



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01057**

(22) Data de depozit: **24.10.2011**

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. **6/2012**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ A BANATULUI
TIMIȘOARA, CALEA ARADULUI NR. 119,
TIMIȘOARA, TM, RO**

(72) Inventatori:
• **PĂCALĂ NICOLAE, CALEA ARADULUI
NR. 105, BL. 1/B, SC. B, AP. 8, TIMIȘOARA,
TM, RO;**
• **DUMITRESCU GABI, STR. LOICHIȚĂ
VASILE NR. 1-3, SC. C, AP. 27,
TIMIȘOARA, TM, RO;**

• **CEAN ADA, STR. BRÂNDUȘEI NR. 8,
SC. A, AP. 18, TIMIȘOARA, TM, RO;**
• **IVAN ALEXANDRA,
CALEA AUREL VLAICU, BL. Z 25, SC. A,
AP. 21, ARAD, AR, RO;**
• **BENCȘIK IOAN, STR. FC. RIPENSIA
NR. 32, AP. 9, TIMIȘOARA, TM, RO;**
• **DRONCA DOREL DĂNUȚ,
STR. DOROBANȚILOR BL. D1, SC. C,
AP. 6, TIMIȘOARA, TM, RO**

(54) **METODĂ CITOMORFOMETRICĂ PENTRU EVALUAREA
VIABILITĂȚII EMBRIONILOR DE ȘOARECE DE LABORATOR**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o metodă citomorfo-
metrică pentru evaluarea viabilității embrionilor de
șoarece de laborator. Metoda constă în determinarea
parametrilor morfometrici ai embrionilor, reprezentați de
grosimea zonei peludice, diametrul exterior și diametrul
interior, pentru care există diferențe semnificative între

embrionii viabili și cei neviabili, în același stadiu de
dezvoltare.

Revendicări: 3
Figuri: 6





DESCRIERE

METODĂ CITOMORFOMETRICĂ PENTRU EVALUAREA VIABILITĂȚII EMBRIONILOR DE ȘOARECE DE LABORATOR

Cu ajutorul metodei, conform invenției, se stabilește viabilitatea embrionilor preimplanționali de șoareci de laborator. Această determinare se face în scopul selecționării mai precise a embrionilor viabili utilizabili în experimentele de biotehnologii asociate embrionilor (congelare, transgeneză, clonare embrionară, microchirurgie embrionară, testare de medii sintetice de cultură, etc.), fără să fie afectată integritatea morfologică și funcțională a acestora.

Se cunosc mai multe metode de determinare a viabilității embrionilor de mamifere.

Una dintre acestea este **evaluarea după criteriile morfologice**. Acest procedeu constă din evaluarea la stereomicroscop a embrionilor, luându-se în considerare caracteristicile morfologice: integritatea zonei pelucide, forma embrionului, prezența blastomerelor extrudate, prezența sau absența vacuolelor intracitoplasmice, uniformitatea dimensiunilor blastomerelor, corelate cu vârsta embrionului. Procedeu este neinvaziv pentru embrion, dar este foarte subiectiv, depinzând în foarte mare măsură de expertiza evaluatorului. De aceea, fiabilitatea metodei este până la 80%, pentru un evaluator experimentat.

O altă metodă constă din **testarea integrității membranelor celulare** cu ajutorul unor coloranți (Neural Red, Trypan Blue și FDA), care au capacitatea de a penetra membranele celulelor vii (Neural Red și FDA) sau moarte (Trypan Blue). Fiabilitatea metodei este ridicată, dar coloranții afectează viabilitatea embrionilor.

Determinarea viabilității embrionilor prin **evidențierea activității enzimice** a celulelor embrionare cu ajutorul unor fluorocromi (FDA, Iodură de propidiu). Aceștia sunt metabolizați de către enzimele celulelor, rezultând compuși fluorescenți care imprimă fluorescență celulelor embrionare, putând fi evidențiate cu ajutorul unui microscop cu fluorescență. Metoda este fiabilă, dar fluorocromii afectează viabilitatea embrionilor.

Cultivarea embrionilor pe termen scurt (12-24 de ore) în incubatoare cu temperatură și atmosferă controlată și monitorizarea evoluției a acestora. Metoda este aplicabilă, numai pentru embrioni în stadii timpurii de dezvoltare, este neinvazivă dar prezintă dezavantajele că solicită echipamente costisitoare, necesită timp îndelungat pentru stabilirea viabilității, iar condițiile de mediu artificial afectează viabilitatea embrionilor, dacă sunt cultivați timp de 24 de ore.

Metoda, conform invenției, pentru evaluarea viabilității embrionilor de șoarece, se bazează pe **evaluarea dimensiunilor principalilor parametri de morfometrie** care condiționează viabilitatea embrionilor (grosimea zonei pelucide, diametrul

1

interior și exterior al embrionilor). Determinarea acestor parametri se poate efectua cu ajutorul ocularului micrometric sau cu ajutorul unor softuri de citomorfometrie.

Avantajele metodei de evaluare a viabilității embrionilor, conform acestei invenții, constau din:

- metoda este simplă;
- este ieftină;
- nu afectează integritatea embrionilor;
- este o metodă rapidă;
- este aplicabilă la embrionii de șoarece de laborator care sunt utilizați în diverse experimente de biotehnologii asociate embrionului, deoarece oferă posibilitatea selectării obiective a embrionilor viabili care, spre deosebire de celelalte metode care afectează viabilitatea, pot continua dezvoltarea după evaluare.

Descrierea metodei: după recoltare, embrionii sunt plasați într-o placă Petri, în mediu de cultură. Plăcuța cu embrionii se examinează la un stereomicroscop cu cameră foto, se fotografiază embrionii din câmpul microscopic, notându-se mărimea obiectivului și a ocularului stereomicroscopului. Plăcuța Petri, cu embrionii, se introduce în incubatorul cu temperatură și atmosferă controlată. Mai departe, măsurătorile se efectuează pe captura de imagine efectuată anterior. Pot fi evaluați următorii parametri: grosimea zonei pelucide (μm), diametrul exterior (μm), diametrul interior (μm), perimetrul exterior (μm), perimetrul interior (μm). **Grosimea zonei pelucide** se determină în zone diferite, luându-se în considerare media valorilor măsurate. **Diametrul exterior** se măsoară pe fața externă a zonei pelucide, în puncte diferite, luându-se în considerare media valorilor măsurate. **Diametrul interior** se măsoară pe fața interioară a zonei pelucide, în puncte diferite, luându-se în considerare media valorilor măsurate. **Perimetrul exterior** se determină conturând, cât mai fidel, fața externă a zonei pelucide. **Perimetrul interior** se determină conturând, cât mai fidel, fața internă a zonei pelucide. (figura 1).

Pentru efectuarea morfometriei embrionilor, am utilizat softul citomorfometric Quick Photo Micro 2.2. (figurile 2, 3, 4 și 5).

În figura 6, sunt redați parametrii morfometrici caracteristici embrionilor viabili și neviabili de șoarece, rezultați în urma măsurătorilor efectuate cu softul Quick Photo Micro 2.2., precum și aspectul morfologic al acestora.

În urma analizei datelor cu privire la parametrii morfometrici ai embrionilor viabili și neviabili am stabilit următoarele valori pentru embrionii viabili și neviabili, în diferite stadii de dezvoltare:

- zigoții viabili au grosimea zonei pelucide de $8,5 \pm 0,9 \mu\text{m}$, diametrul interior de $94,4 \pm 4,6 \mu\text{m}$ și diametrul exterior de $111,9 \pm 5,1 \mu\text{m}$;
- zigoții neviabili au grosimea zonei pelucide de $8,0 \pm 1,5 \mu\text{m}$, diametrul interior de $99,4 \pm 3,1 \mu\text{m}$ și diametrul exterior de $118,1 \pm 10,4 \mu\text{m}$;
- embrionii viabili de 2 celule au grosimea zonei pelucide de $9,2 \pm 1,3 \mu\text{m}$, diametrul interior de $98,0 \pm 2,1 \mu\text{m}$ și diametrul exterior de $116,6 \pm 3,0 \mu\text{m}$;
- embrionii neviabili de 2 celule au grosimea zonei pelucide de $8,0 \pm 1,5 \mu\text{m}$, diametrul interior de $98,0 \pm 2,1 \mu\text{m}$ și diametrul exterior de $117,8 \pm 3,5 \mu\text{m}$;



0-2011-01057--

24-10-2011

- embrionii viabili, în stadiul de morulă, au grosimea zonei pelucide de $10,8 \pm 1,1 \mu\text{m}$, diametrul interior de $98,7 \pm 3,1 \mu\text{m}$ și diametrul exterior de $118,6 \pm 6,0 \mu\text{m}$;
- embrionii neviabili, în stadiul de morulă, au grosimea zonei pelucide de $8,6 \pm 1,1 \mu\text{m}$, diametrul interior de $105,8 \pm 6,8 \mu\text{m}$ și diametrul exterior de $116,5 \pm 3,7 \mu\text{m}$;
- embrionii viabili, în stadiul de blastocist, au grosimea zonei pelucide de $7,3 \pm 1,0 \mu\text{m}$, diametrul interior de $111,9 \pm 5,3 \mu\text{m}$ și diametrul exterior de $120,8 \pm 6,1 \mu\text{m}$;
- embrionii neviabili, în stadiul de blastocist, au grosimea zonei pelucide de $9,1 \pm 1,0 \mu\text{m}$, diametrul interior de $106,0 \pm 4,4 \mu\text{m}$ și diametrul exterior de $111,7 \pm 7,9 \mu\text{m}$.

REVENDICĂRI

1. Metoda de evaluare a viabilității embrionilor, prin citomorfometrie, **caracterizată prin determinarea grosimii zonei pelucide**, poate fi aplicată la embrionii preimplantaționali în toate stadiile de dezvoltare (zigot, stadiul de 2 celule, stadiul de morulă și stadiul de blastocist). Grosimea zonei pelucide la zigoți are o valoare medie de $8,5 \pm 0,9 \mu\text{m}$ și este semnificativ mai mare comparativ cu grosimea zonei pelucide la ovocitele nefecundate ($8,0 \pm 1,5$) ($p \leq 0,001$, testul T). Grosimea zonei pelucide la embrionii neviabili de 2 celule este semnificativ mai mică ($8,0 \pm 1,5 \mu\text{m}$) comparativ cu grosimea zonei pelucide la embrionii viabili în stadiul de două celule ($9,2 \pm 1,3 \mu\text{m}$) ($p \leq 0,05$, testul T). Grosimea zonei pelucide la embrionii neviabili în stadiul de morulă ($8,6 \pm 1,1 \mu\text{m}$) este mai mică comparativ cu grosimea zonei pelucide la embrionii viabili în stadiul de morulă ($10,8 \pm 1,1 \mu\text{m}$), diferențele fiind foarte semnificative ($p \leq 0,001$, testul T). Grosimea zonei pelucide la embrionii neviabili în stadiul de blastocist ($9,1 \pm 1,0 \mu\text{m}$) este mai mare comparativ cu grosimea zonei pelucide la embrionii viabili în stadiul de blastocist ($7,3 \pm 1,0 \mu\text{m}$), diferențele fiind foarte semnificative ($p \leq 0,001$, testul T).

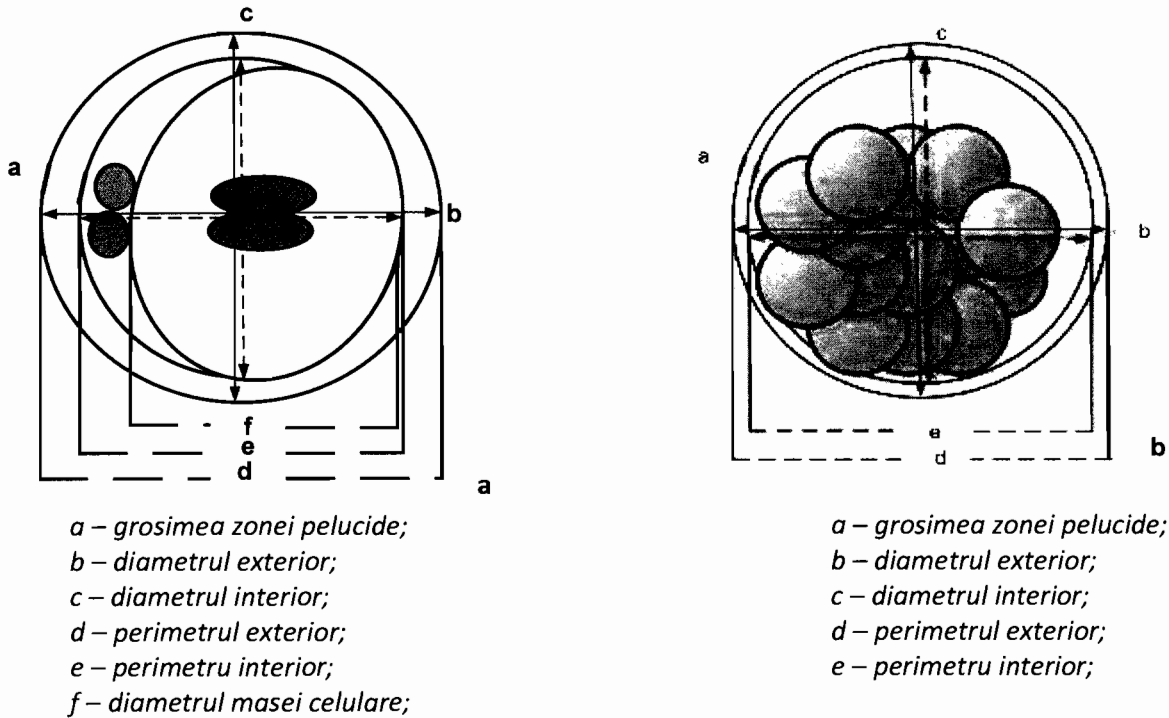
2. Metoda de evaluare a viabilității embrionilor, prin citomorfometrie, **caracterizată prin determinarea diametrului interior al embrionului**, poate fi aplicată numai la embrionii preimplantaționali în stadii avansate de dezvoltarea (stadiul de morulă și stadiul de blastocist). Diametrul interior la embrionii neviabili în stadiul de morulă este mai mare ($105,8 \pm 6,8 \mu\text{m}$), comparativ cu diametrul interior pentru embrionii viabili în stadiul de morulă ($98,7 \pm 3,1 \mu\text{m}$), diferențele fiind foarte semnificative statistic ($p \leq 0,001$, testul T). Diametrul interior, la embrionii neviabili în stadiul de blastocist ($106,0 \pm 4,4 \mu\text{m}$) este mai mic comparativ cu embrionii viabili în stadiul de blastocist ($111,9 \pm 5,3 \mu\text{m}$), diferențele fiind asigurate statistic ($p \leq 0,001$, testul T).

3. Metoda de evaluare a viabilității embrionilor, prin citomorfometrie, **caracterizată prin determinarea diametrului exterior al embrionului**, poate fi aplicată numai la embrionii preimplantaționali în stadiul de blastocist. Diametrul exterior, la embrionii neviabili în stadiul de blastocist ($111,7 \pm 7,9 \mu\text{m}$) este mai mic comparativ cu embrionii viabili în stadiul de blastocist ($120,8 \pm 6,1 \mu\text{m}$), diferențele fiind asigurate statistic ($p \leq 0,001$, testul T).



FIGURI

**METODĂ CITOMORFOMETRICĂ PENTRU EVALUAREA VIABILITĂȚII
EMBRIONILOR DE ȘOARECE DE LABORATOR**



**Figura 1. Schematizarea modului de efectuare a măsurătorilor
morfometrice pe ovocite și embrionii de șoarece**

Handwritten signatures and a date '1' at the bottom of the page.

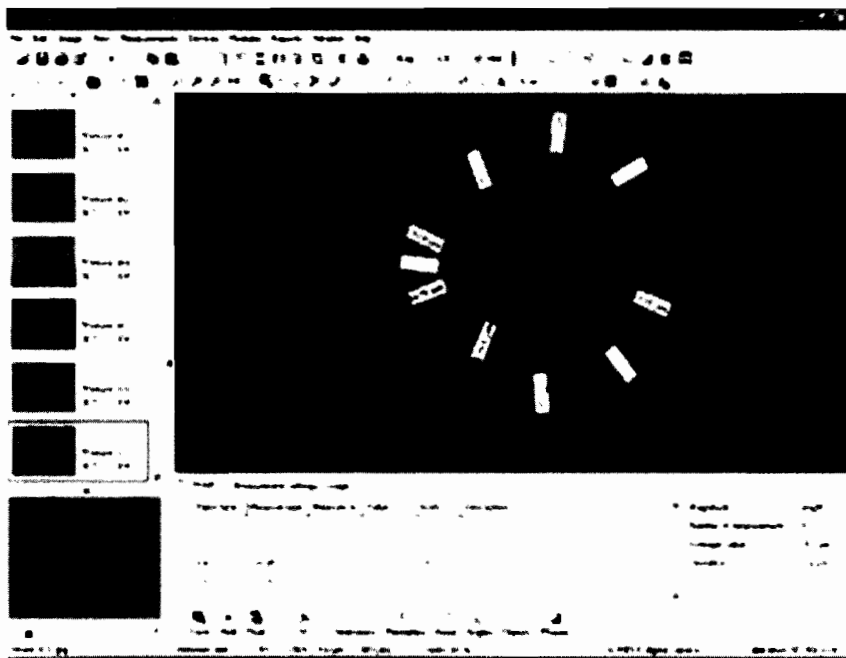


Figura 2. Determinarea grosimii zonei pelucide la embrionii de șoarece cu soft-ul Quick Photo Micro 2.2.

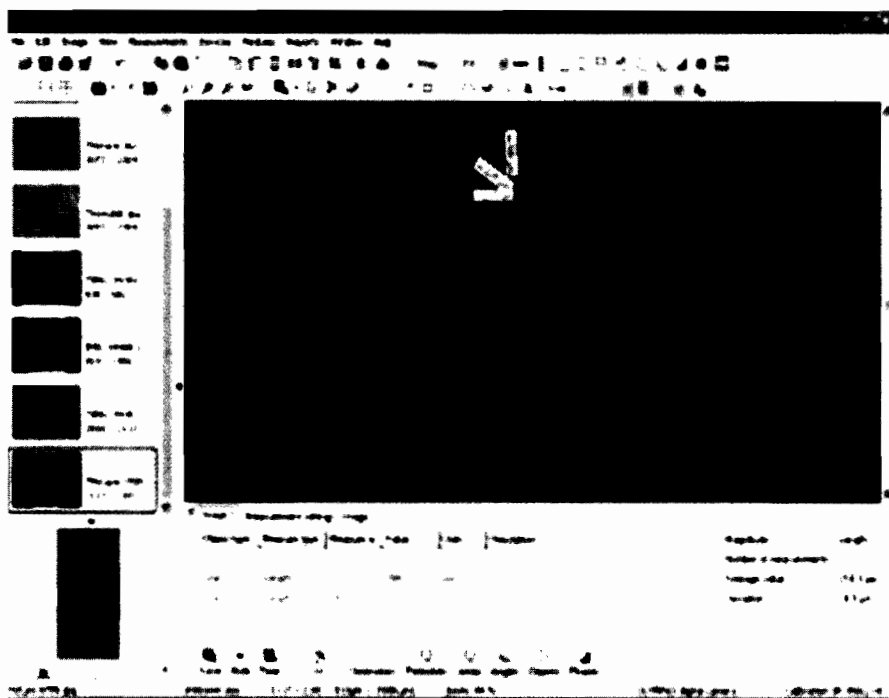


Figura 3. Determinarea diametrului exterior la embrionii de șoarece cu soft-ul Quick Photo Micro 2.2

Handwritten signatures and initials at the bottom of the page, including a large signature on the left, a smaller one in the middle, and a signature on the right.

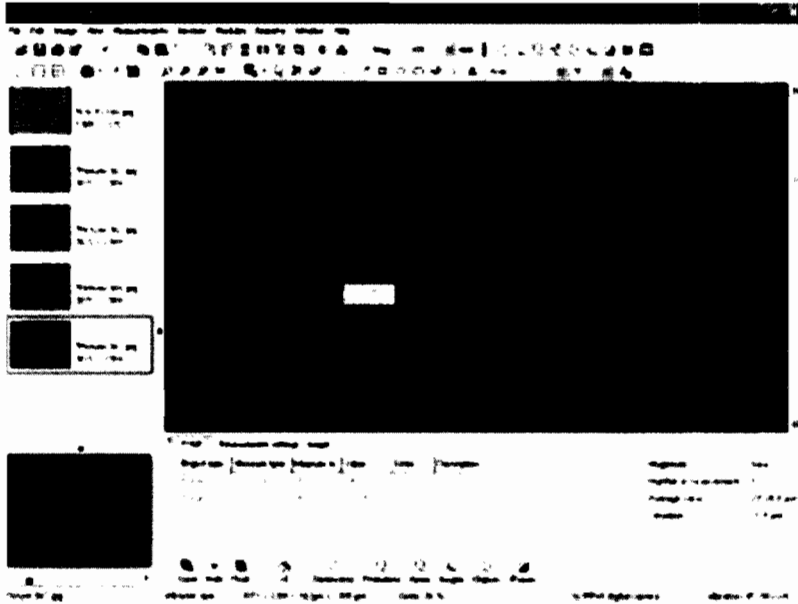


Figura 4. Determinarea perimetrului exterior la embrionii de șoarece cu soft-ul Quick Photo Micro 2.2

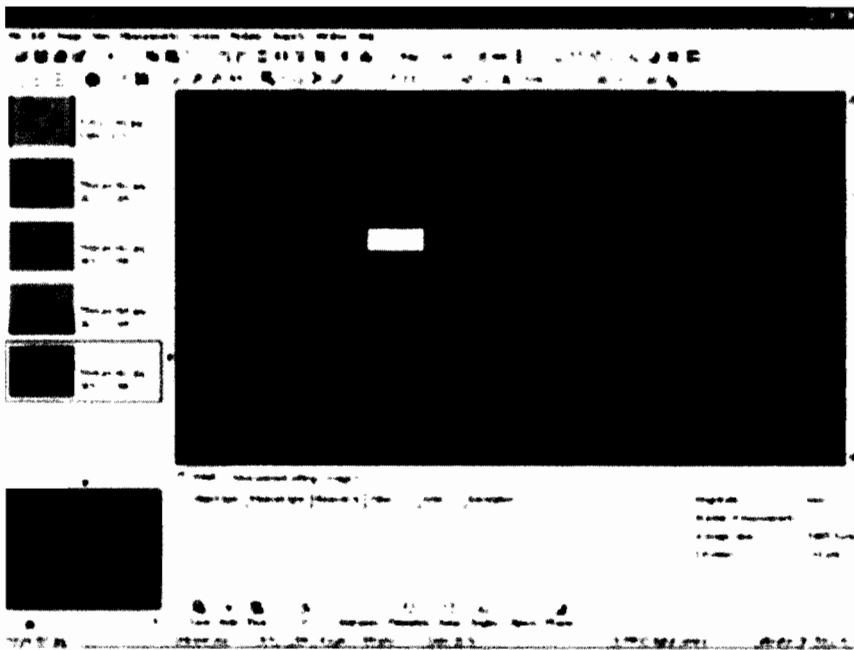


Figura 5. Determinarea perimetrului interior la embrionii de șoarece cu soft-ul Quick Photo Micro 2.2.

[Handwritten signatures and marks]

3

24-10-2011

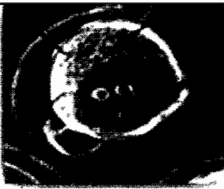







Stadiul de dezvoltare embrioni	Calitate (viabilitate)	Aspect morfologic embrioni	Parametrii morfometrici		
			Grosimea zonei pelucide (μm)	Diametrul interior (μm)	Diametrul exterior (μm)
			$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
Zigot	Viabili		8,5±0,9	94,4± 4,6	111,9±5,1
	Neviabili		8,0±1,5	99,4± 3,1	118,1± 10,4
2 celule	Viabili		9,2± 1,3	98,0±2,1	116,6±3,0
	Neviabili		8,0± 1,5	98,0± 2,1	117,8±3,5
Morulă	Viabili		10,8± 1,1	98,7±3,1	118,6±6,0
	Neviabili		8,6±1,1	105,8± 6,8	116,5±3,7
Blastocist	Viabili		7,3± 1,0	111,9±5,3	120,8±6,1
	Neviabili		9,1±1,0	106,0±4,4	111,7±7,9

Figura 6. Parametrii morfometrici determinați pentru embrionii viabili (codul 1, 2 și 3 de calitate) și neviabili (codul 4 de calitate) de șoarece

