

דו"ח מדעי סופי לתוכנית מס' 15-0378-362

1.2. שם ההצעה:

**אפיון הכשלים הפיזיולוגיים הגורמים לתופעת פרות קשות התעברות (Repeat-
(breeder cows**

Characterization of the physiological failure in repeat-breeder cows

מוגשת לקרן המחקר של מועצת החלב

צוות היגוי בעלי חיים (02-5782)

1.3.

ד"ר עוזי מועלם – המחלקה לבקר וצאן, המכון לבע"ח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן.

עוסק בהזנה, פיזיולוגיה של מערכת הרבייה והקשר בין הזנה ורבייה בבקר.

כתובת מייל: uzim@volcani.agri.gov.il

פרופ' רינה מידן - המחלקה למדעי בע"ח הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש סמית, רחובות

מר משה קאים - המחלקה לבקר וצאן, המכון לבע"ח, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן. עוסק

בממשק רבייה של בקר.

1.4. תקציר

"פרות קשות התעברות" (Repeat-breeder cows ;RBC), הינן פרות ללא ממצאים קליניים במערכת המין על פי בדיקה רקטלית, החוזרות להתייחס במרווחים נורמליים ולא התעברו אחר שלוש הזרעות עוקבות לפחות. ככל הנראה תופעת ה-RB הינה רב-גורמית ויכולה להיגרם עקב תזמון לקוי של ייחום - ביוץ - הזרעה ובעקבות כך אי קיום הפרייה, כשל בהפרייה או תמותה עוברית מוקדמת עקב כשל בתפקוד הגוף הצהוב או בסביבה הרחמית עצמה. עבודות מחקר רבות הוקדשו בניסיון להתגבר על הבעיה ולצמצם את התופעה, אבל באופן יחסי מעט מחקר יועד בניסיון להבין את הכשלים הפיזיולוגיים המאפיינים RBC. בתוכנית המחקר הנוכחית בצענו סדרה של ניסויים ובהם בחנו את מבנה המחזור המיני, איכות הזקיק הפרהאובולטורי ואיכות וכוסר ההפרייה של הביציות אצל פרות קשות התעברות. בחלק הראשון של העבודה ביצענו מעקב אחר השינויים בתבנית ההורמונלית וההתנהגותית של הפרות סביב הייחום. המחזור המיני סונכרן ודגימות דם נלקחו למעקב בכל יום שהוזרק GnRH או PG. החל מ-24 שעות לאחר זריקת PG שנייה, נדגם דם מידי 8 שעות שנמשך עד למועד הופעת סימני ייחום ראשונים. החל מ-36 שעות לאחר הזרקת PG שנייה נערך מעקב רצוף לניטור סימני התנהגות מינית ונלקחו דגימות דם רציפות. בסה"כ השתתפו ב-3 מחזורים של הניסוי 31 פרות ביקורת ו-27 RB. שיעור התגובה לסינכרון היה דומה בשתי הקבוצות, ונותחו 48 ייחומים מוצלחים. נמצא כי פרות ה-RB הקדימו להתייחס והיו פעילות יותר במהלך הייחום לעומת פרות קבוצת הביקורת. כמו כן נמצאה נטייה לריכוזים גבוהים יותר של אסטרוידיון בקבוצת ה-RB לעומת קבוצת הביקורת. נמצאו הבדלים מובהקים במועד הופעת שיא E_2 : 58.1 בקבוצת הביקורת לעומת 50.2 שעות בקבוצת ה-RB ממועד הזרקת PG ($P<0.08$), וכמו כן במועד הופעת שיא LH, 65.2 בקבוצת הביקורת לעומת 57.5 בקבוצת ה-RB ($P<0.009$). נמצאו הבדלים בהתפלגות שיעור הפרות עם מרווח הקטן מ-25 שעות בין הופעת הייחום למועד הופעת הביוץ, או גדול מ-25 שעות ($P<0.02$), ללא הבדלים בזמן הממוצע מייחום עד ביוץ. בחלק השני של העבודה בחנו את התפתחותו ותפקודו של הזקיק הפרהאובולטורי. זקיקים פרהאובולטורים נשאבו שזקיקים מ-17 פרות ביקורת ו-19 RB. בסך הכול נשאבו 66 זקיקים מ-2 הקבוצות, מתוכם 19 זקיקים נמצאו חיוניים בקבוצת הביקורת ו-17 בקבוצת ה-RB. לא נמצאו הבדלים בקוטר הזקיק הפרהאובולטורי או נפחו, וכן ריכוזי הפרוגסטרון והאנדוסטנדין היו זהים בשתי הקבוצות. לעומת זאת ריכוז האסטרוידיון בזקיקים היה גבוה פי 1.7 ב-RB לעומת פרות הביקורת. כמו כן היחס אסטרוידיון/פרוגסטרון שהינו מדד ידוע למידת חיוניותו של הזקיק, ותכולת הזקיק באסטרוידיון הייתה גבוהה פי 2.5 ב-RB לעומת פרות הביקורת. הממצאים מהזקיקים הפרהאובולטורים תואמים את תוצאות החלק הראשון של העבודה. יש לציין כי השאיבה

התבצעה בנקודת זמן קבועה – 48 שעות לאחר PG ולכן הממצאים מעידים על קצה התפתחות מהיר יותר של הזקיקי אצל פרות ה-RB. בחלק השלישי של העבודה בה בחנו את איכות הביציות וכושר ההתפתחות שלהן in-vitro ולא נמצאה פגיעה באיכות הביציות. יחד עם זאת נמצאה פגיעה מובהקת בכושר ההתפתחות העוברית של הביציות לאחר ההפרייה, ומספר הבלסטוציסטים בפרות ה-RB היה נמוך יותר מאשר בפרות הביקורת. לסיכום, נראה כי אין פגיעה בתבנית ההפרשה ההורמונלית סביב הייחום אצל פרות קשות התעברות, יש הקדמה של האירועים ופגיעה קלה בתזמון ייחום-ביוץ, ואין פגיעה באיכותו של הזקיקי הפרהאובולטורי אצל RB. לא נמצאה פגיעה באיכות הביציות או בכושר ההפרייה שלהן אצל פרות RB, אבל קיימת פגיעה בכושר ההתפתחות העוברית על לשלב של בלסטוציסטים. יכול להיות שפגיעה זו בכושר ההתפתחות העוברית הינה אחד מן הגורמים לשיעורי התעברות נמוכים אצל פרות אלה, ודרוש מחקר נוסף לביסוס ממצאים אלה.

1.5. מבוא ותיאור הבעיה

"פרות קשות התעברות" (Repeat-breeder cows ;RBC), הינן פרות ללא ממצאים קליניים במערכת המין על פי בדיקה רקטלית, החוזרות להתייחם במרווחים נורמליים ולא התעברו אחר שלוש הזרעות עוקבות לפחות. על פי סיכומי ספר העדר של שנת 2011 שיעור ההזרעות מהזרעה רביעית ומעלה מתוך כלל ההזרעות עמד על 31.4% ו- 30% בקבוצת המבכירות והפרות, בהתאמה. כמו כן, שיעורי ההתעברות מהזרעה ראשונה ומהזרעה רביעית ומעלה היו במבכירות 38.8% ו- 27.5%, ובפרות 30% ו- 26.9%, בהתאמה. השיעור הגבוה יחסית (כ- 30%) של פרות עם הזרעות רביעית ומעלה מעיד על השכיחות הגבוהה של התופעה ועל חומרת הבעיה. כמו כן הירידה בשיעורי ההתעברות בהזרעות אלה יחסית להזרעה ראשונה מחריפה את הבעיה.

תופעת ה-RB פוגעת מאוד ברווחיות ענף הבקר לחלב עקב הדחייה במועד ההתעברות, וכן לעלייה בהוצאות בגין הזרעות מרובות וטיפול ווטרינרי, הגדלת המרווח בין ההמלטות הגורם לפחיתה במס' הוולדות, הארכת התחלובה המעודדת אצל חלק מן הפרות השמנת יתר לקראת התחלובה הבאה והגדלת הסיכון להפרעות מטבוליות בתחלובה העוקבת (Mellado et al., 2012). כמו כן, במקרים רבים פרות אלה אינן מתעברות כלל גם לאחר 10 הזרעות ויותר ויוצאות מן העדר. יציאה מוקדמת זו מהעדר גורמת להגדלת התחלופה בעדר ולעתים קרובות ליציאת פרות עם פוטנציאל גנטי גבוה טרם זמן, ושיבושים בתוכנית הטיפול בעדר.

תופעת ה-RBC הינה רב-גורמית (Ysusf et al., 2010) ויכולה להיגרם עקב תזמון לקוי של מועדי האירועים ייחום - ביוץ – הזרעה, ובעקבות כך אי קיום הפרייה, כשל בהפרייה עצמה או

תמותה עוברית מוקדמת. בעבודה שנעשתה ע"י Båge et al. (2002) בעגלות נבחנו ההבדלים בתזמון האירועים סביב ההזרעה ב-7 עגלות קשות התעברות (RBH) לעומת 6 עגלות בתולות (VH). באופן כללי, נמצא כי במרבית המשתנים שנבחנו היתה שונות גדולה בין עגלות RBH, לעומת אחידות גדולה יותר בין עגלות VH. הממצאים העיקריים מעבודה זו מראים כי משך חיי הזקיק הפרהאובולטורי היה ארוך יותר ב-RBH לעומת VH, משך הייחום היה ארוך יותר בכ-5 שעות ב-RBH לעומת VH, מועד שיא LH יחסית למועד תחילת הייחום היה מאוחר יותר בכ-4 שעות אצל RBH לעומת VH, והמרווח משיא LH לביזוף היה קצר יותר ב-4 שעות אצל RBH לעומת VH. כמו כן נמצאו רמות בזליות גבוהות יותר של פרוגסטרון סביב הייחום אצל RBH לעומת VH. למשך חיי זקיק פרהאובולטורי ארוכים יותר נמצאו אפקטים שליליים על הבגרת הביציות וההפרייה (Revah and Butler, 1996). כמו כן, רמות בזליות גבוהות של פרוגסטרון בעת הייחום שנמצאו אצל RBH היו במתאם עם התעברות נמוכה יותר לעומת עגלות עם רמות פרוגסטרון נמוכות (Båge, 1999).

למרות שאופי השתנות ריכוזי הפרוגסטרון בפלסמה במשך המחזור המיני נראה נורמלית, ריכוזי הפרוגסטרון בפלסמה במשך הפאזה הלוטאלית של המחזור המיני היו נמוכים יותר אצל RBH לעומת VH (Båge et al., 2002; Båge et al., 2003), מה שיכול אולי להעיד על תפקוד לקוי של הגוף הצהוב.

עבודות מחקר נוספות בחנו ב-RBH את איכות הביציות, וביצועי In vitro maturation (IVM) ו-In vitro fertilization (IVF) לאחר Ovum pick-up (OPU). בעבודה של Båge et al. (2003) נבדקה איכות הביציות שנשאבו מ-5 RBH לעומת 5 VH במשך 12 הימים הראשונים של מספר מחזורים מיניים עוקבים. נמצא שמספר הזקיקים הראויים לשאיבת ביציות אצל RBH היה, רב יותר, אבל שיעור ההצלחה של איסוף הביציות (Recovery rate) היה נמוך יותר ב-RBH לעומת VH (55% לעומת 62%, בהתאמה). כמו כן, איכות הביציות (בדירוג של 1-5: איכות גבוהה 1... איכות נמוכה 5) הייתה גבוהה יותר ב-VH לעומת RBH (55% בדרגת איכות 1 ו-2 ב-VH לעומת 42% ב-RBH), ובנוסף, 7% מביציות ה-RBH דורגו בדרגת איכות 5 לעומת 0.5% בלבד בקבוצת ה-VH. ממצאי עבודה זו מראים איכות נמוכה יותר של ביציות אצל RBH לעומת VH. יש לציין כי לא נמצאו הבדלים בשיעור ההתלמה (Cleavage rate) בין 2 הקבוצות לאחר IVF. בדומה לעבודות האחרות, גם בעבודה זו נמצאה שונות גדולה באיכות הביציות אצל RBH לעומת אחידות גבוהה אצל VH. בעבודה זו נבדקה גם צפיפות הכרומטין ופיזור המיטוכונדריה בביציות לאחר IVM, ונמצאו הבדלים בין הקבוצות כאשר המופע של ביציות ה-RBH תאם יותר לביציות שלא עברו הבגרה נורמלית לעומת ה-VH.

חשוב לציין כי המאפיינים שנמצאו במחזור המיני הטבעי של RBH (Båge et al., 2002) היו דומים לאלה שנמצאו אצל העגלות שעברו OPU, מה שמאשש את המודל של שימוש ב- OPU לבחינת איכות הביציות. כמו כן שיעורי ההתעברות אצל עגלות הניסוי (RBH ו- VH) שהוזרעו לאחר ביצוע OPU, היו דומים לכאלה שנמצאו בניסוי שדה.

נבחנו סיבות נוספות לכשל בקבלת הריון אצל RBC ושאינן קשורות לאירועים סביב הייחום, כגון: כשל בתפקוד הגוף הצהוב או בסביבה הרחמית עצמה. בעבודה ייחודית של Linares (1982) נאספו עוברים ביום 7 לאחר הזרעה של RBH 23 ו- VH 19 (סה"כ 71 עוברים). לא נמצא הבדל בשיעור ההצלחה באיסוף העוברים בין 2 הקבוצות (68 לעומת 76% ב- RBH לעומת VH). העוברים סווגו ל- 3 קטגוריות, נורמלים (N), חריגים (MD) ו- מנוונים (D). לא נמצאו הבדלים בשיעור ההפרייה בין 2 הקבוצות, אבל שיעור העוברים שנמצאו בקטגוריה N היה 28% ב- RBH לעומת 74% ב- VH, ואילו שיעור ה- MD וה- D היה 35% ו- 38% בקבוצת ה- RBH, לעומת 13% ו- 13% בקבוצת ה- VH, בהתאמה. ממצאים אלה מראים יחס עוברים נורמלים:לא נורמלים של 3:1 ב- RBH לעומת 1:3 ב- VH, מה שיכול להצביע על סיכויי התעברות של 25% ב- RBH לעומת 75% של VH. כמו כן יכולות להיות סיבות נוספות לכשל בקבלת הריון כגון: ספיגת עוברים מאוחרת. המחברים משערים שהשיעור הגבוה של עוברים לא נורמלים ב- RBH, יכול להיות קשור לפגיעה מוקדמת מאוד בהתפתחות העוברית. זאת, כתוצאה מההבדלים בתבניות ההורמונליות סביב הייחום (שתוארו לעיל), שיכולים לפגוע בסינכרוניזציה בין העובר והסביבה הרחמית. דוגמא לכך למשל היא הזרעה מאוחרת מדי ומפגש של תאי זרע עם ביצית מבוגרת מדי.

בעבודה של Ferreira et al. (2011) נבחנה איכות הביציות והתפתחותן לאחר IVM ו- IVF אצל עגלות, פרות בשיא הלקטציה ופרות קשות-התעברות (RB) בעונות הקיץ והחורף. בעבודה זו נמצא שביציות שנשאבו מ- RB היו רגישות יותר לעקת הקיץ מאשר ביציות מעגלות, או פרות בשיא הלקטציה. רגישות זו התבטאה בירידה דרסטית בשיעור הפקת הבלסטוציסטים בעונת הקיץ לעומת עונת החורף (ירידה של 64% ב- RBC, לעומת 34% בפרות בשיא לקטציה ו- 23% בעגלות).

מאמצים רבים הוקדשו בניסיון להתגבר על הבעיה ולצמצם את גודל התופעה. אולם מעט עבודות מחקר יועדו להבנת הכשלים הפיזיולוגיים המאפיינים את פרות ה- RB והגורמים לאי קבלת הריון.

סקירת הספרות לעיל מראה כי הפגיעה בפוריות של פרות קשות-התעברות יכולה להיות במספר רבדים: בתבנית ההורמונלית ותזמון מועדי האירועים סביב הייחום, איכות הביציות ובתהליך

ההפרייה, התפתחות עוברית מוקדמת והסביבה הרחמית. יש לציין כי מרבית עבודות המחקר בוצעו בעגלות בלבד ומיעוטן בפרות.

בתוכנית המחקר הנוכחית אנו מציעים לבצע סדרה של ניסויים במטרה לבדוק האם ממצאים קודמים שנמצאו בעגלות אופייניים גם לפרות בוגרות קשות התעברות.

כמו כן, נבחן לראשונה את מאפייני הזקיק הפרהאובולטורי ותפקוד תאי גרנולוזה מזקיקים פרהאובולטוריים של RB לעומת פרות ביקורת. בתאים אלה תיבחן ההתבטאות של חלבונים שונים החיוניים לתהליך הביוץ והתפתחות הגופיף הצהוב: רצפטורים ל-LH ולפרוגסטרון, סטרואידוגנזה (ארומטאז, ואנזימים האחראים לסינתזת פרוגסטרון) והמערכת ליצירת פרוסטגלנדינים. בהמשך נבחן את איכות הביציות ע"י שאיבת ביציות *in-vivo* (OPU), הבגרתם (IVM) והפרייה חוץ גופית (IVF).

1.6. מטרת המחקר:

- א. לבחון האם קיים כשל בתבנית ההפרשה ההורמונלית סביב הייחום אצל RB העלול לגרום לעיכוב בביוץ ופגיעה בתזמון ייחום-ביוץ-הזרעה.
- ב. לבחון האם ב-RB קיימת הפרעה בהתפתחות ובהפרשה ההורמונלית וכן בהתבטאות גנים המעורבים בתהליך הסטרואידוגנזה והביוץ של תאי הגרנולוזה מן הזקיק הפרה-אובולטורי.
- ג. לבחון האם יש פגיעה באיכות הביציות של RB הגורמת לכשל בהפרייה או בהתפתחות העוברית המוקדמת.

חשיבותו וייחודו של המחקר

תופעת ה-RB הינה בעלת השלכות כלכליות משמעותיות ברפת החלב. ההידרדרות הנמשכת בפוריות הפרות בעדרי הבקר לחלב קשורה בין היתר לעלייה בשיעור הפרות שאינן מתעברות לאחר הזרעה שלישית (בקבוצת במבכירות הייתה עלייה של כ-5% בשנתיים האחרונות). הירידה בשיעורי ההתעברות מחייב מחקר בכיוונים שונים, ומחקר זה עשוי לתרום מידע בדבר הכשלים הפיזיולוגיים המאפיינים RB, ולפתח שיטות טיפוליות בהתאם לממצאים. עד כה טרם נעשתה עבודה מקיפה ויסודית בתחום זה בפרות בוגרות, ועבודת מחקר זו תאפשר להבין את הבעיה באופן מעמיק ולמקד את הטיפולים המוצעים בהתאם.

1.7. דו"ח ביצוע של שנת המחקר הראשונה

בשנה הראשונה של המחקר ביצענו מעקב אחר השינויים בתבנית ההורמונלית וההתנהגותית של הפרות סביב הייחום, במטרה לבחון האם יש שיבוש בהפרשה ההורמונלית הגורם לעיכוב במועד הופעת שיא LH ובמועד הביזץ.

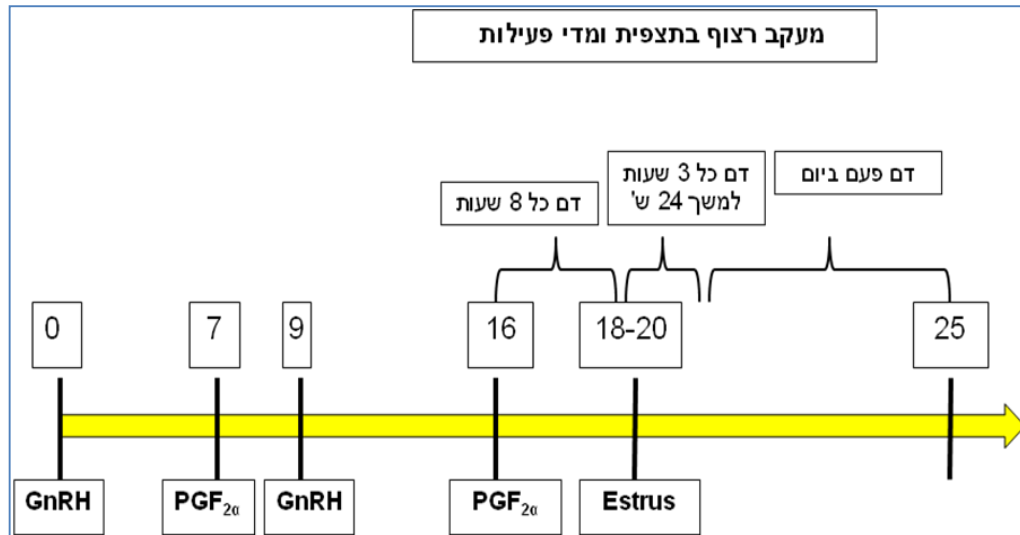
בניסוי זה השתתפו 15 פרות ביקורת ו- 11 פרות RB מרפת הניסיונות בבית דגן.

ביקורת – כקבוצת ביקורת שימשו פרות ומבכירות שנמצאו תקינות בבדיקת מערכת המין אחר ההמלטה, מחזוריות בתום ימי המנוחה (60-70 ימים בתחלובה) שלא הוזרעו עדיין, או כאלה בשלבים מאוחרים יותר של התחלובה שלא הוזרעו מסיבות שאינן קשורות למערכת המין (בירור עטין, גוף וכו').

RB – 11 פרות ומבכירות שהציגו מחזוריות מינית תקינה ושהוזרעו לפחות 3 הזרעות עוקבות ללא קבלת הריון, הוגדרו כ-RBC. מס' ההזרעות הממוצע של פרות ה-RBC בניסוי היה 7 ± 2 הזרעות לפרה. פרות אלה נבדקו לתקינות מערכת המין ורק אלה שנמצאו תקינות בבדיקה ווטרינרית שגרתית צורפו לניסוי. פרות שלא נמצאו הרות לאחר מס' הזרעות אבל עברו אירוע חריג כלשהוא מתחילת התחלובה כגון: ניתוח קיסרי, אירוע דלקתי חריף וכו' לא השתתפו בניסוי. כל הפרות משתי הקבוצות נסרקו לתקינות השלחות בבדיקת אולטראסאונד בשתי בדיקות עוקבות בהפרש של 3 ימים לפני התחלת הניסוי, ומן הניסוי נופו פרות עם שלחות שהראו מופע לא תקין או רחם מוגדל.

מהלך הניסוי מפורט **בתרשים מס' 1**. המחזור המיני סונכרן כפי שמפורט בתרשים. דגימות דם נלקחו למעקב בכל יום שהוזרק GnRH או PG. החל מ-24 שעות לאחר זריקת PG שנייה, נדגם דם מידי 8 שעות שנמשך עד למועד הופעת סימני ייחום ראשונים. החל מ-36 שעות לאחר הזרקת PG שנייה נערך מעקב רצוף (במשך 24 שעות ביממה) לניטור סימני התנהגות מינית. מפרות שהציגו סימני ייחום נלקחו דגימות דם אחת ל-3 שעות במשך 24 שעות. בדגימות דם אלה נקבע ריכוז ה-LH והאסטרדיול סביב הייחום. כמוכן נקבעו ריכוזי הפרוגסטרון בכל דוגמאות הדם שנלקחו במועדי ההזרקות, וכן בחלק מן הדוגמאות במהלך הייחום.

תרשים מס 1. פרוטוקול הניסוי.



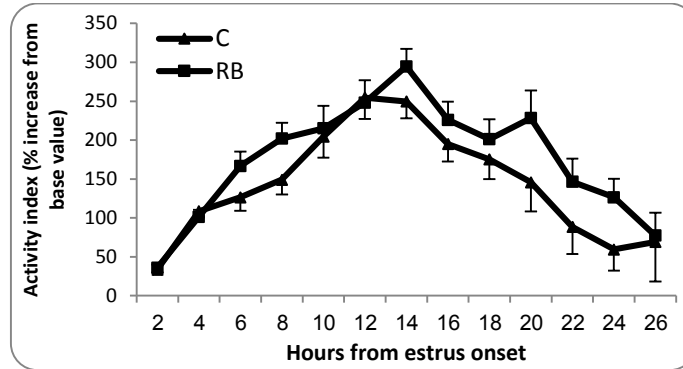
כל הפרות צוידו בתגים המתעדים את פעילות הפרות אחת לשעתיים (תגי צוואר של SCR) ונערך מעקב אחר אופי הפעילות המינית במהלך הייחום.

תוצאות

נערכו 3 מחזורים של הניסוי בו השתתפו בסה"כ 31 פרות ביקורת ו- 27 RB. במחזור הראשון השתתפו 19 פרות, בשני 22 ו- במחזור השלישי 17 פרות. שיעור התגובה לסינכרון היה דומה בשתי הקבוצות: 26 מתוך 31 (84%) בקבוצת הביקורת ו- 22 מתוך 27 (81%) בקבוצת ה-RBC.

בחנו את אינטנסיביות הייחום ב- 2 הקבוצות ע"פ נתוני תגי צוואר. בגרף מס' 1 מופיעה החריגה בפעילות כאחוז מהפעילות הממוצעת ב- 7 ימים שקדמו ליום הייחום. בניתוח התוצאות נראה כי פרות ה-RB היו פעילות יותר מאשר פרות קבוצת הביקורת. כמו כן בניתוח השטח מתחת לעקומה (AUC) של ריכוזי האסטרדיול נמצאה נטייה לריכוזים גבוהים יותר בקבוצת ה-RB לעומת קבוצת הביקורת.

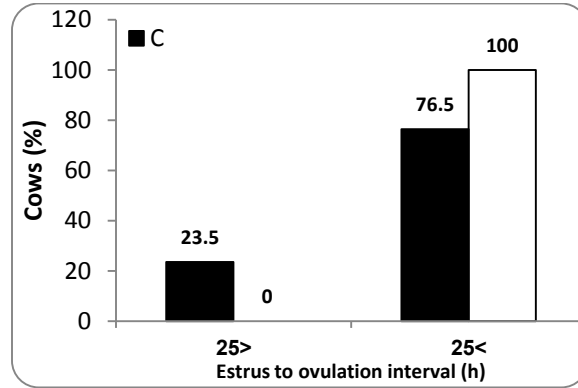
גרף מס' 1. פעילות על פי תג צוואר – שיעור החריגה בפעילות באחוזים לעומת ממוצע 7 ימים שקדמו לייחום.



תזמון האירועים בייחום יחסית למועד הזרקת PG נבחן לפי קבוצות הניסוי. נמצאו הבדלים בין 2 הקבוצות במועד הופעת הייחום לאחר זריקת PG שנייה: 47.9 שעות בקבוצת הביקורת לעומת 56.1 שעות בקבוצת ה-RB ($P < 0.007$). כמו כן נמצאו הבדלים מובהקים במועד הופעת שיא E2: 58.1 בקבוצת הביקורת לעומת 50.2 שעות בקבוצת ה-RB ממועד הזרקת PG ($P < 0.08$), ובמועד הופעת שיא LH, 65.2 בקבוצת הביקורת לעומת 57.5 בקבוצת ה-RB ($P < 0.009$). לא נמצאו הבדלים באורך הייחום הממוצע 19.6 שעות בקבוצת הביקורת לעומת 21.4 שעות בקבוצת הטיפול ($P < 0.25$).

המרווח ממועד הופעת הייחום ועד מועד הביוץ היה גבוה ב- 2.6 שעות בקבוצת ה-RB לעומת קבוצת הביקורת ($P < 0.25$). ואולם כאשר ביצענו ניתוח התפלגות של שיעור הפרות עם מרווח הקטן מ- 25 שעות בין מועד הופעת הייחום לביוץ, או גדול מ- 25 שעות (גרף מס' 2), נמצא הבדל מובהק בין הקבוצות ($P < 0.02$), כאשר בכל ה-RB המרווח היה מעל 25 שעות, לעומת 23.5% מן הפרות בקבוצת הביקורת שהראו מרווח קטן מ- 25 שעות ממועד הופעת הייחום ועד הביוץ.

גרף מס' 2. התפלגות המרווח ממועד הופעת הייחום עד לביזץ, פחות מ- 25 שעות ויותר מ- 25 שעות.



את שנת המחקר השנייה הקדשנו לבחינת התפתחותו ותפקודו של הזקיך הפרהאובולטורי. זקיקים פרהאובולטורים נשאבו שזקיקים מ- 18 פרות ביקורת ו- 17 RB. מספר ההזרעות הממוצע בקבוצת ה- RB היה 7.1 ± 1.7 . מחזור המיני סונכרן ולפרות שהראו ייחום התנהגותי, הזרק PG ביום 14-16 למחזור המיני. 48 שעות לאחר הזרקת ה- PG נשאבו כל הזקיקים מגודל 7 מ"מ ומעלה. הפרוטוקול הנ"ל התבצע בשלושה מקבצים במשך מספר מחזורים מיניים על מנת לאסוף כמות זקיקים ראויה למבחן סטטיסטי. התוצאות מופיעות בטבלה מס' 1. בנוזל הפוליקולרי נקבעו ריכוזי האנדרוסטנדין, אסטרדיול ופרוגסטרון. על פי ריכוזי ההורמונים והיחסים ביניהם נקבעה חיוניותם של הזקיקים. בסך הכול נשאבו 66 זקיקים מ-2 הקבוצות, מתוכם 19 זקיקים נמצאו חיוניים בקבוצת הביקורת ו- 17 בקבוצת ה- RB. 30 זקיקים נמצאו אטרטיים ולא הוכנסו להמשך ניתוח.

מן הטבלה נראה כי לא נמצאו הבדלים בקוטר הזקיך הפרהאובולטורי ולא בנפחו בין 2 הקבוצות. גם ריכוזי הפרוגסטרון והאנדרוסטנדין היו זהים בשתי הקבוצות. לעומת זאת ריכוז האסטרדיול בזקיקים היה גבוה פי 1.7 ב- RB לעומת פרות הביקורת. כמו היחס אסטרדיול/פרוגסטרון שהינו מדד ידוע למידת חיוניותו של הזקיך היה גבוה יותר בקבוצת ה- RBC לעומת פרות הביקורת. תכולת הזקיך באסטרדיול הייתה גבוה פי 2.5 ב- RB לעומת פרות הביקורת, ללא הבדלים בתכולת האנדרוסטנדין והפרוגסטרון.

Table 1. Follicles concentrations of progesterone, androstenedione, estradiol and of E₂-active follicles

	Control	RB	SEM	P=
Cows, n	17	19		
Follicles aspirated, n	36	30		
Atretic follicles, n	17	13		
E ₂ -Active follicles, n	19	17		
Diameter, mm	1.54	1.59	0.1	0.69
Volume, mL	2.32	2.56	0.51	0.75
Progesterone, ng/mL	118.5	119.3	25	0.98
Androstenedione, ng/mL	275.0	317.8	90.0	0.75
Estradiol, ng/mL	1073.6	1854.9	138.2	0.0005
Estradiol/ Progesterone	12.7	31.6	6.5	0.05
Estradiol content, ng	2717	5171	980	0.09
Progesterone content, ng	3462	4522	210	0.74
Androstenedione content, ng	1066	1104	490	0.96

הממצאים מהזקיקים הפרהאובולטורים תואמים את תוצאות החלק הראשון של העבודה, בה נמצאו ריכוזי אסטרוידיל גבוהים יותר ב-RB בפלסמה וכן הפעילות הייתה אינטנסיבית יותר בקבוצה זו. יש לציין כי השאיבה התבצעה בנקודת זמן קבועה – 48 שעות לאחר PG ולכן ריכוזי האסטרוידיל הגבוהים יכולים להיות קשורים לכך שיש ב-RB הקדמה של כל תהליך הייחום והביוץ יחסית למועד הזרקת ה-PG. יחד עם זאת, לא נראה כי קיימת פגיעה כל שהיא באיכותו של הזקיקי הפרהאובולטורי אצל RB יחסית לפרות ביקורת. הממצאים מחלקה הראשון של העבודה מראים כי כל תהליכי הייחום והביוץ מתרחשים מוקדם יותר ב-RB וזה נתמך גם ע"י התוצאות מהזקיקים. כמו כן נמצא כי ריכוזי ה-LH לפני שיא LH היו גבוהים יותר בקבוצת ה-RBC ולא ברורה לגמרי המשמעות של כך.

בשנת המחקר השלישית בחנו את איכות וכושר הפרייה *in-vitro* של ביציות שנשאבו *in-vivo* (OPU). ביציות נשאבו מ-5 פרות ביקורת ו-5 פרות שהוגדרו כ-RB. הביציות נשאבו פעמיים בשבוע במשך 7 שבועות רצופים – סה"כ 14 שאיבות מכל פרה. איכות הביציות נקבעה לפי לפי סטנדרטים מקובלים – בצענו ו-IVM ו-IVF ובחנו את שלבי ההתפתחות של העוברים ואת כמות הבלסטוציסטים שנוצרה. התוצאות מוצגות בטבלה מס' 2.

Table 2. Follicles and oocytes numbers, maturation and cleavage rates of oocytes collected by ovum pickup (OPU)

	Control	RB	SEM	P<
Cows, n	5	5		
OPU sessions	14	14		
Total number of oocytes aspirated	520	486		
Follicles aspirated/cow per session	7.3	7.1	0.39	0.77
Oocytes recovered/cow per session	3.21	3.1	0.25	0.70
Recovery rate, %	44.1	42.2	0.03	0.68
No. of oocytes/cow per session chosen for IVM + IVF	2.3	2.3	0.25	1.0
No. of cleaved oocytes/session	7.1	6.5	0.9	0.63
Cleavage rate, %	63.4	57.6	3.3	0.23
No. of blastocysts/session	1.81	0.72	0.21	0.002
Rate of blastocysts from oocytes for IVF, %	29.2	12.5	3.2	0.002

מן הטבלה נראה שמספר הזקיקים שנשאבו בממוצע בכל שאיבה היה זהה בשני הטיפולים. כמו כן לא נמצאו הבדלים בשיעור הביציות שהופקו מן הזקיקים שנשאבו והוא עמד על כ- 43% בממוצע. לא נמצאו הבדלים בשיעור ההפרייה בין הטיפולים, אבל שיעור הבלסטוציסטים שהתפתחו היה יותר מפי 2 בקבוצת הביקורת מאשר בקבוצת ה-RB. יכול להיות שהפגיעה בביציות בפרות ה-RB מתבטאת בשלבים יותר מאוחרים מאשר ההפרייה ולכן שיעור הבלסטוציסטים היה נמוך יותר למרות שלא נמצאה פגיעה בשיעור ההפרייה בפרות אלה לעומת פרות הביקורת.

סיכום – בעבודת מחקר זו בחנו מספר אספקטים הנוגעים למחזור המיני והפעילות השחלתית בפרות קשות התעברות לעומת פרות ביקורת. בחלק הראשון של העבודה בחנו האם יש הבדל בהפרשה ההורמונלית סביב הייחום ותזמון הביוץ בפרות RB לעומת פרות ביקורת. נמצא כי פרות ה-RB הקדימו להתייחם, וריכוזי האסטרוידול בקבוצת זו היו גבוהים יותר מאשר בקבוצת הביקורת. נמצאו הבדלים מובהקים במועד הופעת שיא E₂ ובמועד הופעת שיא LH נמצאו הבדלים בהתפלגות שיעור הפרות עם מרווח הקטן מ- 25 שעות בין הופעת הייחום למועד הופעת הביוץ, או גדול מ- 25 שעות, אבל בממוצע לא היה הבדל במועד הופעת הביוץ יחסית למועד התחלת הייחום ובשתי הקבוצות הוא היה בתחום הנורמלי. הממצאים מחלק זה של העבודה מראים שיש הקדמה של 7-8 שעות בכל האירועים אצל פרות ה-RB, ללא פגיעה בתבנית ההפרשה ההורמונלית. את שנת המחקר השנייה הקדשנו לבחינת התפתחותו ותפקודו של הזקיק הפרהאובולטורי, הממצאים מהזקיקים הפרהאובולטורים תואמים את תוצאות החלק

הראשון של העבודה - ריכוזי האסטרדיול היו גבוהים והיחס E2/P4 היו גבוהים יותר בקבוצת ה-RB לעומת קבוצת הביקורת. יש לציין כי השאיבה התבצעה בנקודת זמן קבועה – 48 שעות לאחר PG ולכן ריכוזי האסטרדיול הגבוהים יכולים להיות קשורים לכך שיש ב-RB הקדמה של כל תהליך הייחום והביוץ. יחד עם זאת לא נראה כי קיימת פגיעה כל שהיא באיכותו של הזקיף הפרהאובולטורי אצל RB יחסית לפרות ביקורת.

בחלק השלישי של העבודה בה בחנו את איכות הביציות וכוסר ההתפתחות שלהן in-vitro לא נמצאה פגיעה באיכות הביציות. יחד עם זאת נמצאה פגיעה מובהקת בשיעור ההתפתחות של הביציות לאחר ההפרייה, ומספר הבלסטוציסטים בפרות ה-RB היה נמוך יותר מאשר בפרות הביקורת.

נראה כי אין פגיעה בתבנית ההפרשה ההורמונלית סביב הייחום אצל פרות קשות התעברות, יש הקדמה של האירועים ופגיעה קלה בתזמון ייחום-ביוץ. כמו כן אין פגיעה באיכות הביציות או בכוסר ההפרייה שלהן, אבל קיימת פגיעה בכוסר ההתפתחות העוברית על לשלב של בלסטוציסטים. יכול להיות שפגיעה זו בכוסר ההתפתחות העוברית הינה אחד מן הגורמים לשיעורי התעברות נמוכים אצל פרות אלה, ודרוש מחקר נוסף לביסוס ממצאים אלה.

רשימת פרסומים של החוקרים

ד"ר עוזי מועלם

1. Sklan D., **U. Moallem**, and Y. Folman. (1991). Effect of feeding calcium soaps of fatty acids on production and reproductive responses in high producing lactating cows. *J. Dairy Sci.* 74, 510-517.
2. Sklan D., M. Kaim, **U. Moallem**, and Y. Folman. (1994). Effect of dietary calcium-soaps on milk yield, body-weight, reproductive hormones, and fertility in first parity and older cows. *J. Dairy Sci.* 77:1652-1660.
3. **Moallem, U.**, M. Kaim, Y. Folman, and D. Sklan. (1997). Effect of calcium soaps of fatty acids and administration of somatotropin in early lactation on productive and reproductive performance of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2127-2136.
4. **Moallem, U.**, Y. Folman, A. Bor, A. Arav, and D. Sklan. (1999). Effect of calcium soaps of fatty acids and administration of somatotropin on milk production, preovulatory follicular development and plasma and follicular fluid lipid composition in high yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:2358-2368.
5. **U. Moallem**, M. Katz, H. Lehrer, L. Livshitz, S. Yakoby. 2007. Role of Peripartum Dietary Propylene Glycol or Protected Fats on Metabolism and Early Postpartum Ovarian Follicles. *J. Dairy Sci.* 90: 1243-1254.
6. M. Zachut, A. Arieli, **U. Moallem**. 2008. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows". *Reproduction.* 135: 683-692.
7. Klipper E, Tatz E, Kislouk T, Vlodaysky I, **Moallem U**, Schams D, Lavon Y, Wolfenson D, Meidan R. 2008. Induction of heparanase in bovine granulosa cells by luteinizing hormone: possible role during the ovulatory process. *Endocrinology.* 150(1):413-421.

8. M. Zachut, I. Dekel, H. Lehrer, A. Arieli, A. Arav, L. Livshitz, S. Yakoby, **U. Moallem**. 2010. Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality. *J. of Dairy Sci.* 93:529-545.
9. **U. Moallem**, R. Blanck, H. Lehrer, L. Livshitz, M. Zachut, A. Arieli. 2010. Effects of High Dietary Crude Protein on the Characteristics of Preovulatory Follicles in Dairy Heifers. *J. of Dairy Sci.* 97:785-792.
10. Lavon Y, Leitner G, , **Moallem U**, Klipper E, Voet H. S. S Jacoby, G. Glick Meidan R, Wolfenson D. 2011. Immediate and carryover effects of Gram-negative and Gram-positive toxin-induced mastitis on follicular function in dairy cows. *Theriogenology* .76:942-953.
11. M. Zachut, A. Arieli and **U. Moallem**. 2011. Incorporation of dietary n-3 fatty acids into ovarian compartments in dairy cows, and the effects on hormonal and behavioral patterns around estrus. *Reproduction* 141: 833-840.

פרופ' רינה מידן

1. Klipper E, Levit A, Mastich Y, Berisha B, Schams D, **Meidan R**. Induction of endothelin-2 expression by luteinizing hormone and hypoxia: possible role in bovine corpus luteum formation. *Endocrinology*. 2010 Apr;151(4):1914-22.
2. Rayhman O, Klipper E, Muller L, Davidson B, Rich **R**, **Meidan R**. Small interfering RNA molecules targeting endothelin-converting enzyme-1 inhibit endothelin-1 synthesis and the invasive phenotype of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 2008 Nov 15;68(22):9265-73.
3. Klipper E, Tatz E, Kisliouk T, Vlodavsky I, Moallem U, Schams D, Lavon Y, Wolfenson D, **Meidan R**. Induction of heparanase in bovine granulosa cells by luteinizing hormone: possible role during the ovulatory process. *Endocrinology*.2009 Jan;150(1):413-21.
4. **Meidan R**, Levy N. The ovarian endothelin network: an evolving story. *Trends Endocrinol Metab.* 2007 Dec;18(10):379-85. Epub 2007 Nov 9. Review.
5. Podlovni H, Ovadia O, Kisliouk T, Klipper E, Zhou QY, Friedman A, Alfaidy N, **Meidan R**. Differential expression of prokineticin receptors by endothelial cells derived from different vascular beds: a physiological basis for distinct endothelial function. *Cell Physiol Biochem.* 2006;18(6):315-26.
6. **Meidan R**, Klipper E, Gilboa T, Muller L, Levy N. Endothelin-converting enzyme-1, abundance of isoforms a-d and identification of a novel alternatively spliced variant lacking a transmembrane domain. *J Biol Chem.* 2005 Dec 9;280(49):40867-74.
7. Levy N, Gordin M, Smith MF, Bolden-Tiller OU, **Meidan R**. Hormonal regulation and cell-specific expression of endothelin-converting enzyme 1 isoforms in bovine ovarian endothelial and steroidogenic cells. *Biol Reprod.* 2003 Apr;68(4):1361-8.
8. Girsh E, Greber Y, **Meidan R**. Luteotrophic and luteolytic interactions between bovine small and large luteal-like cells and endothelial cells. *Biol Reprod.* 1995 Apr;52(4):954-62.
9. **Meidan R**, Aberdam E, Aflalo L. Steroidogenic enzyme content and progesterone induction by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-generating agents and prostaglandin F2 alpha in bovine theca and granulosa cells luteinized in vitro. *Biol Reprod.* 1992 May;46(5):786-92.

משה קאים

1. קאים מ, גל י, אברמסון מ, בן נון א, מועלם ע. שיפור הפוריות של פרות קשות-התעברות באמצעות טיפול הורמונאלי. הכנס השנתי ה-20 למדעי הבקר 2008, 81-82.
2. קאים מ. בעיית הפרה קשת-התעברות – אפיון וכיווני טיפול לשיפור הפוריות. הכנס השנתי ה-21 למדעי הבקר 2009, 119-120.
3. דורה ר, דה-יונג ד, סלעי ד, אהוביה א, גסיטוע ח, קאים מ. השפעת הטיפול ב-GnRH סמוך למועד ההזרעה על שיעור ההתעברות של פרות קשות-התעברות. הכנס השנתי ה-24 למדעי הבקר, 2012, 132-133.
4. קאים מ, מועלם ע, גסיטוע ח. שיפור הפוריות של פרות קשות-התעברות באמצעות טיפול הורמונאלי. הכנס השנתי ה-24 למדעי הבקר 2012, 134-135.

5. Kaim, M., Gal, Y., Abramson, M., Ben-Noon, I., Moalem, U. Improving repeat breeder cows' fertility by synchronizing ovulation and timed inseminations. 60th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, Barcelona 2009, 410 (abstr.)

רשימת ספרות

- Båge, R. 1999. Progesterone levels at estrus and subsequent conception rates in repeat breeder heifers. In proceeding of AETE 15th Scientific Meeting. 1999. P. 120.
- Båge, R., H Gustafsson, B Larsson, M Forsberg, H Rodríguez-Martínez . 2002. Repeat breeding in dairy heifers: follicular dynamics and estrous cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns. *Theriogenology* 57: 2257-2269
- Båge, R., S. Petyim, B. Larsson, T. Hallap, A.-S. Bergqvist, H. Gustafsson, and H. Rodríguez-Martínez. 2003. Oocyte competence in repeat-breeder heifers: Effects of an optimized ovum pick-up schedule on expression of oestrus, follicular development and fertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 15:115–123.
- de Loos, F., C. van Vliet, P. van Maurik, and T. A. Kruip. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.* 24:197–204.
- Ferreira, R. M, H. Ayres, M. R. Chiaratti, M. L. Ferraz , A. B. Araújo , C. A. Rodrigues , Y. F. Watanabe , A. A. Vireque , D. C. Joaquim , L. C. Smith , F. V. Meirelles , and P. S. Baruselli. 2011. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *J. Dairy Sci.* 94 :2383–2392
- Linares, T. 1982. Embryonic development in repeat breeder and virgin heifers seven days after insemination. *Animal Reproduction Science.* 4:189-198.
- Mellado, M., A. Zuñiga, F.G. Veliz, A. de Santiago, J.E. Garcia, J. Mellado. 2012. Factors influencing pregnancy per artificial insemination in repeat-breeder cows induced to ovulate with a CIDR-based protocol. *Anim. Reprod. Sci.* 134:105-111.
- Revah, I and Butler, W.R. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 106:39-47.
- Roth, Z., A. Arav, A. Bor, Y. Zeron, R. Braw-Tal, and D. Wolfenson. 2001. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* 122:737–744.
- Yusuf, M., T. Nakao, R. B. Ranasinghe, G. Gautam, S. T. Long, C. Yoshida, K. Koike, and A. Hayashi. 2010. Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. *Theriogenology* 73:1220–1229.