8.7.16

סיכום 2 כנסים צמודים בעיר Tourse , בצרפת

1. **A**ssociation for **A**pplied **A**nimal **A**ndrology (4A)

2. **I**nternational **C**ongress on **A**nimal **R**eproduction (ICAR)

בכנס הראשון (24-26 ליוני) דנים אחת לשנתיים בנושאי איכות הזרע ודרכים לשיפור. הכנס קיבץ כ-120 חוקרים ואנשי מקצוע והוא תמיד צמוד לכנס גדול יותר, והפעם זה היה ICAR (26-30 ליוני). בכנס הגדול התקבצו כ-1,000 איש, רובם מהדור הצעיר של קבוצות המחקר, המציגים את המחקרים שלהם בתקצירים או בהרצאות לפני הקהל. הנושאים בכנס זה מפוזרים יותר בין חיות המשק הגדולות: פרות, סוסים, חזירים, כבשים ועיזים וכולם בהיבטים השונים של הרבייה.

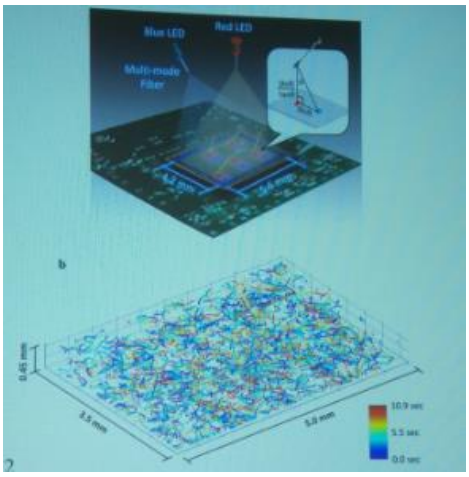
סיכום ה- 4A

בין ההרצאות המוזמנות בלטו מספר הרצאות

- **הדמיה של תנועת הזרע בעזרת צ'יפ חדשני** - חוקר מאוניברסיטת UCLA (קליפורניה ,לוס אנג'לס ,Ozcan), שעדכן את כולנו בטכנולוגיה חדשנית: High throughput imaging and analysis of sperm locomotion using computational on-chip imaging – ההדמיה של תנועת הזרע בעזרת צ'יפ חדשני המחובר לטלפון הנייד, או מחשב נייד/קבוע. הטכנולוגיה אינה צורכת עזרים אופטים הנמצאים במקרוסקופ יקר, אלא נעזרת בעיקרון של תאורה וצל של הפרט הנבחן. כלומר, הדגימה הנלקחת לבדיקת תאי הזרע, מוחדרת לתא בדיקה קטן שבצדו העליון נמצאות שתי נורות זעירות, האחת אנכית והאחת בזוית של °45. הארת תאי הזרע מזוויות שונות מייצרת הצללה תלת ממדית, על מסך הנמצא בתחתית תא הבדיקה. כיוון שתאי הזרע נמצאים בתנועה (החיים), אפשר לעקוב ולתעד את התנועה התלת מימדית (סיבובית לציר, כיוון התנועה, מהירות התנועה) על ידיי "פרשנות" של תנועת הצל שלהם בעזרת תכנת מחשב מתוחכמת. והינה לנו, הגדרה מדויקת יותר לתנועה כיוונית (פרוגרסיבית) של תאי הזרע, וכל זאת בתא מדידה קטן וזול המחובר בכבל USB למחשב או לטלפון. פריצת הדרך הזו תאפשר גם לעקוב אחר בדיקות דם ביתיות, זיהוי מתכות במים, זיהוי אלרגיות, זיהוי E.Coly , מחלות נגיפיות כאיידס....והכל יכול להישלח למוקדי נתונים ודיאגנוסטיקה.

איור 1: תא המדידה החדש (מתוך הרצאתו של Ozcan)

טכניקת התאורה והזיהוי



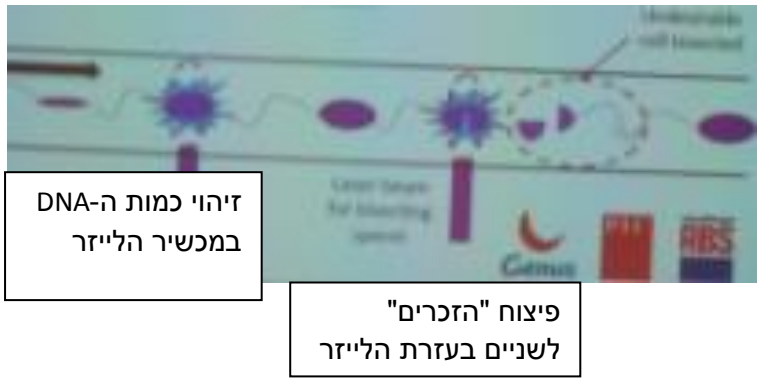
תא המדידה והטלפון הנייד

תא המדידה בצורה אחרת

בהרצאה נצפו תנועות תלת ממדיות עם אבחנות מדויקות של תאי הזרע השונים. ממדים חדשים וכינויים חדשים לצורת התנועה: לינארית, היפרפלאנר, סטאר-ספין, טוויסט, היפר-פרוגרסיבית. נמצא ש-90% מתאי הזרע מסתובבים סביב צירם ימינה ורק 10% שמאלה. "מבול" של מידע חדש שבשנים הקרובות ינסו לראות את מידת התאמתו למדדי הפוריות בשטח.

- **פיתוח חדש של מיון תאי הזרע – Sexing של חברת ההזרעה האמריקאת ABS:** בעשור האחרון התפתחה שיטת מיון תאי הזרע לנקבות/זכרים בעזרת שתי טכנולוגיות שחברו להן יחדיו: 1) זיהוי פלואורסנטי של כמות ה-DNA בתא הזרע - הכמות בכרומוזום ה-X, נקבה, גדול ב3.8% מהכמות בכרומוזום ה- Y,זכר. 2) משיכת תאי הזרע המזוהים לשני קטבים (+) ו-(-). פטנט "יקר מאוד" שנמצא בבעלות חברת (ST) Sexing Technology . היא מקימה מעבדות ברחבי העולם להפרדת תאי הזרע ולמעשה שולטת בתחום זה. חברת ABS פיתחה טכנולוגיה למיון תאי הזרע ששונה במקצת מהטכנולוגיה הקיימת. זה לא מנע מחברת ST לתבוע את חברת ABS, והשתיים נמצאות כעת במאבק משפטי ארוך ויקר. הטכנולוגיה מבוססת על זיהוי פלואורסנטי של כמות ה-DNA בתא הזרע, תוך כדי תנועתו בלחץ ואקום נמוך בתוך קפילר. מכשיר לייזר מזהה את הבדל ה-DNA ומשמיד, על ידיי פיצוח תא הזרע לחלקים, את תאי הזרע הזכריים. לאחר העברת התאים במכשיר, ממלאים קשיות בכ-2.0 מיליון תאים (איור 2). התוצאות בניסוי שדה שביצעה חברת ABS היו דומות לביצועי מיון תאי הזרע כפי שקיבלה חברת ST: שיעורי ההתעברות בעגלות בקבוצת הביקורת היו 58% לעומת 44% בזרמה ממוינת. ניסוי שדה נוסף, ב-17 משקיי חלב גדולים, הביאה לביצועים של 65% בביקורת לעומת 47% בזרמה ממוינת.

איור 2: סכמה לטכניקת זיהוי המין בטכנולוגיה שחברת ABS האמריקאית (מהרצאתה של M. Foust)



- **תאים מתים במירוק והשפעתם על איכות תאי הזרע בקשית ההזרעה**: נמצא שככל שעולים מספר התאים המתים במירוק הטרי, הם משפיעים, בסופו של דבר, גם על איכות תאי הזרע החיים לאחר הקפאה, בקשית. חלקם של תאי הזרע, מתים בזמן תהליך הייצור באשכים, תהליך הנקרא ספרמטוגנזיס. חלק מהתאים ממשיכים להיפגע בהיחשפם לבלוטות המין המשניות (קופר, פרוסטטה, ובלוטות נוזל הזרע)

וחלקם נפגעים בזמן תהליך הקרור והחשיפה לחומרי המיהול וההקפאה. קיימת שונות גדולה בין הפרטים ואחוז התאים המתים, הנמצאים במירוק הטרי עד ההקפאה, נע בין 10-40%. הגורמים לתמותה הם: אוסמולריות, PH, טמפרטורה, עקת חום, אפידימיולוגיה, וחומרים בנוזל המיהול, שחלקם טוקסיים לתאי הזרע (במינון מסויים). מה מידת השפעת התאים המתים על התאים החיים? תאים אלו מפרישים רדיקלים חופשיים הפוגעים בתאי הזרע החיים (במיוחד, באיכות הממברנות), כמוכן, חמצון הגורם להרס ליפידים וחלבונים הגורמים בסופו של התהליך לעצירת תנועתיות תא הזרע. בנוסף לזאת, קיימת גם עליה של שברים ב-DNA תאי הזרע החיים, הגורמים לירידה חדה ביכולת ההפריה.

בניסיונות של הפרייה חוץ גופית (IVF), בהם למעשה אין צורך כמעט בתנועתיות תאיי הזרע, נמצאה ירידה באחוזי ההפריה, ככל שאחוז התאים המתים עלה במירוק הטרי, או הימצאותם של תאים מתים, בנוזל המיועד להפריית הביציות בצלוחית.

איך אפשר למנוע את התופעה? שינוי תזונתי הניתן לזכר או העשרה במונעי חמצון ותוספת מונעי חמצון לנוזלי המיהול. אפשרות נוספת, היא בידוד הזרמה החיה מהזרמה המתה במירוק, בעזרתם של גורמים מכנים: מפל ריכוזים ושחיית החיים, שקיעת המתים.

סיכום כנס ICAR

מחקרים רבים הוצגו במספר אולמות במקביל. אני התמקדתי במספר נושאים: עקת החום, חיזוי פוריות דרך ממצאי מעבדת הזרע, פגיעה במדדי הפוריות לאורך ההריון, מעבר חומר גנטי בין מדינות ושינויים במעבדות הזרע המתרחשים לאור מחקרים חדשים.

צריכת החלב והבשר עולה בארצות המזרח הרחוקות, ועומסי החום, במרבית מהארצות הללו, גבוהים ומשפיעים על מדדי הפוריות של הפרטים.

- **העונתיות והשפעתה על ביצועי הזכרים**: מספר עבודות הוצגו בחלוקה של שלוש עונות: קייץ, חורף ואביב. נמצא שבמרבית העבודות, תנועתיות תאי הזרע לא הייתה שונה בין העונות אולם שלמות ה-DNA נפגעה בעונת הקייץ. הפגיעה הייתה בעיקר באשכים בעקבות עליית הטמפרטורה הסביבתית. לעומת זה, הוצגה מנגד, עבודה ספרדית, שבה לא נמצאה שום שונות במדדי תאי הזרע בין העונות השונות.

- **יצוא/יבוא תאי זרע בין מדינות** – נושא שקיבל דגש רב בדיון של "שולחן עגול": כינוס של נציגי מדינות רבות מהעולם בניהולו של Jan Venneman. Jan ניהל לאורך שנים את קשרי החוץ של חברת CRV ההולנדית ומצוי רבות בנבכי התעודות הווטרינריות השונות בין המדינות השונות. הוא נתן דוגמא ל-50 תעודות ווטרינריות שונות, בין מדינות שונות, שלכולן אותה המטרה: יצוא זרמה. מרבית השינויים בין המדינות הם פרשנויות שונות להמלצות ארגון ה-OIE המאחד בתוכו את מרבית התקנות (שהן בגדר המלצה בלבד) המקנות את האפשרויות השונות לסחר חומר ביולוגי וגנטי בין מדינות. האינטרסים המסחריים והמקצועיים של המדינות הרוצות בשיתוף פעולה, נופלים, לא פעם ולא פעמיים, בשל סחבת גדולה הנובעת מיצירת

האישור הווטרינרי המשותף בין שתי רשויות ממשלתיות ווטרינריות של אותן מדינות. בדיון עלו מספר סוגיות:

1. מדינות המחסנות למחלות מסוימות וניהול הסיכונים הנובעים מכך.

2. יחס מדינות גדולות להמלצות ה- OIE. מדינות אלו, לעיתים קרובות, אינן משתמשות בכל סל התקנות של ה-OIE ומאלצות מדינות השואפות לסחר איתן, לבצע השקעות גדולות מאוד למימוש התעודה הווטרינרית. לעיתים קרובות, גורמים פוליטים ולא מקצועיים, מתערבים בהחלטות אלו.

3. פתרון להופעת מחלות שאינן מופיעות בסל המחלות של ה-OIE: לדוגמא, נגיף השמלנברג המועבר על ידיי יבחושים. מחלה הגורמת למומים ולתמותה, ושנמצאה בשנת 2011 בעיירה קטנה בגרמניה הנקראת שמלנברג. בארגון ה-OIE אין עדיין פתרונות והוראות למחלה זו, אולם מדינות משתמשות בה כבר כחסם למעבר חומר גנטי בניהן.

4. הגברת המחקר והייעוץ המקצועי ל-OIE: הכספים למחקר בסיסי ולאחר מכן המעבר לייעוץ מקצועי ל-OIE, נמצאים בירידה ולא בוחנים מחדש מספר תקנות או התמודדות עם מחלות חדשות, כנדרש.

5. מידע וגישה ל-OIE: כיום, הדרישה לשינוי או לחידוש יכול להגיע לארגון רק ממקור מוסמך של ארגונים ווטרינרים מוכרים על ידיי הממשלות. ארגון ה-International Embryo Technology Society – IETS הוא ארגון חיצוני המוכר ב- OIE ובעל יכולות קשר איתו. כיוון, שבמהותו הוא דן בעיקר בנושא העוברים והסחר בעוברים בין המדינות, רוצים להוסיף לו את "אגף הזרע". בכך הוא יוכל לתקשר בעתיד עם ה-OIE ולדרוש שינויים מהירים יותר, המסתמכים על מחקרים וייעוץ מקצועי, הקיימים בו בצורה טובה יותר.

6. שאלות מחקר פתוחות ל-OIE: עלו מספר סוגיות שאינן פתורות בהוראות ה-OIE.

- ✓ מדוע יש אישור למעבר בין המדינות לפרות/עגלות, לאחר סל של בדיקות ווטרינריות, אולם קיימת החמרה רבה יותר כשמדובר במעבר גנטי בין המדינות, לאחר הזרעה והעברת עוברים/שטיפת ביציות מאותן הפרות.

- ✓ בעידן הג'נומיק, בו תחלופת הפרים היא לעיתים בקצב של אחת ל-4 חודשים, עדיין מתן התשובות מהגופים הווטרינרים הוא איטי וגם יקר. ייעול מערכות התקשורת בין המעבדות לחברות ההזרעה ומשם לתעודה הווטרינרית חייב להיות טוב יותר. לא פעם ולא פעמיים קורה שהערך הגנטי של הפר משתנה, ועדיין אין תשובה מהגוף הווטרינרי על בדיקות שנערכו לו. דוגמא טובה ניתנה בייעול מערכות התקשורת של בדיקות הדם באדם, על ידיי מתן תשובות מהירות בהפרש של מספר שעות.

- ✓ התמודדות מול פתוגנים בשטיפות עוברים In Vivo לעומת שאיבת ביציות והפרייה In Vitro. פרה מחוסנת למחלה מסוימת, מה דין

העוברים שלה? המחקר בעוברי האדם מתקדם מאוד ורצוי ללמוד מהפתרונות שלהם לסיכונים הביולוגים הנמצאים.

- ✓ מידת השימוש באנטיביוטיקה בזרמה המוקפאת. הגישות הקיימות הן מניעה של מחלות בעזרת אנטיביוטיקה לעומת הגישה המצדדת בירידה בשימוש של אנטיביוטיקה.
- ✓ שימוש בטריפסין כמגן על העוברים בסחר גנטי בין מדינות. השימוש בו עבר מהוראה להמלצה בלבד ולעיתים קרובות, יחידות העברת העוברים אינן משתמשות בו יותר. מה מידת השפעתו על חיוניות העוברים?
- ✓ חשש להעברת פתוגניים בחנקן

- **חיזוי פוריות תאי הזרע** – מספר הרצאות דנו בנושא זה (בשני הכנסים). נושא חשוב מאוד. Matthew (מארה"ב) הציג את הנושא בעיניים של חברת ההזרעה. הדגש העיקרי בהרצאתו הייתה ההתמודדות בעידן הג'נומיק עם החלפת הפרים המהירה, והיכולת של חברת ההזרעה לתת את האומדן לפוריות הזרע בצורה מהימנה, לפרים צעירים אלו.

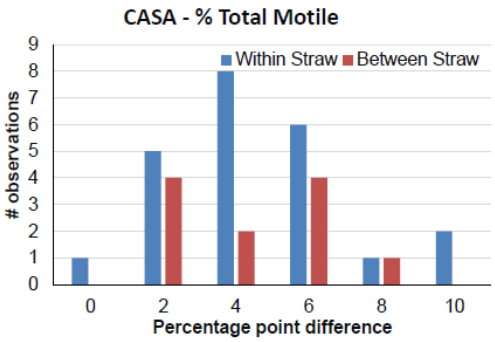
האם התכונות הבאות מספקות את האומדן: תנועתיות תאי הזרע, התנועה הפרוגרסיבית שלהם, אחוז חיים/מתים, המורפולוגיה של תאי הזרע. או שנתונים אחרים על שלמות הממברנה, שברים ב-DNA, פעילות מיטוכנדריאלית, אקרוזום ומצב הכרומטין יספקו אומדן טוב יותר. שאלה חשובה נוספת הייתה סך הבדיקות של המירוק הטרי וסך הבדיקות לאחר הקפאה, מי נותן אומדן טוב יותר? בהיבט של חברות ההזרעה, בדיקות השיגרה, צריכות להיות מהירות ולכן, לעיתים קרובות, טכניקות הדורשות זמן של מספר דקות לבדיקה, לא נכנסות למערך בדיקות השיגרה של המעבדה.

איור 3: חוסר אחידות בתנועתיות תאי הזרע בין פרים, בין מנות זרע של אותו הפר (מהרצאתו של Matthew D. Utt)

Making the Prediction

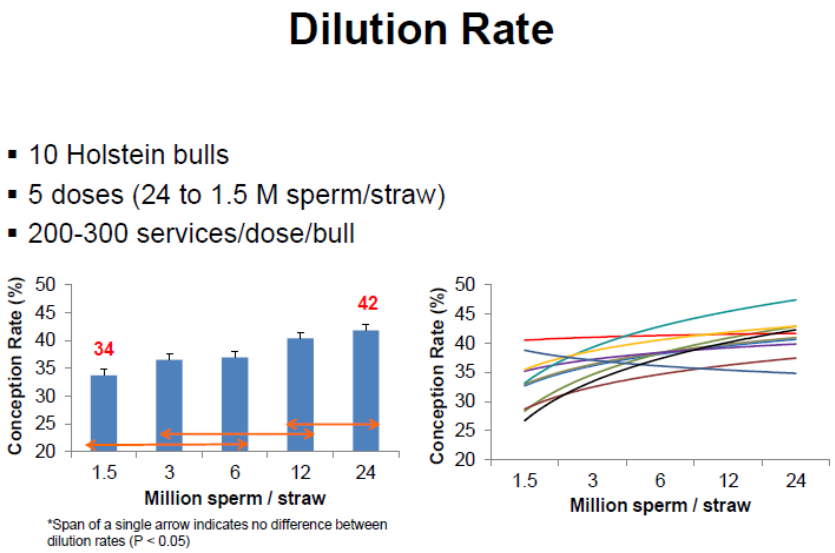
- Expectations of measurement variation for independent variables?

Bull	CASA Total Motile (%)
1	43
2	65
3	72
4	34
5	51
6	32
7	21
8	53



תנועת תאי הזרע היא עדיין גורם חשוב לבחינת איכות תאי הזרע.התנועתיות נמדדת במכשירים שונים. המדידה השכיחה ביותר היא בעזרת טכנולוגיית ה-Computer Assisted Sperm Analysis – CASA, ובאיור 3 מזהים שונות גדולה מאוד בין הפרים. אולם גם קיימת שונות בין הקשיות המופקות ממרוק של פר עד לטווח של 6%. שינויים אלו, משפיעים על ביצועי הפוריות.

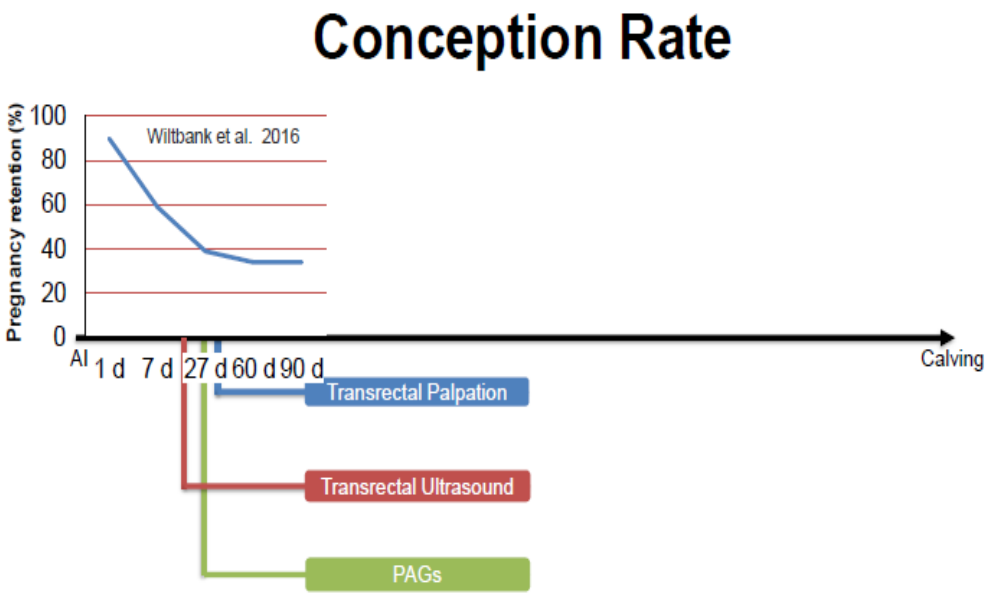
איור 4: מספר תאי הזרע בקשית לפי כמות חומר מיהול (מהרצאתו של Matthew D. Utt)



ניתן לראות שלמרבית הפרים שהיו בניסוי, טווח של 6-20 מיליון בקשית, משקף את פוטנציאל הפוריות המרבי. בנוסף, בין 1.5 ל-6 מיליון תאי זרע בקשית יש מגמת עלייה בביצועי הפוריות אולם אין מובהקות. קיימת מובהקות בין 6 מיליון לעומת 12-24 מיליון תאים בקשית. כלומר, חברות ההזרעה הממלאות את הקשיות ב-15-20 מיליון תאי זרע, מביאות את מרבית הפרים, למדדי הפוריות הטובים שלהם (איור 4).

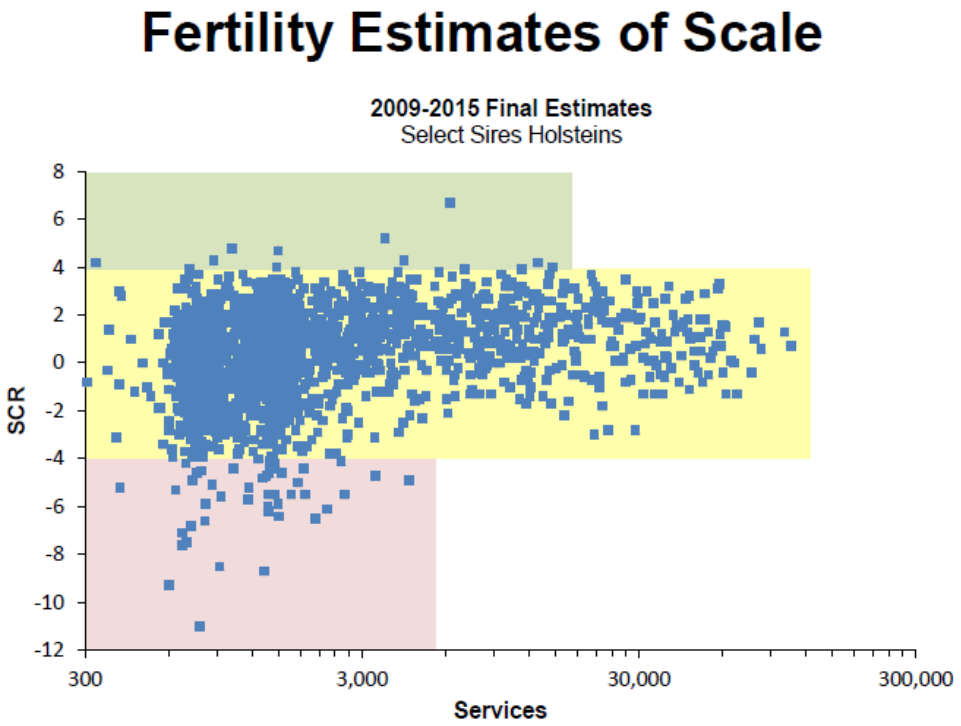
השאלה של איכות תאי הזרע והשפעתם על ביצועי הפוריות ברפת התפרסמה כבר במחקרים רבים. הנושא הגיע לביטוי, פעם נוספת, גם בכנס הזה. נמצא שאחוז גבוה מאוד של ירידה חל בימיו הראשונים של העובר, מזמן ההפריה ועד שלב הבלסטוציסט, בין 50 ל-80 אחוז. גם כשהבלסטוציסט מתחיל את "צעדיו" הראשונים ליקליטה ברחם קיימת עוד ירידה רבה, כשבימים הראשונים אנו מכנים זאת ספיגה ולאחר מכן זו הפלה. ההתייצבות הכללית להריונות, בסופו של התהליך, מתייצבת על כ- 30-50% בפרות. כלומר, במרבית הפעמים ההפריה מתקיימת, ומכאן שהזרע ביצע את תפקידו (איור 5). בעיות ב-DNA תא הזרע, יכולים להשפיע בהמשך הדרך. אולם, "אפקט הפרה" הוא הגורם המשמעותי המשפיעה על יכולת הקליטה והמשך ההריון עד ליציאת הוולד.

איור 5: שיעור זיהוי ההריונות מהפרייה ועד סיום השליש הראשון (מהרצאתו של Matthew D. Utt)



Matthew הציג גם את פיזור פוריות תאי הזרע במדגם גדול ולאורך שנים לעומת מדגם קטן של לוח פרים. בהסבירו את ההבדל בין "סימן" ל - "רעש", הוא התכוון לממצאים מקצועיים המושפעים משינויים אמתיים באוכלוסייה (מובהק, או רק מגמה) לעומת רעשים של אוכלוסייה קטנה בה כל הפרש קטן באחוז ההתעברות של הפר מיד משפיע על החלטות הרפתן/מזריע בשימוש שלו. איור 6 מדגים את הביצועים של אוכלוסיית פרים גדולה שהזריעה בין השנים 2009 ל-2015 . מעט מאוד פרים יצאו מובהקים כלפי מעלה או כלפי מטה. מרביתם באזור הממוצע.

איור 6: פיזור אחוזי ההתעברות (Semen Conception Rate-SCR) של פרים בין השנים 2009ל-2015 (מהרצאתו של Matthew D. Utt)



חברת IMV ערכה שאלון מיוחד שעסק באומדני הפוריות לאור בדיקות המעבדה. מרבית הנשאלים ענו שהתנועה הפרוגרסיבית היא המדד החשוב והקובע. בניסוי שהם ערכו, הם מצאו ששברים ב-DNA הוא המדד הקובע. כלומר, תא הזרע יכול לנוע בצורה נורמלית, אולם ההפריה תיפגע בשל שברים ב-DNA.

- **עבודת המעבדה לקבלה, אבחון והקפאה של תאי הזרע** – מספר עבודות הוצגו ובעיקרן שינוי במדיומים המוספים לתאי הזרע בזמן הקרור. בעבר, מרבית המעבדות, הוסיפו את חלמון הביצה. גם אנו פעלנו כך בעבר. הגישה שונתה בשל המודעות לביטחון ביולוגי ומעבדות רבות משתמשות כיום במדיומים מוכנים המכילים רכיבים ואנטיביוטיקה העוזרים לתאי הזרע לעבור את הקרור-הקפאה-הפשרה בצורה הטובה.

בעקבות ניסיונות שנערכו במספר מעבדות באירופה ובארה"ב שונו סוגי המדיומים המוספים ושונו גם לוחות הזמנים של החשיפה לטמפרטורת החדר ולטמפרטורה של 4 מעלות עד ההקפאה. שינויים אלו צריכים להיות מותאמים לשיגרת העבודה הקיימת היום במעבדות אלו. אנו נבחן פרוטקולים אלו בקפידה, ולאחר נסיונות במעבדה ובשטח נגיע להחלטה על שינוי – כן או לא.

עבודות חשובות בנושא ההורמונים והשימוש הנכון בהם, בתת קבוצות ולא בצורה הגורפת, מתפרסמות בירחון ה-Theryogenology (Procceedings of ICAR 2016, Tours, France 26-30 June 2016).

הסקירה הנוכחית היא ארוכה דייה. הרוצים והמתעניינים בחומר חשוב נוסף על השימוש הנכון בהורמונים, אני מפנה אותם להוצאה זו.

בברכה,

יואל