

3. Основные причины эмбриональной смертности и современные средства по увеличению многоплодия маток / В. П. Хлопицкий [и др.] // Свиноводство. – 2009. – № 4. – С. 51-54.

4. Валушкин, К. Д. Акушерство, гинекология и биотехника размножения животных : учебник / К. Д. Валушкин, Г. Ф. Медведев. – 2-е изд., перераб. и доп. – Минск : Ураджай, 2001. – 869 с.

5. Пат. 2239389 RU, С2 МПК А 61 D 19/02. Способ санации спермы хряков-производителей / Филатов А. В., Конопельцев И. Г., Черных Е. В. ; заявитель и патентообладатель : Вятская государственная сельскохозяйственная академия. – № 2002113592/13 ; заявл. 24.05.2002 ; опубл. 10.11.2004, Бюл. № 31. – 5 с.

6. Применение медицинского озона в акушерстве, гинекологии и неонатологии. – Москва, 2006. – 27 с. – Режим доступа: <https://www.medozone.ru/materials/method/method7.pdf>.

7. Филатов, А. В. Научные основы и практические методы применения озона и БАВ для повышения воспроизводительной способности свиноматок и хряков-производителей : автореф. дис. ... д-ра вет. наук / Филатов А.В. – Саратов, 2005. – 38 с.

8. Primate recombinant zona pel-lucida protein expressed in Escherichia coli bind to spermatozoa / G. K. Gahlay [et al.] // J. Reprod. Immunol. – 2002. – Vol. 53. – P. 67-77. DOI: 10.1016/s0165-0378(01)00083-3.

9. Сравнительная характеристика методов подготовки спермиев к программе искусственной инсеминации / В. А. Питыко [и др.] // Жіночій лікар. – 2007. – № 4. – С. 30.

10. Получение и подготовка сперматозоидов для искусственного оплодотворения // Jofo.me [Электрон. ресурс]. – 2007-2024. – Режим доступа: <https://beremennost.jofo.me/462957.html>. – Дата доступа: 10-02-2015

11. Биотехнология активизации процессов размножения крупного рогатого скота : (методические рекомендации) / А. И. Будевич [и др.]. - Жодино, 2010. - 14 с.

*Поступила 15.03.2024 г.*

УДК 636.2.082.4:591.564

О.В. ПАЙТЕРОВА<sup>1</sup>, А.И. БУДЕВИЧ<sup>1</sup>, Ю.К. КИРИКОВИЧ<sup>1</sup>,  
Н.Ф. ЖУК<sup>2</sup>

## **СОХРАННОСТЬ И ПРИЖИВЛЯЕМОСТЬ ЗАМОРОЖЕННО-ОТТАЯННЫХ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ L-КАРНИТИНА В СОСТАВЕ СРЕДЫ ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЗАРОДЫШЕЙ**

<sup>1</sup>*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси  
по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Брестплемпредприятие, г. Брест, Республика Беларусь*

Одним из важнейших этапов практического применения трансплантации эмбрионов является возможность длительного сохранения зародышей вне организма в глубокозамороженном состоянии с целью их наиболее эффективного

использования для получения потомков от высокоценных животных в программах селекции и разведения крупного рогатого скота. В связи с этим использование в эмбриотрансплантации биологически активных соединений, обладающих липолитическим действием, представляет интерес с точки зрения изучения возможности снижения влияния негативных факторов внешней среды и воздействия низких температур на биоматериал в процессе его нахождения вне организма. В статье представлены материалы исследований влияния L-карнитина в составе среды для извлечения зародышей на сохранность и приживляемость заморожено-оттаянных эмбрионов крупного рогатого скота. Установлено, что применение L-карнитина в вымывной среде не приводило к существенным изменениям в морфологии эмбрионов после их оттаивания по сравнению с контролем. При добавлении в среду для извлечения эмбрионов у коров-доноров липолитического вещества L-карнитина обозначилась тенденция качественного улучшения заморожено-оттаянных зародышей и повышения результативности пересадок дефростированного эмбриоматериала.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, эмбрион, криоконсервирование, L-карнитин, приживляемость, сохранность.

O.V. PAITSERAVA<sup>1</sup>, A.I. BUDZEVICH<sup>1</sup>, U.K. KIRIKOVICH<sup>1</sup>,  
N.F. ZHUK<sup>2</sup>

## **VIABILITY AND SURVIVAL OF FROZEN-THAWED BOVINE EMBRYOS WHEN L-CARNITINE IS USED IN THE EMBRYO EXTRACTION MEDIUM**

*<sup>1</sup>Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Animal Breeding, Zhodino, Republic of Belarus*

*<sup>2</sup>Brestplempredpriyatie, Brest, Republic of Belarus*

One of the most important stages of practical application of embryo transplantation is the possibility of long-term preservation of embryos outside the body in deep-frozen state in order to use them most effectively to obtain offspring from high-value animals in cattle selection and breeding programs. In this regard, the use of biologically active compounds with lipolytic action in embryo transplantation is of interest in the context of studying the possibility of reducing the influence of negative environmental factors and the impact of low temperatures on biomaterial while it is outside the body. The article presents the materials of the study of the effect of L-carnitine as part of the embryo extraction medium on the viability and survival of frozen-thawed bovine embryos. It was found that the use of L-carnitine in the washout medium did not lead to significant changes in the morphology of embryos after thawing compared to the control group. When adding the lipolytic substance L-carnitine to the medium for extracting embryos from donor cows, there was a tendency of qualitative improvement of frozen-thawed embryos and an increase in the efficiency of transfer of defrosted embryo material.

**Keywords:** cattle, embryo, cryopreservation, L-carnitine, survival, viability.

**Введение.** Одним из важнейших этапов практического применения трансплантации эмбрионов является возможность длительного сохранения зародышей вне организма в глубоком замороженном состоянии с целью их наиболее эффективного использования для получения потомков от высокоценных животных в программах селекции и разведения крупного рогатого скота. Вместе с тем, использование технологии криоконсервирования биоматериала сталкивается с проблемой снижения жизнеспособности эмбрионов. Одной из основных причин потери качества биоматериала после низкотемпературного хранения является разрушающее действие физико-химических факторов на эмбрионы в процессе замораживания-оттаивания, что, в свою очередь, отрицательно сказывается на метаболизме зародышей, приводит к деструкции мембраносвязанных компонентов блестящей оболочки и органелл клеток, которые являются наиболее чувствительными структурами к понижению температуры и особенно замораживанию [1, 2].

Использование различных приёмов и методов для сохранения мембран и улучшения их биохарактеристик, связанных с проницаемостью, является одной из приоритетных задач технологии криоконсервирования эмбрионов [3, 4] и ооцитов [5]. Существует ряд подходов для снижения деструкции оболочек, в их числе механические, химические, биофизические и др. [6, 7, 8], при этом одним из перспективных является использование различных биологически активных веществ, позволяющих повысить адаптивность и биодоступность мембран без потери их основных свойств.

По данным некоторых авторов [9], существует корреляция между наличием жировых капель в клетках и их криорезистентностью. Удаление указанных включений с помощью липолитических агентов в ооцитах и эмбрионах крупного рогатого скота повышало их устойчивость к процессам замораживания и оттаивания. Одним из веществ, обладающих способностью к деструкции жира, является L-карнитин, который снижал уровень липидов в ооцитах крупного рогатого скота, мышей и свиней [10, 11, 12]. В дополнение к своей метаболической функции L-карнитин является мощным антиоксидантом [13], уменьшающим накопление активных форм кислорода (АФК) и частоту апоптоза в клетках животных [14, 15]. Антиоксидантный эффект L-карнитина был подтверждён на ооцитах и эмбрионах свиней [10, 16]. Установлено [17], что введение данного вещества в дозе 0,6 мг/мл в среду для созревания ооцитов крупного рогатого скота позволило существенно повысить потенциал развития клеток до стадии бластоцисты (34 % против 20 % в контроле, без заморозки – 44 %), при этом не было обнаружено значительных изменений в скорости созревания ядра, содержании АТФ, времени

первого деления и качестве эмбрионов указанной стадии развития, а отмечалось смещение липидных капель из периферической области во внутреннюю цитоплазму ооцитов. В то же время T. Phongnimitr et al. [18] сообщалось об отсутствии влияния L-карнитина на криоустойчивость ооцитов: использование препарата на невитрифицированных ооцитах значительно увеличило скорость созревания ядер (78 % против 68 %) и достижение клетками стадии бластоцисты на 7-й день культивирования (31 % против 24 % в контроле), но не способствовало повышению криотолерантности ооцитов (выход бластоцист составил 11 % против 13 % в контроле). Исследователями Dias et al. [8] предложено комплексное применение делипидирующих агентов L-карнитина и транслинолевой кислоты в процессе культивирования клеток *in vitro*, что обеспечивало снижение накопления триацилглицеринов в их оболочке и позволило достигнуть лучшей проницаемости зоны пеллюцида для криопротекторов.

Таким образом, использование в эмбриотрансплантации биологически активных соединений, обладающих липолитическим действием, представляет интерес с точки зрения изучения возможности снижения влияния негативных факторов внешней среды и воздействия низких температур на биоматериал в процессе его нахождения вне организма.

**Материал и методика исследований.** Исследования проводились в лаборатории воспроизводства, трансплантации эмбрионов и трансгенеза животных РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» и племенном хозяйстве «Литвиново» РСУП «Брестплемпредприятие».

В качестве доноров эмбрионов использовались клинически здоровые коровы голштинской породы молочного скота отечественной селекции в возрасте от 3 до 6 лет живой массой 650 кг и более. В опытной группе извлечение эмбрионов у доноров осуществлялось нехирургическим способом на 7-й день после первого осеменения животных с использованием сбалансированного солевого раствора Рингера-Локка с добавлением 1 мг/мл сывороточного альбумина крупного рогатого скота (БСА), 12 мкг/мл гентамицина и 0,6 мг/мл L-карнитина («Sigma-Aldrich», Germany). В контрольной группе указанное делипидирующее вещество в составе вымывной среды не применялось.

Поиск клеток в промывной жидкости осуществлялся при 16-кратном, а оценка их качества – при 56-63-кратном увеличении микроскопов NIKON и OPTON. Для манипуляций с эмбрионами и их временного культивирования применялся фосфатно-солевой раствор Дюльбекко с добавлением 1 мг/мл БСА и гентамицина (12 мкг/мл).

В процессе замораживания зародыши насыщались 1,5М раствором

этиленгликоля. Их криоконсервирование проводилось в охлаждающей камере программируемого замораживателя CL-5500 («CryoLogic», Australia) со скоростью снижения температуры 0,5 °С/мин до -40 °С, после чего пайетты с биоматериалом переносились для хранения в жидкий азот при температуре -196 °С. После оттаивания содержимое соломинок помещалось в чашки Петри для проведения процедуры замещения криопротектора в деконсервированных клетках питательной среды.

Сохранность эмбрионов оценивалась визуально по следующим морфологическим признакам: возраст или соответствие уровня дробления стадии развития, целостность мембран, прозрачность цитоплазмы, форма и связь между бластомерами, их цвет и размеры. После оценки качества оттаянные эмбрионы, пригодные к трансплантации, заправлялись в пайетты, затем в катетеры и пересаживались тёлкам-реципиентам. Основные элементы технологии трансплантации эмбрионов осуществлялись согласно методическим рекомендациям [19].

**Результаты эксперимента и их обсуждение.** В таблице приведены данные исследований по сохранности и приживляемости криоконсервированных эмбрионов крупного рогатого скота с использованием в среде для вымывания биоматериала делипидирующего вещества L-карнитина.

Таблица – Влияние липолитического агента L-карнитина в составе среды для извлечения на качество заморожено-оттаянных зародышей коров и их приживляемость

Качество эмбрионов	Количество эмбрионов, n/%			
	Контрольная группа		Опытная группа	
	до заморозки	после оттаивания	до заморозки	после оттаивания
1	2	3	4	5
Всего зародышей, n/%	23/100,0	23/100,0	24/100,0	24/100,0
Отличное, n/%	14/60,9±10,2	3/13,1±7,0**	14/58,4±10,06	4/16,7±7,61**
Хорошее, n/%	5/21,7	15/65,2	5/20,8	15/62,5
Удовлетворительное, n/%	4/17,4	3/13,0	5/20,8	3/12,5
Неудовлетворительное, n/%	0/0,0	2/8,7	0/0,0	2/8,3
Пригодные к пересадке, n/%	23/100,0	21/91,3±5,9	24/100,0	22/91,7±5,5
Средний балл	4,50±0,16	3,83±0,16	4,38±0,17	3,88±0,16
Снижение качества после оттаивания, на балл	0,67		0,50	

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5
Количество пересадок, n/%		21/100,0		22/100,0
Приживляемость на 50 день, n/%		9/42,9		10/45,5

*Примечание.* \*\*P<0.01

Полученные данные свидетельствуют о том, что у коров-доноров опытной группы применение L-карнитина в вымывной среде не приводило к существенным изменениям в морфологии эмбрионов после их оттаивания по сравнению с контролем. Так, после дефростации в опытной группе было получено 91,7 % клеток, пригодных к трансплантации, в контроле указанный показатель составил 91,3 % (разница – 0,4 п. п.). Как в контрольной, так и в опытной группе зародышей было отмечено достоверное (P<0.01) снижение качества эмбрионов, оценённых как «отличные» до криоконсервирования, с разницей в 6,1 п. п. соответственно на 47,8 и 41,7 п. п. Количество «удовлетворительных» и «неудовлетворительных» зародышей в опыте составило 12,5 и 8,3 %, что на 0,5 и 0,4 п. п. было меньше, чем в контроле. Средний балл оттаянных эмбрионов оказался на уровне 3,83 в контрольной группе и был аналогичен результатам в опытной – 3,88, при этом снижение качества эмбриоматериала после его криоконсервирования составило 0,67 и 0,5 балла, а общее количество зародышей отличного и хорошего качества и приживляемость эмбрионов у реципиентов было сопоставимо в обеих группах – 78,3 и 79,2 % и 42,9 и 45,5 % соответственно.

**Заключение.** Таким образом, при добавлении в среду для извлечения эмбрионов у коров-доноров липолитического вещества L-карнитина обозначилась тенденция качественного улучшения заморожено-оттаянных зародышей и повышения результативности пересадок дефростированного эмбриоматериала, что требует проведения дополнительных исследований в плане изучения действия указанного выше биологически активного агента на других этапах технологии криоконсервирования зародышей крупного рогатого скота.

#### Литература

1. Lane, M. Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development / M. Lane, J. M. Maybach, D. K. Gardner // Human Reproduction. – 2002. – Vol. 17(10). – P. 2686–2693. DOI: 10.1093/humrep/17.10.2686.
2. Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection? / A. Van Soom [et al.] // Reprod. Fertil. Dev. – 2010. – Vol. 22(1). – P. 21–31. DOI: 10.1071/RD09230
3. Hershlag, A. Effect of prefreeze assisted hatching on post thaw survival of mouse embryos / A. Hershlag, H. L. Feng // Fertility and Sterility. – 2005. – Vol. 84. – P. 1752–1754. DOI:

10.1016/j.fertnstert.2005.05.065.

4. A prospective randomized study to assess the benefit of partial zona pellucida digestion before frozen-thawed embryo transfers / C. Sifer [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2006. – Vol. 21(9). – P. 2384–2389. DOI: 10.1093/humrep/del149.

5. Application of laser-assisted zona drilling to in vitro fertilization of cryopreserved mouse oocytes with spermatozoa from a subfertile transgenic mouse / M. Anzai [et al.] // *J. Reprod. Dev.* – 2006. – Vol. 52(5). – P. 601–606. DOI: 10.1262/jrd.18040.

6. Montag, M. Use of a laser to evaluate zona pellucida hardness at different stages of mouse embryonic development in vitro and in vivo / M. Montag, B. Kol, H. van der Ven // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2000. – Vol. 17(3). – P. 178–181. doi: 10.1023/a:1017257824215.

7. Effect of zona incision by piezo-micromanipulator (ZIP) on in vitro fertilization in 21 transgenic mice lines / Y. Kawase [et al.] // *Exp. Anim.* 2009. – Vol. 58(4). – P. 415–419. DOI: 10.1538/expanim.58.415.

8. Effect of delipidant agents during in vitro culture on the development, lipid content, gene expression, and cryotolerance of bovine embryos. / O. Dias [et al.] // *Reproduction in Domestic Animals.* – 2020. – Vol. 55(1). – P. 11–20. DOI: 10.1111/rda.13579.

9. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos / M. J. Sudano [et al.] // *Zygote.* – 2014. – Vol. 22. – P. 124–31. DOI: 10.1017/S0967199412000196.

10. Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes / T. Somfai [et al.] // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2011. – Vol. 23. – P. 912–920. DOI: 10.1071/RDv10339.

11. Yamada, T. Beneficial effects of acetyl-L-carnitine treatment during IVM on post-fertilization development of bovine oocytes in vitro / T. Yamada, H. Imai, M. Yamada // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2006. – Vol. 18. – P. 280–281. DOI: 10.1071/RDv18n2Ab346.

12. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development / K. R. Dunning [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2010. – Vol. 83. – P. 909–918. DOI: 10.1095/biolreprod.110.084145.

13. Gülçin, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine / I. Gülçin, // *Life Sci.* – 2006. – Vol. 78. – P. 803–811. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.05.103.

14. Pillich, R. T. Reduction of apoptosis through the mitochondrial pathway by the administration of acetyl-L-carnitine to mouse fibroblasts in culture / R. T. Pillich, G. Scarsella, G. Risuleo // *Exp. Cell Res.* – 2005. – Vol. 306. – P. 1–8. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.01.019.

15. L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway / J. Ye [et al.] // *Regul. Pept.* – 2010. – Vol. 161. – P. 58–66. DOI: 10.1016/j.regpep.2009.12.024.

16. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs / G. Q. Wu [et al.] // *Theriogenology.* – 2011. – Vol. 76. – P. 785–793. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.04.011.

17. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes / V. Chankitisakul [et al.] // *Theriogenology.* – 2013. – Vol. 79(4). – P. 590–598. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.011.

18. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes / T. Phongnimitr [et al.] // *Animal Science Journal.* – 2013. – Vol. 84(11). – P. 719–725. DOI: 10.1111/asj.12067.

19. Усовершенствованная технология трансплантации эмбрионов в молочном и мясном скотоводстве : методические рекомендации / А. И. Будевич [и др.]. – Жодино, 2010. – 17 с.

*Поступила 26.02.2024 г.*