



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **79068** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 5/145 (2006.01)
A61D 19/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 11670	(72) Винахідник(и): Остаповець Лариса Іванівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 09.10.2012	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН НААН,
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.04.2013	вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., 08321 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2013, Бюл.№ 7	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧНИХ ЕМБРІОНІВ СВИНЕЙ IN VITRO

(57) Реферат:

Спосіб одержання партеногенетичних ембріонів свиней in vitro включає культивування ооцитів-кумуляюсних комплексів in vitro, вилучених із яєчників, подальшу їх партеногенетичну активацію та культивування сформованих ембріонів in vitro. Партеногенетичну активацію проводять 7% розчином етанолу у фосфатно-сольовому розчині Дюльбекко протягом 7 хвилин із 0,075 мг/мл канаміцин сульфату та 10% сироватки крові корів. Після чого подальше культивування ембріонів здійснюють в середовищі NCSU-23.

UA 79068 U

Корисна модель належить до репродуктивної біотехнології, зокрема до одержання партеногенетичних ембріонів свиней *in vitro* і може бути використана в експериментальній ембріології та ембріотехнологіях, складовою частиною яких є одержання партеногенетичних ембріонів, а саме в дослідницьких роботах лабораторій з репродуктивної біотехнології.

Одержання партеногенетичних ембріонів *in vitro* дозволяє більш повноцінно підійти до вирішення проблем генетики розвитку, які пов'язані з питаннями раннього ембріогенезу ссавців. Використання бластомерів партеногенетичних ембріонів у процесі формування химерних організмів може слугувати моделлю для дослідження механізмів ініціації ембріонального розвитку, аналізу функцій генів, а саме визначення відмінностей функціонування чоловічого та жіночого геномів протягом раннього ембріогенезу. Питання щодо використання партеногенетичних ембріонів як джерела ембріональних стовбурових клітин для терапевтичного клонування є передумовою для вирішення проблем, які пов'язані з одержанням стовбурових клітин людини в методичному та морально-етичному аспекті. Також використання партеногенетичної активації ооцитів свиней, дозрілих *in vitro*, як тест-системи дає можливість комплексно підійти до питання визначення біологічної повноцінності ооцитів, оптимізації умов їх дозрівання та культивування ембріонів, сформованих після запліднення ооцитів *in vitro*. Успішність проведення генетико-ембріологічних досліджень з одержання партеногенетичних ембріонів ссавців залежить від того, наскільки досконалим є маніпулювання з ооцитами *in vitro* від моменту одержання незрілих гамет до їхньої партеногенетичної активації та культивування ембріонів.

Відомий спосіб одержання партеногенетичних ембріонів свиней *in vitro*, який полягає в культивуванні у середовищі TC 199 з додаванням 10 % фетальної сироватки теляти, 5 % фолікулярної рідини свиней та гормонів (естрадіолу-17 β , хоріогонадотропіну та фолікулостимулюючого гормону), з наступною партеногенетичною активацією 7 %-вим розчином етанолу та циклогексаміду протягом 7 хвилин і культивуванням в модифікованому середовищі Witten's протягом 72 годин [1].

Основним недоліком даного способу є те, що він не забезпечує одержання партеногенетичних ембріонів свиней на більш пізніх стадіях доїмплантаційного розвитку. Тільки у 28,0 % ооцитів спостерігаються ознаки дроблення та ембріони перебувають на 4-6-клітинній стадії. Крім того, умови дозрівання ооцитів свиней потребують використання різних гормонів та інших органічних добавок.

Поставлена задача вирішується тим, що включає культивування ооцитів-кумулюсних комплексів *in vitro*, вилучених із яєчників, подальшу їх партеногенетичну активацію та культивування сформованих ембріонів *in vitro*, згідно з корисною моделлю, партеногенетичну активацію проводять 7 % розчином етанолу у фосфатно-сольовому розчині Дюльбекко протягом 7 хвилин із 0,075 мг/мл канаміцин сульфату та 10 % сироватки крові корів, після чого подальше культивування ембріонів здійснюють в середовищі NCSU-23.

Позитивним технічним результатом заявленого способу є те, що він дозволяє одержати більшу кількість партеногенетичних ембріонів свиней *in vitro* на доїмплантаційних стадіях розвитку.

Заявлений спосіб застосовується наступним чином. Яєчники свиней, відібрані після забою, поміщають у термос із теплим стерильним фізіологічним розчином (+30-33 °C), доставляють у лабораторію протягом 1,5-2 годин після забою. Доставлені в лабораторію яєчники не менше трьох разів відмивають у стерильному фосфатно-сольовому розчині Дюльбекко, який містить 0,075 мг/мл канаміцин сульфату. Ооцит-кумулюсні комплекси виділяють із антральних фолікулів (діаметром 2-6 мм) шляхом розсікання стінки фолікулів. Розсікання стінки фолікулів проводять лезом скальпеля в чашці Петрі, яка містить 5-10 мл середовища TC 199 з 25 мМ буфером Нерес із 0,075 мг/мл канаміцин сульфату та 10 % інактивованої нагріванням (+56 °C, 30 хвилин) сироватки крові корів. Відібрані за морфологічними ознаками ооцит-кумулюсні комплекси свиней спочатку відмивають у 6 каплях середовища TC 199 з 25 мМ буфером Нерес, яке містить 0,075 мг/мл канаміцин сульфату та 10 % сироватки крові корів, а потім у 3 каплях середовища TC 199 на розчині Ерла із 20 % інактивованої нагріванням (+56 °C, 30 хвилин) еструсної сироватки крові корів, 0,11 мг/мл пірувату натрію, 0,1 мг/мл глютаміну, 0,068 мг/мл канаміцин сульфату. Після цього ооцити культивують в 4-х лункових планшетах (по 25-30 клітин на 1 мл) у середовищі TC 199 на розчині Ерла, яке містить 20 % еструсної сироватки крові корів, 0,11 мг/мл пірувату натрію, 0,1 мг/мл глютаміну, 0,068 мг/мл канаміцин сульфату та 3-5 $\times 10^6$ клітин гранульоми на 1 мл середовища.

Після дозрівання *in vitro* ооцит-кумулюсні комплекси свиней перед проведенням активації повністю звільняють від клітин кумулюсу піпетуванням мікропіпеткою діаметром 0,20 мм. Партеногенетичну активацію ооцитів свиней, звільнених від клітин кумулюсу, 7 %-м розчином

етанолу протягом 7 хвилин у фосфатно-сольовому розчині Дюльбекко із 0,075 мг/мл канаміцин сульфату та 10 % сироватки крові корів. Після чого ооцити спочатку відмивають у 6 каплях фосфатно-сольового розчину Дюльбекко із 0,075 мг/мл канаміцин сульфату, 10 % сироватки крові корів без етанолу, а потім в 2-3 каплях середовища NCSU-23 [2] для культивування ембріонів. Культивування ооцит-кумулясних комплексів та партеногенетичних ембріонів проводять при +38,8 °С, 4 % CO₂ (рН на рівні 1,2-7,4) та максимальній вологості. Активовані до партеногенетичного розвитку ооцити формують ембріони на різних стадіях ембріонального розвитку (табл.), включаючи ранню морулу.

Таблиця

Ефективність партеногенетичної активації ооцитів свиней in vitro				
Кількість активованих ооцитів	Кількість ембріонів на стадії			
	всього, n (%)	2-4-клітинний, n (%)	5-2-клітинний, n (%)	16-32-клітинний, n (%)
111	83	32	41	10
	(74,8±4,12)	(28,8±4,30)	(37,0±4,60)	(9,0±2,72)

Джерела інформації:

1. Щегельская Е. А. Партеногенетическая активация яйцеклеток свиньи этанолом и циклогексимидом на метафазе II / Е. А. Щегельская, О. В. Пакулова // Теория и практика племенного дела в животноводстве: матер. междунар. науч.-практ. конф. - Х., 1996. - С. 73-74.
2. Petters R. M. Culture of pig embryos / R. M. Petters, K. D. Wells // Journal of reproduction and fertility. Suppl.-1993. - Vol. 48. - P. 61-73.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання партеногенетичних ембріонів свиней in vitro, що включає культивування ооцитів-кумулясних комплексів in vitro, вилучених із яєчників, подальшу їх партеногенетичну активацію та культивування сформованих ембріонів in vitro, який **відрізняється** тим, що партеногенетичну активацію проводять 7 % розчином етанолу у фосфатно-сольовому розчині Дюльбекко протягом 7 хвилин із 0,075 мг/мл канаміцин сульфату та 10 % сироватки крові корів, після чого подальше культивування ембріонів здійснюють в середовищі NCSU-23.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601