



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61D 19/04 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022114598, 31.05.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.05.2022

Дата регистрации:
17.01.2023

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 31.05.2022

(45) Опубликовано: 17.01.2023 Бюл. № 2

Адрес для переписки:
308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победы, 85, НИУ "БелГУ"

(72) Автор(ы):
Покровский Владимир Михайлович (RU),
Патраханов Евгений Александрович (RU),
Дейкин Алексей Васильевич (RU),
Покровский Михаил Владимирович (RU),
Корокин Михаил Викторович (RU),
Карагодина Анастасия Юрьевна (RU),
Казбан Николай Егорович (RU),
Сушкова Дарья Николаевна (RU),
Воронина Диана Георгиевна (RU),
КочкарOVA Индира Султановна (RU),
Алтухова Оксана Борисовна (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: CN 0101919364 A, 22.12.2010.
КОЗИКОВА Л.В. Трансплантация ранних
эмбрионов кроликов - важный этап получения
трансгенных особей, Современные научные
исследования и инновации, 2017, vol. 2, сс. 49-
52. HOFFMAN K.L., GONZALEZ-MARISCAL
G., Progesterone receptor activation signals
behavioral transitions across the reproductive
cycle of the female (см. прод.)

(54) **Коррекция овуляторного цикла у самок реципиентов кролика для трансплантации эмбрионов, измененных методами генной инженерии**

(57) Реферат:

Изобретение относится к экспериментальной фармакологии и может быть использовано для подготовки самок реципиентов кролика с целью создания трансгенных животных. Коррекцию осуществляют внутримышечным введением самкам кроликов суспензии на основе прогестерона в дозе 11,5 мг/кг вне зависимости от фазы эстрального цикла, а через 4 дня после

введения суспензии прогестерона осуществляют внутримышечное введение простагландина F2 α в дозе 0,083 мг/кг с последующей хирургической трансплантацией генномодифицированных эмбрионов через 24-48 ч после наступления овуляции. Предлагаемая схема гормональной коррекции овуляторного цикла у самок реципиентов кролика для трансплантации

эмбрионов, измененных методами генной инженерии, достоверно повышает количество имплантируемых эмбрионов при их

трансплантации хирургическим методом. 1 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

rabbit, *Horm Behav.*, 2006, vol. 50, N. 1, pp. 154-168.

R U 2 7 8 8 2 0 3 C 1

R U 2 7 8 8 2 0 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 788 203** ⁽¹³⁾ **C1**(51) Int. Cl.
A61D 19/04 (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(52) CPC
A61D 19/04 (2022.08)(21)(22) Application: **2022114598, 31.05.2022**(24) Effective date for property rights:
31.05.2022Registration date:
17.01.2023

Priority:

(22) Date of filing: **31.05.2022**(45) Date of publication: **17.01.2023** Bull. № 2

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, NIU "BelGU"**

(72) Inventor(s):

**Pokrovskij Vladimir Mikhajlovich (RU),
Patrakhanov Evgenij Aleksandrovich (RU),
Dejkin Aleksej Vasilevich (RU),
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),
Korokin Mikhail Viktorovich (RU),
Karagodina Anastasiya Yurevna (RU),
Kazban Nikolaj Egorovich (RU),
Sushkova Darya Nikolaevna (RU),
Voronina Diana Georgievna (RU),
Kochkarova Indira Sultanovna (RU),
Altukhova Oksana Borisovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)****(54) CORRECTION OF THE OVULATORY CYCLE IN FEMALE RABBIT RECIPIENTS FOR
TRANSPLANTATION OF EMBRYOS MODIFIED BY GENETIC ENGINEERING METHODS**

(57) Abstract:

FIELD: pharmacology.

SUBSTANCE: invention relates to experimental pharmacology and can be used to prepare female rabbit recipients in order to create transgenic animals. Correction is carried out by intramuscular administration of progesterone-based suspension to female rabbits at a dose of 11.5 mg/kg, regardless of the phase of the estrous cycle, and 4 days after the introduction of progesterone suspension, intramuscular administration of prostaglandin F2 α at a dose of 0.083

mg/kg is carried out, followed by surgical transplantation of genetically modified embryos 24-48 hours after ovulation.

EFFECT: proposed scheme of hormonal correction of the ovulatory cycle in female rabbit recipients for the transplantation of embryos modified by genetic engineering significantly increases the number of implanted embryos during their transplantation by surgical method.

1 cl, 1 tbl, 1 ex

RU 2 788 203 C1

RU 2 788 203 C1

Изобретение относится к экспериментальной фармакологии и генной инженерии и может быть использовано для подготовки самок реципиентов кролика с целью создания трансгенных животных.

В настоящее время, увеличивается темп работы лабораторий, занимающихся генным редактированием репродуктивного материала разных видов с целью воспроизведения более близкой к реальности модели заболевания в эксперименте или создания животных продуцентов лекарственных белков, которые могут стать биореакторами, многократно превышающими количественные характеристики производства и делающие процесс многократно выгоднее экономически. Кролик как биологический вид, становится все более привлекательным для исследователей из-за своих природных особенностей. В связи с чем становится все более актуальной разработка технологий воспроизведения репродуктивного материала, измененного методами генной инженерии.

Известно применение простагландина F2 α , который способствует овуляции у телок 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 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. Время удаления CIDR, на 5 день фолликулярной волны (в среднем 8,6 \pm 0,5 дня после введения 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).

Данные способы гормональной коррекции овуляторного цикла невозможно применить на кроличьей модели в производстве, так как эстральный цикл крупного рогатого скота, в частности коров, существенно отличается от такового у кроликов. Так у крупного рогатого скота эстральный цикл длится от 18 до 24 дней, кролики (*Oryctolagus cuniculus*) обладают индуцированной овуляцией (Ramirez and Beyer, 1988) с нерегулярными и неопределенными циклами течки; поэтому на ферме (и в лаборатории) они могут размножаться в течение всего года при избытке питательных кормов. (G. González-Mariscal; J.I. McNitt; S.D. Lukefahr (2007). Maternal care of rabbits in the lab and on the farm: Endocrine regulation of behavior and productivity. , 52(1), 0–91. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.03.028)

Задачей изобретения является создание эффективного способа гормональной коррекции овуляторного цикла самок кроликов реципиентов для дальнейшего воспроизводства ими генномодифицированного потомства.

Технический результат заключается в повышении количества и качества имплантируемых генномодифицированных эмбрионов, с определенными необходимыми признаками.

Задача решается с помощью предлагаемого способа, включающего внутримышечное введение самкам кроликов суспензию на основе прогестерона в дозе 11,5 мг/кг вне зависимости от фазы эстрального цикла, а через 4 дня после введения суспензии прогестерона, осуществляют внутримышечное введение простагландина F2 α в дозе

0,083 мг/кг, с последующей хирургической трансплантацией генномодифицированных эмбрионов через 24-48 часов после наступления овуляции.

Таким образом, поставленная задача решена. За счет предлагаемой гормональной коррекции овуляторного цикла самок кроликов с известным гормональным статусом повышается эффективность проведения успешной трансплантации репродуктивного материала, в результате чего повышается количество и качество имплантируемых генномодифицированных эмбрионов, что позволит самке кролика производить большее количество потомства, а это позволит увеличить темп генно-инженерного процесса в получении особей с определенными необходимыми признаками.

Способ осуществляется следующим образом.

Для исследования были выбраны самки кролика породы ХИКОЛЬ массой 3000-3200 г.

20 животным экспериментальной группы была осуществлена гормональная коррекция овуляторного цикла (n=20). Животные в контрольной группе были выбраны в эксперимент методом визуального определения эструса (n=20). У самок кролика экспериментальной группы предварительной выборки не проводилось.

Животные были распределены на 4 группы (N=10).

После проведения 20 животным из экспериментальной группы гормональной коррекции овуляторного цикла: 10 из них были оплодотворены искусственным осеменением, а 10 проводилась трансплантация генномодифицированных эмбрионов.

Остальные 20 животных были распределены по 10 животных в аналогичные группы без проведения гормональной коррекции овуляторного цикла.

Для осуществления первого этапа гормональной коррекции овуляторного цикла у самок кроликов внутримышечно вводилась суспензия прогестерона в дозе 11,25/кг вне зависимости от фазы эстрального цикла самок. Через 4 дня после введения прогестерона, осуществлялось внутримышечное введение простагландина F2 α (ЗАО «Мосагроген», РФ) в дозе 0,083 мг/кг. Предполагаемое время наступления овуляции – 24-48 часов после введения второго препарата.

Пример конкретного выполнения.

Для исследования были выбраны самки кролика породы ХИКОЛЬ массой 3000-3200 г.

Животные были разделены на 4 группы:

1. Искусственное осеменение самок с предварительной гормональной коррекцией овуляторного цикла (ОГКЦ) (n=10).

2. Трансплантация эмбрионов хирургическим способом после предварительной гормональной коррекцией овуляторного цикла (ТГКЦ) (n=10).

3. Искусственное осеменение самок без предварительной гормональной коррекции овуляторного цикла (ОК) (n=10).

4. Трансплантация генномодифицированных эмбрионов хирургическим путем без предварительной коррекции овуляторного цикла (ТК) (n=10).

Для подготовки групп с предварительной гормональной коррекцией овуляторного цикла у самок кроликов внутримышечно вводился прогестерон (суспензия для инъекций, ЗАО «Мосагроген», РФ «Прогестомат» рег. 32-3-4.15-2649 № ПВР-3-4.15/03139 от 27.06.2018) в дозе 11,25 мг/кг вне зависимости от фазы эстрального цикла самок. Для удобства введения препарата прогестерон на масляной основе готовили раствора суспензии прогестерона по известному способу, описанному в патенте № 2761137 публ. 06.12.2021 «В предварительно подготовленную стерильную пластиковую или стеклянную ёмкость с крышкой 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 охлаждаются 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 4,5 мг/100 г. 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 4 суток после введения прогестерона, осуществлялось внутримышечное введение простагландина F2α (ЗАО «Мосагроген», РФ «Магестрофан» рег. 32-3-4.15-2649 № ПВР-3-4.15/03139 от 11.06.15) в дозе 0,083 мг/кг. Предполагаемое время наступления овуляции – 24-48 часов после введения второго препарата. Запланированной датой родов считались 35 суток с начала оплодотворения. Количество генномодифицированных эмбрионов, трансплантируемых самкам в исследуемых группах, составляло 15-18 штук.

После окрола был проведен подсчет потомства у самок кролика из разных исследуемых групп. Результаты эффективности предварительной гормональной коррекции овуляторного цикла представлены в Таблице 1.

Индекс эффективности имплантации рассчитывался путем отношения количества потомства к количеству беременных самок в группе.

Таблица 1

Группы Результаты	ТГКЦ (n=10)	ОГКЦ (n=10)	ТК(n=10)	ОК(n=10)
Количество беременных самок	5	8	3	5
Количество потомства	<u>39</u> (7,8±0,83; <u>7,5(7;8)</u>)	73 (9,125±1,35; 9,25(8;9))	<u>18</u> (6±1;5,(5,5;6,5))	37 (7,4±1,15 7(7;8))
ИЭИ	78%	91%	30%	74%

Примечание: ТГКЦ - Трансплантация генномодифицированных эмбрионов хирургическим способом после гормональной коррекции овуляторного цикла по схеме; ОГКЦ - Искусственное осеменение самок с предварительной гормональной коррекцией овуляторного цикла по схеме; ТК- Трансплантация эмбрионов хирургическим путем без предварительной гормональной коррекции овуляторного цикла; ОК- Искусственное осеменение самок без предварительной гормональной коррекции овуляторного цикла. ИЭИ-индекс эффективности имплантации. Меры среднего уровня выборочных данных: среднее±стандартное отклонение (медиана [первый квартиль; третий квартиль]).

В ходе исследования было установлено, что гормональная коррекция овуляторного цикла группы самок при искусственном осеменении увеличивает количество оплодотворенных особей на 30% (p<0,05) относительно контрольной группы. Количество животных которым проводили трансплантацию генномодифицированных эмбрионов после гормональной коррекции овуляторного цикла по факту регистрации окрола на 35 суток составило на 20% (p<0,05) больше в сравнении с контрольной группой которой проводили трансплантацию без коррекции. Индекс эффективности имплантации при применении препаратов по указанной схеме был выше на 58% у

группы ТГКЦ в сравнении с ТК и на 17% больше у группы ОГКЦ в сравнении с ОК.

Таким образом, предлагаемая схема гормональной коррекции овуляторного цикла у самок реципиентов кролика для трансплантации эмбрионов, измененных методами генной инженерии, достоверно повышает количество и качество имплантируемых эмбрионов при их трансплантации хирургическим методом.

(57) Формула изобретения

Способ коррекции овуляторного цикла у самок реципиентов кролика в эксперименте, характеризующийся тем, что осуществляют внутримышечное введение самкам кроликов суспензию на основе прогестерона в дозе 11,5 мг/кг вне зависимости от фазы эстрального цикла, а через 4 дня после введения суспензии прогестерона осуществляют внутримышечное введение простагландина F2 α в дозе 0,083 мг/кг, с последующей хирургической трансплантацией генномодифицированных эмбрионов через 24-48 ч после наступления овуляции.

15

20

25

30

35

40

45