

**Das Bioenergetische Profil präimplantativer
Rinderembryonen**

-

**Spezifische Effekte der In vitro Kultivierung und der
Kryokonservierung**

Dissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktorin der Agrarwissenschaften

(Dr. agr.)

der Landwirtschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

von

Jessica Patricia Kurzella, M.Sc.

aus Bonn

Bonn 2024

Referent:	Prof. Dr. Michael Hölker
Korreferentin:	Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein
Korreferent:	Dr. Ernst Tholen

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2024

Angefertigt mit Genehmigung der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn

für Barbara Kurzella (geb. Kopiec)

Abstract

A persistent theme in the in vitro production (IVP) of bovine embryos is an impaired developmental competence, which is evidenced by reduced cryosensitivity and lower implantation rates. It correlates with altered embryonic characteristics, including the energy metabolism. Effects of IVP and cryopreservation on mitochondrial functionality for energy production are currently not fully understood but would help to clarify the factors influencing embryonic viability in the future. Consequently, it was hypothesised in this study that mitochondrial functionality for energy production correlates with embryonic viability. To this end the bioenergetic profile, which depicts mitochondrial functionality, was determined in bovine embryos of various developmental competences. It was clarified to which extent the bioenergetic profiles differ 1) in IVP embryos compared to in vivo generated embryos, 2) due to faster vs. slower developmental kinetics of IVP embryos, 3) in cryopreserved compared to non-cryopreserved IVP embryos and 4) due to slow freezing vs. vitrification. The bioenergetic profile is based on the total oxygen consumption of embryos and was determined using the extracellular FLUX analysis (Seahorse XFp, Agilent) on bovine embryo groups. The individual parameters of the bioenergetic profile were measured by using the XF Cell-Mito Stress Test (Agilent). These include non-mitochondrial- and mitochondrial oxygen consumption, ATP-linked respiration and proton leakage related oxygen consumption. Additionally the determined efficiency of energy production, as well as the maximal mitochondrial respiration and the calculated spare capacity. The results showed that more developmentally competent IVP embryos had a comparable bioenergetic profile than embryos generated in vivo. However, developmental kinetics had a significant influence on the bioenergetic profile. Slowed morphokinetics, associated with lower developmental competence, led to reduced ATP-linked respiration and increased proton leakage related oxygen consumption, resulting in inefficient energy production. In addition the spare capacity was significantly reduced. Cryopreservation led to a reduction in mitochondrial respiration and spare capacity, while slow freezing additionally led to increased non-mitochondrial respiration. In summary, slowed developmental kinetics of IVP embryos as well as cryopreservation led to an altered bioenergetic profile characterised by reduced mitochondrial energy production and spare capacity, which correlates with reduced embryonic viability. A connection between the functionality of the embryonic mitochondrial pool and embryonic viability could be established via the bioenergetic profile. In the future, the bioenergetic profile could be used as a tool in basic research on embryonic viability to improve IVP and proving to be beneficial for cattle breeding.

Kurzfassung

Ein beständiges Thema in der In-vitro Produktion (**IVP**) von Rinderembryonen ist die beeinträchtigte Entwicklungskompetenz. Diese lässt sich durch eine verminderte Kryotauglichkeit und geringeren Implantationsraten nachweisen und korreliert mit veränderten embryonalen Eigenschaften, einschließlich des Energiestoffwechsels. Auswirkungen der IVP und der Kryokonservierung auf die mitochondriale Funktionalität zur Energieerzeugung, sind derzeit nicht vollständig geklärt, würden aber zukünftig zur Klärung der embryonalen Vitalität beitragen. Folglich wurde die Hypothese aufgestellt, dass die mitochondriale Funktionalität mit der embryonalen Vitalität korreliert. Hierzu wurde das bioenergetische Profil von Rinderembryonen verschiedener Entwicklungskompetenzen bestimmt und miteinander verglichen. Es wurde untersucht, inwiefern sich das bioenergetische Profil 1) in IVP-Embryonen vs. In-vivo erzeugten Embryonen, 2) durch eine schnellere- vs. eine verlangsamte Entwicklungskinetik von IVP-Embryonen, 3) in kryokonservierten vs. nicht-kryokonservierten IVP-Embryonen 4) durch das Slow Freezing vs. der Vitrifikation, unterscheidet. Das bioenergetische Profil basiert auf dem Gesamtsauerstoffverbrauch von Embryonen und wurde mittels extrazellulärer FLUX Analyse (Seahorse XFp, Agilent) an Rinderembryonen erfasst. Durch die Anwendung des XF-Cell Mito Stress Test (Agilent) wurden die einzelnen Parameter des bioenergetischen Profils bestimmt. Dazu gehören der nicht-mitochondrialen- und der mitochondriale-, der ATP-gebundene- sowie Proton Leak-bezogene Sauerstoffverbrauch. Weiterhin wird der maximale Sauerstoffverbrauch gemessen und sowohl die Effizienz der Energieerzeugung als auch mitochondriale Reservekapazität berechnet. Die ermittelten Ergebnisse zeigten, dass entwicklungs kompetente IVP-Embryonen ein vergleichbares bioenergetisches Profil aufwiesen wie In-vivo erzeugte Embryonen. Dagegen führte eine verlangsamte Entwicklungskinetik, assoziiert mit einer geringeren Entwicklungskompetenz zu einem reduzierten ATP-gebundenen Sauerstoffverbrauch und erhöhten Proton Leak-bezogenen Sauerstoffverbrauch, resultierend in einer ineffizienten Energieerzeugung. Zudem war die mitochondriale Reservekapazität deutlich reduziert. Eine Kryokonservierung führte zu einer Reduktion des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs und der mitochondrialen Reservekapazität. Das Slow Freezing Verfahren erhöhte zudem den nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine verlangsamte Entwicklungskinetik von IVP-Embryonen als auch die Kryokonservierung zu einem veränderten bioenergetischen Profil führen. Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen der Funktionalität des Mitochondrien Pools im Rinderembryo und der embryonalen Vitalität festgestellt werden. Zukünftig kann das bioenergetische Profil, als Werkzeug in der embryonalen Grundlagenforschung dienen, um die IVP zu verbessern, wovon letztendlich auch die Rinderzucht in der Praxis profitieren kann.

Kapitel 1: Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung der assistierten Reproduktionstechniken für die Rinderzucht ..	1
1.1.1 Die Bedeutung der künstlichen Besamung und des Multiple Ovulation Embryo Transfer (MOET).....	1
1.1.2 Die Bedeutung der in vitro Produktion (IVP) von Rinderembryonen.....	2
1.1.3 Die Bedeutung der Kryokonservierung von Rinderembryonen	3
1.2 Der Einfluss einer Kryokonservierung auf Rinderembryonen	4
1.2.1 Die Entwicklungsraten von Rinderembryonen nach Kryokonservierung	4
1.2.2 Einfluss einer Kryokonservierung auf die Morphologie und den Metabolismus von Rinderembryonen	6
1.3 Der Einfluss der IVP auf Rinderembryonen	8
1.3.1 Einfluss der IVP auf die Kryotauglichkeit von Rinderembryonen.....	8
1.3.2 Die Entwicklungsraten nach IVP von Rinderembryonen.....	10
1.3.3 Einfluss einer IVP auf die Morphologie und den Metabolismus von Rinderembryonen	11
1.4 Zusammenhänge zwischen dem Energiestoffwechsel und der Vitalität von Rinderembryonen	13
1.4.1 Der Energiestoffwechsel und die Vitalität von Rinderembryonen.....	13
1.4.2 Die mitochondrialen Charakteristika und die Vitalität von Rinderembryonen.....	15
1.4.3 Das bioenergetische Profil von Embryonen als Indikator für deren Vitalität	17
Kapitel 2: Zielsetzung	21
Kapitel 3: Manuskript I	22
Kapitel 4: Manuskript II	54
Kapitel 5: Allgemeine Diskussion & Schlussfolgerung	87
Kapitel 6: Zusammenfassung	101
Chapter 7: Summary	105
Referenzen	109
Danksagung	139
Publikationen & Konferenzbeiträge	140

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
BSA FAF	fatty acid free bovine serum albumin (fettsäurefreies bovines Serumalbumin)
COX1	Cytochrom-c-oxidase1
DNP	2,4-Dinitrophenol
DMNQ	2,3-Dimethoxynaphthoquinone
ECAR	extracellular acidification rate (extrazelluläre Ansäuerungsrate)
F	nicht-kryokonserviert
FAD / FADH₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCCP	Carbonyl-Cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GR	Geburtenrate
IR	Implantationsrate
IVP	In-vitro Produktion
MOET	Multiple Ovulation Embryo Transfer
mtDNA	mitochondrial desoxyribonucleic acid (mitochondriale Desoxyribonukleinsäure)
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP / NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NRF-1	Nuclear respiration factor-1
OCR	oxygen consumption rate (Sauerstoffverbrauchsrate)
OPU	Ovum Pick up
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PPP	pentose phosphate pathway (Pentose-Phosphat Weg)
RE	Re-expansionsrate
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
SF	Slow Freezing
SOF	Sythetic Oviduct Fluid
SR	Schlupfrate (Hatching)
TCA cycle	Tricarbonsäurezyklus
TE	Tag der Trächtigkeitserfassung
VT	Vitrifikation

Kapitel 1: Einleitung

1.1 Die Bedeutung der assistierten Reproduktionstechniken für die Rinderzucht

Assistierte Reproduktionstechniken sind in der heutigen Rinderzucht für den genetischen Zuchtfortschritt von großer Bedeutung und unterstützen das Reproduktionsmanagement in der landwirtschaftlichen Praxis (Holden and Butler, 2018; Baruselli et al., 2023). Zu den etablierten Techniken gehören die künstliche Besamung, der „Multiple Ovulation Embryo Transfer“ (MOET), die In-vitro Produktion (IVP) und die Kryokonservierung von Rinderembryonen.

1.1.1 Die Bedeutung der künstlichen Besamung und des Multiple Ovulation Embryo Transfer (MOET)

Die künstliche Besamung ist die erstmals durchgeführte assistierte Reproduktionstechnik zur Erzeugung einer Trächtigkeit beim Rind in der landwirtschaftlichen Praxis (Herman and Radsdale A.C., 1946). Diese Technik beinhaltet die Gewinnung und Kryokonservierung von Bullensperma und die Übertragung des Bullenspermas in den Reproduktionstrakt des weiblichen Rindes (Herman and Radsdale A.C., 1946; Parkinson and Morrell, 2019). Die künstliche Besamung bietet sowohl für die Wirtschaftlichkeit der Milch- und der Fleischrinderzucht als auch für die Tiergesundheit Vorteile. Einerseits sind die Kosten für die künstliche Besamung geringer als für Bullen im Natursprung (Overton, 2005), andererseits ist eine gezielte, räumlich und zeitlich unabhängige Anpaarung von genetisch wertvollen Mutter- und Vatertieren möglich, wodurch der genetische Zuchtfortschritt beschleunigt und die Übertragung von Geschlechtskrankheiten verhindert wird (Vishwanath, 2003).

Während die künstliche Besamung die Anzahl der Nachkommen von genetisch wertvollen Vatertieren erhöht, ermöglicht die MOET-Technik zusätzlich die Erhöhung der Anzahl an Nachkommen genetisch wertvoller Muttertiere (Layek et al. 2022). Der erste erfolgreiche Embryotransfer beim Rind wurde 1951 von Willet et al. durchgeführt (Betteridge, 1981). Für den MOET wird der Reproduktionszyklus des Rindes im Rahmen der Superovulation hormonell gesteuert und die Bildung multipler Follikel die gleichzeitig ovulieren, durch aufeinanderfolgende Injektionen von Follikel stimulierendem Hormon (FSH), möglich (Bó and Mapletoft, 2014). Anschließend wird das Rind künstlich befruchtet und die entstandenen Rinderembryonen durchlaufen die ersten embryonalen Teilungsstadien. Am siebten Tag nach der Besamung werden die Rinderembryonen aus dem Uterus des Rindes gespült und mittels Embryotransfer in zyklussynchronisierte Empfängertiere übertragen um die Entwicklung des

genetisch wertvollen Nachkommen fortzusetzen (McDaniel & Cassell, 1981; Wright, 1981; Granleese et al., 2015). Durch die multiplen Ovulationen erhöht sich die Anzahl an Nachkommen pro Zeiteinheit, wodurch sich das Generationsintervall verkürzen kann und wiederum der genetische Fortschritt zusätzlich zur künstlichen Besamung beschleunigt wird (Layek et al. 2022). Allerdings, nimmt seit 2006 die Anzahl der transferierten In-vivo erzeugten Rinderembryonen jährlich um ca. 4,0 % ab, wohingegen der Embryotransfer von In-vitro produzierten Rinderembryonen zwischen 2002 und 2005 kontinuierlich von ca. 600.000 auf über 789.972 transferierten Rinderembryonen angestiegen ist (Viana, 2022).

1.1.2 Die Bedeutung der in vitro Produktion (IVP) von Rinderembryonen

Mit dem im Jahr 1982 erstmals erfolgreich durchgeführten Embryotransfer und der Geburt des ersten In-vitro produzierten Kalbes, eröffnete sich eine weitere Technik der assistierten Reproduktion (Wrenzycki, 2023). Für die IVP von Rinderembryonen können Eizellen durch die ultraschallgestützte vaginale Oozytenaspiration am lebenden Tier, dem sogenannten „Ovum Pick Up“ (OPU), gewonnen werden (Pieterse et al., 1991). Die gewonnenen Kumulus-Oozyten-Komplexe werden dann einer In-vitro Maturation und einer In-vitro Fertilisation unterzogen, in diesen Prozessen reift die Oocyte heran und wird befruchtet. Die entstehende Zygote wird in ein In-vitro Kulturmedium überführt und durchläuft die Teilungsstadien bis zum transferfähigen Blastozystenstadium, welches sieben Tage nach der Befruchtung beim Rind erwartet wird (Wassarman 1987; Sutton-McDowall et al. 2012). Die Kommerzialisierung der IVP von Rinderembryonen hat in den letzten Jahren insbesondere in Nord- und Südamerika sowie Europa erheblich zugenommen (Viana, 2022). Ein Grund dafür ist die Unabhängigkeit dieser Technik vom Reproduktionszyklus des Tieres. Während die MOET-Technik nur bei zyklischen Färsen und Kühen angewendet werden kann, können die Kumulus-Oozyten-Komplexe mittels OPU auch bei präpubertären und frühträchtigen Tieren gewonnen werden (Kruip et al., 1994; Majerus et al., 1999; Lopes et al., 2006). Darüber hinaus kann die OPU-Technik im Gegensatz zur Embryospülung aus superovulierten Spendertieren häufiger pro Zeiteinheit durchgeführt werden, wodurch die Anzahl der mittels OPU-IVP generierten Rinderembryonen und die Anzahl der Abkalbungen pro Jahr höher ausfallen im Vergleich zur MOET-Technik (Layek et al., 2022).

1.1.3 Die Bedeutung der Kryokonservierung von Rinderembryonen

Die Zahl der kryokonservierten transferierten Rinderembryonen steigt kontinuierlich an, im Jahr 2021 waren etwa 60,5 % der In-vivo erzeugten und 41,3 % der In-vitro produzierten transferierten Rinderembryonen zuvor kryokonserviert (Viana, 2022). Die Kryokonservierung von Rinderembryonen ermöglicht einen räumlich als auch zeitlich unabhängigen Embryotransfer (Hasler, 2014). Darüber hinaus vereinfacht es den Handel mit genetischem Material sowie den Aufbau von Genreserven zur Erhaltung der genetischen Vielfalt (Boettcher et al., 2005; Woelders et al., 2012; Ferré et al., 2020a). Willadsen und Rowson unterzogen im Jahr 1973 Rinderembryonen dem konventionellen Einfrieren (Slow Freezing), resultierend in der erstmaligen Geburt eines Kalbes aus einem kryokonservierten Rinderembryo (Willadsen et al., 1978). Das konventionelle Einfrieren ist ein mehrstufiger Prozess unter Anwendung von Kryoprotektivum, um die Bildung intrazellulärer Eiskristalle zu verhindern. Bei einer Temperatur von -6 °C wird die Kristallisation des extrazellulären Mediums (Seeding) manuell ausgelöst. Anschließend erfolgt eine weitere Temperaturabsenkung auf -30°C und die Überführung in flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung (Willadsen et al., 1978; Wurth et al., 1994). Durch die von Willadsen et al. (1978) etablierte Möglichkeit des Direkttransfers von Rinderembryonen auf das Empfängertier wurde das Slow Freezing zum Standardverfahren für die Kryokonservierung von Rinderembryonen in der landwirtschaftlichen Praxis anerkannt (Willadsen et al., 1978; Dochi, 2019). Etwa zehn Jahre später wurden Rinderembryonen erstmalig erfolgreich dem Verfahren des ultraschnellen Einfrierens, der Vitrifikation, unterzogen (Massip et al. 1987). Bei der Vitrifikation wird eine hohe Konzentration verschiedener Kryoprotektiva in Kombination mit einer sehr hohen Einfriergeschwindigkeit durch sofortiges Überführen in flüssigen Stickstoff verwendet, wodurch der Embryo in einen amorphen, glasartigen Zustand übergeht (Fahy et al., 1984; Massip et al., 1987). Ein Direkttransferverfahren hat sich bisher noch nicht standardmäßig etabliert (Ferré et al. 2020b). Zusammenfassend sind assistierte Reproduktionstechniken wie der MOET und die IVP für die heutige landwirtschaftliche Praxis von Bedeutung, da sie auch einen Teilbeitrag zur Beschleunigung des genetischen Fortschritts bieten. Die Kryokonservierung von Rinderembryonen als Verfahren der assistierten Reproduktionstechniken ist für einen effizienten und wirtschaftlichen Einsatz des MOET und zukünftig der IVP von Rinderembryonen von Bedeutung (Hasler, 2014; Ferré et al., 2020a).

1.2 Der Einfluss einer Kryokonservierung auf Rinderembryonen

1.2.1 Die Entwicklungsraten von Rinderembryonen nach Kryokonservierung

Obwohl die Kryokonservierung für die assistierte Reproduktionstechnik beim Rind von Bedeutung ist, schränkt die resultierende reduzierte Entwicklungskompetenz den effizienten Einsatz ein (Ferré et al., 2020b). Die Entwicklungskompetenz wird definiert als die Fähigkeit von Embryonen die Stadien der Embryonalentwicklung erfolgreich zu durchlaufen und sich nach dem Embryotransfer auf ein Empfängertier zu einem lebensfähigen Nachkommen zu entwickeln (Rizos et al. 2002). Die Kryokonservierung, hier definiert als der Prozess des Einfrierens und Auftauens, beeinträchtigt die Entwicklungskompetenz von Rinderembryonen (Ferré et al., 2020b). Dies zeigt sich in der Vitalität von Rinderembryonen nach der Kryokonservierung, welche unter anderem durch die Parameter der Re-Expansion und des Schlupfs (Hatching) aus der Zona pellucida bestimmt werden kann. Weitere Parameter zur Beschreibung der Vitalität sind die Implantations- und Geburtenrate (Overström, 1996). Das Slow Freezing kann letal auf den In-vitro produzierten Rinderembryo wirken, dies äußert sich zum Beispiel in Re-Expansionsraten nach dem Erwärmen von 40 - 60 % (Nedambale et al., 2004; Yu et al., 2010; Vilamil et al., 2012) in Schlupfraten zwischen 30 - 60 % (Enright et al., 2000; Vilamil et al., 2012; Gómez et al., 2020) sowie um ca. 10 % reduzierten Implantations- und Geburtenraten (Hasler et al., 1995; Gimeno et al., 2021; Gómez et al., 2022). Ebenfalls kann die Vitrifikation letal wirken, wobei die Re-Expansionsraten zwischen 57 - 89 % liegen (Vilamil et al., 2012; Marsico et al., 2020). Vitrifizierte In-vitro produzierte Rinderembryonen weisen Schlupfraten von rund 60 - 70 % (Mahmoudzadeh et al., 1994; Nedambale et al., 2004; Vilamil et al., 2012). Nach Embryotransfer von vitrifizierten Rinderembryonen beträgt die Implantationsrate ca. 45 - 60 %, im Vergleich zu nicht-kryokonservierten, transferierten Rinderembryonen welche eine Rate von etwa 57 - 69 % erreichen (Gómez et al., 2020). Folglich führt das Slow Freezing zu niedrigeren Entwicklungsraten im Vergleich zur Vitrifikation (Mahmoudzadeh et al., 1994; Kaidi et al., 2001; Inaba et al., 2016). Weitere Studien, die diesen Zusammenhang unterstreichen sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Re-expansions- und Hatching Raten nach Kryokonservierung von In-vitro produzierten Rinderembryonen

Verfahren	RE (%)	SR (%)	Referenz
SF	-	49,0	<i>Kaidi et al., (2001)</i>
VT	-	55,0	
SF	40,0	22,0	<i>Nedambale et al., (2004)</i>
VT	64,0	54,0	
F	90,0	-	<i>Da Moreira Silva and Metelo, (2005)</i>
SF	39,0	-	
VT	27,0	-	
SF	16,7	12,0	<i>Mucci et al., (2006)</i>
VT	52,1	43,0	
SF	79,4	61,1	<i>Stinshoff et al., (2011)</i>
VT	81,1	63,2	
SF	49,6	-	<i>Inaba et al., (2016)</i>
VT	86,5	-	

Slow Freezing (SF), Vitrifikation (VT), Re-expansionsrate, 24h nach Kryokonservierung in % (RE), Schlupfrate, nach Kryokonservierung in % (SR)

Tabelle 2: Implantations- und Geburtenraten nach Kryokonservierung von In-vitro produzierten Rinderembryonen

Verfahren	TE (d)	IR (%)	GR (%)	Referenz
F		51,3	-	<i>Sanches et al., (2016)</i>
SF	30	40,2	-	
VT		35,9	-	
F	30	41,3	-	<i>Do et al., (2019)</i>
VT		40,0	-	
F		63,5	47,0	<i>Gómez et al., (2020)</i>
SF	40	59,5	45,0	
VT		53,0	53,0	
F	40	70,6	52,9	<i>Gimeno et al., (2021)</i>
SF		60,0	46,7	

nicht-kryokonserviert (F), Slow Freezing (SF), Vitrifikation (VT), Tag der Trächtigkeitserfassung (TE), Implantationsrate in % (IR), Geburtenrate in % (GR)

1.2.2 Einfluss einer Kryokonservierung auf die Morphologie und den Metabolismus von Rinderembryonen

Rinderembryonen sind in der Lage, sich an nicht-physiologische Entwicklungsumgebungen anzupassen (Besenfelder & Havlicek, 2023), wie beispielsweise einen Eingriff in den Entwicklungsprozess durch eine Kryokonservierung zu überleben und einen lebensfähigen Nachkommen hervorzubringen (Gimeno et al., 2021). Durch Reparaturmechanismen können Schädigungen durch die Kryokonservierung innerhalb von vier bis 24 Stunden teilweise behoben werden (Mohr and Trounson, 1981; Vajta et al., 1996; Hara et al., 2018). Trotzdem sind längerfristige negative Auswirkungen wie eine reduzierte Implantations- und Geburtenrate (Kapitel 1.2.1) sowie gesundheitliche Folgen auf die späteren Kälber, wie beispielsweise eine erhöhte Herzfrequenz und Krankheitsanfälligkeit, nachgewiesen (Gómez et al., 2022). Die Kryokonservierung führt zu morphologischen Beeinträchtigungen, welche mit einem veränderten Genexpressionsprofil sowie Energiestoffwechselaktivität korrelieren (Mohr and Trounson, 1981; Massip et al., 1987).

Dabei wirken sich die beiden Kryokonservierungsverfahren, das Slow Freezing und die Vitrifikation, unterschiedlich auf die embryonale Vitalität aus. Die schädigende Wirkung des Slow Freezing Verfahrens beruht auf die potentiell toxische Wirkung des Kryoprotektivums, zusätzlich kommt es zu inter- und extrazellulärer Eiskristallbildung (Valente et al., 2022). Die resultierenden morphologischen Veränderungen des Zytoskeletts von Rinderembryonen, darunter eine reduzierte Anzahl und Beschädigungen der Mikrovilli und Zellverbindungen sind nach Slow Freezing nachweisbar (Mohr & Trounson, 1981; Farin et al., 2001). Dies bedingt einen beeinträchtigten Nährstofftransport und -diffusion im Rinderembryo (Mohr & Trounson, 1981). Die Zelldiffusion wird auch durch eine reduzierte Porengröße und einem reduzierten Anteil der Porenoberfläche der Zona pellucida nach Slow Freezing nachweisbar (Da Moreira Silva & Metelo, 2005). Das Slow Freezing führt sowohl zu Schädigungen als auch zu einer reduzierten Anzahl von vitaler Trophektodermzellen und der inneren Zellmasse, korrelierend mit einem reduzierten Verbrauch von Energiesubstraten (Fair et al., 2001; Kaidi et al., 2001). Negative Auswirkungen des Slow Freezings betreffen auch Zellorganellen, wie Mitochondrien, die ein verändertes Erscheinungsbild der Cristea und der Matrix aufweisen (Fair et al., 2001). Zudem verringert sich die Anzahl an vitalen Mitochondrien nach Slow Freezing, beschädigte Mitochondrien werden elimiert, nachgewiesen durch einen vermehrten mitochondrialen DNA (**mtDNA**) Gehalt im Kulturmedium nach Kryokonservierung (Hayashi et al. 2019). Die reduzierte Anzahl an Mitochondrien korreliert mit einer verminderten Energieerzeugung, so

konnte eine Reduktion der oxidativen Phosphorylierung um rund 50 % nach Kryokonservierung festgestellt werden (Khurana & Niemann, 2000a). Die reduzierte **ATP**-Produktion nach Slow Freezing korreliert mit einer Reduzierung der Pyruvat- und Glukoseaufnahme (Gardner et al., 1996; Kaidi et al., 2001). Dies zeigt sich auch in einer veränderten Genexpression, so war zum Beispiel die Expression des Glukosetransporters – SLC2A1 reduziert (Stinshoff et al., 2011).

Die schädigende Wirkung der Vitrifikation beruht auf der potentiell toxischen Wirkung des Kryoprotektivums. Da die Eiskristallbildung durch die Ausbildung eines amorphen Zustandes vermieden wird, werden morphologische Schäden vermindert (Kuwayama et al., 1994; Mazur and Paredes, 2016). Dies spiegelt sich in einer höheren Anzahl vitaler Trophektodermzellen und innere Zellmasse wider und korreliert mit einem höheren Verbrauch an Energiesubstraten im Vergleich zum Slow Freezing (Kaidi et al., 2001). Im Vergleich zu nicht-kryokonservierten Rinderembryonen ist die Zahl vitaler Zellen nach Vitrifikation dennoch reduziert (Kaidi et al., 2001). Ebenfalls wie das Slow Freezing reduziert die Vitrifikation die Porengröße und den Anteil der Porenoberfläche der Zona Pellucida (Mohr & Trounson, 1981; Da Moreira Silva & Metelo, 2005; Yu et al., 2010) und führt zu einer veränderten Morphologie der inneren mitochondrialen Membran (Hara et al., 2018). Für die Glykolyse und den Lipidstoffwechsel relevante Gene sind unterschiedlich exprimiert, im Vergleich zu nicht-vitrifizierten Rinderembryonen (Stinshoff et al., 2011; Aksu et al., 2012).

Beide Kryokonservierungsverfahren führen zu morphologischen Veränderungen, allerdings im unterschiedlichen Ausmaß. Des Weiteren weist das Genexpressionsprofil nach Slow Freezing mehr differentiell exprimierte Gene auf als nach Vitrifikation (Stinshoff et al., 2011). Ebenfalls führt das Slow Freezing zu einer stärkeren Beeinträchtigung der Energiestoffwechselaktivität, im Vergleich zur Vitrifikation und zu nicht-kryokonservierten Rinderembryonen, nachweisbar durch einen geringeren Pyruvat- und Glukoseverbrauch (Kaidi et al., 2001). Insgesamt führt die Kryokonservierung zu einer veränderten Morphologie, einem veränderten Genexpressionsprofil und einer veränderten Energiestoffwechselaktivität der Rinderembryonen.

1.3 Der Einfluss der IVP auf Rinderembryonen

1.3.1 Einfluss der IVP auf die Kryotauglichkeit von Rinderembryonen

Das Ausmaß der Auswirkungen der Kryokonservierung (Kapitel 1.2) auf In-vitro produzierte Rinderembryonen, werden durch die In-vitro Entwicklungsumgebung beeinflusst (Hasler et al., 1995; Enright et al., 2000; Havlicek et al., 2010; Yu et al., 2010; Vilamil et al., 2012). In-vitro produzierte Rinderembryonen weisen im Vergleich zu In-vivo erzeugten Rinderembryonen eine verminderte Kryotauglichkeit, definiert als die Entwicklungskompetenz von Embryonen nach einer Kryokonservierung, auf. Dies wird durch reduzierte Re-Expansions-, Schlupf- und Implantationsraten von In-vitro produzierten Rinderembryonen im Vergleich zu In-vivo erzeugten Rinderembryonen nachweisbar (Hasler et al., 1995; Yu et al., 2010; Vilamil et al., 2012). In Tabelle 3 sind die Vitalitätsparameter nach Kryokonservierung in Abhängigkeit zur Entwicklungsumgebung dargestellt. Je länger der Rinderembryo In-vitro kultiviert wird, desto geringer fällt seine Kryotauglichkeit aus (Havlicek et al., 2010).

Die verminderte Entwicklungskompetenz nach Kryokonservierung von In-vitro produzierten im Vergleich zu In-vivo erzeugten Rinderembryonen, im Blastozystenstadium, zeigt sich anhand einer stärker ausgeprägten Schädigung des Zytoskeletts als auch anderen Zellorganellen, wie den Mitochondrien (Farin et al., 2001). Das Genexpressionsprofil wird nach einer Kryokonservierung in Abhängigkeit zur Entwicklungsumgebung verändert (Aksu et al., 2012; Sudano et al., 2013). So weisen In-vitro produzierte Rinderembryonen eine größere Anzahl differentiell exprimierter Gene nach Kryokonservierung auf, als In-vivo erzeugte Rinderembryonen (Aksu et al., 2012). Zudem ist die Aktivität des Energiestoffwechsels von In-vitro produzierten Rinderembryonen nach einer Kryokonservierung stärker beeinträchtigt, als bei In-vivo erzeugten Rinderembryonen (Khurana and Niemann, 2000a).

Eine verminderte Kryotauglichkeit von Rinderembryonen wird auch mit einem erhöhten Lipidgehalt und der Lipidzusammensetzung in Verbindung gebracht, die Membranschädigungen während der Kryokonservierung begünstigt (Kim et al., 2001; Mucci et al., 2006; Sudano et al., 2016; Janati Idrissi et al., 2021). Insbesondere Rinderembryonen, die in Medien mit erhöhter Serumkonzentration kultiviert wurden, zeigen eine erhöhte Lipidakkumulation und Empfindlichkeit gegenüber der Kryokonservierung auf (Abe et al., 1999b; Sata et al., 1999). Die Membranschädigung erfolgt durch eine Umverteilung von Phospholipiden in der Zellmembran, wodurch die Permeabilität und Diffusion für Moleküle

und die Elastizität der Zellmembran abnimmt (Amstislavsky et al., 2019). Zudem wird auch die Interaktion zwischen den Lipidtropfen und den Mitochondrien gestört, resultierend in einer Beeinträchtigung der Energiestoffwechselaktivität (Sudano et al., 2016). Folglich ist die Kryotauglichkeit in IVP-Rinderembryonen deutlich herabgesetzt im Vergleich zu In-vivo produzierten Rinderembryonen.

Tabelle 3: Vergleich der Vitalitätsparameter nach Kryokonservierung von In-vitro produzierten und In-vivo erzeugten Rinderembryonen

	Verfahren	RE (%)	SR (%)	IR (%)	GR (%)	Referenz
vivo	F	-	-	76,0	-	<i>Hasler et al. (1995)</i>
	SF	-	-	67,0	-	
vitro	F	-	-	59,0	-	
	SF	-	-	42,0	-	
vivo	SF	-	-	59,5	50,8	<i>Numabe et al. (2000)</i>
vitro	SF	-	-	41,3	34,1	
vivo	SF	72,0	77,0	-	-	<i>Enright et al. (2000)</i>
vitro	SF	11,0	0	-	-	
vivo	SF	62,2	16,2	-	-	<i>Stojkovic et al. (2002)</i>
vitro	SF	22,4	30,6	-	-	
vivo	SF	52,3	-	-	-	<i>Yu et al. (2010)</i>
	VT	63,4	-	-	-	
vitro	SF	46,9	-	-	-	
	VT	57,1	-	-	-	
vivo	SF	86,0	81,0	-	-	<i>Vilamil et al. (2012)</i>
	VT	85,0	71,0	-	-	
vitro	SF	40,0	20,0	-	-	
	VT	69,0	59,0	-	-	

Nicht-kryokonserviert (**F**), Slow Freezing (**SF**), Vitrifikation (**VT**), Re-expansionsrate, 24h nach Kryokonservierung in % (**RE**), Schlupfrate in % (**SR**), Implantationsrate in %, erfasst 60 Tage nach Brunst (**IR**), Geburtenrate in % (**GR**)

1.3.2 Die Entwicklungsraten nach IVP von Rinderembryonen

Während der IVP werden Teilungsraten von rund 70 – 80 % und Blastozystenraten von ca. 30 – 40 % erreicht (Rizos et al., 2003; Nedambale et al., 2004; Lonergan et al., 2016; Demetrio et al., 2020). Teilungs- und Blastozystenraten werden dabei sowohl durch die elterlichen Gameten, insbesondere der Qualität der Oozyte als auch unter anderem durch das In-vitro Kulturmedium beeinflusst (Rizos et al., 2003). Verschiedene laborabhängige IVP-Kulturmedien führen zu unterschiedlichen Entwicklungsraten (Tervit et al., 1972; Rosenkrans et al., 1993; Coy et al., 2022;) Kulturmedien mit erhöhten Serumkonzentrationen oder erhöhten Konzentrationen an Proteinquellen, wie bovines Serumalbumin (**BSA**) korrelieren mit höheren Blastozystenraten (Krisher et al., 1999; Stojkovic et al., 2002; Rizos et al., 2003). Beispielsweise erzielte die Studie von Rizos et al. (2003) höhere Blastozystenraten im Synthetic Oviduct Fluid (**SOF**) Medium und eine Supplementation mit 10 % Serum im Vergleich zu einem Zusatz von 16 mg/ml BSA oder auch 3 mg/ml BSA (39 % vs. 29 % vs. 27 %). Allerdings führen erhöhte Serumkonzentrationen im Kulturmedium zu einem verminderten Implantationserfolg (Lim et al., 2007). Implantationsraten, von rund 30 - 50 %, korrelieren mit dem verwendeten Kultur-medium und der Entwicklungskompetenz der Blastozyste (Farin et al., 1999; Lim et al., 2007). Vergleichend zu In-vivo erzeugten Rinderembryonen sind Implantationsraten nach IVP um rund 10 - 20% reduziert (Hasler et al., 1995; Pontes et al., 2009; Oliveira et al., 2020). In Tabelle 4 sind beispielhaft Implantationsraten zwischen In-vivo erzeugten und In-vitro produzierten Rinderembryonen dargestellt. Insgesamt sind die Entwicklungsraten nach IVP reduziert, wodurch sich die beeinträchtigte Entwicklungskompetenz der In-vitro produzierten Rinderembryonen darstellt.

Tabelle 4: Vergleich der Implantationsraten von nicht-kryokonservierten In-vitro produzierten und In-vivo erzeugten Rinderembryonen

	TE	IR (%)	Referenz
vivo	30	45,6	<i>Pontes et al. (2009)</i>
vitro		37,5	
vivo	23	58,8	<i>Siqueira et al. (2009)</i>
vitro		31,0	
vivo	60	65,5	<i>Oliveira et al. (2020)</i>
vitro		52,1	

Tag der Trächtigkeitserfassung (TE), Implantationsrate in % (IR %)

1.3.3 Einfluss einer IVP auf die Morphologie und den Metabolismus von Rinderembryonen

Die reduzierten Entwicklungsraten nach IVP resultieren aus der Anpassung der Rinderembryonen an die nicht-physiologische In-vitro Entwicklungsumgebung (Besenfelder & Havlicek, 2023; Bruna de Lima et al., 2023). Diese steht auch mit längerfristigen Auswirkungen in Verbindung wie zum Beispiel einer beeinträchtigten körperlichen Entwicklung, einem erhöhten Abort-Risiko sowie einem erhöhten Risiko übergewichtiger Föten und Kälber (Behboodi et al., 1995; McEvoy et al., 1998; Farin & Farin, 1995; Sangild et al., 2000; van Wagten donk-De Leeuw et al., 2000; Farin et al., 2006). Dabei stehen insbesondere Kulturmedien mit erhöhten Serumkonzentrationen im Verdacht, durch eine epigenetische Störung das „Large Offspring Syndrome“ zu begünstigen (Reis et al., 2003; Nava-Trujillo and Rivera, 2023). Der Einfluss der IVP auf Rinderembryonen zeigt sich in veränderten morphologischen und metabolischen Charakteristika.

Morphologische Veränderungen betreffen einen erhöhten Lipidgehalt und ein verändertes Lipidprofil (Sata et al., 1999). Dies wiederum korreliert mit der Kryotauglichkeit (Abe et al., 1999b; Amstislavsky et al., 2019). Weitere morphologische Abweichungen nach In-vitro Kultur zeigen sich in einer dünneren und poröseren Zona pellucida, in verkürzten Mikrovilli sowie Zellverbindungen und vergrößerten Intrazellularräumen (Abe et al., 1999b; Crosier et al., 2001; Farin et al., 2001; Soto-Moreno et al., 2021). Folglich ist bereits durch die IVP die Stabilität und der Flüssigkeitstransport zwischen den embryonalen Zellen beeinträchtigt und wird durch den Kryokonservierungsprozess verstärkt (Mohr & Trounson, 1981; Farin et al., 2001). Wichtige Prozesse, wie der Schlupf aus der Zona pellucida werden hierdurch negativ beeinflusst und korrelieren mit den verminderten Implantationsraten (Lopes et al., 2005; Hoelker et al., 2006; Huayhua et al., 2023). Die vorhandenen Mitochondrien weisen weniger stark aufgefaltete Cristea auf, was mit einer gestörten Energieerzeugung einhergeht (Abe et al., 1999b; Crosier et al., 2001; Farin et al., 2001; Rizos et al., 2002a; Czernik et al., 2022). Die Geschwindigkeit bis zum Erreichen eines Entwicklungsstadiums, die Morphokinetik auch als Entwicklungskinetik bezeichnet, korreliert mit der Entwicklungskompetenz des Rinderembryo (van Soom et al. 1997, Milazzotto et al. 2016). Sowohl zu schnelle als auch verzögerte embryonale Teilungen gehen mit einer verminderten Entwicklungskompetenz und Implantationsfähigkeit von Rinderembryonen einher (Lonergan et al., 1999; Ward et al., 2001; Milazzotto et al., 2016; Silva et al., 2016). Anhand des Zeitpunkts der ersten Teilung kann festgestellt werden, dass Zygoten die sich innerhalb von 26 - 32 Stunden nach der Fertilisation

zum Zwei-Zeller teilen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit das Blastozystenstadium erreichen (van Soom et al., 1997; Dinnys et al., 1999; Carrocera et al., 2016). Die Ausbildung der Blastozyste unterhalb von 155 Stunden nach der Fertilisation korreliert mit einer höheren Wahrscheinlichkeit des Schlüpfens (Huayhua et al., 2023). Des Weiteren zeigt sich, dass expandierte Tag 7 Blastozysten einen signifikant höheren Implantationserfolg nach Embryotransfer aufweisen als Blastozysten, die einen Tag später (Tag 8) expandieren (Hasler et al., 1995; Enright et al., 2000; Gimeno et al., 2021). Ein Einfluss der In-vitro Kulturmedien, vor allem erhöhter Serumkonzentrationen, auf die Entwicklungskinetik konnte aufgezeigt werden (Thompson et al., 1998; Gomez and Diez, 2000; Murillo et al., 2017).

In-vitro produzierte Rinderembryonen weisen im Vergleich zu In-vivo erzeugten Rinderembryonen ein verändertes Genexpressionsprofil auf, die die verminderte Entwicklungskompetenz widerspiegeln (Rizos et al., 2002b; Lonergan et al., 2003b; El-Sayed et al., 2006; Ghanem et al., 2011). Neben einer erhöhten Expremierung von Genen die mit oxidativem Stress und Apoptose korrelieren (Wrenzycki et al., 1999; Rizos et al., 2002a; Lonergan et al., 2003a; Gutiérrez-Adán et al., 2004; Gad et al., 2012), zeigen In-vitro produzierten Embryonen auch eine differentielle Expremierung von Genen, die eine entscheidende Rolle im Energiestoffwechsel besitzen (Lonergan et al., 2003a; Salilew-Wondim et al., 2021). Hierbei sind Gene, die mit dem Glukosetransporter - GLUT5, dem Lipidstoffwechsel und der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, darunter die ATP-Synthase, der NADH-Dehydrogenase und der Cytochrom-c-oxidase assoziiert sind, nach IVP differentiell exprimiert (Wrenzycki et al., 1996; Lonergan et al., 2003a; Gutiérrez-Adán et al., 2004; Gad et al., 2012; Noguchi et al., 2020; Salilew-Wondim et al., 2021). Untersuchungen des Energiestoffwechsels zeigen, dass die IVP einen Einfluss auf die Höhe der Energiestoffwechselaktivität und dem präferierten Energiesubstrat besitzt (Javed and Wright, 1991; Eckert et al., 1998; Khurana and Niemann, 2000b; Kaidi et al., 2001; Rizos et al., 2002a; Sturmey et al., 2010; Krisher and Prather, 2012; Souza et al., 2015). Die suboptimale In-vitro Entwicklungsumgebung führt zu einer erhöhten glykolytischen Aktivität (Khurana & Niemann 2000b; Kaidi et al. 2001), einer stärkeren Nutzung spezifischer Aminosäuren (Rieger et al. 1992a, Gardner et al. 1993, Partridge & Leese 1996) und Lipiden (Smith & Sturmey 2013; Andrade Melo-Sterza & Poehland 2021; Janati Idrissi et al. 2021). Die reduzierte Entwicklungskompetenz In-vitro produzierter Rinderembryonen korreliert mit einer veränderten Morphologie, einer zu raschen oder verzögerten Entwicklungskinetik, einem veränderten Genexpressionsprofil und einer veränderten Energiestoffwechselaktivität.

1.4 Zusammenhänge zwischen dem Energiestoffwechsel und der Vitalität von Rinderembryonen

1.4.1 Der Energiestoffwechsel und die Vitalität von Rinderembryonen

Der Energiebedarf von Embryonen steigt über den präimplantativen Entwicklungsverlauf an, korrelierend mit der steigenden Zellzahl, von den frühen Teilungsstadien bis hin zum Blastozystenstadium (Javed and Wright, 1991; Thompson et al., 1996b; Gardner et al., 2000; Guerif et al., 2013). In den frühen Teilungsstadien wird ATP zu über 95% über die oxidative Phosphorylierung bereitgestellt (Thompson et al., 1996a; Khurana and Niemann, 2000b;). Hierbei wird Pyruvat als bevorzugtes Energiesubstrat verstoffwechselt (Rieger et al., 1992; Thompson et al., 1996a; Guerif et al., 2013). Im Gegensatz dazu ist die glykolytische Aktivität und die Verstoffwechselung von Glukose zur Energieerzeugung mittels anaerober Glykolyse in diesen frühen Teilungsstadien gering (Javed and Wright, 1991; Thompson et al., 1996a; Khurana and Niemann, 2000b). Die Studie von Javed and Wright (1991) identifizierte, dass Glukose zu 93% in den Pentose-Phosphat Weg zur Synthese der Reduktionsäquivalente Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (**NADPH**) und Ribose-5-Phosphat eingeht. Mit der Kompaktierung im Morulastadium steigt der Energiebedarf an, dies ist sowohl an einem signifikanten Anstieg des Pyruvat- und Glukoseverbrauchs als auch an einem Anstieg der Laktatproduktion, dem Endprodukt der anaeroben Glykolyse ersichtlich (Thompson et al., 1996a; Guerif et al., 2013). Die anaerobe Glykolyse gewinnt mit der weiteren Entwicklung an Bedeutung und der Anteil der Reduktionsäquivalente ATP aus der oxidativen Phosphorylierung reduziert sich im Blastozystenstadium auf 86% (Javed and Wright, 1991; Thompson et al., 1996a; Guerif et al., 2013). Die gesteigerte glykolytische Aktivität haben Krisher and Prather (2012) mit dem Warburg Effekt in Verbindung gebracht, der für eine gesteigerte glykolytische Energieerzeugung steht und typisch für schnell proliferierende Zellen ist. Dieser Effekt begünstigt das Wachstum von Zellen, indem Glukose vermehrt zur Produktion glykolytischer Zwischenprodukte wie Ribose-5-Phosphat und NADPH dient, welche wiederum für den Aufbau von Nukleinsäuren und Lipiden als auch für die REDOX-Kontrolle von Bedeutung sind (Krisher & Prather 2012). Gleichzeitig bleibt die mitochondriale Energieerzeugung bestehen und weicht auf Aminosäuren und Fettsäuren als Energiesubstrat aus (Krisher & Prather 2012, Paczkowski et al. 2012, Guerif et al. 2013). Studien konnten nachweisen, dass insbesondere die β -Oxidation in den Mitochondrien für die Blastozystenbildung und das Schlüpfen der Blastozyste von Bedeutung ist (Ferguson und Leese, 1999; Ferguson und Leese, 2006; Jeong et al., 2009; Herrick et al., 2020).

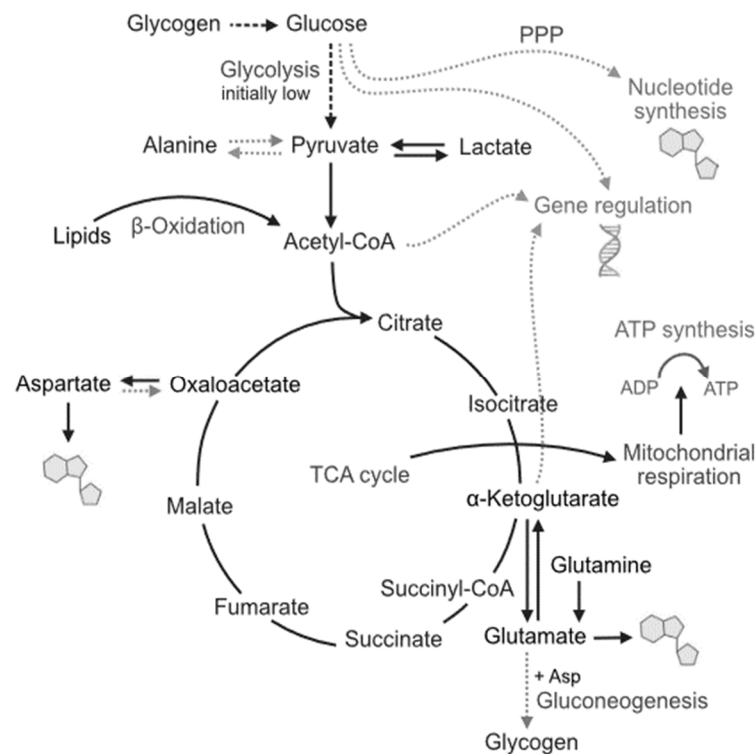


Abbildung 1: Energiestoffwechselwege über die pÄimplantive embryonale Entwicklung

Glykolyse: Im Zytosol lokalisierter Glukose Abbau Weg. Durch mehrere enzymatische Reaktionsschritte Bildung von Pyruvat und ATP. Pyruvat kann als Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus übergehen oder zu Laktat unter der Freisetzung von Protonen (H^+) umgewandelt werden. **Pentose-Phosphat-Weg (PPP):** Im Zytosol lokalisierter Glukose Abbau Weg, produziert NADPH und Ribose-5-phosphat. **Tricarbonsäure Zyklus (TCA cycle):** In den Mitochondrien lokalisierter Abbau Weg von Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidmolekülen, produziert **NADH** und **FADH₂** die in die OXPHOS eintreten. **Oxidative Phosphorylierung (OXPHOS):** An der Inneren Membran der Mitochondrien stattfindender Prozess zur ATP-Produktion unter Sauerstoffverbrauch (Abbildung 2). **β-Oxidation:** Lokalisiert in der mitochondrialen Matrix, dient zur Spaltung langkettiger Fettsäuren, als Nebenprodukt entsteht Acetyl-CoA welches in den TCA Zyklus übergeht (modifiziert nach, Ghosh et al. 2023).

Die Aktivität des Energiestoffwechsels reflektiert die embryonale Vitalität (Leese, 2002; Guerif et al., 2013; Leese et al., 2016). So postuliert die „quiet embryo hypothesis“, dass ein „ruhiger“ Energiestoffwechsel vorteilhafter ist: „...a low rather than high level of metabolism is more compatible with survival in early embryos.“ (Leese, 2002). Im Weiteren unterschieden die Autoren Leese et al. (2008) zwischen „functional quietness“ und „loss of quietness“. Die „functional quietness“ berücksichtigt den Energiebedarf von Embryonen in Relation zu dessen Entwicklungsstadium. Dieser ist, wie zuvor erläutert, in den frühen Teilungsstadien geringer als im Blastozystenstadium. Dagegen wird die „loss of quietness“ durch die Entwicklungsumgebung hervorgerufen, so führt eine suboptimale Entwicklungsbedingung zu einer übermäßig erhöhten Energiestoffwechselaktivität (Leese, 2002). Neuere Erkenntnisse

zeigen, dass die höchste Entwicklungskompetenz mit einem intermediären Energiestoffwechsel einhergeht, das „Goldilocks principle“ (Leese et al., 2016). Eine zu geringe Energiestoffwechselaktivität deutet auf eine mangelnde ATP-Bereitstellung für fortlaufende Entwicklungsschritte hin, wohingegen eine zu hohe Energiestoffwechselaktivität auf Stress hinweist (Guerif et al., 2013; Leese et al., 2016). Stress erhöht den Energiebedarf zum Abbau und zur Reparatur von Zellschädigungen (Tarazona et al., 2006; Guerif et al., 2013). In einer Studie ermittelten Guerif et al. (2013), dass ein intermediärer Pyruvatverbrauch zu höheren Blastozystenraten führte, im Gegensatz zu einem hohen oder niedrigen Pyruvatverbrauch (68,3% vs. 13,3% vs. 25,0%). Dies deckte sich mit der Beobachtung, dass ein intermediärer Sauerstoffverbrauch als Maßzahl der oxidativen Phosphorylierung mit der höchsten Implantationsrate in Verbindung steht (Lopes et al., 2007a). Eine Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung korreliert wiederum mit einer verminderten Vitalität der Blastozyste, was die Bedeutung der Mitochondrien verdeutlicht (Thompson et al., 2000; Tarazona et al., 2006). Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Aktivität des Energiestoffwechsels mit der Entwicklungskompetenz und damit mit der Vitalität von Rinderembryonen korreliert. Insbesondere die in den Mitochondrien angesiedelte oxidative Phosphorylierung ist dabei von grundlegender Bedeutung für die Bereitstellung der für die Entwicklung notwendigen Energie.

1.4.2 Die mitochondrialen Charakteristika und die Vitalität von Rinderembryonen

Die Vitalität von Rinderembryonen korreliert mit dessen Energiestoffwechselaktivität (Leese et al., 2016). Die Schnittstelle zur Energieerzeugung bilden die im Zytoplasma lokalisierten Mitochondrien, in denen Stoffwechselwege, wie der Tricarbonsäurezyklus, die β -Oxidation und die oxidative Phosphorylierung, stattfinden (May-Panloup et al., 2021). Neben ihrer primären Aufgabe zur Energieerzeugung, besitzen Mitochondrien weitere Funktionen in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostasen, der Induktion von Signalwegen und in dem programmierten Zelltod, die Apoptose (Harvey et al., 2002; Tarazona et al., 2006; Baldoceda und Robert, 2017). Mitochondriale Dysfunktionen beeinträchtigen diese Funktionen (Chappel, 2013; Baldoceda und Robert, 2017; Bruna de Lima et al., 2023). Begünstigt werden mitochondriale Dysfunktionen durch ein nicht balanciertes REDOX-Gleichgewicht, dem Verhältnis von Produktion und Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, **ROS**) begünstigt (Harvey et al., 2002; Brookes et al., 2004; Ramalho-Santos et al., 2009). Dieses REDOX-Gleichgewicht wird insbesondere durch eine suboptimale Entwicklungsumgebung beeinträchtigt (Brookes et al., 2004; Dalvit et al., 2005). Die ROS,

darunter das Superoxid Anion Radikal (O_2^-), das Hydrogen Peroxid (H_2O_2) und das Hydroxyl Radikal ($OH^\cdot$), entstehen unter anderem als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien (Guérin et al., 2001; Dalvit et al., 2005; Harvey, 2019). Einerseits besitzen ROS eine wichtige Rolle, weil diese als Signalmoleküle „second messenger“ fungieren und zelluläre Prozesse kontrollieren, wodurch so die embryonale Entwicklungskinetik gesteuert wird (Brookes et al. 2004; Harvey 2019). Andererseits, bedingen supraphysiologische ROS Gehalte oxidativen Stress, der sich negativ auf die embryonale Entwicklungskompetenz auswirkt (Johnson and Nasr-Esfahani, 1994). Supraphysiologische ROS Gehalte führen durch Veränderungen von Biomolekülen (Lipiden, Proteine und Nukleinsäuren) zu mitochondrialen Membranschädigungen, zu Mutationen der mtDNA und bedingen ultimativ auch die Apoptose (Matwee et al., 2000; Ramalho-Santos et al., 2009; Chappel, 2013). Veränderungen und Beeinträchtigungen an der mtDNA führen zu einer veränderten Aktivität des mitochondrialen Energiestoffwechsels, da Gene die für die Enzymkomplexe der Atmungskette codieren, sich auf der eigenen mitochondrialen 16 kbp großen zirkulären mtDNA befinden (Anderson et al., 1982; Plante and King, 1994; Tamassia et al., 2004). Die mtDNA der Embryonen entstammt aus einem kleinen Pool an Mitochondrien der Oozyte („bottle neck effect“), väterliche Mitochondrien werden nach Fertilisation eliminiert (Hutchison et al., 1974). Während der frühen Teilungsstadien ist der Rinderembryo daher auf die bereits vorhandene Anzahl und Kompetenz von Mitochondrien aus der Oozyte zur Energiegewinnung angewiesen, da die Gene für eine mitochondriale Biogenese erst ab dem 8/16-Zellstadium zum Zeitpunkt der embryonalen Genomaktivierung, transkribiert werden, was einem Anstieg des mtDNA Gehalts zum Blastozystenstadium bedingt (May-Panloup et al., 2005; Chiaratti et al., 2010). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Rinderembryonen mit einer geringeren Entwicklungskompetenz eine verminderte Expression von Genen aufweisen, welche mit der mitochondrialen Biogenese (Nuclear respiratory factor 1, **NRF1**) und Energieerzeugung (Cytochrom-c-oxidase 1, **COX1**) assoziiert sind (May-Panloup et al., 2005). Neben der mitochondrialen Biogenese ist ebenfalls die Mitophagie, die Fission geschädigter Mitochondrien (strukturell, mutierte mtDNA, Inaktivität im Energiestoffwechsel) für die mitochondriale Funktionsfähigkeit entscheidend (Fu et al., 2019; Harvey, 2019). Hierdurch und durch die Fähigkeit zur Fusion, der zum Austausch mitochondrialer mtDNA führt, wird die mitochondriale Funktion zum Erhalt der Energieerzeugung gefördert (Koklesova et al., 2022). Weiterhin ist die Migration der Mitochondrien zum Ort des Energiebedarfs von Bedeutung (Krisher und Bavister, 1998; Crosier et al., 2001; Tarazona et al., 2006). Eine Lokalisierung der Mitochondrien um den Zellkern, im Gegensatz zu einer diffusen und peripheren Anordnung,

korreliert mit einer verbesserten Entwicklungskompetenz von Rinderembryonen (Bavister und Squirrell, 2000; Tarazona et al., 2006). Die Deckung des Energiebedarfs entsprechend des jeweiligen Energieanspruchs in den verschiedenen Entwicklungsstadien von Rinderembryonen ist entscheidend (Tamassia et al., 2004; Bang et al., 2015; Fakruzzaman et al., 2015). Hierzu reifen kompetente Mitochondrien über den embryonalen Entwicklungsverlauf heran. So weisen Mitochondrien in den frühen embryonalen Teilungsstadien unreife, runde Mitochondrien mit unterentwickelten Cristea auf die mit einer geringen oxidativen Phosphorylierung korrelieren. Zum Blastozystenstadium hin können kompetente Mitochondrien elongieren und ausgeprägte Cristea ausbilden, was eine Steigerung der Energieerzeugung ermöglicht (Mohr und Trounson, 1981; Plante und King, 1994; Abe et al., 1999a; Crocco et al., 2011; Bang et al., 2015; Hayashi et al., 2021). Der standardmäßige Parameter zur Identifizierung der Aktivität der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung ist der Sauerstoffverbrauch von Embryonen (Gesamtsauerstoffverbrauch), der wie bereits zuvor erläutert (Kapitel 1.4.1) mit der Vitalität von Rinderembryonen korreliert (Hiroyuki Abe, 2007; Lopes et al., 2007b). Allerdings ist die Aussagekraft über die Aktivität der oxidativen Phosphorylierung anhand des Gesamtsauerstoffverbrauchs oberflächlich, da ebenfalls sauerstoffverbrauchende Prozesse außerhalb der Mitochondrien stattfinden und keinerlei Aussagen über das Kapazität und die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung getroffen werden können (Trimarchi et al., 2000; Chacko et al., 2014;). Eine detaillierte Aufschlüsselung des Gesamtsauerstoffverbrauchs, konnte in somatischen Zellen, bereits zur Identifizierung von mitochondrialen Dysfunktionen genutzt werden, die mit der Vitalität der somatischen Zellen und Erkrankungen des Individuums korrelieren (Chacko et al., 2014; Koklesova et al., 2022). Zusammengefasst heißt dies, dass Mitochondrien in Beziehung zur Vitalität von Rinderembryonen stehen. Darunter wird die Vitalität von Rinderembryonen mit deren Gesamtsauerstoffverbrauch in Verbindung gebracht, welcher im weitesten Sinne die oxidative Phosphorylierung widerspiegelt. Detaillierte Parameter des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs könnten jedoch zu einem besseren Verständnis mitochondrialer Dysfunktionen beitragen und Einflussfaktoren auf die embryonale Vitalität identifizieren.

1.4.3 Das bioenergetische Profil von Embryonen als Indikator für deren Vitalität

Das Bioenergetische Profil umfasst diverse Parameter welche die Energieerzeugung in den Mitochondrien kennzeichnet (Chacko et al., 2014). Diese Parameter basieren auf die Sauerstoffverbrauchsrate (oxygen consumption rate, **OCR**) der Zellen, (Chacko et al., 2014;

McKeegan und Sturme, 2015) Sauerstoff dient in den Mitochondrien als Endelektronenakzeptor der Enzymkomplexe der Atmungskette, beschrieben in Abbildung 2 (Brandt, 2022)

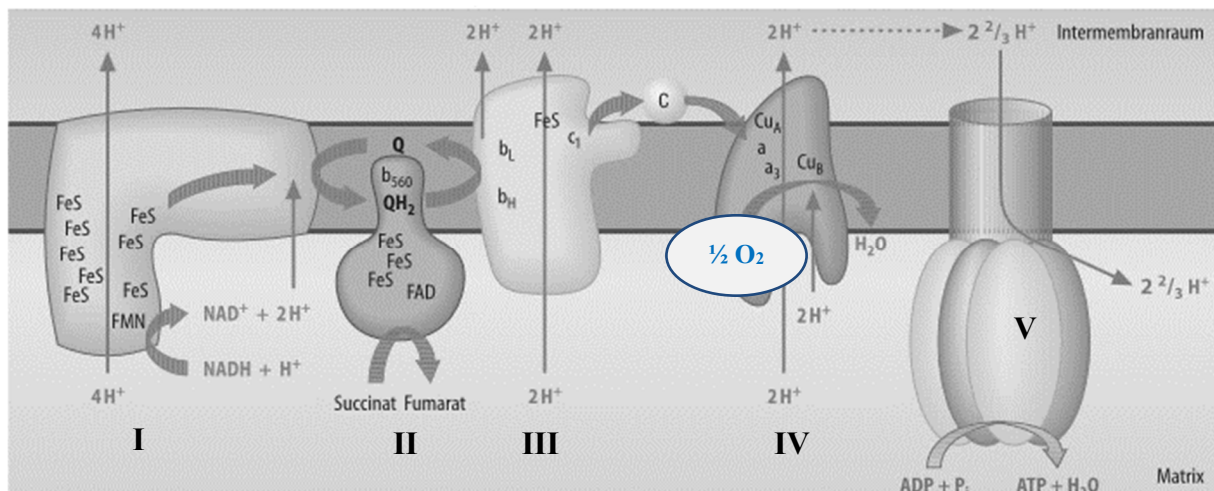


Abbildung 2: Die Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung im Mitochondrium

Dargestellt sind die vier Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung. Die Elektronen der Reduktionsäquivalente **NADH** und Flavin-Adenin-Dinukleotid (**FAD**) werden jeweils auf den I und II Enzymkomplex übertragen. Elektronen werden auf Enzymkomplexe III und IV überführt. Hierbei werden durch die Enzymkomplexe I, II & IV gleichzeitig Protonen aus dem Matrixraum in den Intermembranraum gepumpt, resultierend in einen Protonengradient, welcher zur ATP-Generierung genutzt wird. Sauerstoff reagiert als Endelektronenakzeptor in Komplex IV und wird verbraucht wobei Wasser entsteht (Quelle: modifiziert nach Brandt 2022).

Verschiedene Techniken zur Bestimmung des embryonalen Gesamtsauerstoffverbrauchs existieren. Angefangen von der „Cartesian Driver Technik“ (Friedhandler et al., 1957; Mills and Brinster, 1967) gefolgt von der Entwicklung der Mikrospektrophotometrie und Ultramikrofluoreszenz, welche auf der indirekten Bestimmung des Oxyhämoglobingehaltes (Magnusson et al., 1986) oder der Pyrenefluoreszenz beruhen (Houghton et al., 1996). Neuere Methoden verwenden Elektroden zur Messung des Gesamtsauerstoffverbrauchs, darunter die elektrochemische Scan Mikroskopie - SECM (Shiku et al., 2001), die Nanorespirometrie (Lopes et al., 2005) oder das „chip sensing embryo respiration monitoring system“ - CERM (Wu et al., 2007; Kurosawa et al., 2016). Eine weitere Technik ist die extrazelluläre FLUX Analyse (Seahorse XFp, CA USA), die auf eine fluorometrischen Bestimmung der Sauerstoffkonzentration beruht.

Durch mitochondrial wirksame Substanzen, die sich auf die Enzymkomplexe der Atmungskette auswirken, wie beispielsweise Natriumazid, Rotenone, Antimycin A, Carbonyl-

Cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (**FCCP**), Oligomycin oder 2,4-dinitrophenol (**DNP**) kann der Gesamtsauerstoffverbrauch in die einzelnen Parameter des bioenergetischen Profils aufgespalten werden (Thompson et al., 2000; Thompson and Peterson, 2000; Obeidat et al., 2018; Muller et al., 2019). Die Parameter des bioenergetischen Profils werden in Tabelle 5 beschrieben. Durch die Injektionstechnik der extrazellulären FLUX Analyse können Substanzen im Messverlauf injiziert und Auswirkungen in Echtzeit erfasst werden (Agilent).

In somatischen Zellen konnte das bioenergetische Profil, bereits zur Beurteilung der mitochondrialen Funktionalität, definiert als die Kompetenz der Mitochondrien zur Energieerzeugung, Anwendung finden (Koklesova et al., 2022). Es zeigte sich, dass verschiedene Erkrankungen beispielsweise des Herz-Kreislaufsystems, Diabetes oder Krebs mit mitochondrialen Dysfunktionen korrelieren und sich in einem veränderten bioenergetischen Profil widerspiegeln (Koklesova et al., 2022). In einer früheren Studie konnte beispielsweise an nicht vorbelasteten humanen Monozyten gezeigt werden, dass durch die Kultivierung mit der oxidativen Stress induzierenden Substanz 2,3-dimethoxynaphthoquinone (**DMNQ**), sich das bioenergetische Profil verändert (Chacko et al., 2016). Dabei führte der induzierte oxidative Stress zu einem erhöhten nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch, einer Reduktion des ATP-gebundenen- bei gleichzeitig erhöhtem Proton Leak-bezogenen Sauerstoffverbrauch und einer verminderten Reservekapazität der humanen Monozyten (Chacko et al., 2016). So könnte hypothetisch über das bioenergetische Profil von präimplantativen Embryonen, am Modellorganismus Rind, die mitochondriale Funktionalität zur Energieerzeugung beurteilt und Rückschlüsse auf die embryonale Entwicklungskompetenz gezogen werden. Hierzu wurde in erst kürzlich erschienen Studien, die technische Realisierung der Bestimmung des bioenergetischen Profils an präimplantativen Rinder-, Pferde, Human- und Mäuseembryonen mittels extrazellulärer FLUX-Analyse ermöglicht (Muller et al., 2019; Lee et al., 2022). Jedoch ist bislang unklar inwieweit das bioenergetische Profil, durch eine In-vitro Kultur und nach einer Kryokonservierung, beeinflusst wird und zur Erklärung der embryonalen Vitalität beitragen kann. Zusammengefasst, ermöglicht die Bestimmung des bioenergetischen Profils eine detaillierte Aufschlüsselung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung. In somatischen Zellen korreliert ein beeinträchtigtes bioenergetisches Profil mit einer mitochondrialen Dysfunktion, welche wiederum mit Erkrankungen des Individuums in Verbindung steht. Die Bestimmung des bioenergetischen Profils an präimplantativen Embryonen ist etabliert, jedoch besteht Forschungsbedarf hinsichtlich der Korrelation zwischen mitochondrialer Funktionalität zur embryonalen Vitalität.

Tabelle 5: Die Parameter des bioenergetischen Profils

Erläuterung der Parameter des bioenergetischen Profils zur Charakterisierung der mitochondrialen Gesundheit (modifiziert nach Hill et al., 2012; Chacko et al., 2014).

Parameter des bioenergetischen Profils	Beschreibung
Gesamtsauerstoffverbrauch	Der Sauerstoffverbrauch einer Zelle, der sich aus dem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und dem nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch zusammensetzt.
nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch	Der Anteil des Gesamtsauerstoffverbrauchs, der nicht mitochondrialen Ursprungs ist und durch andere zelluläre Enzyme verursacht wird, beispielsweise der zytoplasmatischen oder membranständigen NADPH-Oxidasen.
mitochondrialer Sauerstoffverbrauch	Der Anteil des Gesamtsauerstoffverbrauchs der Mitochondrien, welcher sich aus dem ATP-gebundenen Sauerstoffverbrauch und dem Proton Leak-bezogenen Sauerstoffverbrauch zusammensetzt.
ATP-gebundener Sauerstoffverbrauch	Der Anteil des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs, der mit der Produktion der Energieäquivalente ATP korreliert.
Proton Leak-bezogener Sauerstoffverbrauch	Der Anteil des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs, der nicht mit der Produktion der Energieäquivalente ATP verbunden ist. Bei diesem regulär stattfindenden Vorgang werden Elektronen über die Enzymkomplexe der Atmungskette geführt und auf Sauerstoff übertragen, aber Protonen tragen nicht zum Aufbau des Protonengradient und damit zur ATP-Synthese bei.
Effizienz der Energieerzeugung	Die Effizienz der Energieerzeugung, ist der prozentuale Anteil des ATP-gebundenen Sauerstoffverbrauchs am mitochondrialen Sauerstoffverbrauch. Je größer der Anteil des ATP-gebundenen Sauerstoffverbrauch, desto höher die Effizienz der Energieerzeugung und desto geringer der Proton Leak-bezogene Sauerstoffverbrauch.
maximaler Sauerstoffverbrauch	Der maximal höchste mitochondriale Sauerstoffverbrauch in der Zelle
mitochondriale Reservekapazität	Die noch vorhandene ungenutzte Kapazität der Zelle zur Energieerzeugung über die Mitochondrien, definiert als die Differenz zwischen maximalen- und mitochondrialen Sauerstoffverbrauch.

Kapitel 2: Zielsetzung

Die IVP und die Kryokonservierung von Rinderembryonen sind häufig angewendete Techniken in der landwirtschaftlichen Praxis und besitzen eine erhebliche Bedeutung für die Rinderzucht. Allerdings bedingen sowohl die IVP als auch die Kryokonservierung eine Reduktion der embryonalen Vitalität. Die embryonale Vitalität korreliert mit der Aktivität des embryonalen Energiestoffwechsels, wobei die Rolle des mitochondrialen Energiestoffwechsels im Kontext der embryonalen Vitalität derzeit nicht vollends geklärt ist. Die vorliegende Arbeit folgt der Hypothese, dass die embryonale Vitalität nach IVP und Kryokonservierung mit der mitochondrialen Funktionalität zur Energieerzeugung korreliert. Zur Klärung dieser Hypothese wurde deshalb das bioenergetische Profil von Rinderembryonen unterschiedlicher Entwicklungskompetenzen und deren Mitochondrien mit einer neuen Methodik, der extrazellulären FLUX Analyse, miteinander verglichen.

Im Detail wurde die vorliegende Studie geplant, um die postulierte Arbeitshypothese durch die Bearbeitung der folgenden Konzepte, zu überprüfen:

- 1.) Analyse des bioenergetischen Profils von IVP-Rinderembryonen im Vergleich zu In-vivo erzeugten Rinderembryonen und dessen Potential zur Erklärung der umweltbedingten embryonalen Vitalität
- 2.) Analyse des bioenergetischen Profils von IVP-Rinderembryonen mit schneller Entwicklungskinetik im Vergleich zu IVP-Rinderembryonen mit verlangsamer Entwicklungskinetik und dessen Potential zur Erklärung der embryonalen Vitalität
- 3.) Analyse des bioenergetischen Profils von IVP-Rinderembryonen nach Kryokonservierung im Vergleich zu nicht-kryokonservierten Rinderembryonen und dessen Potential zur Erklärung der kryobedingten embryonalen Vitalität
- 4.) Analyse des bioenergetischen Profils von IVP-Rinderembryonen nach Kryokonservierung mittels Slow-Freezing und Vitrifikation und dessen Potential zur Erklärung der kryoverfahrensbedingten embryonalen Vitalität.

Kapitel 3: Manuskript I

INTERPRETIVE SUMMARY

The mitochondrial respiration signature of the bovine blastocyst reflects both environmental conditions of development as well as intrinsic embryo quality *By Kurzella et al.* The energy metabolism is one way of explaining the effects of in vitro culture on embryo developmental competence, while mitochondrial functionality might explain the embryo viability. The bioenergetic profiles of bovine blastocysts with different developmental competence, was examined for embryo viability. Less competent in vitro produced blastocysts, characterised by a slower developmental kinetic, show a different bioenergetic profile compared to competent in vitro produced blastocysts and in vivo derived blastocysts. Reduced competence correlates with lower mitochondrial reserve capacity as well as high proton leak related oxygen consumption, which then reduces energy production efficiency.

Scientific reports; <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45691-2>

The mitochondrial respiration signature of the bovine blastocyst reflects both environmental conditions of development as well as intrinsic embryo quality

Kurzella, Jessica¹; Miskel, Dennis¹; Rings, Franca¹; Tholen, Ernst¹, Tesfaye, Dawit²; Schellander, Karl¹; Salilew-Wondim, Dessie^{1,3}; Held-Hoelker, Eva¹; Große-Brinkhaus, Christine¹; Hoelker, Michael^{3*}

¹ Institute of Animal Sciences, Animal Breeding, University of Bonn, Endenicher Allee 15, 53115 Bonn, Germany

² Department of Biomedical Sciences, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, 3105 Rampart Rd, Fort Collins, CO 80521, United States

³ Department of Animal Science, Biotechnology and Reproduction of farm animals, Georg August University Goettingen, Burckhardtweg 2, 37077 Goettingen, Germany

* Corresponding author:

Prof. Dr. med. vet. Michael Hoelker, Department of Animal Science, Biotechnology & Reproduction of farm animals, Buckhardtweg 2, 37077 Goettingen, Germany, Phone: +49 0551-3913945, E-Mail: michael.hoelker@uni-goettingen.de

Abstract

The major limitation of the widespread use of IVP derived embryos is their consistent deficiencies in vitality when compared with their ex vivo derived counterparts. Although embryo metabolism is considered a useful metric of embryo quality, research connecting mitochondrial function with the developmental capacity of embryos is still lacking. Therefore, the aim of the present study was to analyse bovine embryo respiration signatures in relation to developmental capacity. This was achieved by taking advantage of two generally accepted metrics for developmental capacity: I) environmental conditions during development (vivo vs. vitro) and II) developmental kinetics (day 7 vs. day 8 blastocysts). Our study showed that the developmental environment affected total embryo oxygen consumption while different morphokinetics, illustrating the intrinsic embryo qualities correlate with maximal mitochondrial respiration, mitochondrial spare capacity, ATP-linked respiration as well as efficiency of ATP generation. This respiration fingerprint for high embryo quality is reflected by relatively lower lipid contents and relatively higher ROS contents. In summary, the results of the present study expand the existing knowledge on the relationship between bovine embryo quality and the signature of mitochondrial respiration, by considering contrasting environments of development as well as different embryo morphokinetics.

Introduction

In recent years, the production and transfer of in vitro produced (IVP) embryos gained importance for the selection of genetically superior cattle and faster breeding success to support sustainable agriculture (Chair, 2021). One major limitation of the widespread use of IVP bovine embryos, however, is their deficiencies in terms of vitality compared with their ex vivo derived counterparts (Lonergan et al., 2003). More specifically, during the last decades, it has been demonstrated that IVP embryos differ morphologically, metabolically as well as on the molecular level from their in vivo produced counterparts, resulting in a lower viability. There is consensus that the development rate to the blastocyst stage is highly determined by the oocyte whereas the quality of the developed blastocysts depends on the surrounding environment, i.e. culture conditions (Lonergan et al., 2001). Unfortunately, no major improvements of culture conditions have been realised and thus, the success rates for the IVP of bovine embryos have not improved markedly over the last two decades. Embryo development rates remained on a constant level with blastocyst rates, rarely exceeding 40%, as reviewed by Lonergan and Fair (2016). Likewise, development to term after transfer of IVP bovine embryos did not increase within the last two decades, with rates ranging between 35-55% being significantly lower compared to pregnancy rates after the transfer of in vivo derived embryos, as reviewed recently by Hansen (2020). But not only blastocyst source (Vivo vs. Vitro), but also developmental kinetics of IVP derived embryos, correlates with pregnancy rates after transfer to recipients (Pribenszky et al., 2017). Bovine embryos cleaving earlier developed to the blastocyst stage at higher rates compared to those cleaving later (Wrenzycki et al., 2003). Accordingly, after freeze-thawing, fast developing IVP derived embryos reaching blastocyst stage on day 7 post fertilization result in significantly higher pregnancy rates after transfer to recipients compared to those reaching blastocyst stage no earlier than day 8 (Niemann et al., 1982). Although generally accepted, the mechanism behind this is not well understood. Taken together, the increasing importance of the IVP of bovine embryos in commercial cattle breeding programs demands improvement with respect to in vitro culture conditions to improve the viability of embryos derived from IVP. However, the mode by which contrasting environments of development and embryo morphokinetics determine or affect embryo quality or viability is barely studied.

Research of genetic factors shows a link between development and metabolic factors. In a previous study, bovine 2-cell stage embryos that developed to the blastocyst stage displayed a typical gene expression fingerprint relating to pathways involving energy metabolism and oxidative phosphorylation (Held et al., 2012). These results were further confirmed by follow-

up studies demonstrating typical expression trends of genes related to energy metabolism and oxidative phosphorylation both in individual bovine IVP embryos (El-Sayed et al., 2006) and in ex vivo derived embryos (Ghanem et al., 2011; Zolini et al., 2020). Importantly, genes related to energy metabolism and oxidative phosphorylation were not only differentially expressed between competent and non-competent embryos but also between ex vivo and in-vitro derived embryos (Salilew-Wondim et al., 2021). Therefore, embryo respiration might be the key to explain contrasting viabilities both for in-vivo vs. in-vitro derived bovine embryos as well as between early and late developing blastocysts.

Bearing in mind that oxidative phosphorylation takes place within mitochondria, it is not surprising that mitochondria became a recent focus of interest. Ge and colleagues, showed a relationship between mitochondrial characteristics and reproductive outcome (Ge et al., 2012). In agreement, studies demonstrated that differential regulation of mitochondrial genes between in vitro and in vivo derived blastocysts (Noguchi et al., 2020) and mitochondrial function was key in limiting embryonic development (Baldoceda and Robert, 2017). Studies enlightening interconnections between mitochondrial function and developmental capacity of oocytes and embryos are still lacking though. In that regard, several parameters of metabolism were suggested as usable biomarkers for prediction of embryonic quality, morphokinetics and developmental capacity (Thompson et al., 2016). However, studies dealing with direct metabolic comparisons between in vivo and in vitro derived embryos to establish a deeper understanding in terms of interdependencies between mitochondrial features and embryo viability are rare. Therefore, a closer look at mitochondrial respiration signatures might further explain contrasting viabilities of bovine embryos. Even earlier, several specific mitochondrial features, including mitochondrial respiration, mitochondrial spare capacity (maximal mitochondrial respiration related to mitochondrial respiration) and efficiency of ATP generation (ATP-linked respiration related to mitochondrial respiration) were proposed for gaining a deeper understanding of mitochondrial function during embryo development in mice, rabbits (Manes and Lai, 1995; Trimarchi et al., 2000) and the bovine (McKeegan et al., 2021; Thompson et al., 2000). Some of these mitochondrial parameters were recently shown to be determinable via an extracellular FLUX analyser (Muller et al., 2019). However, no study on bovine embryos has been conducted taking advantage of this useful technical option of analysing oxygen consumption signatures of bovine embryos representing contrasting developmental capacities so far.

Therefore, the aim of the present study was to analyse bovine embryo respiration signatures in relation to developmental capacity. This was achieved by taking advantage of two generally

accepted metrics for developmental capacity: I) environmental conditions during development (vivo vs. vitro) as well as II) developmental kinetics (day 7 vs. day 8 blastocysts).

Material and Methods

Experimental design

In this study, three experimental groups of bovine expanded blastocysts were generated. First, we collected fully in vivo-derived expanded bovine blastocysts (VIVO, n=32) generated by the artificial insemination of superstimulated Simmental heifers with the semen of a Holstein Friesian bull. The same bull was also used for in vitro fertilization (IVF). These were classified into in vitro derived embryos (IVP) of high intrinsic quality in case of development to the expanded blastocyst stage by day 7 (VITRO-HIGH, n=32). Conversely, embryos were classified into IVP embryos of low intrinsic quality if they reached expanded blastocyst stage at day 8 (VITRO-LOW, n=48). To analyse potential correlations between bovine embryo metabolic activity and embryo quality, two models for developmental capacity of bovine embryos were used: First, VIVO blastocysts (pools of 8, n=4 replicates) were compared with VITRO-HIGH (pools of 8, n=4) by an extracellular FLUX Analyzer (Seahorse XFp, Agilent) to analyse the effect of the environment. Secondly, VITRO-HIGH blastocysts were compared with VITRO-LOW (pools of 8, n=6). In any case, the extracellular FLUX Analyser was used to analyse the total embryo oxygen consumption rate (OCR) reflecting the extent of oxidative phosphorylation. After measurement of 20 cycles, a mitochondria stress test (XF Cell-Mito Stress Test Kit, Agilent) was used to analyse mitochondrial respiration, non-mitochondrial respiration, maximal mitochondrial respiration, proton leakage, mitochondrial spare capacity, ATP-linked respiration as well as efficiency of ATP generation.

In vivo embryo collection

To generate VIVO blastocysts, Simmental heifers (~440 kg) were subjected to a superovulation protocol. Synchronization was performed by administration of 500 mg of cloprostenol, i.m. (Estrumate). This treatment was repeated after 11 days. Two days after each of the cloprostenol treatments, cows received 0.02 mg of GnRH (Receptal). Twelve days after the last GnRH administration, cows received the first of eight consecutive administrations of FSH over the course of 4 days in decreasing dosages (in total, 300–400 mg of FSH equivalent according to body weight; Folltropin, Vetoquinol). At 60 and 72 h after the initial administration of FSH, cows received two treatments of cloprostenol. Finally, 48 h after the first of the two

cloprostenol applications, ovulation was induced by 0.02 mg of GnRH and heifers received a first insemination. Artificial insemination was repeated twice within a 12-h interval. Embryos were flushed out of the uterus from heifers that had undergone superovulation treatment 7 days after artificial insemination performed on the day of heat. Briefly, an embryo-flushing catheter (CH15; Wörlein) was fixed in the uterine horns. Subsequently, embryos were flushed out by draining each uterine horn with 500 ml of PBS + 5 % ECS. The uterus was flushed using a catheter connected with an embryo filter (Emconfilter 1; no. 04135; Immuno Systems Inc.). Embryos were washed twice in PBS and were evaluated by developmental stage. Only expanded blastocysts were used for further metabolic experiments.

In vitro embryo production (IVP)

Abattoir derived ovaries were collected and transported to the laboratory in insulated flasks containing 0.9 % saline solution (21-30°C). Upon arrival, cumulus oocyte complexes (COCs) were aspirated from small follicles (2–8 mm) and COCs with a homogenous, evenly granulated ooplasm, with oocytes surrounded by at least three layers of cumulus cells, were transferred to modified Tissue Culture Medium 199 (TCM; Sigma) supplemented with 4.4 mM HEPES, 33.9 mM NaHCO₃, 2 mM pyruvate, 2.9 mM calcium lactate, 55 µg m⁻¹ gentamycin, and 12 % (v/v) heat-inactivated ECS. After washing COCs three times, they were cultured in groups of 50 in 400 µl of modified Parker Medium supplemented with 10 µg ml⁻¹ FSH (FSH-p; Schering-Plough) at 38.8 °C in a humidified atmosphere with 5 % (v/v) CO₂ in air. Fertilization was performed in Fert-TALP medium (Parrish, 2014) supplemented with 20 µM penicillamine, 10 µl PHE (Hypotaurnine-Epinephrin-solution), 6 mg ml⁻¹ BSA-FAF, 50 µg ml⁻¹ gentamycin, and 1 µg ml⁻¹ heparin. For IVF, semen of the same sire as used for the generation of VIVO embryos was used. The final concentration of sperm in fertilization droplets was adjusted to 2 x 10⁶ sperm per millilitre. Following 18 h of coculture, the presumptive zygotes, after removal of cumulus cells and sperms, were washed three times and were transferred to in vitro culture. Embryo culture was performed in groups of 50-60 in humidified atmosphere with 5 % (v/v) CO₂ & O₂ in air at 38.8°C for up to 8 days in 400 µl of SOFaa medium (Holm et al., 1999) supplemented with 6 mg ml⁻¹ BSA-FAF overlaid with mineral oil, respectively. Only embryos that reached the expanded blastocyst stage by day 7 of culture (VITRO-HIGH) or later at day 8 (VITRO-LOW) were selected for further analysis.

Determination of embryo baseline oxygen consumption rate (OCR)

Oxygen consumption rates were determined by application of an extracellular FLUX Analyzer (Seahorse XFp, Agilent) capturing changes in oxygen concentration via fluorometric

measurement. Sensors containing Seahorse fluxpaks (Agilent Technology) were incubated overnight at 37°C in a non-CO₂ humidified incubator according to the manufacturer's recommendation. Prior to measurement, the pre-warmed cell plate containing biological material was loaded into the machine according to the manufacturer's recommendation. All 8 wells of the cartridge were filled with 180 µl of modified SOFaa medium supplemented with 4 mM glucose and 0.4 % BSA-FAF but lacking NaHCO₃ and Phenolred (SOF Seahorse). Among these, two plate specific 'blank' cell-free wells containing solely medium were used to account for environmental changes and flux of oxygen in the absence of cells, whereas 6 wells were used for the analysis of pools of 8 expanded blastocysts. To place expanded blastocysts in the correct position directly under the fluorophore sensor, embryos were caged through a custom prepared embryo positioning system (Suppl. figure 2). Briefly, the system consists of a custom prepared polyester mesh (150 µm mesh size, Labomedic) to avoid disaggregation of the embryos from the bottom of the well. The mesh was previously punched out by a biopsy punch (Ø 4 mm, mediware) and washed three times in SOFSeahorse. To further avoid movement of embryos from the center of the well to the periphery, a specific insert providing a free center area for the embryos was used (Suppl. figure 2). After the calibration according to the manufacturer's recommendation and equilibration (15 minutes), baseline measurement of embryo group OCR was determined using a protocol alternating between a 3-minute measurement period and a 30 second re-equilibration period (20 cycles). The measurement period involves the lowering of a sensor, creating a microchamber, for measurement. This is followed by a 30 second period in which the probe is lifted, and the 180 µl well re-equilibrates. The mean value of OCR per well (20 cycles) was noted and normalised to embryo per well as total embryo oxygen consumption given in pmol/min/embryo.

Measurement of mitochondrial oxygen consumption signature:

To determine mitochondrial respiratory characteristics, mitochondrial inhibitors (XF Cell-Mito-Stress Test Kit, Agilent) were loaded immediately before calibration. Briefly, mitochondrial inhibitors (Oligomycin, Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) and Rotenone/ Antimycin A) were dissolved in SOFSeahorse according to manufacturer's guidelines (XF Cell-Mito Stress Test Kit, Agilent). Inhibitors were diluted in warmed analysis media (SOF Seahorse) and loaded into the cell plate (injection ports A-C) within 30 minutes of starting the assay. Concentrations and volumes for mitochondrial inhibitors were 1.5 µM and 20 µl for Oligomycin (injection port A), 4.0 µM and 22 µl for FCCP (injection port B) and 2.5 µM and 25 µl for rotenone/antimycin A (injection port C). Serial

injection of (1) oligomycin, (2) FCCP, and (3) a combination of antimycin A and rotenone each separated by 5 measurement cycles was used for mitochondrial parameters (Supplementary Fig. 1). In detail, the difference between total embryo oxygen consumption and OCR after injection of oligomycin indicates ATP-linked respiration given in pmol/min/embryo. The OCR after injection of FCCP indicates the average maximal mitochondrial respiration per embryo (pmol/min/embryo). The OCR after injection of antimycin A and rotenone indicates the average non-mitochondrial respiration per embryo (pmol/min/embryo). Similarly, the difference in OCR between average total embryo oxygen consumption and average non-mitochondrial respiration per embryo indicates the average mitochondrial respiration per embryo (pmol/min/embryo). Finally, the difference between OCR values after injection of FCCP and after injection of antimycin A and rotenone indicates the average proton leakage per embryo (pmol/min/embryo). The proportion of mitochondrial respiration relative to total embryo oxygen consumption determines mitochondrial respiration (%). Similarly, the proportion of ATP-linked respiration relative to mitochondrial respiration determines the efficiency of ATP generation; and the proportion of maximal mitochondrial respiration relative to mitochondrial respiration determines mitochondrial spare capacity (%). In any case, OCR values (pmol/min) determined by the software of the seahorse XFp within the modified measurement wells (embryo cage) containing a pool of 8 embryos were corrected for volume with the factor 6.425 and divided by 8 to get the average OCR on embryo basis (pmol/min/embryo).

Quantification of embryonic reactive oxygen species (ROS)

Quantification of ROS content was done by using DCFDA (Sigma D-6883). Groups of 30 expanded blastocysts of VITRO-HIGH and 30 expanded blastocysts of VITRO-LOW, were incubated for 30 minutes in PBS containing 0.1 % PVA and 5 mM DCFDA, in the dark at 37°C. After three rounds of washing in PBS containing 0.1% PVA, brightfield and fluorescence pictures were taken by an inverted microscope (DM IRBLeica) and a digital camera (AxioCam ERc5s, Zeiss) of pools of ten expanded blastocysts with the help of a special software (ZenCore2 blue edition, Zeiss). Software settings were identical for subsequent stainings (objective x5, Time to take photo: 2000ms; Exposure 200s; Contrast: Black:0, Gamma: 1 and White: 255). The fluorescence intensities of embryos stained for ROS were analysed by ImageJ software (version 1.47; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and normalized to expanded blastocyst of VITRO-HIGH.

Quantification of embryonic lipid droplet content

To determine the lipid content of expanded blastocysts derived from different experimental groups, embryos were stained with Oil Red and were evaluated under a fluorescence microscope as described for cell cultures elsewhere. Briefly, a 0.5 % Oil Red (ORO; Sigma no. O0625) solution in isopropanol (100 %) was prepared as stock solution. For every use, Oil Red stock solution was diluted in distilled water (60 % : 40 %) to prepare an ORO working solution. For Oil Red staining, blastocysts were washed three times in PBS containing 1 % polyvinyl alcohol, followed by fixation in paraformaldehyde (4 %) for 2 min. Thereafter, fixed blastocysts were transferred to Oil Red working solution for 1 h at 25°C. Following that, expanded blastocysts were washed three times in PBS containing 0.1 % polyvinyl alcohol prior to taking photos with a phase-contrast microscope. Photos were taken with AxioCam ERc5 and Software ZenCore (Zeisse), under phase contrast (PH) with objective x10 (microscop DM IRB, Leica). The red area content related to the diameter of embryos stained for lipid droplets were analysed by ImageJ software (version 1.47; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and normalized to those of the VITRO-HIGH group.

Statistical Analysis

For data analysis, the Wave Software (Agilent) was used to convert data in an excel file followed by data analysis in R. XF Cell-Mito Stress Test mitochondrial parameters were determined according to manufacture guidance (Agilent). The following mitochondrial parameters were determined: basal embryo oxygen consumption can be separated in non-mitochondrial respiration and mitochondrial respiration. Moreover, determination of maximal respiration, proton leakage, ATP-linked respiration was possible and enables further calculation of relative mitochondrial spare capacity and ATP coupling efficiency. Results are reported as average OCR absolute values per embryo (raw data) given in pmol/min/embryo over time, standardised to VITRO-HIGH group (ratio) or reported as proportions relative to VITRO-HIGH group (%). To analyse differences between contrasting embryo groups in terms of different OCR values, analysis of variance (ANOVA) with bonferroni post hoc test was used. P-values $p < 0.05$ were considered significant. Pictures for quantification of ROS were analysed according to grey values and pictures for quantification of lipid droplets (Oil-Red stain) were analysed in relation to red area content by ImageJ software (version 1.47; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). In both cases, graphical estimation of normal distribution and the F-test for examination of variance homogeneity were used, followed by an unpaired t-test for pairwise comparison. Graphics are prepared with Graph-Pad Prism (Dotmatics).

Results

In total, 32 in vivo derived expanded blastocysts (EX) serving as the gold standard (VIVO) were allocated to pools of 8 embryos (n=4) for metabolic measurement. Contrastingly, 32 IVP derived embryos reaching expansion by day 7 (VITRO-HIGH), serving as the model for an alternative developmental environment, were also allocated to pools of 8 embryos (n=4). As a model for low intrinsic embryo quality (VITRO-LOW), 48 IVP derived embryos reaching blastocyst expansion after 8 days of culture (6 replicates, each 8 embryos). The entire outline for the measurement of oxygen consumption over time followed by metabolic testing via serial injections of Oligomycin, FCCP (Carbonyl cyanide-p- trifluoromethoxyphenylhydrazine) and Rotenone Antimycin A are illustrated in figure 1A.

Developmental environment affects total embryo oxygen consumption

The results of our analysis showed that developmental environment significantly ($p < 0.05$) affects total embryo oxygen consumption. Expanded blastocysts of group VIVO displayed 1.3-fold higher oxygen consumption rates (OCR) compared with both VITRO-HIGH and VITRO-LOW groups. In contrast, there was no difference between expanded IVP blastocysts of high and low quality (Figure 1B). When calculating the absolute OCR values of the embryo group on an average OCR value per embryo per well, average OCR per embryos of group VIVO consumed 0.81 ± 0.032 pmol O₂ per minute, whereas embryos of the VITRO-HIGH and VITRO-LOW groups consumed significantly lower amounts (0.61 ± 0.110 & 0.58 ± 0.068 pmol O₂ per minute and embryo, respectively) (Figure 1C).

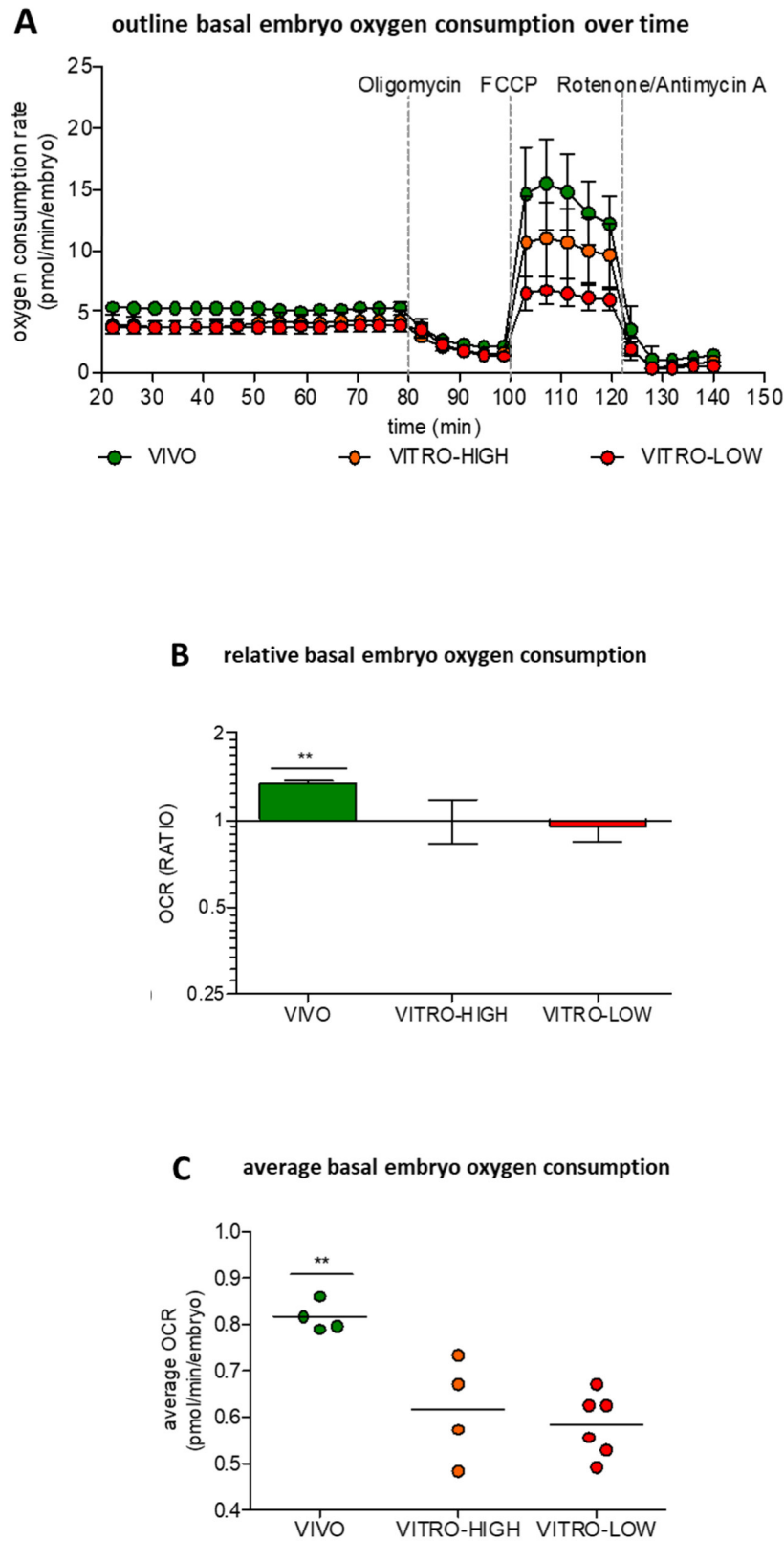


Figure 1: Total embryo oxygen consumption rate (OCR) of contrasting groups of expanded blastocysts (VIVO vs. VITRO-HIGH vs. VITRO-LOW) over time during stress test (A). Ratio of total embryo oxygen consumption (Mean $\pm$ SD, B) as well as total average oxygen consumption of one embryo (C) illustrates significant differences ($p < 0.05$) between embryos of contrasting groups.

Developmental environment and embryonic quality do not correlate with mitochondrial respiration

When dissecting total embryo oxygen consumption into mitochondrial and non-mitochondrial respiration via the mitochondrial stress test, the relative values for mitochondrial respiration of VIVO embryos tended to be higher compared to those of the VITRO-HIGH group (116.0 % vs. 100.0 %). Likewise, a higher embryo quality (VITRO-HIGH vs. VITRO-LOW) went along with slightly higher relative values for mitochondrial respiration (100.0 % vs. 90.2 %) as presented in figure 2A (as RATIO). Accordingly, the average mitochondrial respiration per embryo of the VIVO group was 0.707 ± 0.140 pmol per minute, higher than that of embryo of VITRO-HIGH and VITRO-LOW groups (0.609 ± 0.118 and 0.549 ± 0.041 pmol) as shown in Figure 2B. The mitochondrial proportion of total embryo oxygen consumption was similar for VIVO, VITRO-HIGH and VITRO-LOW, reaching 86.7 - 99.1 % (Figure 2C). Accordingly, absolute values for non-mitochondrial respiration (as RATIO) tended to be lower in embryos of both vitro groups compared to the vivo (Figure 2D). Likewise, average values for non-mitochondrial oxygen consumption per embryo tended to be similar for of the VITRO-HIGH group (0.041 ± 0.039 pmol/embryo/minute) and embryos of VITRO-LOW (0.054 ± 0.024 pmol/embryo/minute) while much lower than the VIVO group (0.123 ± 0.039 pmol/embryo/minute) as shown in figure 2E. Finally, the non-mitochondrial proportion of total embryo oxygen consumption was similar for VIVO, VITRO-HIGH and VITRO-LOW embryos (6.5 - 15.0 %) (Figure 2F).

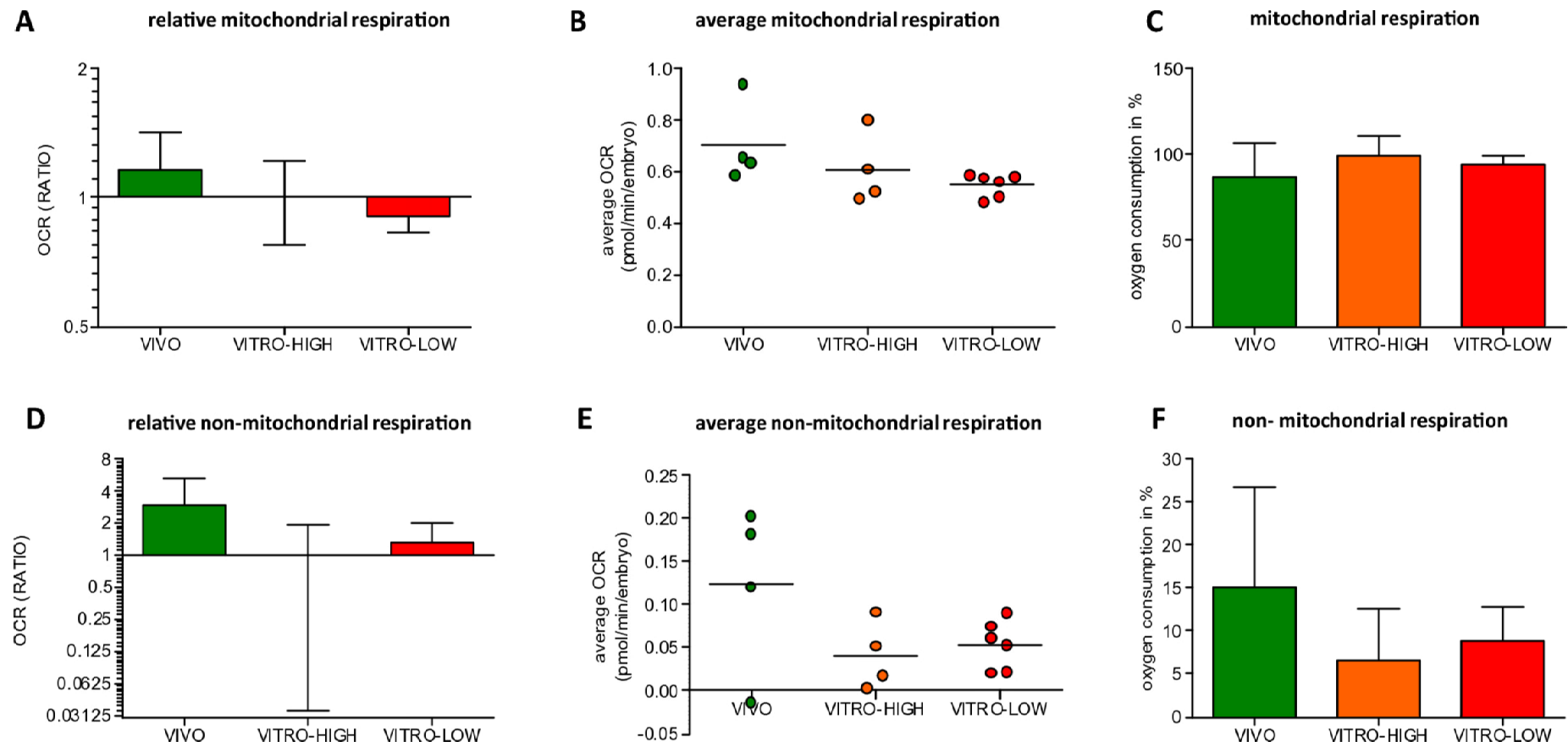


Figure 2: Ratio of mitochondrial respiration (Mean $\pm$ SD, A) as well as average mitochondrial respiration of one embryo (B) illustrates no difference between embryos of contrasting groups. Likewise, proportion of mitochondrial respiration relative to total embryo oxygen consumption (Mean $\pm$ SD) did not differ among groups (C). Ratio of non-mitochondrial respiration (Mean $\pm$ SD, D) as well as average non-mitochondrial respiration of one embryo (E) and proportion of non-mitochondrial respiration (Mean $\pm$ SD) relative to total embryo oxygen consumption (F) did not differ among groups.

Development environment and embryo quality influences the mitochondrial oxidative potential

The mitochondria of VIVO embryos consumed 1.7-fold ($p < 0.01$) more maximal oxygen compared with the mitochondria of VITRO-LOW embryos. Likewise, the mitochondria of the VITRO-HIGH group consumed 1.2-fold more maximal oxygen compared with those of VITRO-LOW embryos (Figure 3A). The average maximal respiration per embryo of the VIVO and VITRO-HIGH groups reached maximal mitochondrial respiration rates of 2.30 ± 0.628 and 1.70 ± 0.499 pmol per embryo and minute, respectively, but this difference was not statistically significant. Conversely, mitochondria of VIVO embryos reached a significantly higher ($p < 0.01$) average maximal oxygen consumption per embryo compared to mitochondria of VITRO-LOW embryos (2.30 ± 0.628 vs. 1.07 ± 0.195 pmol per embryo and minute, respectively) as indicated in Figure 3B. Further examination of mitochondrial respiration showed that mitochondrial spare capacity was not significantly different between VIVO and VITRO-HIGH groups (333.6 % vs. 279.0 %), whereas the VIVO group displayed a significantly higher mitochondrial spare capacity when compared with the VITRO-LOW group (333.6 % vs. 184.0 %, respectively). Moreover, there was a significant difference between embryos of VITRO-HIGH vs. VITRO-LOW (Figure 3C).

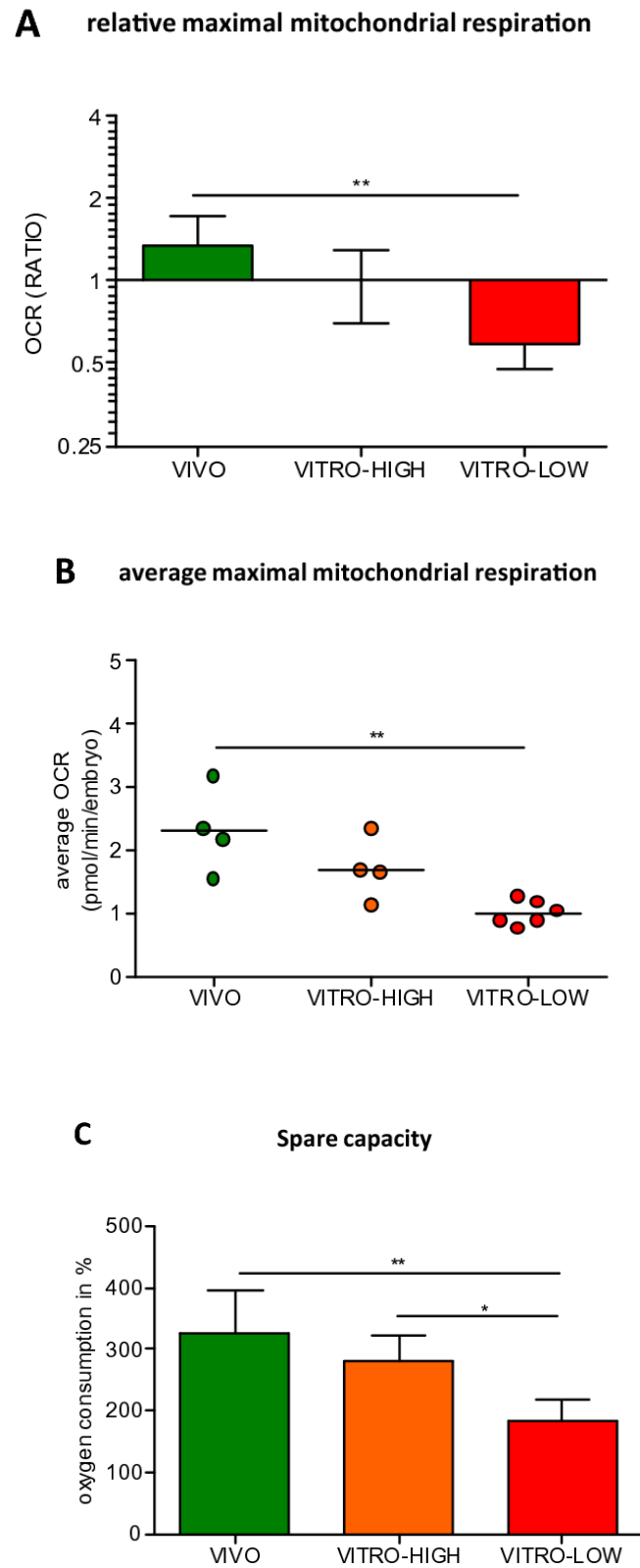


Figure 3: Ratio of maximal mitochondrial respiration (Mean $\pm$ SD, A) as well as average maximal mitochondrial respiration of one embryo (B) illustrates significant ($p < 0.05$) differences between embryos of contrasting groups. Likewise, the proportion of maximal mitochondrial respiration relative to mitochondrial respiration, termed as mitochondrial spare capacity (Mean $\pm$ SD) differed significantly among groups (C).

Embryo quality correlates with oxygen utilization for ATP-linked respiration and efficiency of ATP generation

Higher embryo quality (VITRO-LOW vs. VITRO-HIGH) went along with an approximately 1.3-fold higher oxygen consumption for ATP-linked respiration (Figure 4A). In detail, VITRO-HIGH group embryos utilized significantly ($p < 0.0001$) higher absolute average amounts of oxygen for ATP-linked respiration per embryo compared to the VITRO-LOW group (0.404 ± 0.109 vs. 0.068 ± 0.039 pmol per embryo and minute). In contrast, the average ATP-linked respiration per embryo of the VITRO-HIGH group did not differ from those of the VIVO group (0.404 ± 0.109 vs. 0.503 ± 0.048 pmol/embryo/minute) shown in figure 4A and 4B. Accordingly, the efficiency of ATP generation, defined as a proportion of ATP-linked respiration relative to basal mitochondrial respiration, did not differ between embryos of the VIVO and VITRO-HIGH groups (72.7 % vs. 66.1 %) as illustrated in Figure 4C. Embryos of the VITRO-HIGH group, however, demonstrated a significantly higher coupling efficiency compared to embryos of the VITRO-LOW group (66.1 % vs. 12.7 %), as shown in Figure 4C. Finally, when considering the efficiency of the metabolic activity of cells, there was no significant difference between the VIVO, VITRO-HIGH and VITRO-LOW groups in terms of the relative values for proton leakage (Figure 4D). Likewise, the average oxygen consumed due to proton leakage per embryo (0.204 ± 0.120 vs. 0.206 ± 0.078 vs. 0.154 ± 0.038 pmol per embryo and minute) and relative proton leakage to mitochondrial respiration did not differ between groups, as demonstrated in Figure 4E & 4F.

The content of intracellular lipids and reactive oxygen species reflect embryo quality

Quantification of lipid droplets revealed no difference between VIVO and VITRO-HIGH embryos (Figure 5A-C). Conversely, embryos of the VITRO-LOW group demonstrated higher mean values for lipid droplet accumulation ($p < 0.05$) compared to VITRO-HIGH embryos (Figure 5D-F). In contrast, analysis of ROS level showed higher relative ROS intensities in embryos of the VITRO-HIGH group compared to embryos of the VITRO-LOW group ($p < 0.05$), as presented in Figure 6.

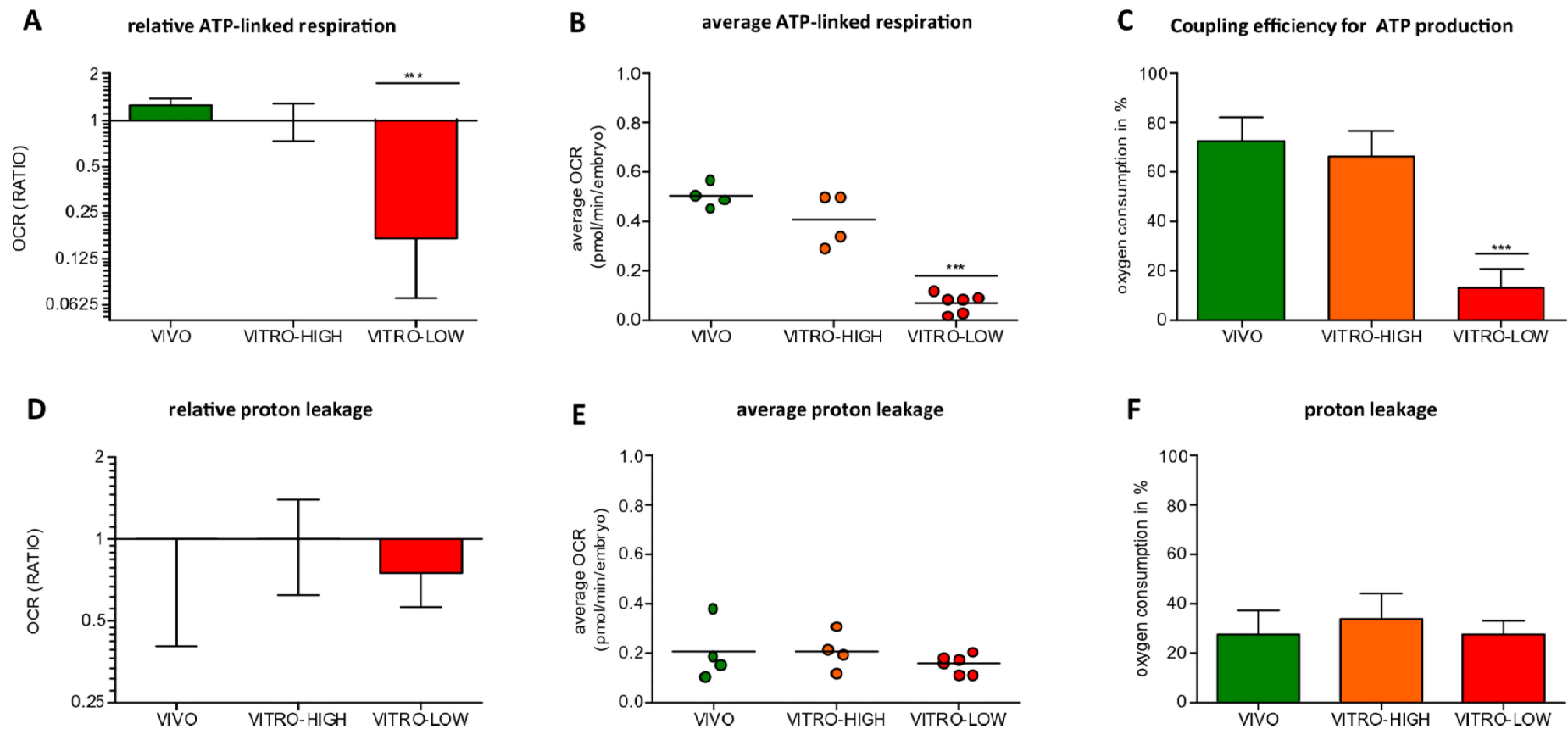


Figure 4: Ratio of mitochondrial respiration utilized for ATP generation (ATP-linked respiration) (Mean $\pm$ SD, A) as well as average ATP-linked respiration of one embryo (B) illustrates significant ($p < 0.05$) differences between embryos of contrasting groups. Likewise, proportion of ATP-linked respiration, termed efficiency of ATP generation (Mean $\pm$ SD) differed significantly among groups (C). Ratio of mitochondrial respiration lost by proton leakage (Mean $\pm$ SD, D) as well as average mitochondrial respiration lost by proton leakage of one embryo (E) and proportion of mitochondrial respiration lost by proton leakage (Mean $\pm$ SD) relative to mitochondrial respiration, termed relative proton leak, (F) did not differ among groups.

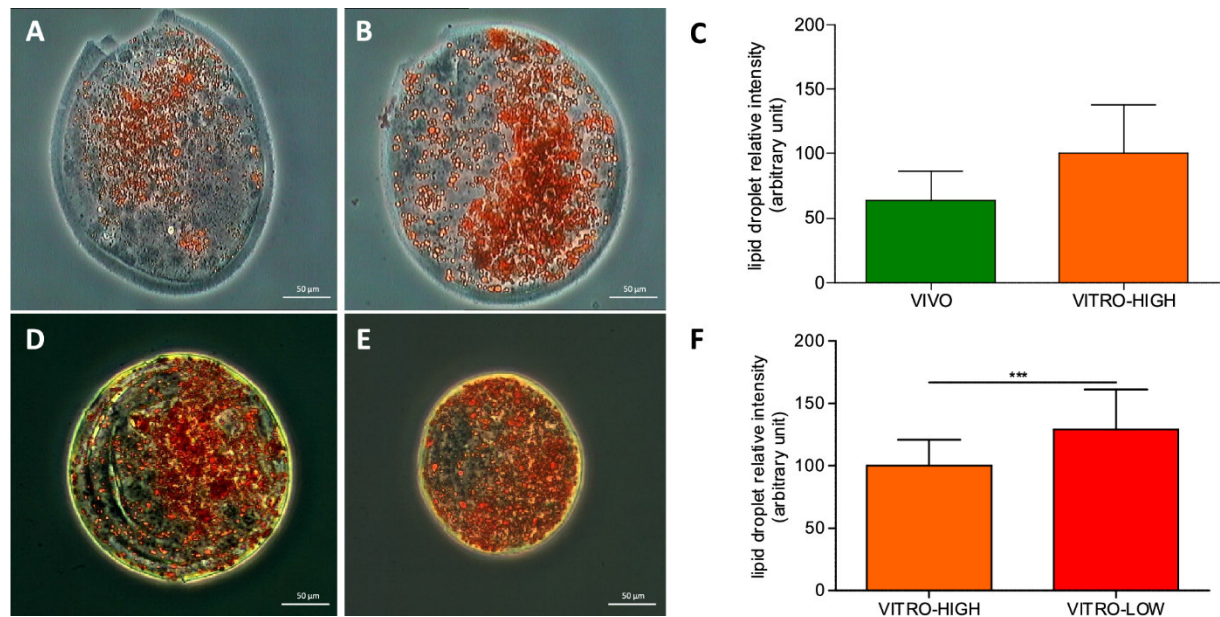


Figure 5: Representative pictures of embryos of VIVO (A) and VITRO-HIGH (B) groups stained for quantification of lipid droplets (Oil-Red). Ratio of lipid droplets (Mean $\pm$ SD) did not show any difference (C). Representative pictures of embryos of VITRO-HIGH (D) and VITRO-LOW (E) groups stained for quantification of lipid droplets. Ratio of lipid droplets (Mean $\pm$ SD) were significantly lower ($p < 0.05$) in embryos of VITRO-HIGH compared to VITRO-LOW groups (F).

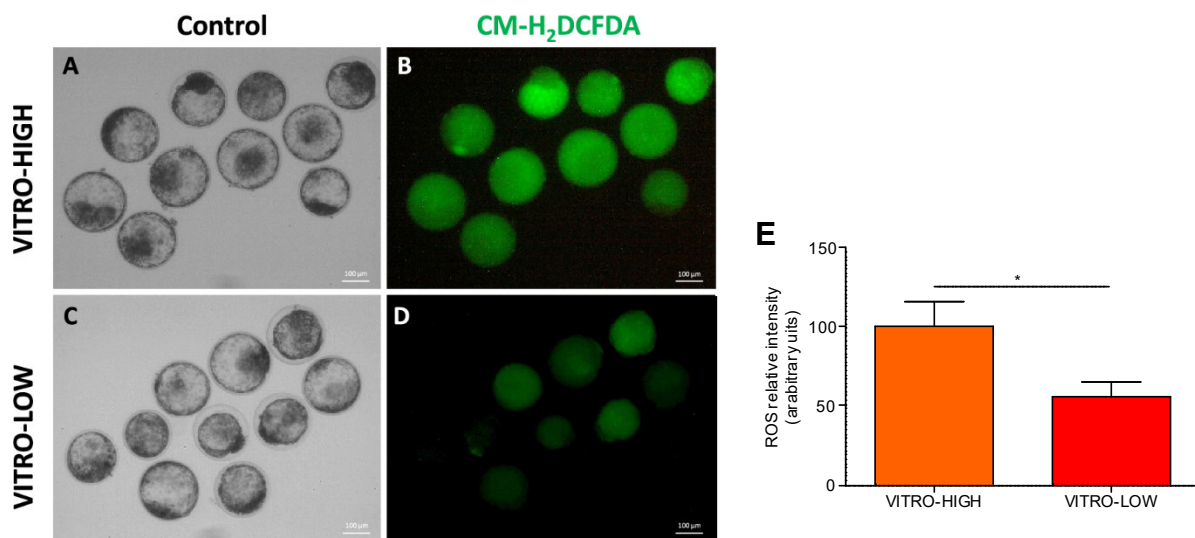


Figure 6: Representative pictures of pools of embryos of VITRO-HIGH (A, B) and VITRO-LOW (C, D) groups stained for quantification of ROS. Ratio of ROS (Mean $\pm$ SD) was significantly ($p < 0.05$) higher in embryos of VITRO-HIGH compared to VITRO-LOW groups.

Discussion

Average OCR values per embryo measured within our study confirmed those observed in a previous study by Muller and colleagues reporting values of 0.85 ± 0.08 pmol/min/embryo for in vitro derived bovine blastocysts groups (Muller et al., 2019). These are close to those obtained in our study with in vitro derived blastocysts showing OCR values of 0.61 ± 0.110 (VITRO-HIGH) or 0.58 ± 0.068 pmol/min/embryo (VITRO-LOW) and VIVO embryos reaching 0.81 ± 0.032 pmol/min/embryo. Considering earlier studies using other measurement strategies to analyse oxygen uptake, the average amounts of oxygen uptake per embryo measured within the present study were comparable to these recent studies, too (Lopes et al., 2005; Obeidat et al., 2018; Thompson et al., 1996b). Here, for example Obeidat et al. (2018), using electrochemical based sensors reported values of 1.48 ± 0.3 fmol/s or Lopes et al. (2005) using nanorespirometrie identified values of 1.3 ± 0.064 fmol/s on single embryo level. In accordance with our results, Thompson et al., also observed differences between in vivo and in vitro derived embryos in terms of OCR (Thompson et al., 1996b; Thompson et al., 1996a). In contrast, the present study did not obtain contrasting rates between embryos of different IVP morphokinetics reflecting different embryo qualities.

Nonetheless, we suggest that variance in vitality of bovine embryos might be indicated by different total oxygen consumption rates, this dependence might not be seen in comparisons between early and late blastocysts, which represent only one parameter reflecting embryo quality among several others. One explanation might be that the total embryo oxygen consumption does not reflect the exact oxygen consumption of mitochondria. Indeed, there are other cell-surface related oxygen consuming processes in cells, and Manes and Lai (1995) identified cell-surface related oxygen consumption by a superoxide generating NAD(P)H oxidase on the surface of rabbit blastocysts. Non-mitochondrial utilization of oxygen in turn has been demonstrated to result in the formation of reactive oxygen species (ROS) and is therefore considered an unfavourable reflector of “bioenergetic health” when present in a high degree (Chacko et al. 2014). In our experiments, embryos of the VIVO, VITRO-HIGH and VITRO-LOW groups utilized 15.0 %, 6.5 % and 8.9 % of totally consumed oxygen for non-mitochondrial oxygen consumption, respectively, and were not significantly different. This is within the range of a recent study of Muller and colleagues reporting a proportion of roughly 20% for non-mitochondrial respiration in in vitro derived embryos (Muller et al., 2019). Also, VIVO, VITRO-HIGH and VITRO-LOW embryos utilized similar average amounts as well as relative proportions of total oxygen uptake for mitochondrial respiration. That might indicate, that well known differences with respect to embryo quality, as consequences of contrasting

environments of development (Lonergan et al., 2001) are not caused by differences in terms of mitochondrial respiration. In summary, the results of our study indicate that differences with respect to embryo viability as a consequence of contrasting environments as well as morphokinetics during early development are not a primarily consequence of differences in terms of total mitochondrial respiration. Although we speculate that sufficient levels of energy generation is of great importance for embryo vitality, it has to be kept in mind that similar mitochondrial respiration does not necessarily indicate an equal energy production, as mitochondrial consumed oxygen is only partially coupled with the production of ATP. If statements are to be made about embryonic vitality, it is of interest to characterise the proportions of ATP-linked respiration and its counterpart, the proton leak. Indeed, a strong correlation between morphokinetics as a model for intrinsic embryonic quality and both absolute and relative amounts of ATP-linked respiration was observed within our study. IVP derived embryos of presumably high quality reach the proportion of ATP-linked respiration of ex vivo derived embryos. In contrast, IVP derived embryos of presumably low quality utilized significantly lower proportions of oxygen for ATP-linked respiration compared to IVP embryos of presumably high quality and ex vivo derived embryos. This confirms an earlier studies by Noguchi and colleagues, reporting contrasting ATP contents between ex vivo and in vitro derived bovine blastocysts (Noguchi et al., 2020). Of impact, our results reveal that fast-developing IVP derived bovine embryos, representing a subpopulation among all IVP embryos being of presumably high vitality, apparently consumed 5-fold higher volumes of oxygen for ATP-linked respiration compared to the slowly developing ones representing a subpopulation of presumably low quality. While such a correlation between developmental kinetics and oxygen-utilization for ATP generation has not been reported in the bovine, similar correlations have been reported for murine embryos by Spielmann et al. (1984). Accordingly, the coupling efficiency of ATP generation was identified to be much lower in IVP embryos of presumably low quality, utilizing approximately 10 % of consumed oxygen, compared to that of IVP embryos of presumably high quality and of ex vivo derived embryos, both utilizing approximately 65 % of their consumed oxygen for ATP generation. These results are within the range of earlier studies (Muller et al., 2019; Thompson et al., 1996a). Keeping in mind the low proportion of only 10 % of consumed oxygen utilized for ATP generation in IVP derived embryos of presumably low quality, however, raises the question about the destination of the remaining 90 % of consumed oxygen. Among the consumed oxygen not coupled to ATP production, one fraction is required to compensate for proton leakage which usually exists up to a certain physiological level, as displayed by Brand (2000). Surprisingly, absolute and

relative volumes of oxygen related to proton leakage did not differ between embryo groups derived from contrasting environments nor by being of different morphokinetics. These values obtained in our study account for 28-32% and are within the range reported recently in another study by Muller and colleagues in in vitro bovine embryos (Muller et al., 2019). In summary, these results could provide a conceivable explanation for the slower developmental kinetics of blastocysts expanded at day 8. As the amount of ATP-linked respiration corresponds to the amount of proton leakage, this could lead to the hypothesis that excessive proton leakage leads to embryonic stress. For a full understanding of embryonic vitality in relation to mitochondrial metabolic activity, it is useful to know the mitochondrial potential of embryos to react to an increased energy demand for further embryonic development.

In our study, embryo quality correlated with maximal mitochondrial respiration potential. Ex vivo derived bovine embryos reached a significantly higher average maximal mitochondrial respiration compared to slowly developing IVP derived embryos, while there was no difference between ex vivo and fast developing in-vitro derived bovine embryos related to high quality. Considering average maximal mitochondrial respiration rates of approximately 2.3, 1.8 and 1.0 pmol per embryo and minute for in vivo derived expanded blastocysts, IVP derived embryos of presumably high quality and IVP derived embryos of presumably low quality, these values were within the range determined earlier for in vitro derived embryos by Muller et al. (2019). In our study, both ex vivo derived as well as fast developing in vitro derived blastocysts showed a significantly higher mitochondrial spare capacity values than slowly developing in vitro derived expanded blastocysts. In other words, bovine embryos of higher quality had a higher ability to react to energy demanding processes or conditions for further development compared to those of lower quality. This finding might also explain the observed fact, by Ziebe and colleagues, that higher developmental kinetics of IVP derived bovine embryos go along with higher pregnancy rates after transfer to recipients (Ziebe et al., 1997). These results also potentially explain the high variability in viability among IVP derived bovine embryos, resulting in lower developmental rates both to the blastocysts stage as well as to term after embryo transfer to recipients when compared with their in vivo derived counterparts. Whether this higher mitochondrial spare capacity is due to a higher total number of mitochondria or due to higher extra potential of mitochondria remains unclear, in the present study. If lower mitochondrial spare capacities are a consequence of a reduced number of mitochondria being fixed within the unfertilized oocyte this would agree with earlier studies indicating that the mitochondrial copy number of oocytes correlates with their developmental capacity as shown for example by Santos et al. (2006) comparing mtDNA copy numbers of unfertilized to

fertilized oocytes. There is consensus that a certain range of mtDNA copies, indicating a distinct number of mitochondria, is required for sufficient embryo energy production and in addition for embryo further development (Santos et al., 2006; Wai et al., 2010; Murakoshi et al., 2013). For example Wai and colleagues identified an critical postimplantation mtDNA copies between 40000-50000 of matured oocytes (Wai et al., 2010). Conversely, there is also evidence that the ability of an embryo to develop does not only depend on the mitochondrial mtDNA content of the oocyte but it is also affected by embryo developmental environment (Kameyama et al., 2007; Marta et al., 2022). Kaeyama and colleagues show that IVP has an impact on mitochondrial transcriptomic and replication control in rat embryos (Kameyama et al., 2007) or Marta and colleagues display alterations in in vivo and in vitro mitochondrial number and function (Marta et al., 2022). Despite a rather low number of mitochondria at early developmental stages, embryonic development might be possible by up-regulating mitochondrial DNA replication processes at later development stages as demonstrated by Chiratti et al. as well as Wai et al. (Chiaratti et al., 2010; Wai et al., 2010). Conclusively it should not be neglected that environmental culture conditions after fertilization could play a pivotal role for biosynthesis and replication of mitochondria within early embryo development. That would agree with the generally accepted finding that embryo quality at blastocyst stage is largely affected by the environmental conditions during early development (Lonergan et al., 2003; Rizos et al., 2003). Although, keeping in mind that the environmental conditions in the present study were the same for fast and slow developing IVP derived embryos while the different morphokinetic as a model for different qualities of these embryos correlated with the maximal mitochondrial respiration potential, we speculate that the initial number of mitochondria or their quality might be causative for the observed differences. Taken together, the results of our study revealed that the intrinsic quality of IVP derived embryos correlates with the maximal mitochondrial respiration potential. In summary, IVP derived embryos of presumably high quality closely resembled ex vivo derived embryos in terms of mitochondrial unused potential whereas IVP derived embryos of presumably low developmental capacity showed a significantly lower potential.

In addition to metabolic outlines, the results of our study demonstrate that IVP embryos of presumably high quality are associated with higher mitochondrial catabolic activity and lower lipid accumulation. Also previous studies demonstrated, that higher embryo metabolism rates go along with increased utilisation of endogenous lipid stores via β -oxidation, as shown by Sutton-McDowall and colleagues by an higher ATP production after culture supplementation with L-Carnitin (Sutton-McDowall et al., 2012). Moreover Aizawa and colleagues demonstrate

under usage of delipidation experiments of oocytes that an imbalance in lipid droplet synthesis results in impaired early embryo development (Aizawa et al., 2019). In agreement, IVP derived embryos of low quality were found to be associated with lower mitochondrial catabolic activity and higher lipid accumulation within the present study. This is in line with earlier studies reporting that reduced utilization of intracellular lipids or even lipid accumulation is a result of insufficient metabolism by mitochondria. Prastowo and colleagues, concluded this from analysis of the AMP-activated protein kinase pathway and identify an relationship between a lower mitochondrial activity and accumulation of lipids in bovine embryos (Prastowo et al., 2016). Interestingly, we were not able to determine any difference between lipid content of ex vivo derived embryos and IVP derived embryos of developmental day 7. In addition to our not different lipid content of VIVO and VITRO-HIGH embryos, Annes and colleagues focus on the lipid profile and also found a similar lipid composition in in vivo and in vitro embryos, whereas the lipid profile was especially impacted by different morphokinetics (Annes et al., 2019). However, in our study the limited number of analysed in vivo derived embryos has to be considered and therefore it cannot be fully excluded that differences exist between ex vivo embryos compared to in vitro derived embryos of presumably high quality to some extent. At this time, however, we cannot rule out whether a slower development as a model for a lower embryo quality associated with higher lipid accumulations and lower mitochondrial metabolism are due to lower mitochondrial qualities or due to lower numbers of total mitochondria.

Furthermore, the present study obtained significantly lower ROS levels in IVP derived embryos of slower compared to faster developmental kinetics. Conversely, high levels of ROS have been connected to high levels of embryo metabolic stress. Collectively, the present study demonstrated that higher respiratory activities of IVP derived embryos of presumably higher quality go along with lower lipid contents and higher ROS levels. This seem to contradict earlier findings proposing that lower levels of ROS are beneficial for further embryo development and the earlier “quiet embryo hypothesis” by Leese, postulating that a quite embryo metabolism is beneficial (Leese, 2002). On the other hand, Brand and colleagues pointed out that a specific threshold of ROS is necessary and beneficial for cell signalling and further development (Brand, 2000). Outside an optimal range, however, intracellular ROS indeed results in various developmentally regulated modes of embryo demise (Bain et al., 2011). ROS levels therefore cannot be considered in isolation but must be considered in relation to metabolic activity. Thus, balance between embryo metabolic activity and the level of antioxidant molecules determining ROS level, in other words oxidative homeostasis, might be one of the most important criteria determining quality of an IVP embryo. In light of our results, an intermediate metabolic activity

going along with intermediate ROS-levels might be most beneficial for further embryo viability as recently introduced by Leese and colleagues in the “goldilocks principal” (Leese et al., 2016) postulating an intermediate status to be most beneficial. Consequently, the results of our study demonstrated that the morphokinetic related quality of IVP derived embryos goes along with relatively lower lipid contents and relatively higher ROS contents.

Collectively, our study revealed the mitochondrial signature of VIVO embryos, reflecting the “gold-standard” compared to IVP derived embryos of fast (day 7 expanded blastocysts, VITRO-HIGH) and slow morphokinetic (day 8 expanded blastocysts, VITRO-LOW) reflecting embryos of presumably high and low quality, respectively. The results presented show that it makes sense to split mitochondrial oxygen consumption into its parameters. Although mitochondrial respiration did not differ between groups in the present study, there were differences in the energy production and the efficiency of energy generation, especially in embryos with slow developmental kinetics associated with lower quality. In addition, these groups of embryos also display an altered mitochondrial potential, which is reflected in reduced maximal respiration and spare capacity. Likewise, the splitting of oxygen consumption showed that fast-developing IVP embryos associated with high quality resemble the level of ex vivo derived embryos in important characteristics such as spare capacity and efficiency of ATP production.

Conclusion

Together, the quality of bovine embryos correlates positively with embryo total oxygen consumption, mitochondrial spare capacity, ATP-linked respiration as well as efficiency of ATP generation. That distinct metabolic fingerprint goes along with a relative low lipid content and a relatively high ROS level, supporting the goldilocks principle. Altogether, the present study is the first one reporting typical mitochondrial oxygen consumption signatures related to developmental capacity reflecting contrasting environments of development as well as different embryo qualities based on embryo morphokinetics in bovine embryos. However, whether differences in terms of mitochondrial respiration signatures are a cause of contrasting mitochondrial densities per embryo or of contrasting mitochondrial efficiencies should be explored in future studies.

Ethics declarations

The present study is reported in accordance with ARRIVE guidelines. All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. Animal handling for collection of in vivo derived embryos was carried out in accordance with the German Law of Animal Protection (TierSchG & TierSchVersV). All experimental protocols performed on cows in this study were approved by the state office for Nature, Environment, and Consumer Protection of North Rhine-Westphalia, Germany (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Deutschland) under license number 84–02.04.2014.A499.

References

- Aizawa R, Ibayashi M, Tatsumi T, Yamamoto A, Kokubo T, Miyasaka N, Sato K, Ikeda S, Minami N, Tsukamoto S (2019) Synthesis and maintenance of lipid droplets are essential for mouse preimplantation embryonic development. *Development (Cambridge, England)* **146**(22). doi:10.1242/dev.181925
- Annes K, Sudano MJ, Belaz KRA, Tata A, Santos VG, Da Fonseca Junior AM, Dos Santos EC, Eberlin MN, Milazzotto MP (2019) Lipid characterization of in vitro-produced bovine embryos with distinct kinetics of development. *Zygote (Cambridge, England)* **27**(6), 413–422. doi:10.1017/S0967199419000534
- Bain NT, Madan P, Betts DH (2011) The early embryo response to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. *Reproduction, fertility, and development* **23**(4), 561–575. doi:10.1071/RD10148
- Baldoceda L, Robert C (2017) Mitochondrial contributions to oocyte and embryonic quality in bovine. *SPERMOVA* **1**(7), 27–31. doi:10.18548/aspe/0005.05
- Brand M (2000) Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology* **35**(6-7), 811–820. doi:10.1016/s0531-5565(00)00135-2
- Chacko BK, Kramer PA, Ravi S, Benavides GA, Mitchell T, Dranka BP, Ferrick D, Singal AK, Ballinger SW, Bailey SM, Hardy RW, Zhang J, Zhi D, Darley-Usmar VM (2014) The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. *Clinical science (London, England : 1979)* **127**(6), 367–373. doi:10.1042/CS20140101

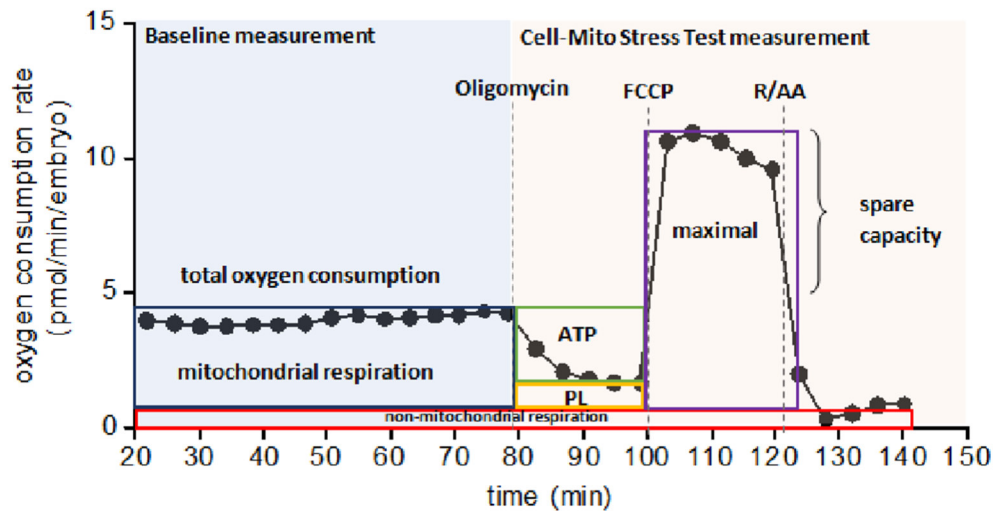
- Chair J (2021) 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals No. 4 [Online]. Available at: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2020.pdf (verified 16 December 2022)
- Chiaratti MR, Bressan FF, Ferreira CR, Caetano AR, Smith LC, Vercesi AE, Meirelles FV (2010) Embryo mitochondrial DNA depletion is reversed during early embryogenesis in cattle. *Biology of Reproduction* **82**(1), 76–85. doi:10.1095/biolreprod.109.077776
- El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, Sirard M-A, Schellander K, Tesfaye D (2006) Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiological genomics* **28**(1), 84–96. doi:10.1152/physiolgenomics.00111.2006
- Ge H, Tollner TL, Hu Z, Dai M, Li X, Guan H, Shan D, Zhang X, Lv J, Huang C, Dong Q (2012) The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation in vitro on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence. *Molecular reproduction and development* **79**(6), 392–401. doi:10.1002/mrd.22042
- Ghanem N, Salilew-Wondim D, Gad A, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K, Hoelker M (2011) Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. *Reproduction (Cambridge, England)* **142**(4), 551–564. doi:10.1530/REP-10-0476
- Hansen PJ (2020) The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle-why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *Journal of animal science* **98**(11). doi:10.1093/jas/skaa288
- Held E, Salilew-Wondim D, Linke M, Zechner U, Rings F, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M (2012) Transcriptome fingerprint of bovine 2-cell stage blastomeres is directly correlated with the individual developmental competence of the corresponding sister blastomere. *Biology of Reproduction* **87**(6), 154. doi:10.1095/biolreprod.112.102921
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H (1999) High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* **52**(4), 683–700. doi:10.1016/S0093-691X(99)00162-4

-
- Kameyama Y, Filion F, Yoo JG, Smith LC (2007) Characterization of mitochondrial replication and transcription control during rat early development in vivo and in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)* **133**(2), 423–432. doi:10.1530/REP-06-0263
- Leese HJ (2002) Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **24**(9), 845–849. doi:10.1002/bies.10137
- Leese HJ, Guerif F, Allgar V, Brison DR, Lundin K, Sturmey RG (2016) Biological optimization, the Goldilocks principle, and how much is lagom in the preimplantation embryo. *Molecular reproduction and development* **83**(9), 748–754. doi:10.1002/mrd.22684
- Lonergan P, Fair T (2016) Maturation of Oocytes in Vitro. *Annual review of animal biosciences* **4**, 255–268. doi:10.1146/annurev-animal-022114-110822
- Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Fair T, Boland MP (2003) Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies. *Reproductive BioMedicine Online* **7**(6), 657–663. doi:10.1016/S1472-6483(10)62088-3
- Lonergan P, Rizos D, Ward F, Boland MP (2001) Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction, nutrition, development* **41**(5), 427–437. doi:10.1051/rnd:2001142
- Lopes AS, Larsen LH, Ramsing N, Løvendahl P, Rätty M, Peippo J, Greve T, Callesen H (2005) Respiration rates of individual bovine in vitro-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. *Reproduction (Cambridge, England)* **130**(5), 669–679. doi:10.1530/rep.1.00703
- Manes C, Lai NC (1995) Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals. *Journal of reproduction and fertility* **104**(1), 69–75. doi:10.1530/jrf.0.1040069
- Marta C, Dawid W, Silvestre S, Pawel G, Salvatore P, Modliński JA, Pasqualino L (2022) Mitochondrial function and intracellular distribution is severely affected in in vitro cultured mouse embryos. *Scientific Reports* **12**(1), 16152. doi:10.1038/s41598-022-20374-6
- McKeegan PJ, Boardman SF, Wanless AA, Boyd G, Warwick LJ, Lu J, Gnanaprabha K, Picton HM (2021) Intracellular oxygen metabolism during bovine oocyte and preimplantation embryo development. *Scientific Reports* **11**(1), 21245. doi:10.1038/s41598-021-99512-5

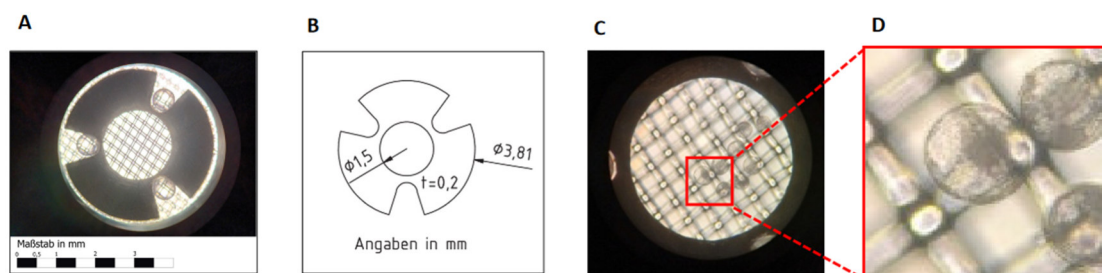
-
- Muller B, Lewis N, Adeniyi T, Leese HJ, Brison DR, Sturmey RG (2019) Application of extracellular flux analysis for determining mitochondrial function in mammalian oocytes and early embryos. *Scientific Reports* **9**(1), 16778. doi:10.1038/s41598-019-53066-9
- Murakoshi Y, Sueoka K, Takahashi K, Sato S, Sakurai T, Tajima H, Yoshimura Y (2013) Embryo developmental capability and pregnancy outcome are related to the mitochondrial DNA copy number and ooplasmic volume. *Journal of assisted reproduction and genetics* **30**(10), 1367–1375. doi:10.1007/s10815-013-0062-6
- Niemann H, Lampeter WW, Sacher B, Kruff B (1982) Comparison of survival rates of day 7 and day 8 bovine embryos after fast freezing and thawing. *Theriogenology* **18**(4), 445–452. doi:10.1016/0093-691X(82)90166-2
- Noguchi T, Aizawa T, Munakata Y, Iwata H (2020) Comparison of gene expression and mitochondria number between bovine blastocysts obtained *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Reproduction and Development* **66**(1), 35–39. doi:10.1262/jrd.2019-100
- Obeidat YM, Evans AJ, Tedjo W, Chicco AJ, Carnevale E, Chen TW (2018) Monitoring oocyte/embryo respiration using electrochemical-based oxygen sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **276**, 72–81. doi:10.1016/j.snb.2018.07.157
- Parrish JJ (2014) Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* **81**(1), 67–73. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.08.005
- Prastowo S, Amin A, Rings F, Held E, Wondim DS, Gad A, Neuhoff C, Tholen E, Looft C, Schellander K, Tesfaye D, Hoelker M (2016) Fateful triad of reactive oxygen species, mitochondrial dysfunction and lipid accumulation is associated with expression outline of the AMP-activated protein kinase pathway in bovine blastocysts. *Reproduction, fertility, and development*. doi:10.1071/RD15319
- Pribenszky C, Nilselid A-M, Montag M (2017) Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online* **35**(5), 511–520. doi:10.1016/j.rbmo.2017.06.022
- Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, La Fuente J de, Boland MP, Lonergan P (2003) Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction* **68**(1), 236–243. doi:10.1095/biolreprod.102.007799

-
- Salilew-Wondim D, Tesfaye D, Rings F, Held-Hoelker E, Miskel D, Sirard M-A, Tholen E, Schellander K, Hoelker M (2021) The global gene expression outline of the bovine blastocyst: reflector of environmental conditions and predictor of developmental capacity. *BMC genomics* **22**(1), 408. doi:10.1186/s12864-021-07693-0
- Santos TA, El Shourbagy S, St John JC (2006) Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertility and sterility* **85**(3), 584–591. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.09.017
- Spielmann H, Jacob-Mueller U, Schulz P, Schimmel A (1984) Changes of the adenine ribonucleotide content during preimplantation development of mouse embryos in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* **71**(2), 467–473. doi:10.1530/jrf.0.0710467
- Sutton-McDowall ML, Feil D, Robker RL, Thompson JG, Dunning KR (2012) Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* **77**(8), 1632–1641. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.12.008
- Thompson J, McNaughton C, Gasparrini B, McGowan L, Tervit H (2000) Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)* **118**(1), 47–55. doi:10.1530/jrf.0.1180047
- Thompson JG, Brown HM, Sutton-McDowall ML (2016) Measuring embryo metabolism to predict embryo quality. *Reproduction, fertility, and development* **28**(1-2), 41–50. doi:10.1071/RD15340
- Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI, Leese HJ (1996) Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *Journal of reproduction and fertility* **106**(2), 299–306. doi:10.1530/jrf.0.1060299
- Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Kennedy CJ, Pullar D, Leese HJ (1996) Oxygen consumption by Day 7 bovine blastocysts: determination of ATP production. *Animal Reproduction Science* **43**(4), 241–247. doi:10.1016/0378-4320(96)01477-7
- Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJ, Keefe DL (2000) Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biology of Reproduction* **62**(6), 1866–1874. doi:10.1095/biolreprod62.6.1866
- Wai T, Ao A, Zhang X, Cyr D, Dufort D, Shoubridge EA (2010) The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biology of Reproduction* **83**(1), 52–62. doi:10.1095/biolreprod.109.080887

-
- Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H (2003) Timing of blastocyst expansion affects spatial messenger RNA expression patterns of genes in bovine blastocysts produced in vitro. *Biology of Reproduction* **68**(6), 2073–2080. doi:10.1095/biolreprod.102.012104
- Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN (1997) Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Human Reproduction* **12**(7), 1545–1549. doi:10.1093/humrep/12.7.1545
- Zolini AM, Block J, Rabaglino MB, Rincon G, Hoelker M, Bromfield JJ, Salilew-Wondim D, Hansen PJ (2020) Genes associated with survival of female bovine blastocysts produced in vivo. *Cell and tissue research* **382**(3), 665–678. doi:10.1007/s00441-020-03257-y

Supplementary Figure 1: OCR outline over time

Graphical Illustration of oxygen consumption rate during baseline measurement and XF Cell-Mito Stress Test: Graphic demonstrates XF Cell-Mito Stress Test Parameter: total oxygen consumption; mitochondrial respiration; non-mitochondrial respiration; Proton Leakage (PL) and ATP-linked respiration (ATP); maximal respiration and spare capacity.

Supplementary Figure 2: The embryo cage

Photography of the embryo cage; consisting of horizontal embryo confinement by a grid (mesh size: 150 μm) and vertical embryo confinement created by a metal insert enabling stable positioning of embryo directly under the sensor necessary for reliable and precise measurement (A). Technical drawing of the metal insert (B). A group of expanded blastocysts positioned by embryo cage (C). Detailed view on expanded blastocysts (D).

Kapitel 4: Manuskript II

INTERPRETIVE SUMMARY

Mitochondrial bioenergetic profiles of warmed bovine blastocyst are typically altered after cryopreservation by slow freezing and vitrification. By Kurzella et al. Cryopreservation results in impaired developmental competence of bovine embryos. Mitochondrial functionality, characterised by the bioenergetic profile, might explain the reduced embryo viability. Cryopreservation modifies the bioenergetic profile of bovine blastocysts, resulting in reduced mitochondrial energy generation and reserve capacity. In addition, the slow freezing method results in an increase of non-mitochondrial respiration.

Theriogenology;doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.10.002

Mitochondrial bioenergetic profiles of warmed bovine blastocyst are typically altered after cryopreservation by slow freezing and vitrification.

Kurzella, Jessica¹; Miskel, Dennis¹; Rings, Franca¹; Tholen, Ernst¹, Tesfaye, Dawit²; Schellander, Karl¹; Salilew-Wondim, Dessie^{1,3}; Held-Hoelker, Eva¹; Große-Brinkhaus, Christine¹; Hoelker, Michael^{3*}

¹ Institute of Animal Sciences, Animal Breeding, University of Bonn, Endenicher Allee 15, 53115 Bonn, Germany

² Department of Biomedical Sciences, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, 3105 Rampart Rd, Fort Collins, CO 80521, United States

³ Department of Animal Science, Biotechnology and Reproduction of farm animals, Georg August University Goettingen, Burckhardtweg 2, 37077 Goettingen, Germany

* Corresponding author:

Prof. Dr. med. vet. Michael Hoelker, Department of Animal Science, Biotechnology & Reproduction of farm animals, Buckhardtweg 2, 37077 Goettingen, Germany, Phone: +49 0551-3913945, E-Mail: michael.hoelker@uni-goettingen.de

Abstract

The widespread use of cryopreserved in vitro produced (IVP) bovine embryos is limited due to their low post-warming viability compared to their ex-vivo derived counterparts. Therefore, the present study aimed to analyse in detail the consequences of cryopreservation (vitrification and slow freezing) on the bioenergetic profile of the embryo and its mitochondria. To accomplish that, day 7 IVP embryos were separated in a non-cryopreserved control group (fresh, n=120, 12 replicates) or were either slow frozen (slow frozen, n=60, 6 replicates) or vitrified (vitrified, n=60, 6 replicates). An in-depth analysis of the bioenergetic profiles was then performed on these 3 groups, analysing pools of 10 embryos revealing that embryo cryopreservation both via vitrification and slow freezing causes profound changes in the bioenergetic profile of bovine embryos. Noteworthy, fresh embryos demonstrate a significantly ($p < 0.05$) higher oxygen consumption rate (OCR) compared to vitrified and slow frozen counterparts (0.858 ± 0.039 vs. 0.635 ± 0.048 vs. 0.775 ± 0.046 pmol/min/embryo). This was found to be largely due to significantly reduced mitochondrial oxygen consumption in both vitrified and deep-frozen embryos compared to fresh counterparts (0.541 ± 0.057 vs. 0.689 ± 0.044 vs. 0.808 ± 0.025 pmol/min/embryo). Conversely, slow-frozen thawed blastocysts showed 1.8-fold ($p < 0.05$) higher non-mitochondrial OCR rates compared to fresh embryos. Maximal mitochondrial respiration of vitrified and slow-frozen embryos was significantly reduced by almost 1.6-fold compared to fresh embryos and the proportion of ATP-linked respiration showed significantly lower values in vitrified thawed embryos compared to fresh embryos (1.1-fold, $p < 0.05$). Likewise, vitrification-warming and freeze-thawing reduced reactive glycolytic capacity (1.4-fold, 1.2-fold) as well as compensatory glycolytic capacity to provide energy in response to mitochondrial deficiency (1.3-fold and 1.2-fold, $p < 0.05$). In conclusion, the present study has, to the best of our knowledge, identified for the first time a comprehensive overview of typical altered metabolic features of the bioenergetic profile of bovine embryos after cryopreservation, which have great potential to explain the detrimental effects of cryopreservation on embryo viability. Avoidance of these detrimental effects through technical improvements is therefore suggested to be mandatory to improve the viability of bovine embryos after cryopreservation-warming.

Keywords: Bioenergetic profile, embryo metabolism, mitochondria, oxygen consumption rate, extra cellular acidification rate

Introduction

Successful transfer of bovine embryos ending up in live offspring can be conducted after embryo cryopreservation. This enables long term storage of valuable genetics as well as supernumerary OPU oocytes or OPU-IVP embryos, resulting in efficient usage of the IVP system and subsequent embryo transfer (Fang et al., 2014). More pregnancies per time unit can be achieved, in comparison to conventional multiple ovulation embryotransfer as well as reduction of hormone usage, favours economic and animal welfare aspects (C. Almiñana, 2018; Ferré et al., 2020). However, the limitation of the widespread use of cryopreserved IVP bovine embryos lies in their deficiencies in terms of cryosensitivity as compared to their fresh counterparts, resulting in reduced survival post-cryopreservation (Kaidi et al., 2001; Sanches et al., 2017; Ferré et al., 2020). During the last decades, studies have shown that cryopreservation affects viability of embryos, especially of those derived from in vitro. Damage occurs both on cellular and molecular level and is reflected in altered embryo metabolism activity (Dobrynsky, 1996; Kaidi et al., 2001; Dalcin et al., 2013; C. Almiñana, 2018; Brair et al., 2020; Kumar et al., 2022). On the one hand, cryotolerance of embryos is impacted by embryo quality prior freezing and cryopreservation alters embryo quality on the other hand. Low embryo quality in turn is associated with high cryosensitivity (Khurana and Niemann, 2000; Rizos et al., 2008). Embryo quality is also a reflection of embryo origin and developmental environment. Suboptimal culture conditions result in compromised in vitro embryo quality, which is reflected in altered metabolism and morphokinetics (Enright et al., 2000; Rizos et al., 2002; Lonergan et al., 2006; Sirard et al., 2006; Gómez et al., 2008; Thompson et al., 2016; Ferré et al., 2020). There is consensus that the high cryosensitivity of bovine in vitro produced embryos goes along with enhanced lipid accumulations caused by culture conditions (Dias et al., 2017; Marsico et al., 2019; Kumar et al., 2022). Furthermore, different effects depending on the cryopreservation method (vitrification vs. slow freezing) on morphological aspects have been reported (Dalcin et al., 2013). Recent studies reveal a more detrimental impact of slow freezing on embryos compared to vitrification (Kaidi et al., 2001; Mucci et al., 2006; Inaba et al., 2016; Najafzadeh et al., 2021). On the other hand, there are some studies that cannot confirm a greater impact after slow freezing (Nicacio et al., 2011; M.E.O.A. Assumpção 2018). Nevertheless, slow freezing is still the preferred method because of its higher practicability for direct transfer under farm conditions (Voelkel and Hu, 1992; Gómez et al., 2020). Moreover, several efforts were conducted related to the optimization of existing slow freezing and vitrification protocols to enhance embryo freezeability. This occurred through investigations of cryoprotectant selection, concentration and optimization of freezing strategies (Caamaño et al., 2015; Gómez et al.,

2020), as well as in vitro culture supplementation (Takahashi et al., 2013; Held-Hoelker et al., 2017; Iwata, 2021;) and micromanipulation prior to freezing (Kumar et al., 2022). Nevertheless, the total number of freshly transferred IVP embryo transfers worldwide is still higher compared to their cryopreserved counterparts (Ferré et al., 2020). Based on the embryo's reduced developmental capacity after cryopreservation, it is generally accepted that cryopreservation itself exhibits detrimental effects on embryo viability. Due, to the logistical importance of embryo cryopreservation as well as the increasing impact of IVP of bovine embryos in commercial cattle breeding programs, overall improvements with respect to in vitro culture conditions and cryopreservation techniques are therefore necessary.

However, there is a fundamental lack of knowledge regarding the mechanisms by which cryopreservation triggers embryonic damage on a cellular level, especially regarding mitochondria as a key player for embryonic vitality. Direct comparison of bioenergetics profiles of cryopreserved embryos compared to fresh control embryos as well as effects of contrasting freezing techniques for the bioenergetics profile are lacking so far. Research on cryoinjuries demonstrated impairment of mitochondrial metabolic activity on a cellular, physiological and molecular level (C. Almiñana, 2018). Earlier studies reported a correlation between embryo cryopreservation and an altered embryo metabolism in terms of oxygen consumption and glycolytic activity (Khurana and Niemann, 2000; Kaidi et al., 2001; Dalcin et al., 2013). These reports were supported by studies reporting altered gene expression patterns after cryopreservation (Stinshoff et al., 2011; Somoskoi et al., 2015; Cuello et al., 2021). Therefore, a profound understanding of cryoinjury in terms of the bioenergetics profile of an embryo would fundamentally enlighten our understanding and would be useful for optimization of existing cryopreservation procedures.

Keeping in mind that also mitochondria, where main energy production via oxidative phosphorylation takes place, are affected by cryoinjuries (Gualtieri et al., 2021), deep analysis of the consequences of cryopreservation on mitochondrial metabolism features are mandatory. In addition, also insights about the distinct effects of contrasting cryopreservation techniques are of high impact. Studies dealing with mitochondrial characteristics and because of cryopreservation as well as caused by contrasting cryopreservation techniques methods, however, are still lacking. Though, a closer look at mitochondrial respiration signatures and the interconnection between mitochondrial respiration and the glycolytic energy generation after cryopreservation might enlighten our understanding fundamentally. Taking advantage of a newly developed platform enabling deep analysis of the bioenergetic profile of bovine embryos we therefore aimed to deeply analyse the consequences of cryopreservation for embryos and

mitochondria's bioenergetic profile in general and the consequences of slow freezing and vitrification in special.

Material and Methods

Experimental design

In this study, three experimental groups of bovine expanded blastocysts were generated. On day 7 after in vitro fertilisation, the embryos were separated into a non-cryopreserved group (fresh) and a cryopreserved group (cryopreserved). Cryopreservation was performed by slow freezing (slow frozen) and vitrification (vitrified). Metabolic measurements were performed on thawed/warmed re-expanded blastocysts after 4h, simultaneously with the fresh embryo group. In total 60 fresh embryos (6 pools, each 10 embryos) were compared with 60 vitrified embryos (6 pools, each 10 embryos) and additional 60 fresh embryos (6 pools, each 10 embryos) were compared with 60 freeze-thawed embryos (6 pools, each 10 embryos), respectively. Two models were used to analyse potential correlations between bovine embryo metabolic activity and embryo cryosensitivity: First, freshly expanded blastocysts were compared with cryopreserved groups using an extracellular FLUX analyser (Seahorse XFp, Agilent) to analyse the effect of cryopreservation. Secondly, vitrified embryos were compared with slow frozen embryos. In each case, the extracellular FLUX analyser was used to analyse the total oxygen consumption rate (OCR) of the embryos, which reflects the extent of oxidative phosphorylation. After measurement of 20 cycles, a mitochondrial stress test (XF Cell-Mito Stress Test Kit, Agilent) was used to analyse mitochondrial respiration, non-mitochondrial respiration, maximal mitochondrial respiration, proton leakage, mitochondrial spare capacity, ATP-linked respiration, and efficiency of ATP generation (Figure 4A). In addition, the extracellular FLUX analyser determined a second parameter the extracellular acidification rate (ECAR) of the embryos, which reflects the main extent of glycolysis. Moreover, we have implemented two further parameters, the reactive- and compensatory glycolytic activity. Reactive glycolytic activity reflects the changing of ECAR after FCCP injection and the compensatory glycolytic activity the changing of ECAR after Rotenone/Antimycin A injection (Figure 4B). Both parameters illustrate how glycolysis change related to changing mitochondrial respiration activity.

In vitro embryo production (IVP)

Ovaries from the abattoir were collected and transported to the laboratory in insulated flasks containing 0.9 % saline (21-30°C). On arrival, cumulus-oocyte complexes (COCs) were aspirated from small follicles (2-8 mm) and COCs with a homogeneous, evenly granulated ooplasm, with oocytes surrounded by at least three layers of cumulus cells, were placed in modified tissue culture medium 199 (TCM; Sigma) supplemented with 4.4 mM HEPES, 33.9 mM NaHCO₃, 2 mM pyruvate, 2.9 mM calcium lactate, 55 µg m⁻¹ gentamycin and 12 % (v/v) heat-inactivated ECS. After three wash steps in modified Parker medium supplemented with 10 µg ml⁻¹ FSH (FSH-p; Schering-Plough) and 5 % heat-inactivated ECS, COCs were cultured in groups of 50 in 400 µl of modified Parker medium at 38.8°C in a humidified atmosphere of 5 % (v/v) CO₂ in air. Fertilisation was performed in Fert-TALP medium (Parrish, 2014) supplemented with 20 µM penicillamine, 10 µl PHE (hypotaurine epinephrine solution), 6 mg ml⁻¹ BSA-FAF, 50 µg ml⁻¹ gentamicin and 1 µg ml⁻¹ heparin. The final concentration of sperm in the fertilisation droplets was adjusted to 2 x 10⁶ sperm per millilitre. After 18 h of coculture, the presumptive zygotes were washed three times to remove cumulus cells and spermatozoa and transferred to in vitro culture. Embryos were cultured in groups of 50-60 in a humidified atmosphere of 5 % (v/v) CO₂ & O₂ in air at 38.8°C for up to 8 days in 400 µl of SOFaa medium (Holm et al., 1999) supplemented with 5 % ECS, each overlaid with mineral oil (Sage oil for tissue culture, ART-4008,cooper surgical®). Only embryos that reached the expanded blastocyst stage by day 7 of culture

Cryopreservation of day 7 expanded blastocysts

Expanded blastocysts were subjected to slow freezing or vitrification. Slow freezing in ethylene glycole has been conducted according to routine procedures as described earlier (Hasler et al., 1997). Briefly, slow frozen embryos were washed in PBS-PVA (phosphate buffered saline with 5 % polyvinyl alcohol). The embryos were then placed in 38.5°C freezing medium (BoviFreeze, Minitüb GmbH). Embryos and freezing medium were placed in 0.25 ml straw with holding medium (Minitüb GmbH), separated by air bubbles. Controlled freezing was performed using a commercial freeze unit for embryos ("Freeze Control", Consartic, Westerngrund) using the following program: from 20°C to -6°C with a cooling rate of 3°C/min, 10 min hold at -6°C followed by manual seeding. Then after additional hold for 5 minutes cooling down until -35°C rates (0.5°C/min) and transfer to liquid nitrogen (-195°C) for storage. Thawing of embryos was conducted manually by holding straws in air for 5 seconds and plunging them in prewarmed water (35°C, 25 sec) using a simple measuring jug filled with

water adjusted for the desired temperature and controlled by use of a thermometer. Embryos were expelled from straws and washed three times in culture media (SOFaa supplemented with 5 % ECS). Vitrification was performed according to a slightly modified established protocol (Vajta et al. 1998). Briefly, expanded blastocysts were washed in holding media (PBS + 20 % TCS) and transferred successively to vitrification media (0.5 M sucrose + 20 % ethylene glycol + 20 % DMSO + 20 % TCS in PBS) and threaded into open pool straws (OPS), followed by direct transfer into liquid nitrogen (-195 °C). For thawing, the OPS content is diluted in sucrose media (SM, 0.5M sucrose (Sigma) in PBS + 20 % TCS), followed by a serially dilution in sucrose and holding media, finally transferred to culture media. Thawed / warmed expanded blastocysts are given four hours for re-expansion (in SOFaa + 5 % ECS) prior analysis of bioenergetics profiles.

Determination of embryo baseline Oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR)

Oxygen consumption rates were determined using an extracellular FLUX analyser (Seahorse XFp, Agilent), which detects changes in oxygen concentration by fluorometric measurement. First, Seahorse sensor cartridge (Agilent Technology) was hydrated with distilled water (millipore) overnight at 37°C in a non-CO₂ humidified incubator according to the manufacturer's recommendations. Prior to measurement the pre-warmed cell plate was prepared containing the biological material. All 8 wells of the cell plate were filled with 180 µl of modified SOFaa medium supplemented with 4 mM glucose and 0.4 % BSA FAF but without NaHCO₃ and phenol red (SOF Seahorse). Of these, two plate-specific 'blank' cell-free wells containing only medium were used to account for environmental changes and oxygen flux in the absence of cells, while 6 wells were used to analyse pools of 10 expanded blastocysts. To place the expanded blastocysts in the correct position directly under the fluorophore sensor, the embryos were caged using a custom-made embryo positioning system (Figure 4), which consists of a custom-made polyester mesh (150µm mesh size, Labomedic) to avoid dislodging the embryos from the bottom of the well. The mesh was previously punched out using a biopsy punch (Ø 4 mm, mediware) and washed three times in SOFSeahorse. To further avoid movement of embryos from the centre of the well to the periphery, a special insert was used to provide a free central area for the embryos (Figure 4). After calibration of the sensor cartridge according to the manufacturer's recommendations and equilibration (15 minutes), baseline measurements of embryo OCR and ECAR were determined using a protocol that alternated between a 3-minute measurement period and a 30-second re-equilibration period (20 cycles) as

outlined in Figure 5. During the measurement period, a sensor is lowered to create a microchamber for measurement. This is followed by a 30 second period during which the probe is raised several times and the 180 μ L SOFSeahorse media is re-equilibrated. The mean value of OCR as well as ECAR per well (20 cycles) was recorded as the total oxygen consumption (Figure 5B) and extracellular acidification (Figure 5B) of the embryo.

Measurement of mitochondrial oxygen consumption and extracellular acidification signatures:

To determine mitochondrial respiratory properties, mitochondrial inhibitors (XF Cell-Mito Stress Test Kit, Agilent) were applied immediately prior to calibration. Briefly, mitochondrial inhibitors (oligomycin, carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) and rotenone/Antimycin A) were dissolved in SOFSeahorse according to the manufacturer's instructions (XF Cell-Mito Stress Test Kit, Agilent). The inhibitors were diluted in 37°C warmed analytical media (SOF Seahorse) and loaded into the ports of the sensor cartridge (injection ports A-C) immediately before calibration. The concentrations and volumes for the mitochondrial inhibitors were 1.5 μ M and 20 μ l for oligomycin (injection port A), 4.0 μ M and 22 μ l for FCCP (injection port B) and 2.5 μ M and 25 μ l for rotenone/Antimycin A (injection port C). Serial injections of (1) oligomycin, (2) FCCP, and (3) a combination of antimycin A and rotenone, each separated by 5 measurement cycles, were used for mitochondrial parameters (Figure 5). Specifically, the difference between total embryo oxygen consumption and OCR after injection of oligomycin indicates ATP-linked respiration, expressed in pmol/min. The OCR after injection of FCCP indicates maximal mitochondrial respiration (pmol/min). The OCR after injection of antimycin A and rotenone indicates non-mitochondrial respiration (pmol/min). Similarly, the difference in OCR between total embryo oxygen consumption and non-mitochondrial respiration indicates mitochondrial respiration (pmol/min). Finally, the difference between the OCR values after injection of Oligomycin and after injection of antimycin A and rotenone indicates proton leakage (pmol/min). The proportion of mitochondrial respiration relative to the total oxygen consumption of the embryo determines the mitochondrial respiration (%). Similarly, the proportion of ATP-linked respiration relative to mitochondrial respiration determines the efficiency of ATP generation; and the proportion of maximal mitochondrial respiration relative to mitochondrial respiration determines mitochondrial spare capacity (%) as outlined in Figure 5A. In addition, we defined two parameters: reactive and compensatory glycolytic activity. The reactive glycolytic activity (mpH/min) shows the effect of maximal mitochondrial respiratory activity on ECAR and was

determined using the maximal ECAR value after FCCP injection. Also, the proportion was determined, as the maximal ECAR value relative to the basal ECAR (%). The compensatory glycolytic activity (mpH/min) is expressed as the mean value of the last three measurement cycles after rotenone/antimycin A injection. Secondly, in relation to the basal ECAR, the proportion of compensatory glycolytic activity (%) is obtained as outlined in Figure 5B. In any case, the OCR values (pmol/min) and ECAR values (mpH/min) determined by the Seahorse XFp software within the modified measurement wells containing a pool of 10 embryos were normalized on embryo per well and corrected for volume of the embryo cage by a factor of 6.425 to obtain the average OCR (pmol/min/embryo) and average ECAR (mpH/min/embryo) on an individual embryo basis.

Data analysis

For data analysis, Wave software (Agilent) was used to convert the data into an Excel file, followed by data analysis in GraphPad Prism (Dotmadics). The mitochondrial parameters of the XF Cell-Mito Stress test were determined according to the manufacturer's instructions (Agilent). The following mitochondrial parameters were determined: total embryo oxygen consumption can be separated into non-mitochondrial respiration and mitochondrial respiration. It was also possible to determine maximal respiration, proton leakage, ATP-linked respiration, allowing further calculation of relative mitochondrial spare capacity and ATP coupling efficiency. Results are reported as absolute values (raw data) in pmol/min/embryo over time (Supplemental file), standardised to the fresh group (ratio) or as proportion (%). Analysis of variance (ANOVA) with bonferroni post hoc test was used to analyse differences between contrasting embryo groups with respect to different OCR and ECAR values. P values $p < 0.05$ were considered significant. In both cases, graphical estimation of normal distribution and F-test for homogeneity of variance was used. Graphs were generated using Graph-Pad Prism.

Results

A total of 1860 COCs were used for IVP to generate a total of 671 Day-7 expanded bovine blastocysts (35.1 %) to conduct the experiments of the present study. Analysis of embryo was performed in pools of 10 embryos ($n=12$). A total of 12 replicates of freshly expanded blastocysts were analysed compared to 6 replicates of vitrified warmed embryos as well as 6 replicates of frozen-thawed re-expanded blastocysts (EX) each containing 10 embryos. The

measurement outline of oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) is presented in Figure 1A and 3A. Here, after 20 baseline metabolism measurement cycles, determination of rates for total oxygen consumption as well as basal extracellular acidification were carried out after admitting XF Cell-Mito stress test in addition.

Vitrification as well as slow freezing reduced total embryo oxygen consumption

Our study demonstrated a ($p < 0.05$) higher OCR of fresh embryos compared to vitrified-warmed and slow frozen-warmed counterparts (0.858 ± 0.039 vs. 0.635 ± 0.048 vs. 0.775 ± 0.046 pmol/min/embryo, respectively). As shown in Figure 1B, both groups of cryopreserved expanded embryos showed a significant reduced oxygen consumption (1.2-fold, $p < 0.05$) compared to fresh expanded control blastocysts.

Vitrification as well as slow freezing reduced mitochondrial respiration

The use of the XF Cell-Mito stress test allowed us to divide the total oxygen consumption into oxygen consumption related to mitochondrial and non-mitochondrial processes. Mitochondrial oxygen consumption of fresh expanded blastocysts was significantly higher compared to vitrified blastocysts as well as slow frozen counterparts (0.808 ± 0.052 vs. 0.541 ± 0.057 vs. 0.689 ± 0.044 pmol/min/embryo, respectively) as presented in the supplement file. In relation to the fresh group, both cryopreserved groups of embryos demonstrated a significant reduction in terms of mitochondrial oxygen consumption (1.2-fold and 1.3-fold, $p < 0.05$), respectively (Figure 1C). The proportion of mitochondrial oxygen consumption relative to the total oxygen consumption did not differ between fresh embryos and those after vitrification-thawing and freeze-thawing (89.3 % vs. 81.8 % vs. 83.5 %), respectively (Figure 1D).

Slow freezing increased non-mitochondrial respiration

Relative to the fresh embryo group, slow-frozen thawed blastocysts showed 1.8-fold ($p < 0.05$) higher oxygen consumption related to non-mitochondrial processes compared to fresh embryos whereas no difference were detectable between vitrified-thawed and fresh expanded blastocysts (Figure 1E). In fresh expanded blastocysts, 10.74 % of the total oxygen consumption accounted for non-mitochondrial oxygen consumption were not significantly different compared to vitrified-thawed and freeze-thawed expanded blastocysts (18.24 % and 16.54 %, respectively) as demonstrated in Figure 1F.

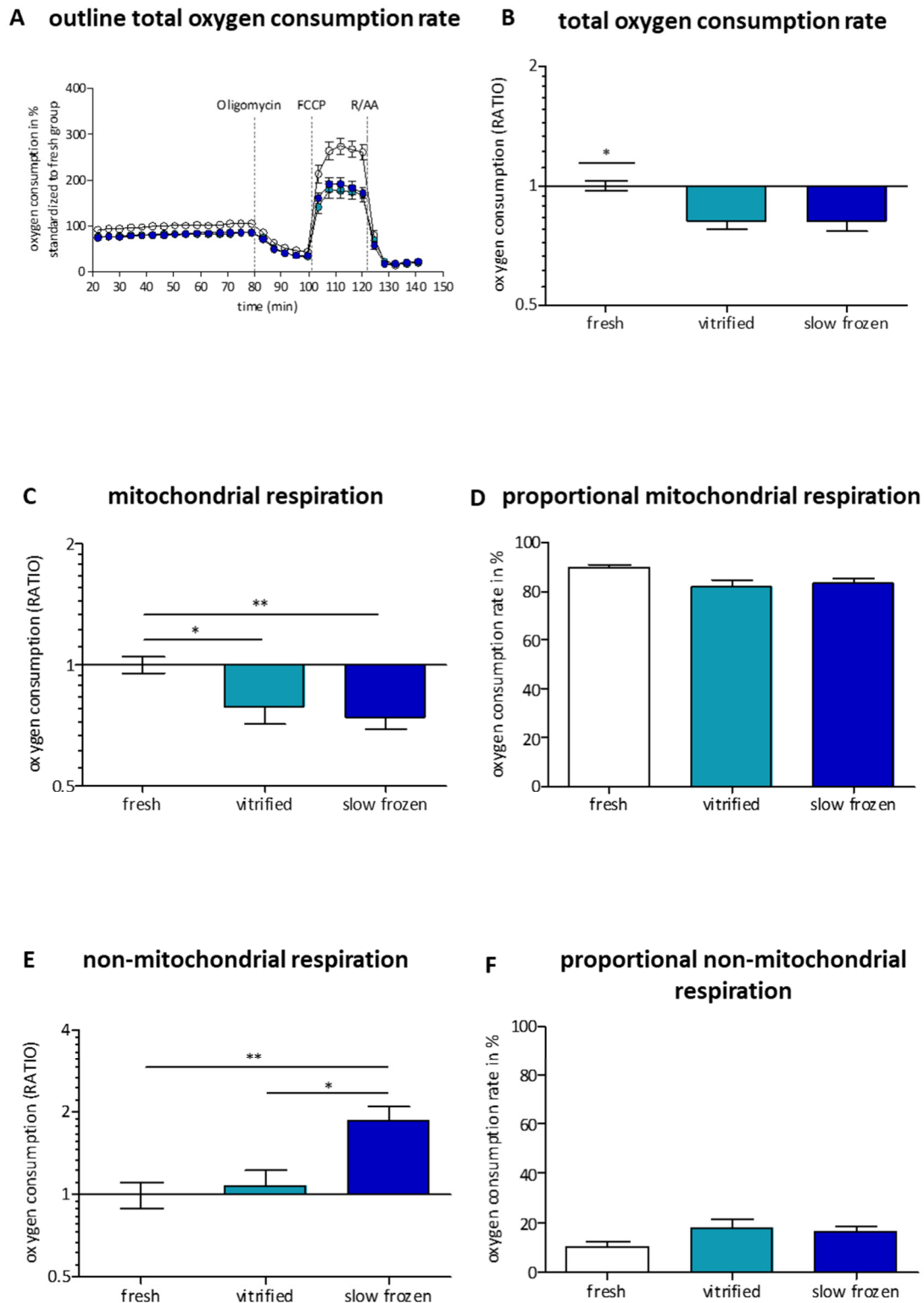


Figure 1: Outline of total embryo oxygen consumption rate (OCR) of fresh embryo groups (n = 12), vitrified embryo groups (n = 6) and freeze-thawed embryos groups (n = 6) each containing 10 blastocysts over time (A). OCR of fresh embryos was significantly higher ($p < 0.05$) compared to vitrified-warmed and frozen-thawed embryo groups (B). Ratio of mitochondrial respiration (mean $\pm$ SEM) was significantly higher in fresh compared to vitrified-warmed and frozen-thawed embryo groups (C) whereas relative proportion of mitochondrial respiration based on total embryo respiration (%) did not differ between fresh and cryopreserved embryo groups (D). Non-mitochondrial respiration was significantly higher in frozen-thawed embryos compared to fresh and vitrified-warmed counterparts (E) whereas relative proportion of non-mitochondrial respiration based on total embryo respiration (%) did not differ between fresh and cryopreserved groups (F).

Vitrification as well as slow freezing reduced maximal mitochondrial energy generation capacity

Maximal respiration of fresh expanded blastocysts was significantly higher compared to vitrified and slow frozen counterparts. Relative to the fresh group, both cryopreserved groups show significantly reduced maximal respiration rates by almost 1.6-fold (Figure 2A). In addition, the relative reserve capacity of frozen-thawed and vitrified-thawed embryos is also reduced compared to their fresh counterpart with no significant differences between the cryopreservation groups (281.10 % vs. 237.20 % vs. 244.30 %, respectively, Figure 2B).

Cryopreservation altered quantity of ATP-linked respiration and abundance of proton leakage

The ratio of ATP-linked respiration showed significantly lower values in vitrified-thawed embryos compared to fresh embryos (1.1-fold, $p < 0.05$) whereas there was no difference compared to slow frozen-thawed embryos (Figure 2C). The coupling efficiency of ATP production, however, was not higher in fresh compared to vitrified-thawed and slow frozen-thawed embryos (65.90 %, 74.54 % vs. 71.12 %, respectively). In contrast, vitrified-thawed embryos even exhibited significantly higher coupling efficiencies compared to their fresh counterparts (Figure 2D).

Likewise, vitrified-thawed and freeze-thawed embryos were found to lose significantly lower amounts of oxygen by proton leakage compared to fresh counterpart. In detail, there was a significant reduction in proton leakage in vitrified-thawed and freeze-thawed embryos compared to fresh embryos (1.5-fold and 1.8-fold, respectively), as demonstrated in Figure 2E. The fraction of proton leakage relative to total mitochondrial respiration was decreased in vitrified-thawed and freeze-thawed embryos compared to their fresh embryos (25.46 % vs. 28.88 % vs. 34.10 %, respectively) as presented in Figure 2F. Vitrified-thawed embryos even display a significant reduction in proton leakage compared to their fresh counterpart.

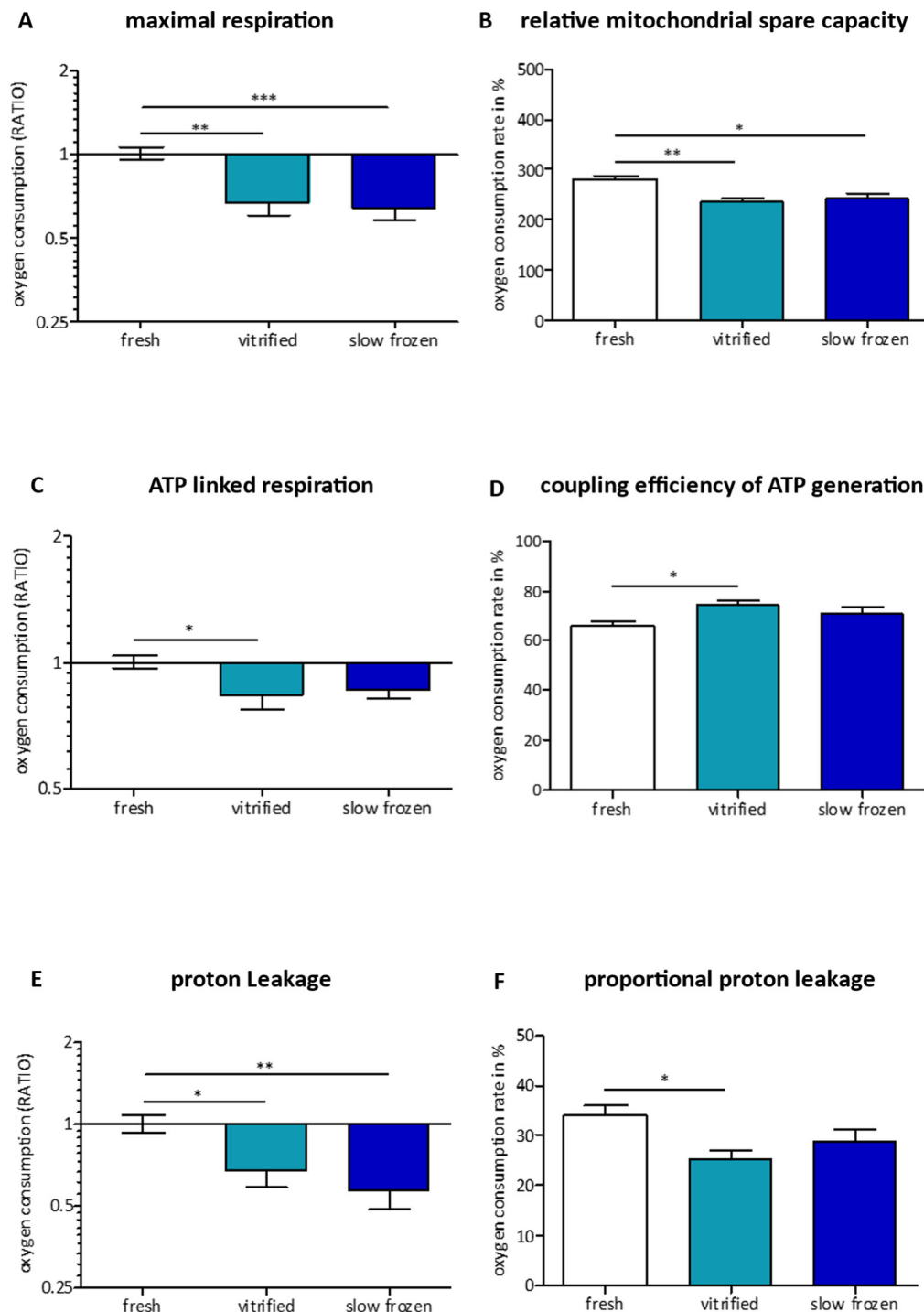


Figure. 2: Outline of embryo oxygen consumption rate (OCR) of fresh embryo groups (n = 12), vitrified embryo groups (n = 6) and freeze-thawed embryos groups (n=6) each containing 10 blastocysts during embryo stress test. Maximum respiration (mean $\pm$ SEM) of fresh embryos was significantly ($p < 0.05$) higher compared to vitrified-warmed and frozen-thawed blastocysts (A). Accordingly, the relative spare capacity was significantly higher in fresh vs. vitrified-warmed and frozen-thawed blastocysts (B). ATP-linked respiration was significantly higher in fresh vs. vitrified-warmed embryos (C) whereas coupling efficiency of ATP generation was significantly higher ($p < 0.05$) vitrified-warmed vs. fresh embryos (D). Amount of consumed oxygen lost by proton leakage was significantly lower in vitrified-warmed and frozen-thawed embryos compared to fresh counterparts (E) and the relative proportion of consumed oxygen lost by proton leakage in relation to total mitochondrial oxygen consumption differed significantly between fresh and vitrified-warmed embryos (F).

Vitrification reduced glycolytic activity

The present study demonstrated significantly ($p < 0.05$) higher individual ECAR values in fresh embryos compared to vitrified-warmed counterparts (0.243 ± 0.014 vs. 0.184 ± 0.008 mpH/min/embryo, respectively) whereas individual ECAR was not lower in frozen-warmed embryos (0.232 ± 0.017 mpH/min/embryo) than in fresh counterpart. Vitrified-warmed embryos showed a 1.2-fold reduction in extracellular acidification compared to the fresh group ($p < 0.05$) whereas frozen thawed embryos did not differ (Figure 3B).

Cryopreservation resulted in a lower potential for reactive glycolytic activity

Our study revealed that the response of the glycolytic pathway to increased mitochondrial respiration rates, the so-called reactive glycolytic activity, is higher in fresh embryos compared to vitrified-warmed and frozen-warmed embryos. In detail, the reactive glycolytic activity was reduced in vitrified-warmed and frozen-warmed embryos compared to fresh embryos (1.4-fold, 1.3-fold, respectively), as illustrated in Figure 3C. The proportion of reactive glycolytic activity related to basal extracellular acidification illustrated no difference between groups, as illustrated in Figure 3D.

Cryopreservation resulted in a lower potential for compensatory glycolytic activity

Our experiments demonstrated that the ability of the glycolytic pathway to compensate energy production in response to mitochondrial shutdown, referred to as the compensatory glycolytic activity was reduced in vitrified-warmed and frozen-warmed embryos compared to fresh embryos (1.3-fold and 1.2-fold, respectively $p < 0.05$) as presented in Figure 3E. The compensatory glycolytic activity in relation to the basal glycolytic activity, however, did not differ among fresh, vitrified-warmed, and frozen-warmed embryos (194.10 % vs. 239.40 % vs. 109.0 %, respectively), as shown in Figure 3F.

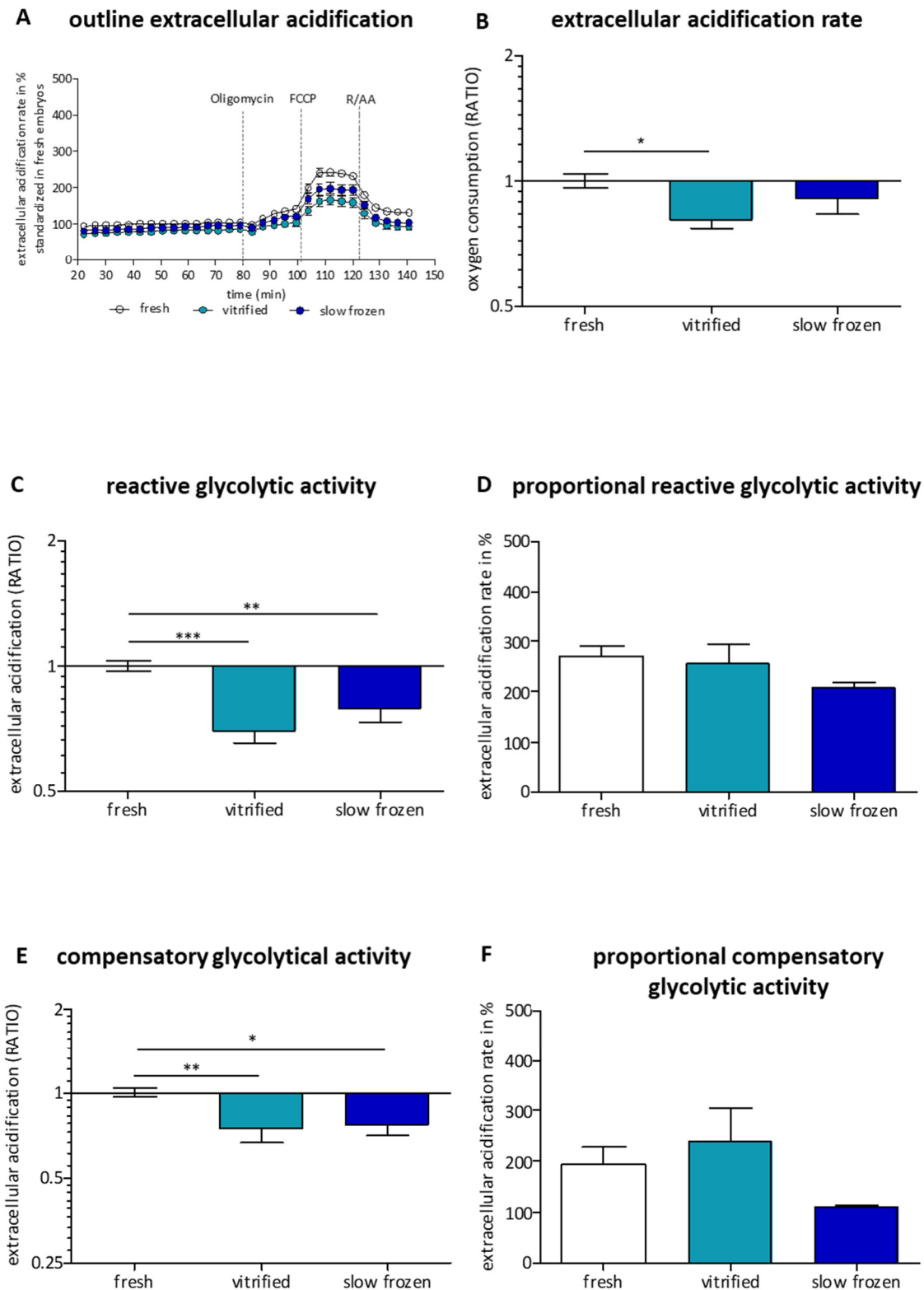


Figure.3: Outline of extracellular acidification rate (OCR) of fresh embryo groups (n = 12), vitrified embryo groups (n = 6) and freeze-thawed embryos groups (n = 6) each containing 10 blastocysts over time (A). Extracellular acidification rate (ECAR) of fresh embryos was significantly ($p < 0.05$) lower compared to vitrified-warmed embryos (B). Reactive glycolytic activity was higher in fresh compared to vitrified-warmed and frozen-thawed embryos (C) whereas relative proportion of reactive glycolytic activity based on total ECAR (%) did not differ between experimental groups (D). Compensatory glycolytic activity was significantly higher ($p < 0.05$) in fresh blastocysts compared to vitrified-warmed and frozen-thawed embryos (E) whereas proportional compensatory glycolytic activity based on total ECAR (%) did not differ between experimental groups (D).

Discussion

In the present study, metabolic measurements in terms of oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were performed on vitrified-warmed and slow frozen-thawed re-expanded blastocysts in comparison to fresh control blastocysts. Re-expansion four hours post-warming was used as a marker for viable embryos as reported previously (Vajta et al., 1996; Kaidi et al., 2001; Shu et al., 2009) confirming that most repair mechanisms are completed after four hours post-cryopreservation (Vajta et al., 1996). Nonetheless, cryopreserved embryos showed profound alterations about their bioenergetic profile.

Vitrification as well as slow freezing reduced total embryo oxygen consumption.

Our study found a reduction in total oxygen consumption (OCR) following cryopreservation compared to fresh control embryos. Lower OCRs after cryopreservation are in accordance with previous studies (Kaidi et al., 2001; Sakagami et al., 2007; Yamanaka et al., 2011; Kumasako et al., 2013). Yamanaka and colleagues for instance reported an OCR of 2.4 fmol/s (0.144 pmol/min) for hatched vitrified-warmed human blastocysts after warming compared to 7.8 fmol/s (0.468 pmol/min) for fresh embryos. In that study, rapid recovery of respiratory capacity was also associated with higher developmental competence (Yamanaka et al. 2011). In further agreement with our results, Sakagami and colleagues associated an OCR higher than 1.0×10^{-14} mol/s (0.6 pmol/min) with higher pregnancy rates in frozen-thawed ex vivo derived bovine blastocysts (Sakagami et al., 2007). Of impact, our study did not obtain a difference with respect to total oxygen consumption between vitrified-warmed and freeze-thawed embryos which appears to be conflictive with the finding that cryopreservation of embryos by vitrification is less detrimental to embryos than slow freezing (Kaidi et al., 2001). Although no differences were found between the two cryopreservation methods, vitrification and slow freezing are based on different strategies which might result in different patterns of damage reflected by contrasting outlines of the bioenergetic profile after warming. Consequently, it is essential to unravel total embryo oxygen consumption into its subcomponents (McKeegan and Sturmey, 2015), namely non-mitochondrial and mitochondrial oxygen consumption.

Vitrification as well as slow freezing reduced mitochondrial respiration.

The results of our study indicate that both analysed strategies for cryopreservation, Vitrification as well as slow freezing, reduced mitochondrial respiration. Our study reveals that mitochondrial respiration representing the amount of oxygen consumed by mitochondria is

reduced in vitrified-warmed and frozen-thawed embryos compared to fresh counterparts. This finding is supported by a recent study reporting impaired mitochondrial activity due to cryopreservation. In that study a reduced mitochondrial energy status associated with an altered mitochondrial distribution pattern was reported (Somoskoi et al., 2015). Even some years earlier, Dalcin and colleagues reported that frozen-thawed as well as vitrified-warmed sheep embryos did not show mitochondrial activity within one hour after warming/thawing (Dalcin et al., 2013). Frozen-thawed and vitrified-warmed embryos demonstrated a higher amount of swollen mitochondria and also an altered distribution compared to the fresh embryos (Dalcin et al., 2013). The lower mitochondrial respiration due to vitrification and slow freezing is also in line with studies reporting effects of cryopreservation on the molecular level. Sohn and colleagues for instance reported inactivation of mitochondrial-related enzymes (Sohn et al., 2002). Generally, damage to embryos due to cryopreservation has been attributed to lower mitochondrial activity and is associated with reduced embryonic developmental capacity (Brookes et al., 2004). Capability of re-expansion of cryopreserved embryos within a given timeframe in turn has been associated with embryo viability (Nedambale et al., 2004; Mucci et al., 2006; Shu et al., 2009; Arshad et al., 2021; Najafzadeh et al., 2021; Serrano Comes et al., 2022). In our study, the re-expansion rate of vitrified-warmed embryos did not differ compared to frozen-thawed embryos, however, it should be kept in mind that mitochondrial respiration reflects the status which does not indicate the unused mitochondrial potential, represented by the mitochondrial spare capacity, which might be even more crucial for subsequent embryo development.

Slow freezing increased non-mitochondrial respiration.

Representing a noteworthy result of the present study, freeze-thaw of bovine embryos resulted in higher non-mitochondrial respiration (RATIO) compared to vitrification-warming as well as compared to non-cryopreservation. In that light, the separation of total oxygen consumption in non-mitochondrial and mitochondrial respiration provided an explanation for the possible detrimental effects of slow freezing compared to vitrification, which has been shown in several studies (Nedambale et al., 2004; Mucci et al., 2006; Arshad et al., 2021; Najafzadeh et al., 2021). Non-mitochondrial oxygen utilisation is unfavourable because these cell surface related oxygen processes are associated with reactive oxygen species (ROS). In turn, high ROS production is associated with negative effects on embryo viability (Manes and Lai, 1995; Chacko et al., 2014). The share of non-mitochondrial respiration in the total oxygen consumption of fresh embryos was the lowest. In contrast, cryopreservation increased non-

mitochondrial related oxygen consumption with freeze-thawing causing highest rates of non-mitochondrial respiration by significance. Based on that finding we suggest that particularly embryos cryopreserved by slow freezing may be under oxidative stress related resulting in higher ROS levels. However, it should be noted that the levels of non-mitochondrial respiration in fresh embryos identified in our study accounted for approximately 10 % lower than those reported in the literature reporting proportions of up to 30 % in fresh mouse embryos (Trimarchi et al., 2000) and up to 20 % in fresh bovine embryos (Muller et al., 2019).

Vitrification as well as slow freezing reduced maximal mitochondrial energy generation capacity.

The results of our study revealed that both vitrification as well as slow freezing affect the maximal mitochondrial respiratory potential after warming. Both techniques of cryopreservation lead to a reduction in spare capacity compared to fresh embryos. To the best of our knowledge, our study is the first to demonstrate a detrimental effect of cryopreservation on maximal respiratory capacity and relative mitochondrial spare capacity of bovine embryo after warming/thawing. In other words, the unused mitochondrial potential for extra energy production is lower in bovine embryos after cryopreservation. This implicates a disadvantage of cryopreserved embryos in terms of energy production for further embryonic development, in which energy requirements are increased (Lopes et al., 2007) and by that in turn could explain the known fact of reduced hatching rates in cryopreserved embryos (Kaidi et al., 2001; Nedambale et al., 2004; Souza et al., 2018; van Do et al., 2018). This raises the question of whether the reduced mitochondrial spare capacity is due to a reduced number of mitochondria, a reduction in mitochondrial quality, or both. Indeed, Hara and colleagues as well as Hayashi et colleagues reported a lower number of blastomeres and lower mitochondrial mtDNA content in blastocysts derived from vitrified-warmed eight-cell embryos and freeze-thawed blastocysts, respectively (Hara et al., 2018; Hayashi et al., 2019). Furthermore, there is agreement on the minimum number of mtDNA copies as an indication of a certain number of mitochondria required for sufficient embryo production (Santos et al., 2006; Chiaratti et al., 2010; Ge et al., 2012). Considering that, we speculate that after cryopreservation, the number of morphologically and functionally intact mitochondria may be lowered resulting in altered mitochondrial respiration and capacity.

Cryopreservation altered quantity of ATP-linked respiration and abundance of proton leakage.

In addition to mitochondrial spare capacity, the efficiency of ATP generation might also be an important factor for embryo quality after cryopreservation. In particular, it should be borne in mind that blastocysts generate 82 % of their ATP via the oxidative phosphorylation pathway (Thompson et al., 1996). In this respect, the results of the present study showed a reduction in coupled respiration related to ATP generation, as well as uncoupled respiration related to proton leakage, after vitrification-warming and freeze-thawing of bovine embryos. Previous studies have also indicated altered levels of ATP production after cryopreservation (Khurana and Niemann, 2000). Surprisingly, both vitrified-warmed and frozen-thawed embryos produced energy as efficiently as fresh embryos with even higher coupling efficiencies for ATP production after vitrification-warming compared to fresh embryos. Similarly, an enhanced efficiency of oxygen consumption in frozen-thawed isolated liver mitochondria was reported earlier (Fuller et al., 1989). Speculatively, a possible explanation for higher coupling efficiencies in vitrified warmed versus fresh embryos could be due to a reduced number of functional mitochondria after cryopreservation. Indeed, Hayashi and colleagues as well as Hara and colleagues demonstrated the exclusion of damaged mitochondria from warmed and thawed embryos and postulated this process to be a mechanism of self-protection and preservation of function (Hara et al., 2018; Hayashi et al., 2019). Furthermore, we suggest that mitochondria that survive the cryopreservation process and regenerate may bear adequate functionality.

Another prerequisite for maintaining cell function is a low level of uncoupled respiration referred to as proton leakage (Brand, 2000). Indeed, cryoinjuries to the inner mitochondrial membrane system lead to higher uncoupled respiration (Tsvetkov et al., 1985). Despite the observed altered mitochondrial metabolic activity in our study and generally accepted morphological cryoinjuries after cryopreservation (Dalcin et al., 2013) increased proton leakage was not observed in the present study. Consequently, we assume that uncoupled respiration was not present at a detrimental level in our study implicating that the inner mitochondrial membrane system was not harmed. This is in agreement with observations of Yamanaka and colleagues who did not identify morphological membrane-related changes after cryopreservation (Yamanaka et al., 2011). Keeping in mind that embryos were given four hours of culture after warming prior analysis, this does not exclude the possibility that damaging uncoupled respiration would have been detectable earlier after warming. This in turn would support the need for an adequate recovery period after warming up.

Cryopreservation resulted in lower potential for reactive glycolytic activity.

The results of the present study showed that cryopreservation altered glycolytic activity. Besides the importance of the mitochondrial energy generating pathway, previous studies had also shown the importance of glycolysis after cryopreservation (Rieger et al., 1991; Gardner et al., 1996). Our study results reveal a reduced glycolytic activity of cryopreserved embryos compared to fresh embryos. Kaidi and colleagues also reported an effect of cryopreservation on glycolytic activity, depending on the cryopreservation method (2001). They postulated a stress response of slow-frozen embryos illustrated by higher glycolytic activity in terms of glucose uptake and lactate production (Kaidi et al., 2001). In agreement, Khurana & Niemann showed a significant reduction of CO₂ produced by glycolysis after slow freezing and vitrification (Khurana and Niemann, 2000) and anaerobic glucose metabolism was inhibited after cryoconservation of equine embryos (Rieger et al., 1991). Likewise, Gardner et al. (1996) measured nutrient uptake in culture media five hours after thawing of slow frozen bovine blastocysts and found a reduced nutrient uptake after freezing and identified glycolysis as an important energy providing pathway after cryopreservation (Gardner et al., 1996). Given that oxidative phosphorylation is related to glycolysis and that both pathways are affected by cryopreservation, the question therefore arises as to the extent to which glycolysis may respond to altered mitochondrial activity. This is of great interest to investigate to know the embryo's ability to meet the energy requirements for the energy-consuming processes of re-expansion and further development.

Cryopreservation resulted in lower potential for compensatory glycolytic activity.

Cryopreservation by vitrification and slow freezing reduced reactive glycolytic activity in the short term and compensatory glycolytic activity in the long term compared with fresh embryos. In contrast, the change in both reactive and compensatory glycolytic activity relative to baseline ECAR was unaffected by cryopreservation, regardless of whether vitrification or slow freezing was used. In other words, fresh embryos have a higher potential for glycolytic activity when mitochondrial energy production by oxidative phosphorylation is limited. Indeed, it was reported two decades ago that more than half of the blastomeres do not survive cryopreservation, resulting in lower rates of mitochondrial energy production by oxidative phosphorylation (Khurana and Niemann, 2000). Our results are also consistent with a recent study reporting that fresh embryos are better able to generate additional energy through glycolysis. In this context, an adequate level of glycolysis appears to be necessary to enable re-expansion after warming, which is an energy-demanding process (Gardner et al., 1996). In

contrast, our results did not show contrasting effects in terms of reactive and compensatory glycolytic activity depending on the cryopreservation technique used. In conclusion, our study shows that the glycolytic activity of embryos is reduced after cryopreservation-warming. In other words, cryopreserved embryos have a reduced capacity to generate extra energy by glycolysis, and therefore we also speculate that these embryos may be limited in their ability to increase mitochondrial energy production using pyruvate if required at later stages of development.

Collectively, our study showed that cryopreserved embryos are generally characterised by a reduced metabolic activity involving oxidative phosphorylation and glycolysis, explaining the detrimental effects of cryopreservation at the level of the bioenergetic profile. However, further research is needed to clarify whether a reduced number of mitochondria or their quality, or even both, cause the altered bioenergetic profiles after cryopreservation observed in the present study. Elucidation of the underlying relationships in this regard could make a fundamental contribution to the overarching goal of improving the cryopreservation of in vitro derived bovine embryos. It should be kept in mind, however, that these effects were obtained in cryopreserved, thawed/warmed embryos that re-expanded within four hours of thawing/warming. This suggests that embryos that have not re-expanded within four hours of thawing/warming may be affected by an even more profound downregulation of both energy-generating pathways. This would explain reduced developmental rates after cryopreservation and reduced pregnancy rates after embryo transfer, leading to lower rates of full-term development. Surprisingly, our study did not obtain any fundamental difference when comparing embryos from vitrification-warming and freeze-thawing in terms of mitochondrial respiration characteristics. However, the extent of non-mitochondrial oxygen consumption differed markedly between vitrified-warmed and frozen-thawed embryos. Speculatively, this higher non-mitochondrial respiration may be a key factor negatively affecting embryo viability after slow freezing compared to vitrification requiring further investigations.

Conclusion

Altogether, the present study identified several typical altered metabolic features, which clearly explain the known detrimental effects of cryopreservation. Fresh bovine embryos demonstrate a significantly higher oxygen consumption rate (OCR) compared to vitrified and slow frozen counterparts. This was found to be largely due to a significantly reduced

mitochondrial oxygen consumptions. In agreement, maximum mitochondrial respiration of vitrified and slow-frozen embryos was significantly reduced, and the proportion of ATP-linked respiration showed significantly lower values in vitrified-warmed embryos compared to fresh embryos. Likewise, vitrification-warming and freeze-thawing reduced reactive glycolytic capacity as well as compensatory glycolytic capacity in response to mitochondrial deficiency. Avoiding, these detrimental effects could improve cryopreservation of bovine embryos, while analysis of these traits could be useful indicators to assess the suitability of different cryopreservation protocols.

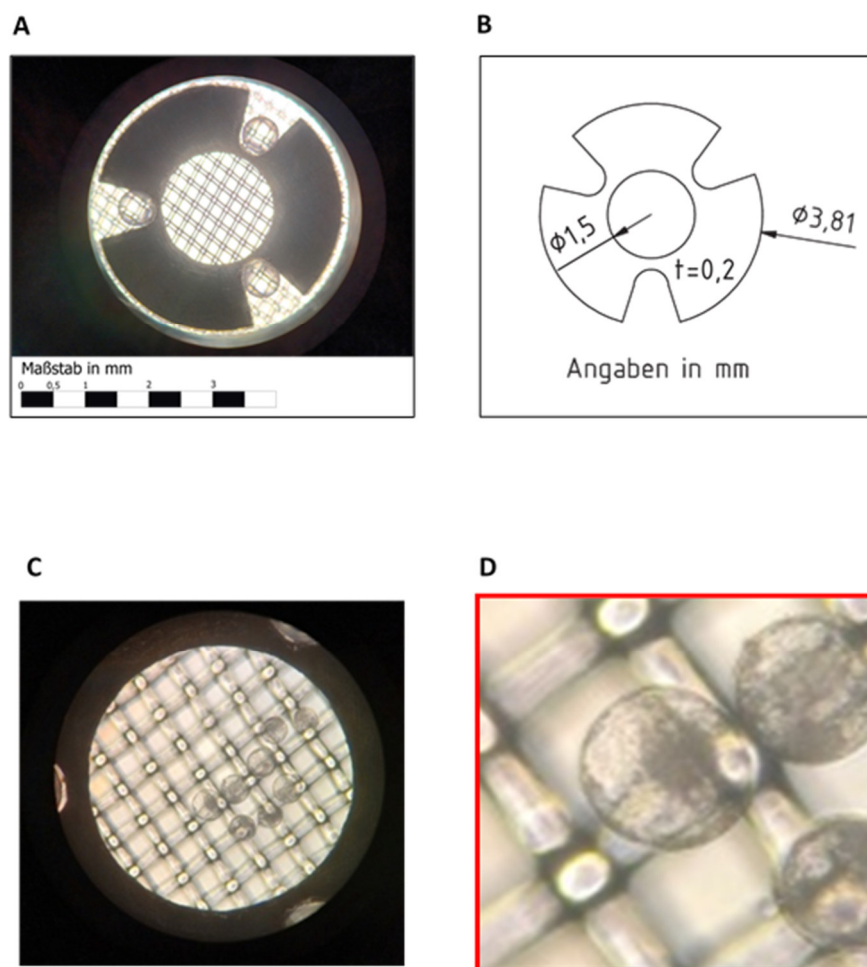
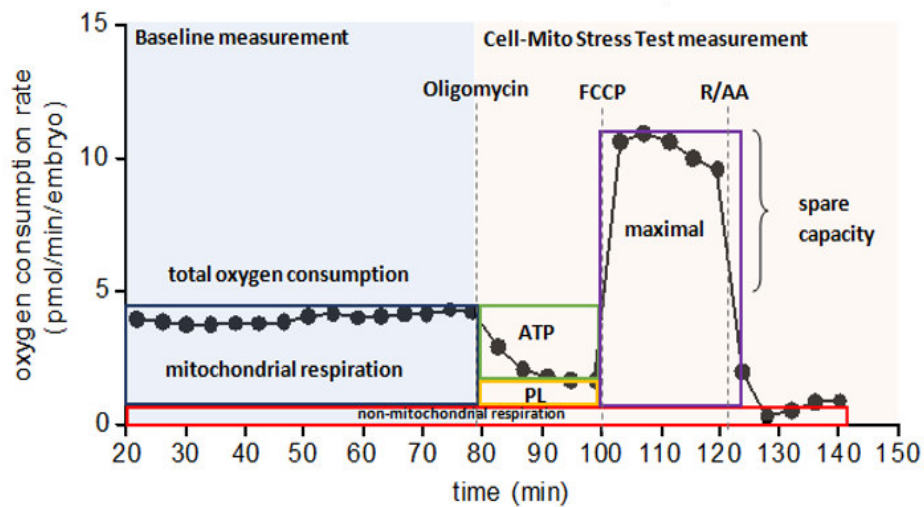


Figure 4: Illustration of the embryo cage for positioning of the embryos under the sensor system (A). This cage system consists of a metal insert as illustrated by a technical drawing (B) and a grid (mesh size: 150 μm , C) positioning a group of expanded blastocysts ($n = 10$, D).

A outline oxygen consumption rate mitochondrial activity



B outline extracellular acidification rate glycolytic activity

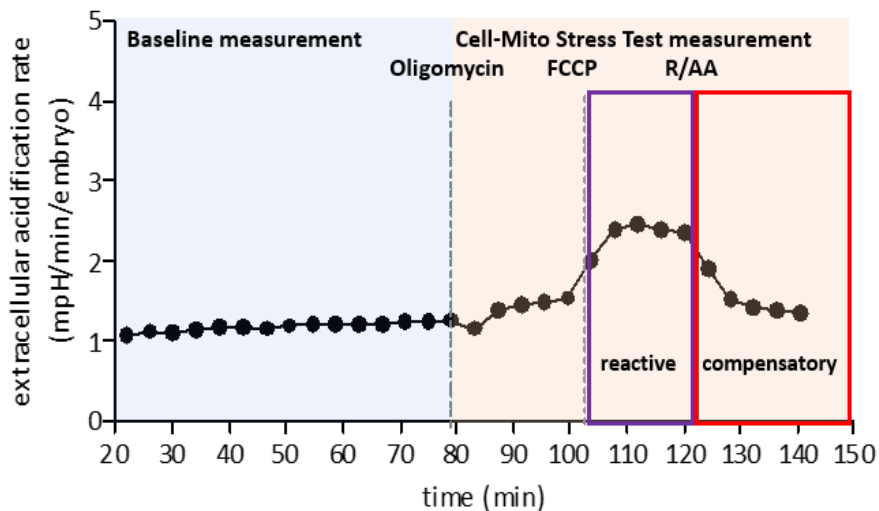


Figure 5: Explanation of the measurement of oxygen consumption rates and extracellular acidification rates. Illustration of the course of the oxygen consumption rate, which reflects the mitochondrial metabolic activity (A). After 15 baseline measurements, an XF Cell-Mito Stress Test (Agilent) followed. This consists of three serial injections of oligomycin, FCCP and R/AA allowing the determination of distinct mitochondrial parameters: Total oxygen consumption is composed of non-mitochondrial and mitochondrial respiration. Oxygen consumption associated with mitochondrial respiration in turn is composed of ATP-linked respiration (ATP) and oxygen consumption associated with proton leakage (PL). In addition, the maximum oxygen consumption and the spare capacity can be determined. Illustration of the course of the extracellular acidification rate, which reflects the glycolytic metabolic activity (B). In addition to the determination of the basic glycolytic activity, two parameters, the reactive glycolytic activity and the compensatory glycolytic activity both representing consequences of altered mitochondrial oxygen consumptions after injection of FCCP and R/AA can be determined.

References

- Arshad U, Sagheer M, González-Silvestry FB, Hassan M, Sosa F (2021) Vitrification improves in-vitro embryonic survival in *Bos taurus* embryos without increasing pregnancy rate post embryo transfer when compared to slow-freezing: A systematic meta-analysis. *Cryobiology* **101**, 1–11. doi:10.1016/j.cryobiol.2021.06.007
- Brair VL, Maia ALRS, Correia LFL, Barbosa NO, Santos JDR, Brandão FZ, Fonseca JF, Batista RITP, Souza-Fabjan JMG (2020) Gene expression patterns of in vivo-derived sheep blastocysts is more affected by vitrification than slow freezing technique. *Cryobiology* **95**, 110–115. doi:10.1016/j.cryobiol.2020.05.009
- Brand MD (2000) Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology* **35**(6-7), 811–820. doi:10.1016/s0531-5565(00)00135-2
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu S-S (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American journal of physiology. Cell physiology* **287**(4), C817-33. doi:10.1152/ajpcell.00139.2004
- C. Almiñana CC (2018) What is new in the cryopreservation of embryos? [Online]. *Animal Reproduction (AR)* **12**(3), 418 - 427-427. Available at: <https://animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/5b5a6031f7783717068b460b>.
- Caamaño JN, Gómez E, Trigal B, Muñoz M, Carrocera S, Martín D, Díez C (2015) Survival of vitrified in vitro-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology* **83**(5), 881–890. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.11.021
- Chacko BK, Kramer PA, Ravi S, Benavides GA, Mitchell T, Dranka BP, Ferrick D, Singal AK, Ballinger SW, Bailey SM, Hardy RW, Zhang J, Zhi D, Darley-Usmar VM (2014) The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. *Clinical Science* **127**(6), 367–373. doi:10.1042/CS20140101
- Chiaratti MR, Bressan FF, Ferreira CR, Caetano AR, Smith LC, Vercesi AE, Meirelles FV (2010) Embryo mitochondrial DNA depletion is reversed during early embryogenesis in cattle. *Biology of Reproduction* **82**(1), 76–85. doi:10.1095/biolreprod.109.077776
- Cuello C, Martinez CA, Cambra JM, Parrilla I, Rodriguez-Martinez H, Gil MA, Martinez EA (2021) Effects of Vitrification on the Blastocyst Gene Expression Profile in a Porcine Model. *International Journal of Molecular Sciences* **22**(3), 1222. doi:10.3390/ijms22031222 Available at: <https://www.mdpi.com/975284>.

- Dalcin L, Silva RC, Paulini F, Silva BDM, Neves JP, Lucci CM (2013) Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. *Cryobiology* **67**(2), 137–145. doi:10.1016/j.cryobiol.2013.05.012
- Dias LRO, Pivato I, Dode MAN (2017) Change in energy metabolism of in vitro produced embryos: an alternative to make them more cryoresistant? *Semina: Ciências Agrárias* **38**(4), 2237. doi:10.5433/1679-0359.2017v38n4p2237
- Dobrinsky JR (1996) Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* **45**(1), 17–26. doi:10.1016/0093-691x(95)00351-8
- Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP (2000) Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* **54**(5), 659–673. doi:10.1016/s0093-691x(00)00381-2
- Fang Y, Zeng S, Fu X, Jia B, Li S, An X, Chen Y, Zhu S (2014) ‘Developmental Competence In Vitro and In Vivo of Bovine IVF Blastocyst After 15 Years of Vitrification (3rd edn).’ [Online]. (Cryoletters). Available at: <https://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2014/00000035/00000003/art00009>.
- Ferré LB, Kjelland ME, Taiyeb AM, Campos-Chillon F, Ross PJ (2020) Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reproduction in Domestic Animals* **55**(6), 659–676. doi:10.1111/rda.13667
- Fuller BJ, Rubinacci A, Geboes K, Loecker W de (1989) The bioenergetics of mitochondria after cryopreservation. *Cryobiology* **26**(4), 333–340. doi:10.1016/0011-2240(89)90057-6
- Gardner DK, Pawelczynski M, Trounson AO (1996) Nutrient uptake and utilization can be used to select viable day 7 bovine blastocysts after cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development* **44**(4), 472–475. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199608)44:4<472::AID-MRD6>3.0.CO;2-I
- Ge H, Tollner TL, Hu Z, Dai M, Li X, Guan H, Shan D, Zhang X, Lv J, Huang C, Dong Q (2012) The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation in vitro on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence. *Molecular Reproduction and Development* **79**(6), 392–401. doi:10.1002/mrd.22042

- Gómez E, Carrocera S, Martín D, Pérez-Jánez JJ, Prendes J, Prendes JM, Vázquez A, Murillo A, Gimeno I, Muñoz M (2020) Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium. *Theriogenology* **146**, 39–47. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.01.056
- Gómez E, Rodríguez A, Muñoz M, Caamaño JN, Hidalgo CO, Morán E, Facal N, Díez C (2008) Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* **69**(8), 1013–1021. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.12.015
- Gualtieri R, Kalthur G, Barbato V, Di Nardo M, Adiga SK, Talevi R (2021) Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Caused by Cryopreservation in Reproductive Cells. *Antioxidants* **10**(3), 337. doi:10.3390/antiox10030337
- Hara T, Kin A, Aoki S, Nakamura S, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H (2018) Resveratrol enhances the clearance of mitochondrial damage by vitrification and improves the development of vitrified-warmed bovine embryos. *PloS one* **13**(10), e0204571. doi:10.1371/journal.pone.0204571
- Hasler JF, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Stokes JE (1997) Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology* **48**(4), 563–579. doi:10.1016/s0093-691x(97)00274-4
- Hayashi T, Kansaku K, Abe T, Ueda S, Iwata H (2019) Effects of resveratrol treatment on mitochondria and subsequent embryonic development of bovine blastocysts cryopreserved by slow freezing. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* **90**(7), 849–856. doi:10.1111/asj.13219
- Held-Hoelker E, Klein SL, Rings F, Salilew-Wondim D, Saeed-Zidane M, Neuhoef C, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M (2017) Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with l-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. *Theriogenology* **96**, 145–152. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.03.014
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H (1999) High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* **52**(4), 683–700. doi:10.1016/S0093-691X(99)00162-4
- Inaba Y, Miyashita S, Somfai T, Geshi M, Matoba S, Dochi O, Nagai T (2016) Cryopreservation method affects DNA fragmentation in trophectoderm and the speed of re-

-
- expansion in bovine blastocysts. *Cryobiology* **72**(2), 86–92.
doi:10.1016/j.cryobiol.2016.03.006
- Iwata H (2021) Resveratrol enhanced mitochondrial recovery from cryopreservation-induced damages in oocytes and embryos. *Reproductive Medicine and Biology* **20**(4), 419–426.
doi:10.1002/rmb2.12401
- Kaidi S, Bernard S, Lambert P, Massip A, Dessy F, Donnay I (2001) Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Biology of reproduction* **65**(4), 1127–1134.
doi:10.1095/biolreprod65.4.1127
- Khurana NK, Niemann H (2000) Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. *Theriogenology* **54**(2), 313–326. doi:10.1016/s0093-691x(00)00351-4
- Kumar S, Chaves MS, Silva AFB, Vale WG, Negreiros NAB, Arcce IML, Melo LM, Freitas VJdF (2022) Factors affecting the cryopreservation of oocytes and embryos in buffalo (*Bubalus bubalis*): A review. *Research, Society and Development* **11**(4), e25111427337.
doi:10.33448/rsd-v11i4.27337
- Kumasako Y, Goto K, Koike M, Araki Y, Abe H, Utsunomiya T (2013) Respiratory Activity of Single Blastocysts Measured by Scanning Electrochemical Microscopy: The Relationship between Pre-Freezing and Post-Warming. *Journal of Mammalian Ova Research* **30**(1), 30–35. doi:10.1274/jmor.30.30
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans ACO (2006) Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* **65**(1), 137–152. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.028
- Lopes AS, Greve T, Callesen H (2007) Quantification of embryo quality by respirometry. *Theriogenology* **67**(1), 21–31. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.09.026
- M.E.O.A. Assumpção, M.P. Milazzotto, R. Simões, A.C. Nicacio, C.M. Mendes, M.R.B. Mello, J.A. Visintin (2018) In vitro survival of in vitro-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification [Online]. *Animal Reproduction (AR)* **5**(3), 116 - 120-120. Available at:
<https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6077f7783717068b4799>.

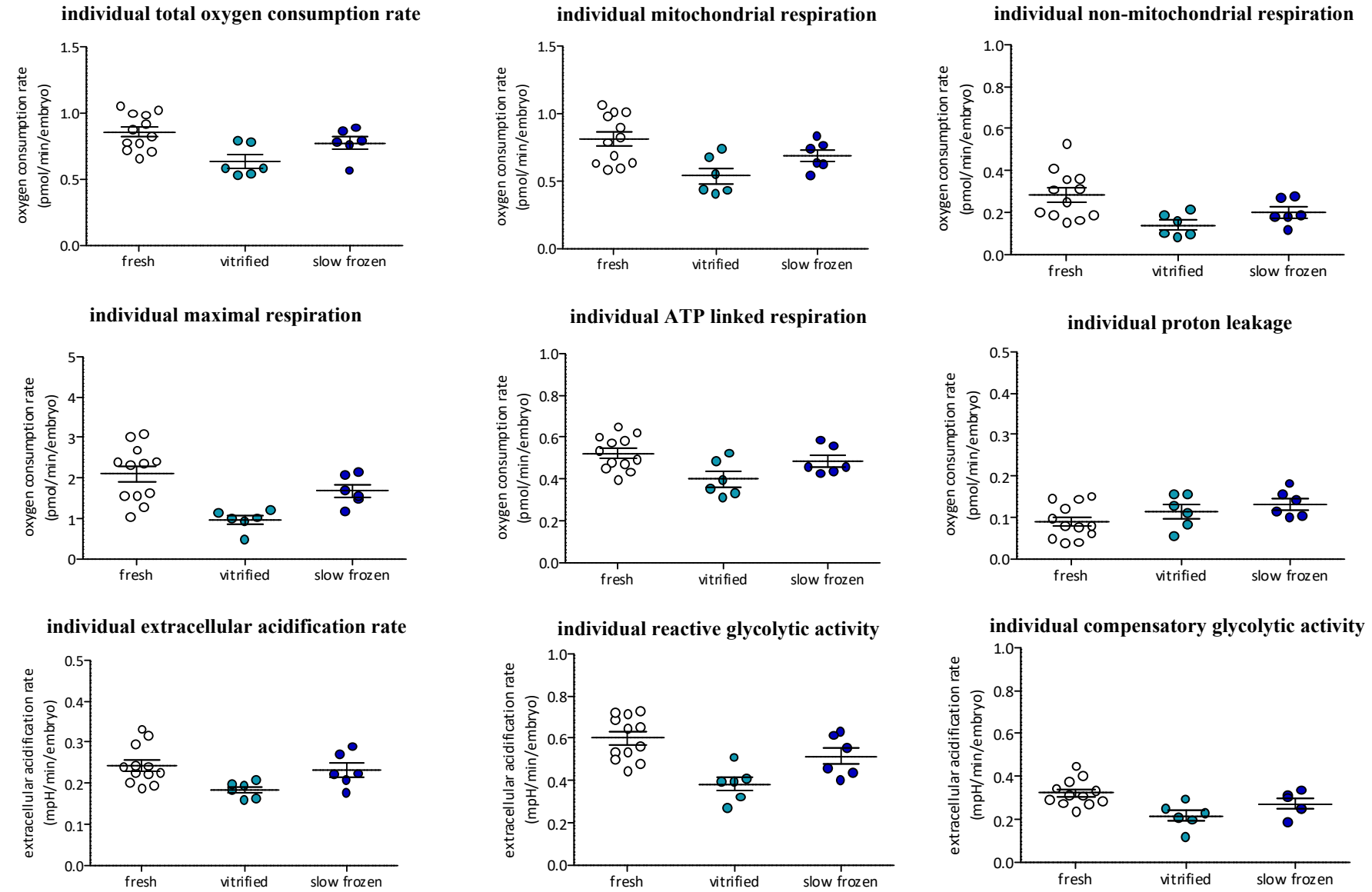
- Manes C, Lai NC (1995) Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals [Online]. *Journal of reproduction and fertility* **104**(1), 69–75. doi:10.1530/jrf.0.1040069
- Marsico TV, Camargo J de, Valente RS, Sudano MJ (2019) Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features. *Animal reproduction* **16**(3), 423–439. doi:10.21451/1984-3143-AR2019-0072
- McKeegan PJ, Sturmey R (2015) ‘The bioenergetic profile of the bovine blastocyst.’ *Reproduction Abstracts*. <https://doi.org/10.1530/repabs.2.O004>
- Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH (2006) Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* **65**(8), 1551–1562. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.08.020
- Muller B, Lewis N, Adeniyi T, Leese HJ, Brison DR, Sturmey RG (2019) Application of extracellular flux analysis for determining mitochondrial function in mammalian oocytes and early embryos. *Scientific Reports* **9**(1), 16778. doi:10.1038/s41598-019-53066-9
- Najafzadeh V, Bojsen-Møller Secher J, Pihl M, Aerenlund A, Jørgensen N, Jensen KK, Jensen MT, Fenner MF, Strøbech L, Hyttel P (2021) Vitrification yields higher cryo-survival rate than slow freezing in biopsied bovine in vitro produced blastocysts. *Theriogenology* **171**, 44–54. doi:10.1016/j.theriogenology.2021.04.020
- Nedambale TL, Dinnyés A, Groen W, Dobrinsky JR, Tian XC, Yang X (2004) Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* **62**(3-4), 437–449. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.10.020
- Nicacio AC, Simões R, Feritas de Paula-Lopes F, Olivera de Barros FR, Peres MA, Ortiz ME, Assumpção MA, Visintin JA (2011) ‘Effects of different cryopreservation methods on post-thaw culture conditions of in vitro produced bovine embryos.’ [Online]. (Zygote). Available at: <https://www.cambridge.org/core/journals/zygote/article/effects-of-different-cryopreservation-methods-on-postthaw-culture-conditions-of-in-vitro-produced-bovine-embryos/f2f9c6689a2ed05eb27d987b0fba9e1b>.
- Parrish JJ (2014) Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* **81**(1), 67–73. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.08.005

- Rieger D, Bruyas JF, Lagneaux D, Bézard J, Palmer E (1991) The effect of cryopreservation on the metabolic activity of day-6.5 horse embryos. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **44**, 411–417.
- Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, La Fuente J de, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A (2008) Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals* **43 Suppl 4**, 44–50.
doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002) Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development* **61**(2), 234–248. doi:10.1002/mrd.1153
- Sakagami N, Akiyama K, Nakazawa Y (2007) 216 THE RELATIONSHIP BETWEEN OXYGEN CONSUMPTION RATE AND PREGNANCY RATE OF BOVINE EMBRYOS. *Reproduction, fertility, and development* **19**(1), 225. doi:10.1071/rdv19n1ab216
- Sanches BV, Zangirolamo AF, Silva NC, Morotti F, Seneda MM (2017) Cryopreservation of in vitro-produced embryos: challenges for commercial implementation. *Animal Reproduction* **14**(3), 521–527. doi:10.21451/1984-3143-ar995
- Santos TA, El Shourbagy S, St John JC (2006) Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertility and Sterility* **85**(3), 584–591.
doi:10.1016/j.fertnstert.2005.09.017
- Serrano Comes C, Pastor Leary C, Hörmann-Kröpfl M, Schenk M, Weiss G (Eds) (2022) ‘The good, the bad and the ugly-The fate of collapsed blastocysts in frozen embryo transfer.’
- Shu Y, Watt J, Gebhardt J, Dasig J, Appling J, Behr B (2009) The value of fast blastocoele re-expansion in the selection of a viable thawed blastocyst for transfer. *Fertility and Sterility* **91**(2), 401–406. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.11.083
- Sirard M-A, Richard F, Blondin P, Robert C (2006) Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* **65**(1), 126–136. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.020
- Sohn IP, Ahn HJ, Park DW, Gye MC, Jo DH, Kim SY, Min CK, Kwon HC (2002) Amelioration of mitochondrial dysfunction and apoptosis of two-cell mouse embryos after freezing and thawing by the high frequency liquid nitrogen infusion. *Molecules and Cells* **13**(2), 272–280. [https://doi.org/10.1016/S1016-8478\(23\)15033-3](https://doi.org/10.1016/S1016-8478(23)15033-3).

- Somoskoi B, Martino NA, Cardone RA, Lacalandra GM, Dell'Aquila ME, Cseh S (2015) Different chromatin and energy/redox responses of mouse morulae and blastocysts to slow freezing and vitrification. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* **13**, 22. doi:10.1186/s12958-015-0018-z
- Souza JF, Oliveira CM, Lienou LL, Cavalcante TV, Alexandrino E, Santos RR, Rodrigues APR, Campello CC, Figueiredo JR, Dias FEF (2018) Vitrification of bovine embryos followed by in vitro hatching and expansion. *Zygote (Cambridge, England)* **26**(1), 99–103. doi:10.1017/S0967199417000570
- Stinshoff H, Wilkening S, Hanstedt A, Brüning K, Wrenzycki C (2011) Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology* **76**(8), 1433–1441. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.06.013
- Takahashi T, Inaba Y, Somfai T, Kaneda M, Geshi M, Nagai T, Manabe N (2013) Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, fertility, and development* **25**(4), 589–599. doi:10.1071/RD11262
- Thompson JG, Brown HM, Sutton-McDowall ML (2016) Measuring embryo metabolism to predict embryo quality. *Reproduction, fertility, and development* **28**(1-2), 41–50. doi:10.1071/RD15340
- Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI, Leese HJ (1996) Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *Journal of reproduction and fertility* **106**(2), 299–306. doi:10.1530/jrf.0.1060299
- Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJ, Keefe DL (2000) Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biology of Reproduction* **62**(6), 1866–1874. doi:10.1095/biolreprod62.6.1866
- Tsvetkov T, Tsonev L, Meranzov N, Minkov I (1985) Functional changes in mitochondrial properties as a result of their membrane cryodestruction. II. Influence of freezing and thawing on ATP complex activity of intact liver mitochondria. *Cryobiology* **22**(2), 111–118. doi:10.1016/0011-2240(85)90165-8
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H (1996) Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Animal Reproduction Science* **45**(3), 191–200. doi:10.1016/s0378-4320(96)01583-7

-
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H (1998) Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development* **51**(1), 53–58. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V
- van Do H, Catt S, Amaya G, Batsiokis M, Walton S, Taylor-Robinson AW (2018) Comparison of pregnancy in cattle when non-vitrified and vitrified in vitro-derived embryos are transferred into recipients. *Theriogenology* **120**, 105–110. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.07.027
- Voelkel SA, Hu YX (1992) Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* **37**(1), 23–37. doi:10.1016/0093-691X(92)90245-M
- Yamanaka M, Hashimoto S, Amo A, Ito-Sasaki T, Abe H, Morimoto Y (2011) Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. *Human reproduction (Oxford, England)* **26**(12), 3366–3371. doi:10.1093/humrep/der324

Supplementary figure: Individual embryo metabolism metrics – oxygen consumption rate & extracellular acidification rate



Kapitel 5: Allgemeine Diskussion & Schlussfolgerung

Assistierte Reproduktionstechniken, wie die In-vitro Produktion von Rinderembryonen und die Kryokonservierung, gewinnen zunehmend an Bedeutung für die Rinderzucht (Viana, 2022). Der Einsatz dieser Techniken wird jedoch durch eine geringere Entwicklungskompetenz nach Embryotransfer sowie einer verminderten Kryotauglichkeit limitiert (Hasler et al., 1995; Rizos et al., 2003; Lonergan et al., 2016). Es ist bekannt, dass die Entwicklungsumgebung Einfluss auf die Entwicklungskompetenz von Rinderembryonen im Blastozystenstadium ausübt (Rizos et al., 2002c). Eigenschaften der Rinderembryonen werden durch die Entwicklungsumgebung beeinflusst und korrelieren mit deren Entwicklungskompetenz, darunter die Aktivität des Energiestoffwechsels (Souza et al., 2015; Rabaglino et al., 2023). Die Aktivität des mitochondrialen Energiestoffwechsels, die sogenannte oxidativen Phosphorylierung, wurde in bisherigen Studien indirekt über den Parameter des Gesamtsauerstoffverbrauchs bestimmt und mit der Entwicklungskompetenz und der Implantationsfähigkeit in Verbindung gebracht (Lopes et al., 2007b; Sakagami et al., 2007). Dieser Parameter stellt jedoch die mitochondriale Funktionalität zur Energieerzeugung nicht in Gänze dar. Tiefergehende bioenergetische Profilanalysen hingegen können die mitochondriale Funktionalität detailliert charakterisieren (Chacko et al. 2014). Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher in einer fundierten Analyse des bioenergetischen Profils von Rinderembryonen unterschiedlicher Entwicklungskompetenz als Folge einer IVP oder einer Kryokonservierung. Dies diene der Beantwortung der Frage, ob die mitochondriale Funktionalität zur Energieerzeugung mit der Vitalität von Rinderembryonen korreliert. Es könnte ein verbessertes Verständnis der Grundlagen der embryonalen Vitalität generiert werden, um zukünftig die Optimierung der IVP und der Kryokonservierung zu realisieren.

Zu diesem Zweck wurde an Rinderembryonen mit unterschiedlicher Entwicklungskompetenz das bioenergetische Profil bestimmt. Dabei erfolgte eine Differenzierung des Gesamtsauerstoffverbrauchs von Rinderembryonen in die beiden Komponenten mitochondrialer Sauerstoffverbrauch und nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch. Nachfolgend wird der mitochondriale Sauerstoffverbrauch in seine Komponenten, den ATP gebundenen- und den Proton Leak-bezogenen Sauerstoffverbrauch unterteilt. Hieraus lässt sich die Effizienz der Energieerzeugung berechnen. Des Weiteren wird der maximale Sauerstoffverbrauch ermittelt und in Relation zum mitochondrialen Sauerstoffverbrauch die mitochondriale Reservekapazität berechnet. Zur Aufklärung des Zusammenhanges zwischen der mitochondrialen Funktionalität zur Energieerzeugung und der Vitalität von

Rinderembryonen wurde in der ersten Studie untersucht, ob das bioenergetische Profil nach einer IVP die Vitalität von Rinderembryonen erklären kann. Die zweite Studie untersuchte, ob das bioenergetische Profil die Vitalität von Rinderembryonen nach Kryokonservierung erklärt.

Das bioenergetische Profil von IVP-Rinderembryonen im Vergleich zu In-vivo Rinderembryonen und dessen Potential zur Erklärung der umweltbedingten embryonalen Vitalität

Es ist bekannt, dass verschiedene morphologische-, genetische, entwicklungs kinetische- und metabolische Charakteristika der Rinderembryonen durch die In-vitro Entwicklungsumgebung beeinflusst werden und mit deren Entwicklungskompetenz korrelieren (Rizos et al., 2002c). Daher wurde in der ersten Studie (Kapitel 3) die Entwicklungsumgebung zur Klassifizierung der Entwicklungskompetenz von Rinderembryonen genutzt, um Korrelationen zwischen der Entwicklungskompetenz und dem bioenergetischen Profil von Rinderembryonen zu bestimmen. Hierzu wurde das bioenergetische Profil von In-vivo erzeugten Rinderembryonen mit dem bioenergetischen Profil In-vitro produzierter Rinderembryonen verglichen. Dabei wurde den In-vitro produzierten Rinderembryonen, die bereits am Tag 7 das expandierte Blastozystenstadium erreicht hatten, eine höhere Entwicklungskompetenz zugeschrieben als jenen, die dieses Stadium erst am Tag 8 erreichten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass In-vitro produzierte Tag 7 Rinderembryonen im Vergleich zu In-vivo erzeugten Rinderembryonen einen signifikant geringeren Gesamtsauerstoffverbrauch aufweisen, wohingegen keine Unterschiede in Bezug auf das bioenergetische Profil zu ermitteln sind.

Der in der vorliegenden Studie ermittelte vorhandene signifikante Unterschied im Gesamtsauerstoffverbrauch nach IVP, deckt sich mit Ergebnissen früherer Studien an Rinderembryonen (Thompson et al., 1996b; Lopes et al., 2007a). In einer kürzlich veröffentlichten Studie (Lee et al., 2022) konnte ebenfalls ein signifikant reduzierter Gesamtsauerstoffverbrauch bei In-vitro produzierten Mäuseembryonen festgestellt werden. In der Vergangenheit wurde der Gesamtsauerstoffverbrauch gleichgesetzt mit der Aktivität der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien und mit der Entwicklungskompetenz von Mäuse-, Human- und Rinderembryonen in Verbindung gesetzt (Lopes et al., 2007a; Wakefield et al., 2011; Satoshi Sugimura et al., 2012; Kurosawa et al., 2016). Dieser Gesamtsauerstoffverbrauch von Embryonen ist streng genommen jedoch nicht gleichzusetzen

mit dem Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien, da zusätzlich nicht-mitochondriale Sauerstoffprozesse existieren, die nicht zur Energieerzeugung sondern zur Generierung von ROS beitragen (Manes und Lai, 1995; Muller et al., 2019; Trimarchi et al., 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen auf die Bedeutung der Bestimmung des bioenergetischen Profils hin, da der Gesamtsauerstoffverbrauch als Parameter zu ungenauen Rückschlüssen führen kann. Der reduzierte Gesamtsauerstoffverbrauch in In-vitro produzierten Rinderembryonen würde auf eine verminderte Aktivität der Mitochondrien schließen lassen, jedoch zeigt das bioenergetische Profil, dass der mitochondriale Sauerstoffverbrauch durch eine IVP in Tag 7 Rinderembryonen nicht beeinträchtigt ist. Eine Tendenz eines reduzierten maximalen Sauerstoffverbrauchs In-vitro produzierter Rinderembryonen war zu verzeichnen, was auf eine tendenziell reduzierte Kapazität zur Energieerzeugung für die weitere Entwicklungsschritte hindeuten könnte. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der erst kürzlich erschienen Studie an Mäuseembryonen, die einen verminderten maximalen Sauerstoffverbrauch nach IVP im Vergleich zu In-vivo erzeugten Mäuseembryonen erfassten (Lee et al., 2022). Überdies zeigt die Studie von Lee et al. (2022), dass das Ausmaß der Reduktion des maximalen Sauerstoffverbrauchs von den verwendeten Kulturbedingungen abhängt. Es sollte daher bedacht werden, dass unterschiedliche Kulturmedien und –systeme im Rahmen der IVP auch unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivität des Energiestoffwechsels von Rinderembryonen haben können (Abe et al., 1999b; Kaidi et al., 2001; Rizos et al., 2002a). So ist beispielsweise bekannt, dass serumhaltige Kulturmedien zu Lipideinlagerungen führen (Wrenzycki et al. 1999; Abe et al. 2002; Held-Hoelker et al. 2017) und ein Anstieg des Gesamtsauerstoffverbrauchs in Rinderembryonen bedingen (Thompson et al., 1996b; Abe et al., 1999b). In der vorliegenden Studie wurde ein SOF-Medium mit einer Supplementierung von Fettsäure freiem bovinem Serumalbumin (**BSA-FAF**) genutzt. Es ist bekannt, dass eine Supplementierung mit Serum im Vergleich zu einer Supplementierung mit BSA-FAF zu höheren Entwicklungsraten, aber morphologisch stärker beeinträchtigten IVP-Embryonen führt, was sich folglich auch im Energiestoffwechsel widerspiegelt (Abe et al. 1999b; Krisher et al., 1999).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der ersten Studie, dass In-vitro produzierte Tag 7 Rinderembryonen ein vergleichbares bioenergetisches Profil wie In-vivo erzeugte Rinderembryonen aufweisen. Der Gesamtsauerstoffverbrauch wird allerdings durch die Entwicklungsumgebung beeinflusst. In Folgestudien sollte das bioenergetische Profil nach Kultur in unterschiedlichen Medien und IVP-Systemen analysiert werden, um neue

Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen der In-vitro Kultur und dem „Large Offspring Syndrom“ aufzudecken. Es wäre denkbar, dass die epigenetischen Veränderungen, die das „Large Offspring Syndrom“ bedingen, sich auch in einem veränderten mitochondrialen Energiestoffwechsel zeigen. Ferner, könnte zukünftig die Fertilitätsproblematik der hochleistenden Milchkühe, bedingt durch eine negative Energiebilanz, mittels Parameter des bioenergetischen Profils untersucht werden.

Das bioenergetische Profil von IVP-Rinderembryonen mit schneller Entwicklungskinetik im Vergleich zu IVP-Rinderembryonen mit verlangsamer Entwicklungskinetik und dessen Potential zur Erklärung der embryonalen Vitalität

In der ersten Studie (Kapitel 3) wurden In-vitro produzierte Rinderembryonen zusätzlich anhand ihrer Entwicklungskinetik, als Modell für die Entwicklungskompetenz gruppiert, da bekannt ist, dass eine verzögerte Entwicklungskinetik von Rinderembryonen mit einer geringeren Entwicklungskompetenz korreliert (van Soom et al., 1997; Lonergan et al., 1999; Huayhua et al., 2023). So wurden Blastozysten die am Tag 8 expandierten als weniger entwicklungskompetent klassifiziert, wohingegen Tag 7 expandierte Blastozysten als entwicklungskompetenter eingestuft werden (Hasler et al., 1995). Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss der Entwicklungskinetik, als Kriterium der embryonalen Vitalität, auf das bioenergetische Profil von Rinderembryonen bestimmt. Hierzu wurde das bioenergetische Profil von In-vitro produzierten Rinderembryonen, welche verzögert am Tag 8 das expandierte Blastozystenstadium erreichten, mit dem Profil der Rinderembryonen, die sich bereits am Tag 7 in diesem Stadium befanden, sowie In-vivo erzeugten Tag 7 Rinderembryonen, welche als entwicklungskompetent angesehen werden, verglichen.

Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass der Gesamtsauerstoffverbrauch der In-vitro produzierten Rinderembryonen mit geringerer Entwicklungskompetenz sich deutlich von In-vivo erzeugten Rinderembryonen unterschied. Des Weiteren zeigte sich, dass In-vitro produzierte Rinderembryonen mit geringer Entwicklungskompetenz ein verändertes bioenergetisches Profil im Vergleich zu entwicklungskompetenteren In-vitro produzierten und In-vivo erzeugten Rinderembryonen aufwiesen. Ein signifikant reduzierter ATP-gebundener Sauerstoffverbrauch bei vergleichbarem Proton Leak wurde in Rinderembryonen mit geringerer Entwicklungskompetenz ermittelt, wodurch die Effizienz der Energieerzeugung sich als erheblich reduziert darstellte. Des Weiteren konnten in den Studien sowohl ein verminderter

maximaler Sauerstoffverbrauch als auch eine stark reduzierte mitochondriale Reservekapazität festgestellt werden. Die reduzierte Aktivität und Effizienz der Mitochondrien der In-vitro produzierten Rinderembryonen von geringer Entwicklungskompetenz korrelierte zudem mit signifikant reduzierten ROS Gehalten und einer gleichzeitig erhöhten Lipidakkumulation.

Frühere Studien zeigten, dass die Entwicklungskompetenz In-vitro produzierter Rinderembryonen einen Einfluss auf den Gesamtsauerstoffverbrauch ausübt (Agung et al., 2005; Hiroyuki Abe, 2007; Kim et al., 2014). In der vorliegenden Studie konnten jedoch keine Unterschiede hinsichtlich des Gesamtsauerstoffverbrauchs zwischen schnellerer und verlangsamer Entwicklungskinetik, nachgewiesen werden. Möglicherweise stehen diese konträren Ergebnisse mit den unterschiedlichen Klassifizierungsmethoden für die embryonale Entwicklungskompetenz in Zusammenhang. Die vorliegende Studie klassifizierte Rinderembryonen anhand ihrer Entwicklungskinetik, wohingegen in der Studie von Agung et al. (2005) morphologische Charakteristika zur Klassifizierung genutzt wurden. Zudem konnte gezeigt werden, dass morphologisch als exzellent und als gut kategorisierte Rinderembryonen sich nicht signifikant im Gesamtsauerstoffverbrauch unterschieden. Lediglich Rinderembryonen mit starken morphologischen Abweichungen wiesen signifikante Unterschiede im Gesamtsauerstoffverbrauch auf (Hiroyuki Abe, 2007). Die in der vorliegenden Studie analysierten Tag 8 Rinderembryonen waren morphologisch allesamt als gut kategorisiert worden, wodurch die nicht vorhandenen signifikanten Unterschiede im Gesamtsauerstoffverbrauch im Vergleich zu In-vitro produzierten Tag 7 Rinderembryonen erklärbar wären. Des Weiteren sollte beachtet werden, dass die extrazelluläre FLUX Analyse die Sauerstoffverbrauchsrate einer Gruppe von Rinderembryonen bestimmt und keine Einzelembryomessungen durchführt, wie dies bei der SECM-Technik, die durch Kim et al., (2014) zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs verwendet wurde, der Fall ist. Durch die Messung von Embryonengruppen und die Berechnung der Messwerte pro Embryo wurde in der vorliegenden Studie ein Mittelwert errechnet. Hierdurch werden potentielle individuell embryonale Effekte unter Umständen maskiert. Allerdings identifizierte die vorliegende Studie einen Zusammenhang zwischen der Entwicklungskompetenz und den einzelnen bioenergetischen Parametern. Dies unterstreicht die Bedeutung der Bestimmung des bioenergetischen Profils, da sich morphologisch gute Rinderembryonen mit unterschiedlicher Entwicklungskinetik in ihrem bioenergetischen Profil unterscheiden. Insbesondere zeigten die vorliegenden Ergebnisse einen reduzierten ATP-gebundenen Sauerstoffverbrauch bei In-vitro produzierten Rinderembryonen mit geringer Entwicklungskompetenz. Dies steht im Einklang mit einem reduzierten mitochondrialen Membranpotential, was über Fluoreszenz Anfärbungen

in einer früheren Studie ermittelt werden konnte (Tarazona et al., 2006). Eine verminderte ATP-Produktion in humanen Embryonen geht mit einer verzögerten Entwicklungskinetik einher und bestätigt das vorliegende Ergebnis (van Blerkom et al., 1995). Dieses Ergebnis widerspricht zwar der „quiet embryo hypothesis“, steht jedoch in Einklang mit dem von Leese et al. (2016) weiterentwickelten „Goldilocks principle“, wonach Embryonen mit einer intermediären Energiestoffwechselaktivität die höchste Entwicklungskompetenz besitzen. Sowohl eine zu hohe, als auch eine zu niedrige Aktivität des Energiestoffwechsels ist mit einer verminderten Entwicklungskompetenz verbunden (Sutton-McDowall et al., 2012; Leese et al., 2016). Ansätze zur Definierung optimaler Wertebereiche für den Verbrauch von Energiesubstraten und den Gesamtsauerstoffverbrauch sind teilweise vorhanden, konnten jedoch lediglich als Orientierung bestätigt werden (Lopes et al., 2007b; Lima et al., 2020). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Energieerzeugung nicht nur in reduziertem Umfang, sondern auch ineffizienter in Rinderembryonen von geringerer Entwicklungskompetenz erfolgt. Der ATP-gebundene Sauerstoffverbrauch war im Verhältnis zum Proton Leak-bezogenen Sauerstoffverbrauch reduziert, in Rinderembryonen mit geringer Entwicklungskompetenz. In somatischen Zellen korreliert dies mit einer verstärkten Translation von „Uncoupling Proteinen“ (Chacko et al., 2014; Zhao et al., 2019). Die verstärkte Aktivität von „Uncoupling Proteinen“, die sich in der inneren mitochondrialen Membran befinden und Protonen aus dem Intermembranraum in den Matrixraum schleusen, stellt einen Schutzmechanismus der somatischen Zelle vor oxidativem Stress dar (Zhao et al., 2019). So zeigen vorherige Studien, dass Herzmuskelzellen parallel zu einer verstärkten Expression des „Uncoupling Protein“, eine reduzierte ATP-Produktion und eine reduzierte Generierung ROS aufweisen, bei gleichzeitig erhöhtem Proton Leak, um so oxidativen Schädigungen durch eine erhöhte mitochondriale Energieerzeugung entgegen zu wirken (Cadenas, 2018). Dies könnte potenziell bedeuten, dass Rinderembryonen mit verminderter Entwicklungskompetenz sich durch einen Proton Leak-bezogenen Sauerstoffverbrauch, im Vergleich zur ATP Produktion, gegen ein erhöhtes ROS Level schützen. Die in der vorliegenden Studie reduzierte ATP-Produktion und verminderten Gehalte an ROS in In-vitro produzierten Rinderembryonen mit geringerer Entwicklungskompetenz, gingen wie zuvor beschrieben, mit einer gesteigerten Lipidakkumulation einher. Bereits frühere Studien zeigten, dass eine verstärkte Lipidakkumulation in Rinderembryonen wiederum mit einer reduzierten β -Oxidation korreliert (Crosier et al., 2001; Sutton-McDowall et al., 2012). Es ist bekannt, dass die im Kulturmedium vorgelegten Energiesubstrate und die endogenen Reserven von Rinderembryonen die Aktivität der oxidativen Phosphorylierung beeinflussen (Barnett and

Bavister, 1996; Ferguson and Leese, 2006). Eine erhöhte Lipidakkumulation und gleichzeitig reduzierte Gehalt an ROS in dieser Studie lässt daher darauf schließen, dass Rinderembryonen von geringer Entwicklungskompetenz nicht von einem Mangel an Energiesubstraten betroffen sind, sondern die mitochondriale Aktivität reduziert ist. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass eine verzögerte Teilung der Zygote mit einer verminderten mitochondrialen Aktivität der Blastozyste verbunden war, was sich ebenfalls in der Expremierung von Genen mit einer Rolle im Lipidstoffwechsel widerspiegelte (Lima et al., 2023). Folglich, kann geschlussfolgert werden, dass Rinderembryonen von geringerer Entwicklungskompetenz, ihren Energieansprüchen für die weitere Entwicklung nicht gerecht werden. Zudem stünde dies im Einklang mit der ermittelten reduzierten mitochondrialen Reservekapazität der Rinderembryonen mit geringerer Entwicklungskompetenz in dieser Studie. Die verminderte mitochondriale Reservekapazität könnte somit eine Erklärung für die Abnahme der Implantationsraten nach Transfer von Tag 8 Blastozysten darstellen (Hasler et al., 1995). Dies verdeutlicht die Wechselwirkung zwischen der embryonalen Entwicklungskompetenz und der Entwicklungsumgebung für den Implantationserfolg. Ursächlich für eine geringe mitochondriale Reservekapazität im Blastozystenstadium könnte die Kompetenz der Mitochondrien zur Energieerzeugung sein. Hierfür spricht der in den vorliegenden Studie ermittelte reduzierte Anteil des ATP-gebundenen Sauerstoffverbrauchs am mitochondrialen Sauerstoffverbrauch, in Rinderembryonen von geringerer Entwicklungskompetenz. Andererseits kann zum jetzigen Zeitpunkt auch nicht ausgeschlossen werden, dass in den Rinderembryonen mit geringerer Entwicklungskompetenz, nicht nur die mitochondriale Funktionalität zur Energieerzeugung sondern auch die Anzahl an Mitochondrien vermindert ist, welche von Mitogenese- und Mitophagieprozessen abhängig ist (Chiaratti et al., 2010; Fu et al., 2019; Zhao et al., 2022). Eine Störung dieser Prozesse, könnte ebenfalls mit einer beeinträchtigten mitochondrialen Kompetenz verbunden sein (Chiaratti et al., 2010).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen somit, dass eine verzögerte Entwicklungskinetik von Rinderembryonen, als Modell für eine geringere Entwicklungskompetenz, mit einer erheblich reduzierten und ineffizienten Energieerzeugung korreliert. Dies weist auf mitochondriale Dysfunktionen als Ursache für die embryonale Vitalität hin. Folgestudien sollten dennoch die Bestimmung der Gesamtanzahl an Mitochondrien pro Rinderembryo, etwa über die Ermittlung der mtDNA copy number, in Betracht ziehen, um die Aussagen der bioenergetischen Profilanalyse zu ergänzen. Dies würde klären, ob die Aktivität

der oxidativen Phosphorylierung von der Gesamtzahl der Mitochondrien beeinflusst wurde oder ausschließlich der mitochondrialen Integrität geschuldet ist.

Das bioenergetische Profil von IVP-Rinderembryonen nach Kryokonservierung im Vergleich zu nicht-kryokonservierten Rinderembryonen und dessen Potential zur Erklärung der kryobedingten embryonalen Vitalität

Neben der IVP beeinträchtigt zudem die Kryokonservierung morphologische-, genetische- und metabolische Charakteristika von Rinderembryonen, was mit einer geringeren embryonalen Vitalität korreliert (Farin et al., 2001; Kaidi et al., 2001; Stinshoff et al., 2011). Die zweite Studie der vorliegenden Arbeit (Kapitel 4) untersuchte daher die Auswirkungen der Kryokonservierung auf das bioenergetische Profil von Rinderembryonen. Hierzu wurde die Parameter des bioenergetischen Profils von kryokonservierten Rinderembryonen (Vitrifikation und Slow Freezing) mit dem von nicht-kryokonservierten Rinderembryonen verglichen.

Die Ergebnisse zeigten, einen reduzierten Gesamtsauerstoffverbrauch nach einer Kryokonservierung. Dies war auf die Reduktion des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs zurückzuführen, welcher mit einem reduzierten ATP-gebundenen Sauerstoffverbrauch einherging. Weiterhin ermittelten die Ergebnisse dieser Studie, dass lediglich die Höhe nicht aber die Effizienz der Energieerzeugung durch die Kryokonservierung beeinträchtigt wurde. Dies zeigte sich an dem unveränderten Anteil des Proton Leak-bezogenen Sauerstoffverbrauchs und dem ATP-gebundenen Sauerstoffverbrauch. Des Weiteren bedingte die Kryokonservierung eine deutlich verminderte mitochondriale Reservekapazität. Zudem zeigten die Ergebnisse, dass zwei ergänzende Parameter, die reaktive- und die kompensatorische glykolytische Aktivität der Rinderembryonen, nach einer Kryokonservierung ebenfalls geringer ausfallen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass eine Kryokonservierung einen starken Einfluss auf das bioenergetische Profil der Rinderembryonen ausübt. Der ermittelte verminderte Gesamtsauerstoffverbrauch nach Kryokonservierung bestätigt dabei frühere Untersuchungen an verschiedenen Spezies (Vajta et al., 1996; Kaidi et al., 2001; Sakagami et al., 2007; Kumasako et al., 2013). Dies lässt auf eine reduzierte mitochondriale Aktivität nach Kryokonservierung schließen, was in der vorliegenden Studie erstmals beobachtet wurde. Des Weiteren bestätigt der reduzierte ATP-gebundene Sauerstoffverbrauch vorherige Berichte bezüglich eines verminderten ATP-Gehaltes in kryokonservierten Rinderembryonen (Khurana und Niemann, 2000a; Hara et al., 2018; Hayashi et al., 2019). Die Verminderung der

Energieerzeugung über die oxidative Phosphorylierung lässt auf Beeinträchtigungen der mitochondrialen Atmungskette als Folge der Kryokonservierung schließen. Diese Schlussfolgerung wird durch eine verminderte Expression von Genen, die für Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette kodieren, unterstützt (Sohn et al., 2002). Zudem korreliert eine verminderte mitochondriale Aktivität mit morphologischen Beeinträchtigungen der Mitochondrien nach Kryokonservierung, die durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an Rinder- und Schafembryonen bestätigt wurden (Fair et al., 2001; Dalcin et al., 2013). Dies könnte ebenfalls die ermittelte, verminderte mitochondriale Reservekapazität in der vorliegenden Studie erklären. Andererseits zeigte sich auch, dass die kryokonservierten Rinderembryonen hinsichtlich der Effizienz der ATP-Erzeugung nicht beeinträchtigt waren. Diese Erkenntnisse entsprechen denen der Studie von Fuller et al. (1989), welche kryokonservierte Mitochondrien aus Leberzellen analysierten. Des Weiteren ist bekannt, dass nicht funktionsfähige Mitochondrien gezielt entfernt werden, sodass ein Pool aus leistungsfähigen Mitochondrien aufrechterhalten wird (Chappel, 2013). Daher kann, die Annahme aufgestellt werden, dass nach Kryokonservierung ein Pool aus funktionsfähigen Mitochondrien erhalten bleibt, wohingegen geschädigte Mitochondrien ausgeschleust und durch Prozesse der Mitophagie abgebaut werden. Dies wird unterstützt durch frühere Erkenntnisse, dass nach Kryokonservierung vermehrt mtDNA im Kulturmedium nachzuweisen ist und gleichzeitig kryokonservierte Rinderembryonen eine verminderte Zellzahl aufweisen (Kaidi et al., 2001; Stinhoff et al., 2011; Hara et al., 2018; Hayashi et al., 2019). Eine reduzierte mitochondriale Reservekapazität bei effizientem mitochondrialen Energiestoffwechsel wäre die Folge, wie in vorliegender Studie ermittelt. Dies liefert auch eine Erklärung für verminderte Schlupf- und Implantationsraten nach Kryokonservierung (Sanches et al., 2016; Gómez et al., 2020), da eine erheblich verminderte mitochondriale Reservekapazität auch auf eine suboptimale Energiebereitstellung für nachfolgende Entwicklungsschritte hindeuten könnte. Daher stellte sich die Frage, ob kryokonservierte Rinderembryonen eine verminderte mitochondriale Energieerzeugung über einen Anstieg der Glykolyse kompensieren können. Dies konnte bereits in Ratten- und Mäuseembryonen aufgezeigt werden (Wakefield et al., 2011; Lee et al., 2022). Die vorliegende Studie konnte dies für Rinderembryonen nicht bestätigen. Die verminderte mitochondriale Aktivität nach Kryokonservierung wurde demnach nicht durch eine gesteigerte glykolytische Aktivität kompensiert. Ergebnisse früherer Studien an Rinderembryonen, wiesen einen reduzierten Laktatgehalt des Kulturmediums nach Kryokonservierung nach und dies wurde mit einer allgemein verminderten glykolytischen Aktivität verbunden (Kaidi et al., 2001). Die Studie von

Gardner et al. (1996) konnte ermitteln, dass die glykolytische Aktivität der Blastozysten für eine Re-expansion nach Kryokonservierung von Bedeutung ist. Vitale Rinderembryonen wiesen im Vergleich zu nicht-vitalen Rinderembryonen einen größeren Glukoseverbrauch und eine höhere Laktatproduktion auf (Gardner et al., 1996). Allerdings konnte in anderen Studien auch festgestellt werden, dass eine sehr hohe Glykolyserate zu niedrigeren Implantationsraten bei Mäuseembryonen führt (Lee et al., 2022). Dies spiegelt das „Goldilocks principle“ wieder, welches die embryonale Vitalität mit einer intermediären Energiestoffwechselaktivität korreliert (Leese et al., 2016).

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Kryokonservierung von Rinderembryonen zu einem veränderten bioenergetischen Profil, insbesondere durch eine verminderte Energieerzeugung durch die oxidative Phosphorylierung, die nicht durch glykolytische Aktivität ausgeglichen werden kann, führt. Ebenfalls wird die mitochondriale Reservekapazität zur Energieerzeugung nach Kryokonservierung reduziert, was ursächlich für eine reduzierte Entwicklungskompetenz kryokonservierter Rinderembryonen sein könnte. Zukünftige Studien sollten die Wechselwirkung zwischen der Glykolyse und der oxidativen Phosphorylierung untersuchen auch in nicht-kryokonservierten Rinderembryonen, aufgrund der bestehenden Interaktion dieser beiden Hauptenergiestoffwechselwege. Weiterhin erscheint eine Bestimmung der Aktivität der β -Oxidation als sinnvoll, da diese in den Mitochondrien lokalisiert ist und sowohl einen Einfluss auf die Aktivität der oxidativen Phosphorylierung nimmt als auch mit Lipidakkumulationen und den Konsequenzen der Kryotauglichkeit korreliert. Dies könnte auch zu einem verbesserten Verständnis über die Funktionsweise des Warburg Effektes in Rinderembryonen beitragen, welcher mit einer steigenden Bedeutung der β -Oxidation für die oxidative Phosphorylierung einhergeht.

Das bioenergetische Profil von IVP-Rinderembryonen nach Kryokonservierung mittels Slow-Freezing und Vitrifikation und dessen Potential zur Erklärung der kryoverfahrensbedingten embryonalen Vitalität.

Es ist bekannt, dass der Grad der Beeinträchtigung von Rinderembryonen nach Kryokonservierung durch das angewandte Kryokonservierungsverfahren beeinflusst wird (Mazur and Paredes, 2016; Valente et al., 2022). Das Verfahren des Slow Freezings führt dabei im Vergleich zur Vitrifikation zu einer stärkeren Beeinträchtigung der Entwicklungskompetenz von Rinderembryonen (Da Moreira Silva and Metelo, 2005; Mucci et al., 2006; Inaba et al., 2016; Sanches et al., 2017; Gómez et al., 2020). Der spezifische Einfluss des Kryokonservierungsverfahrens auf das bioenergetische Profil von Rinderembryonen wurde

deshalb in der zweiten Studie zusätzlich ermittelt. Hierzu wurden expandierte Blastozysten entweder mit dem Verfahren des Slow Freezings oder der Vitrifikation kryokonserviert.

Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass das Kryokonservierungsverfahren einen Einfluss auf den nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch ausübte. Dabei wiesen, Rinderembryonen nach Slow Freezing einen deutlich erhöhten nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu vitrifizierten und nicht-kryokonservierten Rinderembryonen auf.

Bislang wurde der Gesamtsauerstoffverbrauch von Rinderembryonen nach Slow Freezing und Vitrifikation erst in einer Studie verglichen (Kaidi et al., 2001). Im Gegensatz zur vorliegenden Studie konnten in der Studie von Kaidi et al. (2001) Unterschiede hinsichtlich des Gesamtsauerstoffverbrauchs zwischen den beiden Kryokonservierungsverfahren ermittelt werden. Das abweichende Ergebnis, könnte jedoch durch das unterschiedliche Nachkultivierungsverfahren bedingt sein. Die Nachkultivierung vor Bestimmung des Gesamtsauerstoffverbrauchs wurde in der Studie von Kaidi et al. (2001) über 18 h in einer Ko-Kultur mit somatischen Zellen (buffalo rate livercells) durchgeführt, wohingegen in unserer Studie das Nachkultivierungsmedium dem Kulturmedium entsprach. Der in der vorliegenden Studie erstmals aufgezeigte nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch von kryokonservierten Rinderembryonen, verdeutlicht die potenziell nachteilige Wirkung des Slow Freezings im Vergleich zur Vitrifikation. Die schädigende Wirkung eines erhöhten nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs kann dabei durch die Produktion ROS erklärt werden und führt vermutlich zu einer Störung des REDOX-Gleichgewichtes (Chacko et al., 2014). Vermutlich ist der erhöhte nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch ursächlich für eine geringere Entwicklungskompetenz von Rinderembryonen nach Slow Freezing. Das Zeitfenster bis zur Re-Expansion der Rinderblastozyste nach einer Kryokonservierung sollte jedoch für die Interpretation mitberücksichtigt werden. Durch die vorhandene Reparaturmechanismen von Rinderembryonen nach Kryokonservierung (Mohr und Trounson, 1981; Vajta et al., 1996; Hara et al., 2018) können Effekte der Kryokonservierung nach der vier stündige Re-expansionszeit im Vorfeld der extrazellulären FLUX Analyse in der vorliegenden Studie nicht mehr ermittelbar sein, sodass potentielle Effekte auf das bioenergetische Profil der Rinderembryonen nicht mehr detektierbar waren. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Ergebnisse einer früheren Studie an humanen, vitrifizierten maturierten Oozyten, welche vier Stunden nach Erwärmung eine Erhöhung des Gesamtsauerstoffverbrauchs aufwiesen (Han et al., 2019).

Die vorliegende Studie konnte ermitteln, dass das Kryokonservierungsverfahren, vier Stunden nach Kryokonservierung, einen signifikanten Einfluss auf den nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch ausübte. Dieser könnte die schädlichere Auswirkung des Slow Freezings auf die embryonale Entwicklungskompetenz im Vergleich zur Vitrifikation erklären. Zukünftige Untersuchungen sollten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Erwärmung durchgeführt werden, um die Auswirkungen auf das bioenergetische Profil besser zu verstehen. Dies würde auch eine mögliche Maskierung der Ergebnisse durch die Wahl eines ungünstigen Zeitpunktes ausschließen. Darüber hinaus bedarf das Ergebnis des erhöhten nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs nach Slow Freezing weitere Forschung. So sollte der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch verifiziert werden, beispielsweise durch Lokalisierung des Sauerstoffverbrauchs im Embryo nach Kryokonservierung mittels bildgebender Verfahren, die die Autofluoreszenz von NAD(P)H nutzen. Des Weiteren könnte die zusätzliche Bestimmung des Niveaus an ROS Hinweise auf einen schädigenden Einfluss geben.

Insgesamt konnten die beiden Studien zeigen, dass das bioenergetische Profil zu einem verbesserten Verständnis bezüglich der Vitalität von Rinderembryonen nach IVP oder Kryokonservierung beiträgt. Es wurde ersichtlich, dass entwicklungskompetente In-vitro produzierte Rinderembryonen ein vergleichbares bioenergetisches Profil aufwiesen wie In-vivo erzeugte Rinderembryonen. Dagegen zeigte sich ein Einfluss der Entwicklungskompetenz, kategorisiert anhand der embryonalen Entwicklungskinetik, auf das bioenergetische Profil. In-vitro produzierte Rinderembryonen mit verminderter Entwicklungskompetenz weisen eine erheblich reduzierte und ineffiziente Energieerzeugung, als auch eine stark verringerte mitochondriale Reservekapazität auf. Des Weiteren besitzt die Kryokonservierung einen Einfluss auf das bioenergetische Profil, verdeutlicht durch eine verminderte Energieerzeugung über die oxidative Phosphorylierung, sowie eine verminderten mitochondriale Reservekapazität. Zusätzlich konnte ermittelt werden, dass die verminderte mitochondriale Energieerzeugung nicht über eine glykolytische Aktivität kompensiert werden kann. Das Kryokonservierungsverfahren besitzt vier Stunden nach Kryokonservierung einen Einfluss auf den nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch. Es zeigt sich, dass Rinderembryonen nach Slow Freezing einen hohen nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch aufweisen, welcher möglicherweise mit der schädlicheren Auswirkung des Slow Freezings korreliert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern die mitochondriale Funktionalität zur Energieerzeugung, charakterisiert durch das bioenergetische Profil, mit der Vitalität von Rinderembryonen korreliert, beziehungsweise diese beschreiben kann. Durch die Unterteilung des Gesamtsauerstoffverbrauchs in die einzelnen Parameter des bioenergetischen Profils besteht die Möglichkeit Merkmale aufzudecken, die mit der embryonalen Entwicklungskompetenz korrelieren. Anhand unterschiedlicher embryonaler Entwicklungskompetenzen, klassifiziert durch die Entwicklungsumgebung, die Entwicklungskinetik, einer Kryokonservierung sowie dem Kryokonservierungsverfahren selbst, war es möglich, einen Zusammenhang zwischen der Vitalität von Rinderembryonen und der mitochondrialen Funktionalität zur Energieerzeugung herzustellen. Es zeigte sich, dass das bioenergetische Profil einen Beitrag zum Verständnis der Vitalität von Rinderembryonen nach In-vitro Kultivierung in Bezug auf entwicklungskinetische Effekte sowie den Einfluss einer Kryokonservierung liefern kann. Bei der Beurteilung der mitochondrialen Vitalität ist die Beziehung zwischen den einzelnen Parametern des bioenergetischen Profils entscheidend. So kann sich eine beeinträchtigte Entwicklungskompetenz von Rinderembryonen, in einer ineffizienten oder erblich reduzierten Reservekapazität zur Energieerzeugung widerspiegeln. Des Weiteren stellt ein hoher nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch ein potenziell negatives Merkmal dar. Im Gegensatz dazu war für entwicklungskompetente Rinderembryonen ein hoher ATP-gebundener Sauerstoffverbrauch in Relation zum Proton Leak-bezogenen Sauerstoffverbrauch typisch, was eine effiziente Energieerzeugung widerspiegelt. Ein weiteres Kennzeichen entwicklungskompetenter Rinderembryonen ist eine ausreichende mitochondriale Reservekapazität. Damit konnten die vorliegenden Studien eine reduzierte Vitalität der Rinderembryonen nach IVP oder Kryokonservierung durch eine Beeinflussung des bioenergetischen Profils erklären. Folglich konnte die eingangs aufgestellte Hypothese, dahingehend bestätigt werden, dass die Funktionalität des Mitochondrienpools von Rinderembryonen mit der embryonalen Vitalität korreliert.

Dennoch sollte in Folgestudien versucht werden, den Sauerstoffverbrauch auf die Zellzahl der Rinderembryonen zu standardisieren. In den vorliegenden Studien wurde durch die Analyse morphologisch homogener Gruppen diese Limitierung ausgeglichen. Ein objektiveres Verfahren zur Ermittlung der Zellzahl, ist die Bestimmung und Standardisierung der Sauerstoffverbrauchsrates auf die Anzahl an Zellkernen mittels Hoechst-Färbung. Weiterhin verlieren die Embryonen nach der Bestimmung des bioenergetischen Profils ihre Vitalität. Dies schränkt den Nutzen dieser Technik für den Erkenntnisgewinn und die Analyse von

Zusammenhängen im Rahmen der Grundlagenforschung ein. Ferner wäre es von besonderem Interesse, die Beziehung zwischen dem bioenergetischen Profil der Mitochondrien und der Aktivität anderer Zellorganellen, wie beispielsweise dem Endoplasmatischen Retikulum, den Peroxisomen oder den Lysosomen zu untersuchen, umso ein verbessertes Verständnis über die Grundlagen der embryonalen Vitalität zu erhalten. Des Weiteren könnte ein zukünftiges Ziel die Definition eines „bioenergetic health index“ für Rinderembryonen sein, wie durch Chacko et al. (2014) bereits für somatische Zellen geschehen, um einen Wert zur Charakterisierung der embryonalen Vitalität zu erhalten. Da die mitochondriale Funktionalität, in Form des bioenergetischen Profils, mit der embryonalen Vitalität in Beziehung steht, kann zukünftig das bioenergetische Profil als Werkzeug in der Grundlagenforschung genutzt werden. Dies kann zur Optimierung assistierter Reproduktionstechniken dienen und damit zu einer effizienteren Nutzung dieser Techniken führen, wodurch die Rinderzucht in der landwirtschaftlichen Praxis profitieren kann.

Kapitel 6: Zusammenfassung

Assistierte Reproduktionstechniken, zur Generierung von Rinderembryonen über das MOET Verfahren, als auch zur IVP von Rinderembryonen mittels OPU-IVP, können in Kombination mit einer Kryokonservierung zu einem schnelleren Zuchtfortschritt und einem verbesserten Reproduktionsmanagement in der landwirtschaftlichen Praxis beitragen (Hansen, 2023). Die Nachfrage nach In-vitro produzierten Rinderembryonen ist in den letzten zehn Jahren stetig angestiegen (Viana, 2022). Allerdings bedingen sowohl die IVP von Rinderembryonen, als auch die Kryokonservierung eine Reduktion der embryonalen Vitalität. Dies stellt sich in verminderten Entwicklungsraten, reduzierten Re-Expansionsraten nach Kryokonservierung und geringeren Implantationsraten nach Embryotransfer dar (Hasler et al., 1995; Rizos et al., 2002a; Vilamil et al., 2012; van Do et al., 2018). Die Adaptation der Rinderembryonen, an die nicht-physiologische In-vitro Entwicklungsumgebung zeigt sich neben einer veränderten Morphologie und einer differentiellen Expremierung von Genen, die eine Rolle im Energiestoffwechsel besitzen, unter anderem in einer modifizierten embryonalen Energiestoffwechselaktivität. Gleiches ist für Rinderembryonen nach Kryokonservierung bekannt. In diesem Zusammenhang nehmen Mitochondrien eine zentrale Rolle im Rahmen der Energieerzeugung ein.

Die vorliegende Arbeit folgt daher der Hypothese, dass die embryonale Vitalität nach IVP und Kryokonservierung mit der mitochondrialen Funktionalität korreliert. Zur Klärung dieser Hypothese wurde deshalb das bioenergetische Profil von Rinderembryonen unterschiedlicher Entwicklungskompetenzen und deren Mitochondrien mit einer neuen Methodik, der extrazellulären Flux Analyse unter der Anwendung des „embryo cage“ Systems, miteinander verglichen. Dies ermöglicht die Messung des Umfangs der oxidativen Phosphorylierung durch Ermittlung des Gesamtsauerstoffverbrauchs und der Glykolyse, ermittelt durch die extrazelluläre Ansäuerung des Mediums. Zur Erfassung der Einzelparameter des bioenergetischen Profils wurde der XF Cell-Mito Stress Test (Agilent, CA USA) durchgeführt. Dabei werden mitochondrial wirksame Substanzen (Oligomycin, FCCP und Rotenone/Antimycin A) zugesetzt, die auf die mitochondriale Atmungskette einwirken und die Bestimmung der Einzelparameter des bioenergetischen Profils ermöglichen. Somit konnte der embryonalen Gesamtsauerstoffverbrauch in seine einzelnen Komponenten, den mitochondrialen und den nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch, differenziert werden. Weiterhin konnte der mitochondriale Sauerstoffverbrauch in den ATP bezogenen- und Proton

Leak-gebundenen Sauerstoffverbrauch unterteilt werden sowie die Effizienz der Energieerzeugung als auch die mitochondriale Reservekapazität berechnet werden.

Ziel der vorliegenden Studie war es somit zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen dem bioenergetischen Profil als Indikator für die mitochondriale Funktionalität zur Energieerzeugung und der embryonalen Vitalität nach einer IVP oder einer Kryokonservierung besteht. Folglich zielten die hier aufgeführten Studien darauf ab 1.) das bioenergetischen Profil von IVP Rinderembryonen im Vergleich zu In-vivo Rinderembryonen zu analysieren und dessen Potential zur Erklärung der umweltbedingten embryonalen Vitalität zu bestimmen, 2.) das bioenergetischen Profils von IVP Rinderembryonen mit schneller Entwicklungskinetik im Vergleich zu Rinderembryonen mit verlangsamter Entwicklungskinetik zu analysieren und dessen Potential zur Erklärung der embryonalen Vitalität zu bestimmen, 3.) das bioenergetischen Profil von IVP Rinderembryonen nach Kryokonservierung im Vergleich zu nicht-kryokonservierten Rinderembryonen zu analysieren und dessen Potential zur Erklärung der kryobedingten embryonalen Vitalität zu bestimmen sowie 4.) das bioenergetischen Profil von IVP Rinderembryonen nach Kryokonservierung mittels Slow-Freezing im Vergleich zur Vitrifikation zu bestimmen und dessen Potential zur Erklärung der Kryoverfahrens bedingten embryonalen Vitalität zu bestimmen. Diese Konzepte und deren Ergebnisse wurden in zwei aufeinander aufbauenden Studien zusammengefasst und diskutiert.

Die erste Studie (Kapitel 3) befasste sich mit dem Einfluss der In-vitro Kultur auf das bioenergetische Profil von Rinderembryonen. Zu diesem Zweck wurden In-vitro produzierte Rinderembryonen mit In-vivo erzeugten Rinderembryonen verglichen. Zudem wurden die Rinderembryonen nach IVP anhand ihrer Entwicklungskinetik kategorisiert, wobei eine verzögerte Entwicklungskinetik als Modell für eine geringere Entwicklungskompetenz diente. Insgesamt wurden 32 In-vivo erzeugte mit 32 In-vitro produzierten Tag 7 expandierte Blastozysten sowie 48 Blastozysten die erst an Tag 8 expandierten verglichen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass entwicklungskompetente expandierte Blastozysten, die in einem SOFaa + 0.6 % FAF Kulturmedium erzeugt wurden, ein vergleichbares bioenergetisches Profil aufwiesen wie In-vivo erzeugte Rinderembryonen. Beeinträchtigende Auswirkungen der In-vitro Entwicklungsumgebung auf die mitochondriale Energieerzeugung zeigten sich in den Rinderembryonen von verminderter Entwicklungskompetenz anhand von Abweichungen des bioenergetischen Profils. Ein geringerer ATP-gebundener Sauerstoffverbrauch im Verhältnis

zum Proton Leak-bezogenen Sauerstoffverbrauch unterschied sich zwischen In-vivo erzeugten und entwicklungskompetenten In-vitro produzierten Rinderembryonen im Vergleich zu in vitro produzierten Rinderembryonen mit geringerer Entwicklungskompetenz. Dies verdeutlichte, dass eine geringe Entwicklungskompetenz von Rinderembryonen aus IVP mit einer verminderten Effizienz der Energieerzeugung einhergeht. Des Weiteren wiesen Rinderembryonen aus IVP eine geringere mitochondriale Reservekapazität auf. Daraus lässt sich schließen, dass eine verminderte Entwicklungskompetenz von In-vitro produzierten Rinderembryonen sowohl mit einer reduzierten Energieerzeugung als auch mit einer verminderten Reservekapazität zur Energieerzeugung einhergeht. Dies könnte mit einer verminderten Fähigkeit verbunden sein, angemessen auf eine Steigerung des Energiebedarfs in der nachfolgenden Entwicklung zu reagieren und folglich eine Ursache für die geringeren Implantationsraten nach Embryotransfer sein. Damit hat die erste Studie eine praxisrelevante Erklärung für die verminderten Implantationsraten nach Embryotransfer von Tag 8 Rinderembryonen aus IVP gezeigt.

Die zweite Studie (Kapitel 4) befasste sich mit dem Einfluss der Kryokonservierung auf das bioenergetische Profil von Rinderembryonen. Zu diesem Zweck wurde das bioenergetische Profil von nicht-kryokonservierten Rinderembryonen mit dem von kryokonservierten Rinderembryonen aus IVP verglichen. Zusätzlich wurde der Einfluss des Kryokonservierungsverfahrens berücksichtigt, indem das bioenergetische Profil nach Vitrifikation und Slow Freezing miteinander verglichen wurde. Die Kryokonservierung wurde als ein Modell für eine beeinträchtigte Entwicklungskompetenz verwendet. Dabei zeigten frühere Studien, dass das Slow Freezing einen schädlicheren Einfluss im Vergleich zur Vitrifikation ausübt. Insgesamt wurden jeweils 60 nicht-kryokonservierte Rinderembryonen mit jeweils 60 vitrifizierten Rinderembryonen und 60 Rinderembryonen nach Slow Freezing verglichen. Zur Bestimmung des bioenergetischen Profils wurden re-expandierte Blastozysten fünf Stunden nach dem Erwärmen der kryokonservierten Rinderembryonen verwendet. Die Ergebnisse der zweiten Studie zeigten, dass die Beeinträchtigung der Rinderembryonen durch die Kryokonservierung mit der Ausprägung des bioenergetischen Profils korrelierte. Die Höhe des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs und der Energieerzeugung waren nach Kryokonservierung erheblich reduziert. Dies hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Effizienz der Energieerzeugung. Wie in der ersten Studie zeigten Rinderembryonen mit verminderter Entwicklungskompetenz eine signifikant geringere Reservekapazität. Die beeinträchtigte mitochondriale Energiestoffwechselaktivität wurde nicht durch eine erhöhte glykolytische Energiestoffwechsel-

aktivität kompensiert. Schließlich führte das Slow Freezing Verfahren zu einer signifikanten Erhöhung des nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs. Dies könnte eine Ursache für die nachteiligeren Auswirkungen des Slow Freezings im Vergleich zur Vitrifikation sein. Somit zeigte die zweite Studie, dass die Ermittlung des bioenergetischen Profils Aufschlüsse über eine reduzierte Implantationsfähigkeit nach dem Embryotransfer von kryokonservierten Rinderembryonen geben kann.

Das zentrale Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Feststellung, dass die IVP und die Kryokonservierung, als Modelle embryonaler Vitalität, mit dem bioenergetischen Profil korrelieren. Merkmale von Rinderembryonen mit eingeschränkter Entwicklungskompetenz sind eine deutlich niedrigere mitochondriale Reservekapazität sowie eine deutlich reduzierte Energieerzeugung, was sich jedoch nicht zwingend in einer ineffizienten Energieerzeugung widerspiegeln muss. Folglich konnte die eingangs aufgestellte Hypothese, dass die mitochondriale Funktionalität zur Energieerzeugung mit der embryonalen Vitalität korreliert, dahingehend bestätigt werden, dass die Kompetenz des Mitochondrien-Pools von Rinderembryonen im Zusammenhang mit deren Vitalität steht. Allerdings besteht zukünftig die Notwendigkeit das bioenergetische Profil in Zusammenhang mit der Anzahl der Mitochondrien zu stellen, um zu verifizieren, ob die mitochondriale Dysfunktion in Rinderembryonen nur mit einer veränderten mitochondrialen Kompetenz verbunden ist oder zusätzlich durch eine veränderte Mitochondrienanzahl beeinflusst wird. Methodische Einschränkungen der vorliegenden Studie beziehen sich darauf, dass das bioenergetische Profil nur an Gruppen von Embryonen bestimmt werden konnte. Darüber hinaus wirken die eingesetzten mitochondrial wirksamen Substanzen letal. Es bleibt daher eine Herausforderung, das bioenergetische Profil nicht-invasiv, Embryo individuell zu charakterisieren und mit dem Implantationserfolg nach Embryotransfer direkt zu korrelieren. Dies könnte in Zukunft zur Optimierung der IVP und der Kryokonservierung beitragen, wovon letztlich die Rinderzucht in der landwirtschaftlichen Praxis profitieren kann.

Chapter 7: Summary

Assisted reproduction techniques in combination with cryopreservation, like the IVP of bovine embryos, can contribute to faster breeding progress and improved reproduction management in agricultural practice (Hansen et al. 2023). The demand for bovine embryos produced in vitro has steadily risen over the last ten years (Viana 2022). However, both the IVP of bovine embryos and cryopreservation result in a reduction in embryonic viability. This is reflected in reduced development rates to the blastocyst stage, reduced re-expansion rates after cryopreservation and lower implantation rates after embryo transfer (Hasler et al. 1995, Rizos et al. 2002, Rodriguez-Vilamil et al. 2012, van Do et al. 2018). The adaptation of bovine embryos to the non-physiological in vitro developmental environment is reflected in modified embryonic energy metabolism activity, in addition to altered morphology and differential expression of genes that play a role in energy metabolism. The same is true for bovine embryos after cryopreservation. In this context mitochondria play a central role in energy production.

The present study therefore follows the hypothesis that embryonic viability after IVP and cryopreservation correlates with the functionality of mitochondrial energy metabolism. To clarify this hypothesis, the bioenergetic profile of bovine embryos of different developmental competences and their mitochondria were compared using a new methodology, the extracellular flux analysis. This makes it possible to measure the extent of oxidative phosphorylation by determining the oxygen consumption. In addition, glycolysis is measured by the extracellular acidification of the medium. The XF Cell-Mito Stress Test (Agilent, CA USA) was used to record the individual parameters of the bioenergetic profile, of embryo groups at the stage of the expanded blastocyst. This involves the addition of mitochondrially active substances (oligomycin, FCCP and rotenone/antimycin A), which act on the respiratory chain and enable the individual parameters of the bioenergetic profile to be determined. Thus, the embryonic total oxygen consumption could be differentiated into its individual components, mitochondrial and non-mitochondrial respiration. Furthermore, the mitochondrial oxygen consumption could be subdivided into ATP-linked and proton leakage, the efficiency of energy production as well as the calculation of the mitochondrial spare capacity.

The purpose of the present study was to examine whether there is a correlation between the bioenergetic profile as an indicator of the mitochondrial functionality and embryonic vitality

after IVP or cryopreservation. Consequently the studies listed here aimed 1.) to analyse the bioenergetic profile of IVP bovine embryos compared to in vivo bovine embryos, and to determine its potential to explain environmentally induced embryonic viability, 2.) to analyse the bioenergetic profile of IVP bovine embryos with fast developmental kinetics compared to bovine embryos with low developmental kinetics, and to determine its potential to explain embryonic viability, 3.) to analyse the bioenergetic profile of IVP bovine embryos after cryopreservation compared to non-cryopreserved bovine embryos, and to determine its potential to explain cryo-induced embryonic viability and 4.) to analyse the bioenergetic profile of IVP bovine embryos after cryopreservation by slow freezing compared to vitrification, and to determine its potential to explain cryo-induced embryonic viability. These concepts and their results were summarised and discussed in two consecutive studies.

The first study focussed on the influence of in vitro production on the bioenergetic profile of bovine embryos. To this end bovine embryos produced in vitro were compared to bovine embryos produced in vivo. IVP bovine embryos were categorised according to their developmental kinetics, with delayed developmental kinetics serving as a model for lower developmental competence. A total of 32 in vivo produced blastocysts were compared to 32 in vitro produced day 7 blastocysts and 48 in vitro produced delayed blastocysts that did not expand until day 8. The results of this study showed that developmentally competent expanded blastocysts produced in a SOFaa + 0.6% FAF had a comparable bioenergetic profile to in vivo produced bovine embryos. Adverse effects of the in vitro developmental environment on mitochondrial energy production were revealed in the bovine embryos of reduced developmental competence by deviations in the bioenergetic profile. A lower ATP-linked respiration in combination with an increased proton leakage differed between in vivo derived and in vitro produced bovine embryos with higher viability compared to in vitro produced bovine embryos with lower viability. This illustrated that a low developmental competence of bovine embryos from IVP is associated with a reduced efficiency of energy production. Bovine embryos from IVP showed a lower mitochondrial spare capacity. It can therefore be concluded that reduced developmental competence of bovine embryos produced in vitro is associated with reduced energy production and reduced reserve capacity for energy production. This could be associated with a lowered ability to respond appropriately to an increase in energy requirements during subsequent development and is assumed to be one of the reasons for the lower implantation rates after embryo transfer. The first study would thus have provided a practical

explanation for the reduced implantation rates after embryo transfer of day 8 bovine embryos from IVP.

The second study focussed on the influence of cryopreservation on the bioenergetic profile of bovine embryos. For this purpose, the bioenergetic profile of non-cryopreserved bovine embryos was compared to that of cryopreserved bovine embryos from IVP. In addition the influence of the cryopreservation procedure was considered by comparing the bioenergetic profile after vitrification and slow freezing. Previous studies have shown an impaired embryo developmental competence, as well as a more detrimental effect of slow freezing compared to vitrification. A total of 60 non-cryopreserved bovine embryos were compared with 60 vitrified bovine embryos and 60 bovine embryos after slow freezing. Re-expanded blastocysts were used to determine the bioenergetic profile four hours after warming the cryopreserved bovine embryos. The results of the second study showed that the impairment of the bovine embryos by cryopreservation correlated with the bioenergetic profile. The levels of mitochondrial oxygen consumption and energy production were significantly reduced after cryopreservation. However, this had no effect on the efficiency of energy production despite the low level. As in the first study, bovine embryos with reduced developmental competence showed a significantly lower reserve capacity. The impaired mitochondrial energy metabolic activity was not compensated by an increased glycolytic energy metabolic activity. Finally, the slow freezing procedure led to a significant increase in non-mitochondrial oxygen consumption. This could be a reason for the more unfavourable effects of slow freezing compared to vitrification. Thus, the second study showed that the determination of the bioenergetic profile can provide information about the reduced embryo viability after cryopreservation.

The key finding of the present study is that IVP and cryopreservation, as models of embryonic viability, correlate with the bioenergetic profile. Characteristics of bovine embryos with limited developmental competence are a significantly lower mitochondrial spare capacity and a significantly reduced energy production, which however does not necessarily have to be reflected in inefficient energy production. Consequently, the initial hypothesis that mitochondrial functionality for energy production correlates with embryonic vitality could be confirmed to the extent that the competence of the mitochondrial pool of bovine embryos is related to their viability. However, there is a future need to correlate the bioenergetic profile with the number of cellular mitochondria to examine whether mitochondrial dysfunction in bovine embryos is associated only with an altered mitochondrial competence or is additionally

impacted by an altered mitochondrial number. Methodological limitations of the present study relate to the fact that the bioenergetic profile could only be determined in groups of embryos.

In addition, the mitochondrially active substances used have a lethal effect. It therefore remains a challenge to characterise the bioenergetic profile non-invasively and embryo-individually, and to correlate it with the implantation success after embryo transfer. However, the determination of the bioenergetic profile offers the opportunity for further studies to investigate the relationships and effects of embryonic vitality on the activity of mitochondrial energy metabolism. In the future this could contribute to the optimisation of IVP and cryopreservation, which could benefit cattle breeding in agricultural practice.

Referenzen

- Abe H, Otoi T, Tachikawa S, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H (1999) Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. *Anatomy and embryology* **199**(6), 519–527. doi:10.1007/s004290050249
- 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**(3), 325–335. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199907)53:3<325::AID-MRD8>3.0.CO;2-T
- Abe H (2007) A Non-invasive and Sensitive Method for Measuring Cellular Respiration with a Scanning Electrochemical Microscopy to Evaluate Embryo Quality. *Journal of mammalian ova research* **24**, 70-78. doi:10.1274/jmor.24.70
- Agung B, Otoi T, Abe H, Hoshi H, Murakami M, Karja NWK, Murakami MK, Wongsrikeao P, Watari H, Suzuki T (2005) Relationship between oxygen consumption and sex of bovine in vitro fertilized embryos. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **40**(1), 51–56. doi:10.1111/j.1439-0531.2004.00554.x
- Aksu DA, Agca C, Aksu S, Bagis H, Akkoc T, Caputcu AT, Arat S, Taskin AC, Kizil SH, Karasahin T, Akyol N, Satilmis M, Sagirkaya H, Ustuner B, Nur Z, Agca Y (2012) Gene expression profiles of vitrified in vitro- and in vivo-derived bovine blastocysts. *Molecular reproduction and development* **79**(9), 613–625. doi:10.1002/mrd.22068
- Amstislavsky S, Mokrousova V, Brusentsev E, Okotrub K, Comizzoli P (2019) Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review. *Biopreservation and biobanking* **17**(1), 76–83. doi:10.1089/bio.2018.0039
- Anderson S, Bruijn MH de, Coulson AR, Eperon IC, Sanger F, Young IG (1982) Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Journal of molecular biology* **156**(4), 683–717. doi:10.1016/0022-2836(82)90137-1
- Annes K, Sudano MJ, Belaz KRA, Tata A, Santos VG, Da Fonseca Junior AM, Dos Santos ÉC, Eberlin MN, Milazzotto MP (2019) Lipid characterization of in vitro-produced bovine embryos with distinct kinetics of development. *Zygote (Cambridge, England)* **27**(6), 413–422. doi:10.1017/S0967199419000534

- Arshad U, Sagheer M, González-Silvestry FB, Hassan M, Sosa F (2021) Vitrication improves in-vitro embryonic survival in *Bos taurus* embryos without increasing pregnancy rate post embryo transfer when compared to slow-freezing: A systematic meta-analysis. *Cryobiology* **101**, 1–11. doi:10.1016/j.cryobiol.2021.06.007
- Bain NT, Madan P, Betts DH (2011) The early embryo response to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. *Reproduction, fertility, and development* **23**(4), 561–575. doi:10.1071/RD10148
- Baldoceda L, Robert C (2017) Mitochondrial contributions to oocyte and embryonic quality in bovine. *SPERMOVA* **1**(7), 27–31. doi:10.18548/aspe/0005.05
- Bang JI, Jin JI, Ghanem N, Choi BH, Fakruzzaman M, Ha AN, Lee KL, Uhm SJ, Ko DH, Koo BC, Lee JG, Kong IK (2015) Quality improvement of transgenic cloned bovine embryos using an aggregation method: Effects on cell number, cell ratio, embryo perimeter, mitochondrial distribution, and gene expression profile. *Theriogenology* **84**(4), 509–523. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.04.008
- Barnett DK, Bavister BD (1996) What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Molecular reproduction and development* **43**(1), 105–133. doi:10.1002/(sici)1098-2795(199601)43:1%3C105::aid-mrd13%3E3.0.co;2-4
- Baruselli PS, Abreu LÂ de, Paula VR de, Carvalho B, Gricio EA, Mori FK, Rebeis LM, Albertini S, Souza AH de, D'Occhio M (2023) Applying assisted reproductive technology and reproductive management to reduce CO₂-equivalent emission in dairy and beef cattle: a review. *Animal reproduction* **20**(2), e20230060. doi:10.1590/1984-3143-AR2023-0060
- Bavister BD, Squirrell JM (2000) Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Human reproduction (Oxford, England)* **15 Suppl 2**, 189–198. doi:10.1093/humrep/15.suppl_2.189
- Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH, Cargill SL, Kreuscher BR, Medrano JF, Murray JD (1995) Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* **44**(2), 227–232. doi:10.1016/0093-691X(95)00172-5
- Bertolini M, Beam SW, Shim H, Bertolini LR, Moyer AL, Famula TR, Anderson GB (2002) Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. *Molecular reproduction and development* **63**(3), 318–328. doi:10.1002/mrd.90015

- Besenfelder U, Havlicek V (2023) The interaction between the environment and embryo development in assisted reproduction. *Animal reproduction* **20**(2), e20230034. doi:10.1590/1984-3143-AR2023-0034
- Betteridge KJ (1981) An historical look at embryo transfer [Online]. *J Reprod Fertil* **62**(1), 1–13. doi:10.1530/jrf.0.0620001
- Bó GA, Mapletoft RJ (2014) Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* **81**(1), 38–48. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.020
- Boettcher PJ, Stella A, Pizzi F, Gandini G (2005) The combined use of embryos and semen for cryogenic conservation of mammalian livestock genetic resources. *Genetics Selection Evolution* **37**(6), 657–675. doi:10.1051/gse:2005022
- Brair VL, Maia ALRS, Correia LFL, Barbosa NO, Santos JDR, Brandão FZ, Fonseca JF, Batista RITP, Souza-Fabjan JMG (2020) Gene expression patterns of in vivo-derived sheep blastocysts is more affected by vitrification than slow freezing technique. *Cryobiology* **95**, 110–115. doi:10.1016/j.cryobiol.2020.05.009
- Brand, M (2000) Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology* **35**(6-7), 811–820. doi:10.1016/s0531-5565(00)00135-2
- Brandt U (2022) Mitochondrien – Organellen der ATP-Gewinnung. In ‘Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie’. (Eds PC Heinrich, M Müller, L Graeve, H-G Koch) pp. 307–327. (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg). doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_19
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu S-S (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American journal of physiology. Cell physiology* **287**(4), C817-33. doi:10.1152/ajpcell.00139.2004
- Bruna de Lima C, Cristina Dos Santos É, Sirard M-A (2023) DOHaD: A Menagerie of Adaptations and Perspectives: The interplay between early embryo metabolism and mitoepigenetic programming of development. *Reproduction (Cambridge, England)* **166**(1), F15-F26. doi:10.1530/REP-22-0424
- C. Almiñana CC (2018) What is new in the cryopreservation of embryos? [Online]. *Animal Reproduction (AR)* **12**(3), 418 - 427-427. Available at: <https://animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/5b5a6031f7783717068b460b>.

- Caamaño JN, Gómez E, Trigal B, Muñoz M, Carrocera S, Martín D, Díez C (2015) Survival of vitrified in vitro-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology* **83**(5), 881–890. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.11.021
- Cadenas S (2018) Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics* **1859**(9), 940–950. doi:10.1016/j.bbabbio.2018.05.019
- Carrocera S, Caamaño JN, Trigal B, Martín D, Díez C (2016) Developmental kinetics of in vitro-produced bovine embryos: An aid for making decisions. *Theriogenology* **85**(5), 822–827. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.10.028
- Chacko BK, Kramer PA, Ravi S, Benavides GA, Mitchell T, Dranka BP, Ferrick D, Singal AK, Ballinger SW, Bailey SM, Hardy RW, Zhang J, Zhi D, Darley-Usmar VM (2014) The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. *Clinical Science* **127**(6), 367–373. doi:10.1042/CS20140101
- Chacko BK, Zhi D, Darley-Usmar VM, Mitchell T (2016) The Bioenergetic Health Index is a sensitive measure of oxidative stress in human monocytes. *Redox biology* **8**, 43–50. doi:10.1016/j.redox.2015.12.008
- Chair J (2021) 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals No. 4 [Online]. Available at: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2020.pdf (verified 16 December 2022)
- Chappel S (2013) The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. *Obstetrics and gynecology international* **2013**, 183024. doi:10.1155/2013/183024
- Chiaratti MR, Bressan FF, Ferreira CR, Caetano AR, Smith LC, Vercesi AE, Meirelles FV (2010) Embryo mitochondrial DNA depletion is reversed during early embryogenesis in cattle. *Biology of Reproduction* **82**(1), 76–85. doi:10.1095/biolreprod.109.077776
- Coy P, Romar R, Romero-Aguirregomezcorra J (2022) The embryo culture media in the era of epigenetics: is it time to go back to nature? *Animal reproduction* **19**(1), e20210132. doi:10.1590/1984-3143-AR2021-0132
- Crocchi M, Alberio RH, Lauria L, Mariano MI (2011) Effect of serum on the mitochondrial active area on developmental days 1 to 4 in in vitro-produced bovine embryos. *Zygote (Cambridge, England)* **19**(4), 297–306. doi:10.1017/S0967199411000050

- Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE (2001) Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biology of Reproduction* **64**(5), 1375–1385. doi:10.1095/biolreprod64.5.1375
- Cuello C, Martinez CA, Cambra JM, Parrilla I, Rodriguez-Martinez H, Gil MA, Martinez EA (2021) Effects of Vitriification on the Blastocyst Gene Expression Profile in a Porcine Model [Online]. *International journal of molecular sciences* **22**(3), 1222. doi:10.3390/ijms22031222
- Czernik M, Winiarczyk D, Sampino S, Gręda P, Parillo S, Modliński JA, Loi P (2022) Mitochondrial function and intracellular distribution is severely affected in in vitro cultured mouse embryos. *Scientific reports* **12**(1), 16152. doi:10.1038/s41598-022-20374-6
- Da Moreira Silva F, Metelo R (2005) Relation between physical properties of the zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **40**(3), 205–209. doi:10.1111/j.1439-0531.2005.00575.x
- Dalcin L, Silva RC, Paulini F, Silva BDM, Neves JP, Lucci CM (2013) Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. *Cryobiology* **67**(2), 137–145. doi:10.1016/j.cryobiol.2013.05.012
- Dalvit GC, Cetica PD, Pintos LN, Beconi MT (2005) Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production. *Biocell* **29**(2), 209–212.
- Demetrio DGB, Benedetti E, Demetrio CGB, Fonseca J, Oliveira M, Magalhaes A, Dos Santos RM (2020) How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced in vitro? (12 years of practical results at a California dairy farm). *Animal Reproduction* **17**(3), e20200053. doi:10.1590/1984-3143-AR2020-0053
- Dias LRO, Pivato I, Dode MAN (2017) Change in energy metabolism of in vitro produced embryos: an alternative to make them more cryoresistant? *Semina: Ciências Agrárias* **38**(4), 2237. doi:10.5433/1679-0359.2017v38n4p2237
- Dinnys A, Lonergan P, Fair T, Boland MP, Yang X (1999) Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. *Molecular reproduction and development* **53**(3), 318–324. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199907)53:3<318::AID-MRD7>3.0.CO;2-O

- Do VH, Catt S, Kinder JE, Walton S, Taylor-Robinson AW (2019) Vitrication of in vitro-derived bovine embryos: targeting enhancement of quality by refining technology and standardising procedures. *Reproduction, Fertility and Development* **31**(5), 837–846. doi:10.1071/RD18352
- Dobrinsky JR (1996) Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* **45**(1), 17–26. doi:10.1016/0093-691x(95)00351-8
- Dochi O (2019) Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos and its application in cattle reproduction management. *The Journal of reproduction and development* **65**(5), 389–396. doi:10.1262/jrd.2019-025
- Eckert J, Pugh PA, Thompson JG, Niemann H, Tervit HR (1998) Exogenous protein affects developmental competence and metabolic activity of bovine pre-implantation embryos in vitro. *Reproduction, fertility, and development* **10**(4), 327–332. doi:10.1071/R98077
- El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, Sirard M-A, Schellander K, Tesfaye D (2006) Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiological genomics* **28**(1), 84–96. doi:10.1152/physiolgenomics.00111.2006
- Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP (2000) Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* **54**(5), 659–673. doi:10.1016/S0093-691X(00)00381-2
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT (1984) Vitrication as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* **21**(4), 407–426. doi:10.1016/0011-2240(84)90079-8
- Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, Boland MP (2001) Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Molecular reproduction and development* **58**(2), 186–195. doi:10.1002/1098-2795(200102)58:2<186::AID-MRD8>3.0.CO;2-N
- Fakruzzaman M, Ghanem N, Bang J-I, Ha A-N, Lee K-L, Sohn S-H, Wang Z, Lee D-S, Kong I-K (2015) Effect of peroxiredoxin II on the quality and mitochondrial activity of pre-implantation bovine embryos. *Animal Reproduction Science* **159**, 172–183. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.06.015

- Fang Y, Zeng S, Fu X, Jia B, Li S, An X, Chen Y, Zhu S (2014). Developmental Competence In Vitro and In Vivo of Bovine IVF Blastocyst After 15 Years of Vitrification (3rd edn).’ *Cryoletters* **35**(3):232-8 [Online]. Available at:
<https://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2014/00000035/00000003/art00009>.
- Farin PW, Crosier AE, Farin CE (2001) Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* **55**(1), 151–170.
doi:10.1016/s0093-691x(00)00452-0
- Farin PW, Farin CE (1995) Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biology of reproduction* **52**(3), 676–682.
doi:10.1095/biolreprod52.3.676
- Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE (2006) Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* **65**(1), 178–191.
doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.022
- Farin PW, Slenning BD, Britt JH (1999) Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology* **52**(4), 659–670.
doi:10.1016/s0093-691x(99)00160-0
- Ferguson EM, Leese HJ (1999) Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J Reprod Fertil* **116**(2), 373–378. doi:10.1530/jrf.0.1160373
- Ferguson EM, Leese HJ (2006) A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Molecular reproduction and development* **73**(9), 1195–1201. doi:10.1002/mrd.20494
- Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ (2020) Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal : an international journal of animal bioscience* **14**(5), 991–1004.
doi:10.1017/S1751731119002775
- Ferré LB, Kjelland ME, Taiyeb AM, Campos-Chillon F, Ross PJ (2020) Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **55**(6), 659–676. doi:10.1111/rda.13667
- Foote RH (2002) The history of artificial insemination: Selected notes and notables1. *Journal of animal science* **80**(E-suppl_2), 1–10. doi:10.2527/ANIMALSCI2002.80E-SUPPL_21A

- FRIDHANDLER L, HAFEZ ES, PINCUS G (1957) Developmental changes in the respiratory activity of rabbit ova. *Experimental cell research* **13**(1), 132–139.
doi:10.1016/0014-4827(57)90054-X
- Fu W, Liu Y, Yin H (2019) Mitochondrial Dynamics: Biogenesis, Fission, Fusion, and Mitophagy in the Regulation of Stem Cell Behaviors. *Stem cells international* **2019**, 9757201. doi:10.1155/2019/9757201
- Fuller BJ, Rubinacci A, Geboes K, Loecker W de (1989) The bioenergetics of mitochondria after cryopreservation. *Cryobiology* **26**(4), 333–340. doi:10.1016/0011-2240(89)90057-6
- Gad A, Hoelker M, Besenfelder U, Havlicek V, Cinar U, Rings F, Held E, Dufort I, Sirard M-A, Schellander K, Tesfaye D (2012) Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. *Biology of reproduction* **87**(4), 100. doi:10.1095/biolreprod.112.099697
- Gardner DK, Pawelczynski M, Trounson AO (1996) Nutrient uptake and utilization can be used to select viable day 7 bovine blastocysts after cryopreservation. *Molecular reproduction and development* **44**(4), 472–475.
doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199608)44:4<472::AID-MRD6>3.0.CO;2-I
- Gardner DK, Pool TB, Lane M (2000) Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Seminars in reproductive medicine* **18**(2), 205–218. doi:10.1055/s-2000-12559
- Ge H, Tollner TL, Hu Z, Dai M, Li X, Guan H, Shan D, Zhang X, Lv J, Huang C, Dong Q (2012) The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation in vitro on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence. *Molecular reproduction and development* **79**(6), 392–401. doi:10.1002/mrd.22042
- Ghanem N, Salilew-Wondim D, Gad A, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K, Hoelker M (2011) Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. *Reproduction (Cambridge, England)* **142**(4), 551–564.
doi:10.1530/REP-10-0476
- Ghosh S, Körte A, Serafini G, Yadav V, Rodenfels J (2023) Developmental energetics: Energy expenditure, budgets and metabolism during animal embryogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* **138**, 83–93. doi:10.1016/j.semcdb.2022.03.009

- Gimeno I, García-Manrique P, Carrocera S, López-Hidalgo C, Valledor L, Martín-González D, Gómez E (2021) The Metabolic Signature of In Vitro Produced Bovine Embryos Helps Predict Pregnancy and Birth after Embryo Transfer. *Metabolites* **11**(8). doi:10.3390/metabo11080484
- Gomez E, Diez C (2000) Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. *Animal Reproduction Science* **58**(1-2), 23–37. doi:10.1016/S0378-4320(99)00078-0
- Gómez E, Carrocera S, Martín D, Pérez-Jánez JJ, Prendes J, Prendes JM, Vázquez A, Murillo A, Gimeno I, Muñoz M (2020) Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium. *Theriogenology* **146**, 39–47. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.01.056
- Gómez E, Murillo A, Carrocera S, Pérez-Jánez JJ, Benedito JL, Martín-González D, Gimeno I (2022) Fitness of calves born from in vitro-produced fresh and cryopreserved embryos. *Frontiers in veterinary science* **9**, 1006995. doi:10.3389/fvets.2022.1006995
- Gómez E, Rodríguez A, Muñoz M, Caamaño JN, Hidalgo CO, Morán E, Facal N, Díez C (2008) Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* **69**(8), 1013–1021. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.12.015
- Granleese T, Clark SA, Swan AA, van der Werf JHJ (2015) Increased genetic gains in sheep, beef and dairy breeding programs from using female reproductive technologies combined with optimal contribution selection and genomic breeding values. *Genetics, selection, evolution : GSE* **47**(1), 70. doi:10.1186/s12711-015-0151-3
- Gualtieri R, Kalthur G, Barbato V, Di Nardo M, Adiga SK, Talevi R (2021) Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Caused by Cryopreservation in Reproductive Cells [Online]. *Antioxidants* **10**(3), 337. doi:10.3390/antiox10030337
- Guerif F, McKeegan P, Leese HJ, Sturmey RG (2013) A simple approach for COntsumption and RElease (CORE) analysis of metabolic activity in single mammalian embryos. *PloS one* **8**(8), e67834. doi:10.1371/journal.pone.0067834
- Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y (2001) Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human reproduction update* **7**(2), 175–189. doi:10.1093/humupd/7.2.175
- Gutiérrez-Adán A, Rizos D, Fair T, Moreira PN, Pintado B, La Fuente J de, Boland MP, Lonergan P (2004) Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early

- bovine embryos cultured in vivo or in vitro. *Molecular reproduction and development* **68**(4), 441–448. doi:10.1002/mrd.20113
- Han S, Han W, Zhang X, Liu J, Huang, G. (2019) Vitriification of Human In-Vitro Matured Oocytes: Effects on Mitochondrial Ultrastructure and Oxygen Consumption. *Fertility & Reproduction*(3 (1)), 131–135. doi:10.1142/S2661318219500130
- Hansen PJ (2020) The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle-why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *Journal of animal science* **98**(11). doi:10.1093/jas/skaa288
- Hansen PJ (2023) Review: Some challenges and unrealized opportunities toward widespread use of the in vitro-produced embryo in cattle production. *Animal : an international journal of animal bioscience* **17 Suppl 1**, 100745. doi:10.1016/j.animal.2023.100745
- Hara T, Kin A, Aoki S, Nakamura S, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H (2018) Resveratrol enhances the clearance of mitochondrial damage by vitrification and improves the development of vitrified-warmed bovine embryos. *PloS one* **13**(10), e0204571. doi:10.1371/journal.pone.0204571
- Harvey AJ (2019) Mitochondria in early development: linking the microenvironment, metabolism and the epigenome. *Reproduction (Cambridge, England)* **157**(5), R159-R179. doi:10.1530/REP-18-0431
- Harvey AJ, Kind KL, Thompson JG (2002) REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction (Cambridge, England)* **123**(4), 479–486. doi:10.1530/rep.0.1230479
- Hasler JF (2014) Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* **81**(1), 152–169. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.010
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA (1995) Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* **43**(1), 141–152. doi:10.1016/0093-691x(94)00020-u
- Hasler JF, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Stokes JE (1997) Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology* **48**(4), 563–579. doi:10.1016/s0093-691x(97)00274-4

- Havlicek V, Kuzmany A, Cseh S, Brem G, Besenfelder U (2010) The effect of long-term in vivo culture in bovine oviduct and uterus on the development and cryo-tolerance of in vitro produced bovine embryos. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **45**(5), 832–837. doi:10.1111/j.1439-0531.2009.01364.x
- Hayashi T, Kansaku K, Abe T, Ueda S, Iwata H (2019) Effects of resveratrol treatment on mitochondria and subsequent embryonic development of bovine blastocysts cryopreserved by slow freezing. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* **90**(7), 849–856. doi:10.1111/asj.13219
- Hayashi Y, Saito S, Bai H, Takahashi M, Kawahara M (2021) Mitochondrial maturation in the trophectoderm and inner cell mass regions of bovine blastocysts. *Theriogenology* **175**, 69–76. doi:10.1016/j.theriogenology.2021.08.038
- Held E, Salilew-Wondim D, Linke M, Zechner U, Rings F, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M (2012) Transcriptome fingerprint of bovine 2-cell stage blastomeres is directly correlated with the individual developmental competence of the corresponding sister blastomere. *Biology of Reproduction* **87**(6), 154. doi:10.1095/biolreprod.112.102921
- Held-Hoelker E, Klein SL, Rings F, Salilew-Wondim D, Saeed-Zidane M, Neuhoﬀ C, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M (2017) Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with l-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. *Theriogenology* **96**, 145–152. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.03.014
- Herman HA, Radsdale A.C. (1946) ‘Artificial insemination of dairy cattle (494th edn).’ University of Missouri, College of Agriculture, Agriculture Experiment Station [Online]. Available at: https://mospace.umsystem.edu/xmlui/bitstream/handle/10355/55051/AES_bulletin.pdf?sequence=1 (verified 19 February 2024)
- Herrick JR, Rajput S, Pasquariello R, Ermisch A, Santiquet N, Schoolcraft WB, Krisher RL (2020) Developmental and molecular response of bovine embryos to reduced nutrients in vitro. *Reproduction & fertility* **1**(1), 51–65. doi:10.1530/RAF-20-0033
- Hill BG, Benavides GA, Lancaster JR, Ballinger S, Dell'Italia L, Jianhua Z, Darley-Usmar VM (2012) Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biological chemistry* **393**(12), 1485–1512. doi:10.1515/hsz-2012-0198
- Hiroyuki Abe (2007) A Non-invasive and Sensitive Method for Measuring Cellular Respiration with a Scanning Electrochemical Microscopy to Evaluate Embryo Quality [Online]. *Journal of Mammalian Ova Research* **24**(3), 70–78. doi:10.1274/jmor.24.70

- Hiroyuki Abe, Shoko Yamashita, Takeshi Satoh, Hiroyoshi Hoshi (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**(1), 57–66. doi:10.1002/mrd.1131
- Hoelker M, Schmoll F, Schneider H, Rings F, Gilles M, Tesfaye D, Jennen D, Tholen E, Griesse J, Schellander K (2006) Bovine blastocyst diameter as a morphological tool to predict embryo cell counts, embryo sex, hatching ability and developmental characteristics after transfer to recipients. *Reproduction, fertility, and development* **18**(5), 551–557. doi:10.1071/rd05149
- Holden SA, Butler ST (2018) Review: Applications and benefits of sexed semen in dairy and beef herds. *Animal : an international journal of animal bioscience* **12**(s1), s97-s103. doi:10.1017/S1751731118000721
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H (1999a) High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* **52**(4), 683–700. doi:10.1016/S0093-691X(99)00162-4
- Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ, Leese HJ (1996) Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Molecular reproduction and development* **44**(4), 476–485. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199608)44:4<476::AID-MRD7>3.0.CO;2-I
- Huayhua C, Rodríguez M, Vega J, Briones M, Rodríguez-Alvarez L, Mellisho E (2023) Blastulation time measured with time-lapse system can predict in vitro viability of bovine blastocysts. *PloS one* **18**(8), e0289751. doi:10.1371/journal.pone.0289751
- Hutchison CA, Newbold JE, Potter SS, Edgell MH (1974) Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* **251**(5475), 536–538. doi:10.1038/251536a0
- Inaba Y, Miyashita S, Somfai T, Geshi M, Matoba S, Dochi O, Nagai T (2016) Cryopreservation method affects DNA fragmentation in trophectoderm and the speed of re-expansion in bovine blastocysts. *Cryobiology* **72**(2), 86–92. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.03.006
- Iwata H (2021) Resveratrol enhanced mitochondrial recovery from cryopreservation-induced damages in oocytes and embryos. *Reproductive Medicine and Biology* **20**(4), 419–426. doi:10.1002/rmb2.12401

- Janati Idrissi S, Le Bourhis D, Lefevre A, Emond P, Le Berre L, Desnoës O, Joly T, Buff S, Maillard V, Schibler L, Salvetti P, Elis S (2021) Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either in vivo or in vitro before and after slow freezing process. *Scientific Reports* **11**(1), 11618. doi:10.1038/s41598-021-90870-8
- Javed MH, Wright RW (1991) Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. *Theriogenology* **35**(5), 1029–1037. doi:10.1016/0093-691x(91)90312-2
- Jeong WJ, Cho SJ, Lee HS, Deb GK, Lee YS, Kwon TH, Kong IK (2009) Effect of cytoplasmic lipid content on in vitro developmental efficiency of bovine IVP embryos. *Theriogenology* **72**(4), 584–589. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.04.015
- Johnson MH, Nasr-Esfahani MH (1994) Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **16**(1), 31–38. doi:10.1002/bies.950160105
- Kaidi S, Bernard S, Lambert P, Massip A, Dessy F, Donnay I (2001) Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Biology of Reproduction* **65**(4), 1127–1134. doi:10.1095/biolreprod65.4.1127
- Kameyama Y, Filion F, Yoo JG, Smith LC (2007) Characterization of mitochondrial replication and transcription control during rat early development in vivo and in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)* **133**(2), 423–432. doi:10.1530/REP-06-0263
- Khurana NK, Niemann H (2000a) Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. *Theriogenology* **54**(2), 313–326. doi:10.1016/s0093-691x(00)00351-4
- Khurana NK, Niemann H (2000b) Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biology of reproduction* **62**(4), 847–856. doi:10.1095/biolreprod62.4.847
- Kim H, Bok N-H, Kim S-W, Do Y-J, Seong H-H, Kim J-H, Kim DH, Kim M-K, Ko Y-G (2014) Influence of Oxygen Consumption on Pregnancy Rates of Hanwoo Calves following Embryo Transfer. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology* **29**(3), 257–264. doi:10.12750/JET.2014.29.3.257

- Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y (2001) Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* **122**(1), 131–138. doi:10.1530/rep.0.1220131
- Koklesova L, Mazurakova A, Samec M, Kudela E, Biringer K, Kubatka P, Golubnitschaja O (2022) Mitochondrial health quality control: measurements and interpretation in the framework of predictive, preventive, and personalized medicine. *The EPMA journal* **13**(2), 177–193. doi:10.1007/s13167-022-00281-6
- Krisher RL, Bavister BD (1998) Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* **49**(1), 103–114. doi:10.1016/S0093-691X(97)00405-6
- Krisher RL, Lane M, Bavister BD (1999) Developmental Competence and Metabolism of Bovine Embryos Cultured in Semi-Defined and Defined Culture Media. *Biology of Reproduction* **60**(6), 1345–1352. doi:10.1095/biolreprod60.6.1345
- Krisher RL, Prather RS (2012) A role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Molecular reproduction and development* **79**(5), 311–320. doi:10.1002/mrd.22037
- Kruij TA, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MW, Pieterse MC (1994) Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* **42**(4), 675–684. doi:10.1016/0093-691x(94)90384-u
- Kumar S, Chaves MS, Silva AFB, Vale WG, Negreiros NAB, Arcce IML, Melo LM, Freitas VJdF (2022) Factors affecting the cryopreservation of oocytes and embryos in buffalo (*Bubalus bubalis*): A review. *Research, Society and Development* **11**(4), e25111427337. doi:10.33448/rsd-v11i4.27337
- Kumasako Y, Goto K, Koike M, Araki Y, Abe H, Utsunomiya T (2013) Respiratory Activity of Single Blastocysts Measured by Scanning Electrochemical Microscopy: The Relationship between Pre-Freezing and Post-Warming. *Journal of Mammalian Ova Research* **30**(1), 30–35. doi:10.1274/jmor.30.30
- Kurosawa H, Utsunomiya H, Shiga N, Takahashi A, Ihara M, Ishibashi M, Nishimoto M, Watanabe Z, Abe H, Kumagai J, Terada Y, Igarashi H, Takahashi T, Fukui A, Suganuma R, Tachibana M, Yaegashi N (2016) Development of a new clinically applicable device for embryo evaluation which measures embryo oxygen consumption. *Human reproduction (Oxford, England)* **31**(10), 2321–2330. doi:10.1093/humrep/dew187

- Kuwayama M, Fujikawa S, Nagai T (1994) Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in glycerol 1,2-propanediol using 2-step and 16-step procedures. *Cryobiology* **31**(5), 415–422. doi:10.1006/cryo.1994.1051
- Layek SS, Patil SP, Gorani S, Karuppanasamy K, Kishore G, Gupta RO (2022) Ovum Pick-Up and In Vitro Embryo Production in Bovine. In ‘Frontier Technologies in Bovine Reproduction’. pp. 211–232. (Springer, Singapore). doi.org/10.1007/978-981-19-3072-0_11
- Lee SH, Liu X, Jimenez-Morales D, Rinaudo PF (2022) Murine blastocysts generated by in vitro fertilization show increased Warburg metabolism and altered lactate production. *eLife* **11**. doi:10.7554/eLife.79153
- Leese HJ (2002) Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **24**(9), 845–849. doi:10.1002/bies.10137
- Leese HJ (2012) Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction (Cambridge, England)* **143**(4), 417–427. doi:10.1530/REP-11-0484
- Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturmey RG (2008) Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Molecular human reproduction* **14**(12), 667–672. doi:10.1093/molehr/gan065
- Leese HJ, Guerif F, Allgar V, Brison DR, Lundin K, Sturmey RG (2016) Biological optimization, the Goldilocks principle, and how much is lagom in the preimplantation embryo. *Molecular reproduction and development* **83**(9), 748–754. doi:10.1002/mrd.22684
- Lim KT, Jang G, Ko KH, Lee WW, Park HJ, Kim JJ, Lee SH, Hwang WS, Lee BC, Kang SK (2007) Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology* **67**(2), 293–302. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.07.011
- Lima CB de, Dos Santos ÉC, Ispada J, Fontes PK, Nogueira MFG, Dos Santos CMD, Milazzotto MP (2020) The dynamics between in vitro culture and metabolism: embryonic adaptation to environmental changes. *Scientific Reports* **10**(1), 15672. doi:10.1038/s41598-020-72221-1
- Lima CB de, Martin H, Pecora Milazzotto M, Sirard M-A (2023) Genome-wide methylation profile of mitochondrial DNA across bovine preimplantation development. *Epigenetics* **18**(1), 2241010. doi:10.1080/15592294.2023.2241010

- Lonergan P, Fair T (2016) Maturation of Oocytes in Vitro. *Annual review of animal biosciences* **4**, 255–268. doi:10.1146/annurev-animal-022114-110822
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans ACO (2006) Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* **65**(1), 137–152. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.028
- Lonergan P, Fair T, Forde N, Rizos D (2016) Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology* **86**(1), 270–277. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.040
- Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland MP (1999) Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *Journal of reproduction and fertility* **117**(1), 159–167. doi:10.1530/jrf.0.1170159
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adán A, Moreira PM, Pintado B, La Fuente J de, Boland MP (2003) Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction* **69**(4), 1424–1431. doi:10.1095/biolreprod.103.018168
- Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Fair T, Boland MP (2003) Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies. *Reproductive biomedicine online* **7**(6), 657–663. doi:10.1016/S1472-6483(10)62088-3
- Lonergan P, Rizos D, Ward F, Boland MP (2001) Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction, nutrition, development* **41**(5), 427–437. doi:10.1051/rnd:2001142
- Lopes AS, Greve T, Callesen H (2007) Quantification of embryo quality by respirometry. *Theriogenology* **67**(1), 21–31. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.09.026
- Lopes AS, Larsen LH, Ramsing N, Løvendahl P, Rätty M, Peippo J, Greve T, Callesen H (2005) Respiration rates of individual bovine in vitro-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. *Reproduction (Cambridge, England)* **130**(5), 669–679. doi:10.1530/rep.1.00703
- Lopes AS, Madsen SE, Ramsing NB, Løvendahl P, Greve T, Callesen H (2007) Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. *Human reproduction (Oxford, England)* **22**(2), 558–566. doi:10.1093/humrep/del404

- Lopes AS, Martinussen T, Greve T, Callesen H (2006) Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **41**(3), 196–203.
doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00683.x
- M.E.O.A. Assumpção, M.P. Milazzotto, R. Simões, A.C. Nicacio, C.M. Mendes, M.R.B. Mello, J.A. Visintin (2018) In vitro survival of in vitro-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification [Online]. *Animal Reproduction (AR)* **5**(3), 116 - 120-120. Available at:
<https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6077f7783717068b4799>.
- Magnusson C, Hillensjö T, Hamberger L, Nilsson L (1986) Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro. *Human reproduction (Oxford, England)* **1**(3), 183–184. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a136377
- Mahmoudzadeh AR, van Soom A, Ysebaert MT, Kruif A de (1994) Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology* **42**(8), 1389–1397. doi:10.1016/0093-691X(94)90259-L
- Majerus V, Roover R de, Etienne D, Kaidi S, Massip A, Dessy F, Donnay I (1999) Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology* **52**(7), 1169–1179. doi:10.1016/S0093-691X(99)00209-5
- Manes C, Lai NC (1995) Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals [Online]. *Journal of reproduction and fertility* **104**(1), 69–75. doi:10.1530/jrf.0.1040069
- Marsico TV, Caetano DP, Rodrigues R, Valente RS, Fontes PK, Mesquita FS, Da Andrade SCS, Basso AC, Nogueira MFG, Sudano MJ (2020) Transcriptional profiling of embryo cryotolerance. *Molecular reproduction and development* **87**(12), 1245–1259. doi:10.1002/mrd.23436
- Marsico TV, Camargo J de, Valente RS, Sudano MJ (2019) Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features. *Animal reproduction* **16**(3), 423–439. doi:10.21451/1984-3143-AR2019-0072
- Massip A, van der Zwalm P, Ectors F (1987) Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* **27**(1), 69–79. doi:10.1016/0093-691X(87)90071-9
- Matwee C, Betts DH, King WA (2000) Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote (Cambridge, England)* **8**(1), 57–68. doi:10.1017/S0967199400000836

- May-Panloup P, Boguenet M, Hachem HE, Bouet P-E, Reynier P (2021) Embryo and Its Mitochondria. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **10**(2). doi:10.3390/antiox10020139
- May-Panloup P, Vignon X, Chrétien M-F, Heyman Y, Tamassia M, Malthiery Y, Reynier P (2005) Increase of mitochondrial DNA content and transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* **3**, 65. doi:10.1186/1477-7827-3-65
- Mazur P, Paredes E (2016) Roles of intracellular ice formation, vitrification of cell water, and recrystallisation of intracellular ice on the survival of mouse embryos and oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*. doi:10.1071/RD16021
- McDaniel BT, Cassell BG (1981) Effects of Embryo Transfer on Genetic Change in Dairy Cattle. *Journal of dairy science* **64**(12), 2484–2492. doi:10.3168/jds.S0022-0302(81)82873-1
- McEvoy TG, Sinclair KD, Broadbent PJ, Goodhand KL, Robinson JJ (1998) Post-natal growth and development of Simmental calves derived from in vivo or in vitro embryos. *Reproduction, fertility, and development* **10**(6), 459–464. doi:10.1071/RD98126
- McKeegan PJ, Boardman SF, Wanless AA, Boyd G, Warwick LJ, Lu J, Gnanaprabha K, Picton HM (2021) Intracellular oxygen metabolism during bovine oocyte and preimplantation embryo development. *Scientific Reports* **11**(1), 21245. doi:10.1038/s41598-021-99512-5
- McKeegan PJ, Sturmey R (2015) ‘The bioenergetic profile of the bovine blastocyst.’ *Reproduction Abstracts*. DOI: 10.1530/repabs.2.O004
- Milazzotto MP, Goissis MD, Chitwood JL, Annes K, Soares CA, Ispada J, Assumpção MEOÁ, Ross PJ (2016) Early cleavages influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. *Molecular reproduction and development* **83**(4), 324–336. doi:10.1002/mrd.22619
- Mills RM, Brinster RL (1967) Oxygen consumption of preimplantation mouse embryos. *Experimental cell research* **47**(1-2), 337–344. doi:10.1016/0014-4827(67)90236-4
- Mohr LR, Trounson AO (1981) Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biology of Reproduction* **25**(5), 1009–1025. doi:10.1095/biolreprod25.5.1009
- Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH (2006) Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow

- freezing or vitrification. *Theriogenology* **65**(8), 1551–1562.
doi:10.1016/j.theriogenology.2005.08.020
- Muller B, Lewis N, Adeniyi T, Leese HJ, Brison DR, Sturmey RG (2019) Application of extracellular flux analysis for determining mitochondrial function in mammalian oocytes and early embryos. *Scientific reports* **9**(1), 16778. doi:10.1038/s41598-019-53066-9
- Murakoshi Y, Sueoka K, Takahashi K, Sato S, Sakurai T, Tajima H, Yoshimura Y (2013) Embryo developmental capability and pregnancy outcome are related to the mitochondrial DNA copy number and ooplasmic volume. *Journal of assisted reproduction and genetics* **30**(10), 1367–1375. doi:10.1007/s10815-013-0062-6
- Murillo A, Muñoz M, Martín-González D, Carrocera S, Martínez-Nistal A, Gómez E (2017) Low serum concentration in bovine embryo culture enhances early blastocyst rates on Day-6 with quality traits in the expanded blastocyst stage similar to BSA-cultured embryos. *Reproductive biology* **17**(2), 162–171. doi:10.1016/j.repbio.2017.04.002
- Najafzadeh V, Bojsen-Møller Secher J, Pihl M, Aerenlund A, Jørgensen N, Jensen KK, Jensen MT, Fenner MF, Strøbech L, Hyttel P (2021) Vitrification yields higher cryo-survival rate than slow freezing in biopsied bovine in vitro produced blastocysts. *Theriogenology* **171**, 44–54. doi:10.1016/j.theriogenology.2021.04.020
- Nava-Trujillo H, Rivera RM (2023) Review: Large offspring syndrome in ruminants: current status and prediction during pregnancy. *Animal : an international journal of animal bioscience* **17 Suppl 1**, 100740. doi:10.1016/j.animal.2023.100740
- Nedambale TL, Dinnyés A, Groen W, Dobrinsky JR, Tian XC, Yang X (2004) Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* **62**(3-4), 437–449.
doi:10.1016/j.theriogenology.2003.10.020
- Nicacio AC, Simões R, Feritas de Paula-Lopes F, Olivera de Barros FR, Peres MA, Ortiz ME, Assumpção MA, Visintin JA (2011) ‘Effects of different cryopreservation methods on post-thaw culture conditions of in vitro produced bovine embryos.’. *Zygote*. **20**(2):117-22.
doi:10.1017/s0967199410000717
- Noguchi T, Aizawa T, Munakata Y, Iwata H (2020) Comparison of gene expression and mitochondria number between bovine blastocysts obtained in vitro and in vivo. *Journal of Reproduction and Development* **66**(1), 35–39. doi:10.1262/jrd.2019-100

- Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T, Horiuchi T (2000) Production efficiency of Japanese black calves by transfer of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* **54**(9), 1409–1420. doi:10.1016/s0093-691x(00)00463-5
- Obeidat YM, Evans AJ, Tedjo W, Chicco AJ, Carnevale E, Chen TW (2018) Monitoring oocyte/embryo respiration using electrochemical-based oxygen sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **276**, 72–81. doi:10.1016/j.snb.2018.07.157
- Oliveira CS, Da Feuchard VLS, Freitas C de, Da Rosa PMS, Camargo AJDR, Saraiva NZ (2020) In-straw warming protocol improves survival of vitrified embryos and allows direct transfer in cattle. *Cryobiology* **97**, 222–225. doi:10.1016/j.cryobiol.2020.02.007
- Overström EW (1996) In vitro assessment of embryo viability. *Theriogenology* **45**(1), 3–16. doi:10.1016/0093-691X(96)84625-5
- Overton MW (2005) Cost comparison of natural service sires and artificial insemination for dairy cattle reproductive management. *Theriogenology* **64**(3), 589–602. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.05.015
- Parkinson TJ, Morrell JM (2019) Artificial Insemination. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 746–777. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-7233-8.00043-4>
- Parrish JJ (2014a) Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* **81**(1), 67–73. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.08.005
- Parrish JJ (2014b) Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* **81**(1), 67–73. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.08.005
- Pieterse MC, Vos PL, Kruip TA, Wurth YA, van Beneden TH, Willemsse AH, Taverne MA (1991) Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* **35**(4), 857–862. doi:10.1016/0093-691x(91)90426-e
- Plante L, King WA (1994) Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in vitro and in vivo fertilization. *Journal of assisted reproduction and genetics* **11**(10), 515–529. doi:10.1007/BF02216032

- Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM (2009) Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* **71**(4), 690–697. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.031
- Prastowo S, Amin A, Rings F, Held E, Wondim DS, Gad A, Neuhoﬀ C, Tholen E, Looft C, Schellander K, Tesfaye D, Hoelker M (2016) Fateful triad of reactive oxygen species, mitochondrial dysfunction and lipid accumulation is associated with expression outline of the AMP-activated protein kinase pathway in bovine blastocysts. *Reproduction, fertility, and development*. doi:10.1071/RD15319
- Pribenszky C, Nilselid A-M, Montag M (2017) Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reproductive biomedicine online* **35**(5), 511–520. doi:10.1016/j.rbmo.2017.06.022
- Rabaglino MB, Salilew-Wondim D, Zolini A, Tesfaye D, Hoelker M, Lonergan P, Hansen PJ (2023) Machine-learning methods applied to integrated transcriptomic data from bovine blastocysts and elongating conceptuses to identify genes predictive of embryonic competence. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **37**(3), e22809. doi:10.1096/fj.202201977R
- Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A (2009) Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Human reproduction update* **15**(5), 553–572. doi:10.1093/humupd/dmp016
- Reis A, Rooke JA, McCallum GJ, Staines ME, Ewen M, Lomax MA, McEvoy TG (2003) Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development* **15**(5), 275–284. doi:10.1071/RD03004
- Rieger D, Bruyas JF, Lagneaux D, Bézard J, Palmer E (1991) The effect of cryopreservation on the metabolic activity of day-6.5 horse embryos. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **44**, 411–417.
- Rieger D, Loskutov NM, Betteridge KJ (1992) Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reproduction, fertility, and development* **4**(5), 547–557. doi:10.1071/rd9920547

- Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, La Fuente J de, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A (2008) Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals* **43 Suppl 4**, 44–50. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x
- Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P (2002) Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Molecular reproduction and development* **62**(3), 320–327. doi:10.1002/mrd.10138
- Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, La Fuente J de, Boland MP, Lonergan P (2003) Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction* **68**(1), 236–243. doi:10.1095/biolreprod.102.007799
- Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-García R, Pintado B, La Fuente J de, Gutiérrez-Adán A (2002) Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biology of reproduction* **66**(3), 589–595. doi:10.1095/biolreprod66.3.589
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002) Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development* **61**(2), 234–248. doi:10.1002/mrd.1153
- Rosenkrans CF, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK, First NL (1993) Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biology of reproduction* **49**(3), 459–462. doi:10.1095/biolreprod49.3.459
- Sakagami N, Akiyama K, Nakazawa Y (2007) 216 THE RELATIONSHIP BETWEEN OXYGEN CONSUMPTION RATE AND PREGNANCY RATE OF BOVINE EMBRYOS *Reproduction, fertility, and development* **19**(1), 225. doi:10.1071/rdv19n1ab216
- Salilew-Wondim D, Tesfaye D, Rings F, Held-Hoelker E, Miskel D, Sirard M-A, Tholen E, Schellander K, Hoelker M (2021) The global gene expression outline of the bovine blastocyst: reflector of environmental conditions and predictor of developmental capacity. *BMC genomics* **22**(1), 408. doi:10.1186/s12864-021-07693-0
- Sanches BV, Lunardelli PA, Tannura JH, Cardoso BL, Pereira MHC, Gaitkoski D, Basso AC, Arnold DR, Seneda MM (2016) A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology* **85**(6), 1147–1151. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.11.029

- Sanches BV, Zangirolamo AF, Silva NC, Morotti F, Seneda MM (2017) Cryopreservation of in vitro-produced embryos: challenges for commercial implementation. *Animal Reproduction* **14**(3), 521–527. doi:10.21451/1984-3143-ar995
- Sangild PT, Schmidt M, Jacobsen H, Fowden AL, Forhead A, Avery B, Greve T (2000) Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro-produced bovine embryos. *Biology of reproduction* **62**(6), 1495–1504. doi:10.1095/biolreprod62.6.1495
- Santos TA, El Shourbagy S, St John JC (2006a) Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertility and sterility* **85**(3), 584–591. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.09.017
- Santos TA, El Shourbagy S, St John JC (2006b) Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertility and Sterility* **85**(3), 584–591. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.09.017
- Sata R, Tsujii H, Abe H, Yamashita S, Hoshi H (1999) Fatty Acid Composition of Bovine Embryos Cultured in Serum-Free and Serum-Containing Medium during Early Embryonic Development. *Journal of Reproduction and Development* **45**(1), 97–103. doi:10.1262/jrd.45.97
- Satoshi Sugimura, Tomonori Akai, Yutaka Hashiyada, Tamás Somfai, Yasushi Inaba, Muneyuki Hirayama, Tadayuki Yamanouchi, Hideo Matsuda, Shuji Kobayashi, Yoshio Aikawa, Masaki Ohtake, Eiji Kobayashi, Kazuyuki Konishi, Kei Imai (2012) Promising System for Selecting Healthy In Vitro–Fertilized Embryos in Cattle. *PLOS ONE* **7**(5), e36627. doi:10.1371/journal.pone.0036627
- Serrano Comes C, Pastor Leary C, Hörmann-Kröpfl M, Schenk M, Weiss G (Eds) (2022) ‘The good, the bad and the ugly-The fate of collapsed blastocysts in frozen embryo transfer.’ *Human Reproduction* **37**(1). <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deac107.136>
- Shiku H, Shiraishi T, Ohya H, Matsue T, Abe H, Hoshi H, Kobayashi M (2001) Oxygen consumption of single bovine embryos probed by scanning electrochemical microscopy. *Analytical chemistry* **73**(15), 3751–3758. doi:10.1021/ac010339j
- Shu Y, Watt J, Gebhardt J, Dasig J, Appling J, Behr B (2009) The value of fast blastocoele re-expansion in the selection of a viable thawed blastocyst for transfer. *Fertility and Sterility* **91**(2), 401–406. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.11.083

- Silva T, Santos EC, Annes K, Soares CA, Leite RF, Lima CB, Milazzotto MP (2016) Morphokinetic-related response to stress in individually cultured bovine embryos. *Theriogenology* **86**(5), 1308–1317. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.072
- Siqueira LGB, Torres CAA, Souza ED, Monteiro PLJ, Arashiro EKN, Camargo LSA, Fernandes CAC, Viana JHM (2009) Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. *Theriogenology* **72**(7), 949–958. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.06.013
- Sirard M-A, Richard F, Blondin P, Robert C (2006) Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* **65**(1), 126–136. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.020
- Sohn IP, Ahn HJ, Park DW, Gye MC, Jo DH, Kim SY, Min CK, Kwon HC (2002) Amelioration of mitochondrial dysfunction and apoptosis of two-cell mouse embryos after freezing and thawing by the high frequency liquid nitrogen infusion. *Molecules and Cells* **13**(2), 272–280. [https://doi.org/10.1016/S1016-8478\(23\)15033-3](https://doi.org/10.1016/S1016-8478(23)15033-3).
- Somoskoi B, Martino NA, Cardone RA, Lacalandra GM, Dell'Aquila ME, Cseh S (2015) Different chromatin and energy/redox responses of mouse morulae and blastocysts to slow freezing and vitrification. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* **13**, 22. doi:10.1186/s12958-015-0018-z
- Soto-Moreno EJ, Balboula A, Spinka C, Rivera RM (2021) Serum supplementation during bovine embryo culture affects their development and proliferation through macroautophagy and endoplasmic reticulum stress regulation. *PloS one* **16**(12), e0260123. doi:10.1371/journal.pone.0260123
- Souza DK de, Salles LP, Rosa e Silva AAM (2015) Aspects of energetic substrate metabolism of in vitro and in vivo bovine embryos. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* **48**(3), 191–197. doi:10.1590/1414-431X20143744
- Souza JF, Oliveira CM, Lienou LL, Cavalcante TV, Alexandrino E, Santos RR, Rodrigues APR, Campello CC, Figueiredo JR, Dias FEF (2018) Vitrification of bovine embryos followed by in vitro hatching and expansion. *Zygote (Cambridge, England)* **26**(1), 99–103. doi:10.1017/S0967199417000570
- Spielmann H, Jacob-Mueller U, Schulz P, Schimmel A (1984) Changes of the adenine ribonucleotide content during preimplantation development of mouse embryos in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* **71**(2), 467–473. doi:10.1530/jrf.0.0710467

- Stinshoff H, Wilkening S, Hanstedt A, Brüning K, Wrenzycki C (2011) Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology* **76**(8), 1433–1441. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.06.013
- Stojkovic M, Kolle S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson JG, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Sinowatz F, Wolf E (2002) Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* **124**(1), 141–153. doi:10.1530/rep.0.1240141
- Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Leese HJ, Lonergan P (2010) Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability. *Molecular reproduction and development* **77**(3), 285–296. doi:10.1002/mrd.21145
- Sudano MJ, Paschoal DM, Maziero RRD, Rascado TS, Guastali MD, Crocomo LF, Magalhaes LCO, Monteiro BA, Martins A, Machado R, Landim-Alvarenga FDC (2013) Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach *Animal Reproduction* **10**(3), 160-167 Available at: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/112372>.
- Sudano MJ, Rascado TDS, Tata A, Belaz KRA, Santos VG, Valente RS, Mesquita FS, Ferreira CR, Araújo JP, Eberlin MN, Landim-Alvarenga FDC (2016) Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology* **86**(2), 472-484.e1. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.03.025
- Sutton-McDowall ML, Feil D, Robker RL, Thompson JG, Dunning KR (2012) Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* **77**(8), 1632–1641. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.12.008
- Takahashi T, Inaba Y, Somfai T, Kaneda M, Geshi M, Nagai T, Manabe N (2013) Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, fertility, and development* **25**(4), 589–599. doi:10.1071/RD11262
- Tamassia M, Nuttinck F, May-Panloup P, Reynier P, Heyman Y, Charpigny G, Stojkovic M, Hiendleder S, Renard J-P, Chastant-Maillard S (2004) In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. *Biology of reproduction* **71**(2), 697–704. doi:10.1095/biolreprod.103.026104
- Tarazona AM, Rodríguez JI, Restrepo LF, Olivera-Angel M (2006) Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro.

- Reproduction in domestic animals* = *Zuchthygiene* **41**(1), 5–11.
doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00615.x
- Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE (1972) Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *Journal of reproduction and fertility* **30**(3), 493–497. doi:10.1530/jrf.0.0300493
- Thompson J, McNaughton C, Gasparini B, McGowan L, Tervit H (2000) Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)* **118**(1), 47–55. doi:10.1530/jrf.0.1180047
- Thompson JG, Allen NW, McGowan LT, Bell AC, Lambert MG, Tervit HR (1998) Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. *Theriogenology* **49**(6), 1239–1249. doi:10.1016/S0093-691X(98)00071-5
- Thompson JG, Brown HM, Sutton-McDowall ML (2016a) Measuring embryo metabolism to predict embryo quality. *Reproduction, fertility, and development* **28**(1-2), 41–50. doi:10.1071/RD15340
- Thompson JG, Brown HM, Sutton-McDowall ML (2016b) Measuring embryo metabolism to predict embryo quality. *Reproduction, fertility, and development* **28**(1-2), 41–50. doi:10.1071/RD15340
- Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI, Leese HJ (1996) Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *Journal of reproduction and fertility* **106**(2), 299–306. doi:10.1530/jrf.0.1060299
- Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Kennedy CJ, Pullar D, Leese HJ (1996) Oxygen consumption by Day 7 bovine blastocysts: determination of ATP production. *Animal Reproduction Science* **43**(4), 241–247. doi:10.1016/0378-4320(96)01477-7
- Thompson JG, Peterson AJ (2000) Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences. *Human reproduction (Oxford, England)* **15 Suppl 5**, 59–67. doi:10.1093/humrep/15.suppl_5.59
- Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJ, Keefe DL (2000) Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biology of reproduction* **62**(6), 1866–1874. doi:10.1095/biolreprod62.6.1866

- Tsvetkov T, Tsonev L, Meranzov N, Minkov I (1985) Functional changes in mitochondrial properties as a result of their membrane cryodestruction. II. Influence of freezing and thawing on ATP complex activity of intact liver mitochondria. *Cryobiology* **22**(2), 111–118. doi:10.1016/0011-2240(85)90165-8
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H (1996) Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Animal Reproduction Science* **45**(3), 191–200. doi:10.1016/s0378-4320(96)01583-7
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H (1998) Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular reproduction and development* **51**(1), 53–58. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V
- Valente RS, Marsico TV, Sudano MJ (2022) Basic and applied features in the cryopreservation progress of bovine embryos. *Animal Reproduction Science* **239**, 106970. doi:10.1016/j.anireprosci.2022.106970
- van Blerkom J, Davis PW, Lee J (1995) ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Human reproduction (Oxford, England)* **10**(2), 415–424. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a135954
- van Do H, Catt S, Amaya G, Batsiokis M, Walton S, Taylor-Robinson AW (2018) Comparison of pregnancy in cattle when non-vitrified and vitrified in vitro-derived embryos are transferred into recipients. *Theriogenology* **120**, 105–110. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.07.027
- van Soom A, Ysebaert M-T, Kruif A de (1997) Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Molecular reproduction and development* **47**(1), 47–56. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<47::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q
- van Wagendonk-De Leeuw AM, Mullaart E, Roos AP de, Merton JS, Daas JH den, Kemp B, Ruigh L de (2000) Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* **53**(2), 575–597. doi:10.1016/s0093-691x(99)00259-9

- Viana J (2022) 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. A new milestone has been reached: Transfers of IVP embryos were over one million worldwide [Online]. *Embryo Technology Newsletter* **40** (4)). Available at: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2021.pdf. [verified 12.March 2024]
- Vilamil PR, Lozano DH, Oviedo JM, Ongaratto FL, Bó GA (2012) Developmental rates of in vivo and in vitro produced bovine embryos cryopreserved in ethylene glycol based solutions by slow freezing or solid surface vitrification. [Online]. *Animal reproduction* **9**(2), 86–92. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/Developmental-rates-of-in-vivo-and-in-vitro-bovine-Vilamil-Lozano/64b9b9a7f345e140d09178396f272b9a5b75bcb4> [verified 12 March 2024]
- Vishwanath R (2003) Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* **59**(2), 571–584. doi:10.1016/s0093-691x(02)01241-4
- Voelkel SA, Hu YX (1992) Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* **37**(1), 23–37. doi:10.1016/0093-691X(92)90245-M
- Wakefield SL, Lane M, Mitchell M (2011) Impaired Mitochondrial Function in the Preimplantation Embryo Perturbs Fetal and Placental Development in the Mouse. *Biology of Reproduction* **84**(3), 572–580. doi:10.1095/biolreprod.110.087262
- Ward F, Rizos D, Corridan D, Quinn K, Boland M, Lonergan P (2001) Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Molecular reproduction and development* **60**(1), 47–55. doi:10.1002/mrd.1060
- Willadsen S, Polge C, Rowson LE (1978) The viability of deep-frozen cow embryos. *Journal of reproduction and fertility* **52**(2), 391–393. doi:10.1530/jrf.0.0520391
- Woelders H, Windig J, Hiemstra SJ (2012) How developments in cryobiology, reproductive technologies and conservation genomics could shape gene banking strategies for (farm) animals. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **47 Suppl 4**, 264–273. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02085.x
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H (1996) Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Journal of reproduction and fertility* **108**(1), 17–24. doi:10.1530/jrf.0.1080017

- Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H (1999) Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Molecular reproduction and development* **53**(1), 8–18. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<8::AID-MRD2>3.0.CO;2-K
- Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H (2003) Timing of blastocyst expansion affects spatial messenger RNA expression patterns of genes in bovine blastocysts produced in vitro. *Biology of Reproduction* **68**(6), 2073–2080. doi:10.1095/biolreprod.102.012104
- Wright JM (1981) Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology* **15**(1), 43–56. doi:10.1016/s0093-691x(81)80017-9
- Wu M, Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, Parslow D, Armistead S, Lemire K, Orrell J, Teich J, Chomicz S, Ferrick DA (2007) Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *American journal of physiology. Cell physiology* **292**(1), C125–36. doi:10.1152/ajpcell.00247.2006
- Wurth YA, Reinders J, Rall WF, Kruip T (1994) Developmental potential of in vitro produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. *Theriogenology* **42**(8), 1275–1284. doi:10.1016/0093-691X(94)90247-G
- Yamanaka M, Hashimoto S, Amo A, Ito-Sasaki T, Abe H, Morimoto Y (2011) Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. *Human reproduction (Oxford, England)* **26**(12), 3366–3371. doi:10.1093/humrep/der324
- Yu XL, Deng W, Liu FJ, Li YH, Li XX, Zhang YL, Zan LS (2010) Closed pulled straw vitrification of in vitro-produced and in vivo-produced bovine embryos. *Theriogenology* **73**(4), 474–479. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.10.004
- Zhao R-Z, Jiang S, Zhang L, Yu Z-B (2019) Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International journal of molecular medicine* **44**(1), 3–15. doi:10.3892/ijmm.2019.4188
- Zhao S, Heng N, Wang H, Wang H, Zhang H, Gong J, Hu Z, Zhu H (2022) Mitofusins: from mitochondria to fertility. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **79**(7), 370. doi:10.1007/s00018-022-04386-z
- Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN (1997) Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Human Reproduction* **12**(7), 1545–1549. doi:10.1093/humrep/12.7.1545

Zolini AM, Block J, Rabaglino MB, Rincon G, Hoelker M, Bromfield JJ, Salilew-Wondim D, Hansen PJ (2020) Genes associated with survival of female bovine blastocysts produced in vivo. *Cell and tissue research* **382**(3), 665–678. doi:10.1007/s00441-020-03257-y

Danksagung

Zunächst möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Hölker bedanken, der mir nach Abschluss meiner Masterarbeit die Möglichkeit gegeben hat, am Institut für Tierwissenschaften zu promovieren und das Forschungsthema weiter zu verfolgen. Für diese Möglichkeit sowie für die wissenschaftliche Betreuung, die wertvollen Anmerkungen und die aufgewendete Zeit möchte ich mich aufrichtig bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Dr. Sauerwein für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens. Des Weiteren möchte ich mich bei Ihnen und Herrn Prof. Dr. Südekum für die anregenden Diskussionen und Fragen im Rahmen des Graduiertenkollegs bedanken, die einen wertvollen Input für meine Arbeit darstellten. Herrn Dr. Tholen danke ich für die Unterstützung während der Promotion und die Möglichkeiten, die mir gegeben wurden, an Konferenzen die erzielten Forschungsergebnisse zu präsentieren.

Außerdem möchte ich mich herzlichst bei Frau Dr. Held-Hölker bedanken für die Unterstützung bei fachlichen Fragen, für die hilfreichen Anmerkungen sowie für den Gedankenaustausch bezüglich des Seahorse.

Ein besonderer Dank gilt Frau Rings, die mir die praktischen Grundlagen der In-vitro Produktion und Labortätigkeit vermittelt hat. Ihr Erfahrungsschatz und die Mithilfe bei der Probenbearbeitung trugen zum Gelingen der Arbeit bei.

Frau Dr. Große-Brinkhaus, Herrn Dr. Salilew-Wondim und Herrn Miskel möchte ich ebenfalls für die Unterstützung bei fachlichen und statistischen Fragen sowie für den kollegialen Austausch danken.

Abschließend ein Dank von Herzen an meine Familie und Freunde, die meine Sorgen und Freuden während der Promotion geteilt haben. Danke für den Zuspruch und die Zuversicht die Ihr mir gegeben habt.

Publikationen & Konferenzbeiträge

- Kurzella J, Miskel D, Rings F, Tesfaye D, Salilew-Wondim D, Hoelker M (2022) Mitochondrial metabolic characteristics of bovine expanded blastocysts are correlated with embryo quality as well early developmental environment. Abstract, 55. *Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, gleichzeitig 47. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung*, 2 - 4 März 2022, virtuell
- Kurzella J, Salilew-Wondim D, Rings F, Miskel D, Tholen E, Blaschka C, Hölker M (2022) Der mitochondriale Energiestoffwechsel von Rinderembryonen korreliert mit der Entwicklungsumgebung und der embryonalen Qualität. Vortrag, *Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. (DGfZ) und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften e.V. (GfT)*, 21 – 22 September 2022, Kiel, Germany
- Kurzella J, Salilew-Wondim D, Rings F, Miskel D, Blaschka C, Hoelker M (2023) 99 Impact of developmental environment and morphokinetic properties of bovine expanded blastocysts on mitochondrial fitness. Abstract, *Annual Conference of the International Embryo Technology Society*, 16 -19 Januar 2023, Lima, Peru, *Reproduction Fertility and Development* **35** (2), 176; <https://doi.org/10.1071/RDv35n2Ab99>
- Kurzella J, Salilew-Wondim D, Rings F, Tholen E, Blaschka C, Hölker M (2023) Effect of the developmental environment on mitochondrial respiration characteristics of bovine cryopreserved blastocysts. Abstract, *56th Annual Meeting for Physiology and Pathology of Reproduction and 48th Joint Meeting of Veterinary and Human Reproductive Medicine*, 1- 3 März 2023, Münster, Germany
- Kurzella J, Rings F, Salilew-Wondim D, Blaschka C, Tholen E, Hölker M (2023) 058 Effect of freeze-thawing on mitochondrial respiration characteristics in bovine expanded blastocysts derived from contrasting developmental environments. Abstract, *11th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2023)*, 28 Mai - 1 Juni 2023, Galway, Ireland
- Kurzella J, Rings F, Tholen E, Grosse-Brinkhaus C, Salilew-Wondim D, Held-Hölker E, Hölker M. (2023). Effekte eines Serum-Zusatzes zum IVP-Kulturmedium für die mitochondriale Respiration vor und nach einer Kryokonservierung beim Rinderembryo.

Vortrag, 48. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder (AET-d), 15 -16 Juni 2023, Bad Waldsee, Deutschland

- Kurzella J, Rings F, Tholen E, Große-Brinkhaus C, Salilew-Wondim D, Held-Hölker E, Hölker M (2023) Sex-specific contours of mitochondrial respiration characteristics at the pre-elongation stage in individual bovine embryos. Vortrag, 39th Scientific Meeting, Association of Embryo Technology in Europe (AETE), 7 - 8 September 2023, Heraklion, Greece
- Kurzella J, Rings F, Salilew-Wondim D, Tholen E, Große-Brinkhaus C., Held-Hölker E, Hölker M (2023) Serumbooster - Einfluss von Serum als Kulturzusatz auf das bioenergetische Profil frischer und kryokonservierter boviner Embryonen. Vortrag, Vortragsagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. (DGfZ) und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften e.V. (GfT), 13 – 14 September 2023, Halle (Saale), Germany
- Kurzella J, Miskel D, Rings F, Tholen E, Tesfaye D, Schellander K, Salilew-Wondim D, Held-Hoelker E, Große-Brinkhaus C, Hoelker M (2023) The mitochondrial respiration signature of the bovine blastocyst reflects both environmental conditions of development as well as embryo quality. Sci Rep. **13**(1),19408.
<http://doi.org/10.1038/s41598-023-45691-2>.
- Kurzella JP, Held-Hoelker E, Tan X., Salilew-Wondim D, Rings F., Blaschka ., Hoelker M. (2024): 88 Co-culture with bovine oviduct epithelial cells during in vitro culture affects the bioenergetic profile of bovine expanded blastocysts. Abstract, *Annual Conference of the International Embryo Technology Society*, 09 -12 Januar 2024, Denver, Colorado, *Reproduction Fertility and Development* **36** (2), 195-196
<http://doi.org/10.1071/RDv36n2Ab88>
- Kurzella J, Miskel D, Rings F, Tholen E, Tesfaye D, Schellander K, Salilew-Wondim D, Held-Hoelker E, Große-Brinkhaus C, Hoelker H (2024) Mitochondrial bioenergetic profiles of warmed bovine blastocysts are typically altered after cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Theriogenology* **214**, 21-32.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.10.002>