



(51) МПК
G09B 23/28 (2006.01)
A61D 19/00 (2006.01)
A61K 31/57 (2006.01)
A61K 31/5575 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61D 19/00 (2021.08); A61K 31/57 (2021.08); A61K 31/5575 (2021.08); G09B 23/28 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2021112690, 30.04.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.04.2021

Дата регистрации:
06.12.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.04.2021

(45) Опубликовано: 06.12.2021 Бюл. № 34

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
 Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Цуриковой
 Н.Д.

(72) Автор(ы):

Покровский Владимир Михайлович (RU),
 Патраханов Евгений Александрович (RU),
 Покровский Михаил Владимирович (RU),
 Лебедев Петр Романович (RU),
 Белашова Анастасия Викторовна (RU),
 Архипов Иван Сергеевич (RU),
 Карагодина Анастасия Юрьевна (RU),
 Пученкова Олеся Андреевна (RU),
 Голиусов Артем Иванович (RU),
 Нагих Андрей Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Белгородский государственный
 национальный исследовательский
 университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2076593 C1, 10.04.1997. RU
 2704270 C1, 25.10.2019. ИВАНОВ Ю.Н. и др.
 ИССЛЕДОВАНИЯ СИНХРОНИЗАЦИИ
 ПОЛОВОГО ЦИКЛА У САМОК СЕРОЙ
 КРЫСЫ (*RATTUS NORVEGICUS*) ПРИ
 СОВМЕСТНОМ СОДЕРЖАНИИ /
 Вавиловский журнал генетики и селекции,
 2011, т. 15, N 1, стр. 35-44. КЛОЧКОВ Д.В. и
 др. СЕЛЕКЦИЯ НА УСИЛЕНИЕ
 КАТАТОНИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ
 КРЫС, ПОЛОВАЯ ФУНКЦИЯ И (см.
 прод.)

(54) Способ синхронизации эстрального цикла у самок мышей в эксперименте

(57) Реферат:

Изобретение относится к экспериментальной фармакологии и может быть использовано для коррекции эстрального цикла у самок мышей для дальнейшего изучения различных патологий беременности и постнатального периода у человека и сельскохозяйственных животных. Способ синхронизации эстрального цикла у самок

мышей в эксперименте заключается в том, что осуществляют внутримышечное введение самкам мышей суспензии на основе прогестерона в дозе 4,5 мг/100 г вне зависимости от фазы эстрального цикла. Далее вводят через 6 суток простагландин F2a в дозе 0,083 мг/100 г. Изобретение позволяет осуществлять гормон-регулирующую

синхронизацию овуляторного цикла у самок мышей и получить большее количество оплодотворенных особей в запланированные

сроки с минимальной погрешностью в дате родов и, как следствие, большее количество экспериментальных животных. 1 пр., 3 табл.

(56) (продолжение):

СИНХРОНИЗАЦИЯ ЭСТРАЛЬНОЙ ЦИКЛИЧНОСТИ / ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ, 2012, т. 16, N 4/2, стр. 1025-1031. PALARES P. et al. A new method for induction and synchronization of oestrus and fertile ovulations in mice by using exogenous hormones / *Laboratory Animals*, 2009; 43, pages 295-299.

R U 2 7 6 1 1 3 7 C 1

R U 2 7 6 1 1 3 7 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G09B 23/28 (2006.01)
A61D 19/00 (2006.01)
A61K 31/57 (2006.01)
A61K 31/5575 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61D 19/00 (2021.08); A61K 31/57 (2021.08); A61K 31/5575 (2021.08); G09B 23/28 (2021.08)(21)(22) Application: **2021112690, 30.04.2021**(24) Effective date for property rights:
30.04.2021Registration date:
06.12.2021

Priority:

(22) Date of filing: **30.04.2021**(45) Date of publication: **06.12.2021** Bull. № 34

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Tsurikovoj N.D.**

(72) Inventor(s):

**Pokrovskij Vladimir Mikhajlovich (RU),
Patrakanov Evgenij Aleksandrovich (RU),
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),
Lebedev Petr Romanovich (RU),
Belashova Anastasiya Viktorovna (RU),
Arhipov Ivan Sergeevich (RU),
Karagodina Anastasiya Yurevna (RU),
Puchenkova Olesya Andreevna (RU),
Goliusov Artem Ivanovich (RU),
Nagikh Andrej Sergeevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**(54) **METHOD FOR SYNCHRONIZING THE ESTROUS CYCLE IN FEMALE MICE IN EXPERIMENT**

(57) Abstract:

FIELD: experimental pharmacology.

SUBSTANCE: invention relates to experimental pharmacology and can be used to correct the estrous cycle in female mice for further study of various pathologies of pregnancy and postnatal period in humans and farm animals. The method for synchronizing the estrous cycle in female mice in the experiment is that the female mice are intramuscularly injected with a suspension based on progesterone at a dose of 4.5 mg/100 g, regardless of the phase of the

estrous cycle. Then, 6 days later, prostaglandin F2a is administered at a dose of 0.083 mg/100 g.

EFFECT: invention makes it possible to carry out hormone-regulating synchronization of the ovulatory cycle in female mice and to obtain a larger number of fertilized individuals at the planned time with a minimum error in the date of birth and, as a consequence, a larger number of experimental animals.

1 cl, 1 ex, 3 tbl

Изобретение относится к экспериментальной фармакологии и может быть использовано для коррекции эстрального цикла у самок мышей для дальнейшего изучения различных патологий беременности и постнатального периода у человека и сельскохозяйственных животных.

5 В настоящее время, увеличивается темп работы лабораторий, основным модельным организмом которых являются мыши различных линий. В связи с чем всё более актуальной становится необходимость в создании эффективного и экономически менее затратного способа получения экспериментальных животных, в частности мышей.

Известно применение простагландина F2 α , который способствует овуляции у телок 10 препубертатного возраста (C.E.P. Leonardi L.F.M., Pfeifer M.I.B., Rubin J., Singh R.J., Mapletoft G.A., Pessoa A.M., Bairy C.A.M. Silva. Prostaglandin F2 α promotes ovulation in prepubertal heifers Theriogenology. 2012. V. 78, N 7. P. 1578–82. DOI:10.1016/j.theriogenology), которое заключалось в том, чтобы определить влияние экзогенного простагландина F (2 α) (PGF) с или без лечения прогестероном на первую овуляцию у телок 15 препубертатного возраста. Телкам вводили интравaginaльную вставку, высвобождающую прогестерон (CIDR; Pfizer Animal Health, Монреаль, Квебек, Канада), и вызывали фолликулярную волну с помощью 50 мг прогестерона + 2 мг эстрадиолбензоата внутримышечно, а также вводили аналог PGF в больнице. время удаления CIDR, на 5 день фолликулярной волны (в среднем $8,6 \pm 0,5$ дня после введения 20 CIDR); и (3) телки контрольной группы не получали лечения (N = 14). Телок обследовали ежедневно с помощью трансректального ультразвукового исследования с начала эксперимента для подтверждения того, что овуляция произошла, или до 5 дней после инъекции PGF (группы PG и PPG) или до тех пор, пока доминантные фолликулы следующей фолликулярной волны не достигли 8 мм (контрольная группа).

25 Также известна роль простагландина F2 α в функции и структуре жёлтого тела при лютеолизе у телок. (Pinaffi F.L.V., Araujo E.R., Ginther O.J. Role of luteal biosynthesis of prostaglandin F2 α on function and structure of the corpus luteum during luteolysis in heifers. Domest Anim Endocrinol. 2018. N 63. P.10–14. DOI: 10.1016/j.domaniend). Группы были контрольными (n = 8), обработанными PGF (n = 8) и обработанными FM + PGF (n = 9). 30 Лечение проводилось через 10 дней постовуляции в 0, 8 и 16 часов. Протокол был основан на предположении, что лютеолитические характеристики экзогенного PGF будут изменены, если синтез эндогенного PGF будет одновременно подавляться, и сообщения о том, что Лютеолиз включает прямое действие маточного PGF на большие лютеиновые клетки с последующим воздействием крупных клеток на мелкие. На 48 35 час концентрация прогестерона была выше в контрольной группе ($7,6 \pm 0,8$ нг / мл), чем в группе FM + PGF ($3,0 \pm 0,5$ нг / мл), и ниже в группе PGF ($0,7 \pm 0,3$ нг / мл), чем в группе FM + PGF (взаимодействие, P <0,0001).

40 Данные способы синхронизации эстрального цикла невозможно применить на мышинной модели в эксперименте, так как эстральные циклы крупного рогатого скота, в частности коров, существенно отличается от такового у мышей. Так у крупного рогатого скота эстральный цикл длится от 18 до 24 дней, в то время как у мышей эстральный цикл длится 4-5 дней.

Задачей изобретения является создание эффективного способа фармакологической гормон-регулирующей синхронизации эстрального цикла самок мышей в эксперименте. 45 Технический результат заключается в эффективном способе синхронизации эстрального цикла у самок мышей в эксперименте, позволяющем получить большее количество оплодотворенных особей в запланированные сроки с минимальной погрешностью в дате родов, и как следствие большее количество экспериментальных

животных.

Задача решается с помощью предлагаемого способа, включающего внутримышечное введение самкам мышей суспензию на основе прогестерона в дозе 4,5 мг / 100 г вне зависимости от фазы эстрального цикла, а через 6 суток после введения суспензии прогестерона, осуществляют внутримышечное введение простагландина F2 α в дозе 0,083 мг / 100 г. Предполагаемое время наступления овуляции – 34–72 часа после введения второго препарата.

Способ осуществляется следующим образом.

Животные трех линий были разделены на три группы: интактные (естественное спаривание) (n=20), эстральная синхронизация (цитологическое исследование вагинального секрета перед спариванием с определением фазы эструса) (n=20), гормон-регулирующая синхронизация эстрального цикла (n=20). Особи, относящиеся к контрольной группе, были отобраны в случае установления у них эструса. У самок интактной и экспериментальной группы предварительной выборки не проводилось. Самки, вне зависимости от группы, рассаживались к самцам 2:1 соответственно. Запланированной датой родов считались 22 сутки с начала спаривания.

В контрольных группах животные были допущены к спариванию после подтверждения у них фазы эструса путем оценки влагалищного секрета.

Для осуществления первого этапа гормональной синхронизации овуляции у мышей внутримышечно вводился суспензия прогестерона в дозе 4,5 мг / 100 г вне зависимости от фазы эстрального цикла самок. Через 6 суток после введения прогестерона, осуществлялось внутримышечное введение простагландина F2 α (ЗАО «Мосагроген», РФ) в дозе 0,083 мг / 100 г. Предполагаемое время наступления овуляции – 34–72 часа после введения второго препарата.

Оценка фармакологической синхронизации эстрального цикла самок мышей проводилась путем исследования цитологической картины влагалищного секрета. Манипуляция проводилась на следующий день после инъекции прогестерона, через 3 дня и непосредственно перед введением простагландина F2 α и на следующий день после.

У фиксированной самки производится забор влагалищного секрета с целью цитологической оценки фазы эстрального цикла. Осторожно вводили во влагалище небольшое количество (20 мкл) дистиллированной воды с использованием пипетки с последующим втягиванием в пипетку ранее введенной жидкости. Данную процедуру повторяют 4–5 раз. Важно убедиться, что пипетка помещена на входе влагалищного канала и не проникает во влагалищное отверстие. Жидкость, содержащую несколько капель клеточной суспензии, после этого помещают на предметное стекло, высушивают на воздухе и окрашивают по методу Романовского-Гимзе. (Гайдай Е.А., Гайдай Д.С. Генетическое разнообразие экспериментальных мышей и крыс: история возникновения, способы получения и контроля. Лабораторные животные для научных исследований. 2019. – № 4. – 9 с. DOI: 10.29926/2618723X-2019-04-09; Achiraman S., Archunan G., Sankar Ganesh D., Rajagopal T., Rengarajan R.L., Kokilavani P., Kamalakkannan S., Kannan S. Biochemical analysis of female mice urine with reference to endocrine function: a key tool for estrus detection. Zool Sci. 2011. N 28. P. 600–605. DOI: 10.2108/zsj.28.600). Затем предметное стекло накрывали покровным стеклом и немедленно исследовали количественно и качественный состав клеток секрета под световым микроскопом (Биомед 5) при увеличении 40 \times .

На следующий день после инъекции суспензии прогестерона самке мыши отмечается смешанная цитологическая картина, не позволяющая отнести видимый результат к

определенной фазе цикла. Полиморфноядерные лейкоциты и небольшое количество ороговевших клеток отмечается на 3 сутки после введения прогестерона, что соответствует фазе диэструса. На шестые сутки перед введением простагландина F2 α , отмечается преобладание округлых ядросодержащих клеток с небольшим вкраплением между ними ороговевших эпителиальных клеток и полиморфноядерных лейкоцитов. Во влажалищном мазке взятом на следующий день после инъекции простагландина F2 α отмечается преобладание обильных неядерных ороговевших эпителиальных клеток с клетками неправильной формы имеющих зернистую цитоплазму.

Пример конкретного выполнения.

Исключая племенную выборку для эксперимента, были отобраны самки мышей одинакового возраста и веса линий СВА/лас, С57BL/6, BALB/ в каждой по 60 особей, и самцы соответствующих линий в количестве 30 особей, полученные из питомника лабораторных животных «Столбовая» (Московская область, п. Столбовая).

Выбор особей данных линий обоснован наиболее частым их использованием в биомедицинских исследованиях [Auta T., Hassan A.T. Alteration in oestrus cycle and implantation in *Mus musculus* administered aqueous wood ash extract of *Azadirachta indica* (neem) Asian Pacific J Reproduction. 2016. V. 5, N 3. P. 188–192. DOI: 10.1016/j.apjr.2016.03.003].

Животные трех линий были разделены на три группы: интактные (естественное спаривание) (n=20), эстральная синхронизация (цитологическое исследование вагинального секрета перед спариванием с определением фазы эструса) (n=20), гормональная синхронизация эстрального цикла (n=20). Особи, относящиеся к контрольной группе, были отобраны в случае установления у них эструса. Для осуществления первого этапа гормональной синхронизации овуляции у мышей внутримышечно вводили суспензию прогестерона (прогестерон, ЗАО «Мосагроген», РФ «Прогестомат» рег. 32-3-4.15-2649 № ПВР-3-4.15/03139 от 27.06.2018) в дозе 4,5 мг / 100 г вне зависимости от фазы эстрального цикла самок. Приготовление раствора суспензии прогестерона осуществляли следующим образом.

В предварительно подготовленную стерильную пластиковую или стеклянную ёмкостью не более 100 мл помещается 9,95 мл дистиллированной воды. Далее данная ёмкость нагревается на водяной бане до 40°C, после чего в неё помещается с помощью инсулинового шприца 0,05 мл полисорбата Твин-80 и перемешивается стеклянной палочкой до полного растворения. Полученный раствор охлаждают до температуры ниже 25°C для того, чтобы избежать разрушения гормона, оптимальная температура (20-23°C). После охлаждения, струйно, вводим в раствор 1 мл препарата прогестерона. Добиваются гомогенности среды с помощью размешивания стеклянной палочкой или быстрого взбалтывания закрытой ёмкости. Используется непосредственно после приготовления в объеме индивидуальном для каждой особи из расчёта 4,5мг/100г. Хранению и повторному использованию полученная суспензия не подлежит во избежание потери гомогенности и распада среды на фазы, потери специфических свойств гормоном, а также развитию патогенной флоры.

Через 6 суток после введения прогестерона, осуществлялось внутримышечное введение простагландина F2 α (ЗАО «Мосагроген», РФ «Магестрофан» рег. 32- 3-4.15-2649 № ПВР-3-4.15/03139 от 11.06.15) в дозе 0,083 мг / 100 г. Предполагаемое время наступления овуляции – 34–72 часа после введения второго препарата. Самки, вне зависимости от группы, рассаживались к самцам 2:1 соответственно. Запланированной датой родов считались 22 сутки с начала спаривания.

В ходе исследования было установлено, что гормональная синхронизация группы

самок увеличивает количество оплодотворенных особей на 55% относительно интактных групп и на 18,3% относительно контрольных групп. Отбор особей опирающийся на цитологическое исследование влагалищного секрета увеличивает количество беременных самок на 36% ($p<0,05$). Индекс синхронизации овуляции представлен в таблице 1.

Таблица 1.

Название линии	CBA/lac			C57BL/6			BALB/c		
	(И)	(ЭС)	(ГРС)	(И)	(ЭС)	(ГРС)	(И)	(ЭС)	(ГРС)
Количество беременных самок на 14 сутки	5	13	16	5	12	15	8	15	20
Количество самок подсаженных к самцам	20	20	20	20	20	20	20	20	20
ИСО%	25%	65%	80%	25%	60%	75%	40%	75%	100%

Примечание: Здесь и везде далее - И- интактная группа. ЭС- эстральная синхронизация. ГРС- гормонрегулирующая синхронизация.

Гормон-регулирующая синхронизация увеличивает вероятность родов самки на 22 сутки на 53% ($p<0,05$) в сравнении с контрольной группой и на 85,5% ($p<0,05$) в сравнении с интактной группой. Количество самок, разродившихся на 22 сутки представлено в таблице 2.

Таблица 2.

	CBA/lac (n=20)	C57BL/6 (n=20)	BALB/c (n=20)
<u>Интактная группа</u>	3	1	3
<u>Эстральная синхронизация</u>	10*	6*	9*
<u>Гормонрегулирующая синхронизация</u>	16*	15*	17*

Примечание: * $p<0,05$ по сравнению с контрольными группами и экспериментальными. $p<0,05$ по сравнению контрольных групп с интактными.

В линии C57BL/6 в интактной группе на 14 сутки после спаривания беременность отмечалась у 25% самок. Эстральная синхронизация цикла увеличила количество беременных особей относительно контроля на 35%. Гормон-регулирующая синхронизация овуляторного цикла увеличила количество оплодотворенных особей на 50% относительно интактной и на 10% относительно эстральной синхронизации ($p<0,05$).

В линии CBA/lac в интактной группе на 14 сутки после спаривания беременность отмечалась у 25% самок. Эстральная синхронизация цикла увеличила количество беременных особей относительно контроля на 40%. Гормон-регулирующая синхронизация овуляторного цикла увеличила количество оплодотворенных особей на 55% относительно интактной и на 15% относительно эстральной синхронизации ($p<0,05$).

В линии CBA/lac в интактной группе на 14 сутки после спаривания беременность отмечалась у 25% самок. Эстральная синхронизация цикла увеличила количество беременных особей относительно контроля на 35%. Гормон-регулирующая

синхронизация овуляторного цикла увеличила количество оплодотворенных особей на 35% относительно интактной и не изменилось в эстральной синхронизации ($p < 0,05$). А также количество потомства у экспериментальных животных в группах гормон-регулирующей стимуляции выше в сравнении с интактными и группами эстральной синхронизации. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

Название линии	CBA/lac			C57BL/6			BALB/c		
	(И)	(ЭС)	(ГРС)	(И)	(ЭС)	(ГРС)	(И)	(ЭС)	(ГРС)
Количество беременных самок на 14 сутки	5	13	16	5	12	15	8	15	20
Количество потомства	34	77	145	28	67	126	74	123	193
ИР%	6,8	5,9	9,0	5,6	5,5	8,4	9,25	8,2	9,65

Таким образом, полученные результаты убедительно свидетельствуют о выраженном эффекте гормон-регулирующей синхронизации овуляторного цикла у самок мышей, позволяющего получить большее количество оплодотворенных особей в запланированные сроки с минимальной погрешностью в дате родов, и как следствие большее количество экспериментальных животных.

(57) Формула изобретения

Способ синхронизации эстрального цикла у самок мышей в эксперименте, характеризующийся тем, что осуществляют внутримышечное введение самкам мышей суспензии на основе прогестерона в дозе 4,5 мг/100 г вне зависимости от фазы эстрального цикла, с последующим введением через 6 суток простагландина F2a в дозе 0,083 мг/100 г.