

## דוח מדעי מסכם למחקר 362-0775

### שם המחקר:

### מעורבות המערכת האנדוקנבינואידית בדפוס התנועה הפרוגרסיבית ואיכות הזרמה בפרים

הנהלת ענף בקר לחלב - ועדת פיסולוגיה ורבייה

מגישים: דר' מאיה זכות - המכון לחקר בע"ח, מכון וולקני [mayak@volcani.agri.gov.il](mailto:mayak@volcani.agri.gov.il)

טלפון 0528306552

פרופ' צבי רוט – הפקולטה לחקלאות, פיסולוגיה של הרבייה [z.roth@mail.huji.ac.il](mailto:z.roth@mail.huji.ac.il)

טלפון 0505440070

טניה קוגן – הפקולטה לחקלאות, פיסולוגיה של הרבייה

ד"ר ינה בוטנקו – המכון לחקר בע"ח, מכון וולקני

### תקציר מדעי

**רקע מדעי:** ממשק הרבייה ברפת החלב בארץ ובעולם מבוסס על הזרעות מלאכותיות ומתאפיין בשימוש בזרמה קפואה. איכות הזרמה מהווה פקטור משמעותי בממשק הרבייה האינטנסיבי. ירידה או פגיעה באיכות הזרמה במהלך תהליכי השימור בהקפאה יכולה להשפיע על כושר ההפריה ושעור ההתעברות. איכות זרמה ניתנת להערכה על ידי מדדים פיזיולוגיים, מדדים ביוכימיים והקורלציה ביניהם. מספר תאי הזרע הנעים בתנועה פרוגרסיבית (תנועה בקו ישר קדימה) משמש כמדד לקביעת איכות זרמה. מחקרים שנעשו בשנים האחרונות מצביעים על מעורבות המערכת האנדוקנבינואידית (ECS) בתהליכים רבים הקשורים למערכת רבייה הזכרית. חומר המוצא, כמו גם תוצר הפירוק, של האנדוקנבינואידים הראשיים, AEA ו-2-AG, הינו arachidonic acid (AA), חומצת שומן רב בלתי רוויות ממשפחת PUFA שיש לה תפקיד מרכזי בבניית ממברנות התאים. בעבודה קודמת מצאנו קשר בין ריכוז חומצות שומן PUFA בתאי זרע להישרדות תאים פרוגרסיביים. בהתאם לכך, ניתן להניח כי יש קשר בין המערכת האנדוקנבינואידית, הרכב ממברנות התאים ותפקודם. בעבודה הנוכחית, בחנו מהו הקשר בין דפוס התנועה פרוגרסיבית לבין מרכיבי ה-ECS בתאי הזרע ובנוזל הזרע של פרים.

**מטרות המחקר:** המטרה הכללית של המחקר היא לבחון את הקשר בין תנועה פרוגרסיבית של תאי זרע והמערכת האנדוקנבינואידית. מטרות ספציפיות: (1) לאפיין את הפרופיל האנדוקנבינואידית בנוזל הזרע ולבחון האם קיים קשר בין הפרופיל האנדוקנבינואידית לדפוס התנועה הפרוגרסיבית. (2) לאפיין את נוכחות רצפטורים קנבינואידיים (CB1, CB2, TRPV-1) ואת האנזים FAAH בתאי זרע ולבחון האם קיים קשר בין מרכיבים אלו ודפוס תנועה פרוגרסיבית. (3) לבחון את הקשר בין מרכיבי המערכת האנדוקנבינואידית והישרדות הפרוגרסיבית.

**הפעלת המחקר:** בשנה א' של המחקר נאספו 15 מירוקים מפרים שונים בהתאם ללוח הפרים לתקופה. המירוקים (5 מירוקים לקבוצה) שויכו ל-3 קבוצות על בסיס דפוס התנועה הפרוגרסיבית: גבוהה (HPM); מעל 74% תאים נעים פרוגרסיבית), בינונית (MPM); בין 60 ל 74% תאים נעים פרוגרסיבית) ונמוכה (LPM); עד 59% תאים נעים פרוגרסיבית) בהתייחס למאגר הנתונים באותה עת. כל מירוק עבר סרכוז להפרדה לפרקציה תאית (תאי זרע) ונוזלית (נוזל זרע). מכל דוגמא בנפרד, נוזל הזרע ותאי הזרע נלקחו לקביעת פרופיל חומצות שומן ולקביעת פרופיל

אנדוקנבינואידיים. בנוסף, מכל מירוק נלקחה דוגמא על מנת לבחון את הישרדות התאים בעלי תנועה פרוגרסיבית. הפרדה, זיהוי וכימות של חומצות השומן בנוזל הזרע ובתאי הזרע בוצעו לאחר מיצוי הפרקציה השומנית בעזרת כרומוטוגרפיה גזית. בשנות המחקר השנייה והשלישית ביצענו אנליזות של מרכיבי ה-ECS על ידי בחינת ביטוי החלבונים: CB1, CB2, TRPV1, FAAH, DAGLB, NAPE-PLD בתאי הזרע. מבחנים סטטיסטיים נערכו באמצעות תוכנת IBM SPSS Statistics 23.0. עבור כלל המדגם ועבור כל קבוצת ניסוי (HPM, MPM, LPM) בוצע ניתוח קורלציות לא-פרמטרי מסוג Spearman (two-tailed) בין מרכיבי המערכת האנדוקנבינואידיית, הן בנוזל הזרע והן בתאי הזרע. הבדלים בפרופיל האנדוקנבינואידי בין קבוצות התנועתיות הפרוגרסיבית נבחנו באמצעות ניתוח שונות One-way ANOVA ולאחריו בוצע מבחן פוסט-הוק מסוג Tukey HSD לצורך השוואות זוגיות בין הקבוצות. רוב המבחנים הסטטיסטיים נערכו באמצעות תוכנת IBM SPSS Statistics 23.0. הבדלים נבחנו באמצעות Independent samples T test ( $P \leq 0.05$ ). תוצאות ביטוי החלבון נבחנו בתוכנת GLM SAS (2002).

**תוצאות:** שיעור התאים בעלי מורפולוגיה תקינה ושיעור התאים הנעים פרוגרסיבית היו נמוכים משמעותית בקבוצה עם תנועתיות פרוגרסיבית נמוכה בהשוואה לקבוצות עם תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה ובינונית ( $P \leq 0.05$ ). שיעור כלל התאים הנעים היה גבוה בקבוצה עם תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה בהשוואה לקבוצות עם תנועתיות פרוגרסיבית נמוכה ( $P \leq 0.05$ ). אחוז החומצה האולאית (C18:1n9), חומצה ואצ'נית (C18:1n7) וחומצה לינולאית (C18:2n6) היו משמעותית נמוכות יותר בקבוצת HPM גם בתאי הזרע וגם בנוזל הזרע. לא נמצא הבדל משמעותי בין קבוצות חומצות שומן (רוויות, בלתי רוויות, ומסוג אומגה-3 ואומגה-6) בין תאי זרע עם תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה, בינונית ונמוכה. שיעור החומצה הארכידונית (C20:4n-6), אשר מהווה הן חומר מוצא לסינטזה של אנדוקנבינואידיים והן תוצר פירוק אנזימתי שלהם, היה נמוך בתאי זרע ובנוזל זרע בקבוצה HPM בהשוואה לאלה עם תנועתיות פרוגרסיבית נמוכה. לא נמצא הבדל משמעותי בין הקבוצות באחוז ה-DHA (22:6n-3) בתאי זרע, אך אחוז ה-DHA היה גבוה יותר בנוזל זרע של תאי זרע בעלי תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה בהשוואה לנוזל זרע עם תנועתיות פרוגרסיבית נמוכה. בנוסף, נמצא ששיעור חומצות שומן חד ורב-בלתי רוויות היה נמוך יותר בנוזל זרע של התאים בעלי תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה בהשוואה לנוזל זרע של התאים בעלי תנועתיות פרוגרסיבית בינונית. שיעור חומצות שומן מסוג אומגה 6 היה נמוך בנוזל זרע מקבוצת HPM בהשוואה לנוזל זרע של קבוצת MPM ( $P \leq 0.05$ ), אך לא נמצא הבדל בשיעור חומצות שומן מסוג אומגה 3 בין הקבוצות. בבחינת פרופיל אנדוקנבינואידי יחסי, שיעור 2-AG היה נמוך באופן מובהק בנוזל של תאי זרע בעלי תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה בהשוואה לנוזל זרע עם תנועתיות פרוגרסיבית בינונית. AEA לא זוהה בנוזל הזרע. בשנה ג' של המחקר בוצעה אנליזה כמותית אבסולוטית לרמות האנדוקנבינואידיים במעבדה של פרופ' יוסי תם באוניברסיטה העברית. לא זוהה AEA בנוזל הזרע. נמצאו רמות נמוכות בתאי הזרע אך לא נמצאו הבדלים מובהקים ברמות AEA בין קבוצות התנועתיות הפרוגרסיבית. בניתוח הקורלציות בנוזל הזרע לא נמצא מתאם בין רמות האנדוקנבינואידיים או קשרים מובהקים עם הישרדות תנועתיות פרוגרסיבית. ניתוח קורלציות בתוך כל אחת מקבוצות התנועתיות הפרוגרסיבית (HPM, MPM, LPM) לא הראה מתאמים מובהקים בין הפרמטרים שנבדקו. לעומת זאת, ניתוח הקורלציות בפרקציה התאית הצביע על קשרים חיוביים מובהקים בין מולקולות ממשפחת ה-N-acylethanolamines (AEA, OEA ו-PEA) והישרדות פרוגרסיבית. ניתוח קורלציות נפרד בתוך כל אחת מקבוצות התנועתיות הפרוגרסיבית הצביע על קשרים חיוביים חזקים בין מולקולות ממשפחת ה-N-acylethanolamines בקבוצת התנועתיות הפרוגרסיבית הגבוהה, בעוד שבקבוצות התנועתיות הבינונית והנמוכה (MPM, LPM) לא נמצאו קשרים מובהקים סטטיסטיים. כאשר נבחנה ההשפעה של תנועתיות הזרמה על ביטוי חלבונים

של ה-ECS בתאי הזרע, נמצא כי הביטוי של האנזים MGLL, אשר מפרק את האנדוקנבינואיד 2-AG, היה נמוך יותר באופן מובהק בתאי זרע עם תנועתיות נמוכה לעומת תאים עם תנועתיות גבוהה ( $P = 0.045$ ). לעומת זאת, הביטוי של האנזים DAGLB, אשר מסנטז את האנדוקנבינואיד 2-AG, היה גבוה יותר בתאים עם התנועתיות הנמוכה לעומת התנועתיות הגבוהה ( $P = 0.0002$ ). לא נמצא הבדל בביטוי הקולטנים CB1, CB2, TRPV1 או בביטוי האנזימים NAPEPLD, FAAH בין הקבוצות.

**דינון:** בבחינת רמות חומצות שומן ונגזרות-האנדוקנבינואידים התגלו מספר ממצאים מעניינים. ראשית, בהתייחס לחומצה ארכידונית (C20:4n6 AA) המשמשת כפרקורסור לסינתזה של אנדוקנבינואידים מסוג ארכידונוילגליצרולים התקבלה רמה נמוכה של חומצה ארכידונית הן בתאים והן בנוזל הזרע, שהופרדו מזרמה בעלת תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה. קבוצה זו התאפיינה גם ברמה נמוכה של האנדוקנבינואיד 2-AG. הרמה הנמוכה של AA שנמצאה באנליזה הכמותית של האנדוקנבינואידים בנוזל הזרע בקבוצת התנועתיות הפרוגרסיבית הגבוהה מחזקת את ההשערה כי זמינות פרקורסורים למרכיבי המערכת האנדוקנבינואידית קשורה לתפקוד תאי הזרע. לעומת זאת, ובניגוד לממצאי שנה א', היעדר הבדלים ברמות AA בתאי הזרע עצמם, עשוי להעיד כי ריכוז החומצה הארכידונית בסביבה החוץ-תאית (נוזל הזרע) ולא התוך-תאית היא הגורם המקשר בין המערכת האנדוקנבינואידית והתנועה הפרוגרסיבית. בדוגמאות זרמה מקבוצת ה-HPM, הן בתאי הזרע והן בנוזל הזרע נמצא אחוז נמוך יותר של חומצה לינולאית (C18:2n6) המהווה את המקור לסינתזה של החומצה הארכידונית. כמו כן, השיעור הכללי של חומצות שומן מסוג אומגה-6 היה נמוך יותר בפרי ה-HPM. לכן, ניתן לשער כי הזמינות הנמוכה יותר של חומצות שומן מסוג אומגה-6 בתאים ובנוזל הזרמה בפרי ה-HPM קשורים לרמות הנמוכות של האנדוקנבינואיד 2-AG. חומצה לינולאית (C18:2n6) משמשת גם כפרקורסור לאנדוקנבינואיד Linoleoyl-Ethanolamide (LEA), אשר רמתו הייתה גבוהה ביותר ב-MPM, בינונית ב-HPM והכי נמוכה ב-LPM. LEA בעצמו יכול להיקשר לרצפטורים קנבינואידים, ולכן אנו משערים כי LEA יכול להיות אנדוקנבינואיד פוטנציאלי שקשור למידת התנועתיות של הזרמה. ממצא נוסף נוגע ל-Myristoyl-Ethanolamide שהיא מולקולה ממשפחת האנדוקנבינואידים הנוצרת מחומצת שומן מיריסטית (C14:0) ואתנולמין. בעבודה זו, זרמה מקבוצה בעלת תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה התאפיינה גם ברמה גבוהה של החומצה המיריסטית (הן בתאים והן בנוזל הזרע), וגם בנוכחות גבוהה של Myristoyl-Ethanolamide בנוזל הזרע לעומת זרמות עם תנועתיות פרוגרסיבית מופחתת, דבר העשוי להצביע על כך שמולקולה זו גם מהווה ביומרקר פוטנציאלי בעלת קשר לתנועתיות הזרמה, אולם יש לבצע מחקרי המשך בכדי לבחון השערה זו. בהמשך המחקר מצאנו כי בהתאם לספרות, תאי הזרע של פרים מבטאים את מרכיבי ה-ECS, ואפיינו לראשונה בפריים בישראל ברמת החלבון את ביטוי הקולטנים העיקריים CB1, CB2, TRPV1 וכן של האנזימים העיקריים NAPE-PLD, FAAH, MGLL ו-DAGLB. באופן מעניין, רמות האנזימים DAGLB ו-MGLL, אשר מבקרים את רמת ה-2-AG ע"י סינתזה ופירוק בהתאמה, היו שונות בין קבוצות התנועתיות וביחס הפוך אחד לשני, רמת החלבון DAGLB הייתה נמוכה ביותר בתאים עם תנועה פרוגרסיבית גבוהה (HPM) וגבוהה ביותר באלו עם התנועה הנמוכה (LPM), לעומת זאת, רמת החלבון MGLL הייתה נמוכה ביותר בקבוצת LPM. אנו משערים כי לביטוי של אנזימים אלו ולהרכב חומצות שומן, יכולה להיות השפעה על הרכב האנדוקנבינואידים בתאי הזרע וכי הממצאים שהתקבלו מצביעים על המעורבות הפוטנציאלית של המערכת האנדוקנבואידית בדפוס התנועה הפרוגרסיבית בפריים. הממצא כי AEA לא זוהה בנוזל הזרע, לצד נוכחותו ברמות נמוכות בתאי הזרע, עשוי לשקף את אופייה של מולקולה זו כאנדוקנבינואיד בעל טווח פעולה קצר, הנתון לפירוק מהיר בעיקר באמצעות האנזים FAAH. היעדר מתאם בין מרכיבי המערכת האנדוקנבינואידית בנוזל הזרע, וכן היעדר קשרים עם הישרדות פרוגרסיבית עשויים

להצביע על כך שמרכיבי המערכת האנדוקנבינואידית בנוזל הזרע אינם בהכרח משקפים באופן ישיר את הדינמיקה המטבולית הקשורה לתפקוד התנועתי של תאי הזרע, לפחות עבור המולקולות שנבדקו במחקר זה. עוד ייתכן כי ריכוזי המרכיבים בנוזל הזרע מושפעים מגורמים נוספים, שאינם קשורים ישירות לתנועתיות הפרוגרסיבית. לסיכום, מחקר זה הראה לראשונה כי ישנו קשר בין דפוס התנועה הפרוגרסיבית בתאי זרע של פרים לבין מרכיבי ה-ECS. נראה כי ה-ECS בתאי הזרע מתאפיינת בארגון מטבולי מתואם, בעוד שבנוזל הזרע ייתכן שמתקיימת השפעה של גורמים נוספים שאינם קשורים באופן ישיר לתנועתיות הפרוגרסיבית. יש לציין כי ניתוחים בתוך הקבוצות בוצעו על תתי מדגמים קטנים, ולכן יש לפרש את הממצאים בזהירות. לאור ממצאי המחקר יש להמשיך ולבחון במחקרים נוספים את המנגנונים המקשרים בין ה-ECS לתנועתיות תאי זרע, ובהתאם לממצאים לבחון אסטרטגיות לביצוע מודולציות בהפעלת ה-ECS כאמצעי לשיפור התנועתיות של תאי זרע, כאמצעי חדשני לשיפור איכות הזרע בפריים.

## 1. מבוא ותיאור הבעיה

ממשק הרבייה ברפת החלב בארץ ובעולם מבוסס על הזרעות מלאכותיות ומתאפיין בשימוש בזרמה קפואה. איכות הזרמה מהווה פקטור משמעותי בממשק הרבייה האינטנסיבי. ירידה או פגיעה באיכות הזרמה במהלך תהליכי השימור בהקפאה יכולה להשפיע על כושר ההפריה ושעור ההתעברות. איכות זרמה ניתנת להערכה על ידי מדדים פיזיולוגיים, מדדים ביוכימיים והקורלציה ביניהם. מספר תאי הזרע הנעים בתנועה פרוגרסיבית (תנועה בקו ישר קדימה) משמש כמדד לקביעת איכות זרמה (Kathiravan et al., 2011; Morrell et al., 2018). עבודות קודמות ממעבדתנו הראו כי מספר התאים הנעים בתנועה פרוגרסיבית מהווה פקטור חשוב לתהליך ההפריה הן *in-vitro* (Li et al., 2016) והן *in-vivo* (Kogan et al., 2021). בעבודה קודמת מצאנו קשר בין הרכב הליפידים בממברנה של תאי הזרע ובין תנועה פרוגרסיבית והיכולת לשמר את התנועה הפרוגרסיבית לאחר הקפאה (Kogan et al., 2021). בזרמה המאופיינת בתנועתיות פרוגרסיבית גבוהה (HPM) נמצא אחוז גבוה יותר של חומצות שומן מסוג אומגה-3 בהשוואה לזרמה המאופיינת בתנועתיות פרוגרסיבית נמוכה (LPM); 29.1 לעומת 25.1% בהתאמה ( $P \leq 0.0001$ ). לעומת זאת, בזרמה המאופיינת בתנועתיות פרוגרסיבית נמוכה נמצא אחוז גבוה יותר של חומצות השומן מסוג אומגה-6 בהשוואה לזרמה המאופיינת בתנועתיות פרוגרסיבית גבוהה; 13.03 לעומת 10.73% בהתאמה ( $P \leq 0.0001$ ). בנוסף, בחנו את שיעור ההישרדות הפרוגרסיבית (PMS), המוגדר כחסס בין שיעור תאי זרע בעלי תנועתיות פרוגרסיבית לאחר הקפאה והפשרה לבין זה של זרע טרי. נמצא כי אחוז חומצות שומן רב בלתי רוויות (PUFA) היה גבוה יותר בקבוצה המאופיינת בהישרדות פרוגרסיבית נמוכה לעומת גבוהה (33.07 לעומת 30.94%, בהתאמה,  $P \leq 0.02$ ). נמצא כי שינוי ביחס חומצות השומן אומגה-6 לאומגה-3 בממברנת התאים משנה את המאזן של המערכת האנדוקנבינואידית (ECS) (Zachut, 2020). לאור זאת, תתכן האפשרות כי המערכת האנדוקנבינואידית מעורבת בדפוס התנועה הפרוגרסיבית.

אולם, עד כה כמעט ולא נבחן הקשר בין תנועה פרוגרסיבית והמערכת האנדוקנבינואידית בזרימת פריים. המערכת אנדוקנבינואידית (ECS) הינה מערכת פיזיולוגית חשובה המורכבת מקנבינואידים אנדוגניים (אנדוקנבינואידים), רצפטורים לקנבינואידים, ואנזימים האחראים לסינתזה ופירוק של האנדוקנבינואידים. האנדוקנבינואידים העיקריים הם N-arachidonoyl ethanolamide (anandamide, AEA) ו-2-arachidonoyl glycerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). האנדוקנבינואידים (PEA) palmytoylethanolamide ו-(OEA) oleoylethanolamide מווסתים את ההשפעה של AEA (Schuel

(et al., 2002). אנדוקנבינואידיים נקשרים לרצפטורים הקנבינואידיים **CB1** ו-**CB2**, ששייכים למשפחת G-protein coupled receptors, או לרצפטור **TRPV1** (Francavilla et al., 2009). הרצפטור **CB1** מתבטא בעיקר במערכת העצבים המרכזית ומבקר את האכילה והוצאת האנרגיה. כמו כן, הוא מצוי ברקמות פריפריאליות רבות אשר חיוניות למאזן המטבולי הכללי, כדוגמת רקמת השומן (Silvestri and Di Marzo, 2013). הרצפטור **CB2** מתבטא ברמה גבוהה בתאי מערכת החיסון, בהתאמה לתפקידו כבקר מרכזי של התפקוד החיסוני (Howlett, 1995; Pertwee and Ross, 2002). בקרה על כמות הליגנדים האנדוגניים מתבצעת על ידי פעילות האנזימים fatty acid amide hydrolase (**FAAH**), ו-1 monoacyl glycerol lipase (**MGLL**) (Cravatt et al., 1996; Tsuboi et al., 2005) אשר אמונים על פירוק האנדוקנבינואידיים, וכן האנזימים N-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D (**NAPEPLD**) ו-1 Diacylglycerol lipases (**DAGLs**) (Murataeva et al., 2014; Okamoto et al., 2004) אשר אמונים על הסינתזה שלהם. במחקר שנעשה במעבדתה של ד"ר זכות אופיינה לראשונה פעילות ה-**ECS** בבקר. נמצא כי בפרות, רכיבי ה-**ECS** מושפעים ממידת העקה המטבולית סביב ההמלטה (Zachut et al., 2018). על בסיס הממצאים אלו והידע הקיים ביונקים אחרים, ה-**ECS** הינה מערכת פיזיולוגית חשובה, אשר עשויה להשפיע על מגוון רחב של מערכות בבקר (Myers et al., 2021) ובכלל זה מערכת הרבייה הזכרית. מחקרים שנעשו בשנים האחרונות מצביעים על מעורבות ה-**ECS** בתהליכים רבים הקשורים למערכת רבייה הזכרית. בבני אדם, ה-**ECS** מעורבת ישירות בוויסות תהליך הספרמטוגנזה ותפקוד תאי ליידיג באשך (Nielsen et al., 2019). האנדוקנבינואידיים **AEA**, **PEA** ו-**OEA** נמצאו בנוזל זרע של אדם (Zufferey et al., 2020) בעוד שנוכחותם בנוזל זרע של בקר נחקרה עד כה באופן מוגבל. לתאי זרע יכולת לסנתז, לקשור ולפרק קנבינואידיים אנדוגניים (Francavilla et al., 2009). נמצא כי הקולטן **CB1** מתבטא בראש, בחלק האמצעי (mid-piece) ובזנב של תאי הזרע בבני אדם (Rossato et al., 2005), חזירים (Maccarrone et al., 2005) ובקר (Gervasi et al., 2009). עוד נמצא כי שפעול הקולטן **CB1** מעכב תנועתיות של תאי זרע (Amoako et al., 2013). הקולטנים **CB2** ו-**TRPV1** נמצאו בממברנת אקרזום ובזנב של תאי זרע של בקר (Gervasi et al., 2009; Kumar et al., 2019). חומר המוצא, כמו גם תוצר הפירוק, של האנדוקנבינואידיים הראשיים, **AEA** ו-**2-AG**, הינו **AA** (arachidonic acid), חומצת שומן ממשפחת **PUFA** שיש לה תפקיד מרכזי בבניית ממברנות התאים. בעבודה קודמת מצאנו קשר בין ריכוז חומצות שומן **PUFA** בתאי זרע להישרדות תאים פרוגרסיביים (Kogan et al., 2021). בהתאם לכך, ניתן להניח כי יש קשר בין המערכת האנדוקנבינואידיית, הרכב ממברנות התאים ותפקודם. בעבודה הנוכחית, בחנו מהו הקשר בין דפוס התנועה פרוגרסיבית לבין מרכיבי ה-**ECS** בתאי הזרע ובנוזל הזרע של פרים.

## 2. השערת המחקר

הנחת העבודה היא כי למערכת ה-**ECS** יש תפקיד בדפוס התנועה הפרוגרסיבית של תאי זרע ולשיעור הישרדות פרוגרסיבית בעקבות הקפאה/הפשרה. בהתאם לכך, המטרה המרכזית היא לאפיין את רמות הביטוי של הרצפטורים האנדוקנבינואידיים ומרכיבי ה-**ECS** בתאי זרע של בקר, ולבחון האם קיים קשר בינם לבין דפוס תנועה פרוגרסיבית. בנוסף, האם קיים קשר בין הפרופיל האנדוקנבינואידי בנוזל הזרע ובממברנות תאי זרע לבין דפוס תנועה פרוגרסיבית. הבנת הקשר בין דפוס תנועה פרוגרסיבית ופעילות מערכת האנדוקנבינואידיית, תאפשר בעתיד פיתוח שיטה לשיפור איכות הזרע ולטיפול פרטני לפרים נבחרים.

### 3. מטרות העבודה

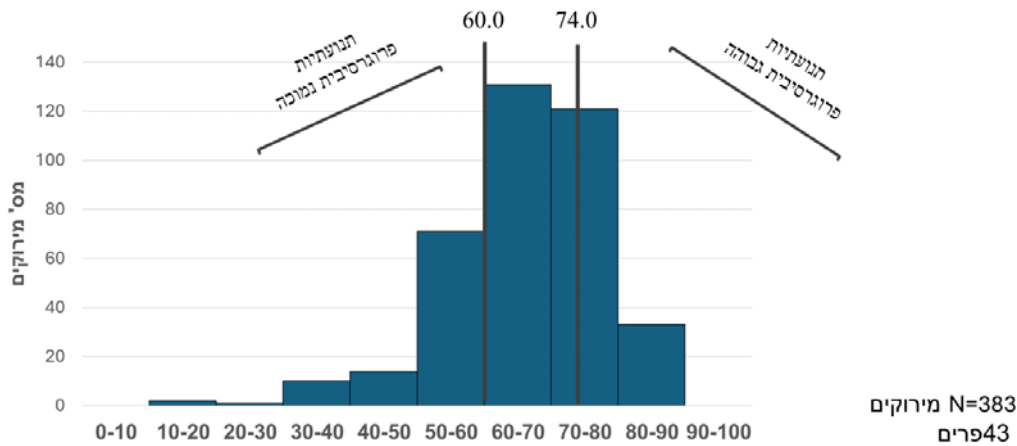
המטרה הכללית של המחקר היא לבחון את הקשר בין תנועה פרוגרסיבית של תאי זרע והמערכת האנדוקנבינואידית. מטרות ספציפיות:

- (1) לאפיין את הפרופיל האנדוקנבינואידית בנוזל הזרע ולבחון האם קיים קשר בין הפרופיל האנדוקנבינואידית לדפוס התנועה הפרוגרסיבית.
- (2) לאפיין את נוכחות רצפטורים קנבינואידיים (CB1, CB2, TRPV-1) ואת האנזים FAAH בתאי זרע ולבחון האם קיים קשר בין מרכיבים אלו ודפוס תנועה פרוגרסיבית.
- (3) לבחון את הקשר בין מרכיבי המערכת האנדוקנבינואידית והישרדות הפרוגרסיבית.

### 4. סיכום מהלך ותוצאות המחקר

#### איסוף דגימות זרע וקביעת דפוס התנועתיות

בשנה א' של המחקר נאספו 15 מירוקים מפרים שונים בהתאם ללוח הפרים לתקופה. איסוף הזרמה נעשה בהתאם לשיטה הנהוגה ב"שיאון" (Orgal et al., 2012). בקצרה, פרי הניסוי הוקפצו על פר "teaser" והדגימה נאספה אל תוך בושט מלאכותית מחוממת, אשר בקצה מולבשת מבחנה. הזרמה הועברה מיידית למעבדה קרובה, שם עברה מיהול עם EasyBuffer B (IMV Technologies) ב-37°C. לאחר מכן, 3 מיקרוליטר הועברו לסלייד ספירה סטנדרטי (Leja Products B.V., Nieuw-Venep, the Netherlands). האנליזה להערכת ריכוז הזרע ודפוס התנועתיות התבצעה על בסיס ממוצע של שמונה שדות מיקרוסקופיות באמצעות מכשיר ה-IVOS II (Hamilton Thorne Inc., Beverly, U.S.A). באמצעות מכשיר זה ניתן לבצע קריאה אופטית לקבלת מדדי איכות של הזרמה ובכלל זה ריכוז תאי הזרע (מיליון תאים למ"ל), מהירות תנועה כללית ותנועה פרוגרסיבית, אחוז תנועתיות כללית ותנועתיות פרוגרסיבית. בהמשך, המירוקים (5 מירוקים לקבוצה) שויכו ל-3 קבוצות על בסיס דפוס התנועה הפרוגרסיבית: גבוהה (HPM; מעל 74% תאים נעים פרוגרסיבית), בינונית (MPM; בין 60 ל 74% תאים נעים פרוגרסיבית) ונמוכה (LPM; עד 59% תאים נעים פרוגרסיבית) בהתייחס למאגר הנתונים באותה עת (איור מספר 1). לאחר מכן, כל מירוק עבר סרכוז (4000 g במשך 10 דקות) להפרדה לפרקציה תאית (תאי זרע) ונוזלית (נוזל זרע). הדוגמאות נשמרו בחנקן נוזלי (-196°C) עד לביצוע אנליזות. מכל דוגמא בנפרד, נוזל הזרע ותאי הזרע נלקחו לקביעת פרופיל חומצות שומן ולקביעת פרופיל אנדוקנבינואידים בשתי שיטות: (1) כימות יחסי המשווה בין הדוגמאות בוצע במכון וייצמן; (2) כימות אבסולוטי בשיטת LC-MS/MS בוצע במעבדה של פרופ' יוסי תם באוניברסיטה העברית בירושלים. תכולת האנדוקנבינואידים האבסולוטית בתאי הזרע ובנוזל הזרע עברו כימות, ונורמלו לנפח או משקל הדגימה (מוצג ביחידות של מול).



**איור 1.** התפלגות המירוקים על פי תנועתיות פרוגרסיבית בזרמה טרייה. מירוקים עם ערכים גבוהים מ-74.0% (25% מאוכלוסייה) הוגדרו כבעלי תנועתיות פרוגרסיבית הגבוהה ומירוקים עם ערכים נמוכים מ-60.0% (25% מאוכלוסייה) הוגדרו כבעלי תנועתיות פרוגרסיבית נמוכה.

בנוסף, מכל מירוק נלקחה דוגמא על מנת לבחון את הישרדות התאים בעלי תנועה פרוגרסיבית. לצורך כך, זרמה טרייה עברה הערכת איכות ובכלל זה הערכה השל תנועתיות הפרוגרסיבית של תאי הזרע ולאחריה הקפאה והפשרה על פי פרוטוקול של חברת שיאון. בקצרה, הזרמה נמהלה ב-AndroMed® extender (Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany) ולאחר מכן הוקפאה באמצעות DigitCool (IMV Technologies, L'Aigle, France) בקצב מבוקר של 15°C לדקה ולאחר מכן בקצב של 40°C לדקה. לאחר ההפשרה בוצעה אנליזה להערכת התנועתיות הפרוגרסיבית של תאי הזרע. באמצעות מכשיר IVOS II של חברת Hamilton Thorne Inc., Beverly, U.S.A. חושב אחוז התאים הפרוגרסיביים לאחר הקפאה-הפשרה מתוך מספר התאים הפרוגרסיביים בזרמה הטרייה.

#### מדידת נתוני זרמה טרייה

נתוני זרמה טרייה מוצגים בטבלה מספר 1. שיעור התאים בעלי מורפולוגיה תקינה ושיעור התאים הנעים פרוגרסיבית היו נמוכים משמעותית בקבוצה עם תנועתיות פרוגרסיבית נמוכה בהשוואה לקבוצות עם תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה ובינונית ( $P \leq 0.05$ ). שיעור כלל התאים הנעים היה גבוה בקבוצה עם תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה בהשוואה לקבוצות עם תנועתיות פרוגרסיבית נמוכה ( $P \leq 0.05$ ). לא נמצא הבדל בריכוז תאי זרע בין שלושת הקבוצות.

#### טבלה 1. נתוני זרמה טרייה כפי שנמדדו במכשיר ה-IVOS II.

תאים נעים פרוגרסיבית		סה"כ תאים נעים		שיעור תאים תקינים מורפולוגית (%)	ריכוז תאי זרע (מיליון/מ"ל)	תנועתיות פרוגרסיבית
מהירות ( $\mu\text{m/s}$ )	שיעור (%)	מהירות ( $\mu\text{m/s}$ )	שיעור (%)			
171.67±2.95	75.50±1.23	164.49±2.03	*91.48±1.01	98.03±0.35	1080.34±125.0	גבוהה
176.84±2.93	66.35±1.78	166.98±3.30	88.43±2.34	95.47±1.18	1510.33±284.00	בינונית
158.99±4.69	*47.20±4.28	142.57±5.54	79.20±3.45	*90.36±1.02	1349.41±126.92	נמוכה

הערכים מוצגים כממוצע ± שגיאת תקן.

## הרכב חומצות שומן בתאי זרע ונוזל זרע

הפרדה, זיהוי וכימות של חומצות השומן בנוזל הזרע ובתאי הזרע בוצעו במעבדתה של דר' מאיה זכות במכון וולקני לאחר מיצוי הפרקציה השומנית בעזרת כרומוטוגרפיה גזית – Hewlett – Packard gas chromatograph (7890 series 2) כפי שתואר בעבודתנו הקודמת (Moallem et al., 2015).

תוצאות הניתוח של הרכב חומצות השומן בתאי הזרע מוצגות ב**טבלה מספר 2**. הרכב חומצות השומן בנוזל הזרע מוצג ב**טבלה 3**. כפי שניתן לראות, אחוז החומצה האולאית (C18:1n9), חומצה ואצ'נית (C18:1n7) וחומצה לינולאית (C18:2n6) היו משמעותית נמוכות יותר בקבוצת HPM גם בתאי הזרע וגם בנוזל הזרע (**טבלה מס' 2, 3**). לא נמצא הבדל משמעותי בין קבוצות חומצות שומן (רוויות, בלתי רוויות, ומסוג אומגה-3 ואומגה-6) בין תאי זרע עם תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה, בינונית ונמוכה (**טבלה מס' 3**).

**טבלה 2**. פרופיל חומצות שומן בתאי זרע עם תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה, בינונית ונמוכה.

תנועתיות פרוגרסיבית נמוכה (LPM)		תנועתיות פרוגרסיבית בינונית (MPM)		תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה (HPM)		חומצת שומן
ש. תקן	ממוצע	ש. תקן	ממוצע	ש. תקן	ממוצע	
2.57	7.39 <sup>b</sup>	1.89	8.80 <sup>b</sup>	1.06	13.67 <sup>a</sup>	C14:0 *
1.52	28.07	2.00	25.83	1.94	27.96	C16:0
0.10	0.37 <sup>b</sup>	0.25	0.58 <sup>ab</sup>	0.26	0.99 <sup>a</sup>	C16:1 *
0.07	0.59 <sup>b</sup>	0.18	0.38 <sup>ab</sup>	0.06	0.06 <sup>a</sup>	C16:2 *
0.31	0.96	0.29	1.07	0.28	1.19	C16:3
0.74	9.31 <sup>b</sup>	0.18	8.13 <sup>b</sup>	0.22	7.43 <sup>a</sup>	C18:0 *
0.49	2.53 <sup>b</sup>	0.14	1.47 <sup>ab</sup>	0.06	1.43 <sup>a</sup>	C18:1n9 *
0.28	2.89 <sup>b</sup>	0.08	2.23 <sup>a</sup>	0.08	2.02 <sup>a</sup>	C18:1n7 *
0.20	4.44 <sup>b</sup>	0.30	4.12 <sup>b</sup>	0.10	3.34 <sup>a</sup>	C18:2n6 *
0.26	0.72	0.25	0.82	0.23	0.82	C18:3n3
0.02	0.16	0.03	0.12	0.04	0.09	C18:3n6
0.13	0.57	0.24	0.69	0.30	0.75	C20:1n9
0.04	0.63 <sup>b</sup>	0.07	0.56 <sup>ab</sup>	0.04	0.40 <sup>a</sup>	C20:3 *
0.14	3.38 <sup>b</sup>	0.13	3.29 <sup>ab</sup>	0.18	2.81 <sup>a</sup>	C20:4n6 *
0.20	0.65	0.28	0.74	0.72	1.51	C20:4n3
1.20	16.67	2.22	21.13	0.90	16.84	C20:5n3
0.09	0.48	0.09	0.34	0.08	0.37	C22:1n9
1.30	15.04	0.86	14.75	1.54	14.14	C22:5n6
0.27	1.09	0.19	1.04	0.07	0.64	C22:5n3
0.43	4.05	0.57	3.93	0.40	3.54	C22:6n3
3.08	44.77	3.26	42.76	2.64	49.06	רוויות
0.68	6.84	0.56	5.30	0.40	5.57	חד בלתי רוויות
3.19	48.39	3.26	51.94	2.30	45.37	רב בלתי רוויות
1.96	23.18	2.59	27.65	0.95	23.35	אומגה-3
1.37	22.86	1.13	22.16	1.63	20.29	אומגה-6
0.08	1.01	0.08	0.83	0.07	0.87	אומגה-6 \ אומגה-3

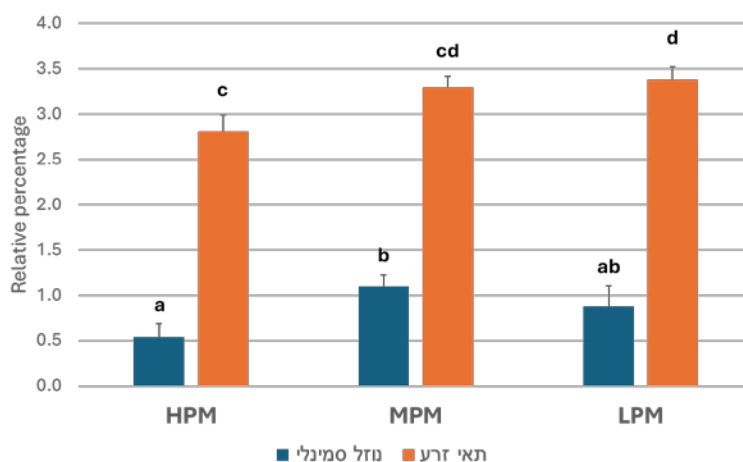
הערכים הם שיעור יחסי מתוך כלל חומצות השומן (%). אותיות בכתב עילי ליד ערכי הממוצע (<sup>a, b</sup>) מסמנות הבדלים מובהקים סטטיסטית בין קבוצות הניסוי ( $P \leq 0.05$ ). כוכבית (\*) לצד שם חומצת השומן מסמלת כי האפקט הראשי (Main effect) של קבוצות התנועתיות נמצא מובהק סטטיסטית ( $P \leq 0.05$ ).

**טבלה 3.** פרופיל חומצות שומן בנוזל זרע עם תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה, בינונית ונמוכה.

תנועתיות פרוגרסיבית נמוכה (LPM)		תנועתיות פרוגרסיבית בינונית (MPM)		תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה (HPM)		חומצת שומן
ש. תקן	ממוצע	ש. תקן	ממוצע	ש. תקן	ממוצע	
1.55	4.74 <sup>ab</sup>	1.27	3.74 <sup>b</sup>	2.64	10.44 <sup>a</sup>	C14:0 *
4.36	51.16 <sup>ab</sup>	1.57	45.12 <sup>b</sup>	0.63	50.64 <sup>a</sup>	C16:0 *
0.07	0.22	0.04	0.10	0.15	0.26	C16:1
0.06	0.20	0.09	0.24	0.09	0.32	C16:2
0.05	0.64	0.04	0.66	0.06	0.62	C16:3
0.82	17.96	1.01	18.66	0.98	18.88	C18:0
0.82	5.18 <sup>ab</sup>	0.71	6.22 <sup>b</sup>	0.74	3.32 <sup>a</sup>	C18:1n9 *
0.10	1.26 <sup>b</sup>	0.12	1.30 <sup>b</sup>	0.21	0.74 <sup>a</sup>	C18:1n7 *
1.02	6.34 <sup>ab</sup>	0.87	8.40 <sup>b</sup>	1.14	4.58 <sup>a</sup>	C18:2n6 *
0.02	0.06 <sup>b</sup>	0.06	0.08 <sup>ab</sup>	0.00	0.00 <sup>a</sup>	C18:3n3 *
0.02	0.12 <sup>b</sup>	0.04	0.06 <sup>ab</sup>	0.02	0.02 <sup>a</sup>	C18:3n6 *
0.31	1.18 <sup>ab</sup>	0.14	1.24 <sup>b</sup>	0.14	0.68 <sup>a</sup>	C20:1n9 *
0.21	0.92	0.27	1.46	0.21	0.78	C20:3
0.22	0.88 <sup>ab</sup>	0.13	1.10 <sup>b</sup>	0.14	0.54 <sup>a</sup>	C20:4n6 *
0.02	0.14	0.06	0.12	0.06	0.06	C20:4n3
0.96	4.84	1.14	6.18	1.02	4.24	C20:5n3
0.14	0.28	0.24	0.38	0.02	0.04	C22:1n9
0.65	3.24	0.60	3.96	0.55	2.34	C22:5n6
0.27	0.44	0.06	0.08	0.07	0.12	C22:5n3
0.17	0.36 <sup>b</sup>	0.27	0.80 <sup>ab</sup>	0.17	1.18 <sup>a</sup>	C22:6n3 *

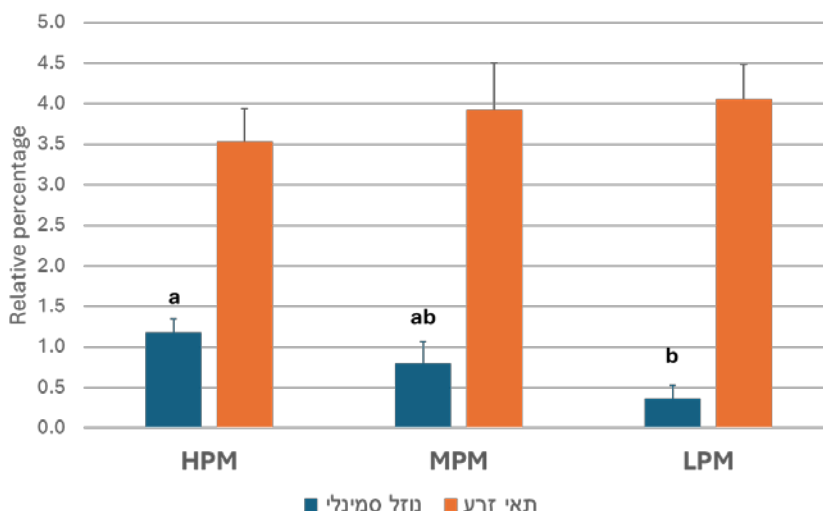
הערכים הם שיעור יחסי מתוך כלל חומצות השומן (%). אותיות בכתב עילי ליד ערכי הממוצע (<sup>a, b</sup>) מסמנות הבדלים מובהקים סטטיסטית בין קבוצות הניסוי ( $P \leq 0.05$ ). כוכבית (\*) לצד שם חומצת השומן מסמלת כי האפקט הראשי של קבוצות התנועתיות נמצא מובהק סטטיסטית ( $P \leq 0.05$ ).

שיעור החומצה הארכידונית (C20:4n-6), אשר מהווה הן חומר מוצא לסינטזה של אנדוקנבינואידים והן תוצר פירוק אנזימתי שלהם, היה נמוך בתאי זרע ובנוזל זרע בקבוצה HPM בהשוואה לאלה עם תנועתיות פרוגרסיבית נמוכה (איור 2).



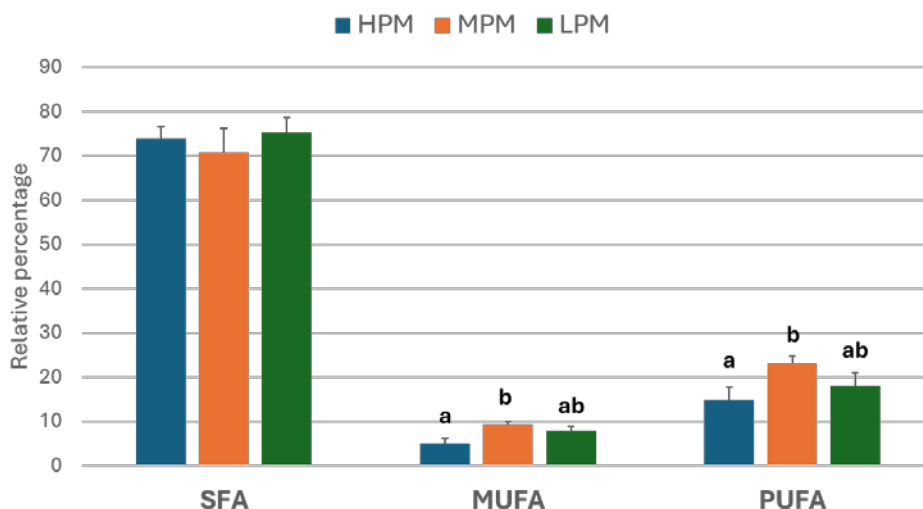
**איור 2.** שיעור חומצה ארכידונית בנוזל זרע ובתאי זרע עם תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה (HPM), בינונית (MPM) ונמוכה (LPM). מוצגים ממוצעים ± שגיאת תקן. אותיות שונות מעל העמודות מעידה על הבדל מובהק בין קבוצות הניסוי ( $P \leq 0.05$ ).

לא נמצא הבדל משמעותי בין הקבוצות באחוז ה-DHA (22:6n-3) בתאי זרע, אך אחוז ה-DHA היה גבוה יותר בנוזל זרע של תאי זרע בעלי תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה בהשוואה לנוזל זרע עם תנועתיות פרוגרסיבית נמוכה (איור 3).

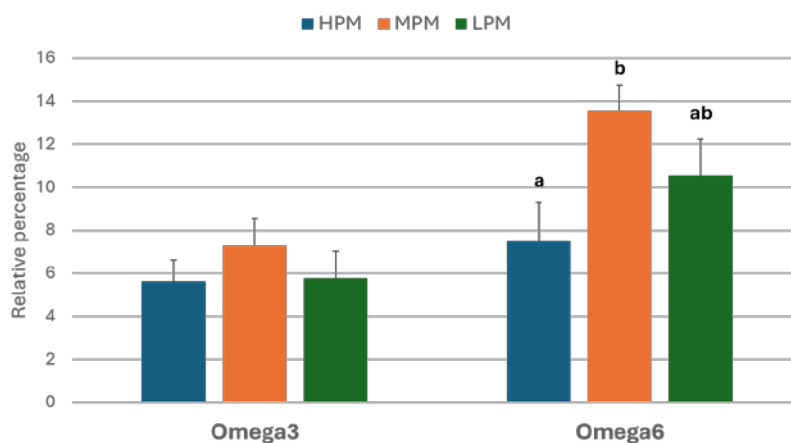


**איור 3.** שיעור חומצה דוקסהקסואנואית (DHA) בנוזל זרע ובתאי זרע עם תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה (HPM), בינונית (MPM) ונמוכה (LPM). מוצגים ממוצעים  $\pm$  שגיאת תקן. אותיות שונות מעל העמודות מעידה על הבדל מובהק בין קבוצות הניסוי ( $P \leq 0.05$ ).

בנוסף, נמצא ששיעור חומצות שומן חד ורב-בלתי רוויות היה נמוך יותר בנוזל זרע של התאים בעלי תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה בהשוואה לנוזל זרע של התאים בעלי תנועתיות פרוגרסיבית בינונית (איור 4). שיעור חומצות שומן מסוג אומגה 6 היה נמוך בנוזל זרע מקבוצת HPM בהשוואה לנוזל זרע של קבוצת MPM ( $P \leq 0.05$ ), אך לא נמצא הבדל בשיעור חומצות שומן מסוג אומגה 3 בין הקבוצות (איור 5). לא נמצא הבדל ביחס אומגה 6 לאומגה 3 בנוזל זרע בקבוצת תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה ( $1.2 \pm 0.20$ ) לזה שבקבוצת תנועתיות פרוגרסיבית בינונית ( $2.16 \pm 0.49$ ), או



**איור 4.** פרופיל חומצות השומן רוויות (SFA; saturated fatty acid), חד בלתי רוויות (MUFA) ורב בלתי רוויות (PUFA) בנוזל זרע בעל תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה (HPM), בינונית (MPM) ונמוכה (LPM). מוצגים ממוצעים  $\pm$  שגיאת תקן. אותיות שונות מעל העמודות מעידה על הבדל מובהק בין קבוצות הניסוי ( $P \leq 0.05$ ).



**איור 5.** שיעור חומצות שומן מסוג אומגה 6 ואומגה 3 בנוזל זרע בעל תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה (HPM), בינונית (MPM) ונמוכה (LPM). מוצגים ממוצעים  $\pm$  שגיאת תקן. אותיות שונות מעל העמודות מעידה על הבדל מובהק בין קבוצות הניסוי ( $P \leq 0.05$ ).

בקבוצת תנועתיות פרוגרסיבית נמוכה ( $1.98 \pm 0.30$ ). התקבלה נטייה למובהקות בין נוזל זרע של תאים בעלי תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה לעומת נמוכה ( $P = 0.07$ ).

### פרופיל אנדוקנבינואידי יחסי בנוזל זרע

במהלך שנה ב' למחקר, נלקחו תשע דוגמאות נוזל זרע ממירוקים בעלי תנועה פרוגרסיבית גבוהה, בינונית ונמוכה (3 מירוקים לקבוצה) לקביעת פרופיל אנדוקנבינואידי באמצעות כימות יחסי בשיטת LC-MS/MS, ביחידת המטבולומיקה במכון ויצמן למדע, רחובות. תוצאות הניתוח של פרופיל אנדוקנבינואידי יחסי בנוזל זרע מוצגות בטבלה מספר 4. שיעור 2-AG היה נמוך באופן מובהק בנוזל של תאי זרע בעלי תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה בהשוואה לנוזל זרע עם תנועתיות פרוגרסיבית בינונית (איור 6). AEA לא זוהה בנוזל הזרע.

**טבלה 4.** פרופיל אנדוקנבינואידי יחסי בנוזל זרע עם תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה, בינונית ונמוכה.

תנועתיות פרוגרסיבית נמוכה (LPM)		תנועתיות פרוגרסיבית בינונית (MPM)		תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה (HPM)		אנדוקנבינואידי
ש. תקן	ממוצע	ש. תקן	ממוצע	ש. תקן	ממוצע	
6.67E+04	7.18E+05 <sup>b</sup>	5.48E+04	8.92E+05 <sup>ab</sup>	2.04E+05	1.36E+06 <sup>a</sup>	Lauroyl Ethanolamide *
5.60E+04	5.33E+05 <sup>b</sup>	1.25E+05	7.74E+05 <sup>ab</sup>	1.64E+05	1.14E+06 <sup>a</sup>	Myristoyl-Ethanolamide *
2.40E+03	2.67E+04 <sup>b</sup>	8.95E+03	5.60E+04 <sup>a</sup>	9.00E+03	4.39E+04 <sup>ab</sup>	Linoleoyl Ethanolamide *
1.75E+04	1.16E+05	4.18E+04	2.16E+05	1.88E+04	1.54E+05	Vaccenoyl ethanolamide
7.34E+02	8.51E+03	6.33E+04	1.15E+05	1.92E+02	6.11E+03	Oleoyl glycine
3.48E+04	1.04E+05	2.92E+04	1.09E+05	2.54E+04	1.03E+05	Linoleoyl Glycerols (1LG+2LG)
2.29E+04	7.38E+04 <sup>ab</sup>	2.31E+03	5.39E+04 <sup>b</sup>	4.33E+03	2.75E+04 <sup>a</sup>	Arachidonoylglycerols (2-AG) *
1.88E+02	1.22E+03	6.94E+02	4.97E+03	0.00E+00	2.02E+03	Docosahexaenoyl Ethanolamide
2.30E+02	7.35E+02	0.00E+00	1.38E+03	0.00E+00	1.17E+03	Docosatrienoyl ethanolamide

1.45E+02	3.33E+03	1.03E+04	1.32E+04	2.33E+03	6.42E+03	Docosaenoyl Ethanolamide
4.01E+03	4.08E+04	1.75E+04	5.47E+04	5.09E+03	3.42E+04	Docosanoyl Ethanolamide
7.46E+03	4.28E+04	8.40E+03	3.62E+04	5.21E+03	2.78E+04	Dihomo-gamma-Lineoyl Glycerols (1HG+2HG)
6.65E+04	4.85E+05	2.24E+04	3.68E+05	1.75E+05	6.97E+05	1-Stearoyl-rac-glycerol

הערכים הם peak areas מנורמלים ופרופורציונלים לכמות התרכובת הקיימת בדוגמה. אותיות שונות בכתב עילי ליד ערכי הממוצע (<sup>a, b</sup>) מסמנות הבדלים מובהקים סטטיסטית בין קבוצות הניסוי ( $P \leq 0.05$ ). כוכבית (\*) לצד שם חומצת השומן מסמלת כי האפקט הראשי (Main effect) של קבוצות התנועות נמצא מובהק סטטיסטית ( $P \leq 0.05$ ).

### כימות אנדוקנבינואידיים אבסולוטי בנוזל הזרע ובתאי הזרע

בשנה ג' של המחקר בוצעה אנליזה כמותית אבסולוטית לרמות האנדוקנבינואידיים במעבדה של פרופ' יוסי תם באוניברסיטה העברית. לא זוהה AEA בנוזל הזרע (טבלה מספר 5). נמצאו רמות נמוכות בתאי הזרע אך לא נמצאו הבדלים מובהקים ברמות AEA בין קבוצות התנועות הפרוגרסיבית (טבלה מספר 6).

**טבלה 5.** פרופיל אנדוקנבינואידי בנוזל הזרע עם תנועות פרוגרסיבית גבוהה, בינונית ונמוכה.

תנועות פרוגרסיבית גבוהה (HPM)		תנועות פרוגרסיבית בינונית (MPM)		תנועות פרוגרסיבית נמוכה (LPM)		אנדוקנבינואידי
ש. תקן	ממוצע	ש. תקן	ממוצע	ש. תקן	ממוצע	
0.21	1.66	0.55	2.68	0.38	1.70	2-Arachidonoylglycerol (2-AG)
0.06	0.14	0.08	0.20	0.31	0.44	Oleylethanolamide (OEA)
0.33	1.06	0.20	0.87	0.54	1.53	Palmitoylethanolamide (PEA)
9.29	46.37 <sup>a</sup>	15.36	85.25 <sup>ab</sup>	19.26	108.67 <sup>b</sup>	Arachidonic Acid (AA)

הערכים מוצגים כממוצע  $\pm$  שגיאת תקן, מנורמלים לנפח הדגימה ומוצגים ביחידות של פיקומול ל"ל (pmol/ml). אותיות שונות בכתב עילי ליד ערכי הממוצע (<sup>a, b</sup>) מסמנות הבדלים מובהקים סטטיסטית בין קבוצות הניסוי ( $P \leq 0.05$ ).

**טבלה 6.** פרופיל אנדוקנבינואידי בתאי זרע עם תנועות פרוגרסיבית גבוהה, בינונית ונמוכה.

תנועות פרוגרסיבית גבוהה (HPM)		תנועות פרוגרסיבית בינונית (MPM)		תנועות פרוגרסיבית נמוכה (LPM)		אנדוקנבינואידי
ש. תקן	ממוצע	ש. תקן	ממוצע	ש. תקן	ממוצע	
0.324	3.820	1.262	5.760	1.868	6.489	2-Arachidonoylglycerol (2-AG)
0.053	0.062	0.379	0.428	0.483	0.702	Anandamide (AEA)
0.033	0.051	0.363	0.525	0.357	0.381	Oleylethanolamide (OEA)
0.060	0.134	0.624	0.949	0.442	0.442	Palmitoylethanolamide (PEA)
0.057	0.188	0.159	0.239	0.036	0.197	Arachidonic Acid (AA)

הערכים מוצגים כממוצע  $\pm$  שגיאת תקן, מנורמלים לנפח הדגימה ומוצגים ביחידות של פיקומול לגרם (pmol/gr). אותיות שונות בכתב עילי ליד ערכי הממוצע (<sup>a, b</sup>) מסמנות הבדלים מובהקים סטטיסטית בין קבוצות הניסוי ( $P \leq 0.05$ ).

## קורלציות בין מרכיבי המערכת האנדוקנבינואידית בנוזל הזרע ושיעור תנועתיות פרוגרסיבית

בניתוח הקורלציות בנוזל הזרע לא נמצא מתאם בין רמות האנדוקנבינואידים, ולא זוהו קשרים מובהקים עם הישרדות תנועתיות פרוגרסיבית (**טבלה מספר 7**). ניתוח קורלציות בתוך כל אחת מקבוצות התנועתיות הפרוגרסיבית (HPM, MPM, LPM) לא הראה מתאמים מובהקים בין הפרמטרים שנבדקו.

**טבלה 7.** מקדמי הקורלציה מסוג Spearman בין רמות האנדוקנבינואידים והישרדות פרוגרסיבית (PMS) בנוזל הזרע – כלל המדגם.

משתנים	2-AG	OEA	PEA	AA	PMS
2-AG	—	0.277 (P = 0.318)	0.105 (P = 0.708)	0.121 (P = 0.666)	-0.093 (P = 0.762)
OEA	0.277 (P = 0.318)	—	0.476 (P = 0.073)	0.397 (P = 0.143)	-0.225 (P = 0.459)
PEA	0.105 (P = 0.708)	0.476 (P = 0.073)	—	0.374 (P = 0.170)	0.014 (P = 0.964)
AA	0.121 (P = 0.666)	0.397 (P = 0.143)	0.374 (P = 0.170)	—	-0.330 (P = 0.271)
PMS	-0.093 (P = 0.762)	-0.225 (P = 0.459)	0.014 (P = 0.964)	-0.330 (P = 0.271)	—

הערך P מייצג את רמת המובהקות של מודל ההשוואה בתוך הקבוצות.

לעומת זאת, ניתוח הקורלציות בפרקציה התאית הצביע על קשרים חיוביים מובהקים בין מולקולות ממשפחת ה-N-acylethanolamines (OEA, AEA, ו-PEA) והישרדות פרוגרסיבית (**טבלה מספר 8**). ניתוח קורלציות נפרד בתוך כל אחת מקבוצות התנועתיות הפרוגרסיבית הצביע על קשרים חיוביים חזקים בין מולקולות ממשפחת ה-N-acylethanolamines בקבוצת התנועתיות הפרוגרסיבית הגבוהה (**טבלה מספר 9**), בעוד שבקבוצות התנועתיות הבינוניות והנמוכה (MPM, LPM) לא נמצאו קשרים מובהקים סטטיסטית.

**טבלה 8.** מקדמי הקורלציה מסוג Spearman בין רמות האנדוקנבינואידים והישרדות פרוגרסיבית (PMS) בתאי זרע – כלל המדגם.

משתנים	2-AG	AEA	OEA	PEA	AA	PMS
2-AG	—	0.410 (P = 0.129)	0.358 (P = 0.191)	0.288 (P = 0.298)	0.386 (P = 0.156)	-0.214 (P = 0.482)
AEA	0.410 (P = 0.129)	—	0.798 (P < 0.001)	0.398 (p=0.142)	0.072 (P = 0.799)	-0.182 (P = 0.552)
OEA	0.358 (P = 0.191)	0.798 (P < 0.001)	—	0.671 (P = 0.006)	-0.105 (P = 0.708)	0.066 (P = 0.831)
PEA	0.288 (P = 0.298)	0.398 (P = 0.142)	0.671 (P = 0.006)	—	0.157 (P = 0.577)	-0.136 (P = 0.659)
AA	0.386 (P = 0.156)	0.072 (P = 0.799)	-0.105 (P = 0.708)	0.157 (p=0.577)	—	-0.203 (P = 0.505)
PMS	-0.214 (P = 0.482)	-0.182 (P = 0.552)	0.066 (P = 0.831)	-0.136 (p=0.659)	-0.203 (P = 0.505)	—

הערך P מייצג את רמת המובהקות של מודל ההשוואה בתוך הקבוצות.

**טבלה 9.** מקדמי הקורלציה מסוג Spearman בין רמות האנדוקנבינואידים והישרדות פרוגרסיבית (PMS) בתאי זרע בקבוצת התנועתיות הפרוגרסיבית הגבוהה (HPM).

משתנים	2-AG	AEA	OEA	PEA	AA	PMS
2-AG	—	0.359 ( <i>P</i> = 0.553)	0.359 ( <i>P</i> = 0.553)	0.300 ( <i>P</i> = 0.624)	0.900 ( <i>P</i> = 0.037)	-0.200 ( <i>P</i> = 0.800)
AEA	0.359 ( <i>P</i> = 0.553)	—	1.000 ( <i>P</i> < 0.01)	0.975 ( <i>P</i> = 0.005)	0.205 ( <i>P</i> = 0.741)	-0.949 ( <i>P</i> = 0.051)
OEA	0.359 ( <i>P</i> = 0.553)	1.000 ( <i>P</i> < 0.01)	—	0.975 ( <i>P</i> = 0.005)	0.205 ( <i>P</i> = 0.741)	-0.949 ( <i>P</i> = 0.051)
PEA	0.300 ( <i>P</i> = 0.624)	0.975 ( <i>P</i> = 0.005)	0.975 ( <i>P</i> = 0.005)	—	0.100 ( <i>P</i> = 0.873)	-1.000 ( <i>P</i> < 0.01)
AA	0.900 ( <i>P</i> = 0.037)	0.205 ( <i>P</i> = 0.741)	0.205 ( <i>P</i> = 0.741)	0.100 ( <i>P</i> = 0.873)	—	-0.200 ( <i>P</i> = 0.800)
PMS	-0.200 ( <i>P</i> = 0.800)	-0.949 ( <i>P</i> = 0.051)	-0.949 ( <i>P</i> = 0.051)	-1.000 ( <i>P</i> < 0.01)	-0.200 ( <i>P</i> = 0.800)	—

הערך *P* מייצג את רמת המובהקות של מודל ההשוואה בתוך הקבוצות.

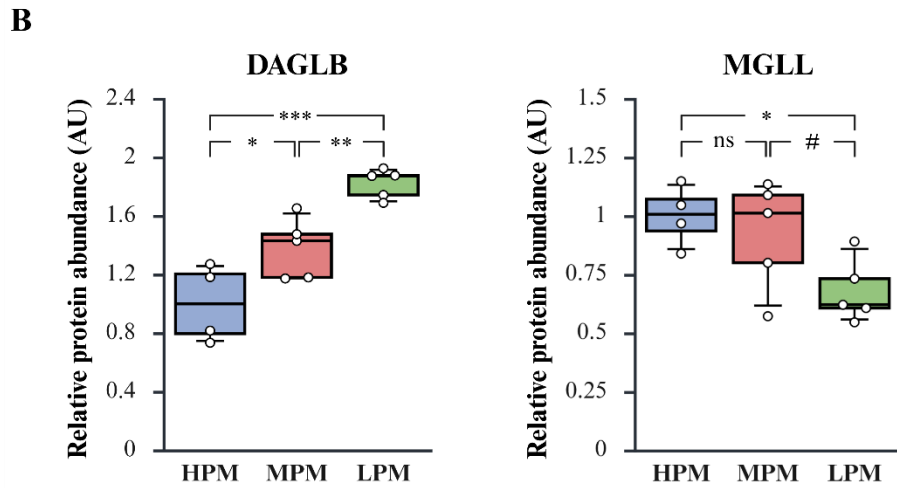
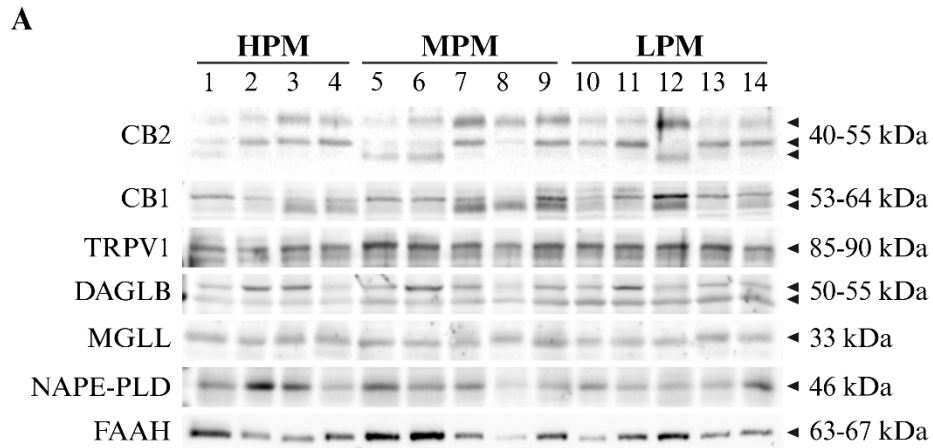
### ביטוי חלבוני ECS בתאי הזרע

בשנות המחקר השנייה והשלישית ביצענו אנליזות של מרכיבי ה-ECS על ידי בחינת ביטוי החלבונים: CB1, CB2, TRPV1, FAAH, DAGLB, NAPE-PLD בתאי הזרע. **הפקת חלבונים:** תאי הזרע הופרדו מהזרמה באמצעות סרכוז (4000 g במשך 10 דקות) ונשטפו ב-PBS. הפקת החלבון בוצעה על ידי הוספת בופר RIPA (Sigma-Aldrich) בתוספת תערובת מעכבי פרוטאזות ופוספאזות (P5726-5ML ו-P8340-5ML, Sigma-Aldrich). ריכוז החלבון בדגימות נקבע בשיטת QPRO Cyanagen BCA Assay (Standard Kit). עבור כל דגימה, כמות שווה של חלבון כללי הופרדה לפי משקל החלבון בשיטת SDS-PAGE בג'ל אקרילאמיד, ולאחר מכן הועברו החלבונים לממברנת ניטרוצלולוז. הממברנות נחסמו בתמיסת חסימה ולאחר מכן הודגרו לילה ב-4°C עם נוגדנים ראשוניים כנגד:

- CB1 (1:200, ab23703, Abcam Biotech)
- CB2 (1 mg/mL, ADI-905-820-100, Enzo Life Sciences)
- TRPV1 (1 mg/mL, WH0007442M1, Sigma-Aldrich)
- FAAH (1 µg/mL, ARP33121\_P050, Aviva Systems Biology)
- MGLL (1:1000, ab24701, Abcam Biotech, UK)
- DAGLB (HPA069377 Sigma-Aldrich; 1:200)
- NAPE-PLD (ab246951 Abcam; 1:200)

לאחר שטיפות הודגרו הממברנות עם נוגדן שניוני מצומד HRP. פיתוח בוצע באמצעות תגובת Enhanced Chemiluminescence (ECL). ביטוי החלבונים נותח באמצעות תוכנת ImageJ (NIH), לאחר חשיפות מרובות לקביעת תחום ליניארי לכל נוגדן. עבור כל חלבון, עוצמת הבנד הספציפי עבור כל דגימה נורמלה ביחס לכמות החלבון הכללית באותה הדגימה. הכימות נעשה באמצעות צביעת פונסו, שיטה מדויקת לכמת את הביטוי הספציפי

ביחס לכל דוגמא. השוואות בין הקבוצות בוצעו באמצעות SAS GLM procedure (version 9.2, 2002). הבדל נחשב מובהק כאשר  $P \leq 0.05$ .



**איור 7.** ביטוי חלבונים של המערכת האנדוקנבינואידית בתאי זרע שנבדלו בתנועות הפרוגרסיביות. \* - הבדל מובהק סטטיסטית ( $P \leq 0.05$ ); \*\* -  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* -  $P \leq 0.001$ ; # - מציין נטייה למובהקות ( $P \leq 0.1$ ).

**טבלה 10.** סיכום אנליזה של ביטוי חלבונים של המערכת האנדוקנבינואידית בתאי זרע שנבדלו בתנועתיות הפרוגרסיבית

Main Effect P-value	קבוצת תנועתיות			חלבון (AU)
	LPM	MPM	HPM	
0.56	1.23 ± 0.24	1.40 ± 0.24	1.00 ± 0.27	CB2
0.26	1.45 ± 0.21	1.49 ± 0.21	1.00 ± 0.23	CB1
0.54	1.12 ± 0.07	1.08 ± 0.07	1.00 ± 0.08	TRPV1
0.0002	1.82 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.38 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.10 <sup>c</sup>	DAGLB
0.045	0.68 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.92 ± 0.08 <sup>ab</sup>	1.00 ± 0.09 <sup>a</sup>	MGLL
0.147	0.59 ± 0.13	0.72 ± 0.13	1.00 ± 0.14	NAPEPLD
0.771	0.80 ± 0.21	0.98 ± 0.21	1.00 ± 0.23	FAAH

הערכים מוצגים כממוצעים ± שגיאת תקן. אותיות בכתב עילי (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) מסמנות הבדלים מובהקים סטטיסטית בין קבוצות הניסוי ( $P \leq 0.05$ ).

**תוצאות:** כאשר נבחנה ההשפעה של תנועתיות הזרמה על ביטוי חלבונים של ה-ECS בתאי הזרע, נמצא כי הביטוי של האנזים MGLL, אשר מפרק את האנדוקנבינואיד 2-AG, היה נמוך יותר באופן מובהק בתאי זרע עם תנועתיות נמוכה לעומת תאים עם תנועתיות גבוהה (איור 7, טבלה 10,  $P = 0.045$ ). לעומת זאת, הביטוי של האנזים DAGLB, אשר מסנטז את האנדוקנבינואיד 2-AG, היה גבוה יותר בתאים עם התנועתיות הנמוכה לעומת התנועתיות הגבוהה (איור מספר 7, טבלה מספר 10,  $P = 0.0002$ ). לא נמצא הבדל בביטוי הקולטנים CB1, CB2, TRPV1 או בביטוי האנזימים NAPEPLD, FAAH בין הקבוצות (טבלה מספר 10).

### סטטיסטיקה

מבחנים סטטיסטיים נערכו באמצעות תוכנת IBM SPSS Statistics 23.0. רמת המובהקות הוגדרה  $P \leq 0.05$ . עבור כלל המדגם ועבור כל קבוצת ניסוי (LPM, MPM, HPM) בוצע ניתוח קורלציות לא-פרמטרי מסוג Spearman (two-tailed) בין מרכיבי המערכת האנדוקנבינואידית, הן בנוזל הזרע והן בתאי הזרע. הבדלים בפרופיל האנדוקנבינואיד בין קבוצות התנועתיות הפרוגרסיבית נבחנו באמצעות ניתוח שונות One-way ANOVA ולאחריו בוצע מבחן פוסט-הוק מסוג Tukey HSD לצורך השוואות זוגיות בין הקבוצות. רוב המבחנים הסטטיסטיים נערכו באמצעות תוכנת IBM SPSS Statistics 23.0. הבדלים נבחנו באמצעות Independent samples T test ( $P \leq 0.05$ ). תוצאות ביטוי החלבון נבחנו בתוכנת GLM SAS (2002).

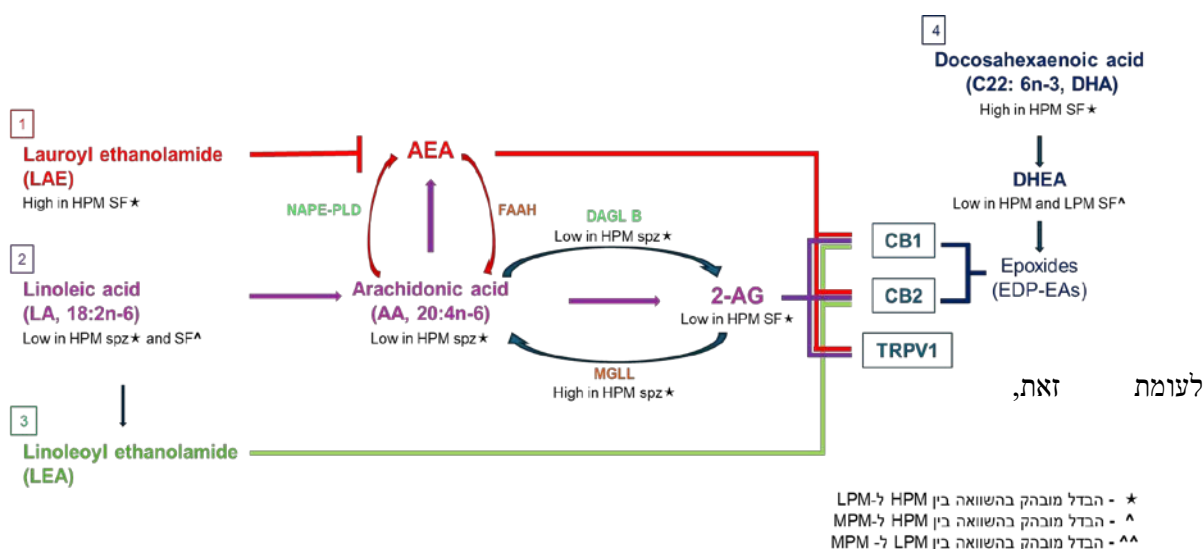
### 5. דיון

במחקר זה אפיינו לראשונה את מרכיבי המערכת האנדוקנבינואידית בזרמה של פרים בישראל, ובחנו את ההרכב של חומצות שומן שמהוות חומרי מוצא לסינתזת האנדוקנבינואידים בתא, הרמות היחסיות והמוחלטות של האנדוקנבינואידים בנוזל ובתאי הזרע, ואת ביטוי הקולטנים והאנזימים המרכזיים בתאי זרע של פרים הנבדלים במידת התנועתיות הפרוגרסיבית שלהם.

בבחינת רמות חומצות שומן ונגזרות-האנדוקנבינואידים התגלו מספר ממצאים מעניינים. ראשית, בהתייחס לחומצה ארכידונית (C20:4n6 AA) המשמשת כפרקורסור לסינתזה של אנדוקנבינואידים מסוג ארכידונוילגליצרולים

(Arachidonoylglycerols) (Komarnytsky et al., 2021) התקבלה רמה נמוכה של חומצה ארכידונית הן בתאים והן בנוזל הזרע, שהופרדו מזרמה בעלת תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה. קבוצה זו התאפיינה גם ברמה נמוכה של האנדוקנבינואיד 2-AG. הרמה הנמוכה של AA שנמצאה באנליזה הכמותית של האנדוקנבינואידים בנוזל הזרע בקבוצת התנועתיות הפרוגרסיבית הגבוהה תואמת את ממצאי השנה הראשונה של המחקר, ומחזקת את ההשערה כי זמינות פרקורסורים למרכיבי המערכת האנדוקנבינואידית קשורה לתפקוד תאי הזרע. לעומת זאת, ובניגוד לממצאי שנה א', היעדר הבדלים ברמות AA בתאי הזרע עצמם, עשוי להעיד כי ריכוז החומצה הארכידונית בסביבה החוץ-תאית (נוזל הזרע) ולא התוך-תאית היא הגורם המקשר בין המערכת האנדוקנבינואידית והתנועה הפרוגרסיבית. הסבר אפשרי נוסף לממצאים אלו, הוא שייכתן ומדובר בשונות בין הדגימות או בין שיטות האנליזה, שנלקחו/נעשו בשנה הראשונה והשלישית למחקר. בדוגמאות זרמה מקבוצת ה-HPM, הן בתאי הזרע והן בנוזל הזרע נמצא אחוז נמוך יותר של חומצה לינולאית (C18:2n6) המהווה את המקור לסינתזה של החומצה הארכידונית. כמו כן, השיעור הכללי של חומצות שומן מסוג אומגה-6 היה נמוך יותר בפרי ה-HPM. לכן, ניתן לשער כי הזמינות הנמוכה יותר של חומצות שומן מסוג אומגה-6 בתאים ובנוזל הזרמה בפרי ה-HPM קשורים לרמות הנמוכות של האנדוקנבינואיד 2-AG. מסלול זה מתואר באיור מספר 8 – מסלול 2. חומצה לינולאית (C18:2n6) משמשת גם כפרקורסור לאנדוקנבינואיד Linoleoyl- (LEA) Ethanolamide, אשר רמתו הייתה גבוהה ביותר ב-MPM, בינונית ב-HPM והכי נמוכה ב-LPM. LEA בעצמו יכול להיקשר לרצפטורים קנבינואידים, ולכן אנו משערים כי LEA יכול להיות אנדוקנבינואיד פוטנציאלי שקשור למידת התנועתיות של הזרמה (איור 8, מסלול 3). כמו כן, בנוזל הזרע של קבוצת HPM נמצאה רמה גבוהה של (LAE) Lauroyl-Ethanolamide אשר עשוי לעכב סינתזה של AEA (איור 8, מסלול 1), אך AEA עצמו לא זוהה בנוזל הזרע. יתרה מכך, רמות גבוהות של חומצת שומן DHA (C22:6n-3) שנצפו בקבוצת HPM עשויות להשפיע על תפקוד הרצפטורים CB1 ו-CB2 דרך הנגזרות שלה DHEA (מולקולה ממשפחת האנדוקנבינואידים) ואפוקסידים (EDP-EAs) כפי שמוצג באיור 8, מסלול 4, אולם במחקרנו לא נמצא הבדל ברמות ה-DHEA כך שהסבירות לכך אינה גבוהה. ממצא נוסף נוגע ל-Myristoyl-Ethanolamide שהיא מולקולה ממשפחת האנדוקנבינואידים הנוצרת מחומצת שומן מיריסטית (C14:0) ואתנולמין. בעבודה זו, זרמה מקבוצה בעלת תנועתיות פרוגרסיבית גבוהה התאפיינה גם ברמה גבוהה של החומצה המיריסטית (הן בתאים והן בנוזל הזרע), וגם בנוכחות גבוהה של Myristoyl-Ethanolamide בנוזל הזרע לעומת זרמות עם תנועתיות פרוגרסיבית מופחתת, דבר העשוי להצביע על כך שמולקולה זו גם מהווה ביומרקר פוטנציאלי בעלת קשר לתנועתיות הזרמה, אולם יש לבצע מחקרי המשך בכדי לבחון השערה זו. בהמשך המחקר מצאנו כי בהתאם לספרות, תאי הזרע של פרים מבטאים את מרכיבי ה-ECS, ואפיינו לראשונה בפריים בישראל ברמת החלבון את ביטוי הקולטנים העיקריים CB1, CB2, TRPV1 וכן של האנזימים העיקריים -NAPE, DAGLB, MGLL, FAAH, PLD ו-DAGLB. באופן מעניין, רמות האנזימים DAGLB ו-MGLL, אשר מבקרים את רמת ה-2-AG ע"י סינתזה ופירוק בהתאמה (Zachut et al., 2025), היו שונות בין קבוצות התנועתיות וביחס הפוך אחד לשני, רמת החלבון DAGLB הייתה נמוכה ביותר בתאים עם תנועה פרוגרסיבית גבוהה (HPM) וגבוהה ביותר באלו עם התנועה הנמוכה (LPM), לעומת זאת, רמת החלבון MGLL הייתה נמוכה ביותר בקבוצת LPM. לא נמצא שוני בין רמת ביטוי הרצפטורים או אנזימים שמבקרים את רמת ה-AEA. אנו משערים כי לביטוי של אנזימים אלו ולהרכב חומצות שומן, יכולה להיות השפעה על הרכב האנדוקנבינואידים בתאי הזרע וכי הממצאים שהתקבלו מצביעים על המעורבות הפוטנציאלית של המערכת האנדוקנבינואידית בדפוס התנועה הפרוגרסיבית בפריים.

במחקר זה ביצענו אנליזה אנדוקנבינואידית בשתי פרקציות: נוזל הזרע ותאי הזרע, במטרה להבדיל בין תרומת הסביבה החוץ-תאית ובין זו של המנגנונים תוך-תאיים ולאמוד את השפעתם על דפוס התנועתיות הפרוגרסיבית של תאי הזרע. הממצא כי AEA לא זוהה בנוזל הזרע, לצד נוכחותו ברמות נמוכות בתאי הזרע, עשוי לשקף את אופייה של מולקולה זו כאנדוקנבינואיד בעל טווח פעולה קצר, הנתון לפירוק מהיר בעיקר באמצעות האנזים FAAH. אולם, היות ולא נמצאו הבדלים בביטוי FAAH בין קבוצות התנועתיות, ייתכן והיעדר ההבדלים ברמות AEA אינו קשור להבדלים בתנועה הפרוגרסיבית. בהתאם לכך, ניתן להציע כי AEA פועל בעיקר ברמה תוך-תאית בתאי הזרע, בעוד שריכוזו בנוזל הזרע נמוך מאוד או עובר פירוק מהיר המונע את זיהויו, ללא קשר ישיר לתנועתיות הפרוגרסיבית של תאי הזרע. היעדר מתאם בין מרכיבי המערכת האנדוקנבינואידית בנוזל הזרע, וכן היעדר קשרים עם הישרדות פרוגרסיבית עשויים להצביע על כך שמרכיבי המערכת האנדוקנבינואידית בנוזל הזרע אינם בהכרח משקפים באופן ישיר את הדינמיקה המטבולית הקשורה לתפקוד התנועתי של תאי הזרע, לפחות עבור המולקולות שנבדקו במחקר זה. עוד ייתכן כי ריכוזי המרכיבים בנוזל הזרע מושפעים מגורמים נוספים, שאינם קשורים ישירות לתנועתיות הפרוגרסיבית.



**איור 8.** מסלולים עיקריים של מטבוליטים ממשפחת האנדוקנבינואידים, שנמצאו ברמות שונות בפרים עם תנועה פרוגרסיבית גבוהה (HPM) לעומת נמוכה (LPM).

הקורלציות החיוביות בין מולקולות ממשפחת ה-N-acylethanolamines בתאי הזרע מצביעות על אפשרות לקיומם של מנגנוני בקרה משותפים במסלול מטבולי זה ברמה התוך-תאית. ממצא זה תואם את הידוע במסלולי הסינתזה והפירוק של מולקולות אלו (Mock et al., 2023) ויכול לרמז על רגולציה מתואמת של המסלול בתאי הזרע. עם זאת, יש להדגיש כי קורלציה אינה מעידה בהכרח על קשר סיבתי, ולכן יש לפרש ממצא זה בזהירות. העובדה שקשרים אלו נמצאו באופן בולט במיוחד בקבוצת התנועתיות הפרוגרסיבית הגבוהה, אך לא בקבוצות הבינונית והנמוכה, עשויה להצביע על תיאום מטבולי גבוה יותר במסלול זה בתאי זרע בעלי תנועתיות תקינה ויעילה יותר. ייתכן שממצא זה משקף רגולציה תוך תאית מדויקת יותר של מסלול ה-N-acylethanolamines בתאים בעלי פוטנציאל תפקודי גבוה, וייתכן שהוא קשור לשמירה על הומאוסטזיס מטבולי הדרוש לתנועתיות פרוגרסיבית מיטבית.

לסיכום, מחקר זה הראה לראשונה כי ישנו קשר בין דפוס התנועה הפרוגרסיבית בתאי זרע של פרים לבין מרכיבי ה-ECS. נראה כי ה-ECS בתאי הזרע מתאפיינת בארגון מטבולי מתואם, בעוד שבנוזל הזרע ייתכן שמתקיימת השפעה של גורמים נוספים או של תהליכים מטבוליים שונים שאינם קשורים באופן ישיר לתנועתיות הפרוגרסיבית. יש לציין כי ניתוחים בתוך הקבוצות בוצעו על תתי מדגמים קטנים, ולכן יש לפרש את הממצאים בזהירות, ולהתייחס אליהם כממצאים ראשוניים המצביעים על מגמות אפשריות ולא כהוכחה חד-משמעית לקשרים מובהקים. לאור ממצאי המחקר יש להמשיך ולבחון במחקרים נוספים את המנגנונים המקשרים בין ה-ECS לתנועתיות תאי זרע, ובהתאם לממצאים לבחון אסטרטגיות לביצוע מודולציות בהפעלת ה-ECS כאמצעי לשיפור התנועתיות של תאי זרע, כאמצעי חדשני לשיפור איכות הזרע בפרים.

## 6. רשימת ספרות

- Agirregoitia, E., Carracedo, A., Subirán, N., Valdivia, A., Agirregoitia, N., Peralta, L., Velasco, G., Irazusta, J., 2010. The CB2 cannabinoid receptor regulates human sperm cell motility. *Fertil. Steril.* 93, 1378–1387. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.153>
- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B., 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384, 83–87. <https://doi.org/10.1038/384083a0>
- Francavilla, F., Battista, N., Barbonetti, A., Vassallo, M.R.C., Rapino, C., Antonangelo, C., Pasquariello, N., Catanzaro, G., Barboni, B., Maccarrone, M., 2009. Characterization of the Endocannabinoid System in Human Spermatozoa and Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in Their Fertilizing Ability. *Endocrinology* 150, 4692–4700. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0057>
- Gervasi, M.G., Rapanelli, M., Ribeiro, M.L., Farina, M., Billi, S., Franchi, A.M., Martinez, S.P., 2009. The endocannabinoid system in bull sperm and bovine oviductal epithelium: role of anandamide in sperm–oviduct interaction. *Reproduction* 137, 403–414. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0204>
- Howlett, A.C., 1995. Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 607–634. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.35.040195.003135>
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., Kadirvel, G., 2011. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System – A Review. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 165–172. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x>
- Kogan, T., Grossman Dahan, D., Laor, R., Argov-Argaman, N., Zeron, Y., Komsky-Elbaz, A., Kalo, D., Roth, Z., 2021. Association between Fatty Acid Composition, Cryotolerance and Fertility Competence of Progressively Motile Bovine Spermatozoa. *Anim. Open Access J. MDPI* 11, 2948. <https://doi.org/10.3390/ani11102948>
- Kumar, A., Mishra, A.K., Singh, V., Yadav, S., Saxena, A., Garg, S.K., Swain, D.K., 2019. Molecular and functional insights into Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) in bull spermatozoa. *Theriogenology* 128, 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.029>
- Li, Y., Kalo, D., Zeron, Y., Roth, Z., 2016. Progressive motility – a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines. *Zygote* 24, 70–82. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000720>
- Maccarrone, M., Barboni, B., Paradisi, A., Bernabò, N., Gasperi, V., Pistilli, M.G., Fezza, F., Lucidi, P., Mattioli, M., 2005. Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J. Cell Sci.* 118, 4393–4404. <https://doi.org/10.1242/jcs.02536>

- Mechoulam, R., Lumír Hanuš, Moshe Ligumsky, Norbert E. Kaminski, Anthony R. Schatz, Asher Gopher, Shlomo Almog, Billy R. Martin, David R. Compton, Roger G. Pertwee, Graeme Griffin, Michael Bayewitch, Jacob Barg, and Zvi Vogel., 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50, 83–90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-D](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-D)
- Moallem, U., Neta, N., Zeron, Y., Zachut, M., Roth, Z., 2015. Dietary  $\alpha$ -linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alter fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 83, 1110–1120. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.008>
- Mock, E.D., Gagestein, B., van der Stelt, M., 2023. Anandamide and other *N*-acylethanolamines: A class of signaling lipids with therapeutic opportunities. *Prog. Lipid Res.* 89, 101194. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101194>
- Morrell, J.M., Valeanu, A.S., Lundeheim, N., Johannisson, A., 2018. Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. *Acta Vet. Scand.* 60, 41. <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0396-2>
- Murataeva, N., Straiker, A., Mackie, K., 2014. Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1379–1391. <https://doi.org/10.1111/bph.12411>
- Myers, M.N., Zachut, M., Tam, J., Contreras, G.A., 2021. A proposed modulatory role of the endocannabinoid system on adipose tissue metabolism and appetite in periparturient dairy cows. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 12, 21. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00549-3>
- Nielsen, J.E., Rolland, A.D., Rajpert-De Meyts, E., Janfelt, C., Jørgensen, A., Winge, S.B., Kristensen, D.M., Juul, A., Chalmel, F., Jégou, B., Skakkebaek, N.E., 2019. Characterisation and localisation of the endocannabinoid system components in the adult human testis. *Sci. Rep.* 9, 12866. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49177-y>
- Nunn, A.V.W., Guy, G.W., Bell, J.D., 2010. Endocannabinoids, FOXO and the metabolic syndrome: Redox, function and tipping point – The view from two systems. *Immunobiology, Special Issue: Cannabinoids and Immunology* 215, 617–628. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.03.005>
- Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., Ueda, N., 2004. Molecular Characterization of a Phospholipase D Generating Anandamide and Its Congeners\*. *J. Biol. Chem.* 279, 5298–5305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306642200>
- Orgal, S., Zeron, Y., Elior, N., Biran, D., Friedman, E., Druker, S., Roth, Z., 2012. Season-Induced Changes in Bovine Sperm Motility Following a Freeze-Thaw Procedure. *J. Reprod. Dev.* 58, 212–218. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-149N>
- Pertwee, R.G., Ross, R.A., 2002. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 101–121. <https://doi.org/10.1054/plef.2001.0341>
- Rossato, M., Ion Popa, F., Ferigo, M., Clari, G., Foresta, C., 2005. Human Sperm Express Cannabinoid Receptor Cb1, the Activation of Which Inhibits Motility, Acrosome Reaction, and Mitochondrial Function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 984–991. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1287>
- Schuel, H., Burkman, L.J., Lippes, J., Crickard, K., Forester, E., Piomelli, D., Giuffrida, A., 2002. *N*-Acylethanolamines in human reproductive fluids. *Chem. Phys. Lipids* 121, 211–227. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(02\)00158-5](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(02)00158-5)
- Silvestri, C., Di Marzo, V., 2013. The Endocannabinoid System in Energy Homeostasis and the Etiopathology of Metabolic Disorders. *Cell Metab.* 17, 475–490. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.001>
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K., 1995. 2-Arachidonoylglycerol: A Possible Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand in Brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 89–97. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2437>

- Tsuboi, K., Sun, Y.-X., Okamoto, Y., Araki, N., Tonai, T., Ueda, N., 2005. Molecular Characterization of N-Acylethanolamine-hydrolyzing Acid Amidase, a Novel Member of the Choloylglycine Hydrolase Family with Structural and Functional Similarity to Acid Ceramidase \*. J. Biol. Chem. 280, 11082–11092. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413473200>
- Zachut, M., 2020. Letter to the editor: Are the physiological effects of dietary n-3 fatty acids partly mediated by changes in activity of the endocannabinoid system in dairy cows? J. Dairy Sci. 103, 1049. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17328>
- Zachut, M., Butenko, Y., dos Santos Silva, P., 2025. *International Symposium on Ruminant Physiology: The involvement of the endocannabinoid system in metabolic and inflammatory responses in dairy cows during negative energy balance\**. J. Dairy Sci. 108, 7643–7661. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25772>
- Zachut, M., Kra, G., Moallem, U., Livshitz, L., Levin, Y., Udi, S., Nemirovski, A., Tam, J., 2018. Characterization of the endocannabinoid system in subcutaneous adipose tissue in periparturient dairy cows and its association to metabolic profiles. PLoS ONE 13, e0205996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205996>
- Zufferey, F., Donzé, N., Rahban, R., Senn, A., Stettler, E., Rudaz, S., Nef, S., Rossier, M.F., 2020. Semen endocannabinoids are correlated to sperm quality in a cohort of 200 young Swiss men. Andrology 8, 1126–1135. <https://doi.org/10.1111/andr.12785>

## Abstract

**Scientific Background:** Reproductive management in both domestic and global dairy cattle farming is heavily reliant on artificial insemination and characterized by the utilization of cryopreserved semen. Ejaculate quality serves as a major determinant in this intensive reproductive management system. A decline or impairment in semen quality during cryopreservation processes can significantly impact fertilizing capacity and conception rates. Semen quality can be evaluated via physiological and biochemical parameters, as well as the correlations between them. The number of spermatozoa exhibiting progressive motility (straight-line forward movement) is widely utilized as an index to determine semen quality. Recent studies indicate the involvement of the endocannabinoid system (ECS) in numerous pathways associated with the male reproductive system. Arachidonic acid (AA)—a polyunsaturated fatty acid (PUFA) that plays a key role in structural cell membrane assembly—serves as both the precursor molecule and the enzymatic degradation product of the primary endocannabinoids, anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG). In a previous study, we demonstrated a relationship between the concentration of PUFAs in spermatozoa and progressive cell survival. Accordingly, it can be hypothesized that a link exists between the endocannabinoid system, cell membrane composition, and sperm function. In the current study, we investigated the relationship between progressive motility patterns and ECS components within bull spermatozoa and seminal plasma.

**Research Aims:** The general objective of this study was to examine the relationship between progressive sperm motility and the endocannabinoid system. The specific aims were:

1. To characterize the endocannabinoid profile in seminal plasma and determine whether a correlation exists between this profile and progressive motility patterns.
2. To characterize the presence of cannabinoid receptors (CB1, CB2, TRPV1) and the fatty acid amide hydrolase (FAAH) enzyme in spermatozoa, and to assess whether a relationship exists between these components and progressive motility patterns.
3. To evaluate the relationship between ECS components and progressive motility survival.

### **Experimental Design**

During the first year of the study, 15 ejaculates were collected from different bulls in accordance with the seasonal breeding schedule. Ejaculates (5 per group) were allocated into three groups based on their baseline progressive motility patterns relative to the database at that time:

- High Progressive Motility (HPM): >74% progressively motile cells.
- Medium Progressive Motility (MPM): 60% - 74% progressively motile cells.
- Low Progressive Motility (LPM): < 59% progressively motile cells.

Each ejaculate was centrifuged to separate the cellular fraction (spermatozoa) from the liquid fraction (seminal plasma). For each isolated sample, seminal plasma and spermatozoa were processed for fatty acid and endocannabinoid profiling. Additionally, an aliquot from each ejaculate was taken to evaluate the survival rate of progressively motile cells. Extraction, identification, and quantification of fatty acids in seminal plasma and spermatozoa were performed following lipid fraction extraction using gas chromatography. During the second and third years of the study, ECS components were analyzed by evaluating the protein expression of CB1, CB2, TRPV1, FAAH, DAGLB, and NAPE-PLD in spermatozoa. Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics software (v23.0). Two-tailed Spearman non-parametric correlation analyses were conducted across the total sample and within each experimental group (HPM, MPM, LPM) to evaluate relationships between ECS components in both seminal plasma and spermatozoa. Differences in endocannabinoid profiles between progressive motility groups were analyzed using one-way ANOVA, followed by Tukey's HSD post-hoc test for pairwise comparisons. Inter-group differences were further analyzed using independent samples t-tests ( $P < 0.05$ ). Protein expression data were analyzed using SAS GLM software (2002).

**Results:** The proportion of morphologically normal cells and progressively motile cells was significantly lower in the LPM group compared to the HPM and MPM groups ( $P < 0.05$ ). The overall percentage of motile cells was higher in the HPM group compared to the LPM group ( $P < 0.05$ ). The percentages of oleic acid (C18:1n9), vaccenic acid (C18:1n7), and linoleic acid (C18:2n6) were significantly lower in the HPM group within both spermatozoa and seminal plasma. No significant differences were observed in overall fatty acid classes (saturated, unsaturated, omega-3, and omega-6 polyunsaturated fatty acids) among the HPM, MPM, and

LPM groups in spermatozoa. The proportion of arachidonic acid (C20:4n6), which serves as both a biosynthetic precursor and an enzymatic degradation product of endocannabinoids, was lower in both spermatozoa and seminal plasma of the HPM group compared to the LPM group. While no significant inter-group differences were found regarding docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n3) content in spermatozoa, the percentage of DHA was higher in the seminal plasma of HPM samples compared to LPM samples. Furthermore, the total proportion of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids was lower in the seminal plasma of HPM cells compared to MPM cells. Omega-6 fatty acid levels were lower in the seminal plasma of the HPM group compared to the MPM group ( $P < 0.05$ ); however, no differences in omega-3 fatty acid levels were detected between groups. Regarding the relative endocannabinoid profile, 2-AG levels were significantly lower in the seminal plasma of HPM samples compared to MPM samples. AEA was not detected in seminal plasma. In the third year of the study, an absolute quantitative analysis of endocannabinoid levels was performed at Prof. Joseph Tam's laboratory at the Hebrew University. AEA remained undetected in seminal plasma; it was found at low levels in spermatozoa, but no significant differences in sperm AEA levels were observed between the progressive motility groups. Correlation analysis within the seminal plasma fraction revealed no correlation between endocannabinoid levels, nor any significant associations with progressive motility survival. Intra-group correlation analyses within each individual motility group (HPM, MPM, LPM) showed no statistically significant correlations among the tested parameters in seminal plasma. In contrast, correlation analysis within the cellular fraction (spermatozoa) indicated significant positive correlations between molecules of the N-acylethanolamine family (AEA, OEA, and PEA) and progressive survival. Disaggregated intra-group correlation analyses demonstrated strong positive correlations between N-acylethanolamine family molecules specifically within the HPM group, whereas no statistically significant associations were found within the MPM and LPM groups. When assessing the impact of semen motility on sperm ECS protein expression, the expression of the monoacylglycerol lipase (MGLL) enzyme—which degrades the endocannabinoid 2-AG—was significantly lower in spermatozoa with low motility compared to those with high motility ( $P = 0.045$ ). Conversely, the expression of diacylglycerol lipase beta (DAGLB)—the enzyme responsible for synthesizing 2-AG—was higher in low-motility cells compared to high-motility cells ( $P = 0.0002$ ). No differences were observed between groups regarding the expression of CB1, CB2, or TRPV1 receptors, nor the enzymes NAPE-PLD and FAAH.

**Discussion:** Evaluation of fatty acid levels and endocannabinoid derivatives revealed several noteworthy findings. First, regarding arachidonic acid (AA, C20:4n6), which acts as a precursor for the synthesis of arachidonoylglycerol-type endocannabinoids, reduced AA levels were observed in both the cellular and seminal plasma fractions isolated from high progressive motility

ejaculates. This HPM group was concurrently characterized by low levels of the endocannabinoid 2-AG. The low level of AA identified via quantitative endocannabinoid analysis in the seminal plasma of the HPM group supports the hypothesis that precursor availability for ECS components is linked to spermatozoal function. Conversely, and in contrast to our Year 1 findings, the lack of differences in AA levels within the spermatozoa themselves may indicate that the concentration of arachidonic acid in the extracellular environment (seminal plasma), rather than the intracellular environment, serves as the linking factor between the endocannabinoid system and progressive motility. In HPM semen samples, a lower percentage of linoleic acid (C18:2n6), the metabolic source for arachidonic acid synthesis, was found in both sperm cells and seminal plasma. Furthermore, the overall proportion of omega-6 fatty acids was lower in HPM bulls. It can therefore be hypothesized that the lower availability of omega-6 fatty acids in the cells and seminal plasma of HPM bulls is functionally related to the low levels of the endocannabinoid 2-AG. Linoleic acid (C18:2n6) also serves as a precursor for the endocannabinoid linoleoyl-ethanolamide (LEA), the levels of which were highest in the MPM group, intermediate in the HPM group, and lowest in the LPM group. Because LEA can bind to cannabinoid receptors, we hypothesize that LEA represents a potential endocannabinoid candidate associated with the degree of semen motility. Another finding concerns myristoyl-ethanolamide, an endocannabinoid-family molecule synthesized from myristic acid (C14:0) and ethanolamine. In this study, semen from the high progressive motility group was characterized by high levels of myristic acid (in both cells and seminal plasma) and a high presence of myristoyl-ethanolamide in the seminal plasma compared to semen with reduced progressive motility. This suggests that this molecule may represent a potential biomarker associated with sperm motility; however, follow-up studies are required to validate this hypothesis. Furthermore, we confirmed that bull spermatozoa express ECS components in line with current literature, and we characterized for the first time at the protein level the expression of the primary receptors (CB1, CB2, TRPV1) and key enzymes (NAPE-PLD, FAAH, MGLL, and DAGLB) in Israeli bulls. Interestingly, the levels of DAGLB and MGLL enzymes, which regulate 2-AG levels via synthesis and degradation respectively, differed between motility groups in an inversely proportional manner. DAGLB protein expression was lowest in cells with high progressive motility (HPM) and highest in those with low motility (LPM). In contrast, MGLL protein levels were lowest in the LPM group. We suggest that the expression of these enzymes, alongside fatty acid composition, can modulate the endocannabinoid profile within spermatozoa, and that these findings point to the potential involvement of the ECS in bovine progressive motility patterns. The finding that AEA was undetected in seminal plasma, alongside its presence at low levels within spermatozoa, may reflect the nature of this molecule as a short-range endocannabinoid subject to rapid degradation, primarily via the FAAH enzyme.

The absence of correlation between ECS components in seminal plasma, as well as the lack of association with progressive survival, may indicate that seminal plasma ECS components do not necessarily directly reflect the metabolic dynamics linked to sperm motor function—at least for the molecules evaluated in this study. It is also possible that component concentrations in seminal plasma are influenced by confounding factors unrelated to progressive motility.

In conclusion, this study demonstrates for the first time a relationship between progressive motility patterns in bull spermatozoa and components of the ECS. The ECS within spermatozoa appears to feature a coordinated metabolic organization, whereas the seminal plasma may be subject to additional regulatory factors not directly coupled to progressive motility. It should be noted that intra-group analyses were conducted on small sub-samples; hence, these findings must be interpreted with caution. In light of these results, future studies should continue to elucidate the mechanisms linking the ECS to sperm motility, and consequently investigate ECS modulation strategies as an innovative approach to enhance semen quality in bulls.