

יישום פוספוליפאז מקבוצת A2 לטיפול בדלקת עטין בבקר

Application of A2 phospholipase for treating bovine mastitis

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף בקר

ע"י

איל סרוסי מכון לחקר בע"ח, מינהל המחקר החקלאי
גבריאל לייטנר, שלמה בלום, אולג קריפוקס המעבדה למחלות עטין, החטיבה לבקטריולוגיה, המכון הווטרינרי

Eyal Seroussi, ARO, Institute of Animal Science, HaMaccabim Road, Rishon LeTsiyon, P.O.B 15159, 7528809, E mail: seroussi@agri.huji.ac.il; Gabriel Leitner, National Mastitis laboratory, Department of Bacteriology, Kimron Veterinary Institute, P.O.B. 12, Bet Dagan, 50250, E mail: leitnerg1@gmail.com; Shlomo Blum, National Mastitis laboratory, Department of Bacteriology, Kimron Veterinary Institute, P.O.B. 12, Bet Dagan, 50250, E mail: shlomobl@moag.gov.il; Oleg Krifuks, National Mastitis laboratory, Department of Bacteriology, Kimron Veterinary Institute, P.O.B. 12, Bet Dagan, 50250, E mail: olegkr@moag.gov.il

תקציר

הצגת הבעיה: ממצאים מדעיים הצביעו לאחרונה שלפוספוליפאזות A2 מופרשות (sPLA2s) יש פונקציות אנטי-דלקתיות, כולל הקלה בסימפטומים במודל עכברי של דלקת עטין. במודל זה הזרקה לבלוטת החלב של פוספוליפאז PLA2G1B שהופק מבלב של בקר, ראגנט זול וזמין מבחינה מסחרית, הביאה להעלמות תסמיני הדלקת בעכברות מניקות שטופלו ב- *Escherichia coli* או בפוליפוסכריד (LPS). **מטרות המחקר:** בהתבסס על הנחת המחקר שפוספוליפאזות sPLA2s הן חלבוני נוגדי דלקת. מטרת המחקר העיקרית היתה ליישם את הממצאים לטיפול בדלקת עטין בבקר. **שיטות עבודה:** הפוספוליפאז הפעיל הוחדר לרבעי עטין שהושרתה בהם דלקת והשפעת הטיפול נבחנה בהשוואה לרבעים ללא טיפול. בתאי עטין במבחנה נבחנה השפעת הפוספוליפאז על חיותם ועל הפרשת ציטוקינים דלקתיים. **תוצאות עיקריות:** בתחילה נבדקה השפעת הפוספוליפאז בתרבית תאי עטין (MEC), לא נצפו שינויים בחיות התאים ולא בדפוס של הפרשת ציטוקינים. עם זאת, כאשר התאים טופלו על ידי LPS או חיידקים חיים, הדגירה עם PLA2G1B הובילה לשיפור משמעותי בחיות התאים, אשר הציע מעורבות של sPLA2s בהגנה על ממברנות מפני נזק של חמצון שומנים ולא פעולה של בקטריוציד. כאשר PLA2G1B1 יושם בו זמנית עם LPS, נצפתה ירידה משמעותית לטווח קצר בהפרשת IL-8, בהשוואה ל- MEC אשר טופלו רק ב- LPS, תצפיות ממקורות אחרים תמכו באפשרות ש- PLA2G1B משפיע על איתות IL-8 בתאים כאלה. בעקבות התוצאה החיובית בתאי תרבית, נבדק עירוי לעטין נגוע של PLA2G1B. במדגם קטן (n = 4) של פרות חולבות שנדבקו כרונית ב- *Streptococcus dysgalactiae*, במקרה יחיד, טיפול יחיד טיהר לחלוטין את החיידקים, מה שהוכיח כי ל- PLA2G1B יש פוטנציאל לרפא דלקת עטין תת-קלינית. סוג זה של דלקת עטין מלווה בהיווצרות ביופילם עמיד ואת סילוקו נתן לייחס ליכולת אופיינית של sPLA2s לצור צברים עם פסולת ושיירי ממברנות ולהקל על בליעתם על ידי מקרופאגים. יתר על כן, במודל בקר של דלקת עטין קלינית, שהתבסס על החדרה של *E. coli* דרך תעלת הפטמה, עירוי יחיד של חלבון PLA2G1B הביא לחזרה מהירה יותר של רמות התפוקה לרמה שלפני ההדבקה בפתוגן ומיתון מהיר של ספירת התאים הסומטיים. במקרה זה, כל אופני הפעולה שתוארו לעיל למיתון הדלקת על ידי sPLA2s עשויים להיות רלוונטיים; כולל עיכוב תחרותי של קולטן sPLA2, אשר מניעת פעילותו מעניקה עמידות להלם אנדוטוקסי. **מסקנות:** לפוספוליפאז פנקראטי יכולת מבטיחה כגורם אנטי דלקתי, המשפר ריפוי דלקת עטין. נדרשת הגדלת המדגם הנבחן ופניה לגורמים מסחריים מתאימים לגיבוש טיפול שיישם את הפוספוליפאז כתרופה לדלקת עטין מהסוגים האמורים.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

1. פרופ. מיכה רון מכון לחקר בע"ח, מנהל המחקר החקלאי
2. פרופ. גרטלר אריה, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית
3. דר. יניב לבון, התאחדות מגדלי בקר

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/לא (מחק את המיותר)

*במידה וכן, על החוקר להמציא פרטים על הגוף שבאמצעותו מופץ הידע (כמו: שה"ם)

תחיתת החוקר  תאריך: 25.2.2018

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

1. לייטנר ג., קריפוקס א., בלום ש., סרוסי א. (2017) יישום פוספוליפאז מקבוצת A2 לטיפול בדלקת עטין. תקציר והרצאה בכנס השנתי ה-29 למדעי הבקר, 23-21 בנובמבר 2017, ירושלים. <http://www.kenesbakar.co.il/Portals/84/21-Gaby.pdf>
2. Shirak, A., Seroussi, U., Gootwine, E. and Seroussi, E. (2017). Sequence motifs capable of forming DNA stem-loop structures act as a replication diode. *FEBS Open Bio*. 7:944-952
3. Seroussi, e., Blum, S.E., Krifucks, O., Leitner, G., Application of pancreatic A2 phospholipase PLA2G1B for treating bovine mastitis. *Plos One* (In preparation).

דו"ח מסכם.

תוכן העניינים:

עמוד	נושא
1	1.1 תקציר
3-4	2.1 מבוא, תוצאות ראשוניות ותיאור הבעיה.
4	2.3 מטרות המחקר.
6-7	<u>3. תוצאות.</u>
6-7	3.1 בחינת השפעת פוספוליפאז PLA2 על אלימות <i>E. coli</i> ו- <i>S. aureus</i> במודל דלקת עטין (immortalized mammary epithelial cells) במבחנה (<i>in vitro</i>).
7-8	3.2 השפעת הפוספוליפאז על מיתון עוצמת הדלקת או מניעתה במודל לדלקת עטין בפרה.
8-10	3.3 איסוף פנוטיפים אימונולוגיים של פרות חולות ובריאות לקראת מבחני אסוציאציה גנומיים.
10-12	<u>4. דיון סיכום ומסקנות.</u>
12-13	<u>5. רשימת ספרות.</u>
14	<u>סיכום עם שאלות מנחות</u>

2.2 מבוא ותיאור הבעיה:

2.2.1 מבוא - זיהומים חיידקיים ובכללם דלקת העטין גורמים נזקים כלכלים כבדים ליצרני החלב ולתעשיית החלב. דלקות העטין גורמות ל: ירידה בכמות/איכות החלב המיוצר; עליה בשעור הוצאת פרות מהעדר בצורה לא מבוקרת; עליה בהוצאות הוטרינריות עקב שימוש יתר בתרופות; הגברת הסיכון לנוכחות שאריות חמרים אנטי-בקטריאליים בחלב/בבשר; כל זאת בנוסף לאבדן כספי עקב פסילות חלב והטלת קנסות כבדים. דלקת עטין קלינית מלווה בהשפעות ארוכות טווח מעבר לתקופה בה נוכח החידק ולעיתים מערכת החיסון מגיבה ביתר תוך הרס הרקמה ופגיעה בייצור החלב מעבר לזמן נוכחות החידק בעטין. במאמר שפורסם לאחרונה, הדגמנו שנזקים ארוכי טווח אלה קשורים לעוצמת התגובה של מערכת החיסון והתמשכותה (Blum et al., 2014).

ריכוז של גנים של פוספוליפאזות מופרשות מהסוג PLA2, אופיין בעבר על ידנו (Golik et al., 2006) בכרומוזום 2 של בקר. שינויים ברמת הביטוי של הפוספוליפאזות האמורות, במהלך התפתחות בלוטות החלב, מעידים על תפקיד אפשרי בבלוטת החלב. יתכן שתפקיד זה קשור ללחץ סלקטיבי, המוביל להתמיינות ויצירת שונות מואצת של פוספוליפאזות אלה, כולל שונות של מספר ההעתקים בבקר (Seroussi et al., 2013). בעבודה שקדמה להצעת מחקר זאת הראנו במודל עכברי של עכברות מניקות מטופלות בפתוגן חיידקי (*E. coli*) או בטוקסין ליפופוליסקריד (LPS), שהזרקה לבלוטת החלב של פוספוליפאז שהופק מלב לב של בקר (PLA2G1B), ראגנט זול וזמין מבחינה מסחרית, הביאה להעלמות תסמיני הדלקת (Seroussi et al., 2013). יתכן שהתגובה שנצפתה נובעת מחסימת הרצפטור PLA2R1 שמעורב בתהליך הדלקתי (מאמר מסכם: 1999 Hanasaki & Arita).

תוצאות הקדמיות: התוצאות ההקדמיות החשובות למחקר המוצע מתוארות בפרוטרוט במאמר שפורסם בכתב העט המדעי *Immunogenetics*, שמסכם את ההתקדמות שהושגה במחקר הנהלת הענף 362-0273, אפיון ושיבוט פוספוליפאזות מקבוצת PLA2G2 וישומן למאבק במחלות זיהומיות של בקר, שהסתיים בשנת 2013. המאמר מביא ארבעה ממצאים עקריים שהחשוב ביניהם מדגים יכולת של פוספוליפאז PLA2G1B למנוע את תסמיני הדלקת במודל עכברי של עכברות מניקות מטופלות בפתוגן חיידקי או בליפופוליסקריד (איור 1). הממצאים כוללים אפיון הפלוטיפים באתר הפוספוליפאזות בכרומוזום 2 והקשר שלהם לתכונות יבול, שיטה לאפיון השונות במספר העתקים באתר הכרומוזומלי האמור על ידי ריצוף ישיר, אפיון הפעילות הקטליטית והאתר הפעיל של פוספוליפאזות מקבוצת PLA2G2D, ובחינה של השפעת עירוי של פוספוליפאז מלב לב של בקר במודל עכברי על דלקת בלוטת החלב, כולל הפחתה כמותית ומדידה ברמות הלקטוז החודר לדם, שהוא תסמין חשוב של הדלקת. לאחרונה בצענו ניסוי הקדמי של עירוי של הפוספוליפאז ($20-40 \mu\text{g}$) לעטין. לפי הערכתנו כמות זאת גדולה בסדר גודל מהנדרש לטיפול. הטיפולים הראו על תגובה מקומית פיסיוולוגית ואימונולוגית ברבע המוזרק, שכללה ירידה ברמת יצור החלב, עליה בספירת התאים הסומטיים וירידה בריכוז הלקטוז. עוצמת התגובה והמשכיותה נמצאה בייחס ישר לכמות הפוספוליפאז שהוזרק. התגובה חלפה כעבור תקופה של עד שלושה ימים, ללא השפעה שלילית על הפרות שנבחנו מעבר לטווח זה (תוצאות לא מוצגות).

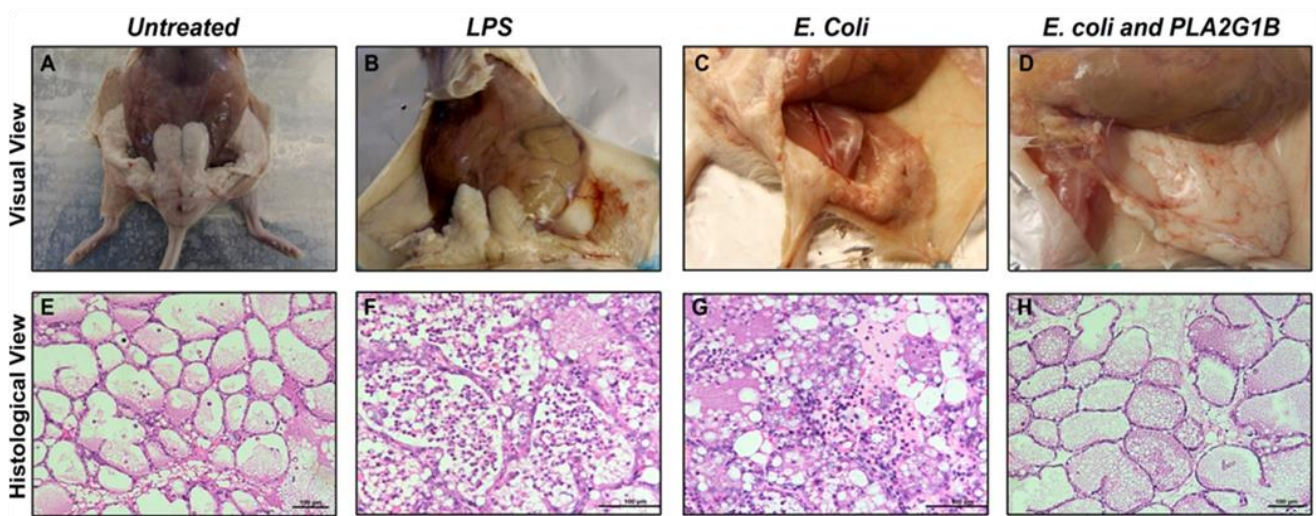
בשנים האחרונות התעצמו העדויות שמצביעות על כך שביונקים לפוספוליפאזות A2 מופרשות (sPLA2s) יש תפקיד בתהליכים מעודדים ומעכבים דלקת (Murakami et al., 2015), אולם תפקידם המדויק בזיהום

זיהומים כגון אלח דם הוא עדיין שנוי במחלוקת (Tan et al., 2017). תפקידים פרו-דלקתיים הונחו במקור כאשר אנזימים אלה בודדו לראשונה והראו יכולת לשחרר את חומצה ארכידונית שהיא גורם מפתח בהשריית דלקת, בעוד שמחקרים שנעשו לאחרונה מצביעים על כך שהם נוטלים תפקיד אנטי-דלקתי בתגובה הדלקתית (Birts et al., 2010). מוצע שהתפקיד של sPLA2s בהקלת מצבי דלקת נובע מתפקוד קטליטי או לא קטליטי, בארבעת המנגנונים הבאים: (1) הוצע לראשונה באמצע שנות השישים, מנגנון קטליטי שבו sPLA2s יכולים לשכך דלקת על ידי הגנה על קרום התא מפציעות ועל ידי תרומה לתחלופת הפוספוליפידים במסגרת ההומאוסטזיס הממברנאלי (Murakami et al., 2017; Vankuijk et al., 1987); (2) פעולה קטליטית אחרת שנוגדת דלקת היא הפונקציה האנטיבקטריאלית של sPLA2, שמודגמת בצורה הטובה ביותר בדמעות אדם כאשר PLA2G2A הוא הבקטריוציד העיקרי של סטפילוקוקים ושל חיידקים גראם-חיוביים אחרים (Qu et al., 1998). (3) מנגנון לא קטליטי הוצע כעורב בהיווצרות של אגרגטים סופרמולקולאריים עם פוספוליפידים אניוניים של בועיות או פסולת תאית, אשר מקלים על בליעתם על ידי מקרופאגים (Birts, 2010). (4) הצעה חלופית למנגנון לא קטליטי לאנטי דלקתיות היא פעולה של sPLA2s כמעכבים תחרותיים של PLA2R1. ידוע שחסימת קולטן רחב טווח זה מעניקה תנגודת בעכברים לקטלניות הנגרמת על ידי אנדוטוקסינים (Seroussi et al., 2013).

המחקר כלל אפיון אופן הפעולה והשונויות הגנטיות והניצפית של פוספוליפאז PLA2 בפרטים נגועים ועמידים ברפת המחקר, וולקני, שכוללת כ-220 פרות חולבות. ברפת קיים מידע שוטף ועכשוי על ארועי דלקת עטין קלינית ותת-קלינית לרבות זיהוי גורם הדלקת (מעקב המבוצע באופן שוטף במעבדה למחלות עטין במכון הווטרנרי). איסוף נתוני דלקת העטין ודגימות גנומיות מהפרות מהוה בסיס למחקר השונויות הגנטיות כולל מספר העתקים בגנום לגנים לפוספוליפאזות והקשר שלהם לנגיעות בדלקת העטין. יישום מוצלח של הפוספוליפאז למאבק בדלקת העטין בבקר יהיה חידוש שלא דווח בעבר ומהווה נכס אינטלקטואלי שניתן להגן עליו בפטנט, אם כי לא איתרנו גורמים מסחריים שיפעלו במהירות הנדרשת לאור הפרסום תוצאות המחקר בכתב עת.

איור 1: השפעת עירוי של פוספוליפאז מלבב של בקר במודל עכברי לדלקת בלוטת החלב.

נחקרו ההשפעות של עירוי תוך-בלוטת-החלב של 1.4 מיקרוגרם פוספוליפאז PLA2G1B על מודל דלקת העטין בעכברים מזן שוויצרי. לוחות בשורה העליונה מציגות תצוגה חזותית של בלוטות החלב הבטנית המנותחת (A-D). שורה שניה: תצוגות היסטולוגיות של חתכים מקבילים של רקמות בלוטת החלב המקובעות בפורמלין וצבועות בצביעת H&E. פסי הסולם הם בגודל של 100 מ"מ (H-E). הבלוטת המוקעת היתה הבלוטה השמאלית של הבטן (L4). כל התמונות הן של בלוטות החלב שנאספו 24 שעות לאחר הטיפול והם מייצגות את המדגם כולו. E, A עכברת ביקורת מוזרקת עם 100 מיקרוליטר של בופר פי.בי.אס. B, F הוקעת תוך-בלוטת-החלב עם 1 מיקרוגרם ליפוסכריד (LPS). בלוטת L4 הציגה סימנים של בצקת, גודש דם וגיוס מאסיבי של נוטרופילים לתוך חלליות ושטחי צינוריות. G, C התנוונות של בלוטת L4 בעקבות הוקעת תוך-בלוטת-החלב עם CFU 10,000 של חיידקי אשריכיה קולי מזן P4. H, D הקלה תסמיני הדלקת בעקבות עירוי 1.4 מיקרוגרם של פוספוליפאז PLA2G1B שלושים דקות לאחר ההוקעה בחיידקי אשריכיה קולי מזן P4.



2.2.2 הנחת היסוד- פוספוליפאזות PLA2 הן חלבוני בקרה של תהליכים דלקתיים.

2.3 מטרת המחקר:

2.3.1 לבחון השפעת הזרקה לעטין של פוספוליפאז PLA2G1B במודל לדלקת עטין בפרה.

2.3.2 על בסיס הממצאים לפתח פרוטוקול לטיפול בפרות נגועות בחיידקים עם תגובה דלקתית בעטין.

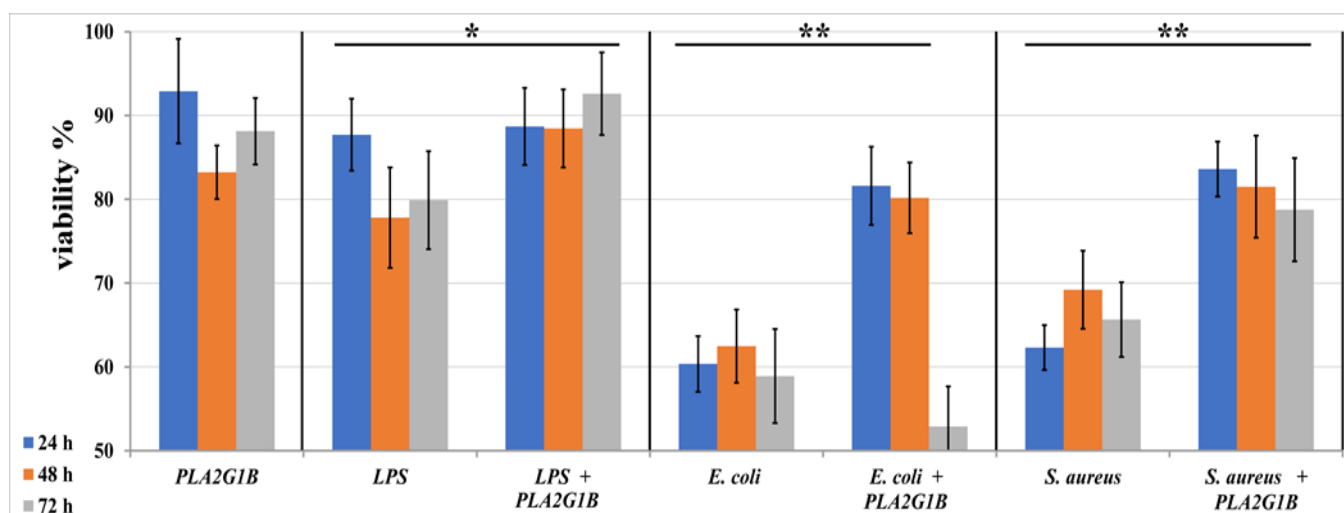
2.3.3 לאפיין את השונויות הגנטיות והניצפית של פוספוליפאז PLA2 בפרטים נגועים ועמידים.

2.3.4 בחינת אלימות *E. coli* ו-*S. aureus* במודל דלקת עטין (immortalized mammary epithelial cells) במבחנה (*in vitro*) בנוכחות פוספוליפאז PLA2.

תוכנית המחקר לשנה השניה כללה: המשך בחינת השפעת הפוספוליפאז על מיתון עוצמת הדלקת או מניעתה בפרות שחלו ובמערכת מודל של תאי עטין שפותחה בשנה הראשונה, כולל בדיקת השפעת PLA2G1B על פרוליפרציה וחיות של התאים בתרבית תאי העטין. המשך פיתוח פרוטוקול ישים לטיפול בפוספוליפאז. איסוף פנוטיפים אימונולוגיים של פרות חולות ובריאות לקראת מבחני אסוציאציה גנומיים בשנה השלישית.

3.1 בחינת השפעת פוספוליפאז PLA2 על אלימות *E. coli* ו- *S. aureus* במודל דלקת עטין (immortalized mammary epithelial cells) במבחנה (in vitro).

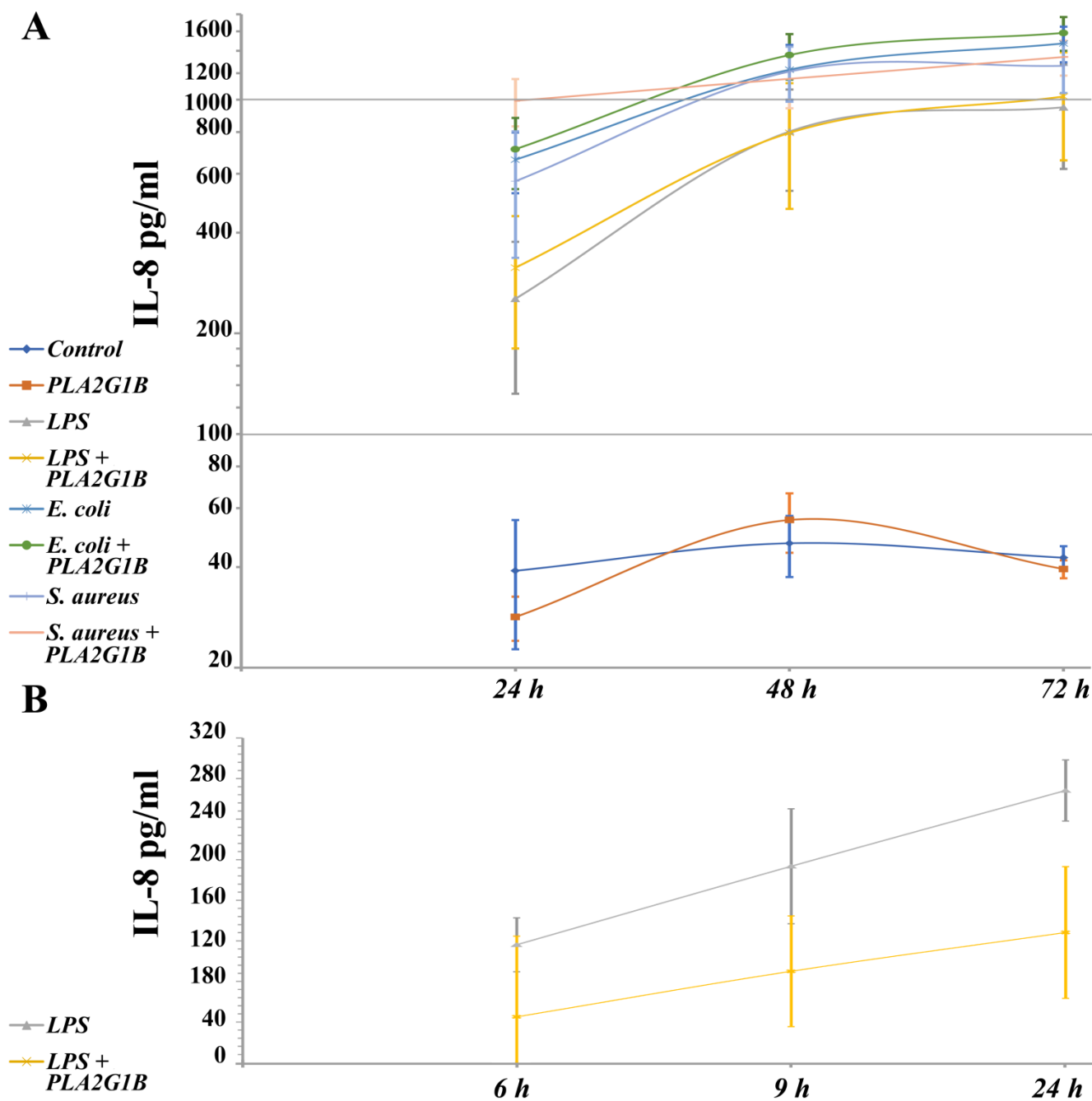
כדי לחקור את הבטיחות ואת היעילות של היישום PLA2G1B כטיפול בדלקת העטין, בדקנו את יישומו בתחילה על ידי טיפול בתאי האפיתל של העטין (MEC) במערכת חוץ גופית. הדגירה של MEC עם 10 מיקרוגרם/מ"ל של PLA2G1B לא גרמה לשינויים בחיוניות התאים, אשר היתה ~90% מהספירה הראשונית (איור 1) ולא שינתה את הפרשת הציטוקינים (איור 2A), נתונים עבור TNF α ו- IL-1 β (לא מוצגים). טיפול של MEC עם ריכוז סופי של 10 מיקרוגרם/מ"ל ליפופוליסקריד או 1×10^5 CFU של *S. aureus*-ZO3984 או של *E. coli*-VL2874 במשך 4 שעות הוביל להפחתה משמעותית בחיות התאים (איור 2). אבל, עם הוספת 20 מיקרוגרם/מ"ל של PLA2G1B לתאים נצפתה ירידה משמעותית בתמותת התאים עד 72 שעות של תאים שנחשפו לליפופוליסקריד ול- *S. aureus* אבל רק במשך 48 שעות לתאים שטופלו עם *E. coli* (איור 2).



איור 2. ההשפעה של הדגרה עם PLA2G1B (20 מיקרוגרם/מ"ל) על החיות של תאי אפיתל העטין שנחשפו ל- *S. aureus* או LPS, *E. coli*. תאים נזרעו בצלחות גידול של 48 בארות ונבדקו בשלוש נקודות זמן לאחר הטיפול (יום 1, כחול; יום 2, ימים, כתום; יום 3, ימים, אפור). חיות התאים חושבה כאחוז מהספירה הראשונית. קווי סטייה המיצגים שגיאה תקנית מוצגים בראשי העמודות (n=3). כוכביות מציינות הבדלים משמעותיים בין ממוצע הממוצעים של שתי קבוצות נקודות הזמן המוגדרות על ידי כל אחד מהברים האופקיים (Student's t-test, p<0.05, n = 6-9, ** * , עם או ללא טרנספורמציה דרוג - rank transformation, בהתאמה).

הדגרה של התאים עם PLA2G1B במשך 4 שעות לא לעוררה את ה- MEC להפריש IL-8 (איור 3A). הדגרה עם *S. aureus*, LPS או *E. coli* במשך 4 שעות עם או ללא טיפול ב- PLA2G1B. חשיפה של התאים ל- 10 מיקרוגרם/מ"ל LPS גירתה את ה- MEC להפריש IL-8 והרמות שלו היו כפולות לחר ארבע ועד פי 10 ~ לאחר 24 שעות (איור 3A, 7000 יחידות, אשר שוות ערך ל- 280 pg/ml של IL-8). רמות IL-8 במדיום עלו בהדרגה לרמות המקסימליות ב- 72 שעות. בכל הזמנים שנבדקו, רמות IL-8 היו גבוהות יותר באופן משמעותי אחר החשיפה לחיידקים בהשוואה לפוליפוסכריד (n=6, Student's t-test, P<0.05). לא נמצא הבדל בין הפרשת IL-8 בין הטיפולים באנדוטוקסין ובחיידקים שטופלו או לא טופלו ב- PLA2G1B. TNF α זוהה רק בתאים שגורו עם *S.*

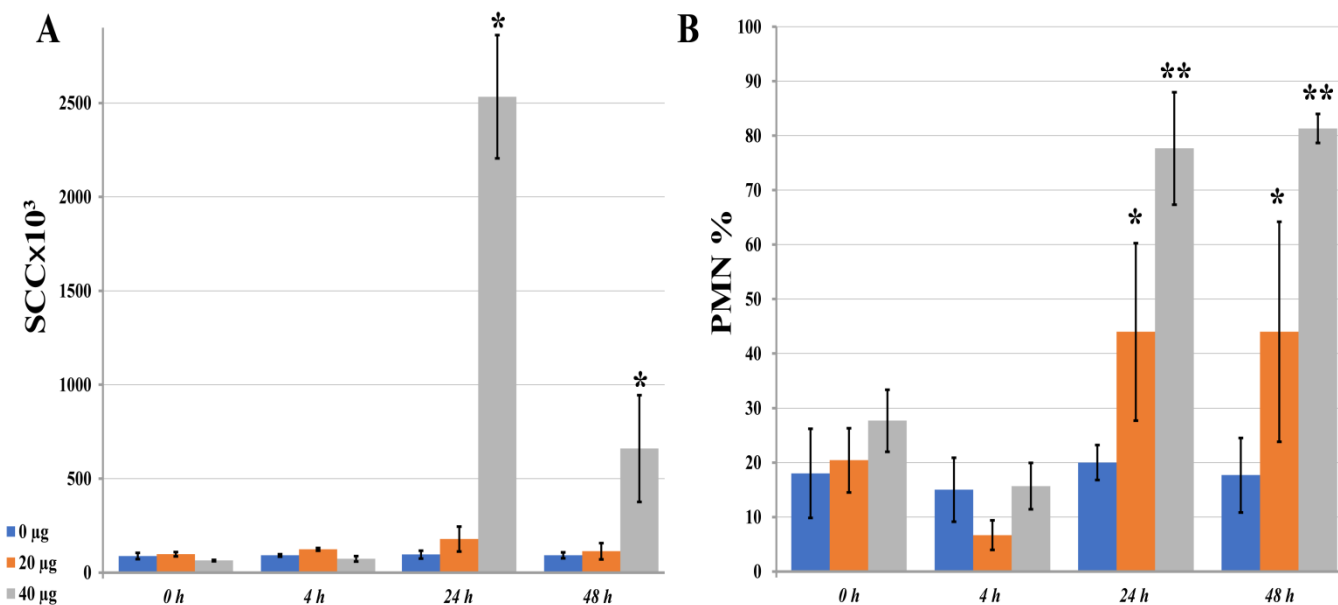
aureus עם או בלי PLA2G1B. לא זוהתה הפרשת IL-1 β כלל (נתונים לא מוצגים). עם זאת, כאשר MEC הודגרו עם 10 מיקרוגרם/מ"ל LPS ביחד עם אחד מהמינונים הבאים 10, 20 או 40 מיקרוגרם/מ"ל של PLA2G1B, נצפתה ירידה משמעותית של רמת הפרשת IL-8 ללא קשר לגודל המינון (איור 3B).



איור 3.2. ההשפעה של הדגרה עם PLA2G1B (20 מיקרוגרם/מ"ל) על הפרשת IL-8 של תאי אפיתל העטין שנחשפו ל-*E. coli*, LPS או *S. aureus*. תאים נזרעו בצלחות גידול של 48 בארות ונבדקו בשלוש נקודות זמן לאחר הטיפול. הרמה של IL-8 במדיום הגידול חושבה באמצעות מבחן ELISA. מוצגים קווי סטייה המיצגים שגיאה תקינית (n=6). (A) תאים נחשפו תחילה לגורם הדלקת למשך 4 שעות ולאחר מכן טופלו עם PLA2G1B. נקודות זמן של הבדיקה היו 1, 2 ו-3 ימים לאחר הטיפול. (B) תאים טופלו בו זמנית עם LPS ועם PLA2G1B1 ונבדקו שלוש פעמים ביום הטיפול.

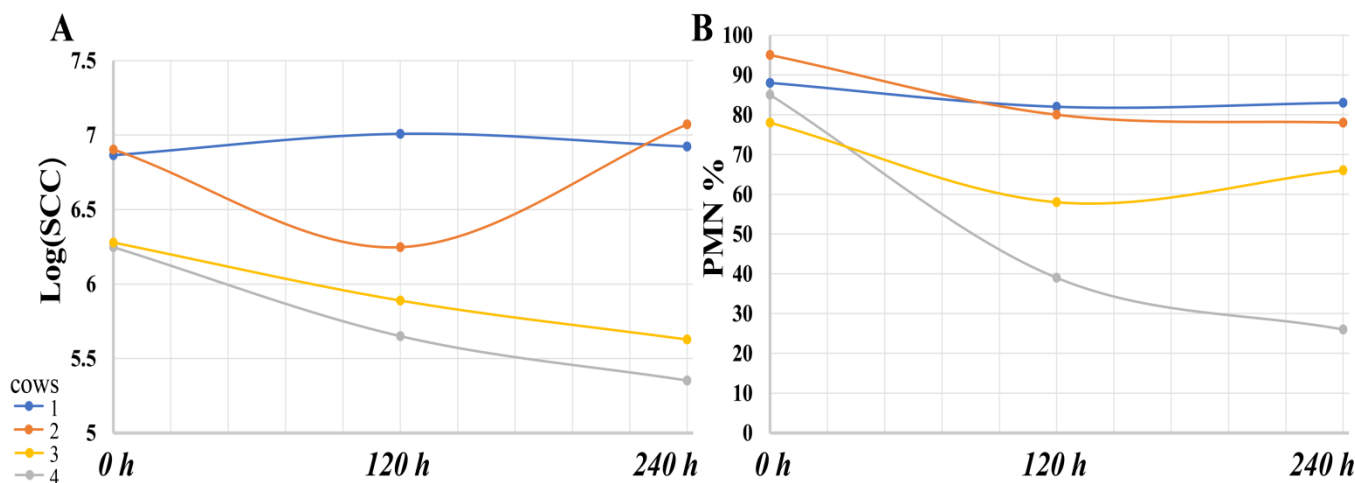
3.2 השפעת הפוספוליפאז על מיתון עוצמת הדלקת או מניעתה בעטין הפרה.

ניסוי 1: בתחילה, בדקנו את הבטיחות של היישום של PLA2G1B בגוף החיה (in vivo). בכל המינונים שנבדקו, לא נמצאו סימפטומים של דלקת מקומית או של נזק רקמתי בבלוטות החלב שטופלו שטופלו ב- PLA2G1B בלבד (איור 4). הדגרות ביקורת של תמיסה פיזיולוגית PFS (0 PLA2G1B) לא השפיעו על ספירת התאים הסומטיים (SCC) ולא את אחוז הלויקוציטים הפולימורפונוקלארים (PMN) בתקופה של 48 שעות. המינון הנמוך של PLA2G1B (20 מיקרוגרם/בלוטה) לא שינה את ספירת התאים הסומטיים הכוללת, עם זאת, נצפתה עלייה משמעותית של אחוז של PMN ל~40% ביום 1 ו-2 לאחר ההזרקה. המינון הגבוה יותר של 40 מיקרוגרם/בלוטה גרם לעלייה של ספירת התאים הסומטיים ביום 1, אשר שככה ביום 2. עלייה חדה של אחוזי PMN ל~80% נצפתה ביום 1 ו-2 (איור 4 A ו-B).



איור 4. השפעות של עירוי בלוטת החלב של PLA2G1B (מיקרוגרם 0, 20, 40) על התאים הסומטיים בחלב פרות. חלב נדגם בבלוטות החלב בעקבות עירוי לעטין של תמיסה פיזיולוגית נטולת פירוגן ללא פוספוליפאז (ביקורת בכחול) ועם 20 (כתום) או 40 (אפור) מיקרוגרם PLA2G1B. קווי סטייה המיצגים שגיאה תקנית מוצגים בראשי העמודות (n=3). (A) ספירת תאים סומטיים (SCC). כוכביות מציינות הבדלים משמעותיים בין המדידה לבין כל שאר המדידות (p < 0.05; Student's t-test, n=3). (B) אחוזים עבור לויקוציטים פולימורפונוקלארים (PMN%) חושבו בתוך אוכלוסיית התאים בכל מדגם חלב. כוכבית אחת מציינת הבדלים משמעותיים בין זוגות המצוינים באופן דומה לבין המדידות לאחר 4 שעות לאחר הטיפול (p < 0.05; Student's t-test, n=3).

ניסוי 2: כדי לבחון את PLA2G1B כתרופה פוטנציאלית עבור דלקת עטין תת קליניים, ארבע פרות נגועות כרונית עם *Streptococcus dysgalactiae* בבלוטה יחידה טופלו 30 מיקרוגרם PLA2G1B שדולל ב- 20 מ"ל תמיסה פיזיולוגית (PFS). רק פרה אחת שבדגימות החלב שלה נצפו ירידות הן בספירת התאים הסומטיים והן בשעור הלויקוציטים הפולימורפונוקלארים נמצאה נקיה לחלוטין מהחיידק (איור 5, באפור). ספירת התאים הסומטיים ירדה ב- 2/4 פרות (איור 5A בצהוב ובאפור). שמונה פרות נגועות כרונית עם סטיפילוקוקים קואגולאז-שליליים (CNS) באחת או בשתי בלוטות טופלו 30 מיקרוגרם PLA2G1B. אף אחת מהפרות האלה לא נרפאה מהחיידק ונצפו רק שינויים קלים בספירת התאים הסומטיים ובהתפלגות הלוקוציטים (הנתונים אינם מוצגים).



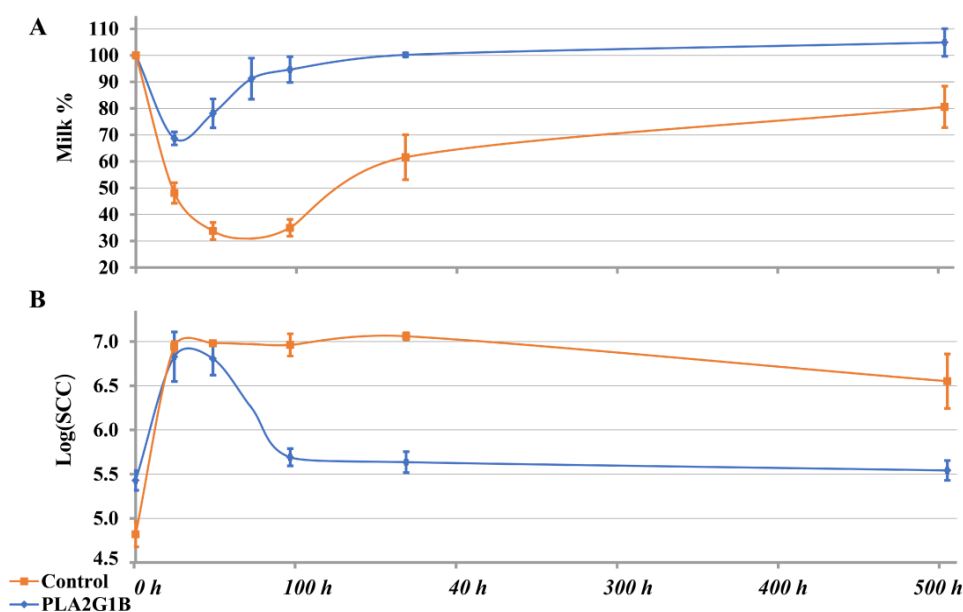
איור 5. השפעות של עירוי של PLA2G1B (30 מיקרוגרם) על תאים סומטיים בחלב פרות של בלוטות החלב עם זיהום כרוני עקב *Streptococcus dysgalactiae*. נבדק הרכבם של דגימות חלב מארבע בלוטות החלב של ארבע פרות (כחול, כתום, צהוב ואפור) נגועות כרונית עם *Streptococcus dysgalactiae*, לאחר עירוי של 30 מיקרוגרם PLA2G1B לרבע עטין. החלב נדגם בשלוש נקודות זמן (יום 0, 5 ו-10). (A) ספירת תאים סומטיים (SCC). (B) אחוזים עבור לויקוציטים פולימורפונוקלארים (PMN%) חושבו בתוך אוכלוסיית התאים בכל מדגם חלב.

ניסוי 3: כדי לבדוק את PLA2G1B כתרופה פוטנציאלית עבור דלקת העטין הקלינית, בלוטות החלב נחשפו ל-*E. coli* וטפלו עם PLA2G1B. במהלך 21 ימים שלאחר העירוי, השינויים בתפוקת החלב ובספירת התאים הסומטיים של פרות טיפול וביקורת מסוכמים באיור 6. מפרות הביקורת 2/6 פרות התנקו מהחיידק בין הימים החמישי והשביעי בעוד שפרות הביקורת האחרות 4/6 נשארו נגועות עד היום ה-21 (סוף הניסוי). לעומת זאת, ביום החמישי, לא זוהו חיידקים בחלבן של 4/6 פרות מטופלות וביום השביעי כל 6/6 הפרות המטופלות נמצאו נקיות מהחיידק. ביום הראשון לפני הטיפול ב-PLA2G1B, בכל הפרות ירדה תפוקת החלב מהתפוקה ביום אפס (100%) ל-60%. בבלוטות הביקורת נמשכה הירידה בחלב ל-30% בין היום השני לרביעי, וביום ה-21 התפוקתן הגיע ל-80% (איור 6A). מבין הפרות המטופלות, יום אחד לאחר הטיפול, החלה תפוקת החלב לעלות והגיע ביום החמישי לרמה שנרשמה לפני החיסון (90-100%). ביום שלאחר החשיפה ל-*E. coli*, מספר התאים הסומטיים גדל בכל הפרות פי 1.2 ~ 6.9×10^6 תאים/מ"ל (איור 6B). מתוך פרות הביקורת, מספר התאים הסומטיים נשאר ברמה גבוהה זאת עד ליום השביעי שלאחר החיסון וביום ה-21 עדיין היה במוצע של 0.8 סדרי גודל מעל לזה שנמדד בזמן האפס. לעומת זאת, ספירת תאים סומטיים של הפרות המטופלות ירדה ביום הרביעי ל- 5.7×10^6 תאים/מ"ל וביום השביעי חזרה לרמה לפני החשיפה לפתוגן (איור 6B).

3.3 איסוף פנוטיפים אימונולוגיים של פרות חולות ובריאות לקראת מבחני אסוציאציה גנומיים בשנה השלישית.

מעקב אחר שקילות החלב החודשיות מבוצע לכל מבכירה עד כניסתה ליובש. עבור כל מבכירה נבחנו נוכחות חיידקים וסת"ס בבלוטת העטין ברמה של רבע בין היום 60-120 בתחלובה. במידה ולא נמצאו חיידקים ו/או עליה בסת"ס ברבע נחלבה המבכירה לכד ומרכיבי החלב לרבות סת"ס והתפלגותם נבחנו. כל מבכירה שבשקילת החלב החודשי הסת"ס נמצא $>70,000$ נבחנה לנוכחות חיידקים בעטין, סוג החיידק וסת"ס.

בדומה כל מבכירה שהראתה סימנים של דלקת קלינית אובחנה לסוג החיידק. בשנת המחקר הראשונה והשניה המליטו 132 מבכירות ו 73 סיימו את התחלובה. נאספו דגימות שיער הפרות (כ- 150 מבכירות) ונשלחו לאנליזת שבב גנטי של כ- 42,000 סמנים של שינוי בסיס יחיד SNPs. סיכום חלקי התוצאת מראה כי 43% מהמבכירות המליטו ללא נגיעות תוך עטינת ואותו האחוז המליטו או נדבקו בשבועות הראשונים לתחלובה, בעיקר בחיידקים קואגולז שליליים או סטרפטוקוקים. בנוסף כ 12% המליטו ללא נגיעות וחלקם עם נגיעות תוך עטינית, נדבקו מיד עם ההמלטה או במהלך החליבה, והציגו דלקות קליניות. הבדיקה הגנומית הראתה שברפת וולקני קיימת בעיה קשה של דיוק בנתוני ההורות (כ- 10% שגיאה) שיתכן שנובעת מחוסר שיוך נכון של העגלות הנולדות לאם. בימים אלה נשלחו דגימות חוזרות לאנליזת שבב, בניסיון להסדיר את נתוני ההורות. ניתוח כלל הנתונים, שמהווה מטרה משנית במחקר זה, יתבצע בהמשך ומחוץ למסגרת תכנית זאת עם הסדרת נתוני ההורות. חלה גם התקדמות במטרה משנית נוספת של פתוח שיטות מדידה למספר העתקים בגנים של פוספוליפאזות שבעבר הצענו כשיטה אמינה מדידה של יחס השיאים בין הווריאנטים בריצוף בשיטת סנגר (Seroussi et al., 2013). במאמר שפורסם בכתב העת *FEBS OPEN* הווריאנטים *BIO* הראנו כיצד ניתן להתגבר על חולשה בשיטה האמורה על ידי תכנון מושכל של תחלים, אם כי הרצף שנבחר להדגמה היה של כבש (Shirak et al., 2017).



איור 5. השפעות של עירוי של PLA2G1B (30 מיקרוגרם) על בלוטות החלב שנחשפו ל- *Escherichia coli*. 12 בלוטות החלב של 12 פרות שונות הודבקו ב- *E. coli* מזן VL2874 (10-30 CFU). לאחר עירוי עטיני של תמיסה פיזיולוגית נטולת פירוגן ללא פוספוליפאז (ביקורת בכתום, n=6) ועם 30 מיקרוגרם PLA2G1B (בכחול, n=6), החלב נדגם בשבע נקודות זמן (יום 0, 1, 2, 3, 4, 7 ו- 21). מוצגים קווי סטייה המיצגים שגיאה תקינית (n=6). (A) תפוקת החלב נמדדה כאחוז מהתפוקה הראשונית (Milk%). (B) ספירת תאים סומטיים (SCC).

4. דיון 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 הליפופוליסקריד (LPS). הודגמה השפעה ממתנת של הראגנט על הפרשת הציטוקין IL8 מתאי התרבית בתגובה לטיפול ברעלן הליפופוליסקריד. תפקידו העיקרי של ציטוקין זה שמכונה גם neutrophil chemotactic factor הוא לגייס נויטרופילים לאיזור הדלקת. מאידך, בעטין עצמו הגביר הראגנט את גיוס תאים אלה לרבע העטין המטופל. לכאורה תוצאות אלה סותרות, אולם בהתחשב שבמערכת הביולוגית המלאה קיימים מנגנונים של משוב חוזר, יתכן שמנגנונים אלה הופעלו והובילו לתוצאות הנצפות. בפרות שהוקעו ב- *E. coli*, הטיפול בראגנט הוביל לשיפור מובהק במדדי התאוששות הפרה שנמדדו כולל תפוקת החלב וערכי התאים הסומטיים. ריפוי הושג גם בטיפול בפרות עם דלקת עטין כרונית ומופע קליני שאובחנו עם נגיעות בסטרפטוקוקוס דיסגלקטיא. תוצאות מבטיחות אלה מצדיקות גיבוש פרוטוקול שיישם את הפוסוליפאז כתרופה לדלקת עטין מהסוגים שהצלחנו לטפל בהם. סרטון בו תעדנו את יישום הטיפול האמור ניתן לצפיה בקישורית: <http://cowry.agri.huji.ac.il/PLA/PhospholipaseTreatment.mp4>.

השוואת התוצאות שקיבלנו לידוע בספרות הכללית מעידה כי אין תקדים לשמוש מעשי בפוסוליפאזות האמורות כנוגדי דלקת, אם כי מתרחב בסיס הידע שמיחס פעולה אנטי דלקתית לקבוצת פוסוליפאזות זאת, כמתואר במאמר מסכם שפורסם בשנה קודמת (Murakami M et al., 2016). תוצאות אלה סוכמו במאמר (Seroussi et al., 2018), שבזמן כתיבת הדו"ח היה בתהליך של הגשה. המאמר בגרסתו הראשונית נגיש בקישורית <http://cowry.agri.huji.ac.il/M19/Seroussi2018.pdf> (תחת הסיסמה: madan19). להלן הממצאים כפי שמתוארים בדיון במאמר הזה:

במודל עכברי עבור דלקת העטין, הודגם כי עירוי לבלוטת החלב העכברית של PLA2G1B של פרה מקל על דלקת חזותית והיסטולוגית ומפחית את רמות הלקטוז חודר לדם (Seroussi, et al., 2013). בעקבות אינדיקציה זאת ואחרות, של sPLA2s יש בעיקר תפקיד אנטי-דלקתי בתגובות הדלקתיות (Birts, et al., 2010), בדקנו את היישום של פוסוליפאז PLA2G1B כתרופה לטיפול בדלקת העטין בבקר. כדי למזער את הסיכון של גרימת נזק לרקמות עם אנזים מעכל זה, תחילה הפעלנו אותו על תאים בתרבית MEC. הדגרה עם הפוסוליפאז, לא הובילה לשינויים בחיוניות התאים ולשינוי בדפוס של הפרשת של ציטוקינים IL-1 β , TNF, ו-IL-8. עם זאת, כאשר התרבית התא טופלה על ידי LPS או חיידקים חיים, הדגרה עם PLA2G1B הובילה לשיפור משמעותי בחיוניות התאים. משום שגם בגוף החיה וגם בתאים בתרבית, גורמי דלקת כגון LPS משרים עלייה של יצירת גורמי חימצון מיטוכונדריאליים (ROS) והצטברות של נזק חמצוני לתא (Kruzel, et al., 2009; Zheng, et al., 2016) ייתכן שהמנגנון הכרוך בשיפור החיוניות של MEC שנצפה כרוך בהגנה שמעניק הפוסוליפאז לממברנות התא מפגיעה של חמצון שומנים (Vankuijk, et al., 1987). הסבר זה הוא המתקבל על הדעת ביותר מתוך ארבעת המנגנונים להסברת הפעולה של sPLA2s לשיכוך דלקת, שמפורטים במבוא. כמו כן במדיום התרבית, PLA2G1B לא יכול לנטרל LPS, אין לו פעולה בקטריוצידי (מנגנון 2) (Seroussi, et al., 2013) ואין מקרופאגים שהוא יכול למשוך (מנגנון 3). בניסיון לחקות את המהלך הטבעי של האירועים, כאשר PLA2G1B יושם לאחר ההוקעה עם גורם הדלקת, לא נצפו השפעות על הפרשת ציטוקינים מ-MEC, מה שגורם להסבר של הפעלת מנגנוני איתות תאיים (מנגנון 4) להיות פחות סביר. עם זאת, כאשר PLA2G1B יושם בו זמנית עם LPS, נצפתה ירידה משמעותית לטווח קצר של IL-8 בהשוואה MEC שטופלו רק עם LPS. השפעה משמעותית על ביטוי רנ"א של IL-8, שהוא ציטוקין הכימוטקטי שמשפיעל נויטרופילים, נצפתה גם במערכת דומה מאוד שבה נמדדה

התגובה של bMEC להדגרה של PLA2G1B עם LPS בו-זמנית או בלעדיו (Kurz, 2018). במערכת זאת בעקבות ההוקעה ב-LPS, תאי bMECs שלא הודגרו עם הפוספוליפאז הציגו ירידה משמעותי של רמות ביטוי הרנ"א של IL-8 בהשוואה bMEC שטופלו עם LPS ו-PLA2G1B. משום שתאי אנדותל אוגרים IL-8 בגופים Weibel-Palade שלהם (Utgaard, et al., 1998), שחרור ציטוקין זה לא צפוי שיהיה מצומד ישירות עם רמות הרנ"א שלו. רמות אלה עשויות לשקף את תהליכי הבקרה של התא על חידוש או הפחתת מאגרים האלה. הוספה אקסוגנית של PLA2G1B ל-bMEC הובילה גם לביטוי שונה של כמה גנים פרו דלקתיים אחרים שמגיבים ל-LPS (Kurz, 2018). לפיכך, המסקנה של קבוצת המחקר האחרונה כי הממצאים שלהם מדגישים את PLA2G1B כתרופה מועמדת, עם הממצאים שלנו כי במבחנה, פוספוליפאז זה שיפר את הישרדות התא תחת עקה שמתווכת על ידי גורמים דלקתיים, אנו מסיקים כי בחינה של יישום PLA2G1B בעטין הבקר היא סבירה.

בדיקה של טיפול יחיד ב-PLA2G1B כתרופה פוטנציאלית עבור דלקת העטין תת קליניים פרות נגועות כרונית עם *Streptococcus dysgalactiae* התבצעה במדגם קטן. עם זאת, הפוגה ספונטנית ממצב כרוני שכזה, הכרוך ביצירת ביופילם עמיד (Olson, et al., 2002) מעולם לא תועדה. לכן, אפילו התצפית של שיעור ריפוי של 1/4 היתה משמעותית. ניסוי נוסף, על מדגם גדול יותר נדרש כדי לאמת ולפתח פרוטוקול ליישום של PLA2G1B כטיפול בסוג זה של דלקת תת קלינית. אפשרי כי היכולת האופיינית של sPLA2s להצמד לפסולת תאית ולהקל על בליעתה על ידי מקרופאגים (מנגנון 3) (Birts, et al., 2010) שיחקה תפקיד בחיסול הביופילם החיידקי.

עירוי יחיד של חלבון PLA2G1B למודל הבקר של דלקת העטין הקלינית השיג הקלה משמעותית בתסמיני המחלה. בדיקה זו התבססה על הוקעה של הבלוטת החלב ב-*E. coli* דרך תעלת הפטמה וטיפול לאחר ההופעה של הסימפטומים הקליניים על ידי עירוי הפוספוליפאז. במקרה זה, אין זה ברור מי מבין ארבעת המנגנונים של שכך דלקת על ידי sPLA2 היה דומיננטי. עם זאת, התוצאות שלנו מאוד תומכות במחקר נוסף של PLA2G1B כתרופה עבור דלקת בעטין בקר.

5. רשימת ספרות.

Blum S.E., Heller E.D., Leitner, G. (2014) Long term effects of *Escherichia coli* mastitis. *Vet. J.* **201**:72–77

Birts CN, Barton CH, Wilton DC (2010) Catalytic and non-catalytic functions of human IIA phospholipase A2. *Trends Biochem Sci* **35**: 28-35.

Golik M., Cohen-Zinder M., Loor J.J., Drackley J.K., Band M.R., Lewin H.A., Weller J.I., Ron M., Seroussi E. (2006) Accelerated expansion of group IID-like phospholipase A2 genes in *Bos taurus*. *Genomics* **87**:527-533.

Hanasaki, K., and Arita, H. (1999) Biological and pathological functions of phospholipase A(2) receptor. *Arch Biochem Biophys.* **372**:215-23. Review.

Kruzel ML, Actor JK, Radak Z, Bacsi A, Saavedra-Molina A, et al. Lactoferrin decreases LPS-induced mitochondrial dysfunction in cultured cells and in animal endotoxemia model. *Innate Immun* **16**: 67-79.

Kurz JP (2018) Bovine Mastitis Resistance: Novel Quantitative Trait Loci and the Role of Bovine Mammary Epithelial Cells. Utah State University, All Graduate Teses and Dissertations: 6910.

Murakami M, Sato H, Miki Y, Yamamoto K, Taketomi Y (2015) A new era of secreted phospholipase A2. *J Lipid Res* **56**: 1248-1261.

- Murakami M, Yamamoto K, Miki Y, Murase R, Sato H, Taketomi Y. (2016) The Roles of the Secreted Phospholipase A(2) Gene Family in Immunology. *Adv Immunol.* **132**:91-134
- Murakami M (2017) Lipoquality control by phospholipase A2 enzymes. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 93: 677-702.
- Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR (2002) Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 66: 86-92.
- Qu XD, Lehrer RI (1998) Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun* 66: 2791-2797.
- 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.
- Seroussi, e., Blum, S.E., Krifucks, O., Leitner, G., (2018) Application of pancreatic A2 phospholipase PLA2G1B for treating bovine mastitis. *Plos One* (In preparation).
- Shirak, A., Seroussi, U., Gootwine, E. and Seroussi, E. (2017). Sequence motifs capable of forming DNA stem-loop structures act as a replication diode. *FEBS Open Bio.* 7:944-952
- Tan TL, Goh YY (2017) The role of group IIA secretory phospholipase A2 (sPLA2-IIA) as a biomarker for the diagnosis of sepsis and bacterial infection in adults-A systematic review. *Plos One* 12.
- Utgaard JO, Jahnsen FL, Bakka A, Brandtzaeg P, Haraldsen G (1998) Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp Med* 188: 1751-1756.
- Vankuijk FJGM, Sevanian A, Handelman GJ, Dratz EA (1987) A new role for phospholipase-A2 - protection of membranes from lipid-peroxidation damage. *Trends Biochem Sci* 12: 31-34.
- Zheng L, Xu Y, Lu J, Liu M, Bin D, et al. (2016) Variant innate immune responses of mammary epithelial cells to challenge by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and the regulating effect of taurine on these bioprocesses. *Free Radic Biol Med* 96: 166-180.

<p>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</p> <p>1. לבחון השפעת הזרקה לעטין של פוספוליפאז PLA2G1B במודל לדלקת עטין בפרה. 2. על בסיס הממצאים לפתח פרוטוקול לטיפול בפרות נגועות בחיידקים עם תגובה דלקתית בעטין. 3. לאפיין את השוניות הגנטיות והניצפיות של פוספוליפאז PLA2 בפרטים נגועים ועמידים. 4. בחינת אלימות <i>E. coli</i> ו-<i>S. aureus</i> במודל דלקת עטין (immortalized mammary epithelial cells).</p>
<p>אלו ממטרות המחקר הושגו בעבודת המחקר בנוכחית</p> <p>כל המטרות קודמו: הודגמה פעילות ריפוי של הפוספוליפאז בעטין (1) ושיפור חיות התאים ומדדי הדלקת במבחנה (4). שופר פרוטוקול הטיפול (2). נאסף חומר ונתונים גנטיים שיאפשרו בעתיד לאפיין קשר בין השונות הפנוטיפית וגנטית של פרות המדגם (3).</p>
<p>עיקרי התוצאות</p> <p>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 הודגמו שיפור חיות התאים והשפעה ממתנת של הראגנט על הפרשת הציטוקין IL8 מתאי התרבית בתגובה לטיפול ברעלן ליפופוליסקריד (LPS). בפרות שהוקעו בא. קולי, הטיפול בראגנט הוביל לשיפור מובהק במדדי התאוששות הפרה שנמדדו כולל תפוקת החלב וערכי התאים הסומטיים. ריפוי הושג גם בטיפול בפרות עם דלקת עטין כרונית ומופע קליני שאובחנו עם נגיעות בסטרפטוקוקוס דיסגלקטיא. התקבלו נתוני שבב גנומי לכ- 150 פרות רפת וולקני שעבורן נאספו נתוני הנגיעות בדלקת עטין.</p>
<p>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת</p> <p>התוצאות הראו שלפוספוליפאז פנקראטי יכולת מבטיחה כגורם אנטי דלקתי המשפר ריפוי דלקת עטין. תוצאות אלה מצדיקות הגדלת המדגם הנבחן מחקר ממשיך לקראת גיבוש פרוטוקול שיישם את הפוספוליפאז כתרופה לדלקת עטין מהסוגים שהצלחנו לטפל בהם. המטרות העיקריות של המחקר לתקופת הדו"ח הושגו. מתעכב ניתוח הנתונים הגנטיים עקב בעיות ברשומות ההורות של פרות וולקני.</p>
<p>בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תכנית המחקר?</p>
<p>בעיה המרכזית העומדת בפני המשך יישום המחקר היא מציאת גורם מסחרי שיבצע את הנדרש ליישום הפוספוליפאז כתרופה. פיתוח ורישום תרופה הם כידוע משימה מורכבת שדורשת מימון ומעורבות של גורם כזה. בנוסף מומלץ לשפר את ניהול רפת וולקני כך שתשלח דגימה לכל עגלה לאנליזת השבב הגנומי עם ההמלטה. כך שיושגו נתוני הורות נכונים הדרושים לניהול מחקרים.</p>
<p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר</p> <p>1. לייטנר ג., קריפוקס א., בלום ש., סרוסי א. (2017) יישום פוספוליפאז מקבוצת A2 לטיפול בדלקת עטין. תקציר והרצאה בכנס השנתי ה-29 למדעי הבקר, 23-21 בנובמבר 2017. ירושלים. http://www.kenesbakar.co.il/Portals/84/21-Gaby.pdf 2. Shirak, A., Seroussi, U., Gootwine, E. and Seroussi, E. (2017). Sequence motifs capable of forming DNA stem-loop structures act as a replication diode. <i>FEBS Open Bio</i>. 7:944-952 3. Seroussi, e., Blum, S.E., Krifucks, O., Leitner, G., Application of pancreatic A2 phospholipase PLA2G1B for treating bovine mastitis. <i>Plos One</i> (In preparation).</p>
<p>פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)</p> <p>← ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)</p>
<p>← חסוי – לא לפרסום: יש לצרף מכתב הסבר</p>
<p>יש להמתין עם פרסום הדו"ח עד לאחר פרסום המאמר</p>