



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01324

(22) Data de depozit: 06.12.2011

(41) Data publicării cererii:
28.09.2012 BOPI nr. 9/2012

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "OVIDIUS"
CONSTANȚA, BD. MAMAIA NR.124,
CONSTANȚA, CT, RO

(72) Inventatori:
• DOBRIN NICOLAE, ALEEA PAJUREI,
NR.9, BL.FE6, SC.A, ET.1, AP.7,
BUCUREȘTI, B, RO;

• ANGHEL ANDREEA HORTANSE,
STR.FĂGETULUI, NR.29, CONSTANȚA, CT,
RO;
• NADOLU DORINA, STR.DEZROBIRII,
NR.143, BL.IV22, SC.B, ET.3, AP.25,
CONSTANȚA, CT, RO

(54) MEDIU SALIN PENTRU CONGELAREA CELULELOR
SPERMATICE DE ȚAP CU ADAOS DE ANTIOXIDANȚI

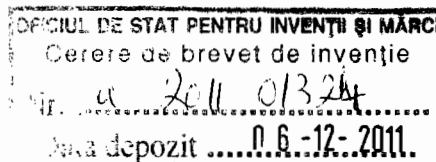
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un mediu de diluție pentru crioconservarea celulelor spermactice de țap. Mediul conform invenției este constituit din 10 mM cisteină, 375 mM tris-(hidroxietil)aminometan, 124 mM acid citric anhidru, 41,6 mM fructoză, 1000 UI/ml penicilină G sodică, 1 mg/ml sulfat de streptomycină, 20% în volum

gălbenuș de ou, are o valoare pH de 6,8 la 37°C, și o osmolalitate de 440 mOsm/kg, măsurată pe baza punctului de îngheț.

Revendicări: 1





Mediu salin pentru congelarea celulelor spermatice de țap cu adaos de antioxidanți

Invenția se referă la un mediu de diluție salin utilizat în domeniul medicinei veterinare și zootehniei pentru congelarea în azot lichid a celulelor spermatice de țap.

Este cunoscut faptul că diluarea spermei este necesară în scopul creșterii volumului unui ejaculat, asigurarea la nivel de doză a unei concentrații de 8×10^7 de celule spermatice, din care să se însămânțeze un număr mai mare de femele. De aceea, calitatea diluantului este deosebit de importantă pentru spermatozoizi, aceștia bazându-și metabolismul și echilibrul osmotic pe substanțele existente în mediul artificial în care sunt puși.

De asemenea, fertilitatea redusă asociată inseminării artificiale cu spermă congelată este atribuită proceselor care decurg pe timpul congelării, când 10-50% dintre spermatozoizi nu rezistă acestui proces și mor. În condițiile montei naturale sperma este expusă în special unor condiții anaerobice, care limitează generarea de specii reactive ale oxigenului. În condițiile conservării, însă, sperma este expusă oxigenului, iar diferitele etape din cursul procesării pot conduce de asemenea la creșterea producției de specii reactive ale oxigenului și scăderea apărării antioxidante (diluția plasmei seminale, deteriorarea enzimelor pe timpul congelării).

Un alt dezavantaj constă în faptul că spermatozoizii sunt și mai susceptibili de a suferi modificări provocate de stresul oxidativ, deoarece membrana lor plasmatică conține mari cantități de acizi grași polinesaturați, iar citoplasma lor conține cantități scăzute de enzime antioxidante.

Până în prezent s-au folosit numeroase medii de diluție, atât saline, dar și pe bază de lapte, pentru conservarea prin congelare a materialului seminal de țap.

Soluțiile cunoscute pentru conservarea materialelor seminare ovine prezintă dezavantajul unei protecții insuficiente pentru obținerea unor indici criobiotici crescuți consecutiv testării *in vitro* și *in vivo*.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă din prepararea unui mediu pentru conservarea unui material seminal de țap care asigură protecția antioxidantă crescută a celulelor crioconservate pentru utilizare în contrasezon de reproducție.

Mediul de diluție, conform invenției, elimină dezavantajele menționate prin aceea că este constituit din 10mM cisteină, 375mM tris (hidroxietil)- aminometan, 124mM acid citric anhidru, 41,6mM fructoză, 1000 UI/ml penicilina G sodium, 1mg/ml streptomycin sulfat, 20% în volum gălbenuș de ou, având o valoare pH de 6,8 la temperatura de 37°C și o osmolalitate, măsurată pe baza punctului de îngheț, de 440 mOsm/kg.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- motilitate spermatozoizi post decongelare de peste 62%
- viabilitate post decongelare de peste 65%
- fecunditate după inseminarea intracervicală cu material seminal congelat, în contrasezon de reproducție de peste 70%
- fecunditate după inseminarea intracervicală cu material seminal congelat, în sezon normal de reproducție de peste 76%
- fertilitate după inseminarea intracervical cu material seminal congelat, în sezon normal de reproducție de peste 75%
- fertilitate după inseminarea intracervical cu material seminal congelat, în contrasezon de reproducție de peste 64%
- obținerea unor indici criobiologici crescuți consecutiv testării *in vitro* și *in vivo*.

Mediul de diluție, conform invenției are o compoziție care prin caracteristicile componentelor sale, oferă o mai bună protecție celulelor spermatică crioconservate de țap. Mediul conține un antioxidant (L-cisteina) care este un compus tiolic ce poate penetra membrana plasmatică și este precursor în biosinteza glutatationului intracelular. De asemenea, cisteina protejează celula spermatică de metabolii toxici ai oxigenului care induc peroxidarea lipidică a membranelor plasmatică spermatică *in vitro*.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției.

Mediul de diluție se obține prin următoarele etape. mai întâi se cântăresc componentele și se asociază după cum urmează: tris (hidroxietil)- aminometan

375mM, acid citric anhidru 124 mM, fructoză 41,6mM și 1000 UI/ml penicilina G sodium, 1mg/ml streptomycin sulfat. După cântărire substanțele se dizolvă în apă bidistilată, soluția obținută fiind încălzită la 45°C pentru o dizolvare completă. După răcire soluția este sterilizată prin filtrare, utilizând filtre cu diametrul porilor de 0,22 microni. Soluția își menține caracteristicile intacte prin stocare la frigider timp de până la 7 zile.

Soluția stoc martor are următoarele compoziție:

- 375mM Tris (hidroxietil)- aminometan
- 124 mM acid citric anhidru
- 41,6mM fructoză,
- 10mM L-cisteină
- 1000 UI/ml penicilina G sodium
- 1mg/ml streptomycin sulfat
- 20% volumetric gălbenuș de ou

Prepararea mediului cu gălbenuș de ou se realizează în ziua colectării spermei. Pentru aceasta se utilizează ouă proaspete, cu gălbenușul intact. Astfel, într-un cilindru gradat se măsoară volumul unui gălbenuș, bine separat de albuș, după care se omogenizează timp de 5-10 minute cu ajutorul unei baghete de sticlă. Se adaugă soluția stoc, încălzită la 37-40°C și se omogenizează. Pentru îndepărtarea resturilor nedizolvate diluantul se centrifughează la 5000g, timp de 15 minute.

Mediul de diluție, conform invenției, prezintă indici criobiotici crescuți, o valoare pH de 6,8 la temperatura de 37°C verificat cu pH-metrul de laborator, și o osmolalitate de 440 mOsm/kg, măsurată pe baza punctului de îngheț.

**Mediu de diluție salin, cu adaos de antioxidanți, pentru crioconservarea
celulelor spermatice de țap**

Revendicări

1. Mediu de diluție salin utilizat în domeniul medicinei veterinare și zootehniei pentru congelarea celulelor spermatice de țap **caracterizat prin aceea că** este constituit din 10mM cisteină, 375mM tris (hidroxietil)- aminometan, 124mM acid citric anhidru, 41,6mM fructoză, 1000 UI/ml penicilina G sodium, 1mg/ml streptomycin sulfat, 20% în volum gălbenuș de ou, având o valoare pH de 6,8 la temperatura de 37°C și o osmolalitate de 440 mOsm/kg, măsurată pe baza punctului de îngheț.