

## תאומים, עירבוב תאים ואילוניות בבקר

אהוד ליפקין, ירון טיקוצ'ינסקי, משה סולר ואדם פרידמן – המחלקה לגנטיקה, מכון אלכסנדר סילברמן למדעי החיים, האוניברסיטה העברית בירושלים  
רמי ארבל, דוד שרוני – החקלאית, אגודה שיתופית לביטוח ולשירותים וטרינריים למקנה בישראל בע"מ

### תקציר

בהריונות תאומים בבקר, כ-90% או יותר מהמקרים, מתאחדים כלי הדם של שני התאומים. תאים מוחלפים בין התאומים, מתבססים ברקמות שונות, ויוצרים פסיפס תאי (קיום מקביל של תאים ממקור גנטי שונה). כאשר התאומים הם זכר ונקבה, התוצאות לכך הן עקרות מלאה של הנקבה (אילוניות), ופגיעות ברמות משתנות בפוריות הזכר, עד כדי עקרות מלאה.

בעבודה הנוכחית נעשה ייתור (אמפליפיקציה) בשיטת ה-PCR של קטע מכרומוזום Y, בדוגמאות דנ"א מדם ומשורשי השער. נבדקו זכרים ונקבות מלידות יחידים, ותאומות פוריות ועקרות לעגלים. התוצאות מאשרות את הקשר בין עירבוב תאים לאילוניות ובין חוסר עירבוב תאים לפוריות. האיבחון בשיטת ייתור הדנ"א מהיר, זול ומדוייק.

### מבוא

תאי XX לתאי XY – דומה בשני התאומים (אם יש בתאומה 3% תאי XY, יהיה אחוז דומה של תאי XY באח התאום שלה!) (4, 18). לא נמצא מתאם בין יחס זה לעוצמת הפגיעה בפוריות; נראה שעצם נוכחות Y גם הכרחית וגם מספיקה לפגיעה זו.

בגלל הסבירות הגבוהה של עקרות, נמכרות בדרך כלל כל התאומות לעגלים, כולל אלה שהיו מתגלות כפוריות לו נשארן בעדר. דבר זה מוריד את אפשרות הסלקציה בעגלות. לכך יש להוסיף את הפגיעות בפוריות הזכרים. מבחן מוקדם לזיהוי עירבוב תאי בתאומים יכול לאפשר את גידול התאומות הפוריות ולמונע גידול עגלים עם סבירות גבוהה לפגיעות בפוריות. דרך יעילה לזיהוי מוקדם של עירבוב תאים בנקבה היא הופעת כרומוזום Y (המעידה כמובן גם על עירבוב באחיה התאום). זיהוי כזה אכן נערך כבר על ידי קביעת קריוטיפים (זיהוי הרכב הכרומוזומים בתא בעזרת מיקרוסקופ; (16), בשיטת טביעת האצבעות של דנ"א (6, 13) ובשיטת ה-PCR (6). בעבודה הנוכחית השתמשנו בשיטת ה-PCR (1) כדי לייתר קטע של כרומוזום Y מתאי דם לבנים ומשורשי

בבקר, במהלך למעלה מ-90% מהריונות התאומים, מתאחדים כלי הדם של שני העוברים; תאים מוחלפים בין התאומים, מתבססים ברקמות שונות לשארית חייהם, ויוצרים פסיפס תאי – קיום מקביל של תאים ממקור גנטי שונה (4, 6, 16). כאשר ההריון הוא של זכר ונקבה, מתבטא העירבוב בהופעה של תאים נושאי כרומוזום Y בנקבה, ותאים נושאי זוג כרומוזומי X בזכר. בהריון כזה גורם העירבוב לאילוניות (freemartinitism) ועקרות מוחלטת של הנקבה, ופגיעה ברמות משתנות בפוריות של הזכר, עד כדי עקרות מלאה (4, 15). באחת העבודות (4) נדחו 58.3% מהפרים התאומים בעלי דם מעורבב מסיבות פוריות, לעומת 5.4% מפרי הביקורת ( $P > 0.001$ ).

פסיפס תאים, יציב למשך כל חיי התאומים, זוהה בכבד, במח העצמות, בתאי דם אדומים ולבנים, וברמה נמוכה בהרבה בריאות, בתאי המין ובעור (4, 6, 9, 13, 15, 18). באוכלוסיית התאומים נמצאה שונות רבה מאד ביחס בין התאים האורחים למקומיים: מ-3% עד 100% (4, 7, 18). בד"כ הרכב תערובת התאים – היחס בין

דוגמאות לתוצאות ייתור קטע מכרומוזום Y מדם ומשערות מוצגות באיורים 1 ו-2, בהתאמה. לאחר ביצוע הייתור הורצו הדוגמאות בג'ל וצולמו במצלמת אור אולטרא-סגול. הפסים הלבנים המסומנים מצביעים על נוכחות כרומוזום Y בפרט הנבדק. יש לציין, כי בנוסף למוצר העיקרי מ-Y, אפשר היה להבחין בפסים חלשים מאד של מוצרים משניים, שהם כנראה מקטעים בעלי דמיון חלקי לקטע המבוקש הנמצאים בכרומוזומים אחרים. אחד ממקטעים אלה קרוב מאד בגודל לקטע הנבדק, אבל תודות להבדלים הניכרים בעוצמת הפס לא היתה כל בעיה להבדיל ביניהם.

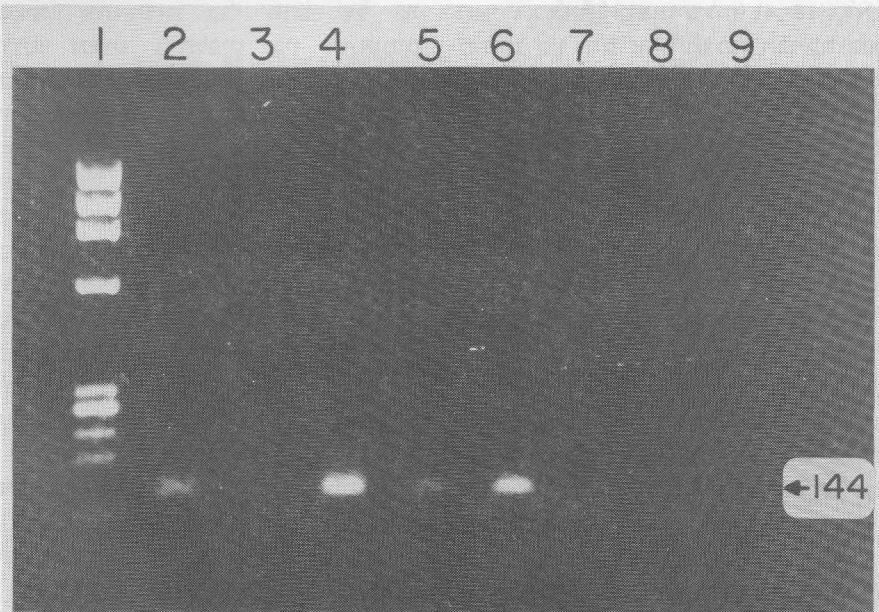
### תוצאות

בייתור מתאי דם לבנים או דנ"א שהופק מהם, התקבלו תוצאות חיוביות מזכר, שתי תאומות עקרות בנות 13 חודש, ו-17 מתוך 20 התאומות הצעירות (עגלות אלה היו צעירות מדי לבדיקת אברי מין). תוצאות שליליות

השערות של התאומות לעגלים בבקר. בשיטה זו מצאנו אישור לכך, שעירבוב התאים אכן מלווה בעקרות, ושחוסר עירבוב מלווה בפוריות.

### שיטות וחומרים

בעבודה נבדקו 24 תאומות לעגלים, כולל: 20 עגלות צעירות, שלוש עגלות עקרות בנות 13 חודשים, מבכירה אחת בהריון, ושתי פרות מבוגרות. כמו כן, נבדקה עגלה עקרה אחת שאינה תאומה לעגל. כל נקבה נבחנה פעמיים לנוכחות כרומוזום Y על ידי ייתור של 144 בסיסים מקטע ידוע מכרומוזום זה (10); איכות הדוגמאות שלא הגיבו בבדיקה אושרה על ידי PCR עם זוג תחלים אוטונומי, המייתר קטע מכרומוזום אחר. זכרים ונקבות פוריות שאינן תאומות שימשו לביקורת. המבחנים נעשו עם דנ"א מנוקה שהופק מתאי דם לבנים, או ישירות מתאי דם לבנים או שורשי שערות. שש תאומות נושאות Y נבחנו הן מתאים לבנים והן משערות.



ערוץ 3: נקבה נורמלית, לא תאומה; ערוצים 4-5: תאומות אילוניות; ערוצים 7-9: תאומות פוריות לעגלים.

איור 1. ייתור קטע של 144 נוקליאוטידים מכרומוזום Y מתאי דם לבנים. ערוץ 1: סמן לגודל; ערוץ 2: זכר;

ואישור לכך, שבמקרה זה לא היה עירבוב דם, ואכן הפרה פוריה.

תודות לקלות הדגימה מהווים שורשי השערות אחד המקורות העדיפים לדני"א מבקד (3). בעבודה הנוכחית נמצאו שורשי השערות כמצע יעיל ליתור דני"א. מאידך, התוצאות מחייבות, כי גם בשימוש במקור זה יש לקחת בחשבון עירבוב תאים. עירבוב כזה פוגע במבחנים גנטיים המבוססים על הרקמות המעורבות. בפרט יהיה קשה לבצע מבחני הורות לצאצאים של הורה עם רקמות מעורבות.

### סיכום

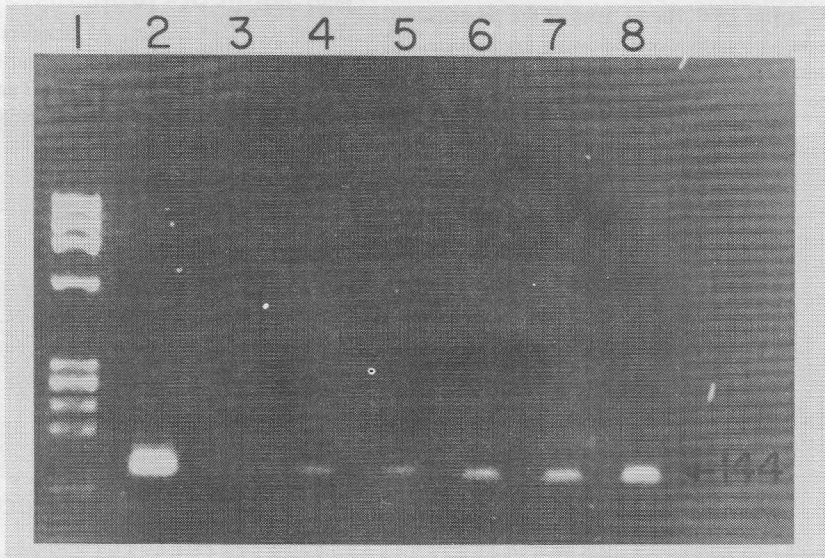
תוצאות העבודה מאשרות את קיום הקשר בין עירבוב תאים לאילוניות: אם יש עירבוב, התאומה עקרה; אם אין עירבוב, התאומה תהיה פוריה. ייתור כרומוזום Y יכול לשמש ככלי רגיש, מהיר ונוח לזיהוי מוקדם של תאומות פוריות לעגלים. מבחן זה יכול גם לזהות תאומים לעגלות עם סיכון לפגיעות בפוריות.

התקבלו מנקבה נורמלית, עגלה תאומה בהריון, ושתי תאומות פוריות בוגרות (איור 1).

ייתור משערות הניב תוצאות חיוביות מזכר, מתאומה עקרה, משתי תאומות צעירות ומשש מהתאומות בהן זוהה כרומוזום Y גם בדם. תוצאות שליליות התקבלו מהנקבה הנורמלית, ומהעגלה העקרה שלא היתה תאומה לעגל (ככל הנראה העקרות נובעת מסיבה אחרת).

### דיון

בעזרת ייתור קטע מכרומוזום Y, זוהתה נוכחותו בתאומות עקרות לעגלים, והעדרו בתאומות פוריות. כל התאומות היו מעדרים עם רישום אמין ולכן עם סבירות נמוכה לזיהוי הורים שגוי. אחת משתי התאומות הבוגרות השתתפה בעבר במבחן הורות (2) וזוהתה כתאומה לעגל. במבחן זה, שנעשה בשיטת טביעת האצבעות של דני"א, נמצא הבדל קל בינה לאחיה התאום, הבדל המצביע על כך שלא היה ביניהם עירבוב דם. בעבודה הנוכחית נבדקו הן דוגמת הדני"א ששימשה לאותו מבחן והן דוגמת דם חדשה; שתיהן נתנו תגובה שלילית



איור 2. ייתור קטע של 144 נוקליאוטידים מכרומוזום משורשי שערות. ערוץ 1: סמן לגודל; ערוץ 2: זכר; ערוץ 3: נקבה נורמלית, לא תאומה; ערוץ 4: תאומה אילונית; ערוצים 5-7: תאומות צעירות לעגלים.

איור 1. ייתור קטע של 144 נוקליאוטידים מכרומוזום משורשי שערות. ערוץ 1: סמן לגודל; ערוץ 2: זכר; ערוץ 3: נקבה נורמלית, לא תאומה; ערוץ 4: תאומה אילונית; ערוצים 5-7: תאומות צעירות לעגלים.

9. MacLachlan N.J. 1987. Ovarian disorders in domestic animals. *Env. Health Pers.* 73:27-33.
10. Miller J.R. and M. Koopman. 1990. Isolation and characterization of two male-specific DNA fragments from the bovine gene. *Anim. Genet.* 21:77-82.
11. Morris C.A. 1984. A review of the genetics and reproductive physiology of dizygotic twinning in cattle. *Anim. Breed. Abst.* 52:803-819.
12. Pinder S.J., B.N. Perry, C.J. Skidmore, and D. Savva. 1991. Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of polymerase chain reaction. *Anim. Genet.* 22:11-20.
13. Plante Y., S.M. Schmutz, K.D.M. Lang and J.S. Moker. 1992. Detection of leucochimaerism in bovine twins by DNA fingerprinting. *Anim. Genet.* 23:295-302.
14. Schellander K., J. Peli, T.A. Taha, E. Kopp and B. Mayr. 1992. Diagnosis of bovine freemartinism by polymerase chain reaction method. *Anim. Genet.* 23:549-551.
15. Short R.V., J. Smith, T. Mann, E.P. Evans, J. Hellet, A. Fryer and J.L. Hamerton. 1969. Cytogenetic and endocrine studies of a freemartin heifer and its bull co-twin. *Cytogenetics.* 8:369-388.
16. Stone W.H., D.T. Berman, W.J. Tyler and M.R. Irwin. 1960. Blood types of the progeny of a pair of cattle twins showing erythrocyte mosaicism. *J. Hered.* 51:136-140.
17. Stone W.H., C. Stormont and M.R. Irwin. 1952. Blood typing as a means of differentiating the potentially fertile from the nonfertile heifer born twin with a bull. *J. Anim. Sci.* 2:744.
18. Teplitz R.L., Y.S. Moon and P.K. Basur. 1967. Further studies of chimerism in heterosexual cattle twins. *Chromosoma (Berl.)* 22:202-209.

## תודות

אנחנו מודים לרפתני גיגור, יענת, מרחביה, תל-יוסף ותל-עדשים על דוגמאות הדם והשער. עבודה זו נתמכה על ידי מועצת החלב בישראל והקרן הדוילאומית למחקר ופיתוח חקלאי ארה"ב-ישראל.

## ספרות

1. א' ליפקין, י' קשי, אלונה נוה, ג' בקמן. 1991. השבחת החי והצומח בעידן הגנטיקה הגנומית. מחקר חקלאי בישראל, ה' (2-1): 144-125.
2. קשי י', נוה א', ליפקין א'. 1990. זיהוי הורים בעזרת הנדסה גנטית. "השדה" ע"ה (ב'): 300-297.
3. רון מיכה, ולר יהודה, בנד מרק ואפרים עזרא. 1992. אימות קרבה גנטית בספר-העדר. חקר ומעש 14: 20-18.
4. Dunn, H.O., K. McEntee, C.E. Hall, R.H. Johnson Jr and W.H. Stone. 1979. Cytogenetic and reproductive studies of bulls born co-twin with freemartins. *J. Reprod. Fert.* 57:21-30.
5. Greene W.A., H.O. Dunn and R.H. Foote. 1977. Sex-chromosome ratios in cattle and their relationship to reproductive development in freemartins. *Cytogenet. Cell Genet.* 18:97-105.
6. Grobet L., C. Charlier, A. Schwers and R. Hanset. 1992. Détection du freemartinisme à l'aide d'empreintes génétiques et d'une sonde Y-spécifique bovine. *Ann. Med. Vet.* 136:41-50.
7. Herschler M.S. and N.S. Fechheimer. 1967. The rôle of sex chromosome chimerism in altering sexual development of mammals. *Cytogenetics* 6:204-212.
8. Kashi Y, E. Lipkin, A. Darvasi, A. Nave, Y. Gruenbaum, J.S. Beckmann and M. Soller. 1990. Parentage identification in the bovine using "deoxyribonucleic acid fingerprints". *J. Dairy Sci.* 73:3306-3311.