



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2016110202, 22.03.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.03.2016Дата регистрации:
04.09.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.03.2016

(45) Опубликовано: 04.09.2017 Бюл. № 25

Адрес для переписки:
125222, Москва, ул. Пенягинская, 12, корп. 1, кв.
5, Юдину С.М.

(72) Автор(ы):

Юдин Сергей Михайлович (RU),
Лунин Владимир Глебович (RU),
Советкин Станислав Васильевич (RU),
Нежданов Анатолий Григорьевич (RU),
Юдина Тамара Ивановна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Юдин Сергей Михайлович (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 7,341,989 B2, 11.03.2008. RU 2
526 571 C1, 27.08.2014. RU 2 493 873 C1,
27.09.2013. NESTOROVIC N., et al., Effects of
multiple somatostatin treatment on rat
gonadotrophic cells and ovaries. Histochem J.
2001 Nov-Dec;33(11-12):695-702.

(54) Препарат для стимуляции фолликулогенеза и способ его применения

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и касается препарата для стимуляции фолликулогенеза, содержащего суспензию химерного белка с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 C-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKFTFTSC в рафинированном растительном

масле с добавлением апирогенной воды для инъекций. Группа изобретений также касается способа стимуляции фолликулогенеза, предусматривающего двукратную подкожную инъекцию указанного препарата. Группа изобретений обеспечивает стимуляцию соматостатинсодержащим препаратом фолликулогенеза. 2 н. и 4 з.п. ф-лы, 1 пр., 14 ил., 8 табл.

RU 2 629 871 C1

RU 2 629 871 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 15/08 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2016110202, 22.03.2016**

(24) Effective date for property rights:
22.03.2016

Registration date:
04.09.2017

Priority:
(22) Date of filing: **22.03.2016**

(45) Date of publication: **04.09.2017** Bull. № 25

Mail address:
125222, Moskva, ul. Penyaginskaya, 12, korp. 1, kv. 5, Yudinu S.M.

(72) Inventor(s):
**Yudin Sergej Mikhajlovich (RU),
Lunin Vladimir Glebovich (RU),
Sovetkin Stanislav Vasilevich (RU),
Nezhdanov Anatolij Grigorevich (RU),
Yudina Tamara Ivanovna (RU)**

(73) Proprietor(s):
Yudin Sergej Mikhajlovich (RU)

(54) **PREPARATION FOR FOLLICULOGENESIS STIMULATION AND METHOD FOR ITS APPLICATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions concerns a preparation for folliculogenesis stimulation containing a suspension of chimeric protein with water-insoluble enzymatically inactive chloramphenicol acetyltransferase without 10 C-terminal amino acids, an amino acid spacer and somatostatin-14 with the amino acid sequence AGCFWKFTFTSC in refined

vegetable oil with addition of pyrogen-free water for injection. The group of inventions also relates to a method for folliculogenesis stimulation, which involves two-fold subcutaneous injection of the drug.

EFFECT: folliculogenesis stimulation by a somatostatin-containing drug.

6 cl, 1 ex, 14 dwg, 8 tbl

RU 2 629 871 C1

RU 2 629 871 C1

Область использования

Изобретение относится к биотехнологии и фармакологии, а конкретно к препарату для стимуляции фолликулогенеза и способу его применения.

Известный уровень

5 Характерной чертой современной цивилизации является увеличение доли бесплодных супружеских пар и возрастающая потребность во вспомогательных репродуктивных технологиях. Международные исследования, проводившиеся среди населения развитых стран, показали, что проблема бесплодия актуальна для пятнадцати-двадцати процентов супружеских пар. Во всем мире диагноз бесплодия можно поставить примерно
10 миллиарду человек.

Десять лет назад в РФ частота бесплодных браков составляла 18,5%, в 2014 году этот показатель приблизился к 25%. Согласно данным статистики в России диагноз бесплодие в 2014 году поставлен шести миллионам женщин и четырем миллионам мужчин. С каждым годом их количество возрастает - примерно на двести пятьдесят
15 тысяч человек.

В США с 1996 по 2004 годы количество детей, родившихся при реализации программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), выросло вдвое, причем, в 2004 году их было уже около 1% от общего количества детей, появившихся на свет (Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению. Под ред. В.И. Кулакова. -
20 ГЭОТАР-Медиа, 2006 г.).

Наиболее частой причиной отсутствия беременности при ЭКО являются неэффективность проводимой гормональной терапии, развитие у женщин постгормонального синдрома гиперстимуляции яичников. Для стимуляции процессов фолликулогенеза у женщин в программе подготовки к ЭКО применяют производные
25 эстрадиола, антагонисты гонадотропин рилизинг гормона, препараты человеческого хорионического гонадотропина, прогестерона (Мартынова М.В., Мишиева Н.Г., Левков Л.А. и др. Акушерство и гинекология, 2015, №11, С. 46-52; Стрельченко Д.А., Перминова С.Г., Донников А.Е., Акушерство и гинекология, 2015, №10, С. 19-26; Галлямова Е.М., Перминова С.Г., Митюрин Е.В., Стрельченко Д.А., Акушерство и гинекология, 2015,
30 №7, С. 48-55).

Частота синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ), патогенез которого до сих пор до конца не ясен, колеблется по разным оценкам в широких пределах: доля больных со средней степенью развития СГЯ составляет до 33%, с тяжелой (вплоть до летальных исходов) - до 10%. СГЯ негативно сказывается и на последующем течении беременности,
35 повышая риск самопроизвольного аборта. По данным Российского национального регистра, при использовании ЭКО частота СГЯ тяжелой степени в 2004 г. составила 5,6% и не имеет тенденции к снижению (Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии. Под ред. В.И. Кулакова, Б.В. Леонова, Л.Н. Кузьмичева. М. 2005; Новорожденные высокого риска. Новые диагностические и лечебные технологии. Под ред. В.И. Кулакова, Ю.И. Барашнева. М., 2006; Основы перинатологии. Учебник. Под ред. Н.П. Шабалова и Ю.В. Цвелева, М, 2004).

Одной из причин неудачных попыток ЭКО и развития СГЯ является резкие и значительные изменения гормонального фона женщин вследствие применения экзогенных гормональных препаратов, сложность регуляции межгормонального взаимодействия и невозможности вычленения из «гормонального ансамбля» только
45 линии половых гормонов.

Иной метод стимуляции фолликулогенеза основан на повышении в организме концентрации эндогенного соматотропного гормона за счет индукции синтеза

антисоматостатиновых антител.

Результаты исследований, проведенных в последние годы, показали, что гормон роста (СТГ) оказывает регулирующее влияние на репродуктивные процессы самок, самцов и на развитие эмбрионов млекопитающих. В середине восьмидесятых годов
5 прошлого века ученые обнаружили, что концентрация гормона роста в плазме спермы быков значительно выше (приблизительно в 3 раза), чем в сыворотке крови (The relationship between immunosuppressive activity and immunoregulatory cytokines in seminal plasma: influence of sperm autoimmunity and seminal leukocytes / R. **Ochsenkühn**, A.E. O'Connor, J.J. Hirst, H.W. Gordon, D.M. Baker de Kretser, M.P. Hedger // Journal of Reproductive
10 Immunology. - 2006. - Vol. 71. - №1. - P. 57-74).

Гормон роста у лососевых рыб оказывает стимулирующее влияние на интерстициальные и первичные половые клетки. Инъекции экзогенного гормона роста кабанам приводят к 2,5-кратному увеличению удельного веса сперматид и
15 сперматоцитов (Kemal, Duru N. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa / N. Kemal Duru, M. Morshedi, S. Oehninger // Fertility and Sterility. - Vol. 74. - P. 1200-1207).

Введение бычкам экзогенного СТГ способствовало повышению содержания в организме инсулиноподобного фактора роста и увеличению концентрации
20 сперматозоидов в эякулятах (Maegava, M. A repertoire of cytokines in human seminal plasma / M. Maegava, M. Kamada, M. Irahara // Journal of Reproductive Immunology. - 2002. - Vol. 54. - P. 3-42).

Увеличение содержания соматотропина в питательных средах для выращивания эмбрионов (5-15 нг/мл) оказывает стимулирующее влияние на созревание ооцитов и
25 культивирование ранних зародышей животных (Роль соматотропного гормона в составе сред для получения эмбрионов in vitro В.П. Симоненко, А.И. Ганджа, Л.Л. Леткевич и др. Розведения і генетика тварин. 2015. №50, С. 212-219).

Также из уровня техники известно (патент РФ 2428604 (ГУЖОН Ален (FR), ЛУМЕ Эрнест (FR)) о применении соматостатина (гормон-антагонист соматотропина) или
30 одного из его аналогов-агонистов для приготовления лекарственного средства, которое предназначено для ингибирования роста покоящихся фолликулов в ткани яичника.

Механизм действия соматостатин-содержащей пептидной субстанции в форме водно-масляной суспензии (далее препарат Сат-Сом) основан на временном связывании
35 эндогенного соматостатина-14 специфическими антисоматостатиновыми антителами и увеличении в организме концентрации эндогенного соматотропного гормона в физиологических пределах. В терапевтической практике генно-инженерный (рекомбинантный) гормон роста применяют при гипофизарном нанизме, синдромах Прадера-Вилли, Шерешевского-Тернера, при заместительной терапии выраженного дефицита эндогенного соматотропного гормона (СТГ) у взрослых. В специальной
40 литературе имеются сообщения об использовании соматотропина для симптоматического лечения следующих заболеваний (показания не утверждены): квашиоркор, остеопороз, кахексия или значительная потеря массы тела у больных СПИДом.

Однако применение рекомбинантного гормона роста в качестве лекарственного
45 средства при подготовке супружеских пар к экстракорпоральному оплодотворению или терапии гиподисфункциональных состояний яичников и нарушений сперматогенеза в настоящее время не рассматривается. Более того, существуют клинические данные, свидетельствующие о неблагоприятном влиянии повышенного содержания СТГ в крови женщин при патологии гипофизарной области на процессы оплодотворения и раннего

эмбриогенеза (К.А. Яворовская, Т.Ю. Иванец, В.Г. Колодько. Особенности фолликулогенеза, раннего эмбриогенеза и беременности раннего срока у женщин с исходной гиперпродукцией СТГ в программе ЭКО - Проблемы репродукции, 2011, №5. С. 72-74).

5 В то же время, исходя из изученных (известных) свойств химерного соматостатинсодержащего препарата, его способность активизировать фолликулогенез априорно и однозначно не следует и до настоящего времени не было известно о том, что данный лекарственный препарат проявляет фолликулостимулирующую активность, что впервые было показано авторами данного изобретения.

10 Метод антисоматостатиновой иммунизации животных с использованием указанного химерного соматостатинсодержащего белка используется в промышленном животноводстве (RU 2034457 C1, МПК А01К 67/02, 1995), а также для стимуляции сперматогенеза сельскохозяйственных животных и человека (RU 2493873 C1, МПК А61К 39/385, 2013; RU 2526571 C1, МПК А61К 39/385, 2014).

15 Сущность изобретения

Технический результат настоящего изобретения заключается в стимуляции соматостатинсодержащим препаратом фолликулогенеза за счет увеличения активности половых гормонов (тестостерон, прогестерон, эстрадиол) в сыворотке крови и индукции комплексных перестроек адаптивного генеза, выражающихся в структурных преобразованиях органов репродуктивной системы и направленных на стимуляцию воспроизводительного потенциала, при использовании препарата для инъекций с низкой реактогенностью адьюванта, позволяющего осуществлять инъекции без болезненных ощущений.

25 Достижение результата обеспечивает препарат для стимуляции фолликулогенеза, содержащий суспензию химерного белка с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp)_n, где n=1, 2, 4, 8, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC в рафинированном растительном масле с добавлением апиrogenной воды для инъекций.

30 В наилучшем варианте осуществления изобретения препарат содержит химерный белок с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp)_n, где n=1, 2, 4, 8, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC из расчета 100-250 мг указанного химерного белка на 100 мл рафинированного растительного масла, включающего 5,0-35 10,0 мас. % апиrogenной воды для инъекций. Предпочтительно использование в препарате рафинированного хлопкового масла или рафинированного арахисового масла.

40 Способ стимуляции фолликулогенеза, предусматривающий двукратную подкожную инъекцию препарата, содержащего суспензию химерного белка с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp)_n, где n=1, 2, 4, 8, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC в рафинированном растительном масле с добавлением апиrogenной воды для инъекций, из расчета 25-50 мкг указанного химерного белка на 1 кг живой массы тела с межинъекционным интервалом 14 суток.

45 В наилучшем варианте осуществления изобретения используют препарат в виде водно-масляной суспензии химерного белка с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот,

аминокислотным спейсером (Sp)_n, где n=1, 2, 4, 8, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFSTC в количестве из расчета 100-250 мг указанного химерного белка на 100 мл рафинированного растительного масла, включающего 5,0-10,0 мас. % апирогенной воды для инъекций. Предпочтительно использование препарата, который содержит рафинированное хлопковое масло или рафинированное арахисовое масло.

Осуществление изобретения и эффективность препарата

Возможность осуществления изобретения поясняется примером получения препарата для стимуляции фолликулогенеза.

Полученный и очищенный от примесей препарат белка растворяют в буфере 0,2 М трис-HCL pH 8,0, содержащем 6 М гуанидинхлорид и 2 М МЭДТА (M-EDTA).

Добавляют 50-кратный молярный избыток β-меркаптоэтанола в расчете на количество S-S групп химерного белка и раствор быстро разбавляют 10-кратным объемом буфера без гуанидинхлорида. Образовавшийся преципитат гибридного белка отделяют центрифугированием в течение 15 минут при 12000 g и температуре 4°C и лиофильно высушивают для последующего хранения или приготовления водно-масляной суспензии.

Для приготовления готовой формы инъекционного препарата используют рафинированное растительное масло и апирогенную воду для инъекций. В растительное масло добавляют воду из расчета 5-10%. Затем добавляют навеску сухого белка из расчета 100-250 мг на 100 мл водно-масляной суспензии. Суспензию гомогенизируют в течение 1-2 минут и передают на разливное оборудование. Готовую суспензию препарата расфасовывают в тару (например, шприцы одноразовые). Готовую лекарственную форму препарата стерилизуют ионизирующим облучением при суммарной дозе облучения порядка 6 кГр.

При иной концентрации компонентов инъекционный препарат приготавливается аналогично. Предпочтительными являются следующие содержания компонентов на 95 мл рафинированного растительного масла: 100 мг химерного белка - 5,0 мас. % апирогенной воды для инъекций; 250 мг химерного белка - 10 мас. % апирогенной воды для инъекций.

Использование в качестве адьюванта для такого рода препарата растительного масла, полностью метаболизирующегося в организме, позволяет в значительной степени снизить уровень реактогенности адьюванта и создает необходимые условия для постепенного поступления действующего вещества в организм человека («депо» препарата). Могут использоваться хлопковое и арахисовое масла. Наличие апирогенной воды в конечной прописи препарата обосновано необходимостью получения водно-масляной суспензии препарата.

Эффективность применения инъекционного препарата для стимуляции фолликулогенеза иллюстрируется следующими примерами.

Для экспериментов использовали белых беспородных крыс. Животные ранее не участвовали в опытах и были выдержаны в течение 14 суток с целью карантина и адаптации. Во время карантинного периода у животных контролировали клинические показатели состояния здоровья. Животных содержали в помещениях с естественно-искусственным освещением и контролируемым микроклиматом. Распределение животных в группы проводили произвольно методом «случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 10%.

Животные были распределены на три группы: I (контрольная) группа - интактные животные, II группа - животные, которым вводили подкожно препарат в форме водно-

масляной суспензии в дозе 25 мкг белка Сат-Сом на 1 кг массы тела дважды с интервалом между инъекциями, равным 14 суткам, III группа - животные, которым подкожно инъецировали препарат в форме водно-масляной суспензии в дозе 50 мкг белка Сат-Сом на 1 кг массы тела дважды с интервалом между инъекциями, равным 14 суткам. Общий срок наблюдения за животными составлял 56 суток, в течение которого учитывали прием корма и воды, внешний вид животных, реакцию на внешние раздражители, возможную гибель.

В конце опыта животных из каждой группы подвергали эвтаназии путем декапитации и отбирали пробы крови. Проводили макроскопический анализ матки и яичников, которые взвешивали на аналитических весах HTR 220CE. Образцы яичников и матки для гистологических исследований фиксировали в 10%-м растворе формалина в течение суток. После промывки в проточной воде материал дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и осуществляли заливку в парафин по общепринятой методике на универсальном автоматизированном микротоме «НМ-360» («Mikron», Германия).

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали метод вариационной статистики с помощью простого сравнения средних по двухстороннему t-критерию Стьюдента. Различия определяли при 0,05 уровне значимости. Статистический анализ выполняли с помощью программы «Student-200». Схема эксперимента отражена в таблице 1.

Таблица 1

Группа крыс	Характеристика групп
Контрольная	Интактные крысы
I опытная	Крысы, получившие соматостатинсодержащий препарат по схеме в дозе 25 мкг/кг массы тела
II опытная	Крысы, получившие соматостатинсодержащий препарат по схеме в дозе 50 мкг/кг массы тела

Изучение общей морфологической картины препарированных органов проводили при помощи светового микроскопа «Nikon» (Япония) после окраски гистологических срезов гематоксилином и эозином. Микрофотосъемку и микроскопическую морфометрию со статистической обработкой осуществляли с помощью микроскопа, совмещенного с сертифицированной программой анализа микроскопического изображения ImageScore C.

В таблице 2 приведены результаты мониторинга динамики прироста массы тела у крыс опытных групп в сравнении с аналогичным показателем у животных контрольной группы (при подкожном введении соматостатинсодержащий препарата Сат-Сом в форме водно-масляной суспензии (n=10, p≥0,5)).

Таблица 2

Длительность наблюдений, сутки	Контрольная группа	Опытная группа	
		25 мкг/кг	50 мкг/кг
0	63,56±3,29	61,20±1,86	58,40±2,09
7	71,33±1,91	67,97±1,26	65,56±1,50
14	103,80±3,08	103,30±1,85	99,08±2,23
21	135,03±4,06	129,78±3,11	133,73±3,06
28	158,86±3,97	155,86±3,43	152,82±3,12
35	187,33±3,77	182,46±3,63	179,66±3,42
42	206,04±2,88	203,37±3,11	201,76±3,22
49	222,38±3,55	220,68±3,84	217,54±4,38
56	229,93±4,38	229,13±4,94	225,63±3,10

При двукратном введении препарата Сат-Сом в дозах 25 мкг белка на 1 кг массы тела и 50 мкг белка на 1 кг массы тела видимых отклонений в состоянии и поведении опытных животных от крыс контрольной группы не отмечали. Все животные охотно потребляли корм и воду, шерсть была гладкой и блестящей. На протяжении всего эксперимента гибели животных в группах не регистрировали. Введение препарата крысам в дозе 50 мкг белка на 1 кг массы тела привело к некоторому статистически недостоверному снижению массы тела по сравнению с аналогичными показателями у животных контрольной и первой опытной групп. Введение препарата в дозе 25 мкг белка на 1 кг массы тела не отразилось статистически значимым образом на текущих значениях привесов.

Доказательством влияния лекарственных препаратов на органы-мишени является показатели относительной массы этих органов. Результаты этого параметра приведены в таблице 3 (относительная масса органов крыс, %; * - $p \leq 0,05$).

Таблица 3

Орган	Контрольная группа, n=10	Опытная группа n=10	
		25 мкг/кг	50 мкг/кг
Матка+яичники	0,19±0,01	0,20±0,01	0,21±0,01*
Только яичники	0,04±0,002	0,04±0,002	0,05±0,002*

Как следует из представленных в таблице 3 данных, двукратное подкожное введение негормонального препарата Сат-Сом в форме водно-масляной суспензии в дозе 25 мкг белка на 1 кг массы тела с межинъекционным интервалом 14 суток не привело к изменению массовых коэффициентов репродуктивных органов по отношению к аналогичному показателю в контрольной группе. Однако у крыс, получавших дозу препарата, равной 50 мкг белка на 1 кг массы тела с межинъекционным интервалом 14 суток, относительная масса яичников возросла в сравнении с аналогичным показателем в контрольной группе животных и составила 0,05±0,002% против аналогичных показателей в контрольной группе, равных 0,04±0,002%. В абсолютных

значениях масса яичников крыс контрольной группы составила $0,09 \pm 0,00018$ г, у крыс второй опытной группы этот показатель был равен $0,11 \pm 0,00022$ г.

При макроскопическом исследовании матки и яичников крыс опытных и контрольной групп отмечено следующее.

5 У животных контрольной группы матка и яичники без видимых изменений, соответствуют норме (Фото на Фиг. 1). В группе животных, получавших препарат в дозе 25 мкг белка на 1 кг массы тела, у некоторых самок стенки рогов матки и яичники гиперемированы (Фото - матка и яичники на Фиг. 2 контрольной группы крыс и на Фиг. 3 опытной группы крыс).

10 У крыс, получивших препарат Сат-Сом в дозе 50 мкг белка на 1 кг массы тела, гиперемия рогов матки и яичников у всех крыс выражена ярче. Яичники увеличены в размерах (фото на Фиг. 4 - Матка и яичники контрольной группы крыс; фото на Фиг. 5 - матка и яичники опытной группы крыс).

15 Результаты морфологических исследований яичника и матки у контрольной группы животных

Светооптически яичник животных контрольной группы характеризуется общими чертами его структурной организации и представлен корковым и мозговым веществом с наличием первичных, вторичных, атрезирующих фолликулов и желтых тел (фото на Фиг. 6 - контрольная группа крыс; фото на Фиг. 7 - опытная группа крыс). Фиг. 6: 1 - 20 первичный фолликул, 2 - вторичный фолликул, 3 - атрезирующий фолликул, 4 - желтое тело. Гематоксилин и эозин, об. 4, ок. 10. Фиг. 7: 5 - примордиальный фолликул, 1 - первичный фолликул, 2 - вторичный фолликул, 3 - атрезирующий фолликул, 4 - желтое тело, 6 - стрелками показана гранулеза вторичных фолликулов, 7 - стрелками показана тека вторичных фолликулов. Гематоксилин и эозин, об. 20, ок. 10.

25 Мозговое вещество яичников крыс контрольной группы представлено рыхлой волокнистой неоформленной соединительной тканью, с большим содержанием эластических волокон и небольшим количеством гладких миоцитов, а также артерий, нервов и многочисленных венозных сплетений.

30 При гистологическом исследовании установлено, что стенка матки у крыс контрольной группы состоит из трех оболочек: слизистой (эндометрия), мышечной (миометрия) и серозной (периметрия). Периметрий представлен плотной волокнистой соединительной тканью, покрытой мезотелием. При определении его толщины во всех экспериментальных группах, отличий по данному показателю не выявлено. См. фото на Фиг. 8: 8 - эндометрий, 9 - миометрий, 10 - периметрий, 11 - маточные железы, 12 - 35 маточный эпителий, 6 - стрелками показана гранулеза вторичных фолликулов, 7 - стрелками показана тека вторичных фолликулов. Гематоксилин и эозин, об. 10, ок. 10.

В рогах и теле миометрий состоит из трех слоев - внутреннего (подслизистого), образованного циркулярно ориентированными миоцитами; среднего (сосудистого) с 40 небольшим количеством гладких миоцитов, косопоперечного направления; наружного (надсосудистого) с клетками косопродольной ориентации. Участок слияния тканевых составляющих характеризуется объединением наружной оболочки - периметрия и части миометрия, а именно, его надсосудистого и сосудистого слоев.

Эндометрий состоит из однослойного эпителия, состоящего из реснитчатых и секреторных столбчатых клеток, а также собственной пластинки, которая содержит 45 простые трубчатые железы, иногда разветвляющиеся вблизи миометрия. Важно отметить, что эпителий маточных желез микроморфологически сходен с поверхностным эпителием. Соединительная ткань собственной пластинки представлена большим количеством фибробластов, в межклеточном веществе матрикс преобладает над

волокнами (Фото на Фиг. 8).

Результаты морфологических исследований яичников и матки у опытных групп животных

По результатам микроморфологического анализа у животных опытных групп по сравнению с микроморфологическим анализом органов крыс контрольной группы, выявлен комплекс структурных преобразований, проявляющихся в увеличении размеров всех групп фолликулов и количества образующихся после овуляции желтых тел, утолщении гранулезы и усилении васкуляризации соединительно-тканной оболочки вторичных фолликулов, что может свидетельствовать о регулирующем влиянии негормонального препарата Сат-Сом на фолликулогенез и на репродуктивные характеристики крыс. Примордиальные фолликулы у крыс опытных групп по сравнению с примордиальными фолликулами интактных животных, увеличены в размерах, при этом лидируют по этому показателю яичники крыс 2 опытной группы, которым вводили препарат в дозе 50 мкг/кг (увеличение на 58%), опережая при этом аналогичный показатель у крыс 1 опытной группы, в которой различие с размерами примордиальных фолликулов группы контроля составляет 38%. Количественные характеристики примордиальных фолликулов существенно не различаются у крыс 1, 2 опытных групп, превосходя по этому показателю аналогичные характеристики примордиальных фолликулов у крыс контрольной группы (Фото на Фиг. 9, 10, 12, 13).

Фиг. 9: Структурная организация яичника в группе животных, получивших препарат 25 мкг/кг. 1 - первичный фолликул, 2 вторичный фолликул, 3 - атрезирующий фолликул, 4 - желтое тело, 13 - третичный фолликул (граафов пузырек). Гематоксилин и эозин, об. 4, ок. 10.

Фиг. 10: Структурная организация яичника в группе животных, получивших препарат 25 мкг/кг. 5 - примордиальный фолликул, 1 - первичный фолликул, 2 - вторичный фолликул, 3 - атрезирующий фолликул, 6 - стрелками показана гранулеза вторичных фолликулов, 7 - стрелками показана тека вторичных фолликулов. Гематоксилин и эозин, об. 20, ок. 10.

Фиг. 12: Структурная организация яичника в группе животных, получивших препарат в дозе 50 мкг/кг. 1 - первичный фолликул, 2 - вторичный фолликул, 3 - атрезирующий фолликул, 4 - желтое тело. Гематоксилин и эозин, об. 4, ок. 10.

Фиг. 13: Микроморфология яичника в группе животных, получивших препарат в дозе 50 мкг/кг. 5 - примордиальный фолликул, 1 - первичный фолликул, 2 - вторичный фолликул, 3 - атрезирующий фолликул, 6 - стрелками показана гранулеза вторичных фолликулов, 7 - стрелками показана тека вторичных фолликулов, 4 - желтое тело. Гематоксилин и эозин, об. 10, ок. 10.

Размеры первичных фолликулов крыс опытных групп, по сравнению с аналогичным показателем у крыс контрольной группы, достоверно ($p \leq 0,05$) увеличены, при одновременном возрастании их количества у животных группы контроля по сравнению с аналогичным показателем в опытных группах.

Вторичные малые и крупные фолликулы характеризуются утолщением гранулезы и степенью васкуляризации теки у крыс опытных групп, при одновременном увеличении количества фолликулов и их морфометрических показателей. Аналогичная тенденция отмечена при исследовании микроморфологических количественных и качественных показателей желтых тел яичников животных опытных групп. Морфологическая характеристика атрезирующих фолликулов свидетельствует об изменении гормонального статуса в организме животных опытных групп, что подтверждается достоверным увеличением их количества и размеров.

При исследовании структурной организации матки у животных установлено, что у крыс опытных групп, по сравнению со структурной организацией матки у крыс контроля, толщина эндометрия и количество маточных желез увеличиваются. Более того, выявлено утолщение мышечной оболочки матки у крыс опытных групп, по сравнению с аналогичными показателями у животных контрольной группы (Фото на Фиг. 11, 14).

Фиг. 11: Структурная организация матки в группе животных, получивших препарат в дозе 25 мкг/кг. 8 - эндометрий, 9 - миометрий, 10 - периметрий, 11 - маточные железы, 12 - маточный эпителий, 6 - стрелками показана гранулеза вторичных фолликулов, 7 - стрелками показана тека вторичных фолликулов. Гематоксилин и эозин, об. 10, ок. 10.

Фиг. 14: Структурная организация матки в группе животных, получивших препарат в дозе 50 мкг. 8 - эндометрий, 9 - миометрий, 10 - периметрий, 11 - маточные железы, 12 - маточный эпителий, 6 - стрелками показана гранулеза вторичных фолликулов, 7 - стрелками показана тека вторичных фолликулов. Гематоксилин и эозин, об. 10, ок. 10.

В таблице 4 приведена сравнительная характеристика размеров яичников крыс контрольной и опытных групп по показателю толщины фолликулов, мкм ($p \leq 0,05$).

Таблица 4

Экспериментальные группы	Примордиальные фолликулы	Первичные фолликулы		Вторичные фолликулы	
		малые	большие	малые	большие
Контроль	20,1±4,56	33,5±3,16	65,7±9,24	95,4±8,13	214±12,1
1 опытная	27,5±3,36	36,8±6,12	66,1±7,12	110±13,8	246±11,5
2 опытная	34,8±6,12*	42,4±5,16*	68,5±8,48	123±14,1*	301±17,6*

* - значения достоверны по сравнению со значениями контрольной группы ($p \leq 0,05$)

В таблице 5 приведены показатели толщины гранулезы вторичных фолликулов яичников крыс контрольной и опытных групп, мкм ($p \leq 0,05$).

В таблице 6 приведены сведения о степени васкуляризации вторичных фолликулов (антральных) яичников крыс контрольной и опытных групп по показателю толщины теки, мкм ($p \leq 0,05$).

В таблице 7 представлена сравнительная характеристика эндометрия и миометрия матки крыс контрольной и опытных групп по показателю толщины тканей, мкм ($p \leq 0,05$).

Таблица 5

Экспериментальные группы	Вторичные фолликулы	
	малые	большие (зрелые)
Контроль	11,3±5,34	28,6±8,28
1 опытная	13,5±3,71	31,4±4,53*
2 опытная	14,2±1,53	46,7±7,21*

* - значения достоверны по сравнению со значениями контрольной группы (p≤0,05)

Таблица 6

Экспериментальные группы	Вторичные фолликулы	
	малые	большие (зрелые)
Контроль	8,28±2,11	12,9±2,37
1 опытная	10,2±1,36	13,7±1,96
2 опытная	12,1±1,23*	25,4±3,89*

* - значения достоверны по сравнению со значениями контрольной группы (p≤0,05)

Таблица 7

Экспериментальные группы	Эндометрий	Миометрий
Контроль	485±11,5	262±7,86
1 опытная	496±9,51	316±8,19*
2 опытная	582±10,1*	341±9,33*

* - значения достоверны по сравнению со значениями контрольной группы (p≤0,05).

В таблице 8 приведены данные о содержании гормонов в сыворотке крови у крыс контрольной и 2 опытной групп.

Таблица 8

Экспериментальные группы	Тестостерон, нг/мл	Эстрадиол, пг/мл	Прогестерон, нмоль/л
Контроль	0,3162 ±0,004	309,689± 15,65	37,65± 2,85
2 опытная	0,6824±0,001	558,70±18,72	66,54±3,14

Как следует из данных, представленных в таблице 8, содержание в сыворотке крови животных половых гормонов, которым вводили негормональный препарат Сат-Сом в дозе 50 мкг/кг массы тела дважды с межинъекционным интервалом 14 суток, достоверно отличается от аналогичных показателей в группе контроля.

Экспериментальные данные, представленные в таблицах 4-8, убедительно доказывают

опосредованное (через увеличение содержания в организме животных соматотропного гормона) стимулирующее влияние негормонального препарата Сат-Сом на процессы фолликулогенеза.

5 Реализация изобретения позволит предложить для клинической практики негормональный соматостатинсодержащий препарат для стимуляции фолликулогенеза за счет увеличения концентрации в сыворотке крови половых гормонов (тестостерон, прогестерон, эстрадиол) и индукции комплексных перестроек адаптивного геноза, выражающихся в структурных преобразованиях органов репродуктивной системы, и направленных на повышение женского воспроизводительного потенциала, при
10 использовании препарата для инъекций с низкой реактогенностью адьюванта, позволяющего осуществлять инъекции без болезненных ощущений.

(57) Формула изобретения

1. Препарат для стимуляции фолликулогенеза, содержащий суспензию химерного
15 белка с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp)_n, где n=1, 2, 4, 8, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC в рафинированном растительном масле с добавлением апиrogenной воды для инъекций.

2. Препарат по п. 1, отличающийся тем, что он содержит химерный белок с
20 водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp)_n, где n=1, 2, 4, 8, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC из расчета 100-250 мг указанного химерного белка на 100 мл рафинированного растительного
25 масла, включающего 5,0-10,0 мас.% апиrogenной воды для инъекций.

3. Препарат по п. 1 или 2, отличающийся тем, что используется рафинированное хлопковое масло или рафинированное арахисовое масло.

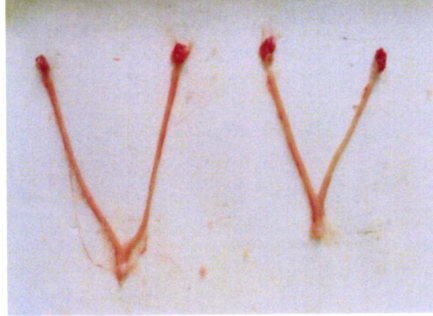
4. Способ стимуляции фолликулогенеза, предусматривающий двукратную подкожную
инъекцию препарата, содержащего суспензию химерного белка с водонерастворимой
30 ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp)_n, где n=1, 2, 4, 8, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC в рафинированном растительном масле с добавлением апиrogenной воды для инъекций, из расчета 25-50 мкг указанного химерного белка на 1 кг живой массы тела с межинъекционным интервалом 14 суток.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что используют препарат в виде водно-масляной
35 суспензии химерного белка с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp)_n, где n=1, 2, 4, 8, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC в количестве из расчета 100-250
40 мг указанного химерного белка на 100 мл рафинированного растительного масла, включающего 5,0-10,0 мас.% апиrogenной воды для инъекций.

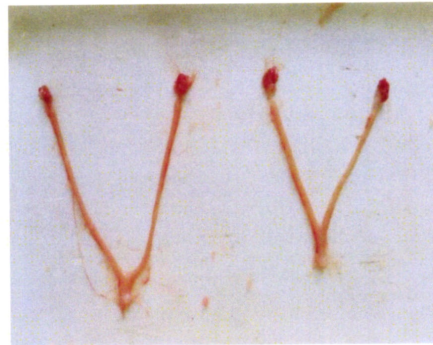
6. Способ по любому из пп. 4 или 5, отличающийся тем, что используют препарат, содержащий рафинированное хлопковое масло или рафинированное арахисовое масло.

45

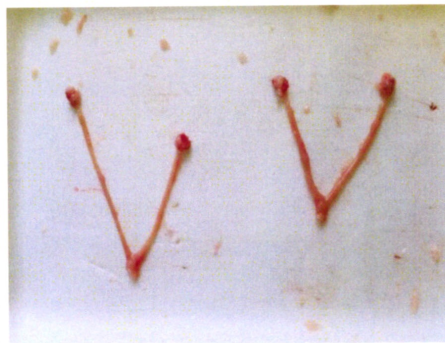
1



Фиг.1



Фиг.2



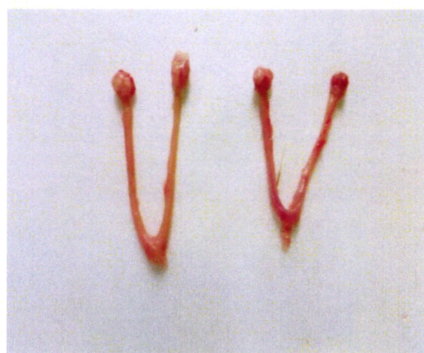
Фиг.3

1

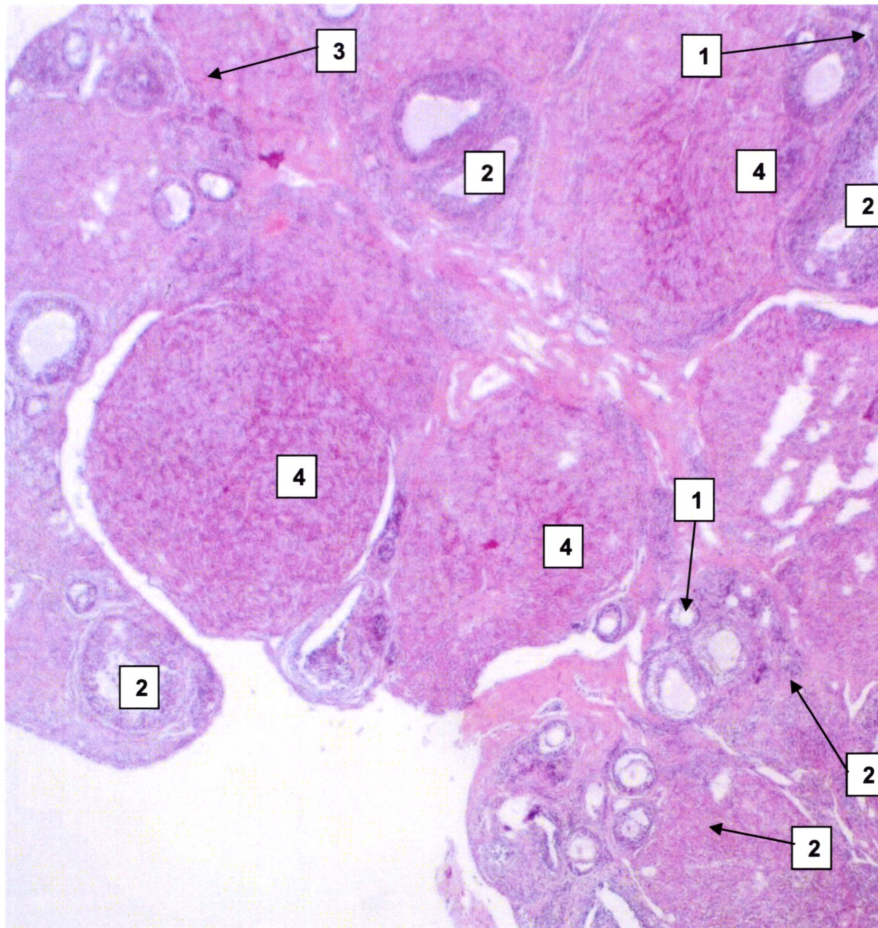
2



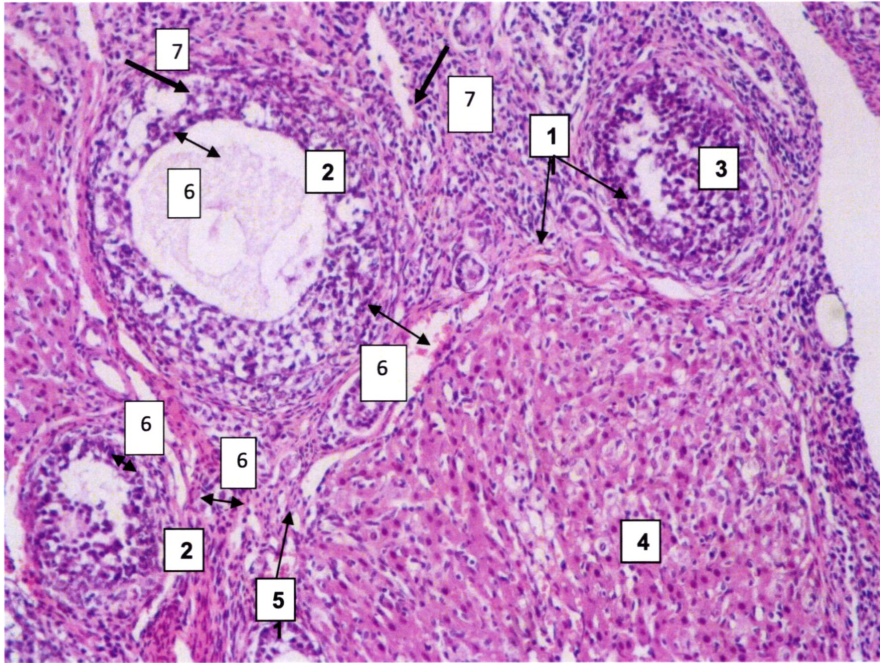
Фиг.4



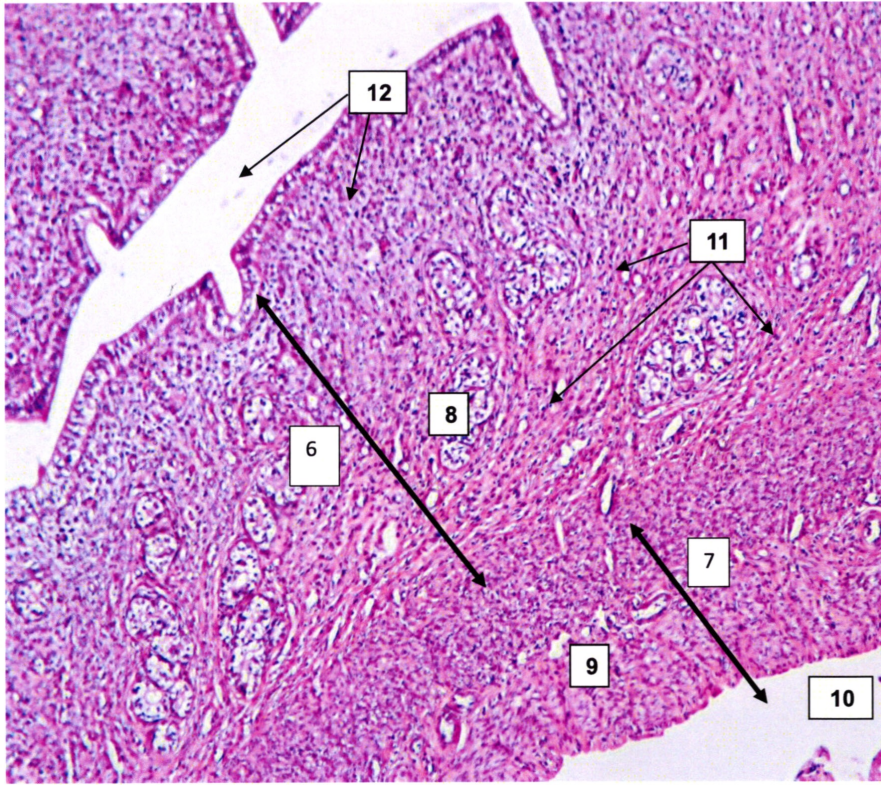
Фиг.5



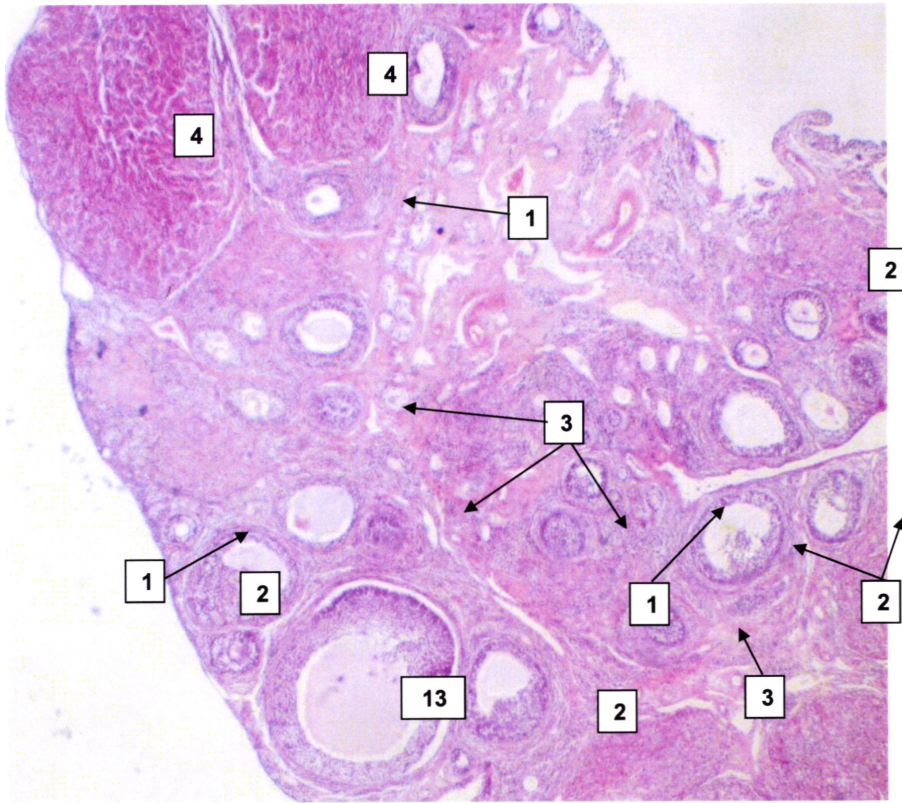
Фиг.6



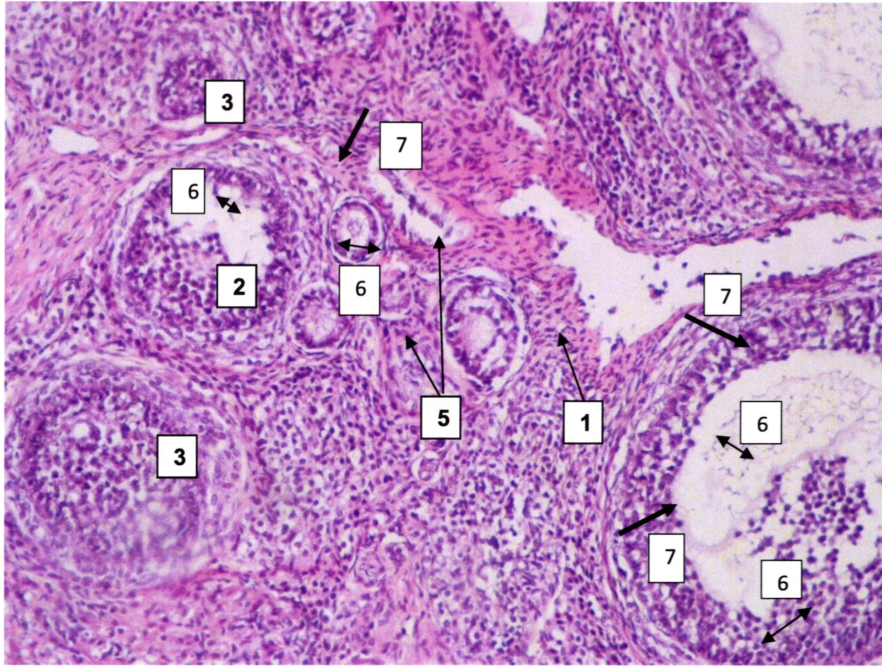
Фиг.7



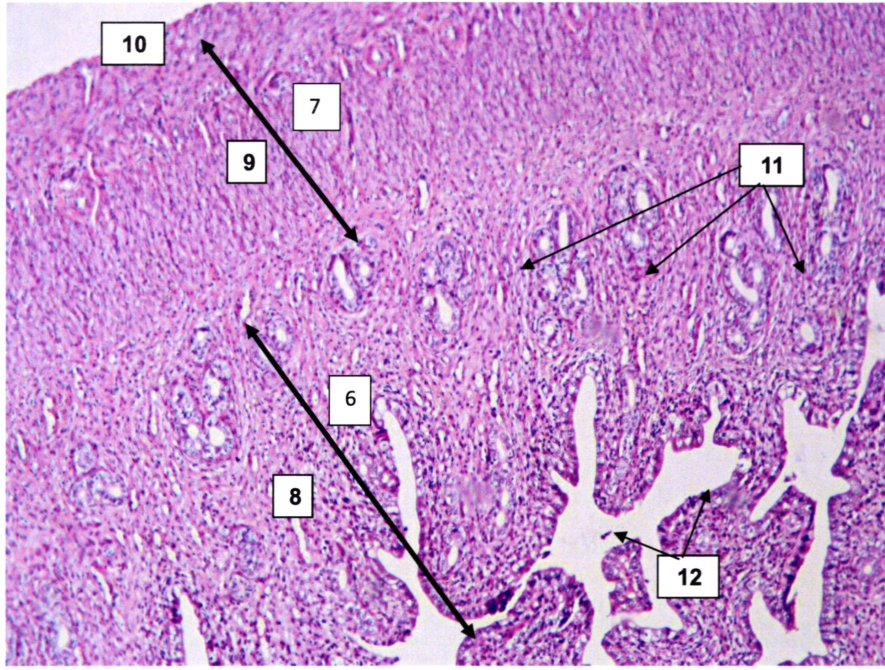
Фиг.8



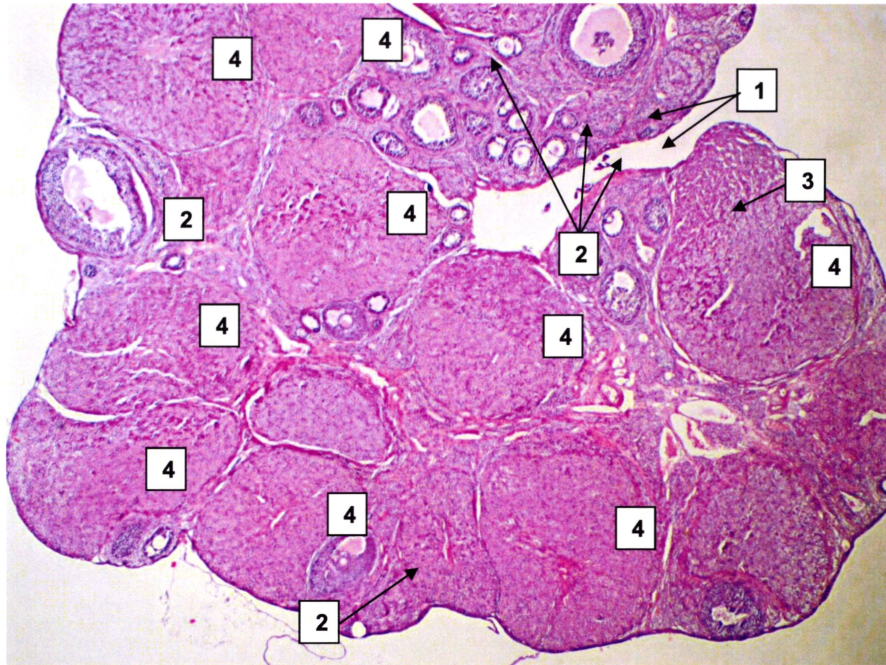
Фиг. 9



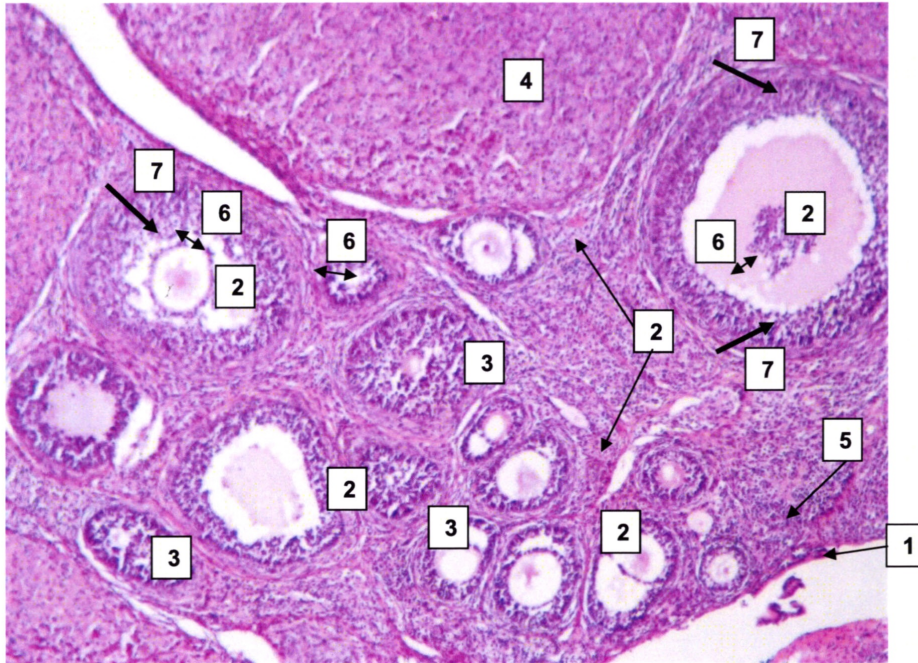
Фиг.10



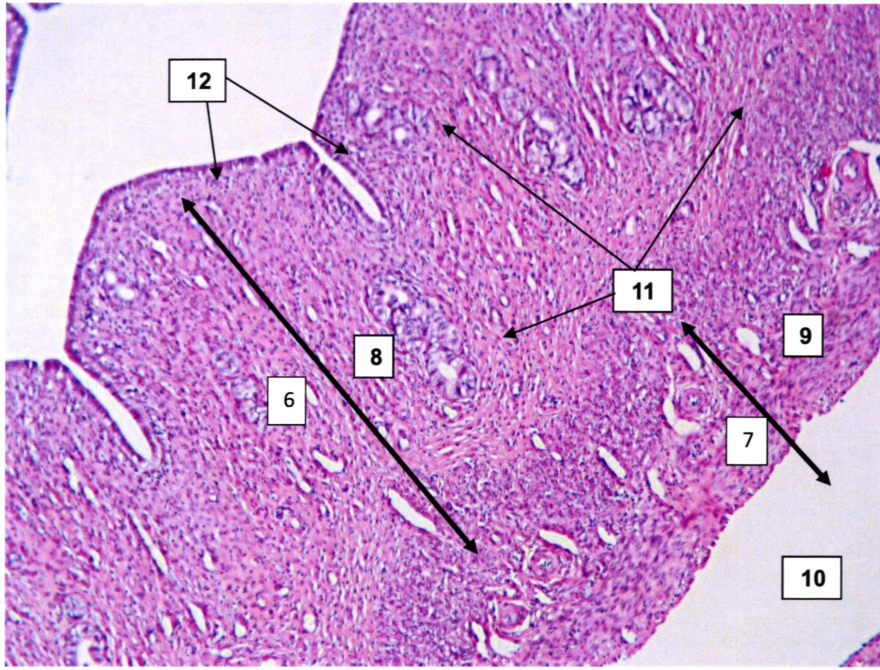
Фиг.11



Фиг.12



Фиг.13



Фиг.14