

דוח מסכם לתוכנית מחקר 820-0355

שם העבודה: בחינת היחס X/Y בתאי הזרע, והקשר לתנועה פרוגרסיבית, מורפוקינטיקה ומין העובר

שמות השותפים למחקר:

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

z.roth@mail.huji.ac.il

מבוא ותאור הבעיה

במשק החלב המבוסס על גידול אינטנסיבי, "היחידה היצרנית" היא הנקבה. בהתאם לכך, העדפתו של הרפתן היא שכל הריון יסתיים בהולדת וולד ממין נקבה, אשר בבוא העת תשמש לתחלופה בעדר. לאור מגמה זו, מזה מספר עשורים קיימת מוטיבציה לפתח יכולת מעשית-יישומית לשנות את היחס 50:50 הקיים באופן טבעי בין שני המינים, לטובת וולדות ממין נקבה. לקביעת מין הוולד יש משמעות ממשקית וכלכלית גבוהה ובכלל זה מזעור מספר הוולדות הזכריים והעיסוק בהם, יעול תהליך ההרחבה של העדר וקיצור האינטרוול לטיפול גנטי (Boro et al., 2016) והקטנת שיעור ההמלטות קשות (dystocia) לדוגמא, שיעור ההמלטות הקשות יורד מ-6% ל-2.5% (Holden and Butler, 2018). הגישה המובילה כיום היא שימוש בזרמה ממוינת. אם כי, השימוש בזרמה ממוינת מצומצם ועומד על 6% וזאת בשל העלות הגבוהה של כל קשית (כ-30\$) ושיעור ההתעברות הנמוך המתקבל בעקבות הזרעה עם זרמה ממוינת.

כרומוזומי המין הם אלו שמכתיבים את הזוויג. בסוף תהליך יצירת תאי זרע (spermatogenesis) מתקבלים תאי זרע אשר מכילים כרומוזום X או Y. לעומת תא הביצית נושא רק את כרומוזום ה-X. כך שלאחר ההפריה, עם פגישתם של שני תאי המין הזכרי והנקבי והיווצרות הזיגוטה, יתכנו הצימודים הבאים: XX או XY (נקבה או זכר, בהתאמה). ביונקים, היחס בין הוולדות הזכריים והנקביים הוא כ-50% היות ומחצית תאי הזרע נושאים כרומוזום Y או X.

השיטה הנפוצה ביותר למיון זרמה על בסיס המטען הגנטי (X או Y) אשר הגיעה לכלל יישום היא באמצעות Flow cytometry. השיטה מתבססת על הבדלים (~4%) בכמות ה-DNA בגרעין תא הזרע הנקבי (בעל כרומטידה X) לתא זרע זכרי (בעל כרומטידה Y). בספרות מדווח כי רמת ההצלחה לקבלת עוברים בזוויג נקבי היא של כ-90%, אם כי שיעורי ההתעברות היו נמוכים יותר. בדיקת בנק הזרע ב"שיאון" העלתה כי התפלגות הזרמה על בסיס התנועה פרוגרסיבית קרובה לנורמאלית, עם ממוצע של 66.0% וסטיית תקן של 8.1%. על בסיס ממצאים אלו ניתן להגדיר את תנועתיות הזרמה (גבוהה, בינונית ונמוכה, איור 2). בעבודה קודמת מצאנו כי הפרייה בתרבית (in vitro fertilization; IVF) עם זרמה בעלת תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה התקבלו יותר עוברים שהתפתחו לעובר בן 8 ימים (בלסטוציסט) בהשוואה להפריה עם זרמה בעלת תנועתיות פרוגרסיבית נמוכה (Li et al., 2016). עד כה לא נבחן הקשר של תנועה פרוגרסיבית והזוויג (מטרת עבודה זו).

למרות הדמיון הפונקציונאלי אשר קיים בין תא זרע X לתא זרע Y נמצאו הבדלים בתנועתיות של תאי הזרע (Sarkar et al., 1984). תנועתיות של תא זרע Y יורדת במהירות בתנאי הדגרה in vitro ב pH נמוך, טמפ' גבוהה וסטריס חמצוני (Shettles et al., 1970) לעומת זאת התנועתיות של תאי זרע X יורדת ב pH גבוה. הממצאים מעידים כי תנועתיות תאי הזרע יכולה להשתנות בתנאי in vitro כמו גם בתנאי in vivo ככל הנראה על ידי שינויים בביטוי של גנים המבקרים את תבנית התנועתיות הייחודית של סוג תא. הנחה זו טרם אוששה. לאור נתונים אלו אנו מניחים בעבודה הנוכחית כי פרמטר התנועה הפרוגרסיבית, יכול לשמש מדד לאמוד את שיעור תאי הזרע X ו Y בזרמה. בנוסף, בחנו גישה לא פולשנית, המבוססת על הבדלים בזמני החלוקה והתפתחות לעובר בין זכר לנקבה.

הנחת העבודה

אנו מניחים כי קיים הבדל באחוז התנועה הפרוגרסיבית בין תאי זרע הנושאים מטען גנטי נקבי לזכרי וכי ההבדל בין סוגי התאים יכול לבוא לידי ביטוי בהבדלים מורפוקינטיים של העובר המתפתח.

מטרות המחקר

המטרה הכללית של העבודה הייתה לבחון את הקשר בין תנועה פרוגרסיבית של תאי זרע, מורפוקינטיקה של העובר המתפתח, וזוויג העובר. אנו מצפים כי ממצאי העבודה יאפשרו לבסס ממשק הזרעות מושכל, תוך התייחסות לייחס תאי זרע זכריים ונקביים, לטובת קבלת יותר וולדות ממין נקבה. הבנת המאפיינים השונים יש ותאפשר לפתח ממשק הזרעות או השתלות עוברים תוך הכוונה לוולדות נקביים. חשוב לציין כי הגישה הנבחנת שונה מהמוטיבציה ארוכת השנים לפתח שיטות למיון תאי זרע ואינה כוללת מיון או מניפולציה כלשהי בתאי הזרע.

המטרות הספציפיות:

- (1) לאפיין את הקשר בין תנועה פרוגרסיבית וייחס תאי זרע בעלי X ו-Y
- (2) לאפיין את הקשר בין מורפוקינטיקה וזוויג העובר וניסיון להגדיר סמנים מורפוקינטיים כתלות בזוויג
- (3) קביעת זוויג עוברים המתפתחים על בסיס סמנים המורפוקינטיים

אופן ביצוע המחקר/שיטות

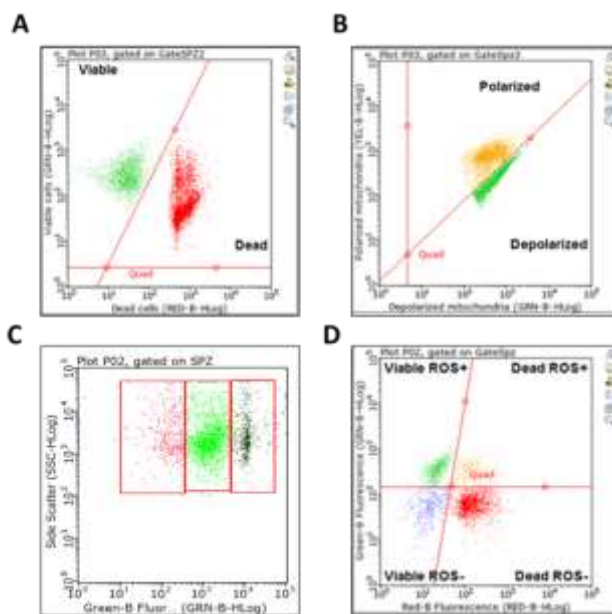
שנה הראשונה

איסוף דוגמאות - איסוף הזרמה נעשה בחברת "שיאון", מפריס מגזע הולשטיין-ישראלי אשר נמצאים בלוח הפריים ומשמשים הלכה ומעשה להזרעה מלאכותית בעדר החלב. איסוף הזרמה נעשה בהתאם לשיטה הנהוגה ב"שיאון". בקצרה, פרי הניסוי הוקפצו על פר "teaser" והדגימה נאספה אל תוך בוסת מלאכותית מחוממת אשר בקצה מולבשת מבחנה. עבור כל פר (n=15) נאספה זרמה ב- 3 חזרות. הזרמה הועברה מיידית למעבדה קרובה, שם עברה אנליזה להערכת איכותה באמצעות מכשיר ה- SQA-Vb של חברת Medical Electronic Systems Ltd (MES) כפי שתואר עלי ידי, Orgal et al., 2012. באמצעות מכשיר זה ניתן לבצע קריאה אופטית לקבלת מדדי איכות של הזרמה ובכלל זה ריכוז תאי הזרע (מיליון תאים למ"ל), אחוז תנועתיות, אחוז תנועתיות פרוגרסיבית. דוגמאות הזרמה אופיינו על בסיס התנועה הפרוגרסיבית, גבוהה (מעל 80% תאים נעים) פרוגרסיבית או נמוכה (עד 50% תאים נעים פרוגרסיבית) כפי שנעשה בעבודה קודמת במעבדתנו (Ying et al., 2014).

אפיון היחס בין תאי זרע נקביים וזכריים – מתוך ניסיון לקבוע את היחס בין תאי זרע זכריים ונקביים בדוגמאות, נעשה שימוש ב-flow cytometer ייעודי לתאי זרע (IMV Technologies) ובקיט ייעודי

לבחינת חיות תאי הזרע. הרציונל שעומד מאחורי הרעיון הוא הבדל בעוצמת הפלורסנציה בין אוכלוסיית תאי זרע נושאי X לאלו הנושאים את Y. הקיט מכיל שני צבענים פלואורסנטיים, אשר שילוב שלהם מאפשר אבחנה בין תאים חיים ומתים, על בסיס עוצמה פלורסנטית וכמות ה-DNA. לטובת כך, דוגמאות זרמה טרייה עם תנועה פרוגרסיבית נמוכה (n=15) או גבוהה (n=15) עברו סרוז ולאחריו התבצע פרוצדורת ה-swim up לקבלת תאי זרע חיים ונעים.

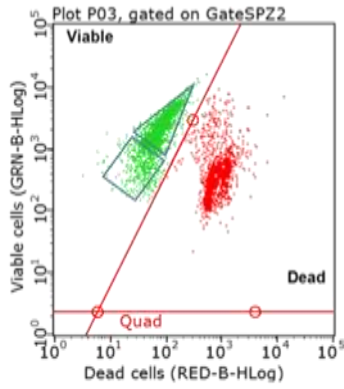
שימוש בזרמה ממוינת – על מנת לאמוד את ההבדלים בין אוכלוסיית תאי זרע הנושאים Y לעומת X. לטובת כך, רכשנו זרמה ממוינת ל-Y וזרמה ממוינת ל-X. נעשה ניסיון לאפיין זרמה ממוינת ל-X ול-Y בהשוואה לזרמה לא ממוינת על בסיס מאפיינים ממברנליים המעידים על איכות התאים. כל זרמה נצבעה בסמנים פלורסנטיים בהתאם לאנליזה תוך שימוש בקיטים ייעודיים (IMV Technologies) לאנליזה של תאי זרע המיועדים להרצה במכשיר Flow cytometer. בכלל זה, שלמות ממברנת התאים (קרי, שיעור התאים החיים; איור 1A), פוטנציאל ממברנת המיטוכונדריה (קרי, שיעור התאים עם פוטנציאל גבוה-polarized או נמוך, depolarized; איור 1B) שלמות ממברנת האקרזום (קרי, שיעור התאים עם ממברנת אקרזום שלמה או פגומה; איור 1C) ואחוז תאים חיים עם או ללא רדיקלים חופשיים (קרי שיעור תאים חיים עם או בלי ROS; איור 1D).



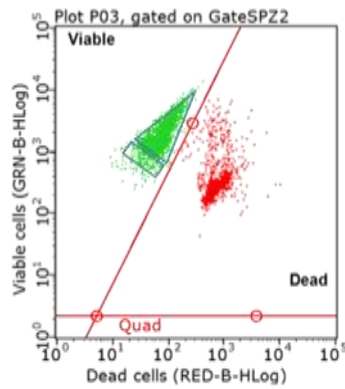
איור 1. פלט המתקבל לאחר הרצה במכשיר ה-FACS ובו מוצגות הפרדות השונות בהתאם לסוג הצבענים. פלט **A** מציג הפרדה לתאי זרע חיים ומתים. פלט **B** מציג הפרדה לתאי זרע בעלי פוטנציאל ממברנה מיטוכונדריואלי גבוה (polarized) ותאי זרע בעלי פוטנציאל ממברנה מיטוכונדריואלי נמוך (depolarized). פלט **C** מציג הפרדה לשלוש אוכלוסיות תאים המציגות ממברנת אקרזום תקינה, משופעלת או פגומה. פלט **D** מתאר הפרדה לארבע אוכלוסיות תאי הזרע המציגות תגובה לעקה חמצונית. המאפשרת אבחנה בין ארבע אוכלוסיות תאים: תאי זרע מתים אשר מציגים או לא מציגים ביטוי של ROS ותאי זרע חיים אשר מציגים או לא מציגים ביטוי של ROS.

תוצאות שנה ראשונה

דוגמאות זרמה עם תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה ונמוכה הודגרו בנוכחות הצבען לצורך קריאה במכשיר IMV לקביעת היחס בין X/Y. התקבל הבדל קל בין זרמה עם תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה ונמוכה (איור מס' 2).



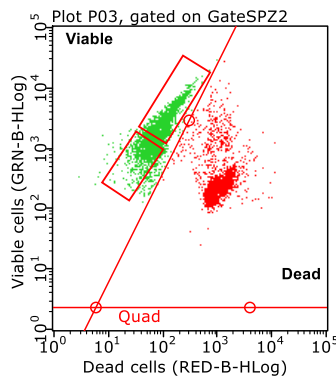
תנועתיות פרורסיבית גבוהה



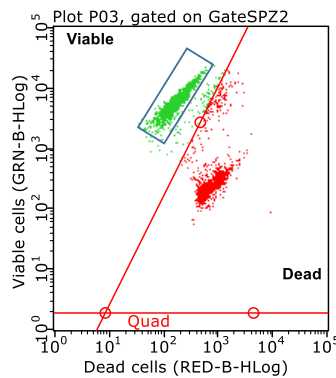
תנועתיות פרורסיבית נמוכה

איור 2: דוגמאות זרמה עם תנועתיות פרורסיבית גבוהה ונמוכה הודגרו בנוכחות הצבען לצורך קריאה במכשיר IMV לקביעת היחס בין X/Y. ניתן להבחין בהבדל קל בין זרמה עם תנועתיות פרורסיבית גבוהה ונמוכה.

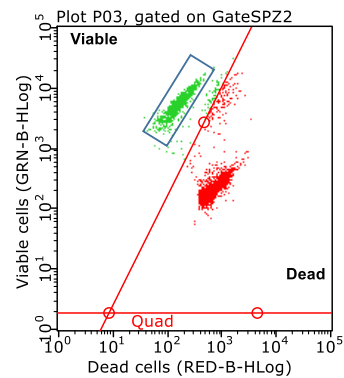
לאור הממצאים, חזרנו על הניסוי, עם זרמה ממוינת ל-X וזרמה ממוינת ל-Y וחזרנו על פרוטוקול הניסוי המתואר מעלה. כביקורת השתמשנו בזרמה לא ממוינת (איור 3). מתוך התוצאות עולה כי לא התקבלו הבדלים בין דוגמאות הזרמה הממוינת. אם כי התקבל הבדל ברור בין זרמה ממוינת (ל-X או ל-Y) לבין זרמה רגילה (לא ממוינת) (טבלה 1). לדוגמא, אחוז התאים החיים ואחוז התאים עם ממברנת אקרזום שלמה נמצא גבוה בקבוצה הלא ממוינת לעומת הממוינות ומעט גבוה יותר בזרמה הממוינת ל-X (טבלה 1). יחד עם זאת, לא נמצאו הבדלים בפוטנציאל ממברנת המיטוכונדריה ואחוז התאים עם ROS בין הזרמה הממוינת ל-X לזו של Y (טבלה 1).



לא ממוין



ממוין ל-X



ממוין ל-Y

איור 3: דוגמאות זרמה ממוינת ל-X ול-Y הודגרו בנוכחות הצבען לצורך קריאה במכשיר IMV.

טבלה 1. מאפיינים ממברנליים בתאי זרע מזרמה ממוינת ל- X, Y וזרמה לא ממוינת.

קבוצה	תאים חיים (%)	פוטנציאל ממברנת מיטוכונדריה (יחס)	תאים חיים עם ROS (%)	תאים חיים עם ממברנת אקרזום שלמה (%)
ממוין ל-Y	12.31	0.16	4.19	20.94
ממוין ל-X	25.63	0.23	4.54	27.72
לא ממוין	59.43	14.76	16.01	52.88

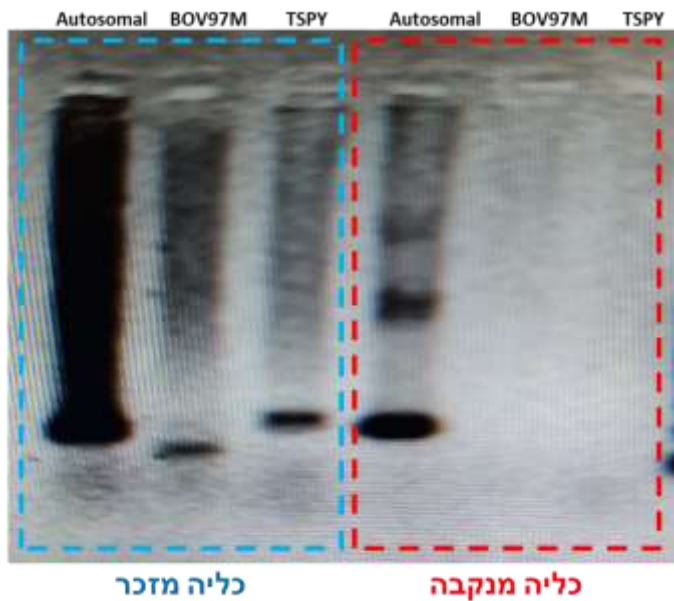
יחס = אחוז התאים עם פוטנציאל ממברנה גבוה ביחס לאחוז התאים עם פוטנציאל ממברנה נמוך.

על בסיס התוצאות שהתקבלו, הגענו לכלל הבנה כי אפיון של תאי זרע בעלי כרומוזום Y ו-X על בסיס מאפיינים ממברנליים איננו מספיק. בהתאם, הוחלט לבחון את גישה ולבחון את יחס העוברים הזכריים/נקביים על בסיס ה-DNA תוך שימוש ב-PCR תוך שימוש בפריימרים ספציפיים לגנים הנמצאים על כרומוזום ה-Y בלבד.

שנה שנייה

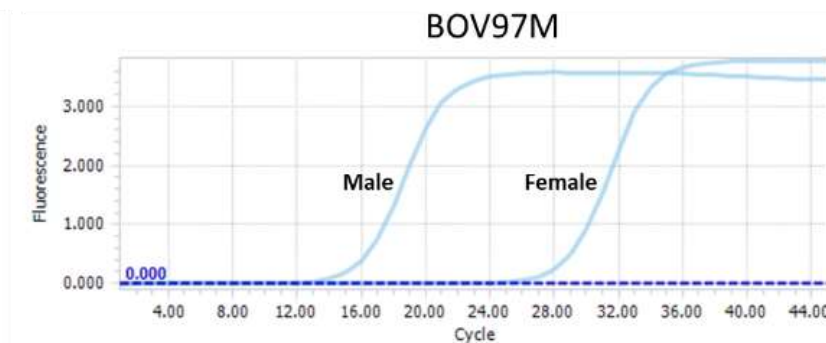
בשלב הראשון העמדנו שיטה לאפיון זוויג יחס X/Y בבולסטוציסטים ובתאי זרע. העמדת השיטה כללה מספר שלבים וביניהם: (1) התאמת פריימרים לזיהוי זוויג ברקמות ידועות של זכר ונקבה; (2) הפקת DNA מעוברים; (3) הפקת DNA מתאי זרע.

(1) **התאמת פריימרים** - נעשה איסוף של רקמות מזכר (כבד, כליה, פין, לב, עור) ורקמות נקבה (כבד, כליה). כל הרקמות נאספו מפרות ופרים שנשחטו בבית מטבחיים. במעבדה, נעשתה שקילה של הרקמות ל-25 מיליגרם, והרקמות נשמרו במקפא -80°C . בשלב הבא, נעשתה הפקה של DNA מהרקמות, תוך שימוש בקיט Dneasy[®] Blood&Tissue kit (Qiagen) בהתאם לפרוטוקול של היצרן. בקצרה, הרקמות עוברות תהליך של lysis, סדרת שטיפות ולאחר מכן אילוציה של ה-DNA. לאחר ההפקה, נעשתה מדידה של רמות ה-DNA בכל רקמה במכשיר ה-Nanodrop. בשלב השני, DNA של רקמת כליה מזכר ומנקבה נלקח לראקציית PCR לטובת הגברה של המקטעים BOV97M, TSPY ו-Autosomal (גן ביקורת) תוך שימוש ב-Taq PCR MasterMix (TIANGEN) $2 \times$. נציין כי הפריימרים (BOV97M, TSPY) נבחנו בגלל מיקומם, על כרומוזום ה-Y. פריימרים אלו נמצאו ספציפיים לזכר מבין סה"כ 7 שנבחנו. ייתרת הפריימרים לא נמצאו מספיק ספציפיים ו/או בעלי ביטוי חלש. תכנית ההרצה נעשתה לפי הפרוטוקול של האנזים (denaturation ב- 94°C למשך 3 דקות, 30 מחזורים של 94°C למשך 30 שניות, 58°C למשך 30 שניות ו- 72°C לדקה לצימוד של הפריימרים והגברה של התוצר, ולבסוף אינאקטיבציה של האנזים ב- 72°C למשך 5 דקות). לאחר מכן, תוצרי ה-PCR הורצו בג'ל (2% אגרז) אלקטרופורזה (איור 4).



איור 4. ג'ל אלקטרופורזה של DNA מכליה של זכר ונקבה לאימות ביטוי של BOV97M ו-TSPY. על בסיס תוצאות ההרצה, נמצא כי התקבל ביטוי של הגן ה-Autosomal בשתי הרקמות (זכר ונקבה) כמצופה. כמו כן, רק בדגימות מהזכר התקבל ביטוי של הגנים BOV97M ו-TSPY. בהתאם לכך, נבחרו הגנים הללו להמשך עבודה. בנוסף, דגימות ה-DNA מהרקמות שימשו כביקורת חיובית לשיטה.

על מנת לוודא את אמינות התוצאות, נעשה שימוש גם בשיטת real time PCR (איור 5). הממצאים שהתקבלו הראו ביטוי גבוה של TSPY ו-BOV97M ברקמה הזכרית בהשוואה לנקבית, בדומה לזה שהתקבל ב-PCR (איור 5).



איור 5. תוצאות real time PCR ברקמות זכר ונקבה עם BOV97M, היושב על כרומוזום ה-Y.

(2) הפקת DNA

הפקת DNA מעוברים- הפקת עוברים במעבדה התבצעה במספר שלבים: איסוף שחלות מבית מטבחיים ביום השחיטה, השחלות הובאו למעבדה בתמיסת Saline (0.9% NaCl) מחומם ל-37°C בתוספת אנטיביוטיקה (Pen-Strep). מכל שחלה התבצעה שאיבה של ביציות, לאחר מכן, הביציות הועברו סדרת שטיפות והועברו להדגרה ב-oocyte maturation medium למשך 22 שעות בטמפרטורה של 38°C ו-5% CO₂ על מנת לאפשר הבגרה של הביציות. לאחר מכן, הביציות הועברו לצלחת עם באריות (30-40 לבאר) המכילות תמיסת IVF-TALP בתוספת של תאי זרע מקשיות קפואות והונחו באינקובטור למשך 18 שעות בטמפרטורה של 38°C ו-5% CO₂ על מנת לאפשר את תהליך ההפריה. לאחר מכן, נעשתה הסרה של תאי הקומולוס העוטפים את הביציות המופרות, ואלו הועברו להדגרה בטיפות של KSOM (25 µL) בצלחת פטרי המכוסה בשמן באינקובטור למשך 8 ימים בטמפרטורה של 38°C עם 5% CO₂ ו-5% O₂. עוברים אשר התפתחו לשלב הבלסטוציסט בימים 7

ו- 8 להדגרה נאספו והוקפאו ב- -80°C עד להמשך עבודה. כל בלסטוציסט הוקפא ונשמר בנפרד, ושימש כדוגמא אחת להמשך העבודה.

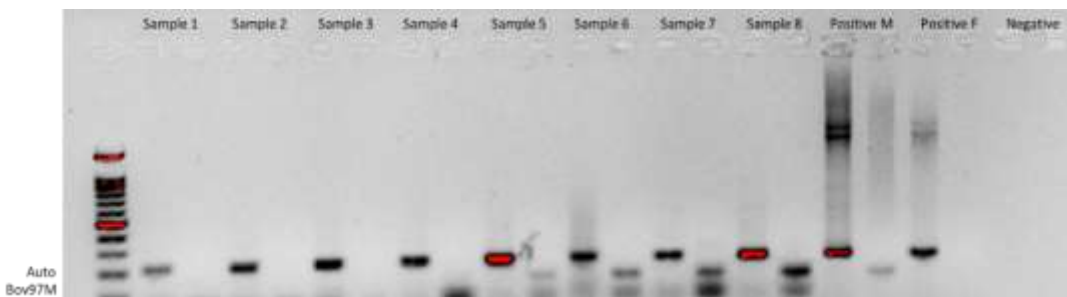
הפקת DNA מבלסטוציסטים

במסגרת העמדת השיטה, נבחנו מספר שיטות. בסופו של יום בחרנו לעשות שימוש ב- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). ההפקה של ה-DNA נעשתה בהתאם להוראות היצרן. לאחר מכן, נמדדה כמות ה-DNA במכשיר ה-Nanodrop. בשלב הבא, ביצענו ההגברה של הגנים BOV97M, TSPY, ו-גן ביקורת (Autosomal) תוך שימוש ב- 2 x Taq PCR MasterMix (TIANGEN). תכנית ההרצה נעשתה לפי הפרוטוקול של האנזים (94°C למשך 3 דקות, 30 מחזורים של 94°C למשך 30 שניות, 58°C למשך 30 שניות ו- 72°C לדקה, ואינאקטיבציה של האנזים ב- 72°C למשך 5 דקות). תוצרי ה-PCR נלקחו להגברה נוספת ב-PCR באותם התנאים כפי שצוין עבור הראקציה הראשונה. נלקחו 8 דוגמאות מתוצרי ה-PCR השני והורצו בג'ל (2% אגרוז) אלקטרופורזה.

(3) **הפקת DNA מתאי זרע** - לצורך כיוול של המערכת, השתמשנו בזרמה לא ממוינת משני פרים שונים ("אסא" ו"ג'ונסון"; שיאון), זרמה ממוינת ל- X (בקר לחלב) וזרמה ממוינת ל- Y (בקר לבשר). במסגרת הניסוי נעשה שימוש בזרמת פרים קפואה אשר שמורה בקשיות (0.221 ml זרמה בכל אחת) במכלי אחסון המכילים חנקן נוזלי. תחילה, הקשיות הופשרו במים שחוממו מראש בתנור ל- 38.5°C למשך כשתי דקות. תוכן הקשיות הועבר למבחנת אפנדורף בנפח של 1.5 ml עם NKM (110 mM) שחומם מראש ל- 38.5°C . לאחר מכן, המבחנה סורכזה בצנטריפוגה למשך 8 דקות ב-600 g עד לקבלת משקע המכיל את כלל תאי הזרע של הדוגמא. הנוזל העליון נשאב החוצה והפלט שהתקבל נלקח להפקת DNA. לאחר בדיקה של מספר שיטות, נבחר לעשות הפקה על ידי שימוש בקיט Genomic DNA (Mini Ax Swab&Semen Spin (A&A Biotechnology). ההפקה נעשתה על פי הוראות היצרן. לאחר מכן, נעשתה מדידה של כמות ה-DNA במכשיר ה-Nanodrop ובהמשך, נעשתה הגברה של הגנים BOV97M ו- Autosomal (ביקורת) בראקציית PCR תוך שימוש ב- 2 x Taq PCR MasterMix (TIANGEN). תכנית ההרצה נעשתה לפי הפרוטוקול של האנזים (94°C למשך 3 דקות, 30 מחזורים של 94°C למשך 30 שניות, 58°C למשך 30 שניות ו- 72°C לדקה, ואינאקטיבציה של האנזים ב- 72°C למשך 5 דקות). לאחר מכן, תוצרי ה-PCR נלקחו להגברה נוספת ב-PCR באותם התנאים כפי שצוין עבור הראקציה הראשונה. תוצרי ה-PCR השני הורצו בג'ל (2% אגרוז) אלקטרופורזה.

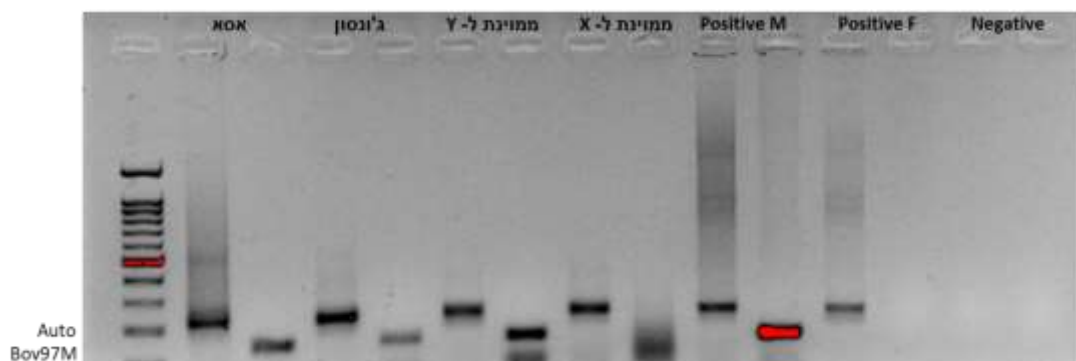
תוצאות שנה שניה

במסגרת העמדת השיטה להפקת DNA ואפיון זוויג של בלסטוציסטים, נמצא כי הרצה של PCR תוך הגברה של שני מקטעים אשר מקושרים עם כרומוזום ה-Y (TSPY, BOV97M) ניתן לאפיין את זוויג העובר (איור 6). מתוך התוצאות עולה כי מתוך 8 בלסטוציסטים, 4 בלסטוציסטים זהו כנקביים (קרי ללא ביטוי של הפריימר BOV97M (דוגמאות 1-4) ואילו 4 בלסטוציסטים זהו כזכריים (קרי עם ביטוי של BOV97M (דוגמאות 5-8) וזאת במתאם עם התוצאות של הרקמה הנקבית והזכרית (איור 6). יש לציין כי בהמשך העבודה, לא הסתפקנו רק ב- BOV97M וזיהוי הבלסטוציסטים נעשה על בסיס BOV97M וגם TSPY.



איור 6. תמונה מייצגת של הרצה בגל של DNA מבלסטוציסטים. Samples 1-8 אלו דוגמאות מייצגות של בלסטוציסטים בודדים; Positive M – רקמה של כליה מזכר; Positive F – רקמה של כליה מנקבה; Negative – דוגמא ללא DNA לביקורת השיטה. לכל דוגמא הורצו 2 באריות, אחת עבור תוצר כנגד פריימר Autosomal (השמאלי) והשנייה כנגד פריימר BOV97M (הימני).

בהמשך, ביצענו הפקת DNA והגברת מקטעים המקושרים עם כרומוזום ה-Y ב-PCR. מתוך התוצאות עולה כי רמות הביטוי של גן הביקורת היו דומות בין הזרמה הממוינת והלא ממוינת. כמו כן, מצאנו כי בתוך הזרמה הלא ממוינת, נמצא הבדל בעוצמת הביטוי של BOV97M מה שיכול לרמז על שונות בין פרים. כמו כן, מצאנו כי בזרמה הממוינת ל-Y התקבל ביטוי של BOV97M ואילו בזרמה הממוינת ל-X, לא התקבל ביטוי שלו. מכיוון שהפקת ה-DNA נעשתה לאחר פרוצדורה של swim-up, כלומר על תאים נעים, ניתן לומר באופן ברור כי תאי זרע מזרמה ממוינת ל-Y יש ויובילו לשיעור עוברים זכריים גבוה, וכי תאי זרע מזרמה ממוינת ל-X יובילו לשיעור גבוה של עוברים נקביים.



איור 7. תמונה מייצגת של הרצה בגל של DNA מתאי זרע. הורצו 2 דוגמאות של זרמה לא ממוינת- "אסא" וג'ונסון", דוגמא של זרמה ממוינת ל-X ודוגמא של זרמה ממוינת ל-Y; Positive M – רקמה של כליה מזכר; Positive F – רקמה של כליה מנקבה; Negative – דוגמא ללא DNA לביקורת השיטה. לכל דוגמא הורצו 2 באריות, אחת עבור תוצר כנגד פריימר Autosomal (השמאלי) והשנייה כנגד פריימר BOV97M (הימני).

שנה שלישית

ביצענו סדרה של ניסויים ובחנו את הקשר בין המורפוקינטיקה של העובר המתפתח ובין זוויג העובר. לטובת כך, נעשה שימוש במודל של הפקת עוברים כפי שתואר עבור השנה השנייה, עם מעט שינויים. בקצרה, ביציות נשאבו משחלות שמקורן מבית המטבחים. הביציות עברו תהליך של הבגרה למשך 22 שעות. בסיומן, הביציות חולקו ל-3 קבוצות ניסוי באופן רנדומלי והופרו עם זרמה ממקור שונה: (1) זרמה לא ממוינת; (2) זרמה ממוינת ל-Y; (3) זרמה ממוינת ל-X. לצורך ההפריה, הביציות עם תאי הזרע נכנסו לאינקובטור למשך 18 שעות. לאחר מכן, נעשתה הסרה של תאי הקומולוס מהתאים, והזיגוטות הועברו להדגרה למשך 8 ימים נוספים (~190 שעות) במערכת המורכבת מאינקובטור ומצלמה – Time lapse system (Yaacobi-Artzi et al., 2022). מערכת זו מאפשרת מעקב רציף אחר התפתחות העובר וזיהוי מאפיינים מורפוקינטיים. עבור כל זיגוטה נעשה מעקב פרטני. המאפיינים המורפוקינטיים שנבחנו היו:

(1) זמני החלוקה של הזיגוטות לעוברים בני 2, 3, 4, 5, 6, 7 ו-8 תאים, זמן התפתחות למורולה וזמן היווצרות הבלסטוציסט.

(2) אופי החלוקה, נורמלי או אבנורמלי. מופע חלוקה נורמלי מוגדר כחלוקה סימטרית של תאי העובר משלב הזיגוטה לעובר בן 2 תאים שווים בגודלם. תת קטגוריה של מופע החלוקה הנורמלי גם כן אופיינה בהתאם לקינטיקה של העוברים. בכלל זה, עובר אשר עבר חלוקה סינכרונית והציג חלוקה לעובר בן 2, 4 ו-8 תאים או עובר אשר הציג חלוקה אסינכרונית והציג חלוקה לעובר בן 3, 5, 6, ו/או 7 תאים לאורך שלבי ההתפתחות. מופע חלוקה אבנורמלי מוגדר כחלוקה של הזיגוטה לאחד מהמופעים: unequal – חלוקה לעובר בן 2 תאים אשר אינם שווים בגודלם, direct – חלוקה ישירה משלב הזיגוטה לעובר בן 3 או 4 תאים (כלומר דילג על חלוקה ל-2 תאים) או reverse – חלוקה של הזיגוטה לעובר בן 2 תאים ומיד לאחר מכן, נעשה איחוי בחזרה לתא אחד.

(3) מורפולוגיה של העוברים- המשך ההתפתחות ובשלבי החלוקה השונים, העוברים נבחנו וקוטלגו כבעלי איכות fair, good או poor. איכות העובר נקבעה לפי אחוז הפרגמנטציה, הצורה ו/או גודל התאים של העובר. איכות הבלסטוציסטים גם כן נבחנה, על בסיס ארגון ה- inner cell mass (ICM) והטרופקטודרם. לצד המאפיינים המורפוקינטיים, בחנו את שיעור ההתפתחות העוברית בהתבסס על שיעור החלוקה לעוברים בני 2-4 תאים (כמדד להצלחת הפריה) ושיעור העוברים שהתפתחו לשלב הבלסטוציסט.

עוברים אשר התפתחו לשלב הבלסטוציסט נאספו לאפיון הזוויג שלהם. לצורך כך, הוסרה הזונה פלוצידה מכל עובר וזאת על מנת לוודא כי אין שאריות של תאי זרע דבוקים לעובר שיתנו תמונת שווא של הזוויג. לאחר מכן, העוברים נשטפו ונשמרו ב-80°C עד להפקת DNA. הפקת DNA נעשתה על ידי שימוש בקיט High Pure PCR Template Preparation Kit כפי שתואר בשנה השנייה. לאחר

מכן, כל דגימת DNA נלקחה ל- PCR להגברה של המקטעים BOV97M ו-TSPY על מנת לבחון את הזוויג של העובר.

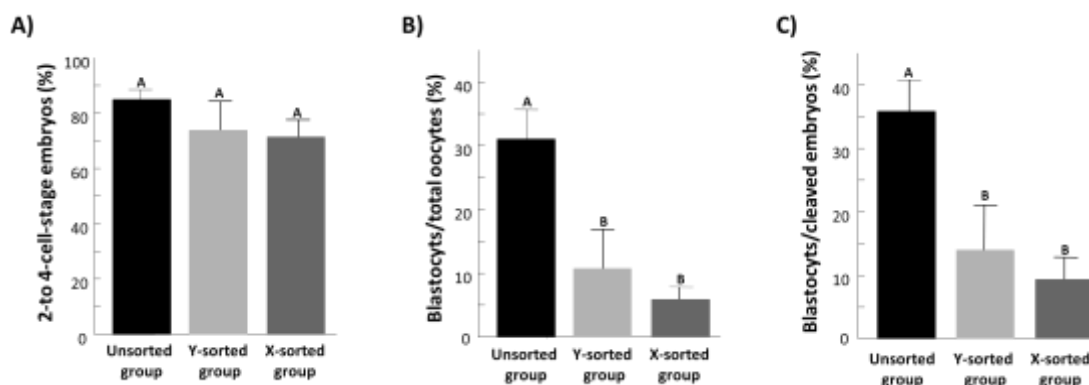
הקשר בין מורפוקינטיקה וזוויג העובר

על מנת לבחון את הקשר בין המורפוקינטיקה נקטנו בשתי גישות מקבילות. גישה ראשונה - נעשה מעקב ורישום של מאפייני המורפוקינטיקה לאחר הפריה עם זרמה לא ממוינת. תחילה, הפרדנו בין העוברים אשר התפתחו לשלב הבלסטוציסט לבין אלו שנעצרו בשלבים מוקדמים יותר. התמקדנו רק בעוברים אשר התפתחו לבלסטוציסטים. קבענו את זוויג של העוברים על בסיס ה-DNA, ובחנו האם בלסטוציסטים נקביים מציגים מאפיינים מורפוקינטיים שונים מהזכריים. לאחר מכן, ביצענו מבחן Discriminative Correlation Analysis על מנת לבחון מהו אחוז המתאם בין הקינטיקה של העוברים לשלבי החלוקה השונים (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 תאים, מורולה ובלסטוציסט) ובין הזוויג (זכר ונקבה).

גישה שניה - בחנו האם נוכל לחזות את זוויג העובר המתפתח לאחר הפריה עם זרמה ללא ממוינת תוך שימוש במאפיינים קינטיים ספציפיים של עוברים זכריים ונקביים.

תוצאות שנה שלישית

לאור ההבדלים שקיבלנו במאפיינים תאיים בין זרמה ממוינת לזרמה ללא ממוינת (תוצאות שנה ראשונה), בחנו את שיעור ההתפתחות העוברית המתקבל בעקבות הפריה עם זרמה ממוינת ולא ממוינת. לא נמצא הבדל בשיעור החלוקה של העוברים ל- 2-4 תאים בין סוגי הזרמות (איור 8A). אולם, התקבל הבדל מובהק ($P=0.0006$) בשיעור העוברים שהתפתחו לשלב הבלסטוציסט (איור 8B,C). הפריה עם זרמה ממוינת, הן ל-X והן ל-Y, הובילה לשיעור בלסטוציסטים נמוך משמעותית בהשוואה לשימוש בזרמה לא ממוינת. תוצאה זו איננה מפתיעה במיוחד, שכן, תהליך המיון ידוע כפוגע באיכות התאים כפי שבא לידי ביטוי בפרמטרים תאיים, בשנה הראשונה (טבלה 1).



איור 8. התפתחות עוברית לאחר הפריה עם זרמה ממוינת ולא ממוינת. (A) בגרף מוצג שיעור החלוקה לעוברים בני 2-4 תאים לאחר הפריה עם זרמה לא ממוינת, זרמה ממוינת ל-X וזרמה ממוינת ל-Y. (B) בגרף מוצג שיעור העוברים שהתפתחו לשלב הבלסטוציסט מסך כל הביציות. (C) בגרף מוצג שיעור העוברים שהתפתחו לשלב הבלסטוציסט מסך העוברים שעברו חלוקה. הניסוי כלל לפחות 3 חזרות ביולוגיות עם 252 ביציות (זרמה לא ממוינת), 304 ביציות (זרמה ממוינת ל-X) ו-112 ביציות (זרמה ממוינת ל-Y). אותיות שונות מעל העמודות מעידות על הבדל מובהק בין קבוצות הניסוי. ממצאים מוצגים כ- Means \pm SEM.

בהמשך, התמקדנו בהבדלים בין עוברים אשר התפתחו מזרמה ממוינת ל-X בהשוואה ל-Y, וזאת על מנת לבחון האם העוברים מציגים מאפיינים מורפוקינטיים שונים. השוואה בין עוברים שהתפתחו לבלסטוציסט ובין אלו שנעצרו בשלבי התפתחות מוקדמים יותר העלתה כי עוברים שהתפתחו לשלב הבלסטוציסט עברו חלוקה לעוברים בני 2, 3 ו-4 מהירה יותר מאשר אלו שלא התפתחו. ממצא זה היה נכון הן לגבי הזרמה הממוינת ל-X והן ל-Y (טבלה 2). לעומת זאת, לא נמצאו הבדלים במורפולוגיה של העוברים שנעצרו לעומת אלו שהתפתחו לבלסטוציסט (טבלה 3).

טבלה 2. מאפיינים קינטיים בין עוברים שהתפתחו או נעצרו לאחר הפריה עם זרמה ממוינת ל-X או ל-Y.

Embryonic stage	X-sorted		Y-sorted	
	Arrested ¹ hpf (n)	Developed ¹ hpf (n)	Arrested ¹ hpf (n)	Developed ¹ hpf (n)
2-cell	41.6±0.6 (189)	32.44±0.99* (17)	35.5±0.73 (64)	31.6±1.2* (13)
3-cell	47.4±0.9 (98)	41.1±2.1* (9)	42.5±1.02 (42)	30.9±1.9* (2)
4-cell	51.9±1.7 (93)	42.5±1.9* (16)	47.3±1.8 (44)	40.8±1.0* (15)
5-cell	60.2±2.6 (63)	60.1±6.9 (11)	56.83±3.14 (29)	61.2±12.3 (4)
6-cell	64.2±3.3 (49)	69.8±7.0 (16)	60.7±3.5 (30)	56.5±5.4 (14)
7-cell	76.28±4.13 (35)	88.74±10.3 (9)	76.25±6.40 (16)	74.94±8.79 (7)
8-cell	94.9±6.3 (18)	107.7±4.2 (14)	92.3±6.7 (10)	89.6±4.8 (14)
Morula	133.2±1.7 (2)	127.7±4.2 (18)	---	119.1±1.8 (15)

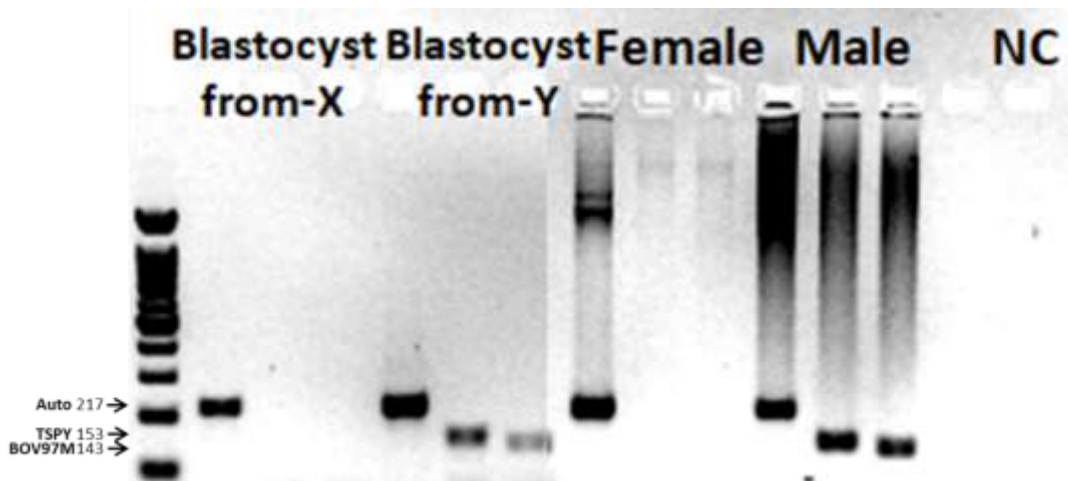
¹hpf=hours postfertilization.

*כוכבית מעידה על הבדל מובהק בין עוברים שנעצרו ובין כאלו שהתפתחו לבלסטוציסטים בתוך כלל האוכלוסייה של העוברים שהופרו עם זרמה ממוינת ל-X או ל-Y.
 הנתונים מוצגים כ-Mean±SEM

טבלה 3. מאפיינים מורפולוגיים בין עוברים שהתפתחו או נעצרו לאחר הפריה עם זרמה ממוינת.

Embryonic stage	Morphology score	X-sorted		Y-sorted	
		Arrested % (n)	Developed % (n)	Arrested % (n)	Developed % (n)
2-cell	Good	59.3 (112/189)	78.6 (11/14)	65.6 (40/61)	90.0 (9/10)
	Fair	34.9 (66/189)	21.4 (3/14)	31.1 (19/61)	10.0 (1/10)
	Poor	5.8 (11/189)	---	3.3 (2/61)	---
4-cell	Good	54.3 (50/92)	53.3 (8/15)	50.0 (22/44)	53.8 (7/13)
	Fair	29.3 (27/92)	46.7 (7/15)	31.8 (14/44)	30.8 (4/13)
	Poor	16.3 (15/92)	---	18.2 (8/44)	15.4 (2/13)
8-cell	Good	35.3 (6/17)	50.0 (6/12)	40.0 (4/10)	28.6 (2/7)
	Fair	52.9 (9/17)	41.7 (5/12)	50.0 (5/10)	57.1 (4/7)
	Poor	11.7 (2/17)	8.3 (1/12)	10.0 (1/10)	14.3 (1/7)

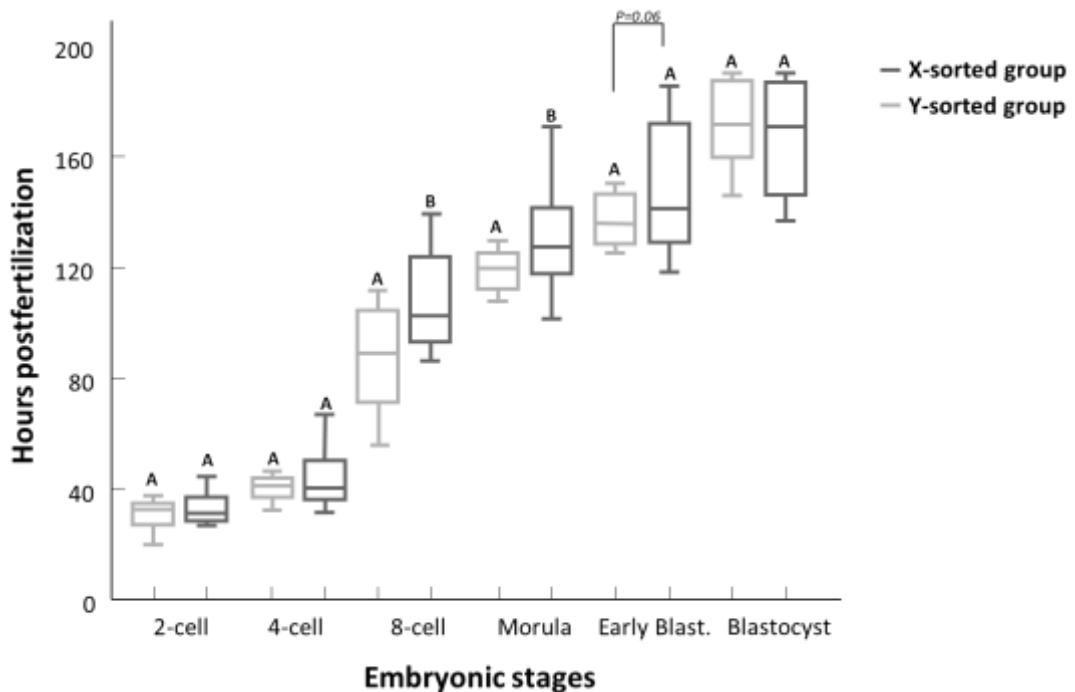
בהתאם לממצאים אלו, התמקדנו באיתור מאפיינים מורפולוגיים רק בעוברים אשר התפתחו לשלב הבלסטוציסט. בנוסף נעשתה הפקת DNA של העוברים ולאחריה- PCR על מנת לאשש כי בעקבות שימוש בזרמה ממוינת X או Y אכן מתקבל עובר הזוויג הצפוי, נקבה או זכר בהתאמה. לא התקבל מתאם של 100% בין הזרמה ובין הזוויג המצופה. מבין הבלסטוציסטים שהתפתחו לאחר הפריה עם זרמה ממוינת ל-X, נמצא כי 76.47% מהם אכן היו נקבות (13/17) ואילו מאלו שעם זרמה ממוינת ל-Y, 80% (12/15) (איור 9). לאור זאת, המשך העבודה והניתוח הסטטיסטי התבססו רק על בלסטוציסטים שהיו במתאם מלא בין הזרמה והזוויג.



איור 9. תמונה מייצגת של הרצה בג'ל של DNA מבלסטוציסטים. משמאל לימין, בלסטוציסט שהתפתח מזרמה ממוינת ל-X (באריות 2-4), בלסטוציסט שהתפתח מזרמה ממוינת ל-Y (באריות 6-8), רקמה מנקבה (באריות 9-11), רקמה מזכר (באריות 12-14) ביקורת שלילית (ללא DNA, באריות 15-17).

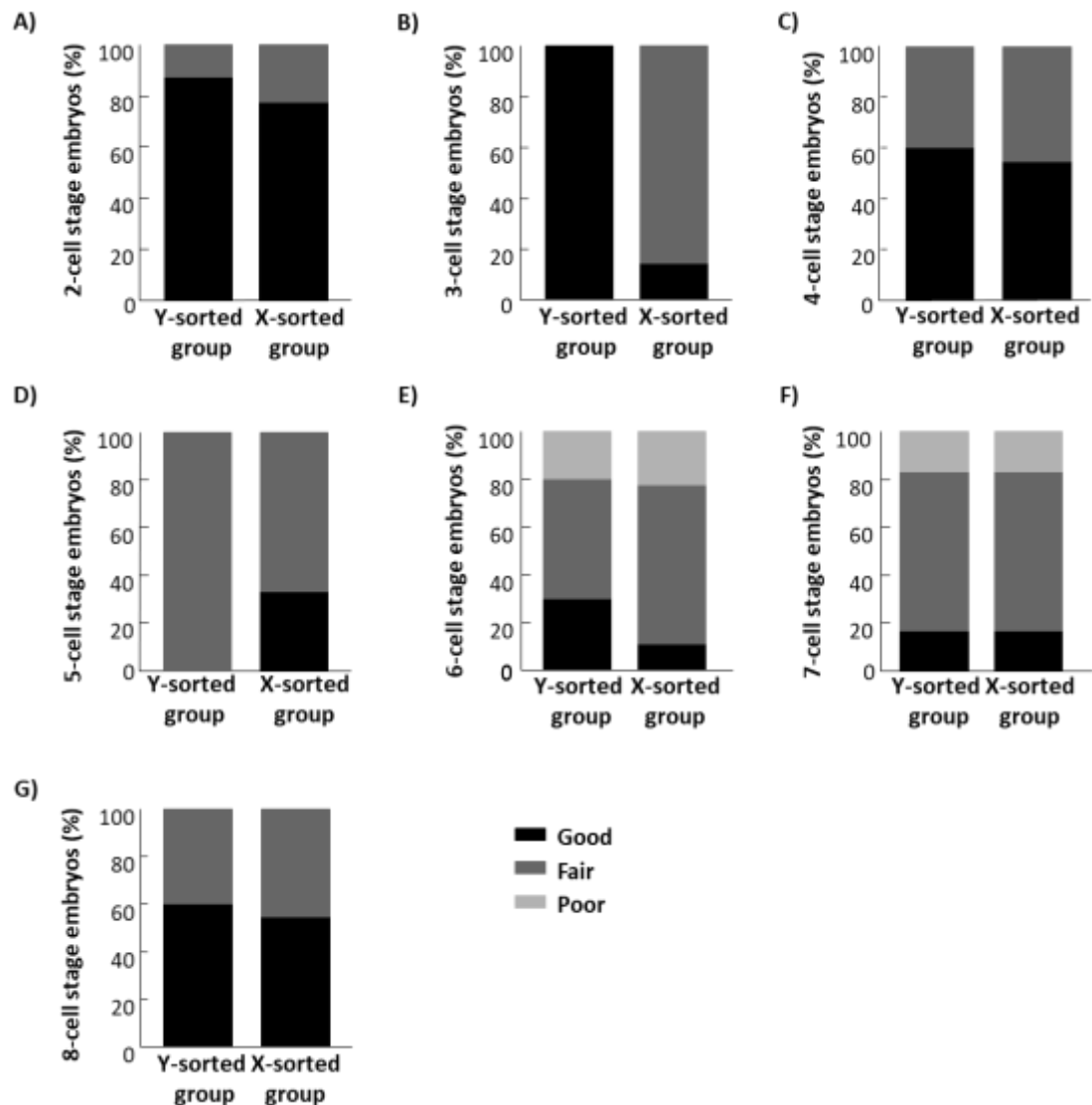
איתור מאפיינים מורפוקינטיים בין זרמה ממוינת ל-X ל-Y

עוברים אשר התפתחו לבלסטוציסט הציגו קינטיקה שונה כתלות בסוג הזרמה. נמצא, כי בלסטוציסטים אשר התפתחו מזרמה ממוינת ל-Y היו מהירים יותר בחלוקתם לעוברים בני 8 תאים ולשלב המורולה בהשוואה לאלו שמזרמה ממוינת ל-X (איור 10). עוד נמצא כי הבלסטוציסטים הזכריים נטו להיות מהירים יותר גם בשלב ה-early blastocyst בהשוואה לנקביים.



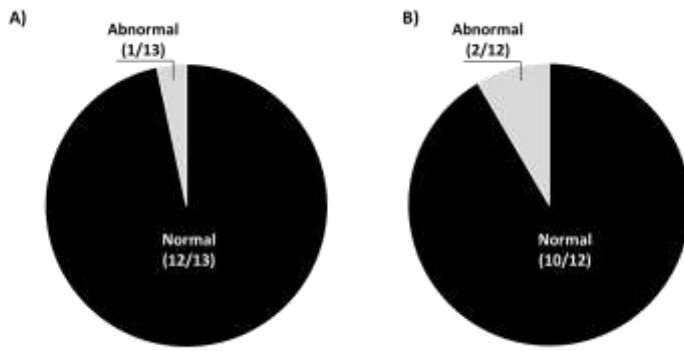
איור 10. קינטיקת ההתפתחות של בלסטוציסטים שהתפתחו מזרמה ממוינת ל-X ול-Y.

בהתייחס לאפיון המורפולוגיה של העוברים, לא נמצאו הבדלים בין בלסטוציסטים שהתפתחו מזרמה ממוינת ל-X לאלו מ-Y (איור 11).



איור 11. מורפולוגיה של עוברים שהתפתחו מזרמה ממוינת ל-X או ל-Y. העוברים קוטלגו כ- good, fair או poor בכל אחד משלבי ההתפתחות העוברית: עוברים בני 2 תאים (A), בני 3 תאים (B), בני 4 תאים (C), בני 5 תאים (D), בני 6 תאים (E), בני 7 תאים (F) ובני 8 תאים (G).

בהמשך, נבחן אופי החלוקה של הבלסטוציסטים. לא נמצא הבדל ביחס חלוקה נורמלית חלוקה לאבנורמלית בין בלסטוציסטים שהתפתחו מזרמה ממוינת ל-X בהשוואה ל-Y (איור 12). יחד עם זאת, שיעור החלוקה הנורמלית היה גבוהה יחסית לחלוקה אבנורמלית בשתי הקבוצות. עוד נציין כי מכלל העוברים עם חלוקה הנורמלית, מרבית הבלסטוציסטים הציגו אופי חלוקה אסימטרי בשתי הקבוצות.

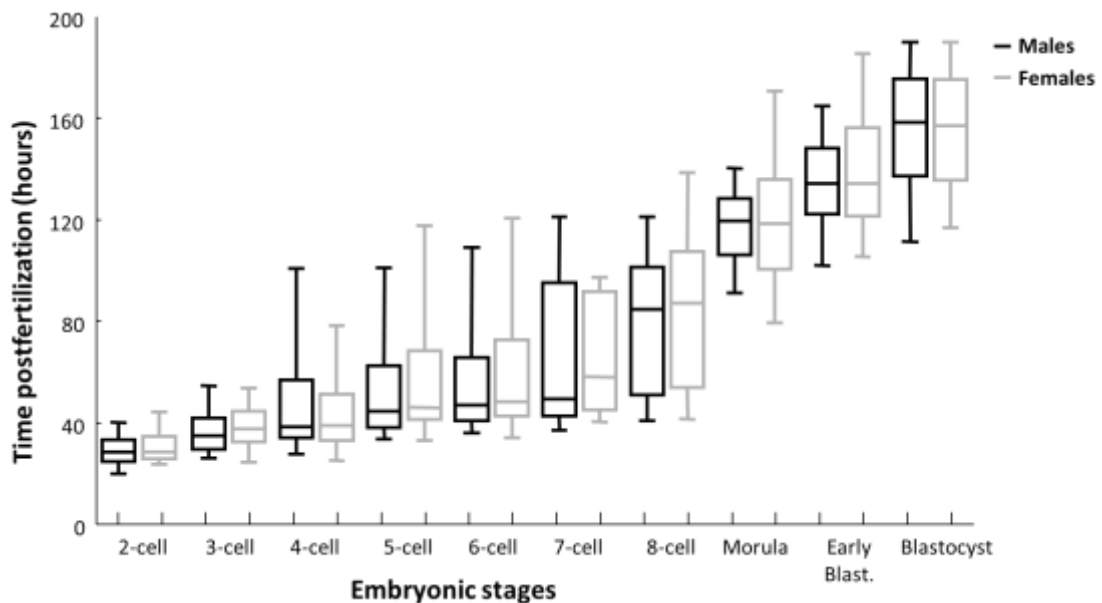


איור 12. התפלגות העוברים לפי אופי החלוקה נורמלית או אבנורמלית. (A) מוצג פאי של התפלגות הבלסטוציסטים לאלו שהציגו מופע נורמלי ואבנורמלי לאחר הפריה עם זרמה ממוינת ל-X. (B) מוצג פאי של התפלגות הבלסטוציסטים לאלו שהציגו מופע נורמלי ואבנורמלי לאחר הפריה עם זרמה ממוינת ל-Y.

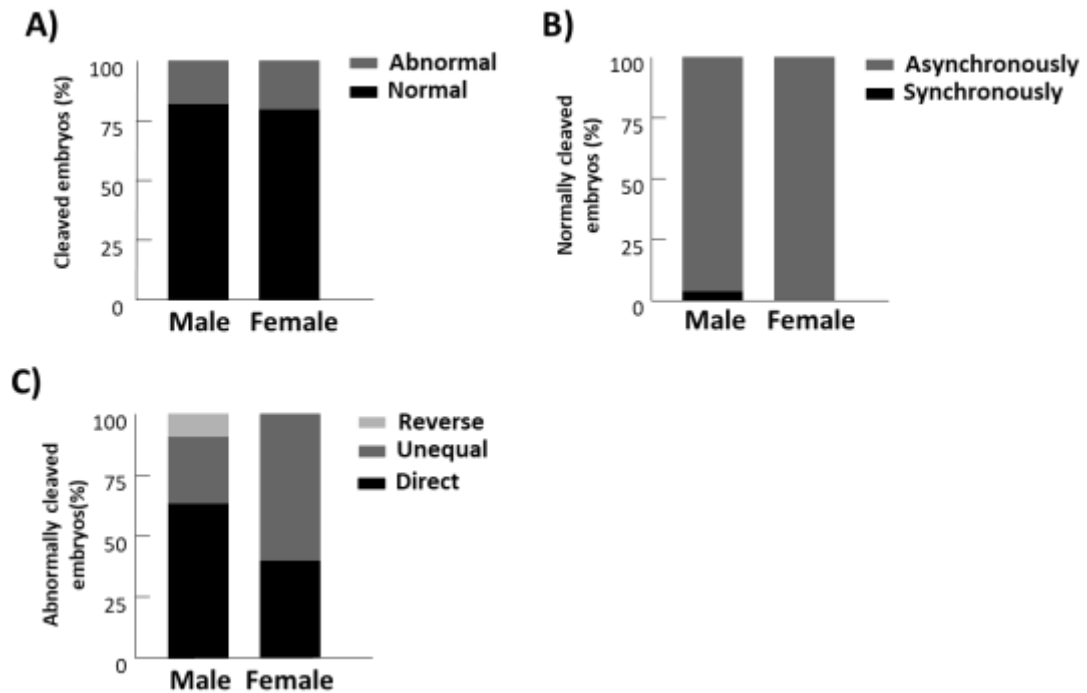
עד כה מסתמן כי בלסטוציסטים זכריים מציגים חלוקה קינטית מהירה יותר לעומת עובריים נקביים בשלוש נקודות ציון לאורך ההתפתחות העוברית: מהפרייה עד חלוקה ל-8 תאים, עד להתפתחות המורולה ועד להתפתחות ו-early blastocyst. הנקודות אלו הוגדרו כסמנים אפשריים לחיזוי זיווג העובר ונבחנו בניסוי המשך.

חיזוי זיווג העובר על בסיס מדדים מורפוקינטיים

בניסוי זה האנליזה התבססה על 112 בלסטוציסטים שנלקחו מ-17 חזרות ביולוגיות שונות. מתוכם נמצא כי 55.36% היו זכרים ו-44.64% נקבות. לא נמצאו הבדלים בקינטיקה של העוברים לאורך שלבי ההתפתחות השונים (איור 13); לא נמצאו הבדלים במופע המורפולוגי של העוברים לאורך שלבי ההתפתחות השונים; לא נמצא הבדל במופע החלוקה לנורמלי ואבנורמלי בין בלסטוציסטים נקביים לזכריים (איור 14).



איור 13. קינטיקת ההתפתחות של בלסטוציסטים זכריים ונקביים שהתפתחו מזרמה לא ממוינת.



איור 14. התפלגות העוברים לפי אופי החלוקה נורמלית או אבנורמלית. (A) מוצגת ההתפלגות של בלסטוציסטים נקביים וזכריים שהציגו מופע נורמלי ואבנורמלי. (B) מוצגת ההתפלגות הבלסטוציסטים הזכריים והנקביים לפי חלוקה סינכרונית ואסינכרונית. (C) מוצגת ההתפלגות של בלסטוציסטים נקביים וזכריים לפי חלוקה אבנורמלית ל- direct, reverse או unequal.

חיזוי- גישה ראשונה

במבחן קורלציה (n=112) בין מדדים קינטיים לאורך שלבי ההתפתחות של העוברים ובין זווית העובר נמצאה קורלציה גבוהה יותר בין הזכרים לעומת הנקבות במספר שלבי התפתחות (טבלה 4). לדוגמא, זמני החלוקה לעובר בן 4 תאים או 6 תאים הציגו מתאם של למעלה מ- 78% עם הזווית הזכרי. לעומת זאת עבור העובריים הנקביים, אחוז המתאם הגבוה ביותר היה 59.2% עם זמן ההתפתחות ל- early blastocyst.

טבלה 4. קורלציה בין זווית העובר ובין זמני החלוקה לאורך ההתפתחות העוברית.

Kinetic parameter	Male blastocysts		Female blastocysts	
	Predicted rate %	n/total blastocyst	Predicted rate %	n/total blastocyst
2-cell	52.7	29/55	39.1	18/46
3-cell	21.2	7/33	57.1	16/28
4-cell	78.0	39/50	42.0	21/50
5-cell	68.4	26/38	30.8	12/39
6-cell	81.3	39/48	25.6	10/39
7-cell	68.2	30/44	48.6	17/35
8-cell	64.5	40/62	42.9	21/49
Morula	59.7	37/62	51.0	25/49
Early blastocyst	43.5	27/62	59.2	29/49
Blastocyst	52.0	26/50	50.0	20/40

חיזוי- גישה שנייה

נעשה חיזוי לעובריים נקביים וזכריים תוך שימוש בשלושה מאפיינים שהוגדרו בעקבות שימוש בזרמה ממוינת: זמן החלוקה לעובריים בני 8 תאים, זמן ההתפתחות למורולה וזמן ההתפתחות ל- early blastocyst. החיזוי לזוויג נעשה על בסיס הזמן הממוצע \pm סטיית התקן של כל אחד מזמני החלוקה שציינו.. לדוגמא, כל עובר אשר זמן החלוקה שלו לשלב ה-8 תאים נפל בתחום של 87.54 ± 17.32 נקבע כזכר, כל עובר אשר זמן החלוקה שלו לשלב ה-8 תאים נפל בתחום של 107.49 ± 16.39 נקבע כנקבה. עובריים שזמן החלוקה ל-8 תאים נפל בזמנים חופפים הוגדר כלא ידוע. גם כאן ראינו כי הסיווג לזכרים היה גבוה יותר ביחס לנקבות (70.5% לעומת 34.8%). נעשה חיזוי על בסיס פרמטר יחיד ובנוסף נבחן שילוב של שניים או שלושה מאפיינים בו זמנית (טבלה 5)

טבלה 5. סיווג בלסטוציסטים לזכריים ונקביים על בסיס מדדים מורפוקינטיים

	Time from fertilization ¹	Sex predicated		
		% Male (n)	% Female (n)	% Unknown ² (n)
Single kinetic parameter	8-cell stage	70.5 (79)	5.4 (6)	24.1 (27)
	Morula	31.2 (35)	14.3 (16)	54.5 (61)
	Early blastocyst	25.0 (28)	18.7 (21)	56.2 (63)
Two kinetic parameters	8-cell stage & morula	44.6 (50)	33.0 (37)	22.3 (25)
	8-cell stage & early blastocyst	37.5 (42)	28.6 (32)	33.9 (38)
	Morula & early blastocyst	27.7 (31)	25.0 (28)	47.3 (53)
Three kinetic parameters	8-cell stage & morula & early blastocyst	42.7 (48)	34.8 (39)	22.3 (25)

¹ ממוצע וסטית תקן לחיזוי עבור זמן החלוקה של עובריים זכריים ל-8 תאים הוא 87.54 ± 17.32 , לשלב המורולה הוא 119.31 ± 6.77 , לשלב ה- early blastocyst הוא 137.16 ± 8.43 . ממוצע וסטית תקן לחיזוי עבור זמן החלוקה של עובריים נקביים ל-8 תאים הוא 107.49 ± 16.39 , לשלב המורולה הוא 129.65 ± 18.42 ולשלב ה- early blastocyst הוא 148.02 ± 20.895 .

² אאוכלוסיית ה- unknown היא עובריים אשר לא ניתן היה לחזות את הזוויג שלהם בגלל חפיפת זמנים בין העובריים הנקביים והזכריים בכל שלב התפתחותי. hours post fertilizaion = hpf*

על מנת לאשש את החיזוי שלנו, בדקנו את המתאם בין הסיווג ובין המטען הגנטי (קרי ה- DNA) של אותם בלסטוציסטים. התוצאות מוצגות בטבלה 6. על בסיס שילוב של שני מדדים קינטיים (חלוקה ל-8 תאים ו- early blastocyst כמו גם חלוקה ל-8 תאים ושלב המורולה) נמצא מתאם של מעל ל- 80% בין החיזוי לזוויג ובין האימות שלו בזכרים. בהתייחס לעובריים הנקביים, המתאם הגבוה ביותר (>50%) נמצא עם זמן החלוקה ל- early blastocyst.

טבלה 6. אימות סיווג הזוויג על בסיס ה- DNA ביחס לאחוזי החיזוי על בסיס ערכים מורפוקינטיים

		DNA validation			
		Male		Female	
		True ¹	False ²	True ¹	False ²
Single kinetic parameter	8-cell stage	44/79 (55.7%)	35/79 (44.3%)	0/6 (0.0%)	6/6 (100%)
	Morula	16/35 (45.7%)	19/35 (54.3%)	5/16 (31.3%)	11/16 (68.7%)
	Early blastocyst	11/28 (39.3%)	17/28 (60.7%)	11/21 (52.4%)	10/21 (47.6%)
	8-cell stage & morula	40/50 (80%)	10/50 (20%)	2/37 (5.4%)	35/37 (94.6%)
Two kinetic parameters	8-cell stage & early blastocyst	37/42 (88.1%)	5/42 (11.9%)	3/32 (9.4%)	29/32 (90.6%)
	Morula & early blastocyst	20/31 (64.5%)	11/31 (35.5%)	5/28 (17.9%)	23/28 (82.1%)
Three kinetic parameters	8-cell stage & morula & early blastocyst	36/48 (75%)	12/48 (25%)	7/39 (17.9%)	32/39 (82.1%)

True¹ = מתייחס להתאמה בין החיזוי של הזוויג (זכר או נקבה) על בסיס הקינטיקה וה- DNA.
False² = מתייחס לחוסר התאמה בין החיזוי של הזוויג (זכר או נקבה) על בסיס הקינטיקה וה- DNA.

סיכום ומסקנות:

1. ככלל, זרמה ממוינת (Y, X) שונה במאפיינים תאיים בהשוואה לזרמה לא ממוינת, והתאפיינה בהתפתחות עוברית נמוכה יותר.
2. עוברים אשר התפתחו מזרמה ממוינת שונים בקינטיקה שלהם כתלות בזוויג. יש לבסס ממצא זה עם מדגם גדול יותר.
3. הסיכוי לחזות עובר זכרי על בסיס קינטיקה וזמני חלוקה שונים הוא גבוה יותר מזה של הסיכוי לחזות עובר נקבי.
4. ההבנות שהתקבלו בעבודה זו יש בהם כדי לתרום בממשק רבייה בו מתקיים ייצור עוברים in vitro והשתלת עוברים ממוינים ללא צורך בשימוש בזרמה ממוינת.

תודות

עבודה זו נעשתה בתמיכתה האדיבה של קרן המחקר של מועצת החלב.

- 1) Boro P, Naha BC and Madkar A (2016). Sexing of semen in bulls: A mini review. *Biology International journal of applied research*. 2(4):460–462.
- 2) Holden SA and Butler ST (2018). Review: Applications and benefits of sexed semen in dairy and beef herds. *Animal*. 12(s1):s97–s103.
- 3) Li Y, Kalo D, Zeron Y and Roth Z (2016). Progressive motility – a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines. *Zygote*. 24(1):70-82.
- 4) Orgal S, Zeron Y, Elior N, Biran D, Fridman E, Druker S and Roth Z (2012) Season-induced changes in bovine sperm motility following freeze-thaw procedure, *Journal of Reproduction and Development*. 58:212-218.
- 5) Sarkar S, Jolly DJ, Friedmann T and Jones OW (1984). Swimming behavior of X and Y human sperm. *Differentiation*. 27(2):120-5.
- 6) Shettles LB (1973). Sperm morphology, cervical milieu, time of insemination and sex ratios. *Andrologie*. 5(3):227-230.
- 7) Yaacobi-Artzi S, Kalo D, Roth Z (2020) Association between the morphokinetics of in-vitro-derived bovine embryos and the transcriptomic profile of the derived blastocysts. *PLoS ONE* 17(10): e0276642.