

דו"ח מסכם
לתכנית מחקר מספר 11-0601-356

רזברטרול בהזנת עופות - אמצעי להקטנת יבוא גרעינים

Resveratrol in poultry feeding – a mean to reduce grain import

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות
צוות ההיגוי: הערכות החקלאות בפני משבר המזון 02-5382

ע"י

מרס פרידמן עינת בעלי חיים, מינהל המחקר החקלאי, רחובות

מרק רוזל בעלי חיים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן

שרה יוספי בעלי חיים, מינהל המחקר החקלאי, רחובות

Miriam Friedman-Einat, Institute of Animal Science, ARO, Rehovot, P.O.B. 6 Bet-Dagan. E-mail:
miriamf@volcani.agri.gov.il

Mark Ruzal, Institute of Animal Science, ARO, Rehovot, P.O.B. 6 Bet-Dagan. E-mail:
markr@volcani.agri.gov.il

Sara Yosefi, Institute of Animal Science, ARO, Rehovot, P.O.B. 6 Bet-Dagan. E-mail: yosefis@volcani.agri.gov.il

תקציר

הצגת הבעיה: הזנת עופות מבוססת כמעט במלואה על גרעינים וכוספאות מיובאים, וצורכת כ 70% מכלל הגרעינים המיובאים למאכל בעלי חיים בישראל. לכן, מציאת דרכים לשפר את יעילות ההזנה ונצילות המזון היא מהמטרות החשובות ביותר בשלוחת העופות. עדויות שפורסמו בקרוב ל 7000 מאמרים בעיתונות המדעית מצביעים על הפוטנציאל של טיפול ברזברטרול להשגת מטרות אלה.

מטרות המחקר כפי שהופיעו בהצעת המחקר: מטרת המחקר הייתה פיתוח השימוש ברזברטרול כתוסף מזון בגידול עופות שעלותו נמוכה ואשר יאפשר העלאת יבולים (בשר וביצים) והקטנת הפחיתים ובאופן זה הקטנת הדרישה לגרעינים. המטרות הספציפיות היו לאתר את התנאים המיטביים והחסכוניים ביותר למתן הרזברטרול ולאפיין את השפעתו על גדילה וצבירת שומן, חיסכון באנרגיה, שיפור ההישרדות בפטמים ושיפור ביצועי ההטלה במטילות מבוגרות.

שיטות העבודה: נבדקו מספר רב של דרכים לטיפול בשלבי ההתפתחות הראשוניים של העופות (בעוברים ובאפרוחים) שעשויים לשפר את יעילות ההזנה והייצור בעופות בוגרים ונבחנו דרכים ומינונים לשימוש ברזברטרול כתוסף מזון בהזנה רציפה בפטמים ובמטילות.

תוצאות עיקריות: הראינו שהזרקת רזברטרול לאלבומין של העובר המתפתח מביא להקטנת צבירת השומן בפטמים בגיל 16 יום אחרי הבקיעה. הראינו שרזברטרול הניתן בתערובת יציב בתנאי הגידול המסחרי. אך מצאנו שכמו בבני אדם, יציבות הרזברטרול בדם העופות מוגבלת. בניסויי הזנה במינוני רזברטרול גבוהים, התקבלו השפעות משמעותיות על גדילה והטלה אך בכיוונים ההפוכים מהצפוי (האטת הגדילה וההטלה בפטמים ובמטילות, בהתאמה). אנו מאמינים כי השפעות אלה נובעות מתופעות לואי של תוצרי הפרוק של הרזברטרול ולכן פיתוחים חדשים שהביאו לשיפור מסיסות ויציבות הרזברטרול יוכלו לאפשר את המשך המחקר לקראת יישומו בעופות.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: למחקר זה תרומה חשובה לאפשרות העתידית של טיפול ברזברטרול בעופות, אך לא ליישום המידי. מעניין ביותר הממצא כי ניתן להשפיע על צבירת שומן בפטם בגיל 16 יום על ידי הזרקת רזברטרול לאלבומין של עוברים. טיפול זה קל ליישום בגידול המסחרי כי הזרקת רזברטרול לאלבומין יכולה לעשות באופן אוטומטי בעלות נמוכה כפי שנעשה למטרות חיסון. ניתן גם להחדיר רזברטרול לביצים על ידי הזנת האימהות. פתרונות לבעיות שעלו במחקר זה מפותחים כיום לשפור השימוש ברזברטרול בבני אדם, ויכולו לשמש גם לעופות בגידול המסחרי.

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)

חתימת החוקרת:



תאריך: נובמבר 2014

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

1. כנס מדע העופות של המועצה לענף הלול 2012,

2. Hen G, Yosefi S, Shinder D, Or A, Mygdal S, Condiotti R, Galun E, Bor A, Sela-Donenfeld D, Friedman-Einat M 2012 Gene transfer to chicks using lentiviral vectors administered via the embryonic chorioallantoic membrane. PloS one 7:e36531

3. מאמר מסכם נוסף על השפעת הרזברטרול בעופות ישלח לפרסום בקרוב.

מבוא

השיפור ההדרגתי ברמת החיים במזרח הרחוק והצריכה ההולכת וגוברת של מוצרי בעלי חיים הם מהגורמים העיקריים לצפי של המשך העלייה במחירי הגרעינים המיובאים המשמשים להזנת בעלי חיים. בניגוד למעלי גירה המפרקים צלולזה, ואשר מסיבה זו ניתן להאביסם במזון גס בהיקף של כ- 65% מתכולת המנה, הזנת עופות מבוססת כמעט במלואה על גרעינים וכוספאות מיובאים, וצורכת כ 70% מכלל הגרעינים המיובאים למאכל בעלי חיים בישראל. לכן, מציאת דרכים לשפר את יעילות ההזנה ונצילות המזון היא מהמטרות החשובות ביותר בשלוחת העופות.

בשני העשורים האחרונים הצטברו עדויות רבות שפורסמו בקרוב ל 7000 מאמרים בעיתונות המדעית על התועלת בצריכה של רזברטרול ועל יעילותו בשיפור המאזן המטבולי (1), בהקטנת צבירת שומן (2, 3), בשיפור בפעילות שריר הלב (4, 5), בהארכת תוחלת החיים (6, 7) ועוד. לכן, מטרת המחקר הייתה לבדוק באיזו מידה התועלות המטבוליות שהודגמו במגוון בעלי חיים יוכלו להשפיע על מדדי הייצור של העופות ולהביא לחיסכון בהזנה.

רזברטרול היא מולקולה קטנה המיוצרת בצמחים כהגנה מפני מזיקים. רמה גבוהה במיוחד נמצאת בקליפות ענבים (לכן מצויה בין האדום) ובשורש הצמח הנפוץ במזרח Japanese Knotweed, שממנו ניתן להפיק כמויות גדולות של רזברטרול בעלות נמוכה. בניגוד לתוספי מזון רבים אחרים, אופן הפעולה של הרזברטרול ידוע ונחקר במחקרים מדעיים. בבעלי חיים ירודים (שמרים, תולעים וזבובים) טיפול ברזברטרול מפעיל את החלבון Sirtuin-2 שתפקידו להגיב למצב של ירידה באנרגיה הזמינה ושבאופן טבעי מופעל על ידי ניקוטינאמיד-אדנין-דינוקלאוטיד מחזור (NAD⁺) (מיוצר במיטוכונדריה במצב של מחסור באנרגיה). מחקרים רבים הראו כי סיגנל של מחסור באנרגיה מביא לשיפור מטבולי משמעותי שמתבטא בשיפור הרגישות לאינסולין, בהקטנת צבירת שומן ובהקטנת תהליכים דלקתיים שקשורים במחלות לב ובבעיות תפקוד אחרות שביחד גורמים להארכת תוחלת החיים (8). החלבון ההומולוגי ביונקים ל Sirtuin-2 המכונה SIRT1, אופייני כבעל תפקיד חשוב בבקרה על חילוף חומרים בכבד, בשריר ובתאי שומן. נמצא כי NAD⁺ ורזברטרול מפעילים את תוצר הגן SIRT1 בבעלי חוליות, בדומה למנגנון שהודגם לגבי Sirtuin-2 בבעלי החיים הירודים (2, 9).

בעופות לא נערכו מחקרים בהקשר זה כלל. הנחת העבודה שלנו הייתה כי השיפורים המטבוליים הנובעים מטיפול ברזברטרול שאופיינו ביונקים, יוכלו להועיל למדדי הייצור בעופות. על פי העדויות הרבות על פעילות הרזברטרול בבעלי חיים אחרים ובתאים בתרבות, שפורסמו בכ 7000 מאמרים, הצפי במחקר זה היה:

א. בפטמים טיפול ברזברטרול יביא להקטנת צבירת השומן ושיפור בנצילות המזון כתוצאה מהגדלת כמות הבשר והפחתת השקעה של אנרגיה בצבירת שומן. בנוסף, השיפור המטבולי צפוי היה שישפר את שרידות הפטמים ויקטין את הפחיתים הנובעים מתמותה.

ב. במטילות הטיפול יביא להארכת משך ההטלה היעילה של המטילות הקלות (המייצרות את ביצי המאכל) והכבדות (המייצרות את ביצי הרבייה). הנחת העבודה הייתה כי שיפור ההטלה בגיל המבוגר יאפשר חיסכון רב ביבוא גרעינים על ידי הקטנת חלקה היחסי של התקופה הבלתי יצרנית, דהיינו, תקופת גידול הפרגיות (כ 4 חודשים) שבה הפרגיות צורכות גרעינים מיובאים אך אינן מטילות.

1. תוצאות עיקריות

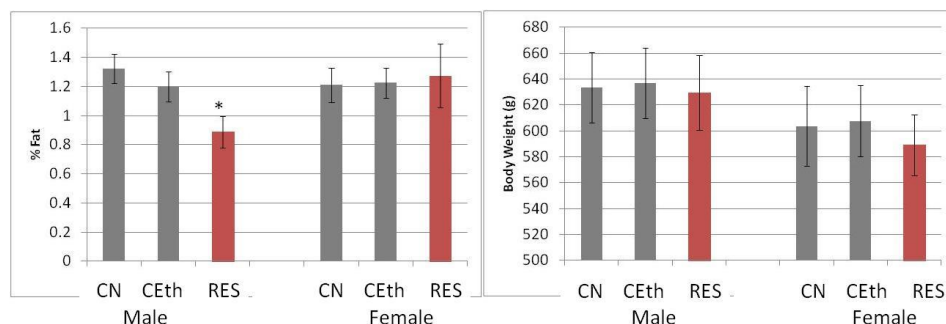
1.2. טיפול ברזברטרול בשלבי ההתפתחות המוקדמים של העובר/האפרוח

רציונל: המטרה בתחילת המחקר הייתה לבדוק את האפשרות לשיפור מטבולי בבוגר על ידי טיפול בשלב העוברי שבו מתהווה רקמת השומן. מחקרים רבים הראו כי למספר תאי השומן הנקבע בשלבי ההתפתחות המוקדמים השפעה מטבולית משמעותית על צבירת שומן בבוגר (16, 17). מחקרים אלה, והיתרונות היישומיים של הטיפול בשלבי ההתפתחות המוקדמים (מבחינת החיסכון בחומר) היו הגורמים שהביאו אותנו להתמקד בניסויים בשלבי התפתחות מוקדמים (לפני ומיד אחרי הבקיעה) בשנת המחקר הראשונה. בניסויים אלה נעזרנו במאמר שבו נעשה אפיון מפורט של התפתחות רקמת השומן העוברית בעופות (18). מאפיון זה ניתן להסיק שרקמת השומן מתחילה להתפתח ביום 12 של ההדגרה. הצפי היה שבניסויים אלה ניתן יהיה ללמוד בנוסף על ריכוזי המטרה של הרזברטרול שאליהם כדאי יהיה להגיע גם בניסוי ההזנה. זאת מאחר שקל יותר לשלוט בריכוזי הרזברטרול בדם על ידי הזרקה. את איכות הרזברטרול שבו השתמשנו במחקר זה בדקנו הן בבדיקה של HPLC והן בניסוי שבו נערכה השוואה בין הרזברטרול הזול מחברות ג'יאנגסינג שבסין לרזברטרול היקר פי 10,000, מסיגמא. האפשרות של רכישת רזברטרול בכמויות גדולות ובעלות נמוכה מהחברה בסין מהווה תנאי ליישום המחקר.

1.1.2. הזרקת רזברטרול לאלבומין בשלב E12 של ההתפתחות

רזברטרול מומס באתנול ($50 \mu\text{g/ml}$; $100 \mu\text{l}$). הוזרק או לאלבומין או לשק האוויר של ביצי פטמים מופרות מזן קוב בשני מינונים של רזברטרול (נפח של 100 ו-200 מיקרוליטר לכל ביצה). הזרקה לשק האוויר של הממס (אתנול) היה רעיל בשני הנפחים שנוסו (בניגוד לדיווחים בספרות (19)) בעוד שהזרקת לאלבומין במינון הנמוך של הרזברטרול (בנפח של 100 מיקרוליטר) לא פגע בבקיעה ובהתפתחות (תוצאות מפורטות בדוח שנת המחקר הראשונה). קבוצת ביקורת אחת לא טופלה כלל, קבוצת ביקורת שניה הוזרקה באתנול (הממס) וקבוצת הטיפול הוזרקה ברזברטרול מומס באתנול. ההזרקה נעשתה ביום 12 של ההדגרה (E12), ב 22 ביצים בכל קבוצה. ההזרקה נעשתה בעזרת מחט G18 דרך חור בביצה שנאטם אחרי ההזרקה בדבק חם. הביצים הוחזרו לאינקובטור להמשך ההדגרה. לא הייתה ירידה משמעותית של ההזרקה על יעילות הבקיעה והיא עמדה על מעל 90% בשלושת הקבוצות. המעקב עד גיל 16 יום מפורט בדוח השנה הראשונה, באיור 1 מובאות התוצאות המשמעותיות ביותר.

איור 1: השפעת הזרקת רזברטרול לאלבומין על צבירת שומן בגיל 16 יום אחרי הבקיעה



משקל הגוף ואחוז שומן תוך בטני (visceral fat) נמדדו בפטמים מזן קוב בגיל 16 יום לאחר הבקיעה: CN - עופות שלא עברו כל טיפול (9 ו 8 זכרים ונקבות, בהתאמה). CEth - עופות שהוזרקו באתנול בלבד (9 ו 12 זכרים ונקבות, בהתאמה) ו RSV - עופות שהוזרקו ברזברטרול (8 ו 9 זכרים ונקבות, בהתאמה) הבדל משמעותי

(n = 0.05) נמצא רק ברקמת השומן של הזכרים המחושב כאחוז ממשקל הגוף. הקווים המאונכים מייצגים את שגיאת התקן (SE).

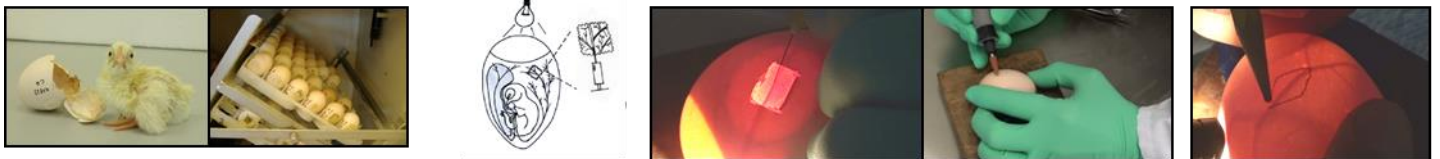
סיכום ומסקנות: ההשפעה על רקמת השומן מעודדת ומעידה כי ניתן להשפיע על התפתחות רקמת השומן על ידי טיפול ברזברטרול בשלב העוברי. אך יתכן כי הגבלת המינן עקב רעילות הממס הגבילה את היכולת לבחון את מלא הפוטנציאל של הטיפול בעוברים (דיון בדרכים לשיפור הטיפולים בניסויי המשך מפורטים בפרק הסיכום והדיון בעמוד 19).

2.1.2. הזרקת רזברטרול לווריד הממבראנה הכוריואלנטואית (chorioallantoic membrane CAM)

השיטה להזרקת רזברטרול לעובר תוך ניצול הגישה הנוחה למערכת הדם החיצונית של ה CAM, מתוארת באיור 2.

איור 2: תיאור שיטת הזרקת הרזברטרול לווריד ה CAM

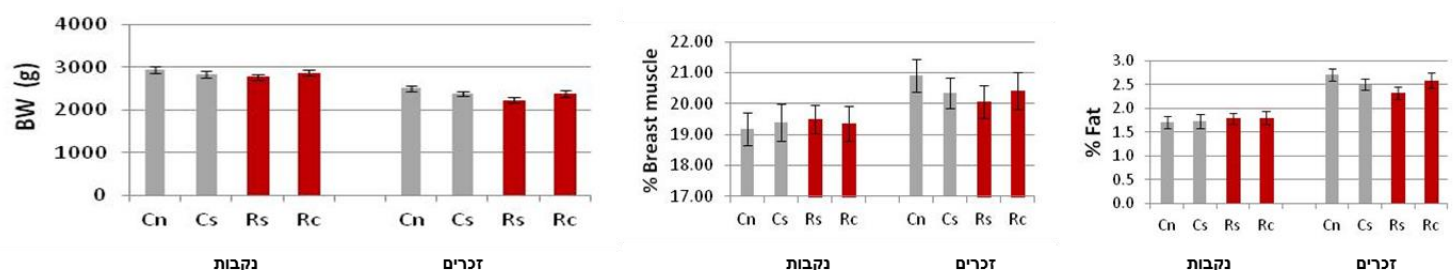
1. סימון וריד 2. הסרת הקליפה הסדנית בעזרת מחרטה עדינה 3. הזרקת הרזברטרול 4. המשך ההדגרה עד לבקיעה



איור 2: בכל עובר בגיל 16 יום נבחר וריד מרכזי באזור לא מסועף והוצאה מסביבו הקליפה הסדנית ללא פגיעה בממברנה הפנימית הצמודה. הזרקת של 50 מיקרוליטר תמיסה נעשתה בעזרת מזרק בעל מחט דקה במיוחד (26G). לאחר ההזרקת החלון נאטם בעזרת דבק חם והעובר מוחזר לאינקובטור עד לבקיעה. 95% מהעוברים המוזרקים בקעו. שיטה נמצאה יעילה להזרקת לעובר של חומרים מומסים במדיום או PBS החל מיום 11 של ההתפתחות העוברים (E11) ועד ל-E16 כפי שמתואר במאמר שפורסם במעבדתנו בעקבות מחקר זה אך בשימוש אחר (20).

בשיטה המתוארת באיור 2 נערכו מספר ניסויים מקיפים כדי לבחון את השלב והממס המתאימים להזרקת הרזברטרול. מאחר שהרזברטרול לא ניתן להמסה במדיום או PBS ברמה מספיקה (על פי הנתונים בספרות המטרה הייתה להגיע למינון של 100 מ"ג רזברטרול לק"ג משקל גוף של העובר (50 מיקרוליטר; 1 מקרוגר' רזברטרול למ"ל לעובר, השוקל כ 10 גר בשלב E12), בניסויים מקדימים הוזרק רזברטרול ממומס באתנול או DMSO ובשני הממסים ההזרקת פגעה בשרידות העוברים. לכן עברנו לשימוש בסולוטול (ממס אורגני שמשמש להמסת רזברטרול בניסויים בבעלי חיים (21) ומצאנו שהוא ניתן להזרקת לווריד העובר ללא כל נזק בשלב E16. לניסוי המתואר באיור 3 נרכשו 90 ביצים מופרות מזן קוב (ממדרגת בראון ובניו, הוד השרון), בעלי משקל ביצה דומה וטפלו בהזרקת לווריד ה CAM כמתואר באיור 2. הביצים חולקו לארבעת הקבוצות על פי משקל ופיזור משקלי דומה בין הקבוצות. ביום 16 להדגרה בוצעה הזרקת של תמיסות רזברטרול מחברות ג'יאנגסינג וסיגמא. האפרוחים שבקעו, גודלו בתנאים המקובלים, בגישה חופשית למזון ולמים עד גיל 40 יום. באיורים 3 ו 4 מוצגות תוצאות נבחרות מהניסוי.

איור 3: תוצאות טיפול ברזברטרול מג'יאנגסינג ומסיגמא בהזרקת לווריד ה CAM בעוברים ביום 16 של ההדגרה

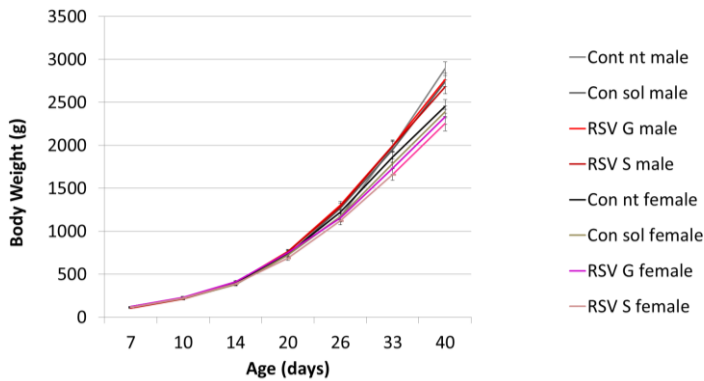


איור 3: העופות נקטלו בגיל 40 יום. משקל גוף העופות (BW), אחוז שריר החזה ואחוז השומן התוך בטני. נמדדו ביום סיום הניסוי. לא נמצאו הבדלים מובהקים ($p \leq 0.05$) בין Cn, ביקורת ללא טיפול; Cs, ביקורת סולוטול (הזרקת של הממס בלבד); Rs, הזרקת של רזברטרול מחברת סיגמא; Rc, הזרקת של רזברטרול מחברת ג'יאנגסינג. מספרי העופות בניסוי ונתוני הבקיעה מסוכמים בטבלה

טיפול	מס ביצים	בקיעה	אחוז בקיעה	תמותה	זכרים	נקבות
ביקורת ללא טיפול	22	20	91	2	9	9
ביקורת מוזרקים בסולוטול	23	20	87	2	7	11
מוזרקים ברזברטרול מסגמא	23	21	91	0	12	9
מוזרקים ברזברטרול מג'יאנגסינג	22	19	86	4	8	7

האחוז המשקלי של רקמות נוספות שנבדקו (לב, טחול, כבד, לבלב) לא נבדלו בין הטיפולים (תוצאות מוצגות בדוח שנת המחקר הראשונה). השפעת הטיפולים על גדילת העופות במהלך הניסוי מתוארת באיור 4. גם כשמאחדים את שתי קבוצות הטיפול ושתי קבוצות הביקורת לא ניתן לראות השפעה משמעותית של הטיפול ברזברטרול על המדדים שנבדקו. (תוצאות מפורטות מוצגות בדוח שנת המחקר הראשונה).

איור 4: גדילת העופות ונצילות המזון בעופות שטופלו ברזברטרול בהזרקה ל CAM



מגדר	טיפול	נצילות מזון	שגיאת תקן
זכרים	ביקורת ללא טיפול	1.53	0.13
	ביקורת סולנטול	1.53	0.12
	רסברטרול ג'יאנגסינג	1.53	0.13
	רסברטרול סיגמה	1.56	0.14
נקבות	ביקורת ללא טיפול	1.55	0.14
	ביקורת סולנטול	1.54	0.13
	רסברטרול ג'יאנגסינג	1.62	0.14
	רסברטרול סיגמה	1.55	0.13

איור 4: משקל גוף העופות נמדד בימים 7, 10, 14, 20, 26, 33, ו 40. העלייה המצטברת במשקל נבדלה באופן מובהק ($p < 0.05$) בין זכרים לנקבות אך לא בין הטיפולים. תוצאה זו מודגמת גם כשחישוב נעשה לכל קבוצה בנפרד (הוצג בדוח השנתי). יעילות המרת המזון (טבלה) חושבה, על ידי חלוקת סך כל צרכת המזון בניסוי לסך כל העלייה במשקל הגוף לעוף. הטיפולים לא השפיעו באופן משמעותי על יעילות המרת המזון.

באיורים 3 ו 4 בכל אחד מהמינים נמצאה נטייה של משקל גוף גבוה יותר בקבוצות שטופלו ברזברטרול. אך השפעות אלה לא היו משמעותיות מהבחינה הסטטיסטית ($p < 0.05$) לא לכול קבוצה בנפרד, (מספרי העופות בכל קבוצה מוצגות באיור 3) ולא בהשוואה של שתי קבוצות הביקורת: בזכרים $n = 16$ ובנקבות $n = 19$; מול שתי הקבוצות המטופלות ברזברטרול: בזכרים $n = 20$ ובנקבות $n = 16$.

סיכום ניסוי ההזרקה ל CAM: על פי התוצאות ניתן להסיק כי הזרקה יחידה של רזברטרול בשלב E16 של ההתפתחות ובריכוז של כ-20 מיקרוגרם לגרם משקל גוף (מחושב על פי נפח ההזרקה ומשקל משוער של עובר בגיל 16 יום) לא השפיעה על מדדי הייצור בגיל שיווק וגם לא על קצב הגדילה ונצילות המזון במהלך הגדילה. יתכן כי ניתן יהיה לקבל השפעה משמעותית במדגם גדול יותר או במינונים גבוהים יותר. בגלל המגבלות הטכניות של השיטה החלטנו לנסות שיטות נוספות.

מסקנה חשובה מניסוי זה היא שחוסר התגובה לטיפול ברזברטרול אינו נובע מעיילות פחותה של החומר שנרכש בסין מחברת ג'יאנגסינג.

3.1.2. טיפול ברזברטרול בהזלפה לחלל הפה (הגמעה) באפרוחים אחרי בקיעה

רציונל: הספיגה של רזברטרול דרך תאי האפיתל של חלל הפה בבני אדם ובחיות מודל נמצאה יעילה יותר מאשר בהזרקה לדם או מתן דרך מערכת העיכול או כל דרך אחרת (22). לכן בדקנו את ההשפעה של הגמעה של תמיסת רזברטרול לאפרוחים ביום הבקיעה. השתמשנו בניסוי זה בנקבות שבהן צבירת השומן רבה יותר מאשר בזכרים בהנחה כי בהן ניתן יהיה להדגים טוב יותר את השפעת הרזברטרול על האטה בצבירת השומן.

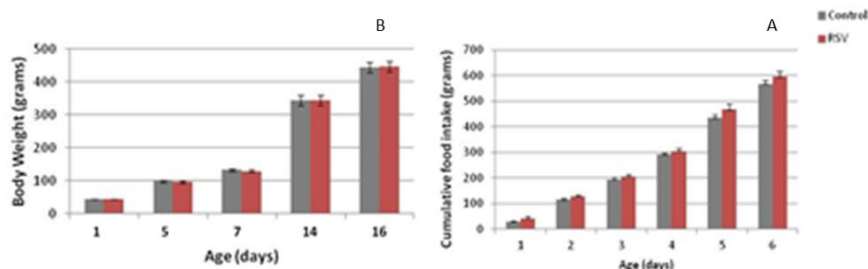
נרכשו 80 אפרוחות מזן קוב בגיל יום מחברת בראון. נבחרו 60 אפרוחות בעלות משקל גוף דומה (43.7 ± 4) וחולקו ל 4 קבוצות בעלות פיזור משקלי דומה. טיפול בהגמעה של רזברטרול מומס ב 60% אתנול בנפח של 0.2 מ"ל 10 mg/kg

(BW) ושל 0.1 מ"ל (50 mg/kg BW) ושל הממס בלבד, ניתן ביום ראשון של הגידול. תוך כדי הטיפול ניתן היה להבחין בתגובה שלילית לממס האלכוהולי בריכוז הגבוה ולכן כל העופות שנשארו (n = 39) טופלו בנפח של 0.1 מ"ל שלגביו לא הובחנה כל תגובה שלילית. חזרנו על הטיפול גם ביום השני של הניסוי ובהמשך נערך מעקב אחר הגדילה וצריכת המזון. (איור 5). המעקב אחר צריכת המזון נערך לגבי כל טיפול ב 4 קבוצות שהיו מסודרות בכלובים לסירוגין, זאת מאחר שבגיל הצעיר לא ניתן להפריד אפרוחים ולגדלם בכלובים אינדיבידואליים.

איור 5: השפעת הגמעת אפרוחות מזן קוב ברזברטרול על משקל גוף וצריכת מזון עד גיל 16 יום

המשקל היחסי של הרקמות המטבוליות: שומן כבד

שמן			
טיפול	משקל	שגאת תקן	משקל יחסי
RSV	5.29	0.34	1.17
ביקורת	5.75	0.30	1.28
כבד			
טיפול	משקל	שגאת תקן	משקל יחסי
RSV	19.74	0.75	4.51
ביקורת	21.02	0.52	4.76
לבלב			
טיפול	משקל	שגאת תקן	משקל יחסי
RSV	2.15	0.12	0.49
ביקורת	2.18	0.09	0.49



איור 5: צריכת המזון המצטברת (A) וקצב הגדילה (B) לא הושפעו מהטיפול הרזברטרול. נצילות המזון חושבה על בסיס הנתונים הסופיים של משקל גוף מצטבר וצריכת מזון מצטברת ונמצאה שווה ל 1.41 בביקורת האתנול ו 1.49 בקבוצת המטופלים ברזברטרול. כשהאפרוחות הגיעו לגיל 16 יום נקבע האחוז המשקלי של הרקמות המטבוליות יחסית למשקל הגוף לפני קטילת העופות (טבלה).

מהנתונים באיור 5 ניתן לראות כי הגמעה במינון של 100 מיליגרם לק"ג משקל גוף של רזברטרול מומס באתנול ביום 1 ו 2 של אפרוחות מזן קוב, אינה משפיעה על גדילה, צריכת מזון, הרכב הגופה ונצילות המזון בגיל 16 יום לעומת אפרוחות שטופלו בממס בלבד. יתכן כי המינון שהוגבל עקב רעילותו של האתנול לא הספיק לקבלת התגובה גם בנקבות.

4.1.2. הזרקה לחלל הבטן של אפרוחים אחרי הבקיעה, מעקב אחר יציבות הרזברטרול בדם והאפשרות לשיפור היציבות בעזרת פיפרין.

רציונל: לאור ההגבלה של כמות הרזברטרול שניתן להזריק לווריד ה- CAM או במתן בהגמעה בגלל רעילות הממסים, ניסינו להזריק רזברטרול מומס בסולוטול לחלל הבטן של אפרוחים אחרי בקיעה. בנוסף, עקבנו אחר נוכחות הרזברטרול המוזרק בדם ובדקנו את האפשרות לשיפור היציבות על ידי תוספת של פיפרין. פיפרין הוא אלקלואיד המופק מפלפל שחור ואופיין כמעכב של האנזים גלוקורונידאז בכבד - אנזים שמוסיף חומצה גלוקורונית למולקולות שונות כמו רזברטרול ובכך מזרז את קצב פינוי הרזברטרול מהדם. בעקבות דיווח על שיפור היציבות של רזברטרול (10) עד לפי עשרה, החלטנו לבדוק את ההשפעה של תוספת זו בעופות.

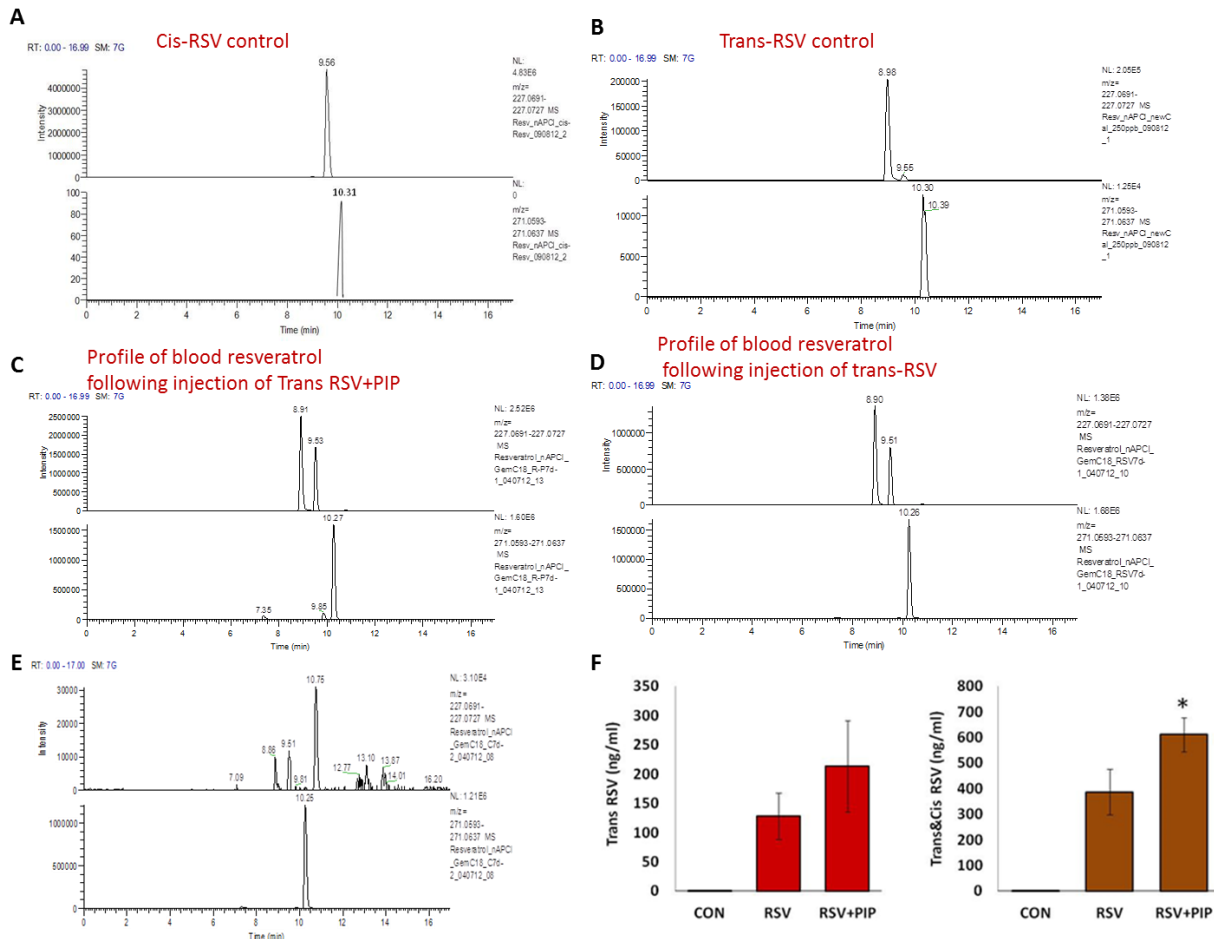
בניסוי בהקף קטן, שנועד לבחינת יציבות הרזברטרול בדם, נבחרו 9 אפרוחים זכרים מזן קוב בגיל 7 ימים בעלי משקל גוף דומה. לשלושת קבוצות הטיפול, שבכל אחת 3 אפרוחים, הוזרקו לחלל הבטן התמיסות הבאות בנפח של 200 מיקרוליטר:

(1) רזברטרול במינון של 100 מיליגרם לק"ג משקל גוף, (2) רזברטרול באותו מינון אך בתוספת של פיפרין (מינון של עשירית מהכמות של הרזברטרול) (3) הממס, סולוטול. דוגמת דם שנלקחה מכל אפרוח חצי שעה לאחר ההזרקה נשלחה לאנליזה ב LC-MS במרכז הצידוד הבין מחלקתי בפקולטה לחקלאות ברחובות. תוצאות האנליזה מודגמות באיורים 6 ו 7. באיור 6 ניתן לראות פרופיל הרזברטרול בדם, בהשוואה לסטנדרטים של האיזומרים טרנס וציס שנרכשו

מחברת מסיגמא כדי לשמש כביקורת. הפרופיל של צורת הטרנס מסיגמא היה זהה לפרופיל של הרזברטרול ששימש לניסויי ההזרקה (מחברת ג'ינסג). נראה כי במחזור הדם כמחצית מהרזברטרול נמצא במצב ציס (איור 6) תופעה שידועה גם ממחקרים ביונקים. באפרוחים שהוזרקו במסמס בלבד ניתן היה לראות רמה נמוכה בכמה סדרי גודל של גזרות של רזברטרול שמקורן בתערובת הסטנדרטית של העופות.

איור 6: אנליזה ב MS - LC, של רזברטרול בדם העופות בעקבות הזרקת רזברטרול בנוכחות ובהעדר פיפרין לחלל

הבטן של אפרוחים



איור 6: פרופיל הרזברטרול בדם מחצית השעה אחרי ההזרקה לחלל הבטן (IP) של רזברטרול (100 מ"ג לק"ג משקל גוף) או רזברטרול בתוספת פיפרין (PIP, בכמות של עשירית מכמות הרזברטרול). לגבי כל אנליזה (A עד D) הגרף התחתון מתאר ביקורת פנימית לאחידות ההפרדה בקולונה. הגרף העליון מתאר את הרזברטרול. תרשים דומה נמצא בכל שלשת הדוגמאות של אותו טיפול הוצגה דוגמא אחת מכול טיפול. המספרים מעל לעקומות מיצגים את העמדה שבה נצפו המולקולות בהפרדה בקולונה. הטרנס-רזברטרול נצפה בעמדה 8.90 עד 8.98 בעוד שה ציס-רזברטרול נצפה בעמדה 9.51 עד 9.56, פרופיל הרזברטרול בדוגמת דם מעוף שטופל במסמס בלבד. על פי ערכי הסקלה ניתן לראות כי כמויות מזעריות של רזברטרול ותוצרי פרוק שלו נמצאים בדוגמא זו ומקורם במזון הבסיסי שניתן לעופות. F, כמות הרזברטרול בדם שחושבה בשושלת המטופלים ברזברטרול ובשלושת המטופלים ברזברטרול בתוספת פיפרין. הכימות נעשה על פי הביקורות (A ו B) שהוטענו לקולונה בכמות ידועה הקווים המאונכים מיצגים את שגיאת התקן. הכוכבית מייצגת מובהקות סטטיסטית ($P < 0.05$).

באיור 6F ניתן לראות כי בנוכחות פיפרין כמות הרזברטרול הכללי בדם כמעט כפולה מאשר בהעדרו (387 ± 88 לעומת 611 ± 67 ננוגרם/מ"ל). בבדיקה של טרנס רזברטרול הנטייה הייתה דומה אבל ההבדל לא היה מובהק כך שלא ניתן להכריע אם תוספת פיפרין עשויה לשפר את יעילות הטיפול ברזברטרול. לאור הממצאים המעודדים בעכברים (10 ו 64 עד 66) החלטנו לבדוק את השפעתו על טיפול ברזברטרול בעופות.

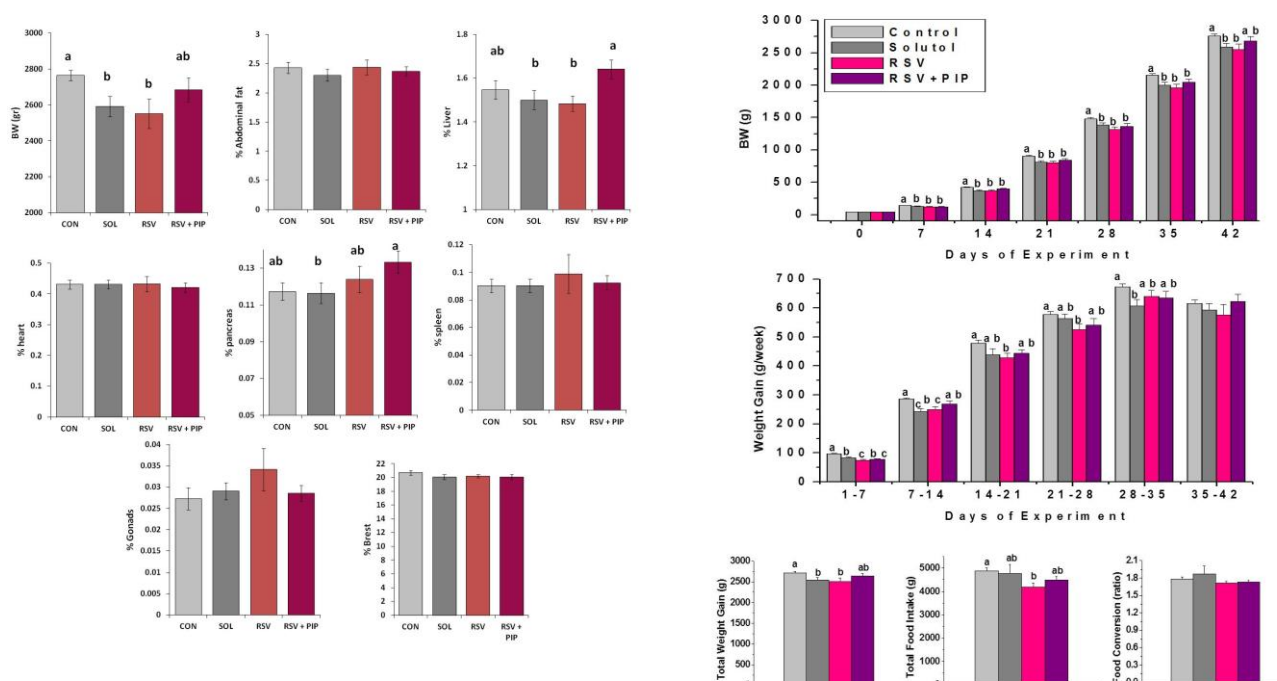
הזרקה של רזברטרול בתוספת ובהעדר פיפרין לחלל הבטן של אפרוחים מזן COBB.

נרכשו 200 אפרוחים זכרים מזן קוב מחברת בראון ובניו. האפרוחים חולקו ל-4 קבוצות בנות 40 אפרוחים בכל קבוצה כך שממוצע ופיזור משקלי הגוף של האפרוחים היה אחיד בכל הקבוצות. קבוצות הניסוי כללו: קבוצת ביקורת ללא כל טיפול, קבוצה שטופלה בממס בלבד, קבוצה שטופלה ברזברטרול (100 mg/kg BW), וקבוצה שטופלה ברזברטרול ופיפרין (אותו מינון של רזברטרול בתוספת של פיפרין (10 mg/kg BW)).

בגיל שבוע נערכה הזרקה לחלל הבטן כפי שמתואר באיור 6, אך בניסוי זה חזרנו על ההזרקה גם למחרת בניסיון למקסם את ההשפעה. ביום שלמחרת נמצאו אפרוחים מתים כמצוין בטבלה שבאיור 7. מאחר שהאפרוחים שלא מתו נראו בריאים לחלוטין, המשכנו בניסוי ובמעקב עד גיל 42 יום.

על פי התמותה המועטה (כצפוי) בקבוצת הביקורת, נראה כי התמותה בקבוצות הניסוי נבעה מהטיפול בהזרקה. מאחר שהזרקה לחלל הבטן היא פרוצדורה שכיחה שלא ידועה כמזיקה (לאחרונה השתמשנו בשיטה זו באפרוחים קלים להחדרת אנטגוניסטים ללפטין (23)) אנו מניחים כי ההשפעה המזיקה היא של הסולוטול ולא של עצם ההזרקה. המעקב אחר קצב הגדילה, צריכת המזון ונצילות המזון מוצגים באיור 7. נראה כי הסולוטול השפיע על ירידה בקצב הגדילה (Weight gain) בשבוע השני (ימים 7-14) והרביעי (ימים 28-35), אך לטיפול ברזברטרול עם וללא תוספת של פיפרין לא הייתה השפעה על הגדילה בהשוואה לקבוצת הביקורת של הסולוטול. גם בבדיקת צריכת המזון ונצילות המזון לא היה הבדל בין קבוצות הטיפול לקבוצת הביקורת של הסולוטול.

איור 7: השפעת הזרקת רזברטרול בתוספת ובהעדר פיפרין לחלל הבטן של פטמים (קוב) בגיל שבוע.



איור 7: השפעת הזרקת RSV בתוספת והעדר PIP לחלל הבטן של אפרוחים טבלה 1: תמותת עופות במהלך הניסוי

טיפול	תמותה	עופות בסוף הניסוי
ביקורת - ללא הזרקה	4	36
הזרקת הממס	15	25
RSV	23	17
RSV + PIP	17	23

על קצב הגדילה, צריכת מזון ונצילות מזון. נערך מעקב שבועי אחר משקל הגוף וצריכת המזון וחיישורה נצילות המזון של העופות שבניסוי. מיד אחרי הקטילה נשקלו רקמות הגוף ומשקלן יחסית למשקל העופות לפני הקטילה מוצג באיור. הקווים המאונכים מיצגים את שגיאת התקן. הבדלים משמעותיים מוצגים באותיות שונות ($P < 0.05$). מספר העופות בכל קבוצה מוצגים בטבלה. . הקווים המאונכים מיצגים את סטיית התקן, אותיות שונות מייצגות שונות סטטיסטית ($p < 0.05$).

על פי התוצאות באיור 6, הטיפול בסולוטול השפיע על ירידה במשקל הגוף ביום 42. אך לטיפול ברזברטרול או לטיפול המשולב של רזברטרול ופיפרין לא הייתה השפעה משמעותית יחסית לקבוצת הביקורת של הממס בלבד. לטיפולים לא הייתה השפעה על האחוז המשקלי של צבירת השומן, החזה הלב הטחול והגונדות. בלבב ובכבד נמצאה עליה בטיפול המשולב של הרזברטרול והפיפרין לעומת הביקורת של הממס בלבד. השפעה זו על הלבב והכבד אינה צפויה מאחר שהיא אופיינית למצבים של השמנת יתר (24, 25).

סיכום הניסוי. סביר להניח כי ההשפעה הרעילה שהייתה לממס סולוטול על העופות הביאה לתמותת העופות במהלך הניסוי ולירידה במשקל הגוף שנמדדה במהלך כל הניסוי ועד ליום 42. על רקע זה קשה לקבוע בוודאות את משמעות העלייה במשקל היחסי של הרקמות המטבוליות – הלבב והכבד לעומת הביקורת של הממס בלבד.

בניסוי שבוצע במקביל הזרקנו לחלל הבטן של אפרוחי לגהורן (מזן לוחמן) בגיל שבועיים אנטגוניסט ללפטין בכל יום במשך 10 ימים ללא שום השפעה חיובית או שלילית על השרידות, או הגדילה (23). לכן נראה שהבעיה נובעת מכך שלא ניתן להמיס רזברטרול ב מים או PBS בעיה שנראה שתוכל להיפתר בעתיד הקרוב (26).

5.1.2. סיכום הניסויים לטיפול ברזברטרול בשלב ההתפתחות המוקדם של העופות/אפרוחים

החשיבות של שלבי ההתפתחות המוקדמים על היעילות המטבולית בבוגר נבחנה במחקרים רבים ביונקים. חלקם בהקשר של רקמת השומן והעובדה שעיקר חלוקת התאים וקביעת גודלה של רקמת השומן נעשית בשלבים אלה (27, 28), וחלקם בהקשר רחב יותר כמו המחקרים המראים שהמצב המטבולי של אימהות בזמן ההיריון משפיע על העובר המתפתח ומשפיע על חייו הבוגרים (29-31). בעופות מעט מאוד נעשה בהקשר זה למרות שמהבחינה היישומית קיים יתרון עצום בפיתוח היכולת להשפיע על העופות בשלב העוברי או בתקופת האימון של האפרוחים. אנו ניסו מספר רב של שיטות (חלקם דווחו רק בדוח שנת המחקר הראשונה). חיפשו השפעות משמעותיות שלא ידרשו מדגמי עופות גדולים כדי להבחין בהם. ברוב הניסויים נתקלנו בבעיות של רעילות הממסים שהגבילו את יכולת הטיפול ואת המינונים. בעיות אלה לא היו צפויות כי לא דווחו בבעלי חיים אחרים. למרות כל זאת כן קבלנו השפעה משמעותית על צבירת שומן בזכרים בגיל 16 יום בעקבות הזרקת רזברטרול לאלבומין בשלב E12 של ההתפתחות העוברית. השפעה זו מצביעה על היתכנות הרעיון ומהווה בסיס לניסויי המשך (ראה פרק סיכום ודין בעמוד 18). אנו מניחים כי ההצלחה הרבה יותר של ההזרקה לאלבומין לעומת ההזרקה לווריד עשויה לנבוע מהשהות הממושכת יותר של הרזברטרול באלבומין מאשר בדם. באופן זה העובר נחשף לרזברטרול לתקופה ארוכה יותר.

גודל המדגם: בשלב ראשוני זה של המחקר ביצענו מספר ניסויים בקנה מידה קטן יחסית כי חיפשנו את הדרך היעילה ביותר לטיפול לפני ביצוע של ניסויים בהיקף גדול שימשכו עד גיל שיווק. בנוסף, האסטרטגיה הייתה לערוך סריקה של כמה שיותר שיטות כדי למצוא את היעילה ביותר. בהנחה שכדי שהטיפול יהיה משמעותי מהבחינה המסחרית הוא צריך לבוא לידי ביטוי גם במדגם קטן, חיפשנו השפעות מסוג זה. בניסויים בעכברים במדגמים קטנים מאלה שדווחו כאן נמצאו השפעות משמעותיות של טיפול ברזברטרול כפי שניתן לראות במאמר שמסכם עשרות מחקרים שנעשו בעכברים בהקשר של השפעות מטבוליות של טיפול ברזברטרול (32). על בסיס מחקרים

אלה ציפינו שההשפעה של הטיפול ברזברטרול תהיה משמעותית גם בקבוצות ניסוי קטנות. על פי התוצאות, הניסויים הבאים שנערכו בוצעו במדגמים גדולים כדאי להגביר את הסיכוי לאתר גם השפעות מתונות.

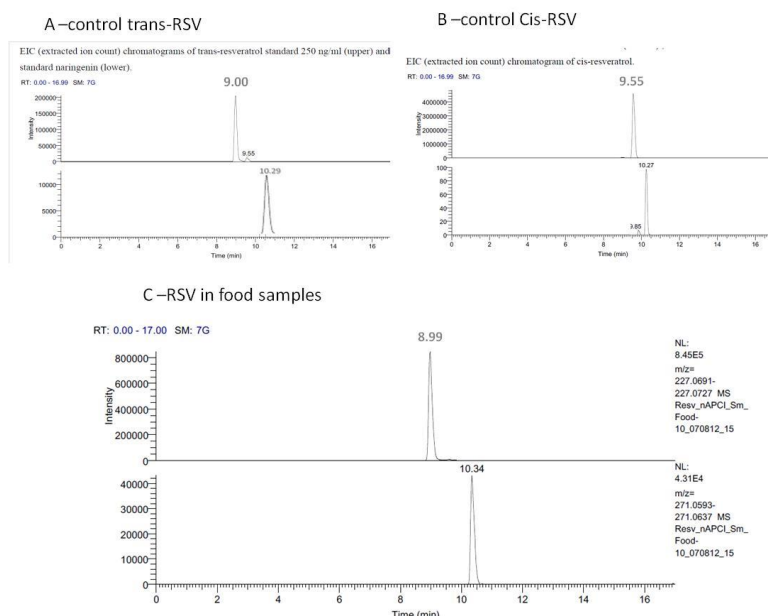
2.2. ניסויי הזנת פטמים

רצינול: למרות הצפייה לעילות רבה של עלות/תועלת בניסויים של הזרקה לעובר, נראה כי בדקנו את כל האפשרויות שעמדו בפנינו בתחום זה ולכן עברנו לניסויים של מתן רזברטרול בהזנה רציפה. החיסרון הייחודי בגישה זו היא עלות מחיר התערובת המכילה רזברטרול אך היתרונות הן קלות הטיפול והעדר גרימה של עקה לעופות המטופלים. בגלל האפשרות להפיק כמויות גדולות בעלות נמוכה מקנה השורש של עשב ה Japanese Knotweed בעיקר בהתחשב בעובדה שעבור הגידול המסחרי יתכן שלא יהיה צורך לנקות את הרזברטרול קרוב ל 100% ניקיון הנהוג לשימוש בבני אדם, אפשרות זו תתאים בהחלט ליישום מדי.

1.2.2. בדיקת יציבות הרזברטרול בתערובת בתנאי הניסוי

תערובת מסחרית מקובלת לגידול אפרוחי פיטום (שמגיעה בצורת כופתיות) נרכשה מחברת בראון ונטחנה לקמח כדי שניתן יהיה להוסיף באופן אחיד את תוספי המזון: רזברטרול במינון של 1 גרם ל ק"ג ורזברטרול באותו מינון בתוספת של פיפרין (במינון של 0.1 גרם ל ק"ג). כדי לבחון לפני תחילת הניסוי את יציבות התוספות בתערובות בתנאי הניסוי נערכה בדיקה של הרזברטרול בתערובות ב LC-MS בתנאי אחסון שונים: הקפאה ב -20°C מעלות בשקית שחורה מיד לאחר הוספתו לתערובת ועד לבדיקה ב LC-MS; שמירה בפח סגור או באבוס, בחשיפה מלאה לתאורה בחדר הגידול, במשך 16 יום. בכל שלשת התנאים נבדקו שלושת תערובות הניסוי (ביקורת, ורזברטרול בתוספת או העדר פיפרין).

איור 8: יציבות הרזברטרול בתערובת



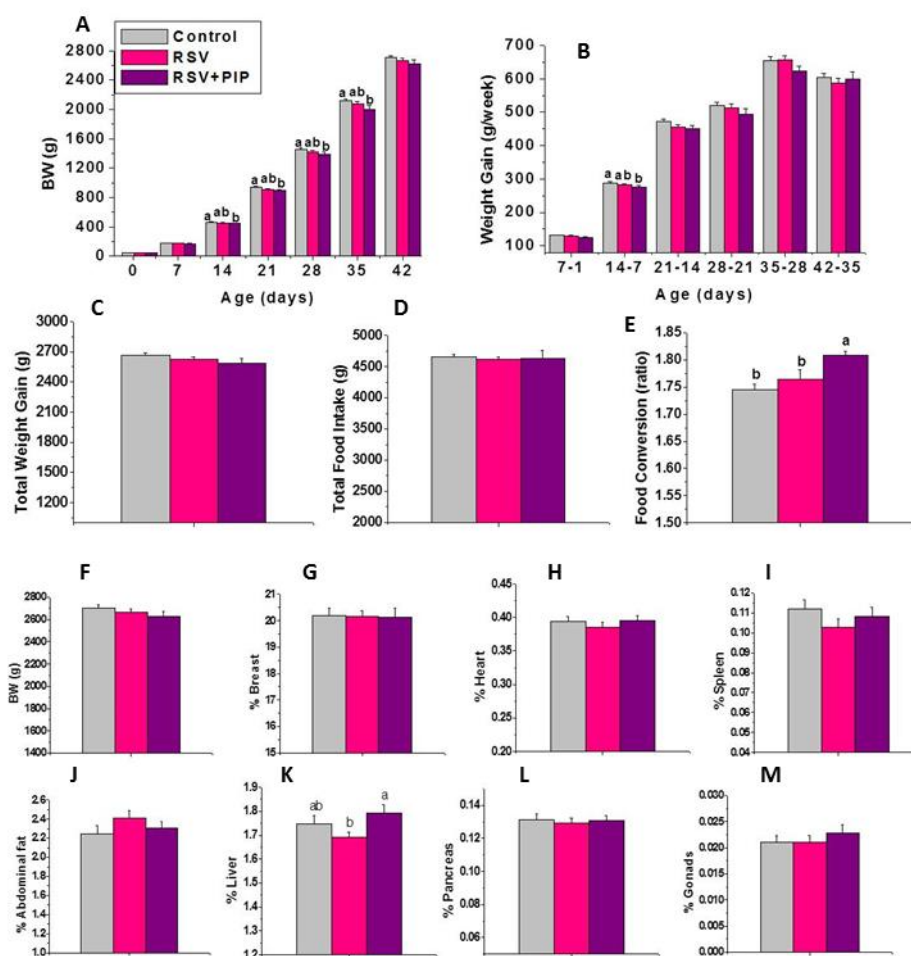
אנליזה של פרופיל ה RSV בתערובת וכמותו נעשה בשיטה של LC-MS. הביקורת של טרנס וציס RSV נקנו מחברת סיגמא. הפרופיל של ה RSV בתערובות (C) מיצג את שלושת הדוגמאות שנתנו תמונה דומה: הדוגמאות בתנאי האחסון השונים (ראה להלן) נראו בדיוק כמו התערובת בפרופיל C (רזברטרול בתערובת ששהתה באבוס בתאורה מלאה במשך 16 יום). התוצאות הכמותיות היו 1020 מ"ג לק"ג תערובת בתערובת א' שהוקפאה מיד לאחר ההכנה, 929 מ"ג לק"ג בתערובת ב' שנשמרה בפח סגור ו 989 מ"ג לק"ג בתערובת שנחשפה לאור. תוצאות אלה מעידות כי הרזברטרול בתערובות יציב בתנאי האחסון במתקן הלול בפחים ובחשיפה לתנאי התאורה בלול).

מכאן הסקנו כי ניתן להכין את התערובות לניסוי בכל שבוע ולשמור את התערובת בפח סגור בחדר הגידול במהלך הניסויים ולחלק את התערובת פעם ביום ללא חשש ליציבות הרזברטרול בתערובת.

1.2.2. ניסוי הזנה בפטמים מזן קוב בתערובת המכילה 1 מ"ג לק"ג רזברטרול

נרכשו 200 אפרוחים זכרים מזן קוב, נבחרו 120 בעלי משקל גוף דומה שחולקו ל 3 קבוצות של 40 אפרוחים כשבכל קבוצה משקל הגוף והפיזור המשקלי של האפרוחים דומה. עד גיל 20 יום גדלו האפרוחים בחדר אימון בקבוצות של 10 אפרוחים בקבוצה. בגיל 20 יום הועברו לחדרי גידול שבו הכלובים גדולים יותר וכל קבוצה חולקה לשתיים. במהלך כל הניסויים התערובות הוכנו בכל שבוע (תערובות הטיפול הכילו 1 גר' לק"ג רזברטרול עם או בלי תוספת של 0.1 מ"ג לק"ג פיפרין). המזון ניתן באכילה חופשית. בכל שבוע נשקלו כל העופות, ונערך מעקב אחרי צריכת המזון. הניסוי נמשך 42 יום, תוצאות המעקב והרכב הגופות שנבדק ביום 42 מפורטים באיור 9. אנליזות של יציבות הרזברטרול בדם ובתערובות הניסוי מוצגים בטבלה 2.

איור 9: השפעת הטיפול ברזברטרול על קצב הגדילה, צריכת המזון, נצילות המזון והרכב הגופה במהלך 42 יום



מעקב אחר משקל הגוף (A); שינוי במשקל גוף בכל שבוע במהלך הניסוי (B); שינוי במשקל הגוף בכל משך הניסוי (C); צריכת מזון כוללת (D); חישוב נצילות המזון (E); משקל בגוף לפני קטילת העופות בסיום הניסוי (F); והאחוז המשקלי של רקמות הגוף השונות (G עד M).

מספרי העופות בכל קבוצה בסוף הניסוי היו: (n = 37 control; n = 36 RSV; n = 35 RSV + PIP). הניסוי כלל 40 עופות בכל קבוצה אך במהלך הגידול הייתה תמותה טבעית וצפויה של שני עופות בכל קבוצה. בנוסף התגלו מקרים בודדים של טעויות בקביעת הזוג על ידי חברת בראון. טעויות אלה התגלו בזמן פתיחת העופות והתוצאות של שקילת המזון תוקנו בהתאם. לגבי העופות שמתו במהלך הניסוי, צריכת המזון המחושבת לעוף תוקנה על פי תאריכי התמותה.

הקווים המאונכים מציגים את שגיאת התקן. הבדלים משמעותיים מוצגים באותיות שונות (P < 0.05).

בסוף הניסוי נבדקה תכולת הרזברטרול בשלושת התערובות,

ובדוגמאות דם של ארבע עופות מכל קבוצת טיפול ב LC-MS (טבלה 2). בתערובות הרזברטרול היה יציב ובכמות הצפויה. בדם של העופות שטופלו ברזברטרול לא היה הבדל משמעותי בכמות הרזברטרול. אך נראה כי בניסוי זה הפיפרין לא הגביר את יציבות הרזברטרול בדם.

טבלה 2: אנליזה (LC-MS) של תכולת הרזברטרול בדוגמאות דם של העופות

Treatment	Blood RSV (ng/ml)	SE
RSV	10.4	1.1
RSV+ PIP	6.4	3.2

התוצאות המוצגות באיור 11 מראות כי לטיפולים לא הייתה השפעה על משקל הגוף בשבוע הראשון של הניסוי למרות שההזנה בתערובות הניסוי החלה ביום בקיעת האפרוחים והבאתם לניסוי. החל מהשבוע השני ועד השבוע החמישי (גיל 42 יום), נמצא הבדל מובהק במשקל הגוף של העופות מהטיפול המשולב של רזברטרול ופיפרין (p < 0.05) לעומת

קבוצת הביקורת. בטיפול ברזברטרול בלבד נראתה מגמה דומה אך לא היה הבדל מובהק. ההבדל במשקל הגוף היה מובהק עד השבוע החמישי של הגידול ולא בסיום הניסוי, דהיינו בגיל 42 יום. בחישוב תוספת המשקל נטו בכל שבוע (weight gain; איור 11B), העיכוב על ידי הטיפול המשולב של רזברטרול ופיפרין היה מובהק רק בשבוע השני של הגידול (ימים 7-14). עיכוב זה בקצב הגדילה שאינו משפיע על משקל הגוף הסופי ביום השייך יכול להוות יתרון ממשקי אילו היה מלווה בשיפור בהמרת המזון (המחושבת כיחס בין צריכת מזון כוללת והעליה במשקל הגוף). אך באיור 11E נראה כי ההשפעה על המרת המזון היא שלילית. על פי איור 11D כל קבוצות הטיפול צרכו את אותה כמות מזון במהלך הניסוי אבל יש להניח כי הנטייה לעליה פחותה במשקל הגוף ביום 42, שלא הייתה משמעותית מהבחינה הסטטיסטית, היא זו שהביאה ליחס של המרת המזון גבוהה יותר, שאיננה כלכלית. באיור 11K ניתן לראות כי ההשפעה המשמעותית היחידה על הרכב הגופה היה בהגדלת אחוז הכבד בטיפול המשולב של רזברטרול ופיפרין לעומת קבוצת הטיפול ברזברטרול בלבד. בדומה למה שמצאנו בניסויי ההזרקה לחלל הבטן (איור 7) לא ברור מה המשמעות של ממצא זה. בולטת במיוחד העדר ההשפעה על צבירת שומן הבטן.

על פי בדיקת רמת הרזברטרול בדם בניסויי ההזנה (טבלה 2; כ 10 נוגרם למ"ל) ספיגת הרזברטרול מהצריכה היומית הממוצעת של כ 180 מ"ג לעוף ליום (בגיל 42 יום) הינה נמוכה אך מתאימה לנתונים בספרות על ספיגת רזברטרול דרך מערכת העיכול באנשים ובחיות מודל (22, 33, 34). על פי הנתונים בספרות, בנוסף ליעילות ספיגה נמוכה, הרזברטרול עובר שינויים בשלושה אופנים: מעבר לצורת ציס, התמרה בסולפט או חומצה גלוקורונית (תהליכים הנעשים בעיקר בכבד), ופתיחת הקשר הכפול האליפטי (תהליך שנעשה ע"י חיידקי המעינים). הפעילות של תוצרי לוואי אלה של הרזברטרול אינה ברורה אך לאחרונה דווח שצורת הציס היא בעלת פעילות דומה לזו של הטרנס (35).

3.2.2. הזנת פטמים במינון קבוע יחסית למשקל הגוף (MPK 400)

רציונל: על פי מאמר בעיתון Cell (36) השפעות משמעותיות של הזנה ברזברטרול בעכברים התקבלה כשהרזברטרול ניתן לא כאחוז קבוע ממשקל התערובת אלא על פי צריכת המזון הצפויה כך שיתקבל מינון קבוע של 400 מ"ג ל ק"ג משקל גוף (MPK-400). גישה זו מביאה לרמת רזברטרול קבועה במחזור הדם במהלך כל תקופת הניסוי.

הניסוי נערך על פי המתכונת של הניסוי המתואר באיור 11 אך כמות הרזברטרול במנה הותאמה בכל שבוע על פי צריכת המזון ומשקל הגוף של קבוצת הביקורת בניסוי הקודם (איור 9). חישוב כמות הרזברטרול כדי להגיע ל-400-MPK מוצג בטבלה 3.

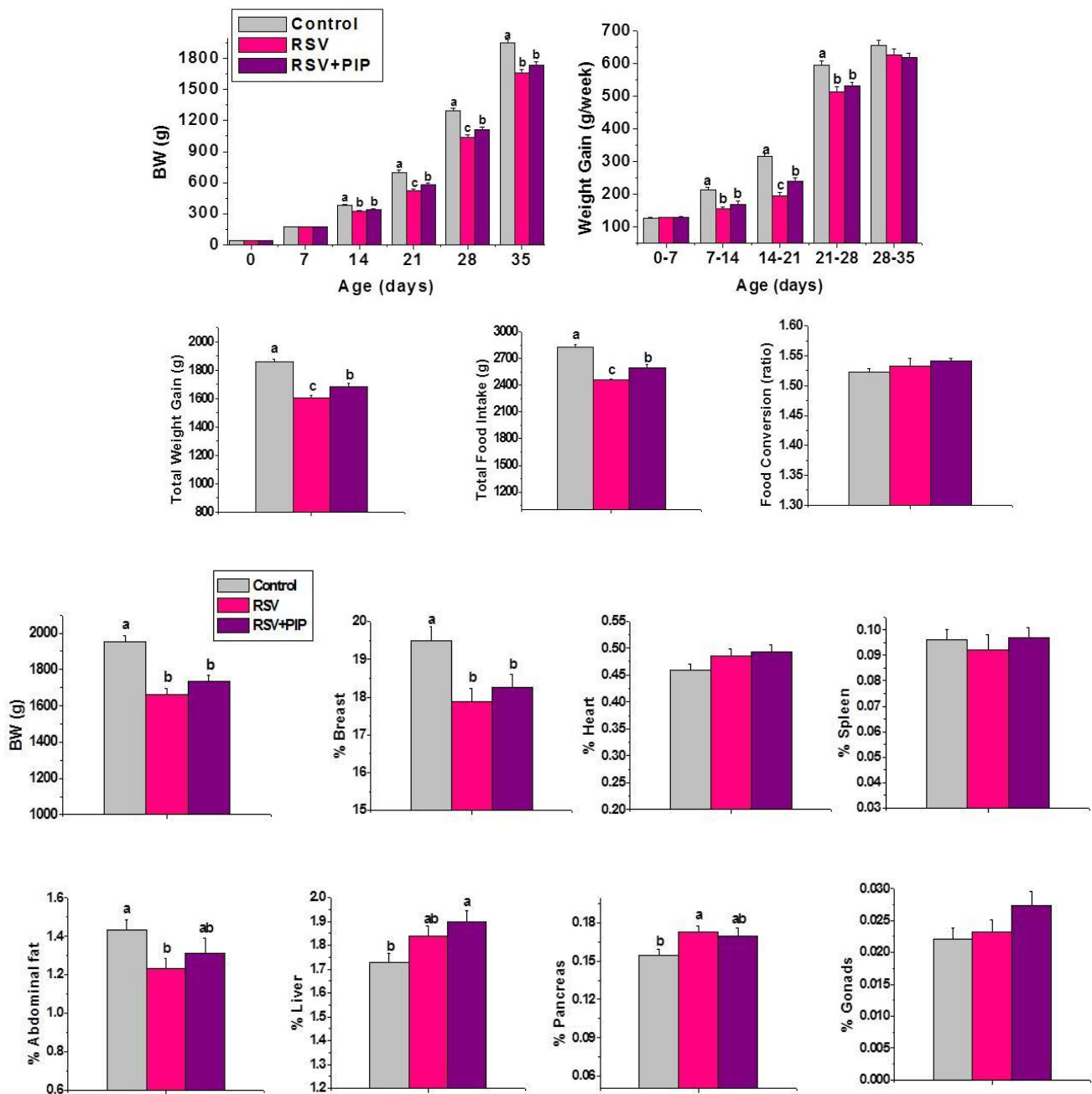
טבלה 3: חישוב כמות הרזברטרול במנה בכל שבוע על פי הצפי של צריכת המזון

Age (weeks)	Actual MPK in exp 5		Calculated expected MPK for experiment 6			
	1g/kg food	2g/kg food	3g/kg food	4g/kg food	5g/kg food	
1	151	303	454	605	757	
2	136	273	409	545	681	
3	112	225	337	449	562	
4	90	180	270	360	450	
5	78	157	235	313	392	
6	65	131	196	262	327	

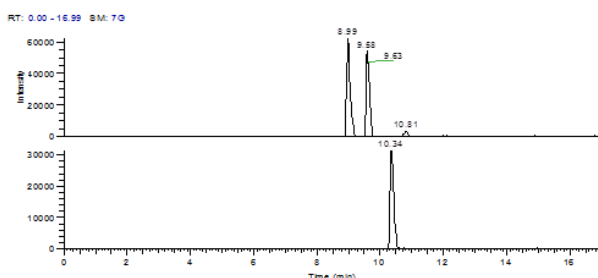
ברקע אפור (טבלה 3) מוצגת הצריכה היומית של הרזברטרול בניסוי הקודם שבו העופות קבלו רזברטרול במינון קבוע של 1 מ"ג לק"ג תערובת (בהתחשב בצריכת המזון יחסית למשקל הגוף של העופות), ברקע צהוב מצוינת התערובת שתביא למינון של 400 MPK המחושב על פי צריכת המזון ומשקל הגוף של הפטמים בקבוצת הביקורת של הניסוי הקודם (איור 9). עד גיל שבועיים ניתן להגיע לערכים אלה בתערובת של 3 גר לק"ג תערובת; בגיל 3 שבועות בתערובת של 4 גר לק"ג תערובת; ובגיל 4 עד 6 שבועות – בתערובת של 5 גר לק"ג תערובת.

קבוצה נוספת קבלה מחצית מכמות הרזברטרול (200-MPK) בתוספת פיפרין (עשירית ממשקל הרזברטרול).

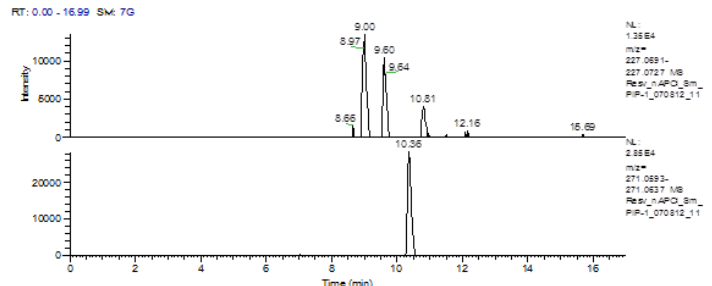
איור 10: השפעת הזנת פטמים ברזברטרול במינון מחושב של 400-MPK או 200-MPK בתוספת פיפרין



פרופיל הרזברטרול בדם בקבוצה שטופלה ברזברטרול בלבד



פרופיל הרזברטרול בדם בקבוצה שטופלה ברזברטרול ופיפרין



איור 10: מעקב אחר משקל גוף, צריכת המזון, המרת המזון והרכב הגופה של העופות בעקבות הזנה רציפה ברזברטרול או ברזברטרול משולב בפיפרין במינון

טבלה 4: אנליזה (LC-MS) של תכולת הרזברטרול בדוגמאות דם של העופות

Treatment	Blood RSV (ng/ml)	SE
RSV	42.5	5.1
RSV+ PIP	35.2	4.2

של 200 ו 400 MPK, בהתאמה. השפעת הטיפול ברזברטרול בלבד הייתה באופן מובהק גדולה יותר מזו של הטיפול המשולב. בסוף הניסוי, נערכה בדיקה של הרכב הגופה על כל העופות שבניסוי:

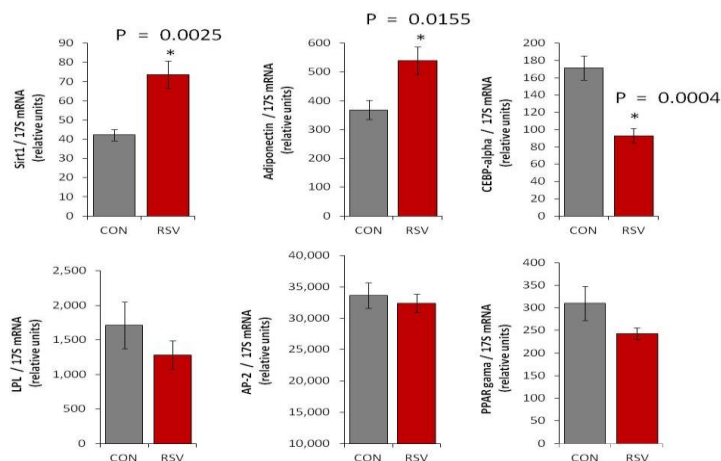
($n = 33$ control; $n = 36$ RSV; $n = 36$ RSV + PIP). בתחילת הניסוי היו 40 עופות בכל קבוצה. במהלך הניסוי מתו 5 עופות בקבוצת הביקורת ו 3 בכל אחת משתי קבוצות הטיפול. בנוסף, היו מקרים בודדים של טעויות בקביעת הזוג על ידי חברת בראון. טעויות אלה התגלו בזמן פתיחת העופות והתוצאות של שקילת המזון ושקילת העופות תוקנו בהתאם. לגבי העופות שמתו במהלך הניסוי, צריכת המזון המחושבת לעוף תוקנה על פי תאריכי התמותה. הקווים המאונכים מציגים את שגיאת התקן. הבדלים משמעותיים מוצגים באותיות שונות ($P < 0.05$).

בסוף הניסוי נבדקה תכולת הרזברטרול בשלוש התערובות, ובדוגמאות דם של ארבע עופות מכל קבוצת טיפול (פרופיל הרזברטרול בדם מופיע בתחתית האיור והכימות בטבלה טבלה 4). ניתן לראות שכ 50% מהרזברטרול נמצא בצורת ציס בדם בעוד שבתערובות נשמרת הצורה טרנס (בדומה למוצג באיור 8). בנוכחות הפיפרין לא רק שאין עדות לייצוב הרזברטרול אלא להופעה של נגזרת נוספת של רזברטרול (בעמדה 10.81 בקולונה) מתוצאה זו ומהמאפיינים הפסיולוגיים אנו מסיקים כי בניגוד לפרסומים ביונקים (10, 37-39), לפיפרין אין השפעה מיטבית על הטיפול ברזברטרול בעופות.

באיור 10 נראה כי לטיפול ברזברטרול במינון הגבוה של 400 MPK הייתה השפעה על קצב הגדילה שבאה לידי ביטוי בחישוב תוספת המשקל השבועית בשבועות השני שלישי ורביעי. למרות שבניסוי זה ההשפעה של הטיפולים על הגדילה ועל צריכת המזון משמעותיות יותר מאשר בניסוי הקודם (איור 9) לא חזרה בניסוי זה ההשפעה המזיקה על נצילות המזון. בנוסף נראה כי העלאת מינון הרזברטרול הביאה לשינויים משמעותיים בהרכב הגופה. ההשפעה של הטיפולים על משקל הגוף, שהייתה בולטת ביותר, לוותה בהשפעה על הקטנת שריר החזה. נמצאה גם השפעה של הטיפול המשולב בלבד (RSV + PIP) על הגדלת הכבד. מאחר שגם בניסוי הקודם הטיפול המשולב הביא להגדלת הכבד, ישנה אפשרות שזו השפעה ספציפית לפיפרין שאינה קשורה לרזברטרול. ההשפעה המובהקת של הטיפול על הקטנת צבירת השומן והגדלת הלב, הייתה משמעותית רק בקבוצה שטופלה ברזברטרול (400 MPK). באיור 11 מוצגות תוצאות של בדיקת השפעת הטיפול ברזברטרול על ביטוי גנים ברקמת השומן.

איור 11: השפעת הטיפול ב RSV על ביטוי גנים בשומן הבטן של פטמים בגיל 35 יום

11



רקמת שומן הבטן בניסוי המתואר באיור שמששה גם להפקה של RNA. בדיקת רמת הביטוי של הגנים המצויינים באיור נעשתה בשיטה של real time PCR (QPCR), עם תחלים ספציפיים ותמיסת ריאקציה המכילה SYBR Green. $n = 7$ בכל קבוצה (טיפול וביקורת)

העלייה המשמעותית באדיפונקטין ו sirt1 והירידה ב CEBP-alpha, מעידים על שיפור מטבולי, והאטת ההתמיינות וצבירת השומן ברקמת שומן הבטן. אך מדדים אלה עשויים לנבוע מהאטת הגדילה וצבירת

השומן ולא להוות את הגורמים המחוללים את האפקט הפיסיולוגי. חוסר ההשפעה על ביטוי הגנים הקשורים להתמיינות תאי השומן (LPL, AP-2, PPAR-gamma) מנוגדים להשפעה הישירה שקבלנו בטיפול ברזברטרול על תאי שומן (תוצאות מוצגות בדוח שנת המחקר הראשונה). לכן קיימת אפשרות שההשפעה שקבלנו בניסוי זה על גדילת העופות במינון הגבוה נובעת מהצטברות של תוצאי הפרוק של הרזברטרול ולא מהשפעה ספציפית של הרזברטרול.

4.2.2. סיכום ניסויי הזנה ברזברטרול בפטמים

תוצאות אלה של עיכוב קצב הגדילה (כולל ירידה באחוז החזה ואחוז השומן) ללא שיפור בצלילות המזון אינן רלוונטיות לגידול המסחרי של הפטמים.

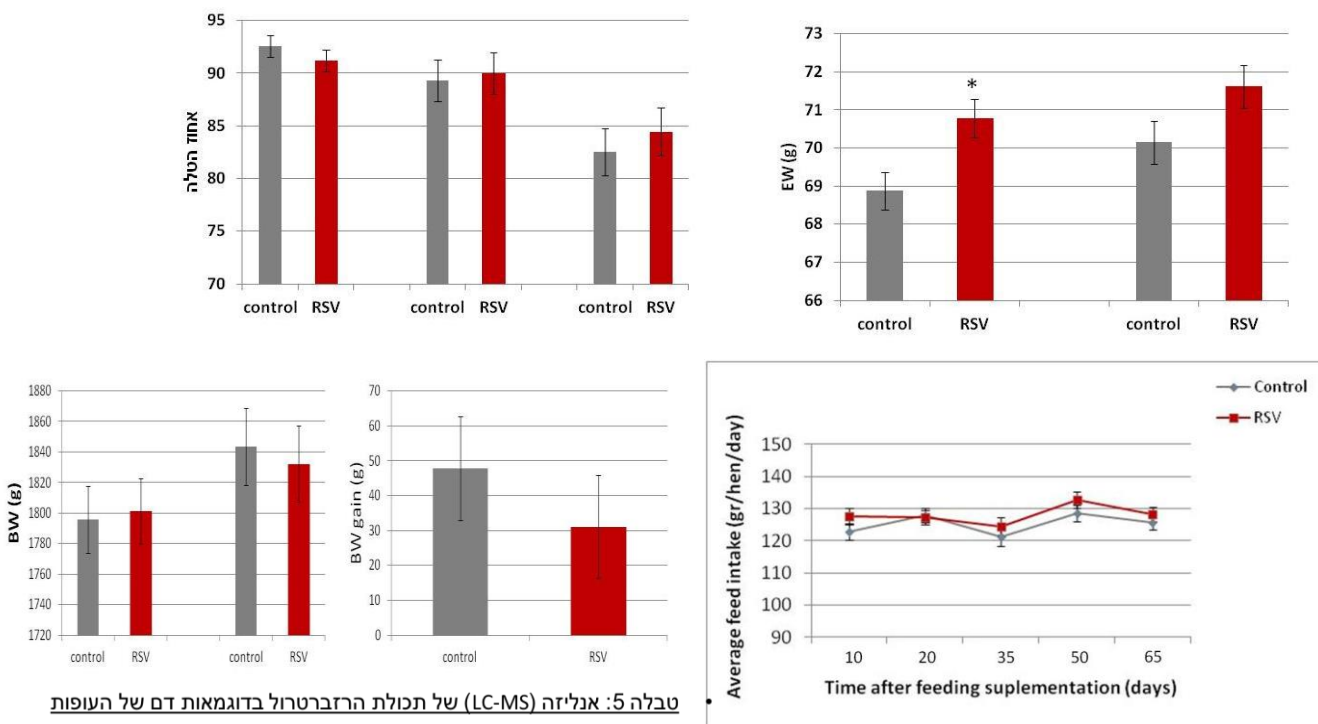
3.2. ניסויי הזנה במטילות קלות

רציונל: בהתבסס על העדויות הרבות לפיהן הרזברטרול משפיע על עיכוב ההזדקנות (ראה פרק מבוא), הערכנו כי טיפול ברזברטרול ישפיע על הארכת משך ההטלה היעילה של המטילות המבוגרות. בנוסף, כדי לבדוק את האפשרות שכדי לשפר את ההטלה בגיל המבוגר יש להתחיל בטיפול כבר בגיל צעיר בוצע גם ניסוי שבו ההזנה ברזברטרול התחילה בגיל 14 יום ונמשכה עד גיל 590 יום.

1.3.2. ניסוי הזנה במטילות בגיל 500 יום 0.5 גר' רזברטרול ל"ק"ג תערובת

תערובת הטלה הוכנה על פי ההרכב המקובל (NRC, 1994) על ידי חברת בראון ובניו. מחצית מהתערובת הוכנה בתוספת של 0.5 ק"ג לטון (500 מיליגרם לק"ג) והמחצית השנייה ללא תוספת של רזברטרול. יציבות הרזברטרול בתהליך הכיפתות נבחנה על ידי בדיקת כמות הרזברטרול בתערובת ב HPLC ביחידת הצב"מ של הפקולטה לחקלאות ונמצאה תקינה. התערובות שימשו להזנה של מטילות מזן לוחמן בנות 500 יום. בגיל זה המטילות צורכות כ 120 גרם תערובת ביום בממוצע ושוקלות כ 1.8 ק"ג בממוצע כך שצריכת הרזברטרול מוערכת בכ 35 מיליגרם לק"ג משקל גוף ליום. מתוך 250 מטילות נבחרו שתי קבוצות של 100 בעלות פיזור דומה של יעילות ההטלה (במהלך 3 שבועות לפני תחילת הניסוי) ומשקל גוף (ביום תחילת הניסוי). המטילות סודרו לסירוגין בקבוצות של 10 ונערך מעקב יומי רציף על יעילות ההטלה ומשקל הביצים (איור 12).

איור 12: בדיקת השפעת הזנת מטילות ברזברטרול על יעילות ההטלה וגודל הביצה



טבלה 5: אנליזה (LC-MS) של תכולת הרזברטרול בדוגמאות דם של העופות

Treatment	Blood RSV (ng/ml)	SE
RSV	1.9	0.5
control	not detectable	

איור 12: אחוז ההטלה חושב על פי מספר הביצים הממוצע למטילה ליום. משקל ממוצע של הביצים הוערך על פי שקילה של כל הביצים שהוטלו במשך שלשה ימים רצופים בכל חודש.

כל המטילות נשקלו לפני תחילת הטיפול ובסוף תקופת הניסוי. השקילות נערכו בשעה 2 בצהריים כדי להקטין את

ההשפעה של מועד הטלת הביצים על משקל הגוף. הגרף השמאלי מציג את משקלי הגוף הממוצעים לכל קבוצת טיפול לפני ואחרי ההזנה ברזברטרול. הגרף הימני מראה את ההבדל בתוספת המשקל בין שתי קבוצות הטיפול בתקופת הניסוי. תוספת המשקל הייתה קטנה בשתי הקבוצות כצפוי למטילות בגיל זה. מספר העופות בכל קבוצה היה 100. הקווים המאונכים מציגים את שגיאת התקן. תמותת המטילות בתקופת הניסוי הייתה של 2 מטילות מקבוצת הביקורת ושתי מטילות מקבוצת הטיפול.

כפי שניתן לראות באיור 12, הטיפול ברזברטרול במטילות המבוגרות הביא לעליה זמנית בגודל הביצה בעוד שלא נמצאה השפעה משמעותית על אחוז ההטלה וצריכת המזון. בדיקת רמת הרזברטרול בדם (טבלה 5) מעידה על הרמה הצפויה בהשוואה לניסויים בפטמים ובהתחשב במינון שניתן במנה.

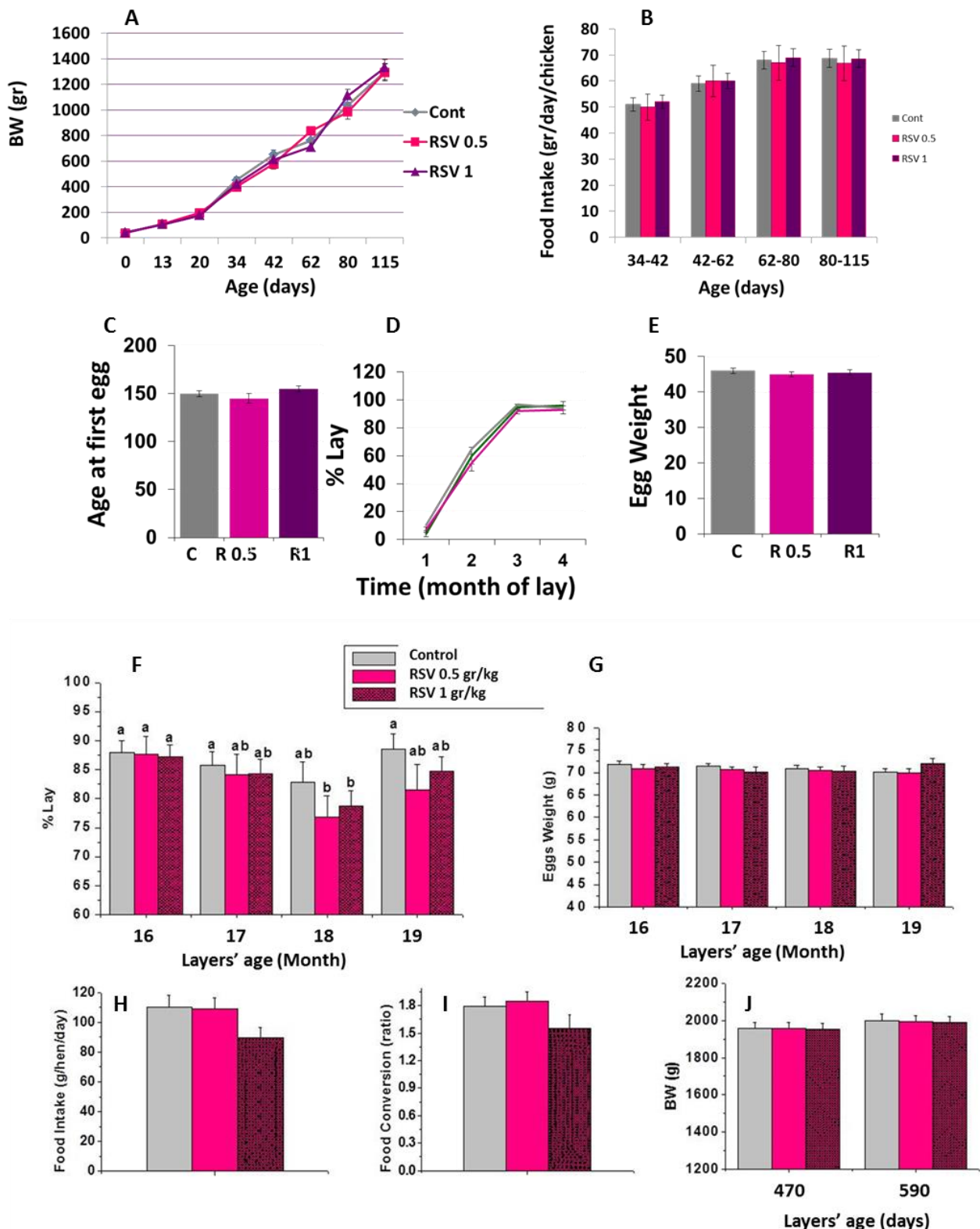
2.3.2. הזנה ברזברטרול במינון של 0.5 ו 1 גר' לק"ג תערובת מגיל 14 יום עד גיל 590 יום.

200 אפרוחות בגיל יום מזן לוהמן נרכשו מחברת הסוללים. האפרוחות חולקו ל 3 קבוצות לפי משקל גוף ממוצע ופיזור משקלי דומה בכל קבוצה. כל קבוצה חולקה ל-3 סוללות בחדר אימון בסיסור מסורג. תנאי התאורה והחימום היו בהתאם לנהוג בגידול המסחרי. התערובות הוכנו בדומה למתואר בסעיף 1.3.2. אך בשני ריכוזים של רזברטרול (0.5 ו 1 ג' לק"ג תערובת), והוגשו לעופות החל מגיל שבועיים. החל מגיל 3 שבועות המטילות עברו לסוללות מרווחות יותר בחדר גידול ובגיל 115 יום הועברו לסוללות ההטלה. משטר התאורה נעשה בהתאם לנהוג בגידול המסחרי (הגעה הדרגתית ל 16 שעות תאורה החל מגיל 21 שבועות). תערובות קמחיות הוכנו בכל 10 ימים ואוחסנו במתקן לול המטילות בפחים סגורים. בסוף הניסוי נלקחו דוגמאות מכל תערובת ומארבע מטילות מכל טיפול לבדיקה ב LC-MS. פרופיל התערובות ופרופיל הרזברטרול בדם נראו בדומה למוצג באיור 8 ו 10 (רזברטרול ללא פיפריין), בהתאמה. כימות הרזברטרול בדם מוצג בטבלה 6.

טבלה 6: אנליזה (LC-MS) של תכולת הרזברטרול בדוגמאות דם של העופות

Treatment	Blood RSV (ng/ml)	SE
RSV 0.5 gr/kg	5.2	1.2
RSV 1.0 gr/kg	9.8	2.3

איור 13: השפעת הזנה ב 0.5 ו 1 גר' רזברטרול לק"ג תערובת על מדדי הגדילה וההטלה של מטילות קלות מזן לוחמן

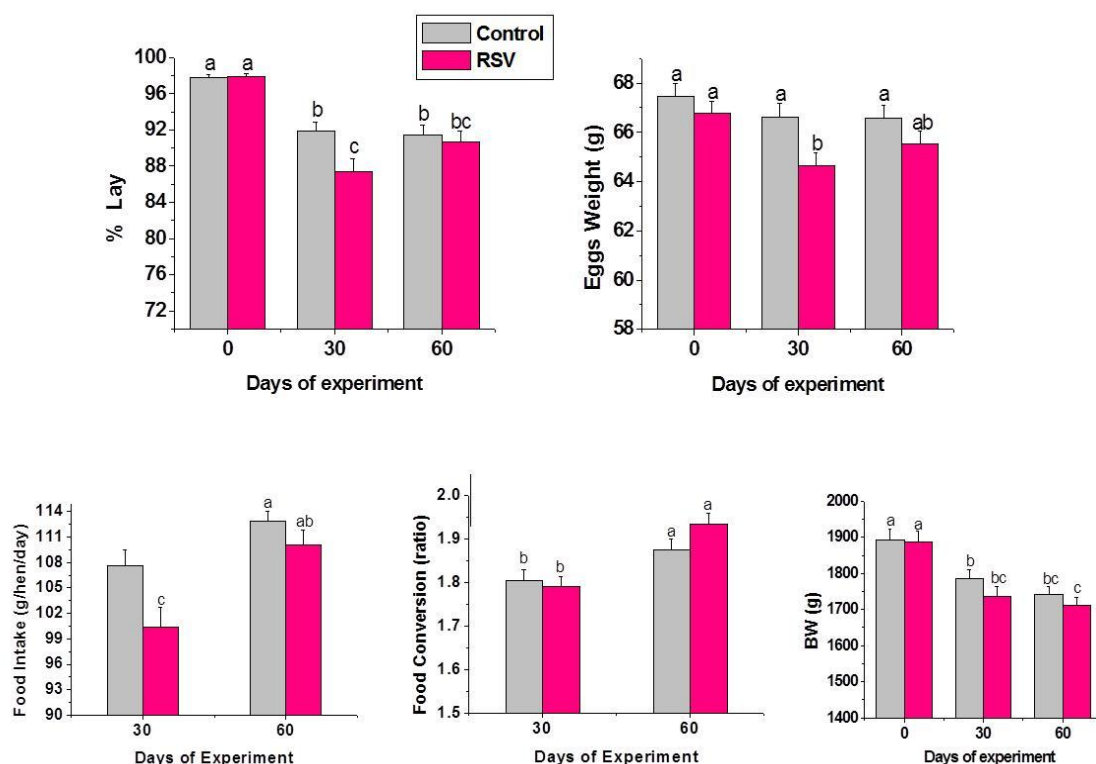


איור 13: סיכום מאפייני הגידול וההטלה של ניסוי המטילות: מעקב אחר משקל גוף (A) וצריכת מזון (B) עד גיל 115 יום. נתוני הכניסה להטלה: גיל המטילות ביום הטלת הביצה הראשונה (C), יעילות ההטלה ב 4 חודשי ההטלה הראשונים (D) משקל הביצה בחודש הראשון של ההטלה (E) מעקב אחר ביצועי המטילות ב 4 חודשי ההטלה האחרונים: (גיל 470 יום עד 590): אחוזי ההטלה (F) משקל ממוצע של הביצים (G). המרת המזון מייצגת את צריכת המזון יחסית למסת הביצים (H), משקל גוף ביום סיום הניסוי (J). הקווים המאונכים מייצגים את שגיאת התקן. $n = 60$ לכל קבוצת טיפול.

3.3.2. השפעת הזנה ברזברטרול במינון של 400 MPK על מדדי ההטלה

הניסוי נערך באותה מתכונת של הניסוי המתואר באיור 12 אבל במינון גבוה יותר של רזברטרול המחושב על פי צריכת המזון ומשקל הגוף של המטילות (400MPK); כ 5 גר' לק"ג תערובת. התוצאות מפורטות באיור 14.

איור 14: השפעת רזברטרול במינון של 400 MPK על מדדי ההטלה



איור 14: מטילות בנות 500 יום חולקו לקבוצות של 100 בכל קבוצה על פי המתואר בסעיף 1.3.2. ובאיור 12 והוזנו בתערובת סטנדרטית (control) או בתערובת סטנדרטית המועשרת ברזברטרול במינון של 400MPK שהיה קרוב ל 5 גר' לק"ג תערובת אחוז ההטלה, משקל הביצים, צריכת המזון, והמרת המזון חושבו כמתואר באיור 13. הקווים המאונכים מיצגים את שגיאת התקן.

4.3.2. סיכום הניסויים במטילות

בניסוי ההזנה ב 0.5 גר' רזברטרול לק"ג תערובת (איור 12) נמצאה השפעה זמנית על עליה בגודל הביצה שלא חזרה ואף נסתרה בניסויים הבאים. בניסוי ארוך הטווח שבו הוזנו המטילות בתערובות המכילות 0.5 ו 1 גר' החל מגיל שבועיים של הגידול לא הייתה השפעה על מדדי הגדילה והכניסה להטלה. זאת בדומה לניסויים שנעשו באותם מינונים בפטמים אך בגיל המבוגר (גיל 17 עד 19 חודשים כלומר מעל גיל 500 יום), נמצאה נטייה לירידה ביעילות ההטלה יחד עם נטייה לירידה בצריכת המזון כך שמידת המרת המזון לא הושפעה (איור 13). במינון הגבוה של הרזברטרול (איור 14) נראתה אותה מגמה של ירידה ביעילות ההטלה בהשפעת הרזברטרול, שאף הייתה מובהקת בחודש הראשון של הניסוי. במינון הגבוה נמצאה בנוסף מגמה של ירידה במשקל הביצים שהייתה מובהקת בחודש הראשון של הניסוי. הירידה במשקל הגוף של המטילות במהלך הניסוי של כל קבוצות הטיפול נובעות כנראה מהטמפרטורות הגבוהות שהיו באותה תקופה (ניסוי ההטלה נערך בלולים פתוחים).

בתחילת תקופת המחקר ניסינו לאתר את האופן היעיל ביותר לטיפול ברזברטרול ובדקנו מספר גישות. בניסויי ההזרקה לעוברים (בשלב התפתחות שונים ובשיטות הזרקה שונות) ולאפרוחים בהזרקה לחלל הבטן ובהזלפה לחלל הפה, נתקלנו בבעיות של רעילות הממסים (אתנול, DMSO וסולטול) המשמשים להמסת רזברטרול בניסויים המדווחים בספרות. בניגוד לניסויים המדווחים, בעופות, לכול הממסים הייתה השפעה רעילה במינונים הגבוהים שלהערכתנו הגבילו את יכולתנו לקבל תוצאות משמעותיות. התוצאה החשובה ביותר בניסויים אלה הייתה ההשפעה של הזרקת רזברטרול לאלבומין של העובר המתפתח (E12) שהביאה בגיל 16 יום אחרי הבקיעה לירידה משמעותית באחוז שומן הבטן בזכרים. בניסויי הזנה שבהם הרזברטרול אינו מומס וניתן כחלק מהתערובת, לא הייתה הגבלה על המינונים ובדקנו מינונים בתחום של 0.5 עד ~5 גר רזברטרול לק"ג תערובת (MPK400). בנוסף, בדקנו את האפשרות לשפר את יציבות הרזברטרול במחזור הדם, בניסויי ההזנה, על ידי תוספת של פיפרין (PIP). זאת בעקבות דיווחים שהתפרסמו במקביל למחקר זה שבו הראו כי פיפרין מעכב את פירוק הרזברטרול בדם ומביא לעליה של ריכוז הרזברטרול בדם ליותר מפי עשרה (10 ו 64-66). להוספה של פיפרין לא נמצאה השפעה משמעותית סטטיסטית לא על מדדי הייצור ולא על רמת הרזברטרול בדם בניסויי הזרקה לחלל הבטן (איורים 6 ו 7) ובשני ניסויי הזנת פטמים (איורים 9 ו 10). נראה כי הפיפרין גרם לעליה במשקל הכבד שיכול להעיד על בעיה מטבולית. בניסויי ההזנה לא התקבלו השפעות משמעותיות במינונים נמוכים של רזברטרול הן בפטמים והן במטילות. אך במטילות, בניסויי ארוך טווח נמצאה נטייה של ירידה ביעילות ההטלה בהשפעת הרזברטרול. המינון הגבוה של 400 MPK (מיליגרם לק"ג משקל גוף) הביא להשפעה פיסיוולוגית משמעותית של ירידה בצריכת מזון, הן בפטמים והן במטילות אך בניגוד למצופה השפעה זו לא התמקדה בהשפעה על צבירת שומן בלבד אלא השפיע לרעה על הגדילה וההטלה, בפטמים ובמטילות בהתאמה. אנו מניחים כי תוצאות אלה שהתקבלו במינון הגבוה של הרזברטרול, והנוגדות את הצפוי מכול מה שידוע על פעילות הרזברטרול בבעלי חיים אחרים, אינן נובעות מהרזברטרול אלא מהצטברות של תוצרי פרוק. תמיכה להנחה זו התקבלה מהסתירה בין ההשפעה הישירה של רזברטרול על תאי שומן בטן שבדדו מפטמים (זירוז ההתמיינות ועליה בביטוי גנים הקשורים להתמיינות) לבין ההשפעה על ביטוי גנים ברקמת השומן של הפטמים בניסוי ההזנה במינון הגבוה שבה עלה ביטוי של גנים המעכבים התמיינות של תאי שומן, ולא עלו הגנים שקשורים בהתמיינות. באם אפשרות זו נכונה, שיפורים הנעשים היום לייצוב הרזברטרול גם על ידי פיתוח של תוספי מזון מייצבים וגם על ידי שינוי במבנה הרזברטרול, יביאו להשפעות הרצויות של טיפול ברזברטרול גם בעופות.

אפשרות נוספת להסביר את התוצאות מתבססת על העובדה שהבקרה על מאזן האנרגיה נעשית במערכת מורכבת מאוד של סיגנלים שמגיעים מהרקמות המטבוליות (שומן, כבד ולבלב), מרקמות הבקרה המוחיות (היפותלמוס והיפופיזה), ממערכת העיכול והשרירים (14), ואפילו מהעצמות (15). לכן, סביר מאוד להניח כי בחיה השלמה, שאיננה נמצאת במצב של הגבלת מזון, הפעלה של חלק מהסיגנלים האופייניים להגבלת מזון איננה מספיקה להביא לשיפור המצופה בחיה שבה מאזן אנרגיה חיובי (צריכת אנרגיה גבוהה מהוצאת אנרגיה). יתכן שמצב זה של סיגנלים סותרים עלול גם להזיק למדדי ייצור מסוימים כמו יעילות ההטלה כפי שמצאנו בניסויים במטילות. לכן סביר להניח כי ההשפעה החיובית של הרזברטרול על המטבוליזם ויעילות ההזנה תבוא לידי ביטוי בתנאים של הגבלת מזון כמו זו הנהוגה בשלוחת הרבייה הכבדה. לכן, אנו מציעים לבצע את הטיפול ברזברטרול על רקע של הגבלת מזון. המטילות הכבדות יהוו את המודל האידאלי לבדיקת הנחה זו מאחר שהן מגלמות שלוש דרישות ייחודיות וקריטיות לניסוי וליישומו: (א) הן גדולות בגידול המסחרי בתנאים של הגבלת מזון משמעותית ומבוקרת לאורך זמן ארוך (החל מגיל שבועיים ועד לסוף תקופת הגידול היצרני – כ 48 שבועות). (ב) בגלל הקושי הרב

בגידולן והיעילות הנמוכה של ההטלה כל שיפור יהיה משמעותי ויהיה ניתן למדידה בתנאי הגידול המסחרי. (ג)
יישום הניסויי יהיה מידי כי הניסויי יערך בתנאי הגידול המסחרי.

לסיכום: במקביל לעבודה שלנו, התפרסמו מספר רב של מאמרים שבהם קימת סתירה בין תוצאות ניסויים בחיות מודל קטנות ובתרבויות רקמה לבין ניסויים שנעשו בבני אדם. סתירה זו מתוארת באופן מפורט במאמר מסכם שפורסם לאחרונה (11) ובמספר מאמרי מערכת (12, 13). חלק מהמאמרים האלה מטילים ספק בהנחות היסוד של התועלת בטיפול ברזברטרול. התאוריה שהצענו בפסקה הקודמת להסביר את הסתירה נתמכת בכך שבבעלי חיים ירודים (שבהם צפוי שמערכת הבקרה פחות מרכבת) הרזברטרול משפיע באופן אופטימלי על השיפור המטבולי וגם תואמת לחלק (כמו 67) אך לא לכול הניסויים בעכברים.

סקירה מעמיקה של הספרות לא מותירה ספק כי הפוטנציאל לטיפול ברזברטרול הוא רב לא רק בהקשר של מניע סרטן (43-46) אלא גם בהקשר שבגינו התחילה ההתעניינות ברזברטרול והיא השפעתו המיטיבה על המטבוליזם: מניעת השמנה, מניעת דלקת כרונית (שנחשבת לתופעה המרכזית של הסינדרום המטבולי), שיפור הרגישות לאינסולין וכדומה (47-50). מחקרים הנערכים בתרבויות תאים מראים באופן ברור את פעילותו האנטי דלקתית ואת מנגנוני הפעולה הספציפיים (51). ההנחה הרווחת היא כי הבעיה של המסיסות, יעילות הספיגה, והציבות הנמוכים, ביחד מונעים את גילוי מלא הפוטנציאל של הטיפול במערכות *in vivo* בעיקר בבעלי חיים גדולים מתולעים ועכברים. בעיה זו מסוכמת בפרוט רב במאמר שפורסם לאחרונה (11). פתרונות לבעיות אלה שהיו קריטיות גם במחקר שלנו בעופות יועילו בעתיד גם למחקר בעופות.

מאמרים מצוטטים

1. Beaudoux JL, Nivet-Antoine V, Giral P 2010 Resveratrol: a relevant pharmacological approach for the treatment of metabolic syndrome? Current opinion in clinical nutrition and metabolic care 13:729-736
2. Fischer-Posovszky P, Kukulus V, Tews D, Unterkircher T, Debatin KM, Fulda S, Wabitsch M 2010 Resveratrol regulates human adipocyte number and function in a Sirt1-dependent manner. The American journal of clinical nutrition 92:5-15
3. Mader I, Wabitsch M, Debatin KM, Fischer-Posovszky P, Fulda S 2010 Identification of a novel proapoptotic function of resveratrol in fat cells: SIRT1-independent sensitization to TRAIL-induced apoptosis. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 24:1997-2009
4. Robich MP, Osipov RM, Nezafat R, Feng J, Clements RT, Bianchi C, Boodhwani M, Coady MA, Laham RJ, Sellke FW 2010 Resveratrol improves myocardial perfusion in a swine model of hypercholesterolemia and chronic myocardial ischemia. Circulation 122:S142-149
5. Sulaiman M, Matta MJ, Sunderesan NR, Gupta MP, Periasamy M, Gupta M 2010 Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. American journal of physiology Heart and circulatory physiology 298:H833-843
6. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA 2006 Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature 444:337-342
7. Morselli E, Maiuri MC, Markaki M, Megalou E, Pasparaki A, Palikaras K, Criollo A, Galluzzi L, Malik SA, Vitale I, Michaud M, Madeo F, Tavernarakis N, Kroemer G 2010 Caloric restriction and

resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell death & disease* 1:e10

- .8 Mouchiroud L, Houtkooper RH, Moullan N, Katsyuba E, Ryu D, Canto C, Mottis A, Jo YS, Viswanathan M, Schoonjans K, Guarente L, Auwerx J 2013 The NAD(+)/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. *Cell* 154:430-441
- .9 Knutson MD, Leeuwenburgh C 2008 Resveratrol and novel potent activators of SIRT1: effects on aging and age-related diseases. *Nutrition reviews* 66:591-596
- .10 Johnson JJ, Nihal M, Siddiqui IA, Scarlett CO, Bailey HH, Mukhtar H, Ahmad N 2011 Enhancing the bioavailability of resveratrol by combining it with piperine. *Molecular nutrition & food research* 55:1169-1176
- .11 Tang PC, Ng YF, Ho S, Gyda M, Chan SW 2014 Resveratrol and cardiovascular health - Promising therapeutic or hopeless illusion? *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*
- .12 Visioli F 2014 The resveratrol fiasco. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*
- .13 Azzi A 2009 Can resveratrol extend your life? *IUBMB life* 61:1010-1011
- .14 Spiegelman BM, Flier JS 2001 Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-543
- .15 Rosen C, Karsenty G, MacDougald O 2012 Foreword: interactions between bone and adipose tissue and metabolism. *Bone* 50:429
- .16 Boulton TJ, Dunlop M, Court JM 1978 The growth and development of fat cells in infancy. *Pediatric research* 12:908-911
- .17 Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P 2008 Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453:783-787
- .18 Speake BK, Noble RC, McCartney RJ 1993 Tissue-specific changes in lipid composition and lipoprotein lipase activity during the development of the chick embryo. *Biochimica et biophysica acta* 1165:263-270
- .19 Durmus E, Inan O, Celik I, Sur E, Ozkan Y, Acar A, Aydin MF 2005 Use of the fertilized hen's egg in the evaluation of embryotoxicity of dental alloys. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 72:322-327
- .20 Hen G, Yosefi S, Shinder D, Or A, Mygdal S, Condiotti R, Galun E, Bor A, Sela-Donenfeld D, Friedman-Einat M 2012 Gene transfer to chicks using lentiviral vectors administered via the embryonic chorioallantoic membrane. *PloS one* 7:e36531
- .21 Seo K, Seo S, Han JY, Ki SH, Shin SM 2014 Resveratrol attenuates methylglyoxal-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by Sestrin2 induction. *Toxicology and applied pharmacology* 280:314-322
- .22 Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr., Walle UK 2004 High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 32:1377-1382
- .23 Gertler A, Shinder D, Yosefi S, Shpilman M, Rosenblum CI, Ruzal M, Seroussi E, Friedman-Einat M 2014 Pegylated leptin antagonist with strong orexigenic activity in mice is not effective in chickens. *The Journal of experimental biology* 217:180-184
- .24 Cuntz U, Frank G, Lehnert P, Fichter M 2000 Interrelationships between the size of the pancreas and the weight of patients with eating disorders. *The International journal of eating disorders* 27:297-303

- .25 Alzaid A, Aideyan O, Nawaz S 1993 The size of the pancreas in diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 10:759-763
- .26 Mattarei A, Carraro M, Azzolini M, Paradisi C, Zoratti M, Biasutto L 2014 New water-soluble carbamate ester derivatives of resveratrol. *Molecules* 19:15900-15917
- .27 Poissonnet CM, Burdi AR, Bookstein FL 1983 Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early human development* 8:1-11
- .28 Oosting A, van Vlies N, Kegler D, Schipper L, Abrahamse-Berkeveld M, Ringler S, Verkade HJ, van der Beek EM 2014 Effect of dietary lipid structure in early postnatal life on mouse adipose tissue development and function in adulthood. *The British journal of nutrition* 111:215-226
- .29 Gaillard R, Felix JF, Duijts L, Jaddoe VW 2014 Childhood consequences of maternal obesity and excessive weight gain during pregnancy. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 93:1085-1089
- .30 Padmanabhan R, Singh S 1980 Effect of maternal starvation during pregnancy on the postnatal growth in rats. *The Indian journal of medical research* 72:766-769
- .31 Smith CA 1947 The effect of wartime starvation in Holland upon pregnancy and its product. *American journal of obstetrics and gynecology* 53:599-608
- .32 Vang O, Ahmad N, Baile CA, Baur JA, Brown K, Csiszar A, Das DK, Delmas D, Gottfried C, Lin HY, Ma QY, Mukhopadhyay P, Nalini N, Pezzuto JM, Richard T, Shukla Y, Surh YJ, Szekeres T, Szkudelski T, Walle T, Wu JM 2011 What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PloS one* 6:e19881
- .33 Boocock DJ, Faust GE, Patel KR, Schinas AM, Brown VA, Ducharme MP, Booth TD, Crowell JA, Perloff M, Gescher AJ, Steward WP, Brenner DE 2007 Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 16:1246-1252
- .34 Wenzel E, Soldo T, Erbersdobler H, Somoza V 2005 Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Molecular nutrition & food research* 49:482-494
- .35 Huang TT, Lai HC, Chen YB, Chen LG, Wu YH, Ko YF, Lu CC, Chang CJ, Wu CY, Martel J, Ojcius DM, Chong KY, Young JD 2014 cis-Resveratrol produces anti-inflammatory effects by inhibiting canonical and non-canonical inflammasomes in macrophages. *Innate immunity* 20:735-750
- .36 Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J 2006 Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127:1109-1122
- .37 Wightman EL, Reay JL, Haskell CF, Williamson G, Dew TP, Kennedy DO 2014 Effects of resveratrol alone or in combination with piperine on cerebral blood flow parameters and cognitive performance in human subjects: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over investigation. *The British journal of nutrition* 112:203-213
- .38 Huang W, Chen Z, Wang Q, Lin M, Wu S, Yan Q, Wu F, Yu X, Xie X, Li G, Xu Y, Pan J 2013 Piperine potentiates the antidepressant-like effect of trans-resveratrol: involvement of monoaminergic system. *Metabolic brain disease* 28:585-595
- .39 Tak JK, Lee JH, Park JW 2012 Resveratrol and piperine enhance radiosensitivity of tumor cells. *BMB reports* 45:242-246
- .40 Das S, Ng KY 2010 Colon-specific delivery of resveratrol: optimization of multi-particulate calcium-pectinate carrier. *International journal of pharmaceutics* 385:20-28

- .41 Ponzo V, Soldati L, Bo S 2014 Resveratrol: a supplementation for men or for mice? *Journal of translational medicine* 12:158
- .42 Buford TW, Anton SD 2014 Resveratrol as a supplement to exercise training: friend or foe? *The Journal of physiology* 592:551-552
- .43 Spencer M, Yang L, Adu A, Finlin BS, Zhu B, Shipp LR, Rasouli N, Peterson CA, Kern PA 2014 Pioglitazone treatment reduces adipose tissue inflammation through reduction of mast cell and macrophage number and by improving vascularity. *PloS one* 9:e102190
- .44 Kim JA, Kim DH, Hossain MA, Kim MY, Sung B, Yoon JH, Suh H, Jeong TC, Chung HY, Kim ND 2014 HS-1793, a resveratrol analogue, induces cell cycle arrest and apoptotic cell death in human breast cancer cells. *International journal of oncology* 44:473-480
- .45 Fu Y, Chang H, Peng X, Bai Q, Yi L, Zhou Y, Zhu J, Mi M 2014 Resveratrol inhibits breast cancer stem-like cells and induces autophagy via suppressing Wnt/beta-catenin signaling pathway. *PloS one* 9:e102535
- .46 Hosseinimehr SJ, Hosseini SA 2014 Resveratrol sensitizes selectively thyroid cancer cell to 131-iodine toxicity. *Journal of toxicology* 2014:839597
- .47 Wang Q, Sun X, Li X, Dong X, Li P, Zhao L 2014 Resveratrol attenuates intermittent hypoxia-induced insulin resistance in rats: Involvement of Sirtuin 1 and the phosphatidylinositol4,5bisphosphate 3kinase/AKT pathway. *Molecular medicine reports*
- .48 Carreras A, Zhang SX, Peris E, Qiao Z, Wang Y, Almendros I, Gozal D 2014 Effect of resveratrol on visceral white adipose tissue inflammation and insulin sensitivity in a mouse model of sleep apnea. *International journal of obesity*
- .49 Mendez-Del Villar M, Gonzalez-Ortiz M, Martinez-Abundis E, Perez-Rubio KG, Lizarraga-Valdez R 2014 Effect of Resveratrol Administration on Metabolic Syndrome, Insulin Sensitivity, and Insulin Secretion. *Metabolic syndrome and related disorders*
- .50 Liu K, Zhou R, Wang B, Mi MT 2014 Effect of resveratrol on glucose control and insulin sensitivity: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials. *The American journal of clinical nutrition* 99:1510-1519
- .51 Bollmann F, Art J, Henke J, Schrick K, Besche V, Bros M, Li H, Siuda D, Handler N, Bauer F, Erker T, Behnke F, Monch B, Hardle L, Hoffmann M, Chen CY, Forstermann U, Dirsch VM, Werz O, Kleinert H, Pautz A 2014 Resveratrol post-transcriptionally regulates pro-inflammatory gene expression via regulation of KSRP RNA binding activity. *Nucleic acids research*
- .52 Fan GH, Wang ZM, Yang X, Xu LP, Qin Q, Zhang C, Ma JX, Cheng HY, Sun XC 2014 Resveratrol inhibits oesophageal adenocarcinoma cell proliferation via AMP-activated protein kinase signaling. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 15:677-682
- .53 Choi KM, Yannakoulia M, Park MS, Cho GJ, Kim JH, Lee SH, Hwang TG, Yang SJ, Kim TN, Yoo HJ, Baik SH, Kim SM, Mantzoros CS 2011 Serum adipocyte fatty acid-binding protein, retinol-binding protein 4, and adiponectin concentrations in relation to the development of the metabolic syndrome in Korean boys: a 3-y prospective cohort study. *The American journal of clinical nutrition* 93:19-26
- .54 Alberdi G, Macarulla MT, Portillo MP, Rodriguez VM 2014 Resveratrol does not increase body fat loss induced by energy restriction. *Journal of physiology and biochemistry* 70:639-646
- .55 2014Can drinking wine really promote longevity? Recent evidence shows the antioxidant resveratrol in wine does not offer a health boost. *Harvard health letter / from Harvard Medical School* 39:5
- .56 2014Resveratrol reversal. *The Johns Hopkins medical letter health after 50* 26:8
- .57 Xiang L, Xiao L, Wang Y, Li H, Huang Z, He X 2014 Health benefits of wine: don't expect resveratrol too much. *Food chemistry* 156:258-263

- .58 Smoliga JM, Blanchard O 2014 Enhancing the Delivery of Resveratrol in Humans: If Low Bioavailability is the Problem, What is the Solution? *Molecules* 19:17154-17172
- .59 Augustin MA, Sanguansri L, Lockett T 2013 Nano- and micro-encapsulated systems for enhancing the delivery of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1290:107-112
- .60 Delmas D, Aires V, Colin DJ, Limagne E, Scagliarini A, Cotte AK, Ghiringhelli F 2013 Importance of lipid microdomains, rafts, in absorption, delivery, and biological effects of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1290:90-97
- .61 Pando D, Caddeo C, Manconi M, Fadda AM, Pazos C 2013 Nanodesign of olein vesicles for the topical delivery of the antioxidant resveratrol. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 65:1158-1167
- .62 Santos AC, Veiga F, Ribeiro AJ 2011 New delivery systems to improve the bioavailability of resveratrol. *Expert opinion on drug delivery* 8:973-990
- .63 Ansari KA, Vavia PR, Trotta F, Cavalli R 2011 Cyclodextrin-based nanosponges for delivery of resveratrol: in vitro characterisation, stability, cytotoxicity and permeation study. *AAPS PharmSciTech* 12:279-286
64. Huang W, Chen Z, Wang Q, Lin M, Wu S, Yan Q, Wu F, Yu X, Xie X, Li G, Xu Y, Pan J 2013 Piperine potentiates the antidepressant-like effect of trans-resveratrol: involvement of monoaminergic system. *Metab Brain Dis* 28:585-595
65. Tak JK, Lee JH, Park JW 2012 Resveratrol and piperine enhance radiosensitivity of tumor cells. *BMB Rep* 45:242-246
- 66 Wightman EL, Reay JL, Haskell CF, Williamson G, Dew TP, Kennedy DO 2014 Effects of resveratrol alone or in combination with piperine on cerebral blood flow parameters and cognitive performance in human subjects: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over investigation. *Br J Nutr* 112:203-213
- 67 **Michan S, Juan AM, Hurst CG, Cui Z, Evans LP, Hatton CJ, Pei DT, Ju M, Sinclair DA, Smith LE, Chen J** 2014 Sirtuin1 over-expression does not impact retinal vascular and neuronal degeneration in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *PLoS one* 9:e85031

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות 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.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
בחינת השפעת טיפול ברזברטרול על מדדי הייצור בפטמים ובמטילות .
מציאת הדרך היעילה ביותר לטיפול מבחינת האופן והמינון .
בדיקת רמת הרזברטרול בדם העופות בשיטות הטיפול השונות.
עיקרי התוצאות.
אימתנו את יציבות הרזברטרול בתערובות ובדקנו את רמתו במחזור הדם בכל הניסויים, בשיטה של LC-MS
הראנו כי טיפול נקודתי בשלב העוברי שבו מתפתחת רקמת השומן משפיע על צבירת השומן לפחות עד גיל 16 יום
הראנו הבדלים משמעותיים בביטוי גנים בתאי שומן בטן מפטמים שהודגרו בנוכחות רזברטרול המצביעים על דמיון לפעילות רזברטרול בבעלי חיים אחרים בכיוון של הקטנת ההשמנה ושיפורים מטבוליים.
מצאנו כי למינונים גבוהים של רזברטרול הניתנים בהזנה תוצאות שליליות על מדדי הייצור בפטמים ובמטילות
אך הצענו דרכים להסביר ולפתור את הסתירה הזאת בין התוצאות הצפויות לתוצאות שהתקבלו.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח?
מטרות המחקר העיקריות לא הושגו אך הידע והניסיון שצברנו יאפשרו את השגת מטרות אלה בעתיד.
הצלחנו לאתר את אופן הטיפול ברזברטרול ואת המינון המתאים לקבלת השפעה על מדדי הגדילה וצבירת השומן.
מצאנו כי הפפרין אינו משפר את יציבות ופעילות הרזברטרול בעופות.
הגענו למסקנה כי יש לבדוק את יעילות הטיפול ברזברטרול בתנאים של מאזן אנרגיה שלילי (הגבלת מזון)
ולא בתנאים של מאזן אנרגיה חיובי (אכילה חופשית) כדאי להימנע מסתירה בין האותות בגוף.
מסקנה זו תוכל להיות מיושמת בשלוחת הרבייה הכבדה הגדלה בהגבלת מזון.
1. בעיות שונות לפתרון
דרוש שיפור מסיסות הרזברטרול, שיפור הספיגה, וייצוב הרזברטרול בדם. נושאים אלה עומדים במרכז
המחקר שנועד לטיפול ברזברטרול בבני אדם והפתרונות שימצאו יוכלו לשמש גם לעופות.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי;
התוצאות פורסמו בכנס העופות ושיטת ההזרקה שפותחה במחקר זה פורסמה בעיתון PlosOne.
מאמר נוסף נמצא בכתיבה.
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) ✓
חסוי – לא לפרסום: יש לצרף אישור ומידע ממוסד המחקר
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -
כן, אחרי שיהיו בידנו פתרונות לבעיות המסיסות והיציבות של הרזברטרול

*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים.