

# Afslutningsrapport

Antioxidative selenoproteiner i konventionel og økologisk mælk

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2006-75

*April 2006*



**mejeri**foreningen

danish dairy board

**Slutrapport**

# **Antioxidative selenoproteiner i konventionel og økologisk mælk**

**Projektperiode**

01-01-2003 - 31-12-2005

**Projektdeltagere**

Kristen Sejrsen, Stig Purup, Peter Kappel Theil og Martin Tang Sørensen  
Afd. for Husdyrsundhed, Velfærd og Ernæring  
Danmarks JordbrugsForskning

og

Björn Åkesson og Katharina Bruzelius Salomonsson  
Biomedical Nutrition, Lund Institute of Technology  
Lund University

**Finansieret af**

Mejeribrugets ForskningsFond  
og  
Direktoratet for Fødevarerhverv

Marts 2006  
Danmarks JordbrugsForskning  
Foulum

## Sammendrag

Det har længe været kendt, at der er glutathion peroxidaseaktivitet i bovin mælk. Alligevel er det først for nylig, at betydningen af disse enzymer og andre selenoproteiner er undersøgt i detaljer af Björn Åkessons gruppe i Lund. Med henblik på at skaffe yderligere viden på området blev der oprettet et samarbejde baseret på Åkessons gruppes ekspertise vedr. selenoproteiner og DJF gruppens ernærings- og laktationsbiologiske ekspertise. Formålet med projektet var følgende:

1. At undersøge forekomsten af specifikke selenoproteiner i mælk og deres betydning for kvaliteten af konventionel og økologisk produceret mælk
2. At undersøge syntese og udskillelse af specifikke selenoproteiner i koens mælkekirtel
3. At belyse forskellige faktorerers betydning for dannelsen af selenoproteiner

De bevilgede midler fra MFF og DFFE skulle anvendes til dækning af undersøgelserne i Danmark. De planlagte undersøgelser i Lund skulle dækkes af bevillinger fra Sverige via Stiftelsen Lantbruksforskning og FORMAS.

I forbindelse med projektet blev der indsamlet et stort antal mælkeprøver ved DJF, heriblandt prøver fra konventionelle og økologiske besætninger. Prøverne skulle analyseres for selenoproteiner ved hjælp af immunologiske metoder i Lund. Der var imidlertid problemer med disse analyser. Derfor er flere alternative metoder blevet undersøgt. Der har været mest succes med en selenspecieringsmetode, hvor valle separeres med gelkromatografi. Undersøgelserne har påvist flere selentoppe af forskellig størrelse. Arbejdet med at identificere disse toppe er ikke blevet afsluttet og analyser af konventionelt og økologisk producerede mælkeprøver fortsætter. En bestemmelse af selenindholdet i mælkeprøverne fra danske økologiske og konventionelle besætninger viste, at selenindholdet i den økologiske mælk var lavere ( $6 \pm 2 \mu\text{g/l}$ ) end i konventionelt produceret mælk ( $9 \pm 3 \mu\text{g/l}$ ). Forskellen hænger sandsynligvis sammen med et højere selenindhold i de kraftfodermidler der anvendes i de konventionelle besætninger.

Formålet med del 2 af projektet var at undersøge om selenoproteiner i mælken dannes i mælkekirtelvævet. Dette blev undersøgt, dels ved at tildele radioaktivt mærket selenit til bovine lakterende mælkekirtelceller *in vitro*, dels ved at undersøge ekspressionen af selenoproteiner i biopsier af mælkekirtelvæv udtaget ved forskellige stadier i laktationscyklus. Resultaterne støtter hypotesen om at selenoproteiner kan dannes lokalt i mælkekirtelvævet. Derudover antyder resultaterne, at selenoproteinerne har biologiske virkninger i forbindelse med ændringer i mælkekirtelvævet under laktationscyklus, samt at de forskellige selenoproteiner har forskellige fysiologiske funktioner. Tilsvarende resultater er ikke tidligere publiceret.

For at belyse om mælkens indhold af selenoproteiner påvirkes af fodringmæssige faktorer blev der gennemført et større koforsøg med 40 køer, hvor fodringen bestod af tildeling af forskellige fedtkilder (solsikke- og rapskager) med og uden tilskud af E-vitamin. Forsøgsresultaterne viste en tendens til en vekselvirkning i mælkekirtelvævets indhold af eGPx. Det antyder, at øget indhold af umættet fedt hæmmer ekspressionen, og at reduktionen ophæves af øget tildeling af E-vitamin. Tilsvarende var der en tendens til, at ekspressionen af

TrxR1 hænger sammen med øget umættet fedt i mælken. Betydningen af selenilskud for ekspresionen af generne for selenoproteinerne i mælkekirtelvævet blev undersøgt i et andet forsøg. Resultaterne viste, at højt selenilskud medførte en reduktion ekspresion af cGPx. Vi har desuden undersøgt ekspresionen af selenoproteinerne i mælkekirtelvæv fra en række andre koforsøg. Resultaterne har blandt andet vist en reduceret ekspresion af cGPx ved stigende kraftfoderandel i rationen og en vekselvirkning mellem grovfodertype (majs- vs. kløvergræsensilage) og andelen af kraftfoder. Betydningen af forskellige faktorer for reguleringen af ekspresionen af selenoproteingener blev undersøgt *in vitro* i mælkekirtelceller. Resultaterne viste, at tilsetning af selenit og fedtsyrer påvirker ekspresionen af et eller flere af generne i overensstemmelse med resultaterne fra koforsøgene.

## Summary

The objective of the project was 1) to investigate the presence of selenoproteins in conventional and organic milk, 2) to investigate the synthesis and secretion of specific selenoproteins in the bovine mammary gland, and 3) to study the influence of different factors for selenoprotein synthesis.

Milk samples were collected from a number of different experiments at Danish Institute of Agricultural Sciences (DIAS) and from conventional and organic farms. The intention was to use immunological methods to measure the selenoprotein content in milk but the method turned out to have problems. Therefore attempts were made to use alternative methods, one being the selenospeciation method based on gel chromatography. The preliminary results are promising. Investigation of the selenium content of organic and conventional milk showed that selenium was lower in organic milk (6 vs 9 µg/l)

*In vitro* studies with bovine mammary cells and measurements in mammary gland biopsies from different stages of the lactation cycle show that selenoprotein genes are expressed in bovine mammary tissue indicating that the selenoproteins are synthesised in the bovine mammary gland. This has not been reported earlier.

To study the impact of nutritional factors an experiment with 40 cows was conducted. The treatments produced milk with different levels of PUFA and vitamin E in the milk. The results showed that eGPx and TrxR1 were affected by the treatments. Measurements of expression of the selenoprotein genes in biopsies from several other experiments show an effect of different nutritional factors such as selenium supplementation, silage type and level of concentrates. We also investigated the effects of various factors *in vitro* using a mammary cell line. These studies also showed an effect of selenium and PUFA on expression of selenoprotein genes.

## Projektets baggrund og formål

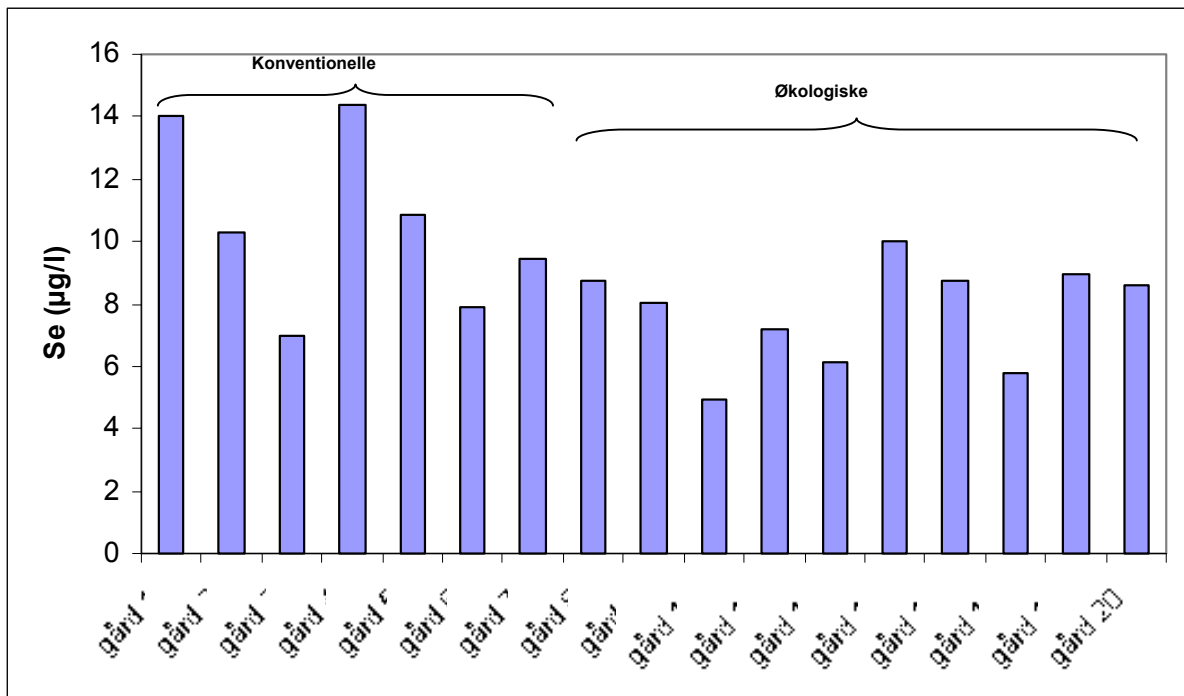
Oxidation i mælk kan medføre smagsfejl samt nedsat stabilitet og holdbarhed af mælken. I følge Granelli et al. (1998) afhænger spontan oxidation i mælk først og fremmest af mælkefedtets indhold af polyumættede fedtsyrer og mælkens indhold af  $\alpha$ -tocopherol og  $\beta$ -caroten, men det er også klart, at andre stoffer har betydning for graden af oxidation og dermed mælkens oxidative stabilitet (Barrefors et al. 1995, Jensen et al., 1996). Det er således vist, at mælk indeholder et antal proteiner med antioxidant virkning. Blandt disse er de såkaldte selenoproteiner, der er essentielle komponenter i adskillige stofskiftereaktioner og har fundamental sundhedsmæssig betydning. Blandt selenoproteinerne er der flere glutathion peroxidaser (cGPX, eGPx, phGPx) og thioredoxin reductase (TrxR1). Selvom det helt siden 1973 har været kendt, at der er glutathion peroxidaseaktivitet i bovin mælk, er dette først for nyligt blevet undersøgt i detaljer af Björn Åkessons gruppe i Lund (Lindmark Månsson & Åkesson, 2000). Med henblik på at skaffe yderligere viden på området blev der oprettet et samarbejde baseret på Åkessons gruppes ekspertise vedr. selenoproteiner og DJF gruppens ernærings- og laktationsbiologiske ekspertise. Formålet med projektet var følgende:

1. At undersøge forekomsten af specifikke selenoproteiner i mælk og deres betydning for kvaliteten af konventionel og økologisk produceret mælk
2. At undersøge syntese og udskillelse af specifikke selenoproteiner i koens mælkekirtel
3. At belyse forskellige faktorerers betydning for dannelsen af selenoproteiner

Det er vigtigt at erindre, at de bevilgede midler fra MFF og DFFE kun skulle dække undersøgelserne i Danmark. De planlagte undersøgelser i Lund dækkes af bevillinger fra Sverige.

## Forekomsten af specifikke selenoproteiner i mælk

I dette og tidligere projekter er indsamlet en stor mængde mælkeprøver med kendt baggrund, bl.a. fra konventionelle og økologiske brug. Disse prøver skulle analyseres for indhold af selenoproteiner i Sverige på Universitetet i Lund, hvor metoder til bestemmelse af proteiner i serum ved hjælp af radioimmuno-assay var indkøbt og publiceret (Huang & Åkesson, 1993). Metoden var også indkøbt til anvendelse i mælk (Chen et al., 2000; Lindmark Månsson, 2000; Lindmark Månsson & Åkesson, 2001). Der har imidlertid efterhånden vist sig at være problemer med de immunologisk baserede analyser. Derfor er flere forskellige metoder blevet undersøgt. Der har været mest succes med en selenspecieringsmetode hvor valle separeres med gelkromatografi og selenindholdet i eluatet måles on-line med ICP-MS (induktivt koblet plasma massepektrometri). Undersøgelserne har påvist flere selentoppe af forskellig størrelse. Arbejdet med at identificere disse toppe er ikke blevet afsluttet og analyser af konventionelt og økologisk producerede mælkeprøver fortsætter. Målet er stadig at mælken fra det gennemførte koforsøg skal analyseres (se senere).

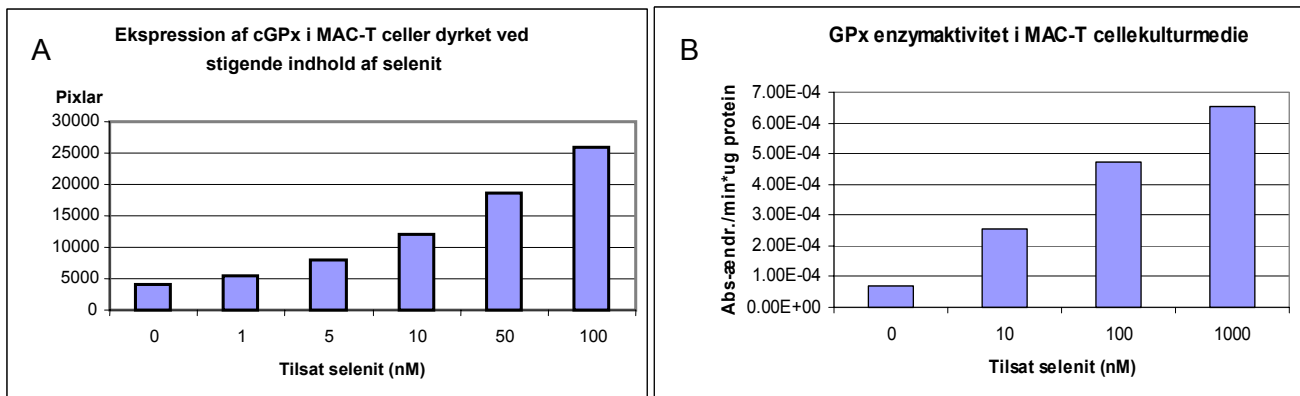


Figur 1. Total selenindhold i tankmælk fra 7 konventionelle og 10 økologiske besætninger

Mælkeprøverne fra danske økologiske og konventionelle besætninger indsamlet af Danmarks JordbrugsForskning, er undersøgt for indhold af selen (figur 1). Selenindholdet i den økologiske mælk var lavere ( $6 \pm 2 \mu\text{g/l}$ ) end i konventionelt produceret mælk ( $9 \pm 3 \mu\text{g/l}$ ) i overensstemmelse med tidligere undersøgelser i svensk mælk (Toledo et al., 2000). Forskellen hænger sandsynligvis sammen med et højere selenindhold i de importerede kraftfodermidler anvendt i de konventionelle besætninger.

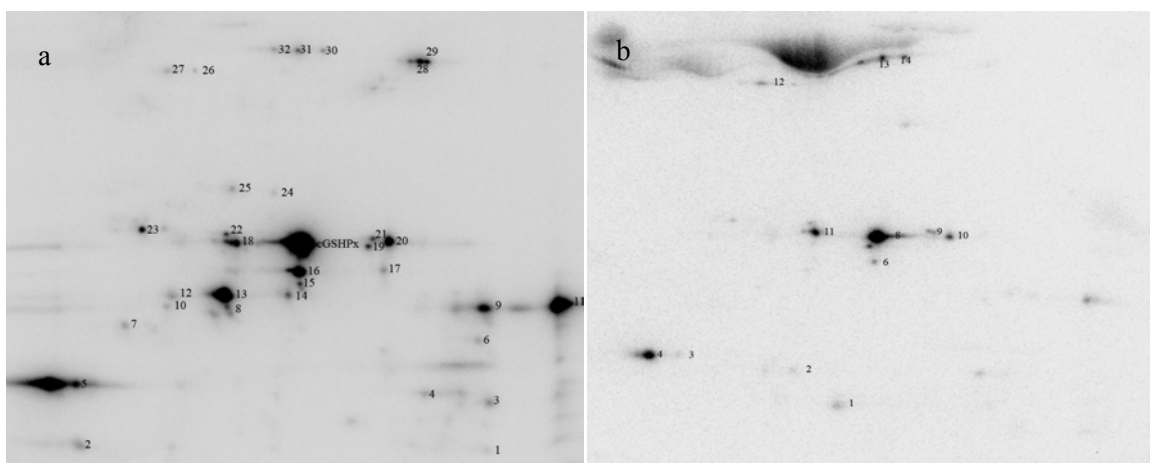
### Syntese og udskillelse af specifikke selenoproteiner i koens mælkekirtel

Formålet med denne del af projektet var at undersøge om selenoproteiner i mælken evt. dannes i mælkekirtelvævet. Dette blev undersøgt dels ved at tildele radioaktivt mærket selenit til bovine lakterende mælkekirtel-celler (MAC-T celler) *in vitro*, dels ved at undersøge ekspressionen af selenoproteinerne i biopsier af mælkekirtelvæv udtaget ved forskellige stadier i laktationscyklus.



Figur 2. Ekspresion (Northern blot) (a) og enzymaktivitet (b) af cGPx i bovine mælkekirtelceller (MAC-T) efter tildeling af stigende koncentrationer af radioaktivt mærket uorganisk selenit til cellekulturmediet

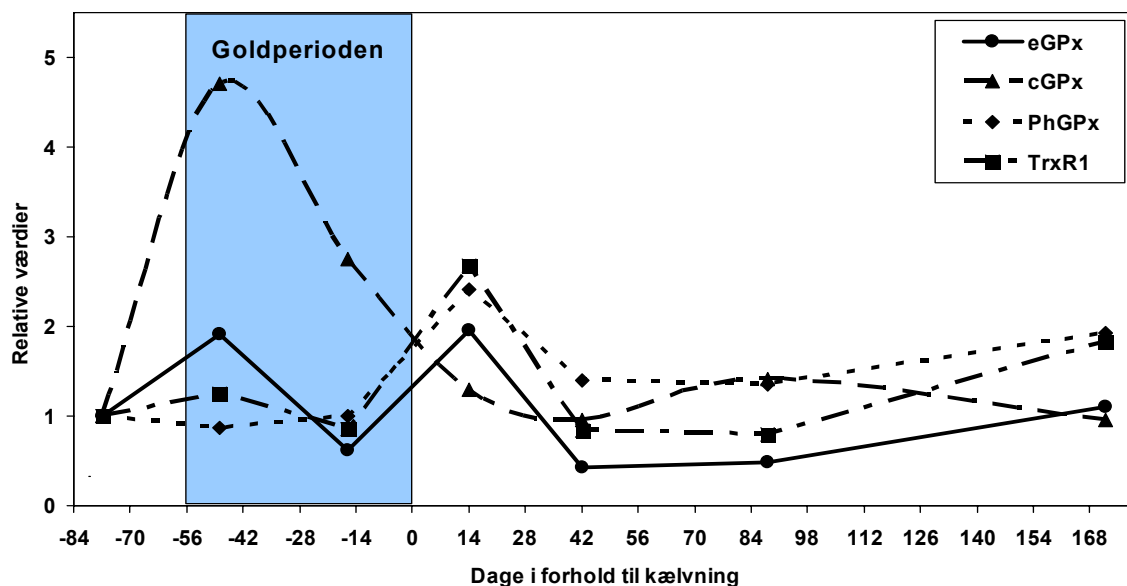
Tilsætning af selenit til MAC-T celler *in vitro* medførte en stigning i ekspresionen af genet, der koder for cGPx samtidig med, at der var en stigning i mediets cGPx aktivitet (figur 2). Tilsætning af radioaktivt mærket selenit ( $^{75}\text{Se}$ ) til cellerne og efterfølgende 2D-gelelektroforese, MALDI-TOF og autoradiogrammer (figur 3) viste dannelse en række specifikke selenoproteiner både intracellulært (cGPx, eGPx, phGPx, TrxR1, deiodinase og selenoprotein P) og extracellulært i cellekulturmediet (cGpx, TrxR1 og selenoprotein P).



Figur 3. Autoradiogram af 2D gel med intracellulære (a) og extracellulære (b) selenoproteiner fra bovine mælkekirtelceller (MAC-T) i kultur med tilsat  $^{75}\text{Se}$ .

Analyserne af biopsierne af mælkekirtelvævet viste, at både cGPx, eGPx, phGPx og TrxR1 blev udtrykt i mælkekirtelvævet *in vivo* (figur 4), og at ekspresionen af generne, undtagen TrxR1, var signifikant påvirket af tidspunktet i laktationscyklus (eGPx -  $p < 0,01$ ; cGPx -  $p < 0,001$ ; phGPx -  $p < 0,08$ ). Ekspresionen af cGPx var stærkt forøget lige efter goldning ( $p < 0,001$ ) i forbindelse med den omfattende programmerede celledød - apoptose - af alveoleceller, der sker dette tidspunkt. I modsætning til cGPx var ekspresionen af phGPx forøget i tidlig laktation ( $p < 0,03$ ) i forhold til goldperioden.





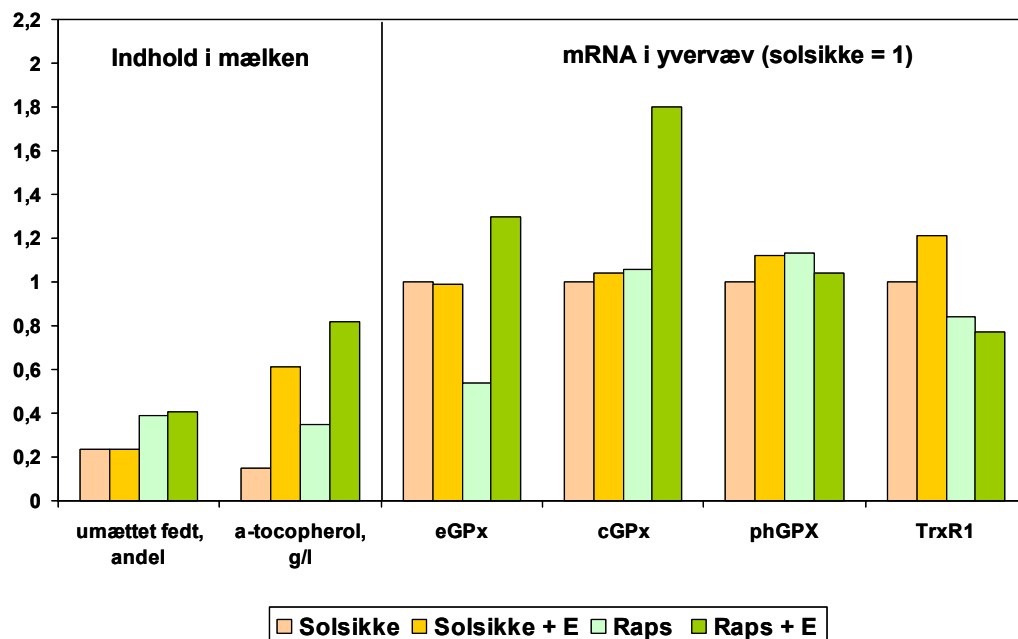
Figur 4. Ekspressionen af generne der koder for eGPx, cGPx, phGPx og TrxR1 i forskellige stadier af laktationscyklus

Resultaterne af undersøgelserne støtter således vores antagelse af, at selenoproteiner i mælk kan være dannet lokalt i mælkekirtlen. Derudover antyder resultaterne, at selenoproteinerne har biologiske virkninger i forbindelse ændringer i mælkekirtelvævet under laktationscyklus, samt at de forskellige selenoproteiner har forskellige fysiologiske funktioner. Tilsvarende resultater er ikke tidligere publiceret.

### Forskellige faktorerers betydning for dannelsen af selenoproteiner

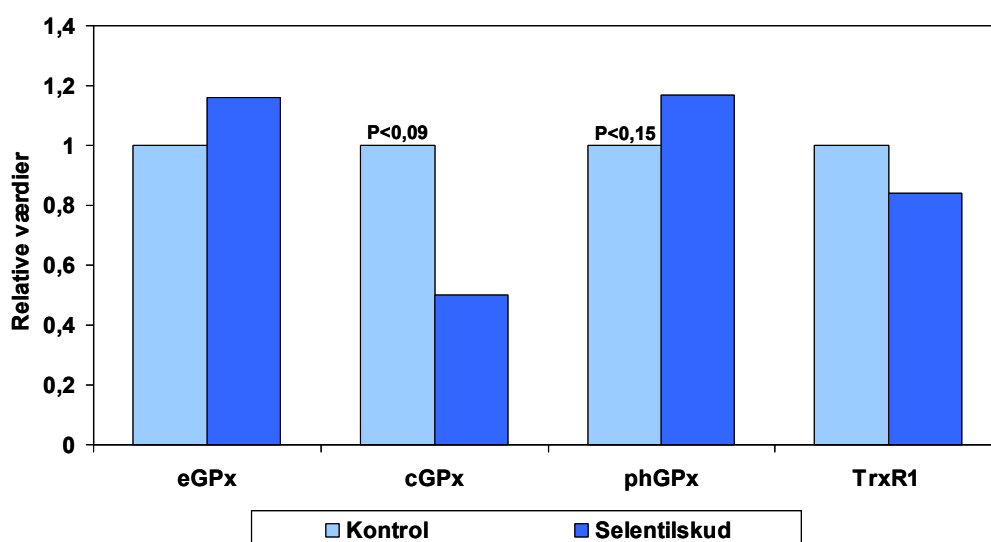
For at belyse om mælkens indhold af selenoproteiner påvirkes af fodringmæssige faktorer blev der gennemført et større koforsøg med 40 køer, hvor fodringen bestod af tildeling af forskellige fedtkilder (solsikke- og rapskager) med og uden tilskud af E-vitamin. Baggrunden for de valgte forsøgsbehandlinger var, som refereret i indledningen, at indholdet af umættet fedt og E-vitamin er de vigtigste faktorer af betydning for graden af oxidation. Som det fremgår af figur 5 (næste side) lykkedes det at opnå store forskelle i mælkens indhold af umættet fedt og E.vitamin ( $\alpha$ -tocopherol).

Der var en tendens til en vekselvirkning i mælkekirtelvævets indhold af eGPx ( $< 0,09$ ), således at øget indhold af umættet fedt hæmmer ekspresionen, en reduktion der ophæves af øget tildeling af E-vitamin. Tilsvarende var der en tendens til, at ekspresionen af TrxR1 hænger sammen med øget umættet fedt i mælken ( $< 0,06$ ).



Figur 5. Betydningen af mælkens indhold af umættet fedt(PUFA) og E-vitamin (E) for ekspressionen af selenoproteinerne eGPx, cGPx, phGPx og TrxR1. (eGPx-PUFA x E-vit  $p < 0,09$ ; TrxR1-PUFA  $p < 0,06$ ).

Vi har også undersøgt betydningen af selentilskud for ekspressionen af generne for selenoproteinerne i mælkekirtelvævet. Resultaterne viste en tendens til en kraftig reduktion i ekspression af cGPx ( $p < 0,09$ ) (figur 6). Vi har desuden undersøgt ekspressionen af selenoproteinerne i mælkekirtelvæv fra en række andre koforsøg. Resultaterne har blandt andet vist en reduceret ekspression af cGPx ved stigende kraftfoderandel i rationen og en vekselvirkning mellem grovfodertype (majs- vs. kløvergræsensilage) og andelen af kraftfoder.



Figur 6. Ekspressionen (mRNA) af selenoproteinerne eGPx, cGPx, phGPx og TrxR1 i mælkekirtelvævet hos køer behandlet med store mængder selen

Det er selvfølgelig meget ærgerligt, at det endnu ikke har vist sig at være muligt at måle mælkenes indhold af selenoproteinerne. Vi håber stadig, at det bliver muligt på den ene eller den anden måde. Vi har stadig mælkeprøver fra de forskellige forsøg i fryseren.

Betydningen af relevante næringsstoffer og vækstfaktorer for reguleringen af syntesen af selenoproteiner undersøgte ved behandling af mælkekirtelceller (MAC-T) i hhv. 3 og 24 timer og efterfølgende måling af ekspresion af selenoproteingenerne cGPx, phGPx og TrxR1 (tabel 1). Resultaterne viste at selenit, linolsyre (LA) og vækstfaktoren TGF- $\beta$ 1 havde effekt på ekspresionen af især cGPx og TrxR1. Således medførte tildeling af selenit en 2-3 gange større ekspresion af cGPx og en mindre opregulering af phGPx og TrxR1 ved behandling i 3 t. Denne opregulering af cGPx er i modstrid med ovenstående resultater fra mælkekirtelvæv hos køer behandlet med selen. En mulig forklaring kan være, at der i koforsøget tildeltes organisk selen, hvorimod der i cellekulturerne tildeltes uorganisk selen. Høje niveauer af cGPx er endvidere tidligere fundet i væv med en høj produktion af peroxider, men disse undersøgelser omfatter desværre ikke mælkekirtelvæv (Brigelius-Flohé, 1999). Tidligere undersøgelser har endvidere vist, at TGF- $\beta$ 1 ændrede ekspresionen af selenoprotein P (Mostert et al., 2001). Vores resultater viser, at TGF- $\beta$ 1 også påvirker ekspresionen af cGPx og TrxR1.

Tabel 1. Ekspresion af gener for selenoproteiner i bovine mælkekirtelceller (MAC-T) efter 3 og 24 t behandling med næringsstoffer og vækstfaktorer (kontrol=1.0)

Behandlingsperiode	cGPx		phGPx		TrxR1	
	3 t	24 t	3 t	24 t	3 t	24 t
Selenit	2.0	3.2	1.3	1.1	1.7	1.0
E-vitamin	1.0	1.1	1.1	1.0	1.1	1.0
LA	0.6	1.0	1.0	1.0	3.6	1.9
CLA (t10,c12)	0.8	1.2	1.1	1.3	1.0	1.1
CLA (c9,t11)	0.8	1.1	1.0	1.1	1.0	1.1
IGF-I	0.7	1.1	1.2	1.2	1.0	1.1
TGF- $\beta$ 1	1.7	1.5	1.2	1.0	2.1	1.3

Selenit: 1  $\mu$ M; linolsyre (LA): 100  $\mu$ M; CLA(10,12): 100  $\mu$ M; CLA (9,11): 100  $\mu$ M; E-vitamin ( $\alpha$ -tocopherol): 1 nM; IGF-I: 10 ng/ml; TGF- $\beta$ 1: 50 pg/ml

## Referencer

- Barrefors P, Granelli K, Appelqvist L-Å, Björck L. Chemical characterization of raw milk samples with and without oxidative off-flavor. *J Dairy Sci* 1995; 78: 2691-2699
- Brigelius-Flohé. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Rad Biol Med* 1999; 27:951-965
- Chen J, Lindmark-Månsson H, Åkesson B. Optimisation of a coupled enzymatic assay of glutathione peroxidase activity in bovine milk and whey. *Intern Dairy J* 2000; 10:347-351
- Granelli K, Barrefors P, Björck L, Appelqvist L-Å. Further studies on lipid composition of bovine milk in relation to spontaneous oxidised flavour. *J Sci Food Agric* 1998; 77:161-171
- Huang W, Åkesson B. Radioimmunoassay of glutathione peroxidase in human serum. *Clin Chim Acta* 1993; 219:139-148
- Jensen SK, Nielsen KN. Tocopherols, retinol,  $\beta$ -carotene and fatty acids in fat globule membrane and fat globule core on cows' milk. *J Dairy Res* 1996; 63:565-574
- Lindmark Månsson H. Bioactive proteins in bovine milk. Studies on glutathione peroxidase, lactoferrin and immunoglobulins. Doctoral thesis, 2000
- Lindmark Månsson H, Åkesson B. Antioxidative factors in milk. *Br J Nutr* 2000; 84 suppl 1:103-110
- Lindmark Månsson H, Åkesson B. Purification and immunochemical assay of bovine extracellular glutathione peroxidase. *Intern Dairy J* 2001; 11:649-655
- Mostert V, Dreher I, Köhrle J, Wolff S, Abel J. Modulation of selenoprotein P expression by TGF $\beta$ 1 is mediated by Smad proteins. *Biofactors* 2001; 14:135-142
- Toledo P, Andrén A, Björck L. Characterisation of organic milk. Poster at Livsmedelsdagarna, Uppsala, October 2000

## Liste over offentliggjorte publikationer

- Sejrsen, K., Purup, S. og Åkesson, B. (2004). Selenoproteiner i konventionel og økologisk mælk. *Mælkeritidende* 7, 172-174.
- Schaltz, R. (2005). Nutrition and milk fat synthesis in dairy cows – influence of unique fatty acids on milk fat composition and mammary gene expression. 78 pp.
- Bruzelius-Salomonsson K, Purup S, James P, Sejrsen K, Önning G and Åkesson B. Biosynthesis of selenoproteins in cultured bovine mammary cells as investigated by 2D electrophoresis and autoradiography. (in preparation)
- Purup S., Theil P.K., Sørensen M.T. & Sejrsen K. Selenoprotein genes are expressed in the bovine mammary gland. (in preparation)

### **Forskeruddanneelse**

Der har været tilknyttet en dansk specialestuderende (Rune Scholtz) i forbindelse med gennemførelsen af koforsøget.

I forbindelse med de cellebiologiske undersøgelser har Katarina Bruzelius-Salomonsson.- phd-studerende i Lund - gennemført cellebiologiske undersøgelser ved DJF.

### **Samarbejdsrelationer**

Hele projektet har været et samarbejde mellem DJF og Lunds Universitet.

### **Resultaternes praktiske og videnskabelige betydning**

De opnåede resultater har stor videnskabelig nyhedsværdi. Det er ikke tidligere vist, at selenoproteinernes gener udtrykkes i mælkekirtelvævet hos køer. Resultaterne antyder også, at selenoproteinerne kan være involveret i forbindelse med mælkekirtelvævet omdannelse – ”re-modelling” - efter goldning og i tidlig laktation.

Det faktum, at ekspressionen er påvirket af fodringen, kan meget vel vise sig, at være af stor praktisk betydning i relation til råvarens kvalitet. Det er dog ikke muligt på basis af dette projekt, at drage de endelige praktiske konklusioner. Det skyldes først og fremmest, at det endnu ikke har været muligt at få mælkens indhold af selenoproteiner analyseret.

### **Relationer til andre mejerirelaterede projekter**

Resultaterne fra dette projekt er relevante i relation til andre projekter, der undersøger forhold af betydning for mælkens oxidation.

