

השפעת משטר הצינון על זרימת הדם לזקיף הדומיננטי ואורך המחזור בזמן עקת החום

The Effect of Cooling Management on Blood Flow to The Dominant Follicle And Estrous Cycle

Length At Heat Stress

שם התלמיד: ליאור עופר

Student name: Lior Ofer

כתובת דוא"ל: lior.ofier@mail.huji.ac.il

מתוכנן לסיים את לימודיו בשנת 2017

כמילוי חלקי של הדרישות לקבלת תואר דוקטור לרפואה וטרינרית מטעם ביה"ס לרפואה וטרינרית ע"ש קורט של האוניברסיטה העברית בירושלים.

המנחה: ד"ר ערן גרשון. חתימה: _____

כתובת דוא"ל: eran.gershon1@mail.huji.ac.il

מקום בצוע העבודה: מרכז וולקני, המחלקה לחקר בקר וצאן, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן, ישראל

תאריך: 13.2.2017

אני מאשר פרסום תקציר העבודה בעברית בעיתון רפואה וטרינרית. חתימת המדריך: _____

תקציר:

אולטרסאונד פותח ככלי מחקר וכלי עזר ממשקי בכל הקשור למערך הרבייה ברפת החלב. השימוש באולטרסאונד מאפשר קבלת נתונים בזמן אמת על שינויים מורפולוגיים של השחלה, מעקב ויזואלי (בניגוד לפלפציה) ומדויק יותר על התפתחות העובר וכן מספק מידע חדש על הפיזיולוגיה של מערכת הרבייה במהלך ההריון ובזמנים שונים של המחזור המיני בפרה. טכניקה זו תרמה רבות להבנה של השינויים במהלך התפתחותם של זקיקים וכאמור אבחון ואספקת נתונים ברמת דיוק גבוה בהרבה מזו שמתקבל במישוש רקטלי. בכלל זה, ניתן לקבל מידע על התפתחות הזקיק הפרה-אובלטורי, התרחשות הביוץ והופעת גופיף צהוב ואבחנה של פתולוגיות שחלתיות.

בעזרת הוספת מדד הדופלר לבדיקת האולטרסאונד ניתן לאמוד את קצב הזרימה וכמות הדם המגיעה לזקיקי השחלה בכלל ולזקיק הדומיננטי בפרט ובכך ללמוד על הדינמיקה של השחלה בשלבים שונים של המחזור המיני וההריון. השימוש בממד זה יכול לספק לנו מידע רב כגון: השוואת קצב זרימת הדם לעומת קצב הגדילה, הניוון, והביוץ של הזקיק ובניית פרופיל זרימת הדם לשחלה בזמן מחזור מלא של פרה.

מטרת המחקר היתה לאפיין את זרימת הדם לזקיק הדומיננטי והפרהאובלטורי בשחלה, לאורך המחזור המיני, בפרות חלב ישראליות. בנוסף, נבדקה ההשפעה של משטרי צינון שונים בתקופת הקיץ, על זרימת הדם לזקיק הדומיננטי.

למטרה זו, 12 פרות הולשטיין ישראליות, מתחלובה שנייה ומעלה, ברפת בית דגן בחודשי הקיץ (יולי-אוגוסט) חולקו אקראית לשתי קבוצות: קבוצה אחת קיבלה את מספר הצינונים הרגיל (חמישה צינונים ביום, 5CS) ואילו הקבוצה השנייה נחשפה למשטר צינונים מוגבר של שמונה צינונים ביממה (8CS).

זרימת הדם לזקיק הדומיננטי וקוטר הזקיק נמדדו ע"י מכשיר אולטרסאונד, תוך שימוש בשיטת הדופלר, מידי יום לאורך כל המחזור המיני ובנוסף נלקחה דגימת דם להערכת הפרופיל הורמונאלי.

לא מצאנו הבדל בקצב התפתחות הזקיקים או בקוטרם בין שתי קבוצות הצינון. אולם, כאשר מדדנו את זרימת הדם לזקיק, מצאנו כי אין הבדל בזרימת הדם בין שתי קבוצות הצינון בימים 1-19 של המחזור, אך מיום 20 ועד לביוץ, מדדנו זרימת דם גבוהה יותר בשחלות של הקבוצה שצוננה שמונה פעמים ביום בהשוואה לקבוצת החמישה צינונים. בנוסף, אורך המחזור היה קצר יותר באופן מובהק בקבוצה שנחשפה ל-8 מינונים לעומת ה-5 צינונים. לא מצאנו הבדלים ברמות הפרוגסטרון בין שתי קבוצות הצינון.

על פי הממצאים, ניתן לומר כי זרימת הדם לזקיק הדומיננטי וכן אורך המחזור המיני של הפרה, הינם מושפעים מעקת חום. הנהגת משטר צינונים מוגבר בזמן עקת חום, עשוי להגביר את זרימת הדם לשחלה וכך לתרום בשיפור ביצועי הפוריות של פרת החלב.

תוכן עניינים:

מבוא	עמוד 4
שיטות וחומרים	עמוד 6
תוצאות	עמוד 10
דיון ומסקנות	עמוד 15
תודות	עמוד 18
רשימת מקורות	עמוד 19

1. מבוא:

1.1 עקת חום

עומס חום נחשב כאחד הגורמים המדכאים הן ייצור חלב והן פוריות בפרות חלב. דרך ההתמודדות הנפוצה והמקובלת כיום בארץ היא משטר צינון המבוסס על 5 עד 7 פרקי זמן הפרוסים על פני יממה, כשכל אחד אורך כ- 30 עד-45 דקות שבהן הפרות נמצאות בחצר צינון יעודית. בתוך פרק הזמן הזה, מתקיימים מחזורים קבועים בני 5 דקות הכוללים 30 שניות של המטרה עילית ומיד לאחר מכן 4.5 דקות של איזורור מסיבי. שיטת צינון זאת תורמת בשמירה על רמת יצרנות גבוהה ושמירה על נורמותרמיה בחודשי הקיץ החמים [2].

נתונים מספר העדר הישראלי מעידים כי בשנים האחרונות, שיעור התעברות מהזרעה ראשונה של פרות יורד מ-45% בחורף, ל-17% בפרות לא מצוננות בקיץ. בארץ, משנת 2000, אנו עדים לירידה של 6.2% ו-14.7% בשיעור ההתעברות במבכירות ובפרות בהתאמה בתקופת הקיץ.

פגיעה בשיעור של כ-10-15% ביצור החלב ורכיביו בקיץ עקב צינון ברמה לא מיטבית נצפתה בעבודות שנעשו לאחרונה בבית דגן ובעקבותיהם הומלץ לצנן את הפרות בחצר צינון בתכיפות של 8 צינונים בני 25 דקות לפחות כל אחד, למניעת הפגיעה ביצור (Honig et al. 2012; Miron et al. 2008). בניסיונות קצרי טווח אלו לא נבחנה השפעת הצינון על הפוריות. במקביל, מחקרים שנעשו בשנים האחרונות, מראים כי רפתות המאופיינות בגנטיקה איכותית ותנובות גבוהות, נמצאות בנסיגה בביצועי הפוריות, ונוצר קונפליקט בין מדדי היצור לביצועי פוריות.

כמו כן, בשנים האחרונות, קיימת עלייה מסויימת ב מספר מופעים הקשורים במערכת הרבייה, ביניהם אנדומטריטיס, שהראה עלייה בתדירות המופע בתוך העדר הישראלי מ-38.1% ל 46% במבכירות ומ 25.5% ל 30.1% בפרות מתחלובה שניה ומעלה [3]. הסבר אפשרי לעלייה זו, הוא העומס המטבולי שפרת החלב הישראלית נתונה בו. לאורך העשור האחרון, תנובת החלב היומית של הפרה הישראלית עלה ממוצע של 40 ליטרים למוצע של כ 50 ליטרים. תנובת חלב גבוהה כל כך, חושפת את הפרה לעומס מטבולי אדיר. בנוסף, שינויי האקלים וההתחממות הגלובלית, גרמו לעלייה בעקת החום אליה הפרות חשופות במשך הקיץ.

השילוב בין שני פקטורים אלה, העלייה בעומס המטבולי והעלייה בעקת החום, עשוי להיות הגורם העיקרי לעלייה בהיארעות של אנדומטריטיס בעדר הבקר לחלב הישראלי.

מחקרים שנערכו בעבר, הראו כי עקת חום אפילו לזמן קצר, פוגעת בתהליכים רבייתיים ובכללם: שיבוש בהתפתחות הזיקים והגוף הצהוב, שיבוש תהליך הסטרדיאוגנזה בשחלה, פגיעה באיכות הביציות, פגיעה בהתפתחות העובר, הפלות וספיגת עוברים [4,5].

שיבוש אפשרי במועד הביוץ מתבניתו הרגילה בעקבות חשיפה לעומס חום, יכול להוות אף הוא גורם מרכזי בירידה בשיעורי ההתעברות בחודשי הקיץ [5]. יתכן וזיהוי של שינוי בזרימת הדם לשחלה, לזיקים ולגוף הצהוב יאפשר זיהוי ואיתור שינויים במועדי הביוץ.

1.2 אולטראסאונד ומדד הדופלר

אולטראסאונד רקטלי פותח ככלי מחקר וכלי עזר ממשקי בכל הקשור למערך הרבייה ברפת החלב. מלבד היתרון הבולט של הבדיקה בכך שאינה וגינלית (ולכן איננה נחשבת פולשנית) ואינה כרוכה במישוש העשוי לגרום נזק, השימוש באולטראסאונד מאפשר קבלת נתונים בזמן אמת על שינויים מורפולוגיים של השחלה, מעקב ויזואלי (בניגוד לפלפציה) ומדויק יותר על התפתחות העובר וכן מספק מידע חדש על הפיזיולוגיה של מערכת הרבייה במהלך ההריון ובזמנים שונים של המחזור המיני בפרה [13].

השימוש ההולך וגובר במדד ה-Color Doppler, ב-15 השנים האחרונות, מקנה יכולת לאמוד את עוצמת הפרפוזיה וכמות הדם המגיעה לאיבר מסויים ומכך השלכה על רמת תפקודו של אותו איבר. האולטראסאונד הרקטלי בשילוב עם טכניקת ה-Color Doppler יכול להיות שימושי כאשר רוצים לחקור ולאמוד את זרימת הדם הגניטלית של הפרה במטרה לזהות שינויים באברי המין לאורך המחזור המיני. הוכח כי קיימים שינויים אופייניים בזרימת הדם לגוף הצהוב במהלך המחזור המיני שנמצאים במתאם גבוה לשינויים ברמות הפרוגסטרון בדם [6,7]. מחקר שעשה שימוש בטכניקת ה-Color Doppler, הראה כי קיימת דווקא עלייה בזרימת הדם לגוף הצהוב בתחילת שלב הלוטאוליזה בפרה [8]. קבוצה אחרת הראתה שזרימת הדם לזיקים בוגרים מתגברת בקצב מהיר יותר סביב שיא ה-LH והביוץ [9-11]. מחקרים אחרים השתמשו ב-Color Doppler כדי להדגים את השינויים שמתרחשים בזרימת הדם בשחלה במהלך המחזור המיני של הפרה [12]. המחקרים הללו הראו שאספקת הדם לזיק נמצאת ביחס ישר לקצב גדילת הזיק, לניוון שלו או לחלופין לביוץ ולמעשה ניתן להשליך ממנה לגבי המצב הפיזיולוגי הנוכחי של הזיק [13]. התפתחות מואצת של כלי דם בשכבת תאי התקה המקיפה את הממברנה הבזאלית ואת שכבת תאי הגרנולוזה של הזיק המתפתח [14]. מחקר אחר גילה שהאפיון ההיסטולוגי המרכזי של הזיק הדומיננטי הוא רמת הווסקולריזציה המואצת בשכבת תאי התקה בהשוואה לזאת של זיקים אטרטיים [14,15].

מטרת המחקר הנוכחי הייתה להעריך ולאמוד את זרימת הדם המשתנה לזקיך במהלך מחזור מיני מלא בפרת חלב ישראלית בחודשי הקיץ, תחת שני משטרי צינון שונים. בזרימת הדם ברקמה הן מבחינת כיוון זרימת הדם והן מבחינת עוצמת הזרימה. את המידע שמתקבל בצבע, ניתן לכמת ע"י חישוב אחוז הריקמה שנצבעה, או לחלופין ע"י תוכנת מחשב המתבססת על מספר פיקסלים צבועים באיזור מוגדר בתמונה. בעזרת הוספת מדד ה-Color Doppler לבדיקת האולטרסאונד, ניתן לאמוד את קצב וכמות הדם המגיעה לזקיכי השחלה ובכך למשל לנסות ולהשוות את קצב זרימת הדם לזקיך לעומת קצב הגדילה, הניוון, והחריגה שלו. (S.M. Pancarci 2011).

2. שיטות וחומרים

2.1 אוכלוסיית המחקר

12 פרות חלב מגזע הולשטיין ישראלי, מתחלובה שנייה ומעלה, שאינן בהריון, חולקו בצורה אקראית לאחת משתי קבוצות ניסוי. קבוצה אחת קיבלה את מספר הצינונים הרגיל הנהוג (5 צינונים ביום, 5CS) ואילו הקבוצה השנייה נחשפה למשטר צינונים מוגבר של 8 צינונים ביממה (8CS). (ראה פסקה 2.2).

בממוצע, הפרות היו בתחלובה שלישית, גילן היה 1500 ימים בקירוב, משקלן היה 670 קילוגרם ותנובת החלב שלהן הייתה 48.9 קילוגרם חלב ליום. כל הפרות בניסוי היו יחסית מאוזנות בהתייחסות למדדי איפיון מקובלים של פרות חלב (ראה טבלה 1).

טבלה 1: ממוצע (± שגיאת התקן של הממוצע) של המדדים השונים כמפורט בטבלה.

8CS (שמונה צינונים ביממה)	5CS (חמישה צינונים ביממה)	מדד משתנה
6	6	סך הכל פרות נבדקות
93 ± 16.7	94.8 ± 7.4	ימים בתחלובה
3.75 ± 1.44	2.67 ± 0.34	מספר תחלובה
1409 ± 110.6	1614.8 ± 102.7	גיל (בימים)
3.5	3.75	ציון גופני
50.2 ± 0.8	47.55 ± 1.4	תנובת חלב יומית (ק"ג)
664 ± 8.5	678 ± 5.5	משקל גוף (ק"ג)
3.35 ± 0.1	3.21 ± 0.06	% שומן בחלב
3.18 ± 0.08	3.03 ± 0.07	% חלבון בחלב
4.85 ± 0.03	4.72 ± 0.04	% לקטוז בחלב

כל קבוצה מנתה 30 פרות סך הכל (כולל פרות הניסוי), ושוכנה בסככה כוללת עם חצר קיץ (לא מקורה) ומרחב מחייה של כ-20 מ"ר לפרה, כולל מזרן ואבוס. הפרות הואבסו על בסיס יומימי במנת חולבות המבוססת על תחמיץ חיטה בעלת ערכים תזונתיים: 1.75Mcal, 16.5% CP, 31.5% crude NDF, לפרה ליום. הפרות עברו סנכרון ייחום הורמונלי

"ovsynch" כפי שמתואר בהמשך. אורך המחזור המיני של הפרות נקבע בעזרת אולטראסאונד: הפרות נבדקו ביממה העוקבת לסוף הסינכרון. זיהוי של גוף צהוב חדש משמע שהתרחש ביוץ (יום 0). סוף המחזור נקבע כאשר זוהה פעם נוספת גוף צהוב חדש.

הניסוי אושר ע"י הועדה המוסדית לניסויים בבע"ח של מרכז וולקני והתבצע ברפת המחקרית של מכון וולקני בבית דגן, בחודשי שיא הקיץ יולי-אוגוסט.

2.2 מערך וניהול הצינונים

הניסוי החל ב-21 ליולי 2014, היום בו זוהה הביוץ הראשון בקרב פרות הניסוי והסתיים ב-17 באוגוסט 2014, היום בו זוהה הביוץ האחרון בקרב פרות הניסוי (סך הכל 27 ימים). בניסוי זה, 12 פרות חלב מגזע הולשטיין ישראלי מתחלובה שניה ומעלה, חולקו באופן אקראי לשתי קבוצות טיפול של 6 פרות כל אחת. אותן 6 פרות הצטרפו לקבוצה קיימת והשלימו למניין של 30 פרות בכל קבוצה.

פרות בקבוצת 5CS צוננו חמש פעמים ביממה, בחצר הצינון שמחוץ למכון החליבה, כאשר שלושה צינונים התבצעו לפני כל חליבה (04:30, 12:30, 19:30) ועוד שני צינונים: בין חליבת בוקר לצהריים (10:15) ובין חליבת צהריים לערב (17:00). פרות בקבוצת 8CS צוננו באופן זה לזה של הקבוצה הראשונה בתוספת שלושה צינונים מיד לאחר כל חליבה (07:00, 15:00, 23:00).

פרק זמן של צינון ימשך כ-30 דקות, כאשר ישנם אינטרוולים חוזרים של המטרה למשך 30 שניות ומיד לאחריה, איורור ללא המטרה למשך 4.5 דקות.

כל הפרות נחלבו שלוש פעמים ביום: חליבת בוקר בשעה 05:00, חליבת צהריים בשעה 13:00 וחליבת ערב בשעה 20:00. נתוני תנובת החלב נאספו למחשב באופן אוטומטי ע"י מערכת החליבה האלקטרונית (של חברת צ.ח.מ אפיקים) בכל חליבה והפרות נשקלו שלוש פעמים ביום ביציאה ממכון החליבה ע"י משקל אלקטרוני שמוצב בשביל היציאה מהמכון.

2.3 סנכרון ייחומים "Ovsynch"

הפרות הנבחרות עברו סנכרון ייחום הורמונלי "ovsynch": מתן מינון כפול (2 מ"ל) בזריקה לשריר של GONAbreed®, gonadorelin acetate, 100 mcg/ml) gonadotropin-releasing hormone (GNRH) analog (Parnell manufacturing PTY LTD, Australia), לאחר 7 ימים מתן של 2 מ"ל PGf2α analog בזריקה לשריר

(estropLAN®, Cloprostenol Sodium, 250 mcg/ml, Parnell manufacturing PTY LTD, Australia) ולאחר יומיים נוספים מתן נוסף של GNRH במינון כפול (2 מ"ל) בזריקה לשריר. ביוץ מתרחש עד כ-36 שעות לאחר זריקת ה GNRH השנייה.

2.4 אולטרסאונד

בדיקות האולטרסאונד התבצעו בעזרת מכשיר אולטרסאונד (MyLab™ five; ESAOTE, Maastrich,) (Netherland) שאליו חובר מתמר טרנס-רקטלי 7.5MHz ונערכו בזמנים קבועים: קבוצת 5CS מיד בצאתן ממכון החליבה לאחר חליבת ערב. קבוצה 8CS, מיד בצאתן מהצינון של שעה 23:00. כך נוצר מצב שהפרות נבדקו בהפרישי זמן זהים לאחר צינון. תדירות הבדיקות הייתה אחת ליומיים החל מיום 3 עד יום 17 למחזור, כאשר החל מיום 18 ועד לביוץ, הבדיקות התבצעו כל יום עד להופעת גוף צהוב חדש, קרי ביוץ. לכל פרה הוקצב משך זמן בדיקה שאינו עולה על 20 דקות. מהלך כל בדיקה כלל את איתור הזקיק הדומיננטי, צילום שלוש תמונות של הזקיק הדומיננטי בחתך רוחב מקסימלי (בכל תמונה חושב קוטר ושטח הזקיק בעזרת תוכנת עריכה יעודית של MyLab™ five (version 2.78) ובהמשך חושב הממוצע של ערכים אלו מכל בדיקה בנפרד)[6]. השינויים בקוטר הזקיק בשתי קבוצות הניסוי תועד גם הוא בעזרת האולטרסאונד. בנוסף, בכל בדיקה נעשה שימוש ב-Color Doppler לצורך מיפוי והערכת זרימת הדם לזקיק הדומיננטי בחתכי רוחב שונים. ערכי המדידה והגדרות המכשיר נקבעו מראש בכדי למנוע שונות בין הבדיקות השונות בפרות השונות. בכל בדיקה, נלקחו שלוש תמונות צבע תוך הקפדה על מפתח מקסימלי של פני השטח של הזקיק בתמונה והכללה של כל הזקיק בתוך "קופסת הצבע" של ה-Color Doppler וזאת בכדי לקבל תמונה מלאה של זרימת הדם בזקיק ולהמנע מארטיפקטים מרקמות שכנות. תמונות הצבע ממכשיר האולטרסאונד הועברו לתוכנה (Pixelflux, chameleon software GMBH), שמוודדת בשטח נבחר את כמות הפיקסלים של צבע בסקלה שבין אדום לכחול ומתרגמת את הנתונים למספרים בעלי ערך כמותי. חושב הממוצע של כל שלוש תמונות מאותה בדיקה לצורך עיבוד וניתוח נתונים בהמשך.

כל המדידות והחישובים של הנתונים שנאספו במהלך הבדיקות, נעשו מחוץ לשעות הבדיקה ולא בזמן שהפרות נמצאות קשורות בחדר הבדיקה.

2.5 איסוף דם ומדידת רמות פרוגסטרון (P4)

דגימות דם נאספו במבחנות EDTA פעם ביומיים עד יום 18 למחזור ואז כל יום עד לביוץ. מבחנות הדם עברו סירכוז במהירות של 10,000 סל"ד למשך 10 דקות ולאחר מכן הסרום הופרד ונשמר במבחנות אפנדורף בהקפאה במינוס 80 מעלות צלזיוס עד לביצוע אנליזה לרמות פרוגסטרון.

רמות פרוגסטרון נמדדו על ידי progesterone coated tubes RIA kit (MP Biomedicals) על פי הוראות היצרן. טווח הזיהוי המינימלי בניתוח רמות הפרוגסטרון היה 0.02 ng/ml .

2.6 מדידות של THI (temperature-humidity index)

טמפרטורה סביבתית ולחות יחסית נמדדו ותועדו כל שלוש שעות ע"י השירות המטאורולוגי הישראלי בבית דגן. לחות יחסית מקסימלית וטמפרטורה סביבתית מינימלית תועדו בשעה 3:00 לפנות בוקר. לחות יחסית מינימלית וטמפרטורה סביבתית מקסימלית תועדו בשעה 12:00 בצהריים. בהתאם, THI מינימלי ומקסימלי נקבע בשעה 3:00 לפנות בוקר ו-12:00 בצהריים בהתאמה. המשוואה הבאה שימשה לצורך חישוב THI [16]:

$$\text{THI} = (1.8 * \text{Tdb} + 32) - (0.55 - 0.0055 * \text{RH}) * (1.8 * \text{Tdb} - 26)$$

כאשר Tdb=dry bulb temperature.

2.7 ניתוח סטטיסטי

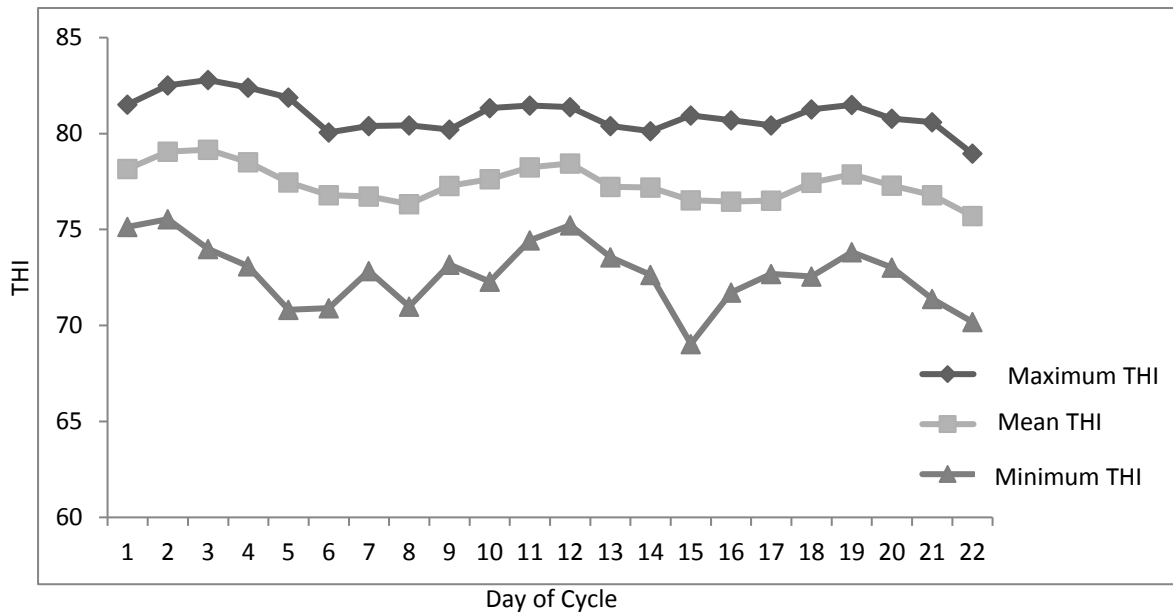
הניתוח הסטטיסטי שהשתמשנו בו הוא ניתוח שונות דו כיווני (ANOVA) (כאשר המשתנים הבלתי תלויים הם מספר צינונים ביום [5 או 8] ופרק זמן [ימים במחזור], והאינטראקציה ביניהם) עם מדידות חוזרות למשתנה אחד (פרק זמן - mixed model ANOVA). כל פרה מהווה את הביקורת לעצמה משום שזרימת הדם נמדדה לכל פרה בנפרד בכל פרקי הזמן של הניסוי.

מבחן Tukey-Kramer honest significant difference שימש לבחינת ההבדלים ולהשוואה בין הממוצעים השונים של הפרטים השונים בתוך כל קבוצת ניסוי. כל הניתוחים הסטטיסטים בוצעו באמצעות תוכנת JMP (SAS Institute, 2005). כל התוצאות מוצגות כממוצע \pm שגיאת התקן של הממוצע.

3. תוצאות

3.1 ערכי THI

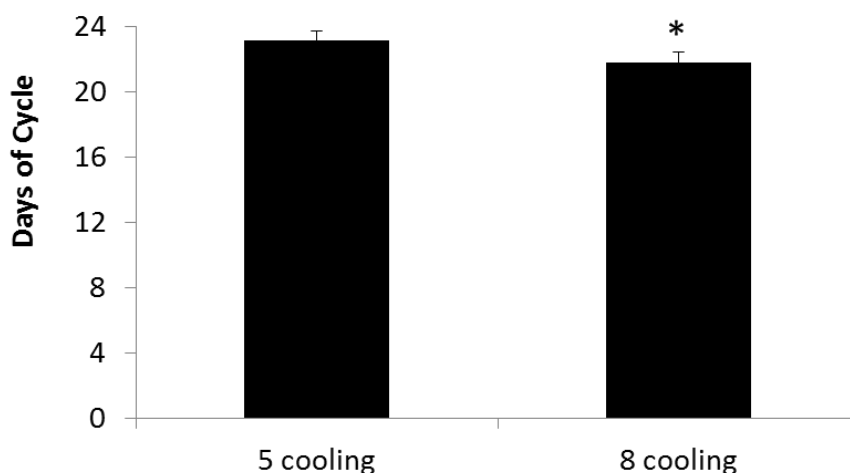
הטמפרטורה הסביבתית הממוצעת במהלך ימי הניסוי הייתה $27.7 \pm 2.9^{\circ}\text{C}$ והלחות היחסית הייתה $67.5 \pm 10.7\%$. THI מינימלי, מקסימלי וממוצע במהלך הניסוי היו 69.0, 82.8 ו- 77.4 ± 3.1 בהתאמה (תמונה 1).



תמונה 1: מדידות יומיות של THI (temperature-humidity index) במהלך תקופת הניסוי (22 ימים).

3.2 אורך המחזור המיני בקבוצת 5CS ובקבוצת 8CS

לכל הפרות בניסוי משתי הקבוצות היה ביוץ בודד. אורך המחזור של הפרות מהקבוצה שנחשפה לשמונה צינונים ביום, היה קצר יותר באופן מובהק בהשוואה לפרות בקבוצה שקיבלה חמישה צינונים ביום (תמונה 2): 21.7 ± 0.7 ימים, לעומת 23.2 ± 0.5 ימים ($P = 0.02$).

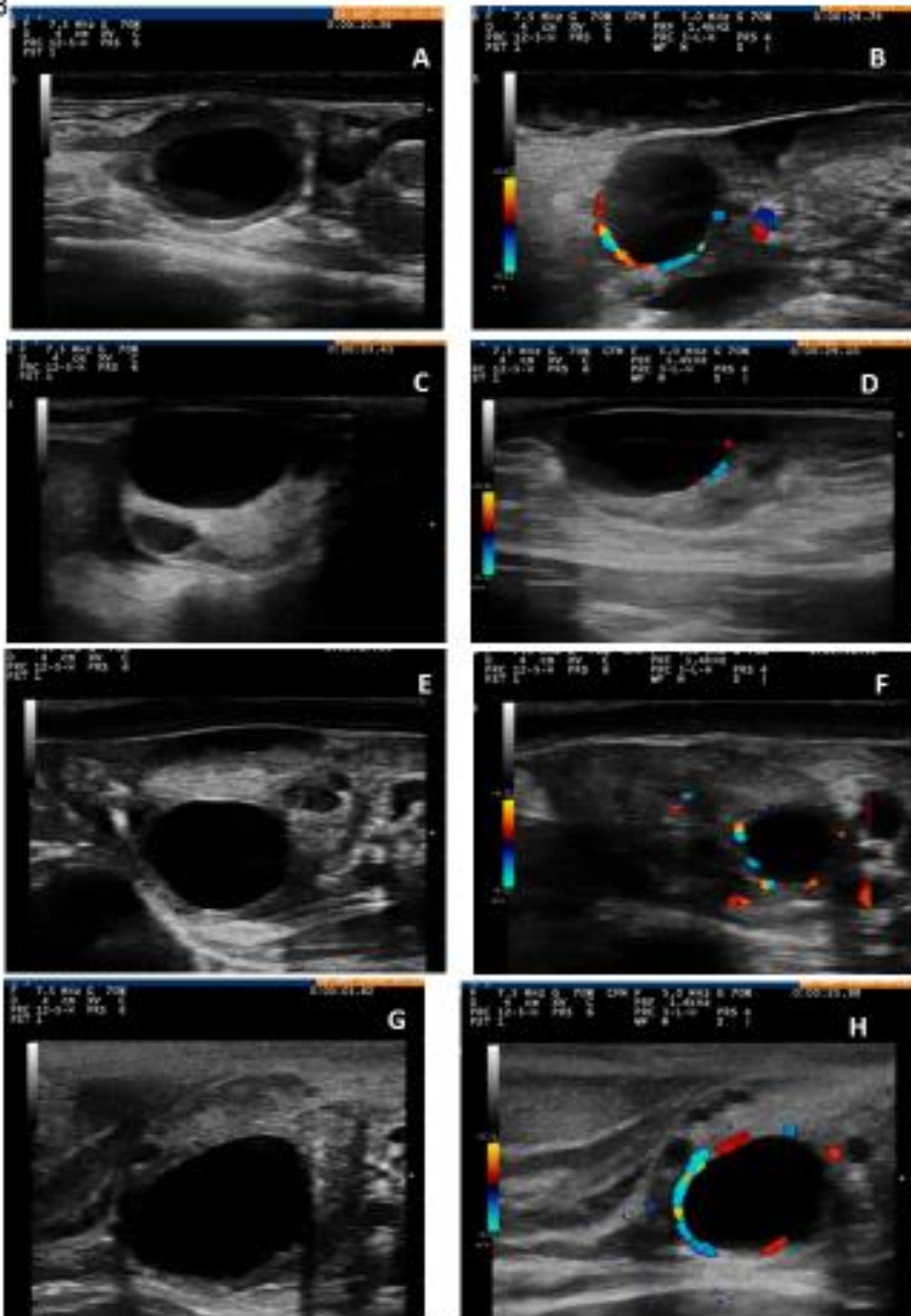


תמונה 2: אורך המחזור המיני. אורך המחזור בקבוצה שקיבלה שמונה צינונים ביממה, היה קצר יותר באופן מובהק בהשוואה לקבוצה שקיבלה חמישה צינונים.

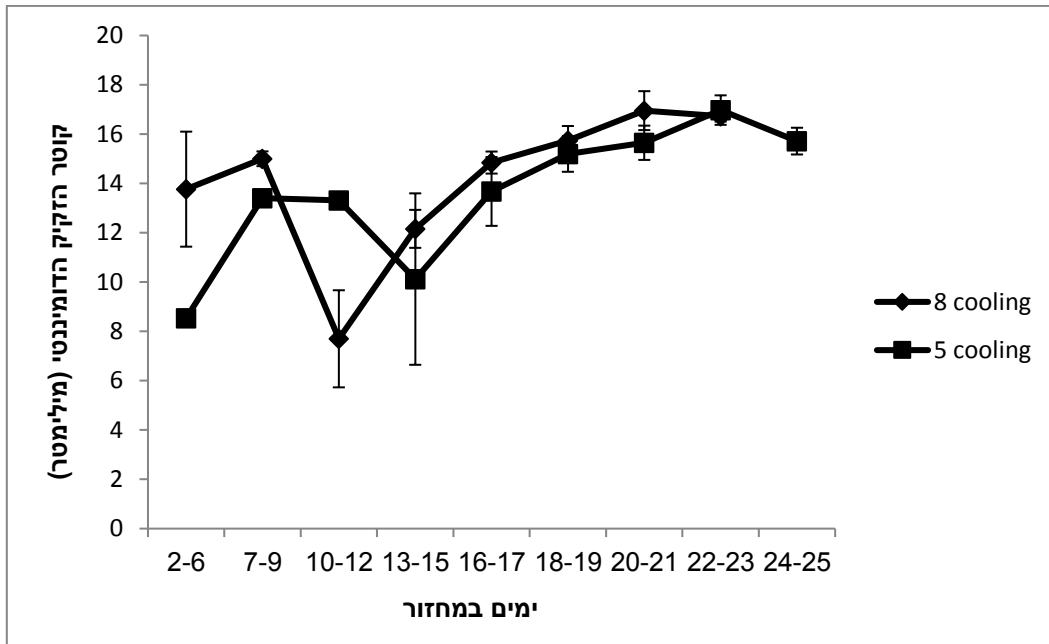
3.3 התפתחות הזקיק וזרימת הדם לזקיק הדומיננטי בקבוצת 5CS ובקבוצת 8CS

מדדנו את קצב התפתחות הזקיק וזרימת הדם לזקיק הדומיננטי בשתי קבוצות הניסוי. תמונות אולטרסאונד B-) (mode Color Doppler של זקיקים בתחילת גל שני וביום לפני הביוץ, מוצגות בתמונה 3. לא נראה הבדל משמעותי בקוטר הזקיק הדומיננטי בין שתי קבוצות הניסוי (5CS מול 8CS) לאורך כל המחזור (תמונה G,E,C,A3 ותמונה 4). בהמשך מצאנו שגל הזקיקים הראשון היה קצר יותר באופן מובהק בקבוצת השמונה צינונים לעומת קבוצת החמישה צינונים (11.5 ± 0.7 ימים מול 14.3 ± 0.6 ימים, בהתאמה, תמונה 4). ובכן, כאשר השווינו את זרימת הדם לזקיק בימים שונים של המחזור, נצפתה עלייה גדולה יותר בזרימת הדם לזקיק הדומיננטי בפרות בקבוצת 8CS לעומת פרות בקבוצת 5CS (תמונה H,F,D,B3). כימות של תמונות ה- Color Doppler לכדי מספרים, הראה שלמשטר אינטנסיבי יותר ל צינונים (שמונה צינונים ביום) אין כל השפעה על זרימת הדם לשחלה במהלך גל הזקיקים הראשון ובתחילת גל הזקיקים השני (ימים 0-19, תמונה 5). אולם, החל מיום 20 למחזור ועד הביוץ, הגברה משמעותית יותר של זרימת דם לזקיק הדומיננטי נרשמה בקרב הפרות שבקבוצת השמונה צינונים (8CS) בהשוואה לקבוצת החמישה צינונים (5CS), (תמונה 5).

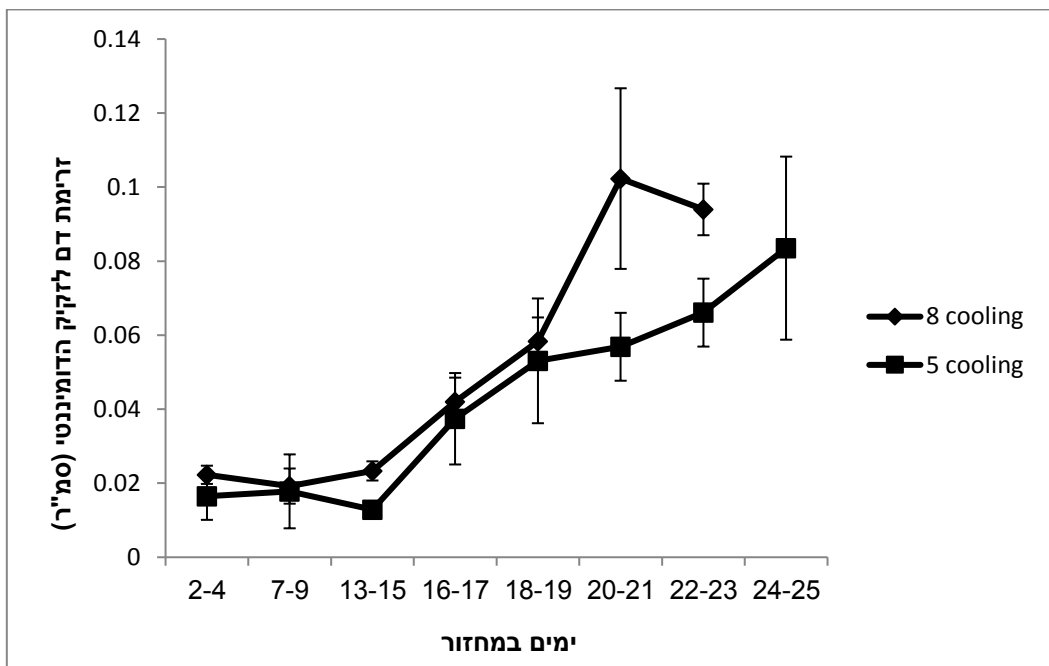
Fig. 3



תמונה 3: תמונות אולטרסאונד משחלות של פרות בניסוי. בתמונה A ו-C ניתן לראות זקיק דומיננטי בתחילת גל זקיקים שני וביום שלפני הביוץ (בהתאמה) בפרה מקבוצת 5CS ובפרה מקבוצת 8CS (תמונות E ו-G בהתאמה). בתמונות B ו-D ניתן לראות את הזקיק באותם שלבים בתוספת מדד Color Doppler בפרה מקבוצת 5CS ובפרה מקבוצת 8CS (תמונות F ו-H בהתאמה). ניתן לראות זרימת דם חלשה יותר מסביב לזקיק בפרה מקבוצת 5CS.



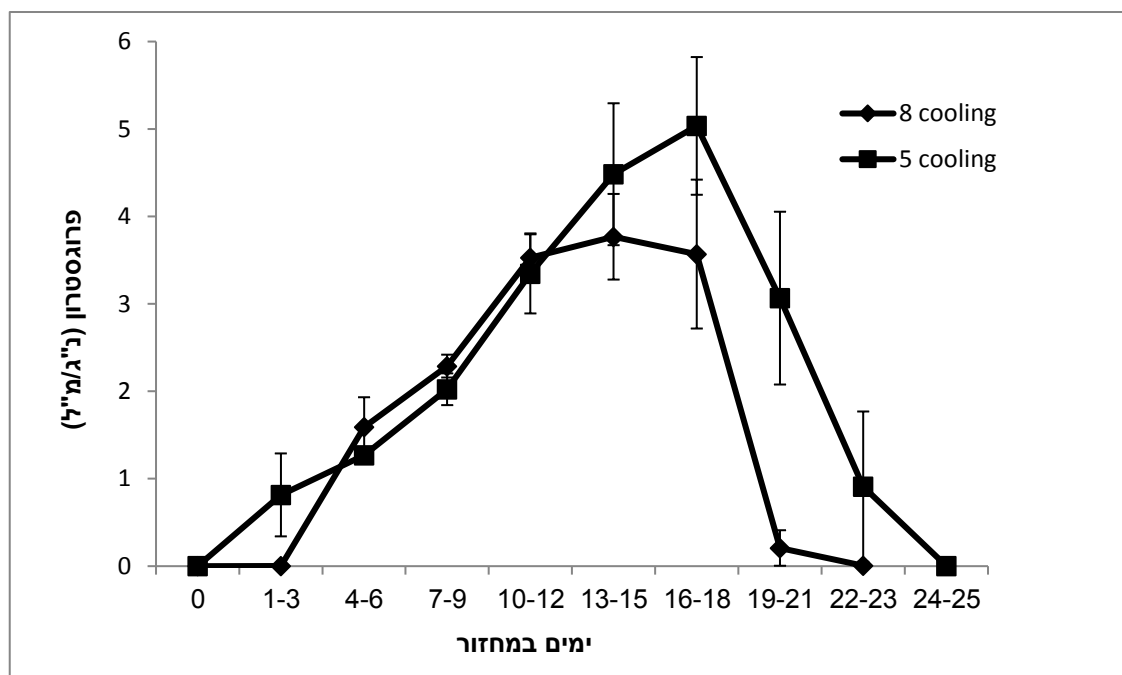
תמונה 4: דפוס הגדילה של הזקיק הדומיננטי מגל זקיקים ראשון ומגל זקיקים שני. אורך הגל הראשון היה קצר יותר בקבוצת 8CS לעומת בקבוצת 5CS, ואילו אורך הגל השני היה זהה בין שתי הקבוצות.



תמונה 5: כימות של זרימת הדם לזקיק הדומיננטי במהלך המחזור המיני. זרימת דם גבוהה יותר לזקיק הדומיננטי נראתה בפרות מקבוצת 8CS, ימים אחדים לפני הביוץ בהשוואה לקבוצת 5CS ($P < 0.05$).

3.4 רמות פרוגסטרון בדם של הפרות בקבוצת 5CS ובקבוצת 8CS

ריכוזי הפרוגסטרון עלו לאורך החצי הראשון של המחזור והגיעו לשיא ביום 13-15 למחזור בקבוצת 8CS וביום 16-18 למחזור בקבוצת 5CS (תמונה 6). באופן מעניין, בקבוצת 5CS נראתה רמה גבוהה יותר, אולם לא באופן מובהק, של פרוגסטרון לאורך המחזור. בהמשך מצאנו שרמות הפרוגסטרון צנחו מוקדם יותר בפרות מקבוצת 8CS לעומת פרות מקבוצת 5CS (תמונה 6).



תמונה 6: רמות פרוגסטרון בדם. אין הבדל מובהק ברמות הפרוגסטרון בין שתי קבוצות הניסוי. הירידה המוקדמת יותר בקרב קבוצת השמונה צינונים היא עקב מחזור מיני קצר יותר בפרות בקבוצה זו.

3.5 ביצועי פוריות

למרות שלא נראו הבדלים מובהקים עקב המספר המצומצם של הפרות שהיו מועמדות להזרעה בתוך קבוצות הניסוי (12 פרות בכל קבוצה), בכל זאת נראה ערך מספרי גבוה יותר של שיעור ההתעברות מהזרעה ראשונה בקבוצת 8CS לעומת הפרות בקבוצת 5CS (6/12, 50%, לעומת 4/12, 33.3% בהתאמה).

במחקר הנוכחי, הדגמנו שלסוג משטר הצינונים יש השפעה על זרימת הדם לזקיק הדומיננטי, תוך שימוש באולטרסאונד בשילוב עם שיטת ה-Color Doppler. השילוב בין שתי השיטות הללו שימש בעבר לגילוי החשיבות של זרימת הדם לזקיק הדומיננטי וההשפעה על התפתחותו [10,17,18] וכן להבנה של השפעת זרימת הדם על התפתחות הגוף הצהוב, תפקודו וניוונו [10,11,19,20]. המחקר הנוכחי תומך בממצאים אלו ויותר מכך אף מציע שבעזרת מדד הדופלר ניתן יהיה לנתר התפתחות של זקיקים וזיהוי של ביוץ בזמן עקת חום, כמו גם לצורך הערכה של יעילות ממשק הצינונים ברפת. הבחירה שלנו לבצע את בדיקות האולטרסאונד בשעות הערב היא מתוך המחשבה שקיים אפקט מצטבר של עומס חום, אשר בא לידי ביטוי מקסימלי בערב לאחר שהפרות חוו עקת חום במשך כל היום.

עקת חום, אפילו לפרק זמן קצר, פוגעת בהרבה תהליכים ותפקודים רבייתיים, לרבות התפתחות זקיקים בשחלה, סטרואידוגנזה, ופגיעה באיכות הביצית [5]. בנוסף, ההשפעה של עקת חום על הזקיק הפרהאבולטורי עלולה לשבש את תהליך הביוץ עצמו ולהביא לחוסר יכולת לתזמן את סימני הייחום יחד עם זמן הביוץ ומועד ההזרעה במהלך חודשי הקיץ [4,5]. עובדה זו יכולה להוות את אחת הסיבות העיקריות לביצועי הפוריות הירודים יחסית בתקופת הקיץ בקרב פרות חלב בארץ [5]. המחקר הנוכחי מציע את מדד הדופלר ככלי מחקרי שיוכל להיות שימושי במחקרים נוספים בתחום בדרך למציאת פתרון לבעיית הפוריות המדוברת. על ידי מדידה של זרימת הדם לשחלה ולזקיק הפרהאבולטורי תוך שימוש במדד הדופלר, ניתן לחזות במדויק יותר את מועד הביוץ הצפוי.

ממצא נוסף שהמחקר שלנו העלה, היה שבפרות שנחשפו לשמונה צינונים ביום, זרימת הדם לזקיק הפרהאבולטורי הייתה גבוהה יותר, גל הזקיקים הראשון היה קצר יותר והמחזור המיני כולו היה קצר יותר באופן מובהק בהשוואה לפרות שצוננו רק חמש פעמים ביום. כבר הוכח בעבר שעקת חום מקושרת להגחה מוקדמת יותר (ב-2-3 ימים) של זקיק דומיננטי מתוך גל הזקיקים השני [21,22] ובהתאם גם "תקופת דומיננטיות" ארוכה יותר [21]. תופעות אלו, של הגחה מוקדמת של זקיק דומיננטי ובכך למעשה "תקופת דומיננטיות" ארוכה יותר, עשויות להוביל בצורה ישירה לביוץ של זקיק מבוגר יותר, כלומר, בייצית מבוגרת יותר ומכאן ירידה בפוריות של פרות החלב המחזורית. בנוסף, נמצא מתאם שלילי בין משך זמן הדומיננטיות של הזקיק הפרהאבולטורי לבין פוריות הפרה [23]. במחקר הנוכחי פרוט מקבוצת השמונה צינונים הראו הגחה מוקדמת יותר של זקיק דומיננטי מגל הזקיקים השני, אך המשך הממוצע של גל הזקיקים השני היה זהה לזה של קבוצת 5CS וזאת משום שהמשך הכולל של המחזור המיני של קבוצת 8CS היה קצר יותר וההבדל באורך המחזור נגרם בשל גל זקיקים ראשון קצר יותר בקבוצת 8CS. אי לכך, לא ניתן לומר שנוצר מצב של "תקופת דומיננטיות" ארוכה תחת משטר של שמונה צינונים ביום, שכן הגל השני הוא הגל הרלוונטי למדדי הפוריות. הממצא שלנו שמשך המחזור המיני

של הפרות בקבוצת 8CS היה קצר יותר, בהחלט נתמך ע"י הנתונים של רמות הפרוגסטרוון בדם שמראים ירידה מוקדמת יותר בפרוגסטרוון בדמן של הפרות מקבוצת 8CS לעומת הפרות בקבוצת 5CS. תופעה זו נראתה כבר בעבר במחקר קודם [24].

בהתבסס על כל הנתונים הללו, אנו משערים שמחזור מיני קצר יותר יכול לתרום בשיפור הפוריות של פרות חלב הנתונות לעקת חום בתקופת הקיץ. כמו כן, בהיבט הממשקי, קיצור אורך המחזור המיני עשוי להוביל בסופו של דבר לקיצור תקופת ימי הריק של הפרה ומכך להתייעלות מסויימת במערך הפוריות ותכנון העדר ברפת הישראלית.

אחת הסיבות האפשריות להופעת מחזור ארוך יותר בפרות מקבוצת 5CS לעומת קבוצת 8CS יכולה להקשר עם מעורבותם של קורטיזול ואדרנוקורטיקורופין (ACTH), הורמונים מתווכי עקה. בעבר כבר הדגינו כי עקת חום הביאה לעליה בריכוזי קורטיזול בדם ולהפרשה מוגברת של ACTH [25,26]. בנוסף, פרות אשר טופלו ב-ACTH, הראו עלייה ברמות קורטיזול בדם וכמו כן בהתארכות משמעותית של השלב הלוטאלי במחזור המיני [27-29]. על כן, פרות בקבוצת 5CS ככל הנראה נחשפו לרמות גבוהות יותר של קורטיזול ו-ACTH בדם שלבסוף הוביל להתארכות של המחזור המיני שלהן.

מחקרים קודמים הראו שעקת חום גורמת לשינויים בזרימת והפצת הדם לאיברים שונים, לרבות אברים של מערכת המין. הדגינו ירידה של כ- 20-30 אחוזים בזרימת הדם לשחלה הן בארנבות והן במטילות שהיו תחת השפעה של עקת חום [30,31]. לכן, סיבה אחרת שיכולה להסביר את ההבדלים באורכי המחזור המיני בין שתי קבוצות הניסוי, היא הירידה בזרימת הדם לשחלה בפרות מקבוצת 5CS שהובילה לירידה בריכוז האסטרדיול $\beta 17$ שמגיע לשחלה בזרם הדם. ואכן, כבר דווח בעבר שריכוז האסטרדיול $\beta 17$ בפלסמה של פרות חלב, נמוך בתקופת הקיץ [32], וישנו מתאם חזק בין ריכוז אסטרדיול $\beta 17$ בדם לבין פעילות ייחומית [33-36]. קיימת האפשרות שבמשטר של חמישה צינונים ביום, זרימת הדם לזיקי פוחתת, ישנה ירידה ברמות האסטרדיול $\beta 17$, דבר שיביא להתארכות של המחזור המיני. כמו כן, יש הטוענים כי לאסטרדיול $\beta 17$ יש תפקיד מפתח בתהליך הניוון של הגוף הצהוב (לוטיאוליזה) [37]. עובדות אלו תומכות בממצאים שלנו שהראו פרק זמן ארוך יותר של נוכחות רמות גבוהות של פרוגסטרוון בדמן של פרות מקבוצת 5CS, דבר המצביע על עיכוב בלוטאוליזה.

במחקרים שנערכו בעבר, הראו כי עקת חום גורמת לירידה בתדירות פעימות השחרור (pulse) של LH ופוגעת בשיא הפולסטיליות שלו כבר בשלבים המוקדמים של המחזור, דבר המשפיע על מידת החשיפה של השחלה ל-LH וגורם להפרעה בהתפתחות הזקי, שיבוש בתהליך הביוץ ובתהליך הניוון של הגוף הצהוב [26] (Gilad et al., 1993 J.Rep Fer). בהמשך הוכח כי להפרשת LH בשלבים הראשונים של המחזור, יש תפקיד חשוב בהיווצרותו

התקינה של הגוף הצהוב המתפקד [38]. תוך התחשבות בעובדות שצוינו עד כה, ניתן לומר כי ישנה האפשרות שפרות מקבוצת 5CS סבלו מעקת חום משמעותית יותר ביחס לקבוצת 8CS, דבר שהוביל לירידה בזרימת הדם אל הזקיך הדומיננטי, שגרמה לירידה ברמות האסטרדיול $\beta 17$ בדם. זו כאמור השפיעה על שחרור LH מההיפופיזה וכך נגרמה הפרעה בהתפתחות הזקיך, הביוץ והניוון של הגוף הצהוב. כל זה יכול להביא לירידה בביצועי הפוריות.

הוספת צינונים לקבוצת 8CS, הביאה לעלייה בזרימת הדם לזקיך הדומיננטי, ואולי גם גרמה לעלייה ברמות האסטרדיול $\beta 17$ ובכך גם לעלייה בריכוז LH ו-GnRH, שבסופו של דבר היטיבה עם התפתחות הזקיך הדומיננטי, הביוץ וניוון הגוף הצהוב. כל אלו יכולים להביא לשיפור בביצועי הפוריות.

לבסוף, במחקר הנוכחי, זוהתה עלייה בשיעור ההתעברות מהזרעה ראשונה בקרב הפרות מקבוצת 8CS בהשוואה לקבוצת 5CS. אבחנה זו מקבלת תימוכין על ידי מחקר אחר שהראה שמשטר צינון אינטנסיבי בעונה החמה הינו הכרחי לשם הצלחה של טיפול הורמונלי [39]. עם זאת, מאחר וביצענו מחקר פיזיולוגי עם מספר מוגבל של פרות, לא ניתן להסיק בצורה חד משמעית לגבי התרומה של שמונה צינונים ביום בהיבט של שיפור בביצועי הפוריות. עריכת ניסוי נוסף עם מספר פרטים גדול יותר הינה חיונית בכדי לקבוע בצורה ברורה יותר כיצד משטר צינונים אינטנסיבי משפיע על ביצועי הפוריות של פרות חלב בתנאים של עקת חום.

תוצאות המחקר שלנו מציגות מתאם ברור בין מספר הצינונים ביום, אורך המחזור המיני וזרימת הדם לשחלה. על בסיס תוצאות אלה, נראה שמספר קטן יותר של צינונים יכול להיות מקושר עם זרימת דם פחותה לזקיך הדומיננטי שלבסוף תוביל להתארכות של המחזור המיני וכך לירידה בביצועי הפוריות.

4.1 מסקנות

תוצאות המחקר שלנו מצביעות על כך שמשטר צינונים אינטנסיבי עשוי לתרום ולו רק קצת, בשיכוך ההשפעות המזיקות של עקת החום על אורך המחזור המיני התקין של הפרה, ככל הנראה על ידי שיפור בזרימת הדם לזקיך הדומיננטי. זרימת דם מוגברת לזקיך הדומיננטי מובילה לקיצור אורך המחזור המיני. בקיצור זה, טמון הפוטנציאל להביא לשיפור בביצועי הפוריות של פרת החלב בעונה החמה. מחקר נוסף דרוש בכדי לקבוע את האפקט של משטרי הצינון השונים על תפקודה של השחלה ועל ביצועי הפוריות של פרות חלב.

תודות

ברצוני להודות למספר גורמים שהיוו מרכיב בלתי נפרד בעבודה זו:

ראשית, תודתי לצוות עובדי רפת מכון וולקני על העזרה, הסבלנות ושיתוף הפעולה במהלך כל ימי הניסוי.

שנית, אודה לפרופסור היינריך בולדווין מאוניברסיטת ציריך, על הלימוד וההכוונה המקצועית בכל הקשור באולטרסאונד בכלל ובטכניקת הדופלר בפרט.

בנוסף, ארצה להודות לד"ר חן הניג שליוותה אותי לכל אורך הניסוי בסבלנות ובמקצועיות רבה והייתה חלק אינטגרלי בלימוד ויישום השיטה של ה Color Doppler ובניסוי כולו.

ולבסוף, אבקש להודות לד"ר ערן גרשון על ההזדמנות והכלים שנתן לי בכדי להוציא את הניסוי לפועל, על הליווי המקצועי והמדעי, על אורך הרוח האופייני ועל השלווה שהכניס איתו אל תוך הניסוי האינטנסיבי הזה.

בהערכה רבה,

ליאור עופר

- [1] Berman A. Increasing heat stress relief produced by coupled coat wetting and forced ventilation. *Journal of dairy science*. 2008;91:4571-8.
- [2] Flamenbaum I, Galon N. Management of heat stress to improve fertility in dairy cows in Israel. *The Journal of reproduction and development*. 2010;56 Suppl:S36-41.
- [3] Galon N, Zeron Y, Ezra E. Factors affecting fertility of dairy cows in Israel. *The Journal of reproduction and development*. 2010;56 Suppl:S8-14.
- [4] Roth Z. Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2008;43 Suppl 2:238-44.
- [5] Wolfenson D, Roth Z, Meidan R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal reproduction science*. 2000;60-61:535-47.
- [6] Herzog K, Brockhan-Ludemann M, Kaske M, Beindorff N, Paul V, Niemann H, et al. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology*. 2010;73:691-7.
- [7] Luttgenau J, Bollwein H. Evaluation of bovine luteal blood flow by using color Doppler ultrasonography. *Reproductive biology*. 2014;14:103-9.
- [8] Acosta TJ, Yoshizawa N, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. *Biology of reproduction*. 2002;66:651-8.
- [9] Herzog K, Bollwein H. Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2007;42 Suppl 2:51-8.
- [10] Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*. 2003;125:759-67.
- [11] Miyamoto A, Shirasuna K, Hayashi KG, Kamada D, Awashima C, Kaneko E, et al. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: New observations using color

ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. *The Journal of reproduction and development*. 2006;52:153-60.

[12] Bollwein H, Meyer HH, Maierl J, Weber F, Baumgartner U, Stolla R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow. *Theriogenology*. 2000;53:1541-52.

[13] Matsui M, Miyamoto A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: practical use for reproductive management in the cow. *Veterinary journal*. 2009;181:232-40.

[14] Jiang JY, Macchiarelli G, Tsang BK, Sato E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction*. 2003;125:211-23.

[15] Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Archives of medical research*. 2001;32:567-75.

[16] Bohmanova J, Misztal I, Cole JB. Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. *Journal of dairy science*. 2007;90:1947-56.

[17] Acosta TJ, Hayashi KG, Matsui M, Miyamoto A. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. *The Journal of reproduction and development*. 2005;51:273-80.

[18] Ginther OJ, Silva LA, Araujo RR, Beg MA. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂α, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biology of reproduction*. 2007;76:506-13.

[19] Miyamoto A, Shirasuna K, Wijayagunawardane MP, Watanabe S, Hayashi M, Yamamoto D, et al. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domestic animal endocrinology*. 2005;29:329-39.

[20] Wiltbank MC, Dysko RC, Gallagher KP, Keyes PL. Relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit corpus luteum. *Journal of reproduction and fertility*. 1988;84:513-20.

[21] Bleach EC, Peiris ID, Grewal TS, Shepherd DA, Savva D. Effect of administration of a novel recombinant bovine interferon on length of oestrous cycle in cattle. *Research in veterinary science*. 1998;64:73-7.

- [22] Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga L, Savio JD, Meidan R, Lew BJ, et al. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biology of reproduction*. 1995;52:1106-13.
- [23] Mihm M, Baguisi A, Boland MP, Roche JF. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *Journal of reproduction and fertility*. 1994;102:123-30.
- [24] Sakatani M, Balboula AZ, Yamanaka K, Takahashi M. Effect of summer heat environment on body temperature, estrous cycles and blood antioxidant levels in Japanese Black cow. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*. 2012;83:394-402.
- [25] Dobson H, Smith RF. What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal reproduction science*. 2000;60-61:743-52.
- [26] Wise ME, Armstrong DV, Huber JT, Hunter R, Wiersma F. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *Journal of dairy science*. 1988;71:2480-5.
- [27] Bage R, Forsberg M, Gustafsson H, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. Effect of ACTH-challenge on progesterone and cortisol levels in ovariectomised repeat breeder heifers. *Animal reproduction science*. 2000;63:65-76.
- [28] Colitti M, Sgorlon S, Stradaioli G, Farinacci M, Gabai G, Stefanon B. Grape polyphenols affect mRNA expression of PGHS-2, TIS11b and FOXO3 in endometrium of heifers under ACTH-induced stress. *Theriogenology*. 2007;68:1022-30.
- [29] Gabai G, Mollo A, Marinelli L, Badan M, Bono G. Endocrine and ovarian responses to prolonged adrenal stimulation at the time of induced corpus luteum regression. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2006;41:485-93.
- [30] Lublin A, Wolfenson D. Lactation and pregnancy effects on blood flow to mammary and reproductive systems in heat-stressed rabbits. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Physiology*. 1996;115:277-85.

- [31] Wolfenson D, Frei YF, Snapir N, Berman A. Heat stress effects on capillary blood flow and its redistribution in the laying hen. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1981;390:86-93.
- [32] Wilson SJ, Marion RS, Spain JN, Spiers DE, Keisler DH, Lucy MC. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *Journal of dairy science*. 1998;81:2124-31.
- [33] Badinga L, Thatcher WW, Diaz T, Drost M, Wolfenson D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*. 1993;39:797-810.
- [34] Fabre-Nys C, Gelez H. Sexual behavior in ewes and other domestic ruminants. *Hormones and behavior*. 2007;52:18-25.
- [35] Lyimo ZC, Nielen M, Ouweltjes W, Kruip TA, van Eerdenburg FJ. Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology*. 2000;53:1783-95.
- [36] Rathbone MJ, Kinder JE, Fike K, Kojima F, Clopton D, Ogle CR, et al. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Advanced drug delivery reviews*. 2001;50:277-320.
- [37] Salfen BE, Cresswell JR, Xu ZZ, Bao B, Garverick HA. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of the bovine oestrous cycle. *Journal of reproduction and fertility*. 1999;115:15-21.
- [38] K.E. Peters EGB, A.S. Cupp, F.N. Kojima, V. Mariscal, T. Sanchez, M.E. Wehrman, H.E. Grotjan, D.L. Hamernik, R.J. Kittok, J.E. Kinder. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. *Biol Reprod*. 1994;51:1248-54.
- [39] Friedman E, Voet H, Reznikov D, Wolfenson D, Roth Z. Hormonal treatment before and after artificial insemination differentially improves fertility in subpopulations of dairy cows during the summer and autumn. *Journal of dairy science*. 2014;97:7465-75.

