגן BAD (טבלה 3).

טבלה 3 - השפעת RSV על הביטוי הממוצע של גנים הקשורים באפופטוזיס ובפרוליפרציה

שם הגן	ביקורת	RSV	SEM	P Value
BAD	21.46	26.60	2.36	NS
BAX	32.60	*65.16	4.40	0.0001
PCNA	19.81	*8.96	2.86	0.0001

בבחינת ההשפעה של RSV על ביטוי גנים הקשורים בעקה HSF1, HSP70, SOD1 ו-STIP1 ניתן לראות כי ה-RSV העלה את ביטויו של הגן STIP1 ($P < 0.005$) (טבלה 4). לא נמצאה השפעה של RSV על הביטוי של HSF1, HSP70, SOD1 (טבלה 4).

טבלה 4 - השפעת RSV על ביטוי גנים הקשורים בעקה

שם הגן	ביקורת	RSV	SEM	P Value
HSF1	30.88	28.87	2.50	NS
HSP70	6006.57	601.45	2319.66	NS
SOD1	162.27	95.32	30.26	NS
STIP1	95.82	*233.29	21.90	0.005

השפעת טיפולי החום על ביטוי גנים באדיפוציטים של בקר לחלב

בפרק זה נציג את השפעת מצבי החום השונים על ביטוי גנים נבחרים, זאת ללא תלות בטיפולי ה-RSV. טיפולי החום היו: 1) איזותרמי – התאים שהו ב-37˚C למשך 48 שעות. 2) חום קצר - התאים שהו 47 שעות בתנאים איזותרמיים ובשעה האחרונה של הניסוי הועברו לאינקובטור של 41.2˚C למשך שעה. 3) חום ארוך – התאים שהו 32 שעות בתנאים איזותרמיים ולאחר מכן הועברו לאינקובטור של 41.2˚C למשך 16 שעות.

בהתייחס לגנים הקשורים במטבוליזם השומן נמצא כי כאשר האדיפוציטים שהו בתנאי עקת חום של 41.2˚C חלה ירידה בביטוי של שני סוגי הליפאזות – HSL ו-MGLL באדיפוציטים. ביטוי HSL ירד באופן מובהק בקבוצת החום הארוך, הן ביחס לקבוצה האיזותרמית ($P = 0.003$) והן ביחס לקבוצת החום הקצר ($P = 0.05$). בהשוואה לקבוצה האיזותרמית הירידה בביטוי MGLL, בקבוצת החום הקצר, הייתה על גבול המובהקות ($p = 0.06$). ביטויו ירד באופן מובהק בקבוצת החום הארוך ($p = 0.006$). בבחינת השפעת עקת החום על ביטוי גנים הקשורים לתהליכי אפופטוזיס, נראה כי בקבוצת החום הארוך ישנה ירידה מובהקת בביטויו של BAD ביחס לביטויו בקבוצה האיזותרמית ($p = 0.05$). באשר ל-BAX, ביטויו נטה להיות הנמוך ביותר בקבוצת החום

הקצר, זאת ביחס לשתי קבוצות החום האחרות (איזותרמית: P = 0.07, חום ארוך: P = 0.12). ביטוי PCNA היה הנמוך ביותר בטיפול החום הארוך, בהשוואה לקבוצה האיזותרמית (p < 0.001). אמנם לא נמצא הבדל בין קבוצת החום הקצר לקבוצה האיזותרמית אך נמצא הבדל מובהק בין קבוצת החום הקצר לקבוצת החום הארוך (P = 0.01). בבחינת הגנים שתפקידם לסייע בעת מצבי עקה, ניכרה השפעה של טיפולי החום בהעלאת ביטויים של הגנים HSP70 ו-STIP1. נִצפה כי ביטויו של HSP70 היה הגבוה ביותר בקבוצת החום הקצר, זאת ביחס לשתי קבוצות החום (איזותרמית: P = 0.02 חום ארוך: P = 0.03). לעומתו ביטוי הגן STIP1 היה הגבוה ביותר דווקא בקבוצת החום הארוך, זאת הן ביחס לקבוצה האיזותרמית (P < 0.0001) והן ביחס לקבוצת החום הקצר (P < 0.0001).

<u>השפעת RSV וטיפולי החום על ביטוי גנים הקשורים בהעברת הסיגנל של Sirt1</u>

בפרק זה נבחן באופן פקטוריאלי את האינטראקציות בין השפעת ה-RSV להשפעת טיפולי החום. כפי שנראה בטבלה מספר 5, ניכר כי ה-RSV לא השפיע על ביטויו של Sirt1 בתנאים איזותרמיים או בתנאי עקת חום ארוך או קצר. אולם, כאשר בחנו את רמות הביטוי של Sirt1 ברמת החלבון נראה בעין (ללא ניתוח סטטיסטי) כי טיפול ב-RSV נוטה להעלות את ביטויו של Sirt1 ברמת החלבון הן תחת תנאים איזותרמיים והן תחת תנאי עקת חום קצר (איור 6).

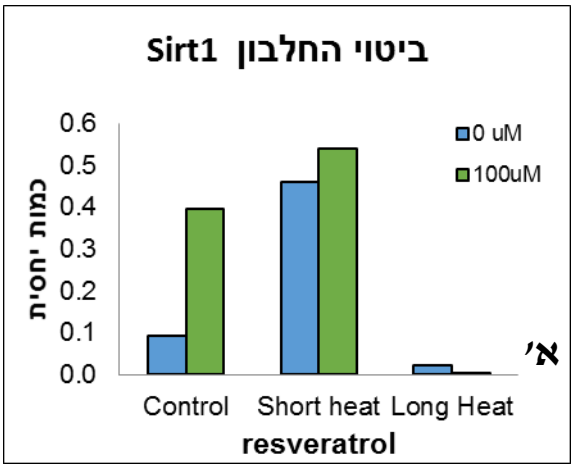
לא נמצאה השפעה של RSV על ביטויו של FOXO1 באדיפוציטים בתנאים איזותרמיים או בטיפול חום קצר, אך ישנה נטייה לירידה בביטוי FOXO3 בעקבות טיפול ב- RSV בקבוצת החום הקצר (RSV-SH) ביחס לקבוצת הביקורת הפנימית (C-SH). מגמה דומה ניתן לראות גם בקבוצת החום הארוך (RSV-LH) לעומת קבוצת הביקורת הפנימית (C-LH) (טבלה 5). לא נצפתה השפעה מובהקת או מגמתית על ביטוי PPARγ לאחר טיפולי ה-RSV בתנאי הטמפרטורה השונים (טבלה 5).

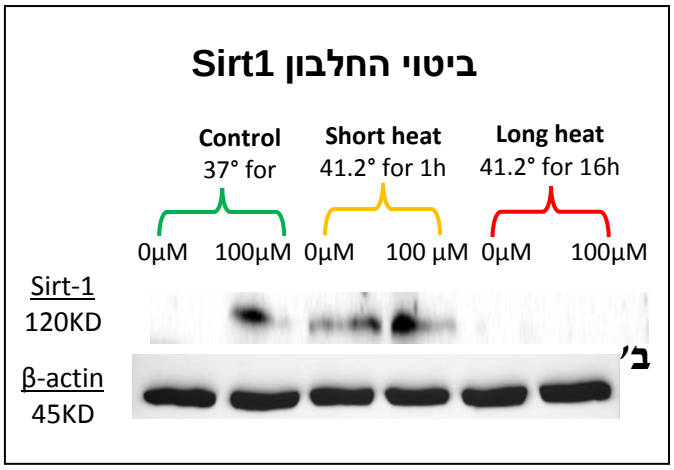
<u>טבלה 5 - שינוי בביטוי היחסי (RQ) של גנים הקשורים במסלול העברת הסיגנל של Sirt1</u>

קבוצה	טיפול	Sirt1		FOXO1		FOXO3		PPARγ	
		RQ	SEM[1]	RQ	SEM	RQ	SEM	RQ	SEM
איזותרמי	ביקורת C-ISO	8.41	1.58	16.18	3.08	10.34	1.75	18.33	5.14
	רזברטרול RSV-ISO	7.46	1.52	15.95	2.95	7.44	1.77	19.28	4.93
חום קצר	ביקורת C-SH	7.72	1.65	12.54	3.20	9.81	1.82	16.12	5.38
	רזברטרול RSV-SH	6.01	1.56	12.56	3.03	# 5.40	1.74	11.95	5.08

חום ארוך	ביקורת C-LH	1.51	6.72	2.93	12.68	1.67	11.05	4.85	12.91
	רזברטרול RSV-LH	1.66	6.77	3.22	13.45	1.84	# 6.98	5.32	11.40

[1] SEM = standard error mean. מספרים המסומנים בסולמית (#) הינם בנטייה למובהקות ($P < 0.13$) ביחס לקבוצת הביקורת הפנימית שלהם.





איור 6– א: השפעת הטיפול ב-RSV על ביטויו של Sirt1 ברמת החלבון (לא נעשתה סטטיסטיקה) ב: אנליזה כמותית לרמות החלבון Sirt1. האנליזה נעשתה באמצעות תוכנת imageJ.

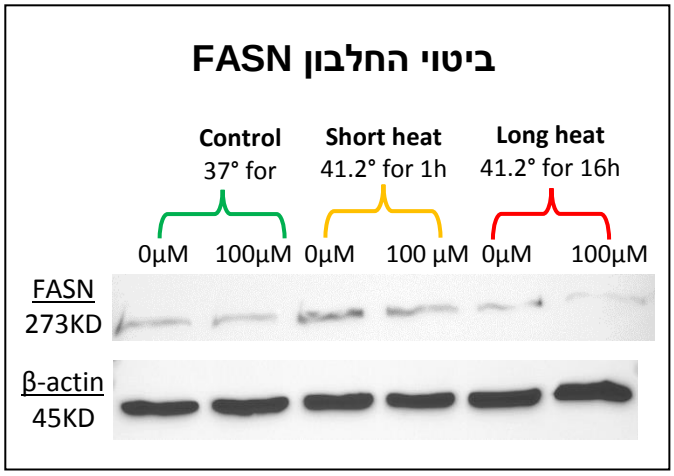
השפעת RSV וטיפולי החום על ביטוי גנים הקשורים במטבוליזם של שומן

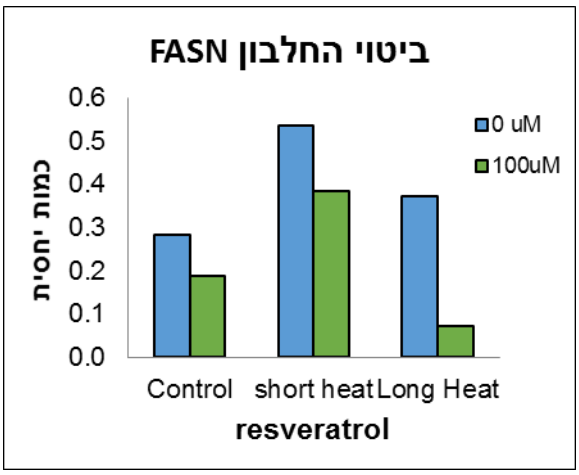
הביטוי הממוצע של HSL עלה באופן מובהק בטיפולי הRSV בחישוב של כל קבוצות הטיפול ב-RSV יחד, כפי שתואר בניתוח התוצאות עפ"י השפעת RSV בלבד בתחילת פרק התוצאות. אך בניתוח של כל קבוצה לחוד (טבלה 6) הנטייה אינה מובהקת סטטיסטית. לא נמצא הבדל בביטוי של MGLL בקבוצות השונות. ניתן לראות כי ה-RSV מעלה באופן עקבי ובצורה מובהקת את רמות ביטויו של PLIN בכל קבוצות טיפולי החום השונות ובהשוואה לקבוצות הביקורת הפנימיות שלהן (P = 0.02 – RSV-ISO, P = 0.02 – RSV-SH ו- P = 0.04 – RSV-LH) (טבלה 6).

נמצאה ירידה מובהקת בביטוי הגן הליפוגני FASN בכל תנאי הטמפרטורה (P = 0.0004, RSV-ISO – P = 0.0001 – RSV-SH ו- P = 0.02 – RSV-LH) (טבלה 6). ביטוי FASN ברמת החלבון הציג מגמה, שאינה סטטיסטית, אך דומה לביטויו ברמת ה-mRNA, של ירידה בביטוי עבור כל קבוצות ה-RSV בכל תנאי החום ביחס לביקורת (איור 7).

טבלה 6 - השפעת RSV וטיפולי החום על ביטוי גנים הקשורים במטבוליזם השומן

קבוצה	טיפול	HSL		MGLL		PLIN		FASN	
		SEM	RQ	SEM	RQ	SEM	RQ	SEM	RQ
איזותרמי	ביקורת C-ISO	0.51	1.79	1.16	5.47	0.79	1.99	1.93	19.96
	רזברטרול RSV-ISO	0.48	# 3.19	1.11	7.34	0.76	* 4.9	1.83	* 9.004
חום קצר	ביקורת C-SH	0.53	1.21	1.21	4.39	0.82	1.44	1.94	20.57
	רזברטרול RSV-SH	0.50	# 2.71	1.15	4.41	0.78	* 4.59	1.90	* 8.04
חום ארוך	ביקורת C-LH	0.48	0.52	1.10	3.27	0.75	1.76	1.88	15.68
	רזברטרול RSV-LH	0.53	1.55	1.20	3.41	0.83	* 4.39	2.03	* 8.56





איור 7 – א: השפעת הטיפול ב-RSV על ביטויו של FASN ברמת החלבון (לא נעשתה סטטיסטיקה) ב: אנליזה כמותית לרמות החלבון FASN. נעשתה באמצעות תוכנת imageJ.

השפעת RSV וטיפולי החום על ביטוי גנים הקשורים באפופטוזיס ופרוליפרציה

בעוד של-RSV לא ניכרה השפעה על ביטוי הגן BAD בטיפולי החום, ניכר כי הוא דווקא מעלה באופן מובהק את ביטוי הגן BAX בכל קבוצות הטיפול תחת תנאי החום השונים, זאת ביחס לקבוצות הביקורת שלהם (RSV-ISO – P = 0.0004, RSV-SH – P = 0.002 ו- RSV-LH – P =

0.01) (טבלה 7). ניכר ה-RSV מסייע בהעלאת ביטויו של PCNA בכל קבוצות החום בהשוואה לאלו שלא טופלו ב-RSV (RSV-ISO – P = 0.004, RSV-SH – P = 0.001 ו- RSV-LH – P = 0.008) (טבלה 7).

טבלה 7_-_שינוי בביטוי היחסי (RQ) של גנים הקשורים באפופטוזיס ופרוליפרציה

קבוצה	טיפול	BAD		BAX		PCNA	
		SEM	RQ	SEM	RQ	SEM	RQ
איזותרמי	ביקורת C-ISO	3.49	25.18	6.52	34.39	4.27	35.33
	רזברטרול RSV-ISO	3.35	29.03	6.25	* 71.5	4.10	* 15.7
חום קצר	ביקורת C-SH	3.64	22.35	6.78	24.95	4.47	33.75
	רזברטרול RSV-SH	3.45	26.35	6.43	* 59.31	4.22	* 8.93
חום ארוך	ביקורת C-LH	3.32	16.86	6.20	38.46	4.03	20.36
	רזברטרול RSV-LH	3.66	#24.39	6.82	* 64.68	4.42	* 2.27

השפעת RSV וטיפולי החום על ביטוי גנים הקשורים במצבי עקה

ניכר כי הגן היחיד שניכר שינוי מובהק בביטוי שלו בעקבות טיפולי ה-RSV הוא הגן STIP1. ביטויו של גן זה עלה בכל קבוצות טיפול החום השונות באופן מובהק (טבלה 8). לא נמצאה הבדל בביטוי של HSF1 או HSP70 בכל אחד מתתי הקבוצות (טבלה 8).

בחינת השפעת RSV על רמות הרדיקלים החופשיים בתאי השומן תחת תנאים איזותרמיים

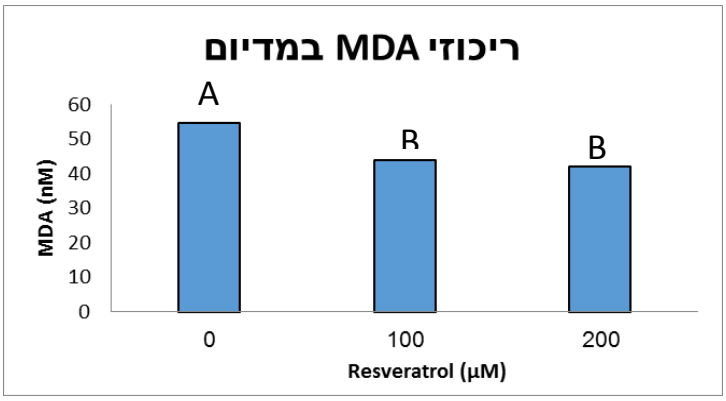
על מנת לבחון את השפעותיו של ה-RSV על רמות הרדיקלים החופשיים במדיום בתגובה להשפעת הטיפול ב-RSV בוצעו שתי אנליזות. האנליזה הראשונה (TBARS) בחנה את רמות ה-ROS באמצעות בחינת ריכוזי MDA. MDA מהווה סמן עקב היותו תוצר בתהליך פראוקסידציה של חומצות השומן. שיטת ORAC, בדקה את רמות נוגדי החמצון על ידי כימות סמן פלורסנטי במדיום ובנוכחות גורם חמצוני.

נמצא כי RSV מוריד באופן מובהק את ריכוזי ה-MDA בקבוצה שטופלה ב-RSV 100μM ($p = 0.01$) ובקבוצה שטופלה ב-RSV 200μM ($p = 0.02$), ביחס לקבוצה שלא טופלה ב-RSV.

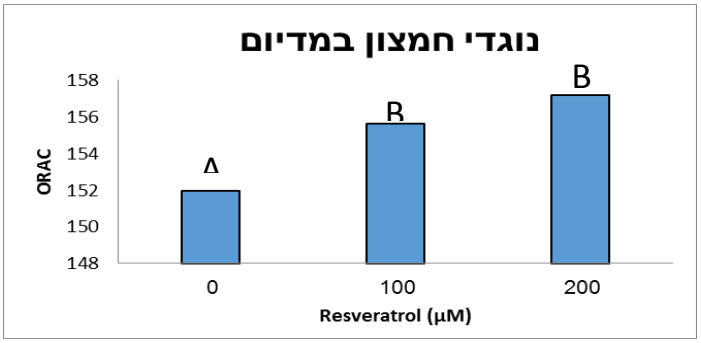
קבוצה	טיפול	HSF1		HSP70		SOD1		STIP1	
		SEM	RQ	SEM	RQ	SEM	RQ	SEM	RQ
איזותרמי	ביקורת C-ISO	3.94	30.98	3590.42	4355.58	44.65	149.59	34.18	45.89
	רזברטרול RSV-ISO	3.51	31.79	3192.86	-2517.66	42.42	73.68	30.45	* 180.41
חום קצר	ביקורת C-SH	3.21	27.87	3794.21	9248.11	52.92	166.90	33.08	50.03
	רזברטרול RSV-SH	3.61	25.15	3301.85	6659.87	43.76	129.96	31.44	* 182.87
חום ארוך	ביקורת C-LH	3.47	33.78	3142.58	4416.00	42.26	170.33	32.20	191.55
	רזברטרול RSV-LH	3.85	29.69	3534.59	-2337.87	46.65	82.31	33.55	* 336.6

טבלה מספר 8 - שינוי בביטוי היחסי (RQ) של גנים הקשורים לעקה ככלל ולעקת חום בפרט

ריכוזי ה-MDA נטו להיות נמוכים יותר בטיפול ה-RSV 200μM לעומת ה-100μM ($p = 0.14$) (איור 35). בנוסף, נמצא כי RSV, מעלה את רמות ה-ORAC המייצגות את הפעילות נוגדת החמצון בשעת איסוף המדיום (לאחר 48 שעות הניסוי). ניתן לראות זאת הן בקבוצה שטופלה ב-RSV 100μM והן בקבוצה שטופלה ב-RSV 200μM וזאת ביחס לקבוצת ה-0μM ($p = 0.05$ ו- $p = 0.04$, בהתאמה). בין קבוצות הטיפול עצמן (בין 100μM ל-200μM) לא נמצא הבדל מובהק ($p = 0.5$) (איור 36).



איור 35 - ריכוזי MDA במדיום הגידול של אדיפוציטים ששהו תחת תנאים איזותרמיים לאחר 48 שעות אינקובציה עם RSV.



איור 36 - ביטוי רמות נוגדי החמצון שנבדקו במדיום גידול התאים, שנאסף מהבאריות, ששהו תחת תנאים איזותרמיים, בעת קצירת הניסוי. רמות נוגדי החמצון מבוטאים באמצעות שיטת ORAC.

דיון ומסקנות

השפעת RSV וטיפולי החום על ביטוי גנים הקשורים במטבוליזם של שומן

HSL ו-MGLL הינן ליפאזות. הנחת המחקר הייתה שהשימוש ב-RSV יעלה את ביטויים של גנים הקשורים בהליך הליפוליטי (Rayalam et al., 2008; Contreras et al., 2017) על מנת לעודד את פירוק רקמת השומן, הן בתנאים איזותרמיים והן בתנאי חום. כאשר בחנו במחקר זה את השפעת טיפולי החום בלבד, וללא תלות ב-RSV, נראה כי רק מעצם חשיפת תאי השומן לחום חלה ירידה בביטוי שתי הליפאזות. ממצא זה תואם לספרות אשר מציגה את נזקי עקת החום בהורדת היכולת בפירוק רקמת השומן (Baumgard and Rhoads, 2012).

בבחינת השפעת ה-RSV, נראה כי RSV מעלה את ביטוי HSL באדיפוציטים באופן מובהק. בהסתכלות על האינטראקציות בין השפעת ה-RSV להשפעת טיפולי החום, ניכר כי השימוש ב-RSV נוטה להעלות את הביטוי של HSL כצפוי מהספרות (Rayalam et al., 2008). במחקר הנוכחי לא מצאנו השפעה של RSV על ביטוי MGLL, ואכן אין עדויות בספרות על ההשפעה של

RSV על אנזים זה. בהתאם להנחת מחקר זה, עבודה זו הינה הראשונה אשר מראה כי RSV מעלה כמשוער את ביטוי הגנים הליפוליטים באדיפוציטים בקר ואף נוטה להעלות את ביטויו תחת תנאי עקת חום.

תפקיד החלבון PLIN הינו להגן על בועיות השומן מפני ליפאזות. בתהליך הליפוליזה הגנתו מוסרת, דבר שמאפשר לליפאזות חופשיות בעשיית תפקידן בפירוק בועיות השומן (נעשה בעיקר על ידי HSL) (Contreras et al., 2017). תוצאות המחקר אכן הראו באופן שונה מהמשוער כי ה-RSV דווקא מעלה באופן מגמתי ומובהק את ביטויו של PLIN בכל קבוצות החום השונות וגם ללא תלות בטיפולי החום. מחקר נוסף שבחן את השפעת ה-RSV על מטבוליזם השומן, הראה תוצאות שאינן מובהקות עבור ביטויו של PLIN: החוקרים הסבירו זאת בכך שכנראה השפעת ה-RSV על מטבוליזם השומן אינו דרך שינוי בביטויו של PLIN, אלא ייתכן שזה בעקבות השינוי ברמת זרחונו (Alberdi et al., 2011). PLIN מעוכב על ידי זרחון, מחקר אשר בדק את רמות זרחונו של PLIN בתגובה לטיפול ב-RSV אכן הראה עלייה בזרחון לאחר השימוש ב-RSV והורדת פעילותו של PLIN (Gheldof et al., 2017).

בבדיקת ביטוי הגן FASN, חלבון שתפקידו שבונה את חומצות השומן לצורך ליפוגנזה (Khan et al., 2014), ניכר כי השפעת ה-RSV הינה משמעותית ומובילה לירידה מובהקת בביטוי הגן, גם ללא תלות בתנאי החום השונים. גם מבדיקה פקטוריאלית, שבחנה את האינטראקציות בין השפעת ה-RSV להשפעת טיפולי החום, ניכרו ממצאים דומים לפיהם ביטויו של FASN ירד באופן מובהק בכל קבוצות הטיפול תחת תנאי החום השונים. כאשר בדקתי את הביטוי החלבוני של FASN, אמנם לא היו די חזרות לסטטיסטיקה, אך התוצאות חפפו לתוצאות ביטוי ה-mRNA וחיזקו אותן. ממצא זה יכול להעיד על עיכוב הליפוגנזה כשם שמדווח בספרות כאחת מהשפעותיו של ה-RSV (Gambini et al., 2015) . מעבר לכך ממצא זה תואם את המחקר שהראה כי RSV מוריד את ביטויו של FASN אף ברמת החלבון (Khan et al., 2014).

ממצאים אלו המראים כי RSV גרם לעלייה בביטוי אנזים ליפוליטי (HSL) וירידה בביטוי אנזים ליפוגני (FASN) באדיפוציטים בבקר הינם חדשניים ומראים כי RSV מסייע בפירוק בועיות השומן בתאי השומן גם תחת תנאי עקת חום.

<u>השפעת RSV על ביטוי גנים הקשורים להעברת הסיגנל של Sirt1</u>

בהסתכלות כללית על השפעת ה-RSV על ביטוי הגן ל- Sirt1, לא ניכרה השפעה מובהקת של ה-RSV בתנאים איזותרמיים או תחת תנאי עקת חום. ממצא זה אינו תואם מחקרים אחרים בהם נמצאה עלייה בביטוי הגן Sirt1 בהשפעת RSV (Surh et al., 1999; Bastin and Djouadi, 2016) אף במינונים נמוכים יותר של 3-10μM (Bai et al., 2008). כמו כן, במחקרים שבוצעו באדיפוציטים של בקר ביטויו של Sirt1 עלה בצורה מובהקת בתגובה לטיפול ב-RSV במינונים של

100-400μM גם ברמת ה-mRNA (Li et al., 2015; Liu et al., 2017). במחקר שנעשה בקו תאי שומן (3T3-L1) (Picard et al., 2004), הראו כי לתאים לוקח 5 ימים לבטא בצורה הגבוהה ביותר את Sirt1 וזאת בתוספת אינסולין במדיום. התאים שאנו גידלנו פוצלו תוך יומיים 3 פעמים לפני תחילת הניסוי, ומדיום הגידול שלהם לא כלל אינסולין. ייתכן ואחת מהסיבות לחוסר השפעת ה-RSV על Sirt1 ברמת ה-mRNA טמונה במספר ימי הגידול ומרכיבי המדיום. בנוסף, ייתכן ואי ההשפעה של ה-RSV על ביטויו של Sirt1, הובילה לכך שגם גנים נוספים שקשורים להעברת הסיגנל של Sirt1 לא השתנו. למרות זאת, כפי שציינתי מבדיקת Sirt1 ברמת החלבון נראה בעין כי RSV הביא לעלייתו בקבוצות RSV-ISO (ביחס ל-C-ISO) ובקבוצת RSV-SH (ביחס ל-C-SH). תוצאות אלו ברמת החלבון אכן חופפות לספרות (Picard et al., 2004), ומכאן שייתכן ומודיפיקציות לאחר הביטוי גרמו לכך שלמרות וביטוי הגן היה זהה, ה-RSV גרם לעלייה ב-Sirt1 ברמת החלבון. במחקר זה לא ניתחנו סטטיסטית את ההשפעה של RSV על ביטוי Sirt1 ברמת החלבון כיוון שאנליזה זו דרשה כמות גדולה של תאים להפקה אשר לא הייתה זמינה במרבית הניסויים שביצענו עם התאים.

כאשר הגנים ממשפחת ה-Forkhead box O (FOXO) משופעלים הם עוברים מהציטופלזמה אל הגרעין שם הם מאקטבים או מעכבים גנים. בהתאם לסיגנל המושרה, גני ה- FOXO's יכולים, בין היתר, לבקר תהליכים אפופטוטים. FOXO1 ו-FOXO3 הינם גנים אשר ביטויים מושפע מביטויו של Sirt1 (Motta et al., 2004). מחקר שבחן את השפעתו של RSV על תאי שומן של בקר הראה כי Sirt1 עושה דה-אצטילציה לחלבון FOXO1 ומעודד אפופטוזיס (Chen et al., 2009). מחקר נוסף הראה כי RSV מוביל לירידה ברמות ה- mRNA של FOXO1 בעקבות שפעול Sirt1 (Costa et al., 2011). במחקר הנוכחי לא נמצאה השפעה של RSV על ביטוי FOXO1, אך נמצא כי RSV נטה להוריד את הביטוי של FOXO3 באדיפוציטים, וזאת בהתאמה לכך שתחת תנאי עקה שפעול Sirt1 מביא לעיכוב FOXO1 ו-FOXO3 (Lavu et al., 2008). ייתכן והירידה בביטוי FOXO3, אשר מעודד תהליכי אפופטוזיס (Daitoku et al., 2011), ובמקביל העלייה בביטוי הגן האפופטוטי BAX והירידה בביטוי הגן הפרוליפרטיבי PCNA שנמצאו בהשפעת RSV, קשורים לאיזון מערכתי של תהליכי אפופטוזיס המתרחשים באדיפוציטים בעקבות החשיפה ל-RSV.

מחקרים רבים הראו ש-RSV מסייע בהורדת ביטוי הגן PPARγ, אשר הינו חלבון עיקרי בבקרת רקמת השומן ואחראי על צבירת שומן (Baile et al., 2011; Costa et al., 2011). Sirt1 מדמה מצב של הגבלה קלורית, נקשר לגנים במסלולו של PPARγ ומוביל לעיכובו (Picard et al., 2004). במחקר הנוכחי לא מצאנו השפעה של RSV על ביטוי Sirt1 , וייתכן שמסיבה זו גם לא נמצאה השפעה על הביטוי של PPARγ. RSV עובד דרך מספר מסלולים ולאו דווקא דרך שפעולו או העלאת ביטויו של Sirt1. ייתכן וההשפעות של RSV היו ברמת החלבון או ברמת שפעול או עיכוב פעילות החלבונים.

רזברטרול והשפעותיו האפופטוטיות והפרוליפרטיות

ממצאי המחקר מראים כי RSV מעלה את ביטויו של BAX באדיפוציטים באופן מובהק. בכל קבוצה אשר קיבלה את טיפול ה-RSV הוא הביא להעלאת ביטוי BAX. העלייה אכן מגמתית, מובהקת ותואמת למחקר (Liu et al., 2017) שהראה של-RSV יש יכולת בקידום אפופטוזיס באדיפוציטים בבקר בין היתר דרך העלאת ביטויו של BAX. בדיקת ביטוי הגן BAD לא הראתה מגמה דומה. כאשר התא נמצא במסלול תקין, חלבון בשם BCL-XL מעכב את BAX. במצב של קידום אפופטוזיס BAD מסיר את העיכוב של BCL-XL על ידי כך שמעכב אותו בעצמו (Liu et al., 2017) ייתכן ו-RSV אינו מביא להעלאת ביטויו אלא רק לשפעולו, ולכן לא ניכר כי ביטויו הגן BAD עלה בצורה מובהקת. הירידה המובהקת בביטוי PCNA התרחשה גם בתנאי עקת חום ללא קשר ל-RSV וגם בהשפעת RSV ללא קשר לטיפולי החום. גן זה אחראי על תיקון נזקי DNA ומסייע לפרולירפציה תאית (Reagan-Shaw et al., 2004). ייתכן ועקת החום פגעה ביכולתו של התא להתחלק ובעקבות זאת חלה ירידה בביטויו של PCNA בתנאים אלו. טיפול ה-RSV גם כן הביא להורדת ביטוי PCNA. ייתכן והסיבה לכך טמונה בקידום אפופטוזיס (Liu et al., 2017) בהשפעת ה-RSV או לחילופין קשורה לעיכוב הליפוגנזה באדיפוציטים (Jones et al., 2005).

השפעת RSV וטיפולי החום על ביטוי גנים הקשורים לעקה

חשיפה של תאים לטמפרטורה גבוהה גורמת למספר חריגות בתפקוד התאי, אשר כוללות בתוכן עיכוב בייצור חלבונים, פגיעה במבנה החלבונים ובתפקודם, שינויים מורפולוגיים הנגרמים בעקבות שינויים במבנה השלד התוך תאי ועוד (Collier et al., 2008).

תפקידו של HSP70 הוא להוות חלבון סוכך (שפרון) ולסייע בהתמודדות התא כנגד מצב העקה, במקרה הזה עקת חום, הן באופן ישיר והן באופן עקיף (Dash et al., 2016). בעבודה זו נמצא כי ביטויו של HSP70 עלה בהשפעת החום הקצר לעומת הביקורת האיזותרמית וטיפול החום הארוך. לעומת זאת, ביטויו של STIP1, אשר מהווה קו-שפרון ונועד לסייע ל-HSP70 (בין היתר) בתהליך קיפול החלבונים מחדש (Odunuga et al., 2004), עלה באופן מובהק דווקא בהשפעת טיפול החום הארוך לעומת הביקורת האיזותרמית. מחקר שבחן את השפעת החום הקצר והחום הארוך על ביטויים של גנים ממשפחת HSF וגנים ממשפחת HSP הראה כי ביטוי ה-mRNA של גנים אלו משתנה כתלות ברקמה הנבדקת ובמשך החשיפה לעקת החום (Xie et al., 2014). ייתכן ובתאי השומן העלייה ב-HSP70 מאוד מהירה על מנת לסייע לתא להתמודד עם עקת החום האקוטית. ייתכן וביטויו של STIP1 היה הגבוה ביותר בקבוצת החום הארוך על מנת לסייע תחת הסטרס הממושך. ניתן להסביר את אי השינוי בביטויו של HSF1 על ידי כך שעליה בפעילותו אינה כרוכה בעליה בביטויו. תפקידו הוא להיקשר לאזור ב-DNA שנקרא heat shock elements (HSE)

ולגרום לאקטיבציה המובילה לתרגום של HSP. לאחר הסיוע של HSF בייצורם של HSP's הוא מתנתק מהם וחוזר להיקשר אל ה-HSE (Xie et al., 2014). חוסר השינוי בביטוי HSF1 לא גרע מהיכולת לבטא את HSP70, באופן דומה לקבוצות הביקורת שלא טופלו ב-RSV.

תפקידו של SOD1 הינו להגן על התא בשעה בה הוא נחשף לעקה חמצונית (Sea et al., 2015) מאחר ועקת החום גורמת לעליה בעקה החמצונית (Sahin et al., 2012) ומאחר וה-RSV הינו נוגד חמצון (Nguyen and Stamper, 2017), היינו מצפים שביטויו של SOD1 יעלה באופן מובהק. מעבר לכך ה-RSV אף מסוגל לשפעל באופן ישיר את SOD1 (Ma et al., 2014). השערתי היא כי גם במקרה הזה שפעול אינו אומר דווקא עליה בביטוי הגן. חיזוק לכך נמצא בבדיקות הנוספות שהראו שה-RSV אכן מסייע בהורדת רמות הרדיקלים החופשיים ובהעלאת נוגדי החמצון במדיום. אכן, נצפה כי השימוש ב-RSV העלה את רמות נוגדי החמצון במדיום באופן מובהק (בדיקת ORAC) ויתר על כן נצפה כי נוכחות ה-RSV הורידה באופן מובהק את רמותיו של MDA, המהווה סמן לרמות הרדיקלים החופשיים במדיום. בדיקות אלו מוכיחות את היות ה-RSV נוגד חמצון. שנית, ניכר שרמות הרדיקלים החופשיים במדיום הינן נמוכות יותר לאחר הטיפול ב-RSV משמע שהשימוש בו כמעודד ליפוליזה וחמצון חומצות שומן לא העלה את העקה החמצונית.

מסקנות

בהתאם להשערת המחקר, הוספת RSV לאדיפוציטים בבקר גרמה לעלייה בליפוליזה אשר התבטאה בעלייה בביטוי הגן הליפוליטי HSL ולירידה בביטוי הגן הליפוגני FASN, ובנוסף נמצאה עלייה בסמנים לאפופטוזיס (עלייה בביטוי BAX וירידה בביטוי PCNA). כמו כן, בהתאמה לתפקידו של RSV כנוגד חמצון, מצאנו ירידה בריכוזי ה-MDA וכן עלייה ברמות ה-ORAC במדיום של האדיפוציטים שטופלו ב-RSV לעומת הביקורת. ממצא נוסף ממחקר זה הוא שעקת החום גרמה לירידה בביטוי הגנים הליפוליטיים HSL ו-MGLL באדיפוציטים, וזאת בהתאמה לכך שידוע כי פרות בתנאי עקת חום אינם מפרקות את רקמת השומן. ממצאי המחקר מראים כי השימוש ב-RSV מוריד את רמות הרדיקלים החופשיים וכי הוא מהווה נוגד חמצון. מכאן שהשימוש ב-RSV, אשר הוביל לעלייה בליפוליזה, גם סייע בשיפור הסטטוס החמצוני בתאי השומן. על סמך ממצאי מחקר זה ניתן להמליץ על ביצוע ניסוי הקדמי לבחינת ההשפעה של תוסף RSV מוגן כרס לפרות חלב בתנאי עקת חום.

רשימת ספרות מצוטטת:

Alberdi, G., V.M. Rodríguez, J. Miranda, M.T. Macarulla, N. Arias, C. Andrés-Lacueva, and M.P. Portillo. 2011. Changes in white adipose tissue metabolism induced by resveratrol in rats. Nutr. Metab. (Lond). 8:29.

Bai, L., W.J. Pang, Y.J. Yang, and G.S. Yang. 2008. Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. Mol. Cell. Biochem. 307:129–140.

Baile, C.A., J.Y. Yang, S. Rayalam, D.L. Hartzell, C.Y. Lai, C. Andersen, and M.A. Della-Fera. 2011. Effect of resveratrol on fat mobilization. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1215:40–47.

Bastin, J., and F. Djouadi. 2016. Resveratrol and myopathy. Nutrients 8.

Baumgard LH and Rhoads RP. 2012. Ruminant Nutrition Symposium: ruminant production and metabolic responses to heat stress. J Anim Sci. 90(6):1855-65.

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, et al. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature. 444(7117):337-342.

Bruckbauer A, Zemel MB, Thorpe T, Akula MR, Stuckey AC, Osborne D, Martin EB, Kennel S, Wall JS. 2012. Synergistic effects of leucine and resveratrol on insulin sensitivity and fat metabolism in adipocytes and mice. Nutr Metab (Lond). 22;9(1):77.

Chen, C.J., W. Yu, Y.C. Fu, X. Wang, J.L. Li, and W. Wang. 2009. Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1-FoxO1 pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. 378:389–393.

Collier RJ, Dahl GE, VanBaale MJ. 2006. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. J Dairy Sci. 89(4):1244-53.

Collier, R.J., J.L. Collier, R.P. Rhoads, and L.H. Baumgard. 2008. Invited Review: Genes Involved in the Bovine Heat Stress Response. J. Dairy Sci. 91:445–454.

Contreras, G.A., C. Strieder-barboza, and W. Raphael. 2017. Adipose tissue lipolysis and remodeling during the transition period of dairy cows 1–12.

Costa, C.D.S., F. Rohden, T.O. Hammes, R. Margis, J.W. Bortolotto, A.V. Padoin, C.C. Mottin, and R.M. Guaragna. 2011. Resveratrol upregulated SIRT1, FOXO1, and adiponectin and downregulated PPARγ1-3 mRNA expression in human visceral adipocytes. Obes. Surg. 21:356–361.

Das A. 2011. Heat stress-induced hepatotoxicity and its prevention by resveratrol in rats. Toxicol Mech Methods. 21(5):393-9.

Daitoku, H., J. ichi Sakamaki, and A. Fukamizu. 2011. Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 1813:1954–1960.

Dash, S., A.K. Chakravarty, A. Singh, A. Upadhyay, M. Singh, and S. Yousuf. 2016. Effect of heat stress on reproductive performances of dairy cattle and buffaloes: A review. Vet. World 9:235–244.

Gambini, J., M. Inglés, G. Olaso, R. Lopez-Grueso, V. Bonet-Costa, L. Gimeno-Mallench, C. Mas-Bargues, K.M. Abdelaziz, M.C. Gomez-Cabrera, J. Vina, and C. Borras. 2015. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. Oxid. Med. Cell. Longev. 2015.

Gheldof, N., S. Moco, C. Chabert, T. Teav, D. Barron, and J. Hager. 2017. Role of sulfotransferases in resveratrol metabolism in human adipocytes. Mol. Nutr. Food Res. 61:1–10.

Jones, J.R., C. Barrick, K.-A. Kim, J. Lindner, B. Blondeau, Y. Fujimoto, M. Shiota, R.A. Kesterson, B.B. Kahn, and M.A. Magnuson. 2005. Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance.. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102:6207–12.

Khan, A., A.N. Aljarbou, Y.H. Aldebasi, S.M. Faisal, and M.A. Khan. 2014. Resveratrol suppresses the proliferation of breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase signaling pathway. Cancer Epidemiol. 38:765–772.

Lavu, S., O. Boss, P.J. Elliott, and P.D. Lambert. 2008a. Sirtuins — novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. Nat. Rev. Drug Discov. 7:841–853.

Li X. 2013. SIRT1 and energy metabolism. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 45(1):51-60.

Li, M., X. Sun, Y. Zhou, X. Wei, Y. Sun, X. Lan, C. Lei, and H. Chen. 2015. Nicotinamide and resveratrol regulate bovine adipogenesis through a SIRT1-dependent mechanism. J. Funct. Foods 18:492–500.

Liu, X., H. Zhao, Q. Jin, W. You, H. Cheng, Y. Liu, E. Song, G. Liu, X. Tan, X. Zhang, and F. Wan. 2017a. Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis by stimulating the SIRT1-AMPKα-FOXO1 signalling pathway in bovine intramuscular adipocytes. Mol. Cell. Biochem. 1–11.

Ma, T., M.S. Tan, J.T. Yu, and L. Tan. 2014. Resveratrol as a therapeutic agent for alzheimer's disease. Biomed Res. Int.

Miron J, Adin G, Solomon R, Nikbachat M, Zenou A, Shamay A, Brosh A, Mabjeesh SY. 2008. Heat production and retained energy in lactating cows held under hot summer conditions with evaporative cooling and fed two rations differing in roughage content and in vitro digestibility. Animal 2(6):843-8.

Moallem U, Altmark G, Lehrer H, Arieli A. 2010. Performance of high-yielding dairy cows supplemented with fat or concentrate under hot and humid climates. J Dairy Sci. 93(7):3192-202.

Motta, M.C., N. Divecha, M. Lemieux, C. Kamel, D. Chen, W. Gu, Y. Bultsma, M. McBurney, and L. Guarente. 2004. Mammalian SIRT1 Represses Forkhead Transcription Factors. Cell 116:551–563.

Nguyen, N.U., and B.D. Stamper. 2017. Polyphenols reported to shift APAP-induced changes in MAPK signaling and toxicity outcomes. Chem. Biol. Interact. 277:129–136.

Odunuga, O.O., V.M. Longshaw, and G.L. Blatch. 2004. Hop: More than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. BioEssays 26:1058–1068.

Picard, F., M. Kurtev, N. Chung, A. Topark-ngarm, R.M. De Oliveira, M. Leid, and M.W. Mcburney. 2004. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-γ. Nature 429.

Rayalam, S., Yang, J. Y., Ambati, S., Della-Fera, M. A., & Baile, C. A. (2008). Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. Phytotherapy research, 22(10), 1367-1371.

Reagan-Shaw, S., F. Afaq, M.H. Aziz, and N. Ahmad. 2004. Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1 hairless mouse skin. Oncogene 23:5151–5160.

Sahin K, Orhan C, Akdemir F, Tuzcu M, Iben C, Sahin N. 2012. Resveratrol protects quail hepatocytes against heat stress: modulation of the Nrf2 transcription factor and heat shock proteins. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 96(1):66-74.

Sea, K., S.H. Sohn, A. Durazo, Y. Sheng, B.F. Shaw, X. Cao, A.B. Taylor, L.J. Whitson, S.P. Holloway, P.J. Hart, D.E. Cabelli, E.B. Gralla, and J.S. Valentine. 2015. Insights into the role of the unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 290:2405–2418.

Surh, Y.-J., Y.-J. Hurh, J.-Y. Kang, E. Lee, G. Kong, and S.J. Lee. 1999. Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. Cancer Lett. 140:1–10.

Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM Jr, Sistonen L, Morimoto RI. 2009. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. Science 20;323(5917):1063-6.

Xie, J., L. Tang, L. Lu, L. Zhang, L. Xi, H. Liu, J. Odle, and X. Luo. 2014. Differential Expression of Heat Shock Transcription Factors and Heat Shock Proteins after Acute and Chronic Heat Stress in Laying Chickens (Gallus gallus) 9:16–18.

Yahav S, Shamay A, Horev G, Bar-Ilan D, Genina O, and Friedman-Einat, M. 1997. Effect of acquisition of improved thermotolerance on the induction of heat shock proteins in broiler chickens. Poultry Science 76:1428-34.

Zachut, M, Honig H, Striem S, Zick Y, Boura-Halfon S, and U Moallem. 2013. Periparturient dairy cows do not exhibit systemic insulin resistance, yet adipose specific insulin resistance occurs in cows prone to high weight loss. *J. Dairy Sci*. 96:5656-69.