

דו"ח מסכם – דו"ח מדעי שנתי לתכנית 12-0275-362

האם הזנת בקר בצמחיית חורש מקנה עמידות מפני תחלואה בקדחת קרציות?
Does grazing in woodland habitat provide resistance against tick fever?

מוגש למועצת החלב

ע"י

אריאל שבתאי	מינהל המחקר החקלאי	נוה יער
אריה ברוש	מינהל המחקר החקלאי	נוה יער
זלמן הנקין	מינהל המחקר החקלאי	נוה יער
יובל גוטליב	הפקולטה לוטרניריה	האוניברסיטה העברית
מאורי רוזן	שה"ם	

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים : כן / לא

חתימת החוקר

תקציר

לקדחת הקרציות חשיבות כלכלית מכרעת לענף הבקר בשל הנזקים הכלכליים הנגרמים בגינה הן בתמותת ראשי בקר והן בטיפולים לפני ואחרי הדבקה. מנתונים כללים הידועים בעולם וכנראה גם מתאימים למצב בארץ היקף התחלואה בעדר יכול להגיע לכדי עשרות אחוזים, כשעיקר הפגיעה בפרטים בוגרים בני 3 שנים ויותר. קשה לצפות התפרצויות של קדחת קרציות, ומבחינה זו מדובר בתופעה מתעתעת. בישראל משתמשים בחיסון מונע כנגד קדחת קרציות, אולם ויכוח ניטש באשר ליעילותו. הבנת המנגנונים המקנים עמידות לקדחת קרציות בבקר, הן ברמה הגנטית והן ברמה הסביבתית, יכולים לסייע בהתמודדות עם המחלה. מסקר שערכנו בקרב מגדלים, ושנתמך חלקית ע"י רישומים בלשכות הוטרינריות, עולה כי רמת התחלואה והתמותה מקדחת קרציות נמוכה באופן מובהק באזור הגליל המערבי (מרעה חורש אלון) בהשוואה לרמת הגולן (מרעה עשבוני). אנו סבורים כי בעדרי הבקר הרועים בחורש קיימת תופעה של עמידות סביבתית לקדחת קרציות, שמקורה בצמחיית החורש. תוצאות שנה ב' של המחקר ממשיכות את הקו המחשבה שהתפתח בעקבות תוצאות שנה א' ותומך בהיפותזה כי קיימת עמידות סביבתית לבבזיה. באופן ספציפי, התוצאות המובאות בדו"ח זה מלמדות כי פוליפנולים מעלוות עלי אלון מצוי מצטברים בפלסמה של הפרות, נספחים לממברנות האריתרוציטים, משפרים את עמידותם האוסמוטית ואת

הפוטנציאל נוגד החמצון שלהם. שימוש במערכת *in vitro* של טפילי מלריה מלמד כי כאשר מטפלים באריתרוציטים במיצויים של צמחי חורש, קטנה משמעותית החדירה שלהם לתוך האריתרוציטים.

מבוא

קדחות קרצית גורמות נזק כלכלי עצום לעדרי הבקר לבשר, עם הפסדים שנתיים הנאמדים במיליארדי דולרים. בארץ אין אומדן מדויק להיקף הכלכלי של הנזק מקדחות קרצית, בין היתר בגלל חוסר היעילות שבזרימת הידע מהשטח את הלשכות הוטרינריות. יחד עם זאת, מגדלים מסווגים את קדחות הקרצית כאחת מהבעיות המרכזיות של הענף.

על מחוללי קדחות הקרצית העיקריים בישראל נמנים בבזיה בוביס, בבזיה ביגמינה, תילריה אנולטה ואנפלסמה מרגינלה. מתוכם פרופורציית אירועי הבזיה היא הגדולה ביותר. טפילי הבזיה מועברים ע"י קרצית הבקר (*Boophilus*) שהיא קרצית חד-פונדקאית. ספורוזואיטים של בבזיה חודרים את זרם הדם של הבקר בעת מציצת דם ע"י הקרציה, ומדביקים אריתרוציטים (תאי דם אדומים). הם מתמיינים למרוזואיטים, עוברים חלוקות בינאריות באריתרוציטים עד להתפוצצותם, ומתחיל מחזור הדבקה של אריתרוציטים נוספים.

מעקב אחר ההרכב הבוטני של צואת פרות בעדר חט"ל מלמד כי עלוות הצומח המעוצה מהווה כ-60% מהדיאטה שלהן בתקופת הזמן שבין מאי וספטמבר. בתקופת זמן זו מתועדים עיקר אירועי התחלואה בקדחות קרצית. מכיוון שעלוות צמחי החורש ידועה בתכולה הגבוהה של פוליפנולים, ומכיוון שלפוליפנולים (בעיקר לטנינים) מיוחסת פעילות אנטי פרזיטית, ערכנו סקר השוואתי בקרב מגדלי בקר בגליל ובגולן לברור אחוז התחלואה והתמותה מקדחות קרצית בעדריהם. תוצאות הסקר הראו כי שיעור התחלואה והתמותה של בקר בעדרי הגולן היה גדול באופן מובהק משל עדרי הגליל, למרות ממשק חיסונים וריסוסים מוקפד.

ההיפותזה שהתעוררה בעקבות האינפורמציה הנ"ל הייתה כי הזנה בצמחיית חורש יוצרת עמידות סביבתית מפני בבזיה במסלולים הבאים:

- הספחות של פוליפנולים על ממברנות האריתרוציטים – אתר ההדבקה של בבזיה, ויצירה של מחסום פיסיקלי/כימי המקשה על חדירת הטפיל לתוך האריתרוציטים.
- הצטברות פוליפנולים, מטבוליטים שלהם או של חומרים אחרים בדם, המפחיתים את שיעור ההדבקה ע"י פגיעה בטפיל.
- שילוב בין 2 המסלולים.

מטרת העבודה המוצגת כאן הייתה לבחון את היתכנות קיומו של המסלול הראשון – שינוי תכונות ממברנות האריתרוציטים בעקבות הזנה בצמחיית חורש.

שיטות וחומרים

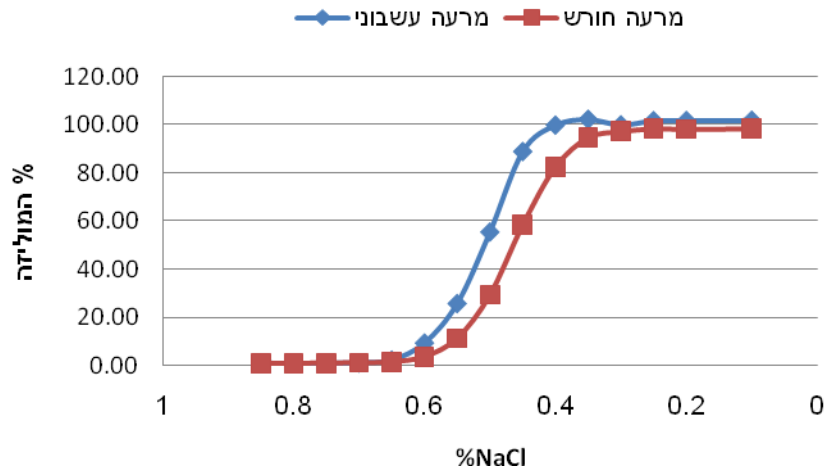
מהלך המחקר כלל מספר שלבים:

1. דיגום דם וקרציות מחמישים פרות בחמישה עדרים במרעה החורש ומחמישים פרות בחמישה עדרים במרעה העשבוני. חלק מהדם הופרד לפלסמה ותאים. הפלסמה שמשה לבדיקת הצטברות פוליפנולים ופוטנציאל נוגד חמצון, והאריתרוציטים – לבחינת הרכב הממברנות (טרם בוצע). מהדם המלא בצענו בתוך שעתיים מזמן הדיגום אנליזה של שבירות אוסמוטית.
2. הזנה מבוקרת של פרות בנוה יער בעלי אלון מצוי, דיגום דם ואנליזה FACS על אריתרוציטים לברור ספיחה של פוליפנולים לממברנות.
3. שימוש במערכת *in vitro* לביסוס ההבנה של המנגנון האחראי לעמידות סביבתית.

תוצאות + דיון

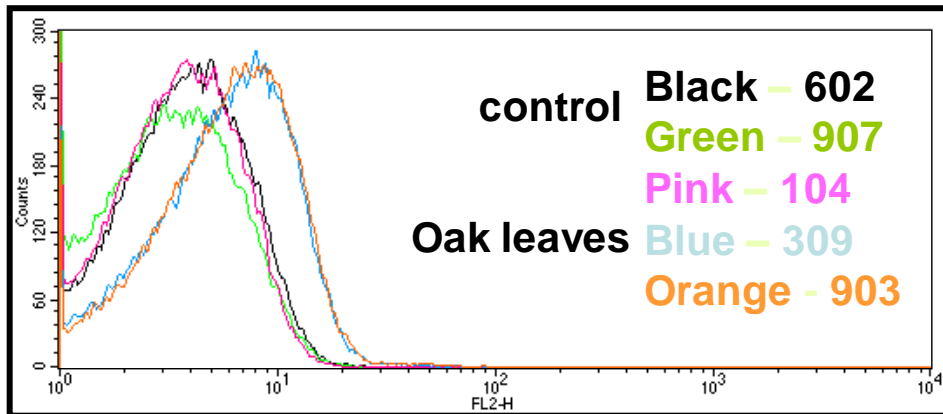
1. ריכוז הפוליפנולים בפלסמה של פרות ממרעה החורש (0.79 ± 0.18 mg/ml) היה גבוה באופן מובהק ($P < 0.001$) מזה של פרות המרעה העשבוני (0.68 ± 0.11 mg/ml), עובדה הרומזת על הצטברות פוליפנולים בפלסמת פרות החורש, שמקורם כנראה בעלווה. לאור העובדה שהדיגום נעשה באביב, אנו משערים כי ההבדלים עשויים להיות גדולים יותר בקיץ ובסתיו, זאת מאחר ותכולת הפוליפנולים בצמחייה עולה בתקופות אלו. ידוע מהספרות כי הספיגה של פוליפנולים, ובעיקר של טנינים נמוכה. שלא בהתאמה לכך, התוצאות הנ"ל מלמדות כי הזמינות הביולוגית של חומרים אלה יכולה לגדול, כתלות בסוג המזון, לפחות כאשר מדובר בעלוות חורש. מאנליזת השבירות האוסמוטית ההשוואתית (איור 1) ניתן לראות כי אריתרוציטים של פרות החורש עמידים יותר לשוק אוסמוטי בהשוואה לאריתרוציטים של פרות המרעה העשבוני. ואכן, דרושה תמיסה היפוטונית יותר ($0.47 \pm 0.04\%$ NaCl) בפרות החורש בהשוואה לפרות המרעה העשבוני ($0.52 \pm 0.03\%$ NaCl) כדי לגרום ל 50% המוליזה של האריתרוציטים ($P = 0.004$). ראוי לציין כי מובהקות זאת מתקיימת בתחום ערכי ההמוליזה של 0.35-0.6% מלח. נתונים אלה עשויים ללמדנו על כך שהתכונות הפיסיקליות של ממברנות האריתרוציטים השתנו כתוצאה מספיחה של חומרים עליהן, וההנחה היא כי מדובר בפוליפנולים.

שבירות אוסמוטית



איור 1: השוואת השבירות האוסמוטית של אריתרוציטים מפרות במרעה עשבוני ובמרעה החורש. לפרות החורש שבירות אוסמוטית נמוכה יותר ($P=0.004$), מה שעשוי להעיד על שינוי התכונות הפיסיקליות של הממברנה, כנראה בעקבות ספיחה של פוליפנולים עליה.

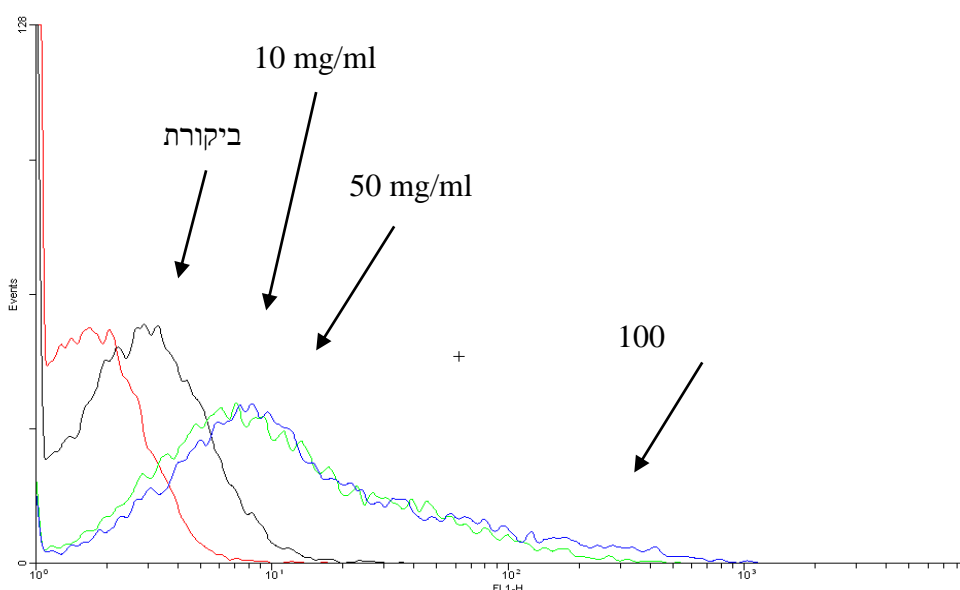
2. כדי לקבל מושג בהיר יותר לגבי אפשרות ספיחתם של פוליפנולים שמקורם בצמחיית חורש לאריתרוציטים של בקר, ערכנו בנודה יער ניסוי הזנה מבוקר בעלים של אלון מצוי, במשך חמישה שבועות. עלים טריים נקטפו שלוש פעמים בשבוע ביער הסוללים והוגשו לפרות הניסוי באופן פרטני. פוליפנולים ידועים כחומרים פלואורסצנטיים, ומה שביקשנו לראות כאן הוא האם הפלואורסצנסיה של האריתרוציטים תשתנה בהשפעת ההזנה בעלי אלון. ואכן, אנליזות של FACS הראו כי חמישה שבועות של הזנה בעלי אלון גרמו להגברת הפלואורסצנסיה של התאים (איור 2). ניסוי זה מחזק את ההבחנה שתוארה לעיל, כי פוליפנולים מהמזון נספגים אל הדם ונספחים על ממברנות האריתרוציטים.



איור 2: הזנה של פרות בעלווה של עלי אלון מצוי גורמת להיסט בפלואורסצנסיה של האריתרוציטים שלהן, כפי שהדבר מתבטא באנליזת FACS.

3. בניסוי נוסף, הדגרנו *in vitro* אריתרוציטים עם מיצוי מימי של עלי אלון מצוי. גם כאן מדדנו העצמה של הפלואורסצנסיה כתלות בריכוז המיצוי, באנליזת FACS (איור 3). יתרה מכך, ניסוי זה מדגים כי לאריתרוציטים יש קיבולת ציפוי, אשר משתנה ככל הנראה כתלות בזהות

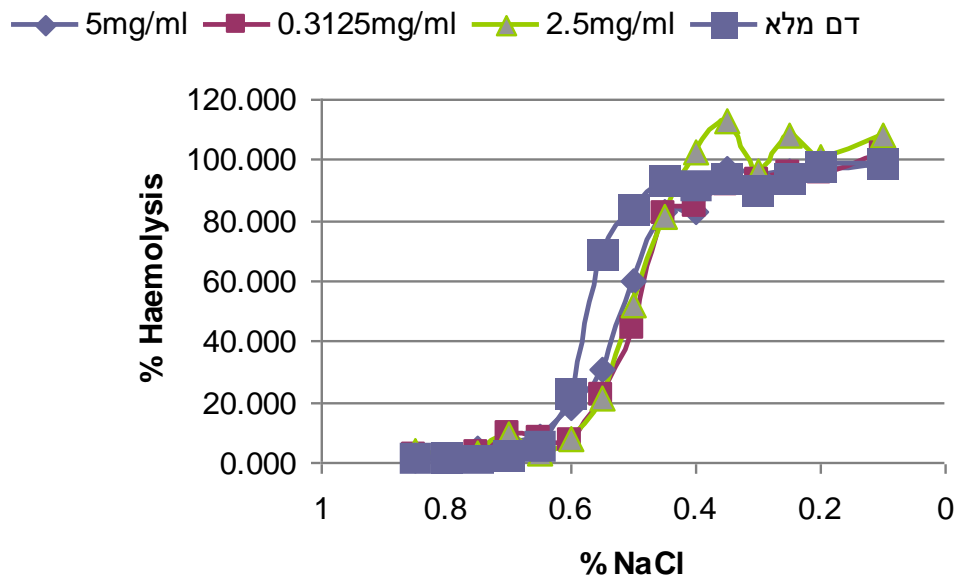
הפוליפנוול, ושבמקרה של מיצוי מימי של עלי אלון מצוי היא כ 50 mg/ml.



איור 3: השפעת ההדגרה *in vitro* של אריתרוציטים עם מיצוי מימי של עלי אלון מצוי על הפלואורסצנסיה שלהם - אנליזת FACS.

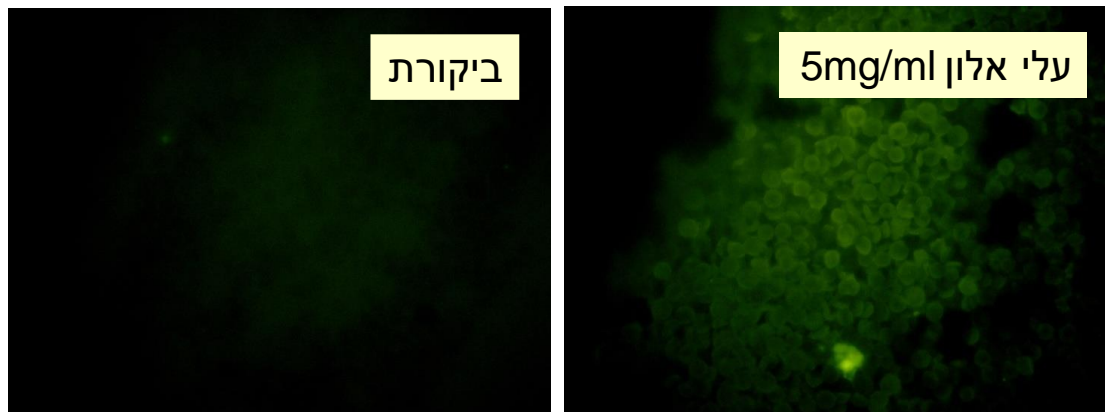
תוצאות שנה א' של המחקר מלמדות כי פוליפנולים מעלוות החורש מצטברים בפלסמה של הפרות, ואף נספחים לממברנות האריתרוציטים. עקב כך משתנות התכונות הפיסיקליות של הממברנות והעמידות האוסמוטית של התאים עולה. אנו סבורים כי יש בכך כדי להקטין את סיכויי החדירה של טפילי הבבזיה לתוך האריתרוציטים. כדי להמשיך ולתמוך בהיפוזזה זאת בצענו בשנה ב' שורה של ניסויים ואנליזות של דגימות מפרות במרעה החורש והעשבוני. על בסיס אנליזות של שבירות אוסמוטית הראנו כי אריתרוציטים של פרות החורש עמידים יותר לשוק אוסמוטי בהשוואה לאריתרוציטים של פרות המרעה העשבוני.

בשנה ב' בקשנו לבחון האם קיים מתאם בין ריכוז המיצוי של עלי אלון (המכיל ריכוז גבוה של פוליפנולים) שאריתרוציטים "רואים" לבין עמידותם לשוק אוסמוטי. מדד זה חשוב מאחר וידוע כי טפילות בבזיה מגבירה את הרגישות של אריתרוציטים לשוק אוסמוטי, קרי, בתמיסה היפרטונית יותר נגרמת להם המוליזה. איורים 4 ו 5 ממחישים כי בריכוזים נמוכים של מיצוי מימי של עלי אלון אין השפעה על השבירות האוסמוטית של האריתרוציטים, אולם ריכוז של 5 mg/ml תורם לשיפור בעמידות האוסמוטית שלהם.



איור 4: השפעת ריכוז מיצוי מימי של אלון על השבירות האוסמוטית של אריתרוציטים מפרות סימנטל – ניסוי *in vitro*

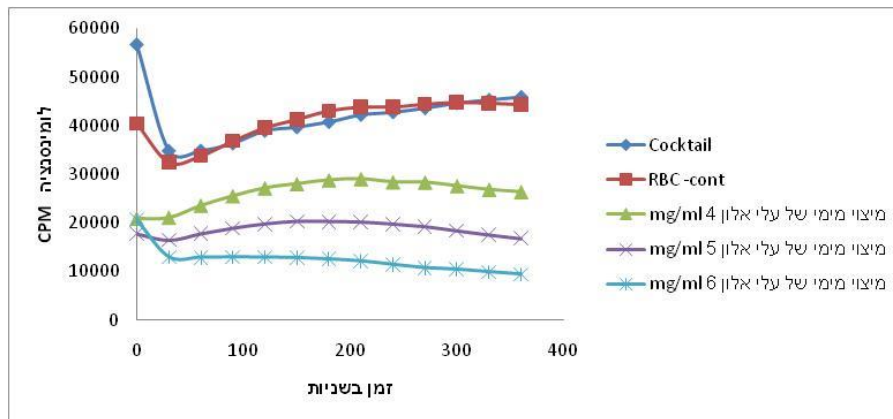
באיור 5 ניתן לראות כי הדגרה של אריתרוציטים במיצוי עלי אלון הגורם לשיפור בעמידותם האוסמוטית של אריתרוציטים מלווה בקישור של חומרים (פוליפנולים) במיצוי למברנת התאים.



איור 5: ספיחת פוליפנולים ממיצוי עלי אלון לאריתרוציטים של פרות סימנטל - ניסוי *in vitro* התוצאות הנ"ל יחד עם אלה שתוארו בדו"ח של השנה הקודמת עשויות להעיד כי הזנה בעלי אלון גורמת להצטברות של הפוליפנולים שלהם בפלסמת הפרות, ושחלקם נספח למברנת האריתרוציטים ומקנה לה עמידות אוסמוטית אשר יכולה להיות קשורה להגברת העמידות מפני חדירת הבבזיה לתוכם.

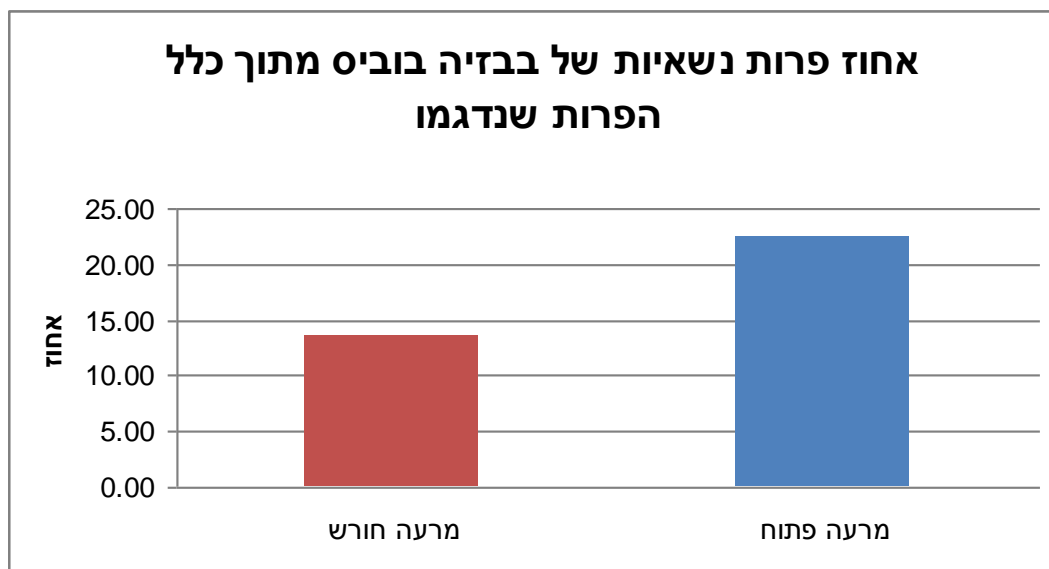
מחקרים מראים כי עקה חמצונית ברמה של ממברנת האריתרוציטים מצויה במתאם עם נגיעות בבזיוזיס. מידע זה מעורר את האפשרות כי הזנה בנוגדי חמצון, תיאורטית יכולה למזער את הנזק החמצוני

למברנה ובכך אולי להקטין את חדירת הטפיל לתאים. ואכן, עלי אלון עתירים בחומרים נוגדי חמצון. בחננו כיצד ריכוזים שונים של מיצוי עלי אלון משפיעים על הפוטנציאל נוגד החמצון של האריתרוציטים. לצורך כך השתמשנו בדם מלא או באריתרוציטים "רחוצים" מפלסמה. באיור 6 ניתן לראות כי תוצאות של אנליזת כמילומינסנסציה לבחינת הפוטנציאל נוגד החמצון של ממברנות האריתרוציטים. ובאמת, ככל שעלינו בריכוז המיצוי, עלה הפוטנציאל נוגד החמצון של התאים (ערכים נמוכים יותר), הן בדם מלא והן באריתרוציטים "רחוצים".



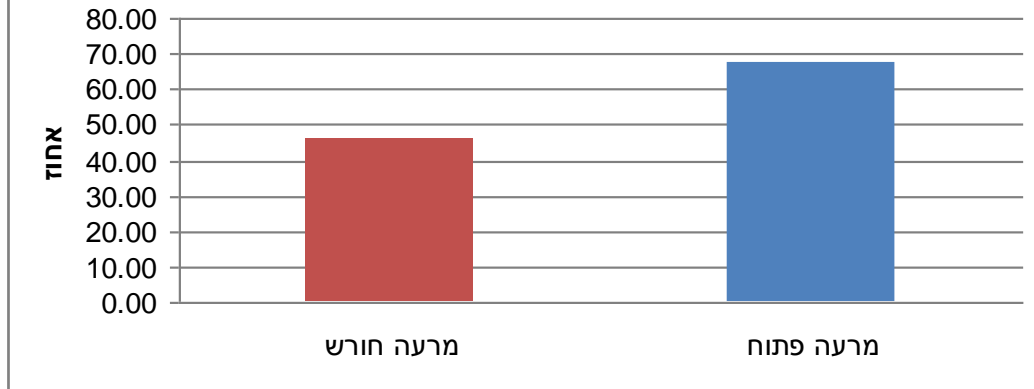
איור 6: פעילות נוגדת חמצון של אריתרוציטים מצופים במיצוי עלי אלון כתלות בריכוז המיצוי ממצא זה עשוי להעיד כי אם צמחיית חורש, או אלון מצוי במקרה הספציפי, מקנים עמידות בפני חדירת בבזיה לאריתרוציטים דרך אינטראקציה עם הממברנה, הם עשויים לעשות זאת במשולב ע"י חסימה פיסיקלית והגברת הפוטנציאל נוגד החמצון שלה.

מעקב אחר אחוז הפרות הנשאיות של בבזיה בוביס (איור 7) ובבזיה ביגמינה (איור 8) במרעה החורש בהשוואה למרעה העשבוני יכול לאושש את ההיפותזה שהועלתה לעיל.



איור 7: השוואה בין פרות במרעה חורש לפרות במרעה עשבוני לאחוז פרות נשאיות של בבזיה בוביס

אחוז פרות נשאיות של בבזיה ביגמינה מכלל הפרות שנדגמו



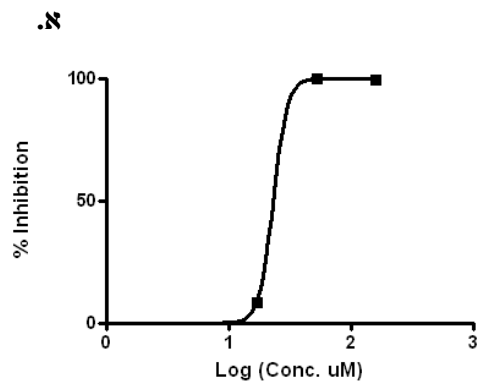
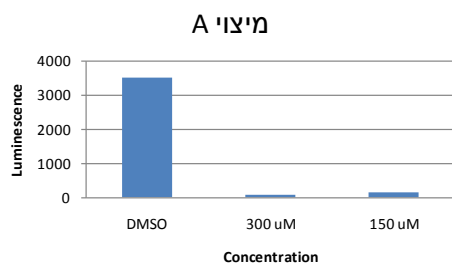
איור 8: השוואה בין פרות במרעה חורש לפרות במרעה עשבונאי לאחוז פרות נשאיות של בבזיה ביגמינה

דגמנו דם מכחמישים פרות (5 משקים שונים) במרעה החורש ומכחמישים פרות (5 משקים שונים) במרעה העשבונאי. בצענו ראקציית PCR עם פריימרים ספציפיים לכל אחד ממיני הבבזיה. התוצאות באיורים 7 ו 8 מלמדות כי פרות במרעה החורש נגועות פחות מפרות במרעה העשבונאי, הן בבבזיה בוביס והן בבבזיה ביגמינה.

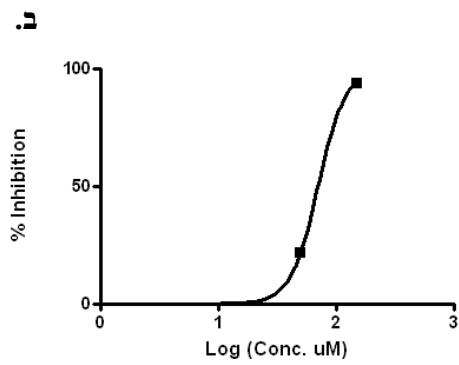
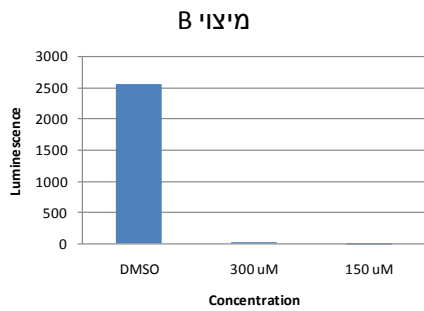
מסקנות שנה א' וב': אנו סבורים כי הזנה בתערובת נכונה של פוליפנולים שמקורם בצמחיית החורש הים-תיכוני, יכולה להוות אפיק חדש במחקר להגנה מפני בבזיה בבקר (ובאדם). חיפוש הרכב הפוליפנולים הספציפי וניסויי הדבקה *in vitro* ו *in vivo* יאוששו או יפריכו היפותזה זאת.

בשנה ג' בצענו ניסויי הדבקה *in vitro* במערכת טרנסגנית של טפיל המלריה, זאת מאחר ובשלב זה לא קיימת בארץ מערכת שכזאת בבבזיה. מעבר לכך, יש צידוק להשתמש במערכת המלריה מאחר ומדובר בשני טפילי דם בעלי קרבה משפחתית גדולה, אשר משתמשים באסטרטגיות וירולנטיות דומות ומתחמקים באופן דומה ממערכת החיסון של המאחסן. להלן הממצאים שהתקבלו:

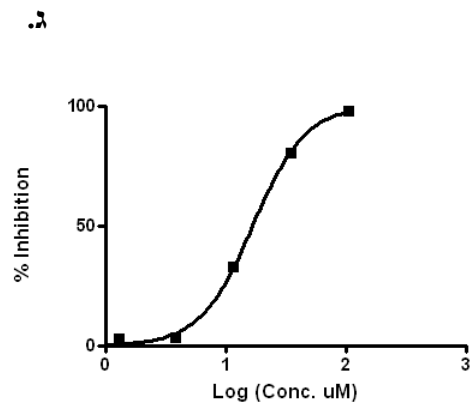
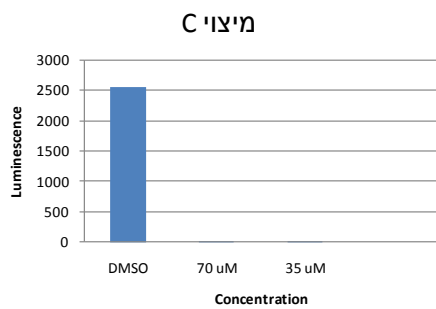
עיכוב פרוליפרציה של טפילי פלסמודיום: הפוטנציאל של שלושה מיצויים שונים לעכב פרוליפרציה של טפילי פלסמודיום מוצג באיור 9. מתוך עקומות העיכוב חושבו ערכי 50% עיכוב כאקוויולנט של EGCG (פוליפנול בעל מסה מולקולרית ממוצעת). מתוך שלושת המיצויים המוצגים באיור 9, מיצוי C היה בעל פעילות העיכוב הפוטנטית ביותר, למרות שספיחתו הכללית לאריתרוציטים הייתה פחות טובה מאשר מיצויים B ו C. יש בכך אולי כדי להניח שבמיצויים השונים יש אפניות משתנה לרצפטורים על גבי ממברנת האריתרוציט הדרושים להכרה עם הטפיל. בעצם פעילות זאת מונע מיצוי C פרוליפרציה של פלסמודיום בריכוזי פוליפנולים המתקרבים לפיסילוגיים.



EC50: 23 uM



EC50: 70 uM



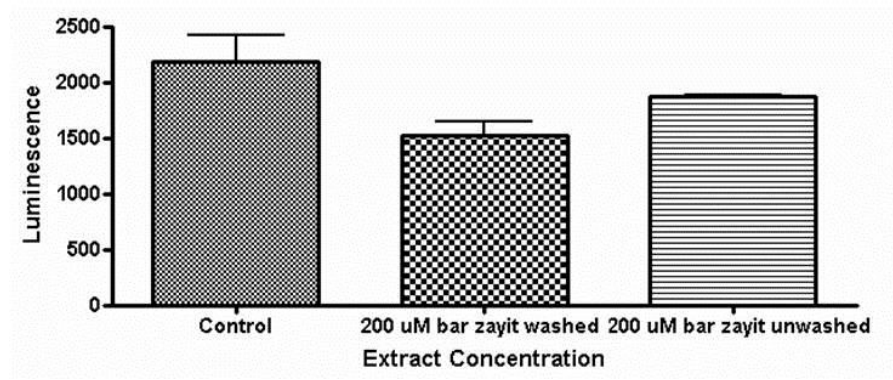
EC50: 16 uM

איור 9: יעילות עיכוב הפרוליפרציה של פלסמודיום של "מיצויים מצמחי חורש שונים.

ברור ראשוני של מנגנון פעילות מיצוי צמחי החורש

המסלולים האפשריים לעיכוב פרוליפרציה של פלסמודיום, אשר עשויה להיות מאוד רלבנטית גם כאשר מדובר בבבזיה, הם הספחות של פוליפנולים על ממברנות האריתרוציטים, הצטברות פוליפנולים, מטבוליטים שלהם או של חומרים אחרים בדם, המפחיתים את שיעור ההדבקה ע"י פגיעה בטפיל, או שילוב בין 2 המסלולים.

כדי להתחיל להבין את תקפות ההשערות הנ"ל, עבדנו עם תרבית פלסמודיום מסונכרנת עבור כל אחד ממיצויי צמחי החורש. משמעות העבודה עם תרבית מסונכרנת *synchronized late stage* (parasites) היא שלמרוזואיטים המגיחים מאריתרוציטים שעברו ליזיס יש רק אריתרוציטים שספוחים עליהם פוליפנולים למחזור הדבקה נוסף. בנוסף, התהליך כולל שטיפה של המדיום כך שאין פוליפנולים חופשיים, או חומרים אחרים מהמיצוי, במדיום. באיור 10 מודגם אפקט המיצוי של בר זית. ניתן לראות כי לתרבית השטופה יש יתרון מסוים על התרבית הלא שטופה, מה שעשוי להעיד כי החומרים הפעילים קשורים לממברנה. תופעה מאוד דומה קיימת גם עבור המיצויים האחרים.



איור 10: עיכוב פרוליפרציה של פלסמודיום על ידי מיצוי פוליפנולי מבר זית – בירור מידת ההשפעה של פוליפנולים ספוחים לממברנה.