



УКРАЇНА

(19) UA (11) 59121 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61D 7/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ЕСТРОГЕНІВ IN VITRO

1

2

(21) u201010103

(22) 16.08.2010

(24) 10.05.2011

(46) 10.05.2011, Бюл.№ 9, 2011 р.

(72) ОСТАПІВ ДМИТРО ДМИТРОВИЧ, САЧКО
РОМАН ГРИГОРОВИЧ, МАРТИН ЮРІЙ ВОЛОДИ-
МИРОВИЧ, АКМИШИН МАР'ЯНА МИКОЛАЇВНА,
ГРАБОВСЬКА ОЛЕКСАНДРА СТЕПАНІВНА, ПИ-
ЛИПЕЦЬ АНДРІЙ ЗЕНОВІЙОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН УКРАЇНИ

(57) Спосіб отримання естрогенів in vitro, який
включає типове синтетичне середовище, клітини
гранульованого шару фолікулів, який **відрізня-**
ється тим, що середовище додатково містить ест-
русну сироватку корів, фолікулярну рідину і гепа-
рин з подальшим культивуванням 30-32 доби із
заміною через 14-16 діб 2/3 об'єму середовища
культивування.

Корисна модель належить до галузі ветерина-
рії та ветеринарної біотехнології, зокрема до
отримання гормонів (естрогенів), а саме до ком-
плексу естрадіол + прогестерон in vitro. Корисна
модель може бути використана для отримання
гормонів (естрогенів), виготовлення їх лікарських
форм і препаратів та використання у практиці ве-
теринарної медицини для стимулювання репродук-
тивної функції самок і лікування безпліддя.

Відомий біологічний спосіб отримання гормо-
нів, зокрема, естрогенів (естрадіолу, прогестерону)
та інших препаратів з гормональною та фермента-
тивною активністю для використання у клінічній
(ветеринарній) - з використанням тваринницької
сировини: гіпофіз - для отримання препаратів фо-
лікулостимулюючого гормону; сім'яники самців -
для отримання лідази, а також кров самок, в тому
числі, сироватку крові жеребих кобил - для отри-
мання препаратів з гонадотропною (фолікулости-
мулюючим та лютенізуючим гормонами) активніс-
тю (Буркат В. П. та ін. Довідник з репродуктивної
біотехнології великої рогатої худоби. Львів. - 2004.
- С. 29-30.).

Відомо також синтетичний спосіб, де прово-
дять синтез відповідних гормонів з простих хіміч-
них речовин, таких як холестерин та амінокислоти
з коротким ланцюгом („Справочник ветеринарных
препаратов применяемых в ветеринарии и живот-
новодстве" / под ред. Дидовца С. Р. - К «Урожай»,
1975 - 351 с.).

Недоліками цих способів є те, що при отри-
манні гормонів (їх препаратів) синтетичним шля-
хом необхідне високотехнологічне обладнання та
реактиви для їх синтезу, а для біологічних - необ-
хідна значна кількість тваринницької сировини та
спеціально обладнані лабораторії (цехи) для під-

готовки матеріалу, виділення та виготовлення
препаратів гормонів. Крім того, при використанні
наведених способів виготовлення препаратів гор-
монів, зокрема естрогенів, отримують тільки один
гормон.

Найбільш близьким по суті до способу, що за-
являється, є отримання естрогенів з використан-
ням клітин гранульозного шару фолікулів яєчників
корів і суміші (1:1) середовищ Дульбекко в модифі-
кації Ігла : Хем F-12 з додаванням 1 мкМ/мл анд-
ростенедіону, 1 мкМ/мл інсуліну і 0,1 % альбуміну
сироватки крові бугая. (Roberts Aj., Echternkamp S.
E. In Vitro Production of Estradiol by Bovine
Granulosa Cells: Evaluation of Culture Condition,
Stage of Follicular Development and Location of Cells
Within Follicles // Biology of Reproduction - 1994. -
51. - P. 273-282).

Однак, недовіком вказаного способу є викори-
стання для культивування клітин гранульози двох
середовищ до яких додатково додають гормона-
льні препарати та альбумін сироватки крові бугая.
Заявлений нами спосіб усуває недоліки прототипу
і забезпечує отримання комплексу естрогенів: ест-
радіол + прогестерон.

В основу корисної моделі покладено завдання
розробити спосіб, який б забезпечував отримання
комплексу естрогенів (естрадіолу, прогестерону),
усував потребу використання двох середовищ та
гормональних препаратів, необхідність постійного
пошуку і підбору тварин, зменшував час на відбір
матеріалу, додаткові витрати на зберігання та ви-
готовлення, був простий у виробництві та застосу-
ванні.

Технічний результат досягають шляхом вико-
ристання синтетичного середовища типу RPMI-
1640 (готовий продукт) та клітин гранульозного

(19) UA (11) 59121 (13) U

шару фолікулів і внесення в середовище еструсної сироватки корів, фолікулярної рідини і гепарину при такому співвідношенні компонентів (в мас.%):

клітин гранульозного шару	5-7 млн. клітин/мл,
фолікулів	8-12,
еструсної сироватки корів	10-12,
фолікулярної рідини	0,0005-0,0015,
гепарину (5 тис. од.)	синтетичне середовище
RPML-1640	до 100 %.

Клітини гранульозного шару отримують з фолікулів діаметром більше 7 мм і культивують 30 діб, з заміною 2/3 об'єму середовища культивування через 14-16 діб.

Ефективність способу ґрунтується на здатності клітин гранульозного шару синтезувати естрогени (естрадіол + прогестерон) у оптимальному співвідношенні для організму самок, а інтенсивність синтезу забезпечується складовими синтетичного середовища RPML-1640 (амінокислот, антиоксидантів, мінеральних солей, енергетичних субстратів - глюкози, пірувату, сукцинату) та доданих біологічних компонентів, які забезпечують перебіг фізіологічних процесів в клітинах гранульозного шару й синтез вказаних гормонів. Культура клітин гранульозного шару фолікулів здатна асимілювати неорганічні та органічні компоненти синтетичного середовища і синтезувати естрогени. При такому способі культивування культура клітин гранульозного шару забезпечує отримання комплексу естрогенів (естрадіол + прогестерон) і є простим біотехнологічним способом отримання комплексу гормонів, виготовлення їх лікарських форм і препаратів та використання у практиці ветеринарної медицини для стимулювання репродуктивної функції самок і лікування безпліддя.

При проведенні заявником патентно-інформаційного пошуку знайдено технічне рішення, в якому є ряд суттєвих ознак спільних із заявленим - використання біологічного способу отримання комплексу гормонів - естрогенів (естрадіолу і прогестерону) при культивуванні клітин гранульозного шару фолікулів яєчників корів (Roberts Aj., Echternkamp S.E. In Vitro Production of Estradiol by Bovine Granulosa Cells: Evaluation of Culture Condition, Stage of Follicular Development and Location of Cells Within Follicles //Biology of Reproduction - 1994. - 51. - P. 273-282)..

Однак, даних суттєвих ознак недостатньо для одержання технічного результату заявленого рішення. Технічних рішень, які б за сукупністю ознак повністю співпадали з ознаками заявленого способу отримання естрогенів *in vitro* не знайдено.

Це дозволяє зробити висновок про відповідність заявленого технічного рішення критерію корисної моделі "новизна".

В джерелах патентної і науково-технічної інформації не знайдено відомостей про способи отримання естрогенів, які б містили ознаки, що відрізняють заявлений корисну модель від прототипу: використання клітин гранульозного шару фолікулів у синтетичному середовищі RPML-1640 з введенням у склад компонентів у такому співвідношенні (в мас.%):

клітин гранульозного шару	5-7 млн. клітин/мл,
фолікулів	8-12 %,
еструсної сироватки корів	10-12 %,
фолікулярної рідини	0,0005-0,0015,
гепарину (5 тис. од.)	синтетичне середовище
RPML-1640	до 100 %.

Отже, заявлене технічне рішення не впливає явним чином з рівня техніки, що дозволяє зробити висновок про відповідність заявленого рішення критерію корисної моделі "винахідницький рівень".

Корисна модель може бути використаний в фармацевтичній галузі та ветеринарній біотехнології для виготовлення препаратів з вмістом комплексу гормонів (естрадіол + прогестерон) та практиці ветеринарної медицини для лікування й стимулювання репродуктивної функції самок сільськогосподарських тварин і тому відповідає критерію корисної моделі "промислова придатність".

Таким чином, заявлене технічне рішення є новим промисловопридатним і має винахідницький рівень, тобто відповідає всім умовам патентної спроможності корисної моделі відповідно до статті 7 розділу II Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі" (№ 1771-III, 2000 р.).

Для реалізації заявленого корисної моделі необхідно отримати клітини гранульозного шару фолікулів яєчників корів. Для цього, після забою корів, відбирають яєчники. Методом аспірації фолікулів отримують фолікулярну рідину з клітинами гранульозного шару. Шляхом центрифугування (1 тис. об. хв. протягом 15 хв.) осаджують клітини гранульози. Надосадову рідину (фолікулярну рідину) відбирають, а до осаду клітин гранульози додають середовище культивування (RPML-1640) у кількості, яка адекватна відібраній фолікулярній рідині. При дотриманні умов антисептики додаткового введення у склад середовища культивування антибіотиків та антимікотиків не доцільно. Після 14-16 добового культивування відбирають 2/3 середовища культивування. У відібраному середовищі культивування містяться продукти синтезу клітин гранульозного шару - гормони: естрадіол - 0,04-2,4 нг/мл і прогестерон - 2,0-69,6 нг/мл.

Для оцінювання ефективності заявленого способу отримання естрогенів було проведено дослід конкретного виконання рішення.

Дослід 1

На м'ясопереробному підприємстві були відібрані яєчники корів. В умовах лабораторії отримано клітини гранульозного шару з фолікулів і проведено їх культивування впродовж 60 діб. При цьому, для встановлення ефективності заявленого способу клітини гранульози розділені на дві частини. Одна частина культивована у середовищі-прототипі, інша - заявленим способом. Вміст естрогенів (естрадіолу та прогестерону) у фолікулярній рідині (0 доба культивування) та середовищі культивування через 2-3, 7-8, 14-16, 30-32 і 60 діб визначали імуноферментним методом. Встановлено, що при культивуванні клітини гранульози синтезують естрогени і виділяють їх в середовище культивування (табл. 1). Так, у

Таблиця 1

Інтенсивність синтезу естрогенів клітинами гранульозного шару фолікулів корів.

Гормони	Концентрація естрогенів, нг/мл					
	Тривалість культивування, доби					
	0	2-3	7-8	14-16	30-32	60
Прототип						
Естрадіол	1,1±0,18	0,6±0,15	0,3±0,11	0,16±0,10	0,15±0,05	-
Прогестерон	63,2±3,31	6,0±1,53	13,9±7,73	3,1±0,63	2,7±0,69	-
Заявлений спосіб						
Естрадіол	1,1±0,18	0,7±0,12	0,4±0,29	0,9±0,47	0,9±0,62	0,4±0,29
Прогестерон	63,2±3,31	8,6±2,36	15,6±7,19	11,7±9,11	4,5±1,84	60,8±4,30

фолікулярній рідині, отриманій при виділенні клітин гранульози, концентрація досліджуваних гормонів максимальна (естрадіолу 1,1±0,18 нг/мл, прогестерону - 63,2±3,31 нг/мл). Через 2-3 доби культивування вміст вказаних гормонів знижується - естрадіолу: у прототипі на 45,5 % і у заявленому способі на 36,4 % і прогестерону, відповідно, 90,6 % і 86,4 %. Збільшення тривалості культивування до 7-8 діб характеризується ще зменшенням концентрацій естрадіолу у прототипі на 50,0 % і у заявленому способі на 42,9 %, порівняно з 2-3 добовим. Після 14-16 діб культивування концентрація естрадіолу у культурі клітин з прототипом продовжує знижуватись на 46,3 % до 0,16±0,10 нг/мл, а у заявленому середовищі, навпаки, зростає на 65,6 % до 0,9±0,47 нг/мл, що майже відповідає вихідній величині (0 доба культивування).

Отже, через 14-16 діб концентрація естрадіолу при використанні заявленого на 82,2 % способу вища, ніж у прототипі. При цьому, використання заявленого способу забезпечує підвищення концентрації естрадіолу, який досягає майже вихідного рівня у фолікулярній рідині (0 доба культивування).

Концентрація прогестерону протягом 7-16 діб при використанні заявленого способу майже не змінюється і становить 11,7-15,6 нг/мл, а у прототипі - знижується на 50,0 % і на 14-16 добу становить 3,1±0,63 нг/мл, що на 83,6 % нижче величини значення при заявленому способі.

Продовження до 30-32 діб культивування заявленим способом концентрація естрадіолу у сере-

довищі культивування клітин майже не змінюється і становить 0,9±0,62 нг/мл, а прогестерону - знижується на 71,6 % до 4,5±1,84 нг/мл, у прототипі - концентрація досліджуваних гормонів не змінюється і становить, відповідно, 0,15±0,05 і 2,7±0,69 нг/мл. Ще через 30 діб (60 діб від початку культивування) при використанні заявленого способу отримання естрогенів концентрація естрадіолу знижується на 55,6 %, а прогестерону, навпаки, зростає на 92,6 %.

Отже, при використанні заявленого способу отримання естрогенів клітини гранульози доцільно культивувати 30 діб у середовищі RPMI-1640, з заміною 2/3 об'єму середовища через 14-16 діб, що забезпечує стабільну їх естроген-синтезуючу здатність.

Дослід 2

З метою отримання максимальної концентрації естрогенів вивчили залежність між тривалістю культивування та синтезом гормонів гранульозою в залежності від розміру фолікулів. Для цього на м'ясопереробному підприємстві були відібрані яйця корів. В умовах лабораторії отримано клітини гранульозного шару з фолікулів діаметром менше 7 мм та більше 7 мм і проведено їх роздільне культивування впродовж 60 діб з використанням заявленого способу отримання естрогенів.

Дослідженнями встановлено, що інтенсивність синтезу естрадіолу найвища у фолікулах діаметром більше 7 мм (табл. 2). Так, концентрація досліджуваних гормонів у фолікулярній рідині, після вилучення клітин

Таблиця 2

Інтенсивність синтезу естрогенів культурою клітин гранульози в залежності від розміру фолікула

Гормони	Розмір фолікула, мм	Концентрація естрогенів, нг/мл					
		Тривалість культивування, доби					
		0	2-3	7-8	14-16	30-32	60
Естрадіол	7<	1,1±0,22	0,6±0,14	0,6±0,40	0,3±0,02	0,2±0,04	0,1±0,03
	>7	1,3±0,11	0,9±0,18	1,1±0,39	2,3±0,75	2,4±0,62	1,1±0,49
Прогестерон	7<	62,5±3,89	7,2±1,69	18,7±10,08	2,0±0,71	5,2±2,58	56,3±3,50
	>7	67,1±3,02	12,0±6,32	9,3±2,10	5,0±1,15	2,9±1,24	69,6±5,23

гранульози, не залежно від розміру фолікула була майже однакою (0 доба). Через 2-3 доби культивування гранульоза з фолікулів більше 7 мм синтезує естрадіолу менше на 30,8 %, порівняно з 0 днем (фолікулярною рідиною). На 7-8 доби культивування клітини підвищують інтенсивність синтезу гормону на 22,2 %, а на 14-16 доби його концентрація подвоюється і становить $2,3 \pm 0,75$ нг/мл. Рівень інтенсивності синтезу естрадіолу клітинами гранульози фолікулів з діаметром більше 7 мм утримується впродовж 30-32 діб. На 60 добу досліджень інтенсивність утворення естрогену знижується до $1,1 \pm 0,49$ нг/мл.

На відміну від клітин фолікулів діаметром більше 7 мм, гранульоза фолікулів менше 7 мм через 2-3 доби культивування синтезує естрадіолу менше на 45,5 %, 14-16 діб - на 72,8 %, 30-32 доби - на 81,9 % та через 60 діб - на 90,1 %, порівняно з його концентрацією у фолікулярній рідині (0 доба).

Отже, для забезпечення максимального син-

тезу та отримання високої концентрації естрадіолу у середовищі культивування необхідно відбирати клітини гранульози з фолікулів діаметром більше 7 мм та культивувати впродовж 30-32 діб, із заміною 2/3 об'єму середовища культивування через 14-16 діб.

Концентрація прогестерону у фолікулярній рідині (0 доба) не залежно від розміру фолікулів в межах $62,5-67,1$ нг/мл, через 2-3 доби культивування клітини з фолікулів діаметром менше 7 мм знизили синтез гормону на 88,5 % та з фолікулів розміром більше 7 мм - на 82,2 %, вміст якого на 7-8 доби вірогідно не змінюється і залишається на рівні 2-3 діб.

На 14-32 доби культивування концентрація прогестерону, не залежно від розміру фолікулів, знаходиться в межах $2,0-5,2$ нг/мл, а на 60 добу культивування, зростає, у гранульозі з фолікулів менше 7 мм - на 90,8 % та з фолікулів більше 7 мм - на 95,9 %.