

Kerimbayev A.A., Kopeyev S.K., Rametov N.M., Ryabinnikova A.I.,  
Kirikbayev S.T., Orynbaev M.B.

## DEFINITION OF IMMUNOGENICITY OF INACTIVATED CULTURAL VACCINE FOR EQUINE HERPES VIRUS SEROTYPE 4

### ***Annotation***

The results on definition of immunogenicity and immunity terms of horses which are vaccinated by experimental batch of the inactivated cultural vaccine for equine herpes virus are presented in this work. The researches had been shown that in the organism of the animals on 7 days after introduction of experimental batch is developed antibodies in 4 and more times higher than before vaccination (sufficient for animals protection). High-level immunity was developed for 21 days after double application of experimental batch.

**Key words:** vaccine, herpes, immunogenicity, cell culture, antibodies.

**УДК 636.2:612.621**

**Кузьмина Т.И., Усенбеков Е.С., Бименова Ж.Ж.**

*ФГБНУ «ВНИИ генетики и разведения», Санкт-Петербург-Пушкин, Россия  
НАО «Казахский национальный аграрный университет», Республика Казахстан*

## О РЕЗУЛЬТАТАХ (BRILLIANT CRESYL BLUE) ВСВ ТЕСТИРОВАНИЯ ООЦИТОВ КОРОВ, ЗАВЕРШИВШИХ ФАЗУ РОСТА IN VIVO ИЛИ IN VITRO

### **Аннотация**

В статье приводятся результаты исследования функционального состояния ооцитов коров (завершенности фазы роста) с использованием прижизненного бриллиантового кристаллического красителя (brilliant cresyl blue - ВСВ) – индикатора активности фермента глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы. Активность фермента возрастает в растущем ооците, к моменту завершения роста - снижается. Использование в качестве диагностического теста для прижизненного тестирования ооцитов позволяет вести селекцию компетентных ооцитов, пригодных для экстракорпорального оплодотворения.

**Ключевые слова:** донорские ооциты, brilliant cresyl blue (ВСВ - тест), культивирование ооцит-кумулясного комплекса, фолликулогенез, мейоз.

### **Введение**

Исследованиями установлено, что у коров в течение полового цикла происходят три волны роста фолликулов, в зависимости от диаметра фолликулы различаются: фолликулы на стадии роста с диаметром 2-5 мм, фолликулы, которые подвергаются атрезии, диаметром 5-8 мм, доминантный фолликул с диаметром более 8 мм. Обычно, количество фолликулов на стадии роста достигает 10-15, фолликулы, подвергающиеся к атрезии 4-5 и один фолликул становится доминантным и подвергается овуляции. Ооциты коров - источник получения нативных и реконструированных эмбрионов с использованием инновационных клеточных репродуктивных технологий (трансагинальная аспирация ооцитов с последующим экстракорпоральным оплодотворением и культивированием эмбрионов, клонирование, трансгенез), позволяющих решать важные для разведения крупного рогатого скота проблемы воспроизводства и моделирование стад высокопродуктивных животных. Основные показатели таких технологий (процент трансферабельных эмбрионов, получение, жизнеспособного потомства) в настоящее время недостаточно высоки [1].

Так, выход эмбрионов из созревших и оплодотворенных *in vitro* ооцитов коров составляет от 25 до 40%, а доля клонированных и трансгенных телят - от 0,3 до 4%, что вызывает необходимость использования большого количества донорских ооцитов. Для совершенствования этих технологий необходимо углубленное исследование фундаментальных основ формирования яйцеклетки животного и оптимизации их отдельных этапов, начальным из которых является отбор донорских ооцитов на основе морфофункциональных параметров.

Применение в качестве зонда для прижизненного тестирования ооцитов бриллиантового кристаллического красителя (brilliant cresyl blue - BCB) - индикатора активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (G6PDH) обеспечивает возможность использования отобранных клеток для дальнейшего культивирования ооцитов, их оплодотворения и получения эмбрионов. BCB детерминирует интрацеллюлярную активность G6PDH, которая играет важную роль в клеточном росте, являясь ключевым ферментом пентозо-фосфатного цикла. Активность фермента возрастает в растущем ооците, к моменту завершения роста - снижается. Нетоксичность данного красителя при его использовании в качестве теста для определения уровня содержания G6PDH была показана в ооцитах овец, в зависимости от их размера, а также при определении компетенции к мейотическому дозреванию ооцитов свиней и коров [2, 3, 4].

Яичники коров, используемые в клеточных репродуктивных технологиях, различаются по морфологии. Представляет несомненный интерес раннее прогнозирование целесообразности использования различных типов яичников в качестве источника получения донорских ооцитов.

Цель настоящего исследования - проанализировать параметры, характеризующие созревание *in vitro* ооцитов, выделенных из яичников на разных стадиях овариального цикла, завершивших фазу роста *in vivo* или *in vitro* (уровни ооцитов, реиницировавших мейоз, достигших стадии метафазы 2, дегенерация хроматина в ооцитах). Сравнить показатели, отражающие потенции к развитию эмбрионов, полученных из завершивших фазу роста *in vivo* или *in vitro* ооцитов коров.

#### **Материалы и методы исследования**

Работа проводилась в 2015 году в лаборатории биология развития ВНИИГРЖ и на кафедре клинической ветеринарной медицины в рамках реализации научного проекта МОН РК «Интенсификация селекционного процесса в животноводстве на основе использования клеточных репродуктивных технологии». Для ранжирования популяции ооцитов, пригодной для дальнейшего созревания *in vitro*, яичники делили на 3 типа: яичники со следами свежей овуляции (перфорация фолликула), яичники на разных стадиях развития желтого тела и яичники на стадии фолликулярного роста (одновременный рост большого числа фолликулов). После извлечения ооцит-кумулюсных комплексов проводили цитоморфологическую оценку: в экспериментах использовали только ооциты, окруженные не менее чем 5-6 слоями кумулюса, с равномерной по ширине зоной пеллюцида, гомогенной ооплазмой.

После морфологической оценки ооциты подвергали BCB-диагностике, основанной на использовании витального красителя BCB - бриллиантового кристаллического голубого. Для проведения BCB-теста ооцит-кумулюсные комплексы коров отмывали 3 раза в растворе Дюльбекко с добавлением 0,4 % бычьего сывороточного альбумина (BSA) (A-7888; mDPBS). Затем ооцит-кумулюсные комплексы подвергали воздействию раствора 26  $\mu$ M BCB (B-5388), приготовленного на основе Дюльбекко, в течение 90 минут. Выбор концентрации основывался на данных, полученных Rodri'guez-Gonza'lez, E. et.al. [2], чем показано, что концентрация 26  $\mu$ M BCB эффективна для оценки качества донорской яйцеклетки без потери её жизнеспособности. По истечении времени воздействия BCB ооцит-кумулюсные комплексы отмывали в растворе Дюльбекко дважды, после чего

оценивали под бинокулярной лупой и разделяли на две группы: ВСВ(+) - окрашенные ооциты (завершившие фазу роста *in vivo*) и ВСВ(-) - неокрашенные ооциты (не завершившие фазу роста *in vivo*).

Режим культивирования и оплодотворения ооцитов *in vitro*, культивирование доимплантационных эмбрионов соответствовал методическим рекомендациям, разработанным в лаборатории биологии развития [5, 6]. В экспериментальных группах использовали систему кокультивирования клеток гранулезы с добавлением 50 нг/мл пролактина (Институт химии гормонов, Москва). В отборе концентраций пролактина руководствовались данными, полученными нами ранее [2]. Для цитогенетического исследования ядерного материала клеток готовили препараты хромосом по методу Tarkowski А.К. [7]. Ооциты или эмбрионы помещали на 5-10 мин в 0,9%-ный раствор цитрата натрия и с помощью препаровальной иглы механически очищали от кумулюса. Затем клетки переносили на сухое обезжиренное стекло и фиксировали смесью метанол-уксусная кислота (3:1). Сухо-воздушные препараты окрашивали по методу Гимза в модификации Романовского азур-эозином в течение 5-10 минут.

Для сравнения результатов, полученных в опытных и контрольных группах, использовали критерий  $\chi^2$  с помощью статистической программы Sigma Stat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости:  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$ . Способность ооцита, завершить мейоз определяется, как мейотическая компетентность. Мейотическая компетентность приобретается поэтапно в течение фолликулярного роста. Ооциты сначала приобретают способность к разрушению зародышевого пузырька и конденсации хромосом, а в результате дальнейшего роста и развития фолликула прогрессировать до стадии метафазы I, и, наконец, достигнуть стадии метафазы II. Мейотическая компетентность связана с размером ооцита, который в свою очередь связан с размером фолликула.

Для получения эмбрионов *in vitro*, отбор компетентных ооцитов является очень важным. Ооциты, используемые для этих целей, выделяются из яичников убитых животных, что приводит к смешиванию ооцитов, выделенных из яичников на различных стадиях эстрального цикла. Для отбора ооцитов используются морфологические параметры, такие как количество слоев кумулюсных клеток, окружающих ооцит, и структура ооплазмы. Этого не достаточно, чтобы оценить компетентность, связанную с индивидуальным развитием ооцита.

Диаметр ооцита - определяющий фактор в приобретении мейотической компетентности. В исследованиях с ооцитами коз, не достигших половой зрелости (окраска ВСВ), было показано, что окрашенные ВСВ(+) ооциты были больше чем те, которые оставались неокрашенными ВСВ(-) (136,6 мм против 125,5 мм в диаметре). Процент ооцитов коз, отобранных с помощью ВСВ-теста, на стадии метафазы II после культивирования *in vitro*, был выше у ВСВ(+) ооцитов, чем у ВСВ(-) ооцитов или ооцитов в контроле [2]. Точно так же ВСВ(+) ооциты свиней по размеру были больше, чем те, которые оставались неокрашенными (113,1 мм против 100,3 мм в диаметре) [3].

#### **Результаты и обсуждение**

В наших исследованиях показано, что после 24 часов культивирования основная масса ВСВ(+) и ВСВ(-) ооцитов коров (от 89 до 93%) во всех исследуемых группах реиницировала мейоз (табл.1). Результаты эксперимента не зависели от типа яичников, из которых были выделены донорские ооциты (свежая овуляция, желтое тело, фолликулярная фаза). Не обнаружено достоверных различий в долях ВСВ(+) и ВСВ(-) ооцитов, реиницировавших мейоз, в группе, где морфология и функциональный статус яичников коров-доноров не определялся (91 и 92%). Анализ показателей ядерного созревания (стадия мейоза, уровень ооцитов с нормальным и дегенерированным хроматином) выявил ряд различий в уровне созревших ооцитов (достижение ооцитами стадии метафазы-II) в

экспериментальных группах (табл.2). Так, в случае использования в качестве источника получения ооцитов яичников с признаками свежей овуляции, процент созревших ВСВ(+) ооцитов превысил таковой у ВСВ(-) ооцитов (77% против 63%,  $P < 0,05$ ).

Таблица 1. Реинициация мейоза в ВСВ-тестированных ооцитах коров, выделенных из яичников на разных стадиях овариального цикла (время культивирования 24 часа, n ооцитов -1106) \*

Тип яичника	ВСВ - тест	Число ооцитов (n)	Реиницировавших мейоз, % (n)	Нереиницировавших мейоз, % (n)
Свежая овуляция	ВСВ(+)	182	92 (167/182)	8 (15/182)
	ВСВ(-)	143	91 (130/143)	9 (13/143)
Желтое тело	ВСВ(+)	134	93 (125/134)	7 (9/134)
	ВСВ(-)	111	91 (101/111)	9 (10/111)
Стадия фолликулярного роста	ВСВ(+)	161	89 (143/161)	11 (18/161)
	ВСВ(-)	103	91 (93/103)	9 (9/103)
Не определялся	ВСВ(+)	153	92 (141/153)	8 (12/153)
	ВСВ(-)	119	91 (76/119)	9 (24/119)

\*Среда созревания ооцитов: ТС199+10%фетальной бычьей сыворотки +  $10^6$  клеток гранулезы /мл среды +50 нг/мл пролактина

Аналогичная тенденция отмечена при культивировании ооцитов, завершивших фазу роста *in vivo* или *in vitro*, выделенных из яичников с желтыми телами на разных стадиях развития и яичников в фолликулярной фазе, а также в случае, если тип яичника в эксперименте не определялся. Разница между группами составила 13-14%. Ооциты во всех исследуемых группах, не завершившие созревания после 24 часов культивирования, находились на разных стадиях мейоза - от диплотены до телофазы. Анализ деструктивных изменений хроматина в ооцитах после завершения времени культивирования выявил тенденцию к увеличению числа ВСВ(-) ооцитов с дегенерированным хроматином по сравнению с ВСВ(+) ооцитами. Следует отметить отсутствие достоверных различий между числом ВСВ(-) ооцитов, выделенных из яичников всех исследованных типов, завершивших мейотическое созревание, также не обнаружено достоверных различий в достижениях ВСВ(+) ооцитами из разных типов яичников стадии метафазы-II.

Таблица 2. Показатели ядерно-цитоплазматического созревания *in vitro* ВСВ-тестированных ооцитов коров, выделенных из яичников на разных стадиях овариального цикла (время культивирования 24 часа, n ооцитов -1106) \*

Тип яичника	ВСВ-тест	Число ооцитов (n)	% (n) созревших ооцитов	% (n) ооцитов на стадиях диплотены-телофазы	% (n) дегенерированных ооцитов
Свежая овуляция	ВСВ(+)	182	77(140/182) <sup>a</sup>	23(42/182) <sup>k</sup>	9(16/182) <sup>s</sup>
	ВСВ(-)	143	63( 90/143) <sup>b</sup>	37( 53/143) <sup>l</sup>	14(20/143) <sup>t</sup>
Желтое тело	ВСВ(+)	134	79(106 /134) <sup>c</sup>	21( 28/134) <sup>m</sup>	8(11/134) <sup>u</sup>
	ВСВ(-)	111	65( 72/111) <sup>d</sup>	35( 39/111) <sup>n</sup>	12(13/111) <sup>v</sup>
Стадия фолликулярного роста	ВСВ(+)	161	80(129/161) <sup>e</sup>	20(32/161) <sup>o</sup>	9(14/161) <sup>w</sup>
	ВСВ(-)	103	67(69/103) <sup>f</sup>	33(34 /103) <sup>p</sup>	16(16/103) <sup>x</sup>

Не определялся	BCB(+)	153	81(123/153) <sup>g</sup>	19( 30/153) <sup>d</sup>	9(14/153) <sup>y</sup>
	BCB(-)	119	68(81/119) <sup>h</sup>	32(38/119) <sup>f</sup>	18(21/119) <sup>z</sup>

\*Среда созревания ооцитов: ТС199+10%фетальной бычьей сыворотки + 10<sup>6</sup> клеток гранулезы /мл среды +50 нг/мл пролактина

Достоверность различия сравниваемых значений (критерий  $\chi$ -квадрат): a,b; c,d; e,f,g,h;k,l;m,n;o,p;q,r;s,z;u,v;u,z;w;z;у,z. p<0,05

Исходя из вышеизложенных результатов, в следующей серии экспериментов мы оценили компетентность BCB-тестированных ооцитов к оплодотворению и развитию из них доимплантационных эмбрионов. Как видно из рисунка, наибольшее количество - 8-16 клеточных эмбрионов было получено при оплодотворении BCB(+) ооцитов (113 эмбрионов против 75 и 89, p<0.001) стадий поздней морулы и бластоцисты достигли 55 эмбрионов, развившихся из BCB(+) ооцитов против 22 эмбрионов, полученных из BCB(-) ооцитов и 30 эмбрионов из ооцитов, не подвергшихся BCB-диагностике (p<0.001).

В результате анализа морфологии доимплантационных эмбрионов не установлено достоверных различий по уровню дегенераций во всех исследуемых группах. При морфологическом анализе эмбрионов учитывали следующие параметры: правильность формы эмбриона, компактность, отклонение в размере клеток, цвет и структура эмбриона, наличие больших везикул, форма зоны пеллюцида, наличие фрагментов клеток. Цитологический анализ проводили с учетом следующих показателей: фрагментация цитоплазмы, неполный набор хромосом в бластомерах, несоответствие числа бластомеров количеству ядер, эмбрионы с пикнотическими ядрами в бластомерах.

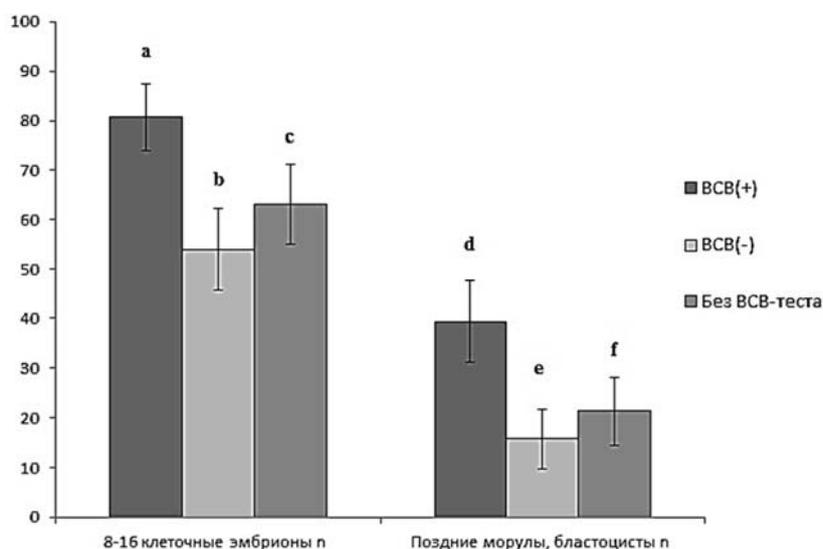


Рисунок 1. Развитие эмбрионов коров из BCB-тестированных ооцитов коров

\*Среда созревания ооцитов: ТС199+10%фетальной бычьей сыворотки + 10<sup>6</sup> клеток гранулезы /мл среды +50 нг/мл пролактина

(n ооцитов – 413, n эмбрионов – 277) Достоверность различия сравниваемых значений (критерий  $\chi$ -квадрат): a, b p <0.001; a, c p <0.001, d, e p <0.001, d, f p <0.001

### Заклучение

В результате анализа данных проведенных экспериментов обнаружено, что ооциты коров, завершившие фазу роста in vivo перед аспирацией [BCB(+) ооциты] из овариальных фолликулов, вне зависимости от типа яичников (яичники со следами свежей

овуляции, с желтыми телами на разных стадиях развития, яичники в фолликулярной фазе), имели высокие показатели оплодотворяемости и дробления (81% и 39% соответственно). Ооциты, не завершившие фазу роста *in vivo*, извлеченные из разных типов яичников [BCB(-) ооциты], реинициировали мейоз, однако, при дальнейшем экстракорпоральном оплодотворении через 24 часа культивирования, уровень оплодотворенных клеток и развившихся из них эмбрионов значительно отличался от процента оплодотворенных BCB(+) ооцитов и полученных из них доимплантационных эмбрионов (54% и 16% соответственно).

Проведенные исследования выявили высокую эффективность использования превентивной BCB-диагностики ооцитов для совершенствования технологии получения эмбрионов *in vitro*. Эффект селекции по BCB-тесту выражался в значительном увеличении количества развившихся из BCB (+) ооцитов доимплантационных эмбрионов, в том числе на стадиях морулы и бластоцисты (39% против 16%,  $p < 0.001$ ) и проявлялся вне зависимости от морфологии и функционального статуса яичников, из которых извлекались ооциты.

### Литература

1. *Wathes D, Taylor V, Cheng Z, Mann G*, 2003. Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. *Reproduction supplement* 61: 216-237.

2. *Heleil B., Kuzmina T., et al.* Effect of prolactin on Developmental Competence of Bovine Oocytes Selected by Brilliant Cresyl Blue Staining. *Jornal of Reproduction and Infertility* 1 (1); 01-07, 2010.

3. *Rodriguez-Gonzalez, E.* Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test / E. Rodri'guez-Gonza'lez, M. Lopez-Be jar, E. Velilla, M.T. Paramio // *Theriogenology*. -2002. -V. 57. -P. 1397— 1409.

4. *Roca, J*, Selection of immature pig oocytes for homologous *in vitro* penetration assays with brilliant cresyl blue test / J. Roca, E. Martinez, J.M. Vazquez, X. Lucas // *Reprod. Fert. Dev.* - 1998. -V. 10. -P. 479-485.

5. *Кузьмина Т.И., Денисенко В.Ю., Лебедева И.Ю., Шокин О.В.* Методы оценки функционального состояния донорских ооцитов, соматических клеток фолликулов и эмбрионов сельскохозяйственных животных: /Метод рекомендации. - М.,2005.- 32 с.

6. *Кузьмина, Т.И., Багиров В.А., Егуазарян А.В. и др.* Биотехнология получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*. -СПб, 2009, 44 с.

7. *Tarkowski A.K.* An air drying method for chromosomal preparation from mouse eggs// *Cytogenetic*. - 1966. - V.I.-P. 394-400.

8. \*Настоящая публикация выполнена в рамках реализации проекта МОН РК «Интенсификация селекционного процесса в животноводстве на основе использования клеточных репродуктивных технологий», финансируемого в рамках бюджетной программы 055 грантового финансирования, госрегистрация № 0115РК00728.

Кузьмина Т.И., Усенбеков Е.С., Бименова Ж.Ж.

### IN VIVO НЕМЕСЕ IN VITRO ЖАҒДАЙЛАРЫНДА ӨСУ САТЫСЫН АЯҚТАҒАН СИБР ООЦИТТЕРІН BCB (BRILANT CRESYL BLUE) ТЕСТІМЕН ТЕКСЕРУ НӘТИЖЕЛЕРІ

#### Аңдатпа

Мақалада сибрлардың донорлық ооциттерінің функциональдық жағдайы мен даму сатыларын анықтау үшін глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа ферментінің белсенділігін балау нәтижелері берілген. Қазір, өсіп келе жатқан ооциттердің ферменттің белсенділігінің

жоғарылайтынын, ал өсу деңгейіне жоғарғы сатысына жеткен ооциттердің белсенділігін төмендейтіні белгілі. Ооциттердің өсу барысында балау тесті ретінде бриллиант кристалдары бояуын пайдалану әдісінің (brilliant cresyl blue - BCB) экстракорпоральдық әдіспен ұрықтандыруға қабілетті ооциттер сұрыптауға мүмкіндік беретіні дәлелденген.

**Кілт сөздер:** донорлық ооциттер, brilliant cresyl blue (BCB - тест), ооцит-кумулюс кешендерін өсіру, фолликулогенез, мейоз.

Kuzmina T.I., Ussenbekov Y.S., Bimenova J.J.

#### ON THE RESULTS OF BCB (BRILLIANT CRESYL BLUE) TEST BOVINE OOCYTES THAT HAVE FINISHED GROWTH PHASE IN VIVO OR IN VITRO

##### **Annotation**

The article presents the results of the study of the functional state of oocytes of cows (the growth phase of completion) using vital brilliant crystalline dye (brilliant cresyl blue - BCB) - an indicator of activity of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase. Established that the enzyme activity in the growing oocyte increases, the time of completion of growth - is reduced. The use as a diagnostic test for in vivo testing of oocytes diamond crystalline dye (brilliant cresyl blue - BCB) allows the selection of competent oocytes suitable for in vitro fertilization.

**Keywords:** donor oocytes, brilliant cresyl blue (BCB - test), the cultivation of the oocyte-cumulus complex, folliculogenesis, meiosis.

ӘОЖ 619:616.921.5;636.3

Майлыбаева А.М., Рыскельдинова Ш.Ж., Асанжанова Н.Н., Қыдырбаев Ж.Қ.,  
Еспембетов Б.А., Сармыкова М.К., Табынов Қ.Қ.

*Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институты*

#### ТҰМАУ ВИРУСТЫҚ ВЕКТОРЛАРЫНЫҢ БРУЦЕЛЛЕЗДІК OMP19 ЖӘНЕ CU-ZN SOD ПРОТЕИНДЕРІН ЭКСПРЕССИЯЛАЙТЫН ГЕНЕТИКАЛЫҚ ЕНДІРМЕЛЕРІНІҢ ТҰРАҚТЫЛЫҒЫН БАҒАЛАУ

##### **Аңдатпа**

Тұмау вирустық векторларының бруцеллездік Omp19 және CU-ZN SOD протеиндерін экспрессиялайтын генетикалық ендірімелерінің тұрақтылығын бағалау мәліметтері көрсетілген. Аталмыш зерттеу жұмыстарының нәтижесі бойынша шекті сұйылту арқасында алынған Flu-NS1-124-Omp19-H5N1 және Flu-NS1-124-SOD-H5N1 вирустық конструкциялардың тауық эмбриондарындағы әр түрлі пассаж деңгейінде бруцеллездік ендірімелердің тұрақтылығы анықталды.

**Кілт сөздер:** бруцеллез, бруцеллездік ендіріме, вектор, экспрессия, эмбрион, биологиялық белсенділік, генетикалық тұрақтылық, тұмау вирусы.

##### **Кіріспе**

Бруцеллез ауылшаруашылық малдарының арасында жиі кездесетін инфекциялық ауру. Қазіргі уақытта бруцеллездің алдын алу үшін *B. abortus* S19, RB51 вакциналары шаруашылықтарда қолданады. Аталған вакциналардың тиімділігімен қатар бірнеше кемшіліктері де бар: буаз малдың іш тастауы, вакцинацияланған сиыр сүтінің құрамында вакциндік штамдардың кездесуі, аурудың жануарлар мен адамдар арасында қайталап