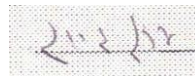


**פיתוח מודל in vitro בפרות לחלב לחקר הבנת תהליכים ופקטורים מעורבים בתהליך  
היצמדות העובר לרחם האם**

מוגש למועצת החלב

**שמות השותפים למחקר**

- ד"ר ערן גרשון PhD; המחלקה לחקר בקר וצאן, מינהל המחקר החקלאי (החוקר הראשי).
- מיכל אלבו MSc; המחלקה לחקר בקר וצאן, מינהל המחקר החקלאי.
- ד"ר טל רז DVM PhD DiplACT; חוקר ביה"ס לרפואה וטרינרית, הפקולטה לחקלאות מזון וסביבה ע"ש סמית', האוניברסיטה העברית בירושלים.



חתימת החוקר הראשי

## תקציר

שיעור ההפריה בפרות לחלב לאחר ההזרעה הינו גבוה, אולם איבודי הריון בשלבים הראשונים, עוד טרם אבחנו בשיטות המקובלות, הינם רבים וגורם לנזקים כלכליים ניכרים. ההערכה היא כי איבוד ההריונות בשלבים המוקדמים עלול להתרחש עקב תהליכים לא תקינים ברמה הפיסיולוגית, אנדוקרינית, פאראקרינית, תאית או מולקולרית בהתפתחות העובר, בהיצמדות העובר לרחם, ברצפטיביות וסלקטיביות האנדומטריום, בקשר שבין העובר לרחם, או בהתפתחות ותפקוד השלייה. תהליכי ההצמדות וההשרשה של העובר לאנדומטריום הינם מורכבים וכוללים תהליכים תאיים ומולקולריים המתוזמנים היטב. עם זאת, ביצוע מחקר של האירועים המולקולריים והמכניזם של תהליכים אלו הינו מאתגר ומורכב, הן בגלל שקשה לבצע מחקרים in-vivo בצורה מעמיקה, והן בגלל שאף על פי שתהליך ההשרשה הינו תהליך אוטונומי שמור - ישנם הבדלים רבים במכניזם של ההשרשה בין בע"ח ממינים שונים בתהליכים אלו (species differences). אומנם קיימים מספר מודלים ומערכות לחקר ההשרשה in-vitro באדם ובעכבר, ואמנם קיים גם מודל in-vivo לחקר השרשת העובר בעכבר, אולם, תהליך השרשת העובר במעלי גירה שונה לחלוטין מזה המתרחש בעכבר ובאדם. בהתאם לזאת, מטרת המחקר היתה לפתח מודל in-vitro של תאי אנדומטריום שיאפשר לחקור את תהליך היצמדות העובר לרחם. לצורך כך, נאספו רחמים של פרות מביית-המטבחיים והועברו למעבדתנו ברחובות. הצלחנו לבנות פרוטוקולים יעילים לאיסוף תאי האנדומטריום, שמירתם בהקפאה, הפשרתם, וגידולם בתרבית. הראנו ע"י צביעות לחלבונים cytokeratin ו-vimentin שאכן מדובר בתאי אנדומטריום, וכן הראנו כי חיוניות התאים נשמרת בתרבית. כמו כן, ע"י שימוש בלנטי-ורוסים להכנסת גן המקודד ל-GFP (green fluorescent protein), הראנו כי באופן עקרוני ניתן לבצע מודיפיקציה גנטית של תאי האנדומטריום הללו, באופן יעיל, דבר שעשוי להיות שימושי ביותר בבחינת תפקודם בתהליכי השרשת העובר במחקרים עתידיים. כמו כן, בוצעו ניסיונות לגידול ספרואידים מקו תאים CT-1, תאים שנוצר מתאי טרופובלאסט של בלסטוציסטים של פרה מיום 11 בהריון, אולם לא הצלחנו לגדל ספרואידים כדי לבחון היצמדותם לתאי האנדומטריום. בנוסף, בוצעו מס' ניסיונות לאיסוף עוברים in-vivo ע"י מתן טיפול ל superovulation לעגלות בוגרות מינית. התגובה השחלתית לטיפול היתה טובה, אולם לא נשטפו עוברים, ולכן לא בחנו את היצמדותם לתרבית האנדומטריום. לסיכום, הצלחנו להעמיד מערכת יעילה של תרבית אנדומטריום של פרה. מצאנו את התנאים המתאימים לצורך איסוף התאים, הקפאתם, הפשרתם, וגידולם, וכן, הראנו כי ניתן לבצע בהם מודיפיקציה גנטית יעילה ע"י וקטור של לנטי-ורוסים. אנו תקווה כי הנתונים והניסיון שהצטברו במהלך המחקר, יאפשרו המשך הפיתוח של מודל להיצמדות העובר לאנדומטריום של פרות בצורה יעילה יותר עם ספרואידים או עוברי in-vivo.

## תיאור הבעיה הנחקרת ופערי הידע בנושא

בפרות לחלב שיעור ההפריה לאחר ההזרעה הינו גבוהה (כ-90%) אולם איבודי הריון בשלבים הראשונים, עוד טרם אבחנון בשיטות המקובלות, הינו גבוה מאוד וגורם לנזקים כלכליים ניכרים. מחקרים הראו כי 20-50% מההריונות בפרות חלב אובדים במהלך החודש הראשון לאחר ההפרייה, ו-10-18% במהלך החודש השני להריון (1-3). ההערכה היא כי איבוד ההריונות בשלבים המוקדמים עלול להתרחש עקב אירועים ותהליכים לא תקינים ברמה הפיסיולוגית, אנדוקרינית, פאראקרינית, תאית או מולקולרית בהתפתחות העובר, בהיצמדות העובר לרחם, ברצפטיביות וסלקטיביות האנדומטריום, בקשר שבין העובר לרחם, או בהתפתחות ותפקוד השלייה.

בשלבי הריון מוקדמים מתרחשים מספר תהליכים קריטיים, הכוללים בין היתר את היווצרות והתמיינות השכבות החוץ עובריות של תאי הטרופובלאסט שייצרו את השלייה ותאי האנדודרם החוץ תאי שייצרו את שק החלמון (4-7). עקב התמיינות הרקמות החוץ עובריות עובר הפרה עובר תהליך התארכות בימים 19-21 של הריון (8, 5, 9), תאי הטרופובלאסט נצמדים לרחם והעובר מתחבר לתאי האנדומטריום של הרחם (8).

הריון תקין מחייב היצמדות של העובר לקיר הרחם בתהליך הקרוי "השרשת העובר". מטרת השרשה לסוגיה, היא לקרב את אספקת הדם של האם לכלי הדם של העובר המתפתח כדי ליעל את מעבר החומרים ביניהם. במקביל, באזור המגע יש עלייה בחדירות כלי הדם (10). על מנת לקבל השרשה מוצלחת, הרחם חייב להיות בשל ומוכן ולספק לעובר מיקרו-סביבה שתתמוך בהיצמדות העובר, גדילתו והתפתחותו. העובר, מהצד שלו, חייב לאותת לרחם שיזהה אותו, תהליך שהכרחי לשמירת ההיריון, מניעת לוטאוליזיס של הגוף הצהוב, השרשת העובר ובהמשך התפתחות השלייה.

תהליך ההצמדות וההשרשה הינו אירוע מורכב מתוזמן והכרחי המאפשר ליונקים להזין ולהגן על העוברים במהלך התפתחותם העוברית ועד ליציאתם לאוויר העולם. בתהליך השרשת העובר מעורבים שני אורגניזמים שונים (אם ועובר) ומספר רב של תאים מסוגים שונים (כגון: תאי הרחם של האם-רירית, סטרומה וכלי דם, תאים מהמערכת האימונית, ותאי הטרופובלאסט של העובר). בנוסף, גנים רבים הן בעובר והן ברחם האם מבקרים את הכנת הרחם להשרשה, ההכרה בין האם לעובר, והשרשת העובר. ביצוע מחקר של האירועים המולקולריים והמכניזם של תהליכים אלו הינו מאתגר ומורכב, הן בגלל שקשה לבצע מחקרים in-vivo בצורה מעמיקה, והן בגלל שאף על פי שתהליך ההשרשה הינו תהליך אוטונומי שמור (11) ישנם הבדלים רבים במכניזם של ההשרשה בין בע"ח ממינים שונים בתהליכים אלו (species differences).

אומנם קיימים מספר מודלים ומערכות לחקר ההשרשה in-vitro באדם ובעכבר (12), ואמנם קיים גם מודל in-vivo לחקר השרשת העובר בעכברים, אולם, תהליך השרשת העובר במעלי גירה שונה לחלוטין מזה המתרחש בעכבר ובאדם (13, 14). בקצרה, בעוד שבכבשים בפרות מתרחשת השרשה מסוג centric, שבה הבלסטוציסט מסוגל לגדול ויוצר שטח מגע מספיק על מנת להתמזג עם אפיתל הלומן מבלי לחדור דרכו, בעכבר, ההשרשה הינה eccentric. בהשרשה זו, אפיתל הלומן יוצר אינווגניציה (מתקפל כלפי פנים) להקפת הטרופובלאסט. לכן המודל העכברי אינו רלוונטי למחקר בהשרשת העובר בחיות משק.

כיום, ישנו מספר מצומצם של מעבדות העוסקות בפיתוח מודלים in-vitro להשרשת העובר במעלי גירה בכלל, ובפרות בפרט (15-18). יש לציין כי בשנים האחרונות מספר מעבדות בעולם מנסות לפתח מודלים להשרשת העובר in-vivo, אולם מודלים אלה מסובכים בגלל מורכבות המערכת. כמו כן, הם יקרים בגלל המחיר של חיות משק ומספר הפריטים שנחוץ לניסוי בודד, יעילותם נמוכה (לרוב בכבשים מקבלים הריונות רק ב-50% מהכבשים ובפרות אף פחות) והם לוקחים זמן רב בגלל אורך ההיריון בחיות משק. בנוסף, כבשים הינם חיות עונתיות הפוריות רק בימי אורך יום קצר ופוריות הפרות מושפעת מעומס חום, כך שמודלים in-vivo מוגבלים בזמן ולא ניתן לעבוד בהם לכל אורך השנה.

### מטרת המחקר

המטרה הראשית של המחקר הנה לפתח מודל ולחקור את תהליך היצמדות העובר לאנדומטריום תקין במודל in-vitro הרלוונטי לפרות.

### תמצית תוכנית המחקר והתוצאות

*יצירת תרבית תאי אנדומטריום ראשונית מרחם של פרות (כשיתוף עם 4 שרון שלזינגר מהמחלקה לבלעת בפקולטה לחקלאות ברחובות ופרופ' נחום שפיגל, מבית הספר לווטרינריה, האוניברסיטה העברית ירושלים):*

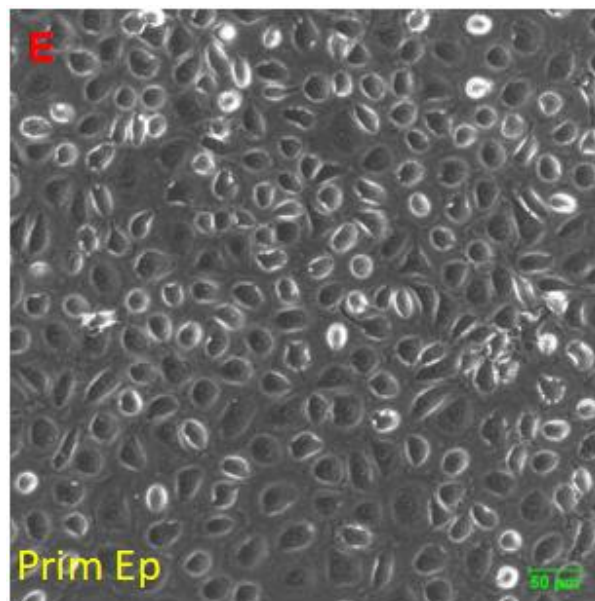
יצורך מטרה זו נאספו רחמים של פרות מבית-המטבחים והועברו למעבדתנו ברחובות. במעבדה, תאי האנדומטריום בודדו על מנת ליצור תרבית תאים ראשונית לפי פרוטוקול המצוי אצלנו במעבדה. בקצרה, התאים הופקו רק מהקרן שקרובה לשחלה שזוהה בה הגוף הצהוב. הקרן נשטפה 3 פעמים ב-50 מ"ל בופר HBSS, בתוספת האנטיביוטיקות פנצילין וסטרפטומיצין. לאחר מכן, באמצעות קטטר הוחדרו לתוך חלל הקרן 50 מ"ל תמיסת טריפסין המהול ב- HBSS בריכוז של 0.3% והקרן הודגרה למשך 60 דקות ב-37°C בטלטול. לאחר ההדגרה, הקרן נחתכה ונפתחה לשניים, ותאי האנדומטריום קולפו ממנה בעזרת סקלפל. תאי האנדומטריום הופרדו משאר קרן הרחם בעזרת סינון דרך cell strainer (100µm). התאים המסוננים סורכזו שלוש פעמים, כל פעם למשך 10 דקות במהירות 100g. לאחר כל סירכוז, הנוזל נשאב ומשקע התאים הורחף במדיום גידול תאים (DMEM שהוספו לו האנטיביוטיקות פנצילין וסטרפטומיצין). על מנת לבדוק את חיות התאים, הם נצבעו ב-trypan blue ונבדקו בעזרת מיקרוסקופ אור. לאחר מכן, התאים נזרעו על גבי צלחת של תרביות תאים ומדיום הגידול שלהם הוחלף כל 12 שעות.

מבית המטבחים נלקחו 3 רחמים מהם הופקו התאים לפי הפרוטוקול המתואר. התאים נזרעו בפלטה של 6 באריות. וטופלו כפי שמתואר בסעיף הקודם. עקבנו אחרי התאים במשך שבוע. כפי שניתן לראות באיור 1, הצלחנו לבדוד את תאי האנדומטריום מרחם הפרות. חלק מהתאים הוקפאו לשמירה לניסויים בהמשך, וחלקם נלקחו לניסויים כפי שמתואר בהמשך.

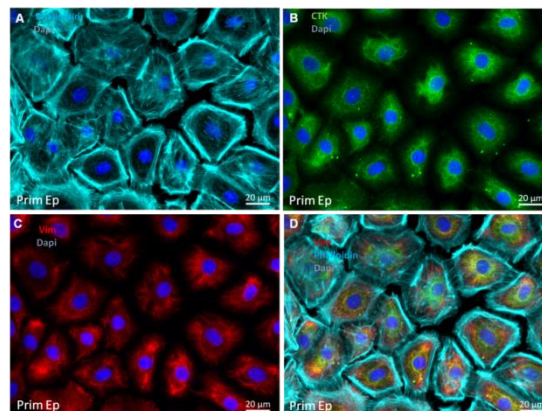
על מנת לוודא שאכן ייצרנו תרביות תאים של האנדומטריום, התאים נזרעו על גבי צלחות ותבוצע צביעה לחלבונים cytokeratin ו-vimentin. שני חלבונים אלה הם סמנים לתאי אפיתל וסטרומה של הרחם. ואכן קיבלנו צביעה ספציפית של התאים עם נוגדנים לחלבונים אלה, דבר המראה שאכן התאים שבודדנו וזרענו הינם תאי האנדומטריום של הרחם (איור 2).

אחת המטרות היא להשתמש במערכת זו לביצוע מניפולציות גנטיות (השתקה או ביטוי יתר של גנים ספציפיים) על תאי הרחם בעזרת לנטיוירוסים כדי לבחון את חשיבותם של גנים מסויימים על תפקוד הרחם, תהליך היצמדות העובר ועוד. על מנת לוודא שאכן תאי האנדומטריום שהפקנו מרחם הפרות ניתנים להדבקה על ידי לנטי-וירוסים, תרביות התאים הודגרו בנוכחות וירוס ביקורת המחדיר לתאים את הגן לביטוי green fluorescent protein (GFP). וירוס זה אינו עושה מניפולציה גנטית אחרת ולא משפיע על תפקוד התאים. כפי שניתן לראות כל התאים שהודגרו עם הוירוס ביטאו GFP (איור 3). בעתיד, נוכל אכן להשתמש במערכת זו לבדיקת חשיבות של גנים מסויימים בפרות לתפקוד הרחם, והיצמדות העובר.

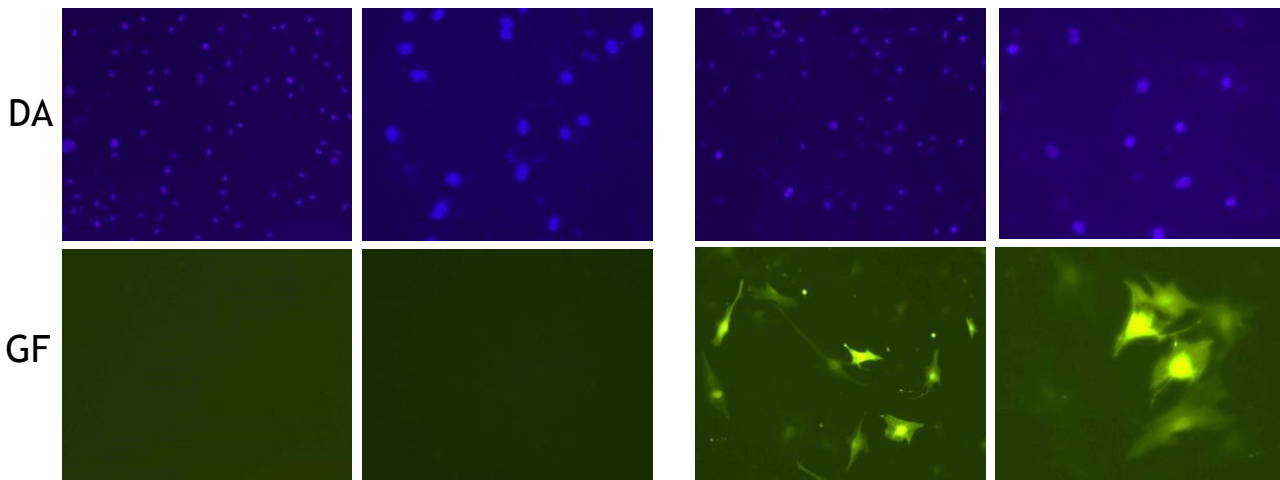
**איור 1: תרבית רחם של תאי אנדומטריום שבודדו מרים של פרה**



**איור 2: ביטוי של cytokeratin ו-vimentin, סמנים לתאי אנדומטריום בתאים שבודדנו בתרבית.**



איור 3: ביטוי GFP בתרבית תאי אנדומטריום לאחר השיפתם לוירוס בעל מטען גנטי לגן זה (ימין) לעומת תאים שלא הודבקו (שמאל). ( DAPI צביעה גרעין להוכחת נוכחות תאים)



לאחר שהקמנו את מערכת תרביות הרחם מפרה והוכחנו שאכן זו תרבית תאי אנדומטריום נקייה, נעשו ניסיונות רבים לייצר ספרואידים שהנם מבנים תלת-מימדיים של תרביות תאים המשמשים כמודל לעובר. השתמשנו בתאי CT-1, קו תאים שנוצר מתאי טרופובלאסט של בלסטוציסטים של פרה מיום 11 להריון. התאים הופשרו ונעשו ניסיונות לגדלם כספרואידים, אך לצערנו נתקלנו בקשיים טכניים בתהליך ההפשרה והגידול. בהתאם, היינו בקשר ישיר עם ד"ר אלן איליי מווירג'יניה טק, ארה"ב שייצר תאים אלה. עם זאת, ולמרות שנבחנו מס' פרוטוקולים, לא הצלחנו לגדל ספרואידים. בהתאם עברנו לאיסוף עוברים in-vivo בשיתוף עם מעבדתו של ד"ר טל רז.

**שטיפת עוברים in-vivo מפרות ויצירת מודל in vitro להיצמדות העובר לתאי האנדומטריום בפרות.**  
 לצורך כך, עוברי פרות נשטפו מרחם פרות ברפת וולקני במהלך חודשי החורף והאביב, בכדי להימנע מההשפעות השליליות של עקת החום. הפרות טופלו בפרוטוקול superovulation המבוסס על טיפולי FSH, והשריית ביוץ ע"י אנלוג של GnRH, כפי שמתואר בטבלה 1, לצורך השראה של ביוצים מרובים. פרוטוקול זה היה בשימוש בפרויקט משותף של שיאון והמעבדה של ד"ר טל רז ונמצא כיעיל יחסית לפרוטוקולים אחרים שנבחנו. לאחר טיפול ה- superovulation, הפרות התורמות הוזרעו עם זרמה קפואה, ושטיפת עוברים בוצעה בהתאם למקובל.

חמש עגלות בגיל 13 חודשים בשני סבבים (שלוש בסבב ראשון ושתיים בסבב שני) סונכרונו בפרוטוקול הסנכרון במהלך שנת 2022. העגלות הוזרעו בזרמה קפואה כפי שמקובל וניסינו לשטוף עוברים. כפי שניתן לראות בטבלה 2 כל העגלות הגיבו לסנכרון ונצפו בהן מספר ביוצים בכל שחלה. אולם, למרות התגובה השחלתית לא התקבלו עוברים מאף עגלה בשני הסבבים. ניסיונות נוספים לא בוצעו, בין היתר בגלל מחסור עולמי בהורמון Porcine.

FSH (Folltropin-V)

**טבלה 1: פרוטוקול השראת ביוצים מרובים (superovulation)**

	AM	PM
<b>0</b>	estrus detection	
<b>10</b>	FSH 3.5ml	FSH 3.5ml
<b>11</b>	FSH 2.5ml	FSH 2.5ml
<b>12</b>	FSH 2ml	FSH 2ml+PG 2ml
<b>13</b>	FSH 1ml+PG 2ml	FSH 1ml
<b>14</b>	GNRH 2ml	AI
<b>15</b>	AI	
<b>21</b>	EF	

**טבלה 2: תגובת העגלות לפרוטוקול השראת ביוצים מרובים (superovulation)**

עגלה 5		עגלה 4		עגלה 3		עגלה 2		עגלה 1		
שמאל	ימין	שמאל	ימין	שמאל	ימין	שמאל	ימין	שמאל	ימין	שחלה
4	5	5	2	1	4	3	6	1	5	מספר גו"צ
2	1	1	1	4	2	ציסטה		5	5	מספר זקיקים

**דיון**

בפרויקט זה ניסינו להקים מערכת in vitro לפתח מודל שיאפשר בעתיד לבחון תהליכים בשלבים הראשוניים של היצמדות העובר ברחם של פרות, כחלק מתהליך ההשרשה. עקרון השיטה הינו יצירת תרבית תאי אנדומטריום ראשונית שמבודדת מרחמים של פרות. על שכבת תאים זו נזרעים ניתן לזרוע ספרואידים, שהנם מבנים תלת מימדים של תאי שלייה המדמים עובר, או לחילופין, עוברים בשלב הבלסטוציסט (שייוצרו in-vivo או in-vitro). כפי שהודגם במחקרים בקודמים בבע"ח אחרים, הספרואידים או העוברים עשויים לעבור היצמדות לתאי האנדומטריום, וניתן לחקור את התהליכים הרלוונטיים בצורה מבוקרת, תוך דגש על הרמה הבסיסית המולקולרית והתאית.

במהלך המחקר הצלחנו להעמיד מערכת של תרבית ראשונית של תאי רחם. הראנו בעזרת צביעות שאכן מדובר בתרבית תאי אנדומטריום. כמו כן, שיפרנו את יעילות הקמת התרבית, הקפאת תאים ושמירתם למחקרים עתידיים. עם זאת, נתקלנו בקשיים בשלב השני של יצירת הספרואידים. הצענו להשתמש בתאי CT-1 שהינם תאי טרופובלאסט של פרה כיוון שזהו קו התאים זה הינו היחיד הקיים לתאי עובר של פרות. אולם, תאים אלה קשים

לגידול ומאד עדינים, ולצערנו לא הצלחנו לגדלם בצורה משביעת רצון שתאפשר ניסויי הצמדה לתרבית האנדומטריום שיצרנו. כיוון שקו תאים זה אינו מסחרי, הוא מוגבל באספקה שלו ולכן החלטנו לא להמשיך עם קו זה ולנסות ולבודד עוברי פרות בשלב הבלסטוציסט למודל ההיצמדות in vitro, כפי שדווח בדוח השנתי שהוגש לקרן המחקר.

בשנה השלישית של המחקר, בצעו ניסיונות לאיסוף עוברים in-vivo. לשם כך, עגלות בוגרות מינית סונכרו וקיבלו טיפול ל superovulation, בהתאם לפרוטוקול הנמצא יעיל יחסית לפרוטוקולים אחרים שנבחנו בפרויקט משותף שבוצע ע"י שיאון והמעבדה של ד"ר טל רז. כפי שהראינו, התגובה השחלתית בכל העגלות שטופלו היתה טובה, אולם לצערנו לא התקבלו עוברים. יתכן כי מדובר בבעיה טכנית בהזרעות, או בתהליך השטיפה. שטיפות נוספות לא בוצעו, בין היתר בגלל מחסור עולמי בהורמון (Folltropin-V) Porcine FSH אולם אנו מנסים להשיגו.

לסיכום, הצלחנו לבנות ולכייל מערכת של תרבית תאי רחם ראשונית שניתן להשתמש בה ככלי מחקרי להבנת תהליכים המתרחשים בתאי הרחם עצמם, ובעתיד, בבחינת התהליכים הרלוונטיים בהצמדות העובר וההשרשה. עם זאת, בשלב זה לא עלה בידינו לבחון תהליכים אלו בתנאי in vitro עקב קשיים בהכנת ספרואידים מקו תאי עובר פרה או מבידוד עוברים in vivo. אנו תקווה כי הנתונים והניסיון שהצטברו במהלך המחקר יאפשרו פיתוח יעיל יותר בעתיד הקרוב. אנו מודים לקרן המחקר על תמיכתם במחקר זה.

#### רשימת ספרות

1. Inskip, E. K., and Dailey, R. A. (2005) Embryonic death in cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* **21**, 437-461
2. Lucy, M. C. (2001) Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *Journal of dairy science* **84**, 1277-1293
3. Santos, J. E., Thatcher, W. W., Chebel, R. C., Cerri, R. L., and Galvao, K. N. (2004) The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal reproduction science* **82-83**, 513-535
4. Bazer FW, G. R., Zavy MT, th E. (1993)ertilization, cleavage, and implantation. *Hafez ESE (ed.) Reproduction in Farm Animals.*, 188-212
5. Betteridge, K. J., and Flechon, J. E. (1988) The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. . *Theriogenology* **29**, 155-187



6. Roberts, R. M. (1991) A role for interferons in early pregnancy. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **13**, 121-126
7. Yang, Q. E., Fields, S. D., Zhang, K., Ozawa, M., Johnson, S. E., and Ealy, A. D. (2011) Fibroblast growth factor 2 promotes primitive endoderm development in bovine blastocyst outgrowths. *Biology of reproduction* **85**, 946-953
8. Degrelle, S. A., Champion, E., Cabau, C., Piumi, F., Reinaud, P., Richard, C., Renard, J. P., and Hue, I. (2005) Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Developmental biology* **288**, 448-460
9. Maddox-Hyttel, P., Alexopoulos, N. I., Vajta, G., Lewis, I., Rogers, P., Cann, L., Callesen, H., Tveden-Nyborg, P., and Trounson, A. (2003) Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. *Reproduction* **125**, 607-623
10. Dey, S. K., Lim, H., Das, S. K., Reese, J., Paria, B. C., Daikoku, T., and Wang, H. (2004) Molecular cues to implantation. *Endocrine reviews* **25**, 341-373
11. Ginsburg, M., Snow, M. H., and McLaren, A. (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* **110**, 521-528
12. Weimar, C. H., Post Uiterweer, E. D., Teklenburg, G., Heijnen, C. J., and Macklon, N. S. (2013) In-vitro model systems for the study of human embryo-endometrium interactions. *Reproductive biomedicine online* **27**, 461-476
13. Lee, K. Y., and DeMayo, F. J. (2004) Animal models of implantation. *Reproduction* **128**, 679-695
14. Wimsatt, W. A. (1975) Some comparative aspects of implantation. *Biology of reproduction* **12**, 1-40
15. Bai, R., Bai, H., Kuse, M., Ideta, A., Aoyagi, Y., Fujiwara, H., Okuda, K., Imakawa, K., and Sakurai, T. (2014) Involvement of VCAM1 in the bovine conceptus adhesion to the uterine endometrium. *Reproduction* **148**, 119-127
16. Farmer, J. L., Burghardt, R. C., Jousan, F. D., Hansen, P. J., Bazer, F. W., and Spencer, T. E. (2008) Galectin 15 (LGALS15) functions in trophectoderm migration

and attachment. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**, 548-560

17. Sakurai, T., Bai, H., Bai, R., Arai, M., Iwazawa, M., Zhang, J., Konno, T., Godkin, J. D., Okuda, K., and Imakawa, K. (2012) Coculture system that mimics in vivo attachment processes in bovine trophoblast cells. *Biology of reproduction* **87**, 60
18. Takahashi, M., Takahashi, M., Hamano, S., Takahashi, H., and Okano, A. (2005) In vitro attachment of bovine hatched blastocysts on fibronectin is mediated by integrin in a RGD dependent manner. *The Journal of reproduction and development* **51**, 47-57