

<https://doi.org/10.61308/YGOG1439>

## Ин витро култивиране на говежди ембриони

Цветелина Тодорова

Селскостопанска академия, Институт по животновъдни науки – Костинброд, 2230, България

Кореспондиращ автор: [tzvetelinata@icloud.com](mailto:tzvetelinata@icloud.com)

**Резюме:** Култивирането на ембрионите е най-дългата стъпка по време на процеса на *in vitro* получаване на ембриони. В това проучване беше изследван ефекта от добавянето на 5% FCS или 3 mg/ml BSA в среди за *in vitro* култивиране SOF и KSOM. При добавяне на FCS в среда SOF, се наблюдава по-добър ефект при разделянето ( $P < 0.05$ ) и процентът бластоцисти е по-висок 58,6%. При добавяне на BSA в среда SOF процента на бластоцистите е 40,1% - значително по-нисък. При култивиране в среда KSOM с добавяне на FCS, степента на разделяне беше по-ниска, отколкото при култивирани в SOF+FCS и делът на бластоцистите беше също малко по-нисък. При добавяне към среда KSOM на BSA, процентът на бластоцистите беше почти като в групата на SOF+BSA. В резултат на проведените експерименти беше установено, че добавянето на FCS в средите KSOM и SOF е полезно за *in vitro* култивирането, което води до по-висок процент на бластоцисти.

**Ключови думи:** говеда; SOF; KSOM; BSA; FCS; ембриони

## *In vitro* cultivation of bovine embryos

Tsvetelina Todorova

Agricultural Academy, Institute of Animal Science – Kostinbrod, 2230, Bulgaria

Corresponding author: [tzvetelinata@icloud.com](mailto:tzvetelinata@icloud.com)

**Citation:** Todorova, Ts. (2024). *In vitro* cultivation of bovine embryos. *Bulgarian Journal of Animal Husbandry*, 61(5), 25-29 (Bg).

**Abstract:** Embryo cultivation is the longest step during the *in vitro* embryo production process. In this study, the effect of adding 5% FCS or 3 mg/ml BSA to SOF and KSOM *in vitro* culture media was investigated. When adding FCS in SOF medium, a better effect on separation was observed ( $P < 0.05$ ), and the percentage of blastocysts was higher - 58.6%. When BSA was added to SOF medium, the percentage of blastocysts was 40.1% - significantly lower. When cultured in KSOM medium with the addition of FCS, the division rate was lower than when cultured in SOF+FCS and the proportion of blastocysts was also slightly lower. When BSA was added to the KSOM medium, the percentage of blastocysts was almost as in the SOF+BSA group. At the conclusion of the conducted experiment, the addition of FCS in KSOM and SOF media is beneficial for *in vitro* cultivation, resulting in a higher percentage of blastocysts.

**Keywords:** bovine; SOF; KSOM; BSA; FCS; embryos

## ВЪВЕДЕНИЕ

Успешното развитие на *in vitro* получени (IVP) говежди ембриони зависи от много фактори по време на етапите на *in vitro* матура-

цията (IVM), *in vitro* оплождането (IVF) и *in vitro* култивирането (IVC). Култивирането на ембрионите е най - дългата стъпка по време на процеса на *in vitro* получаване на ембриони. Зиготите, получени след IVF, се подби-

рат въз основа на техните морфологични характеристики като хомогенност на ZP (*zona pellucida*), размер на перивителиново пространство и цитоплазма, и се поставят в среда за култивиране. В *in vitro* получаването на ембриони, средата за култивиране може да повлияе на ембрионалното развитие (Varuselli et al., 2022).

Въпреки факта, че говежди ембриони могат да бъдат култивирани *in vitro* в среда под дефинираните условия, благоприятният ефект на FCS (*фетален телешки серум*) се отразява върху развитието им. Ембриони, култивирани без протеини, показват промени в метаболизма, намалено развитие (Uddin Bhuiyan et al., 2007) и в броя на клетките (Lim et al., 2007) в сравнение с ембриони, култивирани в среди с наличие на протеини.

Източниците на протеини, добавени към средите за култивиране са FCS, BSA (*говежди серумен албумин*), и заменими и незаменими аминокиселини. Тези източници не само осигуряват аминокиселините, необходими за развитието на ембриона, но също така функционират като хелатори, рН буфери, носители на молекули и повишават повърхностното напрежение на хранителната среда (Hasler, 2010).

Изискването за биологични компоненти като FCS или BSA при *in vitro* получените ембриони е предмет на дискусия поради тяхната сложна и недефинирана композиция. За FCS е доказано, че повишава мембранната пропускливост и увеличава броя на ембрионите, които достигат стадий бластоцист, както и дела на излюпените бластоцисти (Aguila et al., 2020). При добавяне към средите за култивиране на BSA беше доказано, че общият брой клетки в периода на бластулация е по-висок.

Количеството и времето на включване на протеинов източник играят важна роля за стимулиране на развитието на ембриона. Например, добавянето на заменими аминокиселини преди осем - клетъчния стадий стимулира дробенето, увеличава броя на клетките и подобрява ранното развитие на ембриона, но добавянето на незаменими аминокиселини по време на този етап не оказва положи-

телно въздействие върху ранното развитие на ембриона (Gardner, 2008). Освен, че съдържат аминокиселини и други протеинови източници, FCS и BSA също осигуряват неопределени фактори на растежа и енергийни източници, които могат да стимулират развитието на ембриона.

Въпреки общата употреба на няколко среди за *in vitro* получаване на ембриони, сравненията между добавките от FCS или BSA в различни среди за *in vitro* култивиране не са били систематично тествани. Днес едни от най - използваните среди за *in vitro* култивиране са SOF (*синтетик овидукт флуид среда за култивиране*), (Cognie et al., 2004), CR1 (*Чарлс Розенкранкс*) (Rosenkrans et al., 1993) и KSOM (*калиев симплекс оптимизирана среда за култивиране*) (Nedambale et al., 2004).

Целта на настоящото проучване е да се оцени ефекта от добавянето на FCS или на BSA в две среди за *in vitro* култивиране на говежди ембриони, а именно SOF и KSOM.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### *Получаване на кумулусно-ооцитните комплекси*

Кумулусно-ооцитните комплекси (КОК) бяха получени от яйчници от заклани крави, транспортирани до лабораторията в рамките на 2 часа. КОК бяха аспирирани от фоликули с размер от 4 до 8 милиметра с помощта на спринцовка и игла с размер 18G. Фоликулярната течност беше събирана в 50 ml конични центрофужни епруветки. След 10 до 15 минути седимента беше изсмукан с помощта на пастърова пипетка и поставен в малка петриева паничка. За *in vitro* матурация бяха отделени само ооцити с компактен кумулус и повече от три слоя клетки, ооплазма с фини и хомогенни гранули, изпълващи вътрешността на *zona pellucida* и кафяв цвят.

### *In vitro* матурация

Кумулусно-ооцитните комплекси с компактен кумулус и хомогенна цитоплазма

бяха поставени в среда за матуриране TCM 199. Преди започване на матурацията, матурационната среда беше еквилибрирана два до три часа при 39°C, 5%CO<sub>2</sub> и максимална влажност на въздуха. За матуриране бяха използвани четири гнездови плаки (Nunc). Във всяко гнездо беше поставена 400 µl среда, покрита с 400 µl течен парафин. В едно гнездо бяха матурирани от 20 до 40 КОК. Матурацията беше извършена при 39°C, 5% CO<sub>2</sub> във въздух с максимална влажност в продължение на 24 часа.

### *In vitro* оплождане

След *in vitro* матурацията КОК бяха оплодени при еднакви условия със замразена-размразена семенна течност от бик. Сперматозоидите в концентрация от 1x10<sup>6</sup> сперматозоиди/ml се прибавяха към микрокапките на IVF средата Tyrode's albumin- lactate- pyruvate (TALP). Оплождането беше извършено при 39°C, 5% CO<sub>2</sub> във въздух с максимална влажност за 18 часа.

### *In vitro* култивиране

След *in vitro* оплождането, кумулулните клетки на предполагаемите зиготи бяха отстранени, промити и култивирани в групи от 10 оплодени яйцеклетки в четири гнездови плаки в 400 µl среда от SOF или KSOM. Към всяка среда беше добавено по 5% FCS или 3 mg/ml BSA. Култивирането бе извършено в инкубатор при 39°C във въздух с 5% CO<sub>2</sub> при максимална влажност. Степента на разделяне беше определена 48 часа след оплождането,

а развитието до стадий бластоцист на осмия ден.

Статистическата обработка е извършена с програмния продукт Microsoft Excel. Бяха изчислени разделените и бластоцистите по отношение на процента ооцити, които бяха оплодени. В рамките на колоните стойностите с различни букви са значително различни ( $P < 0,05$ ).

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Въпреки общата употреба на няколко среди за *in vitro* получаване на ембриони, сравненията между добавки FCS и BSA в различни среди за *in vitro* култивиране не са били систематично тествани. Това проучване беше направено за да се оцени ефекта от добавянето на 5% FCS или 3 mg/ml BSA в две (KSOM и SOF) среди за култивиране на говежди ембриони.

При добавяне на FCS в среда SOF се наблюдава по-добър ефект при разделянето ( $P < 0,05$ ) и процентът бластоцисти е по-висок. При добавяне на BSA в среда SOF, процентът на бластоцистите е значително по-нисък. (Таблица 1)

При култивиране в среда KSOM с добавяне на FCS, степента на разделяне беше по-ниска, отколкото при култивирани в SOF+FCS, и дялът на бластоцистите беше също малко по-нисък, както е показано в Таблица 2. При добавяне към среда KSOM на BSA, процентът на бластоцистите беше почти като в групата на SOF+BSA.

**Таблица 1.** Ефект от добавянето на FCS или BSA в среда SOF върху *in vitro* развитието на говежди ембриони

**Table 1.** Effect of addition of FCS or BSA in SOF medium on *in vitro* development of bovine embryos

Среди Medium	Оплодени ооцити Oocytes Fertilizad (n)	Разделени Cleavage		Бластоцист Blastocysts	
		(n)	(%)	(n)	(%)
SOF+FCS	316	257	(81,3)	185	(58,6) <sup>a</sup>
SOF+BSA	320	254	(79,5)	128	(40,1) <sup>b</sup>

( $P < 0,05$ )

**Таблица 2.** Ефект от добавянето на FCS или BSA в KSOM среда върху *in vitro* развитието на говежди ембриони

**Table 2.** Effect of addition of FCS or BSA in KSOM medium on *in vitro* development of bovine embryos

Среди Medium	Оплодени ооцити Oocytes Fertilizad (n)	Разделени Cleavage		Бластоцист Blastocysts	
		(n)	(%)	(n)	(%)
KSOM+FCS	310	244	78,9	176	(56,7) <sup>a</sup>
KSOM+BSA	306	234	76,4	120	(39,3) <sup>b</sup>

( $P < 0.05$ )

Морули и бластоцисти, развиващи се в SOF и допълнени с BSA, имат голям брой липидни капчици с висока плътност, предполагащи съдържание на ненаситени мастни киселини, докато тези, култивирани в среда без BSA, имат големи везикули, наподобяващи лизозоми, но с по-малко липидни капчици, подобни на *in vivo* развити морули и бластоцисти. Пероксидацията на тези липиди може да причини структурни увреждания, засягащи функцията и пропускливостта на мембраните, особено в митохондриалните мембрани, и да доведат до необратима загуба на функции като дишане, окислително фосфорилиране, йонен транспорт (Soto-Moreno et al., 2021) и променен ембрионален метаболизъм.

Увеличаването на броя на бластоцистите при култивиране в KSOM и SOF, допълнени с 5% FCS може да се дължи на по-слабо натрупване на липидни капчици и по-малко промени в митохондриите. Това води до леки промени в енергийния метаболизъм, осигурявайки по-добро използване на енергията за постигане на по-високи нива на бластоцисти в сравнение с ембриони, култивирани в среда с BSA. Сред провокираните от FCS митохондриални промени, има значително присъствие на голямо количество на незрели митохондрии, подобно на ранни ембрионални етапи. Производството на АТФ и консумацията на глюкоза е ниска при незрелите митохондрии на ранните ембриони.

Друго предположение за това как концентрацията на пируват може да е намалила щетите провокирани от повишената серумна

концентрация в средата SOF в сравнение с KSOM, може да бъде способността на пирувата да инхибира апоптозата, предизвикана от оксидативен стрес. Свободните радикали, произведени от серума в ембрионалната *in vitro* среда намалява броя на клетките и регулира митохондриално-медирана апоптоза. Освен това, серумът индуцира повишаване на апоптозната честота и намаляване на броя на бластоцистните клетки в *in vitro* произведени говежди ембриони. Пируватът действа като антиоксидант в клетките, инхибирайки реактивни кислородни видове (ROS) чрез промени в клетъчното състояние. Доказано е, че пируватът има способността да елиминира водородни пероксиди (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и други ROS (Xie et al., 2017).

## ИЗВОДИ

В резултат на проведените експерименти беше установено, че добавянето на FCS в средите KSOM и SOF е полезно за *in vitro* култивирането, което води до по-висок процент на бластоцисти.

## Съкращения

IVP - *in vitro* получени ембриони

IVM - *in vitro* матурация

IVF - *in vitro* оплождането

IVC - *in vitro* култивирането

ZP – зона пелуцида

FCS - фетален телешки серум

BSA - говежди серумен албумин

SOF - синтетик овидукт флуид среда за култивиране

CR1 - Чарлс Розенкранк

KSOM - калиев симплекс оптимизирана среда за култивиране

КОК - кумулусно-ооцитните комплекси

TSM199 - среда за матуриране

TALP – тироде албумин лактат пируват

АТФ – аденозин три фосфат

ROS - реактивни кислородни видове

## ЛИТЕРАТУРА

- Aguila, L., Treulen, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M. & Smith, L. C. (2020). Animals Oocyte Selection for In Vitro Embryo Production in Bovine Species: Noninvasive Approaches for New Challenges of Oocyte Competence. *Animals*, 10, 2196.
- Baruselli, P. S., Rodrigues, C. A., Ferreira, R. M., Sales, J. N. S., Elliff, F. M., Silva, L. G., Viziack, M. P., Factor, L. & D'Occhio, M. J. (2022). Impact of oocyte donor age and breed on in vitro embryo production in cattle, and relationship of dairy and beef embryo recipients on pregnancy and the subsequent performance of offspring: A review. *Reprod. Fertil. Dev.*, 34, 36.
- Cognie, Y., Poulin, N., Locatelli, Y. & Mermillod, P. (2004). State of the art production, conservation and transfer of in-vitro-produced embryos in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16, 437–445.
- Gardner, D. K. (2008). Dissection of culture media for embryos: The most important and less important components and characteristics, *Reprod. Fertil. Dev.*, 20, 9-18.
- Hasler, J. F. (2010). Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 22, 119-125.
- Lim, K. T, Jang, G., Ko, K. H., Lee, W. W., Park, H. J., Kim, J. J, Lee, S. H., Hwang, W. S., Lee, B. C. & Kang, S. K. (2007). Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology*, 15, 293-302.
- Nedambale, T. L., Dinnyes, A., Groen, W., Dobrinsky, J. R., Tian, X. C. & Yang, X. (2004). Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 62, 437-449.
- Soto-Moreno, E. J., Balboula, A., Spinka, C. & Rivera, R. M. (2021) Serum supplementation during bovine embryo culture affects their development and proliferation through macroautophagy and endoplasmic reticulum stress regulation. *PLoS ONE*, 16.
- Uddin Bhuiyan, M. M., Kang, S. K. & Lee, B. C. (2007) Supplementation of fructose in chemically defined protein-free medium enhances the *in vitro* development of bovine transgenic cloned embryos. *Zygote*, 15, 189–198.
- Rosenkrans, C. F., Zeng, G. Q., McNamara, G. T., Schoff, P. K. & Fist, N. L. (1993). Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.*, 49, 459–462.
- Xie, M., McCoski, S. R., Johnson, S. E., Rhoads, M. L. & Ealy, A. D. (2017) Combinatorial effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor 2 and insulin-like growth factor 1 on trophoblast cell proliferation and embryogenesis in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, 29, 419.

Received: August, 05, 2024; Approved: September, 24, 2024; Published: October, 2024