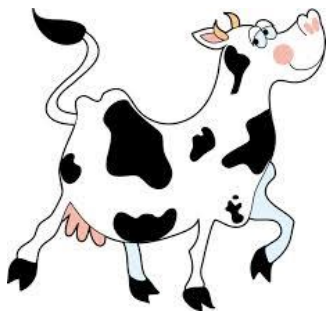


יישום פוספוליפאז מקבוצת A2 לטיפול בדלקת עטין

גבריאלי לייטנר, אולג קריפוקס, שלמה בלום, איל סרוסי

תודות למר' שמאי יעקובי, דר' רועי שקד וצוות רפת המחקר
החקלאי

המעבדה למחלות עטין, החטיבה לבקטריוLOGיה, המכון
הווטרינרי ע"ש קמרון
מכון לחקר בע"ח, מינהל המחקר החקלאי



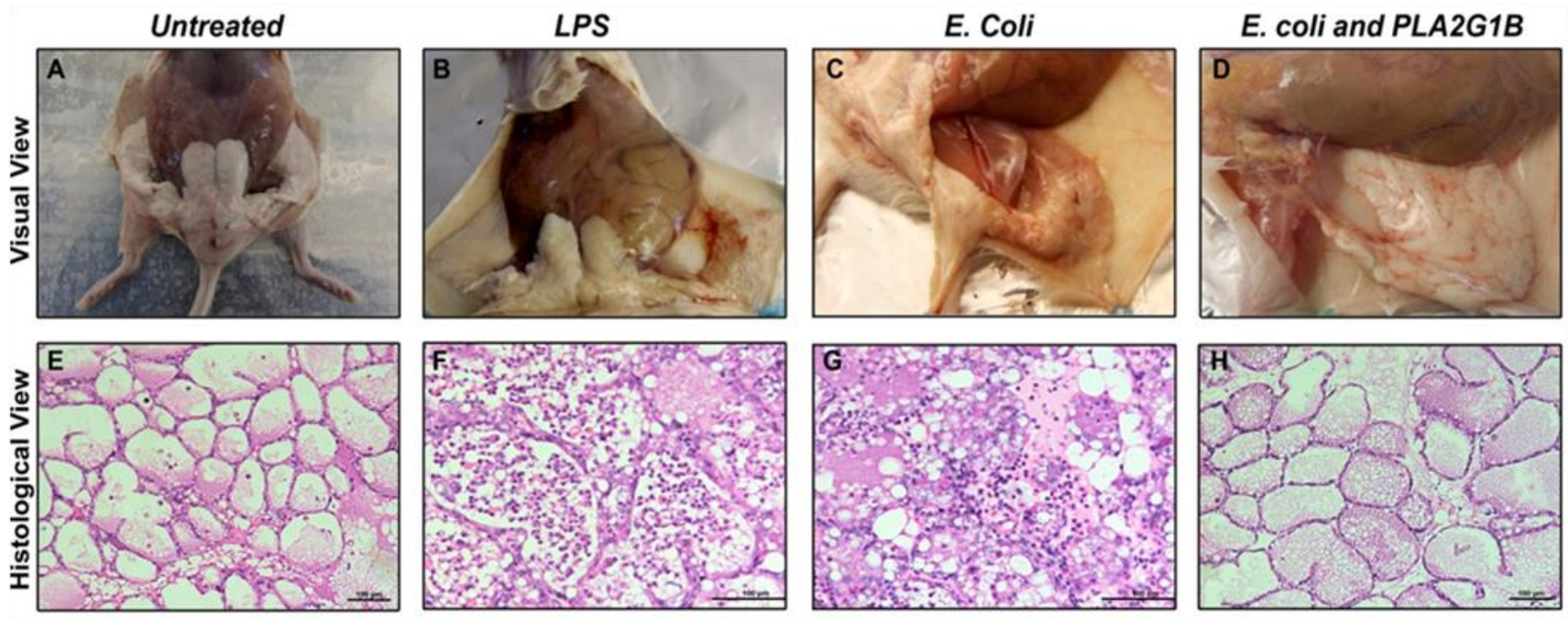
- דלקות העטין גורמות נזקים כלכלים כבדים ליצרני החלב ולתעשיית החלב.



- ריכוז של גנים של פוספוליפאזות מופרשות מהסוג PLA2, אופיין בעבר ונמצא בכרומוזום 2 של בקר. שונות במספר ההעתקים בבקר (Seroussi *et al.*, 2013) ושינויים ברמת הביטוי של הפוספוליפאזות במהלך התפתחות בלוטות החלב, מעידים על תפקיד אפשרי בבלוטת החלב.

- Seroussi E., Klompus S., Silanikove M., Krifucks O., Shapiro F., Gertler A., Leitner G. (2013) Nonbactericidal secreted phospholipase A2s are potential anti-inflammatory factors in the mammary gland. *Immunogenetics* **65**:861-671.

- בעבודה קודמת, הראנו במודל עכברי של עכברות מניקות מטופלות בפתוגן חיידקי (*E. coli*) או בטוקסין ליפופוליסכריד (LPS), שהזרקה לבלוטת החלב של פוספוליפאז שהופק מלב לב של בקר (PLA2G1B), (ראגנט זול וזמין מבחינה מסחרית), הביאה להעלמות תסמיני הדלקת.



מטרות המחקר:

1. לאפיין את השונויות הגנטית והניצפית של גנים לפוספוליפאזת PLA2 בפרטים נגועים ועמידים.
2. לבחון אלימות *E. coli* ו-*S. aureus* במודל דלקת עטין במבחנה (*in vitro*) בנוכחות הפוספוליפאז.
3. לבחון השפעת הזרקה לעטין של פוספוליפאז PLA2G1B על דלקות עטין בפרות.

תוצאות

1. לאפיין את השונויות הגנטית והניצפית של גנים לפוספוליפאזות PLA2 בפרטים נגועים ועמידים.

במהלך 2015-2017 נערך מעקב אחר כל העגלות שהמליטו (רפת המחקרית במנהל המחקר החקלאי, וולקני).

- נגיעות תוך עטינית מהמלטה ועד יובש.
- הגדרת החיידק, ימים בתחלובה בזמן ההדבקה, סוג הדלקת (קלינית או כרונית).
- קביעת התפלגות הסת"ס בחלב ברבעים ללא נגיעות.
- קביעת הרצף הגנטי (שערות).

תוצאות

1. לאפיין את השונות הגנטית והניצפית של גנים לפוספוליפאזת PLA2 בפרטים נגועים ועמידים.

148 מבכירות במעקב.

ללא נגיעות	65	
קליני	12	4 - קולי, 8 סטרפטוקוקוס
כרוני	71	53 - "מקרוקוקים", 3 - סטפ, אוראוס, 15 - סטרפטוקוקוס

57/83 (69%) מבכירות נמצאו נגועות מיד לאחר ההמלטה

תוצאות

1. לאפיין את השונויות הגנטית והניצפית של גנים לפוספוליפאזות PLA2 בפרטים נגועים ועמידים.

148 מבכירות במעקב.

תהליך קביעת הרצף הגנטי נמצא בעבודה

בניתוח ראשוני נמצא קשר בין האב ו/או הסב לסיכויי דלקת עטין.

מטרות המחקר:

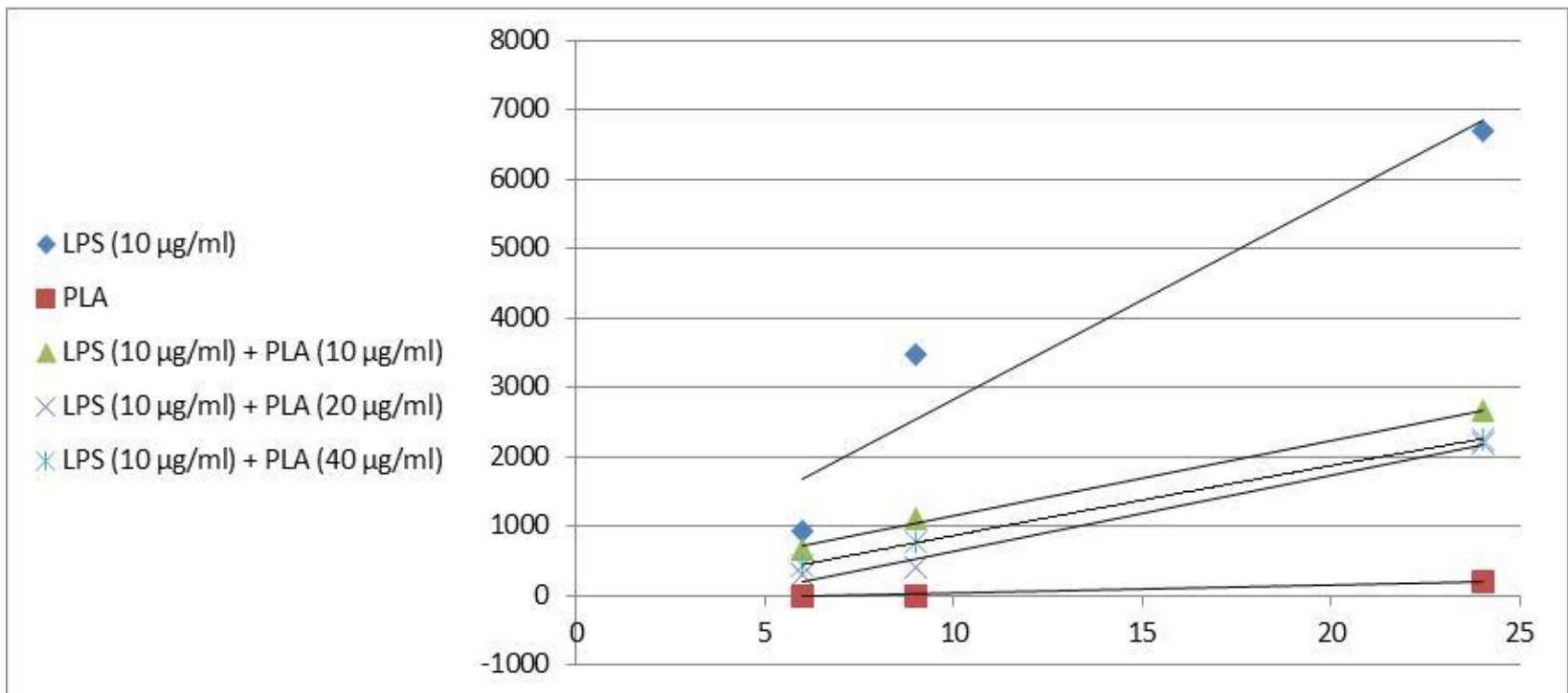
2. לבחון אלימות *E. coli* ו- *S. aureus* במודל דלקת עטין במבחנה (*in vitro*) בנוכחות הפוספוליפאז.

* תאי - immortalized mammary epithelial cells בפלטות הוקעו בחייקי א. קולי וסטפ. אוראוס או LPS ברכוזים שונים, בנוכחות רכוזים עולים של פוספוליפאז (10-40 מיקרוגרם/מ"ל) ובזמני הדגרה עולים (3 שעות עד 3 ימים).

* בכל זמן נתון, נבחנו מספר התאים החיים או האפופטוטיים, וכן ריכוזי ציטוקינים (IL 8, TNF).

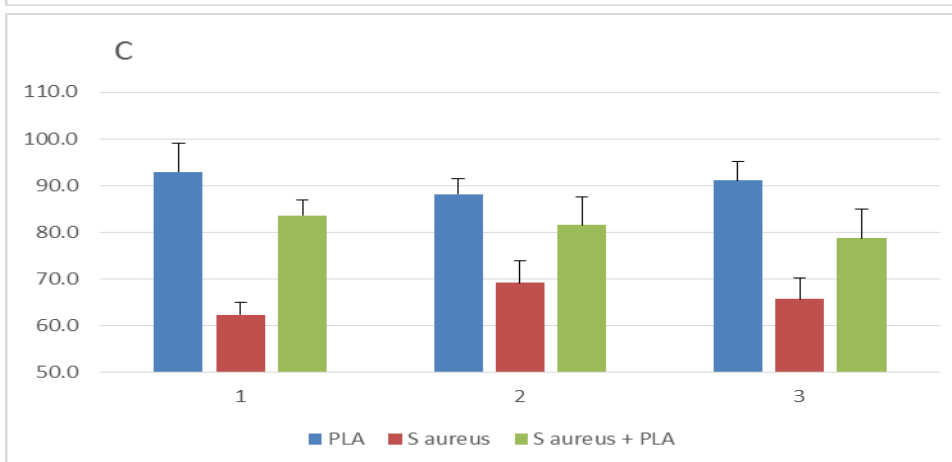
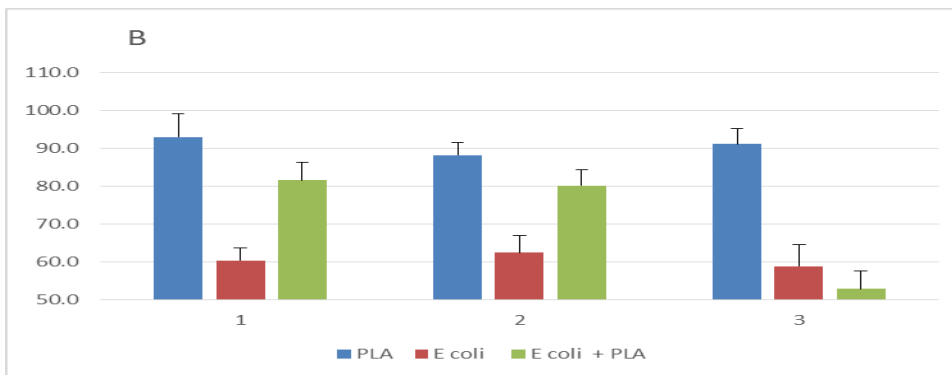
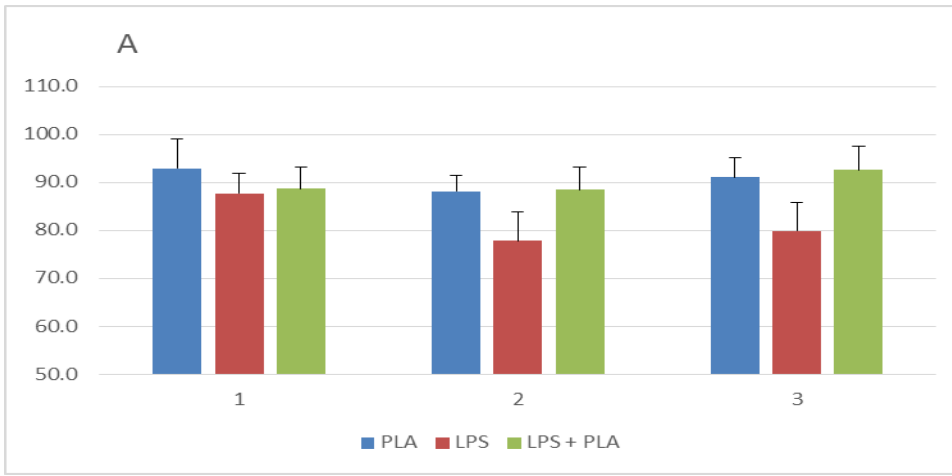
תוצאות

השפעת ריכוזים שונים של פוספוליפאז (PLA) על מיתון הפרשת הציטוקין IL8 מתאי תרבית עטין בתגובה לטיפול ברעלן ליפופוליסכריד (LPS).



תוצאות

השפעת של פוספוליפאז
בריכוז של 20 מיקרוגרם/מ"ל
על חיות תאי תרבית עטין
בתגובה לטיפול ב LPS (A)
חיידקי אשריכיה קולי (B)
סטפילוקוקוס אוראוס (C).



סיכום

הוספות פוספוליפאז בריכוז של 20 מיקרוגרם/מ"ל לשכבת התאים ובתוספת של LPS, חיידקי *E. coli* או של *S. aureus* חיים, מיתנה את הפגיעה בהם באופן משמעותי. פגיעה בתאים ב LPS הגיעה לשיא לאחר יומיים הדגרה ולתמותה של כ- 25% לעומת הדגרה בנוכחות האנזים, חיידק *E. coli* פגעו בעוצמה רבה בחיות התאים לאורך כל 3 ימי הניסוי, לעומת הגנה חלקית שנצפתה בנוכחות הפוספוליפאז ביום הראשון והשני, אך נכשלה ביום השלישי. תוצאות דומות התקבלו גם בהדגרה עם *S. aureus*, בהבדל אחד, האנזים המשיך להגן חלקית על התאים גם ביום השלישי. שלושת הסטימולטורים גרמו לסנתוז ושחרור למדיה של ציטוקין ה- IL8, וב- *S. aureus* גם לציטוקין TNF, רמת הציטוקנים התמתנה באופן מובהק בנוכחות הפוספוליפאז.

מטרות המחקר:

3. לבחון השפעת הזרקה לעטין של פוספוליפאז PLA2G1B על דלקות עטין בפרות.

הטיפול כלל פרות עם דלקת כרונית נגועות בסטרטוקוקוס ($n=4$),

נגועות ב"מיקרוקוקים" ($n=7$, CNS),

פרות שהודבקו תוך עטינית ב *E. coli* ($n=20$), מחציתן טופלו ומחציתן שימשו קבוצת ביקורת ללא טיפול.



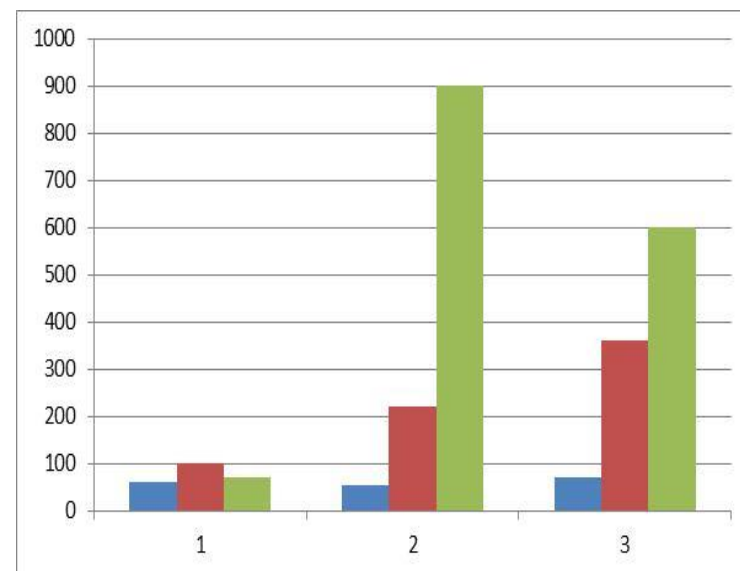
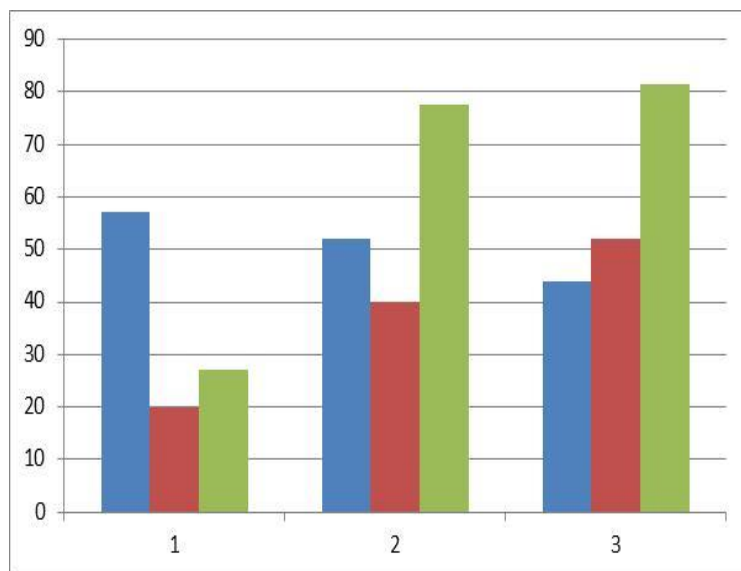
הפרות טופלו פעם אחת בהזרקת

האנזים תוך עטינית לרבע

(20-40 מיקרוגרם בנפח של 20 מ"ל).

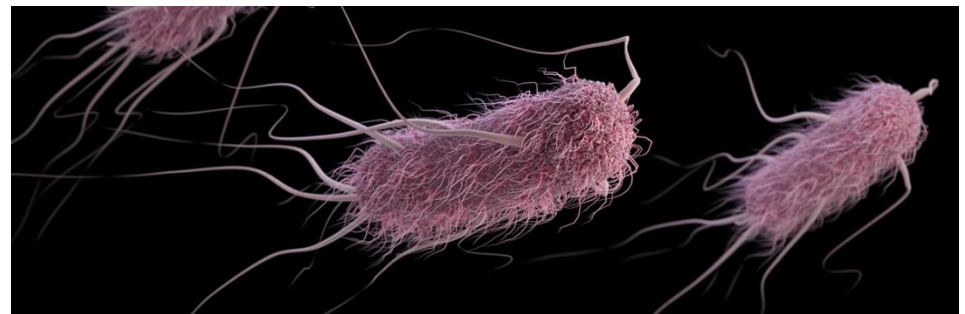
תוצאות

A. שינוי בסת"ס (ימין) ונאוטרופילים (שמאל) ברבעי עטין מטופלים בכמות שונה של פוספוליפאז. רבעי עטין טופלו בכמויות שונות של פוספוליפאז: 0 (כחול), 20 (אדום), 40 (ירוק). ספירת תאים נבדקה בשלושה זמנים: לפני הטיפול (1), יום (2) ו-4 ימים (3) לאחר הטיפול.



תוצאות

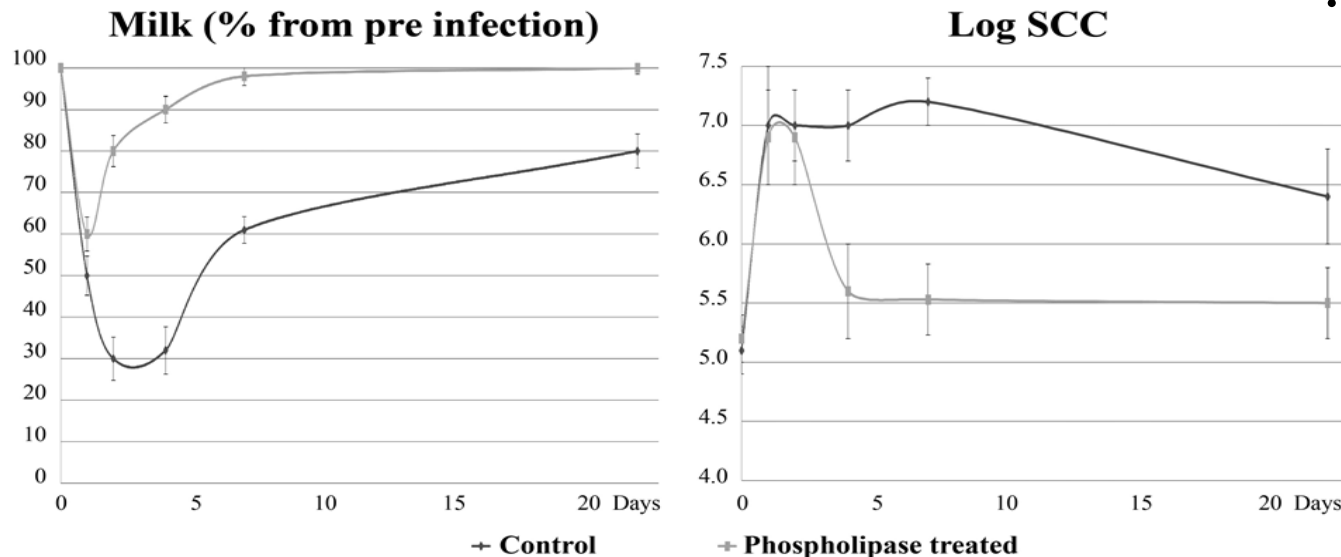
B. 10 פרות הוקעו, כל פרה ברבע אחד, עם חיידקי א. קולי (CFU 30-100). הפרות חולקו לשתי קבוצות, קבוצה אחת טופלה ב 40 מיקרוגרם פוספוליפאז בנפח של 20 מ"ל, בהזרקה חד פעמית והקבוצה השניה שימשה לביקורת ולא טופלה. הפרות טופלו 24-48 שעות לאחר הופעת סימני הדלקת.



תוצאות

לפני הטיפול כל הפרות נמצאו עם סימנים קליניים ברבע המודבק, יצור החלב ברבע וכן בפרה ירד וחלה עליה מסיבית בסת"ס.

אחוז החלב ביחס לכמותו היומית לפני ההוקעה (100%) ולוג סת"ס לפני ובחמש נקודות זמן בתקופה של 21 יום לאחר הטיפול.



סיכום

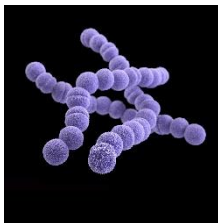
1. בעקבות הטיפול בדלקות עטין שנגרמו מ א. קולי. חלה עליה ביצור החלב לרמתו לפני ההוקעה תוך 5-11 ימים וירדה בסת"ס לרמתו לפני ההוקעה תוך 5-8 ימים. ההבדלים בין הטיפול ללא הטיפול נמצאו מובהקים בשני המדדים.



2. טיפול באנזים נכשל בפרות נגועות ב CNS.



3. טיפול באנזים טיפול באנזים הצליח לנקות את החיידק ב 2/4 הפרות הנגועות בסטרפטוקוקוס ובותרת חלה ירידה משמעותית בסת"ס.



סיכום ומסקנות.

התוצאות מראות כי לראגנט הפוספוליפאז פנקראטי PLA2G1B של בקר יש השפעה מווסתת של מערכת החיסון הן בעטין השלם והן במערכת תאי עטין בתרבית.

בתאי עטין הודגם שיפור מובהק בחיות התאים לאחר חשיפתם לחידקים פתוגנים ולרעלן הליפופוליסכריד (LPS).

הודגמה השפעה ממתנת של הראגנט על הפרשת הציטוקין IL8 מתאי התרבית בתגובה לטיפול ברעלן הליפופוליסכריד. מאידך, בעטין עצמו הגביר הראגנט את גיוס תאים אלה לרבע העטין המטופל.

המשך

בפרות שהוקעו בא. קולי, הטיפול בראגנט הוביל לשיפור מובהק במדדי התאוששות הפרה שנמדדו כולל תפוקת החלב וערכי הסת"ס. ריפוי הושג גם בטיפול בפרות עם דלקת עטין כרונית ומופע קליני שאובחנו עם נגיעות בסטרפטוקוקוס דיסגלקטיא.

תוצאות מבטיחות אלה מצדיקות הגדלת המדגם הנבחן בשנה הבאה לקראת גיבוש פרוטוקול שיישם את הפוסוליפאז כתרופה לדלקת עטין מהסוגים שהצלחנו לטפל בהם.

ניתוח הרצף הגנטי בהקשר לעמידות הפרה בפני חדירה של חיידקים והתפתחות תגובה דלקתית, תאפשר לאפיין את השונות הגנטית והניצפית של גנים לפוספוליפאזות PLA2 בפרטים נגועים ועמידים.

תוצאות הניתוח הראשוני המראה על קשר בין האב ו/או הסב לסיכויי דלקת עטין במדגם קטן של מבכירות אך ברזולוציה של נגיעות ולא סת"ס (המדד המשמש היום בניתוח פרים), בעל חשיבות ויתכן שימצא קשר לגנים נוספים אשר אינם קשורים לאנזים.

חלב בארץ בריא לתינוקות, ילדים, בוגרים וזקנים



תודה

