

# השתלות עוברים המיוצרים in vitro ככלי לשיפור פוריות הקיץ הנמוכה של פרות חלב

ס. יבין<sup>1,2</sup>, י. דקל<sup>1</sup>, י. זרון<sup>3</sup>, ח. גסיטוע<sup>1</sup>, ד. ויטסהיים<sup>3</sup>, צ. רוט<sup>2</sup>, א. ערב<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>המחלקה לבקר וגנטיקה, מנהל המחקר החקלאי; <sup>2</sup>המחלקה למדעי בע"ח, הפקולטה לחקלאות; <sup>3</sup>שיאון, המרכז להזרעה מלאכותית

**מבוא** - הירידה בביצועי הפוריות במהלך חמישים השנים האחרונות היא אחת הבעיות העיקריות המעסיקות את משק הבקר לחלב בארץ ובעולם. אחד הגורמים העיקריים לירידה בפוריות הוא רגישות פרת החלב לעומס חום. טיפוח רב שנים לייצור גבוה של חלב ומנגנון פיסיוולוגי מוגבל לפינוי עודפי האנרגיה הנוצרת במהלך ייצור החלב, הופכים את פרת החלב לבעל חיים רגיש במיוחד. שיעור ההתעברות להזרעה בישראל יורד מ-38% בחודשי השנה הקרים ל-11% בחודשי הקיץ. בעבודות קודמות מצאנו שהפוריות בקיץ נפגעת, עקב רגישות הביציות לעליה בטמפרטורות וכי גם בעונת הסתיו שיעור ההתעברות נותר נמוך וזאת למרות העובדה שפרות כבר אינן חשופות לעומס חום (אפקט מתמשך). בפועל, שיעורי התעברות נמוכים למשך מספר חודשים בשנה (יוני-אוקטובר) מהווים פגיעה כלכלית כבדה למשק החלב.

כיום נהוגות במשק החלב הישראלי מספר שיטות צינון להפגת עומס החום מפרת החלב ובכלל זה שימוש אינטנסיבי במערפלים, מאווררים, צינון תכוף של הפרות והגדלת שטחי ההצללה. אומנם שיטות אלו נמצאו יעילות בכל הקשור להגברת ייצור החלב בקיץ אך השפעתם על ביצועי הרבייה פחותה ומוגבלת. בהתאם, קיים צורך בפיתוח גישות חדשות לשיפור הפוריות ושיעור ההתעברות בחודשי הקיץ.

**מטרת המחקר** - בעבודה זו נבחנה אמינותה ותקפותה של גישה חדשה להעלאת שיעור ההתעברות בתקופת הקיץ אשר יישומה יכול להיעשות בשילוב עם מערכות הצינון הקיימות. השיטה מבוססת על ייצור עוברים בתרביית (*in vitro*) בחודשי החורף, הקפאתם והפשרתם להשתלה בעונת הקיץ. הנחת העבודה המרכזית היא שבאמצעות פרוצדורה זאת נמנע את חשיפת תא הביצית והעובר טרם השרשתו לעקת חום. שלבי התפתחות אלו נמצאו בעבודות קודמות כרגישים במיוחד לעומס חום. היות ושלב הבלסטוציסט פחות רגיש, אנו מניחים כי השתלת עוברים בני 7-8 ימים יעלה את שיעור ההתעברות בעונת הקיץ.

**חומרים ושיטות** - המחקר התבסס על איסוף ביציות משחלות שנאספו מבית מטבחים במהלך חודשי החורף. הביציות מוינו לפי איכותן ורק ביציות בעלות איכות טובה (grade-1) השתתפו בניסוי. הביציות עברו הבגרה (IVM) והפריה (IVF) וגודלו בתרביית למשך 7-8 ימים עד שלב הבלסטוציסט ונשמרו בחנקן נוזלי עד להפשרתם. שימור העוברים בין עונות השנה נעשה בשיטת הזיגוג (vitrification) אשר פותחה במעבדתנו. שיטת הזיגוג מתבססת על שינוי המצב הפיזיקלי של החומר ללא יצירת גבישים במקביל לירידה בטמפרטורה. שימוש בשיטה זו מפחית את הפגיעה



בתאי העובר, מאפשר הורדת ריכוז חומרי השימור ומעלה את שיעור ההישרדות והחיות של העוברים. בשיטת הזיגוג- העוברים עברו הדגרה בשלוש תמיסות זיגוג (VS) בריכוזים עולים לפי הפירוט הבא: הדגרה למשך 3 דקות ב- VS 10%, שטיפה ב- VS 50% ומיד לאחריו הועברו לתמיסה הסופית VS 87.5% (VS 100% מכיל 38% אתילן גליקול, 0.5M טריהלז 6% אלבומין מסרום בקר בתמיסת PBS). העוברים נטענו לקשית SOPS בנפח קטן. הקשית נאטמה על ידי מלחם בצידה הצר ובפקק זיהוי מצידה הרחב. מיד לאחר הטענת העוברים ואטימתם הוכנסה הקשית לחנקן נוזלי שקורר לטמפרטורה של  $(-208^{\circ}\text{C})$ . הקשיות הועברו לאחסון במיכל חנקן נוזלי עד להפשרה.

איכות העוברים המופשרים נבחנה in vitro על פי מספר מדדים כגון: אפיון מורפולוגי והתרחבות מחדש (Re-Expansion). קבוצה נוספת של עוברים עברה פיקסציה בפרהפורמאלדהיד 4%, צביעה פלורסנטית מبدלת לסך כל התאים ב- Hoechst 33342 וצביעה נוספת לאחר ראקציית TUNEL המזהה פעילות אפופטוטית (מוות תאים מתוכנן) לקביעת היחס בין התאים האפופטוטיים לכלל תאי העובר. אנאליזה נעשתה במיקרוסקופ פלורסנטי Nikon Eclipse 50i ובתוכנה לעיבוד תמונה. על מנת לבחון את יכולת העוברים לעבור השתלה ולהתפתח ברחם הפרה, קבוצה נוספת של עוברים הופשרה והעוברים האיכותיים הושתלו בפרות אומנות (ביקורת לשיטה) בעונת החורף.

**תוצאות - כ- 60% מסך הבלסטוציסטים שהופשרו עברו התרחבות מחדש (Re-Expansion) לאחר הדגרה של כשעה באינקובטור. בכ 96% מהעוברים לאחר הפשרה נמצאה ה- Zona Pelucida שלמה. שלושים ושמונה עוברים הושארו לגידול באינקובטור לשם אבלואציה; מספר הבלסטומרים הכולל  $89 \pm 11$  בעוברים שהמשיכו להתפתח (Good, N=21) היה גבוה בצורה מובהקת מאלו שמורפולוגית הוגדרו כפחות איכותיים ( $6.8 \pm 9$  (Poor, N=17). אחוז התאים האפופטוטיים בעוברים האיכותיים (Good) היה נמוך בצורה מובהקת  $38\% \pm 4$  בהשוואה לקבוצת העוברים שהוגדרו מורפולוגית כפחות איכותיים ( $74\% \pm 5$  (Poor). סה"כ 55% מהעוברים שהופשרו הוגדרו מורפולוגית כעוברים איכותיים. עשרה עוברים נוספים הושתלו ביום 7 לאחר הביוץ בפרות אומנות כאשר שלוש מהן בימים אלו בהריון מתקדם.**

אחד הגורמים המרכזיים בהצלחתו של משק החלב הינו שיעור התעברות גבוה. בהתאם לכך, עיקר חשיבותו של מחקר זה היא בתרומתו האפשרית להעלאת ביצועי הפוריות של פרת החלב ובשיפור כלכלת משק החלב. שמירה על רצף התעברות גבוה במהלך חודשי הקיץ והסתיו יגרום באופן ישיר לרצף המלטות ולהתפלגות טובה יותר של ייצור החלב במהלך השנה. אחד הגורמים העיקריים לעונתיות בייצור החלב ולמחסור בחלב בקיץ הם שיעורי ההתעברות הנמוכים של הקיץ והסתיו הקודמים. כיום נדרש מאמץ רב על מנת לנייד חלב מהחורף אל הקיץ מהלך שאינו מתאפשר בכל המשקים. בנוסף שיעור התעברות גבוה יצמצם את שיעור היציאה הלא מבוקרת של פרות טובות מהעד. שילוב של ביציות חורף איכותיות, גידול העוברים ושימורם בשיטת הזיגוג תהווה אסטרטגיה חדשה לצמצום השפעת העונה החמה והעלאת פוריות הקיץ במשק החלב בישראל.