



УКРАЇНА

(19) UA (11) 19077 (13) U
(51) МПК (2006)
C12N 5/00
C12N 13/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ АКТИВАЦІЇ РОЗВИТКУ IN VITRO ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ ССАВЦІВ

1

(21) a200602084
(22) 27.02.2006
(24) 15.12.2006
(46) 15.12.2006, Бюл. № 12, 2006 р.
(72) Шигимага Віктор Олександрович, Колеснікова Алла Олександрівна
(73) ІНСТИТУТ ТВАРИННИЦТВА УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

2

(57) Спосіб активації розвитку in vitro ооцит-кумулусних комплексів (ОКК) ссавців, що включає виділення ОКК, вплив електричними імпульсами і культивування in vitro, який **відрізняється** тим, що об'єктами впливу є щойно виділені ОКК, які перед культивуванням для активації їх розвитку піддають дії електричних імпульсів з енергією 0,7-2,8 мкДж безпосередньо в середовищі для виділення ОКК.

Корисна модель відноситься до біотехнології, зокрема, культивування ОКК in vitro.

Відомий спосіб одержання культури клітин тварин, що оснований на ефекті стимуляції їх проліферації ультразвуком перед пасуванням. Цей спосіб полягає у тому, що клітини нирки теляти короткочасно опромінують високочастотним ультразвуком низької інтенсивності шляхом введення до клітинної маси в суспензії ультразвукового випромінювача [а. с. СРСР №1597387 А1 С12N5/00, 1990р].

Однак, цей спосіб не може бути способом активації ОКК до завершення процесу мейозу в них, бо він власне є способом стимуляції поділу (мітозу) вже спеціалізованих клітин тканин нирки теляти. З іншого боку, при однаковому рівні прикладеної ззовні енергії клітини меншого розміру, тобто клітини тканин нирки, будуть одержувати значно більше енергії на одиницю свого об'єму, ніж великі клітини ОКК. Якщо, використовуючи дані цього способу, перерахувати енергію ультразвуку, отриману однією клітиною нирки, на об'єм одного ОКК, то для одержання того ж ефекту впливу на ОКК знадобилося б на два порядки більше значення енергії. Тому, не з'ясовано, але і не виключено, що така надмірна механічна дія ультразвуком може мати негативний вплив на генетичний апарат статевих клітин ооциту у складі ОКК, а отже і на подальший розвиток майбутнього ембріону з нього. До того ж, стимуляція суспензії клітин нирки безперервна за час дії ультразвуку, а не імпульсна, тобто ризик пошкодження клітини багаторазово зростає би в разі використання цього способу на ОКК. Можлива також і контамінація середовища

досить великим випромінювачем, який до того ж робить проблематичним індивідуальну стимуляцію поодиноких ОКК, бо працює лише у суспензії.

Відомий також спосіб культивування ооцитів корів, що складається з відбору фолікулів і виділення з них ОКК із наступним культивуванням їх у поживному середовищі з фетальною сироваткою і білковим фактором росту. У якості останнього використовують мозковий нейритстимулюючий білок (МНСБ). [а. с. СРСР №1659474 А1 С12N 5/00, 1991р.]

Однак, цей спосіб не є власне способом активації (запуску) процесу мейозу при дозріванні клітин ОКК in vitro, оскільки він переслідує іншу мету - підвищення виходу зрілих ооцитів з неущкодженим генетичним апаратом не за рахунок підвищення кількості запущених ооцитів у мейоз, а за рахунок покращення умов дозрівання ооцитів. Крім того, для здійснення цього способу необхідно одержати (виділити й очистити) необхідну кількість МНСБ, що, судячи з опису, само по собі є досить трудомістким і тривалим процесом. Останнє робить спосіб не завжди здійсненним при відсутності достатньої кількості МНСБ. Таким чином, додавання МНСБ позитивно впливає на життєздатність ооцитів у культурі і його вплив зводиться до зниження рівня дегенерації ооцитів, а тому даний спосіб не є власне способом активації розвитку ОКК.

Відомий обраний за прототип спосіб активації розвитку ооцитів тварин, який включає виділення ОКК, вплив електричними імпульсами на ооцити з подальшим їх культивуванням in vitro. Цей спосіб полягає у тому, що на ооцити, попередньо короткочасно (протягом декількох годин) прокультиво-

(13) U
(11) 19077
(19) UA

вані або дозрілі *in vitro*, діють електричним імпульсом або частіше пачкою імпульсів певної напруги, тривалості та кількості у пачці, причому, для зниження витрат енергії імпульсу на провідність буферного середовища, що містить багато солей, імпульсну активацію проводять у проміжних непровідних середовищах, що містять цукри, наприклад, сахарозу або багатоатомні спирти, наприклад, маніт в ізотонічній концентрації [Zimmermann U., Neil G.A.. Electromanipulation of cells. N.Y.: CRC Press.-1996.- 375p.].

Однак, і цей спосіб не забезпечує коректної активації (запуску мейозу) при дозріванні ОКК *in vitro*, оскільки передбачає додаткове попереднє культивування ооцитів протягом декількох годин або до завершення їх дозрівання перед імпульсною активацією. У цьому способі попереднє культивування власне і є першим природним запуском, який передувє другому штучному імпульсному, який в даному випадку порушує синхронізованість процесу мейозу у природно запущеній програмі розвитку ОКК. Крім того, цей спосіб потребує додаткових трудовитрат (маніпуляцій) по переносу клітин у проміжне непровідне середовище та кількаретовому відмиванню клітин перед ним та після нього. До того ж, не виключений неконтрольований негативний вплив на ооцити цього проміжного середовища, додаткова контамінація та ризик ушкодження або повної втрати клітини в процесі цих маніпуляцій. Стосовно величини підведеної до ооциту енергії імпульсної обробки - вона у цьому способі не встановлена і, як наслідок, не контролюється. Останнє може викликати необґрунтоване перевищення рівня припустимого впливу на ооцити імпульсним електричним полем з необоротним пробоем мембран у тому числі і ядра з різним ступенем руйнування генетичного апарату ооциту в залежності від величини підведеної ззовні енергії. Це може привести до різних генетичних аномалій, що можуть мати наслідки від небажаних мутацій та відхилень у розвитку до повного припинення розвитку ооциту.

В основу корисної моделі поставлено завдання удосконалити спосіб імпульсної активації ооцитів ссавців шляхом контрольованого підсилення природної програми розвитку щойно виділених ОКК імпульсною ініціалізацією (запуском) процесу мейозу, тобто імпульсною дією на ОКК, коли ооцит ще не зрілий і тісно пов'язаний з оточуючими його клітинами гранульози. Такий запуск, будучи більш природним, ніж у прототипі, не погрожує порушенням синхронізованості розвитку ооциту і клітин гранульози. Запропонований спосіб на відміну від відомих аналогів та прототипу передбачає вплив на щойно виділений ОКК або групу ОКК. Удосконалення способу активації забезпечується також шляхом виключення додаткового етапу маніпуляцій з ооцитами та імпульсної дії на них у непровідному середовищі, що додатково зменшує також ризик контамінації та/або втрати клітини. При цьому, рівень імпульсного впливу на ОКК при активації є контрольованим у припустимому інтервалі значень енергії, що не руйнує генетичний апарат клітини, і це є перевагою. Рівень впливу визначається дуже просто: встановлення трьох величин (у прототипі) - напруженості поля (або амплітуди ім-

пульсу), тривалості та кількості імпульсів замінюється однією універсальною характеристикою - сумарною енергією за час дії імпульсної обробки.

Поставлене завдання вирішується тим, що у відомому способі активації розвитку ооцитів, який включає виділення ОКК, вплив електричними імпульсами і культивування *in vitro*, згідно винаходу, об'єктами впливу є щойно виділені ОКК, які перед культивуванням для активації їх розвитку піддають дії електричних імпульсів з енергією 0,7-2,8 мкДж безпосередньо в середовищі для виділення ОКК.

Запропонований спосіб призначений для підвищення шляхом активації ефективності дозрівання жіночих гамет ссавців при виконанні дослідницьких та інших робіт у лабораторіях НДІ (наприклад, реконструкції ембріонів тварин, в тому числі й клонування) та інших галузях біології відтворення. Він полягає у тому, що ооцити у складі ОКК видаляються шляхом проколу антральних фолікулів яєчника у фосфатно-сольовому буфері Дюльбеко (ФСБД) з додаванням 15% фетальної сироватки теляти. Для подальшої роботи у тому ж середовищі добираються ооцити з багатошаровим компактним кумулюсом та рівномірно гранульованою цитоплазмою. Далі, безпосередньо у тому ж самому середовищі, до поодинокого ОКК або групи ОКК подають імпульсну напругу з генератора через мікроелектроди. Подача імпульсної напруги саме у такий спосіб не приводить до контамінації середовища з біоб'єктами. При цьому енергія імпульсної обробки ОКК легко визначається та контролюється по вихідній напрузі генератора, тривалості та кількості імпульсів, а також попередньо одноразово визначеній провідності середовища. Регулюючи вихідну напругу генератора, тривалість та кількість імпульсів, домагаються таких їх значень, щоб не досягти руйнівного рівня підведеної ззовні енергії, а саме, не виходячи за межі 0,7-2,8 мкДж на клітину. Причому, при підведенні енергії нижче 0,7 мкДж активація практично неефективна, а при значеннях підведеної енергії вище 2,8 мкДж починаються пошкодження генетичного апарату ооцитів. В реальних умовах зручно фіксувати вихідну напругу генератора та тривалість імпульсу, змінюючи лише їх кількість. Тоді при задалегідь відомій провідності середовища енергія визначається шляхом добутку квадрату напруги на провідність, тривалість та кількість імпульсів. Після імпульсної активації ОКК помішують у культуральне середовище для дозрівання, наприклад Waymouth MB 752/1 з добавками та здійснюють дозрівання ОКК у термостаті при фізіологічній температурі у вологій атмосфері з 5%-ним вмістом CO₂.

Приклад 1. У якості модельного об'єкту вибрані ОКК миші. Виділені та відібрані за станом кумулюсу та цитоплазми ОКК миші випадковим чином розподіляються на дослідні та контрольну групи і до початку культивування час їх перебування в ФСБД однаковий. Далі безпосередньо у цьому ж середовищі до щойно виділеного ОКК за допомогою мікроелектродів подають імпульсну напругу, звичайно 14В з тривалістю імпульсів 50 мкс, кількість змінюється від 1 до 8 імпульсів дозовано. Попередньо визначена провідність середовища ФСБД складає приблизно 70 мкСм. Шляхом добут-

ку квадрату напруги на провідність, тривалість та кількість імпульсів визначена сумарна енергія, яка становить у різних дослідних групах ОКК 0,7; 1,4; 2,8; 3,5 та 5,6мкДж на клітину. Після цього ОКК дослідних та контрольної групи культивують у середовищі Waymouth MB 752/1, доповненому бікарбонатом натрію, піруватом натрію та 15% фетальної сироватки теляти, протягом 16год. Цитогенетичний аналіз з метою визначення стану генетичного апарату ооцитів проводять за методом Тарковського. Зокрема, за отриманими даними дозрівання ОКК миші *in vitro* виявилось неефе-

ктивним застосування для активації розвитку ОКК електричних імпульсів з енергією 5,6мкДж (табл. 1). За цими даними вибрано приблизно середнє значення енергії в межах допустимої, при застосуванні якого підвищується ефективність розвитку *in vitro* ОКК та яке сприяє найбільш результативній активації, а саме 1,4мкДж.

Приклад 2. Відібрані і розподілені на дослідну та контрольну групи ОКК миші знаходяться безпосередньо у ФСБД, до ОКК дослідної групи подають імпульсну напругу з параметрами, як у прикладі 1, з кількістю імпульсів 2.

Таблиця 1

Ефективність дозрівання *in vitro* ОКК
миші в залежності від енергії імпульсної обробки, (%)

Контроль	Дослід				
	Енергія, мкДж				
	0,7	1,4	2,8	3,5	5,6
58,8	62,5	76,1	75,0	40,0	0

За цими параметрами сумарна енергія складає 1,4мкДж. Через 16год. культивування у середовищі Waymouth MB 752/1 з добавками ОКК, піддані дії електричних імпульсів, виявили у середньому 76,1%-ну ефективність дозрівання *in vitro*, в той час як у контрольній групі цей показник

склав 58,8%. Проведене *in vitro* осіменіння дозрілих ОКК цих груп показало більш високий рівень запліднення ооцитів, які піддавали дії імпульсної активації розвитку (відповідно 20,0 та 36,4%) (табл. 2).

Таблиця 2

Дослідні дані з розвитку *in vitro* ОКК миші, підданих дії найбільш результативної за ефективністю імпульсної обробки (1,4мкДж)

Номер досліду	Дозрівання, п(%)		Запліднення, п(%)	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
1	3/5(60,0)	6/9(66,7)	-	-
2	4/7(57,1)	8/9(88,9)	-	-
3	8/10(80,0)	10/12(83,3)	-	-
4	2/7 (28,6)	5/8(62,5)	0/2(0)	2/5(40,0)
5	3/5(60,0)	6/8(75,0)	1/3(33,3)	2/6(33,3)
Середнє	20/34(58,8)	35/46(76,1)	1/5(20,0)	4/11(36,4)

Запропонований спосіб активації розвитку ОКК *in vitro* шляхом контролюваного за енергією зовнішнього підсилення природної програми розвитку об'єднує переваги імпульсної електричної дії на ооцит, запропонованої в прототипі, з перевагами дії саме на щойно виділені ОКК, застосовуючи

цю дію на них безпосередньо у буферному середовищі. До того ж, запропонований спосіб надає можливість легко управляти процесом активації завдяки перевагам використання електричного принципу імпульсної дії на ОКК.