אפיון גורמים בגלוטן חיטה המאפשרים

תזונת חולי צליאק בחיטה

סמינריון לא מחקרי מוגש לאוניברסיטה העברית בירושלים
הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה' סמית
המכון לביוכימיה ומדעי המזון והתזונה

לשם קבלת תואר מוסמך לא מחקרי למדעי התזונה

מאת: גלית שניר

ניסן תשע"א אפריל 2011

עבודה זו נעשתה בהנחיית:

ד"ר דוד בונפיל:

המחלקה לגידולי שדה במרכז מחקר גילת, מינהל המחקר החקלאי.

תודותיי נתונות:

למנחה שלי, ד"ר דוד בונפיל, שהסכים לקחת על עצמו הנחיה בנושא זה ותרם לי המון ידע, חומר למחקר ועצות טובות.

לבעלי, שהיה אחראי על התמיכה הטכנית הרבה והתמיכה המורלית, ולילדיי שהסתפקו באמא במשרה חלקית.

למשפחתי, שעזרה רבות ופינתה לי זמן איכות לצורך לימודים, ולאבא שלי ששמח לעזור בתחום המקצועי.

לד"ר מרטין שיפר, על עצותיה הטובות.

ל"קרן מולכו", שעזרה לי במימון מחקר זה לצורך שיפור החקלאות בנגב.

תוכן העניינים

1.0 תקציר 5
2.0 רקע 6
2.1 חלבוני הגלוטן וחלבוני תשמורת נוספים 6
2.1.1 גליאדין 7
2.1.2 גלוטנין 7
2.2 איכות החיטה 8
2.2.1 אינדקס גלוטן 8
2.3 גורמי השפעה על איכות החיטה 9
2.3.1 זנים 9
2.3.2 מזיקים 10
2.3.3 תנאי סביבה 11
2.3.4 מחזור גידול/ מימשק עיבודים 12
2.3.5 דישון 13
2.4 מחלת הצליאק: הגדרה ואפידמיולוגיה 15
2.4.1 אפידמיולוגיה 15
2.5 מחלת הצליאק: גנטיקה ופתוגנזה 15
2.5.1 פתוגנזה 16
2.6 מופע המחלה 19
2.7 אבחון 20
2.8 הטיפול במחלה-דיאטה נטולת גלוטן 20
2.8.1 היענות לדיאטה 21
2.8.2 כמות סף של גלוטן בדיאטה 22
2.9 פרוגנוזה 22
3.0 גישות חדשות לטיפול בצליאק 23
3.1 שימוש בחיידקים פרוטאוליטיים 23
3.2 שינוי בתכונות החיטה ו/ או קמח החיטה 26
3.3 עיכוב חלבון הזונולין 28
3.4 עיכוב האנזים tTG 28
3.5 פיתוח אנלוגים לגלוטן 29
4.0 מטרות המחקר והשערות המחקר 31
4.1 מטרות המחקר 31
4.2 השערות המחקר 31
4.3 איזור המחקר 31
4.4 חשיבות המחקר 31
4.5 שיטות המחקר 32
4.5.1 ניתוח סטטיסטי 32
5.0 תוצאות 33
5.1 חלקת "יהודית" 33
5.2 חלקת "מסחרי" 34
5.3 חלקת בעל 35
5.4 חלקת שלחין 37
5.5 רגרסיה רבת משתנים 38
6.0 דיון ומסקנות 41
6.1 בחינת הקשר בין זן לאינדקס גלוטן 41

6.2 השפעת דישון 41
6.2.1 בחינת הקשר בין דישון בחנקן לאינדקס גלוטן..... 41
6.2.2 בחינת הקשר בין דישון בזרחן לאינדקס גלוטן..... 42
6.2.3 בחינת הקשר בין דישון באשלגן לאינדקס גלוטן 43
6.3 בחינת הקשר בין מימשק לאינדקס גלוטן..... 43
6.4 בחינת הקשר בין: משקעים, כמות חלבון גבוהה ואינדקס גלוטן..... 44
6.5 בחינת הקשר בין חיטה עם אינדקס גלוטן נמוך למחלת הצליאק 45
6.6 סיכום..... 48
7.0 ביביליוגרפיה..... 49

1.0 תקציר

החיטה מהווה את הגידול המרכזי של השטחים הפתוחים בישראל. לטענת צרכני החיטה, טחנות הקמח והמאפיות, בשנים האחרונות עלתה והחריפה הבעיה שהחיטה הגדלה בארץ אינה איכותית. "אינדקס גלוטן" הוא מדד לאיכות החלבון המבטא את אחוז המסה של הגלוטן הנשאר על נפה לאחר סינון בצנטריפוגה. חיטה בעלת ערך אינדקס גלוטן הנמוך מרמת הסף אינה מאושרת לשיווק כחיטת לחם וגורמת להפסדים כלכליים למגדלי החיטה.

המטרה הראשונה של עבודה זו היא לבדוק מה הגורמים המשפיעים על אינדקס הגלוטן. נבדקו גורמים שונים ובהם: זן, כרב, סוג עיבוד, ממשק הזנה וכמות המשקעים.

נאספו דגימות מעונת 2007 מחלקות ניסוי במרכז מחקר גילת שבנגב. דגימות החיטה שנתקבלו עברו בדיקות להערכת איכות בתנאים מבוקרים. כל דגימה קיבלה ציון לפי מדד אינדקס הגלוטן ונותח הקשר בינה לבין גורמי הסביבה והממשק שנבדקו.

הגורמים שנמצאו במסגרת עבודה זו כמשפיעים הם: השפעה שלילית של מתן דישון בחנקן וזרחן והשפעה של הזן.

מטרה נוספת של עבודה זו היא בחינת ההשלכות של אינדקס גלוטן נמוך על אפשרות תזונת חולי צליאק בחיטה על פי הנתונים בספרות.

חיטה בעלת אינדקס גלוטן נמוך יכולה לאפיין מצב של פגיעה בחלבוני הגלוטן למשל בעקבות עקת חום או עקת מים, או פירוק אנזימטי ע"י המזיק פשפש הקמה.

לפי סקר ספרות שנערך נמצא כי קיימים היום מחקרים אשר בודקים אפשרויות שונות של מתן חיטה לחולי צליאק לאחר שנערכו שינויים כימיים או אנזימטיים במבנה הגלוטן. השינויים העיקריים שנבדקו והוכיחו תוצאות ראשוניות טובות הם: תוספת אנזימים פרוטאוליטיים ממקורות בקטריאליים או פטרייתים שגורמים לפירוק קשרי הגלוטן ויוצרים פפטידים שאינם מעוררים את המערכת החיסונית. כמו כן ישנם מחקרים שבחנו שינויים כימיים כגון: חימום, חומצה ועוד ואף הם הראו יכולת הורדה של התגובה החיסונית של חולים בתנאים מסויימים.

נמצא שחיטה בעלת אינדקס גלוטן נמוך עברה פירוק של שרשרות הגלוטנינים ובמידה מסוימת גם של שרשרות הגליאדינים, אולם אין עדיין מחקרים שבדקו האם פירוק זה מספיק כדי שניתן יהיה לתת חיטה כזו לחולים. לאור ממצאי עבודה זו מומלץ להמשיך בעבודה עתידית לבדוק האם פירוק זה כולל בתוכו גם את הרצפים הידועים כמעוררי מערכת החיסון של החולים ולבדוק היתכנות של מתן קמח מסוג זה על מערכת החיסון של החולים.

2.0 רקע

מחלת הצליאק הינה מחלה המשלבת אי סבילות למזון, תגובה חיסונית אוטואימיונית ומאפיינים גנטיים. עד לאחרונה נחשבה מחלה זו כנדירה, אולם ממצאים מהשנים האחרונות מראים כי שכיחותה הולכת ועולה. הטיפול היחיד המקובל כיום למחלה זו הוא הימנעות מוחלטת מגלוטן (Rubio-Tapia et al., 2009).

למרות יעילות הטיפול, הוא משלב גם חסרונות כגון קושי בהתמדה, פגיעה באורח החיים, עלויות יקרות ועוד. בשנים האחרונות בעקבות התקדמות בהבנת הבסיס המולקולרי למחלה נעשים מחקרים למציאת פתרונות חדשים לטיפול במחלה. חלק ממחקרים אלו מתמקדים ברצפי הגלוטן מהחיטה ובודקים האם ניתן לגרום להם לעבור שינוי כך שיהפכו להיות בטוחים לשימוש לחולים.

הגלוטן בחיטה (*Triticum aestivum L.*) משמש למאפיות להערכת טיב החיטה ונבדק ע"י מדד הנקרא "אינדקס גלוטן". מדד זה מעיד על איכות החיטה וטיבה, ונמצא כבעל קשר הדוק לתכונות האפייה. הוא מייצג את היחס בין הגלוטן בעל שרשרות החלבון הארוכות לבין כלל הגלוטן הרטוב שכולל גם שרשרות קצרות. חיטה בעלת ערך אינדקס גלוטן הנמוך מרמת הסף אינה מאושרת לשיווק כחיטת לחם וגורמת להפסדים כלכליים למגדלי החיטה.

בעבודה זו בחרתי לערוך סקירת ספרות בנושא מחלת הצליאק, הטיפול במחלה כיום ואפשרויות נוספות לטיפול הנמצאות בשלבי פיתוח, והאם ניתן להשתמש בחיטה ירודה עקב אינדקס גלוטן נמוך כמזון לחולי צליאק.

כמו כן, המחקר יבדוק את השפעת תנאי הסביבה והממשק על מדד אינדקס הגלוטן בחיטה.

2.1 חלבוני הגלוטן וחלבוני תשמורת נוספים

דגנים הם הגידול העיקרי והחשוב ביותר בעולם. כאשר מתוך הדגנים ישנם שלושה המהווים את מקור התזונה העיקרי והם: חיטה, תירס ואורז, אשר מהווים 70% מכלל הדגנים המיוצרים בעולם (Wieser, 2007). בישראל חיטה מהווה גידול נרחב באיזורים בעלי מיעוט משקעים (Klein et al., 2002).

גרעיני הדגנים מכילים כמות יחסית קטנה של חלבון: 10-12% ממשקל הגרגר היבש, אולם הם מהווים מקור נכבד לחלבון בתזונה היומית. בנוסף לתרומתם התזונתית יש לחלבונים תפקיד חשוב בתהליך הכנת המזון, ובייחוד נכון הדבר לגבי חלבוני החיטה אשר נאכלת לאחר שעברה תהליך עיבוד ואפייה.

חלבוני הגרגר נחלקים לשלוש קבוצות עיקריות:

חלבוני התשמורת (פרולאמינים), חלבוני מבנה וחלבונים בעלי תפקיד הגנתי.

חלבוני התשמורת העיקריים באנדוספרם מרבית הדגנים הינם הפרולאמינים. הפרולאמינים מוגדרים כחלבונים המסיסים בתערובת של מים ואלכוהול, ובנוסף הם מאופיינים בכך שהם עשירים בפרולין ובתוצרי גלוטמין. בין הפרולאמינים השונים יש הבדל גדול מאוד בהרכב חומצות האמינו ובמסה המולקולרית שלהם (Shwery & Halford, 2002). הגלוטן בחיטה הוא שם כולל לחלבוני התשמורת: גלוטנינים וגליאדינים. גלוטן מוגדר כמסה האלסטית הנשארת בבצק החיטה לאחר הוצאת הגרנולות העמילניות והרכיבים המסיסים במים. באופן מעשי המונח "גלוטן" מתייחס לחלבונים בעלי תפקיד מפתח בקביעת איכות האפייה של החיטה ע"י הענקת יכולת ספיחת מים, צמיגות, אלסטיות ולכידות לבצק. הגלוטן מכיל מאות תרכובות של חלבונים המורכבים ממונומרים או אוליגומרים ופולימרים המחוברים בשרשראות די סולפידיות. חלבוני הגלוטן מחולקים לשתי פרקציות עיקריות עפ"י תכונות המסיסות שלהם בתערובת של מים ואלכוהול: החלבונים המסיסים: גליאדינים, ושאינם מסיסים: הגלוטנינים. שתי הקבוצות בעלות חשיבות גדולה בתהליך הכנת הבצק, אולם לכל אחת מהם תפקיד שונה. הגליאדינים תורמים בעיקר ליכולת המתיחה והצמיגות של הבצק, ואילו הגלוטנינים תורמים ליכולת ההתלכדות ולאלסטיות של הבצק ולכן הם אלו שאחראים לחוזק הבצק ולגמישותו (Abonyi et al., 2007 ; Wieser, 2007). הרכב חלבון הגלוטן הוא בממוצע כ-50% גליאדין, 10% גלוטנין מסוג HMW ו-40% גלוטנין מסוג LMW (Wieser, 2007). שילוב של פרקציות הגליאדינים והגלוטנינים חיוני ליצירת לחם איכותי.

2.1.1 גליאדין

חלבוני הגליאדין מחולקים לארבע קבוצות עיקריות, לפי יכולת התנועה שלהם ב PH נמוך: α, β, γ, ω. גם בתוך קבוצות אלו מתקיימת חלוקה נוספת לפי משקל מולקולרי והרכב חומצות האמינו. מולקולת הגליאדין מכילה שרשרת יחידה של פוליפפטידים במשקל מולקולרי של 30,000-80,000. היחס בין חלבונים אלו משתנה לפי גנוטיפ החיטה ולפי תנאי הסביבה: קרקע, אקלים, דישון ועוד (Shwery & Halford, 2002).

2.1.2 גלוטנין

פרקציית הגלוטנין מכילה חלבונים בעלי קשר די סולפידי הנבדלים ביניהם בגודלם המולקולרי ולפי תכונה זו מתבצעת החלוקה בין החלבונים השונים. במחקרים רבים נמצא כי חלבונים בעלי משקל מולקולרי גבוה high molecular weight (HMW) הם התורמים העיקריים לתכונות הקמח. כמותם ואיכותם בקמח החיטה נמצאה בקורלציה לתכונות של חוזק הבצק ונפח הלחם. גם בתוך קבוצת הגלוטנינים בעלי משקל מולקולרי גבוה ישנה חלוקה נוספת לתת יחידות ספציפיות מתוכם אותרו כאלה בעלות השפעה מוגברת על חוזק הבצק (Weegels et al., 1996 ; Wieser, 2007).

גלוטנינים בעלי משקל מולקולרי נמוך low molecular weight (LMW) מהווים מרכיב דומיננטי בחלבון הגלוטן. משקלם המולקולרי נע בין 36,000-44,000 והם דומים בהרכב חומצות האמינו שלהם לחלק מהגליאדינים (Weegels et al., 1996).

2.2 איכות החיטה

איכות החיטה נמדדת בפרמטרים רבים התלויים בסוג השימוש הרצוי. ניתן לחלק מדדים אלו לשלוש קבוצות: מדדים פיזיים של טיב הגרגר, מדדים של תפוקת הטחינה ומדדי התנהגות הבצק. מחקרים רבים שנעשו הראו כי חלבון החיטה הינו המרכיב בעל ההשפעה העיקרית על איכות תכונות האפייה. המחקרים הראשונים התמקדו בתכולת החלבון בגרגר ומצאו כי הוא תורם לאיכות הקמח, אולם לא רק כמות החלבון מסבירה את ההבדלים באיכות הקמח בין סוגי החיטה השונים אלא גם איכות חלבון הגלוטן, כפי שבאה לידי ביטוי בחלוקה בין פרקציות החלבון השונות: הגליאדינים והגלוטנינים (Weegels et al., 1996 ; Johansson & Svensson, 1998).
איכות חלבון החיטה נקבעת על פי שני גורמים עיקריים: תכונות גנטיות (Edwards et al., 2007 ; Johansson et al., 2003) ותנאי סביבה משתנים כגון: אקלים, אופן הגידול וכן גורמי נזק כמו מזיקים, פטריות ומחלות (זוהר ופנואל, 1992; Abonyi et al., 2007). סיבות אלו גורמות למצב של חלבון גלוטן בעל איכויות משתנות ובעל הרכב וכמות שונה. שיעור והרכב החלבון משפיעים על התאמת הגרגרים לתעשיות האפייה השונות, על תכונות הבצק ועל איכות תוצר האפיה (Delwiche, 1995). עקב כך שיעור החלבון והרכבו הינם בעלי חשיבות רבה ביותר לאיכות החיטה.

2.2.1 אינדקס גלוטן

קיימות בעולם מספר שיטות מקובלות להערכת פרמטרים של איכות החיטה (Weegels et al., 1996). שיטה אשר נמצאת בשימוש בשנים האחרונות בישראל הינה שיטת אינדקס הגלוטן.
אינדקס גלוטן (Gluten Index-GI) הינו מדד פיזי לבחינת איכות גרגרי החיטה אשר נמצא בשימוש בתחנות הקבלה של החיטה בארץ, ומטרתו להעריך את איכות החיטה המתקבלת לטחינה (Curić et al., 2001).
זאת שיטה מהירה להערכת איכות החיטה. שיטה זו מודדת את איכות הגלוטן לפי פרמטר של חוזק הגלוטן. בשיטה זו הגלוטן נבנה ע"י לישה ו"חיבור" גלוטנינים עם גליאדינים, עמילנים נשטפים מהקמח והגלוטן הרטוב שנשאר עובר סירכוז בתנאים מבוקרים. אח"כ נמדד אחוז המסה של הגלוטן הנשאר על נפה בצנטריפוגה. חישוב חוזק הגלוטן נמדד לפי אחוז חלקיקי הגלוטן הנשארים במסננת לאחר שעברה סירכוז. חלקיקי הגלוטן שנשארים במסננת נשקלים ומדווחים

כאחוז מסך הגלוטן הכללי. הערך המתקבל הוא אינדקס הגלוטן. אינדקס זה מייצג את היחס שבין הגלוטן בעל שרשרות החלבון הארוכות או שיצרו קומפלקס גדול (זו הסיבה שאינם עוברים דרך רשת צפופה) לבין כלל הגלוטן הרטוב שכולל גם שרשרות קצרות אשר עוברות רשת בסירכוז (גלוטן לא איכותי) (AACC, 2000). איכות הגלוטן הנמדדת כאינדקס גלוטן נמצאה במחקרים רבים כבעלת קשר הדוק עם תכונות האפיה (Curić et al., 2001; Edwards et al., 2007 ; Kieffer et al., 1998).

בערכי GI הנמוכים מ-60 הגלוטן חלש מדי והלחם מצומק וקשה (Curić et al., 2001). בישראל גרגרי חיטה עם ערכי GI נמוכים מ-40 נפסלים לשיווק כחיטת לחם וערכם נפגע עקב שיווקם למספוא ועל גרגרי חיטה בתחום של 40-55 "נענשים" במחיר בגלל איכות ירודה.

שיטה זו נמצאת כיום בשימוש נרחב עקב יתרונות של: משך זמן בדיקה קצר, כמות דגימה קטנה, פשטות הבדיקה ומתן מענה גם לגבי איכות וגם לגבי כמות (Cubadda et al.,1992) . עם זאת, אין קשר בין איכות החיטה כפי שמבוטאת באינדקס הגלוטן לבין כמות הגלוטן.

2.3 גורמי השפעה על איכות החיטה

עד היום נעשו מחקרים מעטים לבדיקת השפעת תנאי הסביבה על אינדקס הגלוטן. בחלק מהספרות המצוטטת להלן, אני מניחה שהיות והרכב החלבונים ו/או איכות הקמח השתנו, סביר להניח שגם אינדקס הגלוטן השתנה.

2.3.1 זנים

הרכב חלבוני התשמורת הנצברים בגרגר הינו תכונה תורשתית הנקבעת על פי הזן. במחקר שנערך ע"י Johansson וחובריו (2003) נמצא שההשפעה הגנטית המובילה לאיכות חיטה שונה תלויה בביטוי שונה של פרקציית הגליאדין והגלוטנין, הבדל בביטוי של פולימרים מסוג HMW גלוטנין וכמות שונה שלהם. כאשר יש קורלציה חיובית בין מולקולות HMW גלוטנין לבין חוזק הבצק. בנוסף נמצאה קורלציה חיובית בין כמות הגלוטנינים הכללית לתכונות של איכות הבצק. מחקר זה מתאים לממצאי מחקרים אחרים שאף הם הראו תוצאות דומות (Weegels et al., 1996 ; Chung et al., 2003 ; Shewry & Halford, 2002).

לכן זנים שונים הינם בעלי איכות גלוטן שונה כפונקציה של הגנים המבוטאים בהם. נמצא קשר בין זני חיטה בעלי גנוטיפים שונים לחוזק הגלוטן ולאינדקס גלוטן שונה הן בעולם (Curić et al., 2001; Johansson et al., 2003 ; Edwards et al., 2007), והן בעבודות שנעשו בארץ (בונפיל וחוב., 2010) אשר חילקו את הזנים לפי איכותם כפי שבאה לידי ביטוי במדד של אינדקס הגלוטן. המרכיב הגנטי גורם לתכולה שונה של פרקציות החלבונים, עיקר

ההבדל הוא בהרכב הגליאדין והגלוטנין בגלוטן, וכמו כן ישנו הבדל בתת היחידות שבתוכם. כך נוצר הרכב שונה של חלבון הגלוטן בזנים שונים (Johansson et al., 2003 ,Chung et al. ; 2003). ההבדל בתכולת החלבונים מתבטא בהבדל באיכות הקמח לאפיית לחם בין זנים שונים, בין השאר במדדים של: נפח הלחם, יכולת ההתרחבות וההתנגדות ועוד (Weegels et al., 1996).

הבדל נוסף בין הזנים הוא תגובתם לעקות סביבתיות שונות (הר גיל, 2010).

2.3.2 מזיקים

עבודות רבות בשנים אחרונות בארץ ובחו"ל הראו כי מזיק בשם פשפש הקמה (*Eurygaster integriceps*) פוגע באינדקס הגלוטן (Sivri et al., 2002 ; Aja et al., 2004 ; Kostyukovsky & Zohar, 2004). בעבודה שנעשתה ע"י Sivri ועמיתיו (2002) נמצא כי הפשפש מחדיר דרך הרוק שלו פרוטאזות לתוך הגרגר המתפתח שגורמות לעיכול של החומר הצמחי וכך ניזון החרק מהגרגר. הפרוטאזות במפגשן עם החלבון גורמות להידרוליזה של מולקולות הגלוטנין והגליאדין אשר מעוכלות ונחתכות לשרשרות קצרות. נמצא שהפגיעה העיקרית היא ב HMW גלוטנין ע"י פירוק הידרוליטי שגורם לירידה בגודל הפולימרים של גלוטנין. במספר עבודות (Aja et al., 2004 ; olanca et al., 2009) נמצא שהסובסטרט העיקרי לפעילות הפרוטאוליטית הם ה- HMW גלוטנין, ובשיעור קטן יותר ה- LMW גלוטנין וחלק מהגליאדינים. כך גורם המזיק לקמח חלש יותר המתבטא באינדקס גלוטן נמוך יותר.

במחקר שנערך בארץ ע"י Kostyukovsky & Zohar (2004) נמצא כי צמחים הנגועים בפשפש הקמה היו בעלי אינדקס גלוטן נמוך יותר, אולם נמצא הבדל בדרגת הפגיעה כתלות ב: זן, שלב הגידול, השלב בו נמצא החרק, השפעה של מזג אויר ועוד השפעות סביבתיות. ישנם זנים "חלשים" שככל שנפגעו יותר מהמזיק כך נראתה ירידה באינדקס הגלוטן שלהם, ולעומתם זנים חזקים שגם לאחר שנפגעו מהמזיק איכות החלבון שלהם כמעט ולא נפגעה. בכל החלקות שקיבלו הדברה כנגד פשפש הקמה נמצאה עליה בערכי אינדקס הגלוטן. מחקר זה הינו בעל תוצאות קוהרנטיות למחקרים אחרים שבדקו את השפעת המזיק על חלבון הגלוטן אשר מצאו הבדל בין תגובות זנים שונים לפגיעת פשפש הקמה (Aja et al., 2004 ; Vaccino et al., 2006).

בעבודה שבחנה השפעה של מזיקים ביחד עם עקת חום ונעשתה ע"י Torbica וחובריו (2007) הושוו קמחים משתי שנים: אחת ללא עקות חום וללא פגיעת מזיקים, ולעומתם קמח שנקצר בשנה עם עקת חום ופגיעה של מזיקים, (עקת חום בשלב מילוי הגרגר ובתחילת הקציר). נמצא שבשנה בה היו מזיקים ועקת חום היתה ירידה בכמות הגלוטנינים, בעיקר מסוג HMW, אולם נמצא גם שינוי בכמות הגליאדינים ובכמותם. נמצא ששרשרות עם מ"מ גבוה מ- 70KD נעלמו, ולעומת זאת עלו שרשרות עם מ"מ נמוך מ- 70KD. שינויים אלו גרמו באופן ברור לירידה ב Gl, לקמח חלש

ובעל נפח נמוך. בנוסף נמצאה עליה ביחס גליאדינים: גלוטנינים. נמצא שההשפעות על פרקציות החלבון הנ"ל קרו רק עקב פגיעת מזיקים ולא הושפעו מעקת החום. דבר זה מראה על עמידות לעקת חום, בניגוד להשפעה של מזיקים בשדה.

2.3.3 תנאי סביבה

למרות ההשפעה הגנטית העיקרית על איכות הגלוטן, גם בתוך אותו זן נמצא הבדלים שמקורם בתנאי סביבה שונים, גם בעבודות בעולם (Curić et al., 2001 ; Johansson et al. 2003 ; Johansson & Svensson,1998) וגם בעבודה שנערכה בארץ ע"י הר גיל (2010).
תנאי סביבה שונים מתבטאים ב: טמפרטורה, משקעים, מספר ימי שמש, מחזור הגידול ועוד.
מחקרים רבים בדקו השפעות סביבתיות אלו על איכות החיטה והם יסקרו להלן.

2.3.3.1 משקעים

המשתנה המשפיע ביותר על יבול החיטה הוא משטר המים (Blumenthal et al., 1993). ישנה חשיבות לכמות המשקעים השנתית, אולם גם לפיזור ימי הגשם, משכם ועוצמתם. בנוסף לחיטה יכולת ניצול מים משכבות הקרקע העליונות והתחתונות (Bonfil et al., 1999).
כמות משקעים מרובה בשלב מילוי הגרגר יכולה לגרום לדליפת חנקן מהקרקע וכך להארכת חיי הצמח והעלים אשר מאריכה את תהליך הפוטוסינתזה וייצור העמילנים, ועקב כך לגרעינים עם תכולת חלבון נמוכה באופן יחסי (Johansson & Svensson, 1999), וכן לפחיתה באינדקס גלוטן עקב הגברת החשיפה לעקות טמפרטורה שנוצרה כיון שהתארך שלב מילוי הגרגר (הר גיל, 2010).
לחילופין, במחקר שנערך ע"י Gooding ועמיתיו (2003) על השפעת תנאי בצורת בסביבת גידול מבוקרת נמצא כי חוסר גשמים בשלב מילוי הגרגר, בעיקר בימים 7-1 מהפריחה, גורם לירידה במשקל הגרגר ולעליה בתכולת החלבון בגרעין מכיון שנפגעת יכולת צבירת העמילן. דבר זה גורם לירידה בתפוקת היבול ובאיכות הגרגרים המתקבלים. הדבר נובע מכך שהתרחבות התא תלויה בצריכת המים, ובחוסר מים היא נעצרת, אז נוצרת הפסקת הגדילה והבשלה של הגרגר ובכך מתקצרת תקופת מילוי הגרגר. כך שהשפעת המים היא מורכבת וקשורה למשתנים סביבתיים נוספים ומובילה למשרעת איכויות גדולה (Lopez-Bellido et al., 1998).

2.3.3.2 טמפרטורה וימי שמש

במחקרים רבים (Johansson & Svensson, 1998 ; Gooding et al., 2003) נמצא קשר בין טמפרטורות וימי שמש לאיכות החלבון. ההשפעה יכולה להיות בשילוב עם עקת מים או באופן עצמאי. עליית טמפרטורה בשילוב עם עקת מים (Gooding et al., 2003) וללא עקת מים

(Johansson & Svensson, 1998) עד לטמפרטורה של 30°C נמצאה כבעלת השפעה חיובית על עלייה בתכולת החלבון, עקב הירידה בעמילנים, ועל איכותו. נמצא קשר חיובי בין מספר ימי השמש לנפח הלחם, ריכוז החלבון בגרעין ואיכות החלבון (לפי Mixogram Index), וקשר בין טמפרטורה ממוצעת לאיכות החלבון בשלב מילוי הגרגר (Johansson & Svensson, 1998). אולם טמפרטורה של מעל 30°C בשלב מילוי הגרגר גורמת לפגיעה באיכות החלבון עקב שינוי שנגרם למבנה החלבון ומשפיע על פרקציות החלבון השונות. נמצא שהשפעת חום גבוה משתנה לפי משקל מולקולרי של החלבונים וכי גליאדין עקב משקל מולקולרי נמוך יותר הינו רגיש יותר לעקת חום (Statopholos et al., 2006). נמצא שמספיקים שלושה ימי חום עם טמפרטורות מעל 30°C בתקופת מילוי הגרגר כדי להפוך את הקשר החיובי שבין אחוז החלבון לחוזק הבצק לקשר שלילי. מלבד במקרים בהם יש שפע של מים, נמצא קשר ליניארי בין חומרת בצורת בזמן מילוי הגרגר לאיכות החיטה (Ciaffi et al., 1996).

2.3.4 מחזור גידול/ מימשק עיבודים

למחזור הגידולים השונים השפעה מיטיבה בהתמודדות עם עשבים רעים, מחלות ומזיקים בהשוואה לגידול חיטה רציף. זאת ע"י הגדלת המגוון הביולוגי במערכת החקלאית. מחקרים הראו כי חילוף הגידולים משפר את אצירת המים בקרקע ומעלה את היבול במיוחד באיזורים צחיחים למחצה (Schultz, 1971). הגידולים המקובלים במחזור גידול הם: חיטה, ירקות, מקשה, קטניות, חמניות ועוד.

צורת גידול נוספת היא כרב נח שזהו חוסר גידול מוחלט על הקרקע באותה שנה. במצב זה הקרקע בשדה עוברת השבחה מכיון שאין דרישה למים ומינרלים, ורמת פגעים אחרים יורדת. בעבודתו של Lopez Bellido ועמיתיו (1998) נמצא שמחזור גידולים גרם לשיפור תכונות איכות של החיטה כפי שנמדד ע"י תכונות ויסקו- אלסטיות של הבצק וגם גרם לעליה בתכולת החלבון. קמח באיכות הגבוהה ביותר התקבל בשימוש במחזור גידולים שונים. בנוסף נמצאה עדיפות לממשק עיבוד מינימלי שגרם לעליה בתכולת החלבון ואיכותו עקב השפעה על מים וחנקן בקרקע. קמח באיכות הנמוכה ביותר התקבל בשיטה של דגן רציף (גידול החיטה כל שנה).

בנוסף, לממשק עיבודי הקרקע: פליחה, אי פליחה או מינימום פליחה יש השפעה על כושר ייצור הייבול. גם חיפוי קש היא שיטה לשיפור איכות הקרקע מבחינת אחזקת מים בקרקע ופעילות מיקרוביאלית מוגברת. נמצא שממשק הגידול ללא עיבודי קרקע תרם למניעת סחף קרקע ע"י רוח ומים ללא תלות בסוג הקרקע ובמיקום הגיאוגרפי, בשילוב עם חיפוי הקרקע בקש התקבלה חדירות מים ואוגר מים בקרקע מירביים (Bonfil et al., 1999 ; Karlen et al., 1994). ההשפעה העיקרית היתה על הגברת כושר הייבול ועליה במשקל הגרגר בממשק זה. כמו כן ממשק אי

פליחה הביא לעליה בכמות הנוזלים בזמן הנביטה ולעליה במסה בזמן הנביטה (Klein et al., 2002).

2.3.5 דישון

2.3.5.1 דישון בחנקן

צמח החיטה זקוק לאספקת חנקן מבוקרת מראשית גידולו ולאורך כל שלבי הגדילה. החנקן מהווה אבן בניין לחלבונים בשלבים השונים ובעיקר אחראי על ייצור המסה הוגטטיבית ומנוצל לשם ייצור הגרעינים. מחסור בחנקן עלול לפגוע באיכות ובכמות היבול (אפרת וחובריו 1995 ; Shimshi & Kafkafi, 1978;). עקב כך החנקן הוא הגורם השני בחשיבותו, אחרי מים, המגביל את גידול החיטה (Cooper et al.,1987).

במחקרים רבים שנעשו נמצא כי דישון נמצא בקורלציה חיובית למדדים של משקל נפחי, כמות הגרעינים ומשקלם, תכולת החלבון בגרגר, ספיחת מים ע"י הקמח וכן גורם לנפח גדול יותר של כיכר הלחם. כמו כן נמצאה השפעה חיובית שלו על איכות הקמח המתקבל ע"י כך שמעלה תכולת חלבונים ומגדיל את המטריקס שלוכד בתוכו CO_2, כך עולה חוזק ונפח הלחם. (Johansson & Svensson, 1998 ; Varga & Svenjak, 2006) .

אולם השפעת הדישון הינה מורכבת. כאמור, מעט מדי דישון מוריד את היבול המתקבל, אך עודף דישון יכול לגרום לצמחים החשופים למחסור במים עקב צימוח מוגזם, ובסיכון למחלות, וע"י כך תפגע הן כמות היבול והן איכותו.

גורם חשוב במתן דישון הוא מתי לדשן. במחקר שנעשה ע"י Bonfil וחבריו (2004) נמצא שדישון בשלב שלפני הזריעה מעודד גדילת צמחים ולכן יגרום לניצול מוגבר של מים בזמן הגדילה, כך יכול להיווצר מצב של מחסור במים בשלב מילוי הגרגר וכתוצאה גרגר בעל איכות נמוכה.

דישון בשלב הפריחה יגרום להגברת תכולת החנקן בגרעין וכך יגדיל את אחוז החלבון בגרגר, דבר זה יכול גם להוריד את איבוד החנקן שנגרם עקב גשמי החורף.

נמצא גם שמתן דישון חנקני בשלב מאוחר של עונת הגידול מעלה את תכולת החלבון בגרעין (Bonfil et al., 2004).

2.3.5.2 דישון בזרחן

זרחן הוא הנוטריינט השני ,לאחר חנקן, הנמצא כגורם מגביל בגידול דגנים בכלל וחיטה בפרט. עקב כך הוא הגורם השני בחשיבותו מבחינת דישון לאחר חנקן. זרחן הוא בעל השפעה עיקרית על הנצר, ובנוסף משפיע על כמות הגרגרים ועוזר להתפתחות השורש (Elliott et al., 1997 ; Ortiz-Monasterio et al., 2002).

במחקר מאת Ron & Loewy (2000) נמצא שתוספת זרחן בקרקעות עם מחסור בזרחן גרם להגברת הייבול, וכן השפיע על איכות החיטה ע"י העלאת משקל נפחי, כמות גרגרים ושיפור ביכולתו של הצמח להתמודד עם עשבים רעים.

במחקר מאת Ortiz-Monasterio ועמיתיו (2002) נמצא שתוספת זרחן הגדילה את כמות הייבול. אולם, באשר לאיכות החלבון נמצא כי ההשפעה משתנה לפי גנוטיפ החיטה. בחיטת דורום נמצא שיפור באיכות החלבון (שהתבטא בסוג החלבון, אך לא בכמותו) אולם בדגן מסוג *triticale* לא נמצאה כל השפעה.

גם כאן יש חשיבות לזמן ולכמות הדישון. מתן מוגזם של זרחן יכול לגרום לגדילה וגטטיבית עודפת שתגרום לניצול מים באדמה עוד לפני השלמת התפתחות הגרעין ועקב כך למחסור במים בשלבים יותר מאוחרים וע"י כך תפגע איכות החלבון (Colwell, 1963).

2.3.5.3 דישון באשלגן

אשלגן הוא אחד הנוטריינטים המרכזיים הנחוצים לצמח לצורך גדילה. אשלגן מעורב בתהליכים רבים ובעיקר: ספיגת מים, פוטוסינתזה, אקטיבציית אנזימים והובלת מוטמעים.

אשלגן בעל השפעה על איכות החיטה בגלל חשיבותו לתהליך הפוטוסינתזה והובלת המוטמעים. במחסור שלו תיגרם ירידה הן באיכות החיטה והן בכמות הייבול (Pettigrew, 2008).

במחקר שנערך ע"י Mengel וחובריו (1981) נמצא שחיטים שקיבלו דישון באשלגן הראו ריכוז גבוה יותר של חומצות אמינו בגרגר שלהם, בגלל קצב מעבר גבוה יותר של חומצות אמינו מהחלק הוגטטיבי של הצמח לגרגר, וכך נוצרה בגרגר הצטברות של חומצות אמינו. הסברה היא שהשפעת אשלגן היא דרך זמינות גבוהה יותר של ATP לצמח. בגרגר נמצאו בריכוז גבוה יותר חומצות אמינו מסוג גלוטמט ואספרגין. בנוסף כנראה שישנה השפעה (פחות חזקה) גם על סינטוז חומצות אמינו לחלבונים בגרגר (אלבומין, גלובולין ופרולאמינים).

בסקירה שערך Wang וחובריו (2008) נמצא שבניגוד לממצאי המחקר הקודם, במחקרים שנעשו בשדה דישון באשלגן הראה חוסר השפעה על ריכוז החלבון, והשפעתו היתה רק על עליה בכמות היבול.

2.4 מחלת הצליאק: הגדרה ואפידמיולוגיה

מחלת הצליאק מאופיינת באי סבילות למזון המשולבת עם תגובה אוטואימיונית של מערכת החיסון, ובעלת רקע גנטי. במחלה זו יש אי סבילות קבועה לחלבוני התשמורת: הפרולאמינים המצויים בחיטה, שעורה ושיפון, העיקרי שבהם הוא הגלוטן. היסטוריית המחלה תוארה כבר במאה הראשונה, אבל רק לאחר מלחמת העולם השנייה נצפה ותואר לראשונה הקשר לאכילת חיטה (Hill et al., 2005). המחלה בצורתה הקלאסית מאופיינת בתת ספיגה, המתבטאת באנמיה, שלשולים ועיכוב בגדילה אשר מקורם בתהליך דלקתי קבוע ברירית המעי הדק. חלבוני הגלוטן וחלבוני תשמורת של דגנים נוספים מהווים את הגירוי להתפתחות הדלקת ברירית המעי. אולם, כיום ידוע כי המחלה מופיעה גם בצורות רבות נוספות. תסמיני המחלה חולפים יחד עם ריפוי מלא של רירית המעי בעקבות דיאטה נטולת גלוטן (Alaa et al., 2006).

2.4.1 אפידמיולוגיה

כיום שכיחות מחלת הצליאק מוערכת בין 0.7-2% מהאוכלוסיה. המחלה נפוצה בכל מדינות העולם, ולא רק במדינות אירופה כפי שסברו פעם, אולם היא נמצאת בשכיחות גבוהה יותר אצל לבנים, ובשכיחות נמוכה אצל היספנים, אפרו אמריקאים ואסייתים (Marian, 2005). למרות שבשנים האחרונות שיעור האבחון עולה, עדיין ההערכה היא כי ישנם חולים רבים שאינם מאובחנים, לכן כנראה ששיעורי המחלה גבוהים מהנתונים עליהם מדובר כיום, כנראה אפילו פי 3-4 מנתונים אלו (Laurin et al., 2004 ; Hischenhuber et al., 2006 ; Rubio-Tapia et al., 2009). בנוסף נמצא כי באוכלוסיה המבוגרת (מעל גיל 55) שיעור החולים מגיע אף ליותר מ-2% וזאת כנראה מכיון שהמחלה מתגלה בטווח רחב של גילאים (Vilppula et al., 2009). בסקירת מחקרים שבחנו את שכיחות המחלה בישראל (Lerner, 2010) נמצא כי השכיחות היא של 0.48-0.7% מהאוכלוסיה (פחות מאחוז מהאוכלוסיה). אולם, הנתונים הקיימים היום הינם רק על אוכלוסיות ספציפיות (כגון: תורמי דם, חיילים ועוד) מה שיכול לגרום להטיה בתוצאות, ובאופן כללי יש חוסר של נתונים.

2.5 מחלת הצליאק: גנטיקה ופתוגנזה

במחלת הצליאק קיים מרכיב גנטי דומיננטי: 95% מחולי הצליאק נושאים אלל מסוג HLA DQ2. כמו כן קיימת שכיחות של 10% למחלת צליאק בקרב קרובים מדרגה ראשונה (Alaa et al., 2006).

לגנים מקבוצת HLA תפקיד מכריע במפגש האימיוני: גנים אלה מקודדים לגליקופרוטאינים הקושרים אנטיגנים המוצגים למערכת החיסון, ז"א לתאי T. התצמיד HLA-אנטיגן יכול לגרום לשפעול של תאי T, או להיעדר תגובה. אופי התגובה של תאי T , שפעול או התעלמות תלוי בין

השאר בסוג האנטיגן (גלוטן) ובתאחיזה ל HLA, ולכן גם סוגי HLA יכולים להשפיע על אופי התגובה החיסונית.

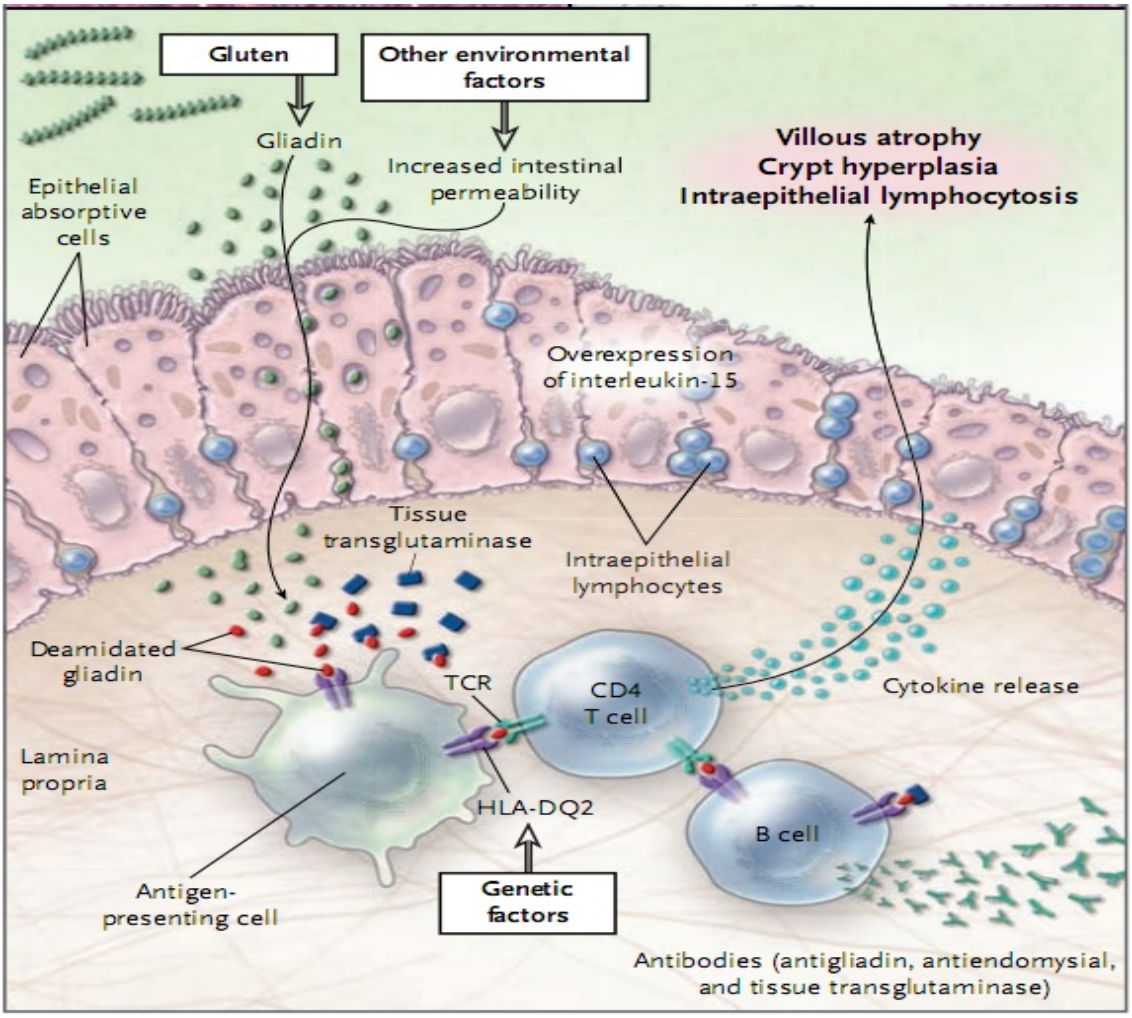
לכ- 95% מהחולים יש אלל מסוג HLA-DQ2 וליתר החולים אלל מסוג HLA- DQ8 (Mowat, 2003). עם זאת מחקרים בתאומים מצביעים על כך שגנים מסוג HLA אחראי רק לכ- 40% מההורשה וכמו כן גנים אלו נמצאים בכ-30% מהאוכלוסיה הרגילה אשר רק מיעוטם יחלה בסופו של דבר בצליאק. לכן קיימים ככל הנראה גם גנים אחרים הגורמים להתפתחות המחלה. נוכחותם של גנים של HLA הינה, אם כן, הכרחית אך לא מספקת ליצירת המחלה ולא כל אדם בעל מבנה גנטי כנ"ל יהיה בסופו של דבר חולה צליאק. לא ברור כיום מהם הגורמים אשר יקבעו בסופו של דבר מדוע רק אחוז קטן מהאנשים עם מבנה גנטי מסוג זה יפתחו צליאק (Green & Bana, 2003). יחד עם זאת ברור כי תנאים הכרחים להתפתחות המחלה כוללים מאפיינים גנטיים מסוימים ומגע עם גלוטן, אך לעיתים רבות לשם התבטאות המחלה דרוש גם גורם נוסף, כגון: זיהומים במערכת העיכול או עקה כלשהיא אשר מעוררים את התפרצות המחלה (Peter et al., 2007).

2.5.1 פתוגנזה

מחלת הצליאק מאופיינת בתגובה חיסונית המתווכת ע"י תאי T משופעלים הגורמים לדלקת כרונית במעי. הדלקת ברירית המעי גורמת חדירות של תאי האפיתל והלמינה פרופריה ושינויים מבניים בשכבת המוקוזה. הדלקת מתחילה במעי הדק הפרוקסימלי ויכולה לערב את כל חלקי המעי. התפתחות תאי T המגיבים כנגד גלוטן הינה אופיינית לחולי הצליאק.

התגובה החיסונית מתרחשת בו זמנית בשני מקומות: בלמינה פרופריה ובשכבת האפיתל שבמעי. החלק המתרחש בלמינה פרופריה מתווך ע"י תאי T מסוג CD4, בעוד התגובה המתרחשת באפיתל מתווכת, ככל הנראה, ע"י תאי T מסוג CD8 .

תאי T מסוג CD4 בלמינה פרופריה נושאים HLA-DQ2 ו- HLA-DQ8 האופיינים בתגובות אוטואימיוניות (Green & Bana, 2003 ; Alaa et al., 2006).



איור 1. פתוגנזה של מחלת הצליאק (Peter et al., 2007).

ממחקרים שנעשו בשנים האחרונות נמצא כי תאי ה-T של חולי צליאק משופעלים ע"י אפיטופים מסוימים שבחלבון ה-α גליאדין. רצפים אלו עמידים לפירוק ע"י אנזימים גסטריים, פנקריאטים ואינטנסטינלים, ומהווים סובסטרט לאנזים Tissue Transglutaminase (tTG). לאחר האינטרקציה עם האנזים tTG הם עוברים דה אמידציה המקנה להם אפיניות חזקה למולקלת HLA-DQ2. קישור זה הוא גורם מפתח בהתפתחות התהליך האוטואימוני בצליאק (איור 1).

בשנת 2002 נעשה מחקר פורץ דרך ע"י Shan ועמיתיו (Shan et al., 2002) שהצליח לזהות כי ישנו אפיטופ ספציפי הדומיננטי ביצירת התגובה החיסונית. אפיטופ זה הוא בעל רצף של 33 חומצות אמינו ומתקבל לאחר פירוק ה- α גליאדין, ומכיל חזרות רבות של פרולין. הוא אחראי לרוב התגובה החיסונית של תאי T מסוג CD4.

מעקובת רצף 33 חומצות האמינו הוא : QLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF

עמידותו הרבה של הפפטיד, העובדה כי הוא עובר דה אמידציה על ידי tTG ויכולתו החזקה לשפעל תאי T הנם כנראה הגורמים המאפשרים לפפטיד זה להתחיל שרשרת תגובות של מערכת החיסון.

הביקורות לאחר פרסום המאמר טוענות כי יתכן שהסבר זה פשטני מדי. בגלוטן קיימים כ- 15 פפטידים המשפעלים תאי T, רובם אינם חלק מהפפטיד בן 33 חומצות האמינו, ויתכן כי תגובה לפפטידים השונים מהפפטיד שזוהה, קשורה להתפתחות המחלה. בנוסף קיימים גם חלבוני התשמורת האחרים מלבד הגליאדין אשר יוצרים תגובה חיסונית אצל החולים (Koning & Vader, 2003). למרות הביקורת, ההישג המדעי ברור וחשוב ומהווה התקדמות מחקרית ושופך אור על טיפולים עתידיים בטיפול בחולי צליאק על ידי פירוק מרכיבים טוקסיים באמצעות אנזימים חידקיים בתוך מערכת העיכול.

בחלבון ה- α גליאדין זהו, ככל הנראה, הרצף העיקרי שגורם לתגובה החיסונית האופיינית למחלה אם כי לא היחיד. לדוגמא, נמצא רצף נוסף של 19 חומצות אמינו שמעורר גם כן את מערכת החיסון. בחלבונים אחרים ישנם, ככל הנראה, גם סוגי רצפים דומים. לדוגמא בחלבון ה- γ גליאדין ישנו רצף של 26 חומצות אמינו וכנראה שגם בחלבונים כמו גלוטנינים, הורדאין (Hordein) וסקלין (Secalin) ישנם רצפים דומים אשר עדיין לא נתגלו וכנראה שגם הם מאופיינים בפפטידים ארוכים, עשירים בפרולין ובעלי עמידות לפירוק פרוטאוליטי. לרצפים אלו עמידות פחותה לפירוק ביחס לרצף 33 mer (Shan et al., 2005; Kwon & Farrell, 2006).

תגובת מערכת החיסון הנרכשת: כאמור, נוצר קישור באפיניות חזקה בין האנטיגנים שחדרו את האפיתל לבין HLA-DQ2 על גבי תאים מציגי אנטיגן. האנטיגן מוצג לתאי T מסוג CD4 ונוצר שפעול של תאי T אשר גורם לשחרור של אינטרפרון γ (INF γ), שגשוג של תאי B ויצירת נוגדנים. שחרור של INF γ יוצר נזק לתאי המעי ע"י שפעול של מאקרופאגים ושחרור ציטוקינים פרו דלקתיים כגון: IL-2, IL-6, TNF-α . כך נוצר נזק לתאי הווילי והיפרפלסיה של הקריפטות במעי (Alaa et al., 2006 ; Kwon & Farrell, 2006).

תגובת מערכת החיסון המולדת: פפטידים של גלוטן יכולים גם לגרום לתגובה של מערכת החיסון המולדת. תגובה זו מאופיינת בעליה בהתבטאות מאקרופגים לאחר החשיפה לגלוטן. המקרופאגים גורמים ליצירת IL-15 ע"י האנטרוציטים אשר גורמים לתגובה של לימפוציטים בתאי האפיתל שמובילה לביטוי של המרקר NK (NKG2D). תאים אלו יכולים להכיר ולהרוג אנטרוציטים אשר מבטאים על פני השטח שלהם מולקולות סטרס (MICA). נוצר שפעול לא נשלט של לימפוציטים בין תאי האפיתל וגם במקרה זה הדבר מוביל להרס של הסיסים. בנוסף IL-15 יכול לגרום נזק לתאי האפיתל ע"י מניעת תהליך אפופטוזיס בתאים ועידוד תאים דנדריטים לתפקד כתאים מציגי אנטיגן. ככל הנראה הלימפוציטים הפעילים בשכבת האפיתל הינם מסוג CD8 (Alaa et al., 2006 ; Green & Bana, 2003).

בעקבות מציאת רצף ה-33 mer ניתן לומר כי התכונות האופייניות לאפיטופים של גלוטן אשר משרים תגובה חיסונית הם: 1. רצפי החלבון עשירים בפרולין ולכן עמידים לפירוק ע"י אנזימים גסטרים, פנקריאטיים ואנזימי הBrush Border וכך הם מגיעים בריכוז גבוה למעי הדק. 2. התגובה החיסונית מוגברת לאחר אינטרקציה עם האנזים tTG שגורם לדה אמידציה באפיטופים אלה. 3. אללים מסוג HLA-DQ2 הינם בעלי קישור ייחודי לרצפים עשירים בפרולין עם שיירי גלוטמאט והם מציגים אותם לתאי T מסוג CD4 במעי הדק (Shan et al., 2005).

2.6 מופע המחלה

מחלת הצליאק פוגעת במעי הדק הפרוקסימלי ויכולה אף לערב את כל המעי הדק. מופע המחלה משתנה בהתאם לגיל החולים. בצורתה הקלאסית המחלה פוגעת בילדים קטנים וגורמת להם לביטוים שונים של תת ספיגה. כאשר הדלקת הינה במעי הדק הפרוקסימלי ישנה תת ספיגה של ברזל, חומצה פולית, סידן וויטמינים מסיסים במים. התוצאה של פגיעה כזו הינה מחסור בברזל, פולט וירידה בצפיפות העצם. כאשר המעי הדק הפרוקסימלי הוא זה שנפגע בלבד יהיו פחות תלונות על שלשולים (ואכן תלונות אלו מופיעות בפחות מ-50% מהחולים) וזאת מכיון שהמעי הדיסטלי שלא נפגע עושה קומפנצסיה ומצליח לספוג את תוצרי הפירוק של שומנים ופחמימות. שלשולים הינם מאפיין קלאסי של המחלה והם קורים כאשר הדלקת מתפשטת גם למעי הדק הדיסטלי. אז גם נראה כשל בשגשוג (FTT) וכאבי בטן. אצל ילדים מעט גדולים יותר סימני המחלה הינם בעיקר קומה נמוכה, אנמיה ותסמינים נוירולוגיים (Green & Bana, 2003). סימנים נוספים, שכיחים פחות הינם הקאות ועצירות.

אצל מבוגרים מופע המחלה מתבטא לרוב בשלשולים, כאבי בטן, אנמיה מחוסר ברזל ואוסטיופרוסיס. אולם ישנם עוד הרבה תסמינים שנגרמים עקב המחלה, בהם: חוסר פריון, איחור בהתבגרות המינית ואי סדירות של הווסת. מעי רגיז, רפלוקס קיבתי-ושטי, פגיעה בזגוגית השיניים (אמייל), תסמינים נוירולוגים ועוד (Hill et al., 2005 ; Briani et al., 2008) .

נמצא כי ישנה שכיחות מוגברת של צליאק במספר מצבים ידועים. קיים סיכון גבוה יותר משאר האוכלוסיה ללקות בצליאק לאנשים עם: תסמונת ע"ש טרנר, תסמונת ע"ש ויליאמס, סוכרת נעורים, מחלה אוטואימונית של בלוטת התריס, המחלה ע"ש אדיסון, אנשים עם מחסור ב IgA, וכן במקרה שקרוב משפחה מדרגה ראשונה אובחן כחולה צליאק (Hill et al., 2005 ; Peter et al., 2007).

ברוב המקרים ישנו איחור בגילוי המחלה, למרות שהחולה מתלונן על סימפטומים שונים, כנראה עקב איחור באבחון ע"י הרופאים, וזאת עקב המופעים הרבים של המחלה שאינם חד משמעיים כפי שסברו פעם (Mowat, 2003).

2.7 אבחון

בשנים האחרונות, הוכנסו לשימוש קליני נוגדנים הניתנים לאיתור בבדיקת דם ועקב כך שונתה דרך אבחון המחלה, על בסיס ההכרה שהמחלה נגרמת על ידי היפגעות רירית המעי עקב תהליכים אימונולוגיים, בודקים בדמו של החולה הימצאות של נוגדנים נגד גלוטמינאזה רקמתית וכן נוגדנים נגד אנדומיזיום- חלבון המשקף תגובה של המעי לגלוטן, אשר עולים בזמן פעילות המחלה (Hill et al., 2005).

ביצוע האבחנה עפ"י האיגוד האמריקאי לגסטרואנטרולוגיה ותזונה בילדים (Hill et al., 2005) וארגון ה-NIH (NIH Consensus, 2004) הינה בסדר הבא:

כאשר יש חשד לצליאק הסקירה הראשונית תיעשה ע"י בדיקה סרולוגית שבודקת את רמת נוגדני האנזים tTG מסוג IgA . זאת בדיקת ה- IgA antibody tTG. בדיקה זו הינה בעלת רגישות וסגוליות גבוהה ביותר, וכן בעלת מחיר נמוך. ככל שרמת הנוגדנים גבוהה יותר כך הנזק למעי רב יותר. בדיקה נוספת הינה בדיקת IgA EMA (Endomysial antibody immunofluorescence) . בדיקה זו בודקת נוגדנים כנגד אנדומיזיום. בדיקה זו לא מדויקת ויש בה יותר הטיות בתוצאה מכיון שתלויה בבודק. בדיקה סרולוגית של הנוגדנים מעבר לסקירה ראשונית יכולה לתת מידע האם החולה שומר על דיאטה נטולת גלוטן (מה שיוריד את רמות הנוגדנים).

כאשר יש תשובה חיובית, השלב הבא הוא ביופסיה מהחלק הדיסטלי של הדאודנום. התשובה הפתולוגית תכלול את: דרגת ההיפרפלסיה של הקריפטות, רמת האטרופיה בסיסים וכן הערכה של מספר הלימפוציטים בתוך רקמות האפיתל. כל הגורמים האלו נמדדים בסולם הנקרא " Marsh grading system".

כאשר האבחון ההיסטולוגי אינו חד משמעי ניתן לעשות עוד סוגי בירור, כגון: בירור גנטי (ל-97% מהחולים יש את המרקר הגנטי DQ8/DQ2 לעומת 30%-40% בלבד באוכלוסיה הכללית). חזרה על הביופסיה כאשר החולה ממשיך לאכול גלוטן או חזרה על הביופסיה כאשר החולה על דיאטה נטולת גלוטן (Schuppan et al., 2009).

2.8 הטיפול במחלה-דיאטה נטולת גלוטן

הטיפול היחיד הקיים למחלה כיום הוא דיאטה נטולת גלוטן למשך כל החיים. הדיאטה מחייבת שמירה על תפריט נטול גלוטן ופרולאמינים נוספים המצויים בחיטה, שעורה, שיפון וכמובן בכל המזונות המיוצרים מהם או המכילים אותם באיזה שהיא צורה. לדוגמא: רטבים, פיצוחים, תבלינים באבקה ועוד (Niewinski, 2008). לגבי שיבולת שועל המחקרים חלוקים וגם ההמלצות שונות ממדינה למדינה. בשנים האחרונות מחקרים מראים כי לרוב החולים שיבולת שועל אינה מזיקה ולא מעוררת את המערכת החיסונית. גם בנושא הזיהום המשני ניתן להשיג כיום שיבולת שועל נקיה מגלוטן אשר אין בה חשש לזיהום (Rashid et al., 2007). ההמלצה כיום במדינת ישראל

היא לא לצרוך שיבולת שועל, אולם במדינות אחרות היא מותרת לשימוש תוך מעקב ובכמות מוגבלת ליום (Rashid et al., 2007).

שמירה על דיאטה נטולת גלוטן דורשת ידע נרחב של החולה לגבי מהם המאכלים המותרים והאסורים, היכן "מתחבא" גלוטן במזונות שונים, ידע לגבי אכילה בחוץ, אירועים שונים וכו'.

בדיאטה נטולת גלוטן יכולים להיווצר חוסרים שונים, כגון: קבוצת ויטמיני B, סיבים ועוד. כמו כן יכולה להיות עליה באחוז האנשים הסובלים מהשמנה עקב ההגבלות המיוחדות של הדיאטה (Kupper, 2005). לכן מומלץ על מעקב קבוע אצל רופא ודיאטנית כדי לנטר בעיות רפואיות שונות שיכולות להופיע עקב המחלה ולעודד שמירה על דיאטה והתמדה בה (Kwon & Farrell, 2006 ; Niewinski, 2008)

2.8.1 היענות לדיאטה

שמירה על דיאטה מתאימה הינה קשה להתמדה מכיון שהדיאטה מגבילה מאוד ויוצרת צמצום ומוגבלות בתפריטו של החולה, דורשת שינויים מכל בני הבית ויכולה לגרום להרגשת שונות בעיקר אצל ילדים. בנוסף יש צורך בהיערכות מיוחדת לאכילה בחוץ, קניות שהן יקרות יותר ועוד (Lamontagne et al., 2001 ; Ciacci et al., 2002 ; Butterworth et al., 2004).

במחקר שבדק את השפעת הדיאטה מבחינה כספית על איכות החיים של החולים נמצא כי מוצרי יסוד ללא גלוטן הינם יקרים בשיעור של פי 2 ויותר ממוצרים רגילים ולכן משפחה עם חולה צליאק נדרשת לשלם הרבה יותר עבור סל המזון הבסיסי שלה, דבר שפוגע בשמירה ובהתמדה (Lee et al., 2007).

במחקר אחר שבדק את איכות החיים של חולי צליאק נמצא כי החולים מרגישים פגיעה באיכות החיים שלהם, בעיקר בתחומים של: חוסר יכולת לאכול בחוץ, קושי בטיולים, השפעת המחלה על המשפחה והשפעה על הקריירה (Lee & Newman, 2003).

כאשר בדקו מה משפיע לטובה על היענות החולים לדיאטה נמצא שישנה התאמה בין שמירה על הדיאטה והתמדה למצב סוציו אקונומי גבוה, השכלה וידע על מחלת הצליאק וסיבוכיה (Alaa et al., 2006). נמצא כי גם אצל ילדים וגם אצל מבוגרים ככל שגדל הידע לגבי המחלה וככל שגבר הידע לגבי ההנחיות התזונתיות כך השמירה היתה טובה יותר (Ciacci et al., 2002). בנוסף ככל שיש יותר מוצרים זמינים נטולי גלוטן כך קל יותר לחולים לשמור על הדיאטה (Butterworth et al., 2004). גורמים נוספים שנמצאו כמשפרים שמירה: חברות בעמותה של חולי צליאק, אולם לא ברור האם זה בגלל החברות בעמותה או שמדובר באנשים שמראש היו בעלי מוטיבציה גבוהה יותר (Lamontagne et al., 2001; Butterworth et al., 2004), ואבחון מוקדם מתחת לגיל ארבע (Hogberg et al., 2003).

2.8.2 כמות סף של גלוטן בדיאטה

קיימת מחלוקת האם ישנה כמות סף של גלוטן המותרת לחולי צליאק. בשנת 1981 נקבע על פי ה- Codex Alimentarius וארגון הבריאות העולמי כי ישנה כמות סף של גלוטן המותרת לחולי צליאק. הכמות היא 20 ח"מ שמתחתיו אפשר לסמן מזון כנטול גלוטן והוא בטוח לאכילה לחולי צליאק (Codex Stan, 1999). הנחיות אלו לא מקובלות בארה"ב ועד לאחרונה גם לא היו מקובלות בישראל. ממש לאחרונה שונה החוק הקיים בארץ ע"י הכנסת וכיום מזון המסומן כנטול גלוטן יכול להכיל 20 ח"מ כנהוג באירופה. בנוסף מזון כזה צריך להיות מיוצר בפס ייצור נפרד ובתנאי בקרת איכות למניעת זיהום צולב.

ישנם מחקרים שונים אשר בדקו מאיזה כמות של גלוטן מתחיל נזק למעי. התוצאות שונות מעט ממחקר למחקר, אולם הטווח שמוזכר ברובם נע בין 10 ל-100 מ"ג גלוטן ליום. בטווחים הנמוכים נמצא שאין שינוי לרקמת המעי ובטווחים הגבוהים נמצא שמתחיל שינוי מינימלי (Thompson, 2001 ; Hischenhuber et al., 2006 ; Akobeng & Thomas, 2008 ; Troncone et al., 2008). בכל אופן כיום הכמות המותרת באירופה ובישראל היא מזערית ולפי הנחיות ה- Codex Alimentarius, ואילו בארה"ב ההנחיות לחולי צליאק הן להקפיד על אפס גלוטן בתפריט.

2.9 פרוגנוזה

נמצא כי אצל כ-70% מהחולים אשר מקפידים על דיאטה נטולת גלוטן יהיה שיפור בתסמיני המחלה בתוך כשבועיים. השיפור מבחינה היסטולוגית יופיע מאוחר יותר ובטווח של עד שנתיים מתחילת הטיפול (Kwon & Farrell, 2006). חוסר הקפדה על דיאטה זו (אף כי לעיתים ההשפעה אינה מיידית) עלולה לגרום להמשך הנזק הפיזיולוגי והדלקת הכרונית ועקב כך לעליה בסיכון לסרטן מסוגים שונים, בעיקר לימפומה מסוג Non Hodgkin. העליה היא בשיעור של פי 3 מבאוכלוסיית המבוגרים ללא המחלה. כמו כן נצפתה עלייה בשכיחות הסרטנים הבאים: חלל הפה, ושט, מעי דק, המעי הגס והכבד וכן פגיעה בצפיפות העצם (Logan,2009 ; West, 2009 ; Freeman, 2009). בנוסף נמצא שהעליה בסיכון לסרטן גבוהה יותר בקרב חולי צליאק לא מאובחנים (Rubio-Tapia et al., 2009).

3.0 גישות חדשות לטיפול בצליאק

הבנת הבסיס המולקולרי למחלת הצליאק ע"י מציאת רצף ה- 33 mer הובילה לכך שחוקרים התחילו לחפש אפשרויות חדשות לטיפול במחלה. במרכזי מחקר ברחבי העולם בוחנים בשנים האחרונות אפשרויות נוספות, מלבד דיאטה, לטיפול בחולים אלה. אלו הם השלבים הראשונים של התהליך וישנם מספר ניסויים הנמצאים כעת בשלבי בדיקת בטיחות ויעילות (PHASE 2). אולם שום תרופה עדיין לא הגיעה לשלב מתקדם מספיק של תוצאות ממשיות בחולים (Schuppan et al., 2009). גישות אלו יפורטו להלן:

3.1 שימוש בחיידקים פרוטאוליטיים

הגישה העיקרית אשר נחקרת כיום ומראה תוצאות מעודדות היא שימוש בפרוטאזות ממקור צמחי או בקטריאלי כדי ליצור פירוק של הפפטידים הטוקסיים בגליאדין לפני שהם מגיעים למוקוזה במעי הדק. כבר במחקר שנערך ע"י Shan ועמיתיו (2002), והיווה את פריצת הדרך בהבנת הבסיס למחלה, נבדקה האפשרות של פירוק רצף ה-33 mer ע"י חיידקים מסוג prolyl endopeptidase (PEP) ממקור של *Flavobacterium meningosepticum*. הם בדקו את יכולתו של האנזים לבקע את רצף הmer 33 בפפטידים של גליאדין In vitro וגם In vivo בתאי מעי של עכברים והראו שיש ירידה חדה בפעילות תאי T. לאחר מחקר זה נעשו מחקרים נוספים שבדקו אנזימי PEP ממקורות שונים. בדיקה של אנזים PEP ממקור של *Aspergillus niger* הראה שגם הוא גורם להידרוליזה של הגליאדין ואף פעיל בטוח PH רחב יותר, ולכן יהיה עדיף (Cerf-Bensussan et al., 2007).

בניסוי שנערך ע"י Stepniak ועמיתיה (2006) נבדקה פעילות PEP ממקור של *A. niger* על חלבוני גלוטן שונים (γ+ α גליאדין +LMW+HMW). הניסוי נערך בתנאי מעבדה המדמים קיבה מבחינת תחום PH , תחת אנזימי עיכול גסטריים ובזמן של שעתיים. נמצא שהאנזים גורם לפירוק של חלבוני הגלוטן השונים בטווח זמן של שעה עד שעתיים. נמצא כי נעשים ביקועים רבים, במקומות שונים, לרוב במרכז הפפטיד. לאחר מכן כשהושמו הפפטידים עם תאי T ממעי של חולים נמצא כי הפפטידים החתוכים כמעט שלא עוררו את תגובת מערכת החיסון.

במחקר שערכו Matysiak-Budnik וקבוצתה (2005) נבדקה יכולת אנזימי PEP ממקור של *Flavobacterium meningosepticum* לבקע רצפי גליאדין ובנוסף נבדקה מה הכמות האפקטיבית הדרושה לכך. המחקר נעשה In vitro וגם Ex vivo בביופסיות מדאודנום של חולים. נמצא כי כדי להשיג דה טוקסיפיקציה מלאה של פפטידים של גליאדין, ובעיקר כדי לפרק את רצף ה- 33 mer יש צורך בכמות גדולה של אנזימים (500 mU/mL) וזמן ממושך של 3 שעות. מה שמצביע על חסרון בשיטה זו. בביקורת על מחקר זה נטען כי החישוב שנעשה איננו מדויק מאחר

והוא מתייחס לכלל הפפטידים בגלוטן כאימונוגנים, מה שאינו נכון ולכן קרוב לוודאי שהכמות האמיתית הדרושה היא קטנה יותר בסביבות 10 מ"ג אנזימים אקטיביים, שזאת כמות דומה לזו של אנזימים אחרים אשר בהם משתמשים באופן טיפולי כדוגמת חיידקי לקטאז לרגישים ללקטוז (Khosla et al., 2005).

במחקר שנערך ע"י Bethune (2006) ועמיתיו החוקרים פיתחו פרוטאזה רקומבינטית בשם EP-B2 (*Cysteine Endoproteas*) המופעל עצמאית וקיים בגרעינים. במחקר, הפרקורסר של EP-B2 (פרו-אנזים) התבטא ב-*Escherichia Coli*. לאחר שלבי הניקוי והקיפול מחדש, הפרקורסר הופעל בתנאים חומציים בכדי לשנות את צורתו לצורה הסופית. בדיקות נוספות שערכו החוקרים באנזים EP-B2 הראו כי הוא מבצע הידרוליזה יעילה של α גליאדין, כולל רצף ה- 33 mer. לאור ממצאים אלו התבצעו עוד מחקרים שהשתמשו בסוג אנזים זה, לרוב בשילוב עם עוד סוגי אנזימים.

במחקר שנערך ע"י Gass ועמיתיו (2007) בדקו שילוב של שני אנזימים: EP-B2 רקומבינטי ממקור של E.colli ו-PEP ממקור של *Sphingomonas capsulate*. בניסוי זה השתמשו בלחם שנקנה במאפיה כדי לראות מה יכולת האנזימים הנ"ל לפרק חלבוני גלוטן לאחר האפייה. הלחם הושם בתנאים גסטריים (חומצות קיבה+אנזימי עיכול+tTG) לזמנים שונים עד שעה, ונבדק In vitro ו-In vivo בעכברים. נמצא כי בין שני האנזימים קיים שילוב סינרגיסטי כאשר EP-B2 חותך במהירות את הקשרים בין חלבוני הגלוטן והופך אותו לאוליגופפטיד ו-PEP תוקף את שאריות הפרולין. בבדיקה מביופסיות מעי של חולי צליאק נמצא שרק שילוב של שני האנזימים גרם לירידה בתגובת תאי T של המערכת החיסונית בצורה משמעותית. בנוסף נמצא כי שני אנזימים אלו עמידים בתנאי הקיבה.

במחקר שביצע Hartmann וחובריו (2006), נלקחו פרוטאזות צמחיות שבודדו מגרגרי חיטה בזמן הנביטה ונבדק האם הן מסוגלות לפרק פפטידים עשירים בפרולין וגלוטמין מחיטה, שעורה ושיפון. הגרגרים הושמו בטמפרטורות שונות ובטווחי PH שונים. נמצא שפירוק מתחיל כבר לאחר כשעתיים ונמשך עד מספר ימים (תלוי בסוג הדגן), הפירוק של הפפטידים הגיע עד למקסימום של 9 חומצות אמינו בפפטיד, כמו כן נחתכו קשרים עשירים בפרולין. הפירוק היה מהיר יותר ב- 30°C לעומת 15°C והטמפרטורה האופטימלית לפירוק היתה של 50°C. מבחינת PH הפרוטאזות היו פעילות בטווח של 3.0-9.0 עם שיא פעילות ב- PH 4.5 ו- 6.5. נתונים אלו מעידים על יכולתם של הפרוטאזות להיות פעילות גם בקיבה, כאשר היתרון שלהם הוא שהן ספציפיות כנגד פרולין וגלוטמין יותר מפרוטאזות בקטריליות, ובנוסף הן לא מהונדסות.

בדיקה של שילוב אחר של אנזימים נערך ע"י Rizzello ועמיתיו (2007). הם בחנו את האנזים *lactobacilli* ממחמצת ופרוטאזות ממקור פטרייתי. הבדיקה בניסוי זה היתה על אפיית לחם עם האנזימים במטרה להגיע לכמות גלוטן של פחות מ-20 ח"מ (הכמות המותרת ליום עפ"י הנחיות

הCodex Alimentarius וה-WHO). אנזים ה-*lactobacilli* נמצא כבעל יכולת לגרום להידרוליזה של גליאדין בעיקר בחלקים שלו העשירים בפרולין. במחקר נאפה לחם ממחמצת קמח חיטה ביחד עם חיידקי ה *lactobacilli* ותערובת הפרוטאזות במינונים שונים. נמצא שבתערובת עם שני הסוגים במינונים הגבוהים ביותר הגלוטן פורק עד כדי כך שהגיע לערך הסף. בלחם זה נעשה פירוק מלא לגליאדינים, ולכ-80% מהגלוטנינים. כאשר תערובת זו הושמה עם נוגדנים גרעיניים (mAbs) לא נמצאה תגובה אימונולוגית. מבחינת רצף הmer 33 נמצא שיש ירידה משמעותית בכמותו לאחר שש שעות, ולאחר שמונה עשרה שעות היעלמות מוחלטת. בתגובה מול לימפוציטים ממעי של חולים נמצא כי היתה ירידה ברמות הלימפוציטים ובייצור γ INF, כאשר בעיסה עם הרמות הגבוהות ביותר של אנזימים התגובה החיסונית ורמות הייצור של γ INF היו שוות לקבוצת הביקורת. אבל, תכונות הלחם הנ"ל היו פחות טובות משל לחם רגיל, בעיקר נפח קטן יותר וטעם מעט שונה.

בסדרת מחקרים שנערכו ע"י Di Cagno וחובריו (2004 , 2002) נמצא שבקטריות מסוג *lactobacilli* הנ"ל במחמצת שאור גרמו להידרוליזה לכל סוגי החלבונים: אלבומין, גלובולין, גלוטנין ובכמות פחותה גם לגליאדין. בנוסף נמצא שחרור של יותר חומצות אמינו וגם שבירת הקשרים של פרולין עם גליאדין. נמצא שגם מקטע 31-43 ב- α גליאדין (19 mer) עבר פירוק הידרוליטי תוך 4 שעות ע"י הבקטריה. לאחר מכן הוכן לחם מחמצת מתערובת דגנים שונים, כולל 30% חיטה. במחמצת הושמו בקטריות מסוג *lactobacilli* הנ"ל ונמצא שהם גרמו לפירוק פפטידים עשירים בפרולין, כולל רצף ה- 33 mer, אולם נדרש זמן תסיסה ממושך לשם כך. הלחם ניתן ל-17 חולי צליאק בשיטה של Double blind למשך יומיים בתנאי דיאטה מבוקרים ואח"כ נבדקו אנזימי מעי שלהם וחדירות המעי. בכל הנבדקים לא נמצאו שינויים לא ברמות האנזימים ולא בחדירות המעי. ניתן לסכם ממצאי מחקרים אלו בכך שבניגוד לפרוטאוזות במערכת העיכול של האדם, הרי שפרוטאזות ממקור צמחי או ממיקרו אורגניזמים שונים יכולים לבקע רצפים עשירים בפרולין. תוצרי הפירוק הם פפטידים קצרים יותר ובעלי פחות ח.א מסוג פרולין. בעבודות שונות נמצא כי הפירוק כולל גם את רצף ה-33 mer. וכך, בסוף התהליך נוצרים פפטידים אשר אינם מעוררים את מערכת החיסון מכיון שהאפיטופים האימונוגניים שבהם פורקו.

המחקרים שהראו זאת היו מסוגים שונים- In vivo, In vitro ו-Ex vivo. המחקרים נעשו על פפטידים סינתטיים של גלוטן, של גליאדין וכן על קמח חיטה ולחם לאחר האפיה. בכולם נמצא שאנזימים מסוגים שונים מבקעים את רצפי החלבון כתלות ב: זמן, כמות, טמפרטורה וחומציות. עם זאת מגבלות לגבי שימוש בפרוטאזות כתרופה לצליאק בעתיד הן:

1. בטיחות- יש לבדוק שלא תיווצר תגובה אלרגית ושלא נכנסים חיידקים לזרם הדם.
2. תופעות לוואי- נכון להיום לא ידוע על תופעות לוואי לטיפול זה.
3. מחיר וכמות אנזימים הדרושה למטרות טיפול.

4. איכות הקמח המתקבל (Sollid & Khosla, 2005).

3.2 שינוי בתכונות החיטה ו/ או קמח החיטה

ישנם חוקרים אשר מתמקדים בנסיון למצוא סוגי חיטים פחות רעילים. הרעיון המשותף לכולם הוא לפתח זנים בעלי יכולת נמוכה או אפסית לעורר את מערכת החיסון. אחת הדרישות החשובות בזנים כאלה היא שיהיו בעלי איכות מספיק טובה לאפיית קמח.

המחקרים השונים בודקים אפשרות של פיתוח והשבחת זנים מתאימים, העברת גנים או יצירת מוטציות מתאימות ובדיקת זנים קדומים של חיטה (Sollid & Khosla, 2005).

גישה אחת היא בכיוון הנדסה גנטית של חיטה במטרה ליצור זני חיטה שלא ישרו תגובה של מערכת החיסון (Sollid & Khosla, 2005 ; Kwon & Farrell, 2006 ; Baldassarre et al., 2008). שתי מגבלות בתחום זה הן: הנדסה גנטית כיום שנויה במחלוקת וישנם מדינות שבהם אסורה במזון. בנוסף, למרות ההתקדמות בהבנת הגורמים למחלה יכול להיות שישנם אפיטופים נוספים בפרקציית הגליאדין או בפרקציות אחרות שאינם ידועים ויכולים אף הם לשפעל את מערכת החיסון. כדי ליצור זן חיטה מתאים בהנדסה גנטית צריך לדעת במדויק את מיקום כל הקטעים הבעייתיים.

מחקר שערכו Spaenij-Dekking ועמיתיה (2005) ביקש לבדוק האם באופן טבעי זני חיטה שונים ביכולתם לשפעל את מערכת החיסון. הם לקחו גרגרי חיטה שהכילו שלושה סוגי גנומים של חיטה: דיפלואיד, טטראפלואיד והקסאפלואיד. הגרגרים נבדלו ברמת הפלואידיות, איזור הגידול, גנטיקה ועונת הגידול. הגרגרים עברו פירוק זהה לזה שבמעי (אנזימי מעי +tTG), הושמו ביחד עם תרבית של תאי T ממעי של חולים ונבדקה עוצמת התגובה של תאי T ותגובת נוגדנים גרעיניים כנגד תאי T ספציפיים. כאשר בדקו את מרכיבי החלבון השונים: גליאדנים וגלוטנינים, נמצא כי רוב חלבוני הLMW ושליש מחלבוני ה- α גליאדין כלל לא היו בעלי אפיטופים אימונוגנים ולא עוררו תגובת תאי T שנבדקו או נוגדנים גרעיניים. לעומתם היו סוגי חלבונים שעוררו יותר משישה סוגים שונים של תאי T. ממצא זה היה ללא קשר לרמת הפלואידיות. דבר זה מצביע על שונות משמעותית ברמות האפיטופים האימונוגנים הקיימים בזני חיטה שונים, ועקב כך שונות בהשפעה על מערכת החיסון. באנליזה נוספת שנערכה נמצא שיש הרכבים שונים של חלבון הגלוטן וזה מה שגורם לתגובה חיסונית שונה שמעורר כל זן. יש לציין כי על אף שנמצא שבחיטה דיפלואידית יש כמות נמוכה של פפטידים מסוג α גליאדין דבר זה לא בא לידי ביטוי בתגובה שהופקה ממערכת החיסון.

מחקר דומה שנערך ע"י Molberg ועמיתיו (2005) בחן גם הוא האם זני חיטה שונים מסוגים קדומים דיפלואידים יכולים לגרום לתגובה חיסונית שונה. הם לקחו מיצוי גלוטן שעבר עיכול ע"י אנזימי קיבה ומדדו את יכולתו לשפעל תאי T ומצאו שינויים גדולים ביכולת שפעול מערכת החיסון

בין הזנים השונים, כנראה עקב שוני גדול בקידוד הגנטי לגליאדין. בנוסף הם מצאו שככל הנראה הגנים המקודדים לרצף הmer 33 או לרצפים דומים לו אינם נמצאים או שנמצאים בכמות קטנה בחיטה קדומה מסוג AA ובחיטה יותר חדשה מסוג AABB (חיטה לפסטה). ממצאים אלו סותרים את המחקר הקודם, בכך שמראים שההשפעה בקידוד הגנטי לגליאדין באה לידי ביטוי בשפעול מערכת החיסון. ממצאי מחקר זה תואמים את ממצאי מחקרו של Weiser (2005) שהראה שחיטים קדומות וחדשות שונות בכמות הגלוטנינים והגליאדינים, בכמויות ה- α גליאדין, וביחס גליאדינים לגלוטנינים.

בשלב הבא ניתן לנצל ידע זה כדי לטפח זנים המכילים רמות נמוכות של אפיטופים אימינוגניים או לעשות השתקה של גנים הידועים כמעוררים את מערכת החיסון. דבר זה נעשה במחקר שנערך ע"י van den Broeck ועמיתיו (2009). במחקר נעשה נסיון לשינוי גנטי והסרת גנים אשר ככל הנראה מקודדים לאפיטופים אימונוגניים. נבדקו סוגי גליאדינים וגלוטנינים שונים ונמצא כי הסרה חלקית של חלבוני α גליאדין יוצרת ירידה ניכרת בשפעול תאי T, אולם במקביל גם פוגעת מאוד בתכונות האפיה. לעומת זאת הסרה חלקית של חלבוני γ ו-ω גליאדין ו-LMW גלוטנין גם גורמת לירידה ברמות תאי T אך פוגעת פחות בתכונות הטכנולוגיות.

רעיון אחר הוא לבצע שינויים לאחר קבלת הקמח בצורות כימיות שונות שבסופם יתקבל קמח חיטה אשר לא יהיה רעיל לחולי צליאק. מחקר כזה נעשה ע"י Gianfrani ועמיתיה (2007). החוקרים מציעים כי טרנסאמידציה של קמח חיטה עם טרנסגלוטאמינז מיקרוביאלי וליזין-מתיל-אסטר יכולה לשמש לקבלת גלוטן שאינו רעיל לחולים, ולמנוע תגובות הנראות באופן טיפוסי לאחר אכילתו בחולים עם מחלת צליאק. הרעיון היה למנוע את המצב בו הגלוטן עובר דה אמידציה ע"י tTG. המחקר כלל מבחני תגר לשורות תאי T ממערכת העיכול, שמוצו מדגימות ביופסיה מ-12 חולים עם מחלת צליאק, והושמו עם הקמח שעבר טיפול. נמצא כי קמח שטופל גרם לחסימה של אקטיבציית תאי T ועקב כך לירידה דרסטית של התגובה הדלקתית בבדיקת הלימפוציטים במעי. במחקר שנערך ע"י Berti ועמיתיה (2007) נבדקה השפעת שינויים כימיים ואנזימטיים על חלבון הגלוטן באופן כללי, ובאופן ספציפי על תכונות היכולות להפחית את רעילותו לחולי צליאק. מיצוי של גלוטן מקמח עבר שינוי ע"י טיפול כימי בחומצה והושם בתנאים משתנים של טמפרטורה וזמן. נמצא שטיפול זה יוצר דה אמידציה של הקבוצה האמידית בחלבון (כנראה דה אמידציה שונה מזו המתרחשת בגוף ע"י tTG בכך שדה אמידציה כימית תלויה בנגישות של הקבוצה האמידית ואינה מכוונת לשיירים ספציפים כמו התגובה המתרחשת בגוף) ופירוק קשרים פפטידים ע"י הידרוליזה. השינוי העיקרי היה בחשיפה לחום של 90C° מעלות ולאורך זמן של 3 שעות. כשנבדקה יכולת חלבונים אלו להפיק תגובה חיסונית של נוגדנים מסוג IgA Anti Gliadin שנלקחו מחולי צליאק נמצא כי יש ירידה בתגובה החיסונית שהופקה, כנראה עקב השינוי בקבוצה האמידית וגם בגלל גודל קטן יותר של החלבון. בשלב הבא נלקחו תאי מעי מחולים ובריאים והושמו עם גלוטן רגיל

וגלוטן שעבר טיפול כנ"ל. נמצא כי תאי מעי של חולים שנחשפו לגלוטן שעבר טיפול בחום וחומצה נשארו דומים במבנם המורפולוגי לתאים שכלל לא טופלו בגלוטן. המסקנות ממחקר זה הן שטיפול כימי שיוצר דה אמידציה ומקטין את גודל חלבון הגלוטן גורם לירידה בתגובה חיסונית ולכן יוצר חלבונים פחות רעילים לחולי צליאק. בנוסף יכול להיות שהחום הורס את חלבוני הגלוטן ויוצר בהם שינוי מבני שגם הופך אותם לפחות רעילים לחולים.

לסיכום, נראה כי זני חיטים שונים הינם בעלי שונות גנטית מבחינת יכולת שפעול המערכת החיסונית אצל חולי צליאק. דבר זה יכול להוות פתח לבחירת זנים פחות רעילים ע"י סלקציה שתעודד זנים אלו או ע"י התערבות גנטית. ניתן גם לשלב אותם עם טיפול נוסף כדי ליצור הורדה נוספת בכמות החלבונים הרעילים. אפשרות נוספת היא לשנות את חלבוני הגלוטן ע"י טיפולים שונים כגון חומצה, חימום, דה/ טרנס אמידציה ועוד, המשנים את מבנה החלבון, וכך מתקבלים פפטידים אשר מפחיתים תגובה חיסונית. ניסויים אלו נמצאים עדיין בשלבים ראשוניים מאוד ואין מחקר מתקדם בנושא. המגבלות בתחום זה הן: שונות גדולה שיש בחיטה גם בין הגליאדינים השונים וגם בפרקציות האחרות המרכיבות את הגלוטן. כמו כן לא ברור מה תהיה איכות קמח כזה (Lerner, 2010).

3.3 עיכוב חלבון הזונולין

הזונולין הוא חלבון המגביר את חדירות המעי, הוא מופרש ע"י רקמת תאי האפיתל של המעי ומופרש גם מתאים באיברים אחרים. הזונולין מבצע כמה פעולות ובכללן ויסות תנועתם של נוזלים, של מולקולות גדולות ושל תאי מערכת החיסון בין מדורים שונים בגוף. בחולי צליאק ישנה סברה כי הגלוטן עצמו גורם להפרשה מוגזמת של זונולין. גילוי הזונולין הביא למחשבה שהחדירות המוגברת של המעי בחולי צליאק היא המאפשרת לגלוטן לזלוג אל מחוץ למעי ולהגיב בחופשיות עם מרכיבי מערכת החיסון שרגישותם מוגברת מסיבות גנטיות. על בסיס ידע זה פותחה תרופה שנמצאת כיום בשלבי מחקר. התרופה מראה בטיחות וסימני יעילות במניעת רעילות גלוטן בחולי צליאק. החוקרים מסבירים כי התרופה אשר מעכבת את פעילות החלבון זונולין, מפחיתה הפרעה בתפקוד מחסום המעי, מעודדת קרבה רבה יותר בין התאים במעי הדק, ובכך מפחיתה חדירות. במחקרים ראשוניים נמצא כי היא הפחיתה משמעותית תסמינים במערכת העיכול במבחן תגר של גלוטן (Paterson et al., 2007; Baldassarre et al., 2008).

3.4 עיכוב האנזים tTG

האנזים tTG הינו גורם קריטי בהתפתחות התגובה החיסונית האופיינית. לכן, אחת הגישות הנחקרות לטיפול במחלת הצליאק היא ע"י עיכוב של האנזים tTG. כאשר מחפשים מעכב כזה

חשוב שיהיה: ספציפי כנגד האנזים tTG הפעיל במעי, בעל יכולת לשרוד בתנאי המעי ובעל יכולת לגרום לעיכוב בפעילות אנזימטית (Sollid & Khosla, 2005 ; Anderson, 2008).
סוג אחד הוא מעכבים תחרותיים מסוגים שונים- פפטידים ושאינם פפטידים. הבעיה בכולם היא שהם כלליים ולא ספציפיים ועקב כך בעלי תופעות לוואי. סוג נוסף של מעכבים הם כאלו שיוצרים קומפלקס עם האנזים tTG שאיננו בעל פעילות.
סוגי מעכבים פוטנציאלים אחרים הם על בסיס כך שלאנזים tTG דרושות רמות סידן גבוהות ולכן נסיון ליצור עיכוב בפעילותו ע"י שימוש באבץ שהוא יון דו ערכי, NO ועוד.
מחקרים שנעשו על עכברים הראו כי עכברים ללא האנזים tTG סובלים מתופעות לוואי קשות שאינן מוגבלות רק למערכת העיכול. כגון: פגיעה בשרשרת הנשימה המיטוכונדריאלית, שינויים במשק הגלוקוז ועוד (Esposito et al., 2007).
מחקר אחד שנערך ע"י Choi וחובריו (2005) בחולדות הצליח להראות שקיים מעכב אשר מצליח לעכב רק את ה tTG שבמעי , וכאשר ניתן באופן אורלי הוא נסבל ע"י החולדות ובעל זמן מחצית חיים קצר ולכן נראה בעל אפשרות לשימוש בעתיד.
בתחום זה קיימת עוד עבודת מחקר רבה.

3.5 פיתוח אנלוגים לגלוטן

שיטה נוספת אשר נבדקת היא פיתוח מולקולות אנלוגיות לגלוטן שמטרתן לחסום את הקישור גלוטן-HLA וע"י כך למנוע את שפעול מערכת החיסון, או לחילופין לפתח מקטעי גלוטן לתרכיב שיחשוף את מערכת החיסון לכמויות קטנות של גלוטן מן הסוג הגורם לתגובה חיסונית חזקה. התקווה היא שחשיפות קטנות, חוזרות ונשנות יגרמו, בסופו של דבר, למערכת החיסון לסבול את נוכחות הגלוטן. ז"א לחסן חולים בעזרת מקטעי גלוטן נבחרים כדי לגרום לתאי T לסבול גלוטן המוצג על ידי מולקולות HLA-DQ2 ולא להגיב לו (Kwon & Farrell, 2006). כיום מתבצע מחקר בתחום זה והחיסון הניתן מכיל מקטעי פפטידים של ω + α גליאדין.

3.6 יצירת סבילות לגלוטן

בימים אלו נמצא בעיצומו מחקר אירופאי רחב היקף הכולל גם מרכז בישראל ומטרתו לבדוק האם ניתן ליצור סבילות לגלוטן ע"י חשיפת תינוקות בגילאי 4-7 חודשים הנמצאים בסיכון גבוה לפיתוח צליאק (לפי רקע משפחתי ובדיקות גנטיות ל- HLA) לגלוטן. במסגרת המחקר התינוקות נחשפים לגלוטן בכמויות קטנות בשלב הנחשב מתאים מבחינת התקבלות הגלוטן ע"י מערכת החיסון ובשילוב עם הנקה (המהווה גורם מגן) במטרה לייצר סבילות לגלוטן. כאמור, מחקר זה בעיצומו ותוצאותיו עדיין לא התפרסמו (Lerner, 2010).

לסיכום,

כפי שנסקר בסקירת הספרות לעיל נעשים בשנים האחרונות מחקרים במספר מקומות בעולם אשר בודקים טיפול לחולי צליאק על בסיס חיטה שעברה שינוי גנטי, אנזימטי או כימי. תוצאות מחקרים אלו מראים כי שינוי בהרכב חלבוני החיטה או שבירה שלהם מורידים את התגובה החיסונית המופקת מתאי T של חולים ועקב כך יכולים להיות בטוחים לשימוש לחולים. אולם, לפי החיפוש בספרות ולמיטב הבנתי, לא קיימים מחקרים אשר בדקו את האפשרות של השפעת קמח חיטה עם אינדקס גלוטן ירוד על חולי צליאק, לא באופן תיאורטי ולא באופן מעשי.

4.0 מטרות המחקר והשערות המחקר

4.1 מטרות המחקר

מטרת העבודה היא בחינת אפשרות לנצל חיטה שאינה איכותית לתעשיית הלחם עקב אינדקס גלוטן נמוך, כמקור תזונה לחולי צליאק.

באופן פרטני מטרת העבודה תושג ע"י מטרות הביניים הבאות:

(1) בחינת השפעת זנים שונים על אינדקס הגלוטן.

(2) בחינת השפעת הזנה בחנקן, זרחן ואשלגן על אינדקס גלוטן של זנים שונים.

(3) בחינת השפעת תנאי סביבה (מימשק גידול ומים) על אינדקס גלוטן של הזן יובל בגידול בעל והזן זהיר בגידול מושקה.

(4) בחינת ההשלכות של אינדקס גלוטן נמוך על אפשרות תזונת חולי צליאק בחיטה על פי הנתונים בספרות.

4.2 השערות המחקר

השערת המחקר בעבור השפעת חיטה עם אינדקס גלוטן נמוך על חולי צליאק

(1) ניתן לשלב חיטה עם אינדקס גלוטן נמוך עקב פגיעה בשלב הסינתזה (זן,תנאי סביבה ועוד), או מפירוק בעקבות פגיעת פשפש הקמה בתזונת חולי צליאק.

השערות המחקר בעבור השפעה על אינדקס גלוטן:

(1) לזנים שונים השפעה על אינדקס הגלוטן.

(2) לממשקי גידול, הזנה והשקיה השפעה על אינדקס הגלוטן.

4.3 איזור המחקר

ניסויי השדה עבור מחקר זה נעשו במרכז מחקר גילת שבצפון הנגב, בשנת תשס"ז (עונת 2006-2007).

4.4 חשיבות המחקר

חשיבות עבודה זו היא בהיבט של הבנת הגורמים המשפיעים על אינדקס גלוטן בחיטה ומתן כלים כתוצאה מכך לגידול חיטה איכותית יותר, דבר הדרוש למאפיות ולחקלאים.

היבט נוסף בעבודה זו הוא בחינת אפשרות חדשה שלא נבדקה עד היום למתן קמח חיטה עם פגיעה באינדקס הגלוטן לחולי צליאק. במידה ותמצא אפשרות תיאורטית כזו הרי שמדובר בשינוי

מהותי בדיאטת חולי צליאק שיוכלו לאכול גם קמח המופק מחיטה בתנאים מסוימים. דבר זה בעל חשיבות עצומה לחולים הן מבחינת איכות הלחם, זמינותו, גיוון הדיאטה והמחיר הכלכלי הנלווה לכך.

4.5 שיטות המחקר

(1) איסוף ובדיקת נתוני אינדקס הגלוטן מחלקות בחוות גילת שבנגב.

(2) ניתוח סטטיסטי של השפעת הגורמים השונים על אינדקס הגלוטן.

(3) סקירת ספרות עבור השערת המחקר השלישית.

4.5.1 ניתוח סטטיסטי

מובהקות סטטיסטית נקבעה כאשר $p<0.05$. הנתונים מוצגים כממוצע +- שגיאת תקן.
קביעת ההבדלים בין הטיפולים נעשתה בעזרת מבחן t. נעשו ניתוחי שונות רב משתנים ע"י שימוש ברגרסיה רבת משתנים ברמת מובהקות של 0.05, וכן דורגו על פי T-Ratio בערך מוחלט אשר מביע את עוצמת הקשר וכיוונו.

הניתוחים הסטטיסטיים בוצעו בחבילת התוכנה JMP 7 מבית SAS Institute Inc.

5.0 תוצאות

להלן מובאות תוצאות מניסויים שנעשו בשנת 2007 בחלקות שדה במרכז מחקר גילת.
במסגרת המחקר נבדקו שבעה זני חיטה שונים, אשר משרעת הממוצעים של אינדקס הגלוטן שלהם נעה בין 97-3 . גורמי השונות שניתנו היו: זנים, רמות דישון, טיפולי השקיה או חוסר השקיה וסוגי ממשק.
כל דוגמת חיטה שנתקבלה נטחנה ואינדקס הגלוטן נקבע על ידי שתי בדיקות על פי הפרוצדורה המקובלת.
שנת 2007 בה בוצע המחקר היתה שנה עם משקעים נמוכים מהממוצע באיזור הדרום ועם טמפרטורות גבוהות מהממוצע.
נתוני המחקר התקבלו מארבע חלקות שונות ויוצגו בנפרד לכל חלקה. חוסר איזון בין נתוני החלקות השונות לא איפשר לערוך השוואה בין השדות השונים.

5.1 חלקת "יהודית"

בחלקה זו נבדקה השפעת זנים שונים על אינדקס הגלוטן. חלקה זו קיבלה דישון בחנקן, אשלגן וזרחן. כמות המשקעים (גשם + השקיה) בחלקה זו היתה: 351 מ"מ מים לעונה. צורת העיבוד היתה של עיבוד מלא על כרב נח.
ממוצע היבול: 362 ק"ג/ ד'.
אחוז החלבון הממוצע: 14.8%.

טבלה 1. ממוצע אינדקס גלוטן לפי זנים שונים.

זן	חזרות	ממוצע GI	שגיאת תקן
בית השיטה	2	88.5	1.8
גדרה	2	83.8	5.4
גליל	2	70.9	3.9
זהיר	1	80.2	
יובל	2	67.7	4.9
רותם	2	90.9	2.8
רם	2	77.5	3.0
ממוצע כללי	13	79.9	2.6

בחלקה זו עקב מיעוט חזרות קשה להסיק מסקנות חד משמעיות. אולם, ניתן לראות (טבלה 1) כי יש הבדל באיכותם של הזנים השונים לפי מדד אינדקס הגלוטן, כאשר משרעת הנתונים היא בין אינדקס גלוטן גבוה של 90 לזן רותם ועד ל-67 לזן יובל. לא נמצאו בניסוי זה זנים עם אינדקס גלוטן גרוע שיכול להיפסל לקמח חיטה (פחות מ-60). גם הזן גליל אשר נמצא בעבודות בארץ (הר-גיל, 2010) כזן עם ערכי אינדקס גלוטן נמוכים, מראה נתונים סבירים בחלקה זו, מה שמראה כי ישנם תנאים בהם גם זן בעל אינדקס גלוטן נמוך יכול להשיג תוצאות סבירות.

5.2 חלקת "מסחרי"

בחלקה זו נזרע הזן גליל שידוע כזן עם ערכי אינדקס גלוטן נמוך לרוב (בונפיל וחוב., 2010 ; הר-גיל, 2010). נבחנה השפעת סוגי דישון שונים והשפעת השקיה או חוסר השקיה על ערכי אינדקס הגלוטן. הניסוי כלל 4 חזרות ומספר הבדיקות היה 47.

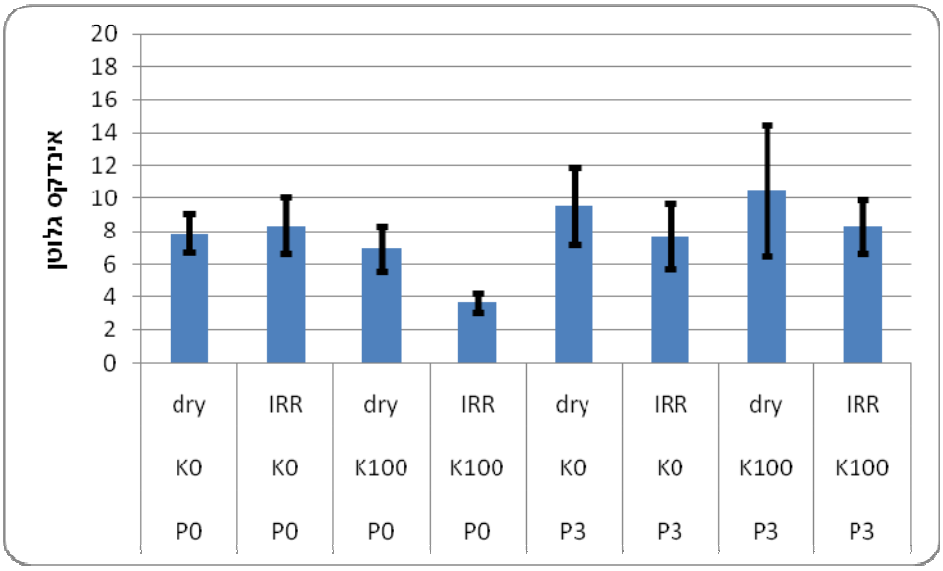
חלקה זו קיבלה טיפולי דישון משתנים של אשלגן (0 או 100 ק"ג לדונם) וזרחן (0 או 3 ק"ג לדונם). בכל החלקה ניתן גם דישון אחיד בחנקן.

כמות המשקעים בחלקה זו היתה: 306 מ"מ מים לעונה בטיפול המושקה ו-216 מ"מ מים לעונה בטיפול שלא הושקה.

צורת העיבוד היתה של דגן רציף באי פליחה.

ממוצע היבול: 229 ק"ג/ ד'.

אחוז החלבון הממוצע: 12.6%



איור 2. השפעת רמות שונות של: השקיה, אשלגן וזרחן על אינדקס גלוטן בזן גליל.

ניתן לראות (איור 2) נתונים גרועים מאוד של זן זה עם אינדקס גלוטן ממוצע של 8, דבר שתואם את הידע הארצי (בונפיל וחוב., 2010 ; הר-גיל, 2010) לגבי איכות זן זה. נתונים אלו לא הצליחו להשתפר גם עם תוספת דישון ו/ או השקיה. בחלקה זו להזנה בזרחן ואשלגן לא היתה כל השפעה על אינדקס הגלוטן. גם לתוספת השקיה לעומת חלקות יבשות לא היתה השפעה על האינדקס .

5.3 חלקת בעל

בחלקה זו נבדק הזן יובל ללא השקיה. נבדקו השפעות ממשק שבתוכו נכללו: עיבוד קרקע (CT), או חוסר עיבוד (NT) או מינימום עיבוד (MT). וכן מחזורי גידול שונים: גידול מחזורי רציף של חיטה כל שנה (CW) מול גידול אחת לשנתיים (WF). בנוסף נבדקו השפעות דישון שונות על אינדקס הגלוטן: דישון בחנקן ברמות שבין 0 ל-15 ק"ג לדונם, ודישון בזרחן ברמות שבין 0 ל-1 ק"ג לדונם. [ונבדקה אפשרות לחוסר עיבוד עם דשן ראש חנקן בהשתבלות (NTN)].

מספר החזרות בחלקה זו היה 4 ומספר הבדיקות היה 66. כמות המשקעים בחלקה זו היתה: 216 מ"מ מים לעונה.

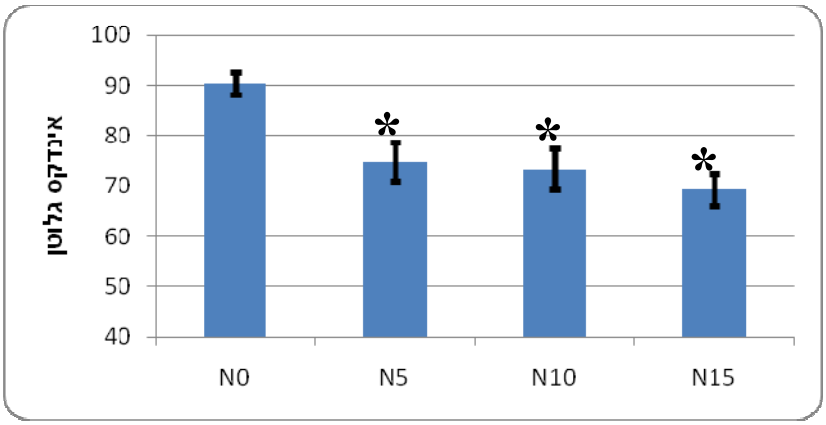
ממוצע היבול: 139 ק"ג/ ד'.

אחוז החלבון הממוצע: 14.1%

טבלה 2. השפעת סוגי ממשקים שונים על אינדקס גלוטן של הזן יובל, חלקת בעל.

ממשק	ממוצע	שגיאת תקן	מובהקות
CWCT	73.8	5.3	בג
CWMT	86.2	2.7	א
CWNT	64.0	4.5	ג
CWNTN	79.7	3.8	אב
WFCT	67.2	4.4	ג
WFNT	87.5	2.5	א

ניתן לראות (טבלה 2) שלרוב במימשק אי פליחה אינדקס הגלוטן גבוה יותר פרט לדגן רציף מחופה (CWNT) ולכן לא ניתן לדעת האם מדובר בתופעה אמיתית שבה אי פליחה גורמת לעליית GI. זאת במיוחד כיוון שהטיפול CWNTN בסופו של דבר לא קיבל דשן ראש והיה זהה (פרט להיסטוריה) לטיפול CWNT. (בכל אופן ההבדלים בממשקים בחלקה זו היו קטנים יחסית).

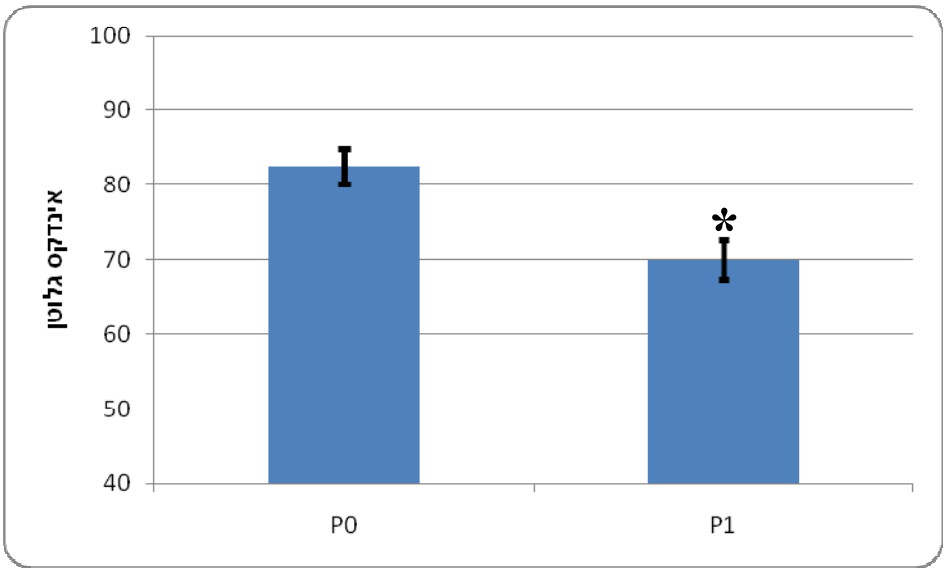


איור 3. השפעת דישון ברמות שונות של חנקן על אינדקס הגלוטן בזן יובל

בניגוד לחוסר השפעת הממשק, דישון בחנקן (איור 3) הוריד בצורה מובהקת את רמות אינדקס הגלוטן יחסית לחלקות שלא קיבלו דישון, ללא קשר לכמות ההזנה שניתנה. בחלקת הביקורת נמצא ערך ממוצע של 90.2 (±2.2) לעומת חלקות הניסוי שברמה של N5 נמצא ממוצע של 74.7

(±3.8), N10 עם ממוצע 73.3 (±4.1) ו- N15 עם ממוצע של 69.2 (±3.1). ההבדלים בין רמות החנקן השונות בטיפולים המדושנים לא היו משמעותיים סטטיסטית.

גם הזנה בזרחן גרמה לירידה מובהקת ברמת אינדקס הגלוטן יחסית לחלקת ההיקש (איור 4). ממוצע קבוצת הביקורת היה 82.4 (±2.3) לעומת ממוצע של 69.9 (±2.7).



איור 4. השפעת דישון בזרחן על אינדקס הגלוטן בזן יובל

לסיכום, בכל השילובים שנבדקו הזן יובל הראה אינדקס גלוטן תקין (מעל 60) אך לא הצטיין גם עם שינויי ממשק ודישון. להיפך, נמצאה ירידה בערכים עם מתן תוספת דשן מכל סוג. נתוני הזן יובל בחלקה זו תואמים את הנתונים לגביו שהתקבלו מחלקת יהודית וכן תואמים נתונים הידועים לגבי זן זה מעבודתו של הר גיל (2010).

5.4 חלקת שלחין

חלקה זו היא חלקה שבה גודל הזן זהיר עם השקיית עזר. הזן זהיר נמצא בעבודות שנעשו בארץ (בונפיל וחוב., 2010 ; הר-גיל, 2010) כזן עם ערכי GI בינוניים. כמו בחלקת בעל, גם כאן הגורמים שנבדקו הם: ממשק, חנקן וזרחן.

מספר החזרות בחלקה זו היה 4 ומספר הבדיקות היה 45. כמות המשקעים בחלקה זו היתה: 341 מ"מ מים לעונה.

ממוצע היבול: 178 ק"ג/ ד'.

אחוז החלבון הממוצע: 11.5%

טבלה 3. השפעת סוגי ממשקים שונים על אינדקס גלוטן של הזן זהיר, חלקת שלחין.

		ממוצע	שגיאת תקן
ממשק			
CWCT	א	89.2	2.5
CWMT	א	85.7	1.6
CWNT	א	84.6	4.4
WFCT	א	88.9	3.2
WFMT	א	87.0	3.1
WFNT	א	87.3	5.1
חנקן			
0	א	91.4	1.5
5	אב	89.8	1.4
10	ב	87.7	3.2
15	ב	80.0	3.2
זרחן			
0	א	89.0	1.4
1	ב	85.1	2.4

בחלקה זו נמצא שהזן זהיר הצטיין בתנאי דישון וממשק שונים (טבלה 3), ולצורות ממשק שונות לא נמצאה השפעה על ערכי GI. נתונים אלו גם תואמים את הנתונים של זן זה בחלקת יהודית. למרות שנתוני GI היו טובים, נמצא שמתן דישון הן בזרחן והן בחנקן הורידו באופן מובהק את אינדקס הגלוטן. ההשפעה המשמעותית ביותר היא מתן תוספת חנקן: ככל שניתן יותר חנקן כך ירדו ערכי GI.

5.5 רגרסיה רבת משתנים

פרמטרים של יבול יכולים לשמש אומדן שמייצג מה היו תנאי הגידול. רמות היבול משמשות כמדד להערכת כמות המים, רמות ייבול גבוהות מאפיינות בד"כ כמות מים גבוהה. משקל נפחי גבוה

מייצג תנאי גידול טובים, וגם כמות חלבון נמוכה מייצגת תנאים טובים שאפשרו התנפחות גרגר טובה, צבירת עמילנים ומיהול החלבון.

לכן, בחלקות שלחין ובעל, נבדקו במודל של רגרסיה רבת משתנים פרמטרים של היבול כמייצגים את תנאי הגידול ובנוסף הוכנסו למודל גורמי הניסוי: חנקן וזרחן, אלו הגורמים הבלתי תלויים. הגורם התלוי: אינדקס הגלוטן.

טבלה 4. גורמי ההסבר לערכי אינדקס גלוטן בחלקת בעל:

גורם	מובהקות	T Ratio
חלבון	0.000	-4.274
P	0.01	-2.649
משקל נפחי	0.048	-2.021

נמצא (טבלה 4) כי יש השפעה מובהקת בעלת מתאם שלילי בין רמות חלבון, דישון בזרחן ומשקל נפחי לבין ערכי אינדקס הגלוטן.

הגורם הראשון בחשיבותו הוא כמות החלבון: ככל שכמות החלבון גבוהה יותר כך יש ירידה בערכי GI, ולאחר מכן משפיעים מתן דישון בזרחן (בהתאמה לתוצאות הקודמות), והמשקל הנפחי.

ממצאים אלו מראים כי תנאי גידול גרועים, עם כמות מים מוגבלת, כפי שמתבטאים בפרמטרים של ייבול יחסית נמוך וחלבון גבוה, מורידים את ערכי אינדקס הגלוטן. אפשרות נוספת היא שדישון חנקני עודף שתוצאתו הישירה היא עליה בכמות החלבון הוא ההסבר לקשר בין כמות חלבון לערכי אינדקס גלוטן משפיע גם במקרה זה.

הממצאים ברגרסיה לגבי מתאם שלילי בין רמות זרחן לבין אינדקס הגלוטן תואמים את ממצאי הניתוחים הקודמים לגבי השפעתם השלילית בחלקות השונות.

טבלה 5. גורמי ההסבר לערכי אינדקס גלוטן בחלקת שלחין:

גורם	מובהקות	T Ratio
יבול	0.008	-2.782
חלבון	0.086	-1.762

בחלקת שלחין נמצאה השפעה מובהקת בעלת קשר שלילי בין כמות היבול לבין ערכי אינדקס הגלוטן (טבלה 5). ככל שכמות היבול גבוהה יותר כך יורד אינדקס הגלוטן. שוב נראה כי תנאי גידול טובים מורידים את ערכי אינדקס הגלוטן.

מבחינת כמות החלבון התוצאה אינה מובהקת אולם ניתן לראות מגמה דומה לזו שנמצאה בחלקת בעל שבה ככל שהחלבון גבוה יותר כך אינדקס הגלוטן נמוך יותר.

לסיכום, ניתן לראות שלפי ניתוח רב משתנים נמצא שלתנאי גידול השפעה על מדד אינדקס הגלוטן.

6.0 דיון ומסקנות

6.1 בחינת הקשר בין זן לאינדקס גלוטן

עבודות שנעשו הן בעולם והן בארץ הראו כי איכות החלבון היא בעיקרה פונקציה של הגנוטיפ: זנים שונים הינם בעלי איכות גלוטן שונה כפונקציה של הגנים המבוטאים בהם (בשילוב תנאי מזג אוויר וגם ללא קשר). בסקירה מאת Rakszegi וחובריו (2008) שבה נבדקו 150 זני חיטה שונים שגודלו בכל העולם, כולל זנים קדומים וזנים מודרנים, נמצא שיש שונויות רבות התלויות בזן: תכולת עמילנים, תכולת החלבון, שונויות בין גרגרי החיטה. גם מבחינת תכונות החלבון נמצאו הבדלים בתכולת החלבון הכללי, תכולת הגלוטן ואינדקס הגלוטן שנע בין 96-14. ז"א יש השפעה נרחבת לזן גם על תכונות אגרונומיות וגם על תכונות הקשורות לאיכות טכנולוגית. בסקירה מאת Troccoli וחובריו (2000) נמצא שזן הוא הגורם הראשון בחשיבותו על איכות הגלוטן, לעומת כמות החלבון שמושפעת קודם כל מתנאי הסביבה. בשתי עבודות שנעשו לאחרונה בארץ נמצא שהגורם המשפיע ביותר על אינדקס גלוטן הוא הזן ולאחריו תנאי סביבה. בעבודה שנעשתה ע"י הר גיל (2010) ומטרתה היתה לנתח את הגורמים המשפיעים על איכות החיטה לפי מדד אינדקס הגלוטן נמצא כי בקנה מידה ארצי ואיזורי הזן הוא המשתנה המשפיע ביותר בחשיבותו על מדד זה. בעבודה נוספת שנערכה ע"י בונפיל וחובריו (2010) נמצא כי ניתן לדרג את הזנים בארץ לפי רמות אינדקס הגלוטן שלהם, וכי זהו הגורם הראשי בחשיבותו. יחד עם זאת נמצא שכל הזנים, גם הטובים יותר מבחינת איכותם, נפגעו מתנאי מזג אוויר ו/ או פשפש הקמה ואז מתקבל טווח רחב של איכויות לכל זן (כאמור, קיים שילוב של גורמים גנטיים וגורמים סביבתיים).

הממצאים מחלקות המחקר נמצאים בהתאמה לספרות. נמצא שישנה השפעה של זן החיטה על אינדקס הגלוטן. זנים בעלי אינדקס גלוטן גבוה בד"כ הצטיינו גם בתנאי סביבה שונים, עם זאת זנים בעלי אינדקס גלוטן נמוך לעיתים השתפרו עם טיפולים שונים, למשל, בחלקת יהודית. נתונים לגבי איכות זנים שנבדקו בעבודות שונות שנסקרו תואמים את התוצאות שהתקבלו במסגרת עבודה זו לגבי שבעת הזנים שנבדקו.

על סמך תוצאות מחקר זה ניתן לקבל את השערת המחקר הראשונה לפיה לזנים שונים השפעה על אינדקס הגלוטן.

6.2 השפעת דישון

6.2.1 בחינת הקשר בין דישון בחנקן לאינדקס גלוטן

התוצאה העיקרית שחזרה על עצמה בצורה מובהקת גם בחלקת הבעל וגם בחלקת השלחין היא שתוספת דישון בחנקן הורידה את איכות החיטה כפי שבאה לידי ביטוי באינדקס הגלוטן.

במחקרים נוספים נמצאה תופעה זו (Colwell, 1963 ; Varga & Svenjak, 2006), לעיתים בכל רמה של תוספת חנקן ולעיתים מעל רמה מסוימת. במחקרו של Horvat ועמיתיו (2006) נמצא כי אינדקס גלוטן עלה במתן חנקן ברמה נמוכה אולם ברמות גבוהות של חנקן מעל 20 ק"ג לד' נרשמה ירידה חדה של עד 15 יחידות GI.

גם במחקרו של הר גיל (2010) נמצא שהגברת הדישון החנקני הובילה לפחיתה ב GI באופן מובהק. כשנבדק שילוב של דישון עם תנאי אקלים נמצא שככל שהיו תנאים קשים יותר של מים וטמפרטורה כך היתה הירידה בערכי GI מוגברת. הירידה הממוצעת עקב תופעה זו הגיעה ל-22 יחידות של אינדקס גלוטן.

ההסבר לתופעה זו הוא שעודף דישון בשלב שלפני הזריעה מעודד גדילת צמחים ושורשים ולכן יגרום לניצול מוגבר של מים על ידי הצמח וזאת בשני אופנים:

1. הגברת הגדילה תגרום לדיות מוגבר של הצמח, אשר מתגברת עוד יותר באיזורים צחיחים.
2. דישון מעודד התפתחות שורשים עמוקים יותר שינצלו יותר מים מהקרקע (Shimshi & Kafkafi, 1978).

בנוסף לכך הדישון החנקני משפיע על פרמטרים רבים בגידול שגורמים להארכת שלב מילוי הגרגר ומביאים לחשיפה מוגברת לעקת מים וטמפרטורות (Sinclair & Jamieson, 2006).

כך יכול להיווצר מצב של מחסור במים בשלב מילוי הגרגר וכתוצאה גרגר בעל איכות נמוכה.

6.2.2 בחינת הקשר בין דישון בזרחן לאינדקס גלוטן

בשלושת החלקות בהן נבדקה השפעת דישון זרחני על אינדקס גלוטן נמצא כי תוספת זרחן גרמה לירידה באינדקס הגלוטן או שלא השפיעה, אך בכל המקרים לא העלתה את אינדקס הגלוטן.

תוצאות אלו דומות למספר מחקרים אחרים. במחקרם של Porter & Paulsen (1983) ניתן דישון ברמות זרחן שונות (0, 56 ו-112 ק"ג לדונם) בשדות חיטה עם זני חיטה שונים. נמצא כי ישנם זנים שככל שקיבלו רמה גבוהה יותר של דישון זרחני כך היתה ירידה באחוז החלבון בגרגר, ולעומתם זנים אחרים שרק מהרמה הגבוהה ביותר של זרחן נפגע ריכוז החלבון שלהם. תופעה זו היתה מושפעת מעקות סביבתיות שונות שגרמו ככל הנראה להבדלים בניצול הזרחן. תוצאה זו חזרה על עצמה במחקרים נוספים (Ortiz-Monasterio et al., 2002 ; Yaseen & Malhi, 2009) שהראו שככל הנראה, זני חיטה שונים זקוקים לכמויות שונות של זרחן. ולכן, הזנה בזרחן גרמה לירידה באחוז החלבון בגרגר בזנים מסוימים, וברמות זרחן משתנות.

מחקר שנערך ע"י Horvat ועמיתיו (2006) מצא כי הזנה בזרחן לא השפיעה על איכות החיטה כפי שבאה לידי ביטוי ב GI, אחוז החלבון בגרגר ואחוז הגלוטן הרטוב. חוסר השפעה זו נמצאה גם בבדיקה של קבוצת הניסוי מול קבוצת הביקורת וגם ברמות שונות של דישון זרחני.

תופעה של חוסר השפעה או השפעה שלילית של מתן זרחן יכולה לנבוע מכמה גורמים:

בדומה לדישון החנקני, כך גם בדישון זרחני, מתן הזרחן גרם לגדילה וגטטיבית מוקדמת שהיתה בעודף וגרמה לצמח לנצל רזרבות מים מהקרקע עוד לפני שהושלמה התפתחות הגרעין. בשנה שבה היה מחסור במים, שימוש במים בתחילת הגידול בא על חשבון מים לצמח בהמשך העונה ועקב כך כנראה שנוצרה גם פגיעה באיכות חלבוני החיטה (Colwell, 1963).
תופעה נוספת שמתרחשת בתנאי עקה סביבתית היא ירידה ביכולת השורשים לניצול חומרי מזון מהקרקע. הצמח לא משתמש ביכולתו המקסימלית לנצל נוטריינטים. לדוגמא- קליטת זרחן מהירה קורית רק כאשר יש לחות גבוהה בקרקע (Ma et al., 2007).

6.2.3 בחינת הקשר בין דישון באשלגן לאינדקס גלוטן

מתן תוספת אשלגן שנבדקה לא הראתה כל השפעה על אינדקס הגלוטן. תופעה זו נצפתה גם במחקרים נוספים שבדקו השפעה של אשלגן על איכות החלבונים בחיטה ולא מצאו כל השפעה של אשלגן על GI, אחוז החלבון בגרגר ואחוז הגלוטן הרטוב (Horvat et al., 2006). בסקירת מחקרים שנערכה ע"י Wang ועמיתיו (2008) נמצא שבתנאי שדה במספר מקומות בעולם אשלגן לא השפיע על אחוז החלבון בגרגר ולפעמים אפילו הוריד את שיעורו וזאת בניגוד למחקרים בתנאים מבוקרים שבהם נמצא קשר חיובי בין דישון באשלגן לבין אחוז החלבון.
גם כאן הסיבות האפשריות הן: ההבדל בכמות האשלגן המצוי בקרקע אשר משתנה לפי סוג הקרקע, דישון שנעשה ומחזור הגידול (Tan et al., 2007 ; Ma et al., 2007), והבדל ביכולת ניצול האשלגן בין זנים שונים כתלות בגנוטיפ (Ma et al., 2007 ; Pettigrew, 2008).

לסיכום, על סמך תוצאות מחקר זה ניתן לקבל את השערת המחקר לפיה לממשקי הזנה שונים של חנקן וזרחן השפעה על אינדקס הגלוטן, כאשר הקשר שנמצא בין שני גורמים אלו הוא שלילי, ועודף דשן פוגע באינדקס הגלוטן.

6.3 בחינת הקשר בין מימשק לאינדקס גלוטן

מחקרים רבים הראו שאי פליחה, בעיקר בשנים עם מיעוט גשמים (Lopez Bellido et al., 1998) או באקלים ים תיכוני עם כמות משקעים נמוכה מ-300 מ"מ (De Vita et al., 2007) נותנת יתרון מבחינת כושר ייצור החלבון, איכות חלבון והגדלת תכולת החלבון בגרגר בעיקר לאחר תקופת יובש (Bonfil et al., 1999 ; Hatfield et al., 2001). הסבר לתופעה זו הוא שאי פליחה גורמת לעליה בכמות המים בשכבת הקרקע העליונה וכך המים זמינים יותר לצמח וגם פחות מתאדים מהקרקע (De Vita, 2007), דבר שנותן יתרון בשנים עם מיעוט גשמים. בחלקת בעל בה כמות המשקעים היתה 216 מ"מ נמצאה מגמה שהפחתת עיבוד מעלה את אינדקס הגלוטן, כנראה עקב הגדלת כמות המים הזמינה לצמח ומניעת תנאי עקה.

לעומת זאת, בחלקת שלחין לא נמצאה השפעה על אינדקס הגלוטן בשום צורת ממשק.
ישנם מספר מצבים עיקריים המתוארים בספרות בהם אין השפעה לסוג הממשק: בשנים עם כמות משקעים בינונית-טובה (Lopez Bellido et al., 1998 ; De Vita, 2007) ובמצב בו הקרקעות ללא חוסרים של מים או מינרלים (Rusu et al., 2008). בחלקת שלחין שקיבלה השקיה והגיעה לממוצע של 341 מ"מ מים לעונה, כנראה שהקרקע לא היתה במחסור של מים ועקב כך שימוש באי פליחה לא נתן יתרון על שיטות עיבוד אחרות. הבדל נוסף הוא מבחינת איכות הזן. במחקרים רבים שנעשו נמצא כי קיים הבדל בין זנים בתגובתם לעקות סביבה שונות (Lawrence et al., 1988) דבר שהשפיע על איכות החלבון בתנאי עקה (כפי שהיו בשנה בה בוצע המחקר). נמצא קשר בין זני חיטה בעלי גנוטיפים שונים ליכולת ניצול מים מהקרקע וליכולת ההתמודדות עם תנאי עקת מים (Johansson & Svensson, 1998 ; Curić et al., 2001 ; Edwards et al., 2007).
לסיכום, לא ניתן לקבל או לדחות את השערת המחקר לפיה לממשקי עיבוד שונים השפעה על אינדקס הגלוטן עקב תוצאות שונות בחלקות הניסוי.

6.4 בחינת הקשר בין: משקעים, כמות חלבון גבוהה ואינדקס גלוטן

נמצא קשר הפוך בין אחוז החלבון בגרגר לבין אינדקס הגלוטן. תופעה זו בחלקת "בעל" מקורה ככל הנראה במיעוט גשמים שיצרה עקת מים הגורמת לעליה באחוז החלבון ויחד עם זאת לפגיעה באיכותו כפי שמשתקף באינדקס הגלוטן. קשר זה בין מחסור במים בתנאים מסוימים של עונת הגידול לעליה באחוז החלבון הינו ידוע ומתואר בספרות (Lopez Bellido et al., 1998 ; Ozturk et al., 2004). במחקר שנערך ע"י Gooding ועמיתיו (2003) נמצא שהגורם לירידה במשקל הגרגר ולעליה בתכולת החלבון בגרעין הוא פגיעה ביכולת צבירת העמילן. דבר זה גורם לירידה באיכות הגרגרים המתקבלים. הדבר נובע מכך שהתרבות והתרחבות התאים מתרחשת בשלבים המוקדמים של מילוי הגרגר ואז נוצרת הפסקת הגדילה בעקבות עקת מים והבשלה של הגרגר ובכך מתקצרת תקופת מילוי הגרגר. הממצאים בחלקת בעל תואמים את הספרות מכיון שאחוז החלבון הממוצע היה גבוה (14%) וממוצע המשקעים בחלקה זו היה נמוך (216 מ"מ).
לעומת זאת אחוז החלבון בחלקת שלחין היה ממוצע (11%) וככל הנראה בחלקה זו לא התקיים הקשר הנ"ל מכיון שחלקה זו היתה מושקית ולא נוצרה בה עקת מים. בחלקה זו הקשר בין שני הגורמים גם לא היה מובהק אלא נצפה כמגמה, אולי עקב הבדל זה.
גורם נוסף שיכול להסביר ממצא זה הוא שהעליה ברמות החלבון היא תוצאה ישירה של דישון בחנקן, שנמצא בחלקים קודמים של העבודה כבעל השפעה שלילית על אינדקס הגלוטן.

השקיה:

מכיון שאין אפשרות לעשות השוואה בין השדות בעל ושלחין עקב מיקום בשתי חלקות שונות לא ניתן למדוד השפעה של תוספת מים על אינדקס גלוטן משתי חלקות אלו. בחלקת "מסחרי" בה נבדק האם תוספת מים משפרת את אינדקס הגלוטן נמצא שאין השפעה להשקיה. ממצא זה תואם מחקרים שהובאו והראו כי הגורם הראשון בחשיבותו המשפיע על אינדקס גלוטן ואיכות החיטה הוא הזן. לכן בזן גליל שידוע כבעל ערכי אינדקס גלוטן גרועים (הר גיל, 2010 ; בונפיל וחוב., 2010) גם השקיה לא עזרה (Troccoli et al., 2000 ; Rakszegi et al., 2008).

אם כך, לא ניתן לאשר או לדחות את השערת המחקר לגבי השפעת השקיה על אינדקס הגלוטן מהיקף זה של העבודה ולשם כך נדרשים ניסויים נוספים.

6.5 בחינת הקשר בין חיטה עם אינדקס גלוטן נמוך למחלת הצליאק

כאמור, חיטה בעלת אינדקס גלוטן נמוך יכולה לנבוע מפגיעה בשלב הפרה סינתזה עקב שוני בין זנים, עקות חום ומים ועוד, או מפירוק בשלב הפוסט סינתזה בעקבות פגיעת פשפש הקמה. ברוב המקרים נמצא שחיטה בעלת אינדקס גלוטן נמוך מאופיינת בירידה בכמות הגלוטנינים בכלל ובפרט אלו בעלי משקל מולקולרי גבוה (HMW גלוטנין). זהו הממצא העיקרי החוזר על עצמו בעבודות שונות (Khatkar et al., 2002 ; Rosell et al., 2002 ; Aja et al., 2004 ; Olanca et al., 2009). דבר זה תואם את הידוע לנו על כך שהגלוטנינים הם אלו האחראים לתכונות של חוזק הבצק, וכי קמח חזק מאופיין בכמות גבוהה של גלוטנינים מסוג HMW וכן ביחס גבוה של גלוטנין לגליאדין, ולהיפך (Shewry & Halford, 2002).

הפרקציה שעד כה נמצאה כמשמעותית ביותר ביצירת התגובה החיסונית היא פרקציית הגליאדין, ובפרט קבוצת ה- α גליאדין. ישנם מעט מאוד מחקרים שהראו השפעה של תנאי אקלים או מזיקים בשדה על פרקציית הגליאדין (Aja et al., 2004 ; Torbica et al., 2007). יחד עם זאת, כנראה שקיימים רצפים נוספים בפרקציית הגלוטנין ובחלבוני תשמורת אחרים המעוררים את מערכת החיסון (Shan et al., 2005 ; Kwon & Farrell, 2006) ולכן יש חשיבות לפגיעה גם בהם. לא נמצאו מחקרים שבדקו השפעה על רצף ה- 33 mer בחיטה בעלת אינדקס גלוטן נמוך.

בחינת אינדקס גלוטן נמוך עקב פגיעה בשלב הפרה סינתזה

עקת חום היא הפגיעה העיקרית בשלב הפרה סינתזה שהשפעתה נבחנה על הרכב חלבוני הגלוטן.

Torbica וחובריו במחקרם (2007) הראו שבשדה עקת חום של 30° C בשלב מילוי הגרגר, ועקת חום נוספת של 30-39°C בתחילת הקציר לא השפיעו על הרכב חלבוני הגלוטן ולא על אינדקס

הגלוטן. בניגוד אליו, Flagella וחובריו (2010) הראו שעקת מים ועקת חום מתונה מעלה כמות פולימרים של HMW גלוטנין ומעלה את אינדקס הגלוטן, אך ללא השפעה על הגליאדין. אולם, רוב המחקרים שבדקו השפעת חום על איכות החיטה מצאו שבזמן עקת חום בטמפרטורות של 30°C ועד 40° C בשדה בזמן מילוי הגרגר יש עליה בתכולת החלבון ביחד עם עליה בתכולת הגליאדין וירידה ביחס גלוטנין: גליאדין ועקב כך מתקבל קמח באיכות גרועה, כפי שנמצא גם לגבי מדד אינדקס הגלוטן. ההסבר לשינוי זה הוא עליה בסינתזת גליאדין וירידה בסינתזת גלוטנין (Balla et al., 2009). גם כשנבדקה השפעת מחסור במים בשלב מילוי הגרגר נמצאה עליה באחוז הגליאדין יחסית לגלוטנין (Saint Pierre et al.,2007). בכל מקרה ההשפעות הנ"ל, כפי שבאות לידי ביטוי בהרכב חלבון הגלוטן, מורכבות ומשתנות גם בהתאם לזמן העקה ולזן החיטה (Wieser, 2007). לסיכום, במחקרי מעבדה ההשפעה של חום על הרכב החלבון נמצאה בעיקר בהקשר להשפעות חום בטמפרטורות גבוהות על פרקציית הגליאדין, ברור כי טיפול בחום אשר משנה את מבנה חלבוני התשמורת יגרום לשינוי / הפחתת התגובה החיסונית. בטמפרטורות מתונות יותר בשדה ובעקות מים יש מעט מחקרים והממצאים לא אחידים בתוצאותיהם אולם רובם מצביעים על עליה בכמות הגליאדין. לצורך מתן קמח זה לחולים כנראה ששינוי כזה לא יעזור ואף יכול להיות גרוע יותר עקב הידע הקיים על פרקציית הגליאדין שמכילה בתוכה מרכיבים הידועים כמעוררים את מערכת החיסון. אלא אם כן, בקמח זה נפגעה השפעת הגליאדינים כמעוררי התגבה החיסונית.

בחינת אינדקס גלוטן נמוך עקב פגיעה בשלב הפוסט סינתזה

בתחום זה נעשו יותר מחקרים גם לגבי עקת חום וגם לגבי השפעת מזיקים. מספר מחקרים במעבדה הראו שפרקציית הגליאדין היא הרגישה ביותר לחום. השפעת חום הגורמת לשינוי מבנה החלבון מתחילה מטמפרטורה של 55° C ובטמפרטורה של 90° C – 100° C יש פירוק של פולימרים של גליאדין והם מצטרפים למבנה של הגלוטנין (Singh Stathopoulos et al., 2006 ; & MacRitchie, 2004). Berti ועמיתיה (2007) במחקרם הראו שחום של 90°C גרם לשינוי בחלבון כך שלא עורר את מערכת החיסון של חולים (כנראה עקב הפגיעה בגליאדין). ממצאי מחקרים אלו מראים שאכן מתרחשת פגיעה בחלבוני הגליאדין (לא מפורטים סוגי הגליאדין שנפגעו), אולם, החיסרון במחקרים אלו הוא שבדקו טמפרטורות גבוהות בהרבה מאלו שבשדה. כאשר בדקו מה מתרחש בפרקציות החלבון השונות בעקבות פגיעת מזיקים בשדה נמצא שפשפש הקמה מפריש אנזימי עיכול הכוללים פרוטאזות מבלוטות הרוק שלו, ופרוטאזות אלו יוצרות פירוק של פולימרים גדולים של חלבון, ובנוסף יש עליה של חלבונים במשקל מולקולרי נמוך. עבודה של Aja ועמיתיו (2004) הראתה שכאשר לקחו גלוטן ביחד עם מזיקים והשאירו את הקמח להדגרה למשך מספר שעות נמצאה השפעה על הגליאדינים. הפירוק הגדול ביותר אומנם התרחשה בפרקציית ה HMW גלוטנין, אולם נמצאה גם ירידה בכמות מולקולות קטנות יותר במשקל

מולקולרי של 70,000 ו-30,000. וכן נוצרו תוצרי פירוק חדשים של רצועות במשקלים מולקולריים של 30,000-45,000.

גם בעבודה של Rosell ועמיתיו (2002) בה נבדקו חלבוני חיטה לאחר שהותקפו ע"י המזיק *Aelia spp.* נמצא שנעשית הידרוליזה ע"י פרוטאזות של החרק לחלקי ה-HMW וה-LMW גלוטנין וגם לחלקי הגליאדין בצורה מסוימת.

Olanca ועמיתיו (2009) בעבודתם הראו שפשפש הקמה פוגע גם בפולימרים של חלבון, אך גם במונומרים, ובאופן ספציפי נראתה ירידה בריכוז של: HMW ו-LMW גלוטנין, γ ו-ω גליאדין. עקב הפירוק שנעשה נמצא שיש עליה יחסית בחלבונים במשקל מולקולרי נמוך.

מעבודות אלו ניתן להסיק שפירוק הגלוטן ע"י המזיקים בשדה מערב את כל פרקציות החלבון, אם כי הפירוק העיקרי הוא של מולקולות הגלוטנין.

גם כאשר ההידרוליזה של פרקציית הגליאדין היא לא מלאה עדיין יכולה להיות פגיעה מספקת בחלבוני הגלוטן כך שיהיו נסבלים ע"י החולים, כפי שהראתה Di Cango (2004) שכאשר נעשתה הידרוליזה חלקית של הגליאדין מחיטה (במחמצת עם לקטובצילי), בשילוב עם דגנים אחרים מותרים, לא נוצרה התגובה החיסונית הרגילה אצל חולים.

בנוסף, יש אפשרות שגם פגיעה בפרקציות הגלוטן הנוספות עזרה להפחית את תכונותיו הרעילות של חלבון הגלוטן.

לגבי השפעה של אינדקס גלוטן נמוך על רצפי הפרולין לא נמצאו מחקרים שבדקו זאת בהקשר לאיכות החיטה ולאינדקס גלוטן.

ממחקרים אלו ניתן להסיק שפגיעת מזיקים בשדה שגורמת לפירוק של החלבון הינה בעלת יכולת השפעה על פרקציית הגלוטנינים ועל פרקציית הגליאדינים במידה מסוימת. מחקרים אלו נמצאים בהתאמה למחקרים אחרים שנעשו והובאו בסקירת הספרות והראו שפרוטאזות ממקור צמחי או ממיקרו אורגניזמים שונים יכולים לבקע רצפים של גליאדינים ורצפים עשירים בפרולין. כאשר בתנאי מעבדה בה נעשתה תסיסה מבוקרת למשך מספר שעות ניתן היה להגיע לפירוק מלא או כמעט מלא של רצפי החלבון, כולל רצפים הידועים כמעוררי מערכת החיסון ובסופו של התהליך התקבלו פפטידים אשר אינם רעילים לחולים (Shan et al., 2002 ; Bethune et al., 2006 ; Gass et al., 2007).

לא ניתן לאשר או לדחות את השערת המחקר לגבי השפעת חיטה עם אינדקס גלוטן נמוך כמזון לחולי צליאק בהיקף זה של העבודה, לשם כך נדרשים ניסויים נוספים.

6.6 סיכום

אינדקס גלוטן הוא מדד חשוב לאיכות החיטה. בעבודה זו נבדקו השפעות משתני ממשק וסביבה על רמת אינדקס הגלוטן. המסקנות העולות ממחקר זה הן:

1. קיימת השפעה לזן על ערכי אינדקס הגלוטן.
2. עלייה בדישון בכלל, ובפרט בדישון חנקני מביאה לירידה בערכי אינדקס הגלוטן כנראה עקב סינתזת חלבונים מוגברת.
3. לא נמצאה העדפה לכרב או לצורת עיבוד מסוימת באופן מובהק.

היכולת להבין את הגורמים המשפיעים על אינדקס הגלוטן חשובה לתעשיית החיטה בישראל, ובפרט למגדלים, לכן חשובים מחקרים עתידיים שיוסיפו לנתח גורמים נוספים ואינטרקציות נוספות בין תנאי הסביבה והממשק לאינדקס הגלוטן.

לגבי מתן חיטה בעלת אינדקס גלוטן נמוך לחולי צליאק: לפי המחקרים שנסקרו והובאו ניתן להסיק שחיטה בעלת אינדקס גלוטן נמוך, בעיקר עקב פירוק הגלוטן ע"י מזיקים בשלב הפוסט סינתזה, עברה שינוי ברמה מסוימת בפרקציית הגליאדין, ושינוי גדול ומרכזי של פירוק פרקציות הגלוטנין. לפי הידע הקיים בספרות כעת לא ניתן לדעת האם פירוק שרשרות הגליאדין כולל גם את הרצפים הידועים כמפעילי מערכת החיסון אצל חולי צליאק, ו/ או עד כמה ניתן לגרום לפירוק כזה ע"י תוספת של פרוטאזות ממזיקים. אולם, ידוע שפרוטאזות ממיקרו אורגניזמים שונים הראו כי יש להן היכולת לגרום לפירוק גם של הרצפים הידועים כמשרי התגובה החיסונית בפרקציית הגליאדין וגם יכולת לשבור את קשרי הפרולין שבגליאדין. מכאן ניתן להקיש שגם פירוק המתרחש ע"י מזיקים שונים בשדה יכול להביא לאותם תוצאות. בנוסף ישנם מחקרים שהראו שישנם עוד רצפים בפרקציות החלבון השונות שגם שבירה שלהם תפחית את רעילות הגלוטן כאשר ניתן לחולים (אם כי רצפים אלו בעלי יכולת הפקת תגובה חיסונית חלשה יותר). כך שיש יסוד להניח כי חיטה מסוג זה הינה פחות רעילה לחולים, אם כי לא ברור האם בצורה מספקת.

לכן, השלב הבא לצורך בדיקת התאמת חיטה בעלת אינדקס גלוטן נמוך לחולי צליאק יהיה בחינה במעבדה של השינוי שנוצר בהרכב הגליאדינים והגלוטנינים, כולל רצפים עשירים בפרולין והרצפים הידועים כרעילים לחולי צליאק, ע"י אותם מזיקים אשר יוצרים בשדה גם את הפגיעה באינדקס הגלוטן.

בנוסף יש לבדוק מה תהיה איכות הלחם המתקבל והאם הפגיעה בחלבוני הגליאדנים והגלוטנינים תאפשר אפיית לחם מתאים לשימוש מבחינת תכונות טכנולוגיות.

7.0 ביביליוגרפיה

אפרת י, פינטהוס מ, עמיר י. דגני חורף לגרגרים. האנציקלופדיה לחקלאות,כרך ה' "גדולי שדה". ירושלים :מודן. 1995 : 289-338.

בונפיל ד, כהן ד, אסידו ס, אלאטראש ס, קוסטיוקובסקי מ, יאסינוב ג, הר-גיל ד, סבוראי ט. אינדקס גלוטן- תמונת מצב 2009. ניר ותלם 2010;23 :21-16.

הר גיל ד. ניתוח מרובה קני מידה של הגורמים המשפיעים על איכות החיטה. ע"ג. אוניברסיטת בן-גוריון בנגב 2010.

זוהר ד, פנואל י. "גדול חיטה-הלכה למעשה". תל אביב: ארגון עובדי הפלחה ומשרד החקלאות 1992.

AACC .Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, Method 3812,10th edition, American Association of Cereal Chemists St. Paul, Minnesota, USA 2000.

Abonyi T, Kiraly I, Tomoskozi S, Baticz O, Guóth A, Gergely S, Scholz E, Lásztity D, Lásztity R. Synthesis of gluten-forming polypeptides. 1. biosynthesis of gliadins and glutenin subunits. J Agr Food Chem 2007;55:3655-3660.

Aja S, Perez G, Rosell CM. Wheat damage by Aelia spp. and Erygaster spp.: effects on gluten and water-soluble compounds released by gluten hydrolysis. J Ceareal Sci 2004;39:187–193.

Akobeng AK, Thomas AG. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with celiac disease. Aliment Pharmacol Ther 2008;27:1044-1052.

Alaa R, Joseph AM, Martin FK. American Gastroenterological Association (AGA) Institute Technical Review on the Diagnosis and Management of Celiac Disease. Gastroenterology 2006;131(6):1981-2002.

Anderson RP. Coeliac disease: current approach and future prospects. Intern Med J 2008;38(10):790-9.

Baldassarre M, Laneve AM, Grosso R, Laforgia N. Celiac disease: pathogenesis and novel therapeutic strategies. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2008;8(3):152-8.

Balla K, Karsai I, Veisz O. Analysis of the quality of wheat varieties at extremely high temperatures. Cereal Res Commun 2009;37:13-16.

Berti C, Roncoroni L, Falini ML, Caramanico R, Dolfini E, Bardella MT, Elli L, Terrani C, Forlani F. Celiac-related properties of chemically and enzymatically modified gluten proteins. J Agr Food Chem 2007;55(6):2482-8.

Bethune MT, Strop P, Tang Y, Sollid LM, Khosla C. Heterologous expression, purification, refolding, and structural-functional characterization of EP-B2, a self-activating barley cysteine endoprotease. Chem Biol 2006;13(6):637-47.

Blumenthal CS, Barlow EWR, Wrigley CW. Growth environment and wheat quality: the effect of heat stress on dough properties and gluten proteins. J Cereal Sci 1993;18:3-21.

Bonfil DJ, Karnieli A, Raz M, Mufradi I, Asido S, Egozi H, Hoffman A, Schmilovitch Z. Decision support system for improving wheat grain quality in the Mediterranean area of Israel. Field Crop Res 2004;89:153-163.

Bonfil DJ, Mufradi I, Klitman S, Asido S. Wheat grain yield and soil profile water distribution in a no till arid environment. Agron J 1999;91:368-373.

Briani C, Samaroo D, Alaedini A. Celiac disease: from gluten to autoimmunity. Autoimmunity Rev 2008;7(8):644-50.

Butterworth JR, Banfield LM, Iqbal TH, Cooper BT. Factors relating to compliance with a gluten-free diet in patients with coeliac disease: comparison of white caucasian and south asian patients. Clin Nutr 2004;23(5):1127-34.

Cerf-Bensussan N, Matysiak-Budnik T, Cellier C, Heyman M. Oral proteases: a new approach to managing coeliac disease. Gut 2007;56(2):157-60.

Choi K, Siegel M, Piper JL, Yuan L, Cho E, Strnad P, Omary B, Rich KM, Khosla C. Chemistry and biology of dihydroisoxazole derivatives: selective inhibitors of human transglutaminase 2. Chem Biol 2005;12(4):469–75.

Chung OK. Ohm JB, Lookhart GL, Bruns RF. Quality characteristics of hard winter and spring wheats grown under an over-wintering condition. J Cereal Sci 2003;37:91-99.

Ciacci C, Cirillo M, Cavallaro R, Mazzacca G. Long-term follow-up of celiac adults on gluten-free diet: prevalence and correlates of intestinal damage. Digestion 2002;66:178–185.

Ciaffi M, Tozzi L, Borghi B, Corbellini M, Lafiandra D. Effect of heat shock during grain filling on the gluten protein composition of bread wheat. J Cereal Sci 1996;24:91-100.

Codex Alimentarius Commission. Codex General Standard for the Labelling of Prepackaged Foods (Codex Stan 1 – 1985, Rev. 1 – 1991, Amended 1999). Rome, Italy: FAO/WHO, 1999.

Colwell JD. The effect of fertilizers and season on the yield and composition of wheat in southern New South Wales. Aust J Exp Agr 1963;3(8) 51 – 61.

Cooper PJM, Gregory PJ, Tully D, Harris HC. Improving water use efficiency of annual crops in the rainfed farming systems of West Asia and North Africa. Exp Agr 1987;23:113-158.

Cubadda R, Carcea M, Pasqui LA. Suitability of the gluten index method for assessing gluten strength in durum wheat and semolina. Cereal Food World 1992;37(12):866-869.

Curic D, Karlovic D, Tusak D, Petrovic B, Dugum J. Gluten as a standard of wheat flour quality. Food Technol Biotech 2001;39(4):353–361.

De Vita P, Di Paolo E, Fecondo G, Di Fonzo N, Pisante M. No-tillage and conventional tillage effects on durum wheat yield, grain quality and soil moisture content in southern Italy. Soil Till Res 2007; 92(1-2): 69-78.

Delwiche SR. Single wheat kernel analysis by near-infrared transmittance: protein content. Cereal Chem 1995;72(1):11-16.

Di Cagno R, De Angelis M, Auricchio S, Greco L, Clarke C, De Vincenzi M, Giovannini C, D'Archivio M, Landolfo F, Parrilli G, Minervini F, Arendt E, Gobbetti M. Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. Appl Environ Microbiol 2004;70(2):1088-96.

Di Cagno R, De Angelis M, Lavermicocca P, De Vincenzi M, Giovannini C, Faccia M, Gobbetti, M. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. Appl Environ Microbiol 2002;68 (2):623-633.

Edwards NM, Gianibelli MC, McCaig TN, Clarke JM, Ames NP, Larroque OR, Dexter JE. Relationships between dough strength, polymeric protein quantity and composition for diverse durum wheat genotypes. J Cereal Sci 2007;45:140–149.

Elliott DE, Reuter DJ, Reddy GD, Abbott RJ. Phosphorus nutrition of spring wheat (Triticum aestivum L.). 1. Effects of phosphorus supply on plant symptoms, yield, components of yield, and plant phosphorus uptake. Aust J Agr Res 1997;48(6): 855-867.

Esposito C, Caputo I, Troncone R. New therapeutic strategies for coeliac disease: tissue transglutaminase as a target. Curr Med Chem 2007;14(24):2572-80.

Freeman HJ. Malignancy in adult celiac disease. World J Gastroenterol 2009;15(13):1581-3.

Flagellaa Z, Giuliani MM, Giuzioa L, Volpi C, Masci S. Influence of water deficit on durum wheat storage protein composition and technological quality. Eur J Agron 2010;33(3): 197-207.

Gass J, Bethune MT, Siegel M, Spencer A, Khosla C. Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. Gastroenterology 2007;133(2):472-80.

Gianfrani C, Siciliano RA, Facchiano AM, Camarca A, Mazzeo MF, Costantini S, Salvati VM, Maurano F, Mazzarella G, Iaquinto G, Bergamo P, Rossi M. Transamidation of wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease. Gastroenterology 2007;133(3):780-9.

Gooding MJ, Ellis RH, Shewry PR, Schofield JD. Effects of restricted water availability and increased temperature on the grain filling, drying and quality of winter wheat. J Ceareal Sci 2003;37:295-309.

Green PH, Bana J. Coeliac disease. Lancet 2003;362:383-91.

Hatfield JL, Sauer TJ, Prueger JH. Managing soils to achieve greater water use efficiency: a review. Agron J 2001;93(2):271-280.

Hartmann G, Koehler P, Wieser H. Rapid degradation of gliadin peptides toxic for coeliac disease patients by proteases from germinating cereals. J Cereal Sci 2006;44(3):368-371.

Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S, Hoffenberg EJ, Horvath K, Murray JA, Pivor M, Seidman EG. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005;40(1):1-19.

Hischenhuber C, Crevel R, Jarry B, Mäki M, Moneret-Vautrin DA, Romano A, Troncone R, Ward R. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. Aliment Pharmacol Ther 2006;23(5):559-75.

Hogberg L, Grodzinsky E, Stenhammar L. Better dietary compliance in patients with coeliac disease diagnosed in early childhood. Scand J Gastroenterol 2003;38:751–754.

Horvat D, Loncaric Z, Vukadinovic V, Drezner G, Bertic B, Dvojkovic K. The influence of mineral fertilization on winter wheat yield and quality. Cereal Res Commun 2006;(34):429 - 432.

Johansson E, Prieto-Linde ML, Svensson G, Jonsson JO. Influences of cultivar, cultivation year and fertilizer rate on amount of protein groups and amount and size distribution of mono- and polymeric proteins in wheat. J Agr Sci 2003;140:275-284.

Johansson E, Svensson G. Variation in bread-making quality: effects of weather parameters on protein concentration and quality in some Swedish wheat cultivars grown during the period 1975-1996. J Sci food Agr 1998;78(1):109-118.

Johansson E, Svensson G. Influences of yearly weather variation and fertilizer rate on bread-making quality in Swedish grown wheats containing HMW glutenin subunits 212 or 510 cultivated during the period 1990±96. J Agr Sci 1999;132:13-22.

Karlen DL, Wollenhaupt NC, Erbach DC, Berry EC, Swan JB, Eash NS, Jordahl JL. Crop residue effects on soil quality following 10-years of no-till corn. Soil Till Res 1994;31(2):149-167.

Khatkar BS, Fido RJ, Tatham AS, Schofield JD. Functional properties of wheat gliadins. I. Effects on mixing characteristics and bread making quality. J Cereal Sci 2002;35(3):299-306.

Khosla C, Gray GM, Sollid LM. Putative efficacy and dosage of prolyl endopeptidase for digesting and detoxifying gliadin peptides. Gastroenterology 2005;129(4):1362-3.

Kieffer R, Wieser H, Henderson MH, Graveland A. Correlations of the breadmaking performance of wheat flour with rheological measurements on a micro-scale. J Cereal Sci 1998;27(1):53-60.

Klein JD, Mufradi I, Cohen S, Hebbe Y, Asido S, Dolgin B, Bonfil DJ, Establishment of wheat seedlings after early sowing and germination in an arid Mediterranean environment. Agron J 2002;94(3):585-593.

Koning F, Vader W. Gluten peptides and Celiac disease. Science 2003;299:513.

Kostyukovsky M, Zohar D. Sunn Pest Eurygaster integriceps Put. and Wheat Quality in Israel. International Quality Grains Conference Proceedings 2004;1-7.

Kupper C. Dietary guidelines and implementation for celiac disease. Gastroenterology 2005;128(4):121-7.

Kwon JH, Farrell RJ. Recent advances in the understanding of celiac disease: therapeutic implications for the management of pediatric patients. Paediatr Drugs 2006;8(6):375-88.

Lamontagne P, West GE, Galibois I. Quebecers with celiac disease: analysis of dietary problems. Can J Diet Pract Res 2001;62:175–181.

Laurin P, Stenhammar L, Falth-Magnusson K. Increasing prevalence of coeliac disease in Swedish children: Influence of feeding recommendations, serological screening and small intestinal biopsy activity. Scand J Gastroenterol 2004;39:946–952.

Lawrence GJ, Macritchie F, Wrigley CW. Dough and baking quality of wheat lines defllict in glutenin subunits controlled by the GLU A1, GLU B1 and GLU D1 loci. J Cereal Sci 1988;7:109-112.

Lee A, Newman JM. Celiac diet: its impact on quality of life. J Am Diet Assoc 2003;103(11):1533-5.

Lee AR, Ng DL, Zivin J, Green PH. Economic burden of a gluten-free diet. J Hum Nutr Diet 2007;20(5):423-30.

Lerner A. An additional piece in the Israeli celiac disease puzzle. IMAJ 2010;12:305–306.

Lerner A. New therapeutic strategies for celiac disease. Autoimmun Rev 2010;9(3):144-147.

Logan RF. Malignancy in unrecognised coeliac disease: a nail in the coffin for mass screening? Gut 2009;58(5):618-9.

Lopez Bellido L, Fuentes M, Castillo JE, Lopez Garrido FJ. Effects of tillage, crop rotation and nitrogen fertilization on wheat grain quality grown under rainfed Mediterranean conditions . Field Crop Res 1998;57:265-276.

Ma Q, Rengel Z, Bowden B. Heterogeneous distribution of phosphorus and potassium in soil influences wheat growth and nutrient uptake.Plant Soil 2007;291(1-2):301-309.

Marian R. Epidemiology of Celiac Disease: What are the prevalence,incidence, and progression of celiac disease? Gastroenterology 2005;128:47–51.

Matysiak-Budnik T, Candalh C, Cellier C, Dugave C, Namane A, Vidal-Martinez T, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. Gastroenterology 2005;129(3):786-96.

Mengel K, Secer M, Koch K. Potassium effect on protein formation and amino acid turnover in developing wheat grain. Agron J 1981;73(1):74-78.

Molberg O, Uhlen AK, Jensen T, Flaete NS, Fleckenstein B, Arentz-Hansen H, Raki M, Lundin KE, Sollid LM. Mapping of gluten T-cell epitopes in the bread wheat ancestors: implications for celiac disease. Gastroenterology 2005;128(2):393-401.

Mowat AM. Coeliac disease-a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. Lancet 2003;361(9365):1290-2.

Niewinski MM. Advances in celiac disease and gluten-free diet. J Am Diet Assoc 2008;108(4):661-72.

NIH Consensus Statement on Celiac Disease. NIH Consensus and State-of-the-Science Statements. 2004;21(1):28–30.

Olanca B, Ozay DS, Koksel H. Effects of suni-bug (Eurygaster spp.) damage on size distribution of durum wheat (Triticum durum L.) proteins. Eur Food Res Technol 2009;229(5):813-20.

Ortiz-Monasterio JI, Peña RJ, Pfeiffer WH, Hede AH. Phosphorus use efficiency, grain yield, and quality of triticale and durum wheat under irrigated conditions. Proceedings of the 5th International Triticale Symposium 2002;30(5):9-14.

Ozturk A, Aydin F. Effect of water stress at various growth stages on some quality characteristics of winter wheat. J Agron Crop Sci 2004;190(2):93-99.

Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, Fasano A, Meddings JB. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. Aliment Pharmacol Ther 2007;26(5):757-66.

Peter HR, Green MD, Christophe Cellier MD. Celiac Disease. N Engl J Med 2007;357:1731-43.

Pettigrew WT. Potassium influences on yield and quality production for maize, wheat, soybean and cotton. Physiol Plantarum 2008;133:670–681.

Porter MA, Paulsen GM. Grain protein response to phosphorus nutrition of wheat Triticum aestivum, plant nutrition. Agron J 1983;75(2):303-305.

Rakszegi M, Boros D, Kuti C, Lang L, Bedo Z, Shewry PR. Composition and end-use quality of 150 wheat lines selected for the HEALTHGRAIN diversity screen. J Agric Food Chem 2008;56(21):9750-9757.

Rashid M, Butzner D, Burrows V, Zarkadas M, Case S, Molloy M, Warren R, Pulido O, Switzer C. Consumption of pure oats by individuals with celiac disease: a position statement by the Canadian Celiac Association. Can J Gastroenterol 2007;21(10):649-51.

Ron, M.M. Loewy, T. Effect of phosphorus placement on wheat yield and quality in southwestern Buenos Aires (Argentina). Commun Soil Sci Plan 2000;31(17):2891-2900.

Rosell CM, Aja S, Bean S, Lookhart G. Effect of Aelia spp. and Eurygaster spp. Damage on Wheat Proteins. Cereal Chem 2002;79(6):801-805.

Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan EL, Johnson DR, Page W, Erdtmann F, Brantner TL, Kim WR, Phelps TK, Lahr BD, Zinsmeister AR, Melton LJ, Murray JA. Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. Gastroenterology 2009;137(1):88-93.

Rusu T, Gus P, Moldovan IF, Bogdan I, Moraru PI, Pop A, Pacurar I, Clapa D. Influence of soil tillage system on winter wheat bread manufacture quality. Acta Hort 2008;802:233-238.

Saint Pierre C, Peterson CJ, Ross AS, Ohm J, Verhoeven MC, Larson M, Hoefer B. Grain protein content and composition of winter wheat cultivars under different levels of N and water stress. Western Nutrient Management Conference 2007;7:62-64.

Schultz JE. Soil water changes under fallow-crop treatments in relation to soil type, rain fall and yield of wheat. Aust J Exp Agr 1971;11:236-242.

Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. Gastroenterology 2009;137(6):1912-33.

Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. Science 2002;297(5590):2275-9.

Shan L, Qiao SW, Arentz-Hansen H, Molberg Ø, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. J Proteome Res 2005;4(5):1732-41.

Shewry PR, Halford NG. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. J Exp Bot 2002;53(370):947-958.

Shimshi D, Kafkafi U. The effect of supplemental irrigation and nitrogen fertilisation on wheat (Triticum aestivum L.). Irrigation Sci 1978;1:27-38.

Sinclair T, Jamieson P. Grain number, wheat yield, and bottling beer: an analysis. Field Crop Res 2006;98:60-67.

Singh H, MacRitchie F. Changes in proteins induced by heating gluten dispersions at high temperature. J Cereal Sci 2004;39:297–301.

Sivri D, Sapirstein H, Bushuk W, Keksel H. Wheat intercultivar differences in sceptibility of glutenin protein to effects of bug (Eurygaster integriceps) protease. Cereal Chem 2002;79:41-44.

Sollid LM, Khosla C. Future therapeutic options for celiac disease. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2005;2(3):140-7.

Spaenij-Dekking L, Kooy-Winkelaar Y, van Veelen P, Drijfhout JW, Jonker H, van Soest L, Smulders MJ, Bosch D, Gilissen LJ, Koning F. Natural variation in toxicity of wheat: potential for selection of nontoxic varieties for celiac disease patients. Gastroenterology 2005;129(3):797-806.

Stathopoulos CE, Tsiami AA, Dobraszczyk BJ, Schofield JD. Effect of heat on rheology of gluten fractions from flours with different bread-making quality. J Cereal Sci 2006;43:322–330.

Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, Moester M, De Ru A, Baak-Pablo R, van Veelen P, Edens L, Koning F. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006;291(4):621-9.

Tan DS, Jin JY, Huang SW, Li ST, He P. Effect of long-term application of K fertilizer and wheat straw to soil on crop yield and soil K under different planting systems. Agr Sci China 2007;6(2):200-207.

Thompson T. Wheat starch, gliadin, and the gluten-free diet. J Am Diet Assoc 2001;101(12):1456-9.

Torbica A, Antov M, Mastilovic J, Knezevic D. The influence of changes in gluten complex structure on technological quality of wheat (Triticum aestivum L.). Food Res Int 2007; 40(8):1038-1045.

Troccoli A, Borrelli GM, De Vita P, Fares C, Di Fonzo N. Durum wheat quality: a multidisciplinary concept. J Cereal Sci 2000;32(2):99-113.

Troncone R, Auricchio R, Granata V. Issues related to gluten-free diet in coeliac disease. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2008;11(3):329-33.

Vaccino P, Corbellini M, Reffo G, et al. Impact of Eurygaster maura (Heteroptera: Scutelleridae) feeding on quality of bread wheat in relation to attack period. J Econ Entomol 2006;99(3):757-763.

van den Broeck HC, van Herpen TW, Schuit C, Salentijn EM, Dekking L, Bosch D, Hamer RJ, Smulders MJ, Gilissen LJ, van der Meer IM. Removing celiac disease-related gluten proteins from bread wheat while retaining technological properties: a study with Chinese Spring deletion lines. BMC Plant Biol 2009;7:9:41.

Varga B, Svenjak Z. The effect of late season urea spraying on grain yield and quality of winter wheat cultivars under low and high basal nitrogen fertilization. Field Crop Res 2006;96:125-132.

Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekelä I, Patrikainen H, Valve R, Mäki M, Collin P. Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in elderly people: a population-based study. BMC Gastroenterol 2009;29: 9:49.

Wang ZH, Li SX, Malhi S. Effects of fertilization and other agronomic measures on nutritional quality of crops. J Sci Food Agr 2008;88(1):7-3.

Weegels PL, Hamer RJ, Schofield JD. Critical review functional properties of wheat glutenin. J Cereal Sci 1996;23:1-18.

Weiser H. Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. Eur Food Res Technol 2005;211:262-268.

Wieser H. Chemistry of gluten proteins. Food Microbiol 2007;24(2):115-9.

West J. Celiac disease and its complications: a time traveller's perspective. Gastroenterology 2009;136(1):32-4.

Yaseen M, Malhi SS. Differential growth performance of 15 wheat genotypes for grain yield and phosphorus uptake on a low phosphorus soil without and with applied phosphorus fertilizer. J Plant Nutr 2009;32(4-6):1015-1043.

CHARACTERIZATION OF WHEAT GLUTEN FACTORS APPROPRIATE FOR WHEAT INGESTION IN CELIAC PATIENTS

Wheat is the crop grown on most of the open areas in Israel. According to wheat consumers, gristmills and bakeries, Israeli wheat is not of high quality, a problem which has worsened over recent years.

Gluten Index is an indicator of protein quality calculated by the percentage of gluten mass remaining on the sieve after centrifugation. Wheat falling under the Gluten Index threshold is not approved for marketing as bread flour, causing financial loss to growers.

The first goal of this study was to assess the factors that influence the Gluten Index. For this study diverse factors were tested, among them: quantity of precipitations, cultivar, type of tilling and fertilization.

Samples from the 2007 season were collected from the fields of The Gilat Research Center at the Negev Region of Israel. The wheat samples collected were tested for quality in controlled conditions. Each sample was graded according to the Gluten Index and the relationship between the sample and environmental /management factors was analyzed. The factors found to be effective were influence of genotype and negative effect of fertilization by nitrogen and phosphorous.

An additional goal of this study was to assess, by reviewing published data, the possible effect of low gluten index on the nutrition of celiac patients.

Low Gluten Index wheat may characterize condition of damage to gluten protein as in cases of temperature or water stress, or in the enzymatic breakdown caused by wheat pests.

The literature review for this study found trials investigating the possibilities of feeding wheat with chemically or enzymatically modified gluten to celiac patients. The major modifications that were tested and resulted in positive preliminary responses were: additional proteolytic enzymes from bacterial or fungal origin that result in the breakdown of gluten bonds and generate peptides that do not stimulate the immune system. Other studies have investigated chemical modifications, e.g.: heating, acid, that in certain conditions, were able to reduce

the immune response of the patients. It was proved that low gluten index wheat has a breakdown of glutenin chains and to a certain extent a breakdown of gliadin chains, but there still aren't any studies that investigated the possibility that this breakdown is sufficient to single out this wheat as appropriate for celiac patients. Therefore, it is suggested to further investigate whether this encompasses the sequences known to stimulate the immune system of the patients, as well as to further investigate the effect of this flour on the immune systems of the patients.

CHARACTERIZATION OF WHEAT GLUTEN FACTORS APPROPRIATE FOR WHEAT INGESTION IN CELIAC PATIENTS

M.Sc Thesis

Submitted to the Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment

The Hebrew University of Jerusalem

For the Degree of "Master in Nutritional Sciences"

By:

Galit Snir

April 2011