



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **63995** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
A61D 19/00ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ПІДГОТОВКИ ВІВЦЕМАТОК ДО ЗАЖИТТЄВОГО ВИЛУЧЕННЯ ООЦИТІВ**

1

2

(21) u201104096

(22) 05.04.2011

(24) 25.10.2011

(46) 25.10.2011, Бюл.№ 20, 2011 р.

(72) ЛОБАЧОВА ІРИНА ВІКТОРІВНА

(73) ІНСТИТУТ ТВАРИННИЦТВА СТЕПОВИХ РА-
ЙОНІВ ІМ. М. Ф. ІВАНОВА "АСКАНІЯ-НОВА" НАА-
НУ - НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ СЕЛЕКЦІЙНО-
ГЕНЕТИЧНИЙ ЦЕНТР З ВІВЧАРСТВА

(57) Спосіб підготовки вівцематок до зажиттєвого вилучення ооцитів, який включає введення у піхву вагінальних песаріїв, що містять препарат гестагенної дії, який **відрізняється** тим, що перед введенням песаріїв з гестагеном тваринам вставляють у піхву на строк 6 діб поролонові губки, до яких додана речовина епінефрин у кількості 20-30 мг, а при введенні песаріїв з гестагеном вівцям внутрішньом'язово ін'єктують препарат естрогенної дії у дозі 2-3 мг.

Корисна модель належить до сільського господарства, зокрема до відтворення певних генотипів овець шляхом трансплантації ембріонів, які отримують після культивування ооцитів *in vitro*. Корисна модель використовується при підготовці вівцематок до зажиттєвого вилучення ооцитів.

Культивування ооцитів *in vitro* є біотехнологічним методом одержання ембріонів для наступної трансплантації тваринам-реципієнтам. Існує два способи вилучення ооцитів із яєчників - постмортальний і зажиттєвий. За другим способом тварина-донор не усувається із процесу природного відтворення, а за рахунок проведення серії процедур з вилучення кількості ооцитів, яку можна отримати від неї протягом певного періоду, сягає кількох десятків.

Відомий спосіб використання вівцематок, за яким тварин піддають серійній процедурі зажиттєвого лапароскопічного вилучення ооцитів без попередньої додаткової стимуляції (Kuhholzer B. et al, Theriogenology, 48: 545-550 (1997); Berlinguer F. et al., Theriogenology, 61:1477-1486 (2004); Morton K.M. et al., Repr. Dom. Anim., 40:422-428 (2005)). Недоліком даного способу є мала кількість і низька якість вилучених ооцитів, а також погіршення результативності вилучення зі зростанням порядкового номеру аспірації.

Ооцити одержують шляхом аспірації антральних фолікулів, кількість останніх залежить від стадії статевого циклу, сезону року і індивідуальних особливостей тварини. Встановлена позитивна кореляція здатності ооцитів до наступного розвитку з діаметром фолікула, з якого ооцит вилучають

(Pavlok A. et al., Mol. Repr. Dev., 35:233-243 (1993)). Для збільшення діаметра фолікулів і, відповідно, якості аспірованих з них ооцитів тварин-донорів піддають попередній штучній стимуляції. Вівці належать до тварин з сезонним типом відтворення, що проявляється зменшенням інтенсивності фолікулогенезу в їх яєчниках і позначається на якості вилучених ооцитів. Тому в анаестральний період додаткова стимуляція є необхідним і вимушеним заходом.

Найбільш розповсюдженим є застосування гонадотропних гормонів, які діють безпосередньо на клітинні структури яєчників і стимулюють розвиток антральних фолікулів. До таких гормонів належать фолікулостимулюючий (ФСГ) і лютеїнізуючий (ЛГ) гормони, місцем синтезу яких є передня доля гіпофізу, і гонадотропін сироватки жеребної кобили (ГСЖК), джерелом якого є хоріонічна оболонка плоду. Використання гонадотропних гормонів суміщають з застосуванням гестагенів, обробка якими передуює введенню гонадотропінів, а також з гонадотропін-релізінг факторами. До таких способів належать: спосіб, за яким тварин за попередньою гестагенізацією піддають одноразовій обробці фолікулостимулюючим гормоном (ФСГ) у дозі, яка залежить від маси тварини (Valasi I. et al, Repr. Dom. Anim., 42:230-237 (2007)); спосіб, за яким тварин за попередньою гестагенізацією піддають одноразовій або багаторазовій обробці визначеною дозою ФСГ і ГСЖК (Ptak G. et al., Biol.Repr., 69:278-285 (2003); Gibbons A. et al., Repr. Fert. Dev., 18:244-245 (2005); Gibbons A. et al., Repr. Dom. Anim., 42:423-436 (2007)); спосіб, за яким

(13) **U**(11) **63995**(19) **UA**

через 12-14 діб від початку дії песаріїв тваринам одноразово або чотирма ін'єкціями ін'єктують визначені дози ФСГ і ЛГ (Baldassarre H. et al., *Theriogenology*, 45:707-717 (1996)); спосіб, за яким через 7 діб від початку гестагенізації тварин піддають обробці ЛГ-Рг, а починаючи з 10-ї доби - 8-разовим ін'єкціям ФСГ з 12-годинним інтервалом (Berlinguer F. et al., *Theriogenology*, 65:1099-1109(2006)).

Недоліками вищенаведених способів є їх висока собівартість з причини використання вартісних препаратів ФСГ, ЛГ і ЛГ-Рг, а також необхідність багаторазових ін'єкцій препарату ФСГ з причини його короткого періоду розкладу в організмі.

Відомий спосіб підготовки вівцематок до серійних операцій з вилучення ооцитів, за яким тварин за 48 годин до аспірації піддають одноразовій обробці ГСЖК у дозі 1500 ІО, а відразу після вилучення ооцитів ін'єктують антисироватку до ГСЖК для попередження негативного впливу пролонгованої дії гонадотропіну. Вказана схема дозволяє ефективно використовувати вівцематок протягом 10 тижнів з інтервалом між аспіраціями 7 діб (Stangl M. et al., *Theriogenology*, 52:709-716 (1999)). Перевагою способу є зменшення кількості ін'єкцій, недоліком - необхідність використання вартісної антисироватки.

Головною метою попередньої стимуляції вівцематок при зажиттєвому вилученні ооцитів є прискорення розвитку існуючих і формування додаткових фолікулів в яєчниках. Способи, які сприяють посиленню фолікулогенезу, можуть вважатися аналогами способів підготовки тварин до операцій з зажиттєвого вилучення ооцитів.

Відомий спосіб покращення якості розвитку ооцитів в яєчниках, за яким тварин піддають обробці препаратами ретинолу (Заявка на патент US 20020028849). Недоліком способу є його недостатня ефективність.

Відомі способи стимуляції фолікулогенезу, які передбачають сумісне або поодинокі використання гестагенів і гонадотропних гормонів, зокрема: спосіб, за яким тварин піддають тривалій обробці гестагенами з наступною обробкою ЛГ-Рг або його аналогами у дозах, ефективних для індукції овуляції (Патент US 4673665); спосіб, за яким передбачається застосування ЛГ або його аналога - хоріонічного гормону людини з/без додаткового використання ФСГ (Патент US 7151083); спосіб, за яким тварин піддають обробці природним або рекомбінантним ФСГ у достатній загальній дозі протягом 3-5 діб з/без додаткового застосування синхронізуючого агента і з/без додаткового застосування перед, під час або після початку введення ФСГ препарату ЛГ (Заявка на патент WO 1987006466); спосіб, за яким тваринам у певний день ін'єктують одноразово або багаторазово антагоніст до ЛГ-Рг з наступною обробкою ЛГ, ЛГ-Рг, агоністом ЛГ-Рг або хоріонічним гонадотропіном людини (Заявка на патент US 20050049200). Недоліками цих способів є непередбачуваність результативності стимуляції, висока вартість обробки.

Вівці належать до тварин з сезонністю статеві активності, спадання якої припадає на весняні місяці. У цей час проліферативна активність яєчників гальмується. Основну роль у сезонній регуляції статевої активності у овець відводять гормону мелатоніну (Kennaway D.J. et al., *Endocrinol.*, 110:1766-1772 (1982); Woodfill C. et al., *J. Biol. Rhythms*, 7: 1-11 (1992); Malpaux B. et al., *Repr. Nutr. Dev.*, 39:355-366 (1999)). Відомі способи стимуляції проліферації у овець, за якими тварин піддають обробці препаратом мелатоніну (Патент AU 7291587) або його антагоністів (Патент US 4880826). Недоліками даних способів є їх недостатня ефективність, значна тривалість обробки, що унеможливорює серійність операцій з вилучення ооцитів. Відомий спосіб стимуляції проліферації яєчників овець шляхом скорочення тривалості світлового дня (Yeates N.T.M., *Nature*, 160:4065 (1947)). Необхідною умовою такого способу є створення 5-годинного перепаду між початковою і кінцевою довжиною освітлення. Недоліком способу є непрогнозованість результатів, необхідність залучення великих приміщень, значна тривалість підготовки, що унеможливорює його використання в схемах підготовки овець до зажиттєвого вилучення ооцитів.

Суттєвий вплив на репродуктивні функції справляє нервова система, зокрема, її вегетативна частина. Остаточні механізми реалізації її дії не з'ясовані. Відомо, що обробка адренкортикотропним гормоном двічі на добу протягом 5,5 днів сприяє підвищенню рівня фолікулостимулюючого гормону в крові баранів і покращує реакцію на введення ЛГ-Рг, а також знижує концентрацію ЛГ в анастральний період (Mohamed F.H.A., Cox J.E., *Theriogenology*, 29:859-865 (1988)). Тож, можна припустити, що вплив нервової системи опосередковується зміною концентрації гонадотропних гормонів в організмі і чутливості до них. Відомі способи посилення фолікулогенезу за рахунок впливу на окремі ланки нервової системи, зокрема: спосіб, за яким стимуляція формування додаткових фолікулів і корекція статевої активності і запліднювальної здатності самиць ссавців досягається за рахунок зміни співвідношення активності ланцюгів вегетативної нервової системи (ВНС) шляхом ініціювання зміни співвідношення загальної або місцевої активності симпатикотропного і ваготропного ланцюгів ВНС електричною стимуляцією нервових центрів

ВНС або множинною ін'єкцією фармакологічних препаратів, до яких належать епінефрин, норепінефрин, опіюїди, альфа- і бета-агоністи, преднізолон, ангіотензини, блокатори натрієвих та магнієвих каналів, кокаїн, амфітамін, ефедрин, допамін, допутамін та інші (Заявка на патент US 20050143788); спосіб, за яким ініціювання фолікулогенезу в яєчниках досягається обробкою тварин інгібітором моноамінооксидази (Заявка на патент WO 2002005805), яка відповідна за розщеплення адреналіну і норадреналіну в організмі; спосіб, за яким тварин піддають обробці інгібітором фосфодіестерази з або без додаткового застосування малих доз ФСГ (Патент US 7153824); спосіб, за яким нормалізація статевої функції відбувається

за рахунок електричного подразнення нервів і окремих органів, що стимулює і модулює продукцію відповідних гормонів (Патент US 7623924). Недоліками даних способів є мала прогнозованість дії, необхідність використання вартісного препарату, необхідність багаторазових ін'єкцій або вживлення електродів в організм для забезпечення перманентності подразнення.

Відомий спосіб, за яким репродуктивні функції тварин стимулюють за рахунок імуностимуляції, яку здійснюють шляхом обробки тварин препаратами клітинної стінки мікобактерій (Патент EP 0714305). Недоліком способу є складність приготування препарату, вимоги до його чистоти.

Мало відомо про природу чинників, які визначають компетентність ооцитів тварин до наступного розвитку і овуляції. На роль найбільш ймовірно висувається відповідність концентрації стероїдів у фолікулярній рідині (Moog et al., JEEM, 56:319-335 (1980)). Відомий спосіб, за яким стимулювання фолікулогенезу здійснюють за допомогою одного з препаратів, до яких належать прогестерон, естроген, простагландин або їх аналоги, які використовують в твердій або рідкій формі і які вводять в організм за допомогою пристроїв, які сприяють вільному або під зусиллям, або контролюваному введенню (Заявка на патент WO 2003065924). Недоліком способу є недостатня ефективність, непрогнозованість прояву стимулюючого ефекту.

Аналогом винаходу, який вибраним за прототип, є спосіб, за яким вівцематок в анестральний період піддають обробці вагінальними песаріями з гестагеном (норгестомет) протягом 7-14 діб. Зажиттєве вилучення ооцитів проводять на наступну добу після вилучення песаріїв. Перевагою такого способу підготовки є його низька собівартість і простота, недоліком - низький показник вилучуваності ооцитів, недостатня якість останніх, необхідність додаткових обробок при повторних аспіраціях, значне зниження кількості вилучених ооцитів зі зростанням порядкового номеру аспірації. Додаткова обробка вівцематок препаратом ФСГ сприяє покращенню результатів вилучення, але знижує економічну ефективність робіт (Stenbak T.K. et al., Theriogenology, 56:51-64(2001)).

Задачею корисної моделі є збільшити кількість антральних фолікулів на яєчниках вівцематок на момент зажиттєвого вилучення ооцитів, спростити схему підготовки тварин за рахунок зменшення кількості маніпуляцій з тваринами, зменшити загальну вартість підготовки за рахунок виключення використання вартісних препаратів, попередити зниження кількості і якості вилучених ооцитів при повторних аспіраціях.

Поставлена задача вирішується тим, що перед обробкою тварин гестагенами проводять зміну місцевого співвідношення активності симпатикотропного і ваготропного ланцюгів вегетативної нервової системи для імітування природного відновлення статеві активності у овець напередодні парувального сезону, а під час введення вагінальних песаріїв з гестагеном тварин обробляють препаратом естрогенної дії для посилення проліферації епітеліального шару яєчників. Зажиттєве вилучення ооцитів проводять триразово через

певні проміжки часу без будь-якої додаткової обробки.

Для вирішення задачі були проведені відповідні дослідження. У ході цих досліджень встановлено, що обробка вівцематок у анестральних період препаратом епінефрин, який вводили у піхву у складі поронозових губок (5-30 мг/тварину), обумовлює посилення інтенсивності фолікулогенезу в яєчниках, що позначається збільшенням кількості наявних антральних фолікулів на 10-30 % на 10 добу після вилучення губок. Стимулюючий ефект епінефрину був більшим при дозі останнього 20-30 мг і проявлявся лише в анестральний сезон, тоді як в естральний період його дія була різноякісною. Підвищення дози епінефрину вважали недоцільним з можливості місцевого некрозу тканин піхви під впливом високих доз катехоламінів. Також було виявлено, що додаткова обробка тварин препаратом естрогенної дії у дозі 2-3 мг на початку гестагенізації сприяла збільшенню відсотку тварин, у яких при зажиттєвому вилученні ооцитів отримували епітеліальні клітини яєчників з доброю війчастою активністю, які є необхідним компонентом культурального середовища зажиттєве вилучення ооцитів і морфологія яких корелує зі здатністю ооцитів до наступного розвитку. Позитивний вплив естрогенів пов'язували зі стимуляцією розвитку фолікулів (Hulshof S. et al., Theriogenology, 44:217-226 (2005)), а також проліферації епітеліальних клітин яєчників (Bai W. et al., In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim., 36:657-666 (2000); Gaytan M. et al., Reprod., 129:311-321 (2005); Perniconi S.E. et al., Clinics, 63(3): 381-388 (2008)), які можуть бути одним з джерел епітеліального фактору росту, для якого показано позитивний вплив на синтез гонадотропінів (Murray J.F. et al., J.Endocrinol., 137:253-264 (1993)) та розвиток ооцитів і фолікулів (Goff Ak. et al., Repr. Dom. Anim., 36:19-24 (2001); Jy-Young Park et al., Science, 303:682-684 (2004); Andrade E. et al., Vet. Med. Int., 2011 (2011)).

На основі результатів досліджень розроблено спосіб підготовки вівцематок до зажиттєвого вилучення ооцитів, який включає послідовно: введення у піхву на строк 6 діб поронозових губок, до яких додано препарат нейротропної дії епінефрин у дозі 20-30 мг, внутрішньом'язову ін'єкцію препарату естрогенної дії у дозі 2-3 мг, введення у піхву вагінальних песаріїв, які містять препарат гестагенної дії. Строк дії песаріїв з гестагеном становить 10-12 діб, зажиттєве вилучення ооцитів проводять на 2-3-ю, 12-у і 24-у добу після вилучення песаріїв з гестагеном без будь-яких додаткових обробок.

Для визначення ефективності пропонованого способу вівцематок у весняні місяці піддали обробці за двома схемами - дослідною (розроблена схема) і контрольною (схема обробки за прототипом, без додаткового застосування ФСГ). У тварин дослідної групи обробці гестагеном передувала 6-денна дія вагінальних поронозових губок (1,5×1,5×2,5 см), всередину яких додавали 20 мг епінефрину («Sigma», E1635), після якої тваринам внутрішньом'язово вводили по 2 мл препарату «Фолікулін», який містить 0,1 % діючої речовини

естрону. Для наступної 10-12-денної гестагенізації використовували вагінальні песарії з кронолоном

(30 мг, «Intervet»). Узагальнені результати досліджень наведені у таблицях 1 і 2.

Таблиця 1

Схема обробки	Порядковий номер аспірації	n	Кількість вилучених ооцитів, шт./гол.	
			всього	придатних до культивування
дослідна	перша	3	13,67±2,16	11,67±2,04
	друга	3	7,00±2,83	5,67±3,19
	третя	3	10,67±1,08	8,67±2,27
	за три разом	9	31,33±5,49	26,00±6,12 ^a
контрольна	перша	3	10,33±2,68	8,00±1,87
	друга	3	8,00±1,87	5,67±1,47
	третя	3	3,76±1,47	2,33±0,41
	за три разом	9	22,00±4,95	14,33±1,78 ^b

Таблиця 2

Схема обробки	Порядковий номер аспірації	n	Досягли стадії метафаза 2, %
дослідна	перша	35	77,14
	друга	17	64,71
	третя	25	68,0
контрольна	перша	19	68,42
	друга	16	37,5
	третя	7	42,86

За показниками кількості антральних фолікулів на поверхні яєчників, вилучених ооцитів, і їх здатності до подальшого розвитку підготовка вівцематок за пропонуваним способом сприяє посиленню інтенсивності фолікулогенезу і збільшенню загальної кількості вилучених ооцитів, попереджає зниження інтенсивності фолікулогенезу протягом періоду використання тварин, а також збільшує

здатність вилучених ооцитів до наступного розвитку (за показником досягнення стадії метафаза 2 після культивування поза організмом) на 13 % при першому вилученні, на 72 % - при другому і на 61 % - при третьому. Схема обробки не передбачає використання вартісного препарату ФСГ, а також додаткових обробок перед другою і третьою аспіраціями.