



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**  
Institutionen för kliniska vetenskaper

# Äggstockstransporttemperaturens påverkan på embryoutveckling och fettstruktur *in vitro*

*Johan Ekelund*

*Uppsala  
2018*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2018:66*



# Äggstockstransporttemperaturens påverkan på embryoutveckling och fettstruktur *in vitro*

The impact of ovary transport temperature on embryo development and lipid content *in vitro*

**Handledare:** Ylva Sjunnesson, institutionen för kliniska vetenskaper

**Biträdande handledare:** Denise Laskowski, institutionen för kliniska vetenskaper

**Examinator:** Ann-Sofi Bergqvist, institutionen för kliniska vetenskaper

Johan Ekelund

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0736

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2018

**Delnummer i serie:** Examensarbete 2018:66

**ISSN:** 1652-8697

**Elektronisk publicering:** <https://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** temperatur, transport, blastocyst, lipid, IVF

**Key words:** temperature, transport, blastocyst, bovine, lipid, IVF

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper



## **SAMMANFATTNING**

Embryoöverföring är en viktig del av boskapsindustrin i stora delar av världen. Att förstå hur det tidiga embryot påverkas av yttre och inre faktorer är viktigt, även för konventionell uppfödning av nötkreatur. Att erhålla forskningsmaterial för detta ändamål kan vara problematiskt och dyrt för det enskilda laboratoriet, att förbättra och maximera transporten av äggstockar är en viktig del av forskningen.

Detta arbete har undersökt om en lägre transporttemperatur än vad som använts tidigare vid *in vitro* embryo produktionslaboratoriet vid SLU, är mer fördelaktigt. Temperaturen hos transportvätskorna varierade mera om den lägre starttemperaturen användes. Både kvalitén och kvantiteten jämfördes mellan de båda grupperna. Andelen befruktade äggceller som utvecklades till blastocyster och även hur långt dessa blastocyster hade utvecklats var liknande i bägge grupper och ingen signifikant skillnad hittades, kvalitetsgraderingen av blastocysterna visade inte på några skillnader. Det fanns ingen signifikant skillnad mellan fettinnehållet och antalet fettdroppar i blastocyster mellan grupperna.

Slutsatsen blev att den nuvarande och högre temperaturen troligtvis var bättre, trots att det inte var några signifikanta skillnader mellan grupperna, eftersom den antas stressa äggstockarna och äggcellerna mindre.

## **SUMMARY**

Embryo transfer is an important part of the cattle industry in many parts of the world. To understand how the early embryo is affected by extrinsic and intrinsic factors is important, even for conventional breeding of cattle. To obtain research material for this purpose can be problematic and expensive for a single laboratory, to improve and maximize the transportation of the ovaries is an important part of the research.

This study has analyzed if a lower transportation temperature, compared with former used temperature at the embryo production laboratory at SLU, is more advantageous. The temperature of the transportation liquid varied more when the lower temperature was used. Both quality and quantity of the both groups were compared. The rate of fertilized oocytes that evolved to blastocysts, and the quality of blastocysts, were similar in both groups and showed no significant variance. No significant variance was found in lipid content and lipid count between the groups. The conclusion is that the presently used and higher temperature most likely is better, although no significant differences were found between the groups, because minor alternations in temperature is expected to stress the ovaries and oocytes less.



# INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INTRODUKTION.....	1
LITTERATURÖVERSIKT.....	2
Tidig embryonal utveckling hos nötboskap .....	2
Transport av nötkreaturs äggstockar från slakteri till laboratorium .....	3
<i>In vitro</i> produktion av embryon.....	3
Embryotransfer i ett internationellt perspektiv.....	4
<i>In vitro</i> modell för utveckling av oocyter och embryon.....	4
Alternativ för analys av oocyter och embryon .....	5
Analys av cellulära fetter.....	5
Studiens mål .....	5
MATERIAL OCH METODER.....	6
Studiens utförande.....	6
Media.....	6
Insamling av äggstockar på slakteri .....	7
<i>In vitro</i> produktion av embryon.....	7
Färgning .....	8
Kärnfärgning .....	8
Lipidinfärgning.....	10
Konfokalmikroskopering.....	10
Analys av de infärgade äggcellskomplexen .....	11
Analys av de infärgade blastocysterna .....	11
Statistisk metod .....	12
RESULTAT .....	13
Transportmediets temperaturförändringar.....	13
Jämförelse av utvecklingen från äggcell till blastocyst.....	13
Bedömning av blastocysterna.....	13
Analys av lipidinnehållet i äggcellskomplexen.....	15
Analys av lipidinnehållet i blastocysterna.....	15
Utvärdering av LipidTOX.....	16
DISKUSSION .....	17
Transportmediets temperaturförändringar.....	17

Jämförelse av utvecklingen från äggcell till blastocyst.....	17
Bedömning av blastocysterna.....	17
Analys av lipidinnehållet i äggcellskomplexen.....	18
Analys av lipidinnehållet i blastocysterna.....	18
Utvärdering av LipidTOX.....	19
SLUTSATS .....	19
REFERENSER.....	20

## FÖRKORTNINGAR

Blco	Blastocoel
BSA	Bovint serum albumin
CO <sub>2</sub>	Koldioxidgas
COC	Äggcellskomplex
DMSO	Dimetylsulfoxid
ET	Embryotransfer
FSH	Follikel stimulerande hormon
ICM	Inre cellmassan
IVM	<i>In vitro</i> embryo mognad
IVF	<i>In vitro</i> embryo fertilisering
IVP	<i>In vitro</i> embryo produktion
LH	Luteiniserande hormon
M	Molar
MEM	Icke-essentiella aminosyrelösning
NaCl	Natriumklorid
N <sub>2</sub>	Kvävgas
O <sub>2</sub>	Syrgas
OPU	Ovum Pick-up
PBS	Fosfatbuffrad saltlösning
PFA	Paraformaldehyd
PVA	Polyvinylalkohol
Tb	Trofoblastceller



## INTRODUKTION

Kunskapen om däggdjurens utveckling i det tidiga embryonala stadiet är knapphändig. Att veta vad som kan påverka embryot positivt eller negativt och vad som kan ge långvariga effekter på embryot, fostret och det levande djuret är viktigt. I dag vet man att det är mer än bara generna som skapar förutsättningarna för en individ, oavsett djurslag. Att ta reda på och undersöka dessa potentiella faktorer är angeläget.

Alla däggdjurs tidiga embryonala utveckling liknar varandra på många sätt och kunskap från en studie som, i detta fall, utförs på nötboskap kan delvis även appliceras på människan.

Embryo transfer (ET) har blivit viktigare och mer förekommande inom mjölk- och köttindustrin. Vinsterna av ET är att man kan undvika att transportera djur, vilket minskar lidandet vid transport och minskar risken att sprida sjukdomar mellan djur och områden. Man kan även utnyttja de mer genetiskt värdefulla hondjuren i större grad än tidigare, då de inte behöver genomgå en dräktighet för varje avkomma de lämnar efter sig.

En del av embryona för ET produceras genom att man fångar upp äggcellerna från äggstocken innan ägglossningen, så kallad *ovum* pick-up (OPU). Äggcellerna befruktas i en artificiell miljö i ett laboratorium, så kallad *in vitro* befruktning (IVF). De befruktade äggen utvecklas därefter till blastocyster, ett tidigt embryonalt stadiet, i laboratoriemiljö. En blastocyst kan därefter förflyttas in i livmodern på ett annat hondjur som kan fullfölja dräktigheten och föda kalven.

För *in vitro* produktion (IVP) av blastocyster som ska utgöra forskningsmaterial så är OPU en dyr och krävande process. En metod som istället används är att man tar äggstockarna från slaktade djur och suger ut äggcellerna direkt från äggstocken, vilket möjliggör en större mängd äggceller men kan medföra andra nackdelar som lång transporttid mellan slakteri och laboratorium och att man antagligen inte vet den genetiska bakgrunden hos djuren som äggcellerna kommer ifrån.

I denna studie undersöktes hur temperaturen i transportmediet påverkar äggcellskomplexen och embryonas tidiga stadier, genom att jämföra en lägre temperatur med den som används för tillfället av laboratoriet. Den embryonala utvecklingen följdes och utvärderades kontinuerligt till och med dag åtta.

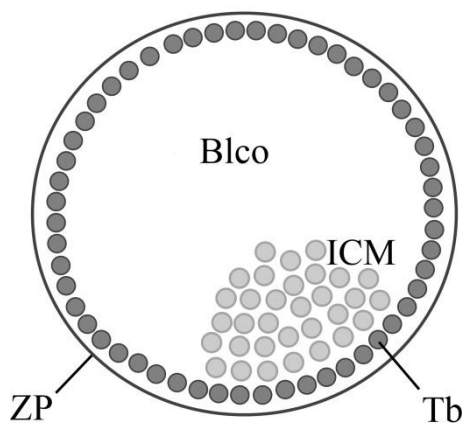
Även en ny infärgning av lipiderna i äggcellskomplexen och embryona utvärderades.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Tidig embryonal utveckling hos nötboskap

En ko har ägglossning i genomsnitt var 21:e dag om hon inte blir betäckt. Kons äggstockar innehåller konstant flera äggcellsinnehållande folliklar i olika storlekar och i olika mognadsstadier. Vid varje ägglossning så spricker en mogen follikel och avger ett äggcellskomplex från en av kons två äggstockar.

Vid ägglossningen är äggcellen täckt av zona pellucida, ett heltäckande lager av glykoproteiner (Gordon, 2003, s 62), och oftast flera lager av cumulus celler. Tillsammans bildar äggcell och cumulusceller äggcellskomplexet. Cumulus cellerna är förbundna med äggcellen genom gap junctions i zona pellucida (Gordon, 2003, s 62) och cumulus cellerna ansvarar i stort för äggcellens försörjning genom att bidra med energisubstrat och utsöndrar faktorer som främjar vidare embryonal utveckling (Munakata *et al.*, 2016; Auclair *et al.*, 2013).



**Figur 1.** Schematisk bild på blastocyst. Blastocoel, Blco, är det vätskefyllda utrymme inne i blastocysten. Den inre cellmassan, ICM, kommer att bilda fostret. Trofoblastcellerna, Tb, kommer att bilda fosterhinnorna. Blastocysten omges fortfarande av zona pellucida, ZP.

Efter befruktningen börjar embryot att genomgå ett antal celldelningar (cellklyvningar), där den ursprungliga stora cellen skapar flera celler men den totala volymen av embryot är densamma. Att utgå från en stor cell som sedan klyvs till flertalet mindre celler är energisparande, eftersom cellen inte behöver producera fler organeller och mera cytoplasma (Sturmeijer *et al.*, 2009). Alla processer som sker inom de första celldelningarna styrs av ämnen och mRNA som är sparade i äggcellen. När cellerna i embryot uppgår till ungefär 8-16 celler, så påbörjas den största delen av aktiveringen av embryots genom (Gordon, 2003, s 224). Detta möjliggör att embryot kan i högre grad producera cellkomponenter och energi. Efter att embryot har ökat till ungefär 32 celler så växer även embryots volym. Dess lipidhalt har visats minska (Abe *et al.*, 2002) och syreanvändningen ökar, vilket talar för att morulan har börjat förbränna fett och ökat sin energiomsättning.

Embryot utvecklas vidare till en blastocyst, vilken består av tre mer eller mindre distinkta delar, den inre cellmassan (ICM), trofoblastcellerna (Tb) och blastocoelen (Blco), utrymme som omger embryot (**Figur 1**). ICM är de celler som kommer utvecklas till fostret, Tb till fosterhinnorna och moderkakan (Gordon, 2003, s 225). Blastocysten omges fortfarande av zona pellucida vid denna tidpunkt, men kläcks ut ur den relativt snart efter övergång till blastocyst (ofta tidigast vid 7 dagar efter befruktningen).

## Transport av nötkreaturs äggstockar från slakteri till laboratorium

Äggstockar från slaktade hondjur av nötboskap används rutinmässigt för *in vitro* produktion (IVP) av embryon som forskning bedrivs på (Aman *et al.*, 1994). Det krävs att ett slakteri slaktar tillräckligt många hondjur under en koncentrerad tid och att avståndet mellan slakteriet och laboratoriet inte är för långt (Wang *et al.*, 2011). Kontinuerlig tillgång på äggstockar som uppfyller kraven kan vara problematiskt. Både transporttiden och temperaturen hos mediet som äggstockarna ligger i, påverkar äggcellernas kvalitet, både mognads- och utvecklingsmässigt efter *in vitro* mognad (IVM) och *in vitro* befruktning (IVF) (Pedersen *et al.*, 2004; Matsushita *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011; Wongsrikeao, 2005). Det gäller för det enskilda laboratoriet att skapa rutiner som fungerar för det laboratoriet.

Tiden mellan insamling på slakteriet och aspiration av folliklarna på laboratoriet kan spela roll, då den kan både vara för kort och för lång för specifika temperaturer. En studie visade att den optimala tiden är 4 timmar i 30 °C, både kortare och längre tidsintervall gav en sämre framväxt utav 64-cells embryon (Blondin *et al.*, 1997). Vid förvaring i 25 °C kunde äggstockarna förvaras längre utan att klyvningsgraden eller blastocystproduktionen minskade (Yang *et al.*, 1990). Tiden kan vara svår att påverka då laboratoriet oftast har möjlighet att få äggstockar från endast ett fåtal slakterier.

Temperaturen som äggstockarna förvaras i under transport är det som är lättast att optimera och bör anpassas efter transporttidens längd. Studier har visat att kroppstemperatur, 37-38 °C, är suboptimalt och att temperaturer runt 15-30 °C i 3-5 timmar är temperaturintervallet vid den transporttiden som bör eftersträvas och att de temperaturerna sinsemellan uppvisar ingen större skillnad (Pedersen *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011).

Vid avlivningen av hondjuret slutar hjärtat att slå och kroppen får en akut syrebrist, ischemi, på grund av blodbrist, detta gäller även äggstockarna (Wongsrikeao *et al.*, 2004). Vid en ischemi så kan kroppsegna enzymer aktiveras vilket kan leda till en cellulär nedbrytning. Vid en lägre temperatur så är enzymernas aktivitet lägre och således så går nedbrytningen långsammare. För att hindra nedbrytningen så är även en så kort tid som möjligt i en ischemisk miljö viktigt (Wang *et al.*, 2011). Äggstockar kan förvaras i 24 timmar i 10 °C utan att oocyternas potential till att mogna och utvecklas, upp till blastocyststadiet, förändras (Matsushita *et al.*, 2004). Dock är oocyterna *in vitro* känsliga för temperaturer under 38 °C, då de redan vid 1 min i 25 °C omgivning, uppvisade tecken på en förändrad morfologi (Aman *et al.*, 1994). Miljön i follikeln verkar vara skyddande för oocyten, även vid ischemi och lång transport, och till synes kan man få ut ett acceptabelt antal blastocyster vid olika temperatur och även vid suboptimala temperaturer. Den stora utmaningen är att komma fram till det optimala temperaturspannet och rutinerna för laboratoriet.

## *In vitro* produktion av embryon

Det exakta förfarandet vid IVP av bovina embryon skiljer sig mellan protokoll, men är i huvudsak densamma. Oocyter mognas ut, fertiliseras och kultiveras *in vitro* och kan därefter direkt överföras till ett mottagardjur, frysas eller analyseras på olika sätt.

Oocyter samlas antingen in genom aspiration utav äggcellskomplex från äggstockar som kommer ifrån slaktade djur eller så samlar man in äggcellskomplex från levande djur genom aspiration genom vaginalväggen med hjälp av ultraljudsguidning (OPU). Äggcellskomplexen inkuberas i inkubator med modifierad atmosfär, högre CO<sub>2</sub>-halter, lägre O<sub>2</sub>-halt och högre fuktighet, för mognad *in vitro*.

Efter *in vitro* mognad prepareras oocyterna för fertilisering och spermier, oftast fryst när det gäller nötkreatur, i en given koncentration adderas för befruktning *in vitro* under inkubation. Efter fertilisering så låter man de presumtiva zygoterna utvecklas till blastocyster, antingen till dag 7 eller dag 8. Därefter så måste man antingen fixera dem, frysa ned dem eller utföra en embryotransfer eftersom de vid dag 9-10 börjar fästa mot plasten i odlings-skålen och blir mer lika en cellkultur än ett embryo.

Embryotransfer innebär att man överför ett embryo till en mottagare. Det gör det möjligt att börja med ett stort antal ägg från ett hondjur med högt avelsindex, en genetiskt värdefull individ. Dessa ägg får sedan mogna ut och befruktas *in vitro* och embryon kan sedan transporteras ut till bönder med hondjur som har ett lägre avelsindex och låta dessa djur föda fram en kalv med ett avsevärt mycket högre avelsindex än sin moder. På detta sätt så kan man spara både tid och pengar genom stora genetiska framsteg på kort tid. Transporten av embryon är även ett förhållandevis säkert sätt att transportera avelsmaterial mellan områden med olika sjukdomsstatus, risken är minimal att sprida sjukdomar genom ET (Sutmoller *et al.*, 1997).

ET möjliggör att välja avelsdjur från ett större geografiskt område och även att avelsdjuren inte behöver transporteras långt, stå i karantän eller behöver anpassa sig till en ny miljö (Mapletoft *et al.*, 2005), vilket förbättrar ekonomin för bonden och även djurskyddet.

### **Embryotransfer i ett internationellt perspektiv**

Under 2014 inrapporterades till The International Embryo Technology Society (IETS) Data Retrieval Committee att 829 309 *embryo transfers* på nötkreatur hade genomförts globalt (IETS 2014). Dock förelåg en stor underrapportering i vissa länder och ingen rapportering alls från Asien och många andra områden. I många länder genomförs dock inga ET eller ytterst få.

Av dessa 829 309 ET så användes *in vitro* producerade embryo från OPU i 44 % av fallen, i majoriteten av de resterande fallen så användes *in vivo* producerade embryon.

I Sydamerika inrapporterades att det genomfördes 251 273 ET från OPU IVP embryon och i princip alla skedde i Brasilien, med en inrapporterad siffra på 244 795 ET, det vill säga 29,5 % av världens inrapporterade ET.

De två andra stora användarna av ET, Nordamerika och Europa, använder framför allt *in vivo* producerade embryon, där man först inseminerar kon och sedan sköljer ut de befruktade embryona.

### ***In vitro* modell för utveckling av oocyter och embryon**

*In vitro* produktion av embryon i en laboratoriemiljö försöker att härma den situation som embryot annars skulle ha haft *in vivo* i äggladaren och livmodern under den första veckan.

Denna metod ger en möjlighet att studera oocytmognaden och utvecklingen av det tidiga embryot utan att behöva använda levande försöksdjur. Fördelen med IVP är att man kan studera och analysera ett större antal oocyter och embryon billigare och mer effektivt än vid *in vivo* studier (Leroy *et al.*, 2008). Dock ger *in vivo* studier störst trovärdighet.

### **Alternativ för analys av oocyter och embryon**

För att analysera oocyterna och blastocysterna används ofta ljusmikroskop, konfokalmikroskop och/eller elektronmikroskop. Ljusmikroskopets fördel är att man inte behöver döda cellerna för vidare förberedelser innan analys. I en studie av Jeong *et al.* (2009) bedömdes oocyterna i ljusmikroskop och delades in i grupper efter sin nyans på cytoplasman och gick sedan vidare i försöket, vilket visar på ljusmikroskopets fördelar. Det går självklart att färga in celler och studera de i ett ljusmikroskop, vilket Abe *et al.* (2002) gjorde med hjälp av Sudan Black B, ett ämne som färgar fett.

Konfokalmikroskopets fördelar är att det är relativt lätt att göra en kvantitativ studie gjord på ett stort material, dock innebär det fixering och infärgning av cellerna. Till skillnad från ljusmikroskopet så går det att få tvärsnitt av de intakta cellerna för att kunna analysera dem bättre. Auclair *et al.* (2013) använde sig av fluorescerande färger och konfokalmikroskop för att undersöka oocyters totala lipidinnehåll.

För att studera organellernas mikrostruktur krävs elektronmikroskop, vilket ger en bra kvalitativ bild över det man studerar, dock är det dyrt och arbetskrävande. Abe *et al.* (1999) studerade fett droppars och mitokondriers struktur och utseende hos embryon och fann skillnader mellan sina grupper tack vare analys i elektronmikroskop.

### **Analys av cellulära fetter**

Nile Red är en fluorescerande färg som används för att färga in cellulära lipider (Greenspan *et al.*, 1985). Det går att kvantifiera mängden lipider i en cell genom att studera hur mycket fluorescerande ljus som de cellulära lipiderna avger (Genicot *et al.*, 2005).

I en studie av Barceló-Fimbres *et al.* (2011) så fann de att mängden fluorescerande ljus korrelerade väl med hur många fett droppar, oavsett storlek, cellen innehåller. Sambandet blev ännu starkare om fett dropparna delades in i tre olika storlekar, små 2-4  $\mu\text{m}$ , mellanstora 4-6  $\mu\text{m}$  och stora  $>6 \mu\text{m}$ , och den totala volymen sedan jämfördes med mängden ljus. I blastocyster fann studien att stora fett droppar motsvarar 49 % av den totala fettvolymen och mellanstora droppar 43 %, även om antalet fett droppar i dessa två grupper var procentuellt lägre än antalet små fett droppar. Även densiteten hos stora fett droppar är större än hos mindre fett droppar (Abe *et al.*, 2002).

### **Studiens mål**

I denna studie undersöktes hur temperaturen i transportmediet påverkar äggcellskomplexen och embryonas tidiga stadier, genom att jämföra en lägre temperatur med den som används för tillfället av laboratoriet. Den embryonala utvecklingen följdes och utvärderades kontinuerligt till och med dag åtta. Även en ny infärgning (LipidTOX) av lipiderna i äggcellskomplexen och embryona utvärderades.

## MATERIAL OCH METODER

### Studiens utförande

Äggstockar från slaktade nötkreatur, oberoende utav ras, ålder och reproduktionsstatus, användes. Äggstockarna delades in i två grupper som transporterades i vätskor med olika temperatur: hög temperatur (H, 30 °C) och låg temperatur (L, 25 °C). Temperaturen i transportvätskan mättes på slakteriet efter insamlingen och vid ankomst till laboratoriet, för att undersöka hur temperaturen förändrades. Tre stycken omgångar (batcher) genomfördes under 2 månader (september-oktober). Vid ankomst till laboratoriet aspirerades COCs ut från folliklarna i äggstockarna, de fick därefter mogna. Efter mognad plockades 4-5 COCs slumpmässigt ut från varje grupp som fixerades i paraformaldehyd (PFA) för färgning. Återstående COCs blev befruktade med spermier från en tjur med påvisad hög fruktsamhet i fält och *in vitro*. Embryonas första celledelningar följdes upp 44 timmar efter befruktningen, och utvecklingen och morfologin av embryona bedömdes och registrerades dag sju och åtta efter befruktningen. På dag åtta fixerades embryona i PFA. Efter fixeringen färgades embryona. Färgningarna som användes; en färg för neutrala fetter och en färg för cellkärnor. Konfokalmikroskop Zeiss LSM 510 (Zeiss, Oberkochen, Tyskland) användes för anskaffning av bilderna av COCs och embryon.

### Media

Om inget annat anges så köptes samtliga reagenser in från Sigma Aldrich, Stockholm, Sverige. Beställningsnumret anges i parentes första gången reagenten nämns.

Sökmedium bestod av hepes-buffrad TCM 199 (M 7528) med 0,2 % w/v bovint serumalbumin 96-99 %, BSA (Fraction V) (A3311) och 50 µg/ml gentamicinsulfat (G1264).

Mognadsmedium för *in vitro* befruktning bestod av TCM 199 (M2154) med 0,2 % w/v bovint serumalbumin 96-99 % (BSA) (Fraction V), 0,68 mM L-glutamin (G8540), 50 µg/ml gentamicinsulfat, 0,5 µg/ml FSH och 0,1 µg/ml LH (Stimufol, Partner Animal Health).

För befruktning användes tre medium, kapaciteringsmedium för selektion av rörliga spermier, wash-2-medium för hantering av oocyter och fertiliseringsmedium för *in vitro* befruktning.

Kapaciteringsmediet bestod av 110 mM natriumklorid (S5886), 2,68 mM kaliumklorid (P5405), 25 mM natriumbikarbonat (S5761), 0,29 mM natriumfosfat (S5011), 0,49 mM magnesiumklorid (M2393), 5 mM HEPES (H3375), 1 µM natriumpyruvat (P4562), 0,03 µliter natriumlaktat (L7900), 1,23 µg/ml glukos (G6152), 50 µg/ml gentamicinsulfat och 0,6 % w/v bovint serumalbumin (BSA) (Fraction V).

Wash-2-mediet bestod av 114 mM natriumklorid, 3,19 mM kaliumklorid, 2 mM natriumbikarbonat, 0,29 mM natriumfosfat (S5011), 0,49 mM magnesiumklorid, 2 mM kalciumklorid (C7902), 10 mM HEPES, 1 µl/ml Fenol röd (P0290) innehållandes 0,5 µM natriumpyruvat, 0,03 µM natriumlaktat, 50 µg/ml gentamicinsulfat och 0,3 % w/v bovint serumalbumin (BSA)(Fraction V) (A3311).

Fertiliseringsmediet: 114 mM natriumklorid, 3,19 mM kaliumklorid, 25,88 mM natriumbikarbonat, 0,29 mM natriumfosfat, 0,49 mM magnesiumklorid, 2 mM kalciumklorid, 10 mM HEPES, 1 µl/ml Fenolröd, 0,5 µM natriumpyruvat, 0,03 µl natriumlaktat, 50 µg/ml gentamicinsulfat, 0,6 % w/v bovint serumalbumin, fri från fettsyror (A7030) innehållandes 3 µg/ml heparin (H3149) och PHE med en slutlig koncentration på 1,7 mM natriumklorid, 10 µM hypotaurin (H1384), 20 µM pencillamin (P4875), 1,5 µM epinephrin (E1635), och 42 µM natriummetabisulfit (S9000).

Modifierad syntetisk äggledarvätska (mSOF) bestod av 0,11 M natriumklorid, 7 mM kaliumklorid, 1,19 mM kaliumfosfat (P5655), 25 mM natriumbikarbonat, 0,33 mM pyrodrusyra natriumsalt (P4562), 1 mM L-glutamin (G5840), 0,171 mM kalciumklorid, 1,5 mM glukos, 110 mM natriumlaktat, 0,49 mM magnesiumklorid innehållandes icke-essentiell aminosyralösning (MEM) (100x) (M7145), aminosyralösning (50x) (B6766), 0,4 % w/v bovint serumalbumin, fri från fettsyror och 50 µg/ml gentamicinsulfat.

### **Insamling av äggstockar på slakteri**

Äggstockarna transporterades från slakteriet i Linköping till laboratoriet på Ultuna, en sträcka på 270 km, i termosar. En termos innehöll 250 ml 0,9 % NaCl-lösning med temperaturen 30 °C och den andra innehöll samma sak men med temperaturen 25 °C.

Äggstockar från slaktade kor och kvigor samlades in direkt efter urtag. Det kontrollerades att båda äggstockarna fanns med i inälvspaketet, var hela och att de inte var kraftigt förorenade. Därefter klipptes de loss och en av äggstockarna lades slumpmässigt i en av termosarna och den andra äggstocken från samma djur i den andra termoserna. Insamlingen skedde under maximalt en timme. Efter insamlingen mättes temperaturen i båda termosarna och antecknades. Transporten tillbaka till laboratoriet tog 3-5 timmar och under denna tid förvarades termosarna i en isolerad väska.

### ***In vitro* produktion av embryon**

Vid ankomst till laboratoriet mättes temperaturen i båda termosarna. Först aspirerades vätskan från 2-9 mm stora folliklar i äggstockarna med hjälp av en 5 ml spruta och 18 G kanyl, se **figur 2**. Vätskan blandades i sökningsmedium, därefter samlade COCs upp från vätskan med hjälp av ljusmikroskop och pipett. COC:erna lades därefter över i mognadsmedium och inkuberades i 22 timmar i 38,5 °C, 5 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> och 90 % N<sub>2</sub> i maximal fuktighet.

Expanderade oocyter förbereddes för befruktning genom att pipettera dem i wash-2-medium tills 3-5 lager av cumuluscellerna återstod. Efter att oocyterna blev tvättade, blev de antingen befruktade *in vitro* eller fixerade för färgning. Oocyter för befruktning blev därefter sköljda i fertiliseringsmedium och befruktade *in vitro*. Spermier från en SRB-tjur med bevisad fruktsamhet i fält och i laboratorium användes (3-1716 Sörby).

Två strån med 225 µliter i vardera användes. Spermier placerades i botten av ett rör med kapaciteringsmedium och inkuberades i 5 % CO<sub>2</sub> i 45 minuter. Det översta lagret av kapaciteringsmediet sögs upp och centrifugerades i 300 x g i 7 minuter. Efter centrifugeringen avlägsnades det översta lagret av kapaciteringsmediet och spermier spädades ut i fertiliserings-

medium och koncentrationen bestämdes med hjälp av bürcherkammare. Spermielösningen adderades till preparerade oocyter för befruktning *in vitro*. Befruktningen gjordes med en koncentration av  $1 \times 10^6$  spermier per milliliter och inkuberades i 22 timmar i 38,5 °C, 5 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> och 90 % N<sub>2</sub> i maximal fuktighet.

Efter inkubationen så sköljdes zygoterna och obefruktade äggceller i mSOF-medium och alla cumulusceller avlägsnades. Brunnarna täcktes med Ovoil, för att skydda mediet och cellerna. Cellerna låg i mSOF-medium till och med dag åtta i inkubator (38,5 °C, 5 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> och 90 % N<sub>2</sub> i maximal fuktighet). Efter 44 timmar bedömdes och räknades de cellerna som hade börjat dela sig och hur många som hade delat sig mer än en gång. Blastocysterna bedömdes i stereomikroskop på dag sju och dag åtta efter befruktningen, enligt IETS, 2010. De delades först in i vilken fas de hade utvecklats till (blastocyst, expanderad blastocyst och blastocyst under eller efter kläckning från zona pellucida) och därefter bedömdes kvalitén från 1 till 4, där 1 är excellent eller bra och 4 är degenererad eller död. På dag åtta avlägsnades alla blastocysterna för fixering och senare infärgning.

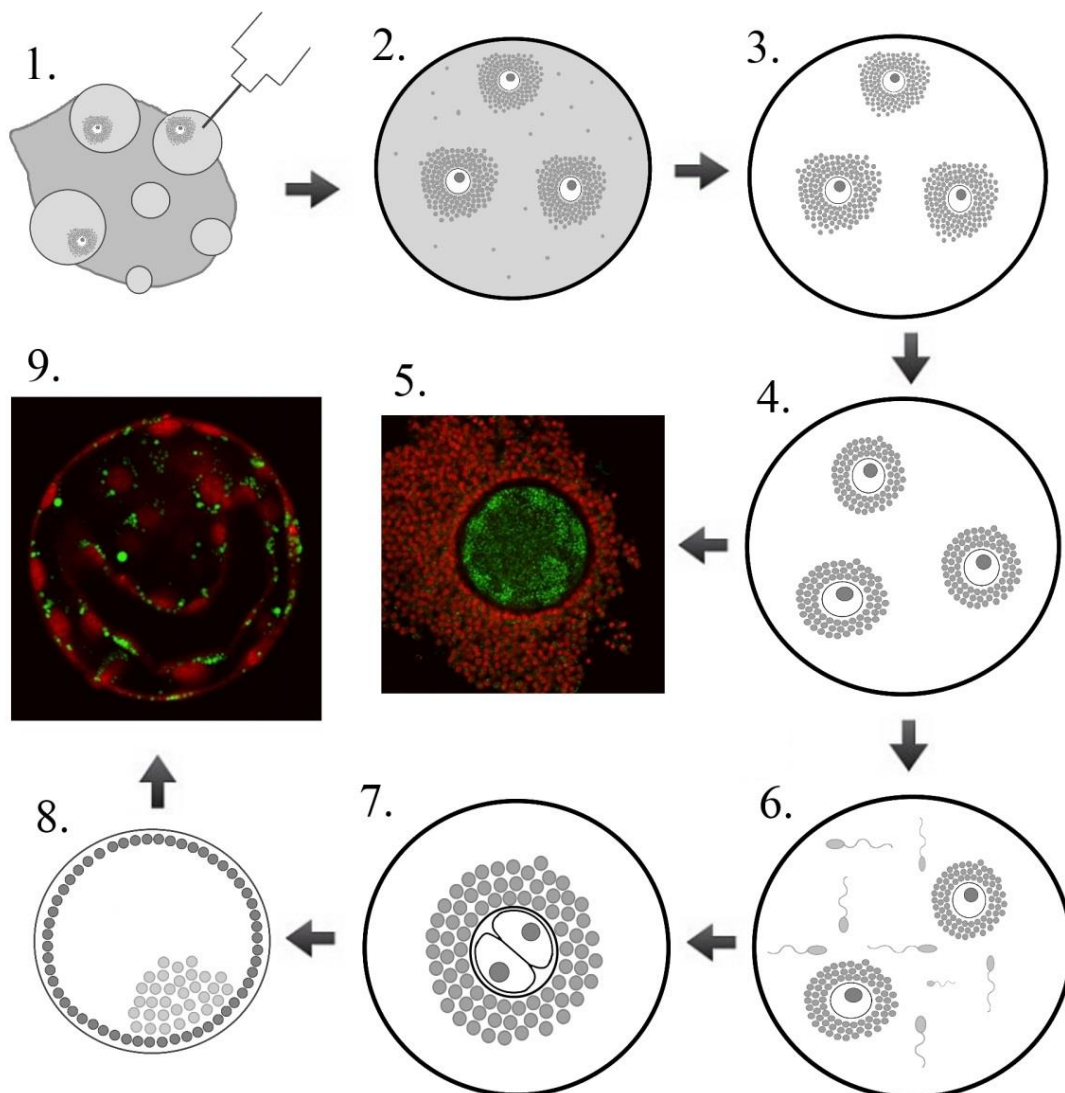
## **Färgning**

Mogna oocyter och dag åtta blastocyster fixerades och färgades. Oocyter/embryon fixerades i 2 % PFA över natten i 4°C och sköljdes sedan 5 gånger och förvarades i fosfatbuffrad saltlösning (PBS) med 1 % polyvinylalkohol (PVA) i 4°C tills de färgades in. Efter avslutad infärgning monterades cellerna på Black well-plattor med Vectashield mounting medium och förseglades under ett täckglas med nagellack.

## **Kärninfärgning**

DraQ-5 (Deep Red Anthraquinone 5, BioNordika, Stockholm, Sweden) blandades med PBS med PVA till koncentrationen 1:500. Cellerna fick ligga i lösningen i 20 min under skydd från ljus. Cellerna pipetterades direkt från DraQ-5-lösningen till en brunn med LipidTOX-lösning.



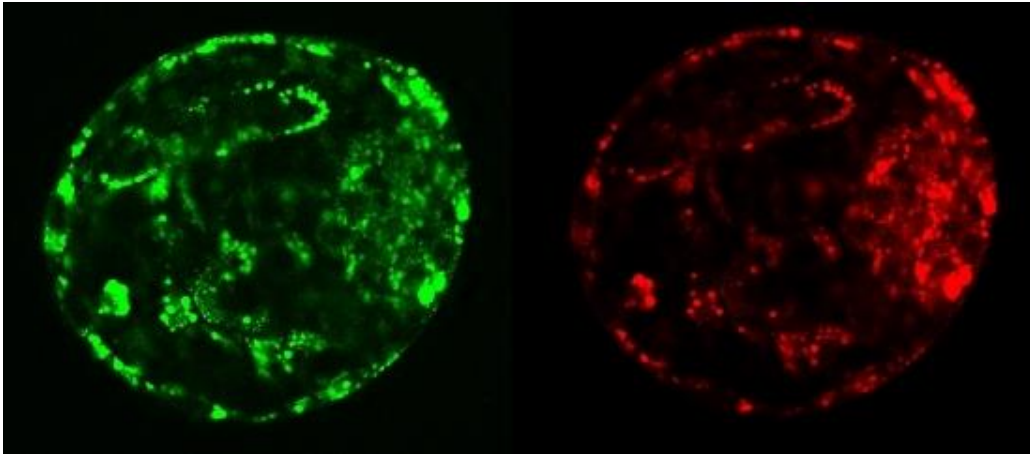


**Figur 2.** Översikt av *in vitro* produktionen av embryon. 1. Aspiration av folliklar, 2-9 mm. 2. Follikelväska, COC:er och sökemedium. 3. COC:er i mognadmedium för inkubation och mognad. 4. COC:erna tvättades och de yttersta cumuluscell-lagrena avlägsnades. 5. Ett fåtal COC fixerades, infärgades och analyserades. 6. Majoriteten av äggcellskomplexen blev befruktade. 7. På dag 2 efter befruktning, kontrollerades hur många av COC:erna som genomgått minst en klyvning. 8. På dag 8 så fixerades de COC:erna som hade utvecklats till blastocyster. 9. Infärgning av blastocysterna och analys.

## Lipidinfärgning

LipidTOX (HCS LipidTOX™ Green Neutral Lipid Stain, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) förvarades fruset i koncentrationen 1:10 i dimetylsulfoxid (DMSO) enligt tillverkarens rekommendationer. Innan infärgningen späddes färglösningen ytterligare i PBS med PVA till koncentrationen 1:100. Cellerna fick ligga i lösningen i 30 minuter under skydd från ljus.

En blastocyst färgades in med Nile Red (Sigma Aldrich, Stockholm, Sverige) och LipidTOX, se **bild 1**, för positiv kontroll av LipidTOXs egenskaper.



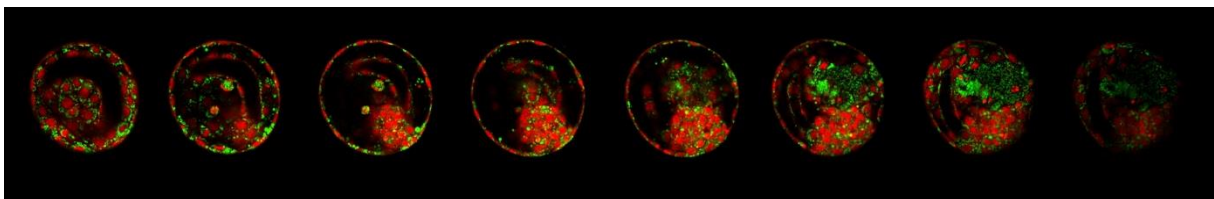
**Bild 1.** Kontroll av LipidTOX. En blastocyst färgades in med både LipidTOX och Nile Red, därefter togs två bilder i konfokalmikroskopet av denna. Infärgningen till vänster är LipidTOX och infärgningen till höger är Nile Red.

## Konfokalmikroskopering

Konfokalmikroskop Zeiss LSM 510 användes med laservåglängderna 633 och 488 nm. Alla bilder togs med 20 gångers förstoring. Alla bilder togs av samma person.

DraQ-5s optimala exciteringsvåglängd är 647 nm, vid mikroskoperingen användes helium-neon-laser 633 nm, och LipidTOXs optimala exciteringsvåglängd är 507 nm, och argonlaser 488 nm användes. Programmet ZEN 2009 användes vid mikroskoperingen och ZEN 2009 Light edition användes vid analyseringen.

Utförandet av bildtagningen var samma för både COCs och blastocysterna, förutom att bilderna av COCs togs i 4 plan och blastocysterna togs i 8 plan, se **bild 2**. Både den översta och understa delen av COCs och blastocysterna ställdes in manuellt och optiskt i mikroskopet. Antal plan ställdes in för de olika typerna och bilderna togs automatiskt i samma bildserie.

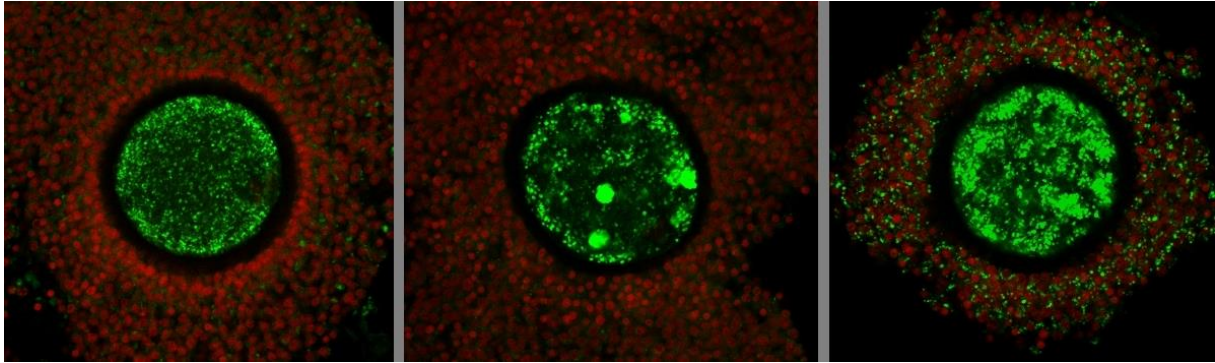


**Bild 2.** Bildserie av en och samma blastocyst. Ytterkanterna ställdes in manuellt och därefter togs bilderna automatiskt med samma avstånd mellan varje bild.

### Analys av de infärgade äggcellskomplexen

Varje fjärdedelsbild av äggcellskomplexen analyserades och bedömdes utifrån om de hade eller inte hade starkt fluorescerande fettdroppar och/eller kompakta fettkomplex, se **bild 3**.

Bedömningen av alla äggcellskomplex gjordes av samma person.

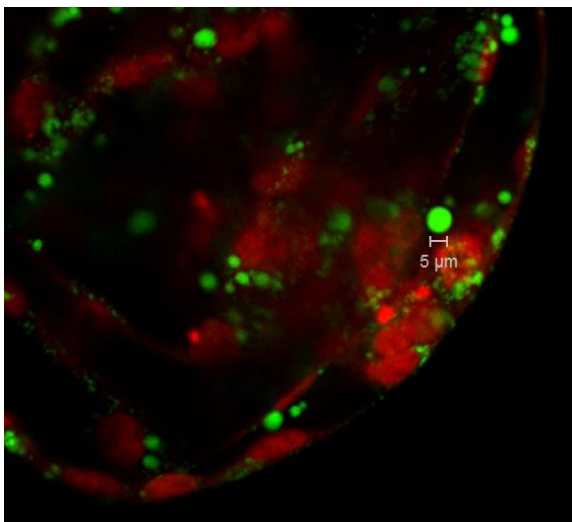


**Bild 3.** Bedömning av COC. Äggcell till vänster bedömdes vara normal. Äggcell i mitten bedömdes innehålla flertalet fettdroppar. Äggcell till höger bedömdes innehålla kompakta fettkomplex.

### Analys av de infärgade blastocysterna

Kontroll av blastocysternas morfologi och antalet cellkärnor genomfördes för att kunna exkludera de döda blastocysterna eller de som inte hunnit utveckla sig till blastocyster. Embryon som innehöll uppskattningsvis färre än 40 cellkärnor räknades inte som blastocyster och exkluderades.

De cirkulära, starkt fluorescerande fettdropparna som var 5  $\mu\text{m}$  eller större räknades i varje åttondelsbild av blastocysten, se **bild 4**. Varje droppe som inkluderades av kraven räknades oavsett lokalisation. Varje bild bedömdes enskilt utom i de fall där dropparna överlappade två bilder på grund av dess storlek. Vid klar misstanke om detta räknades inte den droppen i en av bilderna. Vid klar misstanke om detta räknades inte den droppen i en av bilderna. Bedömningen av alla blastocyster gjordes av samma person.



**Bild 4.** Fettdroppe hos blastocyst. Fettdroppen är större än 5  $\mu\text{m}$ , är tydligt cirkulär och starkt fluorescerande.

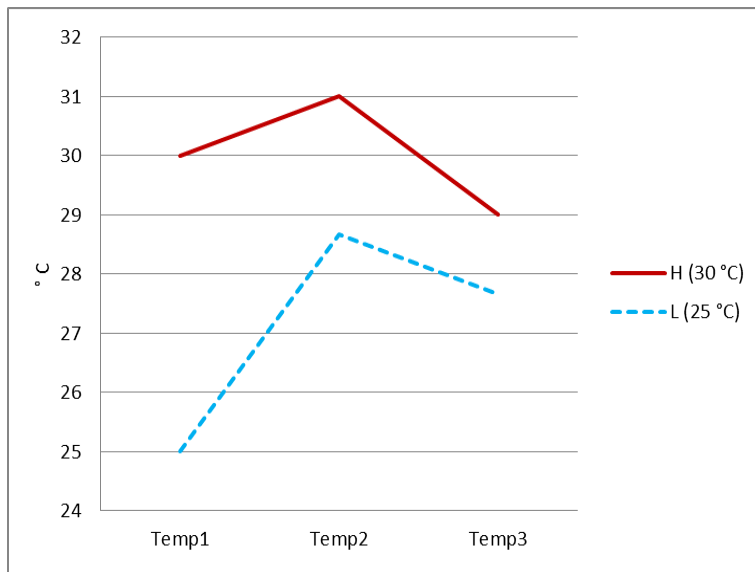
## Statistisk metod

Andelen äggceller som genomgått celldelning (klyvning) samt andelen embryon som fortsatt utvecklas till blastocyster analyserades statistiskt med logistisk regression (proc glimmix med binominal distribution, SAS 9.3, Milltown, USA) med omgång (batch) som slumpmässig faktor samt observationer på dag 7 och 8 som upprepade mätningar. Kontinuerliga variabler insamlade vid bildanalys (från konfokalmikroskopet) t ex antal kärnor, analyserades med en linjär mixed model med omgång (batch) som slumpmässig faktor. Behandlingens effekt på kvalitativa variabler (utvecklingsgrad, kvalitetsgrad respektive storleksklassificering på fettdroppar) analyserades med logistisk regression med multinominal distribution och kumulativ logit som funktionslänk (proc glimmix, även här med omgång (batch) som slumpmässig faktor). P-värden under 0,05 har bedömts som signifikanta. Data presenteras som medelvärden om inget annat framgår av beskrivningen.

## RESULTAT

### Transportmediets temperaturförändringar

Vid mätning av temperaturen på slakteriet efter insamling av äggstockar, hade innehållet i bägaren med hög temperatur (H) ökat i genomsnitt 1,0 °C till 31,0 °C, och innehållet i bägaren med låg temperatur (L) hade ökat i genomsnitt 3,7 °C till 28,7 °C. Vid mätning av temperaturen vid ankomst till laboratoriet hade innehållet i bägaren H minskat i genomsnitt med 2,0 °C till 29,0 °C, och innehållet i bägaren L hade minskat i genomsnitt med 1 °C till 27,7 °C, se **figur 3**. Ingen signifikant skillnad sågs mellan grupperna.



**Figur 3.** Den genomsnittliga temperaturförändringen hos transportmediet över tid. Temp1 är ingångstemperaturen, Temp 2 är efter insamling på slakteri, Temp 3 är vid ankomst

### Jämförelse av utvecklingen från äggcell till blastocyst

Ingen signifikant skillnad sågs mellan grupperna i utvecklingen från omogen oocyt till blastocyst på dag 8, se **tabell 1**.

### Bedömning av blastocysterna

På dag 8 gjordes en okulär bedömning av blastocysterna i ljusmikroskop där de delades in i vilken fas de utvecklats till, se **figur 4**, och kvalitén på dem, se **figur 5**. Det fanns en numerär tendens för H-gruppen att ha mer utvecklade blastocyster och bättre kvalitetsgradering men denna skillnad var inte signifikant.

Behandling	Antal expanderade oocyter <sup>1</sup>	Klyvningsantal <sup>2</sup> (%) <sup>3</sup>	Antal blastocyster <sup>4</sup> (%) <sup>5</sup>
H (30 °C)	185	163 (88,1 %)	43 (23,2 %)
L (25 °C)	176	156 (88,6 %)	39 (22,2 %)

**Tabell 1.** Utvecklingen av äggceller till blastocyster dag 8.

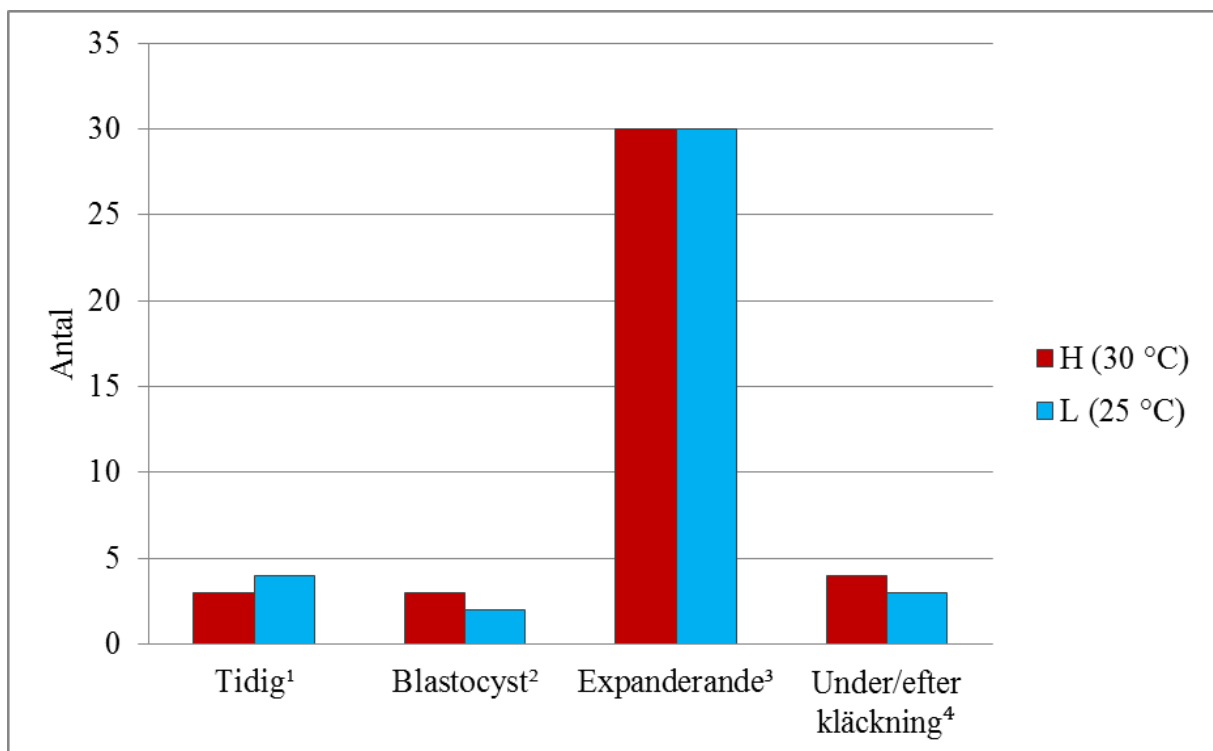
<sup>1</sup> Antalet expanderade oocyter som blev befruktade.

<sup>2</sup> Antalet befruktade oocyter som har delat sig dag 2.

<sup>3</sup> Andelen av de befruktade oocyterna som har delat sig dag 2.

<sup>4</sup> Antalet blastocyster som utvecklats till dag 8 efter befruktning.

<sup>5</sup> Andelen av de befruktade oocyterna som har utvecklats till blastocyster dag 8.



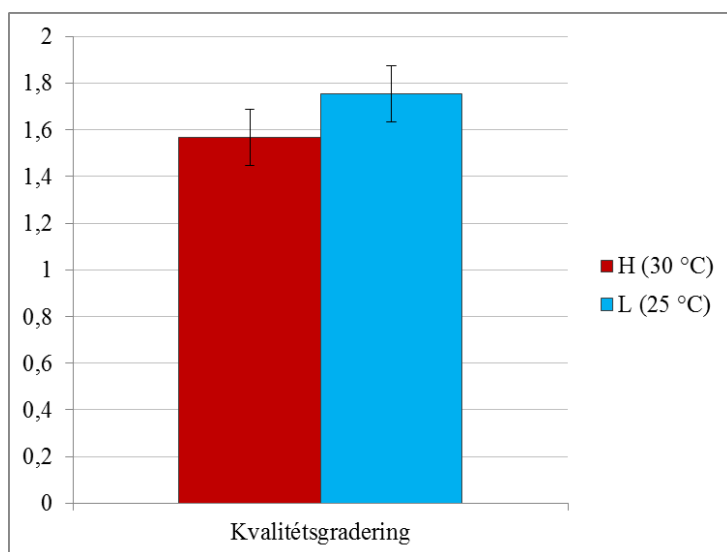
**Figur 4.** Bedömning av vilket utvecklingsstadium blastocysterna har nått till.

<sup>1</sup> Tidig blastocyst, det första stadiet.

<sup>2</sup> Blastocyst.

<sup>3</sup> Expanderande blastocyster eller blastocyster som förväntas inleda kläckning.

<sup>4</sup> Blastocyster som håller på att kläckas eller har kläckts.



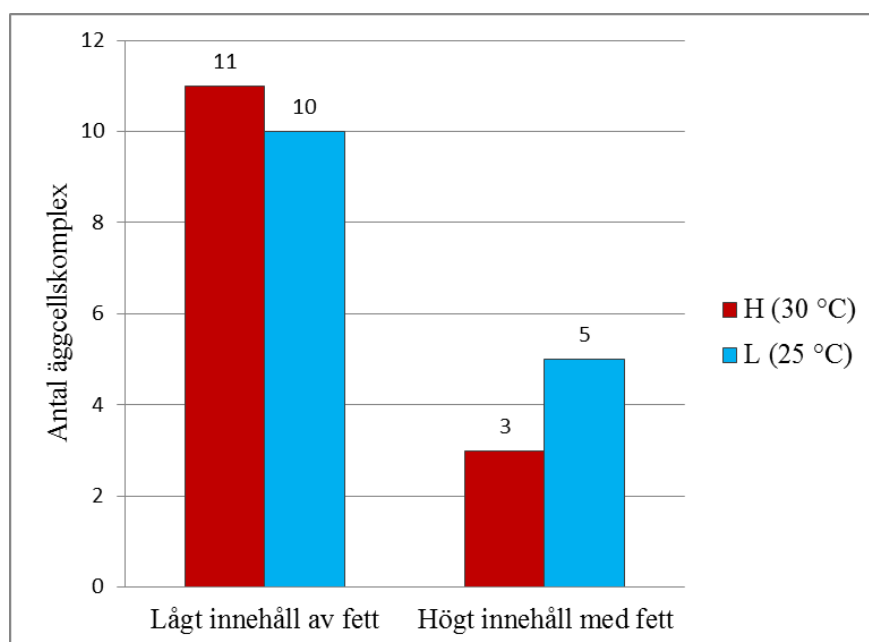
**Figur 5.** Bedömning av blastocysternas genomsnittliga kvalitet. Graderingen har följt skalan 1-4, där 1 är bäst och 4 är sämst. H-behandlingen gav gradering  $1,6 \pm 0,1$ , L-behandlingen  $1,8 \pm 0,1$ . Värdena är uppskattade medelvärden  $\pm$  medelfel.

### Analys av lipidinnehållet i äggcellskomplexen

5 av 15 blastocyster i gruppen som transporterats i 25 °C vätska, L-behandling, uppfyllde kriterierna för högt fetthinnehåll och 3 av 14 i gruppen som transporterats i 30 °C vätska, H-behandling, uppfyllde kriterierna, se *figur 6*.

### Analys av lipidinnehållet i blastocysterna

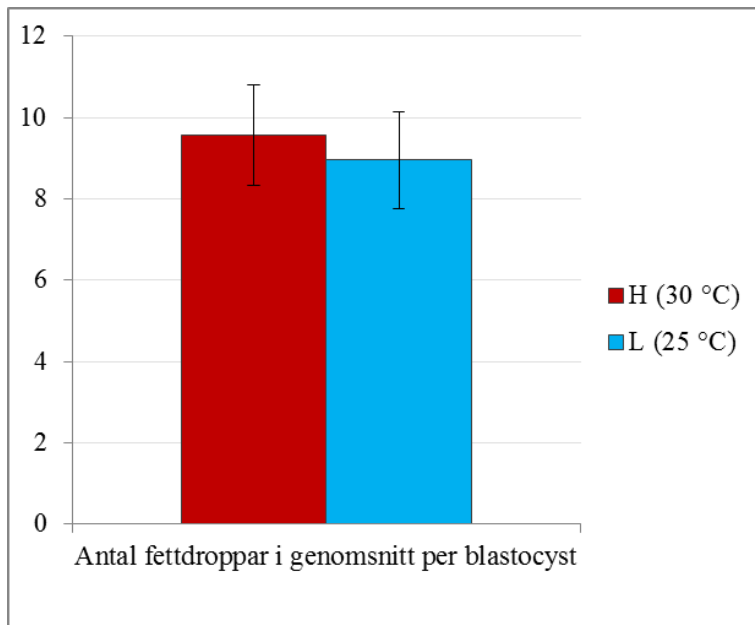
Det genomsnittliga antalet av fett droppar hos H-blastocysterna var 9,6 fett droppar per blastocyst och motsvarande hos L-blastocysterna var 9,0 fett droppar per blastocyst, se *figur 7*. Det fanns ingen signifikant skillnad mellan grupperna.



**Figur 6.** Antalet äggcellskomplex i respektive behandling som innehöll lågt respektive högt innehåll av fett.

## Utvärdering av LipidTOX

De områden hos blastocysten som LipidTOX färgade in, färgade även Nile Red in. Till synes avvek inte infärgningarna från varandra vad gäller vad de färgade in, dock så uppfattades LipidTOX ha tydligare kontrast och tydligare fluorescens.



**Figur 7.** Antalet fett droppar i genomsnitt per blastocyst i respektive behandling. Antalet fett droppar i H-gruppen var 9,6±1,2, L-gruppen 9,0±1,2. Värdena är uppskattade medelvärden ± medelfel.



## DISKUSSION

### Transportmediets temperaturförändringar

Redan vid 1 minuts förvaring i 25 °C så riskerar äggceller att påverkas negativt (det blir en form av stress för cellerna) och Aman *et al.*, 1994, fann att ungefär hälften av äggcellerna som utsätts för det får förändringar i sitt cellskelett. Dock så verkar äggstocken skyddande och det går att förvara äggstockar i 10 °C i 24 timmar utan att potentialen för äggcellerna att utvecklas vidare försämras (Matsushita *et al.*, 2004). Temperaturen i bågarna hölls inte aktivt på samma nivå, utan transporterades i termos och kylväska, vilket gjorde att de kroppsvarma äggstockarna påverkade temperaturen. Detta påverkade framför allt L-gruppen där temperaturen ökade mest i genomsnitt, innan avfärd från slakteriet. Skillnaden i början av transporten var därför mindre än vid starten av insamlingen och skillnaden vid ankomst till laboratoriet var dessutom ännu mindre, eftersom det varmare innehållet i H-termosen hade förlorat mest värme.

Även om temperaturerna närmade sig varandra under transporten så höll sig temperaturen i H-gruppen stabilare överlag.

Den största skillnaden och stressen är för de äggstockar som samlas in tidigt och läggs i L-termosen då temperaturen fortfarande är omkring 25 °C. Enligt Leese *et al.*, 2007, så måste man, för att maximera utvecklingen till blastocyst, minimera och undvika onödig stress och faktorer som kan orsaka stress.

### Jämförelse av utvecklingen från äggcell till blastocyst

Ingen signifikant skillnad, och endast en minimal skillnad, observerades mellan grupperna vad gäller hur stor andel av de befruktade oocyterna som utvecklades till blastocyster.

I en studie där de jämförde tre olika temperaturer, 15 °C, 25 °C och 35 °C, hos transportvätskan under en transport på 3-4 timmar av äggstockar från nötboskap, så fann de att det inte fanns någon signifikant skillnad med 15 °C och 25 °C, men en klar skillnad mellan 35 °C och de två andra grupperna, där 35 °C gav tydligt färre blastocyster (Wang *et al.*, 2011). Det kan vara så att miljön i äggstocken har möjlighet att skydda äggcellen i ett relativt vitt temperaturintervall under transport, men när man går utanför detta intervall, så ses en tydlig skillnad på COC:ernas utvecklingspotential.

Wongsrikeao *et al.*, 2005, fann liknande resultat i deras studie av oocyter från suggor att det inte fanns någon skillnad mellan två grupper av äggstockar som förvarats 6 timmar i 25 °C respektive 35 °C, däremot var det en tydlig skillnad mot den gruppen som förvarats 6 timmar i 15 °C och därmed producerat klart färre blastocyster.

### Bedömning av blastocysterna

Det var en liten tendens att enstaka blastocyster i H-gruppen hade utvecklats till högre stadie än blastocysterna i L-gruppen. Blastocysterna i H-gruppen fick även en marginellt bättre gradering. Dock så finns det en liten risk att högre utvecklade blastocyster får en bättre gradering per automatik, eftersom graderingen är subjektiv även om man utgår från strikta kriterier.

En mindre stressande miljö kan dock möjliggöra för embryona att lägga mera energi på sin egen utveckling och den lilla positiva tendensen i H-gruppen kan höra ihop med att temperaturen hos äggstockarna hålls mera stabil under transporten (Leese *et al.*, 2007).

### **Analys av lipidinnehållet i äggcellskomplexen**

För analysen så krävdes det fixering och infärgning som innebär att oocyterna var tvungna att tas ut ur den huvudsakliga studien. Det fanns ingen signifikant skillnad mellan grupperna men antalet äggcellskomplex som analyserades var mycket lågt och det är därför svårt att dra några långtgående slutsatser från resultatet.

Studier har visat att oocyter från nötboskap som innehåller mera fett har högre potential att utvecklas vidare och snabbare än oocyter med lägre andel fett (Jeong *et al.*, 2009), en anledning till detta kan vara att det först är möjligt för embryot att implantera sig i livmodern efter kläckning ur ZP, vilket tar 9-11 dagar efter ägglossningen (Gordon, 2003, s 223). Sturme *et al.* (2009) lägger fram en hypotes att fettrikheten hos däggdjurs oocyter speglar hur lång tid embryot måste vara självförsörjande innan implantation.

Awasthi *et al.* (2010), visade dock att graderingen av oocyter hörde ihop med mängden fett i deras studie. De fann att de oocyter som bedömdes ”dåliga” innehöll mera fett och fett droppar än de som bedömdes ”bra”.

I min studie så har ingen bedömning av oocyterna gjorts, så därför är det svårt att säga om fetthalten hos de fettrika oocyterna är normal eller för hög.

### **Analys av lipidinnehållet i blastocysterna**

Tendensen att blastocysterna i H-gruppen innehöll fler fett droppar kan stärka teorin att de ej behövde förbränna lika mycket energi för att motverka den möjliga stressen i att transporteras i en svalare miljö. Fett behövs för dess höga energiinnehåll, men för mycket fettinnehåll i embryot har visats predisponera för flera olika problem.

*In vivo* härkomna blastocyster innehåller fett droppar i både trofoblastcellerna och ICM-cellerna, men ej i överflöd (Abe *et al.*, 1999), vilket kan betyda att antalet fett droppar i både H- och L-gruppen ligger inom normalspannet.

Enligt Abe *et al.*, 2002, som lät embryon från nötboskap utvecklas i medium med extra fett, så innehöll blastocysterna fler fett droppar och innehöll mer fett än kontrollgruppen. Detta tillstånd visade sig höra ihop med omogna mitokondrier.

Mitokondrierna kan behöva bli stimulerade för att mogna ut genom att embryots endogena energireserver krävs för överlevnad, men ej i den grad att embryon svälter ihjäl innan implantation.

Den totala volymen av fett i embryot är det relevanta och storleken hos fett dropparna spelar stor roll för hur mycket fett det innehåller. Volymen hos ett klot med diametern 8  $\mu\text{m}$  motsvarar volymen hos 8 klot med diametern 4  $\mu\text{m}$  (Barceló-Fimbres *et al.*, 2011). Det har även visats att många av de större fett dropparna har en högre fettdensitet än mindre fett droppar (Abe *et al.*,

2002). Vilket betyder för att få en sann bild av embryonas fettinnehåll så behöver man analysera mera än bara antalet fettdroppar.

Fetma hos blastocyster orsakar även en mer teknisk nackdel, då embryon med ett större fettinnehåll klarar av en nedfrysning sämre. Ushijima *et al.*, 1999, visade genom att centrifugera bort det överflödiga fett hos feta blastocyster klarade de nedfrysning lika bra som blastocyster med ett normalt innehåll av fett.

### **Utvärdering av LipidTOX**

LipidTOX bedömdes vara likvärdig med Nile Red. LipidTOX uppfattades även vge en skarpere infärgning av de cellulära lipiderna. Den gröna färgen gav också en tydlig kontrast mot den röda kärninfärgningen med DraQ-5.

### **SLUTSATS**

Det finns ingen signifikant skillnad mellan den lägre transporttemperaturens påverkan på äggcellskomplexens och blastocysternas kvalitet och kvantitet jämfört med vad laboratoriet använt sig av hittills. Ingen tydlig tendens att någon av behandlingarna skulle vara överlägsen den andra har visats heller. Hypotesen att äggstockarna i den högre temperaturgruppen utsätts för mindre stress väger över åt dess fördel.

LipidTOX ger en tydlig infärgning av de cellulära lipiderna och är ett fullgott alternativ till andra fluorescerande färger som använts under lång tid.

## REFERENSER

- Abe, H., Yamashita, S., Itoh, T., Satoh, T., Hoshi, H. (1999). Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development*, 53, pp.325-335.
- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H. (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction and Development*, 61, pp.57-66.
- Aman, R.R., Parks, J.E. (1994). Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 50, pp.103-110.
- Auclair, S., Uzbekov, R., Elis, S., Sanchez, L., Kireev, I., Lardic, L., Dalbies-Tran, R., Uzbekova, S. (2013). Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *American Journal of Physiology*, 67, pp.599-613.
- Awasthi, H., Saravia, F., Rodríguez-Martínez, H., Båge, R. (2010). Do cytoplasmic lipid droplets accumulate in immature oocytes from over-conditioned repeat breeder dairy heifers? *Reproduction in Domestic Animals*, 45, pp.194-198.
- Barceló-Fimbres, M., Seidel Jr., G.E. (2011). Cross-validation of techniques for measuring lipid content of bovine oocytes and blastocysts. *Theriogenology*, 75, pp. 434-444.
- Blondin, P., Coenen, K., Guilbault, L.A., Sirard, M.-A. (1997). In vitro production of bovine embryos: Developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*, 47, pp.1061-1075
- Genicot, G., Leroy, J.L.M.R., Van Soom, A., Doonay, I. (2005). The use of a fluorescent dye, Nile Red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology*, 63, pp.1181-1194.
- Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos*. 2<sup>nd</sup> ed., Biotechnology in agriculture series; 27. Oxon, UK; Cambridge, MA: CABI Pub.
- Greenspan, P., Mayer, EP., Fowler, SD. (1985). Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology*, 100, pp.965-973.
- IETS, editors Stringfellow, D.A., Givens, M.D., (2010). *Manual of the International Embryo Transfer Society – a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures*. 4<sup>th</sup> ed. Savory, Illinois: IETS.
- IETS, collated by Perry, G. (2014). *Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals*. International Embryo Technology Society, Data Retrieval Committee. Tillgänglig: [https://www.iets.org/pdf/comm\\_data/December2015.pdf](https://www.iets.org/pdf/comm_data/December2015.pdf)
- Jeong, J., Cho, S.J., Lee, H.S., Deb, G.K., Lee, Y.S., Kwon, T.H., Kong, I.K. (2009). Effect of cytoplasmic lipid content of in vitro developmental efficiency of bovine IVP embryos. *Theriogenology*, 72, pp.584-589.
- Leese, H.J., Sturmey, R.G., Baumann, C.G., McEvoy, T.G. (2007). Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. *Human Reproduction*, 22, pp.3047-3050.
- Leroy, J.L.M.R., Opsomer, G., Van Soom, A., Goovaerts, I.G.F., Bols, P.E.J. (2008). Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. *Reproduction of Domestic Animals*, 43, pp.612-622.

- Mapletoft, R.J., Hasler, J.F. (2005) Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 24, pp393-403.
- Matsushita, S., Tani, T., Kato, Y., Tsunoda, Y. (2004). Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after in vitro fertilization, parthenogenetic activation or somatic cell nucleus transfer. *Animal Reproduction Science*, 84, pp.293-301.
- Munakata, Y., Ichinose, T., Ogawa, K., Itami, N., Tasaki, H., Shirasuna, K., Kuwayama, T., Iwata, H. (2016). Relationship between the numbers of cells surrounding oocytes and energy states of oocytes. *Theriogenology*, 86, pp1789-1798.
- Pedersen, H.G., Watson, E.D., Telfer, E.E. (2004). Effect of ovary holding temperature and time on equine granulosa cell apoptosis, oocyte chromatin configuration and cumulus morphology. *Theriogenology*, 62, pp.468-480.
- Sturme, R.G., Reis, A., Leese, H.J., McEvoy, T.G. (2009). Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction of Domestic Animals*, 44 (Suppl 3), pp. 50-58
- Sutmoller, P., Wrathall, A.E. (1997). A quantitative assessment of the risk of transmission of foot-and-mouth disease, bluetongue and vesicular stomatitis by embryo transfer in cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 32, pp111-132
- Ushijima, H., Yamakawa, H., Nagashima, H. (1999). Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. *Biology of Reproduction*, 60, pp.534-539.
- Wang, Y.S., Zhao, X., Su, J.M., An, Z.X., Xiong, X.R., Wang, L.J., Liu, J., Quan, F.S., Hua, S., Zhang, Y. (2011). Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the development competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science*, 124, pp.48-54.
- Wongsrikeao, P., Otoi, T., Karja, N., Agung, B., Nii, M., Nagai, T. (2005). Effects of ovary storage time and temperature on dna fragmentation and development of porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 51, pp.87-97.
- Yang N.S., Lu K.H., Gordon I. (1990). In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology*, 33, pp.352 ABSTRACT