

# זיהוי מוקדם של הסיכוי לפתח מחלות דרכי נשימה (BRD) בבקר

מאי 2008

מגיש: ד"ר אריאל שבתאי

## מבוא

קומפלקס מחלות דרכי הנשימה בבקר, המכונה בשם כללי (Bovine Respiratory Disease; BRD) ונגרם פעמים רבות עקב שינויים חריפים בממשק הבקר ובעקבות העברתו ממקומו ("Shipping fever"), גורם לשני שלישים ממקרי התחלואה ולכ- 10% ממקרי התמותה של בני בקר (בר גיא, 1998; Wiske, 1985). BRD הינה מחלה בעלת אטיולוגיה רב-גורמית (פיסיקלית, ביולוגית, כימית ופסיכולוגית, לחוד או בסינרגיזם), המאופיינת בשינוי תלוי-עקה ברגישות של דרכי הנשימה לפתוגנים וירליים וחיידקיים, אשר בנסיבות רגילות מאכלסים את מערכת הנשימה העליונה בעגל (Roth and Perino, 1998) אך אינם מסכנים אותו. הפתוגנים הללו משגשים בחלקה התחתון של מערכת הנשימה תוך ניצול מצב העקה שמצויה בו מערכת החיסון (Muggli-Cockett et al., 1992; Roth and Perino, 1998), כתוצאה מגמילה ו/או טרנספורט, ערבוב קבוצות, שונות גיל בחצר הגידול, גורמי אקלים, גזים ואבק באוויר ועוד. מהות הנזק הפיסיולוגי של המחלה הוא בגרימת הדבקויות של קרומי הריאה, מה שמוליך לסתימה חלקית או מוחלטת של נאדיות הריאה ודרכי האוויר המובילים אליה. הפגיעה בפונקציונאלית של הריאה והשלכותיה על המטבוליזם, כמו גם הפגיעה בתיאבון של העגלים גוררות ירידה ניכרת ביצרנות. זאת, בתוספת להוצאות הטיפול במחלה מסבים למגדלים הפסדים שנתיים כבדים. ואכן, ההפסדים הכלכליים השנתיים הנגרמים בשל תמותה או תחלואה מ-BRD נאמדים בארה"ב ב- 600-700 מיליון דולר. בישראל מתווסף הנזק של פגיעה ברמת הכשרות של הבקר, והפסדים שנתיים של כ- 23 מיליון ש"ח למגדלים. כיום, האמצעים להערכה מוקדמת של רגישות העגלים לתחלואה לא קיימים כלל והזיהוי של המחלה בשלביה המוקדמים הם סובייקטיביים ומערבים הערכה ויזואלית הנתמכת במדידות קליניות מועטות. זיהוי התחלואה בשלב התפרצות המחלה, מאפשר לרוב לרפא את בעל החיים ולמזער את הנזקים הפיסיולוגיים והבריאותיים אך הנזקים הכלכליים הנלווים המצטברים עדיין גדולים מאוד. בדיקות היסטופתולוגיות (סירכות) בטבחות עגלי פיטום מצביעות על ליקויים ריאתיים ב- 37-68% מהעגלים שלא אובחנו וטופלו בחייהם (Gardner et al., 1999; Wittum et al., 1996). משמעות הדבר היא שליקויים ריאתיים קורים גם אם לא נצפתה דלקת ריאות. עובדות אלה מצביעות, ללא ספק, על הצורך בזיהוי אובייקטיבי מוקדם של הסיכון של בעל חיים לחלות ב-BRD, כדי לאפשר טיפול מונע יעיל שימנע את הנזקים הכרוכים במחלה. במהלך שלוש העשורים האחרונים הולכות ומצטברות ראיות הקושרות, נסיבתית, בין התפתחות BRD ועקה חמצונית (Hays et al., 1978; Hutcheston and Cole, 1985; Chirase et al., 2004). בהתבסס על

התוצאות הנ"ל, קיים ניסיון בשנתיים האחרונות להערכת הקשר בין גורמים המאיצים BRD וסמנים ביולוגיים אנדוגניים לעקה חמצונית. מאחר ועקה חמצונית במתכונת של סמנים ביולוגיים אנדוגניים היא פועל יוצא של מגוון רחב של עקות, נדרש, לעניות דעתנו, סמן בעל "טביעת אצבע" ספציפית לסוג העקה. סמנים אקסוגניים שכאלה, רגישים ל- RNS/ROS, פותחו זה מכבר ע"י פרופסור יעקב ויה במיג"ל. הסמנים בנויים מיחידות אנדוגניות כמו חומצה אמינית טירוזין (לזיהוי פגיעה בחלבון) המחוברת לחומצה לינולאית (לזיהוי פגיעה בליפידים) ואלה קשורות במידת הצורך ליחידה שלישית כמו גואנוזין (לזיהוי פגיעה ב- DNA) או כולסטורול (זיהוי פגיעה בסטרולים), כאשר כל היחידות הללו מחוברות בקשר קוולנטי זו לזו. הדגרה של אחד הסמנים הללו עם דוגמה ביולוגית (דם, רקמה, תאים, רוק) המצויה במצב של עקה חמצונית תגרום לפגיעות בסמן ושינויים במבנה שלו (חמצונים שונים בכל אחד ממרכיביו) בהתאם לסוג העקה המצויה במערכת הנבדקת. כתוצאה מכך עשויה להיות קורלציה בין סוג העקה הקיימת במערכת לבין סוג הפגיעה בסמן, או בין סוג המצב הפתולוגי המתפתח בייצור ממנו לקוחה הדוגמה לבין סוג השינוי שחל בסמן, ובאופן כזה קבלת טביעת אצבע של המחלה בסמן.

**מטרת המחקר:** פיתוח אמצעי לזיהוי אובייקטיבי וספציפי מוקדם של הסיכון לחלות ב- BRD, כדי לאפשר טיפול מונע יעיל להקטנת התחלואה ולשיפור רמת הכשרות והיצרנות של עגלי בקר לבשר.

### **שיטות וחומרים**

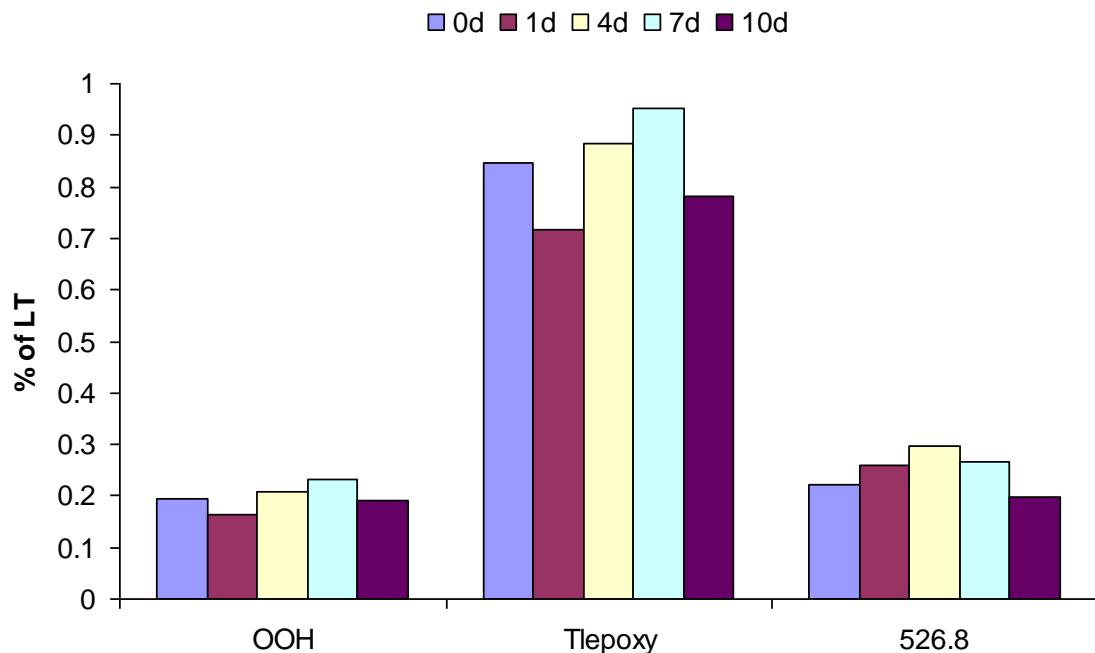
60 עגלי הולשטיין, בני 3-28 ימים, הועברו לאחר המלטה ברפת בית דגן ליונקיה בנוה יער. העגלים טופלו במשך 5 הימים הראשונים להגעתם ב- Pen-Strep. 3 מ"ל של דם נלקחו, מכל 60 העגלים שלושה ימים לפני העברתם (ברפת בבית דגן) וכן שעה, 4-6 שעות, 1, 4, 7, 10 ימים לאחר הגעתם ליונקיה בנוה יער. 1 מ"ל נלקח לתוך מבחנה עם הסמן האקסוגני LT (חומצה לינולאית – טירוזין). הדם הודגר ב- 37°C למשך שעה, מוצה לתוך תערובת ממסים אורגניים (הקסן: איזופרופנול), ומצב החמצון של הסמן (הופעתם של תוצרי חמצון של הסמן) פוענח באמצעות GC/MS, LC/MS/MS. 1 מ"ל של הדם סורכז ב 1000g והפלסמה נאספה לצורך אנליזה של קורטיזול. 1 מ"ל של הדם שימש להפקת RNA. ה RNA מוצה ע"י TRI REAGENT בהתאם להוראות היצרן וטופל ב RNase-free DNase להסרת זיהום של DNA. כמות ה RNA ואיכותו נקבעו בעזרת Nanodrop ND-1000 ובג'ל, בהתאמה. 2µl של RNA שימשו ליצירת cDNA ע"י Superscript II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen), בהתאם להוראות היצרן. השינויים בביטוי תוצרי הגן HSP90α נקבעו ע"י semi-quantitative RT-PCR.

### **תוצאות**

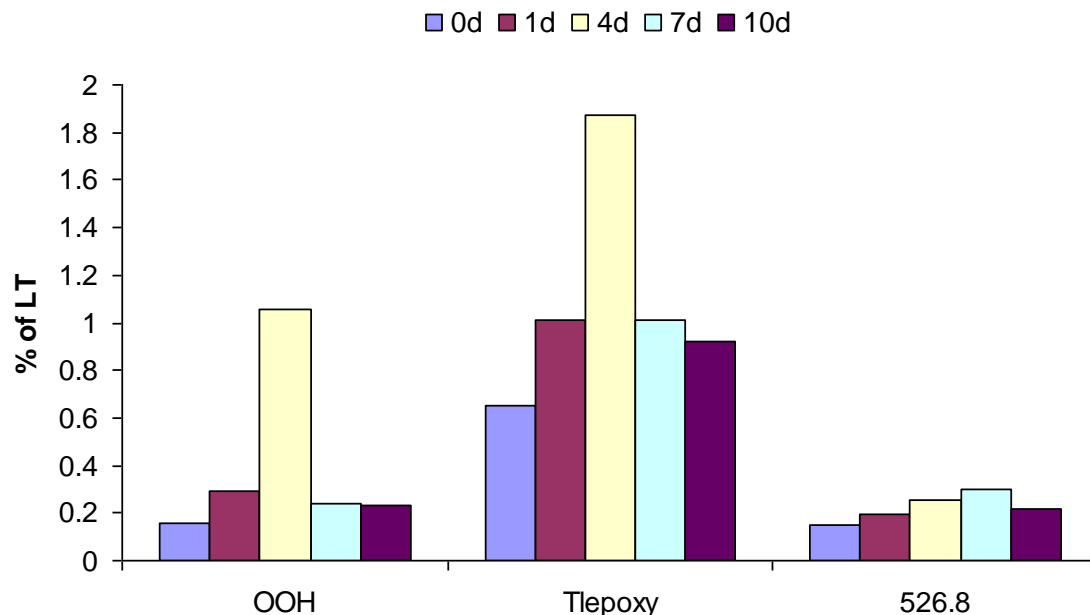
בשנה הראשונה של המחקר בחנו את האפשרות לחיזוי מוקדם של הסיכוי של עגל לחלות בדלקת ריאות כתוצאה מהעברתו מרפת המוצא ליונקיה בנוה יער, בשלוש רמות: 1. חמצון של מקרומולקולות ע"י שימוש בסמן האקסוגני LT. 2. רמות קורטיזול בפלסמה. 3. רמות הביטוי של חלבון העקה HSP90 $\alpha$  בתאי הדם. באמצעות אנליזות אלה, ושל נוספות בהמשך המחקר, אנו שואפים להרכיב "תעודת זהות פנוטיפית" של עגל המועד לחלות, ולקבוע את חלון הזמן שבו הזיהוי יהיה אינדיקטיבי.

השפעה אינדיבידואלית של העברה על חמצון מקרומולקולות. באיור 1 מתוארים שלושה תוצרי חמצון של הסמן LT 1, 4, 7, 10 ימים לאחר העברת עגלים מבית דגן לנוה יער. שלושת המולקולות הן תוצרי חמצון של החומצה הלינולאית, וניכר שההעברה לא השפיעה על חמצון של טירוזין. באיור 1 מודגמים שני דגמי חמצון של הסמן האקסוגני. בפנל א' ניתן לראות כי רמות החמצון של החומצה הלינולאית לא השתנו בעקבות ההעברה. לעומת זאת, בפנל ב' ניתן לראות עליה פי 5 (של התוצר OOH) או פי 3 (של התוצר TLepoxy), 4 ימים לאחר הגעת העגל ליונקיה בנוה יער. על בסיס הנתונים שנאספו בשנה זאת ניתן להגיד שמשלושת תוצרי החמצון של הסמן, TLepoxy הוא האינדיקטיבי ביותר במצבים של עקה חמצונית בעקבות העברה.

⚡

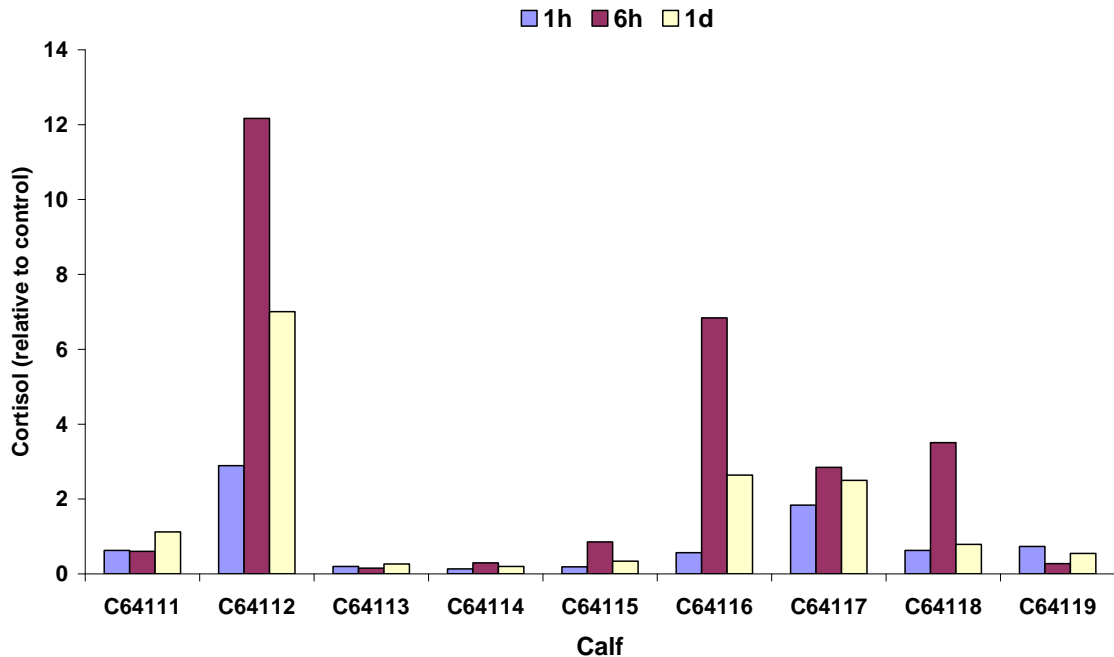


⚡



איור 1: תוצרי חמצון של הסמן האקסוגני LT בתגובה להעברת עגלים ממקומם. בפנל א' מוצג עגל עם רמות חמצון נמוכות, ובפנל ב' מוצג עגל עם רמות חמצון משמעותיות. בשני המקרים תוצרי החמצון שהתקבלו הם של המרכיב של החומצה הלינולאית בסמן (ולא של הטירוזין).

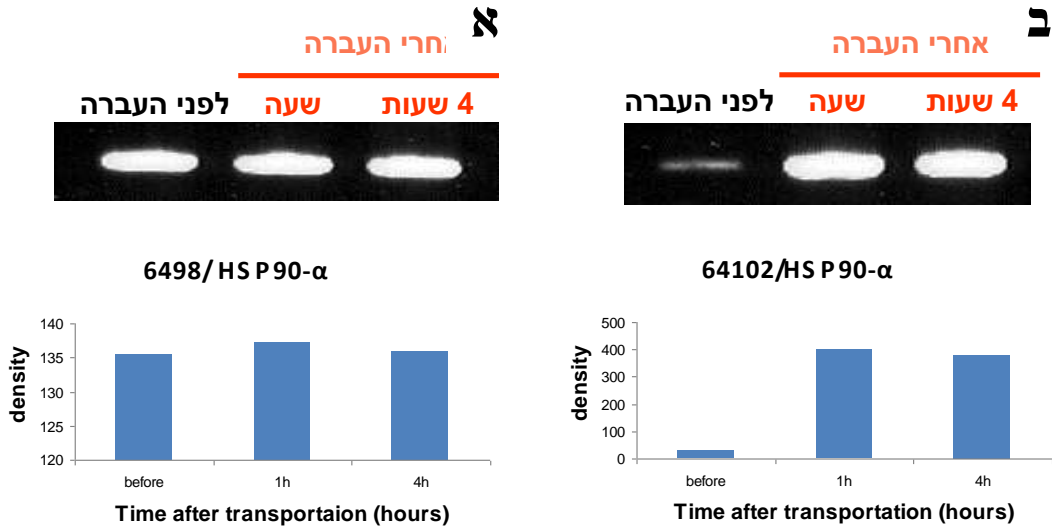
השפעת העברת עגלים על ריכוז הקורטיזול בפלסמה. באיור 2 ניתן לראות את ההשפעה האינדיבידואלית של ההעברה על רמות הקורטיזול בפלסמה של עגלים. גם כאן, בדומה למופיע באיור 1 ההשפעה היא סלקטיבית, קרי, בעוד עגלים מסוימים מגיבים מאוד להעברה בעגלים אחרים לא ניכר שינוי ברמת הקורטיזול בעקבות ההעברה. איור 2 מתאר את רמות הקורטיזול פרקי זמן קצרים לאחר ההעברה (עד יום אחד) יחסית לרמת הביקורת. ריכוז הקורטיזול חוזר לרמתו הבסיסית לאחר יום אחד (תוצאות לא מוצגות). באופן שרירותי בחרנו רמת קורטיזול שהיא פי 2 מרמת הביקורת (לפני ההעברה) כרמה שמגדירה תגובה להעברה. על פי הקריטריון הזה כ 50% מהעגלים לא הגיבו להעברה. לא התקבל מתאם מובהק בין תגובת החמצון ותגובת הקורטיזול של אותם עגלים.



איור 2: השפעת העברה של עגלים מרפת בית דגן ליונקיה בנוה יער על הריכוז היחסי (לרמת הביקורת) של קורטיזול בפלסמה. רמה 2 נקבעה באופן שרירותי כרמה שמעליה הייתה תגובה להעברה.

בתגובה למגוון רחב של עקות מייצרים תאי הגוף באופן סלקטיבי, מהיר, מסיבי והפיך חלבוני עקת חום (heat shock proteins; HSP) (Welch, 1990). שמם של חלבונים אלה נגזר מההקשר שבו התגלו – תגובה לשינויי טמפרטורה, אולם התגובה התאית לעקה, הגוררת ביטוי מוגבר של HSP, מושרית גם על ידי גורמים סביבתיים ופתו-פיסיולוגיים רבים אחרים, כמו: קור, הגבלת קלוריות, מי-חמצן, אתנול, אנלוגים של חומצות אמינו, רעלני נשימה, מתכות כבדות, היפוקסיה, הדבקות וירליות ובקטריאליות, דלקות ומצבים פסיכולוגיים (Udelsman et al., 1993; Aly et al., 1994; Morimoto et al., 1994; Franci et al., 1996; Matz et al., 1996; Campisi et al., 2003). באיור 3 ניתן לראות כי בעוד שעגלים מסוימים אינם משנים את רמת הביטוי של חלבוני עקת החום בתגובה להעברה ( $HSP90\alpha$  במקרה של המחקר הנוכחי) (פנל א'), עגלים אחרים מגיבים להעברה בביטוי מסיבי של  $HSP90\alpha$  (פנל ב'). מתוך הנתונים שהצטברו בשנת מחקר זאת, ניתן להסיק כי שיא הביטוי של  $HSP90\alpha$  בעגלים שהגיבו להעברה היה 4-6 שעות לאחר הגעתם ליונקיה, ובמקרים מסוימים יום אחד לאחר הגעתם. בחלק גדול מהמקרים עגלים שהגיבו בהגברת הביטוי של

HSP90 $\alpha$  הגיבו גם ביצירה של תוצרי חמצון של LT. קשר קצת פחות הדוק היה בין ביטוי HSP90 $\alpha$  וקורטיזול.



איור 3: ביטוי mRNA של חלבון העקה HSP90 $\alpha$  בתאי דם של עגלים בעקבות העברתם ממקומם. א. עגל עם רמות ביטוי לא משתנות = תגובה נמוכה. ב. עגל עם רמות ביטוי גבוהות של HSP90 $\alpha$  בעקבות ההעברה. בחלק התחתון של האיור מוצג ביטוי גרפי של רמות ה mRNA המופיעות בחלקו העליון.

### דיון ומסקנות

מבין כל עגלי ההולשטיין הצעירים הנקנים במשקים שונים ומועברים ליונקיה (ואח"כ למפטמה) בנוה יער, כ 30-40% חולים בדלקת ריאות במהלך החודשים הראשונים שלאחר ההעברה. נתון זה מתאים גם לאחוזי הכשרות הכללים בארץ של עגלים מגזע זה. אנו סבורים כי קיימת שונות גנטית המצויה בבסיס ההבדלים האינדיבידואליים הללו. מחקרים רבים הראו כי העברת עגלים פוגעת בתפקוד מערכת החיסון (Blecha et al., 1984; Gupta et al., 2007; Murata et al., 1987; Roth and Perino, 1998; Yagi et al., 2004; מחקרים רבים אחרים דווחו על הקשר שבין עקה לירידה בביצועי מערכת החיסון ולפתולוגיות שונות (ובכללן מחלות נשימה), כמו גם על קשר (נסיבתי, בשלב זה) בין העברת עגלים לבין התפתחות עקת חמצון (Chirase et al., 2004). העברת עגלים נחשבת עקה המהווה זרז לתחלואה בדלקת ריאות. הקשר הזה העברה (עקה) – עקת חמצון – שינוי בתפקוד מערכת החיסון – תחלואה אינדיבידואלית בדלקת ריאות, בנוסף לעובדה שאין כיום אמצעי לחיזוי מוקדם של סיכוי של עגל לחלות בדלקת ריאות, מעוררים את הצורך

בפיתוח של אמצעי זיהוי כזה. ניתוח של הנתונים הרבים המצויים בספרות רומז כי יש לחפש אמצעי שכזה במערכות המתמודדות עם עקה. בשנת המחקר החולפת (2007) ניסינו ללמוד את התגובה לעקת העברה בשלוש הרמות שצוינו בפרק התוצאות. בשנה הבאה אנו מתכוונים להרחיב את המערכת ולתעד ביטוי גנים ספציפיים במערכת החיסון יחד עם התנהגות הזנה ממוחשבת ביונקיה, בחינת ביצועי הגדילה ורמת הכשרות, כדי להרכיב "תעודת זהות פנוטיפית" של עגלים מועדים לחלות בדלקת ריאות.

### ספרות מצוטטת

1. אורי בר גיא (1998). מחלות בקר בישראל – היבטים קליניים, משקיים, כלכליים ומניעתם. הוצאת אקדמון, מהדורה שנייה.
2. **Aly, K.B., Pipkin, J.L., Hinson, W.G., Feuers, R.J., Duffy, P.H., Lyn-Cook, L. and Hart, R.W.** (1994). Chronic caloric restriction induces stress proteins in the hypothalamus of rats. *Mech Ageing Dev.* **76**:11-23
3. **Blecha, F., Boyles, S. L. and Riley, J. G.** (1984). Shipping suppresses lymphocyte blastogenic responses in Angus and Brahman Angus feeder calves. *J. Anim. Sci.* **59**(3): 576–583
4. **Chakrabarti, S. and Patel, K. D.** (2005). Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **78**(1): 279–288.
5. **Campisi, J., Leem, T.H. and Fleshner, M.** (2003). Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. *Cell Stress Chaperones* **8**: 272–286.
6. **Chirase, N. K., Greene, L. W., Purdy, C. W., Loan, R. W., Auvermann, B. W., Parker, D. B., Walborg, E. F. Jr, Stevenson, D. E., Xu, Y. and Klaunig, J. E.** (2004). Effect of transport stress on respiratory disease, serum antioxidant status, and serum concentrations of lipid peroxidation biomarkers in beef cattle. *Am. J. Vet. Res.* **65**(6): 860-864.
7. **Cox, G.** (1998). The role of neutrophils in inflammation. *Can. Respir. J.* **5** (Suppl. A): 37A–40A.
8. **Franci O, Amici A, Margarit R, Merendino N, Piccolella E.** (1996). Influence of thermal and dietary stress on immune response of rabbits. *J. Anim. Sci.* **74**:1523-1529.
9. **Gardner, B. A., Dolezal, H. G., Bryant, L. K., Owens, F. N. and Smith, R. A.** (1999). Health of finishing steers: Effects on performance, carcass traits and meat tenderness. *J. Anim. Sci.* **77**: 3168-3175.
10. **Gupta, S., Earley, B. and Crowe, M. A.** (2007). Effect of 12-h road transportation on physiological, immunological, and haematological parameters in bulls housed at different space allowances. *Vet. J.* **173**: 605-616.
11. **Hays, V. S., Gill, D. R., Smith, R. A. and Ball, R. L.** (1978). The effect of vitamin E supplementation on performance of newly received stocker cattle. *Oklahoma state University Anim. Sci. Res. Report MP-199*: 198-201.
12. **Hutcheson, D. P. and Cole, N. A.** (1985). Vitamin E and selenium for yearling feedlot cattle. *Fed Proc.* **44**: 549 (abstract).

13. **Lekeux, P.** (1995). Bovine respiratory disease complex: an European perspective. *Bov. Pract.* **29**: 71–75.
14. **Matz, J.M., LaVoi, K.P., Moen, R.J. and Blake, M.J.** (1996). Cold-induced heat shock protein expression in rat aorta and brown adipose tissue. *Physiol. Behav.* **60**: 1369–1374.
15. **Morimoto, R.I., Jurivich, D.A., Kroeger, P.E., Mathur, S.K., Murphy, S.P., Nakai, A., Sarge, K., Abravaya, K. and Sistonen, L.T.** (1994). Regulation of heat shock gene transcription by a family of heat shock factors. In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (ed. R. I Morimoto, A. Tissieres and C. Georgopoulos), pp. 417-455.
16. **Muggli-Cockett, N. E., Cundiff, L. V. and Gregory, K. E.** (1992). Genetic analysis of bovine respiratory disease in beef calves during the first year of life. *J. Anim. Sci.* **70**: 2013-2019.
17. **Murata, H., Takahashi, H. and Matsumoto, H.** (1987). The effects of road transportation on peripheral blood lymphocyte subpopulations, lymphocyte blastogenesis and neutrophil function in calves. *Br. Vet. J.* **143**: 166–174.
18. **Roth, J. A. and Perino, L. J.** (1998). Immunology and prevention of infection in feedlot cattle. *Clin. North America: Food Anim. Prac* **14(2)**: 233-255.
19. **Udelsman, R., Blake, M.J., Stagg, C.A., Li, D.-G., Putney, D.J. and Holbrook, N.J.** (1993). Vascular heat shock protein expression in response to stress. Endocrine and autonomic regulation of this age-dependent response. *J. Clin. Invest.* **91**: 465–473.
20. **Welch W.J.** (1990). The mammalian stress response: Cell physiology and biochemistry of stress proteins. In: *Stress Proteins in Biology and Medicine* (ed. R. I Morimoto, A. Tissieres and C. Georgopoulos), pp. 223-278. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
21. **Wiske, S. E.** (1985). Feedlot cattle pneumonias (Symposium on Bovine Respiratory Disease). *Vet. Clin. North America: Food Anim. Prac.* **1(2)**: 289-310.
22. **Wittum, T. E., Woolen, N. E., Perino, L. J. and Littledike, E. T.** (1996). Relationship among treatment for respiratory tract disease, pulmonary lesions evident at slaughter, and rate of weight gain in feedlot cattle. *JAVMA* **209**: 814-818.
23. **Yagi, Y., Shiono, H., Chikayama, Y., Ohnuma, A., Nakamura, I. and Yayou, K.-I.** (2004). Transportation stress increases somatic cell counts in milk, and enhances the migration capacity of peripheral blood neutrophils of dairy cows. *Clin. Pathol.* **66(4)**: 381–387.