

## 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 רות - 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 האנדוקנבינואיד בנזול הזרע ולבחון האם קיים קשר בין הפרופיל האנדוקנבינואיד 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 אנדוקנובינואידיים. 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 האנדוקנובינואידית, הן בנוזל הזרע והן בתאי הזרע. הבדלים בפרופיל האנדוקנובינואידי בין קבוצות התנועות 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 תנועות פרוגרסיבית נמוכה בהשוואה לקבוצות עם תנועות פרוגרסיבית גבוהה ובינונית ( $P \leq 0.05$ ). שיעור כלל התאים הנעים היה גבוה בקבוצה עם תנועות פרוגרסיבית גבוהה בהשוואה לקבוצות עם תנועות 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 תנועות פרוגרסיבית גבוהה, בינונית ונמוכה. שיעור החומצה הארכידונית (C20:4n-6), אשר מהווה הן חומר מוצא לסינטזה של אנדוקנובינואידיים והן תוצר פירוק אנזימתי שלהם, היה נמוך בתאי זרע ובנוזל זרע בקבוצה HPM בהשוואה לאלה עם תנועות 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 תנועות פרוגרסיבית גבוהה בהשוואה לנוזל זרע עם תנועות פרוגרסיבית נמוכה. בנוסף, נמצא ששיעור חומצות שומן חד ורב-בלתי רוויות היה נמוך יותר בנוזל זרע של התאים בעלי תנועות פרוגרסיבית גבוהה בהשוואה לנוזל זרע של התאים בעלי תנועות 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 אנדוקנובינואידי יחסי, שיעור 2-AG היה נמוך באופן מובהק בנוזל של תאי זרע בעלי תנועות פרוגרסיבית גבוהה בהשוואה לנוזל זרע עם תנועות פרוגרסיבית בינונית. AEA לא זוהה בנוזל

הזרע. בשנה ג' של המחקר בוצעה אנליזה כמותית אבסולוטית לרמות האנדוקנבינואידים 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 האנדוקנבינואידים 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 N-acylethanolamines (OEA, AEA, 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 סטטיסטית. 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- (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. 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 -NAPL, DAGLB, MGLL, FAAH, PLD. 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 בקבות 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.