

## עבודת גמר

**ההשפעה של קוטל העשבים אטראזין והמטבוליט הראשי שלו, DACT, על עמידות תאי זרע של בקר בתהליך ההקפאה ולאחר ההפשרה**

**Effect of the herbicide atrazine and its major metabolite, DACT, on bovine sperm resistance during cryopreservation and after thawing**

כמילוי חלקי של הדרישות לשם קבלת תואר דוקטור לרפואה וטרינרית מטעם ביה"ס לרפואה וטרינרית ע"ש קורט של האוניברסיטה העברית בירושלים.

עבודת הגמר של התלמידה: ארינה זובוב Arina Zubov

שנת סיום לימודים לתואר DVM: 2019

בהדרכת: פרופ' צבי רוט

מוסד ביצוע העבודה: הפקולטה לחקלאות, רחובות

תאריך: מרץ 2020

" אני מאשר פרסום תקציר העבודה בעברית בעיתון רפואה וטרינרית "

חתימה \_\_\_\_\_

## תקציר

במהלך תהליכי הקפאה והפשרה, תאי הזרע חשופים לגורמי עקה כימיים ( קריופרוטקטורים ) ו/או פיזיקאליים העלולים לגרום שינויים הרסניים בלתי הפיכים לממברנות התא. הערכה מדויקת של שלמות מבנית ותפקודית של תאי זרע טריים וכמו כן של תאים שעברו שימור בהקפאה, הינה בעלת חשיבות גדולה למטרת ניבוי יכולת ההפריה והצלחת תהליך הזרעה מלאכותית. קוטל העשבים אטרזין והמטבוליט הראשי שלו diaminochlorotriazine ( DACT ) נחשבים כמזהמים סביבתיים וחומרים משבשי פעילות אנדוקרינית, המשבשים בין השאר את תפקוד תאי הזרע. בהתחשב בנזק אפשרי הנגרם כתוצאה מחשיפה של ממברנות תאי זרע למזהמים סביבתיים, לא ניתן לשלול השפעה מתווספת של תהליך שימור בהקפאה על תאי הזרע. המטרה של המחקר הנוכחי הייתה להעריך את השפעת החשיפה של תאי זרע לאטרזין (  $1\mu\text{M}$  או  $0.1$  ) ו DACT (  $10\mu\text{M}$  או  $1$  ) במהלך או לאחר תהליך ההקפאה על עמידותה של זרמת בקר להקפאה ולאחר ההפשרה. שלמות ותפקוד ממברנות תאי זרע הוערכה בעזרת שימוש בסמנים פלואורסנטים : (1) דני"א דו-גדילי הוערך בעזרת 4',6-diamidino-2-phenylindole ( DAPI ) ; (2) שלמות ממברנת התא הוערכה בעזרת propidium iodide ( PI ) ; (3) ראקציית אקרזום הוערכה בעזרת fluorescein ( FITC-PSA ) isothiocyante-conjugated *Pisumsativum* agglutinin ; (4) פוטנציאל ממברנת מיטוכונדריה הוערך בעזרת סמן פלואורסנטי 5, 5',6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine ( JC-1)iodide . הממצאים מראים, כי חשיפת זרמה לאטרזין (  $1\mu\text{M}$  או  $0.1$  ) או DACT (  $10\mu\text{M}$  או  $1$  ) במהלך ההקפאה, נוטה להעלות את שיעור תאי הזרע המתים ביחס לביקורת (  $P < 0.09$  ) ; חשיפה ל DACT (  $10\mu\text{M}$  או  $1$  ) מעלה את פוטנציאל ממברנת מיטוכונדריה (  $P < 0.03$  ). לא נמצאה השפעה של אטרזין או DACT על ראקציית אקרזום ספונטנית. לעומת זאת, שיעור תאי הזרע בעלי ראקציית אקרזום מושרית בעזרת קלציום יונפור, היה נמוך יותר לאחר חשיפה ל DACT בריכוז  $1\mu\text{M}$  (  $P < 0.05$  ). חשיפת תאי הזרע לאטרזין בריכוז  $1\mu\text{M}$  לאחר תהליכי הקפאה והפשרה העלתה את שיעור התאים המתים ביחס לביקורת (  $P < 0.05$  ), אך לא נצפתה השפעה משמעותית על פוטנציאל ממברנת מיטוכונדריה או ראקציית אקרזום. לסיכום, חשיפת זרמה לאטרזין או DACT במהלך תהליך ההקפאה, פוגעת בהשרדותם, כפי שנבחן לאחר ההפשרה. לעומת זאת, בעקבות חשיפת תאי הזרע לאחר תהליך ההקפאה וההפשרה לא היה אפקט משמעותי.

## **Abstract**

During freezing and thawing procedures, sperm are exposed to chemical and/or physical stressors that may cause adverse and harmful changes to sperm membranes. Accurate evaluation of the structural and functional integrity of fresh as well as cryopreserved sperm is highly important in predicting sperm fertilization capacity and success of artificial insemination. The herbicide atrazine and its major metabolite, diaminochlorotriazine ( DACT ) are considered a ubiquitous environmental contaminants and endocrine disruptors, which deleteriously effect sperm function. Taking into consideration possible damage caused by environmental contaminants to sperm membranes, additive effects during cryopreservation cannot be ruled out. The aim of the current study was to evaluate the effect of atrazine ( 0.1 or 1  $\mu\text{M}$  ) and DACT ( 1 or 10  $\mu\text{M}$  ) exposure during or after cryopreservation on bovine sperm cryotolerance. Sperm membrane integrity and functionality were evaluated using fluorimetric probes: (1) doublestranded DNA was examined by 4',6-diamidino-2-phenylindole ( DAPI ); (2) plasma membrane integrity was examined by propidium iodide ( PI ); (3) acrosome reaction was examined by fluorescein isothiocyanate-conjugated Pisumsativum agglutinin ( FITC-PSA ); mitochondrial membrane potential was examined by 5,5',6,6'-tetra-chloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide ( JC-1 ) fluorescent probe. The findings demonstrate, that exposure of sperm to atrazine ( 0.1 or 1  $\mu\text{M}$  ) or DACT ( 1 or 10  $\mu\text{M}$  ) during cryopreservation increased the proportion of dead sperm relative to the control (  $P < 0.09$  ); exposure to DACT ( 1 or 10  $\mu\text{M}$  ) increased mitochondrial membrane potential (  $P < 0.03$  ). Neither atrazine nor DACT affected spontaneous acrosome reaction. In contrast, the proportion of sperm with  $\text{Ca}^{++}$  ionophore-induced acrosome reaction was lower after exposure to 1  $\mu\text{M}$  DACT (  $P < 0.05$  ). Following freezing and thawing procedures, exposing sperm to 1  $\mu\text{M}$  atrazine increased the proportion of dead sperm relative to the control (  $P < 0.05$  ), but had no significant effect on sperm mitochondrial membrane potential or acrosome reaction. In conclusion, exposing sperm to endocrine-disrupting chemicals such as atrazine or DACT during cryopreservation reduces sperm cryotolerance and resistance post-thawing.

## תוכן עניינים

2.....	תקציר
3.....	Abstract
5.....	מבוא
8.....	מטרות העבודה
8.....	השערות העבודה
9.....	חומרים ושיטות
15.....	תוצאות
19.....	דיון
21.....	מסקנות
22.....	הבעת תודה
23.....	ביבליוגרפיה

# 1. מבוא

## אטרזין והסביבה החקלאית

הסביבה בה אנו חיים ובפרט הסביבה החקלאית מזוהמת בחומרים כימיים רבים ובכלל זה חומרי הדברה שונים, הידועים כחומרים משבשי פעילות אנדוקרינית ( EDCs ). חומרים אלה פוגעים בפעילות התקינה של המערכת האנדוקרינית וכן במערכות אחרות כגון מערכת הרבייה ( Jin et al., 2015 ; Schiffer et al., 2014 ). אטרזין ( ATZ ) הינו אחד מחומרי ההדברה הנפוצים ביותר לשימוש חקלאי בעולם ומשמש בעיקר לקטילת עשבים בגידולי תירס, קנה סוכר ושדות חיטה ( Barr et al. 2007 ). אטרזין הנמצא בסביבה יכול לנדוד בעיקר במדיום נוזלי ועל כן הינו השכיח ביותר להימצא בנחלים, נהרות, מי תהום ומי השתייה. בהיכנסו לגוף, אטרזין עובר מטבוליזם מהיר למטבוליטים שונים, כאשר העיקרי מביניהם הינו DACT ( diaminochlorotriazine ). המטבוליטים נוצרים בעיקר ע"י פוטודגרדציה של אטרזין על פני שטח הקרקע ( Koskinen & Clay, 1997 ) וביכולתם להישאר בשכבות התחתונות של הקרקע שנים רבות ( Cox, 2001 ). בשנת 2004 אטרזין נאסר לשימוש במדינות איחוד האירופי, אך עדיין נמצא בשימוש נרחב בארצות רבות ובניהן ארה"ב וישראל. ריכוזי אטרזין שנמצאו במי תהום נעים בטווח של  $0.01-6 \mu\text{g/L}$  ובמספר ארצות נמצאו ריכוזים בטווח של  $0.01-5 \mu\text{g/L}$  במי השתייה ( WHO, 2003 ). ריכוז אטרזין המורשה במי שתייה בארה"ב הינו  $3 \mu\text{g/L}$  ( Basheer & Lee, 2004 ) ובישראל כ-  $2 \mu\text{g/L}$  ( תקנות בריאות העם, 2013 ). בישראל, מנוטרים כ-17 חומרי הדברה במי שתייה, בניהם ATZ וסימזין בשכיחות הגבוהה ביותר. בשנים 1997-2010 נמצא ATZ באופן קבוע בכ- 16-26% ממקורות המים שנבדקו. הריכוזים שנמצאו נמוכים מהתקן ולפיכך המים אינם נחשבים לפסולים לשתייה ( Bas Spector&Fidelman, 2012 ).

## אטרזין ובעל החיים

כאמור בבע"ת, כאשר אטרזין נכנס לגוף, הוא עובר פירוק בכבד למגוון מטבוליטים, הניתנים לאיתור בשתן חולדות ובני אדם ( Ikonen et al., 1988 ). ביונקים, המטבוליט הראשי והעיקרי שאליו מתפרק ATZ הינו DACT. בעכברים נמצאו ריכוזי DACT של  $5400 \mu\text{M}$  בשתן,  $100 \mu\text{M}$  בפלסמה ו  $50 \mu\text{M}$  במח ( Brzezicki et al., 2003 ; Ross et al., 2008 ; Barr et al., 2007 ). מחקרים רבים הראו כי חשיפה ל ATZ ו DACT אפילו בריכוזים נמוכים הנמצאים בסביבה גורמת לסטרס חמצוני ולשלל תופעות בעלות השפעות אנדוקריניות ( Jin et al., 2014 ). בין יתר האפקטים שלו כ-EDC, אטרזין משבש תהליכים המתווכים בהורמוני אסטרוגן ואנדרוגנים החיוניים לפעילות מערכת המין והרבייה. לדוגמא, בריכוז  $10^{-5} \text{ mol/L}$  הוא מעלה את פעילות אנזים ארומטאז, הקריטי בתהליך יצור אסטרוגן ומוריד יצירת אנדרוגנים בקו תאים סרטניים ממקור אדם המגיבים לאטרזין ( Fan et al., 2007 ). חשיפה לאטרזין קשורה בין היתר להתפתחות תהליכים סרטניים, ביניהם סרטן השד בחולדות שהוזנו ב  $100 \text{ מ"ג/ק"ג}$  אטרזין במשך שבועיים ( Eldridge et al. 1994 ) או בנשים שנחשפו למים המזוהמים באטרזין ( Kettles et al. 1997 ). בנוסף, דווח כי הזנה של חולדות עד  $200 \text{ מ"ג/ק"ג}$  אטרזין במשך

כחודש גורמת לדלקת בבלוטת הערמונית (Stoker et al. 1999) ולהתפתחות סרטן הערמונית (Pintér et al. 1990) כפי שנמצא בבני אדם שעבדו בתעשיית ייצור אטרזין (MacLennan et al. 2002).

### תהליך הספרמטוגנזה

תאי הזרע נוצרים בצינוריות יוצרות הזרע באשך בתהליך הקרוי ספרמטוגנזה. הספרמטוגנזה מתרחשת במהלך חיי הזכר הבוגר ונבדלת בין מינים שונים של בע"ח בעיקר במשך זמן התהליך. בבקר משך הספרמטוגנזה הוא כ-61 ימים (Senger, 2003). ניתן לחלק את תהליך הספרמטוגנזה ל-3 שלבים: הראשון, שלב השגשוג, בו מתרחשות חלוקות מיטוטיות של תאים דיפלואידים המשמשים כתאי אב הנקראים ספרמטוגוניה. כתוצאה מחלוקות אלו נוצרים ספרמטוציטים ראשוניים. השלב השני, שלב חלוקת הפחתה, בו ספרמטוציטים ראשוניים עוברים חלוקה מיוטית ראשונה ושניה עד לקבלת הספרמטידים. הספרמטידים הינם תאים הפלואידים. השלב השלישי, שלב ההתמיינות, שלב בו אין חלוקות ובו הספרמטידים מקבלים את המורפולוגיה הסופית והופכים לתאי זרע האופייניים- בעלי ראש וזנב. הראש, מכיל את הגרעין עם המטען הגנטי ואת שלפוחית האקרזום. הזנב מכיל את ה-midpiece ובו מיטוכונדריה המסודרות בצורת סליל (Senger, 2003). תאי זרע שהשלימו את המורפוגנזה, מופרשים לחלל הבין צינורי ונעים ליותרת האשך, האפידידימיס.

האפידידימיס מורכב מראש, גוף וזנב. במהלך המעבר של תאי הזרע באפידידימיס, הם עוברים שינויים מורפולוגיים ופונקציונלים כגון רכישת תנועה ופוטנציאל הפריה (França et al., 2005; Senger, 2003). תאי הזרע הבשלים מאוחסנים בזנב האפידידימיס עד לשלב הפליטה. מיד לאחר הפליטה, תאי הזרע עדיין אינם בעלי יכולת הפריה. כאשר הזרע מגיע למערכת המין הנקבית, הוא עובר הכשרה (קפסיטציה), תהליך שבלעדיו תא זרע לא יוכל להפרות את הביצית. במהלך הקפסיטציה עובר תא הזרע שינויים ובניהם שינויי ממברנה בראש התא וקבלת תנועה היפראקטיבית בזנב (de Lamirande et al., 1997). רק תאי זרע שעברו קפסיטציה הם בעלי יכולת להיקשר ל zona pellucida (ZP) של הביצית ולעבור ריאקציית אקרזום (AR). במהלך AR יש שחרור אנזימים הנמצאים בשלפוחית האקרזום שמחוררים את ה ZP של הביצית, מה שמוביל לאיחוי ממברנות של תא הזרע והביצית. קפסיטציה ו AR הינם תהליכים הכרחיים בכדי שתתרחש הפריה. ניתן לחקות *in-vitro* את תהליך הקפסיטציה הטבעי, ע"י תנאי תרבית ספציפיים (John J. Parrish, 2014). לאחר קפסיטציה *in-vitro*, ניתן להשרות AR *in-vitro* ע"י משרנים פיסיולוגיים כמו ההורמון פרוגסטרון או משרנים לא-פיסיולוגיים כמו קלציום יונופור (Parrish et al., 1988). כאשר AR מושרת ללא סיבה ידועה, זוהי AR ספונטנית (Abou-haila & Tulsiani, 2009). תא זרע שעבר AR ספונטנית אינו יכול להיקשר ל ZP של הביצית ולהפרות אותה.

## אטרזין ומערכת הרבייה

כפי שהוזכר, אחת המערכות שמושפעות מחשיפה ל EDCs היא מערכת הרבייה, ובפרט מערכת המין הזכרית. מספר מחקרים מראים כי חשיפה לאטרזין פוגעת במערכת הרבייה בכלל ובתאי הזרע בפרט. חשיפה של דו חיים לאטרזין גורמת לפגיעה בהתפתחות אברי המין, תופעת הרמפרודיטיזם ואפילו התפתחות ביציות בזכרים של צפרדעים, גם בריכוזים נמוכים של אטרזין, הרלוונטיים מבחינה אקולוגית ( Hayes et al., 2002, 2003 ). תופעות של ירידה ברבייה נצפו בדגים כתוצאה מחשיפה לאטרזין בריכוזים שבין  $0.5-50 \mu\text{g/L}$  ( Tillitt et al., 2010 ). מחקרים בחולדות הראו כי הזנה ב-  $120 \text{ מ"ג/ק"ג}$  של אטרזין גרמה לדלדול נוגדי חמצון באשך ובאפידידימיס ולכן משרה סטרס חמצוני ( Abarikwu et al. 2010 ). בחשיפה *in-vitro* לאטרזין בריכוז  $50-500 \mu\text{M}$ , נצפתה ירידה בתנועה פרוגרסיבית ( Betancourt et al., 2006 ) ובריכוז  $8-40 \mu\text{M}$  עלייה ב AR ספונטנית בתאי זרע שמקורם מחזיר ( Maravilla-Galván et al., 2009 ). השינויים בתנועתיות הזרע כנראה מעידים על כך שאטרזין גורם לשינויים במיטוכונדריה, האחראית ליצירת אנרגיה לצורך תנועה ( Hase et al., 2008 ; Betancourt et al., 2006 ). מחקרים מהשנים האחרונות, בניהם מחקר שיצא ממעבדתנו, הראה כי חשיפה ישירה של תאי זרע של בקר לריכוזים אקולוגיים של ATZ ( $0.1-1 \mu\text{M}$ ) ו DACT ( $1-10 \mu\text{M}$ ) פוגעת בממברנות של תאי הזרע וכך באיכותם במהלך שלבי ספרמטוגנזה, מעברם, איחסוןם באפידידימיס ובזרמה. בין ההשפעות שנצפו היו ירידה בחיוניות, שיבוש AR והיפרפולריזיה של ממברנות המיטוכונדריה בתאי הזרע. השפעת המטבוליט DACT נמצאה אף יותר חמורה מ ATZ עצמו. תאי הזרע שהיו הרגישים ביותר להשפעות מקורם מזנב האפידידימיס, כלומר תאי זרע בשלים ומוכנים לפליטה ( Komsky-Elbaz & Roth, 2016 ). פגיעה באיכות תאי הזרע נצפתה במחקר נוסף בו עכברים הוזנו במינונים נמוכים של ATZ ( $0.1, 1, 10 \text{ מ"ג/ק"ג}$ ). בכל הריכוזים הנ"ל נצפתה ירידה בתנועתיות פרוגרסיבית, בשלמות הממברנות ותפקוד המיטוכונדריה של תאי הזרע ( Saalfeld et al., 2018 ). כל אלו יכולים להוביל לפגיעה ביכולת ההפריה ופוריות הזכר.

כיום, רוב הרבייה בענף הבקר מתבצעת ע"י הזרעה בזרמה הנשמרת בהקפאה ( Funk, 2006 ). שימור בהקפאה מאפשר השבחה וסלקציה להגדלת הייצור בחיות משק. בכדי לבצע הקפאה ישנו צורך בהוספה של חומרים המגנים על התאים מפני נזקי ההקפאה. למשל, הוספה של גליצרול לזרמה עוזרת לשמור על יציבות ממברנות תאי הזרע במהלך ההקפאה ( Thomas, 1998 ).

פגיעה בממברנות תגרום לנזק לממברנות התא, האקרזום והמיטוכונדריה. נזק לממברנות אלו יפגע בחיות התא או ביכולתו להפרות בעתיד. ידוע, כי תהליך ההקפאה מפחית בכ 50% את חיות תאי הזרע ואת תנועתיותם כתוצאה מפגיעה במיטוכונדריה וע"י כך את שיעורי ההפריה בהזרעה מלאכותית ( Thomas, 1998; Watson, 1995 ). נוסף על כך, חשיפה של תאי זרע לחומרים שונים לפני או אחרי ההקפאה יכולים להשפיע על עמידות לתהליך ההקפאה ועל פוטנציאל הפוריות. למשל, הוספה שלרזומרין המשמש כנוגד חמצון לזרמת חזיר לאחר הקפאה

העלתה חיות, שלמות אקרוזום ואחוזי פוריות ( Malo et al., 2010 ). ניתן להניח כי חשיפת זרמה לרעלנים סביבתיים או EDC's מהסביבה תפגע בעמידותם להקפאה, איכותם וביכולת ההפריה שלהם.

### **המחקר הנוכחי יתמקד בהשפעת אטרזין ו DACT על שלמות הממברנות של תאי זרע מזרמת פריס במהלך או אחרי תהליך ההקפאה.**

הייחודיות במחקר זה מתבטאת בכמה אספקטים :

1. התמקדות בתאי זרע שסיימו תהליך ספרמטוגנזה- בתאי הזרע עצמם ולא בהשפעה על האשך ;
2. ריכוזי אטרזין שנבחנו בניסוי הינם רלוונטיים מבחינה סביבתית ;
3. נבדקה גם את השפעתו של המטבוליט , DACT , על הזרמה ;
4. בוצעה חשיפה ישירה של זרמה לאטרזין או DACT ולא דרך הזנה הכוללת חומרים אלו.
5. נבדקה ההשפעה של אטרזין או DACT על תהליך ההקפאה של זרמת פריס, תהליך שחשוב ורלוונטי מאוד לתחום הבקר לחלב, מכיוון שכיום רוב הרבייה בבקר לחלב נעשית ע"י זרמה קפואה.

### **מטרות העבודה**

**המטרה הכללית של המחקר הינה לבחון את ההשפעה של חשיפת תאי זרע ל ATZ או DACT בריכוזים רלוונטיים סביבתית במהלך תהליך ההקפאה ולאחריו, על עמידות להקפאה של זרמה ממקור בקר. היעדים :**

1. לבחון כיצד תושפע עמידות תאי הזרע בתהליך ההקפאה בעקבות חשיפה לאטרזין או המטבוליט DACT. מצב זה מדמה תאי הזרע בגוף הפר הנחשף לאטרזין שעובר פירוק בכבד למטבוליטים שונים ובניהם למטבוליט DACT.
2. לבחון כיצד יושפעו תאי זרע מופשרים בעקבות חשיפה לאטרזין או המטבוליט DACT. מצב זה מדמה תאי זרע מופשרים המוזרעים לגוף הפרה שנחשפה לאטרזין שעובר פירוק בכבד למטבוליטים שונים ובניהם DACT.

### **השערות העבודה**

עבודה קודמת שנעשתה במעבדתנו הראתה כי חשיפה לאטרזין או DACT בריכוזים הרלוונטיים מבחינה סביבתית פוגעת באיכות תאי הזרע ( Komsky-Elbaz & Roth, 2016 ).

ההשערות שעולות :

1. חשיפה של תאי הזרע לאטרזין או ל DACT במהלך הקפאה תפגע בעמידותם בתהליך ההקפאה ובהתאם לכך באיכותם.
2. חשיפה של תאי זרע מופשרים לאטרזין או ל DACT תפגע באיכותם.

בשני המקרים, נצפה לירידה בחיות, עליה ב AR ספונטנית, ירידה ב AR מושרית ופגיעה בפוטנציאל ממברנת המיטוכונדריה, העלולה להוביל לעקה חמצונית של התא. כל אלו עלולים להוריד את פוטנציאל הפוריות ( מעבר למטרות מחקר זה ).



## 2. חומרים ושיטות

### 2.1 חומרים וראגנטים

כל החומרים נרכשו מחברת Sigma (רחובות, ישראל) אלא אם צוין אחרת.

אטרזין, (ATZ; lot #421-55A; 2-chloro-4-(ethylamine)-6-(isopropylamine)-s-triazine, רמת נקיון: 98.9%) ו-diaminochlorotriazine (DACT; lot# 404-99A; 2-chloro-4,6-diamino-1,3,5-triazine, רמת ניקיון: 96.7%) נרכשו מ Chem Service Inc. (West Chester, פנסילבניה, ארה"ב). לצורך העבודה הוכנו תמיסות מלאי של ATZ ו DACT בריכוז 10 mM בממס dimethyl sulfoxide (DMSO) לפי הוראות היצרן (Chem Service Inc.).

לצורך הערכת שלמות ממברנות תאי הזרע השתמשנו בצבענים פלורוסנטים הבאים:

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI): נקשר ל dsDNA, צובע את גרעיני התאים בכחול.

Propidium iodide (PI): להערכת שלמות ממברנת התא, צובע גרעיני תאים בעלי ממברנת תא פגומה באדום.

*Pisum sativum agglutinin* (FITC-PSA): להערכת שלמות ממברנת אקרזיום, צובע בירוק אקרזיום פגום או שאריות אקרזיום שעבר AR.

5, 5',6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide (ENZOBiochem; JC-1, ניו יורק, ארה"ב): להערכת פוטנציאל ממברנת מיטוכונדריה ( $\Delta\Psi_m$ ). צובע מיטוכונדריה עם פוטנציאל ממברנה גבוה (אדום) ונמוך (ירוק).

### 2.2 הכנת זרמה

כל הניסויים בוצעו על פי תקנים ישראלים לרווחת חיות משק משנת 1994.

זרמת פרים סופקה על ידי "שיאון", החברה להזרעה מלאכותית וטיפוח בבקר (חפץ חיים, ישראל). לצורך הניסויים השתמשנו רק בזרמה שהכילה לפחות 80% תאי זרע בעלי כושר תנועתיות. איסוף הזרמה נעשה בעזרת ואגינה מלאכותית. תאי זרע נשטפו בעזרת צנטריפוגה (600g במשך 8 דקות ב  $25^{\circ}\text{C}$ ) בבופר NKM (110 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM MOPS, 3-N-morpholino propanesulfonic acid, pH 7.4) שאינו מעודד קפסיטציה. לאחר השטיפה, תאי זרע הושארו לביצוע "swim-up" במשך 20 דקות בבופר NKM. טכניקה זו מאפשרת לדגום שיעור גבוה של תאים נעים. תאים בעלי כושר תנועתיות נאספו להמשך הניסויים. התאים שנשטפו נשמרו ב  $39^{\circ}\text{C}$  עד לשימוש.

### 2.3 הקפאת זרמה

בשלב הראשון, נלקחה דגימה של  $200 \mu\text{L}$  של תאי זרע למבחנות פלסטיק (  $\text{T-311 Cryovial}$ ®, סימפורט, קנדה ) המיועדות להקפאה בנפח של  $1.5 \text{ mL}$ . ההקפאה בוצעה לאחר הוספה של  $200 \mu\text{L}$  מדיום הקפאה, AndroMed freezing medium ( Minibut ). תאי הזרע בתוספת מדיום הקפאה עורבבו בזהירות על ידי פיפטציה. הדוגמאות קוררו במקרר תוך כדי טלטול ידני במשך 3 שעות ב  $4^\circ \text{C}$ . לאחר מכן, בוצע תהליך ההקפאה בהדרגתיות בכדי למנוע עקת קור לתאי הזרע. בשלב הראשון, הדוגמאות הועברו לתהליך הקפאה על אדי חנקן נוזלי בגובה של כ  $15 \text{ cm}$  מעל מיכל חנקן ב  $130-140^\circ \text{C}$  (-) למשך 10 דקות. בשלב השני, הדוגמאות הועברו לתוך חנקן נוזלי במיכל חנקן נוזלי ב  $196^\circ \text{C}$  (-) למשך 24 שעות לפחות לפני ההערכה. דוגמאות זרמה קפואות הופשרו על ידי העברתם לאמבט מים בטמפרטורת  $37^\circ \text{C}$  למשך דקה.

### 2.4 תהליך קפסיטציה בתאי הזרע

קפסיטציה *in-vitro* הושרתה כפי שתואר בעבודות קודמות ( Parrish et al., 1999; Winer 1988 ). בקצרה, על מנת להשרות קפסיטציה, דוגמאות זרמה מופשרות עברו סירכוז. משקע תאי הזרע הורחף והודגר בבופר mTALP ( modified Tyrode solution המכיל  $100 \text{ mM NaCl}$ ,  $3.1 \text{ mM KCl}$ ,  $1.5 \text{ mM MgCl}_2$ ,  $0.92 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $25 \text{ mM sodium lactate}$ ,  $10 \text{ IU/mL}$ ,  $0.1 \text{ mM sodium pyruvate}$ ,  $20 \text{ mM HEPES [pH 7.4]}$ ,  $\text{mM NaHCO}_3$ ,  $20 \mu\text{g/mL heparin}$ ,  $2 \text{ mM CaCl}_2$ ,  $1 \text{ mg/mL BSA}$ , penicillin ). התאים הודגרו ב mTALP למשך 4 שעות ב  $39^\circ \text{C}$  עם  $5\% \text{ CO}_2$ . בכדי לאמת שתאי הזרע עברו תהליך קפסיטציה, בחנו את יכולת תאי הזרע לעבור AR, שהשרינו על ידי הוספה של קלציום יונופור (  $\text{Ca}^{++}$  ionophore A23187 ) בריכוז  $20 \mu\text{M}$  למשך 20 דקות נוספות של הדגרה.

### 2.5 טיפולים

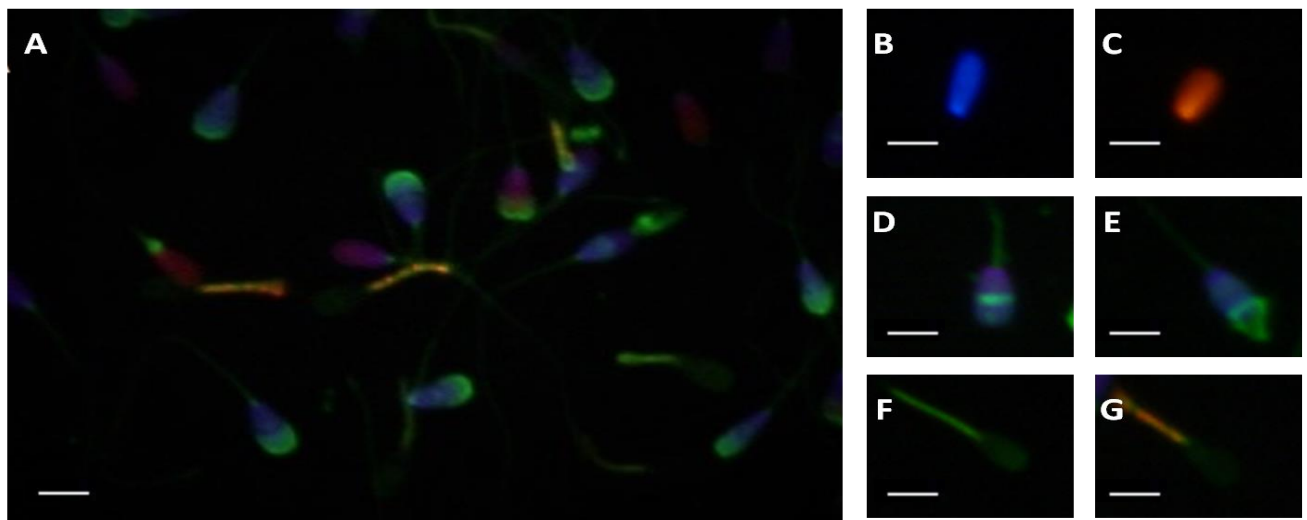
הניסויים בוצעו בנפרד עבור ATZ ו DACT. תאי הזרע נחשפו ל ATZ בריכוז סופי של  $0.1$  או  $1 \mu\text{M}$ , או ל DACT בריכוז סופי של  $1$  או  $10 \mu\text{M}$ . ריכוזים אלו נבחרו בהתאם למידע הידוע היטב ממודלים ניסויים במחקרים קודמים ( Forgacs et al. 2013; Komsky-Elbaz & Roth 2016 ). לפי הוראות היצרן ( Chem Service Inc. ), ATZ ו DACT הומסו בממס DMSO (  $0.01\%$  הריכוז המירבי ). הניסויים כללו שתי קבוצות ביקורת: 1. קבוצה של תאי זרע ללא חשיפה ל DMSO/DACT/ATZ 2. קבוצה של תאי זרע שנחשפו לממס DMSO בריכוז  $0.01\%$ , בכדי לשלול את

השפעתו על תאי הזרע בפרמטרים שנבדקו. בריכוזים הסופיים שהשתמשנו בהם בניסוי הנוכחי, הממס DMSO לא נמצא בעל השפעה מזיקה על חיוניות תאי הזרע. התאים הודגרו בmTALP עם או ללא ATZ או DACT ב  $39^{\circ}\text{C}$  תחת אטמוספירה עם  $5\% \text{CO}_2$  באוויר. הערכת תאי הזרע בוצעה לאחר 0 (זרמה טרייה וזרמה מופשרת) ו 4 שעות של הדגרה, ולאחר 20 דקות נוספות של הדגרה בתוספת של קלציום יונופור בריכוז  $20 \mu\text{M}$  ששימשה כביקורת חיובית ל AR.

## 2.6 הערכה פלואורסנטית סימולטנית של ממברנות תאי זרע

הערכה פלואורסנטית סימולטנית של ממברנות תאי זרע (ממברנת תא, אקרוזום ומיטוכונדריה) בוצעה כפי שתואר בעבודה קודמת ממעבדתנו (Komsky-Elbaz & Roth 2016). בקצרה, למשקעי תאי זרע הוסף בופר mTALP עד לריכוז סופי של  $25 \times 10^6$  תאים/מ"ל. לאחר מכן, דגימה בנפח  $150 \mu\text{L}$  של תאי זרע מהולים בבופר mTALP עברה סירכוז בצנטריפוגה מחוממת. למשקע הוספו  $133 \mu\text{L}$  NKM ו- $17 \mu\text{L}$  DAPI מתמיסה בריכוז  $0.1 \text{mg/mL}$  והדוגמא הודגרה במשך 10 דקות ב  $37^{\circ}\text{C}$ . לאחר ההדגרה, הדוגמא עברה סרכוז ו  $100 \mu\text{L}$  בופר mTALP הוספו למשקע התאים. בנוסף,  $3 \mu\text{L}$  של PI ( $0.5 \text{mg/mL}$ ),  $2 \mu\text{L}$  של JC-1 ( $153 \mu\text{M}$ ) ו  $50 \mu\text{L}$  של FITC-PSA ( $1 \text{mg/mL}$ ) הוספו. הדוגמא עברה הדגרה נוספת במשך 10 דקות ב  $37^{\circ}\text{C}$ , סורכזה ולמשקע הוספו  $40 \mu\text{L}$  של mTALP.

מתוך המבחנה נלקחו  $10 \mu\text{L}$  של הדוגמא הונחו על גבי זכוכית נושאת, כוסו בזכוכית מכסה ועברו מיד להערכה באמצעות מיקרוסקופ פלורסנטי (NikonEclipse, TE-2000-u, טוקיו, יפן) בעזרת תוכנת NisElements (Nikon, טוקיו, יפן) והמצויד במצלמה דיגיטלית (Nikon; DXM1200F, טוקיו, יפן) עם ערור ב  $450\text{--}490 \text{nm}$  ופליטה ב  $515\text{--}565 \text{nm}$  ושימוש בפילטר משולש. לפחות 200 תאים נספרו בכל קבוצת ניסוי וסווגו בהתאם לפלואורסנציה שנפלטת מכל צבען. השפעת הטיפולים על התאים נבדקה באמצעות תוכנה Image-j (גרסה 1.47v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, ארה"ב) וספירה ידנית.



**איור 1. צילום בעזרת מיקרוסקופ פלואורסנטי בהגדלה X400 של תאי זרע צבועים ב-4 סמנים פלואורסנטיים. A-** צביעה סימולטנית בעזרת 4 סמנים פלואורסנטיים: FITC-PSA, JC-1, DAPI, PI. **B-** גרעין תא זרע צבוע כחול בסמן DAPI. **C-** גרעין תא זרע בעל ממברנה פגומה צבוע אדום בסמן PI. **D-** תא זרע עם אקרוזום פגום ובעל שארית אקרוטוריאליית של האקרוזום צבועה ירוק בסמן FITC-PSA. **E-** תא זרע העובר ראקציית אקרוזום עם שלפוחית אקרוזום נשפכת. **F-** תא זרע עם פוטנציאל ממברנת מיטוכונדריה נמוך צבוע ירוק בסמן JC-1. **G-** תא זרע עם פוטנציאל ממברנת מיטוכונדריה גבוה צבוע אדום בסמן JC-1. סרגל קנה מידה =  $10 \mu\text{M}$ .

## 2.7 תוכנית עבודה

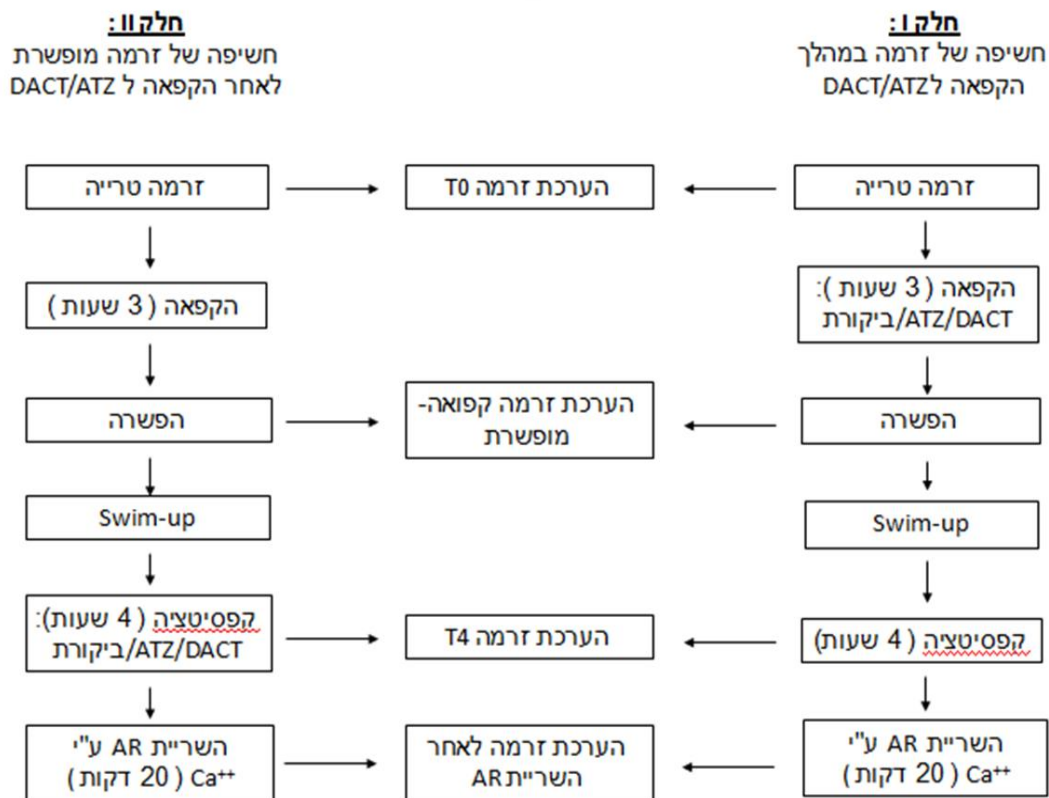
איור סכמטי של תכנית העבודה מוצג באיור 1.

בכל חלק בניסוי, שלוש דוגמאות זרמה משלושה פרים שונים נאספו לכל אחד משני חלקי הניסוי מ"שיאון", החברה להזרעה מלאכותית וטיפוח בבקר. בחלק I, דגימות נלקחו להערכה לפני הטיפול (T0) והדוגמאות הועברו מיידית לשימור בהקפאה בנוכחות או היעדר ATZ (0.1 או  $1 \mu\text{M}$ ) או DACT (1 או  $10 \mu\text{M}$ ) במשך 3 שעות בטמפרטורת  $4^\circ\text{C}$  ולאחר מכן נשמרו בחנקן נוזלי ב  $196^\circ\text{C}$  (-). לאחר ההקפאה, הדוגמאות הופשרו ודגימות נלקחו להערכה (זרמה קפואה-מופשרת). שאר הדוגמאות נשטפו, ורק תאי זרע בעלי תנועתיות, חיוניים, לאחר תהליך "swim up" הועברו לקפסיטציה למשך 4 שעות ב  $37^\circ\text{C}$ . לאחר 4 שעות, הדוגמאות נלקחו להערכה נוספת (T4) והושרתה AR במשך 20 דקות נוספות על ידי הוספת קלציום ינופור. לאחר מכן, בוצעה הערכה לשלמות האקרוזום.

בחלק II, דגימות נלקחו להערכה (T0) לפני הטיפול והדוגמאות הועברו מיידית לשימור בהקפאה למשך 3 שעות בטמפרטורת  $4^\circ\text{C}$  ונשמרו בחנקן נוזלי ב  $196^\circ\text{C}$  (-). לאחר ההקפאה, הדוגמאות הופשרו ודגימות נלקחו להערכה (זרמה קפואה-מופשרת). שאר הדוגמאות נשטפו, ורק תאי זרע בעלי תנועתיות, חיוניים לאחר תהליך "swim up"

הועברו לקפסיטציה במשך 4 שעות ב  $37^{\circ}\text{C}$ , בנוכחות או היעדר ATZ (0.1 או  $1\ \mu\text{M}$ ) או DACT (1 או  $10\ \mu\text{M}$ ).

לאחר 4 שעות, הדוגמאות נלקחו להערכה נוספת (T4) והושרתה AR במשך 20 דקות נוספות על ידי הוספת קלציום יונופור. לאחר מכן, בוצעה הערכה לשלמות האקרזום.



**איור 2. איור סכמטי של תוכנית העבודה.** הניסוי כלל שני חלקים: שלוש דוגמאות זרמה נאספו לכל חלק של ניסוי. בחלק I, תאי הזרע הוערכו לאחר שנחשפו ל ATZ ( $1\ \mu\text{M}$  או  $0.1\ \mu\text{M}$ ) או DACT ( $10\ \mu\text{M}$  או 1) במהלך ההקפאה. בחלק II, תאי זרע שהוקפאו והופשרו הוערכו לאחר חשיפתם ל ATZ ( $1\ \mu\text{M}$  או  $0.1\ \mu\text{M}$ ) או DACT ( $10\ \mu\text{M}$  או 1). תאי הזרע הוערכו בתחילת הניסוי (T0), לאחר 4 שעות (T4) של קפסיטציה ולאחר 20 דקות נוספות של הדגרה בתוספת קלציום יונופור.

## 2.8 ניתוח סטטיסטי

ניתוח סטטיסטי בוצע בנפרד עבור ניסויים עם ATZ ו DACT ולא כלל הצלבת השוואות בין התרכובות או הקבוצות השונות שנבחנו בניסויים. כל הערכים ששימשו לסיווג תאי הזרע בצביעות השונות הומרו לאחוזים ונורמלו ל T0 (זמן 0), בחלק I לפני הטיפול ובחלק II לפני תהליך ההקפאה בטרם האנליזה. הנתונים עברו אנליזה באמצעות התוכנה JMP-13 (SAS Institute Inc., Cary, 2004, NC, ארה"ב). כמו כן, בוצע מודל ANOVA ובו הריכוזים,

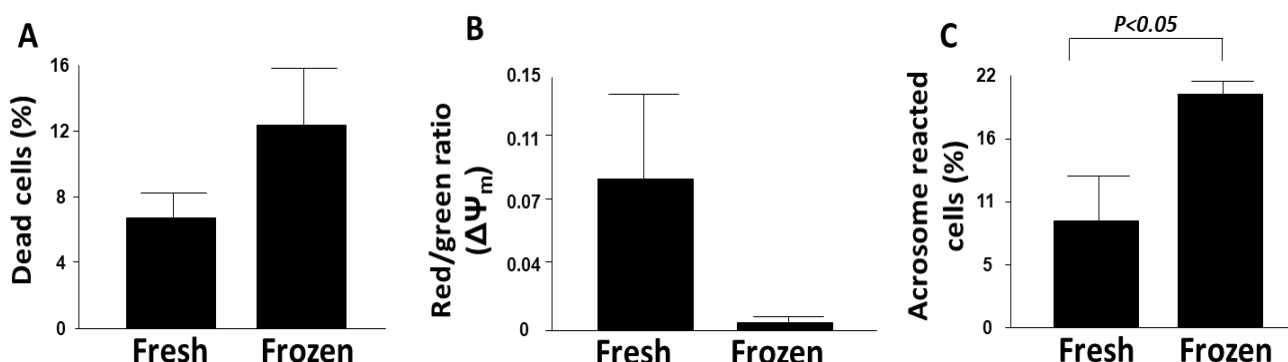
הזמן והאינטראקציות בניהם היו כהשפעות קבועות והפר כהשפעה אקראית. לאחר מכן ביצענו השוואות Posthoc בעזרת מבחן Contrast t-test ( LS-MEANS Student's t-test ). הנתונים מוצגים כממוצע  $\pm$  סטיית תקן של הממוצעים. עבור כל הנתונים, רמת מובהקות של  $P < 0.05$  נחשבה כמובהקות סטטיסטית. ערכי מובהקות בין 0.05 ו-0.1 דווחו כנטייה למובהקות. בכל חלק משני חלקי הניסוי השתמשנו בזרמה מ 3 פרים.

### 3. תוצאות

#### 3.1 השפעתו של תהליך שימור בהקפאה על הזרמה

בתהליך ההקפאה נמצא הפרש של כ 6% בכמות תאי הזרע המתים בהשוואה לזרמה טרייה (  $12.3 \pm 3.5\%$  ו- 6.7  $\pm 1.5\%$ , בהתאמה; גרף 1A). נתון זה לא היה בעל מובהקות סטטיסטית, אם זאת לא ניתן להתעלם מהחשיבות הפיזיולוגית.

פוטנציאל ממברנת מיטוכונדריה ( $\Delta\Psi_m$ ) נמוך יותר נצפה לאחר הקפאה בהשוואה לזרמה טרייה (  $0.01 \pm 0.003$  ו-  $0.1 \pm 0.01$ , בהתאמה; גרף 1B) עם נטייה למובהקות ( $P < 0.1$ ). ריאקצית אקרזום ספונטנית התרחשה באחוזים גבוהים משמעותית לאחר הקפאה, בהשוואה לזרמה טרייה (  $20.4 \pm 1.1\%$  ו-  $9.3 \pm 3.9\%$ , בהתאמה,  $P < 0.05$ ; גרף 1C).

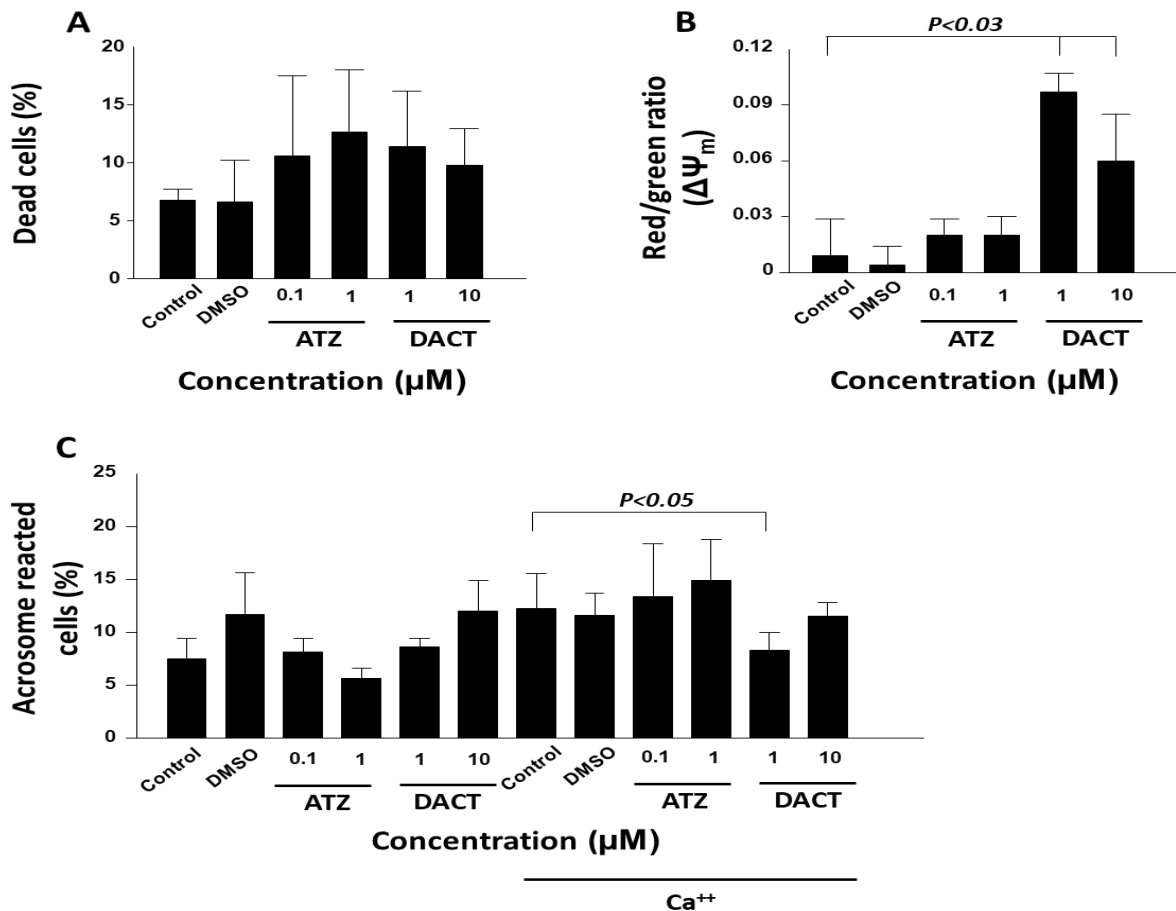


גרף 1. השפעת תהליך ההקפאה על תאי הזרע. הזרמה הוקפאה לאחר הוספה של מדיום הקפאה AndroMed (Minibut) ביחס של 1:1. תהליך ההקפאה בוצע בשלושה שלבים: קירור במשך 3 שעות ב  $4^{\circ}\text{C}$ , הקפאה באדי חנקן נוזלי ב  $130-140^{\circ}\text{C}$  (-) למשך 10 דקות והקפאה בחנקן נוזלי ב  $196^{\circ}\text{C}$  (-) למשך 24 שעות לפחות לפני ההערכה. הזרמה הופשרה ב  $37^{\circ}\text{C}$  טרם הערכתה. A- חיות תאי הזרע נבדקה בעזרת סמן פלואורסנטי PI. B- פוטנציאל ממברנת מיטוכונדריה ( $\Delta\Psi_m$ ) נבדק בעזרת סמן פלואורסנטי JC-1 ומוצג כיחס ממוצע של תאי זרע הצבועים אדום (פוטנציאל גבוה) / ירוק (פוטנציאל נמוך). C- AR נבדקה בעזרת סמן פלואורסנטי FITC-PSA. הנתונים מוצגים כאחוז ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן של התאים המוערכים וחושבו עבור 3 דוגמאות ולפחות 200 תאים בכל קבוצת ניסוי.

### 3.2 השפעת חשיפה ל ATZ או ל DACT במהלך ההקפאה על הזרמה

חשיפת זרמה ל ATZ (0.1 או 1  $\mu\text{M}$ ) או ל DACT (1 או 10  $\mu\text{M}$ ) במהלך ההקפאה העלתה את כמות תאי הזרע המתים (10.6  $\pm$  6.9%, 12.6  $\pm$  5.4%, 11.4  $\pm$  4.7% ו- 9.8  $\pm$  3.2%, בהתאמה; גרף 2A) בהשוואה לביקורת (6.8  $\pm$  0.9%), עם נטייה למובהקות ( $P < 0.09$ ).

חשיפה ל DACT בריכוז 1 או 10  $\mu\text{M}$  העלתה משמעותית את ה- $\Delta\Psi_m$  של התאי הזרע שנחשפו במהלך ההקפאה בהשוואה לתאי הזרע שלא נחשפו (0.1  $\pm$  0.02 או 0.1  $\pm$  0.01 לעומת 0.01  $\pm$  0.01, בהתאמה,  $P < 0.03$ ; גרף 2B). בנוסף, AR ספונטנית לא הושפעה משמעותית כתוצאה מחשיפה ל ATZ או DACT במהלך ההקפאה (גרף 2C). לעומת זאת, AR מושרית ע"י קלציום יונופור הייתה נמוכה יותר לאחר חשיפה ל DACT בריכוז 1  $\mu\text{M}$  בהשוואה לביקורת (8.3  $\pm$  1.7% לעומת 12.2  $\pm$  3.3%, בהתאמה  $P < 0.05$ ; גרף 2C).



גרף 2. השפעת חשיפה ל ATZ או ל DACT במהלך ההקפאה על הזרמה. תאי הזרע נחשפו במהלך תהליך ההקפאה ל ATZ בריכוז 0.1 או 1  $\mu\text{M}$  או ל DACT בריכוז 1 או 10  $\mu\text{M}$ , שהומסו בממס DMSO. לאחר ההפשרה תאי הזרע הודגרו במשך 4 שעות. השריית AR נעשתה בעזרת הדגרה של תאי הזרע עם קלציום יונופור בריכוז 20  $\mu\text{M}$  למשך 20 דקות נוספות. A- חיות תאי הזרע נבדקה בעזרת סמן פלואורסנטי PI. B- פוטנציאל ממברנת

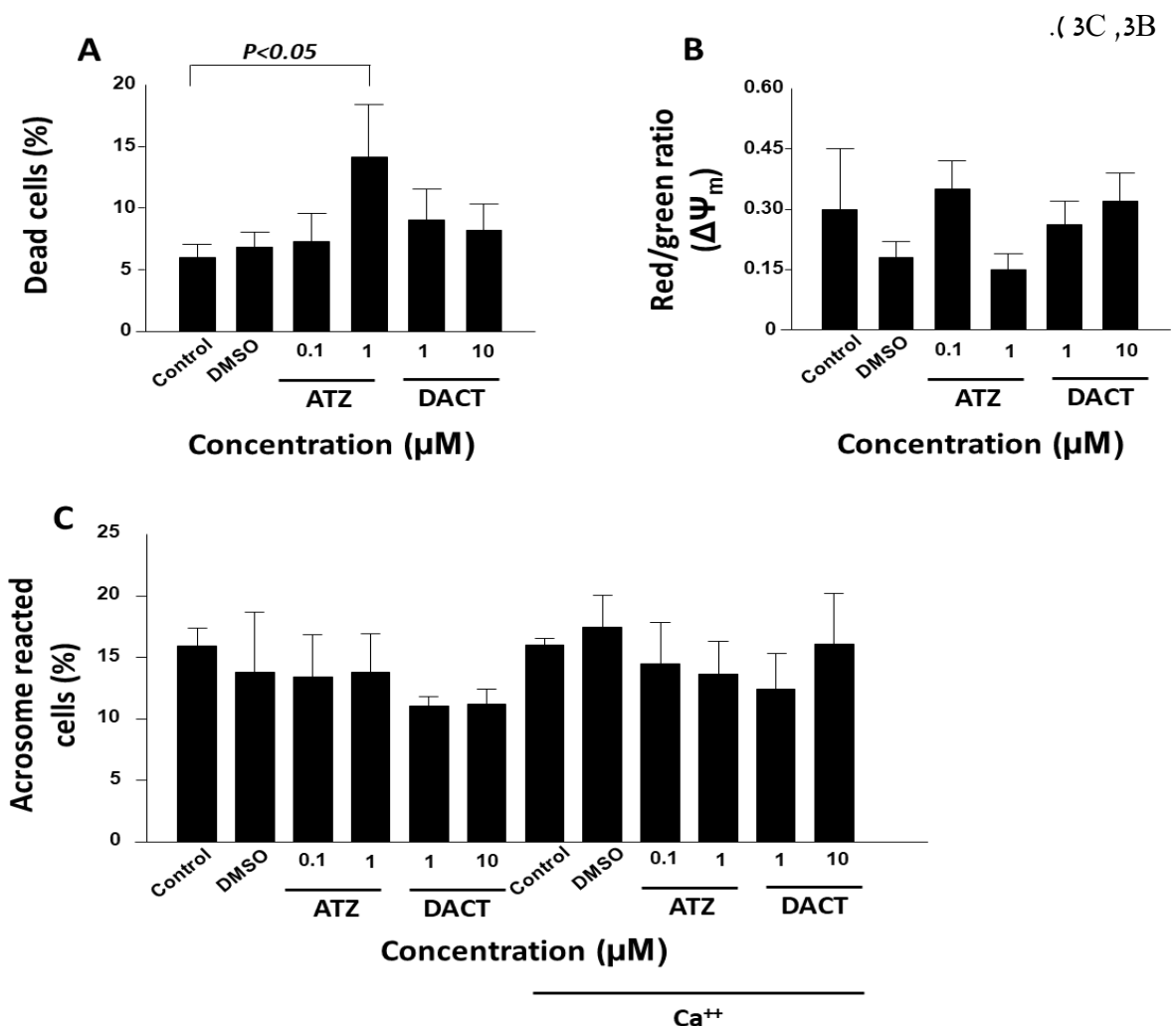


מיטוכונדריה ( $\Delta\Psi_m$ ) נבדק בעזרת סמן פלואורסנטי JC-1 ומוצג כיחס ממוצע של תאי זרע הצבועים אדום (פוטנציאל גבוה) / ירוק (פוטנציאל נמוך). AR -C נבדקה בעזרת סמן פלואורסנטי FITC-PSA. הנתונים מוצגים כאחוז ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן של התאים המוערכים וחושבו עבור 3 דוגמאות. לפחות 200 תאים נבדקו בכל קבוצת ניסוי.

### 3.3 השפעת חשיפה ל ATZ או ל DACT לאחר הקפאה והפשרה על הזרמה

חשיפת זרמה שהוקפאה והופשרה ל ATZ בריכוז  $1 \mu\text{M}$  העלתה את כמות תאי זרע המתים בהשוואה לביקורת ( $14.1 \pm 4.3\%$  לעומת  $6.1 \pm 1\%$ , בהתאמה,  $P < 0.05$ ; גרף 3A).

לא נצפתה השפעה משמעותית על AR ו- $\Delta\Psi_m$  לאחר חשיפה ל ATZ או DACT על זרמה קפואה שהופשרה (גרף



גרף 3. השפעת חשיפה ל ATZ או ל DACT לאחר הקפאה והפשרה על הזרמה. זרמה שנשמרה בחנקן נוזלי למשך 24 שעות לפחות והופשרה. לאחר ההפשרה תאי הזרע הודגרו במשך 4 שעות עם ATZ בריכוז  $0.1 \mu\text{M}$  או  $1 \mu\text{M}$

או עם DACT בריכוז 1 או  $10 \mu\text{M}$ , שהומסו בממס DMSO. השריית AR נעשתה בעזרת הדגרה של תאי הזרע עם קלציום יונופור בריכוז  $20 \mu\text{M}$  למשך 20 דקות נוספות. **A** - חיות תאי הזרע נבדקה בעזרת סמן פלואורסנטי PI. **B** - פוטנציאל ממברנת מיטוכונדריה ( $\Delta\Psi_m$ ) נבדק בעזרת סמן פלואורסנטי JC-1 ומוצג כיחס ממוצע של תאי זרע הצבועים אדום (פוטנציאל גבוה) / ירוק (פוטנציאל נמוך). **C** - AR נבדקה בעזרת סמן פלואורסנטי FITC-PSA. הנתונים מוצגים כאחוז ממוצע  $\pm$  שגיאת תקן של התאים המוערכים וחושבו עבור 3 דוגמאות. לפחות 200 תאים נבדקו בכל קבוצת ניסוי.

## 4. דיון

במחקר הנוכחי בחנו האם קוטל העשבים ATZ והמטבוליט הראשי שלו DACT, בריכוזים רלוונטיים אקולוגית, הינם בעלי השפעה מזיקה על איכות תאי הזרע ממקור בקר, בנוסף לתהליך שימור בהקפאה עצמו ( כלומר, אפקט מתווסף). תהליך ההקפאה כשלעצמו ידוע כגורם נזק לממברנות תאי הזרע ( Gürlér et al. 2016 ). בבני אדם, חומרי הדברה ידועים כפוגעים ביכולת ההפריה של תאי זרע *in-vitro* ( Schuppe & Schill 2004 ). חשיפת תאי זרע לכימיקלים סביבתיים יכולה לקרות בזמן תהליך קפסיטציה במערכת מין הנקבית. כהוכחה לכך, EDCs כגון דיאוקסינים נמצאו בנוזלי מערכת מין הנקבית, בריר צוואר הרחם ובנוזל הזיקיק ( Tsutsumi et al. 1998 ). בהתחשב בכך, במחקר הנוכחי, רק ATZ בריכוז  $1 \mu\text{M}$  היה בעל השפעה שלילית על הישרדות תאי הזרע לאחר ההפשרה. ייתכן וממצא זה בעל רלוונטיות כאשר EDCs נמצאים במערכת מין הנקבית בריכוזים משמעותיים. למרות זאת, השפעת חומרי הדברה על עמידות תאי זרע להקפאה אינה ידוע.

בזמן תהליך ההקפאה, תאי זרע חשופים לשלל גורמי סטרס ובניהם עקת קור וסטרס אוסמוטי או חמצוני ( Yoon et al. 2015 ). כפי שידוע כבר, שימור בהקפאה פוגע בחיות תאי זרע, מעודד תגובת AR ספונטנית, משנה פעילות מיטוכונדריה ויכול להוביל לירידה בשרידות, תנועתיות ותפקוד תאי זרע ( Treulen et al. 2018 ). הממצאים במחקר הנוכחי קושרים שינויים אלו בפגיעה בממברנות תא הזרע, הידועות כאתר עיקרי לפגיעה בעקבות ההקפאה ( Sieme et al. 2015 ). לאור החשיבות הפיסילוגית והמגמה שהתקבלה, ממצאים אלה צריכים אישוש על מדגם גדול יותר.

המבנה והתכונות הביופיזיקליות של ממברנת הפלסמה נמצאים בקורלציה לרגישות תאי הזרע לתהליכי הקפאה והפשרה ( Yeste, 2016; Bailey, 2000 ). בנוסף לכך, מחקרים קודמים ממעבדתינו, סיפקו עדויות כי ממברנת הפלסמה בעלת רגישות גבוהה למזהמים סביבתיים כגון ATZ, DACT, ואפלאטוקסין B1 ( Komsky-Elbaz & Roth 2016; Komsky-Elbaz et al., 2018 ). במחקר הנוכחי, אנו מדווחים על אפקט מתווסף של פגיעה בחיוניות תאי הזרע כתוצאה מחשיפה ל ATZ או DACT. אפקט משמעותי נצפה כאשר תאי זרע נחשפו למזהמים אלו בזמן תהליך ההקפאה. אפקט מינורי נצפה כאשר תאי זרע נחשפו לריכוזים גבוהים יותר של ATZ לאחר תהליך ההקפאה וההפשרה. מכאן, ניתן להניח כי חשיפה של תאי זרע ל EDC, אפילו בריכוזים נמוכים, פוגעת בעמידות להקפאה ובחיוניות התאים.

הממברנה המיטוכונדריואלית בעלת רגישות גבוהה לסטרס. מחקרים קודמים מצאו כי חשיפה של תאים סומטיים ל EDC כגון תרכובות אורגנו פוספטים ( Carlson et al. 1999 ; Kadenbach et al. 2004 ) משפיעות על  $\Delta\Psi\text{m}$

המתבטא בהיפרפולריזציה של הממברנה המיטוכונדריואלית. בנוסף, חומר הדברהalachlor גורם דהפולריזציה במיטוכונדריואלית של תאי זרע הומניים ( Ouchchane et al. 2007 ).

במחקרים קודמים ממעבדתנו, דיווחנו כי חשיפה של תאי זרע ל DACT בריכוז 1 או  $10 \mu\text{M}$  מעלה יחס תאי זרע עם  $\Delta\Psi\text{m}$  גבוה במיוחד ( Komsky-Elbaz & Roth 2016 ). במחקר הנוכחי, היפרפולריזציה של  $\Delta\Psi\text{m}$  תאי הזרע נצפתה לאחר חשיפה ל DACT במהלך תהליך ההקפאה. היפרפולריזציה זמנית של הממברנה המיטוכונדריואלית יכולה להוביל לעליה ביצור רדיקלים חופשיים ואפופטוזיס התא ( Kadenbach et al. 2004 ; Hüttemann et al. 2008 ).

מתוך כלל המבנים הבונים את תא הזרע, המיטוכונדריואלית נחשבת לרגישה ביותר לתהליך ההקפאה ( Treulen et al. 2018 ). במחקר הנוכחי, חשיפה ל ATZ או DACT לאחר הקפאה והפשרה לא השפיעה על  $\Delta\Psi\text{m}$ . יתכן כי תאי זרע ששרדו את תהליך ההקפאה עמידים יותר ל ATZ או DACT. כתמיכה בהנחה זו, השראת עקה חמצונית קלה בעזרת חנקן חמצני  $1 \mu\text{M}$  לפני ההקפאה, נמצאה בעלת אפקט מגן על שיפור זרמה בהקפאה בעקבות העלאת עמידות התאים לעקה. התאים היו בעלי חיוניות, תפקוד ממברנת הפלסמה ופעילות מיטוכונדריואלית גבוהים יותר ( Sharafi et al. 2015 ). אי לכך, ייתכן כי במחקר הנוכחי, תהליך ההקפאה עצמו שימש כעקה ותאי הזרע ששרדו תהליכי הקפאה והפשרה, התמודדו טוב יותר עם החשיפה העוקבת ל ATZ או DACT. אף על פי כן, בכדי לאמת הנחה זו, יש צורך בביצוע ניסויים נוספים עם מספר רב יותר של דגימות.

ממברנות האקרזום יכולות גם כן להיפגע על ידי תהליך הקפאה או חשיפה ל EDC. הימצאות שלפוחית אקרזום שלמה הכרחית לצורך חדירת תא הזרע לביצית ובכך לשפר את הסבירות להפריה מוצלחת ( Srivastava et al. 2013 ). זרמה עם שיעור גבוה של AR ספונטני עלולה להיות בעלת יכולת הפריה נמוכה ( Wisner et al. 2012 ). במחקר הנוכחי, שיעור תאי זרע עם AR ספונטני לא הושפע עקב חשיפה ל ATZ או DACT במהלך או לאחר ההקפאה. מנגד זה, שיעור תאי הזרע שעברו AR מושרית באמצעות קלציום ינופור, היה נמוך יותר לאחר חשיפה ל DACT במהלך ההקפאה. במהלך תהליך ההקפאה, עקת קור פוגעת בחדירות הסלקטיבית של ממברנות תא הזרע לסידן ( Bailey 2000 ), מה שגורם לעלית בכניסת הסידן לתוך התא המהווה טריגר לקפסיטציה ו AR ספונטנית ( Yoon et al. 2015 ). הממצאים שלו מראים השפעה של נזק מתווסף של הקפאה וחשיפה ל EDC על שלמות ממברנות האקרזום. שינויים אלו יכולים לפגוע בפוטנציאל ההפריה העתידי של תא הזרע. למרות זאת, חשיפה של זרמה ל ATZ או DACT לאחר הקפאה והפשרה, לא השפיעה על AR.

## 5. מסקנות

בעבודה זו התבצעו שני ניסויים בלתי תלויים על מודל מצומצם על מנת לבחון היתכנות של השפעת ATZ והמטבוליט שלו לפני ואחרי ההקפאה. במודל אשר בחן חשיפה לפני ההקפאה נמצא כי DACT פוגע בפוטנציאל ממברנת המיטוכונדריה וראקציית האקרוזום המושרית, כלומר, חשיפה של תאים לפני ההקפאה פוגעת באיכותם. למיטב ידיעתנו, זהו מחקר ראשון המציג אפקט מזיק מצטבר של EDC כגון ATZ ו DACT על תהליך ההקפאה של תאי הזרע. במודל השני אשר בחן חשיפה של תאים לאחר הקפאה והפשרה, לא נצפתה השפעה משמעותית של המזהמים על איכות תאי הזרע. מכאן, תוצאות ראשוניות אלו מצביעות על כך שזרמה שהוקפאה והופשרה ושרדה תהליכים אלה, ככל הנראה פחות רגישה לגורמי עקה סביבתיים. כל אלו יכולים להעיד על עמידות טובה יותר של זרמה אשר שומרה בהקפאה והופשרה בזמן הזרעה מלאכותית בבקר. כיוון מחקר זה צריך להמשיך להיבדק על מדגם גדול יותר.

מחקר זה, המתמקד באיכות תאי הזרע כתוצאה מחשיפה ל ATZ או DACT במהלך ולאחר תהליך ההקפאה הינו בעל רלוונטיות לפוריות הבקר ולכן בעל חשיבות עליונה לתחום בקר לחלב. שניהם תחומים בעלי ערך גדול מאוד לחקלאות בעולם ובפרט בישראל. נוסף על כך, מחקר זה יכול להיות רלוונטי גם לפוריות האדם, מכיוון שניתן להתייחס לפר כחיית מודל ליונקים, בניהם האדם, ובהבנת הירידה בפוריות הזכר הן בבעלי החיים והן בבני האדם.

## 6. הבעת תודה

ברצוני להודות :

תודה מיוחדת לפרופ' צבי רוט על הליווי הצמוד, הנחייתו ותרומתו לאורך ביצוע וכתיבת עבודה זו.

לדרי אליסה קומסקי אלבו על העזרה בביצוע הניסויים, הליווי והנחיה בכתיבת העבודה.

למוטי סקציאר על עזרתו כחלק מצוות המעבדה.

ל"שיאון" על העזרה ושיתוף הפעולה.

- Abarikwu, S. O., Adesiyun, A. C., Oyeloja, T. O., Oyeyemi, M. O., & Farombi, E. O. (2010). Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by a herbicide, atrazine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *58*(3), 874–882. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9371-2>
- Abou-haila, A., & Tulsiani, D. R. P. (2009). Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *485*(1), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.02.003>
- Bailey, J. L. (2000). Semen Cryopreservation in Domestic Animals : A Damaging and Capacitating Phenomenon Minireview, *21*(1).
- Barr, D. B., Panuwet, P., Nguyen, J. V., Udunka, S., & Needham, L. L. (2007). Assessing exposure to atrazine and its metabolites using biomonitoring. *Environmental Health Perspectives*, *115*(10), 1474–1478. <https://doi.org/10.1289/ehp.10141>
- Basheer, C., & Lee, H. K. (2004). Hollow fiber membrane-protected solid-phase microextraction of triazine herbicides in bovine milk and sewage sludge samples. *Journal of Chromatography A*, *1047*(2), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.130>
- Betancourt, M., Reséndiz, A., & Fierro, E. C. y R. (2006). Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. *Reproductive Toxicology*, *22*(3), 508–512. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.03.001>
- Brzezicki, J. M., Andersen, M. E., Cranmer, B. K., & Tessari, J. D. (2003). Quantitative identification of atrazine and its chlorinated metabolites in plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, *27*(8), 569–573. Retrieved from papers://1bd45c8b-41c4-4aa0-8c11-1f45d452467f/Paper/p75
- Carlson, K., Ehrich, M., Neuroblastoma, S. Y. Y. H., Transmembrane, M., & Phar-, M. T. A. (1999). Organophosphorus Compound-Induced Modification of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Mitochondrial Transmembrane Potential, *42*, 33–42.
- Cox, C. (2001). Atrazine : Environmental Contamination and ecological effects. *Journal of Pesticide Reform*, *21*(3), 12–20.
- de Lamirande, E., Leclerc, P., & Gagnon, C. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*, *3*(3), 175–194. <https://doi.org/10.1093/molehr/3.3.175>
- Eldridge J.C., Fleenor-Heyser D.G., Extrom P.C., Wetzel L.T., Breckenridge C.B., Gillis J.H., Luempert L.G., Stevens J.T. (1994). Short-term effects of chlorotriazines on estrus in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, *43*(2), 155-167.
- Fan, W. Q., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., ... Nawata, H. (2007). Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: Implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environmental Health Perspectives*, *115*(5), 720–727. <https://doi.org/10.1289/ehp.9758>

- Forgacs, A. L., D'Souza, M. L., Huhtaniemi, I. T., Rahman, N. A., & Zacharewski, T. R. (2013). Triazine Herbicides and Their Chlorometabolites Alter Steroidogenesis in BLTK1 Murine Leydig Cells. *Toxicological Sciences*, *134*(1), 155–167. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft096>
- França, L. R., Avelar, G. F., & Almeida, F. F. L. (2005). Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, *63*(2 SPEC. ISS.), 300–318. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.014>
- Funk, D. A. (2006). Major advances in globalization and consolidation of the artificial insemination industry. *Journal of Dairy Science*, *89*(4), 1362-1368.
- Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., & Leiding, C. (2016). Theriogenology Effects of cryopreservation on sperm viability , synthesis of reactive oxygen species , and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, *86*(2), 562–571. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.007>
- Hase, Y., Tatsuno, M., Nishi, T., Kataoka, K., Kabe, Y., Yamaguchi, Y., ... Watanabe, H. (2008). Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *366*(1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.107>
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., & Vonk, A. (2003). Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives*, *111*(4), 568–575. <https://doi.org/10.1289/ehp.5932>
- Hüttemann, M., Lee, I., Pecinova, A., Pecina, P., Przyklenk, K., & Doan, J. W. (2008). Regulation of oxidative phosphorylation , the mitochondrial membrane potential , and their role in human disease, 445–456. <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9169-3>
- Ikonen, R., Kangas, J., & Savolainen, H. (1988). Urinary atrazine metabolites as indicators for rat and human exposure to atrazine. *Toxicology Letters*, *44*(1–2), 109–112. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(88\)90136-1](https://doi.org/10.1016/0378-4274(88)90136-1)
- Jin, Y., Lin, X., Miao, W., Wang, L., Wu, Y., & Fu, Z. (2015). Oral exposure of pubertal male mice to endocrine-disrupting chemicals alters fat metabolism in adult livers. *Environmental Toxicology*, *30*(12), 1434–1444. <https://doi.org/10.1002/tox.22013>
- Jin, Y., Wang, L., Chen, G., Lin, X., Miao, W., & Fu, Z. (2014). Exposure of mice to atrazine and its metabolite diaminochlorotriazine elicits oxidative stress and endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *37*(2), 782–790. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.014>
- Kadenbach, B., Arnold, S., Lee, I., & Hu, M. (2004). The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases, *1655*, 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2003.06.005>
- Kettles M.A., Browning S.R., Prince T.S., Horstman S.W. (1997). Triazine herbicide exposure and breast cancer incidence: an ecologic study of Kentucky counties. *Environmental Health Perspectives*, *105*(11), 1222-1227.
- Komsky-Elbaz, A., & Roth, Z. (2016). Effect of the herbicide atrazine and its metabolite DACT on bovine sperm quality. *Reproductive Toxicology*, *67*, pp.15–25. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890623816303914>. *Reproductive*



*Toxicology*, 67, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.11.001>

- Komsky-Elbaz, A., Saksier, M., Roth, Z. (2018). Aflatoxin B1 impairs sperm quality and fertilization competence. *Toxicology*, 393(October 2017), 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.11.007>
- Koskinen, W. C., & Clay, S. a. (1997). Factors affecting atrazine fate in north central U.S. soils. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 151, 117–165. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9216258>
- Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Martínez, F., Cano, R., de Blas, I., & Espinosa, E. (2010). Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*, 61(1), 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.06.009>
- Maravilla-Galván, R., Fierro, R., González-Márquez, H., Gómez-Arroyo, S., Jiménez, I., & Betancourt, M. (2009). Effects of atrazine and fenoxaprop-ethyl on capacitation and the acrosomal reaction in boar sperm. *International Journal of Toxicology*, 28(1), 24–32. <https://doi.org/10.1177/1091581809333138>
- Ouchchane, L., Artonne, C., Vasson, M., & Janny, L. (2007). In vitro alachlor effects on reactive oxygen species generation, motility patterns and apoptosis markers in human spermatozoa, 23, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.08.007>
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A., & First, N. L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of reproduction*, 38(5), 1171–1180.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., & Graham, J. K. (1999). In vitro capacitation of bovine spermatozoa: Role of intracellular calcium. *Theriogenology*, 51(2), 461–472. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00240-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00240-4)
- Parrish, John J. (2014). Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>
- Pintér A., Török G., Börzsönyi M., Surján A., Csík M., Kelecsényi Z., Kocsis Z. (1980). Long-term carcinogenicity bioassay of the herbicide atrazine in F344 rats. *Neoplasma*, 37(5), 533–544.
- Saalfeld, G. Q., Varela Junior, A. S., Castro, T., Pereira, F. A., Gheller, S. M. M., da Silva, A. C., ... Colares, E. P. (2018). Low atrazine dosages reduce sperm quality of *Calomys laucha* mice. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(3), 2924–2931. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0657-z>
- Schiffer, C., Müller, A., Egeberg, D. L., Alvarez, L., Brenker, C., Rehfeld, A., ... Strünker, T. (2014). Direct action of endocrine disrupting chemicals on human sperm. *EMBO Reports*, 15(7), 758–765. <https://doi.org/10.15252/embr.201438869>
- Schuppe, H., & Schill, W. (2004). Review article The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals, 345, 337–345.
- Senger P.L. (2003). *Pathways to pregnancy and parturition* (second edition). Pullman, WA: Current Conceptions Inc
- Sharafi, M., Sc, M., Zhandi, M., Ph, D., Shahverdi, A., Ph, D., ... Ph, D. (2015). Beneficial Effects of Nitric Oxide Induced Mild Oxidative Stress on Post-Thawed Bull Semen Quality, 9(2), 230–237.
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2015). Review Article Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation Cryopreservation of Semen Use of In Situ FTIR to Study Biomolecular, c, 20–26. <https://doi.org/10.1111/rda.12594>

- Srivastava, N., Srivastava, S. K., Ghosh, S. K., Kumar, A., Perumal, P., & Jerome, A. (2013). Acrosome membrane integrity and cryocapacitation are related to cholesterol content of bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2(2), 126–131. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(13\)60132-3](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(13)60132-3)
- Thomas, C. A. (1998). Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 58(3), 786–793. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.3.786>
- Tillitt, D. E., Papoulias, D. M., Whyte, J. J., & Richter, C. A. (2010). Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 99(2), 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.011>
- Treulen, F., Elena, M., Aguila, L., Uribe, P., & Felmer, R. (2018). Cryobiology Cryopreservation induces mitochondrial permeability transition in a bovine sperm model. *Cryobiology*, 83(May), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.06.001>
- Tsutsumi, O., Uechi, H., Sone, H., Yonemoto, J., Takai, Y., Momoeda, M., ... Taketani, Y. (1998). Presence of Dioxins in Human Follicular Fluid : Their Possible Stage-Specific Action on the Development of Preimplantation Mouse Embryos, 501, 498–501.
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871–891. <https://doi.org/10.1071/RD9950871>
- Wiser, A., Sachar, S., Ghetler, Y., Shulman, A., & Breitbart, H. (n.d.). Assessment of sperm hyperactivated motility and acrosome reaction can discriminate the use of spermatozoa for conventional in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection : Preliminary results, 313–315. <https://doi.org/10.1111/and.12068>
- World Health Organization (2003). *Atrazine in Drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva: Author. Retrieved from: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/atrazinerev0305.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/atrazinerev0305.pdf)
- Yeste, M. (2016). Theriogenology Sperm cryopreservation update : Cryodamage , markers , and factors affecting the sperm freezability in pigs, 85, 47–64. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>
- Yoon, S., Kwon, W., Rahman, S., Lee, J., & Pang, M. (2015). A Novel Approach to Identifying Physical Markers of Cryo-Damage in Bull Spermatozoa, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126232>

משרד הבריאות (2013). תקנות בריאות העם (איכותם התברואתית של מי שתיה ומיתקני מי שתיה), התשע"ג-2013. נדלה מתוך: <https://www.health.gov.il/LegislationLibrary/Briut47.pdf>