СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ

ИНСТИТУТ ПО ЖИВОТНОВЪДНИ НАУКИ - КОСТИНБРОД

ЦВЕТЕЛИНА ЯНЧЕВА ТОДОРОВА

ИН ВИТРО МЕТОДИ ЗА АСИСТИРАНА РЕПРОДУКЦИЯ ПРИ СЕЛСКОСТОПАНСКИ ЖИВОТНИ

АВТОРЕФЕРАТ

Костинброд, 2024 г.

СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ

ИНСТИТУТ ПО ЖИВОТНОВЪДНИ НАУКИ - КОСТИНБРОД

ЦВЕТЕЛИНА ЯНЧЕВА ТОДОРОВА

ИН ВИТРО МЕТОДИ ЗА АСИСТИРАНА РЕПРОДУКЦИЯ ПРИ СЕЛСКОСТОПАНСКИ ЖИВОТНИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Област на висшето образование:
6. Аграрни науки и ветеринарна медицина
Професионално направление: 6.3. Животновъдство
Научна специалност: Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването

Научен ръководител: проф. дбн Пламен Тодоров

Костинброд, 2024 г.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита от разширеното заседание на Научния съвет на отдел „Генетика, развъждане и репродукция“ при Институт по животновъдни науки – Костинброд.

Дисертационният труд се състои от 135 страници, 14 таблици, 17 фигури и 23 снимки. В списъка на цитираната литература са посочени 179 литературни източници на латиница.

Номерацията на разделите, таблиците, фигурите и снимките в Автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ……..2024 г. от ……часа в зала ……на ИЖН – Костинброд.

Материалите във връзка със защитата са на разположение при научния секретар на ИЖН – Костинброд и на електронната страница на ИЖН – Костинброд https://www.ias.bg/

Научно жури :

Доц. д-р Таня Иванова - ИЖН, Костинброд
Проф. д-р Стайка Лалева - Земеделски институт, Ст. Загора
Проф. дсн Радослав Славов - Тракийски университет, Ст. Загора
Проф. дсн Лилян Сотиров - Тракийски университет, Ст. Загора
Доц. д-р Станимир Димитров - Тракийски университет, Ст. Загора

Изказвам сърдечна благодарност на научният ми ръководител проф. дбн Пламен Тодоров за оказаната помощ при разработване на дисертационния труд и на моето семейство за безрезервната подкрепа.

СЪКРАЩЕНИЯ

AMH (*anti-müllerian hormone*)	антимюлеров хормон
AAS (*Antibiotic/Antimycotic Solution*)	антимикотичен антибиотик
BSA *(Bovines Serum Albumin)*	говежди серумен албумин
CB	среда за витрифициране
CE	среда за еквилибрация
CPA *(Cryoprotectants)*	криопротектори
CL (*Corpus luteum*)	жълто тяло
CM	среда за манипулиране
CR1 *(Charles Rosenkrans medium)*	среда Чарлс Розенкранц
DMSO *(Dimethyl sulfoxide)*	диметилсулфоксид
ДО	денудирани ооцити
eCG *(electrocardiogram)*	електрокардиограма
EG *(ethylene glycol)*	етилен гликол
FCS *(fetal calf serum)*	фетален телешки серум
FF *(follicular fluid)*	фоликулярна течност
FSH *(follicle - stimulating hormone)*	фоликуло - стимулиращ хормон
GnRH *(Gonadotropin - Releasing - Hormon)*	гонадотропин релизинг хормон
GV *(germinal vesicle)*	германален везикул
GVBD *(germinal vesicle breakdown)*	разпад на германален везикул
IVC (*in vitro* cultation)	*in vitro* култивиране
IVF (*in vitro* fertilization)	*in vitro* оплождане
IVM (*in vitro* maturation)	*in vitro* матуриране (узряване)
IVP (*in vitro* embryo production)	*in vitro* производство на ембриони
КОК	кумулусно-ооцитни комплекси
KSOM (*potassium simplex optimized medium)*	среда за култивиране
LH *(luteinizing hormone)*	лутеинизиращ хормон
MEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*)	среда за култивиране
MI: Metaphase I	метафаза I
MII: Metaphase II	матафаза II
MVC (*minimum volume cooling*)	минимален обем охлаждане
OF *(oviductal fluid)*	овидуктална течност
OPS (*open pulled straw*)	отворена система за замразяване
PVP (*Polyvinilpyrrolidone)*	поливинилпиролидон
PBS (*phosphate - buffered saline)*	фосфатно буфериран физиологичен разтвор
P4 (*progesteron*)	прогестерон
P	разредител
TALP (*Tyrode's albumin lactate pyruvate*)	тирод албумин лактат пируват

1. УВОД

Асистираните репродуктивни технологии (ART) се използват от животновъдите за подобряване на общия генетичен профил на стадата им. Получаването на ембриони от говеда чрез *in vitro* методи има значение не само като основна технология за разработване на нови научни методи (интрацитоплазматични инжекции на сперматозоиди, генен трансфер, клониране чрез нуклеарен трансфер, определяне на пола, предимплантационна диагностика и т.н.), но и при развъдната работа.

Някои комерсиални приложения на технологията за *in vitro* оплождане включват:

1. Подобряване на продуктивните и генетични характеристики на животните,
2. Преодоляване на безплодието на ценни високопродуктивни животни,
3. Производство на трансгенни и клонирани животни,
4. Осигуряват източник на ембриони с определен пол,
5. Производство на близнаци при месодайни говеда
6. На молекулярно ниво техниката се използва за изясняване на събития, свързани със съзряването, оплождането на ооцитите и развитието на ембрионите, тези събития са трудни за изследване при естествени условия в живи животни.

Производството на ембриони *in vitro* е процес в три стъпки, включващ *in vitro* матуриране на ооцити (IVM), *in vitro* оплождане (IVF) и последващо *in vitro* култивиране (IVC) на зиготата до стадий бластоцист. Развитието на ембриона *in vitro* е силно повлияно от събития, настъпващи по време на узряването, оплождането и последващото развитие на оплодените ооцити. Подобряването на ефективността и идентифицирането на източниците на вариации между IVF системите или между

различните лаборатории, са по-важни при рутинно производство на бластоцисти, от индивиди с високи генетични качества.

Ооцитите, които се използват за изследователски цели, обикновено се получават от яйчниците на заклани крави. По отношение на ефективността, приблизително 90% от незрелите ооцити претърпяват ядрено съзряване и преминават от профаза I до метафаза II, като приблизително 80% се подлагат на *in vitro* оплождане и се разделят поне веднъж до двуклетъчен стадий. Въпреки това, повече от половината не успяват да достигнат стадий бластоцист, от 7 до 8 дни по-късно. По този начин, основният спад в развитието се получава по време на последната част от процеса (IVC) и процента на получените бластоцисти рязко намалява. Въпреки това има убедителни доказателства, че качеството на яйцеклетката е основен фактор, определящ получаването на бластоцисти. В много *in vitro* лаборатории, успешно се криоконсервират, чрез витрификация, матурирани говежди ооцити и ембриони.

Въпреки постигнатите до момента резултати, е необходимо да се подобри метода *in vitro* за получаване на ембриони от говеда и да се проучи влиянието на витрификацията на матурирани говежди ооцити и ембриони върху тяхното развитие.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящата дисертационна работа е да се подобри метода за получаване на ембриони от говеда *in vitro* и да се проучи влиянието на криоконсервацията на ооцити и ембриони чрез витрификация върху тяхното развитие.

Така поставената цел предполага реализирането на следните основни **задачи**:

1. Проучване на ефекта от продължителността на транспортиране на яйчниците от кланицата до лабораторията върху качеството и количеството на получените кумулусно - ооцитни комплекси.

2. Установяване на ефекта от метода за получаване на кумулусно - ооцитни комплекси върху *in vitro* получените ембриони.

3. Изследване на ефекта на функционалното състояние на яйчниците, размера и броя на фоликулите върху резултатите от *in vitro* получените ембриони.

4. Проучване на влиянието на продължителността на *in vitro* матурацията на кумулусно - ооцитните комплекси върху резултатите от *in vitro* получените ембриони.

5. Изследване на ефекта от добавянето на 5% или 10% FCS при *in vitro* култивиране със среди CR1, KSOM или SOF.

6. Изследване на ефекта на кумулусните клетки (КК) по време на витрификация на матурирани говежди ооцити.

7. Изследване на ефекта от прилагането на опростен метод за витрификация на ембриони.

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експериментите бяха проведени през периода февруари 2019 г.- март 2023г. в лабораторията по *in vitro* на Besamungsverein, Neustadt a.d.Aisch, Германия, в лабораторията по *in vitro* на Институт по животновъдни науки - Костинброд и в National Institute for Agriculture and Food Research and Technology (INIA, Department of Animal Reproduction), Madrid, Испания.

3.1. МАТЕРИАЛ

3.1.1. Апаратура - стерео микроскоп, микроскоп, CO_2 инкубатор, инкубатор, центрофуга, pH метър, вортекс, електронна везна.

3.1.2. Консумативи - плаки с 4 гнезда "Four Well Multidish", петриеви панички с диаметър 35 mm, петриеви панички с диаметър 92 mm, плаки с 6 гнезда, плаки с 12 гнезда, центрофужни епруветки, 50 ml, стоящи, центрофужни епруветки, 50 ml, бехерови чаши, бутилки с винт, автоматични пипети, серологични пипети.

3.1.3. Химикали - Bovine serum albumin (BSA), BME Essential Amino Acids Solution, Heparin, Hyaluronidase type I-S, MEM Non-essential Amino acids Solution, $MgCl_2$, NaCl 0.9%, Pyruvic acid.

3.1.4. Хормони - Follicle Stimulating Hormone (FSH), Luteinizing Hormon (LH)

3.1.5. Среди за in vitro получаване на ембриони - Всички среди са на Sigma, Germany

3.1.5.1. Phosphate-buffered saline (PBS) **-** 4 l вода бидестилирана, 32g NaCl , 0.8 g KCl , 4.6 g $Na_2HPO_4*2H_2O$, 0.8 g KH_2PO_4, 0.4 g $CaCl_2$, 0.4 g $MgCl_2*6H_2O$, pH 7.3-7.4

3.1.5.2. Modified Parker´s Medium (MPM) Среда за in vitro матуриране на ембриони

3.1.5.3. Sperm TALP **-** Среда за капацитация

3.1.5.4. Fert TALP среда за in vitro опложданe

3.1.5.5. Среди за in vitro култивиране на ембриони – KSOM, CR1, SOF**.** Преди работа, средата заедно с BME, MEM и FCS се еквилибрира при 39°C at 5%CO_2 за два часа.

3.1.5.6. TCM-199 - Готова среда от Sigma, Germany

3.1.6. Среди за витрификация

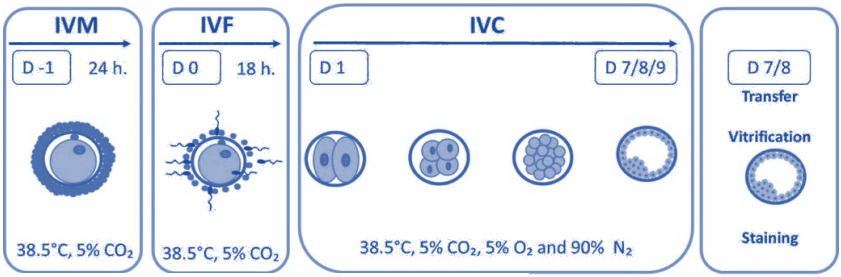
3.2. МЕТОДИ

3.2.1.Транспорт на яйчниците

От кланица бяха взети морфологически интактни яйчници от заклани крави. Транспорта до лабораторията беше извършван в рамките от два до шест часа в разтвор на 0.9% NaCl при температура от 20 – 40º С. В лабораторията яйчниците преди пунктиране или рязане бяха промити с разтвор на PBS.

3.2.2. Получаване на кумулусно - ооцитните комплекси

Получаването на КОК ставаше чрез пункция или чрез нарязване. Всички фоликули с размер от 2 - 8 mm се пунктираха ръчно с помощта на 5 сс спринцовка и игла с размер 18G. Нарязването на яйчниците се извършваше със скалпел. Фоликулярната течност се събираше в 50 ml конични центрофужни епруветки, в които предварително беше поставен около 2 ml MPM (*Modified Parker's Medium*) с добавка от 20% *фетален телешки серум* (FCS). След 10 до 15 минути седимента се изсмукваше с помощта на пастьорова пипетка и се поставяше в малка петриева паничка в която имаше около 3 ml MPM + 20% FCS. Изследването на седимента беше извършвано под стереомикроскоп при увеличение 40х. КОК с повече от три слоя кумулусни клетки и равномерна цитоплазма бяха оставяни за експерименти.



Фигура 1: Модел на получаване на ембриони in vitro

3.2.3. *In vitro* матуриране

Матурацията се извършваше в *Модифициран Паркър медиум* (MPM) с добавка на 20% декомплементиран (56°C, 30 минути) *естрален серум* (ECS) и 2 mg/ml *фоликулостимулиращ хормон* (FSH).

Преди започване на матурацията матурационната среда беше еквилибрирана два до три часа при 39°C, 5%CO_2 и максимална влажност на въздуха. За матуриране бяха използвани четири гнездови плаки (*Four Well Multidish Plates*, Nunc), като във всяко гнездо се поставяха 400 µl среда и се покриваха с 400 µl течен парафин. В едно гнездо се матурираха от 20 до 40 КОК. Матурацията беше извършвана при 39°C, 5% CO_2 във въздух с максимална влажност в продължение на 18 - 24 часа. След приключване на матурацията ооцитите се прехвърляха във фертилизационна среда.

3.2.4. *In vitro* оплождане

3.2.4.1. Среда за капацитация

За капацитацията беше използвана *модифицирана Tyrode's лактат среда* (PARRISH et al.,1985), която по-нататък ще бъде означавана като *сперм - Talp.* Средата се приготвяше като основен разтвор без *фенолрот,* който се съхранява при 4°C и може да се използва в продължение на четири седмици. В деня на експеримента към основния разтвор беше добавяно по 6 mg/ml BSA (*Bovine Serum Albumin*) и *натриев пируват*. Разтвора беше филтриран и pH се нагласяваше на 7,4. Така приготвената капацитационна среда беше инкубирана в термостат при 39°C, 5% CO_2 и максимална влажност на въздуха.

3.2.4.2. Среда за in vitro оплождане

За оплождането беше използвана така наречената

модифицирана Tyrode's лактат среда (BAVISTER, 1995), която по-нататък ще бъде обозначавана като *ферт-Talp*. Тя се приготвяше като основен разтвор, който при съхраняване при 4°C може да се използва до две седмици. В деня на експеримента към основният разтвор се добавяше 6 mg/ml BSA и *натриев пируват*, pH се нагласяше на 7,4 и разтвора се филтрираше. Към него се добавяше стерилно *хепарин, епинефрин и хипотаурин*, които се съхраняваха дълбоко замразени като стерилни разтвори.

По 100 µl от тази среда се накапваше в малки петриеви панички и се покриваше с 3 ml течен парафин. Приготвената среда се еквилибрираше до използването при 39°C, 5% CO_2 във въздух и максимална влажност.

3.2.4.3. Приготвяне на семенната течност

За *in vitro* оплождането се използваше дълбоко замразена в пайети семенна течност от бици. За всеки експеримент се използваха две пайети от по 500 µl. Пайетите се потапяха за 8 секунди в 39°C топла вода и семенната течност се смесваше в предварително затоплена центрофужна епруветка.

В предварително приготвени епруветки (1,8 ml. Nunc) се поставяше 1 ml *Sperm-Talp*, с микропипета внимателно се подслояваше 200 µl семенна течност, епруветките се затваряха и се инкубираха за един час, при 39°C. След инкубацията се отпипетираше 800 µl от горните слоеве, събираха се в центрофужна епруветка и се центрофугираха за 10 минути при 100 x G.

3.2.4.4. Оплождане на *in vitro* матурираните ооцити

Оплождането на матурираните ооцити се извършваше в малки петриеви панички. За целта във всяка паничка се накапваха две капки по 100 µl от фертилизационната среда и се покриваха с 3 ml течен парафин. Матурираните ооцити с експандиран кумулус

се промиваха еднократно във фертилизационна среда и се прехвърляха в капките. В една микрокапка се култивираха от 20 до 40 ооцита.

Сперматозоидите в концентрация от ~10^6 сперматозоиди / ml се прибавяха към микрокапките и се култивираха заедно при 39°C, 5%CO_2 във въздух и максимална влажност. Инкубацията се извършваше за 14 до 24 часа, в зависимост от началото на експеримента.

3.2.5. *In vitro* култивиране

3.2.5.1. Среди и условия за култивиране

След опложданe ооцитите се промиваха веднъж и се култивираха в три вида среди: *Synthetic Oviductal Fluid* **(**SOF), *Charles Rosenkrans 1* (CR1) или *Potassium simplex optimized medium* (KSOM) с добавка на 5 или 10% *fetal calf serum* (FCS) върху монослой от епителни клетки от яйцепровода или монослой от гранулозни клетки. При прехвърлянето в култивационната среда беше използвана тънка пипета за да се отстранят кумулусните клетки.

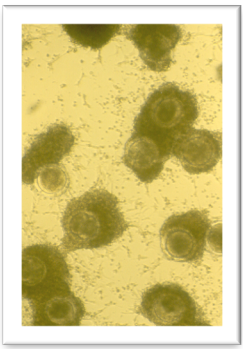
За култивиране бяха използвани четири гнездови плаки (*Four Well Multidish,* Nunc), като във всяко гнездо бяха поставени по 400 µ1 SOF с 5 или 10% неинактивиран FCS. Във всяко гнездо бяха поставени от 20 до 40 ооцита, покрити с 400 µ1 течен парафин и инкубирани при 39°C, 5% CO2 във въздух и максимална влажност.

3.2.5.2.Преценка на ембрионите

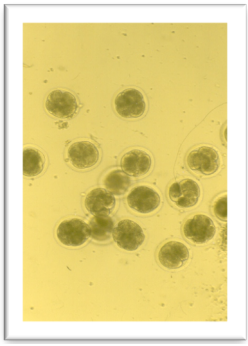
След 44 до 48 часа култивиране ембрионите бяха отделяни внимателно от обкръжаващите ги епителни клетки и бяха преценявани морфологически. Като разделени и следователно оплодени се приемаха ембриони с интактни, равномерно разделени бластомери. След 48 и 140 до 168 часа ембрионите се

преценяваха отново под стереомикроскоп.

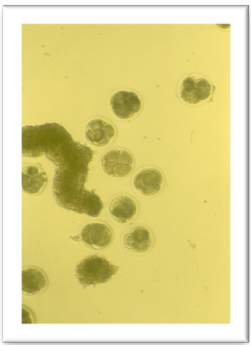
Ембрионите се прехвърляха в среди за култивиране (CR1, SOF или KSOM) върху епителни клетки. Средите се сменяха 24 до 48 часа преди поставянето на ембрионите в тях. Ембрионите се култивираха в тези среди до стадий експандиран бластоцист без смяна на средите.



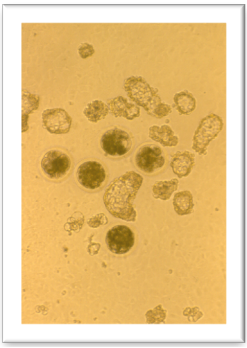
Снимка 1:Зиготи и ембриони на 2-клетъчен стадий (48^{ми} час)



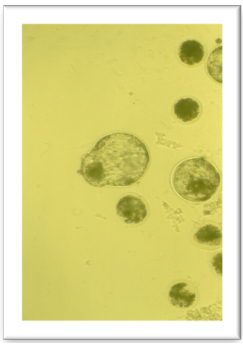
Снимка 2:Ембриони 4-6 клетъчен стадий (72^{ри} час)



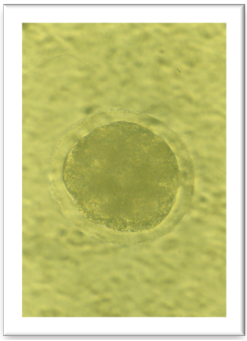
Снимка 3:Ембриони 8-16 клетъчен стадий (96 ^{ти} час), кокултивирани с гранулозни клетки



Снимка 4: Компактиращи ембриони - морули (120 час, монослой от епителни клетки)



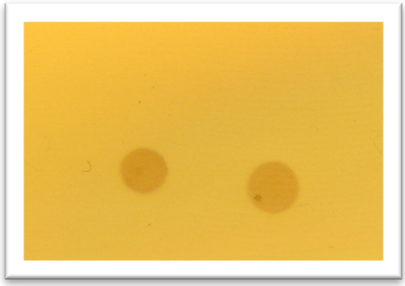
Снимка 5: Експандирани бластоцисти и излюпващ се бластоцист (8-9 ден)



Снимка 6: Компактна морула върху монослой от епителни клетки

Оцветяване на КОК

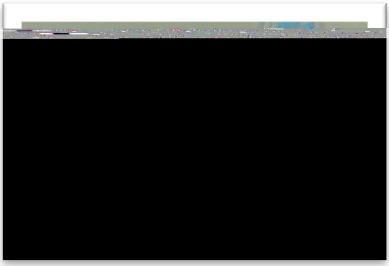
След 22-часова *in vitro* матурация, КОК са напълно оголени с 0,3% хиалуронидаза в DPBS без Ca-Mg и оцветени чрез ацето - орцеинов метод за изследване на мейотичния статус на ооцита. Ооцитите се оцветяваха с 1% орцеин в 45% оцетна киселина в продължение на 20 минути



Снимка 7: Яйцеклетки в MII оцветени с ацето-орцеин

Снимка 8: Яйцеклетки в MII оцветени с ацето-орцеин

Освен чрез ацето – орцеинов метод ооцитите бяха оцветявани и с Hoechst 33342, за етапа на нуклеарна матурация като *германинален везикул* (GV), разпадане на германинален везикул, *метафаза I* (MI) или *метафаза II* (MII). За анализ на данните, ооцитите в стадий GV се считат за незрели, а в MII ооцитите се считат за напълно зрели, като разпадане на германинален везикул и MI етапите се обединяват и се определят като междинни етапи.



Снимка 9: Яйцеклетки в MII оцветени с Hoechst 33342 (x200)

Снимка 10: Яйцеклетки в MII оцветени с Hoechst 33342 (x200)

3.2.6.Витрификация

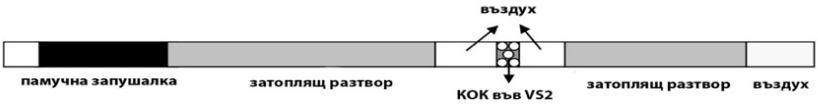
3.2.6.1. Процедури за витрификация и затопляне

3.2.6.1.1. Подготовка на средите, модифицирано по Kuwayama et al. 2007

In vitro матурираните говежди ооцити се витрифицираха в среда за манипулиране (CM) TCM199 с добавен 20% фетален телешки серум (FCS). Тази среда е базова за приготвяне на всички среди за витрифициране. Етапите на витрификация и размразяване бяха извършвани при 38, 5 °C, върху затоплена повърхност.

Витрификацията беше извършвана на два етапа: еквилибриране и витрификация. Ооцитите бяха еквилибрирани чрез прехвърлянето им последователно в три капки от 75 μl среда за еквилибриране (CE), съставена от среда за манипулиране с добавени 7,5% етиленгликол (EG) и 7,5% диметил - сулфоксид (DMSO). След като ооцитите възвърнаха първоначалния си обем, те бяха прехвърляни в четири последователни 50 μl капки от среда за витрифициране (CB), съставена от средата за манипулиране (CM) с добавени 15% EG, 15% DMSO и 0, 5 M захароза. Ооцитите бяха поставени в средата за еквилибриране за 10–15 минути и в средата за витрификация за 45 – 60 секунди. След замразяване и престояване една седмица в течен азот (LN2) ооцитите бяха размразени чрез прехвърлянето им в затопляща среда, съставена от среда за манипулиране с 1 M захароза. Това беше последвано от тристепенно промиване на хиперосмоларната захароза, намалена от 1 M на 0, 5 M (първо промиване за 3 минути), 0, 25 M (второ промиване за 5 минути) и 0 M в среда за манипулиране (трето промиване за 5 минути). Ооцитите бяха промивани в среда за манипулиране три пъти и след това бяха инкубирани в среда за зреене в продължение на 2 часа, за да им се даде възможност да се възстановят.

Най-малко ден преди витрифицирането бяха приготвяни основните среди:
Среда за еквилибриране (СЕ), среда за витрифициране (СВ), разредител (Р) и среда за манипулиране (СМ).

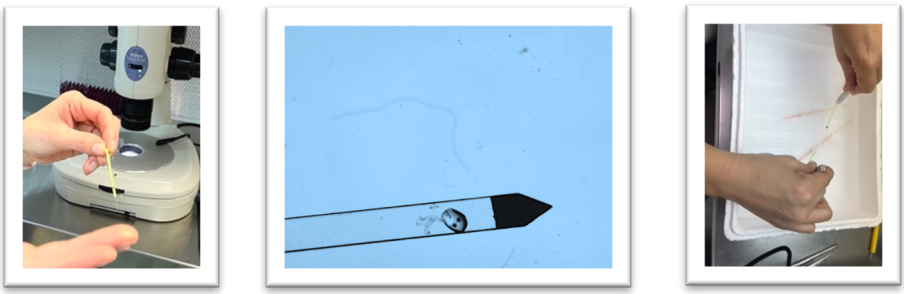


Фигура 2: Зареждане на криоустройство Пайета от 0,25 ml за витрификация на кумулусно - ооцитни комплекси (КОК).

Най-често използваните криоустройства за витрификация са пайета и криотоп. Криоустройството Криотоп е използвано при експериментите за витрификация на матурирани говежди ооцити:



Фигура 3 : Зареждане на криоустройство Криотоп за витрификация на кумулусно - ооцитни комплекси



Снимка 11, 12, 13: Зареждане на. криоустройство Криотоп

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Представените резултати в дисертационния труд условно могат да се разделят на две групи:

Първата група експерименти обхваща получаването на кумулусно ооцитните комплекси, in vitro матурацията, in vitro оплождането и in vitro култивирането.

4.1. Ефект от продължителността на времето за транспортиране на яйчниците от кланицата до лабораторията, върху качеството и количеството на получените кумулусно - ооцитни комплекси и ефект на температурата на средата за транспортиране

Беше проведен експеримент за проследяване на ефекта от продължителността на времето за транспортиране на яйчниците от кланицата до лабораторията върху качеството и количеството на получените кумулусно - ооцитни комплекси. Яйчниците, които бяха получени от заклани крави бяха разделени на три групи, според продължителността на времето за транспортиране, съответно 2, 4 и 6 часа. Във всяка група имаше по десет яйчника поставени в разтвор на 0.9% NaCl при температура от 20ºC. При този експеримент КОК бяха получавани само чрез нарязване на яйчниците. Направена беше преценка по критериите за класифициране на кумулусно - ооцитните комплекси.

На Фигура 4 са сравнени резултатите от продължителността на времето на транспортиране на яйчниците от кланицата до лабораторията. С много добро качество бяха КОК транспортирани за 2 часа до лабораторията.

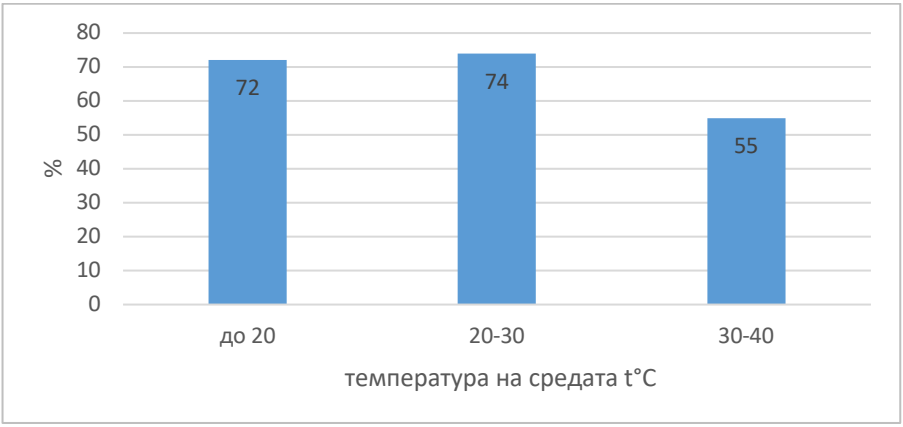


Фигура 4: Ефект от продължителността на времето на транспортиране на яйчниците от кланицата до лабораторията

Според SALEH et al., (2017), средното количество ооцити получено от яйчници транспортирани за 6 часа е 15, 9%, а от яйчници транспортирани за 9 часа процента на получените ооцити с добро качество е 17, 1%. Според SONOWAL et al. (2017) ооцитите с повече от 4 - 5 слоя кумулусни клетки, обграждащи *zona pellucida* и с хомогенна цитоплазма се считат за ооцити с добро качество и при тях транспортирането е до 6 часа. NARITA et al.,(2005) съобщават, че съхранението на яйчниците за 5 - 8 часа при температура 37 - 39°C намалява скоростта на матурация на ооцитите и влияе неблагоприятно на тяхното развитие до стадий бластоцист, след *in vitro* оплождане. За разлика от тях, ABE and SHIOYA, (1996) съобщават, че съхранението на яйчниците в продължение на 8 часа при температура 20 - 25°C не засяга нито скоростта на матурация на ооцитите, нито развитието до стадий бластоцист.

Освен продължителността на транспортиране на яйчниците от кланицата до лабораторията, беше изследвано и влиянието на температурата на средата при транспортиране върху качеството на КОК. При продължителност на транспортиране на яйчниците от

кланицата до лабораторията за 2 часа бяха тествани три температури на средата. Всяка промяна в температурата влияе на качеството на КОК, като при температура до 20°С качеството е много добро. При температура на средата между 20 и 30 градуса и качеството и количеството са добри, а при температура от 30 и 40 градуса качеството е задоволително.



Фигура 5: Ефект на температурата на средата за транспортиране на яйчниците от кланицата до лабораторията върху качеството на получените ооцити

4.2. Ефект на метода за получаване на КОК върху количеството им

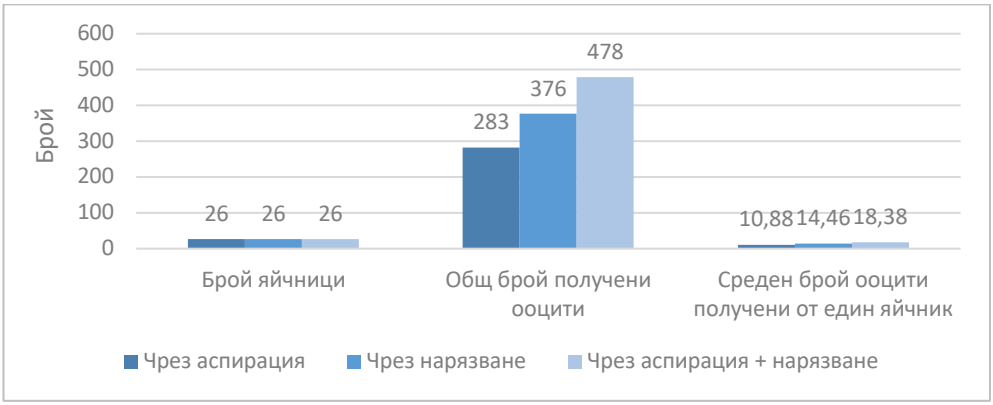
В проведеният експеримент за установяване на ефекта на метода за получаване на кумулусно - ооцитни комплекси върху количеството им, бяха сравнени резултатите от получаване на ооцити чрез пунктиране, чрез нарязване и комбиниран метод чрез пунктиране и след това нарязване на яйчника. Общият брой на КОК получени от един яйчник чрез аспирация беше средно 10,88 ооцита, 14,46 броя при нарязване и 18,38 при смесен метод (аспирация плюс нарязване) (Фигура 6).

При смесеният метод (аспирация плюс нарязване) се получават достоверно повече КОК ($P<0,05$), в сравнение само с метода на аспирация или само чрез нарязване, но не е установен

значителен ефект между нарязване и аспирация плюс нарязване (P>0,05). Това вероятно се дължи на факта, че при разрязването се достига до фоликули, които са разположени дълбоко в кортекса и не са видими.

Недостатъкът на този метод е, че в средата за манипулация се получава по-голямо количество кръв и клетки и се затруднява процеса на изолиране на качествените ооцити. Освен това вероятността за микотична контаминация е по-голяма. Според нашите изследвания методът на нарязване дава по-голям брой КОК с умерено качество и повече ембриони, докато метода на аспирация дава умерен брой КОК с повишено качество и добро количество ембриони. В това изследване не беше включено функционалното състояние на яйчниците и естралния цикъл на кравите.

Методите за получаване на ооцитите не повлияват на последващо ембрионално развитие след *in vitro* опложданe в MII стадий (WANG et al., 2007).



Фигура 6: Ефект на метода за получаване на КОК върху количеството на получените ооцити

4.3. Ефект на функционалното състояние на яйчниците и различния размер на фоликула върху потенциала за развитие на говежди ооцити.

В експериментът беше изследван ефекта на жълтото тяло и различния размер на фоликула върху потенциала за развитие на говежди ооцити.

Яйчниците бяха получени от крави с клинично нормален репродуктивен тракт след клане. За да оценим потенциала за развитие на ооцитите, те бяха разделени на три групи: *с жълто тяло* (*corpus luteum* CL+), без *жълтото тяло* (CL-) и контролни яйчници. След класифициране на яйчниците въз основа на наличие или отсъствие на CL, фоликулите бяха разделени в три групи според техните диаметри - малки (МФ, 3–6 mm), средни (СФ, 6–9 mm) и големи (ГФ, 9–15 mm). В експеримента бяха включени, 1197 ооцита, разпределени в 7 експериментални групи въз основа на техния произход (*с жълто тяло* - МФ, *с жълто тяло* - СФ, *с жълто тяло* - ГФ и *без жълто тяло* - МФ, *без жълто тяло* - СФ, *без жълто тяло* - ГФ и контрола), като техният потенциал за развитие беше оценен след *in vitro* процеса. При контролата ооцитите бяха без селекция въз основа на наличие или отсъствие на CL и размер на фоликула.

В Таблица 1 са показани потенциала за развитие на ооцитите, получени от яйчници с *жълто тяло* или без *жълто тяло* с различен размер на фоликула. В този експеримент размерът на фоликула имаше определен ефект върху развитието на ооцитите и се счита, че ооцити от малки фоликули имат най-нисък процент на развитие сред групите.

Таблица 1: Развитие на говежди ооцити, получени от яйчници с фоликули с различни размери, с жълто тяло (CL) или без жълто тяло CL

Групи	Подгрупи	Брой ооцити (n)	Разделени (n %)	Бластоцисти от общия брой ооцити (n %)	Бластоцисти от разделените (n %)
Ефект на жълтото тяло	Контрола	226	186 82,5	83 36,9	77 41,2
	без жълто тяло	438	361 82.5	172 39.4	166 46.1
	с жълто тяло	483	354 73.3	157 32.5	137 38.6
Ефект на големината на фоликула	Контрола	226	186 82.5	83 36.9	77 41.2
	Малки фоликули 3 - 6 mm	371	290 78.2	118 31.8	102 35.2
	Средни фоликули 6 – 9 mm	425	366 86.1	161 37.9	149 40.7
	Голми фоликули 9 –15 mm	125	102 81.2	53 42.1	48 47.5

(p <0.001)

Съществува обаче хетерогенност в компетентността за развитие на ооцити, произхождащи от различен размер на фоликулите на яйчниците с CL. Процентът на бластоцистите, получени от яйчници *без* CL и *средни фоликули* и *без* CL и *големи фоликули* е по-голям (P<0.001) от този на яйчници с CL и *малки фоликули* и яйчници с CL и *средни фоликули*. Въпреки това, няма значителни разлики в процентите на образуване на бластоцисти между *контролната група*, без CL и *малки фоликули* и с CL и *големи фоликули*.

В Таблица 2 е показано дали наличието или отсъствието на *жълто тяло,* чрез взаимодействията с размера на фоликула, има ефект върху развитието до бластоцист (P<0,001).

Таблица 2: Ефект върху развитието до бластоцисти при наличие или отсъствие на жълто тяло чрез взаимодействията с размера на фоликула

Групи	Подгрупи	Брой ооцити (n)	Разделени (n %)		Бластоцисти от общия брой ооцити (n %)		Бластоцисти от разделените (n %)	
Ефект на жълтото тяло и големината на фоликула	Контрола	226	186	82.5	83	36.9	77	41.2
	без CL МФ (3 - 6 mm)	185	150	81.3	67	36.2^{ab}	59	39.1^{ab}
	без CL СФ (6 – 9 mm)	202	174	85.9	77	38.1^{a}	75	42.9^{a}
	без CL ГФ (9 –15 mm)	61	51	83.8	24	39.8^{a}	23	45.9^{a}
	с CL МФ (3 - 6 mm)	186	141	75.8	57	30.8^{c}	51	36.2^{b}
	с CL СФ (6 – 9 mm)	223	183	82.1	75	33.5^{bc}	70	38.4^{b}
	с CL ГФ (9 –15 mm)	64	49	76.7	22	34.9^{b}	20	40.6^{ab}

***CL** - Corpus luteum*
***a, b, c** - Стойностите в колоната с различни горни индекси се различават значително ($p < 0.001$). (Student's t-тест).*
***без CL** – без жълто тяло, **с CL** – с жълто тяло, **МФ** – малки фоликули, **СФ** – средни фоликули, **ГФ** – големи фоликули*

В този експеримент, присъствието или отсъствието на CL чрез взаимодействията с размера на фоликула не е имало никакъв ефект върху степента на експанзия и разделяне между групите.

Друг източник на хетерогенност в компетентността за развитие на ооцитите е размера на фоликула, от който се получава ооцита (BEKER-VAN WOUDENBERG, A.R. et al., 2010). Ето защо, настоящото проучване беше проведено, за да се оцени потенциалът за развитие на ооцити, получени от яйчници с CL и *без* CL и различни размери на фоликулите. Резултатите показаха, че наличието или отсъствието на CL чрез отчитане на взаимодействията с размера на фоликула има ефект върху

процента на бластоцистите получени от ооцитите. Процентът на бластоцисти получени от ооцити от среден и голям фоликул на яйчници, които нямат CL е по-голям от този на ооцити, получени от малък и среден фоликул на яйчници, имащи CL. Освен това, нашите резултати показаха, че има значителна разлика в процента на развитие до бластоцисти между ооцитите, получени от фоликули със същия размер от яйчниците, които нямат CL и яйчниците с *CL*. Беше доказано, че процентите на образуване на бластоцисти от ооцити, получени от малък и среден фоликул на яйчници, с CL са по-ниски от тези на яйчници, които са *без* CL.

В настоящото проучване имаше хомогенност в компетентността за развитие на ооцити, произхождащи от малки, средни и големи размери на фоликула на яйчници, които са без жълто тяло. Размерът на фоликула има положителен ефект върху компетентността за развитие на ооцитите, като процента на получените бластоцисти от яйчници с CL и големи фоликули е по-голям, от този на получени от яйчници *с CL* и малки фоликули. При говеда, кози и овце ооцитите, получени от големи фоликули, са по-компетентни по отношение на *in vitro* ембриналното развитие, отколкото ооцитите получени от *малки фоликули* (BEKER van WOUDENBERG et al., 2010). Нашите резултати потвърдиха тези наблюдения, при които се смята, че ооцитите от малки фоликули имат най-нисък процент на развитие в групите.

Освен това, в настоящото изследване всички ооцити получени от яйчници *с CL* не са повлияни от отрицателните ефекти на жълтото тяло и е налице хетерогенност в развитието на ооцитите поради ефекта на размера на фоликула. Когато диаметърът на фоликула се увеличи до приблизително 2 mm (малки фоликули) и ооцитите се увеличат в диаметър от 110 до 120 μm, се придобива компетентност за развитие и по-голямата част от ооцитите след оплождането продължават своето ембрионално развитие. Следователно може да се предположи, че жълтото тяло

оказва отрицателно въздействие най-вече върху растежа на малки растящи фоликули, отколкото върху големи растящи фоликули.

От друга страна, концентрацията на различни биохимични съставки на фоликулярната течност може да се промени с напредване на фоликулярното развитие и наличието или отсъствието на CL. Фоликулярната течност от фоликули в говежди яйчници без CL е по-подходяща за използване при матуриране на ооцити, отколкото тази от яйчници с CL, тъй като техните данни показват, че по време на аспирация, съдържанието на метаболити във фоликулярната течност от яйчниците, които не носят CL, е по-високо в сравнение с тези на яйчниците, носещи CL. Тези различни биохимични съставки на фоликулярната течност могат да са отговорни за по-високи проценти на разделяне и достигане до бластоцисти от яйчници без CL, отколкото тези от яйчници с CL. Освен това съдържанието на глюкоза във фоликулярната течност от големите фоликули е значително по-голямо в сравнение с тази от малките и средни фоликули в яйчниците без CL.

Следователно наличието или отсъствието на CL чрез взаимодействия с размера на фоликулите има ефект върху средата на ооцитите и тяхната компетентност за развитие, както се наблюдава в нашето проучване. След образуването на CL се образуват нови кръвоносни съдове и така то ще получи по голям обем от кръвния поток в сравнение с другите тъкани в яйчника. Наистина, увеличаването на притока на кръв към фоликулните клетки в яйчниците без CL води до увеличено снабдяване с гонадотропини и други системни биохимикали и хормонални фактори, необходими за развитието на фоликулите. Ооцитите, произхождащи от големи фоликули, не са повлияни от отрицателните ефекти на CL толкова, колкото тези, произхождащи от малки и средни фоликули. Всъщност събирането на яйчници, категоризирани въз основа на наличието

или отсъствието на CL и различни размери на фоликулите, би било полезно при търговското производство на говежди лабораторни ембриони.

Не само размерът на фоликула, но и диаметърът на извлечения ооцит също е положително свързан с повишеното качество и *in vitro* компетентността за развитие на ооцитите. Ооцитите, получени от по-големи фоликули, имат по-голям диаметър. По същия начин, *in vitro* получени ембриони от ооцити, получени от по-малки фоликули (<6 mm), имат по-ниска компетентност за развитие поради непълно ядрено и цитоплазмено съзряване, по-голяма степен на атрезия и по-висока степен на аномалии при оплождане, липса на производство на важни протеини, които са необходими за компетентност на растеж *in vitro* (SAAD et al., 2019). Следователно, е правдоподобно да се предположи, че за добро качество на ооцитите и по-добър резултат от *in vitro,* трябва да бъдат аспирирани фоликули ≥ 6 mm.

Ооцитите, получени от < 6 mm фоликули, имат недостатъчен синтез на майчината иРНК, която е необходима за компактирането и диференциацията на ембрионите в напреднали стадии и липса на производство на основни протеини, които са необходими за *in vitro* растежна компетентност (SHABANKAREH et al., 2015). Според някои автори средният брой ооцити получени от яйчници с големина на фоликула ≥6 mm е до 3 пъти по-висок от този на <6 mm фоликули.

Следователно е правдоподобно да се предположи, че за добро качество на ооцитите и по-добър резултат от *in vitro* получени ембриони, трябва да се аспирират фоликули с размери по-големи от 6 mm.

4.4. Влияние на продължителноста на матурацията върху деленето и по-нататъшното развитие на *in vitro* получени ембриони

Беше проведен експеримент за установяване на влиянието на продължителността на матурацията върху деленето и по-нататъшното развитие на *in vitro* получени ембриони. Получените КОК бяха разделени в пет групи. Матурацията беше извършена в среда MPM с добавка на 20% декомплементиран (56°C, 30 минути) естрален серум (ECS) и 2 mg/ml фоликулостимулиращ хормон (FSH). Матурацията беше прекратявана по различно време през два часа (18, 20, 22, 24 и 26 часа) от началото ѝ.

След това матурираните ооцити бяха оплодени в TALP среда и култивирани до стадий бластоцист. Получените резултати са представени в таблица 3:

Таблица 3: Ефект от продължителността на in vitro матурацията върху развитието на говежди ооцити

Продължителност на матурация часове	Брой ооцити n	Разделени n	Разделени %	Морула n	Морула %	Бластоцист n	Бластоцист %
18	247	119	48.2[a]	60	50.5	31	26.1[c]
20	270	153	56.7	76	49.7	44	28.8[b]
22	225	143	63.6	74	51.8[a]	41	28.7[b]
24	240	145	60.4[a]	73	50.4[a]	37	25.5[a]
26	269	138	51.3[c]	49	35.5	31	22.4

P <0,05

Най-висока степен на делене имаше при продължителност на матурацията от 22 часа – 63.6%, а най-ниска при матурация от 18 часа – 48.2%. Най-висок процент в стадий морула бяха достигнали 51.8% от разделените ооцити матурирани в продължение на 22 часа. От разделените най-висок процент

бластоцисти 28.8% имаше при матурираните в продължение на 20 часа. Най-подходящите часове за *in vitro* матурация на ооцити достигнали до стадий бластоцист са 20 и 22 часа.

4.5. Ефект на различни FCS концентрации в три среди за *in vitro* култивиране – CR1, SOF и KSOM

Успешното развитие на *in vitro* получени (IVP) говежди ембриони зависи от много фактори по време на етапите на *in vitro* матурацията (IVM), *in vitro* оплождането (IVF) и *in vitro* културането (IVC). В *in vitro* получаването на ембриони, средата за култивиране може да повлияе на ембриоталното развитие.

Въпреки факта, че говежди ембриони могат да бъдат култивирани *in vitro* в среда под дефинираните условия, благоприятния ефект на фетален телешки серум (FCS) се отразява върху развитието им. Ембриони, култивирани без протеини показват промени в метаболизма, намалено развитие (THOMPSON et al., 1998) и в броя на клетките (LIM et al., 2007) в сравнение с ембриони, култивирани в среди с наличие на протеини.

Изискването за биологични компоненти като FCS или говежди серумен албумин (BSA) при IVP е предмет на дискусия поради тяхната сложна и недефинирана композиции. За FCS е доказано, че повишава мембранната пропускливост и увеличава броя на ембрионите, които достигат стадий бластоцист, както и дела на излюпените бластоцисти.

Въпреки общата употреба на няколко среди за *in vitro* получаване на ембриони, сравненията между добавки с различни FCS концентрации в различни среди за *in vitro* култивиране не са били систематично тествани. Това проучване беше направено за да се оцени ефекта от различни FCS концентрации в три (CR1, KSOM и SOF) среди за култивиране на говежди ембриони.

Увеличаване на концентрацията на FCS от 5 до 10% в среда CR1 намалява скоростта на разделяне (P <0.05). Въпреки това нямаше съществени разлики в развитието до бластоцисти (P > 0.05) и излюпени бластоцисти (P > 0.05) между ембрионите, култивирани с 5 или 10% от FCS (Таблица 4).

Таблица 4: Ефект от добавянето на 5 или 10% фетален телешки серум (FCS) в CR1среда върху in vitro развитието на говежди ембриони

FCS (%)	Оплодени ооцити (n)	Разделени (n %)	Бластоцист (n %)
5	420	350 (83.37) [a]	167 (39.81)
10	306	199 (65.17) [b]	104 (34.23)

Със среда KSOM степента на разделяне беше подобна, като при зиготи, култивирани в 5 или 10% от FCS (P > 0,05). Докато делът на бластоцистите беше значително по-голям (P <0.05), когато ембрионите бяха култивиран в KSOM, допълнен с 5% в сравнение с 10% FCS, степента на излюпване не е значима при различия (P > 0,05) между групите, както е показано в Таблица 5.

Таблица 5: Ефект от добавянето на 5 или 10% фетален телешки серум (FCS) в KSOM среда върху in vitro развитието на говежди ембриони.

FCS (%)	Оплодени ооцити (n)	Разделени (n %)	Бластоцист (n %)
5	405	296 (72.98)	165 (40.75) [a]
10	278	193 (69.42)	73 (26.26) [b]

Подобни резултати бяха наблюдавани при средата SOF (Таблица 6). Различните концентрации на FCS не повлияха на скоростта на разделяне (P > 0.05). Когато FCS концентрацията се повишава от 5 до 10%, скоростта за развитие да бластоцист е значително намалена (P <0,05). Въпреки това, няма значими

разлики (P > 0,05) в излюпването на бластоцисти между ембриони култивирани с различни концентрации на FCS.

Таблица 6: Ефект от добавянето на 5 или 10% фетален телешки серум (FCS) в SOF среда върху in vitro развитието на говежди ембриони.

FCS (%)	Оплодени ооцити (n)	Разделени (n	%)	Бластоцист (n	%)
5	421	351	(83.37)	226	(53.68) [a]
10	320	257	(80.46)	90	(28.15) [b]

Намаляването до 5% FCS по време на *in vitro* култивирането доведе до по-висок процент на бластоцисти в KSOM и SOF среда. Това увеличение на бластоцистите, когато концентрацията на FCS беше намалена в средата за култивиране SOF, е описано по-рано (ASSUMPÇÃO et al., 2002). Намаляването на процента на бластоцистите в среда допълнена с по-високи концентрации FCS може да бъде поради морфологични промени, провокирани от FCS. Няколко проучвания показват натрупване на липиди в ембриони от преживни животни, култивирани в среда, допълнена със серум (REIS и др., 2003). Морули и бластоцисти, развиващи се в TCM199, 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 (KOWALTOWSKI and VERCESE, 1999) 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 10% FCS.

При използване на средата CR1 нямаше значителна разлика в степента на развитие до бластоцисти при култивиране с 5% или 10% FCS. Това вероятно се дължи на по-висока концентрация на пируват в CR1 средата (2.0 M) в сравнение със SOF (0,30 mM), KSOM (0,5 mM) и физиологичната концентрация в яйцепровода (0.5 mM). Очевидно количеството пируват, добавен към средата не влияе на ембрионалния метаболизъм. Въпреки това, 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.

По този начин, добавянето на 10% FCS в средата за култивиране може да е провокирало увеличаването на незрелите митохондрии в ембрионите в по-късен стадий и консумирането на повече пируват от ембрионите със зрели митохондрии.

Друго предположение за това как концентрацията на пируват може да е намалила щетите провокирани от повишената серумна концентрация в средата CR1 в сравнение с другите среди, 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 - медиирана 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 (H2O2) и други ROS (BASSENGE et al., 2001).

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

Втората група експерименти включва криоконсервация чрез витрификация на нематурирани ооцити и витрификация на ембриони.

4.6. Ефект на кумулусните клетки върху витрификацията на матурирани говежди ооцити

Въпреки постигнатият голям напредък, витрификацията на ооцити и ембриони остава предизвикателство, тъй като след размразяване тяхното оцеляване и развитие са компрометирани. За да се прилага най-добрият протокол за витрификация трябва да се минимизират щетите, които претърпяват ооцитите и ембрионите по време на процеса и да се постигне по-висок процент на преживяемост и развитие.

Бяха проведени експерименти с цел да се разработи и оптимизира стратегията за витрификация на матурирани говежди ооцити и ембриони. За да се реализира тази обща цел беше необходимо да се определи ефекта на кумулусните клетки върху витрификацията на матурирани говежди ооцити.

Витрификация и размразяване

In vitro матурираните говежди ооцити бяха витрифицирани с някои модификации, както е описано от KUWAYAMA et al. (2005). Използваната среда за манипулиране (CM) беше TCM199

с добавен 20% фетален телешки серум (FCS). Тази среда е базова за приготвяне на всички среди за витрифициране. Етапите на витрификация и размразяване бяха извършвани при 38, 5 °C, върху затоплена повърхност.

Витрификацията беше извършвана на два етапа: еквилибриране и витрификация. Ооцитите бяха еквилибрирани чрез прехвърлянето им последователно в три капки от 75 µl среда за еквилибриране (CE), съставена от среда за манипулиране с добавени 7,5% етиленгликол (EG) и 7,5% диметил - сулфоксид (DMSO). След като ооцитите възвърнаха първоначалния си обем, те бяха прехвърляни в четири последователни 50 µl капки от среда за витрифициране (CB), съставена от средата за манипулиране (CM) с добавени 15% EG, 15% DMSO и 0,5M захароза. Ооцитите бяха поставени в средата за еквилибриране за 10 – 15 минути и в средата за витрификация за 45 – 60 секунди. След замразяване и престояване една седмица в течен азот (LN_2) ооцитите бяха размразени чрез прехвърлянето им в затопляща среда, съставена от среда за манипулиране с 1 M захароза. Това беше последвано от тристепенно промиване на хиперосмоларната захароза, намалена от 1 M на 0,5 M (първо промиване за 3 минути), 0,25 M (второ промиване за 5 минути) и 0 M в среда за манипулиране (трето промиване за 5 минути). Ооцитите бяха промивани в среда за манипулиране три пъти и след това бяха инкубирани в среда за зреене в продължение на 2 часа, за да им се даде възможност да се възстановят.

In vitro оплождане *и in vitro* култивиране

Свежи ооцити (невитрифицирани) и витрифицирани ооцити бяха оплодени при еднакви условия със замразена/ размразена семенна течност от бик. Крайната концентрация на сперматозоиди от $1x10^6$ сперматозоиди/ml беше коригирана със средата за оплождане средата *Tyrode's albumin – lactate - pyruvate*

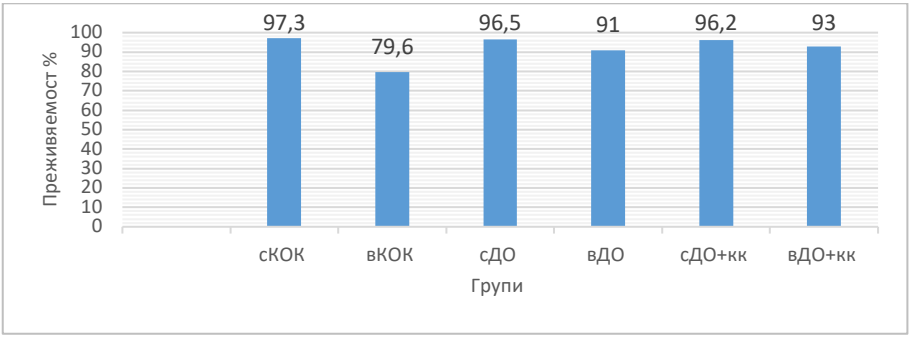
(TALP), състояща се от буфериран с бикарбонат разтвор на *Tyrode*, допълнен с говежди серум албумин (BSA) (6 mg/ml) и хепарин (25 mg/ml). На 21[и] час след *in vitro* оплождането, кумулусните клетки на предполагаемите зиготи бяха отстранени, промити и култивирани в групи от 25 в 50 µl капки от *Synthetic oviductal fluid medium* (SOF), допълнена с 0,4% говежди серум албумин. Култивирането беше извършено в инкубатор при 39°C във въздух с 5% CO2 при максимална влажност. Степента на разделяне беше определена 48 часа след оплождането, а развитието до стадий бластоцист на ден 8.

В експериментът матурираните говежди ооцити (n=1200), бяха разделени на случаен принцип в две групи - свежи и витрифицирани. Свежите ооцити също бяха разделени на три групи: свежи кумулусно - ооцитни комплекси (сКОК), свежи оголени (денудирани) ооцити (сДО) и свежи оголени ооцити, с добавени кумулусни клетки по време на оплождане (сДО+кк). Ооцитите във витрифицираната група също бяха разделени на три групи след затопляне: витрифицирани кумулусно - ооцитни комплекси (вКОК), витрифицирани денудирани ооцити (вДО) и витрифицирани денудирани ооцити с добавени кумулусни клетки по време на оплождане (вДО+кк). Интактните КК, които бяха добавени към витрифицираните ооцити по време на оплождането, бяха получени един ден преди размразяването и бяха култивирани при същите условия като останалите ооцити. КК бяха отстранени чрез пипетиране след оплождането и преди преценка на преживяемостта, разделянето и достигане на стадий бластоцист.

Степента на преживяемост на групите от свежи ооцити беше много близо до 100%, без значителни разлики между групите. Въпреки това, степента на преживяемост на вДО в групите (91,0%) и вДО+кк (93%) беше по-висока от вКОК (79,6%), $p<0,05$.

Витрифицираните КОК имат значително по-ниски нива на преживяемост (79,6%) в сравнение с техните свежи аналози 97,3% съответно, (p<0,05).

Фигура 7: Нива на преживяемост на ооцитите

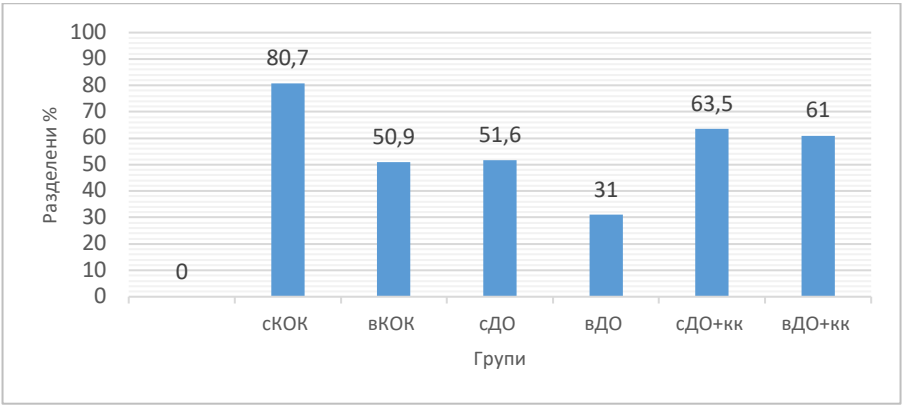


P<0,05;
вКОК – витрифицирани кумулусно-ооцитни комплекси; вДО – витрифицирани денудирани ооцити; вДО+кк – витрифицирани денудирани ооцити с кумулусно-ооцитни комплекси; сКОК – свежи кумулусно-ооцитни комплекси ; сДО – свежи денудирани ооцити; сДО+кк –свежи денудирани ооцити с кумулусно-ооцитни комплекси

Отстраняването на КК след матуриране значително намалява броя на разделените ооцити (p<0,05). Въпреки това, увеличението на степента на разделяне беше по-голяма при сДО+кк в сравнение със сДО (63,5 % срещу 51,6% съответно, p<0,05). Същият ефект беше наблюдаван сред витрифицираните групи (p<0,05). (Фигура 8)

Добавянето на КК към витрифицирани денудирани ооцити (вДО+кк) води до степени на делене, сравними с тези при витрифицирани кумулусно - ооцитни комплекси (съответно 61,0% срещу 50,9% респективно). Степента на разделяне на вКОК (50,9%) и витрифицирани денудирани ооцити (вДО) (31,0%) е значително по-ниска от свежите КОК (сКОК) (80,7%) и свежите денудирани ооцити (сДО) (51,6%), p<0,05

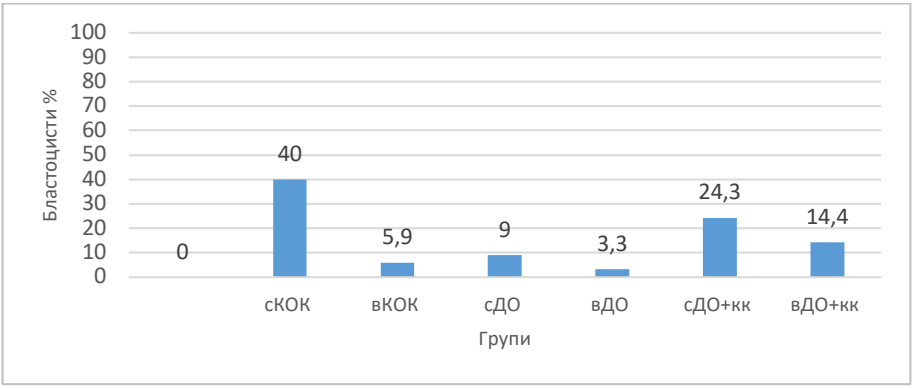
Фигура 8: Степен на разделяне след оплождане



P<0,05

Шансовете да се развият до бластоцисти са по-големи при свежи кумулусно - ооцитни комплекси (сКОК) (40,0%) и свежи денудирани ооцити с добавени кумулусни клетки (сДО+кк) (24,3%) в сравнение с витрифицирани кумулусно - ооцитни комплекси (вКОК) (5,9%) и витрифицирани денудирани ооцити с добавени кумулусни клетки (вДО+кк) (14,4%), p<0,05. Сред витрифицираните групи наблюдавахме, че отстраняването на кумулусните клетки не оказва значителен ефект върху развитието до бластоцист на витрифицирани денудирани ооцити (вДО) (3,3%) в сравнение с витрифицирани кумулусно - ооцитни комплекси (вКОК) (5,9%), но процентът на развитие до бластоцисти при витрифицирани денудирани ооцити с добавени кумулусни клетки (вДО+кк) е значително по-висок в сравнение с витрифицирани денудирани ооцити (вДО) (14,4% срещу 3,3% съответно, p<0,05).

Фигура 9: Развитие на оплодени ооцити до стадий бластоцист



P<0,05

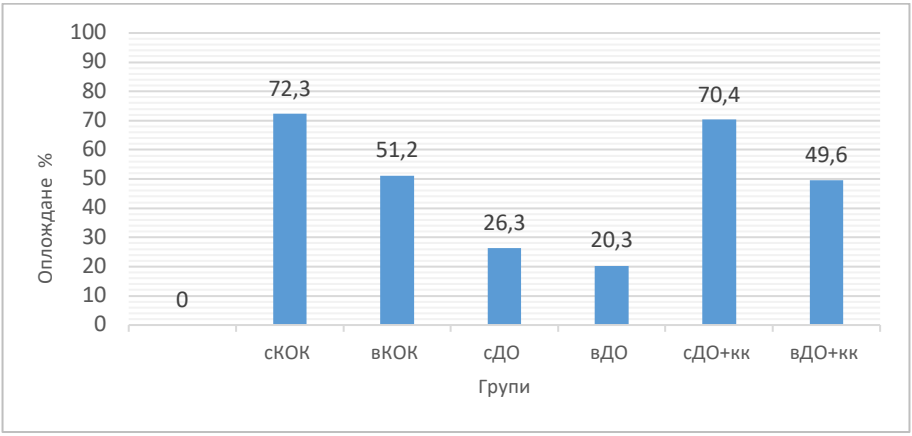
Отстраняването на кумулусните клетки преди оплождането има отрицателен ефект върху скоростта на развитие (Фигура 10).

При свежите ооцити степента на оплождане на свежи денудирани ооцити (сДО) (26,3 %) бе значително по – ниска в сравнение със свежите кумулусно - ооцитни комплекси (сКОК) (72,3%) $p<0.05$. Добавянето на непокътнати свежи кумулусни клетки към свежи денудирани ооцити (сДО) може да повлияе степента на оплождане, до степен да не се различава значително от сКОК (72,3% срещу 70,4 % съответно). Същият ефект беше наблюдаван и при витрифицирани ооцити.

Степента на оплождане беше значително по-висока за вКОК в сравнение с вДО (51,2% срещу 20,3% съответно, $p<0,05$) и ситуацията можеше да бъде обърната, когато вДО са допълнени с непокътнати КК (вДО+кк, 49,6%).

Ефектът на кумулусните клетки по време на витрификацията е изследван от много автори в продължение на години, но при няколко вида са получени противоречиви резултати.

Фигура 10: Степен на оплождане



При хората в началото се наблюдава благоприятен ефект на кумулусните клетки върху оцеляването на матурирани ооцити (KUWAYAMA et al. 2005), но PAUL et al., (2018) не съобщават за разлики в преживяемостта на кумулусно ооцитните комплекси в сравнение с денудирани ооцити. При коне е установено, че наличието на кумулусни клетки е от полза по време на витрификацията на матурирани ооцити (ZHANG et al. 2020), докато GASPARRINI et al., 2007 съобщават, че те играят вредна роля по време на витрификацията на биволски ооцити. От друга страна, не са открити разлики в степента на преживяемост между кумулусно - ооцитните комплекси и денудираните ооцити от овце (ZHANG et al. 2009). При говеда са докладвани противоречиви резултати. CHINEN et al., (2020) не наблюдават никакъв ефект, когато кумулусните клетки присъстват по време на витрификацията на говежди ооцити. По същия начин ZHANG et al., (2020) не наблюдава никакъв ефект върху оцеляването на зрели говежди ооцити, когато те са витрифицирани с кумулусни клетки. Нашите наблюдения са в унисон с последното изследване.

Предполага се, че кумулусните клетки могат да възпрепятстват дифузията на вода и криопротектант, което води до неадекватна клетъчна защита. Трябва да се отбележи, че денудираните ооцити са по-лесни за манипулиране, когато се използва *Криотоп* по време на витрификация (TASHIMA et al., 2017). Освен това количеството течност около тези ооцити е по-малко в сравнение с кумулусно - ооцитните комплекси. По-малко количество течност около ооцита води до по-висока скорост на охлаждане и затопляне (ARAV, 2014, SINHA et al., 2014), което може да бъде положително за оцеляването на денудираните ооцити в сравнение с кумулусно-ооцитните комплекси, (SOMFAI and HIRAO, 2021).

Известно е, че отстраняването на кумулусните клетки малко преди *in vitro* оплождането (IVF) силно намалява степента на оплождане при говедата (DUJÍČKOVÁ et al., 2021). По време на оплождането кумулусните клетки привличат, улавят и селектират сперматозоидите. Те са важни за индуциране на капацитацията на сперматозоидите, акрозомната реакция и пенетрацията и за предотвратяване на втвърдяването на *zona pellucida*. В проведения експеримент отстраняването на кумулусните клетки след *in vitro* матурация намали скоростта на развитие, разделяне и достигане до стадий бластоцист. За да се разреши този проблем, по време на оплождането към денудираните ооцити (ДО) се добавиха интактни кумулусни клетки. По този начин денудираните ооцити могат да възстановят способността си за развитие (TASHIMA, et al. 2017). ZHANG et al., (2020) показват, че скоростта на разделяне на витрифицирани биволски ооцити се увеличава, когато денудираните ооцити се допълват с интактни кумулусни клетки, но не и при развитието до бластоцисти.

Друг начин за разрешаване на негативния ефект на кумулусните клетки по време на витрификацията и за допускане на положително влияние по време на оплождането включва

частично намаляване на кумулусните клетки преди витрификацията (DUJÍČKOVÁ et al. 2021).

Нашите данни показват, че е препоръчително да се отстранят поне част от кумулусните клетки преди витрификацията на матурирани говежди ооцити. Денудираните ооцити преживяват витрификация с по-висока скорост от кумулусно - ооцитните комплекси, въпреки че тяхното оплождане и последващо развитие на ембриони са компрометирани поради липсата на кумулусни клетки. Добавянето на интактни кумулусни клетки може да възстанови ситуацията, осигурявайки на денудираните ооцити подобни скорости на оплождане и развитие на ембрионите като при витрифицираните кумулусно - ооцитните комплекси.

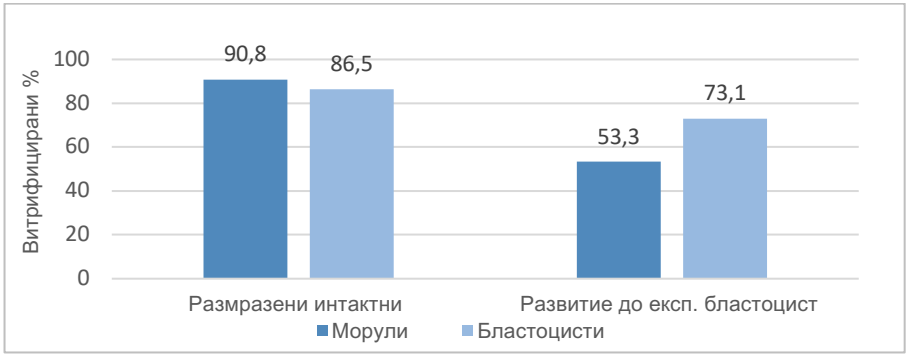
4.7. Витрификация на говежди ембриони

Беше проведен експеримент с цел подобряване на метода за витрификация на говежди ембриони с използване на безопасна, проста и успешна техника.

Настоящите протоколи за витрификация, макар и успешни, имат недостатъци, което ги прави трудни за ефективно използване. Проблемите включват използването на диметилсулфоксид (DMSO), относително токсичен криопротектор, контейнери с микроразмери, които често са отворени към замърсяване и трудни за манипулиране и кратко време за експозиция, което е технически трудно и не оставя място за грешки. Метода наречен S3 витрификация, използва голям, стерилен, запечатващ се контейнер и улеснява манипулациите. С този метод бяха витрифицирани говежди ембриони, като бяха инкубирани в два разтвора с етиленгликол при 23°C в продължение на 5 минути всеки. След това бяха прехвърлени в разтвор за витрифициране от

глицерол и етиленгликол (EG) в продължение на две минути, като през това време бяха зареждани в стерилна 0,25 ml пайета, която беше запечатвана топлинно и бяха витрифицирани. Пайетите се размразяваха за 5 секунди на въздух, след това за 10 секунди във вода при 30°C. Сравнени бяха резултатите получени при витрификация на морули и бластоцисти по метода S3.

След 24 часа култивиране, изследваните ембриони бяха оценявани за реекспандиране на бластоцела. Получените резултати показаха, че при размразените интактни морули процента е по-висок (90,8%), докато при бластоцистите е 86,5%. До стадий експандиран бластоцист достигнаха по-голям процент от групата бластоцисти 73,1%. Ембрионите избрани за витрификация бяха бластоцисти, експандирани бластоцисти или излюпени бластоцисти. Техниката S3 осигурява високи нива на оцеляване над 90% при говежди ембриони.



Фигура 10: Резултатите получени при витрификация на морули и бластоцисти по метода S3

Тази нова техника, наречена S3 витрификация е различна, базирана на основните принципи на криоконсервация. Сравнително голям контейнер и стерилна пайета от 0,25 ml може да се зареди и запечата лесно без бързане на процедурата. Освен това, въпреки че е използван по-дълъг период на експозиция (12

минути преди охлаждане) от основните методи, доказателствата за токсичност са много малко.

Тази нова техника, наречена S3 витрификация е различна, базирана на основните принципи на криоконсервация. Сравнително голям контейнер и стерилна пайета от 0,25 ml може да се зареди и запечата лесно без бързане на процедурата. Освен това, въпреки че е използван по-дълъг период на експозиция (12 минути преди охлаждане) от основните методи, доказателствата за токсичност са много малко.

Говеждите ембриони, витрифицирани с помощта на S3 метода, не изискват изкуствено предизвикан колапс на бластоцела преди замразяване, за да се получат високи скорости за оцеляване на ембрионите. Тъй като бластоцелът се състои главно от вода, когато замръзне ще се образуват ледени кристали, представяйки потенциално смъртоносен проблем по време на витрификация. Това е довело до разработване на изкуствено намаляване или колапс на бластоцела преди витрификация.

По време на витрификация и размразяване, в повечето случаи бластоцелът не колабира напълно и остава около половината от първоначалния си размер. След размразяване и премахване на криопротектора ембриона може лесно да се класифицира и се трансферира веднага без нужда от култивиране до възникване на повторно експандиране, за да се потвърди неговото оцеляване. Това е различно от много от конвенционалните витрификационни процедури, при които ембриона се свива или колабира по време на размразяване и отстраняване на криопротектора (VANDERZWALMEN et al., 2003). Трудно е да се оцени ембрион или да се определи дали е оцелял след колапс на бластоцела, и култивиране за няколко часа или една нощ преди прехвърлянето (KUWAYAMA et al., 2005a; 2005b; LIEBERMANN et al., 2006), за да се визуализира повторно експандиране и да се определи дали ембрионът и бластомерите са

непокътнати. Голямата част от ембрионите, които са култивирани за една нощ, се възстановяват напълно и продължават да се експандират и понякога да се излюпват. Избягване на пълен колапс на ембриона по време на размразяване и отстраняването на криопротектора е друго предимство на витрификацията по метода S3, тъй като позволява незабавна проверка на оцеляването, полесно се правят решения относно това колко ембриони трябва да бъдат размразени, без да се чака повторно експандиране.

Тези резултати показват, че ембрионите могат да бъдат витрифицирани с помощта на прост, лесен за използване протокол, в относително голям, стерилен, запечатващ се контейнер без необходимост от DMSO и по начин, който позволява достатъчно време за балансиране и зареждане, без да се налага да се бърза по време на процедурата.

5. ИЗВОДИ И ПРЕПОРЪКИ

5.1 ИЗВОДИ

5.1.1. Най-добри резултати бяха получени при транспортиране на яйчниците от кланицата до лабораторията за два часа при температура на средата от 20°C до 30°C.

5.1.2. Метода на получаване на КОК чрез аспирация е за предпочитане, тъй като няма замърсяване, но броя получени ооцити е между 10 и 11. При метода на получаване на КОК чрез нарязване има опасност от микотична контаминация, но се получават с 32% повече ооцити.

5.1.3. Размерът на фоликула има положителен ефект върху компетентността за развитие на ооцитите. Бластоцистите, получени от яйчници без жълто тяло от СФ и ГФ е с около 5% по-голям от този на яйчници с жълто тяло.

5.1.4. При получаване на КОК от яйчници с диаметър на фоликула от 6 mm до 10 mm резултатите са най-добри. Броя на фоликулите оказва влияние на резултатите от получените *in vitro* ембриони. При яйчници с над 15 фоликула се получават около 30% бластоцисти.

5.1.5. При продължителност от 20 до 24 часа на *in vitro* матурацията на ооцити се получават най-добри резултати.

5.1.6. При добавяне на 5% фетален телешки серум (FCS) към средата за култивиране SOF се получават най-висок процент бластоцисти. Намаляването на концентрациите на

FCS в средите KSOM и SOF са полезни за *in vitro* култивирането. При използване на средата CR1 не се наблюдаваха значителни разлики в степента на развитие до бластоцисти при култивиране с 5% или 10% FCS.

5.1.7. Степента на преживяемост на витрифицирани денудирани ооцити (вДО) в групите (91,0%) и витрифицирани денудирани ооцити с кумулусни клетки (вДО+кк) (93%) са по-високи от витрифицираните КОК (79,6%). Отстраняването на кумулусните клетки след матуриране значително намалява броя на разделените ооцити, но процента на развитие до бластоцисти при (вДО+кк) е значително по-висок в сравнение с вДО (14,4% срещу 3,3% съответно).

5.1.8. Предимство на метода за витрификация S3 е избягването на пълен колапс на ембриона по време на размразяване и отстраняването на криопротектора.

5.2. ПРЕПОРЪКИ

5.2.1. Препоръчваме кумулусно ооцитните комплекси да се получават от яйчници с диаметър на фоликула над 6 mm.

5.2.2. Най-добри резултати се получават при продължителност на *in vitro* матурацията в продължение на 22-24 часа.

5.2.3. Метода за витрификация на ембриони S3 е подходящ за практиката, защото е прост и лесен за използване, без необходимост от DMSO. Препоръчваме да се прилага при ембриотрансфер.

6. ПРИНОСИ

6.1. Оригинални научни приноси

6.1.1. Чрез сравнителни изследвания на различни дефинирани хранителни среди са оптимизирани условията за *in vitro* култивиране. Установено е, че култивирането в хранителна среда SOF с добавка на 5% FCS достоверно повишава процента на получените бластоцисти.

6.1.2. Степента на преживяемост на витрифицирани денудирани ооцити култивирани в присъствието на кумулусни клетки (вДО+кк) е значително по-висока.

6.1.3. Разработена е опростена система за опаковане на ембрионите преди витрифициране с използване на стандартни пайети.

6.2. Приноси с научен и приложен характер

6.2.1. Подобрен е метода за получаване на ембриони от говеда *in vitro*, чрез модификации на утвърдени схеми.

6.2.2. Получени са нови данни за влиянието на размера на фоликулите върху качеството на ембрионите.

6.2.3. Установено е предимството на метода за получаване на ооцити чрез пунктиране на фоликулите.

6.2.4. Потвърдена е най-оптималната продължителност на *in vitro* матурацията.

7. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Tsvetelina Todorova,** 2023, Effect of cumulus cells on vitrification of matured bovine oocytes, Bulgarian Journal of Animal Husbandry, LX, 1, 4-12, Web of Science - CABI, EBSCO