



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01324**

(22) Data de depozit: **06/12/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/04/2016** BOPI nr. **4/2016**

(41) Data publicării cererii:
28/09/2012 BOPI nr. **9/2012**

(73) Titular:
• UNIVERSITATEA "OVIDIUS" DIN
CONSTANȚA, BD.MAMAIA NR.124,
CONSTANȚA, CT, RO

(72) Inventatori:
• DOBRIN NICOLAE, ALEEA PAJUREI
NR.9, BL.FE 6, SC.A, ET.1, AP.7,
CONSTANȚA, CT, RO;
• ANGHEL ANDREEA HORTANSE,
STR.FĂGETULUI NR.29, CONSTANȚA, CT,
RO;
• NADOLU DORINA, STR.DEZROBIRII
NR.143, BL.IV 22, SC.B, ET.3, AP.25,
CONSTANȚA, CT, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
FLORIN VARO GHIURU, IOAN LADOȘI,
IULIAN ROMAN, ANDREA HETTIG,
MARIUS ZĂHAN, VASILEA MICLEA,
"ANTIOXIDANT MEDIUM FOR
MANGALITA BOAR SEMEN
CRYOPRESERVATION", BULLETIN
UASVM ANIMAL SCIENCE AND
BIOTECHNOLOGIES, 67 (1-2), 2010;
MARIUS ZĂHAN, VASILE MICLEA,
FLORIN GHIURU, IULIAN ROMAN,
ALEXANDRU RUSU, ILEANA MICLEA,
MANUEL MIHĂILESCU, "THE INFLUENCE
OF FREEZING ON SOME RARE BREEDS
BOAR SEMEN CRYOPRESERVATION",
BULLETIN UASVM ANIMAL SCIENCE AND
BIOTECHNOLOGIES, 67 (1-2), 2010

(54) **MEDIU DE DILUȚIE SALIN PENTRU CRIOCONSERVAREA
CELULELOR SPERMATICE DE ȚAP**



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

3 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 spermatozoice, din
5 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
7 osmotic pe substanțele existente în mediul artificial în care sunt puși.

9 De asemenea, fertilitatea redusă, asociată inseminării artificiale cu spermă congelată,
este atribuită proceselor care decurg pe timpul congelării, când 10...50% dintre spermatozoizi
11 nu rezistă acestui proces și mor. În condițiile montei naturale, sperma este expusă în special
unor condiții anaerobe, care limitează generarea de specii reactive ale oxigenului. Însă, în
13 condițiile conservării, 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).

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

19 Până în prezent s-au folosit numeroase medii de diluție, atât saline, cât și pe bază de
lapte, pentru conservarea prin congelare a materialului seminal de țap. Documentul **Florin Varo**
21 **Ghiuru, Ioan Ladoși, Iulian Roman, Andrea Hettig, Marius Zăhan, Vasile Miclea**
Antioxidant Medium for Mangalita Boar Semen Cryopreservation, **Bulletin UASVM Animal**
23 **Science and Biotechnologies**, **67(1-2)/2010** se referă la stabilirea condițiilor tehnice ale
crioconservării indispensabile a spermei de vier, pentru ameliorarea eficienței porcului nativ de
25 Mangalița. Obiectivul acestui studiu a fost de a determina dacă acidul ascorbic este capabil să
îmbunătățească astfel calitatea spermatozoizilor crioconservați din porci de Mangalița.
27 Ejaculatul de la porcul de Mangalița și PIC (ca comparație) spermă de porc congelată într-un
extender suplimentat cu 200 μ M acid ascorbic (vitamina C), 400 μ M Trolox[®] (o vitamina E
29 hidrosolubilă analog), 200 + 400 μ M vit. C + vit. E, 200 + 200 μ M vit. C + vit. E sau fără
suplimentare a fost decongelat și apoi a fost evaluată motilitatea spermatozoizilor. Tratamentul
31 cu 200 + 400 μ M vit. C + vit. E are efectul cel mai benefic asupra motilității spermatozoizilor de
Mangalița după congelare-decongelare, printre concentrațiile testate ($P < 0,05$), iar documentul
33 **Marius Zăhan, Vasile Miclea, Florin Ghiuru, Iulian Roman, Alexandru Rusu, Ileana**
MICLEA, Manuel MIHĂILESCU, "The Influence of Freezing on Some Rare Breeds Boar
35 **Semen Cryopreservation"**, **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**, **67(1-**
2)/2010 se referă la cercetări în crioconservarea materialului seminal de vier, aplicarea de
37 îngheț-dezghet (FT) materialului seminal în programe de inseminare artificială comercială (AI)
este încă limitată. Principalele surse de material seminal utilizate în AI sunt păstrarea
39 materialului seminal la temperatura camerei (RT) și, uneori, material seminal proaspăt (F). Cu
toate acestea, utilizarea germoplasmei de mascul din genebank pe unele rase rare este legată
41 de capacitatea de a folosi material seminal congelat. Scopul acestui studiu a fost de a evalua
efectul metodei de conservare a materialului seminal și, în special, influența congelării pe
43 Mangalița Roșu și crioconservarea materialului seminal de vier de Bazna.

45 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*.

47 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
49 celulelor crioconservate, pentru utilizare în contrasezon de reproducție.

RO 127803 B1

Mediul de diluție, conform invenției, elimină dezavantajele menționate prin aceea că 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 streptomycină 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. 1
3
5

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- motilitate spermatozoizi post decongelare de peste 62%; 7
- viabilitate post decongelare de peste 65%;
- fecunditate după inseminarea intracervicală cu material seminal congelat, în contrasezon de reproducție, de peste 70%; 9
- fecunditate după inseminarea intracervicală cu material seminal congelat, în sezon normal de reproducție, de peste 76%; 11
- fertilitate după inseminarea intracervicală cu material seminal congelat, în sezon normal de reproducție, de peste 75%; 13
- fertilitate după inseminarea intracervicală, cu material seminal congelat, în contrasezon de reproducție, de peste 64%; 15
- obținerea unor indici criobiologici crescuți, consecutiv testării *in vitro* și *in vivo*. 17

Mediul de diluție, conform invenției, are o compoziție care, prin caracteristicile componentelor sale, oferă o mai bună protecție celulelor spermatice 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 metaboliții toxici ai oxigenului care induc peroxidarea lipidică a membranelor plasmactice spermatice *in vitro*. 19
21
23

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției.

Exemplu 25

Mediul de diluție se obține prin următoarele etape: mai întâi se cântăresc componentele și se asociază după cum urmează: tris (hidroxietil)-aminometan 375 mM, acid citric anhidru 124 mM, fructoză 41,6 mM și 1000 UI/ml penicilină G sodică, 1 mg/ml streptomycină 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 μm. Soluția își menține caracteristicile intacte prin stocare la frigider timp de până la 7 zile. 27
29
31

Soluția stoc martor are următoarea compoziție: 33

- 375 mM Tris (hidroxietil)-aminometan; 35
- 124 mM acid citric anhidru;
- 41,6 mM fructoză;
- 10 mM L-cisteină - 1000 UI/ml penicilină G sodică; 37
- 1 mg/ml streptomycină sulfat;
- 20% volumetric gălbenuș de ou. 39

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 min, 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 5000 g, timp de 15 min. 41
43
45

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. 47

RO 127803 B1

1

Revendicare

3

Mediu de diluție salin, pentru crioconservarea celulelor spermatice de țap, **caracterizat prin aceea că** 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 streptomicină 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.

7



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 191/2016