



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 52177

(13) A

(51) 6 A61D19/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ДОЗРІВАННЯ IN VITRO ООЦИТІВ КОРІВ ТА ОВЕЦЬ

(21) 2002031913

(22) 07 03 2002

(24) 16 12 2002

(46) 16 12 2002, Бюл. №12, 2002р

(72) Гевкан Іван Іванович, Мадіч Алла Всеволодівна, Чорненський Тарас Ярославович, Розгон Іван Іванович

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

(57) Середовище для дозрівання in vitro ооцитів корів та овець, що містить хлористий натрій, хлористий калій, гідрокарбонат натрію, фосфорнокислий натрій, хлористий кальцій, фенол червоний, хепес, гентаміцин, естральну сироватку, фолікуло-стимулюючий гормон (ФСГ), лютеотропний гормон (ЛГ), піруват натрію і гепарин, яке відрізняється тим, що до складу середовища додатково введені преднізолон і лізин при такому співвідношенні компонентів

NaCl	1,305 - 1,450г
KCl	0,0513 - 0,057г
CaCl ₂	0,065 - 0,072 г
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,069 - 0,077г
NaH ₂ PO ₄	0,007 - 0,008г
NaHCO ₃	0,470 - 0,522г
фенол червоний	0,0018-0,002г
хепес	0,535 - 0,595г
гентаміцин	3,6 - 4,0мкг/л
естральна сироватка	45 - 50г
ФСГ	4,5 - 5,0мкг/мл
ЛГ	4,5 - 5,0мкг/мл
Na-піруват	7,2 - 8,0мг
гепарин	4,41-4,90мкг/мл
преднізолон	0,20 - 0,60мкг/мл
лізин	18,0 - 20,0мкг/мл
вода тридистильована	до 250мл

Винахід відноситься до галузі репродуктивної біотехнології, зокрема, ядерного дозрівання ооцитів до стадії метафази II, а саме до середовищ для дозрівання ооцитів корів і овець in vitro і може бути використаний в біотехнологічних центрах, в господарствах з різними формами власності і в приватному секторі

Відоме і використовується в галузі репродуктивної біотехнології середовище для дозрівання ооцитів in vitro (1) 100мл середовища містить наступні інгредієнти

NaCl	0,8г
KCl	0,02г
CaCl ₂	0,02г
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,1г
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,006г
Глюкоза	0,1г
NaHCO ₃	0,1г

Недоліком існуючого середовища для дозрівання in vitro ооцитів є відсутність біологічно-активних речовин, що забезпечують інтенсифікацію процесів ядерного дозрівання в ооцитах

Найбільш близьким по суті до середовища, що заявляється, є середовище (2)

NaCl	1,305 - 1,450г
------	----------------

KCl	0,0513 - 0,057г
CaCl ₂	0,065 - 0,072г
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,069 - 0,077г
NaH ₂ PO ₄	0,007 - 0,008г
NaHCO ₃	0,470 - 0,522г
Фенол червоний	0,0018 - 0,002г
Хепес	0,535 - 0,595г
Гентаміцин	3,6 - 4,0мкг/л
Естральна виворотка	45 - 50г
ФСГ	4,5 - 5,0мкг/мл
ЛГ	4,5 - 5,0мкг/мл
Na-піруват	7,2 - 8,0мг
Гепарин	4,41 - 4,90мкг/мл
Вода три дистильована	до 250мл

Дане середовище забезпечує 70% ядерного дозрівання ооцитів in vitro до стадії метафази II

Недоліком цього складу середовища є відсутність в ньому речовин, що забезпечують інтенсифікацію процесів ядерного дозрівання в ооцитах

Заявлене нами середовище усуває недоліки прототипу і забезпечує попліндукторну дію на проліферативні процеси в ооцитах за рахунок наявності в заявленому середовищі додаткових біологічно-активних речовин, що проявляється в 85%-ому ядерному дозріванні ооцитів in vitro до стадії ме-

(13) A

(11) 52177

(19) UA

тафази II, в створенні оптимального збалансованого мікросередовища аналогічного умовам *in vivo*

В основу винаходу поставлено завдання розробити ефективний склад середовища для дозрівання *in vitro* ооцитів спрямованого на ефективну індукцію ядерного дозрівання *in vitro* ооцитів до стадії метафази II

Технічний результат досягають шляхом додаткового внесення до складу середовища преднізолону і лізину при такому співвідношенні інгредієнтів

NaCl	1,305 - 1,450г
KCl	0,0513 - 0,057г
CaCl ₂	0,065 - 0,072г
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,069 - 0,077г
NaH ₂ PO ₄	0,007 - 0,008г
NaHCO ₃	0,470 - 0,522г
Фенол червоний	0,0018 - 0,002г
Нерес	0,535 - 0,595г
Гентаміцин	3,6 - 4,0мкг/л
Естральна виворотка	45 - 50г
ФСГ	4,5 - 5,0мкг/мл
ЛГ	4,5 - 5,0мкг/мл
Na-піруват	7,2 - 8,0мг
Гепарин	4,41 - 4,90мкг/мл
Преднізолон	0,20 - 0,60мкг/мл
Лізін	18,0 - 20,0мкг/мл
Вода тридистильована	до 250мл

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак винаходу, який заявляється і технічним результатом, якого можна досягнути є наступним

без преднізолону неможливо

підтримувати на належному рівні водно-сольовий баланс ооцита, оскільки преднізолон виступає як сіль-затримуючий фактор і як фактор інтенсифікації проліферативних процесів в клітинах кумулюсу,

активізувати ДНК-залежну РНК-полімеразу та підвищити інтенсивність синтезу цистонних білків ядерного апарату ооцитів

без лізину неможливо

створити оптимальну концентрацію екзогенного лізину у середовищі для дозрівання *in vitro* ооцитів,

підсилити ініціацію ядерного дозрівання, за рахунок додаткового вмісту лізину в середовищі,

підсилити дію поліпептидних факторів росту клітин кумулюсу,

нормалізувати синтез цистонних білків, які забезпечують мейотичне дозрівання ооцитів до метафази II

Запропоноване середовище дозволяє забезпечити ядерне дозрівання ооцитів до стадії метафази II, підтримувати на оптимальному рівні водно-сольовий баланс ооцита та інтенсифікацію проліферативних процесів в клітинах кумулюсу, оптимальну концентрацію сумарного лізину в культуральному середовищі, підвищити ініціацію ядерного дозрівання ооцитів, підсилити дію поліпептидних факторів росту клітин кумулюсу

При проведенні патентно-інформаційного пошуку заявником і авторами винаходу знайдено технічне рішення, яке містить найбільшу кількість ознак, спільних із заявленим середовищем наявність в середовищі NaCl, KCl, NaHCO₃, NaH₂PO₄,

MgCl₂ 6H₂O, CaCl₂, фенол червоний Нерес, гентаміцин, естральна сировотка, ФСГ, ЛГ, Na-піруват, гепарин

Однак, наявність зазначених, спільних з прототипом ознак, недостатня для одержання технічного результату, який забезпечує заявлене середовище

Технічних рішень, які б за сукупністю ознак повністю співпадали із заявленим середовищем - не виявлено Це дозволяє зробити висновок про відповідність заявленого технічного рішення критерію винаходу "новизна"

В патентній і науково-технічній інформації не знайдено технічних рішень, в яких були б описані відомості про ознаки, що відрізняють заявлений винахід від прототипу і забезпечують досягнення технічного результату, - введення в середовище препаратів лізину і преднізолону при такому співвідношенні компонентів

NaCl	1,305 - 1,450г
KCl	0,0513 - 0,057г
CaCl ₂	0,065 - 0,072г
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,069 - 0,077г
NaH ₂ PO ₄	0,007 - 0,008г
NaHCO ₃	0,470 - 0,522г
Фенол червоний	0,0018 - 0,002г
Нерес	0,535 - 0,595г
Гентаміцин	3,6 - 4,0мкг/л
Естральна виворотка	45 - 50г
ФСГ	4,5 - 5,0мкг/мл
ЛГ	4,5 - 5,0мкг/мл
Na-піруват	7,2 - 8,0мг
Гепарин	4,41 - 4,90мкг/мл
Преднізолон	0,20 - 0,60мкг/мл
Лізін	18,0 - 20,0мкг/мл
Вода тридистильована	до 250мл

Отже, заявлене технічне рішення не витікає явним чином з рівня техніки, що дозволяє зробити висновок про його відповідність критерію винаходу "винахідницький рівень"

Заявлене технічне рішення належить до галузі репродуктивної біотехнології тварин, зокрема до ядерного дозрівання *in vitro* ооцитів до стадії метафази II Воно може бути застосоване як середовище для дозрівання *in vitro* ооцитів у біотехнологічних центрах, в господарствах з різними формами власності, приватному секторі і тому відповідає критерію винаходу "промислова придатність"

Таким чином, заявлене технічне рішення є новим, промислово - придатним, має винахідницький рівень, тобто відповідає всім умовам патентноспроможності винаходу згідно із ст 7 розділу II "Закону України про охорону прав на винаходи і корисну модель" №1771-111, 2002р

Середовище готують шляхом поступового розчинення вищезгаданих інгредієнтів в тридистильованій з доведенням об'єму до 250мл

Ефективність заявленого середовища і його переваги перед прототипом підтверджені прикладами конкретного виконання Середовище виготовляється в умовах стерильного боксу лабораторії клітинної інженерії УААН (м Львів) і застосовувалось в дослідному господарстві "Грядя"

Приклад 1 З мінімальним значенням інгредієнтів

NaCl	1,305г
KCl	0,051г
CaCl ₂	0,065 г
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,069г
NaH ₂ PO ₄	0,007г
NaHCO ₃	0,470г
Фенол червоний	0,0018г
Нерес	0,535г
Гентаміцин	3,6мкг/л
Естральна виворотка	45г
ФСГ	4,5мкг/мл
ЛГ	4,5мкг/мл
Na-піруват	7,2мг
Гепарин	4,41мкг/мл
Преднізолон	0,20мкг/мл
Лізін	18,0мкг/мл
Вода три дистильована	до 250мл
Приклад 2 3 середнім значенням інгредієнтів	
NaCl	1,378г
KCl	0,054г
CaCl ₂	0,068 г
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,073г
NaH ₂ PO ₄	0,008г
NaHCO ₃	0,496г
Фенол червоний	0,0019г
Нерес	0,565г
Гентаміцин	3,8мкг/л
Естральна виворотка	47,5г
ФСГ	4,75мкг/мл
ЛГ	4,75мкг/мл
Na-піруват	7,6мг
Гепарин	4,66мкг/мл
Преднізолон	0,40мкг/мл
Лізін	19,0мкг/мл
Вода тридистильована	до 250мл
Приклад 3 3 максимальним значенням інгредієнтів	
NaCl	1,450г
KCl	0,057г
CaCl ₂	0,072г
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,077г
NaH ₂ PO ₄	0,008г
NaHCO ₃	0,522г
Фенол червоний	0,002г
Нерес	0,595г
Гентаміцин	4,0мкг/л
Естральна виворотка	50г
ФСГ	5,0мкг/мл
ЛГ	5,0мкг/мл
Na-піруват	8,0мг
Гепарин	4,90мкг/мл
Преднізолон	0,80мкг/мл
Лізін	20,0мкг/мл

Вода тридистильована до 250мл

Результати спостережень за дозріванням ооцитів в умовах заявленого середовища із мінімальним, середнім і максимальним значенням інгредієнтів свідчать про те, що найбільш ефективним виявився склад середовища із середнім значенням інгредієнтів. Відсоток ядерного дозрівання ооцитів до стадії метафази II в умовах середовища із середнім значенням складу інгредієнтів становив 85% проти 84% - в середовищі із мінімальним і 84,3% із максимальним значенням складових середовища.

Одержані ооцити вміщували в стерильні чашки Петрі, дозрівали до метафази на протязі 24 годин у вищезгаданих середовищах при температурі 38,5°C з 5% CO₂. Рівень ядерного дозрівання оцінювали по наявності полярного тільця та гомогенності ооплазми ооцитів. Ефективність дозрівання ооцитів в контрольному середовищі становила 40%, в середовищі прототипа - 70%, в запропонованому середовищі - 85%. Рівень ефективності дослідних груп з ооцитами великої рогатої худоби не відрізнявся від рівня ефективності застосування вищезгаданих середовищ при роботі з ооцитами овець.

Заявлене середовище для дозрівання in vitro ооцитів успішно застосовувалось в дослідному господарстві "Гряди" і в лабораторії клітинної інженерії Інституту біології тварин.

Ефективність застосування рекомендованого середовища (%)

Кількість ооцитів вміщених в середовище	Контроль	Прото-тип	Нове середовище
ВРХ	210	320	430
овець	60	90	110
% ядерного дозрівання ооцитів до стадії метафази II	40	70	85

Джерела інформації

- 1 Справочник биохимика Р. Досон, Д. Елліот, У. Елліот, К. Джонс. Издательство "Мир", с. 374
- 2 Ergebnisse von In-vitro - Befruchtungsversuchen mit Rinderoozyten unter Berücksichtigung ihrer Entwicklungsfähigkeit nach Transfer auf Empfängertiere. Inaugural-dissertation zur Erlangung des Grades eines Doctor Medicinæ Veterinariæ Vorgelegt von Uwe R. Waldmann, Hannover 1991, s. 35 - 38

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 - 20 - 90

ТОВ "Міжнародний науковий комітет"

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 - 32 - 71