



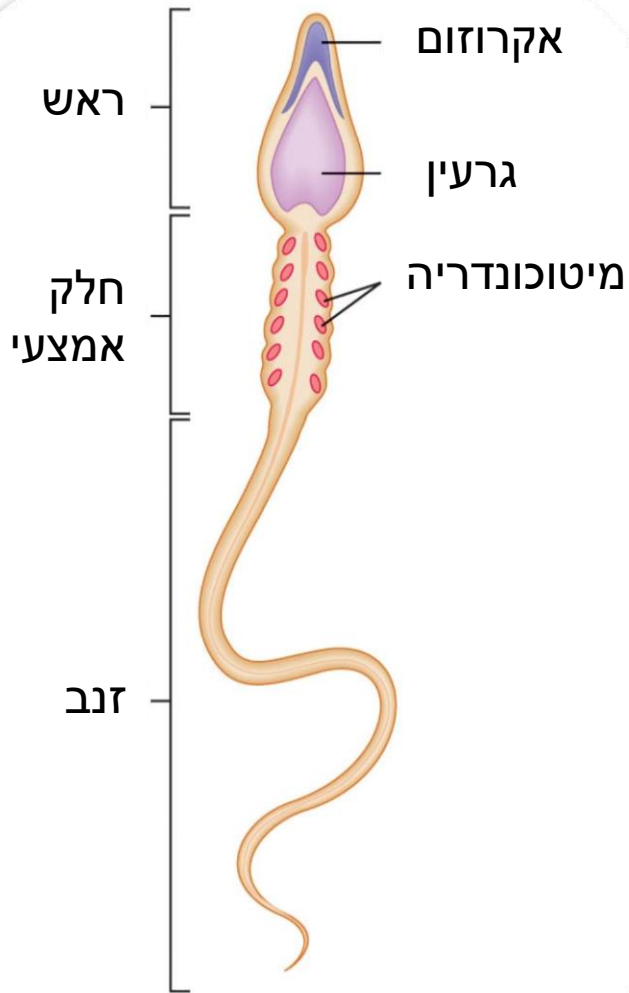
שיטות פלוארומטריות לאפיון ממברנות תאי זרע וקביעת איכותם

אליסה קומסקי-אלבז^{1,3}; יואל זרון^{2,3}; טניה קוגן^{2,3}; צביקה רוט^{1,3}

¹הפקולטה לחקלאות; ²שיאון; ³המרכז לחקר תאי זרע בבע"ח



תא הזרע



© 2011 Pearson Education, Inc.

- **אקרוזום** - שלפוחית בקצה ראש תא הזרע, המכילה אנזימים מעכלים
- **ריאקציית אקרוזום** - שפיכת תוכן האקרוזום לצורך קישור וחדירה לביצית
- **מיטוכונדריה** - מאגר האנרגיה של תא הזרע. מצוי בחלק האמצעי של התא

בדיקות זרע שגרתיות

מתבססות על אבחון פרמטרים פיזיולוגיים וויזואליים:

- נפח הזרמה
- ריכוז תאי הזרע
- תנועה פרוגרסיבית
- מורפולוגיה
- חיות

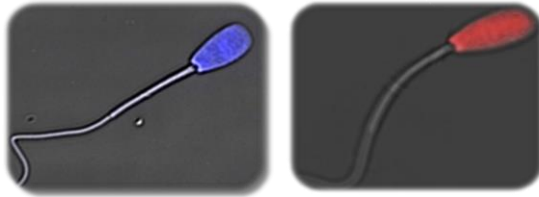


הנחת העבודה

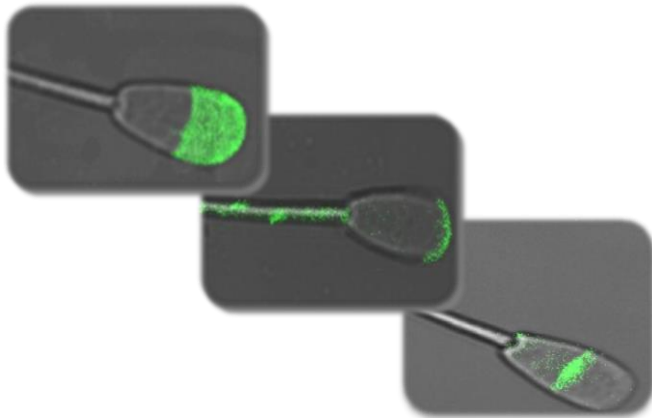
אפיון של מדדים פיסיוולוגיים
פונקציונליים יאפשר לנבא בצורה
טובה יותר את פוטנציאל ההפריה
של תאי הזרע

שיטה 1 - צביעה מרובעת סימולטנית

התאים נצבעו בצביעות פלואורסצנטיות
על מנת לאפיין את איכותם:

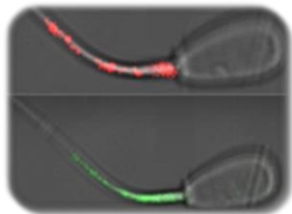


- חיות התאים - צביעת **DAPI** + **PI**



- שלמות וריאקציית האקרוזום –

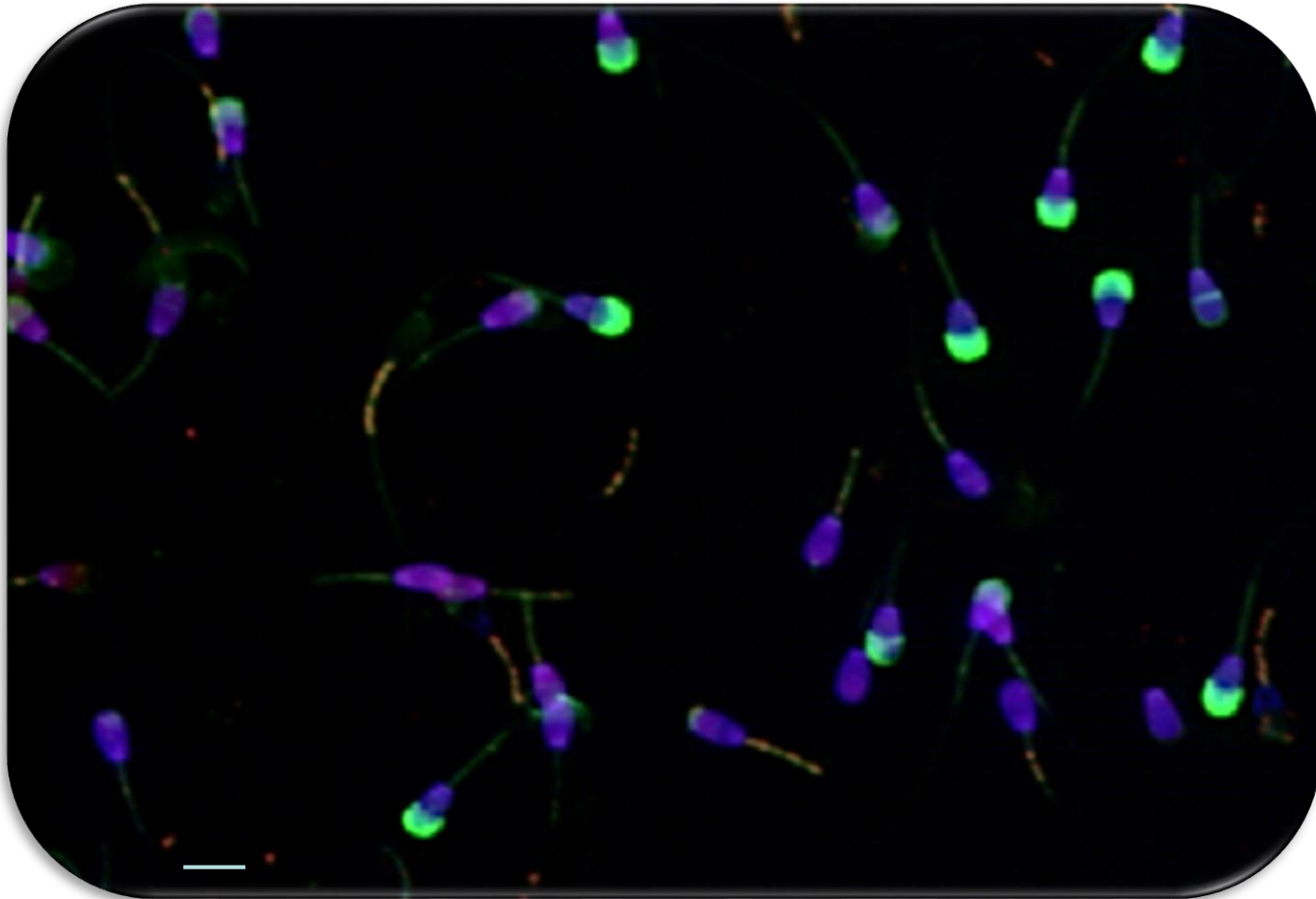
צביעת **FITC-PSA**



- פוטנציאל ממברנת

המיטוכונדריה – צביעת **JC-1**

אבחון ממברנות תאי זרע תוך שימוש בסמנים פלואורסצנטיים



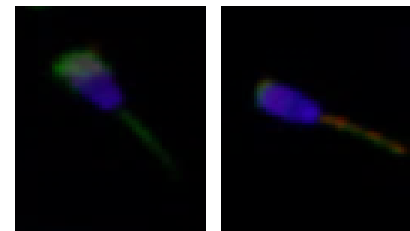
יתרונות וחסרונות

חסרונות

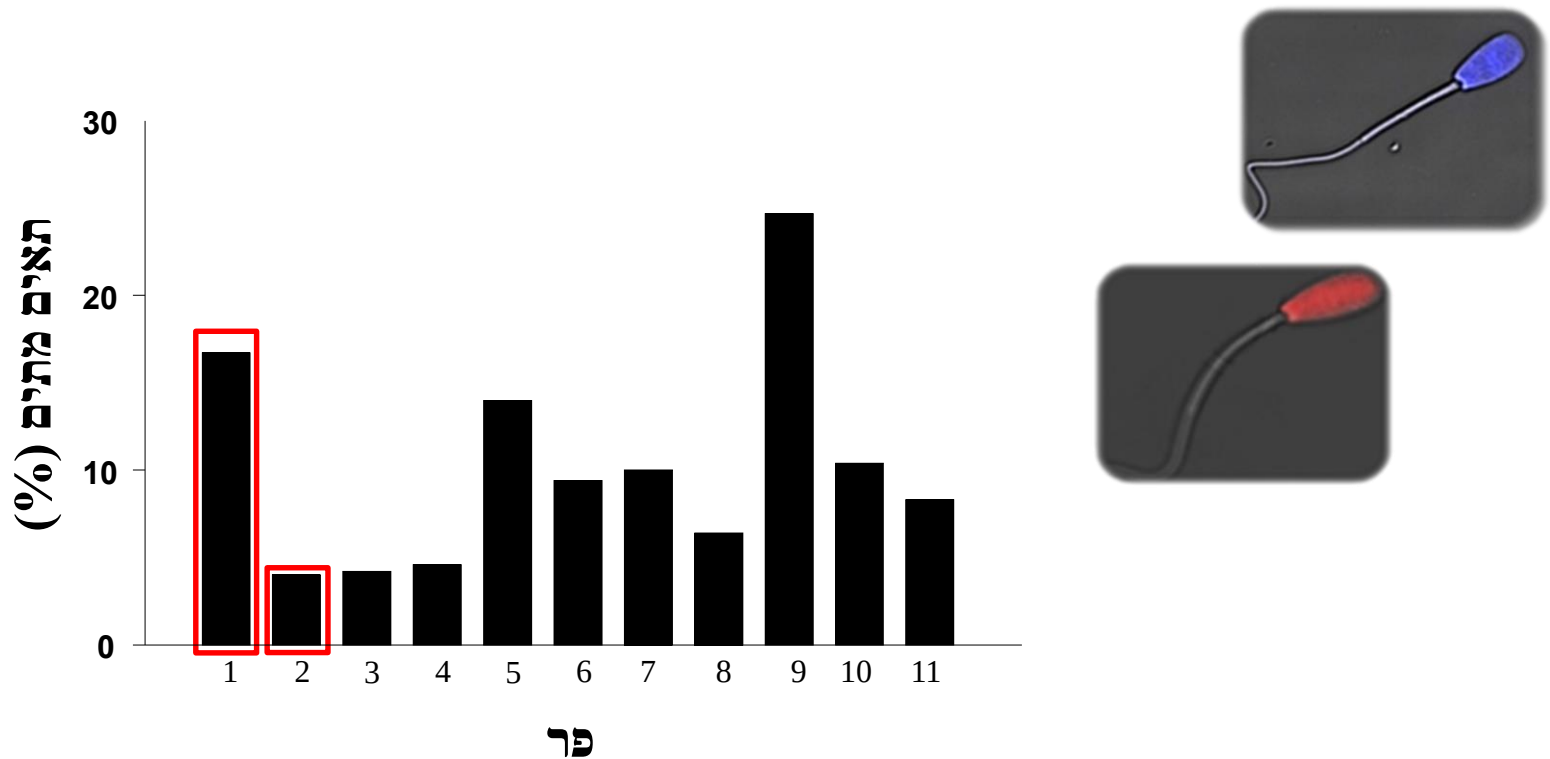
- מאפשרת אבחון של מספר תאים קטן יחסית (מאות)
- אבחון ממושך של תאים לאחר הצביעה
- סובייקטיבית

יתרונות

- יכולה לספק אינפורמציה רבה לגבי כל המדדים הנבדקים בו זמנית באותו תא הזרע



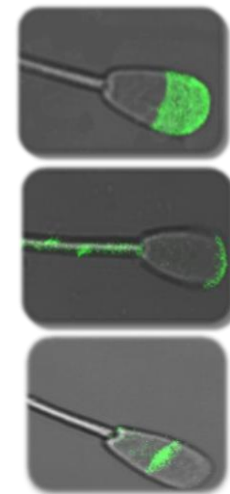
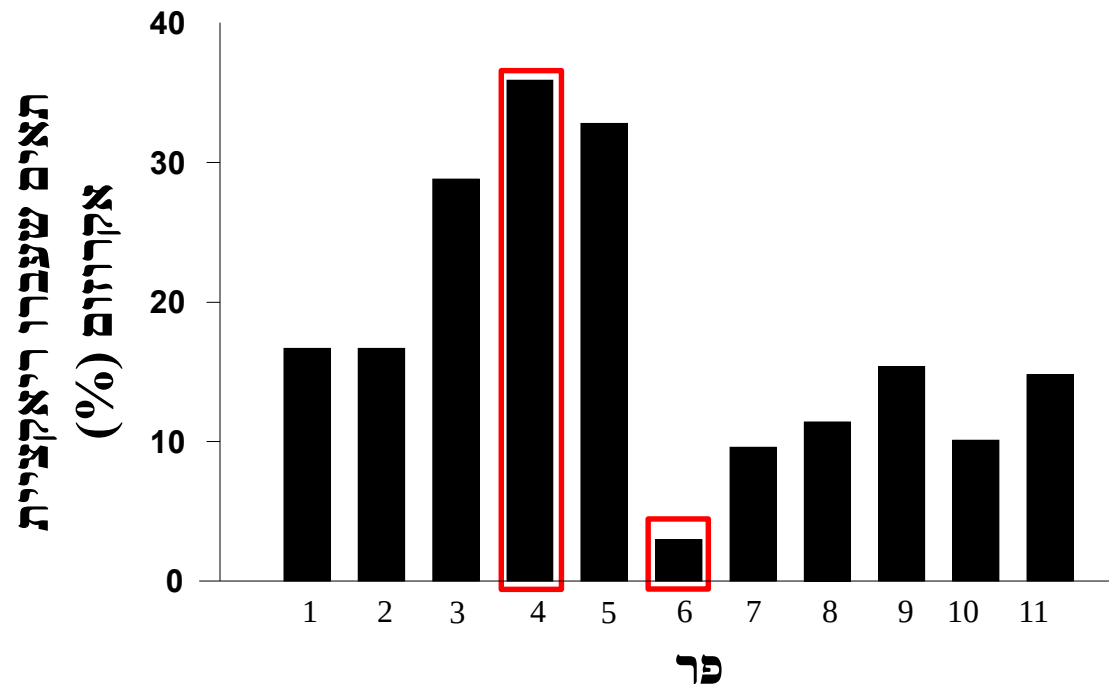
חיות – שלמות ממברנת הפלזמה



200 תאים ; N=11 עבור כל פר

Komsky-Elbaz, A. and Roth, Z. JOVE, 2018

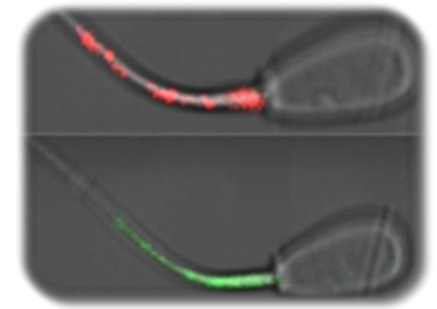
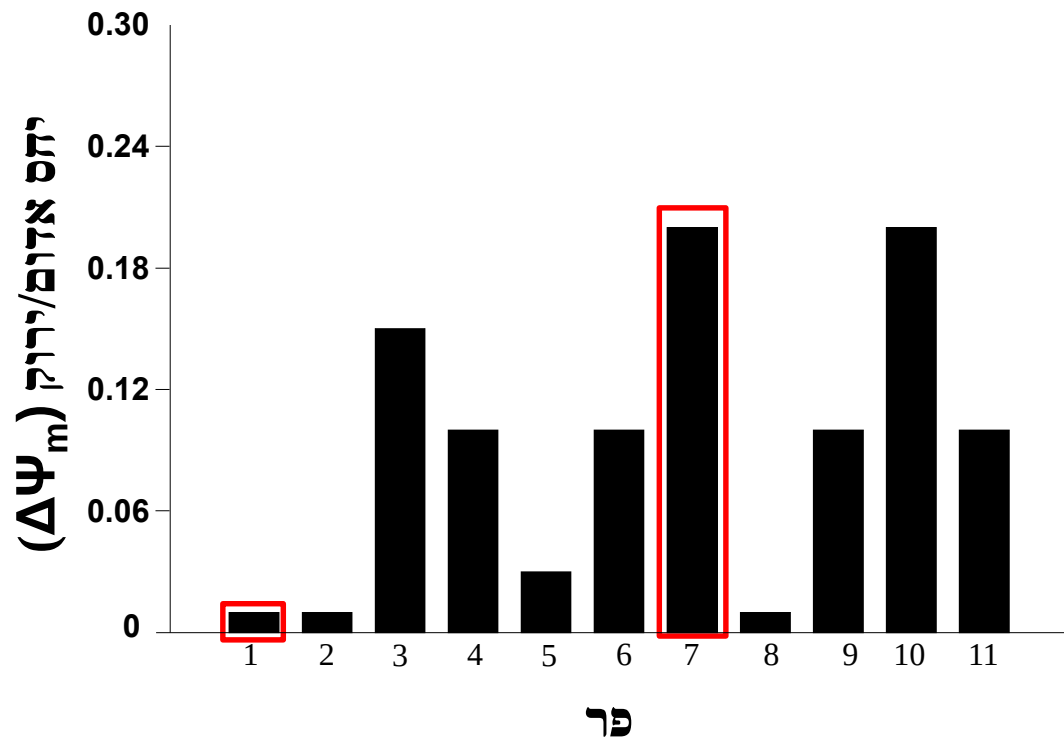
שלמות האקרזום



200 תאים עבור כל פר ;N=11

Komsky-Elbaz, A. and Roth, Z. JOVE, 2018

פוטנציאל ממברנת המיטוכונדריה



שיטה II - EasyCyte



■ Viability

Membrane permeability is an indicator of cellular viability. Through membrane integrity, this test indicates percentage of viable spermatozoa.



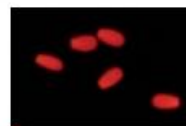
Live



Dead

■ Sperm count

Assess accurate cell numbers and population percentages without reference beads.



■ Oxidation level

This assay measures the intracellular level of Reactive Oxygen Species needed for sperm function but that are harmful at a high level.



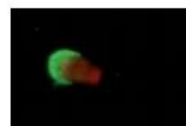
Strongly oxidized



■ Viability and acrosome integrity

The acrosome is essential for fertilization.

A new combination of three stains was developed by IMV. Two of the stains monitor the integrity of the acrosome and of the membrane, simultaneously. The third fluorochrome is sperm-specific and thus allows to remove debris from the analysis.

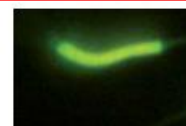


■ Mitochondria activity

To reach the ovocyte, the sperm needs energy which is produced by the mitochondria. This assay analyzes membrane potential (polarized, depolarized) to show the integrity of the mitochondria.



High potential



Low potential



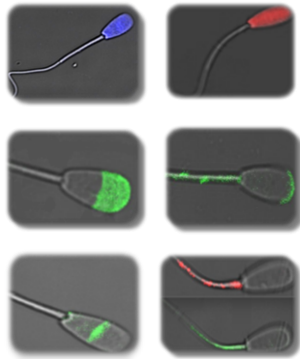
יתרונות וחסרונות

יתרונות

- מאפשרת אבחון מהיר של מספר תאים רב (אלפים)
- אבחון מהיר של תוצאות
- קיטים מוכנים לשימוש
- אובייקטיבית

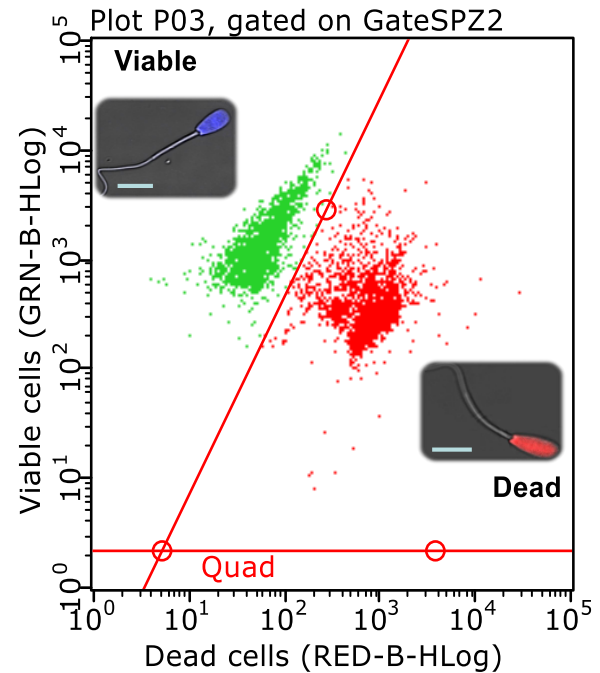
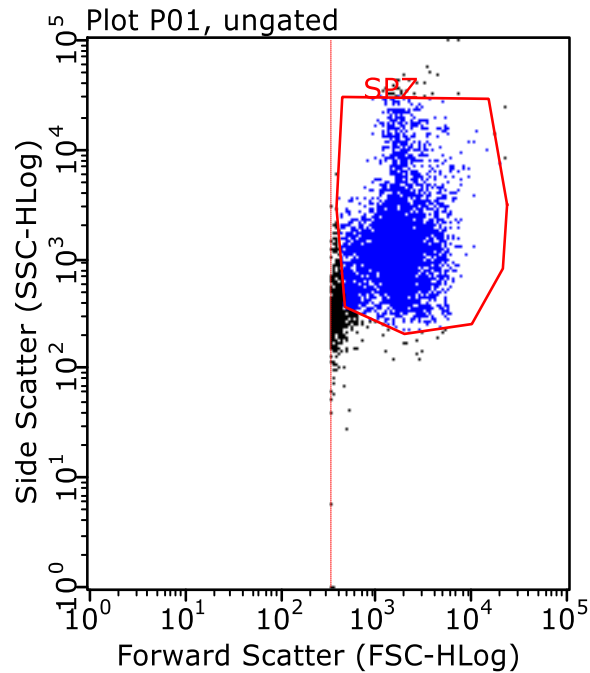
חסרונות

- כל צבען נבדק בנפרד בקיט ייעודי

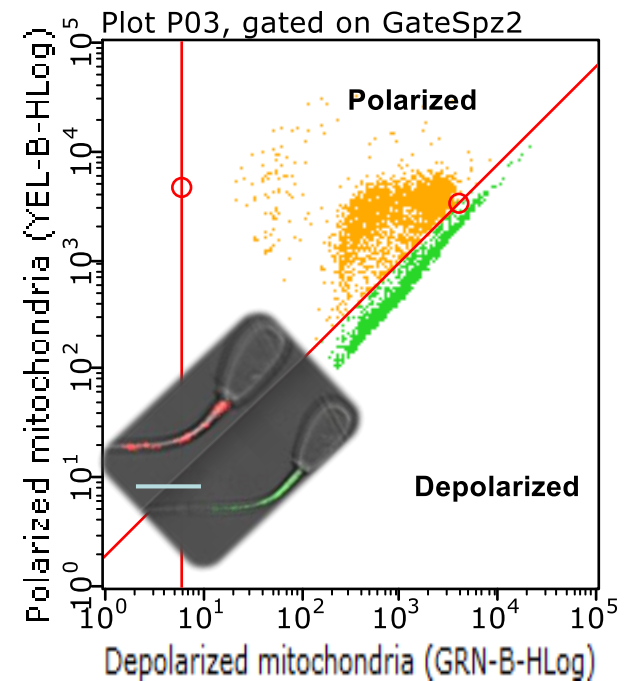
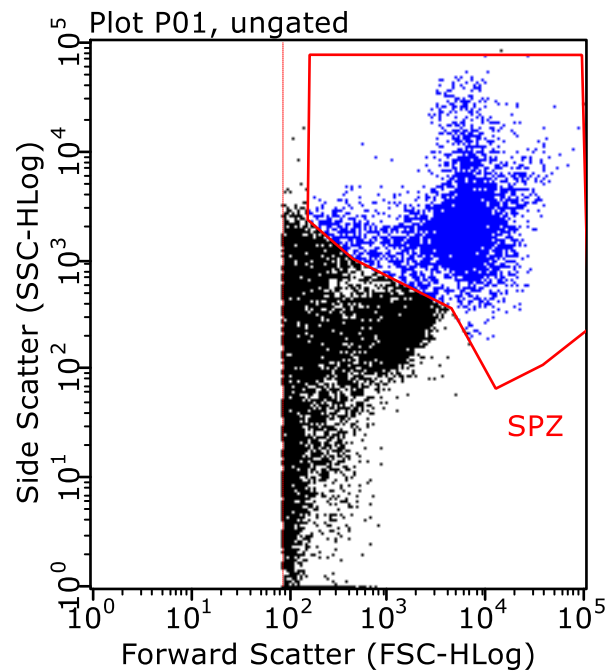


- בדיקה ברמת הזרמה ולא התא הבודד

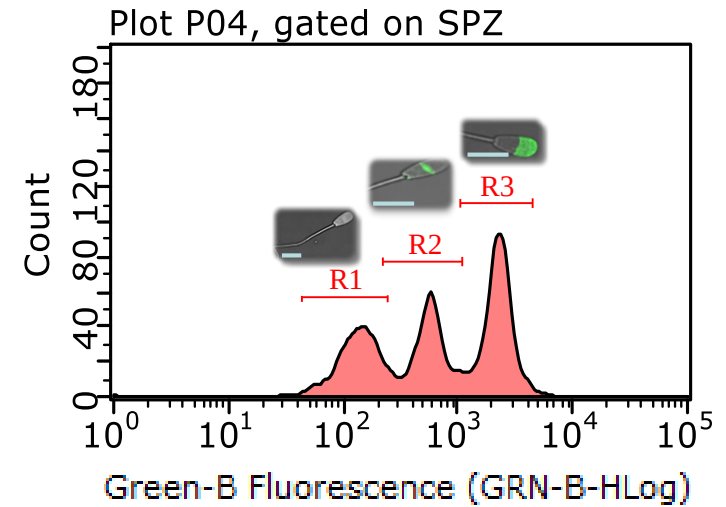
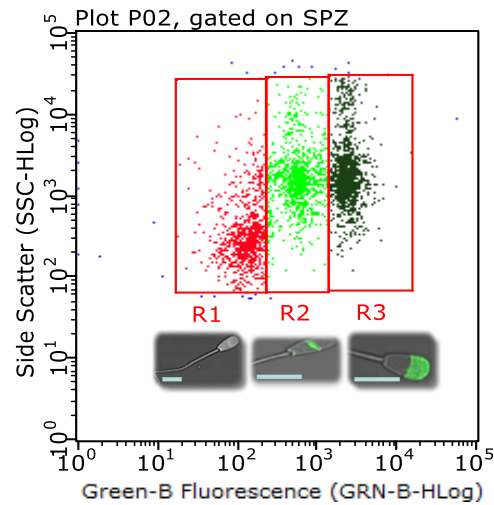
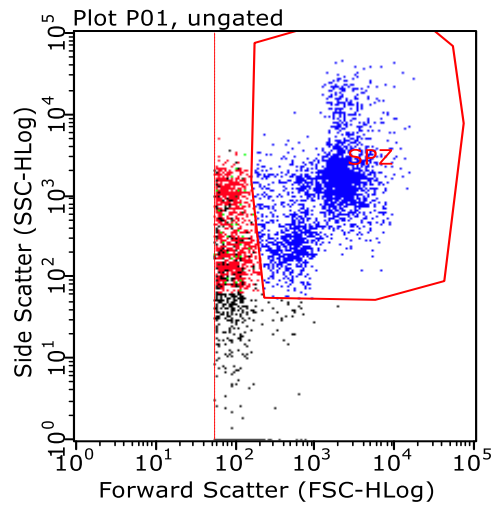
חיות – שלמות ממברנת הפלזמה



פוטנציאל ממברנת המיטוכונדריה



שלמות האקרוזום



השוואה בין שתי שיטות פלוארומטריות לאבחון ממברנות תאי זרע

שלמות האקרזום			$\Delta\Psi_m$			חיות		מס' תאים ממוצע	
אקרזום פגום	אקרזום שעבר ריאקצייה	אקרזום שלם	יחס גבוה/נמוך	גבוה	נמוך	מתים	חיים		
24.3 ± 3.0%	38.0 ± 5.7%	37.3 ± 7.2%	0.5 ± 0.06	34.3 ± 2.52%	65.7 ± 2.25%	67.3 ± 1.53%	32.7 ± 1.53%	253	צביעה מרובעת
21.0 ± 8.0%	39.5 ± 6.5%	39.5 ± 5.7%	0.5 ± 0.02	35.0 ± 1.00%	65.0 ± 1.00%	67.7 ± 2.08%	32.3 ± 2.08%	5000	ציטומטריית זרימה

מסקנות

- ישנה התאמה מלאה בין התוצאות המתקבלות בכל אחת מהשיטות.
- שימוש בשיטות פלואורומטריות לאבחון תאי זרע יכול לסייע בהערכת פוטנציאל הפוריות של דגימות זרמה טריות וקפואות ובכך לשפר את אחוזי ההצלחה בהזרעות המלאכותיות.
- על מנת לאשש את הפרדיקציה יש לבצע ניסויי פוריות *in-vitro* וכן *in-vivo*.



תודה רבה!!!



דר' יואל זרון

טניה קוגן
רונית לאור

HU-CEAEH - המרכז למצוינות בחקלאות
ובריאות הסביבה

ASRC - המרכז לחקר תאי זרע בבעלי חיים



פרופ' צבי רוט

דר' דורית קלו
שירה יעקובי-ארצי
מוטי סקציאר
אורית דואק
דן רכס
מאייס מנסור