

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2018-300

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/075 (2010.01)

C07C 11/21 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.06.2018**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **04.09.2019**
(Věstník č. 36/2019)

(71) Přihlašovatel:
Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i., Praha 10,
Uhřetěves, CZ

(72) Původce:
Ing. Kristýna Hošková, Ph.D., Praha 5, Smíchov,
CZ
Ing. Tereza Žalmanová, Ph.D., Praha 6, Hradčany,
CZ
Ing. Tomáš Kott, Ph.D., Poleň, CZ
prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc., Praha 10, Uhřetěves,
CZ

(74) Zástupce:
Patentová kancelář VYNALEZY.cz, Mgr. Hana
JIRKALOVÁ, Michelská 18/12a, 140 00 Praha 4,
Michle

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob eliminace defektů zrání savčích
oocytů vyvolaných glyfosátem A**

(57) Anotace:
Řešení se týká způsobu zdokonalené kultivace
oocytů s ukončenou růstovou fází získaných od
zvířat, která byla vystavena účinku glyfosátu,
v podmínkách in vitro využívající kultivace s beta-
ocimenem. Tato kultivace umožňuje získat
podstatně větší množství kvalitních dozrálých
oocytů, což má velké využití při reprodukčních
biotechnologiích hospodářských zvířat.

Způsob eliminace defektů zrání savčích oocytů vyvolaných glyfosátem A

Oblast techniky

5

Řešení se týká zvýšení vývojové schopnosti savčích oocytů získaných od zvířat, která byla vystavena nepříznivým účinkům herbicidu glyfosátu. Tento způsob kultivace má velký význam zejména při asistované reprodukci hospodářských zvířat.

10

Dosavadní stav techniky

Narůstající znečištění životního prostředí má za následek poruchy plodnosti. K polutantům, které se na tom významně podílejí, patří i endokrinní disruptory čili látky schopné narušit hormonální rovnováhu organismu. Mezi nimi zaujímají významné místo i herbicidy používané v zemědělství včetně glyfosátu. Tyto látky jsou v životním prostředí velmi rozšířené a jejich negativní efekt se projevuje už ve velmi nízkých koncentracích. Je proto krajně obtížné, ne-li nemožné, zajistit, aby lidé či zvířata nebyli účinku těchto látek vystaveni. V současné době se pro asistovanou reprodukci savců, např. pro klonování, in vitro oplození, transgenozí, včetně hospodářsky významných druhů využívají oocyty dozrálé v podmínkách in vitro. Ty mohou pocházet od zvířat, jež byla vystavena účinkům látek znečišťujících životní prostředí. Kvalita takových oocytů je snižena a jejich schopnost dozrát v podmínkách in vitro bývá narušena. Platí to i při expozici zvířat glyfosátem, který se vyskytuje v krmivech a je schopný následně narušit zrání oocytů in vitro. Proto se vyvíjejí systémy kultivace, které by riziko narušení in vitro zrání u oocytů ze zvířat exponovaných glyfosátem eliminovaly. Pro tyto kultivační systémy se hledají látky, které by u oocytů kultivovaných in vitro zabránily významným vývojovým defektům.

Pokud by se podařilo zajistit plnohodnotné zrání i u oocytů ze zvířat, která byla předtím v důsledku znečištění životního prostředí vystavena působení glyfosátu, zvýšilo by se využití šlechtitelského potenciálu samic a zefektivnily by se i postupy asistované reprodukce.

Podstata vynálezu

Uvedené problémy odstraňuje způsob eliminace defektů zrání savčích oocytů vyvolaných glyfosátem, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že během zrání těchto oocytů v podmínkách in vitro jsou oocyty vystaveny působení beta-ocimenu.

Způsob podle vynálezu je charakterizován tím, že se oocyty s ukončenou růstovou fází kultivují in vitro s beta-ocimenem po dobu, která je u daného druhu zvířat běžně nutná pro postup zrání oocytů do metafáze II. Způsob podle vynálezu je dále charakterizován tím, že se na oocyty s ukončeným růstem a úplně vyvinutou vývojovou schopností během jejich zrání in vitro působí v in vitro kultuře beta-ocimenem v koncentracích od 10 do 100 nM, přičemž tato kultivace trvá po dobu, která odpovídá době nutné v podmínkách kultivace in vitro pro postup zrání oocytů do stadia metafáze II.

Způsob zvýšení ochrany oocytů proti efektům glyfosátu podle vynálezu se konkrétně výhodně provádí tak, že se nezralé savčí oocyty s ukončeným růstem a úplně vyvinutou vývojovou schopností in vitro kultivují v médiu s beta-ocimenem v koncentraci 50 nM. Kultivace trvá dobu, která je u daného druhu potřebná pro dozrání oocytů s ukončenou růstovou fází a plnou vývojovou schopností v podmínkách in vitro, tj. u prasete asi 44 až 48 hodin, u skotu 22 až 24 hodin, a poté se získá nejméně 80 % kvalitních oocytů pro jejich další použití.

Způsobem podle vynálezu jsou oocyty vystaveny působení beta-ocimenu, což má pozitivní vliv na kvalitu zrání oocytů, především pak na integritu dělicího vřeténka a euploidní stav

- chromozomů dozrálého oocyty. To se ukazuje jako velmi výhodné, protože experimenty původců prokázaly, že kultivace s beta-ocimemem má příznivý efekt na zrání oocytů od zvířat, jež byla předtím vystavena účinku glyfosátu. Pokud není použit způsob podle vynálezu, pak většina kultivovaných oocytů ze zvířat, jež byla předtím vystavena účinkům glyfosátu, má narušené dělicí vřeténko a při vydělení prvního pólóvého tělíska dochází k aneuploidiím. Takové oocyty jsou pro většinu biotechnologií nepoužitelné. Způsobem podle vynálezu je dosaženo úplného zrání oocytů do metafáze II u více než 80 % oocytů. Tyto oocyty lze použít pro další reprodukční biotechnologie, protože jsou s to se vyvíjet v kvalitní embrya.
- Výsledkem způsobu kultivace podle vynálezu je podstatné zvýšení podílu oocytů, jež dokončí zrání a jsou využitelné pro další reprodukční biotechnologie. Ve srovnání s tradičními postupy kultivace je nárůst podílu dozrálých oocytů zhruba dvoj- až trojnásobný, což má velký hospodářský význam. Způsob kultivace in vitro oocytů od zvířat, jež byla předtím vystavena účinku glyfosátu, podle vynálezu lze využít zejména při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat, např. pro klonování či ICSI.

Způsob zvýšení vývojové schopnosti oocytů od zvířat vystavených před kultivací glyfosátu jejich kultivací in vitro s beta-ocimemem podle vynálezu byl původci úspěšně ověřen v laboratořích a stájích u přihlašovatele, kterým je Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., v Praze, CZ.

Následující příklady provedení způsob podle vynálezu pouze dokládají, aniž by ho jakkoliv omezovaly.

25 Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Při klasické kultivaci prasečích oocytů od prasnic, jež byly předtím vystaveny účinkům glyfosátu v krmivu, dochází v podmínkách in vitro za 44 hodin ke kompletaci zrání do stádia metafáze II u 38 % oocytů. Způsobem podle vynálezu jsou prasečí oocyty s ukončenou růstovou fází odebrané ze zvířat, jež byla vystavena účinku glyfosátu, např. v krmivu z plodin ošetřených tímto herbicidem, kultivovány po celou dobu kultivace in vitro, tj. po dobu 44 hodin v kultivačním médiu s přidávkou 50 nM beta-ocimenu. Při tomto postupu stoupá významně podíl dozrálých oocytů, které dosáhnou stádia metafáze II s četností přes 80 %. Takto získané oocyty lze podrobit standardní partenogenetické aktivaci, např. kalcium ionoforem, a navodit u nich embryonální vývoj do stádia blastocysty. Takto získané savčí partenogenetické zárodky ve vývojovém stádiu blastocysty lze využít například pro tvorbu embryonálních kmenových buněk.

40 Příklad 2

Při tradiční kultivaci oocytů skotu s ukončeným růstem od krav, jež byly předtím vystaveny účinkům glyfosátu v krmivu, dochází v podmínkách in vitro za 24 hodin ke kompletaci zrání do stádia metafáze II u 41 % oocytů. Způsobem podle vynálezu jsou oocyty skotu s ukončenou růstovou fází od krav, jež byly předtím vystaveny účinku glyfosátu, např. v krmivech z plodin ošetřených tímto herbicidem, kultivovány po celou dobu kultivace, tj. po dobu 24 hodin, v kultivačním médiu s 50 nM beta-ocimenu. Při tomto postupu stoupá významně podíl dozrálých oocytů, které dosáhnou stádia metafáze II s četností přes 85 %. Takto získané oocyty lze podrobit standardnímu oplození in vitro. Úspěšně oplozené oocyty se dále vyvíjejí v embrya vhodná pro přenos náhradní matce.

Průmyslová využitelnost

- 5 Nový způsob eliminace defektů zrání savčích oocytů in vitro vyvolaných glyfosátem využívá účinků beta-ocimenu, kdy dojde k podstatnému zvýšení množství získaných kvalitních dozrálých oocytů, což má velký význam při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat.

10

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob eliminace defektů zrání savčích oocytů vyvolaných glyfosátem, **vyznačující se tím,** že během zrání těchto oocytů v podmínkách in vitro jsou oocyty vystaveny působení beta-ocimenu.
- 15 2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím,** že se na oocyty s ukončeným růstem a úplně vyvinutou vývojovou schopností od zvířat, jež byla předtím vystavena účinkům glyfosátu, během zrání oocytů in vitro působí beta-ocimenem v koncentracích od 10 do 100 nM, přičemž tato kultivace trvá po dobu, která odpovídá době nutné v podmínkách kultivace in vitro pro postup zrání oocytů do stádia metafáze II, tj. u prasete 44 až 48 hodin a u skotu 22 až 24 hodin, načež se získá nejméně 80 % kvalitních oocytů.
- 20