

שימוש בתאי גזע לטיפול בדלקות רחם בפרות חלב

אנדרס ברניס-קארוליס^{1,2}, פרופ' נחום שפיגל² וד"ר שרון שלזינגר¹

¹המחלקה למדעי בעלי החיים, ² ביה"ס לרפואה ווטרינרית, הפקולטה לחקלאות, רחובות.

תקציר

דלקות רחם לאחר ההמלטה הינן ממצבי התחלואה הנפוצים בפרות חלב בארץ ובעולם. המחלה גורמת לנזקים כלכליים, הנובעים בעיקר מפגיעה בתנובת החלב ובפוריות, ולפגיעה ברווחת הפרות. הטיפול במחלה מצריך שימוש נרחב בכמויות גדולות של תרופות אנטיביוטיות אשר בנוסף לעלותו תורם להתפתחות עמידות בחיידקים העלולים להוות סכנה לאדם ולבהמה. בנוסף, יעילות הטיפול מוגבלת ואין בהכרח קשר בין החלמה קלינית לשיפור במדדי ההתעברות הנפגעים בשל מחלות רחם. מסיבות אלו המחקר לחיפוש אחר טיפול בדלקות רחם הינו בעל חשיבות למשק הישראלי. תאי גזע מזנכימליים (MSC) הינם תאים מולטיפוטנטיים קלים לבידוד ממגוון רקמות, הם קלים וזולים לגידול בתרבית, הם לא מעוררים תגובה חיסונית חזקה כך שניתן לבצע איתם השתלות ממקור זר (אלוגני) ובעיקר – הם מווסתים את תגובת מערכת החיסון. הוכח שבמצבי דלקת או תגובה חיסונית חזקה, הוספה של תאים אלו וויסתה את התגובה והפחיתה אותה כך שבמובן מסוים תאים אלו הם "אנטי-דלקתיים". מאחר שדלקות רחם מהוות בעיה חמורה, ולתאים אלו יכולות אימונו-מודולטוריות, נבחן השינוי בסביבה החיסונית והדלקתית (immune homeostasis) ברחם בזמן ולאחר דלקת בעקבות טיפול ב-MSC. חבל טבור של פרה שימש לבידוד תאי MSC והשפעתם על התגובה האימונית של תאי מערכת החיסון (מאקרופאגים, תאי T) ותאי אפיתל של הרחם. שנית, פותחה ונבדקה מערכת מודל לדלקת רחם בעכבר אשר בעזרתה הוכח שטיפול בתאי הגזע משפר את התגובה החיסונית ומקטין את הזיהום החיידקי ברחם. מכיוון שבטיחותו של הטיפול ברורה, בשלב הבא יש לבדוק את היתכנות ויעילות הטיפול במקרי שדה של דלקת רחם בפרות חלב.

מבוא

דלקות רחם לאחר ההמלטה הנן התחלואה השכיחה ביותר בבקר לחלב בארץ ובעולם, אשר אחראית לנזק כלכלי רב ופגיעה ברווחת חיות המשק. הנזקים הכלכליים הם כתוצאה מהפגיעה בפוריות, ירידה בייצור החלב ויציאה מהעדר ועלויות הטיפול הרפואיים (Waage et al., 1998). על פי נתוני רפואת העדר בחקלאית ומחקר שערך צוות המחקר בשנים האחרונות, ברפתות רבות מגיעים שעורי דלקות הרחם (ראשוניות ומשניות כתוצאה מעצירות שליה) לכדי כ- 40% מהפרות הממליטות ונגרמים נזקים כבדים כתוצאה מירידה בתנובת החלב והפוריות. בנוסף לכך, הטיפול המקובל כיום בדלקות רחם כולל שימוש אינטנסיבי בחומרים אנטיביוטיים וזאת בניגוד למגמה המועדפת כיום למזער שימוש זה בחיות המשק. (Sheldon et al., 2009).

למרות שנים רבות של מחקר בתחום דלקות הרחם בחיות משק, שיעורי היארעות וההמצאות של המחלה נשארו קשיחים ואף במגמת עליה במשקים רבים. התפתחות רפואת העדר, אסוף המידע, מחשובו וניתוח בשיטות אנאליטיות מתקדמות תרמו רבות להבנת גורמי סיכון וקשרים אפידמיולוגיים שונים אך למרבה האכזבה לא סייעו משמעותית לשליטה ומזעור של הבעיה. בנוסף לכך קיימים פערי ידע גדולים בהבנת מחוללי המחלה והמנגנונים התאיים והמולקולריים המובילים להתפתחותה. על פי ניסיון העבר ברפואת האדם וברפואה הוטרינרית, אין ספק שמחקר העוסק בפיתוח טיפולים חדשניים יעזור להבנה טובה יותר של תהליכי המחלה ולפיתוח שיטות נוספות למניעה ושליטה במחלה חשובה זאת.

למרות שנים רבות של מחקר וטרינרי בתחום, התהליכים הדלקתיים המתחוללים ברירת רחם בפרות המפתחות דלקות רחם לאחר ההמלטה עדיין אינם מובנים במלואם. מספר חיידקים כגון *ארקנובקטריום פיוגנס*, *אשריכיה קולי* (א. קולי) וחיידקים אנארוביים גרם שליליים מבודדים מרחם הפרות הלוקות בדלקות רחם. עם זאת, גורמים אלה מבודדים גם מרחם פרות שלא מפתחות דלקות רחם וניסיונות בודדים שנעשו לעמוד על ההבדלים בין אוכלוסיות אלה לא צלחו עד כה. ניתן לשער שההבדל נובע בין השאר מהשונות של תגובת מערכת החיסון בין פרטים שונים (Sheldon et al., 2017a; Sheldon et al., 2017b). תפקידה של מערכת החיסון בדלקות רחם, בעיקר מהסוג התת קליני או הכרוני, עדיין אינו ברור.

אנו מציעים כאן להשתמש בתאי גזע מזנכימליים (MSC), הידועים בין השאר ביכולתם לבקר תהליכי דלקת, על מנת להשיב לאיזון את התגובה החיסונית ברחם ובכך אולי להאיץ את הריפוי. MSC הם התאים הנבדקים ביותר בהקשר של רפואה תאית ורגנרטיבית, ניתנים לבידוד ממגוון רקמות בגוף הבוגר, בעלי יכולת גדילה טובה בתרבית ויכולים להתמייין לתאי עצם, סחוס, שומן ועוד (Kuroda and Dezawa, 2014). נכון ל 2016, 493 ניסיונות קליניים באדם בדקו או בודקים עדיין שימוש בתאים מסוג זה למחלות שונות והקצב הולך וגובר, ואף קיימות כמה תרופות המבוססות על התאים הללו שאושרו לשימוש (לדלקת פרקים וכנגד תגובת שתל למאכסן; מחלת GvHD). שני שימושים עיקריים מוצעים לתאים מהבחינה הקלינית: הראשון מניח שביכולתם להישאר בגוף ואף להתמייין לרקמת המטרה אליה הוחדרו וכך לתקן רקמות פגועות, למשל סחוס או עצם (Gao et al., 2016; Kuroda and Dezawa, 2016). השני מניח שבין אם התאים נשארים בגוף ובין אם לא יש להם השפעה ממתנת או מווסתת על מערכת החיסון, שנגרמת כנראה מהפרשת ציטוקינים, כימוקינים וחומרים נוספים. מסיבה זו התאים גם נחשבים בטוחים במיוחד (immune privileged)

לשימוש, שכן התגובה החיסונית כנגדם חלשה או שאינה קיימת כלל (Xiong et al., 2016). מחקרים הראו שהשתלות ממקור אלוגני (זר) היו יעילות ובטוחות כמו השתלות אוטולוגיות (מקור עצמי), ומחקרים בכלבים ועכברים אף הוכיחו את הבטיחות והיעילות של השתלות ממקור קסנוגני אנושי (Ma et al., 2014).

לסיכום, כל הידע שנצבר עד היום מצביע על בטיחות גבוהה של שימוש בתאי MSC ממקורות שונים ובדרכי החדרה מגוונות. יש לציין שהשימוש בתאי MSC כולל מצבים ספטיים ודלקות מחיידקים שונים ואף הוכח שלתאי MSC השפעות אנטימיקרוביאליות ניכרות. לפיכך ועל פי הניסיון שהצטבר ברפואת האדם, אין חשש לטפל בעזרת תאי MSC במצבים כגון דלקות רחם או דלקות עטין.

למרות ההתקדמות המחקר על MSC בתחום הרפואה האנושית, הניסיונות לשימוש בתאים אלו לרפואת חיות משק מועטים, אם כי נעשו ניסיונות לשימוש בתאים לרפואת חיות מחמד. מחקר שפורסם לאחרונה הראה פעילות אנטימיקרוביאלית של MSC מפרה (bMSC) נגד הגורם העיקרי לדלקות עטין, *Staphylococcus aureus* (Cahuascano et al., 2019). כל הניסיונות גם בבני אדם וגם בחיות, מוכיחים את בטיחותם של התאים שכמעט ואינם מעוררים תגובה חיסונית נגדם או גורמים לבעיות אחרות (Hass et al., 2011; Nowakowski et al., 2016). במחקר המתואר הצענו לבדוק את השימוש בתאים אלו לטיפול בדלקות רחם בפרות חלב במודלים של תרביות תאים ועכברים. בכך קיוונו לפתוח פתח לשימוש ברפואה תאית בחיות משק.

מטרות המחקר היו להפיק תאי גזע מזנכימאליים מבקר ולבסס את ההיתכנות, הבטיחות והיעילות של השימוש בתאי גזע מזנכימאליים לטיפול בדלקות רחם. מטרה זאת הושגה לראשונה בפרויקט מחקר זה המעמיד תשתית של ידע ויכולות מוכחות להמשך מחקר במקרי שדה בפרות חלב לשם יישום הטיפול.

שיטות וחומרים

גידול התאים בתרבית

תאי MSC:bMSC הופקו מרקמת חבל הטבור בהתאם ל (Toupadakis et al., 2010). בקצרה, האבר נאסף מהרפת (חבל טבור) או מבית המטבחים (שומן), עובר טבילה באתנול לניקוי ואז חיתוך ידני ואנזימטי. התאים נשמרים בחנקן נוזלי. לניסוי, התאים הופשרו ונזרעו בצלחות במדיום נמוך בגלוקוז (Gibco's Modified Eagle's low glucose Dulbecco's Modified Eagle's (FBS) 10% fetal bovine serum) ותערובת של פניצילין סטרפטומיצין (5%). מדיום הוחלף מידי 3-4 ימים. תאים מזנכימאליים ממח העצם של עכבר (mMSC) הופקו כפי שתואר (Hinden et al., 2015) והתקבלו בתודה מדר' אסנת אלמוג חזני, האונ' העברית וביה"ח הדסה.

תאי אפיתל מרירית הרחם: קו התאים bovine endometrial cell line BEND (ATCC CRL-2398) התקבל מהמעבדה של דר' ערן גרשון, מכון וולקני וגודלו בהתאם להנחיות ה-ATCC. תאי רחם ראשוניים – פרימאריים – הופקו כפי שמתואר ב-(Skarzynski et al., 2000). בקצרה, רחם מפרה בשלב הייחום המוקדם (יום 2-5) נאסף מבית מטבחים בשלמותו והודגר למשך 45 דק ב 37 מעלות עם תמיסה אנזימטית הכוללת 0.05% desoxyribonuclease I, 0.005% collagenase I, 0.05% HBSS ו-0.1% BSA. התאים שהתנתקו מהרחם סוננו, נשטפו והודגרו במדיום DMEM/Ham's F-12;

בתוספת סרום ואנטיביוטיקה כמקובל, עד שמילאו את התרבית. לאחר שישה ימים מדיום הגידול הועשר ב- 0.1% BSA, 5 ng/ml sodium selenite, 0.5 mM ascorbic acid, 5 mg/ml transferrin. כל התאים גודלו באינקובטור בתנאי סביבה נשלטים- 5% CO₂ וטמפרטורה של 37 מעלות- אלא אם צוין אחרת.

הערכת זמן ההכפלה

bMSC נזרעו בריכוז 104/cm² ופוצלו כל 3-5 ימים. ספירה ובדיקת חיות התבצעו באמצעות סופר תאים אוטומטי TC-10 (Biorad) וצביעת Trypan blue. הנוסחה $N=N_0 \times 2^{t/T}$ שימשה לכימות זמן ההכפלה במהלך ההעברות כאשר $N=N_0$ מס תאים סופי, N_0 מספר תאים התחלתי ו T זמן ההכפלה.

התמיינות של התאים לסחוס, עצם ושומן

פרוטוקול ההתמיינות והצביעה נלקחו Gomez-Leduc et al. (2016) Gomez-Leduc et al. בקצרה, התמיינות לעצם הושרתה ע"י הוספת 2-ascorbic acid 100 μ M, dexamethasone 7-10 M, β -glycerophosphate 10 mM phosphate, 10 mM למדיום הגידול. ההתמיינות נבחנה וכומתה ע"י צביעה עם alizarin red S. בשביל התמיינות לשומן התאים גודלו בתוספת 0.5 M dexamethasone, 6-10 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, 0.2 mM indomethacin, 10 μ g/mL recombinant human Bodipy 493/503, או שימוש ב- 0.3% oil red O צביעה ע"י צביעה (rh) insulin Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient. התמיינות לסחוס הושרתה במדיום Mixture F-12 (DMEM/F-12) media עם תוספות: 5% FBS, 100 IU/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine (Biological Industries), 1% Insulin-Transferrin-Selenium (ITS-G, Gibco) 10ng/mL Transforming Growth Factor-beta 1 TGF β 1 (PeproTech) (Mackay et al., 1998, Challa et al., 2010) ההתמיינות נבחנה בצביעת Alcian Blue (Sigma-Aldrich) 0.6%.

תרבית משותפת ובחינת היכולת האימונו-מודולטורית של התאים

התרבית המשותפת נעשתה ע"י גידול התאים זה על גבי זה ביחס של 10:1 או 5:1 למשך 24 שעות. בחינת האימונומודולציה נעשתה בשתי דרכים. (1) תאי T: דם נלקח מעורק הצוואר של פרה בריאה (בית דגן, ישראל) ותאי דם פריפריים מונוקלאריים (PBMC) הופקו בעזרת Histopaque 1077 (Sigma) and Histopaque 1119. התאים שופעלו ע"י concanavalin A והחלו להתחלק באופן מוגבר. כמות התאים החיים נבדקה ע"י MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) (Shi et al., 2018) ונקראה במכשיר SpectraMax i3 plate Reader באורך גל 550nm. (2) מקרופאגים: לקו תאי מאקרופאגים של עכבר RAW יכולת להפוך לתאי M1 – פרואינפלמטוריים – או M2 – אנטי-אינפלמטוריים בעקבות שפעול ע"י הוספת 1 μ g/mL of lipopolysaccharides (LPS) לשלוש שעות. היחס בין שתי האוכלוסיות הנ"ל ע"י ביטוי סמנים מוסכמים (Mittal et al., 2016) נבחן ע"י נוגדנים CD86 ו-CD163 ב flow cytometry וכן ע"י בדיקת השינוי בביטוי הגנים.

החדרת גן מדווח לתאים וקריאת הסיגנל

החדרת הגנים מדווח נעשתה בעזרת לנטי-וירוס כפי שמתואר ב- (Nissim-Eliraz et al., 2017)

הגן לוציפראז (firefly luciferase (pGL4.24-luc2P, Promega) הוכנס תחת הבקרה של רצפי קישור ל NF-kB (pLNT-minP-5kB-luc2P) כפי שתואר אצל (Brignall et al., 2017). התאים המודבקים נזרעו בצפיפות שווה ועוצמת הסיגנל הזרחני כומתה לאחר הוספת 150 $\mu\text{g/ml}$ D-luciferin (GoldBio) בעזרת קורא פלטות מסוג SpectraMax i3x multiple detection. על מנת לעקוב אחרי תאי ה- MSC ברחם לאחר הזרקה, גן מדווח פלאורוסנטי ירוק (NF-kB 5kb- Venus) הוחדר לתאים ע"י לנטי-וירוס כפי שתואר (Salamon et al., 2020).

הכנת העכברות להזרקה

עכברות BALB/C בתולות בנות 6-8 שבועות (Envigo, Israel) סונכרונו ע"י medroxy progesterone (MPA; Depo-Provera, Pfizer Inc., New York City, NY, USA) לשלב הדיאסטרוס בשתי הזרקות – יום 0 ויום 5 (Zhou et al., 2016). יום 7 נקבע כיום תחילת הניסוי לאחר בדיקת הסינכרוניזציה באמצעות vaginal smears (Byers et al., 2012). עשר דק' לפני תחילת הניסוי הוזרק לעכברות 6 mg/kg clenbuterol hydrochloride (Planipart®, Boehringer Ingelheim, Auckland, NZ) להרפיית הרחם ומניעת התכווצויות.

ההוקעה

מושבות של חיידקים לאחר גידול של 5 שעות נשטפו כשהגיעו ל $0.6 = \text{O.D.}$ וההוקעה נעשתה בנפח של $10 \mu\text{l}$ בעזרת NSET™ Device (ParaTechs Corporation, Lexington, Kentucky, USA) (Figure 5A). נזילה החוצה מנעה ע"י הכנסת דבק ביולוגי לצוואר הרחם. על מנת לאפשר הדמיה של הטיפול, הטיפול, ICG (Indocyanine green) $5 \mu\text{gr}$ הוכנסו עם החיידק והדמיית גוף מלאה התקבלה ע"י IVIS Lumina Series III (PerkinElmer Inc., MA USA).

הזרקת תאי mMSC

הזרקת התאים המסומנים נעשתה 6 שעות לאחר ההוקעה באותה שיטה. 250 אלף תאים הורחפו בנפח של $10 \mu\text{l}$ PBS, בתוספת של ICG, והוכנסו לרחם. עכברות ביקורת ללא הוקעה סונכרונו וטופלו באופן זהה אך קיבלו הזרקת תאי MSC או PBS בלבד.

בדיקה היסטולוגית

העכברות הוקרבו ודוגמאות רחם להיסטופתולוגיה, לספירות חיידקים ולמדידת רמות ציטוקינים וכימוקינים נלקחו כפי שדווח בעבר (Nissim-Eliraz et al., 2017). בקצרה: לאחר קיבוע בפראפין נשלחו חתכים בעובי $5 \mu\text{m}$ לצביעות hematoxylin ו- eosin (H&E).

ספירת חיידקים

תמצית מהרחם נזרעה במיהולים עוקבים ומושבות נספרו לאחר 24 שעות, כפי שמוצג ב Figure 5C, D.

בדיקת ביטוי ציטוקינים

ביטוי הגנים נעשה באמצעות RT-qPCR כפי שתואר (Bruckner et al., 2018; Nissim-Eliraz et al., 2017). ניתוח התוצאות נעשה ע"פ שיטת $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak and Schmittgen, 2001) והנירמול נעשה לגן הביקורת mouse β -actin (Actb).

הדוגמאות קובעו בעזרת 4% paraformaldehyde והוקפאו. כמה חתכים נצבעו ב- anti-CD45 phalloidin וב- DAPI וצולמו ב Axio Imager M1 upright fluorescence microscope (ab23910) ב- phalloidin וב- DAPI וצולמו ב Axio Imager M1 upright fluorescence microscope (Zeiss, Germany).

הערכת מודל הדלקת

טבלה 1: הפרמטרים לקביעת רמת הדלקת ברחם ואופן כימותם

Variable	Category	Score (range)
Epithelium		Score (0–10)
Height	Columnar	0
	Cuboidal	1
	Flattened	2
Epithelial damage	Absent	0
	Mild	1
	Moderate	2
	Ulcer	3
Inflammatory cell type	Absent	0
	Mononuclear	1
	Polymorphonuclear	2
Infiltrate intensity	Absent	0
	Mild (≤ 5 cells/hpf; $\times 40$)	1
	Moderate (≥ 6 – 10 cells/hpf; $\times 40$)	2
	Severe (> 10 cells/hpf; $\times 40$)	3
Lamina propria		Score (0–5)
Inflammatory cell type	Absent	0
	Mononuclear	1
	Polymorphonuclear	2
Infiltrate intensity	Normal (≤ 20 cells/hpf; $\times 40$)	0
	Mild (≥ 21 – 40 cells/hpf; $\times 40$)	1
	Moderate (≥ 41 – 70 cells/hpf; $\times 40$)	2
	Severe (> 70 cells/hpf; $\times 40$)	3
Endometrial gland		Score (0–3)
infiltration intensity	Absent	0
	mild (≤ 3 cells total in glands/hpf; $\times 40$)	1
	moderate (≥ 4 – 8 cells total in glands/hpf; $\times 40$)	2
	severe (≥ 9 cells total in glands/hpf; $\times 40$)	3
Vascular		Score (0–3)
vascular congestion	Absent	0
	mild (≤ 10 RBC /hpf; $\times 40$)	1
	moderate (≥ 11 – 40 RBC /hpf; $\times 40$)	2
	severe (≥ 41 RBC /hpf; $\times 40$)	3
perimetrium		Score (0–3)
infiltration intensity	Absent	0
	mild (≤ 1 – 3 cells /hpf; $\times 40$)	1
	moderate (≥ 4 – 8 cells /hpf; $\times 40$)	2
	severe (≥ 9 cells /hpf; $\times 40$)	3
lumen		score (0–3)
infiltration intensity	Absent	0
	mild (≤ 1 – 10 cells /hpf; $\times 40$)	1
	moderate (≥ 11 – 50 cells /hpf; $\times 40$)	2
	severe (≥ 51 cells /hpf; $\times 40$)	3
Total		Score (0–27)

hpf; Per high power field at the stated magnification ($\times 10$ or $\times 40$).

Flow cytometry

התאים נותקו מהצלחות בעזרת טריפסין ולאחר מכן פולטרו דרך פילטר ניילון לקבלת תאים מבודדים (Thermo Fisher). פלורוסנציית התאים נקבעה על ידי מכשיר Flow Cytometer Cytoflex from Beckman Coulter, בשימוש בלייזר 488nm. בכדי לבדוק את האנטיגנים שמבטאים על פני השטח לפי המלצת ה International Society of Cellular Therapy (ISCT) נבחנו נוכחות המרקרים הספציפיים: CD90 ו CD105, CD73 והעדר ביטוי של המרקרים CD34, CD45. נבדקה פלורוסנצייה ירוקה ואדומה באמצעות ערוצי FL1 (FITC-A), FL2 (PE-A) בהתאמה. כל דגימה הכילה מינימום של 10,000 תאים שנבדקו בקצב הרצה של 30-60 ul/second. סיווג לשערים התבסס על גרנולריות וגודל התא (SSC-A, FSC-A בהתאמה). בכל ניסוי הורצה דוגמה של תאים שלא נצבעו שהיוותה ביקורת שלילית- בכדי להבחין בין אוטופלורוסנצייה של התאים/ נוגדי החמצון לבין הפלורוסנצייה של הצביעה. תוצאות ה Flow cytometry הועברו לתוכנת FlowJo V.10 לביצוע אנליזה.

אתיקה

העבודה בוצעה בצמוד ובכפוף לכל נהלי האתיקה לניסויים בבעלי חיים, אישור אתי למערכת המודל התקבל מוועדת האתיקה של האונ' העברית IACUC ומספרו MD-18-15455-3 and MD-19-15801-3. אישור אתי ללקיחת דגימות חבל טבור מהרפת בבית דגן התקבל מהוועדה האתית של מכון וולקני ומספרו 16688.

ניתוח סטטיסטי

נעשה בעזרת בתוכנה GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA) לאנליזות סטטיסטיות. נערכו מבדקי t test כשערך P.value נמוך מ0.05 נחשב כמוובהק.

טבלה 2: רשימת פריימרים ל RT-qPCR

Gene	Forward	Reverse	
KC	CGCTCGCTTCTCTGTGCA	ATTTTCTGAACCAAGGGAGCT	242bp
IL-6	GATGCTACCAAACCTGGATATAATC	GGTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG	269bp
TNF α	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	175bp
Ly6G	TGCCCCCTTCTCTGATGGATT	TGCTCTTGACTTTGCTTCTGTGA	79bp
A20	AAACCAATGGTGATGGAAACTG	GTTGTCCCATTCGTCATTCC	224bp
I κ B α	GTCTCCCTTCACCTGACCAA	CAGCAGCTCACGGAGGAC	99bp
INOS	TTGGAGTTCACCCAGTTGTG	ACCAGAGGCAGCACATCAA	74bp
MIP2	TGCCTGAAGACCCTGCCAAGG	GTTAGCCTTGCCTTTGTTCAG	189bp
Icam1	CTGAGCTCCGCTGCTACCT	AGGCCAGGGATCACAAC	112bp
IL-1	GGTCAAAGGTTTGAAGCAG	TGTGAAATGCCACCTTTTGA	94bp
IL-10	TGGCCTTG TAGACACCTTGG	AGCTGAAGACCCTCAGGATG	129bp
ACTB	ATGGAGGGGAATACAGCCC	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT	149bp

תוצאות

הפקה ואפיון של תאי MSC מפרה, בעלי יכולת לווסת את תגובת תאי מערכת החיסון.

תאים הופקו משלושה חבלי טבור umbilical cords (UC) של פרות ועגלי חלב בסוף ההריון, בהסכמת הבעלים ותחת אישור אתי ממכון וולקני. תאי MSC נוספים הופקו גם משומן שהגיע מבית המטבחים. הרקמות עברו עיבוד אנזימטי כפי שמתואר ב (Tessier et al., 2015). התאים גדלים ושומרים על סטריליות ועל יכולת חלוקה למשך 15 העברות לפחות, אך כל הניסויים המתוארים נעשו עם תאים לפני העברה (Passage) 5. ראשית, נערכה בחינה פנוטיפית של התאים- מורפולוגיה ופוטנציאל החלוקה. התאים מפגינים מורפולוגיה פיברובלסטית מאורכת אופיינית ל MSC, שנשמרה תקינה לפחות ב 10 העברות (Figure 1A). הערכת זמן ההכפלה הראתה עליה משמעותית בזמן הנדרש להשלמת מחזור חלוקה לאחר חמש העברות ולאחר מכן ירידה הדרגתית איטית (Figure 1B). שנית, ביטוי סמנים אופייניים ל MSC כמו CD44, CD73 והיעדר סמנים לקו המטופואטי כגון CD45 (לפי הנחיות איגוד תאי הגזע העולמי (ISCT) (Dominici et al., 2006; Galipeau et al., 2016)) נבדקו ב flow cytometry ובמיקרוסקופיה (Figure 1C). בנוסף, נבחנה יכולת ההתמיינות של התאים לסחוס, עצם ושומן (Figure 1D). לבסוף, על מנת לוודא שלתאים יכולת לווסת את מערכת החיסון, bMSC הודגרו בתרבית משותפת עם תאי T או מקרופאג'ים משופעלים, ויכולתם להוריד את חלוקת תאי ה T או את הפרשת הציטוקינים של המקרופאג'ים נבחנה. במצב רגיל, תאי T מתחילים להתחלק באופן מוגבר בעקבות שפעול ע"י הוספת חומר הנקרא concanavalin A. לאחר השפעול, כמות התאים החיים נבדקה ע"י MTT ונמצא כי הדגרה משותפת עם תאי bMSC מורידה את החלוקה (Figure 1E). בדיקה נוספת מתבססת על קו תאי מאקרופאג'ים של עכבר שנקרא RAW264.7. תאים אלו יכולים להפוך לתאי M1 – פרואינפלמטוריים – או M2 – אנטי-אינפלמטוריים. ניתן לקבוע את היחס בין שתי האוכלוסיות הנ"ל בעזרת בדיקה של ביטוי סמנים מוסכמים כמו CD86 (ל 1M) ו CD163 (ל 2M) (Mittal et al., 2016). בעקבות שפעול עולה כמות התאים מסוג 1M בעוד שהאוכלוסית ה M2 יורדת. הדגרה משותפת עם תאי bMSC הפכה תהליך זה ועיכבה את התגובה החיסונית כפי שנראה בבדיקת flow cytometry של סמנים מוסכמים (Figure 1F) ובשינוי בדגם ביטוי הציטוקינים שנמדד ע"י RT-qPCR (Figure 1G). לסיכום, תוצאות אלו מעידות על הקלות והיעילות של בידוד והפקת תאי MSC מפרה. תאים אלו גדלים בתרבית במהירות ובקלות, ניתן להקפיא בכמויות גדולות ולהפשיר בקלות רבה וכן לגדל אותם בצלחת למשך חודשים. וחשוב מכל, לתאים אלו ישנה השפעה רחבת היקף וחזקה על פעילות תאי מערכת החיסון כפי שצפוי ומדווח בספרות לגבי תאי MSC ממקור אנושי או עכברי.

תאי MSC מווסתים תגובה דלקתית של תאי אפיתל הרחם

ברחם, תאי אפיתל מבססים את קו ההגנה הראשון מפני מיקרואורגניזמים. מחקרים הראו כי לתאים אלו יכולת לחוש בחיידקים בעזרת ה pattern recognition receptors (PRR) כמו למשל ה toll-like receptors (TLRs) שלהם. קולטנים אלו מופעלים ע"י מולקולות המופרשות מהפתוגנים ומפעילים תגובה תאית מקיפה של ביטוי ציטוקינים וגנים נוספים, בתיווך פקטור השעתוק nuclear factor-κB (NF-κB) (Sheldon et al., 2019). תאים מרירית הרחם של פרה התקבלו (BEND) או הופקו מרחם וגודלו בתרבית ראשונית במעבדה (PEP). לתאים הוחדר בעזרת לנטי-וירוס הגן המדווח לוציפראז תחת הבקרה של רצפי קישור ל NF-κB (Brignall et al., 2017) (Figure 2A) וביטוי נראה בבהירות,

בהוספת הסובסטרט לוציפרין (Figure 2B). שפעול מערכת החיסון התאית המולדת של תאי האפיתל ע"י ריכוזים שונים של LPS (אגוניסט ל TLR4), PAM3CSK4 (אגוניסט ל TLR2) ו-poly I:C (אגוניסט ל TLR3) מדגים את יעילות ורגישות המערכת שיצרנו (Figure 2C-E). על כן כוילה מערכת של תרבית משותפת (Co-culture) בה נזרעים תאי האפיתל ליצירת שכבה חד תאית בדומה לאופן גדילתם בגוף, ואז מתווספים אליהם תאי bMSC כפי שמתואר באיור (Figure 3A, B) למשך 24 שעות. לאחר מכן התאים משופעלים ע"י הוספת LPS ותגובתם הדלקתית נבחנת ומכומתת לפי רמת ההארה של הגן המדווח, שנבדקת לאורך זמן בעזרת קורא פלטות. תגובה של מערכת ה-NF- κ B לריכוזים שונים של LPS (אגוניסט ל TLR4) נראתה כצפוי (Figure 3C, D). על מנת לבחון האם התגובה של תאי BEND או PEP תושפע מנוכחות תאי ה-MSC, הוכנסו לתרבית המשותפת תאי bMSC בשלושה ריכוזים שונים. בשני קווי התאים האפיתליים, נמצא כי ריכוז נמוך של תאי bMSC מספיק על מנת לעכב את התגובה הדלקתית המופעלת ע"י LPS (Figure 3C, D). מכך ניתן להסיק כי לתאי bMSC יכולת לווסת את התגובה החיסונית המולדת של תאי אפיתל של רחם פרה *in vitro*.

ביסוס מודל לדלקת רחם בעכברות

על מנת לבחון את יכולת תאי MSC להשפיע על התגובה החיסונית גם *in vivo*, ולא רק בתרבית, התאמצנו להעמיד מודל לדלקת רחם בעכברות, עליו נוכל לבצע ניסויים רבים שיקדמו אותנו בהבנת המחלה. עכברות בתולות בנות 6-8 שבועות סונכרנו לשלב הדיאסטרוס. יום 7 נקבע כיום ההוקעה – החדרה של חיידקים חיים לרחם, כפי שמאויור ב (Figure 4A). הדמיית גוף מלאה התקבלה ע"י הזרקת חומר ניגוד ICG (Figure 4B). ארבע קבוצות של 3 עכברות קיבלו טיפול ב (1) PBS – ביקורת, (2) תאי mMSC, (3) חיידקי E. coli, (4) חיידקי E. coli ולאחר שש שעות תאי mMSC. העכברות הוקרבו 24 שעות לאחר ההזרקה ודגימות רחם משתי הקרניים נלקחו לצביעות היסטולוגיות או אימונופלאורוסנטיות (Figure 4C-H). לשם מידול נכון של הדלקת, השתמשנו בחיידק מסוג Escherichia coli strain 8-3B43 שבודד מדלקת ברחם של פרה, 3 ימים לאחר המלטה (התקבל מפרופ' ווגנר, ווינה (Prunner et al., 2014; Wagener et al., 2015)). החיידק סומן בצבע זרחני אדום (Figure 5A), ולאחר טרנספורמציה עם הגן הסמן mCherry (Mills et al., 2013) גדל במעבדה כראוי (Figure 5B). לאחר ההקרבה, נלקחו דוגמאות גם לספירות חיידקים, והיה מרגש להיווכח כי בקרן לה הוזרקו תאי MSC בנוסף לחיידקים ספירת החיידקים ירדה משמעותית (Figure 5C). על מנת לבחון האם הירידה בספירת החיידקים משתקפת גם במצב הקליני של הרחם, גובש "מדד דלקת" הבוחן משתנים שונים במצב הפיזיולוגי ובמופע הקליני של העכברה והרחם בעקבות הטיפולים השונים (הפרמטרים לקביעת המדד מפורטים בטבלה 1). מעניין לציין כי כבר החדרת PBS העלתה את מדד הדלקת ברחם, והוספת תאי mMSC הורידה אותו (Figure 5D), בדומה למה שנראה בניסוי *in vitro*. לעומת זאת, תאי mMSC שנוספו לאחר ההוקעה עם החיידקים העלו את מדדי הדלקת עוד יותר. הדלקת מתאפיינת בכניסת נויטרופילים רבים מהדם לרחם (Figure 5E, F) וניתן לראות בצורה יפה כי החיידקים שהוזרקו ללומן (מסומנים בירוק) מקיימים איתם ועם תאי האפיתל מגעים (Figure 5G). לבסוף, הזרקה של תאי mMSC מסומנים פלאורוסנטית לרחם עם חיידקים (Figure 5H) מאפשרת להבחין במגע קרוב בינם ובין הנויטרופילים המגויסים (Figure 5I, J).

הדגימות מהעכברות לאחר הטיפול השונים נלקחו גם למדידת רמות ציטוקינים וכימוקינים כפי שדווח בעבר (Nissim-Eliraz et al., 2017). שינוי ביטוי הגנים באזור ההזרקה מעיד גם הוא על גיוס נייטרופילים (Ly6G) ממערכת החיסון (Figure 6). סמני דלקת כמו ICAM1, TNF α , iNOS, MIP2, KC, IL6, IL1 β and IL10, עלו גם הם בביטוי באופן משמעותי (Figure 6) לאחר ההוקעה עם חיידקים, ועוד יותר מכך אם לטיפול התוספה הזרקה של תאי MSC.

דיון ומסקנות

במחקר המתואר נבחנה ההשפעה של תאי MSC על מדדי דלקת באפיתל הרחם בשני מודלים – *in vivo* ו *in vitro*. קודם כל, תיארונו בידוד ותירבות של תאי MSC מחבל טבור של עגל, והראינו את פוטנציאל החלוקות הגדול של התאים כמו את יכולתם להשפיע על תאי מערכת החיסון – תאי T ומקרופאג'ים. בבדיקות אלו, לתאי ה bMSC היתה השפעה ממתנת על שפעול התאים. לאחר מכן הקמנו מערכת לבדיקה *in vitro* של התקשורת בין תאי אפיתל מרירית הרחם של פרה לתאי bMSC. השתמשנו הן בקו תאים קנוי והן בתרבית ראשונית שהפקנו מרחם וראינו כי בשני המקרים, לתאי ה bMSC השפעה ממתנת על התגובה הדלקתית של אפיתל הרחם. לאחר שקיבלנו אישור להנחת המוצא שלנו, והיא שלתאי MSC פוטנציאל תרפויטי במקרים של דלקת רחם, במודלים בתרבית, עברנו למודל *in vivo* בעכברות. במודל זה הצלחנו להעמיד מערכת המדמה דלקת רחם וראינו כי 24 שעות לאחר ההוקעה, הוספת תאי mMSC מגבילה את הגדילה וההתפשטות החיידקית באופן משמעותי, אולי בגלל גיוס חזק במיוחד של מערכת החיסון.

הישגי המחקר הנוכחי פורצי דרך ומקוריים; הצלחנו להעמיד מערכת להפקת תאי גזע מזנכימאליים מבקר והוכחנו את פעילותם ויעילותם. למרות ריבוי המחקרים בתחום זה, במיוחד ברפואת האדם, מנגנוני הפעילות ואופן השימוש בתאים מצריך המשך מחקר ופיתוח המתקיים במרץ רב בשל הפוטנציאל הרב המצוי בתחום. בכדי לבחון את מנגנוני הפעילות העמדנו לראשונה מערכות בתרביות תאים ובחיות מעבדה אשר אפשרו לנו לבחון את ההיתכנות, הבטיחות והיעילות של גישה חדשנית זאת לטיפול בדלקות רחם. לאחר הפקת התאים מרקמות הבקר התאים נבדקו במערכות במעבדה על פי הקריטריונים המקובלים בתחום. בשלב הבא העמדנו מערכות תאי אפיתל הרחם מבקר שהינם קו ההגנה הראשון ברחם ובחנו את האינטראקציות בין תאי הגזע המזנכימאליים לתאי אפיתל הרחם. מערכת מודל זאת הדגימה את ההשפעה של תאי הגזע המזנכימאליים מבקר על התגובה החיסונית של תאי אפיתל הרחם למרכיבים חיידקיים שונים. מערכת זאת תאפשר לנו להמשיך ולחקור את מנגנוני הפעילות של תאי הגזע ברחם. ברם, מערכות תאים במעבדה אינן מאפשרות לשחזר את המתחולל בריקמה השלמה של איבר מורכב כמו הרחם ובשל כך נעשה מאמץ גדול להעמיד מערכת מודל של דלקת רחם בעכברות. לראשונה הצלחנו להעמיד מערכת מודל דלקת רחם בעכברות אשר הינה הדירה ומשחזרת נאמנה את המחלה בפרות חלב. מערכת זאת אפשרה לנו לחקור ולהבין טוב יותר את התגובה החיסונית והדלקתית ברחם ובשלב השני לבחון את בטיחות ויעילות הטיפול בתאי גזע מזנכימאליים בדלקת רחם אקוטית שנגרמה ע"י זני שדה של חיידקי אשריכיה קולי אשר בודדו ממקרי שדה של דלקות רחם בפרות חלב. תוצאות המחקר מחזקות את היתכנות הטיפול, בטיחות הטיפול ויעילות הטיפול בתאי גזע מזנכימאליים לדלקות רחם.

הישגי המחקר הנוכחי מהווים תשתית מצוינת להמשך מחקר והפיתוח של הטיפול בדלקות רחם בעזרת תאי גזע מזנכימאליים. תוצאות המחקר מדגימות את הישרדות תאי הגזע ברחם המודלק, את האינטראקציות של תאי הגזע עם תאי מערכת החיסון ברחם, את הגברת התגובה החיסונית והורדת הזיהום החיידקי בשלב מאד מוקדם של המחלה, 24 שעות לאחר ההוקעה.

בשלב הבא יש לבחון במודל שפותח את השפעת הטיפול על ההחלמה המיקרוביאלית וההיסטולוגית של הרחם ועל ביצועי הפוריות העתידיים של החיות. מערכת המחקר שפותחה מהווה תשתית אידאלית למחקר המשך אשר יבסס את הפיתוח של טיפול חדשני זה. ערך מוסף מרכזי של המחקר הינו הבנה מעמיקה יותר של תהליכי הדלקת והתגובה החיסונית ברחם, בתחום זה קיימים פערי ידע גדולים אשר אינם מאפשרים פיתוח אמצעים נוספים להתמודדות עם המחלה הפוגעת קשות בעדר החלב הישראלי.

לסיכום, לאור השימוש הנרחב ב- MSC ברפואת האדם והבטיחות של הטיפול כפי שהודגמה במחקרנו, אנו צופים התכנות ממשית לשימוש בתאי MSC לטיפול במצבי תחלואה שונים בחיות משק, ובראש ובראשונה דלקות רחם ועטין. בסיומו של המחקר הנוכחי, שכלל העמדת מערכת והוכחת היתכנות ראשונית, ניתן לגשת למחקרי יעילות קליניים להוכחת יעילות הטיפול בפרות.

- Brignall, R., Cauchy, P., Bevington, S.L., Gorman, B., Pisco, A.O., Bagnall, J., Boddington, C., Rowe, W., England, H., Rich, K., *et al.* (2017). Integration of Kinase and Calcium Signaling at the Level of Chromatin Underlies Inducible Gene Activation in T Cells. *The Journal of Immunology* 199, 2652-2667.
- Bruckner, R.S., Nissim-Eliraz, E., Marsiano, N., Nir, E., Shemesh, H., Leutenegger, M., Gottier, C., Lang, S., Spalinger, M.R., Leibl, S., *et al.* (2018). Transplantation of Human Intestine into the Mouse: A Novel Platform for Study of Inflammatory Enterocutaneous Fistulas. *J Crohns Colitis*.
- Byers, S.L., Wiles, M.V., Dunn, S.L., and Taft, R.A. (2012). Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS ONE* 7, e35538.
- Cahuascanco, B., Bahamonde, J., Huaman, O., Jervis, M., Cortez, J., Palomino, J., Escobar, A., Retamal, P., Torres, C.G., and Peralta, O.A. (2019). Bovine fetal mesenchymal stem cells exert antiproliferative effect against mastitis causing pathogen *Staphylococcus aureus*. *Vet Res* 50, 25.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Galipeau, J., Krampera, M., Barrett, J., Dazzi, F., Deans, R.J., DeBruijn, J., Dominici, M., Fibbe, W.E., Gee, A.P., Gimble, J.M., *et al.* (2016). International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytotherapy* 18, 151-159.
- Gao, F., Chiu, S.M., Motan, D.A.L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H.L., Tse, H.F., Fu, Q.L., and Lian, Q. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell death & disease* 7, e2062-e2062.
- Gomez-Leduc, T., Hervieu, M., Legendre, F., Bouyoucef, M., Gruchy, N., Poulain, L., de Vienne, C., Herlicoviez, M., Demoor, M., and Galera, P. (2016). Chondrogenic commitment of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in collagen matrices for cartilage engineering. *Sci Rep* 6, 32786.
- Hass, R., Kasper, C., Bohm, S., and Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 9, 12.
- Hinden, L., Shainer, R., Almogi-Hazan, O., and Or, R. (2015). Ex Vivo Induced Regulatory Human/Murine Mesenchymal Stem Cells as Immune Modulators. *Stem Cells* 33, 2256-2267.
- Kuroda, Y., and Dezawa, M. (2014). Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent muse cells, in basic research and regenerative medicine. *Anatomical Record* 297, 98-110.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., and Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells (Nature Publishing Group), pp. 216-225.
- Mills, E., Baruch, K., Aviv, G., Nitzan, M., and Rosenshine, I. (2013). Dynamics of the type III secretion system activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *mBio* 4.
- Mittal, M., Tiruppathi, C., Nepal, S., Zhao, Y.Y., Grzych, D., Soni, D., Prockop, D.J., and Malik, A.B. (2016). TNFalpha-stimulated gene-6 (TSG6) activates macrophage phenotype transition to prevent inflammatory lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E8151-E8158.
- Nissim-Eliraz, E., Nir, E., Shoval, I., Marsiano, N., Nissan, I., Shemesh, H., Nagy, N., Goldstein, A.M., Gutnick, M., Rosenshine, I., *et al.* (2017). T3SS-dependent microvascular thrombosis and ischemic enteritis in human gut xenografts infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*.

- Nowakowski, A., Drela, K., Rozycka, J., Janowski, M., and Lukomska, B. (2016). Engineered mesenchymal stem cells as an anti-cancer trojan horse. *Stem Cells and Development* 25, 1513-1531.
- Prunner, I., Pothmann, H., Wagener, K., Giuliodori, M., Huber, J., Ehling-Schulz, M., and Drillich, M. (2014). Dynamics of bacteriologic and cytologic changes in the uterus of postpartum dairy cows. *Theriogenology* 82, 1316-1322.
- Salamon, H., Nissim-Eliraz, E., Ardrnai, O., Nissan, I., and Shpigel, N.Y. (2020). The role of O-polysaccharide chain and complement resistance of *Escherichia coli* in mammary virulence. *Vet Res* 51, 77.
- Sheldon, I.M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., and Schuberth, H.J. (2009). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod* 81, 1025-1032.
- Sheldon, I.M., Cronin, J.G., and Bromfield, J.J. (2019). Tolerance and Innate Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of Endometritis in Dairy Cattle. *Annual Review of Animal Biosciences* 7, 361-384.
- Sheldon, I.M., Cronin, J.G., Pospiech, M., and Turner, M.L. (2017a). Mechanisms linking metabolic stress with innate immunity in the endometrium. *J Dairy Sci.*
- Sheldon, I.M., Owens, S.E., and Turner, M.L. (2017b). Innate immunity and the sensing of infection, damage and danger in the female genital tract. *J Reprod Immunol* 119, 67-73.
- Shi, Y., Wang, Y., Li, Q., Liu, K., Hou, J., Shao, C., and Wang, Y. (2018). Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nat Rev Nephrol* 14, 493-507.
- Skarzynski, D.J., Kobayashi, S., and Okuda, K. (2000). Influence of nitric oxide and noradrenaline on prostaglandin F(2)(alpha)-induced oxytocin secretion and intracellular calcium mobilization in cultured bovine luteal cells. *Biol Reprod* 63, 1000-1005.
- Teixeira, J., Rueda, B.R., and Pru, J.K. (2008). Uterine stem cells. In *StemBook* (Cambridge (MA)).
- Tessier, L., Bienzle, D., Williams, L.B., and Koch, T.G. (2015). Phenotypic and immunomodulatory properties of equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *PLoS ONE* 10, e0122954.
- Waage, S., Sviland, S., and Ødegaard, S.A. (1998). Identification of Risk Factors for Clinical Mastitis in Dairy Heifers. *Journal of Dairy Science* 81, 1275-1284.
- Wagener, K., Prunner, I., Pothmann, H., Drillich, M., and Ehling-Schulz, M. (2015). Diversity and health status specific fluctuations of intrauterine microbial communities in postpartum dairy cows. *Vet Microbiol* 175, 286-293.
- Xiong, H., Bai, C., Wu, S., Gao, Y., Lu, T., and Hu, Q. (2016). Biological characterization of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord. 8354.
- Zhou, T., Hu, M., Pearlman, A., and Rohan, L.C. (2016). Expression, regulation, and function of drug transporters in cervicovaginal tissues of a mouse model used for microbicide testing. *Biochemical Pharmacology* 116, 162-175.

Figure legends:

Figure 1: Characterization of bovine umbilical mesenchymal stem cells. (A) Umbilical-derived, bovine mesenchymal stem cells (bMSC) display spindle-shaped morphology, proliferate and adhere to plastic surfaces. No changes in cell morphology was observed up to 8 passages. Scale bars; 500 μm (B) bMSC population doubling time for 12 passages. (C) Immunophenotyping (left panel; flow cytometry analysis,) and immunofluorescent microscopic imaging (right panel; see detailed images in Figure 3). (D) bMSCs can differentiate into chondrocytes, osteoblasts and adipocytes (stained by Alcian Blue, Alizarin red and Oil Red O respectively). (E) MTT assay was used to quantify the effect bMSC on T cell proliferation. Assays were performed using bovine peripheral blood mononuclear cell (PBMC) activated with Concanavalin A, showing reduced proliferation when co-cultured with MSCs for 4 days at MSC/PBMC cells ratio of 1:5. (F) Murine macrophage cell line (RAW 264.7) were co-cultured with bMSCs for 24 hours and then activated by LPS for 3 hours. RAW cells without MSC were examined as reference cultures. RAW cells were then stained with pro-inflammatory M1 (pink bars) or anti-inflammatory M2 (blue bars) antibody. Mean fluorescence intensity \pm SEM is indicated for $n=3$. All bars are significantly different ($p<0.01$) by Student's t-test. (G) The transcriptional profile of 5 mouse genes was investigated by RT-qPCR on RNA extracted from the activated macrophages with or without co-cultured bMSC or MEFs negative control. The expression levels of typical pro-inflammatory genes were reduced in RAW cells co-cultured with bMSC but not with MEFs. Three house keeping genes were used as reference genes – UBC, EIF5a and EIF1a. Data are mean \pm SEM for $n=3$.

Figure 2. Activation of inflammatory response in bovine endometrial cells. Bovine endometrial cell line (BEND) was transduced with luminescence NF-kB reporter (A-B). Activation of NF-kB, the master regulator of inflammation, in BEND cells is demonstrated in response to pathogen associated molecular patterns (PAMPs); LPS (C) , PAM3CSK4 (D) and poly I:C. D-luciferin was added at time 0, 50 and 100 minutes (broken lines) and luminescence signals were quantified every 5 minutes using SpectraMax i3x multiple detection microplate reader (Molecular Devices, CA USA).

Figure 3. Bovine mesenchymal stem cells (bMSC) suppress activation of NF-kB by LPS in bovine endometrial cells. Illustration of the experiment: Bovine endometrial cells (BEND) and bovine primary endometrial epithelial cells (PEP) expressing the luminescence NF-kB reporter were co-cultured with bMSC and activated with LPS

(A). Fluorescence microscopic images of bMSC stained with DAPI, phalloidin and CFSE are shown in (B). Co-culture experiments were performed at 1:1, 1:10, 1:100 and 1:1000 ratios of bMSC to BEND (C) or PEP cells (D). D-luciferin was added at time 0, 50 and 100 minutes (broken lines) and luminescence signals were quantified every 5 minutes. Scale bars 20 μ m.

Figure 4. Establishment of the mouse model system. Intrauterine transcervical infusion and imaging techniques were established (A). A whole-body image with intravital imaging of the challenged uterine horns (designated as ipsilateral and contralateral) using ICG (B). Synchronized diestrus virgin 6-8 weeks old female BALB/C mice were used as normal controls to establish the structure, immune cells composition and expression of inflammatory markers in steady state uteri. Annotated microscopic images of H&E stained FFPE section (C) and cryo sections stained with Phalloidin and DAPI (E-F). Annotated schematic diagram of uterine structures is shown in D (adapted from (Teixeira et al., 2008)). Annotated structural elements include; lumen (L), luminal epithelium (LE), endometrial glands (EG), endometrial stroma (ES), inner muscles (IM), outer muscles (OM), blood vessels (BV), perimetrium (PM) and broad ligament. Immune fluorescence staining was used to demonstrate CD45+ immune cells in the normal diestrus uterus (G), most of which were F4/80+ macrophages (H).

Figure 5. Modulation of murine metritis by mesenchymal stem cells treatment (MSC). Diestrus virgin 6-8 weeks old female BALB/C mice were challenged by transcervical infusion with *E. coli* strain 8-3B43/pKB4985 mCherry expressing bacteria (A) (comparative growth curves in LB are shown in B) originally isolated from a natural case of clinical post-partum bovine metritis in a dairy cow. Mice were sacrificed 24 hours after challenge and the uterus was trisected for total bacterial counts (C) and histology. Metritis was scored (D) using H&E stained sections (E). Metritis is characterized by massive infiltration of neutrophils into the endometrium and lumen (black arrows in E and yellow arrow in F). Representative images of fluorescence staining using DAPI (blue) phalloidin (cyan in F and red in H), anti-murine CD45 antibodies (red in F), anti-murine Ly6G (green in F). Fluorescing mCherry bacteria interacting with luminal neutrophils and endometrial epithelial cells are visible in G. Some challenged mice were also treated with MSCs expressing the NF- κ B/venus reporter (H-I) and disease was evaluated by metritis score (D). Bacterial colonization observed following *E. coli* challenge was significantly reduced by MSC treatment of challenged mice (C).

Figure 6. Relative expression of inflammatory markers in the uterus. Six to eight weeks old diestrus virgin BALB/C mice were treated by transcervical infusion with

(1) PBS, (2) mMSC, (3) E. coli, or (4) E. coli followed by mMSC six hours thereafter. Normal, non-treated diestrus mice were used as controls. Mice were sacrificed 24 hours after challenge and total RNA was extracted from uterine horns. Using QPCR the relative expression of Ly6G (neutrophil marker), ICAM1, TNF α , iNOS, MIP2, KC, IL6, IL1 β and IL10 genes was quantified relative to RNA samples extracted from the uterus of normal age-matched, diestrus control mouse. Each data point within box plots represents a single uterine horn and data demonstrates recruitment of neutrophils (Ly6G) and increased expression of inflammatory markers in the uterus.

Figure 1:

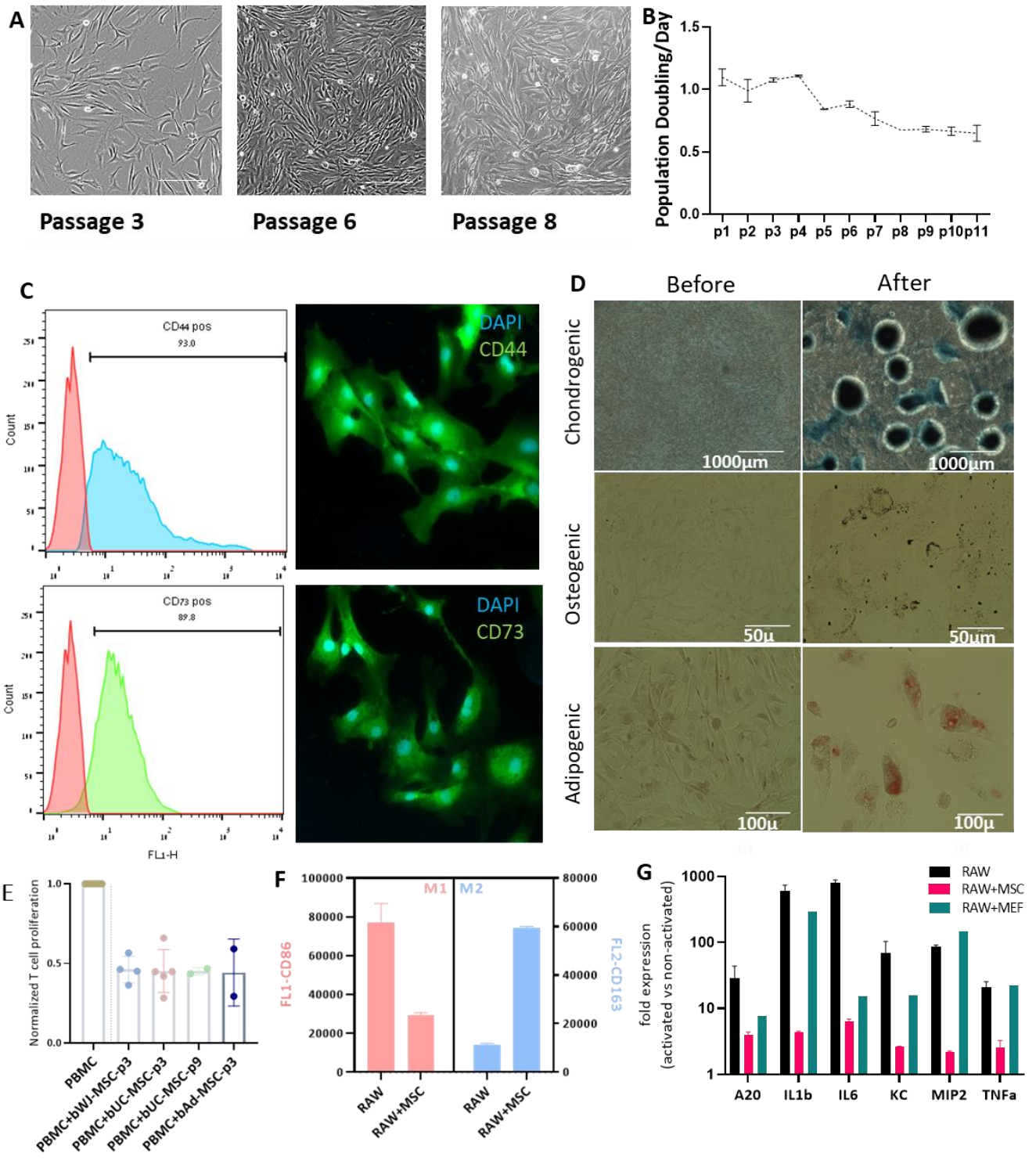


Figure 2:

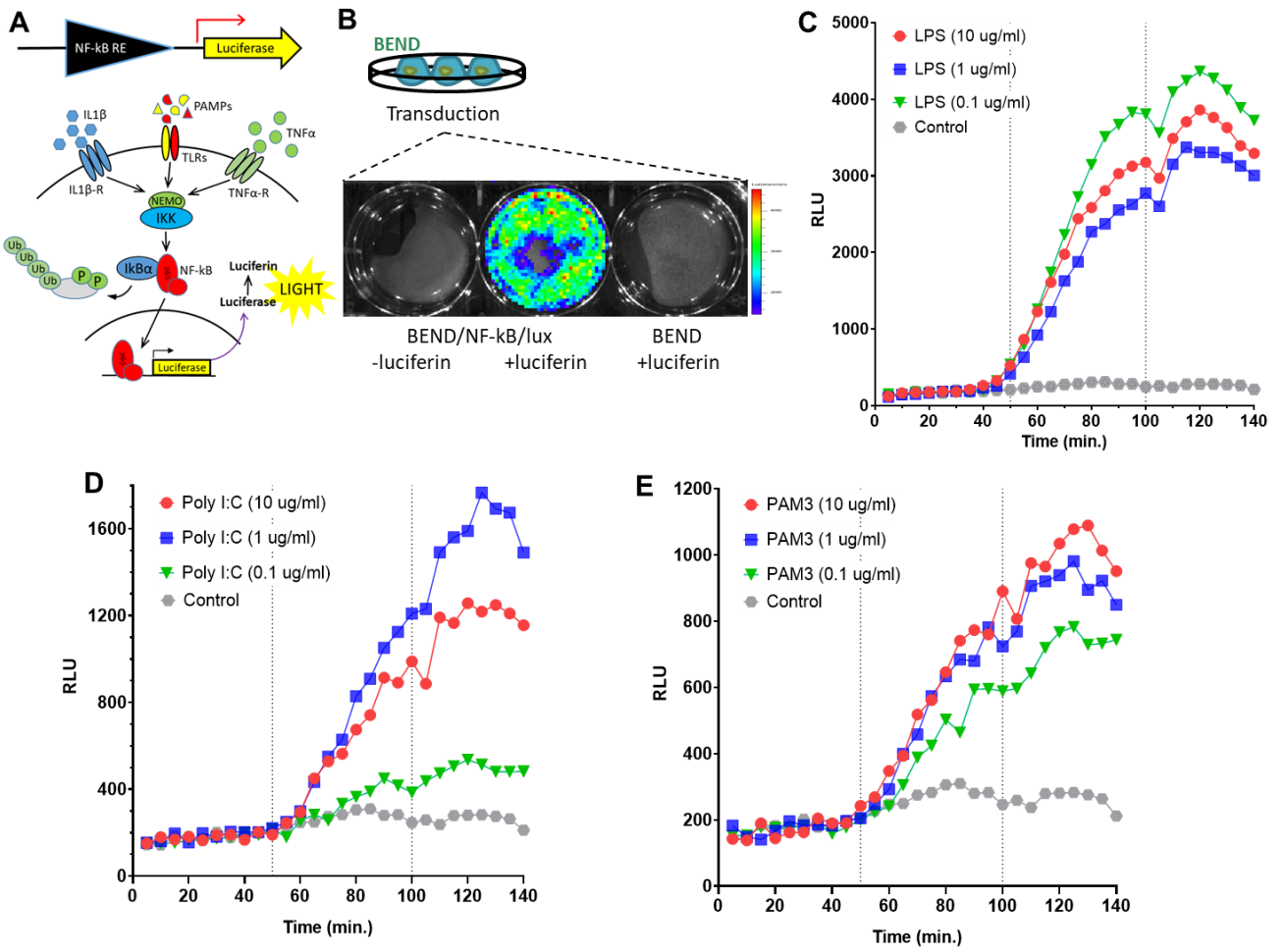


Figure 3:

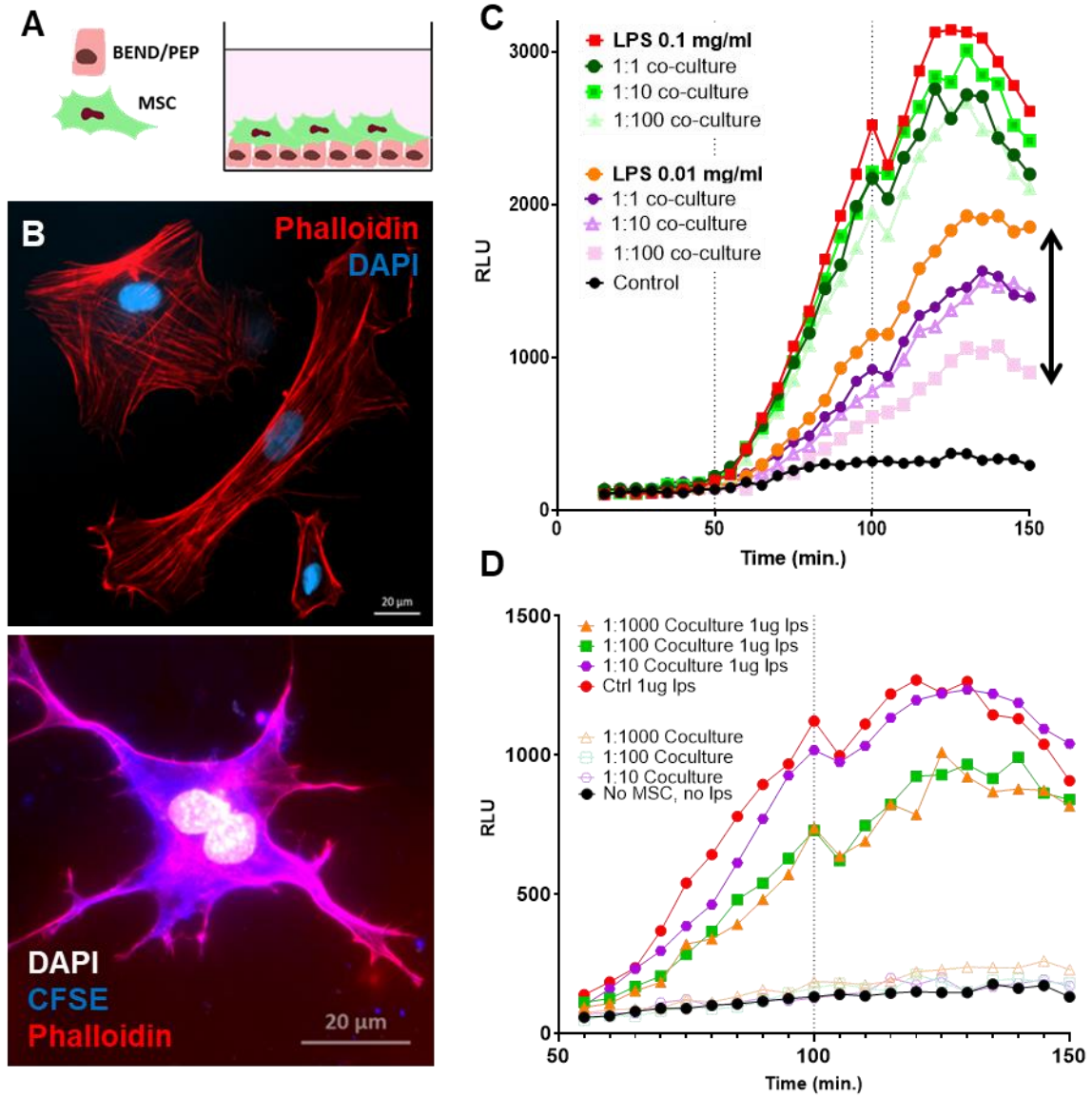


Figure 4:

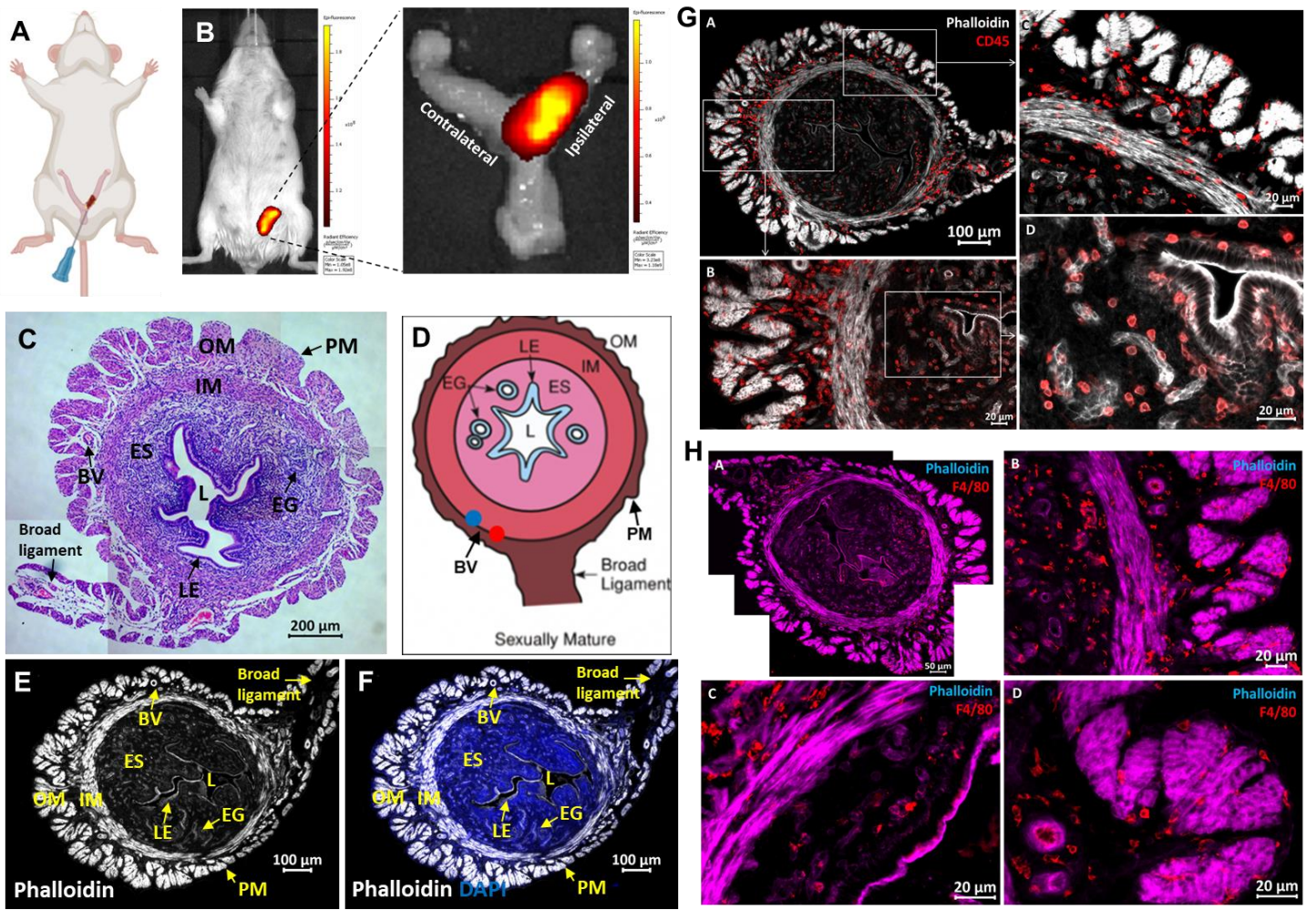


Figure 5:

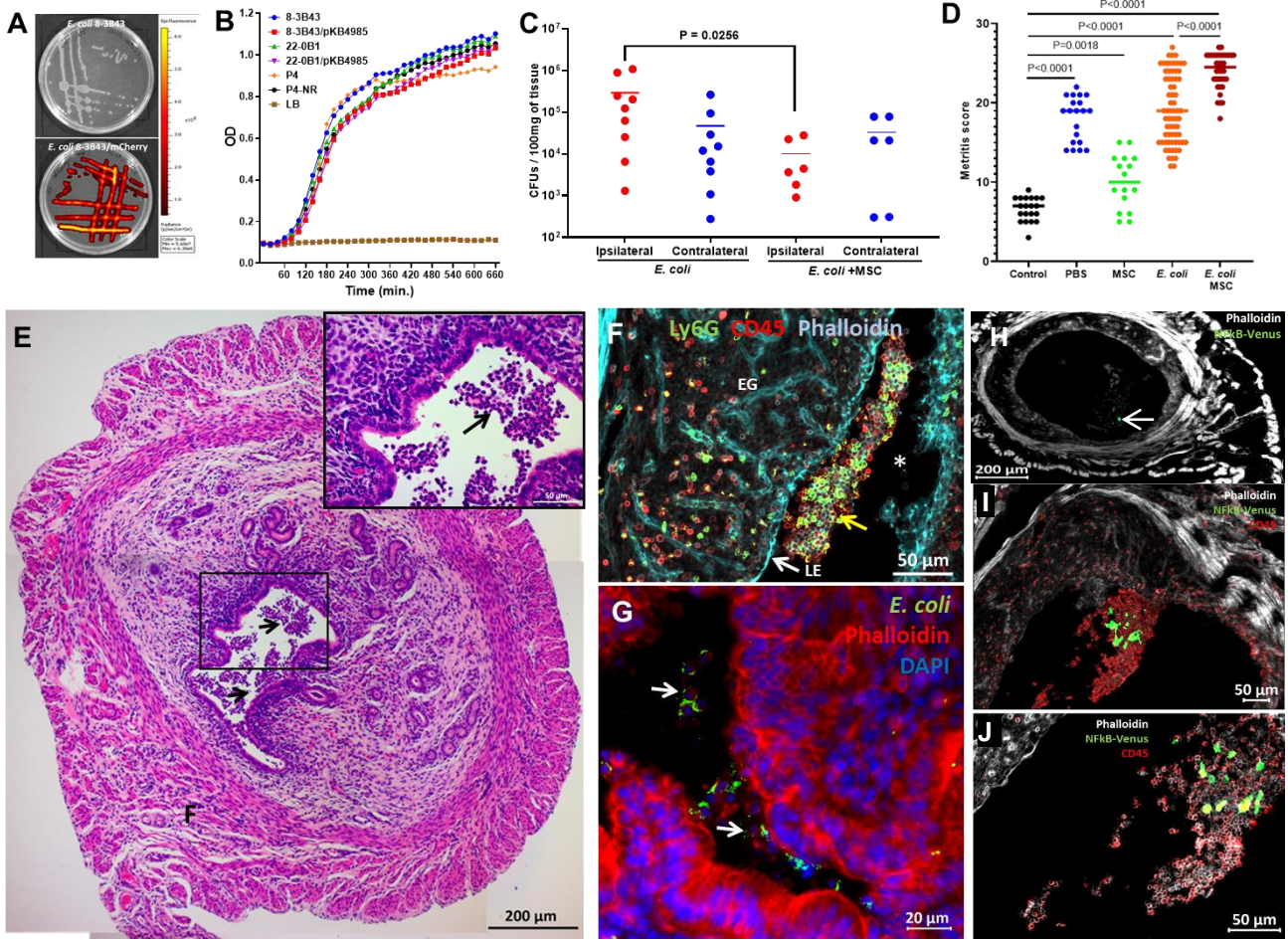
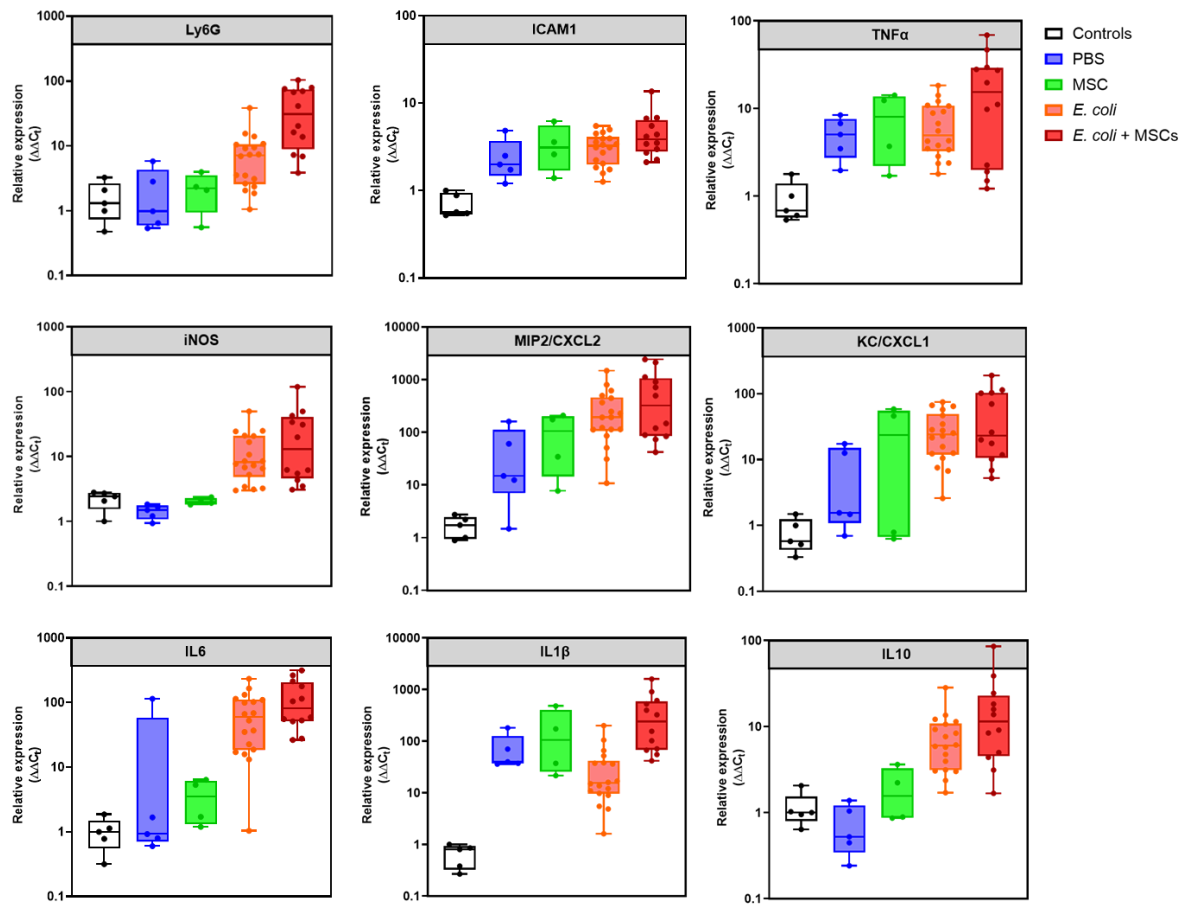


Figure 6:



Applying Mesenchymal Stem cells for metritis treatment

Andrés Bernys-Karolys^{1,2}, Nahum Y. Shpigel² and Sharon Schlesinger¹

¹Faculty of Agriculture, Food and Environment, ²Koret School of Veterinary Medicine, The Hebrew University of Jerusalem, POB 12, Rehovot 76100, Israel

ABSTRACT

Endometritis, an inflammatory response of the uterus to luminal bacteria, is a common disease in farm animals. The disease leads to considerable economic losses decreasing milk production and fertility and affecting animal welfare. Currently, local and systemic administration of antibiotics is the most common method of treatment. However, this strategy has many disadvantages including an incomplete cure rate, increasing occurrence of bacterial resistance, and antibiotics residues in the milk and other animal products. Therefore, alternative effective approaches for the management of bovine metritis should be looked for and tested.

The use of mesenchymal stem cells (MSCs) is emerging as an efficacious and safe treatment for many infectious and non-infectious inflammatory diseases in human and veterinary medicine. Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent progenitor cells, which can be found in most bodily tissues. MSCs pose the ability of multi-lineage differentiation into cell types such as adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes, and are known to exert anti-inflammatory, immunosuppressive, and trophic characteristics.

In this study, we derived bovine MSCs from umbilical tissues (bMSCs). These cells were fully characterized and confer with established criteria for morphology, growth, expression markers, immunomodulatory activity, and multilineage differentiation. Co-culturing these MSCs with primary bovine endometrial epithelial cells following inflammatory activation by LPS resulted in a modulated immune reaction of the endometrium cells. This supports our hypothesis that MSC could be used as anti-inflammatory agents for therapy. To further examine the hypothesis, we developed an *in vivo* system to study metritis in mice. Using *E. coli* isolated from endometriotic cow, we caused inflammation in the mice uterus. Injecting MSC to the uterus six hours later enhanced neutrophils recruitment and cytokine secretion in the uterus, and reduced the bacterial proliferation and propagation.

In sum, this study is the first step in the way to develop veterinary cellular therapy for farm animals. We hope that our conclusions will be further developed and used to study both Endometritis and mesenchymal stem cells.

