

קביעת סולם למדידה רווחת העוף

Determining a scale to evaluate chicken welfare

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

נעם מאירי המחלקה לעופות, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

Noam Meiri, Department of Poultry Science, ARO The Volcani Center, PO Box 6 Bet Dagan. 50250, E-mail: meiri@agri.huji.ac.il

אפריל 2010

ניסן תש"ע

תקציר

1. הצגת הבעיה: בשנים האחרונות גדלה המעורבות הציבורית בצורך ברווחת חיות המשק בכלל ומעורבות בתנאי הגידול של העופות בפרט. באירופה חוקקו חוקים המגדירים תנאי מינימום לגידול חיות משק. חוקים אילו נועדו לצמצם את הצפיפות שהכוונה היא להוריד את צפיפות הפטמים בלולים מצפיפות של גודל סופי כיום של בין 38-40 קילו למטר רבוע לעד 20 קילו למטר רבוע. תוספת עלות היצור בפטמים בהורדת הצפיפות צפויה להיות כ-25%. שינויים אילו בעלויות הם משמעותיים מאוד אך אין סולם שמגדיר במדויק את מידת העקה שממנה סובלים העופות בתנאי הגידול השונים.

2. מטרת המחקר: מחקר זה נועד לתת למגדילים כלי על מנת להסביר לציבור את היתרונות והחסרונות הנובעים משינויים חוקתיים בצורת הגידול של הפטמים.

3. שיטות העבודה: בחינת מדדים פיזיולוגיים ריכוזי mRNA וחלבוני עקה בדם ובמוח פטמים בגילאים שונים ובעקות אקלימיות שונות ובחינת ריכוז במוח של הורמוני ההיפוטרמוס.

4. תוצאות עיקריות: בשלוש שנות המחקר אפינו שינוי בביטוי mRNA וחלבוני עקה בדם, ובמוח בתנאי עקות אקלימיות שונות תוך שימת דגש על חום קור ורוח, בגילאי פטמים שונים, בחדרים מבוקרי אקלים ומצאנו שינויים מדידים בטמפרטורת הגוף, בשינוי משקל הגוף, ובביטוי ה mRNA והחלבונים השונים. נמצא כי מהלך עקת חום ועקת קור באפרוחים בני 3 ו-10 ימים מתרחש שינוי משמעותי בטמפרטורת הגוף במשקל הגוף.

ברקמת הדם ובמוח נמצא כי ביטוי ה- mRNA של חלבונים העקה HSP70, c-Fos, HSF3, HSF1 עולה באופן משמעותי. מידת השינוי בביטוי כל אחד מהגנים תלוי בטמפרטורה, באזור בו הוא נבחן (דם או כל אחד מאזורי העקה במוח) בגיל האפרוחים ובטמפרטורת העקה. נמצא יחס ישר בין מידת העקה והזמן והמידה בה משתנה ביטוי החלבונים. שינויים אלה מאפשרים לקבוע כי גנים אילו יכולים לשמש כסמנים מהימנים לקביעת מדד העקה בעופות. מדד נוסף לסולם העקות האקלימיות נמצא כי שלושת ההורמונים המבקרים בהיפוטרמוס CRH, AVT ו-TRH משתנים בחשיפות של פטמים בעקות האקלימיות השונות.

5. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: המחקר התקדם היטב ולפי התוכנית. מהממצאים בשלוש שנות המחקר ניתן לראות שאכן חלבוני העקה משתנים בצורה דיפרנציאלית כתוצאה מהעקות בעוצמות שונות. תוצאה זו מאפשרת להגדיר סולם למדידת עקה בפטמים.

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הממצאים לא מהווים בשלב זה המלצות לחקלאים.

5. חתימת החוקר: _____

מבוא

רווחת חיות המשק בכלל ורווחת הפטמים בפרט הפכה בשנים האחרונות לנושא מרכזי בהתעניינות הציבורית. באירופה חוקקו חוקים המגדירים תנאי מינימום לגידול חיות משק ואף בארץ מתחילים לחוקק חוקים המגבילים גידול חיות משק או מגדירים את תנאי המחיה של חיות משק לדוגמא: החוק שחוקק האוסר פיתום אווזים. במסגרת החוקים שחוקקו באירופה שנועדו לצמצם את הצפיפות, הכוונה היא להוריד את צפיפות הפטמים בלולים מצפיפות של גודל סופי כיום של בין 38-40 קילו למטר רבוע לעד 20 קילו למטר רבוע. השינויים שנובעים מהחוקים שחוקקו ע"י האיחוד האירופאי מעלים את מחיר התוצרת בצורה משמעותית ומכבידים מאוד על המגדלים מבחינה כלכלית אך אין סולם שמגדיר במדויק את מידת העקה שממנה סובלים העופות בתנאי הגידול השונים ולכן לא ניתן לתת לציבור מענה על השאלה הבסיסית האם חייהם של העופות לא נוחים, או כמה בדיוק ישתפרו חיי העופות עם נגדיל את גודל הכלובים או נשנה את תנאי האקלים בכלובים. כלל לא בטוח שהמעבר לגידול פטמים בצפיפות נמוכה יקטין את עקת העופות. ידוע לדוגמא שההתנהגות האגרסיבית של עופות גדולה יותר בלהקות קטנות מאשר בלהקות גדולות אשר בהן מפתחות אסטרטגיות להימנע מאינטראקציות שליליות. מחקר זה מגדיר את מידת העקה בפטמים בתנאי גידול שונים.

שיטות וחומרים

3.1 בעלי חיים

אפרוחים מסוג קוב הובאו ממדגרת "בראון" ביום הראשון לבקיעתם והושמו בחדרים מבוקרים בטמפרטורה מיטבית של 30°C , עד לחשיפה לכל אחת מהעקות הנבחנות, עם מזון ומים ללא הגבלה ומחזור תאורה של 12 שעות אור. כל הניסויים נערכו בהתאם להנחיות של הוועדה לניסויים בבעלי חיים.

3.2 מבחן פיזיולוגי

3.2.1 עקת חום

ביום השלישי לחייהם נחשפו אפרוחים לטמפרטורה של 37°C , 38.5°C ו- 41°C (כל אחת בנפרד) למשך 24 שעות. קבוצת ביקורת הושארה בטמפרטורה של 30°C . לפני החשיפה לעקה, ולאחר 0.5, 1, 2, 6, 12 ו-24 שעות במהלך החשיפה נשקלו האפרוחים (8 אפרוחים בכל נקודת זמן) וחום גופם נמדד. לאחר 24 שעות, עם סיום העקה, הורדה הטמפרטורה חזרה ל- 30°C . לפני החשיפה ומהלך החשיפה לעקה האפרוחים נשארו בחדרים המבוקרים. באופן דומה נערכה חשיפה לעקת חום של 35.5°C ושל 37.5°C גם באפרוחים בגיל 10 ימים, שהן 7.5 ו-9.5 מעלות מעל הטמפרטורה המיטבית בגיל זה שהיא 28°C , ובגיל 24 ימים שבו הטמפרטורה המיטבית היא 24°C .

3.2.2 עקת קור

ביום השלישי, הרביעי והשישי לחייהם נחשפו אפרוחים לטמפרטורה של 16°C למשך 3 שעות. קבוצת ביקורת הושארה בטמפרטורה מיטבית של 30°C . לפני העקה, ולאחר 0.5, 1.5 ו-3 הוקרבו 8 אפרוחים לשם לקיחת

רקמות, והושארו 8 אפרוחים נוספים שעברו חשיפה חוזרת לקור ביום הבא. לפני החשיפה ומהלך החשיפה לעקה האפרוחים נשארו בחדרים המבוקרים.

בדומה, ביום העשירי לחייהם נחשפו אפרוחים לטמפרטורה של 16°C למשך 12 שעות. קבוצת ביקורת הושארה בטמפרטורה מיטבית של 30°C . לפני העקה, ולאחר 2, 6 ו-12 שעות במהלך החשיפה נשקלו אפרוחים (8 אפרוחים בכל נקודת זמן) וחום גופם נמדד. קבוצת ביקורת נוספת כללה אפרוחים בגיל 10 ימים שעברו אקלום לקור: חשיפה הדרגתית לקור במהלך 10 ימים שבהם הורדה הטמפרטורה מ- 30°C בהדרגה כל יום חצי מעלת צלזיוס עד ל- 16°C .

3.2.3 עקה משולבת של חום ורוח (אוורור) ואקלום לחום

ביום השמיני, העשרים ושניים ושלושים ושש לאחר הבקיעה נחשפו אפרוחים מכל אחת מקבוצות הגיל לטמפרטורות 38°C , 34.8°C ו- 33.8°C בהתאמה למשך שעה וחצי. כמו כן, בכל גיל קבוצת אפרוחים נוספת נחשפה לטמפרטורת אלה המלוות עם מהירות רוח של 0.9m/sec לאפרוחים בני 8 ימים ו- 1.5m/sec לאפרוחים בני 22 ו-36 יום. קבוצה שלישית מכל גיל הייתה אפרוחים שעברו אקלום לטמפרטורת העקה במשך 3 ימים. האקלום נעשה על ידי עלייה הדרגתית בטמפרטורה (מטמפרטורה מיטבית בכל גיל לטמפרטורת העקה) שנמשכה 48 שעות, שלאחריהן הושארו הפטמים בטמפרטורה הקיצונית למשך 24 שעות עד למועד החשיפה לעקה. כל קבוצה מנתה בין 7 ל-9 פטמים. לפני החשיפה ומהלך החשיפה לעקה האפרוחים נשארו בחדרים המבוקרים. הגילאים, מהירויות הרוח וטמפרטורות העקה והאקלום מסוכמים בטבלה מספר 1.

Age (days)	Heat exposure ($^{\circ}\text{C}$)	Ventilation (m/sec)	Acclimation temp ($^{\circ}\text{C}$)
8	38	0.9	38.1
22	34.8	1.5	34.2
36	33.8	1.5	35.2

טבלה 1. גיל, טמפרטורת עקה, מהירות רוח וטמפרטורת אקלום.

3.3 איסוף רקמות

לצורך הפקת RNA וחלבון נאספו רקמות מהאפרוחים לפני החשיפה לעקות השונות ובמהלכן לאחר 5, 10 ו-15 דקות, ו-0.5, 1, 1.5, 2, 6, 12 ו-24 שעות, בגילאים השונים. דם בנפח $200\mu\text{L}$ נלקח מן האפרוחים והוקפא בחנקן נוזלי. ההיפותלמוס הקדמי והארכיסטריאטום הוצאו בניחוח לפי Andrew (1991) ונשמרו בתוך (Ambion) RNALater. לצורך אימונופלווארסנציה, הוצאו מוחות שלמים ועברו קיבוע ב-4% פרפורמאלדהיד ב-PBS למשך 24 שעות.

3.4 הפקת RNA

הפקת RNA נעשתה ב-Tri reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) מעופות בודדים, על פי הפרוטוקול, עם מספר שינויים. רקמת היפותלמוס קדמי והארכיסטריאטום עברו הומוגנציה ב-0.5ml של Tri reagent והודגרו בטמפרטורת החדר למשך חמש דקות. לתמיסה הוספו 0.1ml כלורופורם והיא סורכזה למשך 15

דקות במהירות 12,000xg ב-4°C. הפאזה המימית העליונה הועברה למבחנה חדשה. בשלב הבא הוספו לפאזה המימית 0.25ml איזופרופנול. לאחר אינקובציה של 10 דקות בטמפרטורת חדר, סורכזו הדוגמאות במהירות 12,000xg בטמפרטורה של 4°C, למשך 15 דקות. למשקע הוספו 0.5ml אתנול 75% והוא סורכז במהירות של 12,000xg בטמפרטורה של 4°C למשך 15 דקות. המשקע הסופי הורחף ב-20µl של H₂O_{DEPC}. ריכוז ה-RNA בדוגמא נקבע על ידי קריאה בספקטרופוטומטר קפילרי באורך גל של 260nm. הפקת RNA מהדם נעשתה באופן דומה על פי הפרוטוקול: 15µL דם הומסו ב-1ml של Tri reagent והודגרו בטמפרטורת החדר למשך חמש דקות. לתמיסה הוספו 0.2ml כלורופורם והיא סורכזה למשך 15 דקות במהירות 12,000xg ב-4°C. הפאזה המימית העליונה הועברה למבחנה חדשה. בשלב הבא הוספו לפאזה המימית 0.5ml איזופרופנול. לאחר אינקובציה של 10 דקות בטמפרטורת חדר, סורכזו הדוגמאות במהירות 12,000xg בטמפרטורה של 4°C, למשך 15 דקות. למשקע הוספו 1ml אתנול 75% והוא סורכז במהירות של 12,000xg בטמפרטורה של 4°C למשך 15 דקות. המשקע הסופי הורחף ב-20µl של H₂O_{DEPC}. ריכוז ה-RNA בדוגמא נקבע על ידי קריאה בספקטרופוטומטר קפילרי באורך גל של 260nm.

Reverse Transcription PCR 3.5

ריאקצית Reverse transcription PCR נעשתה באמצעות האנזים M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). ל-1µg מכל דוגמת RNA הוספו 0.5µL של Oligo dT ו-0.5µL תחלים רנדומאליים. לאחר אינקובציה של 5 דקות ב-70°C וקירור מיידי, לכל דוגמא הוספו 50 units של האנזים M-MLV בבופר ריאקציה ו-dNTP. הדוגמאות הודגרו למשך 50 דקות ב-37°C ו-15 דקות נוספות ב-75°C.

Real-time PCR 3.6

ריאקצית Real-time PCR נעשו בעזרת Applied) model 7000 sequence analysis system (Biosystems, Foster City, CA). כל ריאקציה הכילה 20ng cDNA, 5pmol מכל תחל ו-9µl Absolute Blue SYBR Green ROX Mix (ABgene, Epsom, UK) בנפח סופי של 18µl. לאחר כל ריאקציה נותחו עקומות הדיסוציאציה של התוצר (על מנת לוודא כי קיים רק תוצר הגברה אחד). מספר מחזורי הריאקציה הדרושים על מנת להגיע לשלב הלינארי (CT) עבור כל גן שנבדק (X) שימש לחישוב הביטוי היחסי של הגן בעזרת הנוסחה: $2^{-(Ct_{\text{gene}} - X - Ct_{\text{standard}})}$. הגנים 18s או β -actin שימשו כ-House-keeping genes לצורך נרמול התוצאות (standard). הערכה סטטיסטית של ההבדלים בין הקבוצות נעשתה בעזרת ANOVA.

התחלים תוכננו בעזרת התוכנה Primer Express, רצפי התחלים:

HSF1	Fw 5'-CGAGGACATCAAGGTGAGCG-3'
	Rv 5'-TGGCTATCAGCTTGGAGTCCAT-3'
HSF3	Fw 5'-GAATGGCGAGAACTTCTGCAT-3'
	Rv 5'-GCTGTCGGATGAAGCTGGAG-3'
HSP70	Fw 5'-TGGGTGTCTTCCAGCATGG-3'
	Rv 5'-GATGAGGCGCTCTGTATCGG-3'
HSP90	Fw 5'-TTTGAAGTACCCGAGCAAGC-3'

	Rv 5'-CTATGCCGGTATCCACAATGG-3'
c-Fos	Fw 5'-TACTCCCTCTGACCCCAAAGG-3'
	Rv 5'-CCAACGCACCCTACGCTTAG-3'
TRH	Fw 5'- TTGCAGAAAATCACAATGCCA-3'
	Rv 5'- TGAGGCAAACACCAGACAAGG-3'
AVT	Fw 5'- GCACACTCAGCATGGCAGAG3-3'
	Rv 5'- ATGTAGCAGGCGGAGGACAA-3'
CRH	Fw 5'-TTAGGACCAAATCTGATCACAAGTTC-3'
	Rv 5'-CGGCGTCCTTCCTCTGC-3'
18s	Fw 5'-CGGGTTGGTTTTTGGTCTGAT-3'
	Rv 5'-ATGGTTCCTTTGGTCGCTCC-3'
β-actin	Fw 5'-CCGCAAATGCTTCTAAACCG-3'
	Rv 5'-AAAGCCATGCCAATCTCGTC-3'

3.7 הפקת חלבון

לצורך ביצוע Western blot analysis ההיפותלמוס הקדמי עבר הומוגניזציה ב- SDS sample buffer (25 mM) כל דוגמא הורתחה באמבט מים למשך 5 דקות. לצורך קביעת חלבון, כל דוגמא נמהלה פי 20, ל-10 μl דוגמא הוספו 50 μl של 0.4N NaOH ו-140 μl של ddH₂O. לכל דוגמא הוסף 1 ml של ריאגנט C טרי (2% Na₂CO₃ in NaOH 0.1N, 2%) והיא הודגרה למשך 10 דקות בטמפרטורת החדר, ולאחר מכן הוספו 50 μl של ריאגנט D (Folin reagent) למשך שעה בטמפרטורת החדר. ריכוז החלבון בדוגמא נקבע על ידי קריאה בספקטרופוטומטר באורך גל של 630nm והשוואה לעקומת כיוול של BSA בריכוזים ידועים לשם חישוב ריכוז החלבון שהופק בכל דגימה.

Western blot analysis 3.8

כמויות שוות של חלבון מכל דוגמא, הופרדו על גבי 12% SDS-polyacrylamide gel ועברו ע"י electroblotting לממברנת ניטרצילולוז. ה- blot נצבע בצביעת Ponceau לחלבונים ונחסם עם 5% BSA ב- TBST (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) למשך שעה אחת בטמפרטורת החדר. כל blot נחתך לשני חלקים: החלק העליון, המכיל חלבונים בטווח של 55-90 kDa, הודגר עם נוגדן ראשון פולי-קלונלי כנגד Hsp70 (Biovision Research Products, CA, USA) והחלק התחתון, המכיל חלבונים בטווח של 30-55 kDa, הודגר עם נוגדן ראשון פולי-קלונלי כנגד β-Actin (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) כביקורת העמסה. ההדגרה נעשתה למשך הלילה בטלטול בטמפרטורה של 4°C. לאחר שלוש שטיפות, כל אחת 5 דקות, ב- TBST הודגרה ה- blot עם נוגדן שני פולי-קלונלי (Amersham Anti-rabbit IgG Biosciences, Little Chalfont, UK) בריכוז 1:3000 למשך שעה וחצי בטמפרטורת החדר. לאחר שעה וחצי נשטף שלוש שטיפות, כל אחת 5 דקות ב- TBST. הסיגנל זוהה על ידי חשיפת ה- blot לסובסטרט SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL) וצילומו בעזרת המכשיר Image Master VDS-CL (Amersham Pharmacia Biotech Sweden). ניתוח התוצאות וקביעת הדנסיטומטריה נעשו ע"י התוכנה ImageJ 1.30. הערכה סטטיסטית של ההבדלים בין הקבוצות נעשתה בעזרת ANOVA.

3.9 אימונופלוורסנציה

מוחות שלמים עברו פיקסציה ב-4% פורמאלדהיד ב-PBS בטמפרטורה של 4°C למשך הלילה. לשם קיבוע המוחות בפרפין, המוחות עברו דה-הידרציה ע"י שתי שטיפות עם PBS למשך 30 דקות ב-4°C, וסדרת שטיפות של שעה ב-4°C עם: 50%, 70%, 85%, 95% אתנול, שתי שטיפות ב-100% אתנול למשך שעה ב-4°C, כלורופורם-אתנול למשך 30 דקות בטמפרטורת החדר ושתי שטיפות בכלורופורם למשך שעה בטמפרטורת החדר. לבסוף הועברו המוחות לשלוש שטיפות, כל שטיפה למשך שעה, בפרפין 60%. קוביות הפרפין נחתכו לחתכים בעובי 5µm והונחו בטיפת 2% אתנול על גבי זכוכית נושאת, והזכוכיות הונחו על פלטה בטמפרטורה של 37°C למשך הלילה. לצורך הצביעה האימונית החתכים עברו דה-פרפיניזציה ורה-הידרציה. החתכים הושרו פעמיים ב-xylene למשך חמש דקות בכל פעם, פעמיים ב-100% אתנול למשך חמש דקות, באתנול 96% למשך חמש דקות, באתנול 80% למשך חמש דקות ושלוש פעמים במים למשך חמש דקות. בשלב הבא הורתחו החתכים בבופר סודיום ציטראט (10mM Na citrate, pH 6.0) למשך 10 דקות ולאחר קירור נשטפו ב-PBS ונחסמו ע"י 10% סרום חמור ב-PBS למשך שעה. לאחר החסימה הושרו החתכים עם נוגדן פולי-קלונלי ל-HSF1 (תודות לזאב ארד ואריאל שבתאי) במיחול 1:100 בתמיסת חסימה ב-4°C למשך הלילה. החתכים נשטפו עם PBS שלוש פעמים למשך חמש דקות בכל פעם והודגרו עם נוגדן שני donkey anti-rabbit IgG מצומד ל-Cy3TM מהול 1:400 ב-PBS למשך שעתיים. לאחר שלוש שטיפות עם PBS למשך חמד דקות, גרעיני התאים נצבעו בצביעת counterstain ע"י הדגרה של חמש דקות ב-4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Sigma, St. Louis, MO), וכוסו בזכוכית מכסה בעזרת fluorescence mounting medium (Sigma). חתכי ביקורת הודגרו רק עם הנוגדן השני: donkey anti-rabbit IgG מצומד ל-Cy3TM מהול 1:400 ב-PBS למשך שעתיים. הצביעה אובחנה במיקרוסקופ פלואורסנטי.

1.1 השפעת עקות אקלימיות על טמפרטורת גוף ומשקל גוף של פטמים

1.1.1 שינוי בטמפרטורה ובמשקל גוף של אפרוחים בגיל 3 ימים בעקת חום

מטרתה של עבודה זו היא הגדרתו של סולם לזיהוי עקה בעופות המורכב מפרמטרים מדידים פיזיולוגיים ומולקולאריים. לשם כך, בשלב ראשון התרכזתי בהשפעת עקות אקלימיות על שינוי בטמפרטורת הגוף ובמשקל של פטמים בגיל 3 ו-10 ימים. תחילה התרכזתי באפרוחים בני שלושה ימים שאותם חשפתי לעקת חום מבוקרת בטמפרטורה של 37°C למשך עשרים וארבע שעות ובדקתי את השתנותם של שני מדדים פיזיולוגיים: טמפרטורת הגוף ושינוי בתוספת משקל הגוף בזמנים קבועים במהלך העקה בהשוואה לאפרוחים אשר גדלו בטמפרטורה מיטבית של 31°C (קבוצת הביקורת). כל קבוצה מנתה 8 אפרוחים. באיור 1 ניתן לראות כי כבר לאחר 30 דקות של חשיפה לעקת חום של 37°C , טמפרטורת הגוף של אפרוחים עלתה בכ- 1.2 מעלות צלזיוס בהשוואה לקבוצת הביקורת. טמפרטורה גבוהה זו נשמרה לאורך כל החשיפה לחום סביבתי גבוה ($p < 0.05$, מבחן Tukey-Kramer) (איור 1A). כמו כן, נמצא כי לעקת החום יש השפעה מובהקת על שינוי משקל הגוף בכל אחד מחלונות הזמנים שנבחנו. באיור 1 ניתן לראות כי בעוד שבאפרוחים שגודלו בטמפרטורה מיטבית ישנה עלייה קבועה במשקל הגוף, הרי שבאפרוחים שנחשפו ל- 37°C התקבל עיכוב בעלייה במשקל האפרוחים שנמשכה ב-12 השעות הראשונות מתחילת העקה, ורק לאחר 24 שעות מתקבלת עלייה במשקל האפרוחים ($p < 0.05$, מבחן Tukey-Kramer) (איור 1B).

1.1.2 שינוי בטמפרטורה ובמשקל גוף של אפרוחים בגיל 10 ימים בעקת חום

על מנת לבחון את השינויים בתגובת האפרוחים לחשיפה לעקה בגיל מבוגר מגיל התקופה הקריטית של התפתחות בקרת הטמפרטורה, בשלב הבא, חשפתי אפרוחים בני 10 ימים לעקת חום מבוקרת בטמפרטורה של 37°C למשך עשרים וארבע שעות, ובדומה, נמדדו טמפרטורת הגוף ושינוי בתוספת משקל הגוף בזמנים קבועים במהלך העקה בהשוואה לאפרוחים בני אותו גיל שגדלו בטמפרטורה מיטבית של 30°C (קבוצת הביקורת). כל קבוצה מנתה 8 אפרוחים. באיור 2 ניתן לראות כי טמפרטורת הגוף של אפרוחים שנחשפו ל- 37°C גבוהה יותר מקבוצת הביקורת בכל אחת מנקודות הזמן שנבדקו, וכבר אחרי שעה מתחילת העקה עלתה טמפרטורת גופם בכ- 2.5°C (איור 2A). גם בבדיקת השינוי בתוספת משקל הגוף נמצא כי קיים עיכוב בעליית משקל הגוף של האפרוחים לאחר שעה. עלייה במשקל גוף האפרוחים מתקבלת רק 12 שעות לאחר תחילת החשיפה לחום (איור 2B).

1.1.3 שינוי בטמפרטורה ובמשקל גוף של אפרוחים בגיל 3 ימים בעקת קור

מאחר ומטרת העבודה לבדוק את תגובת האפרוחים לעקת שונות נבחנו השינוי בטמפרטורה ובמשקל גוף של אפרוחים גם בהשפעת עקת קור. האפרוחים חולקו לשלוש קבוצות: הקבוצה הראשונה – קבוצת הביקורת שהתה במשך הניסוי בטמפרטורה מיטבית של 30°C , קבוצה שנייה – קבוצת אקלום עברה אקלום לקור במשך 10 ימים על ידי הורדה של הטמפרטורה ב- 0.5°C כל 6 שעות עד לטמפרטורה של 16°C , קבוצה שלישית – קבוצת העקה שהתה במשך 10 ימים בטמפרטורה מיטבית של 30°C ועברה מיידית לטמפרטורה של 16°C . כל קבוצה מנתה 8 אפרוחים. באיור 3 ניתן לראות כי טמפרטורת הגוף של הקבוצה המאוקלמת לקור אינה שונה באופן מובהק מזו של קבוצת הביקורת בעוד שטמפרטורת הגוף של האפרוחים שנחשפו לעקה יורדת באופן משמעותי לאחר שעתיים, 6 שעות ו-12 שעות מתחילת העקה (איור 3A). דפוס דומה ניתן לראות גם בתוספת משקל הגוף אשר זהה בין קבוצת האקלום לקבוצת הביקורת אך נמוך באופן משמעותי לאחר שעתיים מתחילת העקה בקבוצת העקה, אשר מתאפיינת בגדילת פיצוי לאחר שש ושתיים עשרה שעות מתחילת העקה (איור 3B).

1.2 שינוי בביטוי של חלבוני עקה ברקמת הדם, בהיפותלמוס הקדמי ובארכיסטריאטום של אפרוחים בגיל 3 ימים בעקת חום

על מנת להגדיר את מידת העקה שממנה סובלים העופות כתוצאה מהתנאים השונים השוררים בלול נבחנה בשלב הראשון מידת השינוי של ה-mRNA של חלבוני העקה בדם ובאזורי מוח המבקרים עקה בתנאי חום. על מנת ליצור עקת מתגברות נחשפו אפרוחים שונים לטמפרטורות סביבה עולות. ה-mRNA הנבחן הינו של פקטורי השעתוק HSF1, HSF3 ו-c-Fos ושל חלבוני העקה HSP70 ו-HSP90, אשר ידוע כי הם מופעלים ברמות שונות בהתאמה למידת העקה והחרדה שהעוף חש (Yahav, Shamay et al. 1997). בכל קבוצת עקה נדגמו דם, היפותלמוס וארכיסטריאטום מ-9 פטמים. ביטוי הגנים נעשה באמצעות Real-time PCR. הערכה סטטיסטית של ההבדלים בין קבוצות האפרוחים שנחשפו לעקה בכל אחד מחלונות הזמן לבין אפרוחים נאיביים (קבוצת הביקורת) נעשתה בעזרת ANOVA.

1.2.1 ביטוי mRNA של חלבוני עקה ברקמת הדם של אפרוחים בגיל 3 ימים בחום

מצאתי כי $15\mu\text{l}$ דם מלא הם נפח המספיק על מנת לבצע אנליזה כמותית למספר רב של גנים לאחר הקפאתו בחנקן נוזלי מבלי לגרום לעופות נזק. בטמפרטורת סביבה של 37.5°C נמצאו הבדלים קטנים בביטוי חלבוני העקה אותם אתאר בהמשך. עם העלייה בטמפרטורה ל- 38.5°C נצפתה עלייה בביטוי חלבוני העקה ברקמת הדם: עלייה מובהקת בביטוי של HSF1 חצי שעה מתחילת העקה ל- 2.3 ± 0.44 ($p < 0.05$) בהשוואה לאפרוחים נאיביים. עלייה זו נמשכה לכל משך העקה כאשר מובהקות סטטיסטית קיימת בשש שעות (עלייה של 2.6 ± 0.7 , $p < 0.05$), בשתיים עשרה שעות (עלייה של 2.7 ± 0.5 , $p < 0.05$) ובעשרים וארבע שעות עלייה של 4 ± 0.8 ($p < 0.01$) (איור 4A). ברמת ביטוי של פקטור השעתוק HSF3

התקבלה עלייה משמעותית מאוד כבר לאחר שעתיים מתחילת העקה (12.6 ± 7.8 , $p < 0.05$), ולאחר 24 שעות עלייה נוספת בביטוי הגן ל- 3.7 ± 1.0 ($p < 0.01$) (איור 4B). מתקבלת גם עלייה ממושכת בביטוי c-Fos כאשר בחצי שעה הביטוי גבוה מהביטוי באפרוחי ביקורת פי 6.6 ± 2 ($p < 0.01$), בשעה וחצי 4.4 ± 0.9 ($p < 0.01$), בשש שעות 7.2 ± 2.5 ($p < 0.05$) ובעשרים וארבע שעות 13.6 ± 4.7 ($p < 0.01$) (איור 4C). בחלבונים העקה HSP70 ו-HSP90 נצפתה עלייה משמעותית מאוחרת יותר, שהתחילה שעתיים מתחילת העקה, ב-HSP70 12.9 ± 3.9 ($p < 0.01$) וב-HSP90 9.6 ± 1.6 ($p < 0.01$) (איור 1 D ו-E, בהתאמה). בשש שעות ביטוי החלבונים היה עדיין גבוה, HSP70 7.4 ± 3.9 ($p < 0.05$) וב-HSP90 3.2 ± 0.9 ($p < 0.01$) (איור 4 D ו-E, בהתאמה), ובשתיים עשרה ועשרים וארבע שעות ישנה התמתנות ברמת הביטוי של שני החלבונים, אך זו עדיין נשארת גבוהה (איור 4).

1.2.2 הבדלים בביטוי mRNA של חלבוני עקה ברקמת הדם של אפרוחים בגיל 3 ימים בין חשיפה לחום של 37.5°C לזה של חשיפה ל- 38.5°C

לאור השינויים בביטוי חלבוני העקה בדם ובמטרה ליצור סולם לעקות בעוצמות שונות ובאורכי זמן שונים של חשיפה לעקה, בחנתי את ההבדלים בביטוי הגנים בין שתי עקות חום, עקה של 37.5°C ועקה של 38.5°C בשתי נקודות זמן, שעתיים ועשרים וארבע שעות מתחילת החשיפה לחום, והשוותי את ביטויים של חלבוני העקה לאלו באפרוחים שגודלו בטמפרטורה מיטבית של 31°C (איור 5). כל קבוצה מנתה 9 אפרוחים. ניתן לראות כי באופן כללי ביטוי הגנים בעקה של 38.5°C גבוה בהשוואה ל- 37.5°C . כמו כן, ניתן לראות כי ההבדל בין שתי נקודות הזמן שנבחנו משמעותי יותר בעקה של 38.5°C ומובהק בביטוי HSP90 ו-HSP70 (איור 5D ו-5E בהתאמה). ניתן לסכם ולומר כי בעקה הקיצונית יותר ביטוי mRNA של הגנים המבניים מהיר וגבוה יותר בהשוואה לעקה המתונה.

1.2.3 ביטויים של חלבוני עקה בהיפותלמוס הקדמי של אפרוחים בגיל 3 ימים בחשיפה לחום

בהיפותלמוס הקדמי לא התקבל שינוי בביטוי חלבוני העקה c-Fos, HSF3, HSF1 ו-HSP90 בתגובה לעקת חום של 38.5°C באפרוחים בני 3 ימים (איור 3 A-C ו-E). לעומת זאת, ביטוי הגן HSP70 עולה בחצי השעה הראשונה מתחילת העקה פי 2.6 ± 0.8 ($n=8$, $p < 0.05$) בהשוואה לאפרוחים נאיביים. העלייה ממשיכה גם לאחר שעה ל- 3.2 ± 0.9 ($n=8$, $p < 0.05$) ומגיעה לשיא לאחר שעתיים מתחילת העקה (פי 5.3 ± 0.5 , $n=8$, $p < 0.01$) (איור 6). לאחר שש שעות מתחילת העקה מתרחשת ירידה בביטוי, אך הביטוי נשאר גבוה בהשוואה לאפרוחים נאיביים לאורך כל החשיפה לחום 6, 12 ו-24 שעות (1.6 ± 0.3 ; 2 ± 0.3 , $n=8$, $p < 0.05$ ו- 1.7 ± 0.1 , $n=8$, $p < 0.01$) (בהתאמה) (איור 6D).

1.2.4 עלייה בביטוי mRNA והחלבון Hsp70 בהיפותלמוס הקדמי כתלות בטמפרטורת העקה

מאחר וביטוי של HSP70 עולה בחשיפה לחום, בשלב הבא נבחנו השינויים בביטוי mRNA של HSP70 בשתי טמפרטורות נוספות במטרה לבחון את השפעת טמפרטורת העקה על הביטוי. נמצא כי קיים יחס ישר בין טמפרטורת העקה לבין ביטוי mRNA של HSP70 (איור 7). ב- 37.5°C התקבלה עלייה מובהקת בביטוי פי 1.9 ± 0.2 ($n=5$, $p<0.01$) שש שעות מתחילת העקה, ולאחריה ירידה עד לרמה הבסיסית לאחר עשרים וארבע שעות. ב- 38.5°C התקבלה עלייה משמעותית בביטוי כבר לאחר שעה מתחילת העקה של 3.2 ± 0.9 ($n=8$, $p<0.05$), שנמשכה לערך גבוה יותר לאחר שעתיים, 5.3 ± 0.5 ($n=8$, $p<0.01$) (איור קודם). ב- 41°C התקבלה עלייה משמעותית לאחר שעתיים מתחילת העקה של 2 ± 0.4 ($n=8$, $p<0.05$) ולאחר שש שעות, 8.4 ± 1.7 ($n=8$, $p<0.01$) (איור 7). לאחר 12 ו-24 שעות מתרחשת ירידה בביטוי אולם הביטוי נשאר גבוה, 1.5 ± 0.2 ($n=8$, $p<0.05$) ו- 3.2 ± 0.4 ($n=8$, $p<0.01$), בהתאמה (איור 7).

לאור השינויים המשמעותיים בביטוי mRNA של HSP70 בטמפרטורות השונות בחנתי את ביטוי החלבון ב-Western blot בשתי טמפרטורות ומצאתי גם ברמת החלבון התאמה בין ביטוי החלבון Hsp70 לבין התלות בטמפרטורת העקה. איור 8 מסכם את היחס בין ביטוי החלבון Hsp70 ב-8 אפרוחים בכל נקודת זמן לבין ביטוי החלבון באפרוחים שלא עברו חשיפה לעקה. על מנת לתקן הבדלים בכמויות החלבון שהוטענו, רמת הביטוי של Hsp70 בכל דוגמא הושוותה לרמת הביטוי של החלבון β -actin אשר ביטוי בתאים קבוע (איור 8A, פאנל תחתון בכל אחת מהטמפרטורות).

בעקה של 38.5°C חלה עלייה בביטוי של כ-74% שעתיים מתחילת העקה ($n=8$, $p<0.01$). רמתו נשארת גבוהה שש שעות מתחילת העקה, כ-32% ($n=8$, $p<0.05$), ולאחר שתיים עשרה שעות כ-51% ($n=8$, $p<0.05$). לאחר עשרים וארבע שעות רמת הביטוי של החלבון היא כ-38% (לא מובהק) (איור 8B, שמאל). ב- 41°C חלה עלייה משמעותית יותר בביטוי שעתיים מתחילת עקת החום בכ-127% ($n=8$, $p<0.01$), הנמשכת גם לאחר שש שעות בכ-82%. בשתיים עשרה שעות ועשרים וארבע שעות רמת החלבון מתמתנת אך ממשיכה להיות גבוהה, כ-33% וכ-73%, בהתאמה (איור 8B, ימין).

1.2.5 עלייה בביטוי mRNA וחלבון של פקטורי השעתוק Hsf1 ו-Hsf3 בהיפותלמוס הקדמי כתלות בטמפרטורת העקה

מאחר ומטרת העבודה הינה להגדיר סולם אשר בוחן את מידת העקה בחלונות זמן שונים, מדקות ועד שעות, הנחת העבודה הייתה כי ביטוי פקטורי השעתוק HSF1 ו-HSF3 יהיה מהיר, ובעזרתו אוכל להגדיר קיום עקות בחלון הזמן של דקות מתחילת העקה. אך בזמנים מאוד קצרים לא מצאתי עלייה משמעותית בביטויים של HSF1 ו-HSF3 בעקת חום של 41°C . אולם, בביטוי של גנים אלו התקבלה עלייה מתונה אך מובהקת שש שעות (שלוש מאות שישים דקות) מתחילת העקה, כאשר ב-HSF1 עלייה ל- 1.6 ± 0.07 ($n=8$, $p<0.01$) וב-HSF3 עלייה ל- 1.4 ± 0.08 ($n=8$, $p<0.01$) (איור 9A).

בנוסף, בצביעה אימונופלווארסנטית של חתכי מוח סגיטליים של אפרוחים נאיביים ושל אפרוחים לאחר שש שעות מתחילת עקת החום נמצא כי תאי ההיפותלמוס הקדמי מבטאים יותר מהחלבון Hsf1 לאחר שש שעות מתחילת העקה בהשוואה לחתכים מאפרוחים שלא נחשפו לעקת חום. צביעת הגרעינים ב-

DAPI הראתה כי פיזור הגרעינים בשני החתכים דומה (איור 9B). יש לציין ששיטה זו היא איכותית ולא כמותית.

1.2.6 ביטוי mRNA של חלבוני עקה בארכיסטריאטום של אפרוחים בגיל 3 ימים בחום

בנוסף להיפותלמוס הקדמי, המשמש כמרכז לבקרת עקות מטבוליות, הארכיסטריאטום בעופות הוא מקבילו של האמיגדלה היונקית ומרכז מידע כללי על עקות. ולכן, בנוסף לשינוי ביטוי חלבוני עקה בהיפותלמוס בדקתי גם את ביטוי חלבוני העקה באזור זה. מצאתי כי הביטוי של פקטורי השעתוק HSF1 ו-HSF3 עולה במהלך עקת החום בארכיסטריאטום באופן דומה לעליית הביטוי של גנים אילו בהיפותלמוס. הביטוי של HSF1 עולה באופן מובהק לערך של 2 ± 0.4 ($n=11$, $p<0.05$) ו- 2.1 ± 0.3 ($n=13$, $p<0.01$) כעבור שעות מתחילת העקה, בהתאמה (איור 10A). ביטוי HSF3 עולה כעבור שעות מתחילת העקה (לא מובהק) ומגיע לפי 1.7 ± 0.2 ($n=13$, $p<0.05$) ופי 1.5 ± 0.1 ($n=13$, $p<0.05$), $n=5$) כעבור שש ושתיים עשרה שעות מתחילת העקה, בהתאמה (איור 10B). ביטוי של HSP70 עולה כעבור שעות מתחילת העקה פי 3.6 ± 0.8 ($n=11$, $p<0.01$), וביטוי יורד אך ממשיך להיות גבוה באופן מובהק 6 ו-12 שעות מתחילת העקה (2.7 ± 0.3 ; $n=13$, $p<0.01$; ו- 2.0 ± 0.3 ; $n=5$, $p<0.01$). הביטוי יורד לרמה הבסיסית לאחר עשרים וארבע שעות (איור 10D). ביטוי c-Fos יורד בחצי השעה הראשונה לחשיפת האפרוחים לחום (איור 10C). ביטוי הגן HSP90 לא השתנה בתגובה לעקת החום (איור 10E).

1.3 שינוי בביטוי של חלבוני עקה ברקמת הדם ובהיפותלמוס הקדמי באפרוחים בגיל 10 ימים בחום

על מנת להרחיב את יעילותו של סרגל העקה לגילאים בוגרים, בדקתי בשלב הבא את ביטוי חלבוני העקה בפטמים בני עשרה ימים על ידי חשיפתם ביום העשירי לחום של 37.5°C למשך עשרים וארבע שעות. בכל קבוצה נדגמו דם, היפותלמוס וארכיסטריאטום מ-5 פטמים לפחות בנקודות זמן קבועות במהלך העקה. ביטוי הגנים נעשה באמצעות Real-time PCR. הערכה סטטיסטית של ההבדלים בין קבוצות האפרוחים שנחשפו לעקה בכל אחד מחלונות הזמן לבין אפרוחים נאיביים (קבוצת הביקורת) נעשתה בעזרת ANOVA.

1.3.1 שינוי בביטוי mRNA של חלבוני עקה ברקמת הדם של פטמים בגיל 10 ימים בחום

בדומה לדגימות שנערכו ביום 3 נדרשו $15\mu\text{l}$ דם על מנת לבצע אנליזה כמותית לכל הגנים. במהלך עקת החום התקבלה עלייה בביטוי של כל חמשת הגנים שנבדקו. עלייה זו היא הדרגתית וממושכת ונמשכת עד עשרים וארבע שעות מתחילת העקה (איור 11). לאחר עשרים וארבע שעות מתחילת העקה העלייה בביטוי HSF1 היא פי 4.3 ± 0.8 ($n=5$, $p<0.05$) (איור 11A), העלייה בביטוי HSF3 היא פי 2.6 ± 0.9 (לא מובהק) (איור 11B) וב-c-Fos ל- 28.5 ± 6.6 ($n=5$, $p<0.01$) (איור 11C). גם ב-HSP70 העלייה הדרגתית וממושכת

וקיימת מובהקות סטטיסטית לאחר שתיים עשרה שעות, 4.4 ± 1.7 ($n=5$, $p<0.05$) (איור 11D). ביטוי HSP90 לאחר שתיים עשרה שעות הינו פי 3.7 ± 0.4 ($n=4$, $p<0.01$) ובעשרים וארבע שעות פי 8.3 ± 2.3 ($n=5$, $p<0.05$) (איור 11E).

1.3.2 שינוי בביטוי mRNA של חלבוני עקה בדם של פטמים בגיל 10 ימים בטמפרטורה של 35.5°C ושל 37.5°C

לאור השינויים בביטוי חלבוני העקה בדם ובמטרה לבחון את ההשפעה של חשיפה לטמפרטורות שונות, בחנתי את ההבדלים בביטוי הגנים בין שתי עקות חום, של 35.5°C ושל 37.5°C , בשתי נקודות זמן, שש ועשרים וארבע שעות (איור 12). באיור 12 ניתן לראות כי ביטוי הגנים בעקה של 37.5°C גבוה בהשוואה לביטוי הגנים ב- 35.5°C . כמו כן, ניתן לראות כי ההבדל בין שתי נקודות הזמן שנבחנו משמעותי יותר בעקה של 37.5°C ומובהק בביטוי HSF1 ו-HSP90 (איור 12A ו-12D בהתאמה). ניתן לסכם ולומר כי בעקה הקיצונית יותר ביטוי mRNA של הגנים גבוה ונמשך זמן ארוך יותר.

1.3.3 ביטוי mRNA של חלבוני עקה בהיפותלמוס הקדמי של פטמים בגיל 10 ימים בחום

בתגובה לעקת חום בגיל 10 ימים מתרחשת עלייה בביטוי פקטורי השעתוק HSF1 ו-HSF3 המתחילה לאחר שעתיים מתחילת העקה (איור 13 A ו-B, בהתאמה). ב-HSF1 העלייה בביטוי הגן מובהקת כבר שעתיים מתחילת העקה (עלייה ב- 1.3 ± 0.15 ; $n=8$, $p<0.05$) שנמשכה עד 24 שעות (איור 12A). באופן דומה, ב-HSF3 ישנה עלייה מובהקת שעתיים מתחילת העקה (עלייה ב- 1.6 ± 0.2 ; $n=8$, $p<0.05$) שנמשכה גם לאחר שש שעות, 1.5 ± 0.12 ($n=8$, $p<0.05$) (איור 13B). ב-c-Fos נצפתה ירידה הדרגתית עד לשש שעות, כאשר לאחר שעתיים מתחילת העקה הביטוי ירד ל- 0.49 ± 0.10 ($n=8$, $p<0.05$) ולאחר שש שעות, 0.46 ± 0.08 ($n=8$, $p<0.05$). לאחר 24 שעות ניתן לראות שהגן חוזר לרמתו הבסיסית. ב-HSP70 נצפתה עלייה הדרגתית וממושכת החל מחצי שעה מתחילת העקה כאשר שיאה היה בשעתיים ובשש שעות 2.6 ± 0.3 ($n=8$, $p<0.01$) ו- 2.6 ± 0.3 ($n=8$, $p<0.01$) בהתאמה. למרות הירידה, לאחר שתיים עשרה ועשרים וארבע שעות בביטוי הגן HSP70 נשאר גבוה ומובהק בהשוואה לעופות נאיביים, 2.0 ± 0.3 ו- 1.8 ± 0.15 ($n=8$, $p<0.01$) בהתאמה (איור 13D). בביטוי הגן HSP90 לא התקבל שינוי בתגובה לעקת החום בדומה ליום 3.

1.4 שינויים ארוכי טווח בביטוי mRNA של חלבוני עקה ברקמת הדם ובהיפותלמוס הקדמי במהלך תקופת הגידול בתנאי חום

מכיוון שמצאתי כי בביטוי HSP70 מתקבלים השינויים המשמעותיים ביותר הן בדם והן בהיפותלמוס הקדמי, ועל מנת לבחון את יעילותו של גן זה כסמן לעקה במהלך תקופת הגידול, בשלב הבא בחנתי את

השינוי בביטוי הגן בשלושה גילאים שונים בהשוואה לעופות נאיביים בני אותו גיל, אשר ביטוי הגן נורמל לערך 1 המסומן בכל אחד מהגרפים באיורים 14 ו-15 בקו המקווקו האופקי. כמו כן, בחנתי את ביטוי פקטור השעתוק של HSP70, HSF1 ואת השינוי בביטוי c-Fos, המהווה סמן של עקה. לשם כך, השוואת הביטוי בכל אחד משלושת הגילאים נעשתה בשתי נקודות זמן, שעתיים ועשרים וארבע שעות, וזה על מנת ליצור סולם למדידת עקה שיהיה רחב מבחינת חלון הזמן אותו הוא משקף. ההפרש בין טמפרטורת העקה לבין הטמפרטורה המיטבית בכל גיל היה 7-8 מעלות, כלומר מידת העקה בכל גיל הייתה קבועה. טמפרטורות העקה מסוכמות בפרק השיטות והחומרים.

1.4.1 הבדלים בביטוי mRNA של HSF1, c-Fos ו-HSP70 ברקמת הדם כתלות בגיל הפטם

באיור 14 ניתן לראות שינויים בביטוי mRNA של פקטורי השעתוק HSF1 ו-c-Fos ושל הגן HSP70 ברקמת הדם של פטמים בשלושה גילאים שונים, 3, 10/7 ו-24 יום, לאחר שעתיים (איור 14A) ולאחר עשרים וארבע שעות (איור 14B) מתחילת עקת החום. באפרוחים בני 3 ימים נמצאה עלייה בביטוי HSF1 פי 1.9 ± 0.5 ופי 4 ± 0.8 לאחר שעתיים ולאחר עשרים וארבע שעות, בהתאמה, בהשוואה לאפרוחים נאיביים בני אותו גיל. אולם, למרות שלא נמצאה עלייה משמעותית בגילאי 7 ו-24 ימים לאחר שעתיים מתחילת העקה (איור 14Ai) ניתן לראות באיור 14Bi כי עוצמת ביטוי הגן גבוהה באופן משמעותי בחשיפה לעקת חום לאחר 24 שעות בכל אחד מהגילאים שנבחנו. בשונה, בביטוי הגן HSP70 נמצאו הבדלים מובהקים בין שלושת הגילאים בחלון הזמן שלאחר שעתיים מתחילת העקה: הביטוי עולה באופן משמעותי בגיל 3 ימים פי 12.9 ± 4 בהשוואה לאפרוחים נאיביים בני אותו גיל, אולם בפטמים בגיל 7 ו-24 ימים הביטוי נמוך באופן משמעותי (איור 14Aii). לאחר 24 שעות לא נמצאה תלות בביטוי בשלושת הגילאים, כלומר עוצמת ביטוי הגן הייתה גבוהה באופן משמעותי בכל אחד מהגילאים (איור 14Bii). גם עוצמות הביטוי של c-Fos לאחר שעתיים היו גבוהות בגילאים השונים (איור 14Aiii), אולם רק לאחר 24 שעות דפוס הביטוי המתקבל הינו תלוי גיל (איור 14Biii).

1.4.2 הבדלים בביטוי mRNA של HSF1 ו-HSP70 בהיפותלמוס הקדמי כתלות בגיל הפטם

באיור 15 ניתן לראות שינויים בביטוי mRNA של HSF1 ו-HSP70 בהיפותלמוס הקדמי של פטמים בגילאים שונים, 3, 10 ו-24 יום, לאחר שעתיים (איור 15A) ולאחר עשרים וארבע שעות (איור 15B) מתחילת עקת החום. ביטוי HSF1 לא שונה בגילאים השונים מזה של אפרוחים נאיביים הן לאחר שעתיים (איור 15Ai) והן לאחר עשרים וארבע שעות (איור 15Bi), בעוד שעוצמת הביטוי של HSP70 לאחר שעתיים גבוהה באופן משמעותי בכל אחת מקבוצות הגיל על אף שבפטמים בגיל 10 ו-24 ימים הביטוי נמוך בהשוואה לאפרוחים בגיל 3 ימים (איור 15Aii). לאחר עשרים וארבע שעות לא נמצאו הבדלים בין קבוצות הגיל השונות, כלומר עוצמת ביטוי הגן גבוהה באופן משמעותי בכל אחד משלושת הגילאים.

1.5 שינוי בביטוי של חלבוני עקה ברקמת הדם ובהיפותלמוס הקדמי באפרוחים בקור

מאחר ומטרת המחקר היא להגדיר סולם מדיד לעקות שונות בוצעה עקת קור לאפרוחים ביום השלישי לאחר הבקיעה על ידי חשיפתם לטמפרטורה 16°C למשך שלוש שעות. ביום הרביעי והשישי לחיי האפרוחים, האפרוחים נחשפו לעקות קור עוקבות (אחת בכל יום) בנות שלוש שעות, בדומה לעקה ביום השלישי. ביום הרביעי וביום השישי נבחנו שתי קבוצות של אפרוחים: האחת, נחשפה לעקת קור של 16°C בפעם הראשונה באותו היום (Stress), והשנייה, נחשפה בימים הקודמים לעקות קור עוקבות (Challenge). בדומה לניסויים הקודמים, הגנים שנבחנו הם פקטורי השעתוק HSF1, HSF3 ו-c-Fos ואת חלבוני העקה HSP70 ו-HSP90. בכל קבוצה דגמנו דם והיפותלמוס מ-8 פטמים לפחות בנקודות זמן קבועות במהלך העקה. את מדידת כמות ה-mRNA של הגנים השונים בדקנו באמצעות Real-time PCR. הערכה סטטיסטית של ההבדלים בין קבוצות האפרוחים שנחשפו לעקה בכל אחד מחלונות הזמן לבין אפרוחים נאיביים (קבוצת הביקורת) נעשתה בעזרת ANOVA.

1.5.1 שינוי בביטוי חלבוני עקה בהיפותלמוס הקדמי של פטמים בגיל 3 ימים בקור

בתגובה לעקת הקור אליה נחשפו האפרוחים חלו שינויים בביטוי הגנים השונים, והתמונה שהתקבלה הפוכה מזו המתקבלת בעקת חום (איור 16). ביטוי HSF1 ו-HSF3 ירד במהלך העקה, והגיע ב-HSF1 לפי 0.51 ± 0.07 ($n=8$, $p<0.05$) לאחר שעה וחצי ופי 0.53 ± 0.06 ($n=8$, $p<0.05$) לאחר שלוש שעות (איור 16A). בנקודת זמן זו ביטוי HSP70 ירד לפי 0.49 ± 0.09 ($n=8$, $p<0.05$) (איור 16D). לעומת זאת, בביטוי HSP90 לא היה שינוי במהלך העקה (איור 16E), ואילו בביטוי HSF3 ו-c-Fos הירידה שהתקבלה לא הייתה מובהקת סטטיסטית (איור 16 B ו-C, בהתאמה).

1.5.2 שינוי בביטוי חלבוני עקה ברקמת הדם ובהיפותלמוס הקדמי של אפרוחים בגיל 4 ימים בקור

ביום הרביעי מהבקיעה נבחנו השינויים בשתי קבוצות: האחת, נחשפה לעקת קור בפעם הראשונה (Stress), בעוד שהשנייה עברה התניה לקור ביום השלישי ונחשפה לקור ביום הרביעי בפעם השנייה (Challenge). מכל קבוצה דגמנו דם והיפותלמוס קדמי בזמנים קבועים: חצי שעה, שעה וחצי ושלוש שעות מתחילת העקה. באיור 17 ניתן לראות כי לא נמצאו הבדלים בביטוי הגנים השונים בדם פטמים בגיל 4 ימים שנחשפו לעקת קור בטמפרטורה 16°C . בבדיקת ביטוי הגנים בהיפותלמוס של אפרוחים משתי הקבוצות נמצאו הבדלים בביטוי הגנים בין קבוצת העקה לבין הקבוצה שנחשפה לקור בפעם השנייה (איור 18). בביטוי HSF1, HSF3, c-Fos ו-HSP70 לא נמצא הבדל בין שתי הקבוצות, אולם, ביטוי HSP90 היה גבוה באופן משמעותי בקבוצת העקה לאחר חצי שעה ושעה וחצי מתחילת העקה בהשוואה לקבוצת ה-challenge (איור 18).

1.5.3 שינוי בביטוי חלבוני עקה בהיפותלמוס הקדמי של פטמים בגיל 6 ימים בקור

ביום השישי לחיי האפרוחים נמצא שינוי בולט במגמת הביטוי של פקטורי השעתוק בתגובה לעקת הקור המבוטא בעלייה של פקטורי השעתוק במהלך העקה המגיע לאחר שלוש שעות לפי 3.26 ± 0.76 ($p < 0.05$), בביטוי HSF3 (איור 19B) ופי 5.77 ± 2.05 ($n=8$, $p < 0.05$) בביטוי c-Fos (איור 19C). בביטוי החלבונים HSP70 ו-HSP90 לא נמצא שינוי בביטוי (איור 19 D ו-E, בהתאמה). בבחינת ביטוי הגנים באפרוחים שעברו שלוש חשיפות לקור בזו אחר זו התקבלה מגמה דומה בביטוי שלושת פקטורי השעתוק (איור 20A-C), ובנוסף התקבלה עלייה גם בביטוי HSP70 בחצי השעה הראשונה פי 2.08 ± 0.36 ($n=5$, $p < 0.05$) ולאחר שעה וחצי פי 2.92 ± 0.71 ($n=5$, $p < 0.05$), הממשיכה גם לאחר שלוש שעות (איור 20D).

1.6 ביטוי של חלבוני עקה בדם ובהיפותלמוס הקדמי בתנאי עקה משולבים

מאחר ומטרת עבודה זו היא להגדיר סולם מדיד לעקות שונות, בחנתי בשלב הבא את הביטוי של חלבוני העקה בתנאי עקה משולבים במטרה לאמוד את רגישות הסולם לעקות שונות במהלך תקופת הגידול. לשם כך, בחנתי את השינוי בביטוי הגנים בשלושה גילאים שונים: 8 ימים, 22 ימים (3 שבועות) ו-36 ימים (חמישה שבועות). בכל גיל נבחנו 3 קבוצות טיפול אשר כל אחת מנתה 7-9 אפרוחים: הראשונה, פטמים שעברו עקת חום בלבד. השנייה, פטמים שעברו עקת חום המלווה ברוח (אוורור). השלישית, פטמים שעברו אקלום לטמפרטורת העקה הקיצונית במשך 3 ימים לפני העקה. האקלום נעשה על ידי עלייה הדרגתית בטמפרטורה (מטמפרטורה מיטבית בכל גיל לטמפרטורת העקה) שנמשכה 48 שעות, שלאחריהן הושארו הפטמים בטמפרטורה הקיצונית למשך 24 שעות עד למועד החשיפה לעקה. הגילאים, טמפרטורות העקה ומהירויות הרוח מסוכמים בפרק השיטות והחומרים (טבלה 1).

1.6.1 ביטוי של חלבוני עקה בפטמים בעקת חום ובעקת חום ורוח

באיור 21 ניתן לראות את ביטוי שלושת פקטורי השעתוק ברקמת הדם של פטמים בני 8 ימים שנחשפו לעקת חום (21A) ולעקת חום המלווה ברוח (21B). באפרוחים שנחשפו לעקת החום נצפתה עלייה מובהקת בביטוי HSF1 פי 1.4 ± 0.06 לאחר חצי שעה מתחילת העקה ($n=6$, $p < 0.01$). בביטוי HSF3 התרחשה עלייה עד לחצי שעה מתחילת העקה, 1.4 ± 0.1 ($n=9$, $p \leq 0.01$). ביטוי c-Fos עולה גם כן כתוצאה מעקת החום, ומגיע לערך של פי 1.9 ± 0.3 ($n=7$, $p < 0.05$) לאחר חצי שעה ופי 1.7 ± 0.2 ($n=9$, $p < 0.05$) לאחר שעה וחצי מתחילת העקה. בחשיפה לעקת חום המלווה ברוח ניתן לראות כי העליות בביטוי שלושת פקטורי השעתוק מתמתנות באופן משמעותי ומגיעות לערכים נמוכים בהשוואה לאפרוחים שנחשפו לעקת החום בלבד (איור 21B).

שינוי קיצוני יותר בביטוי חלבוני העקה מצאתי בביטוי שלושת פקטורי השעתוק בהיפותלמוס הקדמי. באיור 22 ניתן לראות כי בעקה המלווה ברוח חל היפוך בולט ומשמעותי במגמת הביטוי של שלושת פקטורי השעתוק בהשוואה לעקת החום. בעקת החום התקבלו עליות בביטוי פקטורי השעתוק (22A). לעומת זאת, בעקה המשולבת ביטוי HSF1 מתאפיין בירידה בחצי השעה הראשונה המגיעה לאחר שעה וחצי לפי 0.4 ± 0.04 ($n=6$, $p < 0.05$), בביטוי HSF3 ישנה ירידה בחצי השעה הראשונה לפי 0.38 ± 0.12 .

($n=7$, $p<0.05$) ובביטוי c-Fos לפי 0.3 ± 0.1 ($n=7$, $p<0.05$) (22B). כלומר, בהיפותלמוס הקדמי עקת חום המשולבת עם רוח ממתנת באופן משמעותי את עליית הביטוי של פקטורי השעתוק. בדומה, גם עוצמת הביטוי של הגן HSP70 שהתקבלה בעקב המלווה ברוח הייתה נמוכה מזו שבעקת החום. באיור 23 ניתן לראות כי בעקת החום ביטוי HSP70 עלה פי 3.7 ± 1.1 ($n=7$, $p<0.05$) בחצי השעה הראשונה (איור 23A), בעוד שבעקב המשולבת בפרק זמן זה הביטוי היה נמוך יותר, 2.9 ± 0.3 ($p<0.01$), ($n=7$) (איור 23B). לאחר שעה וחצי מתחילת עקת החום ביטוי HSP70 הינו 4.0 ± 1.1 ($n=7$, $p<0.05$) (איור 23A), ובעקב המשולבת, 3.3 ± 0.2 ($n=7$, $p<0.01$) באותו פרק זמן (איור 24B). בביטוי HSP90 לא התרחשה עלייה בביטוי בשני סוגי העקות (איור 23).

ברקמת הדם פטמים בגיל 22 יום התקבלה מגמה דומה כפי שניתן לראות באיור 24. למרות שלא נצפו הבדלים משמעותיים בין שתי העקות בביטוי HSF1 ו-c-Fos, ביטוי HSP70 עלה באופן משמעותי בעקת החום פי 4.5 ± 1.3 ($n=8$, $p<0.05$) חצי שעה מתחילת העקה ופי 16.5 ± 3.6 ($n=8$, $p<0.05$) (איור 24A), בעוד שבעקב המשולבת הביטוי היה מתון באותו פרק זמן: 1.8 ± 0.3 ($n=7$, $p<0.05$) (איור 24B). לכן, ניתן לומר כי גם בגיל 22 יום הייתה התמתנות של תגובת העקה בעקב המשולבת עם הרוח בהשוואה לעקת החום בלבד.

בפטמים בגיל 36 יום התקבלה תמונה שונה מזו שהתקבלה בפטמים בגיל 8 ימים ובפטמים בגיל 22 ימים. באיור 25 ניתן לראות כי הביטוי של HSF1, HSP70 ו-c-Fos בעקב המשולבת עולה באופן מהיר יותר ולערכים גבוהים יותר מאשר עקת החום בלבד. לאחר שעה וחצי מתחילת העקה העלייה בביטוי HSF1 בעקת המשולבת היא פי 7.5 ± 2.7 ($n=7$, $p<0.05$) (איור 25B) בעוד שבעקת החום הביטוי היה נמוך יותר פי 2.3 ± 1.3 (איור 25A). ביטוי HSP70 פי 3 ± 0.4 ($n=7$, $p<0.01$) (איור 25B) בעקב המשולבת ובעקת החום הביטוי היה גם כן נמוך יותר, פי 2.1 ± 1.1 (איור 25A). גם בביטוי הגן c-Fos ניתן לראות הבדל משמעותי בין שתי העקות, 24.2 ± 12.4 לאחר שעה וחצי בעקב המשולבת (איור 25B) ו- 2.6 ± 1.1 בעקת החום (איור 25A). לאור ממצאים אלה ניתן לומר כי בגיל 36 יום מתקבל אפקט הפוך מזה של הגילאים 8 יום ו-22 יום הבא לידי ביטוי בכך שבגיל 36 יום הרוח איננה ממתנת את עקת החום אלא תורמת ומחריפה את העקה אותה חשים העופות.

1.6.2 ביטוי חלבוני עקה בפטמים שעברו אקלום לחום

בנוסף, בחנתי את ביטוי חלבוני העקה בכל אחד משלושת הגילאים בקבוצת הפרטים המאוקלמים בהשוואה לעופות נאיביים בני אותו גיל. באיור 26 ניתן לראות את ביטוי חלבוני העקה בדם של אפרוחים בני 8 ימים שעברו אקלום בהשוואה לאפרוחים נאיביים בני אותו גיל. ניתן לראות כי לא התקבלו הבדלים משמעותיים בביטוי HSF1, HSF3, HSP70 ו-HSP90 בין אפרוחים מאוקלמים לבין אפרוחים נאיביים למעט הגן c-Fos שביטויו עלה באופן משמעותי באפרוחים מאוקלמים פי 2 ± 0.3 ($n=7$, $p<0.01$) בהשוואה לנאיביים (איור 26C).

בהיפותלמוס הקדמי של אפרוחים אלה נמצאה תמונה דומה, לא התקבלו הבדלים משמעותיים בביטוי חמשת הגנים בין אפרוחים מאוקלמים לבין אפרוחים נאיביים (איור 27).

ביום 22 נמצאו הבדלים משמעותיים ברקמת הדם של פטמים מאוקלמים לעופות נאיביים. באיור 28 ניתן לראות כי ביטוי HSF1 גבוה בעופות מאוקלמים פי 1.7 ± 0.2 ($n=9$, $p<0.05$) בהשוואה לנאיביים (איור 28A), וביטוי HSP70 הינו 12.3 ± 3.1 ($n=9$, $p<0.01$) (איור 28C) בהשוואה לעופות נאיביים בני אותו גיל. בביטוי c-Fos לא נמצא הבדל בין שתי הקבוצות. בחינה של ביטוי HSF1 ו-HSP70 בהיפותלמוס הקדמי מראה תמונה דומה, עלייה בביטוי HSF1 פי 2 ± 0.3 ($n=9$, $p<0.05$) (איור 29A) ועלייה בביטוי HSP70 פי 1.9 ± 0.4 (איור 29B) בקבוצת הפטמים שעברו אקלוס לחום בהשוואה לפטמים נאיביים בני אותו הגיל. ברקמת הדם של פטמים בני 36 יום נמצאה תמונה דומה לזו המתקבלת ביום 22 (איור 30). ביטוי HSF1 בעופות שעברו אקלוס היה 2.7 ± 0.6 ($n=7$, $p<0.05$) (איור 30A) וביטוי HSP70 33.8 ± 15 ($n=7$, $p<0.05$) (איור 30C). גם בביטוי c-Fos התקבלה עלייה משמעותית בעופות המאוקלמים, 9.1 ± 4 (איור 30B).

1.7 שינוי בביטוי mRNA של ההורמונים CRH, AVT, ו-TRH בהיפותלמוס הקדמי

דרך נוספת לזיהוי ואפיון של עקות הינה בחינה של רמת הביטוי של ה-mRNA של ההורמונים המבקרים בהיפותלמוס הקדמי. בעבודה זו התרכזתי בשלושה הורמונים המפעילים שלושה תהליכים שקשורים בשינויים הפיזיולוגיים החלים על בעל החיים במהלך עקה תרמית. הראשון, הוא Corticosterone (CRH) Releasing Hormone, המפעיל ציר סיגנל מהיפותלמוס הקדמי לאדרנל לשחרור קורטיקוסטרון, הורמון סטרואידי המשמש כהורמון עקה. השני, Arginine Vasotocin (AVT) המשתתף בשמירת ההומיאוסטאזיס של הנוזלים בגוף, ומופרש יחד עם CRH מה-PVN. השלישי, Thyrotropin Releasing Hormone (TRH), המבקר את הפרשתם של הורמוני התירואיד, T_4 ו- T_3 , הנוצר על ידי הסרה של אטום יוד אחד בכבד ובכליה, וממלא תפקיד בבקרה על הסטטוס המטבולי של בעל החיים הודות להשפעתו התרמוגנית הבאה לידי ביטוי בעלייה של ייצור חום.

1.7.1 ביטוי mRNA של ההורמונים CRH, AVT, ו-TRH בהיפותלמוס הקדמי בעקת חום

בבחינת הביטוי של mRNA של CRH נמצאה עלייה משמעותית ומובהקת לאחר שעתיים פי 3 ± 0.6 ($n=4$, $p<0.05$) אשר נמשכת גם לאחר שש שעות ומגיעה לפי 4.6 ± 0.7 ($n=4$, $p<0.05$) בתגובה לעקת חום באפרוחים בני 3 ימים (איור 31A). בבדיקה של הרמה הבסיסית של mRNA של CRH ביום השלישי לאחר הבקיעה וביום העשירי מראה כי באפרוחים נאיביים בני 10 ימים רמה בסיסית גבוהה מזו הקיימת באפרוחים נאיביים בני 3 ימים ($p<0.05$) (איור 31B).

בבדיקת הביטוי של AVT ו-TRH בהיפותלמוס הקדמי של אפרוחים בני 3 ימים שנחשפו לעקת חום של 38.5°C בהשוואה לאפרוחים נאיביים לא נמצאו הבדלים משמעותיים (איור 32A). גם ביום העשירי לאחר הבקיעה לא נמצא הבדל מובהק בהשוואה לאפרוחים נאיביים. אולם, באפרוחים בני 10 ימים ניתן לראות הבדלים בביטוי שני ההורמונים בין שתי קבוצות: האחת - אפרוחים שנחשפו לעקת חום בפעם הראשונה בגיל 10 ימים (Stress), השנייה - אפרוחים שנחשפו בפעם הראשונה לעקת חום ביום השלישי לחייהם וביום העשירי עברו חשיפה נוספת (Challenge). נמצא כי ביטוי TRH גבוה בקבוצה שעברה

חשיפה חוזרת מזה שבקבוצת העקה ואף מובהק לאחר שש שעות. ביטוי AVT לעומת זאת גבוה יותר בקבוצה שנחשפה לעקה ומובהק לאחר שעתיים בהשוואה לקבוצה שעברה חשיפה חוזרת לחום(איור 32B).

ברמה הבסיסית של TRH לא נמצאו הבדלים בין אפרוחים בני 3 ימים ובין אפרוחים בני 10 ימים. בשונה, נמצאו הבדלים משמעותיים ברמה הבסיסית של AVT כך שרמתו גבוהה באפרוחים נאיביים בני 10 ימים בהשוואה לאפרוחים נאיביים בני 3 ימים ($p < 0.01$), ובאפרוחים בני 10 ימים שעברו חשיפה חוזרת לחום בהשוואה לאפרוחים נאיביים בני 10 ימים ($p < 0.05$) (איור 32C).

1.7.2 ביטוי mRNA של CRH, AVT ו-TRH בהיפותלמוס הקדמי בעקת קור

חשיפה של אפרוחים בני 3 ימים לעקת קור של 16°C גרמה לעלייה בהיפותלמוס הקדמי בביטוי mRNA של TRH (איור 33A) ו-CRH (איור 33C) לאחר חצי שעה מתחילת העקה אך ללא מובהקות סטטיסטית. כמו כן, גם בביטוי AVT (איור 33B) לא נמצאו שינויים משמעותיים בחשיפה לעקת קור של אפרוחים בגיל 3 ימים.

באפרוחים בני 4 ימים נצפו הבדלים בביטוי שלושת ההורמונים (איור 34). ביטוי TRH עולה באפרוחים שעברו עקה, לאחר חצי שעה פי 1.4 ± 0.2 , ומגיע לאחר שלוש שעות לפי 1.7 ± 0.1 ($n=8$, $p < 0.05$). באפרוחים לאחר חשיפה שנייה לקור ביטוי TRH נשאר נמוך במהלך העקה (איור 34A). גם ביטוי AVT עלה לאחר חצי שעה בקבוצת העקה לפי 1.3 ± 0.2 ונשאר קבוע, בעוד שבאפרוחים בחשיפה השנייה הגיע הביטוי לאחר חצי לפי 1.9 ± 0.1 ($n=8$, $p < 0.01$) (איור 34B). ביטוי CRH לעומת זאת לא השתנה ולא נמצא הבדל בביטוי בין שתי הקבוצות (איור 34C).

באפרוחים בני 6 ימים ביטוי mRNA של TRH לא השתנה במהלך עקת הקור באופן משמעותי בכל אחת מהקבוצות. אולם, לאחר 3 שעות נמצא הבדל מובהק בביטוי ההורמון בין אפרוחים שעברו עקה שבהם הביטוי הגיע לפי 1.3 ± 0.1 ובין אפרוחים שעברו חשיפה חוזרת לקור שבהם הביטוי נשאר נמוך, 0.8 ± 0.07 (איור 35A). בביטוי AVT לעומת זאת נצפו הבדלים משמעותיים בין הקבוצות במגמה הפוכה. הביטוי היה גבוה בקבוצת האפרוחים לאחר חשיפה חוזרת ונמוך בקבוצת העקה, כאשר הבדלים מובהקים בין שתי הקבוצות התקבלו לאחר חצי שעה ולאחר שעה וחצי מתחילת העקה (איור 35B). בביטוי CRH לא נצפו שינויים לאורך זמן בקבוצת העקה, למעט באפרוחים לאחר חשיפה חוזרת אשר הראו ירידה משמעותית לאחר שעה וחצי מתחילת העקה, פי 0.3 ± 0.06 ($n=5$, $p < 0.05$) (איור 35C).

1.7.3 ביטוי mRNA של ההורמון AVT בתנאי עקה משולבים

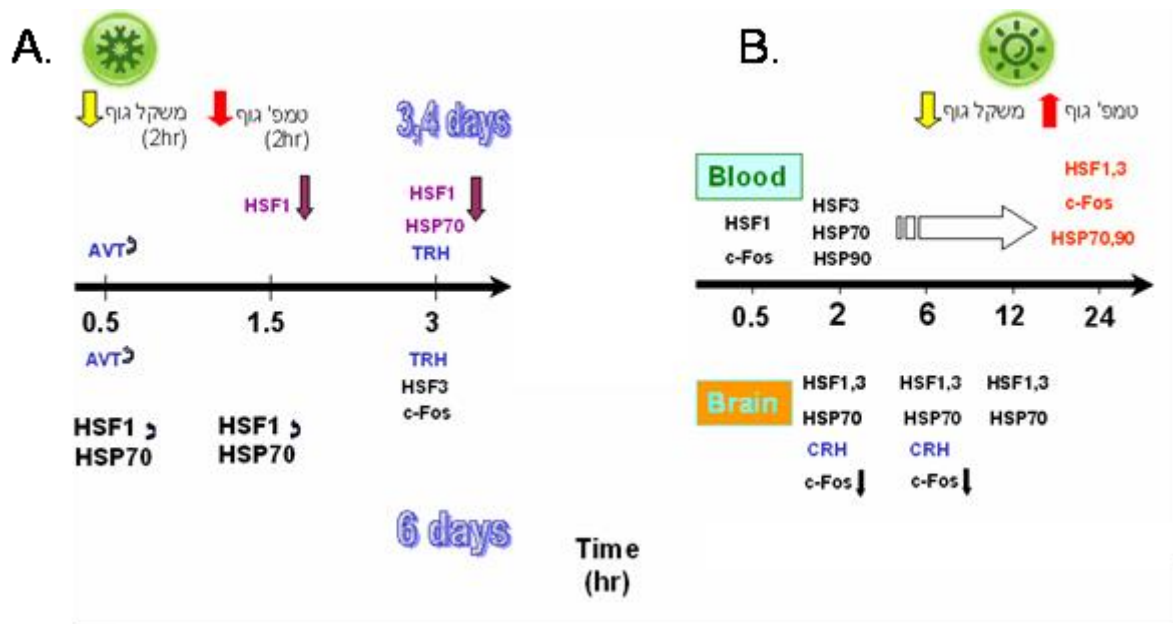
בעקת חום בעקת חום המלווה ברוח מצאנו שינוי בביטוי mRNA של AVT בהיפותלמוס הקדמי של פטמים בני 8 ימים. באיור 36 ניתן לראות כי בעקה המשולבת ביטוי הגן עולה באופן משמעותי חצי שעה מתחילת העקה פי 1.7 ± 0.3 , וממשיך לעלות גם לאחר שעה וחצי לפי 2 ± 0.3 (איור 36B). בפרק זמן זה ביטוי ההורמון גבוה באופן משמעותי בקבוצת העקה המשולבת בהשוואה לקבוצת עקת החום בלבד

($p < 0.05$). בעקת החום הביטוי עולה מעט לאחר חצי שעה אולם לאחר שעה וחצי הביטוי חוזר לרמתו הבסיסית (איור 36A). באפרוחים בני 8 ימים שעברו אקלום לחום לא התקבל הבדל משמעותי בביטוי AVT בהשוואה לאפרוחים נאיביים (איור 36C).

סיכום

סולם מדיד להגדרת עקות אקלימיות בפטמים

ניתן לומר כי במהלך החשיפה לעקות האקלימיות שבחנתי בעבודה זו מתרחשים שינויים במדדים פיזיולוגיים וביוכימיים אשר באמצעותם ניתן להגדיר סולם לקביעת מידת העקה האקלימית בפטמים המבוסס על תיאור ההשתנות של מדדים אלה (איור 37). בחשיפה לעקת חום של אפרוחים בגיל 3 ימים התקבלה כבר לאחר 30 דקות עלייה בטמפרטורת הגוף בכ-1.2 מעלות צלזיוס שנשמרה במשך כל החשיפה, כמו כן עקת החום גרמה לעיכוב העלייה במשקל הגוף שנמשך ב-12 השעות הראשונות מתחילת העקה. כפי שניתן לראות באיור 37, המתאר באופן גרפי את התוצאות, ברקמת הדם, התקבלו שינויים מהירים ומשמעותיים בביטוי HSF1 ו-c-Fos, כבר לאחר חצי שעה מתחילת העקה, ולאחר שעותיים בביטוי HSF3, HSP70 ו-HSP90. לאחר 24 שעות ביטוי שלושת פקטורי השעתוק עולה לערכים גבוהים, וניתן לייחסו לקיומה של עקה ממושכת וכרונית. בדומה, גם בהיפותלמוס הקדמי התגובה לעקת החום מהירה ומתקבלת עלייה בביטוי HSP70 כבר לאחר חצי שעה המגיעה לערך המקסימאלי לאחר שעותיים. בחלון זמן זה ביטוי CRH עולה גם כן ומגיע לערך המקסימאלי לאחר שש שעות. בגיל 8 ו-10 ימים תיאור השתנות ביטוי הגנים הן בדם והן בהיפותלמוס דומה לזה המתקבל בגיל 3 ימים. ברקמת הדם ביטוי HSF1 ו-c-Fos מקדים את ביטוי HSF3 ומתקבלים ערכי ביטוי גבוהים של כל הגנים שנבדקו לאחר 24 שעות. במוח חלון הזמן המשמעותי הוא לאחר שעותיים עד שש שעות מתחילת העקה המתאפיין בעלויות בביטוי HSF1, HSF3, HSP70 ו-CRH וירידה בביטוי c-Fos. כמו כן, השינוי בביטוי HSF1, HSF3 ו-HSF1 ו-HSP70 (ברמת ה-mRNA וברמת החלבון) בהיפותלמוס הקדמי נמצא ביחס ישר לטמפרטורת החשיפה. בעקת קור התקבלה ירידה משמעותית בטמפרטורת הגוף של אפרוחים בגיל 10 ימים החל משעותיים לאחר העקה ותוספת משקל הגוף בפרק זמן זה היא הנמוכה ביותר שהתקבלה. אולם, התגובה הביוכימית לקור בהיפותלמוס הקדמי משתנה בתלות בגיל הפטם ומאופיינת במעבר מירידה בביטוי חלבוני ה-HSPs בגיל 3 ימים לעלייה משמעותית בגיל 6 ימים ולאחר חשיפה חוזרת לקור. לעומת זאת, השינויים בביטוי TRH ו-AVT אינם תלויי גיל ודפוסי הביטוי שהתקבלו דומים הן באפרוחים בגיל 4 ימים והן באפרוחים בגיל 6 ימים. בנוסף מצאתי כי דפוס הביטוי של TRH ו-AVT הופכי בעקת חום בהשוואה לזה המתקבל בעקת קור. ממצא זה תאם את ציפיותי שביטוי TRH גבוה בחשיפה לעקת קור, בהשוואה לחשיפה חוזרת לקור, ונמוך בחשיפה לחום, בהשוואה לחשיפה חוזרת לחום, בעוד שדפוס הביטוי של AVT הפוך בכל אחת מהעקות. לסיכום, תיאור השינוי של הגנים אותם בחנתי על פי רצף הזמן הוא לפי הסדר הבא: הגנים המהירים ביותר הינם HSF1 ו-c-Fos, כאשר עוצמת הביטוי של c-Fos גבוהה מזו של HSF1. גם ביטוי הגן HSP70 משתנה באופן מהיר אולם מגיע לערכים גבוהים מאוחר יותר במקביל לעלייה בביטוי של HSF3.



איור 37. תיאור גרפי של ביטוי חלבוני העקה ברקמת הדם ובמוח במהלך חשיפה לעקת קור (A) ולעקת חום (B) בפטמים. חץ יורד מתאר ירידה בביטוי הגן. חץ עגול כלפי מעלה מתאר את ביטוי הגן לאחר חשיפה חוזרת לעקה.

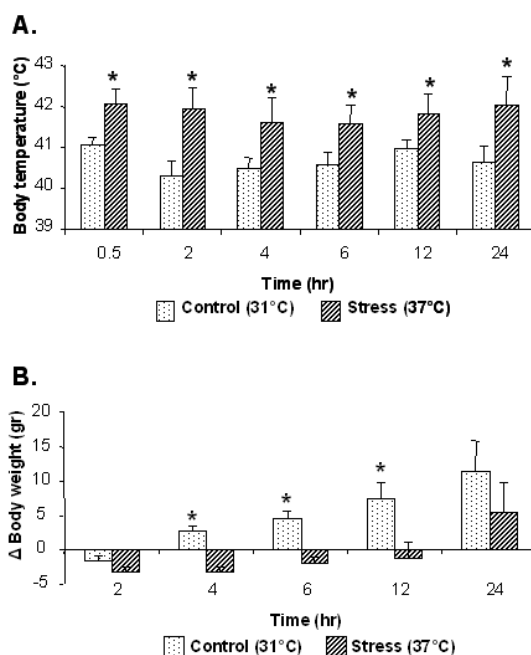
סיכום עם שאלות מנחות

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב 3 עד 4 שורות מכסימום לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

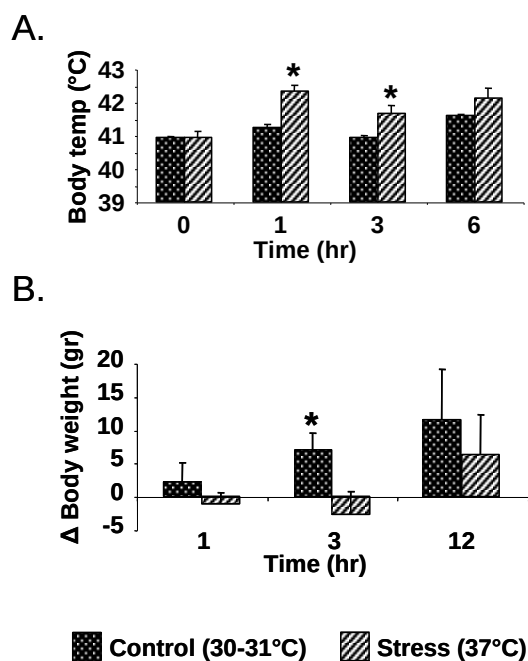
שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

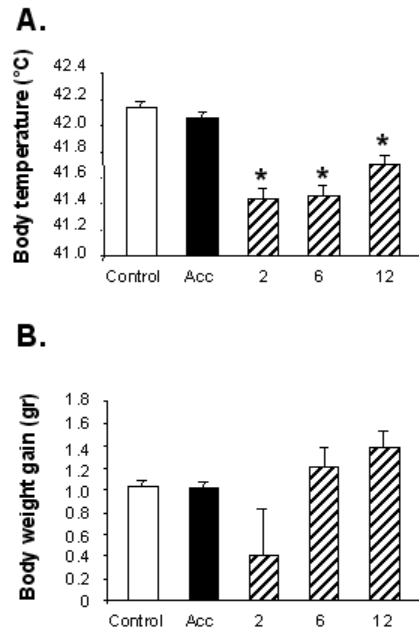
1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
רת המחקר זה הייתה לפתח סולם מדיד להגדרת עקות אקלימיות בפטמים תוך התרכזות במדידת ריכוזי חלבוני עקה בדם ובמוח.
2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.
הניסויים העיקריים היו חשיפת פטמים לעקות חום וקור אקוטיות וכרוניות ולעקות משולבות של חום ורוח ומדידת ריכוזי חלבוני עקה בדם ובמוח בגילאים שונים של פטמים. מהמחקר ניתן לראות שאכן חלבוני העקה משתנים בצורה דיפרנציאלית כתוצאה מהעקות השונות. בנוסף משתנים גם ההורמונים המשחררים בהיפותלמוס ומדדים פיזיולוגיים כגון משקל גוף וטמפרטורת גוף.
3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח.
המחקר התקדם היטב ולפי התוכנית. מהממצאים במחקר זה ניתן להתחיל ולסרטט סולם שמגדיר את מידת העקה ומתי התרחשה העקה.
4. הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר.
המחקר התרכז בעקות אקלימיות ולגביהן הוסגו כל המטרות המחקר – יש להמשיך את המחקר ולהוסיף עקות נוספות ולראות האם גם בעקות אילו סולם העקות יגדיר את העקות בצורה נכונה.
5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - <u>יש לפרט</u> : פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.
המאמרים שהם תוצאה של מחקר זה נמצאים עכשיו בשלבי כתיבה ואני צופה בין שנים לשלושה מאמרים שיסכמו את העבודה (ראו פרק התוצאות)
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות ◀
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) ◀
✓ חסוי – לא לפרסם - מאחר והתוצאות עדיין לא פורסמו אבקש לדחות את פרסום הדו"ח בכמה חודשים עד שנסיים את הפרסום המדעי המסודר ◀



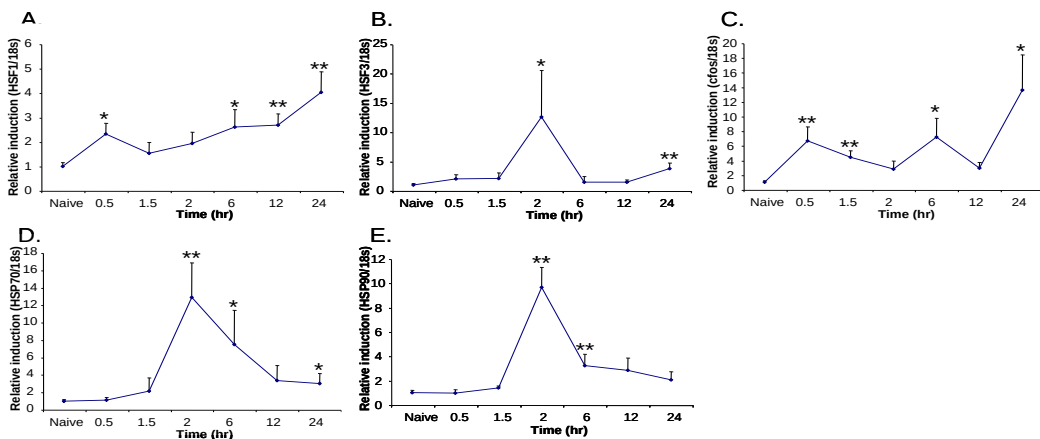
איור 1. השפעת עקת חום על טמפרטורת הגוף ועל שינוי במשקל הגוף של אפרוחים בגיל 3 ימים. A. טמפרטורת גוף (°C). B. שינוי במשקל גוף (gr). אפרוחי הביקורת גודלו בטמפרטורה מיטבית של 31°C. בכל קבוצה N=8. * - הבדל מובהק בין קבוצת העקה לקבוצת הביקורת בנקודת זמן. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M.



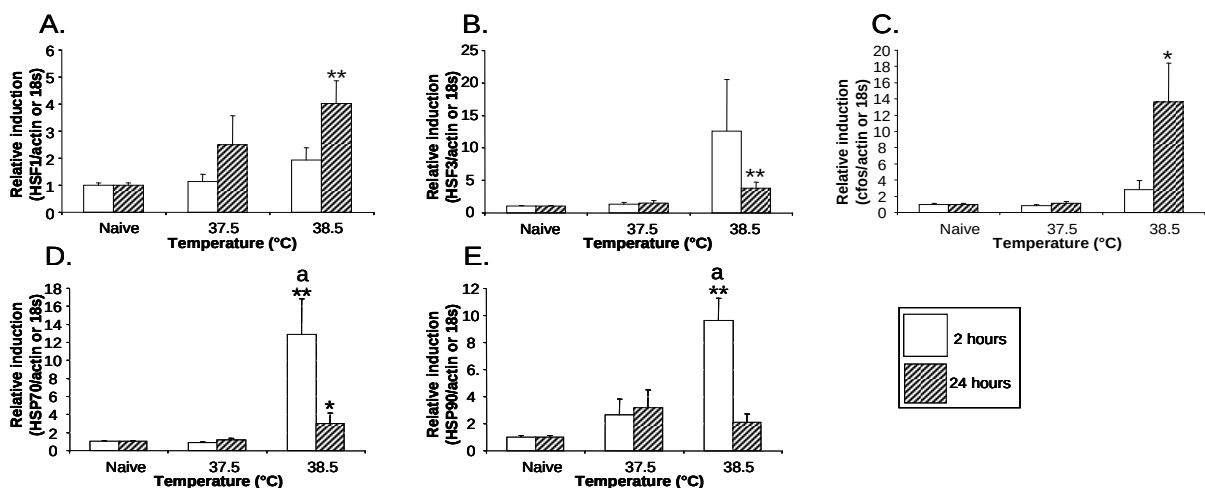
איור 2. השפעת עקת חום על טמפרטורת הגוף ועל שינוי במשקל הגוף של אפרוחים בגיל 10 ימים. A. טמפרטורת גוף (°C). B. שינוי במשקל גוף (gr). אפרוחי הביקורת גודלו בטמפרטורה מיטבית של 30°C. בכל קבוצה N=8. * - הבדל מובהק בין קבוצת העקה לקבוצת הביקורת בנקודת זמן. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M.



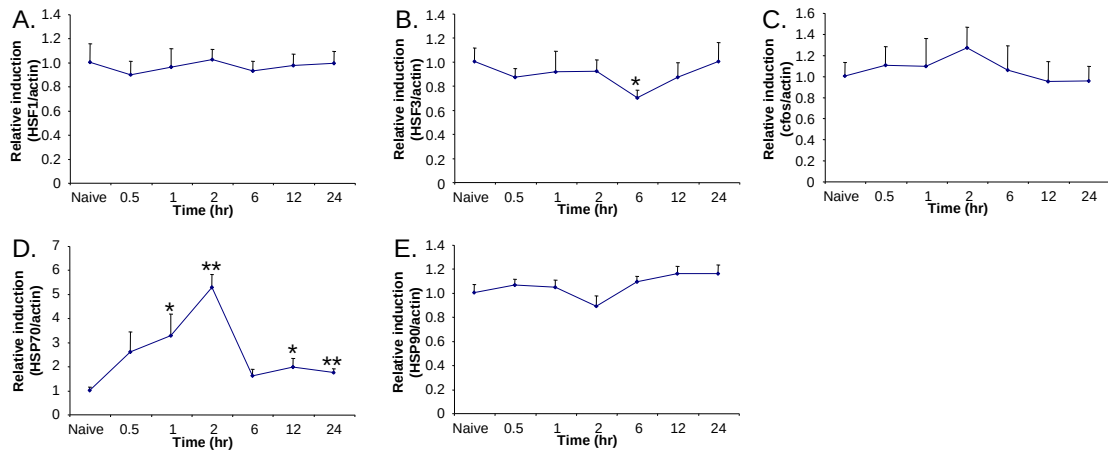
איור 3. השפעת עקת קור על טמפרטורת הגוף ועל משקל הגוף של אפרוחים בגיל 10 ימים. A. טמפרטורת גוף (°C). B. תוספת במשקל גוף (gr). אפרוחי הביקורת גודלו בטמפרטורה מיטבית של 30°C. בכל קבוצה N=8. * - הבדל מובהק בין קבוצת העקה לקבוצת הביקורת בנקודת זמן. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M.



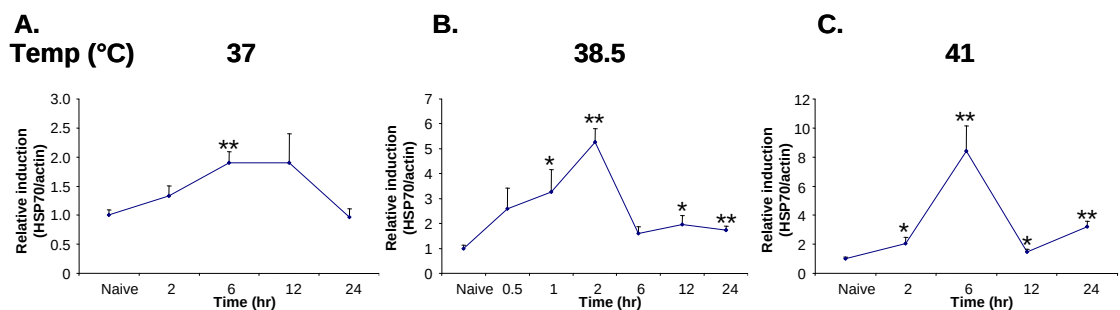
איור 4. ביטוי mRNA של חלבוני עקה ברקמת הדם באפרוחים בני 3 ימים בתנאי חום של 38.5°C. נבחנו 15 μ ל דם מכל אחד מהפטמים: הופק RNA מכל דגימת דם, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 3 ימים בטמפרטורה 38.5°C בהשוואה לביטוי הגן 18s באותם אפרוחים. N=9 בכל אחת משתי חזרות הניסוי. התוצאות ב-A הם של HSF1. B. HSF3. C. c-Fos. D. HSP70. E. HSP90. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.



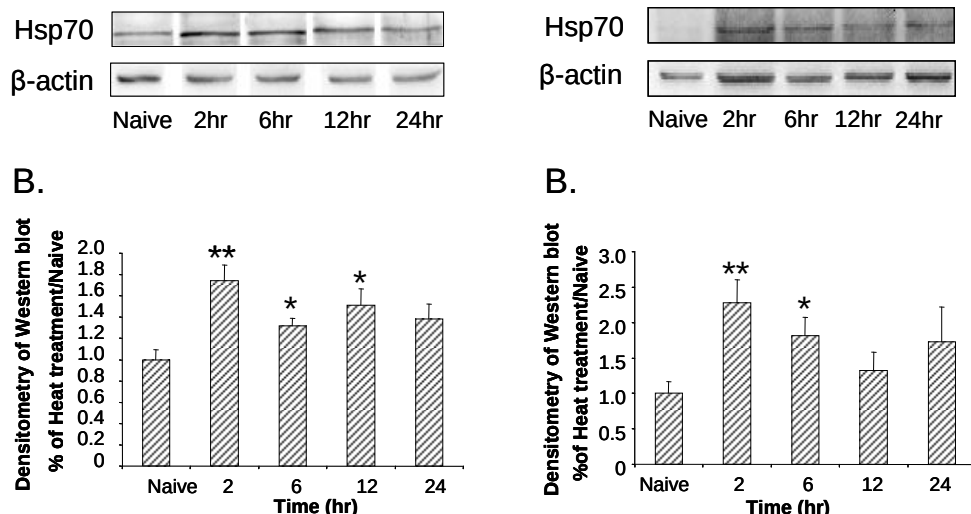
איור 5. ביטוי mRNA של חלבוני עקה ברקמת הדם ביום 3 בתנאי עקת חום שונים שתיים ועשרים וארבע שעות לאחר תחילת העקה. נבחנו 15 μ ל דם מכל אחד מהפטמים: הופק RNA מכל דגימת דם, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 3 ימים בטמפרטורה 37.5°C ובטמפרטורה 38.5°C שתיים ועשרים וארבע שעות לאחר תחילת עקת החום בהשוואה לביטוי הגן actin/18s באותם אפרוחים. N=9. התוצאות ב-A הם של HSF1. B. HSF3. C. c-Fos. D. HSP70. E. HSP90. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. a - הבדל מובהק בין שתיים לבין עשרים וארבע שעות בחשיפה לאותה טמפרטורה.



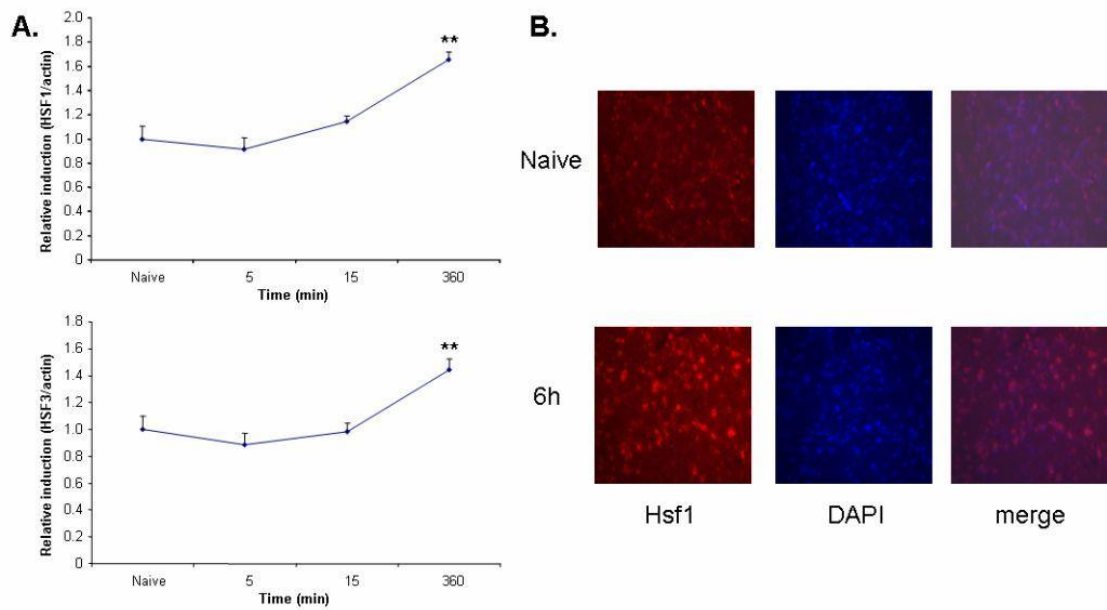
איור 6. ביטוי mRNA של חלבוני עקה בהיפותרמיה הקדמי של אפרוחים בני 3 ימים בתנאי חום של 38.5°C. מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 3 ימים בטמפרטורה 38.5°C בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=8 בכל אחת משתי חזרות הניסוי. התוצאות ב-A הם של HSF1. B. HSF3. C. c-Fos. D. HSP70. E. HSP90. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.



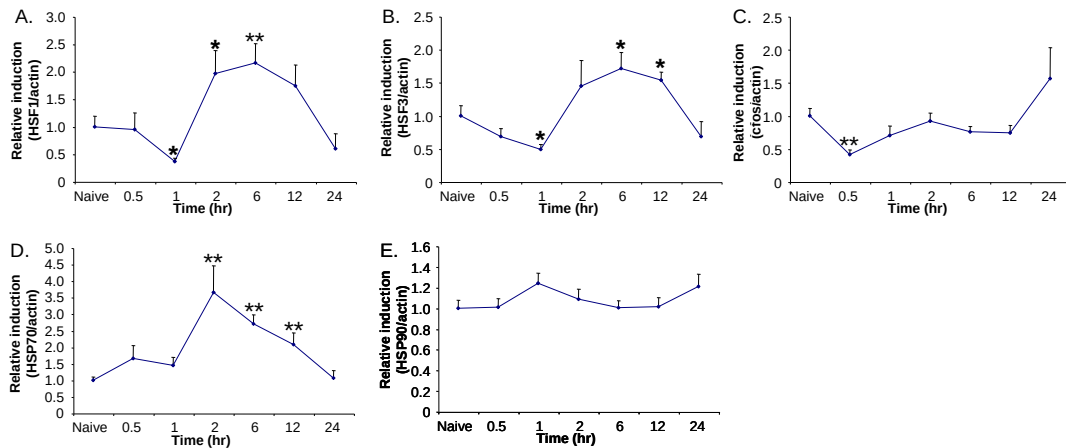
איור 7. ביטוי החלבון Hsp70 בהיפותרמיה הקדמי של אפרוחים בני 3 ימים בתנאי חום של 38.5°C ושל 41°C. A. גיל Western מייצג את ביטוי החלבון בכל נקודת זמן כתוצאה מעקת חום של 38.5°C (שמאל) ו-41°C (ימין). כל דוגמא מכילה חלבון מאפרוח בודד. B. דנסיטומטריה של תוצאות ה-Western blot נמדדה בעזרת התוכנה ImageJ 1.30. כל נקודת זמן מייצגת את היחס בין כמות החלבון Hsp70 באותה נקודה לבין הכמות שנמדדה לפני החימום. על מנת למזער הבדלים הנובעים מהטענה לזיהוי חלבון Hsp70 באותה נקודה. C. גיל Western מייצג את כמות החלבון β -actin באותה נקודה. כל נקודת זמן מייצגת את הממוצע של 8 אפרוחים $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.



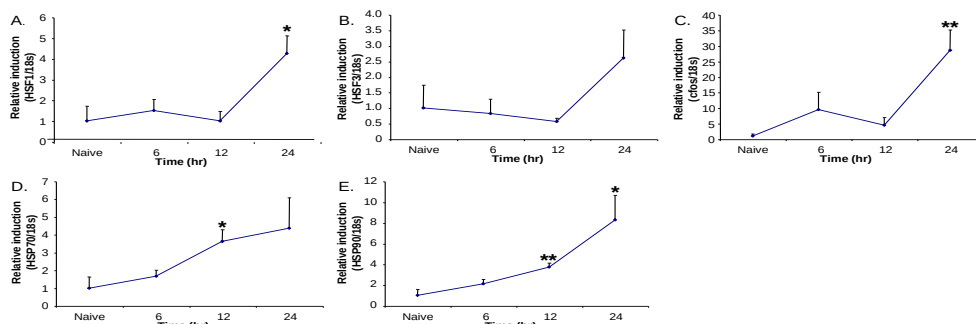
איור 7. תלות בין ביטוי mRNA של Hsp70 בהיפותרמיה הקדמי לבין טמפרטורת העקה. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 3 ימים בטמפרטורות 37°C (A), 38.5°C (B) ו-41°C (C) בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=8. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.



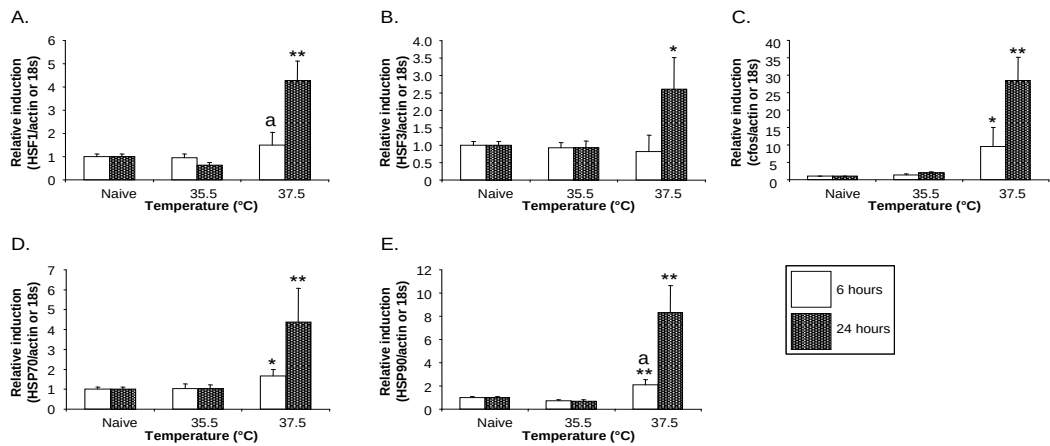
איור 9. ביטוי mRNA וחלבון של Hsf1 ו-Hsf3 בהיפותרמיה הקדמי של אפרוחים בני 3 ימים בחום של 41°C. A. מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 3 ימים בטמפרטורה 41°C בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=8. A. HSF1. B. HSF3. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. ** $p \leq 0.01$. B. ההיפותרמיה הקדמי נצבע בחתכי מוח גיטליים בצביעה אימונופלווארסנטית לפני ובמהלך התנית החום. בתמונות השמאליות מוצגת צביעה עם נוגדן ספציפי ל-Hsf1 ונוגדן anti-rabbit IgG מצומד ל-Cy3. בתמונות הימניות מוצגים אותם שדות בצביעת גרעינים (DAPI). התמונות הימניות מוצגים אותם שדות באיחוי של שתי הצביעות. התמונות צולמו בהגדלה X100. ההיפותרמיה הקדמי זוהה ע"י האטלס (Kuenzel and Masson 1988), L=0.5 mm.



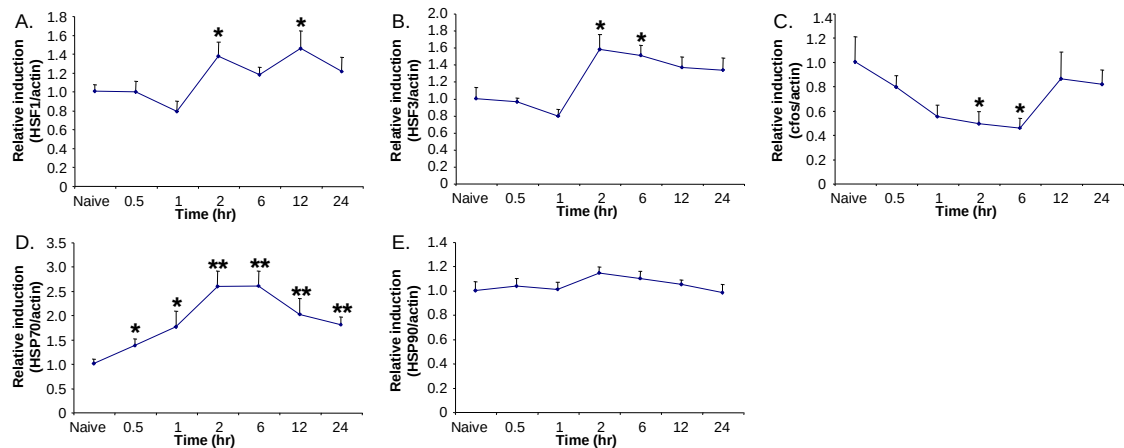
איור 10. ביטוי mRNA של חלבון עקה בארכיסטריאטום של אפרוחים בני 3 ימים בתנאי חום. מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 3 ימים בטמפרטורה 38.5°C בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=8. A. Hsf1. B. Hsf3. C. c-Fos. D. Hsp90. E. Hsp70. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.



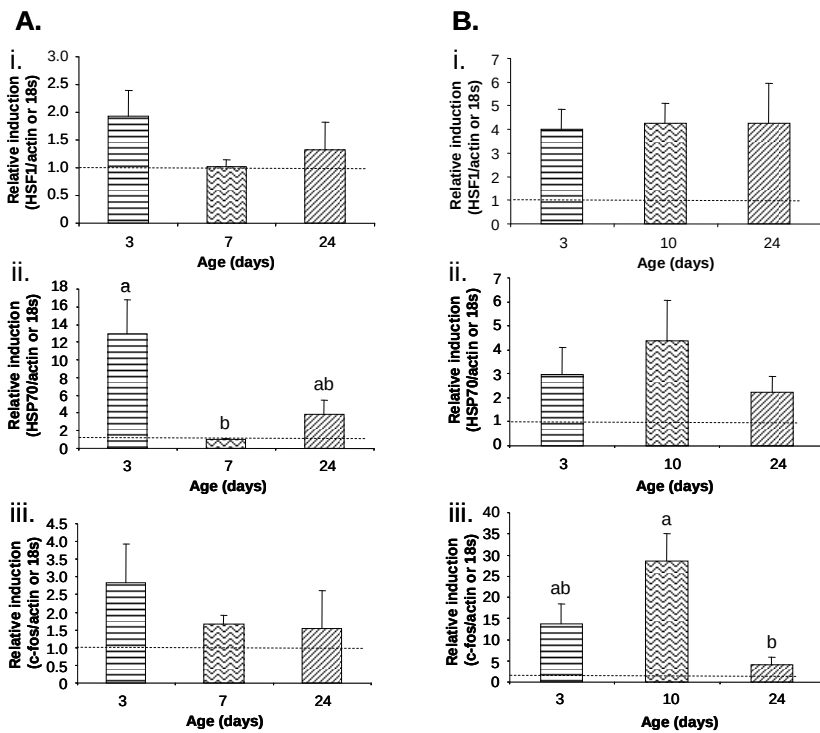
איור 11. ביטוי mRNA של חלבון עקה ברקמת הדם אפרוחים בני 10 ימים בתנאי חום של 37.5°C. נבחנו 15 דם מכל אחד מהפטמים: הופק RNA מכל דגימת דם, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 10 ימים בטמפרטורה 37.5°C בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=5. A. Hsf1. B. Hsf3. C. c-Fos. D. Hsp90. E. Hsp70. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.



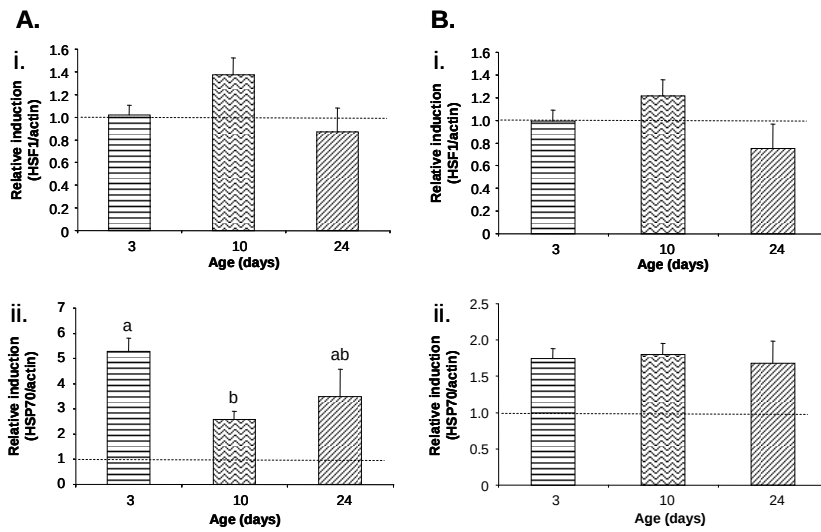
איור 12. ביטוי mRNA של חלבוני עקה ברקמת הדם ביום 10 בתנאי חום שונים שש ועשרים וארבע שעות לאחר תחילת העקה. נבחנו ל־15 דם מכל אחד מהפטמים: הופק RNA מכל דגימת דם, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב- Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 10 ימים בטמפרטורה 35.5°C ובטמפרטורה 37.5°C שש שעות לאחר תחילת עקת החום בהשוואה לביטוי הגן β -actin/18s באותם אפרוחים. התוצאות ב-A הם של HSF1. B. HSF3. C. c-Fos. D. HSP70. E. HSP90. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. - ***/ - * - הבדל מובהק בין אפרוחים שנחשפו לטמפרטורות שונות בזמן נתון: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ - a - הבדל מובהק בין שש לבין עשרים וארבע שעות בחשיפה לאותה טמפרטורה.



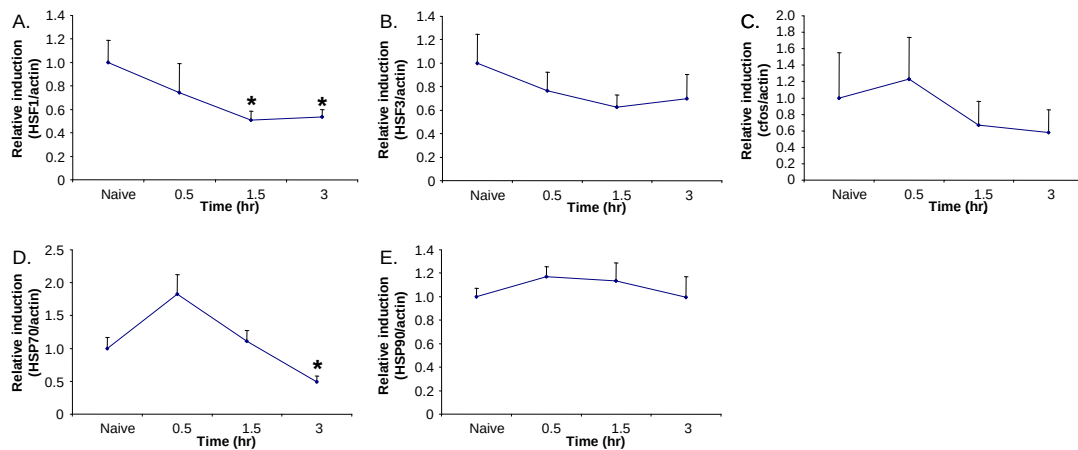
איור 13. ביטוי mRNA של חלבוני עקה בהיפותלמוס הקדמי של אפרוחים בני 10 ימים בחום. מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב- Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 10 ימים בטמפרטורה 37.5°C בהשוואה לביטוי הגן β -actin/18s באותם אפרוחים. N=8. התוצאות ב-A הם של HSF1. B. HSF3. C. c-fos. D. HSP70. E. HSP90. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.



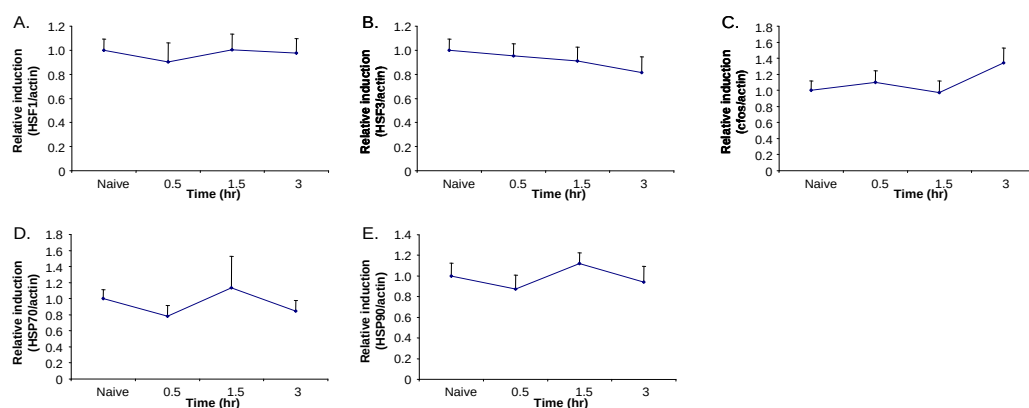
איור 14. ביטוי mRNA של HSF1, HSF3, c-Fos, HSP70 ו-HSP90 ברקמת הדם במהלך תקופת הגידול בתנאי חום. מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב- Real-time PCR. (i) HSF1 של הגנים HSF1, (ii) HSP70 ו-c-Fos (iii) באפרוחים בני 3, 7, 10 ו-24 ימים לאחר שתיים מתחילת עקת החום, בהשוואה לביטוי הגן β -actin/18s באותם אפרוחים. B. כמות הביטוי של הגנים HSF1 (i), HSP70 (ii) ו-c-Fos (iii) באפרוחים בני 3, 10 ו-24 ימים עשרים וארבע שעות מתחילת עקת החום, בהשוואה לביטוי הגן β -actin/18s באותם אפרוחים. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. אותיות שונות מסמנות הבדל מובהק בין הגילאים.



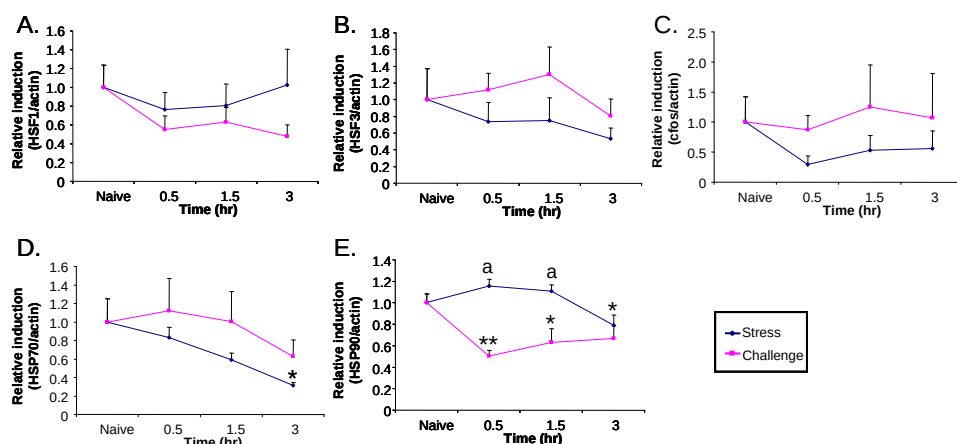
איור 15. ביטוי mRNA של HSF1 ו-HSP70 בהיפותלמוס הקדמי במהלך תקופת הגידול בתנאי חום. מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. A. כמות הביטוי של הגנים HSF1 (i) ו-HSP70 (ii) באפרוחים בני 3, 10 ו-24 ימים לאחר שעתיים מתחילת עקת החום, בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. B. כמות הביטוי של הגנים HSF1 (i) ו-HSP70 (ii) באפרוחים בני 3, 10 ו-24 ימים עשרים וארבע שעות מתחילת עקת החום, בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. אותיות שונות מסמנות הבדל מובהק בין הגילאים.



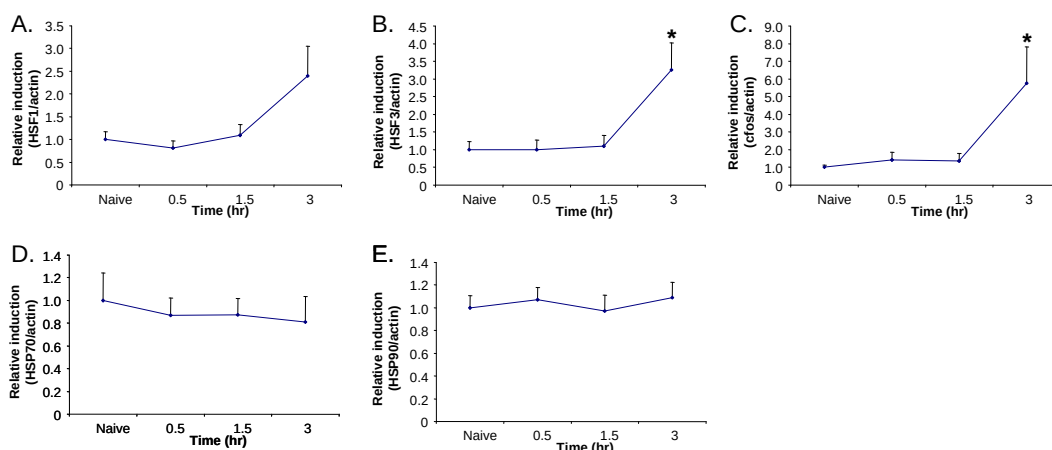
איור 16. ביטוי חלבוני עקה בהיפותלמוס הקדמי של אפרוחים בני 3 ימים בתנאי קור. מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 3 ימים בטמפרטורה 16°C בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=8. התוצאות ב-A הם של HSF1. B. HSF3. C. c-Fos. D. HSP70. E. HSP90. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$.



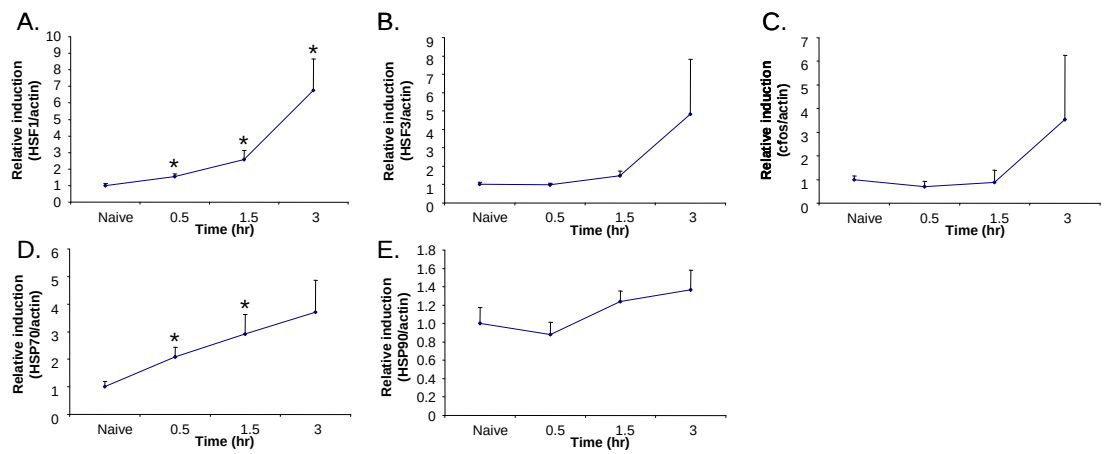
איור 17. ביטוי חלבוני עקה ברקמת דם אפרוחים בני 4 ימים בתנאי קור. נבחנו $15\mu\text{g}$ דם מכל אחד מהאפרוחים: הופק RNA מכל דגימת דם, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 4 ימים בטמפרטורה 16°C בהשוואה לביטוי הגן $\beta\text{-actin}$ באותם אפרוחים. $N=8$. התוצאות ב-A הם של HSF1. B. HSF3. C. HSP90. D. HSP70. E. Fos. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M.



איור 18. ביטוי חלבוני עקה בהיפותלמוס הקדמי של אפרוחים בני 4 ימים בתנאי קור ולאחר חשיפה חוזרת לקור. מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 4 ימים בטמפרטורה 16°C בהשוואה לביטוי הגן $\beta\text{-actin}$ באותם אפרוחים. $N=8$. התוצאות ב-A הם של HSF1. B. HSF3. C. HSP90. D. HSP70. E. Fos. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. - **/* - הבדל מובהק בין אפרוחים באותה קבוצת טיפול לבין אפרוחים נאיבים: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ - הבדל מובהק בין אפרוחים בעקת קור לבין אפרוחים בחשיפה חוזרת לקור באותו פרק זמן.

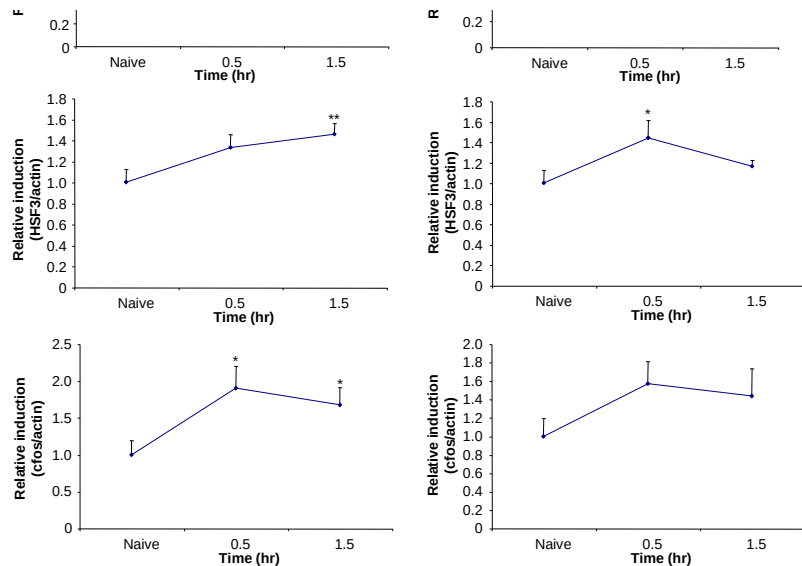


איור 19. ביטוי חלבוני עקה בהיפותלמוס הקדמי של אפרוחים בני 6 ימים בתנאי קור. מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 6 ימים בטמפרטורה 16°C בהשוואה לביטוי הגן $\beta\text{-actin}$ באותם אפרוחים. $N=8$. התוצאות ב-A הם של HSF1. B. HSF3. C. HSP90. D. HSP70. E. Fos. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$.

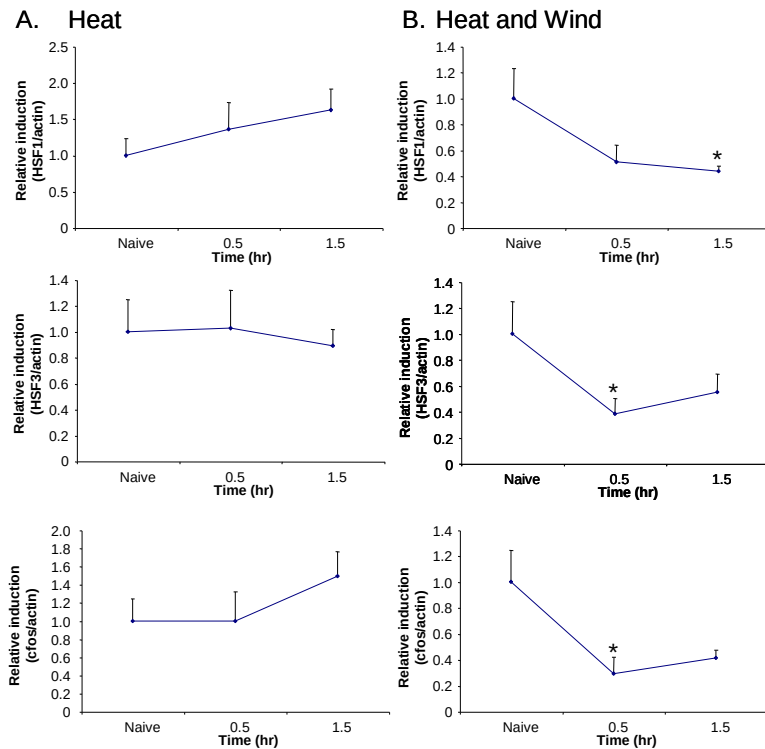


A. Heat **B. Heat and Wind**

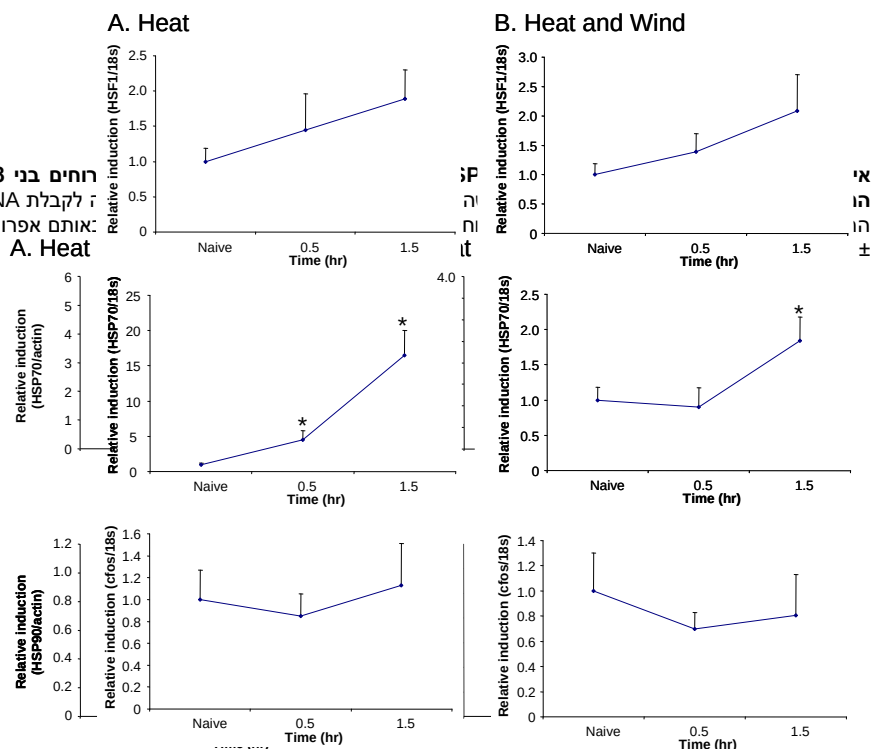
איור 20. ביטוי חלבוני עקה בהיפותלמוס הקדמי של אפרוחים בני 6 ימים לאחר שלוש חשיפות לקור. מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 6 ימים בטמפרטורה 16°C בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=8. התוצאות ב-A הם של HSF1. B. HSF3. C. c-Fos. D. HSP70. E. HSP90. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$.



איור 21. ביטוי mRNA של פקטורי השעתוק HSF1, HSF3, ו-c-Fos ברקמת דם פטמים בני 8 ימים בעקת חום (A) ובעקת חום המלווה ברוח (B). נבחנו 15 דם מכל אחד מהפטמים: הופק RNA מכל דגימת דם, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 8 ימים בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=9. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

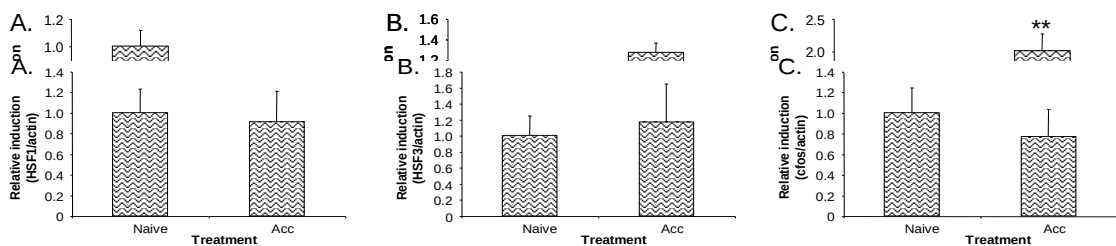
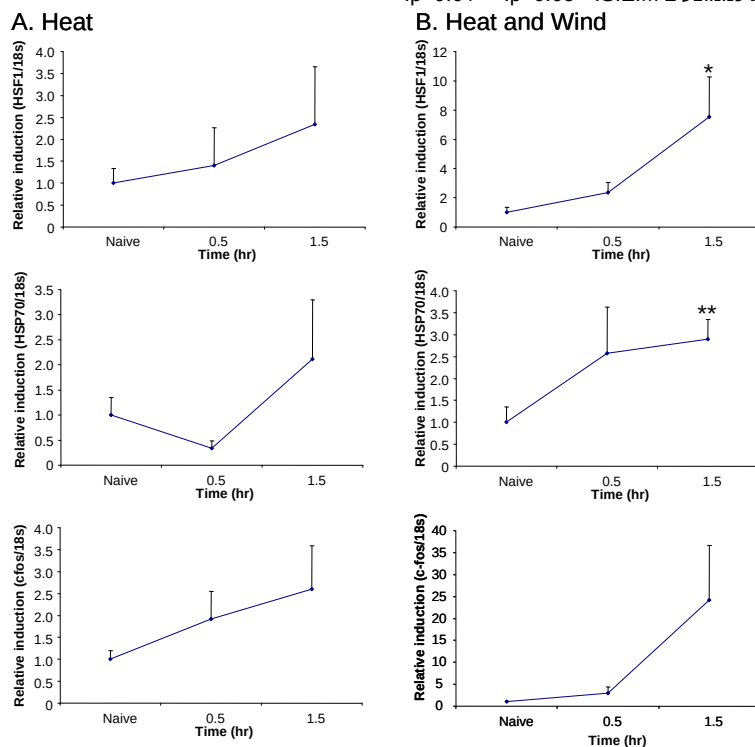


איור 22. ביטוי mRNA של פקטורי השעתוק HSF1, HSF3 ו-c-Fos בהיפותרמוס הקדמי של אפרוחים בני 8 ימים בעקת חום (A) ובעקת חום המלווה ברוח (B). מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 8 ימים בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=7. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * p < 0.05.



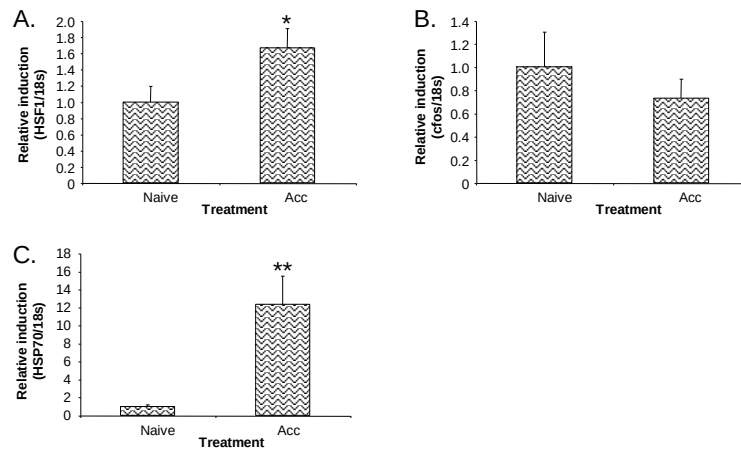
רוחים בני 8 ימים בעקת חום (A) ובעקת חום המלווה ברוח (B). מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 8 ימים בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=7. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * p < 0.05.

איור 24. ביטוי mRNA של HSF1, HSP70, ו-c-Fos ברקמת הדם פטמים בני 22 ימים בעקת חום (A) ובעקת חום המלווה ברוח (B). נבחנו 15 µg דם מכל אחד מהפטמים: הופק RNA מכל דגימת דם, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 22 ימים בהשוואה לביטוי הגן 18s באותם אפרוחים. N=9. התוצאות מוצגות כממוצע ± S.E.M. * p≤0.05, ** p≤0.01.

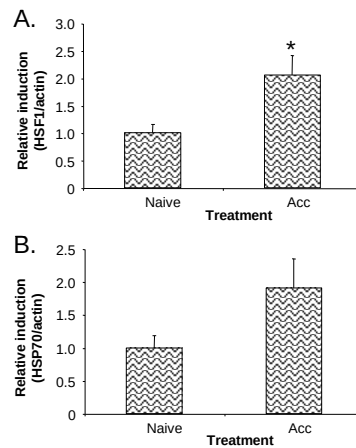


איור 25. ביטוי mRNA של HSF1, HSP70, ו-c-Fos ברקמת הדם פטמים בני 22 ימים בעקת חום (A) ובעקת חום המלווה ברוח (B). נבחנו 15 µg דם מכל אחד מהפטמים: הופק RNA מכל דגימת דם, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 22 ימים בהשוואה לביטוי הגן 18s באותם אפרוחים. N=9. התוצאות מוצגות כממוצע ± S.E.M. * p≤0.05, ** p≤0.01.

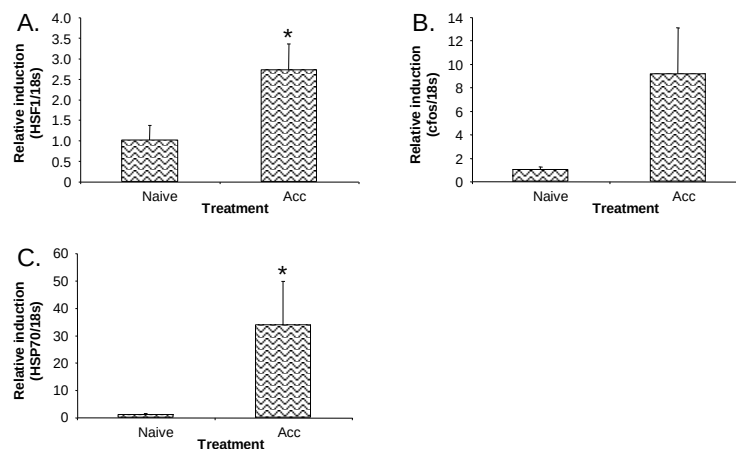
איור 26. ביטוי חלבוני עקה בהיפותלמוס הקדמי של אפרוחים בני 8 ימים שעברו אקלום לחום. מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 8 ימים שעברו אקלום בהשוואה לביטוי הגן β-actin באותם אפרוחים. N=7. התוצאות מוצגות כממוצע ± S.E.M.



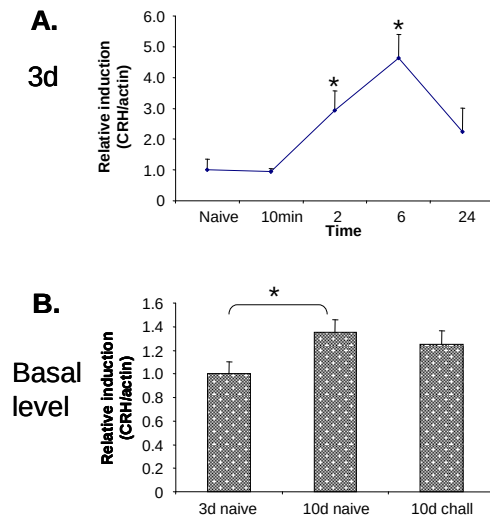
איור 28. ביטוי חלבוני עקה ברקמת הדם של פטמים בני 22 ימים שעברו אקלום לחום. נבחנו 15 μ ל דם מכל אחד מהפטמים: הופק RNA מכל דגימת דם, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 22 ימים שעברו אקלום בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=9. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.



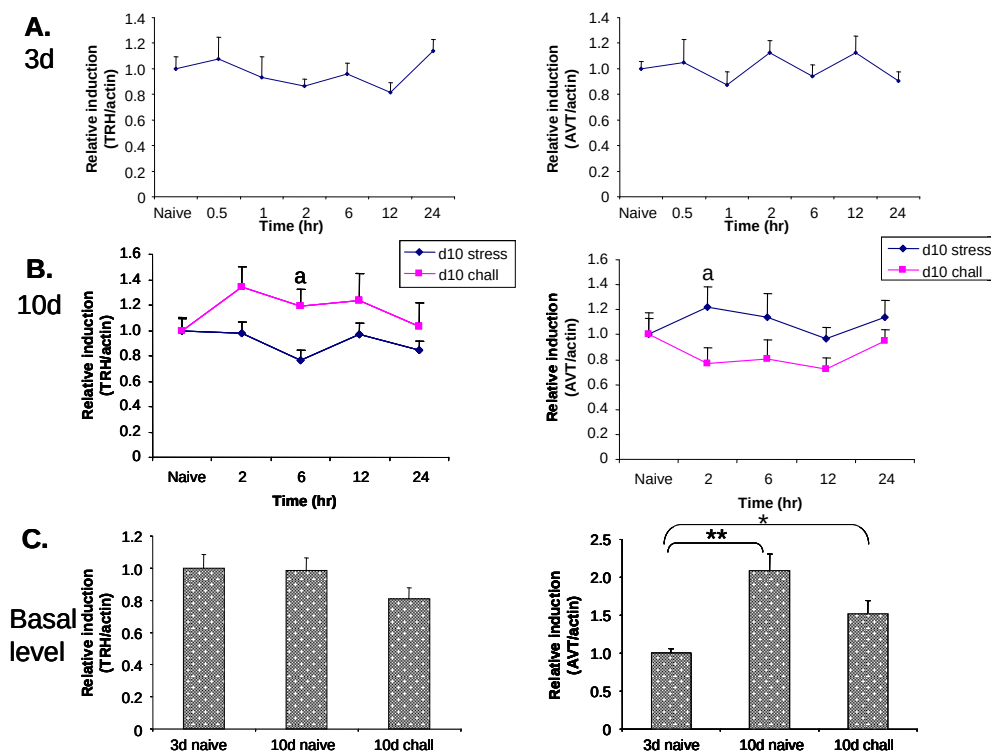
איור 29. ביטוי חלבוני עקה בהיפותלמוס הקדמי של פטמים בני 22 ימים שעברו אקלום לחום. מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 22 ימים שעברו אקלום בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=7. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$.



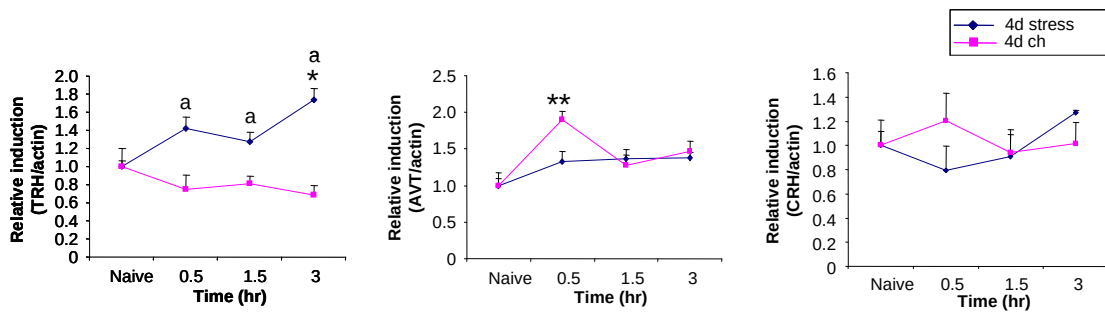
איור 30. ביטוי חלבוני עקה ברקמת הדם של פטמים בני 36 ימים שעברו אקלום לחום. נבחנו 15 μ ל דם מכל אחד מהפטמים: הופק RNA מכל דגימת דם, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 36 ימים שעברו אקלום בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=8. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$.



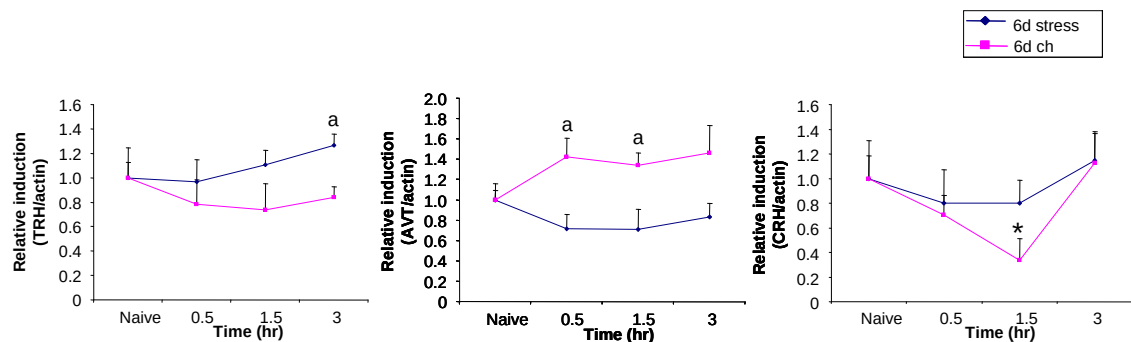
איור 31. ביטוי mRNA של CRH בהיפותלמוס הקדמי של אפרוחים בעקת חום. A. ביטוי mRNA של CRH באפרוחים בגיל 3 ימים שנחשפו לעקת חום של. B. ביטוי mRNA של CRH באפרוחים נאיביים בגיל 3 ימים ובאפרוחים בגיל 10 ימים שעברו שתי עקות חום ביום השלישי וביום העשירי לחייהם (chall). מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בעקת חום בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=8. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$.



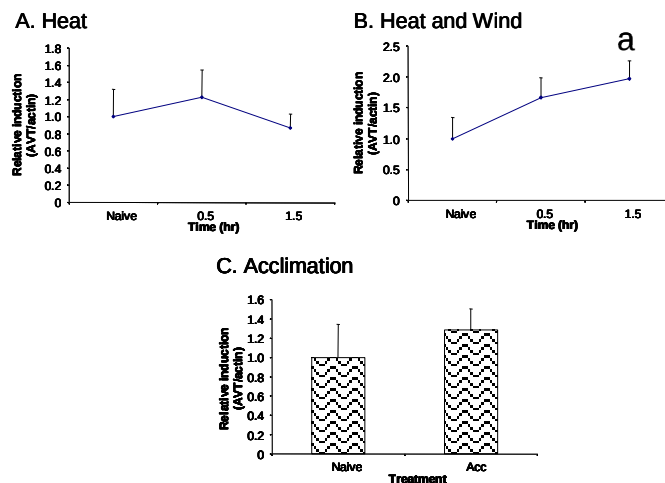
איור 32. שינוי בביטוי mRNA של TRH ושל AVT בהיפותלמוס הקדמי של אפרוחים בעקת חום. A. אפרוחים בני 3 ימים שנחשפו לעקת חום. B. אפרוחים בני 10 ימים שנחשפו לעקת חום ובאפרוחים לאחר חשיפה חוזרת לחום. C. באפרוחים נאיביים בגיל 3 ימים ובאפרוחים בגיל 10 ימים שעברו שתי עקות חום ביום השלישי וביום העשירי לחייהם (chall). מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בעקת חום בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=8. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. a – הבדל מובהק בין אפרוחים בעקת חום לבין אפרוחים בחשיפה חוזרת לחום באותו פרק זמן.



איור 34. ביטוי mRNA של TRH, AVT ו-CRH בהיפותרמוס הקדמי של אפרוחים בני 4 ימים בעקת קור ולאחר חשיפה חוזרת קור. מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 4 ימים בטמפרטורה 16°C בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=8. התוצאות ב-A הם של TRH. B. AVT ו-C. CRH. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. - **/* - הבדל מובהק בין אפרוחים באותה קבוצת טיפול לבין אפרוחים נאיביים: * p<0.05, ** p<0.01 - הבדל מובהק בין אפרוחים בעקת קור לבין אפרוחים בחשיפה חוזרת לקור באותו פרק זמן.



איור 35. ביטוי mRNA של TRH, AVT ו-CRH בהיפותרמוס הקדמי של אפרוחים בני 6 ימים בתנאי עקת קור ולאחר חשיפה חוזרת קור. מכל דגימה הופק RNA, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 6 ימים בטמפרטורה 16°C בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=5. התוצאות ב-A הם של TRH. B. AVT ו-C. CRH. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. - *** - הבדל מובהק בין אפרוחים באותה קבוצת טיפול לבין אפרוחים נאיביים: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 - הבדל מובהק בין אפרוחים בעקת קור לבין אפרוחים לאחר חשיפה חוזרת לקור באותו פרק זמן.



איור 36. ביטוי mRNA של AVT בהיפותרמוס הקדמי של אפרוחים בני 8 ימים בעקת חום (A) ובעקת חום המלווה עם רוח (B) ובאפרוחים שעברו אקלימ לחום (C). מכל אחד מהפטים הופק RNA מכל דגימת דם, נעשה Reverse Transcriptase PCR לכל דגימה לקבלת cDNA אשר נבחן ב-Real-time PCR. התוצאות מוצגות ככמות הביטוי של הגנים באפרוחים בני 8 ימים בהשוואה לביטוי הגן β -actin באותם אפרוחים. N=7. התוצאות מוצגות כממוצע $\pm$ S.E.M. - a - הבדל מובהק בין אפרוחים בעקת המשוכלת לבין אפרוחים בעקת חום בלבד לאחר שעה וחצי.