

דוח מסכם לתכנית מחקר מס' 17-339-820

(תקציב אוניברסיטאי 0390404)

1.2 שם ההצעה: ביסוס ובחינת מדד הדעיכה לצורך חישוב פקטור המיהול והכנת הקשיות להזרעה

1.3 שמות השותפים למחקר

פרופ' צביקה רוט – המחלקה לבעלי חיים, הפקולטה לחקלאות, רחובות- חוקר ראשי.

z.roth@mail.huji.ac.il

ד"ר יואל זרון- מנהל מקצועי של "שיאון"- אחראי על ניסוי הפוריות.

גב' טניה קוגן "מעבדת שיאון"- איסוף זרמה ונתונים.

תקציר

ממשק הרבייה ברפת החלב בארץ ובעולם מבוסס על הזרעות מלאכותיות. הוא מתאפיין בשימוש בזרמה קפואה, הנאספת ממספר מצומצם של פרים נבחרים ומשמשת להזרעת כמות רבה של פרות. איכות הזרמה מהווה פקטור משמעותי בממשק הרבייה האינטנסיבי. ירידה או פגיעה באיכות הזרמה במהלך תהליך השימור בהקפאה, יכול להשפיע על כושר ההפריה ושעור ההתעברות. איכות זרמה ניתנת להערכה ע"י מדדים פיזיולוגיים (קינמטיקה), ביוכימיים (הרכב ותקינות הממברנות) והקורלציה ביניהם. ברוב מכוני ההזרעה בעולם נהוג לקבוע את איכות הזרמה תוך התייחסות לתנועתיות וריכוז התאים בזרמה. זאת על מנת לקבוע את פקטור המיהול כך, שבסופו של תהליך יהיו כ- 20 מיליון תאים בכל קשית של 0.25 מ"ל. תנועתיות פרוגרסיבית היא אחת המדדים הפיזיולוגיים של תאי זרע ומתייחסת ליכולת של התא לנוע בקו ישר. תנועתיות פרוגרסיבית נמצאת במתאם חיובי עם פוריות ומשמשת לניבוי יכולת ההפריה של תאי זרע. ב"שיאון" פרמטר זה משמש לחישוב פקטור מיהול הזרע, אשר משפיע באופן ישיר על איכות וכמות הקשיות המיוצרות מכל מירוק. מטרת העבודה הנוכחית הייתה לאפיין תנועתיות פרוגרסיבית ולבחון השפעת תהליכי הקפאה והפשרה על יכולת הישרדות של תא זרע עם תנועתיות פרוגרסיבית. הבנה זו חשובה ביותר לקביעת יחס מיהול בין ריכוז תאי זרע עם תנועתיות פרוגרסיבית לפני ההקפאה, לבין נפח חומר מיהול המגן בפני נזקי הקפאה והפשרה. העבודה נעשתה בשלושה שלבים; בשלב הראשון בוצע ניתוח רטרוספקטיבי של הנתונים הקיימים בשיאון.

נמצא כי במהלך תהליך ההקפאה חלה ירידה בשיעור תאי הזרע הנעים כמו כן בשעור תאי הזרע עם תנועתיות פרוגרסיבית בפרט, מ- 76 ל- 51% ($P < 0.01$) ומ- 66 ל- 37.8%, בהתאמה ($P < 0.01$). הישרדות פרוגרסיבית, המוגדרת כיחס בין שיעור תאי זרע בעלי תנועתיות פרוגרסיבית לאחר הקפאה והפשרה לבין אלה של זרע טרי, נמצאה במתאם שלילי ($r = -0.44$) עם תנועה פרוגרסיבית בזרמה טרייה ($P < 0.01$). בניסיון להבין מה העומד בבסיס ההישרדות הנמוכה של מירוקים, המתאפיינים באחוז גבוה של תאי זרע עם תנועה פרוגרסיבית, בשלב השני, התמקדנו באפיון הרכב (פרופיל חומצות שומן) ותקינות ממברנות (חיות, פעילות מיטוכונדריה, שלמות אקרזום, סטטוס חימצוני) של תאי זרע בעלי תנועה פרוגרסיבית עם הישרדות גבוהה ונמוכה. נמצא כי זרמה טרייה עם הישרדות פרוגרסיבית גבוהה התאפיינה בפעילות מיטוכונדרילית גבוהה יותר בהשוואה לזרמה עם הישרדות פרוגרסיבית נמוכה, (יחס 3.7 לעומת 1.9, בהתאמה; $P < 0.05$), ובאחוז גבוה יותר של תאים חיים, שיצרו תרכובות חמצון פעילות בעקבות עקה חימצונית, בהשוואה לזרמה עם הישרדות פרוגרסיבית נמוכה 43.4 לעומת 29.1%, בהתאמה; $P < 0.05$). לא נמצא הבדל משמעותי ברמת החיות ושלמות האקרזום בין שתי הקבוצות. תוצאות אנליזת הרכב הממברנות של תאי זרע טרי הראו, כי לא נמצא הבדל משמעותי בין רמת חומצות שומן רוויות (SFA) וחד-בלתי רוויות (MUFA) בין שתי הקבוצות. עם זאת, הריכוז היחסי של חומצות שומן רב-בלתי רוויות (PUFA), היה גבוה יותר בקבוצה המאופיינת בהישרדות פרוגרסיבית נמוכה לעומת זו המאופיינת כגבוהה (33.07 לעומת 30.94%, בהתאמה; $P < 0.05$). בזרמה עם הישרדות נמוכה רמת חומצות שומן מסוג אומגה-6 היתה גבוהה יותר מחומצות שומן מסוג אומגה-3 (9.5 לעומת 10.4%, בהתאמה; $P < 0.05$), אך לא נמצא הבדל בין הקבוצות ביחס אומגה-6 לאומגה-3. בהסתמך על ממצאי השלבים הראשונים של המחקר, בשלב השלישי למחקר בדקנו את השערה כי העלאת ריכוז הזרמה תשפיע על איכות מנות הזרעה ונתוני פוריות, על ידי שיפור הישרדות פרוגרסיבית של תאי זרע במהלך תהליכי הקפאה והפשרה. כל מירוק חולק לשתי קבוצות. קבוצה ראשונה (קבוצת הביקורת) עברה תהליך של מיהול והקפאה לפי פרוטוקול הקיים בשיאון, קבוצה שנייה (קבוצת הטיפול) סורכזה ב- 600g במשך 8 דקות ונוזלי הזרע הוצאו. לאחר מכן, שתי הקבוצות עברו מיהול והקפאה לפי פרוטוקול הקיים בשיאון. בשלב הראשון של העבודה, נבחנה השפעת העלאת הריכוז על מדדי תנועתיות ומאפיינים תאיים. לא נמצא שינוי משמעותי בשיעור תנועתיות כללית ותנועתיות פרוגרסיבית לאחר הקפאה והפשרה בין שתי הקבוצות. גם הישרדות תאים בעלי תנועה פרוגרסיבית בעקבות תהליך הקפאה/הפשרה היה דומה בין קבוצת הביקורת לטיפול. שיעור התאים החיים לאחר הקפאה/הפשרה היה גבוה יותר בקבוצת הטיפול לעומת הביקורת (47.5 ו- 40.0% בהתאמה; $P < 0.001$). בקבוצת הטיפול היו יותר תאים חיים שלא ביטאו ROS תוך תאי ופחות תאים חיים שבטאו ROS תוך תאי מאשר בקבוצת הביקורת

(27.6 ו-34.3% לעומת 40.8 ו-12.8%, בהתאמה; $P < 0.01$). לא נמצא הבדל מובהק בין קבוצת הביקורת והטיפול בפעילות מיטוכונדריאלית ובשלמות ממברנת האקרזום בתאים חיים. בשלב השני הועמד ניסוי לבחון את ההשפעה של העלאת ריכוז הזרמה, על כושר ההפריה ושעור ההתעברות בשטח, כאשר המדד הנבחן הוא שעור ההריונות המתקבל. כל מירוק חולק לשתי קבוצות. קבוצת ביקורת בה הזרמה נמהלה בהתאם לריכוז המירוק וקבוצה שניה בה הזרמה סורכזה לפני המיהול. הזרעות נעשו על ידי המזריעים של שיאון וניתוח נתונים יעשה בהמשך על בסיס הנתונים המצטברים של שיאון/ספר העדר. על סמך הממצאים שהתקבלו ניתן לומר כי זרמה בעלת תנועתיות פרוגרסיבית רגישה יותר לתהליכי שימור בהקפאה. ניתן לשער כי תהליכי שימור בהקפאה פוגעים ביכולת תאי זרע לנוע בקו ישר, מה שמתבטא בירידה גבוהה יותר בשיעור תאי זרע עם תנועתיות פרוגרסיבית בהשוואה לירידה בשיעור תאי זרע בעלי תנועתיות כללית. הישרדות של תאים בעלי תנועתיות פרוגרסיבית קשורה ככל הנראה ליכולת תאים אלה לעמוד בפני עקה חימצונית. חומצות שומן רב בלתי רוויות מהוות אחת המטרות העיקריות לתרכובות חמצן פעילות בתהליך חמצון חומצות שומן. לכן ניתן לשער כי יכולת לעמוד בפני עקה חימצונית נובעת משיעור נמוך יחסית של חומצות שומן מסוג זה בממברנות של תאים אלה. בנוסף, טיפול העלאת ריכוז הזרמה שיפר את יכולת העמידות של תאי זרע לתהליכי הקפאה/הפשרה, אך לא השפיע על הישרדות פרוגרסיבית. ייתכנות השימוש בשיטה המוצעת תקבע לאחר ניתוח תוצאות פוריות בשטח.

Abstract

Semen quality assessment methods include the evaluation of physiological parameters (concentration, viability, motility and morphology), biochemical parameters (membrane composition and integrity), and the correlation between them. Commonly, artificial insemination (**AI**) centers assess semen quality according to motility and concentration evaluation, in order to determine the dilution factor for a final concentration of about 20 million sperm cells in each 0.25 ml straw. Progressive motility (**PM**) is one of the physiological characteristics of sperm cells, which refers to the cell's ability to move in a straight line. Progressive motility is required for moving forward in the female reproductive tract and is often used to predict fertilization competence. In the AI-center "Sion", the PM parameter is used to calculate the dilution factor of semen samples, thereby affecting the number of straws produced from each ejaculate. The aim of the current study was to examine the survival of progressively motile sperm, following the freeze-thawing process. The study was performed in three stages. The first stage included retrospective analysis of data taken from 'Sion', in order to compare the PM of fresh semen to that of cryopreserved semen. Findings indicated that the proportion of motile- and progressively motile sperm decreased during the freeze-thaw process, from 76 to 51%, and from 66 to 37.8%, respectively ($P < 0.01$). In addition, sperm PM was found to be more susceptible to the preservation process than sperm motility, expressed by a decrease in PM, following freezing and thawing (28.2 vs. 25.0 percentage units, respectively; $P < 0.01$).

In the second stage, we have defined a new parameter, named "progressive motility survival" (**PMS**), which expresses the ratio between the PM of semen before and after freeze–thawing. Ejaculates were divided into high- or low-PMS, and were examined for their membrane integrity; their viability, mitochondrial activity, acrosome integrity, and reactive oxygen species (**ROS**) intracellular level. Note, that examinations were performed on fresh semen, and the PMS was calculated after the preservation process. Findings indicated that samples of high-PMS had a higher mitochondrial activity, compared to semen of low-PMS (ratio 3.7 vs. 1.9, respectively; $P < 0.05$). Samples of high-PMS had

relatively a higher proportion of viable spermatozoa with intracellular ROS expression, than that in samples with low-PMS (43.4 versus 29.1%, respectively; $P < 0.05$). In addition, samples were evaluated for fatty acid membrane composition. The findings indicated that the concentration of saturated- and monounsaturated fatty acids in the sperm membrane, did not differ between the low- and high-PMS groups. However, the relative concentration of polyunsaturated fatty acids (**PUFA**) was higher in the low- than the high-PMS group (33.07 vs. 30.94%, respectively; $P \leq 0.02$). The proportion of omega-6 fatty acids was higher in the low- than the high-PMS group (10.4 vs. 9.5%, respectively; $P < 0.05$). On the other hand, the proportion of omega-3 fatty acids did not differ between the groups. Thereby, the omega-6 to omega-3 ratio did not differ between low- and high progressive motility groups.

The aim of the third part of the study was to improve cryosurvival of progressively motile spermatozoa, by manipulating the dilution process. In our preliminary analysis, we found that PM is negatively correlated with sperm semen concentration ($r = -0.64$, $P < 0.01$). Therefore, it was reasonable to assume that the proportion of cryoprotectants that were added during the dilution process, further affected the PMS. To confirm this assumption, the ejaculates ($n=21$) were divided into two samples; the control samples underwent a routine procedure of dilution in order to get 25 million spermatozoa per 0.25 ml, i.e., the dilution was performed based on the initial ejaculate concentration. The treated samples were centrifuged at 600g for 8 min, the seminal fluid was extracted, and the samples were diluted with cryoprotectants in order to get a final concentration of 25 million spermatozoa per 0.25 ml, i.e., the dilution was based on the post centrifugation concentration. All samples underwent the freezing procedure and the sperm motility, viability, acrosome integrity, mitochondrial activity and the level of ROS were examined post thawing. The findings indicated that sperm viability was higher in the treated- relative to the control group (47.5 and 40.0%, respectively; $P < 0.001$); sperm motility, PM and PMS did not differ between the groups. In addition, the proportion of viable spermatozoa that expressed intracellular ROS, was lower in the treated- relative to the control group (34.3 vs. 40.8%, respectively; $P < 0.01$). However, the

mitochondrial membrane potential and acrosome integrity did not differ between the groups.

As a consequence of the first two parts, a field fertility study was conducted, in order to examine the effect of the aforementioned procedure on fertilization capacity. Ejaculates were divided into control and treated groups, as described above. All samples were cryopreserved in straws until insemination. The insemination procedure (n= 60 per group) was done by Sion's professional inseminators. The data recorded in Sion's herd book is awaiting statistical analysis.

Summary The findings of the present study indicate that spermatozoa with high PM are more sensitive to cryopreservation processes. High PM survival is associated with better oxidative status, most likely due to a low proportion of PUFA in the membranes, which is known to be a major target for active oxygen compounds in the fatty acid oxidation process. In addition, high PM was found to correlate negatively with semen concentration. Therefore, manipulating the dilution process has been suggested. The examined procedure seems to be suitable for handling ejaculates with high PM and low concentration, expressed by higher viability after the freezing/thawing procedure. The profitability of the proposed procedure will be determined after analyzing the data of the field fertility trial.

מבוא ותיאור הבעיה

היכולת לאפיין את איכות הזרמה ובחינת פרי-ההרבעה הופכים למרכיב מרכזי בפוריות עדר הבקר לחלב, ולו רק מהסיבה שזרמה מפר אחד משמשת להזרעת מאות פרות. ידוע שאיכות הזרמה מושפעת מעונתיות, גיל, תזונה, תחלואה, מזהמים סביבתיים וגורמים גנטיים. מכאן שתהליך יצירת תאי זרע הינו מושפע ואף עלול להיפגע וכפועל יוצא מכך תיתכן פגיעה באיכות וביכולת ההפריה של תא הזרע. בממשק של הזרעות מלאכותיות בו נעשה שימוש בזרמה קפואה, למרכיב הישרדות התאים במהלך ההקפאה וההפשרה יש חשיבות עליונה. איכות הזרמה ניתנת להערכה ע"י מספר מדדים ואלו כוללים מדדים פיזיולוגיים (ריכוז הזרמה, נפח זרמה, מספר ואחוז תאים בעלי תנועתיות ובעלי תנועתיות פרוגרסיבית, מהירות התנועה, מורפולוגיה), מדדים ביוכימיים (הרכב חומצות שומן בממברנה), והקורלציה ביניהם (Argov et al., 2013). לכל אחד מהמדדים הנ"ל יש ערכי מינימום המשמשים להגדרת זרמה טובה, חריגה מערכים אלו משמעותה זרמה באיכות ירודה. חשוב לציין, כי אף אחד מהפרמטרים הנ"ל אינו מהווה מדד יחיד לקביעת איכות הזרמה.

תנועה פרוגרסיבית - מבין הפרמטרים הפיזיולוגיים נמצא שלתנועתיות תאי הזרע יש את הקשר החזק ביותר עם כושר ההפריה. ניתן לאפיין תנועתיות על ידי התרשמות סובייקטיבית של תנועת הזרמה תחת מיקרוסקופ או לחילופין באמצעות מכשור המתבסס על קריאה של עוצמה ותדירות הפרעות האור בהתאם לתנועה של תאי זרע. דוגמא לכך הוא מכשיר ה- Sperm Quality Analyzer- Visual bull (SQA-Vb) אשר נמצא בשימוש בשרות להזרעה מלאכותית, "שיאון". ניתן לאפיין את תנועת התאים באמצעות מספר פרמטרים כגון מהירות ממוצעת של תאים, מספר תאים נעים ומספר תאים הנעים בתנועה פרוגרסיבית (יכולתו של תא הזרע לנוע קדימה). תאי הזרע רוכשים את התנועה הפרוגרסיבית לאחר המירוק, בשלב הקפטיציה (Yanagimachi, 1994). התנועה הפרוגרסיבית כוללת את הכיווניות, שהיא למעשה נגזרת פיזיולוגית ממבנה זנב התא ופעילות המיטוכונדריות לאספקת אנרגיה לתא בכלל ולצרכי תנועה בפרט. פרמטר זה חשוב לתהליך ההפריה היות ועל תא הזרע לעבור מרחק רב בצינור המין הנקבי החל בבושת וכלה באמפולה שם מתבצעת ההפריה.

בניסוי מקדים מצאנו מתאם חיובי בין מספר התאים בקשית הנעים פרוגרסיבית ושיעור התעברות *in vivo*. כאשר מספר התאים הנעים פרוגרסיבית היה 1.5 מיליון, שיעור ההתעברות היה כ- 32% וכאשר מספר התאים הנעים פרוגרסיבית היה 6 מיליון, שיעור ההתעברות היה גבוה יותר ועמד על 43%. לעומת זאת, הזרעה עם קשיות המכילות מספר כולל של כ- 15 מיליון תאים נעים פרוגרסיבית, לא הובילה לשיפור בשיעור ההתעברות. מכאן ניתן לשער כי למספר התאים שנעים פרוגרסיבית לאחר הקפאה יש תרומה לא מבוטלת על הסיכוי להצלחת ההפריה וכי מדד התנועה

הפרוגרסיבית יכול לשמש לקביעת איכות הזרמה בפרים. בנוסף, נמצא כי בבנק הזרע "שיאון" התפלגות הזרמה על בסיס התנועה פרוגרסיבית קרובה לנורמאלית, כאשר 35% מהדוגמאות בעלות מספר תאים נעים פרוגרסיבית קטן מ- 6 מיליון ואילו 65% בעלות מספר תאים נעים פרוגרסיבית גדול מ- 6 מיליון. על בסיס התפלגות זאת הגדרנו תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה, בינונית ונמוכה. מצאנו כי שעור ההפריה *in vitro* היה גבוהה עם זרמה בעלת תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה בהשוואה להפריה עם זרמה בעלת תנועתיות נמוכה, וזאת למרות שבתנאי תרבית לתנועה הפרוגרסיבית כשלעצמה לא אמור להיות יתרון (Ying et al., 2014). ממצאים אלו מצביעים על כך שתנועה פרוגרסיבית קשורה למאפיינים נוספים, כמו פעילות מיטוכונדריאלית (Ying et al., 2014) והרכב הממברנה (דנה גרוסמן, לא פורסם) של התא.

הרכב הממברנה - ממברנת התא מורכבת מפוספוליפידים אשר מורכבים ממספר סוגי חומצות שומן אשר משפיעות על תכונות הממברנה ופעילויותיו השונות של התא. קיומן של חומצות שומן רוויות בממברנה מעלה את קשיחותה (Benedetti and Emmelot, 1968), בעוד שחומצות שומן רב בלתי רוויות מגדילות את גמישות, קימור וחוסר יציבות הממברנה (Furland et al., 2007). כמו כן, ריכוז גבוה של כולסטרול בממברנת התא מקשיח את הממברנה (Darin-Bennett and White, 1977). לגמישות ממברנת תא הזרע יש חשיבות רבה והשפעה על תהליכים ביוכימיים הדרושים לתהליך ההפריה. הורדת ריכוז הכולסטרול בממברנת תא הזרע חיונית הן להבשלת תאי הזרע ביותרת האשך, והן לתהליך ה- capacitation אשר מתרחש במערכת המין הנקבית (Thérien et al., 1998). בשני תהליכים אלו פירוק הכולסטרול גורם לעלייה בנוזליות הממברנה (Travis and Kopf, 2002). בהקשר זה נציין כי בעבודה שנעשתה לאחרונה במעבדתנו נמצא מתאם בין הרכב חומצות השומן בזנב תא-הזרע ומדדים פיסולוגים כגון, תנועתיות, תנועה פרוגרסיבית ומהירות (Argov et al., 2013). בעבודה קודמת אשר עסקה באפיון ובחינת התנועה הפרוגרסיבית כמדד לאיכות זרמה מצאנו כי זרמה בעלת תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה ותנועה פרוגרסיבית נמוכה נבדלות בהרכב חומצות השומן, כפי שבא לידי ביטוי שונה ביחס בין חומצות שומן מסוג אומגה 3 לחומצות שומן מסוג אומגה 6. לנתון זה חשיבות רבה היות ולהרכב חומצות השומן בממברנה תפקיד מפתח ביכולת התא לשרוד את תהליך ההקפאה וההפשרה קרי שעור הדעיכה (= שעור ההישרדות). במהלך התהליך של ההקפאה וההפשרה הנהוג כיום, רק כ-40% מתאי הזרע שורדים. במהלך ההקפאה חשופים תאי הזרע לשינויים אוסמוטיים ושינויים בטמפרטורה המשפיעים על ארגון, הרכב, נזילות וחדירות הממברנה. יתרה מכך הממברנה של תאי זרע אשר שרדו הקפאה דומה במבנה לזו של תא זרע אשר עבר capacitation.

הנחת העבודה ומטרות המחקר

הנחת העבודה המרכזית היא כי התבססות על שיעור הדעיכה של התאים בשלב הכנת הקשיות להקפאה, בנוסף לריכוז התאים הנעים פרוגרסיבית בזרמה הטרייה אפשר ייצור קשיות עם מספר מיטבי של תאי זרע נעים פרוגרסיבית, אשר ישפר את שיעור ההפריה ויקטין את עלות הייצור. בנוסף אנו מניחים כי (1) קיימת שונות בשיעור הדעיכה בין פרים וכי ניתן להגדיר שיעור דעיכה עבור כל פר ופר; (2) קיים מתאם בין שני הפרמטרים, תנועה פרוגרסיבית ושיעור הדעיכה; (3) שיעור הדעיכה כמו גם התנועה הפרוגרסיבית מושפעים מהרכב ותקינות ממברנות התא.

מטרות העבודה:

- א. לבצע ניתוח רטרוספקטיבי על מנת לאפיין את שיעור הדעיכה של תנועה פרוגרסיבית בזרמת פרים.
- ב. לבצע אנאליזות של זרמת פרים להרכב חומצות השומן תוך התייחסות לשיעור הדעיכה של תנועה פרוגרסיבית (נמוך וגבוה) בזרמת פרים.
- ג. לבחון שתי גישות למיהול זרמה בעלת תנועתיות גבוהה וריכוז נמוך.

אופן ביצוע המחקר/ שיטות

בשנה הראשונה ביצענו ניתוח רטרוספקטיבי של הנתונים הקיימים בשיאון, אשר כלל 3,779 מירוקים שנאספו במהלך שנת 2016, מ-133 פרים פעילים. נפח הזרמה, ריכוז תאי הזרע, אחוז תנועתיות, אחוז תנועתיות פרוגרסיבית נבחנו באמצעות מכשיר (SQA-Vb Medical Electronic Systems, LTD). נבחנה התפלגות ערכי-הדעיכה של הזרמה שנאספה לערכי דעיכה גבוהים ונמוכים. כמו כן, נבחן האם קיים מתאם בין שיעור הדעיכה ותנועה פרוגרסיבית.

בשנה השנייה למחקר נעשה אפיון של הרכב ותקינות ממברנות של תאים מזרמה בעלת שיעור דעיכה נמוך לעומת תאים מזרמה בעלת שיעור דעיכה גבוהה. הישרדות תנועה פרוגרסיבית הוגדרה כשיעור הזרע בעל תנועתיות פרוגרסיבית לאחר תהליכי הקפאה והפשרה, יחסית לשיעורם בזרע טרי. העבודה נעשתה בשני שלבים. בשלב ראשון נבחנה תקינות הממברנות ע"י מאפיינים תאיים (חיות, שלמות האקרזום, פעילות מיטוכונדריאלית ורמת חמצון). לצורך האפיון, נלקחו שתי קבוצות, האחת כללה זרמה טרייה עם הישרדות פרוגרסיבית גבוהה ($\leq 62.5\%$) והשנייה כללה זרמה טרייה עם הישרדות פרוגרסיבית נמוכה ($\geq 51.4\%$). הניסוי כלל 53 מירוקים מ-24 פרים. האנאליזה התבצעה באמצעות מכשיר (EasyCyte II Plus (IMV technologies) וערכות (EasyKit (IMV Technologies) ייעודיות המכילות צבענים פלורסנטים לבחינת תקינות ממברנות התא (חיות, שלמות האקרזום, פעילות מיטוכונדריאלית ורמת חמצון).

השלב השני כלל בחינה של הרכב חומצת השומן בממברנת תאי זרע. לטובת הניסוי נלקחו 56 מירוקים מ-10 פרים וחולקו לשתי קבוצות שאופיינו בהישרדות פרוגרסיבית גבוהה ($\leq 62\%$) או נמוכה ($\geq 50.7\%$). מיצוי הליפידים התבצע בשיטת Folch ולאחריה הדוגמאות עברו מתילציה. הפרדה, זיהוי וכימות של חומצות השומן התבצעו במעבדתה של דר' ארגוב בפקולטה לחקלאות בעזרת כרומטוגרפיה גזית על ידי עקומת סטנדרט חיצונית כפי שתואר בעבודתנו הקודמת (Argov et al., 2013).

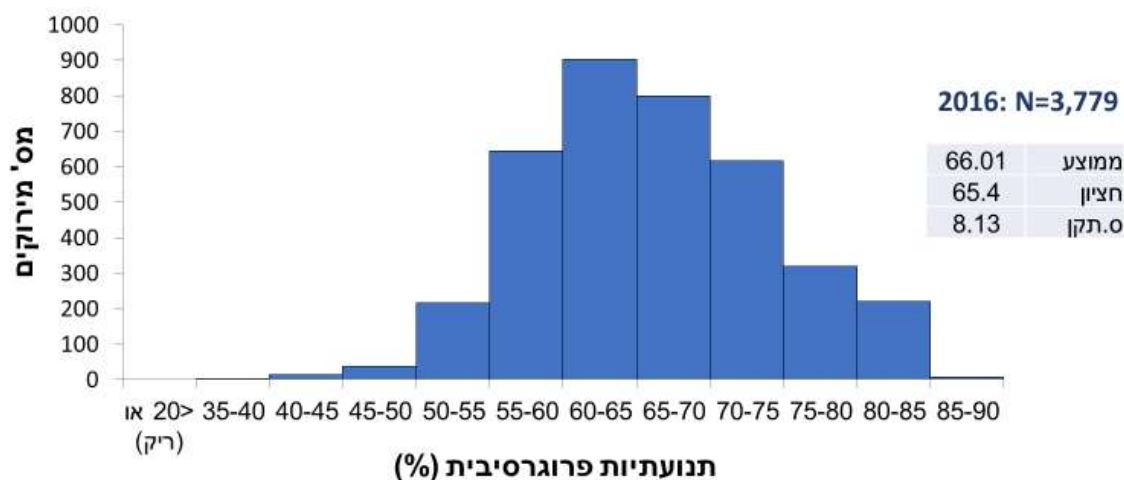
השנה השלישית- ממצאים שהתקבלו בשנים הראשונות למחקר מרמזים על קשר בין ריכוז זרמה טרייה לבין הישרדות פרוגרסיבית (**טבלה מס' 2**). בהתאם לכך, השערת המחקר בשנה זו הייתה כי העלאת ריכוז הזרמה באמצעות סרכוז תשפיע על כמות חומרי השימור המוספים לדוגמא ובכך על איכות מנות הזרעה קרי, שיפור הישרדות פרוגרסיבית של תאי זרע במהלך תהליכי הקפאה והפשרה. בשלב הראשון נבחנה השפעת העלאת הריכוז על מדדי התנועתיות ומאפיינים תאיים. המחקר נעשה תוך שימוש ב-21 מירוקים מ-6 פרים. כל מירוק חולק לשתי קבוצות, קבוצה ראשונה (קבוצת הביקורת) עברה תהליך של מיהול והקפאה לפי פרוטוקול הקיים בשיאון (כלומר, ללא הגדלת ריכוז הזרמה ושינוי בפקטור המיהול). קבוצה שנייה (קבוצת הטיפול) סורכזה ב-600g במשך 8 דקות ונוזלי הזרע הוצאו. בעקבות כך, התקבלה עליה בריכוז הזרמה מ-719.2 מיליון תאים/מ"ל בקבוצת הביקורת ל-1,218.8 מיליון תאים/מ"ל בקבוצת הטיפול. לאחר מכן, שתי הקבוצות עברו מיהול והקפאה לפי פרוטוקול הקיים בשיאון. הערכת מאפיינים פיזיולוגיים ותאיים בוצעו בדומה לשנים קודמות (שנה א', ב').

בשלב השני ביצענו ניסוי פוריות בו נבחנה הלכה למעשה השפעת העלאת ריכוז הזרמה על כושר ההפריה ושעור ההתעברות בשטח. המדד הנבחן הוא שעור ההריונות המתקבל. לצורך השוואה, הוכנו שני סטים של קשיות עבור כל מירוק (כ 40 מירוקים מ 3 פרים) בשיטה זהה לזן שתוארה מעלה. קבוצת הטיפול סורכזה ב-600g במשך 8 דקות ונוזלי הזרע הוצאו ובמקומם הוספה כמות זהה של חומר מיהול. כל סט קשיות קיבל קוד הזרעה; הקשיות המקודדות שימשו להזרעת פרות ומבכירות. ההזרעות נעשו על ידי מזריעים מקצועיים מ"שיאון". בהמשך יעשה ניתוח נתונים על בסיס הנתונים המצטברים של שיאון/ספר העדר.

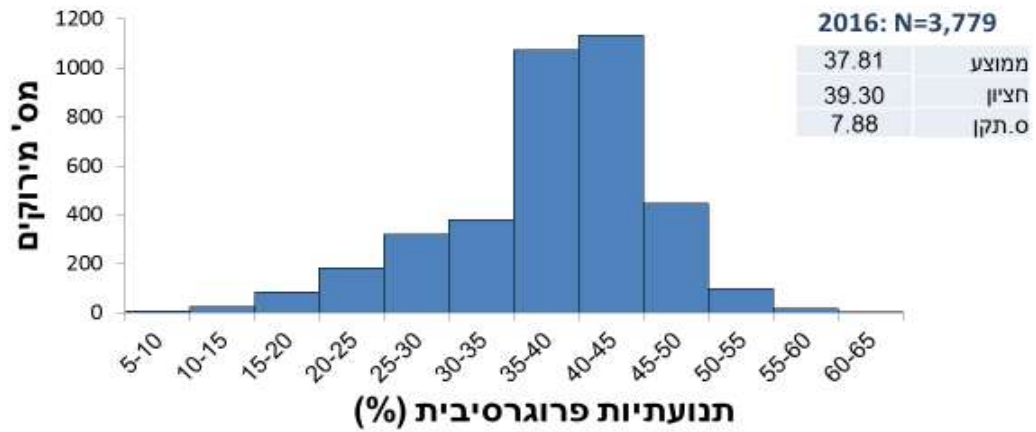
כל המבחנים הסטטיסטיים נערכו באמצעות תוכנת IBM SPSS Statistics 23.0. בדיקות התפלגות נורמלית נעשו על פי מבחן Shapiro-Wilk. מבחני קורולציות בין המשתנים נעשו על ידי שימוש ב-Pearson's correlation coefficient. הבדלים במאפיינים תאיים ובפרופיל חומצות השומן נבחנו באמצעות T-test ($p < 0.05$). השפעות טיפולים על איכות הזרמה נבחנו באמצעות Paired Samples T test ($p < 0.05$) או Wilcoxon S-R test ($p < 0.05$).

תוצאות ודין

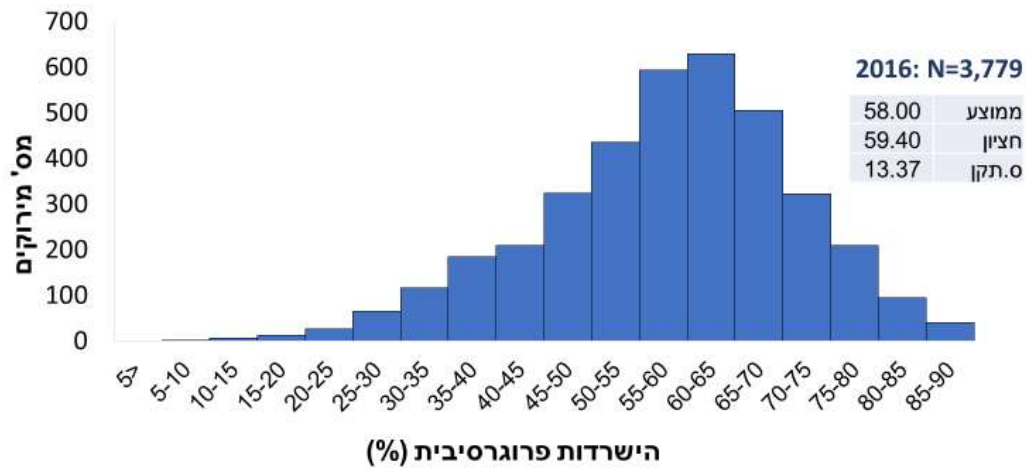
שנה א- בניתוח רטרופקטיבי של מאגר הנתונים הקיים בשיאון, נמצאה התפלגות נורמלית של תנועתיות פרוגרסיבית בין המירוקים, עם ממוצע של 66.0% וחציון 65.4% (גרף מס' 1). עוד נמצא כי שיעור תאי הזרע בעלי יכולת תנועה, בפרט תנועתיות פרוגרסיבית, קטן במהלך תהליך ההקפאה בחנקן נוזלי (-196°C) מ-76 ל-51% ($P < 0.01$) ומ-66 ל-37.8%, בהתאמה (טבלה 1; $P < 0.01$), הירידה בשיעור תאי הזרע הנעים פרוגרסיבית בעקבות הקפאה/הפשרה הייתה גבוהה יותר בהשוואה לתאים בעלי תנועתיות כללית (28.2 לעומת 25.0 יחידות אחוז, בהתאמה (טבלה 1; $P < 0.01$), כאשר בחנו את ה"הישרדות פרוגרסיבית", המוגדרת כיחס בין שיעור תאי זרע בעלי תנועתיות פרוגרסיבית לאחר הקפאה והפשרה לבין אלה של זרע טרי, התקבלה התפלגות נורמלית, עם ממוצע של 58.0 וחציון של 59.4% (גרף מס' 3). באופן מפתיע ובניגוד להנחת העבודה נמצא מתאם שלילי ($r = -0.44$) בין תנועה פרוגרסיבית בזרימה טרייה ושעור הישרדות פרוגרסיבית, אם כי המתאם היה נמוך (טבלה 2; $p < 0.01$). בנוסף, תאים בעלי תנועה פרוגרסיבית גבוהה היו רגישים יותר לתהליך שימור בהקפאה אשר התבטא בירידה בשיעור תאי הזרע הנעים בהשוואה לתאים בעלי תנועתיות כללית 28.2 לעומת 25.0%, בהתאמה, (טבלה 1; $P < 0.01$). בנוסף התברר כי לא ניתן לחזות הישרדות תאים לאחר הקפאה לפי נתוני תנועתיות פרוגרסיבית בזרמה טרייה.



גרף 1. התפלגות המירוקים על פי תנועתיות פרוגרסיבית בזרמה טרייה.



גרף 2. התפלגות המירוקים על פי תנועתיות פרוגרסיבית בזרמה לאחר הקפאה.



גרף 3. התפלגות מירוקים על פי הישרדות פרוגרסיבית לאחר הקפאה.

טבלה מס' 1. השפעת תהליך הקפאה/הפשרה על תנועתיות ותנועתיות פרוגרסיבית.

	% תנועתיות פרוגרסיבית (טר)	% תנועתיות (מופשר)	% תנועתיות פרוגרסיבית (טר)	% תנועתיות (מופשר)
ממוצע	66.0	51.0*	76.0	37.8**
ס. תקן	8.1	7.0	9.7	7.9
ירידה (יחידות %)	25.0 ^A		28.2 ^B	
ס. תקן	11.2		10.7	

$p < 0.001$ N=3,737

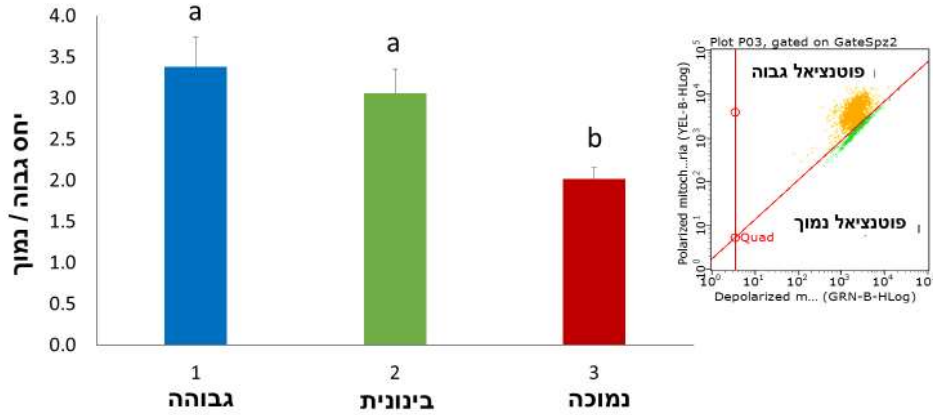
טבלה מס' 2. מתאם (פירסון) בין הישרדות פרוגרסיבית למאפיינים של זרע טרי. מתאם נחשב מובהק כאשר $P \leq 0.01$ (מסומן ב- *).

מאפייני זרמה	r	r ²	P
עונה (נובמבר-מאי; יוני-אוקטובר)	-0.031	0.001	0.057
גיל בקפיצה (ימים)	-0.117*	0.014	< 0.001
ריכוז הזרמה (מיליון/מ"ל)	0.356*	0.126	< 0.001
תנועתיות כללית (%)	-0.474*	0.224	< 0.001
תנועתיות פרוגרסיבית (%)	-0.438*	0.192	< 0.001
הישרדות לפי תנועתיות כללית (%)	-0.938*	0.880	< 0.001
מהירות (מיקרון/שנייה)	0.515*	0.265	< 0.001
פקטור מיהול (נפח סופי/נפח זרמה התחלתי)	0.493*	0.243	< 0.001

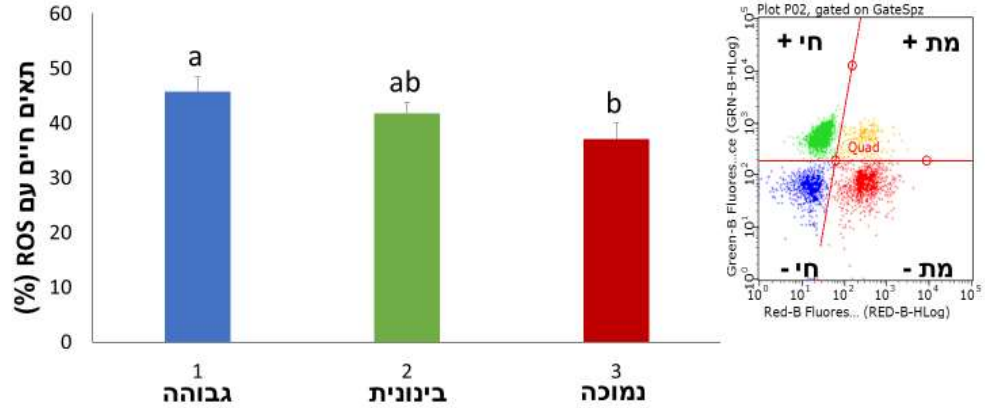
שנה ב - בשנה השנייה התמקדנו באפיון הרכב ותקינות ממברנות של תאי הזרע על מנת לנסות להבין מה העומד בבסיס ההישרדות הנמוכה של מירוקים המתאפיינים באחוז גבוה של תאי זרע עם תנועה פרוגרסיבית. בהתבסס על בחינת תקינות הממברנות נמצא כי זרמה טרייה עם הישרדות פרוגרסיבית גבוהה התאפיינה בפעילות מיטוכונדריאלית גבוהה יותר בהשוואה לזרמה עם הישרדות פרוגרסיבית נמוכה, יחס 3.7 לעומת 1.9 בהתאמה (גרף מס' 4; $P < 0.05$). בזרמה עם הישרדות פרוגרסיבית גבוהה נמצא אחוז גבוה יותר של תאים חיים שיצרו תרכובות חמצון פעילות בעקבות עקה חמצונית וזאת בהשוואה לזרמה עם הישרדות פרוגרסיבית נמוכה, 43.4

לעומת 29.1%, בהתאמה (גרף מס' 5, $P < 0.05$). לא נמצא הבדל משמעותי ברמת החיות ושלמות האקרזוזם בין שתי הקבוצות (טבלה 3; $P < 0.05$).

תוצאות אנליזת הרכב הממברנות של תאי זרע טרי מוצגות בטבלה מס' 4. לא נמצא הבדל משמעותי בין רמת חומצות שומן רוויות (SFA) וחד בלתי רוויות (MUFA) בין שתי הקבוצות (גרף מס' 6). עם זאת, הריכוז היחסי של חומצות שומן רב בלתי רוויות (PUFA) היה גבוה יותר בקבוצה המאופיינת בהישרדות פרוגרסיבית נמוכה לעומת זו המאופיינת כגבוהה 33.07 לעומת 30.94%, בהתאמה (גרף מס' 6; $P < 0.05$). בזרמה עם הישרדות נמוכה רמת חומצות שומן מסוג אומגה-6 היה גבוה יותר מחומצות שומן מסוג אומגה-3 (גרף מס' 7), אך לא נמצא הבדל בין הקבוצות ביחס אומגה-6 לאומגה-3 (גרף מס' 8).



גרף 4. פוטנציאל ממברנת המיטוכונדריה בזרמה טריה עם שיעור הישרדות פרוגרסיבית גבוה, בינונית ונמוכה. בצד ימין מוצג פלט כפי שמתקבל ממכשיר ה-EasyCyte II Plus, מוצגות שתי אוכלוסיות תאים המתקבלות באנליזה זו: תאים עם מיטוכונדריה בעלות פוטנציאל ממברנה גבוה ותאים עם מיטוכונדריה בעלות פוטנציאל ממברנה נמוך. מוצג בגרף היחס שבין תאי זרע בעלי פוטנציאל ממברנה מיטוכונדריאלי גבוה לבין תאים בעלי פוטנציאל ממברנה מיטוכונדריאלי נמוך. מוצגים ממוצעים \pm שגיאת תקן. אותיות שונות מעל כל עמודה מעידים על הבדל מובהק בין קבוצות הניסוי. $P < 0.05$.



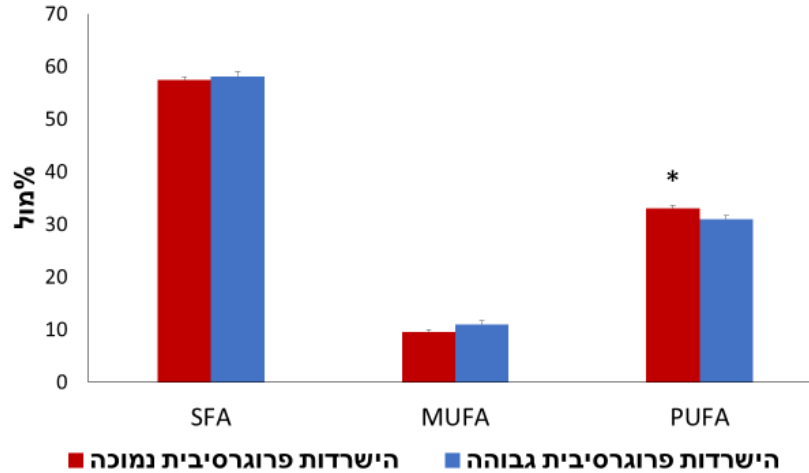
גרף 5. רמת חמצון בתאי זרע חיים מזרמה טרייה עם שיעור הישרדות פרוגרסיבית גבוה, בינונית ונמוכה. בצד ימין מוצג פלט כפי שמתקבל ממכשיר ה-EasyCyte II Plus, מוצגות ארבעת אוכלוסיות התאים המתקבלות באנליזה זו: תאים חיים המבטאים רדיקלים, תאים חיים אשר אינם מבטאים רדיקלים, תאים מתים אשר מבטאים רדיקלים ותאים מתים אשר אינם מבטאים רדיקלים. מוצג בגרף שיעור התאים החיים אשר ביטאו רמה של רדיקלים חופשיים. מוצגים ממוצעים \pm שגיאת תקן. אותיות שונות מעל כל עמודה מעידים על הבדל מובהק בין קבוצות הניסוי. $P < 0.05$.

טבלה מס' 3- השוואה בין מאפיינים ממברנליים של זרמה טרייה עם הישרדות פרוגרסיבית גבוהה, בינונית ונמוכה. התוצאות מוצגות כממוצע \pm שגיאת תקן ($P \leq 0.05$).

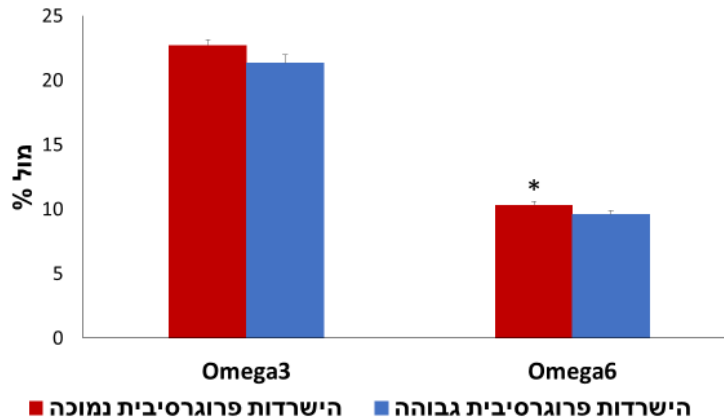
מאפיין	פרמטר הנבדק (%)	הישרדות פרוגרסיבית גבוהה (% \pm SEM)	הישרדות פרוגרסיבית בינונית (% \pm SEM)	הישרדות פרוגרסיבית נמוכה (% \pm SEM)
חיות	תאים חיים	63.67 \pm 2.7	62.37 \pm 2.4	59.38 \pm 3.4
שלמות האקרזום	ממברנת אקרזום תקין	52.39 \pm 1.7	50.18 \pm 1.9	52.89 \pm 2.0

טבלה מס' 4: פרופיל חומצות שומן בתאי זרע טריים עם הישרדות תנועתית פרוגרסיבית גבוהה ונמוכה. הערכים מוצגים כריכוז יחסי. ההבדל נחשב משמעותי כאשר $P \leq 0.05$ ומסומן ב- (*).

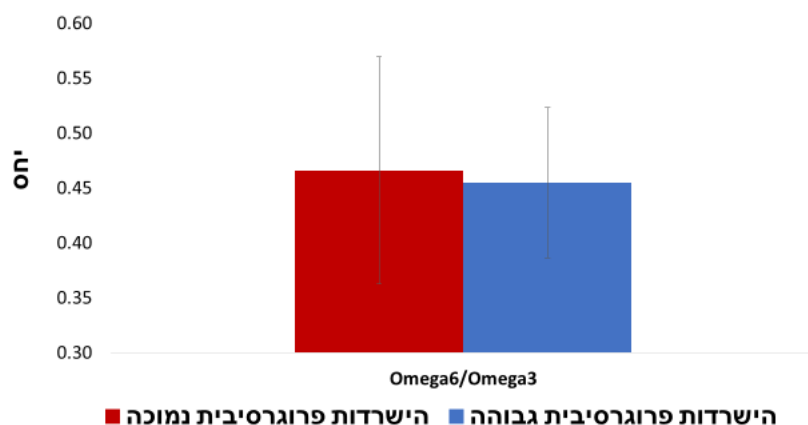
p	הישרדות פרוגרסיבית נמוכה	הישרדות פרוגרסיבית גבוהה	ח. שומן
.021	13.44	17.18	C14:0*
.006	0.35	0.28	C15:0*
.018	30.90	28.31	C16:0*
.608	12.10	12.35	C18:0
.013	0.35	0.25	C20:0*
.005	0.33	0.26	C16:1n7 cis9*
.548	2.58	2.64	C18:1n7
.335	0.45	0.41	C18:1n9 t
.118	5.93	7.32	C18:1n9 cis
.000	4.95	4.03	C18:2n6 cis9,12*
.032	0.25	0.20	C18:3n3 cis 9,12,15*
.001	0.37	0.23	C18:3n6*
.015	0.32	0.25	20:1n9*
.835	0.55	0.59	20:3n6
.470	3.56	3.65	C20:4n6
.814	1.01	0.97	C22:4n6
.141	22.57	21.08	C22:6n3



גרף 6. פרופיל חומצות שומן מתאי זרע בעלי שיעור הישרדות פרוגרסיבית נמוך וגבוה. מוצג בגרף התפלגות סוגי חומצות השומן בתאים בעלי הישרדות פרוגרסיבית נמוכה וגבוהה לחומצות שומן רוויות (SFA; saturated fatty acid), חד בלתי רוויות (MUFA) ורב בלתי רוויות (PUFA). מוצגים ממוצעים \pm שגיאת תקן. כוכבית מעל עמודה מעידה על הבדל מובהק בין קבוצות הניסוי. $P < 0.05$.



גרף 7. שיעור חומצות שומן מסוג אומגה 6 ואומגה 3 בתאים בעלי שיעור הישרדות פרוגרסיבית נמוך וגבוה. מוצגים ממוצעים \pm שגיאת תקן. כוכבית מעל עמודה מעידה על הבדל מובהק בין קבוצות הניסוי. $P < 0.05$.



גרף 8. יחס חומצות שומן מסוג אומגה 6 ואומגה 3 בתאים בעלי שיעור הישרדות פרוגרסיבית נמוך וגבוה. מוצגים ממוצעים \pm שגיאת תקן. $P < 0.05$.

מיטוכונדריה מספקת אנרגיה זמינה לסיבי הזנב של תא זרע, ובכך מאפשרת תנועה יעילה של התא המסייעת לתהליך ההפריה. היות ותהליך השימור בהקפאה פוגע בפעילות מיטוכונדריואלית ניתן לשער שתאי זרע עם מאגר גדול יותר של מיטוכונדריה פעילה לפני הקפאה יהיו בעלי תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה יותר לאחר הפשרה. בנוסף, תאים בעלי הישרדות פרוגרסיבית גבוהה מתמודדים טוב יותר עם עקה כימיונית ככל הנראה תוצאה של רמה נמוכה יותר של ח. שומן רב בלתי רוויות.

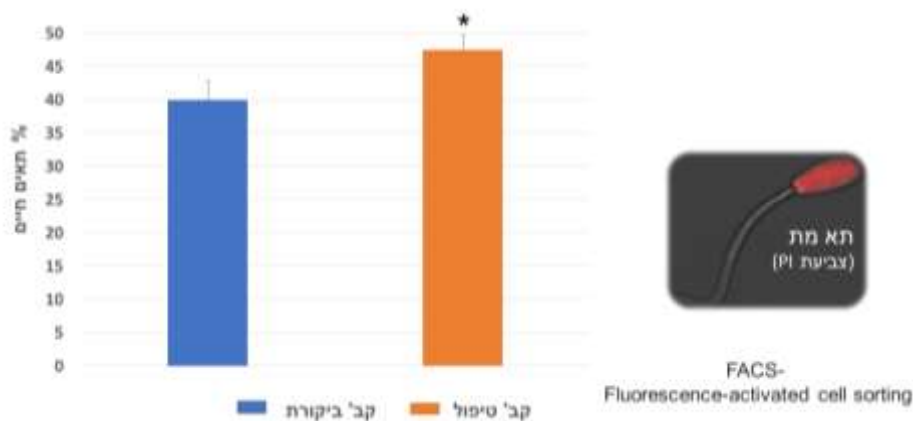
שנה ג - העלאת ריכוז הזרמה והגדלת פקטור המיהול גרמו לירידה מבוקרת בריכוזיות בתמהיל. שיעור התאים החיים לאחר הקפאה/הפשרה היה גבוה יותר בקבוצת הטיפול לעומת הביקורת 47.5% ו-40.0% בהתאמה (**גרף מס' 9**; $P < 0.001$). הטיפול אך לא השפיע על תנועתיות כללית ותנועתיות פרוגרסיבית לאחר הקפאה והפשרה (**טבלה 5**). הישרדות תאים בעלי תנועה פרוגרסיבית בעקבות תהליך הקפאה/הפשרה היה דומה בין קבוצת הביקורת לטיפול, 60.9% ו-60.8% בהתאמה (**טבלה 5**). בקבוצת הביקורת היו יותר תאים חיים שבטאו ROS תוך תאי ופחות תאים חיים שלא ביטאו ROS תוך תאי מאשר בקבוצת הטיפול, 40.8% ו-12.8% לעומת 34.3% ו-27.6% בהתאמה (**גרף מס' 10**; $p < 0.01$). כמו כן, לא נמצא הבדל מובהק בין קבוצת הביקורת והטיפול בפעילות מיטוכונדריואלית ובשלמות ממברנת האקרזום בתאים חיים (**טבלה מס' 6**). על בסיס תוצאות הניסוי נמצא כי העלאת ריכוז הזרמה והגדלת פקטור המיהול גרם להשפעה מטיבה על יכולת העמידות של תאי זרע לתהליכי הקפאה/הפשרה.

טבלה מס' 5: הערכת תנועתיות תאי זרע בשתי קבוצות הניסוי. התוצאות מוצגות כממוצע \pm סטיית תקן ($P \leq 0.05$).

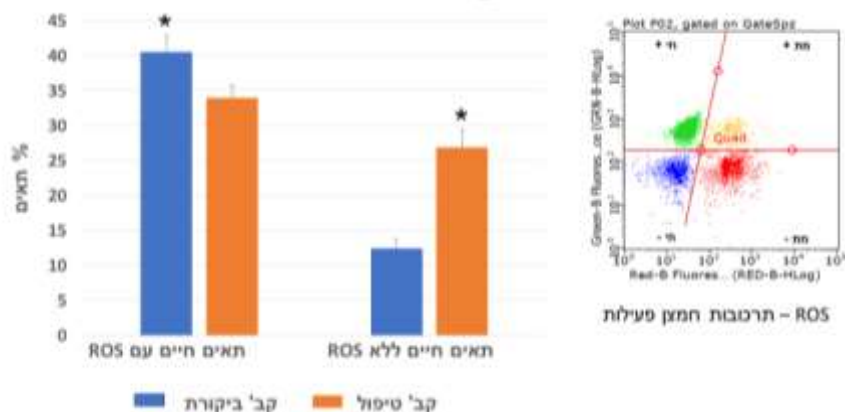
נתונים סופיים (לאחר הקפאה והפשרה)		נתונים התחלתיים (זירמה טרייה)	פרמטר הנבדק
קבוצת טיפול	קבוצת ביקורת		
60.0 ± 14.3	55.7 ± 10.3	622.9 ± 188.3	ריכוז (מיליון מ"ל)
66.7 ± 9.3	66.2 ± 7.0	91.6 ± 6.2	תנועתיות (%)
52.1 ± 7.9	51.5 ± 6.0	86.1 ± 6.3	תנועתיות פרוגרסיבית (%)

טבלה 6: השוואה בין מאפיינים ממברנליים של זרמה לאחר הפשרה עם הישרדות פרוגרסיבית גבוהה ונמוכה. התוצאות מוצגות כממוצע \pm שגיאת תקן ($P \leq 0.05$).

קבוצת טיפול (ממוצע \pm שגיאת תקן)	קבוצת ביקורת (ממוצע \pm שגיאת תקן)	פרמטר הנבדק	מאפיין
2.42 ± 0.5	2.95 ± 0.5	יחס בין תאים עם פוטנציאל ממברנה גבוה לנמוך	פוטנציאל ממברנת המיטוכונדריה
34.51 ± 1.3	39.50 ± 2.2	אקרזום תקין (%)	שלמות ממברנת האקרזום



גרף 9. שיעור התאים החיים לאחר הפשרה. בתמונה המצורפת מוצג תא זרע בודד אשר נצבע באופן חיובי ל-PI אשר מעיד על כך שממברנת התא נפגמה והתא מת. בגרף מוצג שיעור התאים החיים בקבוצת הביקורת ובקבוצת הטיפול. ממוצע \pm שגיאת תקן. * $P < 0.05$.



גרף 10. רמת חמצון בתאי זרע חיים לאחר הפשרה. בצד ימין מוצג פלט כפי שמתקבל ממכשיר ה-EasyCyte II Plus, מוצגות ארבעת אוכלוסיות התאים המתקבלות באנליזה זו: תאים חיים המבטאים רדיקלים, תאים חיים אשר אינם מבטאים רדיקלים, תאים מתים אשר מבטאים רדיקלים ותאים מתים אשר אינם מבטאים רדיקלים. מוצג בגרף שיעור התאים החיים אשר ביטאו רמה של רדיקלים חופשיים ושיעור התאים החיים אשר לא ביטאו רדיקלים בכל אחת מקבוצות הניסוי. מוצגים ממוצעים \pm שגיאת תקן. אותיות שונות מעל כל עמודה מעידים על הבדל מובהק בין קבוצות הניסוי. * $p < 0.05$.

סיכום

על סמך הממצאים שהתקבלו ניתן לומר

1. כי תנועתיות פרוגרסיבית נפגעת משמעותית בעקבות תהליכי שימור בהקפאה. אנו סבורים כי רגישות הגבוהה של תאים בעלי תנועה פרוגרסיבית לתהליכי שימור בהקפאה ככל הנראה קשורה להרכב ממברנת התא.
2. הישרדות פרוגרסיבית גבוהה קשורה ככל הנראה לכך שלתאים יש יכולת טובה יותר לעמוד בפני עקה חימצונית. יתכן והסיבה לכך היא בשיעור נמוך יותר של חומצות שומן רב בלתי רוויות בממברנות של תאים אלה. חומצות שומן מסוג זה מהוות אחת המטרות העיקריות לתרכובות חמצן פעילות בתהליך חמצון חומצות שומן.
3. הטיפול להעלאת ריכוז הזרמה והגדלת פקטור המיהול שיפרו את יכולת העמידות של תאי זרע לתהליכי הקפאה/הפשרה, אך לא השפיעה על הישרדות פרוגרסיבית.
4. מומלץ לבדוק את השימוש בשיטה בניסוי פוריות בשטח.

- Argov-Argaman, N., Mahgrefthe, K., Zeron, Y., and Roth, Z. (2013). Variation in lipid profiles within semen compartments—the bovine model of aging. *Theriogenology*, 80(7), 712-72.
- Benedetti E. L., and P. Emmelot. 1968. Structure and function of plasma membranes isolated from liver. In: *The Membranes*. Academic Press, New York and London.
- Darin-Bennett A. and I.G. White. 1997. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14: 466–470.
- Furland N.E., Oresti G.M., Antollini S.S., Venturino A., Maldonado E.N., and M.I. Aveldaño. 2007. Very long-chain polyunsaturated fatty acids are the major acyl groups of sphingomyelins and ceramides in the head of mammalian spermatozoa. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 18151–18161.
- Thérien I., R. Moreau and P. Manjunath. 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* 59: 768-776.
- Travis A. J., and G.S. Kopf. 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J. Clin. Invest.* 110: 731-736.
- Yanagimachi R. 1994. *Mammalian Fertilisation*. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction* 1: 189-317.
- Ying L., Kalo D., Zeron Y. and Z. Roth. 2014. Progressive motility—a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines Zygote, doi:10.1017/S0967199414000720.

רשימת פרסומים אחרונים לנושא הנחקר

1. Argov N, Sklan D, Zeron Y and Roth Z (2007) Association between seasonal changes in fatty-acid composition expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. *Theriogenology*, 67, 878-885.
2. Orgal S, Zeron Y, Elior N, Biran D, Fridman E, Druker S, Roth Z (2012) Season-induced changes in bovine sperm motility following freeze-thaw procedure, *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 58 (2012) No. 2 p. 212-218.
3. Argov-Argaman N, Mahgrefthe K, Zeron Y, Roth Z (2013) Season-induced variation in lipid composition is associated with semen quality in Holstein bulls. *Reproduction* 145, 479-489.
4. Argov-Argaman N, Mahgrefthe K, Zeron Y, Roth Z (2013) Variation in lipid profiles within semen compartments—the bovine model of aging. *Theriogenology* 80:712-721.
5. Ying L, Kalo D, Zeron Y, Roth Z (2014) Progressive motility—a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines *Zygote*, doi:10.1017/S0967199414000720.
6. Moallem U, Neta N, Zeron Y, Zachut M, Roth Z (2015) Omega-3 fatty acids dietary from flaxseed or fish oil sources differentially alters fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen bulls' semen *Theriogenology*, 87: 1110-11120.
7. Malama E, Zeron Y, Janett F, Siuda M, Roth Z, Bollwein H (2016) Seasonal variation in the quality of frozen-thawed semen collected from Holstein-Friesian bulls under subtropical conditions"- *Theriogenology*, in press.
8. Komsky-Elbaz A and Roth Z (2016) Effect of the herbicide Atrazine and its metabolite diaminochlorotriazine (DACT) on bovine sperm quality and fertilization competence. *Reproductive Toxicology*, submitted.