



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 62361

(13) A

(51) 7 A61D19/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ЯКОСТІ ДЕОНСЕРВОВАНИХ ЕМБРІОНІВ, ЗАМОРОЖЕНИХ НАДШВИДКИМ МЕТОДОМ

1

2

(21) 2003032130

(22) 11 03 2003

(24) 15 12 2003

(46) 15 12 2003, Бюл. № 12, 2003 р.

(72) Яремчук Ірина Митодівна, Шаловило Степан Григорович, Шаран Микола Михайлович, Пасіцький Микола Дмитрович

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

(57) Спосіб підвищення якості деонсервованих ембріонів, заморожених надшвидким методом, який включає розморожування ембріонів занурен-

ням пайет у водяну баню при кімнатній температурі з наступними 5-хвилинними витримками в середовищах з 5% розчином гліцерину і 0,5М розчином сахарози та з 0,25М розчином сахарози й культивування у культуральному середовищі, який відрізняється тим, що розморожені ембріони вміщують у культуральне середовище, в яке додатково вводять біологічно активну речовину – препарат "Філомек" у концентрації 0,19-0,21%, а культивування ембріонів здійснюють в термостаті при температурі 37°C протягом 30-45 хвилин

Винахід відноситься до галузі репродуктивної біотехнології, зокрема, до способів покращення якості деонсервованих ембріонів великої рогатої худоби, а саме до способів розмороження ембріонів, заморожених надшвидким методом. Спосіб може бути використаний у біотехнологічних центрах, племзаводах, племрепродукторах та господарствах і підприємствах, які здійснюють трансплантацію ембріонів для прискореного відтворення високопродуктивних тварин.

Відомий спосіб розморожування ембріонів (Кузнецов В.Є., автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук "Цитогенетичні аспекти розвитку in vitro доімплантаційних зародків ссавців, отриманих біотехнологічними методами", 1999р.), який включає використання середовища, що містить 0,5М розчин сахарози, в якому розморожені ембріони витримують 5 хвилин із наступним перенесенням у розчин фосфатно-сольового буфера (PBS) із 20% фетальною сироваткою теляти, після чого розморожені ембріони, для культивування, вносять у культуральне середовище.

Спосіб забезпечує 65% виживання деонсервованих ембріонів, запліднених in vitro, та біля 45% їх приживлення. Недоліком відомого способу є низька якість деонсервованих ембріонів.

Найбільш близьким по суті до способу, що заявляється, є спосіб підвищення якості ембріонів, описаний Шаловило С.Г. (автореферат дисертації

на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук "Розробка наукових і практичних методів підвищення ефективності трансплантації ембріонів у племінному скотарстві", 1996р.) Спосіб базується на використанні, при розморожуванні ембріонів, середовища, що містить 5% розчин гліцерину і 0,5М сахарози. Далі ембріони поміщають у середовище з 0,25М розчином сахарози, із наступним перенесенням їх у культуральне середовище та здійснюють трансплантацію деонсервованих ембріонів. Спосіб забезпечує 40% приживлення розморожених ембріонів.

Недоліком відомого способу є незадовільний рівень приживлення ембріонів.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки прототипу і забезпечує одержання морфологічно повноцінних розморожених ембріонів, приживлення яких у реципієнтів становить 50-65 відсотків.

В основу винаходу поставлено завдання розробити ефективний, економічно вигідний, зручний у застосуванні спосіб підвищення якості деонсервованих ембріонів, заморожених надшвидким методом, який би забезпечував одержання морфологічно повноцінних ембріонів із високим відсотком приживлення при трансплантації.

Технічний результат досягають шляхом поміщення деонсервованих відомим способом ембріонів у культуральне середовище, що містить препарат "Філомек" у концентрації 0,19-0,21% та культивуванням їх у ньому протягом 30-45 хвилин

(13) A

(11) 62361

(19) UA

у термостаті при температурі 37°C

Додавання до культурального середовища 0,19-0,21% препарату "Філомек" забезпечує 90% життєздатності деконсервованих ембріонів та 50-65% їх приживлення після трансплантації реципієнтам

Препарат "Філомек" являє собою природну субстанцію із тканин морських організмів на основі фосфоліпідів - фосфатидилхопіна й фосфатидилетаноламіна (70-80%), які у своїй структурі мають біологічно активні поліненасичені жирні кислоти. За рахунок властивостей фосфоліпідів і Ω -3 поліненасичених жирних кислот препарат "Філомек" має широкий спектр біологічної дії, зокрема, мембраностабілізуючу дію, яка дає можливість реконструювати, пошкоджені при криоконсервації, компоненти мембран клітин. Введення препарату "Філомек" у культуральне середовище забезпечує відновлення морфологічних та фізіологічних властивостей деконсервованих ембріонів та сприяє підвищенню їх приживлення після трансплантації.

При проведенні патентно-інформаційного пошуку авторами і заявником виявлено технічне рішення (прототип), що містить найбільшу кількість суттєвих ознак, спільних із заявленим способом (Шаловило С.Г., автореферат дисертації на здобуття вченого ступеня доктора сільськогосподарських наук "Розробка наукових і практичних методів підвищення ефективності трансплантації ембріонів у племінному скотарстві", 1996р.) розмороження ембріонів здійснюють зануренням пайєт з ембріонами у водяну баню при кімнатній температурі з наступним перенесенням ембріонів у середовище з 5% розчином гліцерину і 0,5М розчином сахарози на 5 хвилин та подальшим перенесенням їх у середовище з 0,25М розчином сахарози на 5 хвилин та культивування їх у культуральному середовищі. Однак, наявність зазначених, спільних із прототипом, ознак недостатня для одержання технічного результату, який забезпечує заявлений спосіб.

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

У патентній і науково-технічній інформації не знайдено технічних рішень, в яких були б описані відомості про ознаки, що відрізняють заявлений спосіб від прототипу і забезпечують досягнення технічного результату (у культуральне середовище для культивування розморожених ембріонів додають препарат "Філомек" у концентрації 0,19-0,21% і культують ембріони у термостаті при температурі 37°C протягом 30-45 хвилин). Отже, заявлене технічне рішення не випливає явним чином із рівня техніки, що дозволяє зробити висновок про відповідність його критерію винаходу "винахідницький рівень".

Заявлений спосіб відноситься до галузі репродуктивної біотехнології, зокрема, до способів покращення якості деконсервованих ембріонів, заморожених надшвидким методом і може бути використаний у біотехнологічних центрах, племзаводах, племрепродукторах та господарствах і під-

приємствах, які здійснюють трансплантацію ембріонів, і тому відповідає критерію винаходу "промислова придатність".

Таким чином, заявлене технічне рішення є новим, промисловим придатним, має винахідницький рівень, тобто відповідає всім умовам патентоспроможності винаходу відповідно до статті 7 розділу II Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі" №1771 - III, 2000р.

У господарстві, де здійснюють трансплантацію ембріонів заморожених надшвидким методом, ембріони для трансплантації готують наступним чином: ембріони, заморожені надшвидким методом, розморожують у водяній бані при кімнатній температурі. Після цього ембріони переносять у середовище з 5% розчином гліцерину та 0,5М розчином сахарози і витримують 5 хвилин. Потім ембріони поміщають у середовище з 0,25М розчином сахарози на 5 хвилин, із подальшим перенесенням ембріонів у культуральне середовище, до якого додають препарат "Філомек" у концентрації 0,2%. У цьому середовищі ембріони культують у термостаті при температурі 37°C протягом 30-45 хвилин, після чого оцінюють їх за морфологічними ознаками і трансплантують реципієнтам.

Ефективність заявленого способу, його переваги перед прототипом та визначення оптимальної дози біологічно активного препарату "Філомек", що вноситься у культуральне середовище для розморожених ембріонів підтверджено прикладами конкретного виконання способу.

В господарстві ім. Шевченка Жовківського району Львівської області проведено підготовку ембріонів, заморожених надшвидким методом, до трансплантації їх телицям-реципієнтам. Для цього було відібрано 47 ембріонів, які були поділені на 4 групи.

Ембріони I групи розморожувались за відомим способом (прототипом) із використанням при розморожуванні ембріонів середовища, що містить 5% розчин гліцерину і 0,5М сахарози з подальшим перенесенням у середовище з 0,25М сахарози та культуральне середовище.

Ембріони II, III, IV груп розморожували за новим способом із використанням у культуральному середовищі біологічно активного препарату "Філомек" для відновлення фізіологічних функцій ембріонів.

У середовище для культивування ембріонів

II групи було додано препарат у мінімальній дозі - 0,19%

III групи - у середній дозі 0,2%

IV групи - у максимальній дозі 0,21%

Життєздатність деконсервованих ембріонів культивованих у середовищах із додаванням різних концентрацій препарату "Філомек" визначали за відновленням бластопорожнини і поверненням об'ємів бластомерів у їх вихідний стан. Усі морфологічно повноцінні ембріони були пересаджені реципієнтам. Рівень приживлення ембріонів визначали ректальною діагностикою на 60-й день після трансплантації.

Результати досліджень наведені у таблиці

Таблиця

Життєздатність та функціональність деконсервованих ембріонів культивованих у різних середовищах

Показники	Групи			
	прототип I група	дослідні		
		II група (0,19% конц. Філомеку)	III група (0,2% конц. Філомеку)	IV група (0,21% конц. Філомеку)
Розморожено ембріонів, шт	11	12	12	12
Нормально розвинених після культивування, шт	9	10	11	9
Вживання ембріонів, %	81,1	83,3	91,6	75
Пересаджено ембріонів, шт	9	10	11	9
Тільних реципієнтів, гол	4	5	7	3
Приживлення, %	44,44	50,0	63,63	33,33

Культивування ембріонів у середовищі з препаратом "Філомек" значно покращило їх морфологічну характеристику, зокрема, спостерігалось плавне повернення об'ємів бластомерів у їх вихідний стан та реекспансія бластопорожнини у ранніх бластоцист. При цьому не спостерігалось морфологічних порушень.

У ембріонів першої групи, які культивувались у середовищі без вищевказаного препарату, відмі-

чалось незначне збільшення об'ємів бластомерів і часткове руйнування клітинної мембрани.

Як видно з таблиці 1, найвищий відсоток вживання деконсервованих ембріонів та приживлення їх після трансплантації, був у III групи, де у культуральне середовище для культивування було додано 0,2% концентрацію препарату "Філомек".