

דו"ח מדעי מסכם לתכנית 12-0317-362

עקת חימצון במהלך ההיריון והקשר שלה לחיוניות השגר הנולד ולבריאות האמהות

מוגש להנהלת ענף צאן. יולי 2012

ע"י

אריאל שבתאי	מינהל המחקר החקלאי	נוה יער
אלכס רוזוב	מינהל המחקר החקלאי	בית דגן
אלישע גוטויין	מינהל המחקר החקלאי	בית דגן

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים : כן / לא

חתימת החוקר

תקציר

במקביל לשיפור בוולדנות בעדרי הצאן בארץ גדל גם אחוז הכבשים החשופות לרעלת היריון כמו גם תמותת הטלאים סביב מועד ההמלטה. עלייה בצרכים האנרגטיים במהלך ההיריון עלולה לחשוף את האם והולדות לעקה חמצונית אשר תוביל לפגיעה בבריאות האם ובחיוניות העוברים. ואכן, מחקר ראשוני שביצענו בכבשי אפק אסף הנושאות תאומים שלישיות ורביעיות הראה כי בסוף ההיריון הכבשים נמצאות בעקה חמצונית ברמה גבוהה מאוד. עקה זו נמצאה גם ביום הראשון לחיים אצל הטלאים שנולדו. לא ידוע עד כמה משפיע מספר העוברים על עוצמת העקה החמצונית במהלך ההיריון. כמו כן, טרם נבדקה האפשרות כי טיפול בנוגדי חמצון יכול להביא לצמצום עקה זו בכבשים. השימוש בנוגדי חמצון יכול להיות יעיל בהקטנת ההסתברות לפתח מחלות תלויות עקה חמצונית בחיות משק. קליפות רימונים הן מקור בלתי נדלה של נוגדי חמצון. לאחרונה דווחנו כי אכילה של קליפות רימונים ע"י עגלי מפטמה הביאה לשיפור בפוטנציאל נוגד החמצון של הדם, להגברת הספיגה של ויטמין E מהמזון אל הפלסמה ולמניעת עקת החמצון המתפתחת מספר ימים לאחר הגמילה, ואשר עשויה להיות באסוציאציה עם התפתחות מחלות נשימה בעגלי מפטמה. מטרת המחקר של שנה א' הייתה לאפיין את התפתחות ועוצמת העקה החמצונית במהלך ההיריון בכבשי אפק, ולבחון אם היא תלויה במספר העוברים. העקה החמצונית נועדה להיבחן מתוך דגימות דם שנלקחו מהכבשים אחת לחודש עד להמלטה ושבועיים לאחר ההמלטה, ע"י שימוש בסמן האקסוגני LT. נאספו כארבע מאות דוגמאות דם במהלך ההיריון, אולם בשל תקלה בשנה א' של המחקר, שנבעה מריכוז נמוך של הסמן קשה היה להסיק מסקנות לגבי עקת החמצון. יחד עם

זאת, בצענו אנליזות גם של חומצות השומן החופשיות בדם, לצורך ניטור פרוק שומני המאגרים במהלך ההיריון. אנליזות אלה מעידות כי פרוק השומנים בחודש הרביעי להיריון בכבשים הנושאות שלושה וארבעה עוברים הוא גבוה באופן מובהק מזה של כבשים עם אחד או שני עוברים או בחודשי ההיריון המוקדמים. בשנה ב' שחזרנו את דוגמאות הפלסמה לאנליזה של הסמן LT. מצאנו הבדלים בעקה החמצונית שחוות כבשים מרובות עוברים בהשוואה לכבשים שמספר העוברים שלהן היה אחד או שניים. ההבדלים החלו לקבל ביטוי בחודש השלישי להיריון ונמשכו עד חודשיים אחרי ההמלטה, ללמד על גודל העקה החמצונית שחוות כבשים מרובות עוברים במהלך המחצית השנייה של ההיריון. ההיגיון שבהתבוננות המשולבת על ריכוז NEFA ועקה חמצונית יכול להעיד כי בעקבות פירוק מסיבי של שומני מאגרים לצורך אספקת הדרישות האנרגטיות של הכבשה מרובת העוברים בחודשי ההיריון המתקדמים, חל מטבוליזם לא תקין של חומצות השומן הללו, אין ניצול תקין של האנרגיה ומתרחשת עקה חמצונית. על בסיס האמור לעיל ניתן לשער כי שילוב של נוגדי חמצון כמו קליפות רימונים, בשלב הנכון של ההיריון, יכול למנוע את התופעה.

מבוא

הכנסת זני אפק הביאה לשיפור בוולדנות בעדרי הצאן בארץ (Gootwine et al. 2008). אולם, לא ניתן לנצל במלואה את ההתקדמות הגנטית בוולדנות היות ונמצא כי ככל שהוולדנות גדלה כך גם גדל אחוז הכבשים החשופות לרעלת היריון (Zamir et al., 2009), וכן גדלה באופן יחסי תמותת הטלאים סביב מועד ההמלטה. כך לדוגמא, בעדר האפק אסף של מרכז וולקני הוולדנות הממוצעת היא כ-2.5 טלאים להמלטה בעוד מספר הטלאים הנולדים חיים להמלטה הוא כ-2.1. רוב תמותת הטלאים מתרחשת ברחם לקראת סוף ההיריון ולא כתוצאה מקשיים בהמלטה. נשיאת מספר עוברים חושפת את הכבשה לעקה מטבולית. עדות לעקה בה נמצאת הכבשה היא עליית קצב הלב שלה העומדת ביחס יישר למספר העוברים אותה היא נושאת (Gootwine, 2009).

עקה חמצונית נגרמת כאשר היחס הרצוי בין שיירים מחמצנים (Pro-oxidants) לבין שיירים נוגדי חמצון (Antioxidants) מופר בגוף בעל החיים לטובת ריכוז גבוה יותר של השיירים המחמצנים, תהליך שיכול להוביל לפגיעה בחומצות גרעין, חלבונים ושומנים וכתוצאה מכך לפגיעה בתפקוד תאי הגוף (Martindale and Holbrook, 2002). הקשר בין עקה חמצונית לאטיולוגיה של מחלות retained (mastitis, udder edema, placenta) המשפיעות על ביצועי הרבייה והיצרנות בפרות חלב ידוע כבר למעלה משני עשורים (Miller and Brzezinska-Slebodzinska, 1993). עקה חמצונית תוארה גם בכבשי אווסי במהלך ההיריון (Erisir et al., 2009). עלייה בצרכים האנרגטיים במהלך ההיריון עלולה לחשוף את האם והולדות לעקה חמצונית אשר תוביל לפגיעה בכריאות האם ובחיוניות העוברים. ואכן, מחקר ראשוני שביצענו בכבשי אפק אסף הנושאות תאומים שלישיות ורביעיות (נתונים שלא פורסמו) הראה כי בסוף ההיריון הכבשים נמצאות בעקה חמצונית ברמה גבוהה מאוד. עקה זו נמצאה גם ביום הראשון לחיים אצל הטלאים שנולדו. לא ידוע עד כמה משפיע מספר העוברים על עוצמת העקה

החמצונית במהלך ההיריון. כמו כן, טרם נבדקה האפשרות כי טיפול בנוגדי חמצון יכול להביא לצמצום עקה זו בכבשים.

קיימות מגוון של שיטות להערכת עקה חמצונית. בשנים האחרונות נעשה שימוש בסמן אקסוגני רגיש לרדיקלים חופשיים של חמצן והנקן (ROS/RNS) לחקר מחלות הומאניות (Szuchman et al 2006; 2007) ומחלות בקר (Eitam et al., 2010). הסמן המצוי ביותר בשימוש על ידינו בנוי מיחידות אנדוגניות של החומצה האמינית טירוזין (לזיהוי פגיעה בחלבון) המחוברת בקשר קוולנטי לחומצה לינולאית (לזיהוי פגיעה בחומצות שומן). הדגרה של הסמן עם דוגמה ביולוגית (דם, רקמה, תאים, רוק) המצויה במצב של עקה חמצונית תגרום לפגיעות בסמן ושינויים במבנה שלו (חמצונים שונים בכל אחד ממרכיביו) בהתאם לסוג העקה המצויה במערכת הנבדקת. תוצרי החמצון של מולקולת הסמן המקורית נקבעים באופן כמותי להערכת רמת העקה החמצונית. השימוש בנוגדי חמצון יכול להיות יעיל בהקטנת ההסתברות לפתח מחלות תלויות עקה חמצונית כחיות משק (Miller and Brzezinska-Slebodzinska, 1993). קליפות רימונים הן מקור בלתי נדלה של נוגדי חמצון. לאחרונה (Shabtay et al., 2008) דווחו כי אכילה של קליפות רימונים טריות ע"י עגלי מפטמה הביאה לשיפור בפוטנציאל נוגד החמצון של הדם ולהגברת הספיגה של ויטמין E (נוגד החמצון החשוב ביותר במדיום הליפידים של הגוף) מהמזון אל הפלסמה. אבקה של קליפות רימונים מיובשות, כשניתנה לעגלים צעירים עם הגמילה, הצליחה למנוע את עקת החמצון המתפתחת מספר ימים לאחר הגמילה, ואשר עשויה להיות באסוציאציה עם התפתחות מחלות נשימה בעגלי מפטמה (נתונים שלא פורסמו).

מטרות המחקר:

לכמת את דרגת העקה החמצונית תוף שימוש בסמני עקה במהלך ההיריון בכבשי אפק אסף, כתלות בשלב ההיריון ומספר העוברים.

שיטות וחומרים

למרות שבשנה הראשונה למחקר תוכנן לבדוק את השתנות רמת העקה החמצונית בעשרים כבשי אפק אסף כתלות בשלב ההיריון ובמספר העוברים אותו הכבשה נושאת, אספנו דוגמאות משבעים כבשים, ביניהן היו כבשים לא בהיריון, נושאות יחידים, תאומים, שלישיות, רביעיות וחמישיות. הדיגום בוצע בכבשים מתוך עדר בית דגן המונה כ-400 אימהות, שלהן נתוני ולדנות ממספר המלטות. דגימות הדם נלקחו מכל הכבשים טרם הרבעה. דגימות הדם נלקחו מהכבשים אחת לחודש עד להמלטה ובדיקה נוספת בחלק מהכבשים בוצעה חודשיים לאחר ההמלטה. דגימות הדם הודגרו עם הסמן למשך שעה ורבע באמבט (37°C), הסמן ותוצרי החמצון שלו מוצו ונשמרו בהקפאה עד לבדיקה. הבדיקה נעשתה במכשיר LC/MS/MS. נתוני ההמלטה: מספר טלאים, מספר טלאים חיים, משקל לידה ומין הטלה נרשמו. אנליזת חומצות שומן חופשיות בוצעה בפלסמה של הכבשים בעזרת קיט ייעודי.

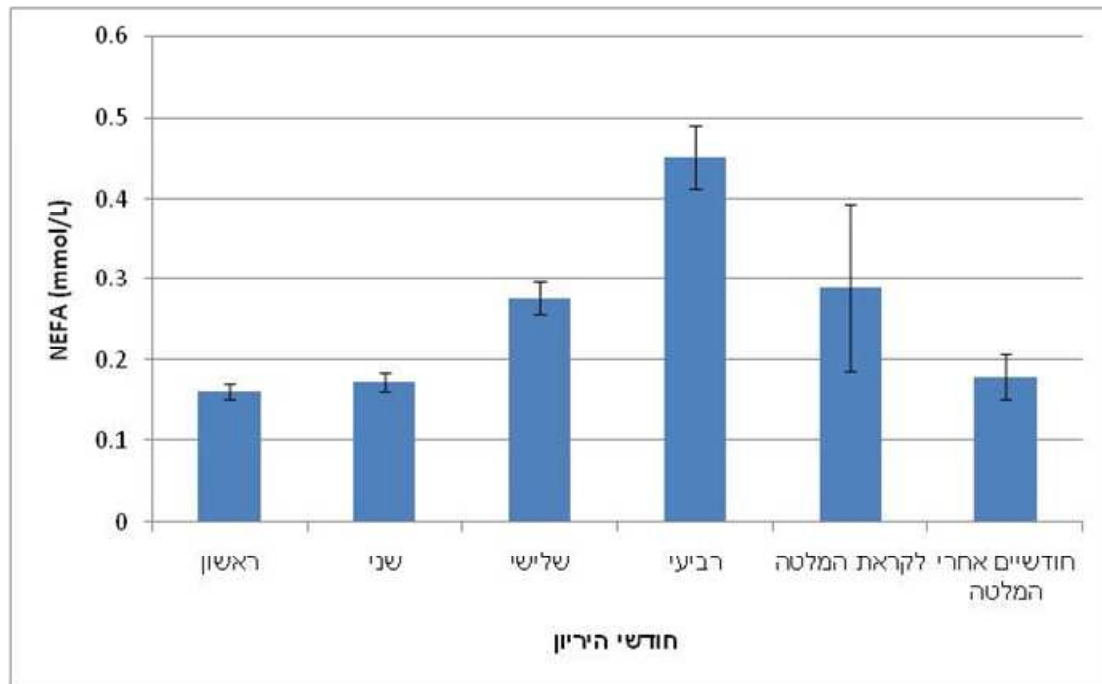
תוצאות + דיון

נאספו כארבע מאות דוגמאות דם במהלך ההיריון ולאחר ההמלטה, אולם בשל תקלה שנבעה מריכוז נמוך של הסמן LT קשה היה להסיק מסקנות לגבי עקת החמצון. יחד עם זאת, הצגנו את ריכוז תוצר החמצון LT-epoxide כפי שהוא מופיע כיחס בין הריכוז לאחר ההמלטה לריכוז בתחילת ההיריון (טבלה 1).
בניתוח הכולל את מספר הוולדות ששרד בהמלטה, ניתן היה לראות בשנה א' כי התקיים מתאם שלילי בין רמת העקה החמצונית המבוטאת ע"י תוצר החמצון LT-epoxide למספר העוברים שהכבשה נשאה.
($r=-0.45$, $P<0.05$)

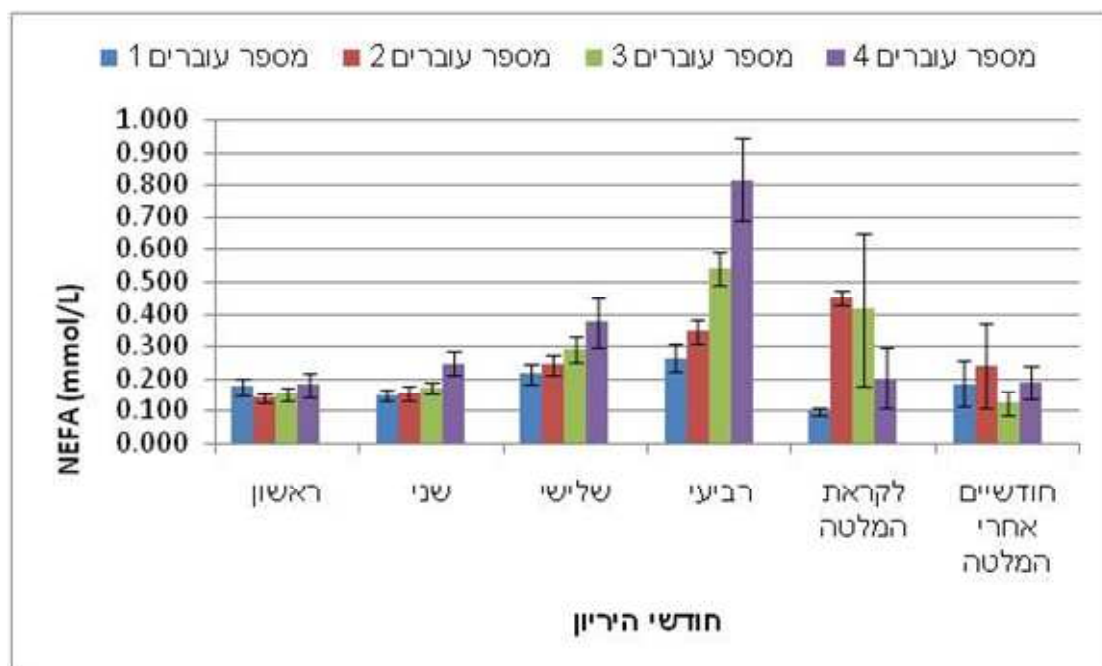
טבלה 1: עקת חמצון, המבוטאת ע"י תוצר החמצון LT-epoxide, והמתאם שלה למספר העוברים של הכבשה.

sheep Nr	days after birth	LT-epoxy-ratio 6/2	embryo Nr.	embryo viability (%)	ketosis
8156	81	12.18	1	100	X
6806	68	12.13	1	100	X
8808	74	22.11	1	0	X
1563	64	22.28	2	100	X
1157	84	79.57	2	100	X
1228	86	18.97	3	100	V
6618	61	8.59	3	100	X
1555	65	16.97	3	100	X
6535	66	10.78	3	67	V
9473	70	59.58	3	100	X
6870	60	2.10	4	75	X
7205	70	22.43	4	100	X
9177	67	10.76	4	100	X
9347	69	16.47	4	50	X
3426		4.60	4	50	V
9137	71	20.36	5	80	X

איור 1 מתאר את השפעת התפתחות ההיריון על ריכוז חומצות השומן החופשיות בדם (NEFA).
מהחודש השלישי בהיריון ועד סמוך להמלטה, ריכוז NEFA גבוה יותר באופן מובהק ($P<0.001$) מאשר בתחילת ההיריון. עוד ניתן לראות באיור 1 כי חודשיים לאחר ההמלטה ריכוז ה NEFA יורד לריכוז הדומה לזה בתחילת ההיריון.



איור 1: ריכוז NEFA כפונקציה של השלב בהיריון.

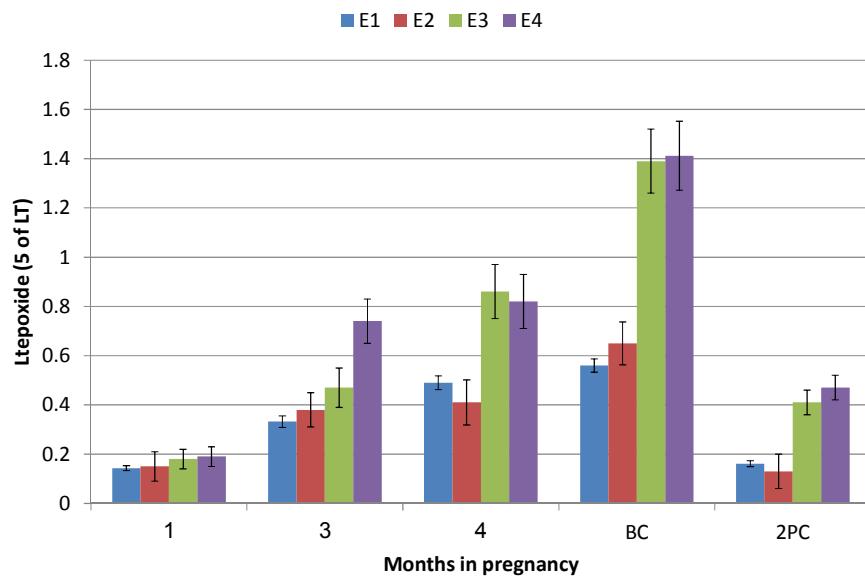


איור 2: ריכוז NEFA בדם של כבשים כפונקציה של החודש בהיריון ומספר הוולדות

מאיוור 2 ניתן ללמוד כי לא רק לחודש בהיריון אלא גם למספר הוולדות השפעה על ריכוז חומצות השומן החופשיות בדם, קרי, על העומס המטבולי. כבשים בעלות שלושה וארבעה עוברים מפרקות יותר משומן המאגרים, בעיקר בחודש הרביעי להיריון, כדי לעמוד בעומס המטבולי.

בשנה ב' של המחקר שחזרנו את דגימות הפלסמה שנאספו ובצענו אנליזה מחודשת של תוצר החמצון LTepoxide של הסמן LT. התוצאות מודגמות באיוור 3. מבחן ANOVA המלווה במבחן Bonferroni הראו מספר תופעות. ראשית, למעט בחודש השלישי להיריון, לא נתגלו הבדלים בעקה החמצונית שחוו כבשים שמספר העוברים שלהם היה שלושה או ארבעה. ההבדלים בין כבשים אלה לכבשים שמספר העוברים שלהן היה אחד או שניים החלו לקבל ביטוי בחודש השלישי להיריון ונמשכו עד חודשיים אחרים ההמלטה, ללמד על גודל העקה החמצונית שחוות כבשים מרובות עוברים במהלך המחצית השנייה של ההיריון.

בדו"ח של שנה א' דיווחנו כי מהחודש השלישי בהיריון ועד סמוך להמלטה, ריכוז ה NEFA היה גבוה יותר באופן מובהק מאשר בתחילת ההיריון. עוד דיווחנו כי לא רק לחודש בהיריון אלא גם למספר הוולדות השפעה על ריכוז חומצות השומן החופשיות בדם, קרי, על העומס המטבולי. כבשים בעלות שלושה וארבעה עוברים פרקו יותר משומן המאגרים, בעיקר בחודש הרביעי להיריון, כדי לעמוד בעומס המטבולי.



איוור 3: השפעת החודש בהיריון ומספר העוברים על ריכוז תוצרי החמצון LTepoxide בדם של כבשים. BC – לפני המלטה, 2PC – חודשיים לאחר המלטה. E1, E2, E3, E4 – היריון עם עובר אחד עד ארבעה.

מסקנות

התוצאות ההקדמיות שהיו לנו לפני תחילת המחקר העידו כי כבשים לקראת המלטה מצויות בעקת חמצון גדולה בהשוואה לכבשים בתחילת ההיריון. בשנת המחקר הראשונה הצבנו לעצמנו לנטר את השלב שבו מתחילה להופיע עקה חמצונית במהלך ההיריון, כתלות במספר העוברים, מתוך הסתכלות עתידית שבשלב זה ניתן יהיה להוסיף למזון של הכבשים מיצוי קליפות רימון, כדי להקטין את עקת החמצון המתפתחת. כאמור, בשל תקלה, שמהותה הייתה סמן שריכוזו היה נמוך פי 10 מהמקובל במחקרנו, לא הצלחנו לנבא את שלב תחילת ההתפתחות של העקה החמצונית. יחד עם זאת, ראינו (בשלב הדיגום בו לא הייתה בעיה עם הסמן – הדיגום של חודשיים לאחר המלטה) כי קיים מתאם בין מספר העוברים והדעיכה של העקה החמצונית, מה שמדגיש בפעם נוספת את חוזקו של הסמן LT בניבוי עקה חמצונית בחיות משק. בניסיון להפיק בכל זאת אינפורמציה רלבנטית משנת מחקר זאת, מהפלסמה שאספנו בצענו אנליזות לניטור ריכוז ה NEFA בדם הכבשים, כתלות בשלב ההיריון ומספר העוברים. ואכן, בחודש הרביעי להיריון, בכבשים הנושאות שלושה וארבעה עוברים, רמת ה NEFA היא הגבוהה ביותר. בשנת המחקר השנייה שחזרנו את הדוגמאות לצורך אנליזת LT. התוצאות הראו עליה מקבילה בתקופה זאת גם בעקה החמצונית. ההיגיון שבהתבוננות המשולבת על ריכוז NEFA ועקה חמצונית יכול להעיד כי בעקבות פירוק מסיבי של שומני מאגרים לצורך אספקת הדרישות האנרגטיות של הכבשה מרובת העוברים בחודשי ההיריון המתקדמים, חל מטבוליזם לא תקין של חומצות השומן הללו, אין ניצול תקין של האנרגיה ומתרחשת עקה חמצונית. ההקבלה בתוצאות ה LT וה NEFA מצביעים כי שילוב של נוגדי חמצון כמו קליפות רימונים, בשלב הנכון של ההיריון, יכול למנוע את העקה החמצונית/מטבולית המתפתחת בשלבים הקריטיים של ההיריון בכבשים מרובות עוברים, ולהקל על מאזן האנרגיה השלילי המאפיין תקופה זאת, להקטין את תופעת רעלת ההיריון ותמותת הטלאים סביב המלטה. על בסיס האמור לעיל ניתן לשער כי שילוב של נוגדי חמצון כמו קליפות רימונים, בשלב הנכון של ההיריון, יכול למנוע את התופעה.