

דוח מסכם לתכנית מחקר 705-0068-15

שיפור והתאמת תהליך העברת עוברים לפרות הולשטיין-פריזי גבוהות תנובה במשק החלב
בישראל

מוגש למועצה לענף החלב

הדו"ח מוגש ע"י:

ד"ר טל רז, DVM, PhD, Dipl. ACT

בביה"ס לרפואה וטרינרית ע"ש קורט, האוניברסיטה העברית. החוקר הראשי.

tal.raz@mail.huji.ac.il

ד"ר יואל זרון, B.Sc.Agri, M.B.A, PhD

המנהל המקצועי של החברה להזרעה מלאכותית בבקר בישראל, שיאון.

yoel@sion-israel.com

ד"ר אמיר שיפמן DVM

החברה להזרעה מלאכותית בבקר בישראל, שיאון. ראש המחלקה להעברת עוברים בשיאון.

Amir@sion-israel.com

העברת עוברים הינה כלי חשוב בפיתוח בקר לחלב עקב האפשרות למנף ולקדם שיפור גנטי משמעותי בזמן קצר לעומת ההזרעה המלאכותית. תהליך העברת עוברים מבוסס על השראת ביוצים מרובים והזרעה של פרות נבחרות (donor, המקור הגנטי) במקביל לסנכרון פרות אומנות (recipients), כך שייוצרו עוברים רבים שיחשפו לתנאי רחם דומים לאחר העברתם מרחם הפרה התורמת לפרה הפונדקאית. עם זאת, תהליך העברת עוברים הינו מורכב וכולל נקודות כשל רבות הקשורות בין היתר בבחירת הפרות התורמות והפונדקאיות, פרוטוקולי הטיפול להשראת ביוצים מרובים בתורמות וסנכרון הפונדקאיות, טכניקת שטיפת העוברים, העברתם לפונדקאיות, ועוד.

המחקר הנוכחי, שהינו שיתוף פעולה פורה בין שיאון לבין ביה"ס לרפואה וטרינרית, הינו המחקר המעמיק והמסודר שבוצע בישראל בתחום זה כדי לבחון את תהליך העברת העוברים. מטרת המחקר העיקרית הייתה להביא לייעול והתאמה של טיפולי העברת העוברים ספציפית לפרות ההולשטיין-פריזי במשק החלב בישראל, על ייחודו הגנטי והממשקי. הנ"ל בוצע ע"י (1) בחינה והשוואה של שלוש פרוטוקולי superovulation בעגלות ובפרות תורמות (donors). (2) קביעת קריטריונים ומדדים לבחירה מושכלת של פרות תורמות בתהליך העברת העוברים בישראל. (3) בחינה והשוואה של שני פרוטוקולי סנכרון של פרות פונדקאיות (recipients).

עבודת המחקר הראתה כי פרוטוקול superovulation שהיה נהוג טרם המחקר איננו יעיל דיו וכי יש להחליפו בפרוטוקולים אחרים שנבחנו, שהראו תוצאות גירוי שחלתי ויבול עוברים טובים יותר. נמצא כי בחירה מושכלת של פרות תורמות, עפ"י קריטריונים ברורים, יכול בהחלט לשפר את תוצאות ה-ET. כמו כן, נמצא כי סנכרון פונדקאיות עם פרוטוקול CIDR הינו יעיל יותר ומביא יותר פונדקאיות לידי ביוץ בזמן הרצוי ובטווח זמן קרוב יותר לפרה התורמת. לצערנו שיעור ההתעברות בפרות הפונדקאיות לא היה משביע רצון במחקר הנוכחי, ויש צורך במחקרים נוספים כדי לבחון כיצד ניתן לשפר זאת, יתכן שע"י ייעול אופן בחירת הפונדקאיות, הטיפול הרוטיני שלהן, סנכרון, שיפור בחירת העוברים להעברה, וכן שיפור טכניקת השתלת העובר ברחם. אנו תקווה כי מסקנות המחקר ייושמו וכי טכניקת העברת העוברים תמשיך להתפתח ולהשתפר, ותתרום לשיפור הגנטי של פרת החלב הישראלית.

העברת עוברים הינה כלי חשוב בפיתוח בקר לחלב עקב האפשרות למנף ולקדם שיפור גנטי משמעותי בזמן קצר לעומת ההזרעה המלאכותית [1-3]. תהליך העברת עוברים מבוסס על השראת ביוצים מרובים והזרעה של פרות נבחרות (donor, המקור הגנטי) במקביל לסנכרון פרות אומנות (recipients), כך שייוצרו עוברים רבים שיחשפו לתנאי רחם דומים לאחר העברתם מרחם הפרה התורמת לפרה הפונדקאית [4]. עם זאת, תהליך העברת עוברים הינו מורכב וכולל נקודות כשל רבות הקשורות בין היתר בבחירת הפרות התורמות והפונדקאיות, פרוטוקולי הטיפול להשראת ביוצים מרובים בתורמות וסנכרון הפונדקאיות, טכניקת שטיפת העוברים, העברתם לפונדקאיות, ועוד [5, 6]. השראת ביוצים מרובים בפרה התורמת ("superovulation") הינו תנאי הכרחי וצוואר בקבוק מרכזי בקביעת יעילות הצלחת התהליך [7, 8]. מחקרים רבים הראו כי יש התאמה בין כמות הביוצים לבין כמות העוברים המיוצרים. עם זאת, קיימת שונות גדולה בתגובה לטיפול superovulation בין פרות, ומקובל שכ-15-25% מהפרות שעוברות תהליך זה אינן מייצרות עוברים כלל, וכ-70% מסה"כ העוברים מיוצרים ע"י 30% מהפרות [9]. השונות יכולה לנבוע מגורמים רבים, הן חיצוניים כגון אקלים, ממשק, תזונה וכן הפרוטוקול להשריית ביוץ יתר ויישומו, והן מגורמים אינטרינזים הקשורים בפרה עצמה, כגון גיל, מצב גופני, תנבת חלב ומצב מטבולי, גזע, קווי הדם, גנטיקה וכו' [2, 10].

בישראל, תחום העברת עוברים מקודם על ידי היחידה להעברת עוברים של שיאון. פרת החלב הישראלית מניבה כמויות חלב מהגבוהות בעולם והינה ייחודית באיכות ובעליונות הגנטית שלה יחסית לפרות הולשטיין-פריזי במקומות אחרים בעולם. לעליונות זו עשויות להיות השפעות מטבוליות ניכרות. בכדי שתהליך של העברת עוברים יתבצע באופן יעיל יש צורך להתאימו לפיזיולוגיה של הפרה. עם זאת, עד לביצוע מחקר זה, לא בוצע מחקר מעמיק ומסודר שבחן את תהליך העברת העוברים והתאמתו לפרת החלב בישראל, ולא נבדקה לעומקה התגובה השחלתית לטיפול superovulation. בהתאם לזאת, חברו החוקרים הרשומים לעיל כדי לבחון ולשפר את תהליך העברת העוברים הקיים בישראל. כחלק מכך, לפני תחילת המחקר עלו שאלות רבות, כגון: כיצד כדאי לבחור את הפרות המתאימות לתכנית של העברת עוברים? מהם הקריטריונים להתחלת התהליך? ומהם פרוטוקולי הטיפול המתאימים, הן בפרות התורמות והן בפרות הפונדקאיות? עדר הבקר לחלב ההולשטיין-פריזי הישראלי עבר טיפוח גנטי ייחודי והוא שונה מהגזעים הקיימים בעולם, הן מבחינה פיזיולוגית (לדוגמא עקב קצב מטבוליזם מאוד גבוה) והן מבחינה ממשקית ותנאי סביבה. אי לכך, היה צורך בביצוע מחקר מקיף שיביא לשיפור ביעילות תהליך של העברת עוברים בפרות חלב בישראל תוך התאמה של הטיפולים לגנטיקה של קווי הדם, תנאי הסביבה ותנאי הממשק הרלוונטיים בישראל.

מטרות המחקר

מטרת המחקר העיקרית הייתה להביא ליעול והתאמה של טיפולי העברת העוברים ספציפית לפרות ההולשטיין-פריזי במשק החלב בישראל, ע"י

(1) בחינה והשוואה של שלוש פרוטוקולי superovulation בעגלות ובפרות תורמות (donors).

(2) קביעת קריטריונים ומדדים לבחירה מושכלת של פרות תורמות בתהליך העברת העוברים בישראל.

(3) בחינה והשוואה של שני פרוטוקולי סנכרון של פרות פונדקאיות (recipients).

אופן ביצוע המחקר

המחקר בוצע כמחקר פרוגרסיבי במהלך 3.5 שנים, במשקי חלב מסחריים, במסגרת העבודה השוטפת של היחידה להעברת עוברים של שיאון (בניהולו של ד"ר אמיר שיפמן), בשיתוף פעולה עם המעבדה של ד"ר טל רז מהאוניברסיטה העברית, תוך קבלת ייעוץ מפרופ' ראובן מייפלסופט מה- Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan שבקנדה. פרות ועגלות עתודה מגזע הולשטיין-פריזי ישראלי נבחרו לשמש כתורמות (donors) עפ"י האינדקס הגנטי שלהם. עגלות מחזוריות בגיל שמעל 13 חודשים מגזע הולשטיין-פריזי ישראלי מאותם המשקים, שימשו כפונדקאיות.

שטיפות עוברים מפרות/עגלות תורמות בוצעו במהלך חודשי החורף והאביב, בכדי להימנע מההשפעות השליליות של עקת החום, כמקובל בשיאון. בחלק הראשון של המחקר נבדקו והשוו 3 פרוטוקולי טיפול שונים להשראת ביוצים מרובים בתורמות (superovulation), באופן נפרד, הן בעגלות, והן בפרות תורמות, כמפורט בטבלה 1. בחלק השני של המחקר, נבחנו רק שני פרוטוקולים superovulation שהראו את התוצאות הטובות ביותר.

לאחר טיפולי ה- superovulation, הפרות התורמות הוזרעו עם זרמה קפואה, ושטיפת עוברים בוצע בהתאם למקובל ע"י שטיפת הרחם טרנס-צרוויקלית. ביום שטיפת העוברים כל הפרות התורמות נבדקות ע"י בדיקה טרנס-רקטלית אולטראסונוגרפית [11], בכדי להעריך את התגובה השחלתית לטיפול ה- superovulation. טרם תחילת פרוצדורת שטיפת העוברים נבדקו ונרשמו הפרמטרים הבאים: מס' גופים צהובים בכל שחלה, מס' וקוטר הזקיקים בכל שחלה, טונוס רחם, קוטר הרחם (בבסיסי הקרניים ובגוף הרחם), טונוס צוואר רחם, קוטר ואורכו. כמו כן נרשמים ממצאים אבנורמליים במערכת המין, במידה ונמצאו.

עבור כל שטיפה נרשמו הפרמטרים הבאים: סה"כ עוברים, סה"כ עוברים חיוניים, כמות הביציות הלא-מופרות, איכות העוברים (Excellent; Good; Fair; Poor), עפ"י הנחיות ה- *International Embryo Transfer Society*), ושלבי התפתחות העוברים (Early morula; Compact morula; Early blastocyst; Blastocyst; Expanded blastocyst; Hatching blastocyst).

עבור כל עגלה/פרה תורמת סונכרנו לפחות 8 פונדקאיות, שהינן עגלות מחזוריות בגיל של מעל 13 חודשים. הפונדקאיות נבדקו ע"י בדיקה טרנס-רקטלית אולטראסונוגרפית ביום העברת העוברים. ונרשמו הפרמטרים הבאים: הימצאות גוף-צהוב (מיקום, קוטר, ומרקם) וזקיקים (קוטר) בשחלות, טונוס רחם, קוטר הרחם (בבסיסי הקרניים ובגוף הרחם), טונוס צוואר רחם, קוטר ואורכו. כמו כן נרשמו ממצאים אבנורמליים במערכת המין, במידה ואובחנו. השתלה של עובר יחיד בפונדקאית בוצעה טרנס-צרוויקלית. זהות העובר המושתל בכל פונדקאית נירשם והפרות הפונדקאיות ניבדקו להריון כמקובל במשק.

טבלה 1: שלושת הפרוטוקולים ל- superovulation שנבחנו בשלב ראשון בפרות/עגלות תרומת

Tx Day	1 Routine320mg	2 Routine400mg&LH	3 5d-400mg-LH
0	Estrus detection	Estrus detection	Estrus detection
7			CIDR insertion
9			PM: FSH
10	AM: FSH PM: FSH	AM: FSH PM: FSH	AM: FSH PM: FSH
11	AM: FSH PM: FSH	AM: FSH PM: FSH	AM: FSH PM: FSH
12	AM: FSH PM: FSH+ PG	AM: FSH PM: FSH+ PG	AM: FSH PM: FSH+ PG
13	AM: FSH+ PG PM: FSH	AM: FSH+ PG PM: FSH	AM: FSH+ PG PM: : FSH+ CIDR removal
14		PM: GnRH	AM: FSH
15	AM: AI PM: AI	AM: AI PM: AI	AM: GnRH PM: AI
16			AM: AI
22	Embryo recovery	Embryo recovery	Embryo recovery
	Cows: 320mg Heifer: 270mg Decreasing dose 4d protocol	Cows: 400mg Heifer: 340mg Decreasing dose 4d protocol	Cows: 400mg Heifer: 340mg Decreasing dose 5d protocol

תוצאות ודין

טיפול superovulation בפרות ובעגלות

תוצאות superovulation שנבחנו בשלב ראשון של המחקר הראו כי פרוטוקולי 2+3 הביאו לגירוי שחלתי ויבול עוברים גבוה יותר, יחסית לתוצאות שהתקבלו מפרוטוקול 1 (שהינו הפרוטוקול המסורתי שבו השתמשו טרם תחילת המחקר). אי לכך, בשלב השני של המחקר הייתה התמקדות בשני פרוטוקולים אלו, ובוצעו שטיפות נוספות, בהתאם ליכולת לגייס פרות למחקר. בנוסף, בעקבות תגובות שראינו בראשית המחקר (כגון סימני דרישה במועד מוקדם/מאוחר מהצפוי) ותוך התייעצות עם פרופ' ראובן מייפלסופט, בוצעו תיקונים מזעריים בשני פרוטוקולים אלו על מנת למיטב אותם (כפי שמופיע בטבלה 2).

תוצאות הגירוי השחלתי ויבול העוברים שהתקבלו בשלושת הפרוטוקולים מסוכמות בטבלה 3 (עבור פרות) ובטבלה 4 (עבור עגלות).

טבלה 2: שני הפרוטוקולים ל- superovulation שנבחנו בשלב שני בפרות/עגלות תורמות

באדום מסומנים השינויים שבוצעו בפרוטוקולים, יחסית לטבלה 1.

Tx Day	2 Routine400mg&GnRH	3 5d-400mg-GnRH+CIDR
0	Estrus detection	Estrus detection
7		CIDR insertion
9		PM: FSH
10	AM: FSH PM: FSH	AM: FSH PM: FSH
11	AM: FSH PM: FSH	AM: FSH PM: FSH
12	AM: FSH PM: FSH+ PG	AM: FSH PM: FSH
13	AM: FSH+ PG PM: FSH	AM: FSH+ PG PM: : FSH+PG
14	AM: GnRH PM: AI	AM: FSH + CIDR removal
15	AM: AI	AM: GnRH PM: AI
16		AM: AI
21	Embryo recovery	
22		Embryo recovery
	Cows: 400mg Heifer: 340mg Decreasing dose 4d protocol	Cows: 400mg Heifer: 340mg Decreasing dose 5d protocol

טבלה 3: סיכום תוצאות הגירוי השחלתי ויבול העוברים שהתקבלו בפרות תורמות לפי הפרוטוקולים השונים

Protocol - <u>COWS</u>	1	2	3
No. of EF	10	16	13
CL per cow	7.2±1.3 (3-17)	8.9±1.4 (0-19)	8.5±1 (3-12)
Embryos per EF	3.6±1.6 (0-17)	7.3±1.5 (0-19)	5.2±1 (0-12)
Embryo per CL	0.42±0.12 (0-1)	0.72±0.07 (0-1)	0.6±0.1 (0-1)
Overall embryo per CL rate	50% (36/72) ^b	81.7%(116/142) ^a	61.8% (68/110) ^b
Unfertilized oocyte (UFO)	0.3±0.21(0-2)	2.27±0.83(0-10)	0.46±0.31(0-4)
UFO%	8.3% (3/36)	29.3% (34/116)	8.8% (6/68)
Transferable embryos per EF	2.9±1.4 (0-15)	4.6±1.2 (0-19)	4.2±0.9 (0-9)
% of transferable embryos	80.5% (29/36) ^a	64.3%(74/116) ^b	79.4%(54/68) ^a
% cows yield no embryo	20% (2/10)	12.5% (2/16)	7.7% (1/13)

^{a,b} different values within a row are significantly different (p<0.05)

עפ"י כלל הנתונים בטבלה 3, בפרות התורמות (מתחלבה ראשונה ומעלה) הגירוי השחלתי (superovulation) ויבול העוברים היה טוב יותר כאשר הן טופלו עפ"י פרוטוקולים 2, או 3, יחסית לפרוטוקול המסורתי שהיה נהוג בשיאון עד לתחילת המחקר (פרוטוקול 1). לא נמצא יתרון בולט לפרוטוקול 2 על פני פרוטוקול 3, ונראה על פניו כי שניהם יעילים במידה דומה. עם זאת, בהחלט יתכן כי הגדלת כמות הפרות בכל קבוצה היה מאפשר בחירה טובה יותר מבין שניהם.

כפי שדווח בספרות, עם שיפור התגובה השחלתית בפרות, נראתה עליה בכמות הביציות הלא-מופרות (UFO) וכן ירידה באחוז העוברים שבאיכות טובה (% of transferable embryos, בעיקר בפרוטוקול 2). הנ"ל מהווה גורם מגביל בטיפולו superovulation, שכאמור- הינו מוכר כאשר יעילות הגירוי השחלתי עולה. הנ"ל יכול לנבוע, בין היתר, משינויים הורמונליים, כגון עלייה ממושכת ברמות האסטרוגן, שעשויות להשפיע לשלילה הן על שיעור ההפריה של הביציות והן על ההתפתחות העוברית הראשונית- תהליכים שמתרחשים באובידקט בשעות ובימים שלאחר הביוץ [5].

טבלה 4: סיכום תוצאות הגירוי השחלתי ויבול העוברים שהתקבלו בעגלות תורמות לפי הפרוטוקולים השונים

Protocol - <u>HEIFERS</u>	1	2	3
No. of EF	10	20	20
CL per cow	9.5±1 (4-14)	10.5±1.1 (4-19)	11.2±1 (4-20)
Embryos per EF	6.9±0.9 (3-11)	8.6±1.2 (2-19)	5.6±1.2(0-20)
Embryo per CL	0.74±0.07 (0.45-1) ^{ab}	0.8±0.06 (0.4-1) ^a	0.46±0.08 (0.0-1) ^b
Overall embryo per CL rate	72.6%(69/95) ^{a#}	81.9%(172/210) ^{a#}	50%(112/224) ^b
Unfertilized oocyte (UFO)	1.7±0.58(0-5)	2.45±0.86(0-14)	1.15±0.39(0-5)
UFO%	24.6% (17/69)	29.7% (51/172)	20.5% (23/112)
Transferable embryos per EF	4.1±0.9 (0-9)	4.8±0.8(1-16)	3.6±0.89(0-14)
% of transferable embryos	59.4%(41/69)	55.8%(96/172)	62.8%(72/112)
% cows yield no embryo	0 ^{a,b}	0 ^a	20%(4/20) ^b

^{a,b} different values within a row are significantly different (p<0.05)
[#]p=0.0655

עפ"י כלל הנתונים בטבלה 4, בעגלות התורמות הגירוי השחלתי (superovulation) ויבול העוברים היה טוב יותר כאשר הן טופלו עפ"י פרוטוקול 2, יחסית לפרוטוקול המסורתי שהיה נהוג בשיאון עד לתחילת המחקר (פרוטוקול 1), וגם יחסית לפרוטוקול 3. חשוב לציין כי בתחילת המחקר, עגלות שטופלו בפרוטוקול 2 הראו סימני ייחום מוקדם מכפי שציפינו, וגם כמות ה-UFO שהתקבלו היה גבוה. בעקבות כך, הוקדמו הטיפול ב-GnRH (שאמור

להשרות ביוץ מסונכרן) וכן מועד ההזרעה הראשונה ב- 12 שעות. בעקבות כך, חלה ירידה ניכרת בכמות ה-UFO שהתקבלו: בפרוטוקול 2 ההתחלתי התקבלו בממוצע 6.2 ± 2.8 בייציות לא מופרות בכל שטיפה (31/67, 46.3% מכלל העוברים), אולם לאחר שיפור הפרוטוקול התקבלו בממוצע 1.2 ± 0.4 בייציות לא מופרות בכל שטיפה (18/105, 17.1% מכלל העוברים) ($p < 0.05$). בהתאם לזאת, פרוטוקול 2 המשופר נתן תוצאות טובות יותר, והוא הפרוטוקול superovulation המומלץ בעגלות הולשטיין פריזי-ישראלי.

קריטריונים להכללה או להוצאת פרות מתהליך של העברת עוברים

כחלק מבחינת התהליך של העברת עוברים, בוצעה סקירה ספרותית לבחירת קריטריונים לבחירת פרות לשמש כפרות תורמות. צוות המחקר החליט שכל פרה צריכה להיבדק ע"י הרופא הווטרינר כדי לוודא מערכת רבייה תקינה טרם התחלת הטיפול ההורמונלי. מעבר לכך, הוחלט על הקריטריונים הבאים להוצאה מהתהליך (exclusion criteria):

- פרה מעל 450 ימים מהמלטה
- מצב גופני בשיא חלב נמוך מ 2.5
- הפרה סובלת מציסטה, ללא חזרה למחזוריות תקינה
- הפרה סבלה משני אירועי ציסטה או יותר בתחלובה הנוכחית
- דלקת עטין בחודש האחרון
- צליעה בחודש האחרון
- מערכת רבייה לא תקינה בבדיקת ע"י רופא
- מעל 6 הזרעות להתעברות בתחלובה הקודמת
- ללא שני ייחומים לפחות לפני התחלת הפרוטוקול

בנוסף, המשקים הונחו שלא לבצע חיסונים "קשים" (פו"ט, קטרת העור) בזמן הטיפול ההורמונלי.

במסגרת המחקר לא בוצעה בדיקה של מדדים אלו באופן ישיר, בין היתר כיוון שהיה ברור מראש כי לא נוכל לכלול מספיק פרות/עגלות לצורך בדיקה מעמיקה, עם כוח סטטיסטי (power) מספק. עם זאת, במקביל לביצוע שטיפות עוברים לצורך המחקר, התבצעו שטיפות עוברים שלא במסגרת המחקר בפרות שלא עמדו בקריטריונים שנקבעו. תוצאות יבול העוברים בשטיפות אלו, כפי שמוצגות בטבלה 5, היו פחות טובות באופן ברור, בהשוואה לתוצאות מהפרות שנכללו במחקר ועמדו בקריטריונים שנקבעו (טבלה 3). הנ"ל תומך בהמלצתנו להקפיד על הקריטריונים שפורטו לעיל לגבי הכללה/הוצאה של פרות תורמות מתהליך של שטיפת עוברים.

טבלה 5: תוצאות יבול העוברים שהתקבל בפרות תורמות שלא נכללו במחקר ולא עמדו בקריטריונים

להכללה

Protocol	1(traditional)	2	3	Total (1,2,3)
No. of EF	11	9	5	25
Embryos per EF	4.36±1.3 (0-23)	5.6±2.5 (0-23)	6±2.9 (0-16)	5.16±1.2 (0-13)
Transferable embryos per EF	2.8±0.9 (0-10)	2.3±0.9 (0-8)	3.4±2 (0-10)	2.8±0.7 (0-10)
% of transferable embryos	64.6% (31/48)	41.2% (21/51)	56.6% (17/30)	53.4%(69/129)
% cows yield no embryo	9.1% (1/11)	33.3% (3/9)	20% (1/5)	20%(5/25)

פרוטוקולים לסנכרון פונדקאיות

כאמור, עבור כל עגלה/פרה תורמת סונכרנו בד"כ 8-10 פונדקאיות, שהינן עגלות מחזוריות בגיל של מעל 13 חודשים. הפונדקאיות נבדקו ע"י בדיקה טרנס-רקטלית אולטראסונוגרפית ביום העברת העוברים לבדיקת תקינותן וכן כדי לוודא הימצאות של גוף צהוב. בחלק הארי של המחקר האומנות סונכרנו ע"י מתן כפול של PG בלבד. עם זאת, כדי לבחון אלטרנטיבה לכך, הוששו שני פרוטוקולים לסנכרון פונדקאיות. בביצוע ההשוואה, בעבור כל פרה תורמת סונכרנו במקביל 10 פונדקאיות: 5 פונדקאיות סונכרנו עם פרוטוקול PG, ו-5 פונדקאיות סונכרנו עם פרוטוקול CIDR, כדלהלן:

פרוטוקול סנכרון PG בפונדקאיות

- ערכי הימים הרשומים מתייחסים ליום הייחום הספונטני בפרה התורמת, טרפ תחילת הטיפול ההורמונלי.
- מתן PG ראשון יום לאחר זיהוי דרישה בפרה התורמת.
- מתן PG שני לפונדקאית, יחד עם מתן PG לפרה התורמת (יום 12 בפרוטוקול SuperOv2, יום 13 בפרוטוקול SuperOv3).
- העברת עובר ביום 21 (כאשר התורמת קיבלה טיפול SuperOv2) או 22 (כאשר התורמת קיבלה טיפול SuperOv3)

פרוטוקול סנכרון CIDR בפונדקאיות

- ערכי הימים הרשומים מתייחסים ליום הייחום הספונטני בפרה התורמת, טרפ תחילת הטיפול ההורמונלי.
- הכנסת CIDR ביום 6 (כאשר התורמת קיבלה טיפול SuperOv2) או 7 (כאשר התורמת קיבלה טיפול SuperOv3). CIDR הושאר ל-5 ימים.

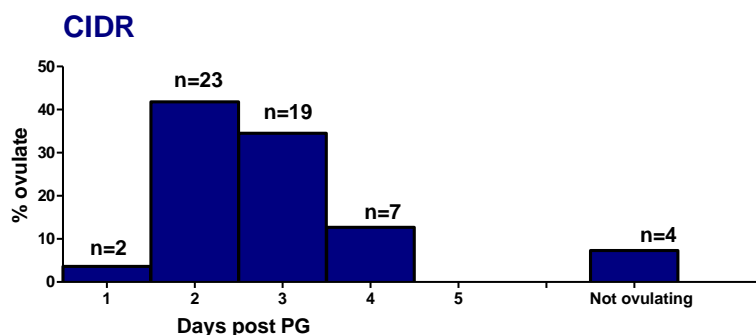
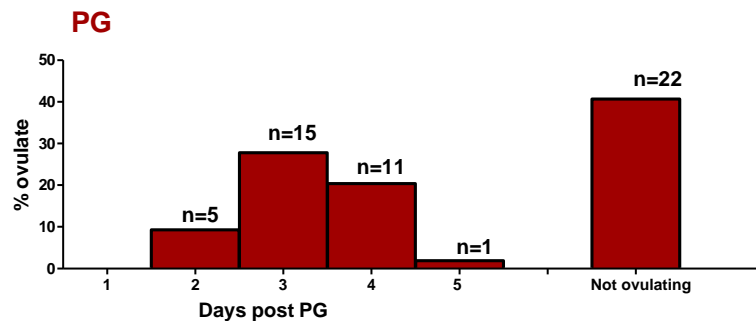
- הוצאת CIDR ביום 11 (כאשר התורמת קיבלה טיפול SuperOv2) או 12 (כאשר התורמת קיבלה טיפול SuperOv3).
- מתן GnRH ביום 14 (כאשר התורמת קיבלה טיפול SuperOv2) או 15 (כאשר התורמת קיבלה טיפול SuperOv3). הנ"ל בוצע במקביל להזרעה של הפרה התורמת.
- העברת עובר ביום 21 (כאשר התורמת קיבלה טיפול SuperOv2) או 22 (כאשר התורמת קיבלה טיפול SuperOv3).

המעקב אחר הפרה התורמת ועבור הפרות הפונדקאיות היה, בין היתר, תוך ביצוע מעקב אולטראסונוגרפי טרנס-רקטלי של מערכת הרבייה, בתדירות גבוהה, לצורך אפיון וזיהוי התגובה השחלתית וקביעת מועד הבייץ באופן מהימן. סה"כ נבחנו 54 עגלות פונדקאיות שסונכרנו בפרוטוקול PG, ו-55 עגלות פונדקאיות שסונכרנו בפרוטוקול CIDR.

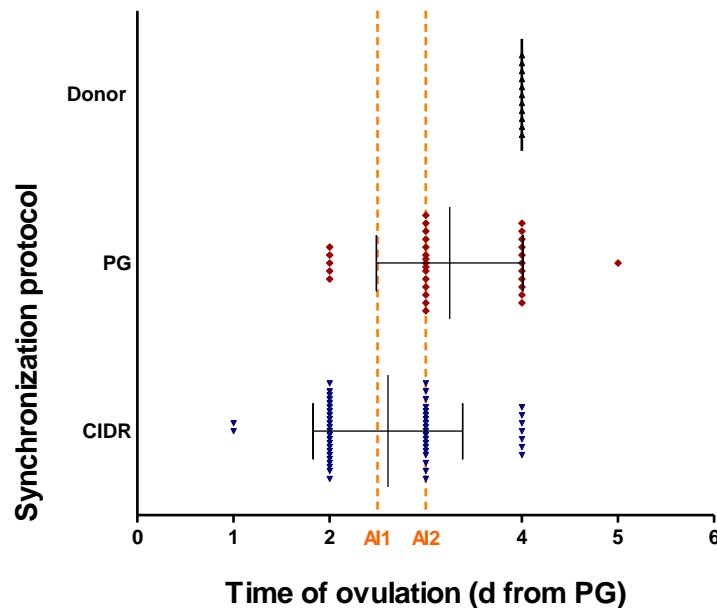
סנכרון העגלות הפונדקאיות היה יעיל יותר בפרוטוקול CIDR. כפי שניתן לראות בתרשים 1, הנ"ל התבטא בכך שיותר עגלות הגיבו ובייצו בתגובה לפרוטוקול זה (פרוטוקול PG: 59.3%, 32/54; פרוטוקול CIDR: 92.7%, 51/55; $p < 0.0001$). כמו כן, כפי שניתן לראות בתרשים 2, רמת הסנכרון בין הפרה התורמת לפונדקאיות הייתה טובה ויותר בשימוש בפרוטוקול CIDR, ויותר פונדקאיות בייצו בטווח זמן של ± 24 שעות מהתורמת (פרוטוקול PG: 51.9%, 28/54; פרוטוקול CIDR: 72.7%, 40/55; $p = 0.0303$).

תרשים 1: התפלגות הבייצים לפי פרוטוקול סנכרון אומנות בפרוטוקול PG ובפרוטוקול CIDR

נתונים מוצגים כאינטרוול זמן ממתן PG אחרון.



תרשים 2: מועד הביצים בפרות התורמות ובפונדקאיות שסונכרו להן בפרוטוקול PG ובפרוטוקול CIDR
נתונים מוצגים כאינטרוול זמן ממתן PG אחרון.



מנתונים אלו ניתן להסיק כי שימוש בפרוטוקול CIDR לסנכרון עגלות אומנות הינו צפוי יותר: יותר אומנות בייצו בזמן הצפוי, וביוצן היה מסונכרן טוב יותר עם הביוצן בפרות התורמות. אם כך, מבחינת יעילות הסנכרון נראה כי פרוטוקול CIDR טוב יותר בעגלות אומנות. עם זאת, בהחלטה על שיקולי עלות-תועלת יש לקחת בחשבון את תוספת עלות הטיפול (עלות CIDR, ו-GnRH), וכן את תוספת העבודה (הוצאה והכנסה של CIDR, ומתן זריקה נוספת).

שיעורי התעברות בפרות פונדקאיות שהועבר אליהם עובר

באופן כללי, שיעור ההתעברות בפונדקאיות לאחר שהועבר אליהן עובר היה נמוך מהרצוי, כפי שניתן לראות בטבלה 6. לפרוטוקול ה- superovulation בתורמות לא היה השפעה מובהקת על הסיכוי להתעברות בפונדקאית, אולם הייתה נטייה לשיעור התעברות גבוהה יותר בפונדקאיות אליהן הועבר עובר שנשטף מתורמת שטופלה ב SuperOv-3 יחסית ל פרוטוקול SuperOv-1.

טבלה 6: שיעור התעברות בפונדקאיות שהושתלו אצלן עובר שנשטף מפרות תורמות שטופלו בפרוטוקולי superovulation שונים.

Donors Protocol	1	2	3	Total
No. recipients	59	149	117	327
Conception rate	24.6%# (15/61)	30.2% (45/149)	37.6%# (44/117)	31.8% (104/327)

p=0.08

בהשוואה בין פונדקאיות שסונכרנו בפרוטוקול PG לעמת פרוטוקול CIDR לא נמצאו הבדלים מובהקים, אולם מדובר בכמות העברות קטנה מידי מכדי להסיק מסקנות ברורות (סה"כ הועברו בחלק זה של המחקר 51 עוברים לפונדקאיות שטופלו באחד מהפרוטוקולים). בנוסף, שיעור ההתעברות בפונדקאיות לא הושפע מיום הייחום שנצפה בפונדקאיות (עפ"י הערכת פודומטרים, יחסית למתן PG) או מגיל הפונדקאית בזמן השתלת העובר (במסגרת טווח גילאי הפונדקאיות שנעשה בהן שימוש במחקר).

ישנם גורמים רבים שעשויים להשפיע על התעברות הפונדקאיות לאחר העברת העוברים, כגון בריאות הפרה הפונדקאית ותקינות מערכת הרבייה, איכות העובר, טכניקת העברה, גורמים אינטרסים, גורמי סביבה וכו', [1, 12, 13]. מחקרים קודמים הראו כי לטכניקת העברת העובר יש חשיבות גדולה: דווח כי מיקום העובר ברחם הפונדקאית, הקושי בהעברתו וכמות הזמן הדרושה להשלמת ההעברה השפיעו על שיעורי ההיריון [14]. במחקר הנוכחי, חלק גדול מהעוברים הועברו ללא מתן אלחוש אפידורל לעגלות הפונדקאיות, אך עם זאת, במטרה לשפר את שיעור ההתעברות, בשלב מסוים של המחקר צוות המחקר יישם אלחוש אפידורלי. הנ"ל הביא לשיפור בשיעור ההתעברות (31% ללא אפידורל; 40% עם אפידורל). עם זאת, שיעור ההתעברות עדיין היה נמוך מהרצוי.

סיכום ומסקנות

העברת עוברים הינה כלי חשוב בפיתוח בקר לחלב עקב האפשרות למנף ולקדם שיפור גנטי משמעותי בזמן קצר לעומת ההזרעה המלאכותית [1-4]. תהליך העברת עוברים מבוסס על השראת ביוצים מרובים והזרעה של פרות נבחרות (donor, המקור הגנטי) במקביל לסנכרון פרות אומנות (recipients), כך שייוצרו עוברים רבים שיחשפו לתנאי רחם דומים לאחר העברתם מרחם הפרה התורמת לפרה הפונדקאית. עם זאת, תהליך העברת עוברים הינו מורכב וכולל נקודות כשל רבות הקשורות בין היתר בבחירת הפרות התורמות והפונדקאיות, פרוטוקולי הטיפול להשראת ביוצים מרובים בתורמות וסנכרון הפונדקאיות, טכניקת שטיפת העוברים, העברתם לפונדקאיות, ועוד [4].

המחקר הנוכחי, שהינו שיתוף פעולה פורה בין שיאון לבין ביה"ס לרפואה וטרינרית, הינו המחקר המעמיק והמסודר שבוצע בישראל בתחום זה כדי לבחון את תהליך העברת העוברים והתאמתו לפרת החלב בישראל, על ייחודה הגנטי והממשקי. עבודת המחקר הראתה כי פרוטוקול superovulation שהיה נהוג טרם המחקר (פרוטוקול 1) איננו יעיל דיו וכי יש להחליפו בפרוטוקולים אחרים שנבחנו (בעגלות- פרוטוקול 2, ובפרות- פרוטוקול 2 או 3), שהראו תוצאות גירוי שחלתי ויבול עוברים טוב יותר. נמצא כי בחירה מושכלת של פרות תורמות, עפ"י קריטריונים ברורים, יכולה בהחלט לשפר את תוצאות ה-ET. כמו כן, נמצא כי סנכרון פונדקאיות עם פרוטוקול CIDR הינו יעיל יותר ומביא יותר פונדקאיות לידי ביוץ בזמן הרצוי ובטווח זמן קרוב יותר לפרה התורמת. לצערנו שיעור ההתעברות בפרות הפונדקאיות לא היה משביע רצון, ויש צורך במחקרים נוספים כדי לבחון כיצד ניתן לשפר זאת, ע"י שיפור אופן בחירת הפונדקאיות, הטיפול הרטיני שלהן, סנכרון, שיפור בחירת עוברים באופן

יעיל יותר, וכן שיפור טכניקת השתלת העובר ברחם. אנו תקווה כי טכניקת העברת העוברים תמשיך להתפתח ולהשתפר, ותתרום לשיפור הגנטי של פרת החלב הישראלי.

תודות

אנו מודים לקרן המחקרים של מועצת החלב, להנהלת שיאון, וכן לאוניברסיטה העברית, על המימון שניתן למחקר זה. אנו מודים לכל אנשי הצוות בשיאון, ובעיקר לאנשי היחידה להעברת העוברים, ד"ר אמיר שיפמן וד"ר גוסטבו וייבשניידר על שיתוף הפעולה הפורה, ההשקעה והעבודה הקשה לאורך המחקר. תודה לכל הרפתנים על שהסכימו שפרותיהן ישמשו במחקר, ובעיקר לרפת שובל.

ספרות מצוטטת

- [1]Hasler JF. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. Theriogenology. 2014;81:152-69.
- [2]Bo GA, Mapletoft RJ. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. Theriogenology. 2014;81:38-48.
- [3]Hasler JF. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. Journal of dairy science. 1992;75:2857-79.
- [4]Moore SG, Hasler JF. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. J Dairy Sci. 2017;100:10314-31.
- [5]Sartori R, Bastos MR, Wiltbank MC. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. Reprod Fertil Dev.22:151-8;2010 .
- [6]Ferraz PA, Burnley C, Karanja J, Viera-Neto A, Santos JE, Chebel RC, et al. Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. Theriogenology. 2016;86:1834-41.
- [7]Mapletoft RJ, Bo GA. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. Reproduction, fertility, and development. 2011;24:278-83.
- [8]Bo GA, Guerrero DC, Adams GP. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. Theriogenology. 2008;69:81-7.

- [9]Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction, nutrition, development.* 2002;42:601-11.
- [10]Kafi M, McGowan MR. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal reproduction science.* 1997;48:137-57.
- [11]DesCoteaux L, Gnemmi G, Colloton J. Ultrasonography of the bovine female genital tract. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice.* 2009;25:733-52;09Table of Contents.
- [12]Hayakawa H, Hirai T, Takimoto A, Ideta A, Aoyagi Y. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology.* 2009;71:68-73.
- [13]Peippo J, Vartia K, Kananen-Anttila K, Raty M, Korhonen K, Hurme T, et al. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal reproduction science.* 2009;111:80-92.
- [14]Roper DA, Schrick FN, Edwards JL, Hopkins FM, Prado TM, Wilkerson JB, et al. Factors in cattle affecting embryo transfer pregnancies in recipient animals. *Anim Reprod Sci.* 2018;199:79-83.