



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01325**

(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:
• ZAMFIRESCU STELA FILOFTEIA,
BD. MAMAIA NR. 124, CONSTANȚA, CT,
RO;
• DOBRIN NICOLAE, BD. MAMAIA NR. 124,
CONSTANȚA, CT, RO

(54) **PROCEDEU DE INCLUDERE A CELULELOR SPERMATICE
DE BERBEC ȘI ȚAP PENTRU EXAMINARE
ELECTRONO-MICROSCOPICĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de diagnosticare a unui material seminal de berbec, în vederea utilizării acestora în tehnici de reproducere asistată. Metoda conform invenției constă din colectarea de celule spermatiche solitare de berbec, care se diluează în proporție de 1:1 cu tampon Tris și centrifugate, urmată de îndepărtarea supernatantului, resuspendarea sedimentului într-un mediu de prefixare, după care suspensia se centrifughează și se decantează, iar sedimentul este din nou prefixat și spălat în aceleași condiții, urmând să fie porționat în specimene cu latura de 0,5 mm, care se fixează separat cu acid osmic 2%,

timp de 1 h, la 4°C, speciemenle se spală cu tampon și sunt apoi deshidratate în băi de 10 min, cu alcool etilic de concentrații crescătoare, la a 2-a spălare cu alcool făcându-se contrastarea în acetat de uranil 0,5% și acid fosfotungstic 1%, urmată de două băi cu propilen oxid, în final se efectuează etapa de impregnare și includerea speciemenelor în rășini epoxidice, materialul astfel preparat obținut fiind supus analizei la un microscop electronic.

Revendicări: 1



Procedeu de includere a celulelor spermaticice de berbec și țap pentru examinare electrono-microscopică

Invenția se referă la un procedeu de diagnostic morfologic al spermei de berbec și țap (celule spermaticice de berbec și de țap), în vederea utilizării acesteia în tehnici de reproducție asistată cu aplicabilitate în domeniul medicinei veterinare.

Este cunoscut faptul că, în general, celulele solitare (de tip celule spermaticice, alge, protozoare, celule sanguine etc.) se procesează folosind metode uzuale de includere care se centrifughează repetat după fiecare fază (colectare, prefixare, fixare, spălare, deshidratare) rezultând un preparat deteriorat cu artefacte specifice (aplatizări excesive ale nucleului, fracturi membranare). Mai mult, în timpul deshidratării celulele devin ușoare, plutesc în deshidratantul respectiv (alcool sau acetonă) iar pentru concentrarea acestora este nevoie de centrifugări la turații mai mari de 3000 g.

Dezavantajul principal al metodelor cunoscute este faptul ca specimenul final conține foarte puține celule spermaticice.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă din evaluarea rapidă a calităților morfologice ale unui material seminal ovin conservat în vederea utilizării acestuia în tehnici de reproducție asistată.

- Metoda de diagnostic morfologic a unui material seminal de berbec, în vederea utilizării acestuia în tehnici de reproducție asistată, conform invenției, elimină dezavantajele menționate prin aceea că, într-o primă etapă, un material biologic conservat de tip celule solitare spermaticice de berbec și țap se diluează sub agitare lentă cu tampon Tris, pH 6,9 în proporție de 1:2 (v/v), omogenatul rezultat se centrifughează la 800 g la temperatura camerei timp de 15 minute, este îndepărtat supernatantul prin aspirare cu o trompă de vid, după care într-o a doua etapă sedimentul rezultat este resuspendat într-un mediu prefixator format din tampon

cacodilat 1M și glutaraldehidă 2,7%(m/v) cu adaos de 0,1M zaharoză la temperatura de +5°C, la care se menține timp de 2 h. Suspensia celulară prefixată este supusă unei a doua centrifugări la rece, la 800 g timp de 15 minute și la 1300 g timp de 10 minute, după care supernatantul este îndepărtat prin decantare. Sedimentul de celule spermaticice este plasat în tampon cacodilat 1M fără glutaraldehidă cu adaos de 0,1M zaharoză și este porționat în specimene cu latura de 0,5 mm, care într-o a treia etapă sunt fixate cu acid osmic 2 % dizolvat în apă bidistilată, timp de 1 h la +4°C, iar speciamele oxidate sunt spălate de două ori cu tampon cacodilat rece, după care, într-o a patra etapă acestea sunt deshidratate în băi seriate de alcool etilic, în concentrație de 30%, 50% și 70%, în care se realizează contrastarea, la temperatura camerei, timp de 14 h. Deshidratarea speciamelelor se continuă la temperatura camerei cu alcool de concentrație 90%, 95%, 2 băi în alcool etilic 100% și 2 băi de propilen oxid. În a cincea etapă, speciamele cu celule spermaticice sunt impregnate cu un amestec de rășini epoxidice, format din DDSA, MNA și DMP30 în proporție de 1/1 cu propilen oxid, la temperatura camerei timp de 16 h, fiind plasate în capsule transparente care sunt umplute cu rășină epoxidică, unde sunt menținute 3 h la temperatura camerei. Polimerizarea se face timp de 72 ore în termostat la temperatura de 67°C, după care speciamele polimerizate rezultate sunt supuse secționării, colorării și analizei calitative la un microscop electronic.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- se obține rapid un material biologic de tip celule spermaticice de berbec și țap care prezintă un prognostic de evaluare adecvat pentru utilizarea acestora în tehnici de reproducție;
- crește densitatea celulelor care se examinează cu efect asupra preciziei diagnosticului morfologic al celulelor;
- reducerea perioadei de lucru cu cel puțin 1,5 ore;
- eliminarea centrifugărilor repetate care deteriorează celulele, metoda folosind numai 2 operații de centrifugare.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a metodei, conform invenției.

În scopul determinării modificărilor ultrastructurale după congelarea și decongelarea în azot lichid, metoda, conform invenției constă din examinarea electrono-microscopică a celulelor solitare de tip celule spermatice de berbec și țap) prin parcurgerea a 5 etape și anume:

- colectare și diluție,
- prefixare,
- fixare,
- deshidratare,
- includere în rășini epoxidice.

Etapa 1. Colectarea și diluția spermei

Sperma colectată cu vagina artificială conservată prin refrigerare (prin care sperma este menținută la temperaturi de +4 - +5°C până la folosire) se diluează cu tampon Tris, pH 6,9 în proporție de 1:2 (v/v). Tamponul are temperatura de 32°C. După agitare lentă, omogenatul se centrifughează la 800 g care constituie prima centrifugare, la temperatura camerei timp de 15 minute. Supernatantul este îndepărtat prin aspirare cu o trompă de vid. Prin această operațiune este îndepărtată plasma seminală.

Etapa 2. Prefixare în tampon cacodilat 1M cu glutaraldehidă (GA) 2,7%

Sedimentul rezultat este resuspendat în mediu prefixator format din tampon cacodilat 1M, zaharoză 1M și GA 2,7%, la temperatura de + 5°C. Se omogenizează și se menține la temperatura de +4°C timp de 2 ore. Omogenatul prefixat se centrifughează la 800 g care constituie a doua centrifugare timp de 15 minute, și încă 10 minute la 1300 g. Operațiunea se realizează cu o centrifugă cu răcire. Supernatantul este îndepărtat prin decantare, iar sedimentul este suficient de condensat, atașat de partea inferioară a tubului de centrifugare. Într-o sticlă de ceas se pune tampon cacodilat 1M și zaharoză 1M , fără GA, la +4°C , în care se plasează sedimentul ferm de celule spermatice desprins de pe tub. Acesta este porționat în specimene mici, cu latura de 0,5 mm. Lichidul de spălare este îndepărtat și prin aceleași manopere se efectuează a 2-a spălare care are rolul de a îndepărta excesul de fixator.

Etapa 3. Fixarea în acid osmic 2%.

Specimenele cu celule spermatice sunt plasate în tuburi mici de sticlă care conțin 2 ml de mediu fixator rece, format din acid osmic (OsO_4) 2 % (m/v) dizolvat în apă bidistilată. Fixarea propriu zisă se face timp de 1 oră la $+4^\circ\text{C}$. În acest interval specienele devin negre datorita oxidării lor de acidul osmic, aceasta arată că fixarea s-a făcut bine. Fixatorul este îndepărtat lent prin decantare și înlocuit cu mediu tampon cacodilat și zaharoză rece pentru spălare și îndepărtarea excesului de osmiu. Operațiunea de spălare se face de 2 ori cu tampon cacodilat rece. Fiecare spălare durează câte 5 minute.

Etapa 4. Deshidratarea speciemenelor

Pentru deshidratare se folosesc băi seriate de alcool etilic rece, în concentrație de 30%, 50% și 70%. În fiecare baie de alcool specienele se țin câte 10 minute. În aceasta faza a deshidratării se face contrastarea speciemenelor în a doua baie de alcool etilic 70%, care conține 0,5% acetat de uranil și 1% acid fosfotungtic. Contrastarea se face la temperatura camerei, timp de 14 ore, după care se continuă deshidratarea speciemenelor la temperatura camerei cu alcool etilic în concentrație de 90%, 95% urmate de 2 băi în alcool etilic 100% și 2 băi de propilen oxid. Fiecare baie durează 10 minute.

Etapa 5. Includerea în rășini epoxidice.

Specimenele cu celule spermatice sunt plasate în amestec Epon812, (format din DDSA, MNA și DMP30 ca agent de polimerizare) în proporție de 1/1 cu propilen oxid. Impregnarea se face la temperatura camerei timp de 16 ore, după care sunt preluate și plasate în capsule transparente. Capsulele sunt umplute cu EPON812 pur, menținute 3 ore la temperatura camerei și 72 ore în termostat încălzit la temperatura de 67°C . La sfârșitul polimerizării specienele de culoare neagră se află în vârful capsulei. Specienele astfel pregătite sunt supuse evaluării din punct de vedere al calităților morfologice.

Aprecierea morfologiei celulelor spermatice. Profilul morfologic al spermatozoizilor a fost apreciat prin caracterizarea modificărilor apărute la nivelul integrității membranei celulare la toate structurile (cap, acrozom, piesa

intermediară, piesa principală și piesa terminală). Au fost analizate cel puțin 200 de celule pe secțiuni seriate.

Aprecierea motilității spermatozoizilor înainte de procesare

Motilitatea s-a apreciat prin tehnica evaluării manuale în preparat umed, la microscopul optic (x100 mărire) dotat cu placă încălzitoare menținută la 37°C și cameră foto. Integritatea structurală a membranelor plasmactice (viabilitatea) s-a apreciat prin metoda colorației eozină-nigrozină (Baril și colab., 1993).

Procentul spermatozoizilor cu anomalii

Examenul morfologic al spermatozoizilor constă în determinarea numărului de spermatozoizi cu aspect anormal. Determinarea spermatozoizilor anormali se face prin utilizarea aceluiași metode de colorare utilizate pentru determinarea viabilității, deoarece acestea permit și aprecierea anumitor aspecte de structură.

Parametrii ultrastructurali

Modificările ultrastructurale apărute la nivel membranar după decongelare au fost evaluate prin microscopie electronică de transmisie (TEM), prin secționarea probelor incluse în rășini epoxidice (Epon 812). Profilul electronomicroscopic al spermatozoizilor a fost apreciat prin caracterizarea modificărilor apărute la nivelul integrității membranei celulare la nivelul capului, acrozomului, piesei intermediare, piesei principale și piesei terminale.

Rezultate

Secțiunile colorate și examinate la microscopul electronic prezintă cu 20% mai puține artefacte datorate manipulărilor frecvente: aplatizări ale nucleului, fracturi membranare și desprinderi ale capului de flagel iar precizia diagnosticului morfologic al celulelor este mai mare.

Alterările structurale observate sunt atribuite tratamentelor suportate de celule în diferite variante de congelare/decongelare iar decizia privind diagnosticul este datorat tratamentului și nu manipulărilor frecvente ale celulelor prin centrifugare.

Metodă de diagnostic morfologic a unui material seminal de berbec

Revendicări

1. Metodă de diagnostic morfologic a unui material seminal de berbec, în vederea utilizării acesteia în tehnici de reproducție asistată, caracterizat prin aceea că, într-o primă etapă un material biologic conservat de tip celule solitare spermaticice de berbec și țap se diluează sub agitare lentă cu tampon Tris, pH 6,9 în proporție de 1:2 (v/v), omogenatul rezultat se centrifughează la 800 g la temperatura camerei timp de 15 minute, este îndepărtat supernatantul prin aspirare cu o trompă de vid, după care într-o a doua etapă sedimentul rezultat este resuspendat într-un mediu prefixator format din tampon cacodilat 1M, zaharoza 1M și glutaraldehidă 2,7%, la temperatura de + 5°C, la care se menține timp de 2 ore. Suspensia este supusă unei a doua centrifugări la rece, la 800 g timp de 15 minute și la 1300 g timp de 10 min, după care supernatantul este îndepărtat prin decantare iar sedimentul de celule spermaticice este plasat în tampon cacodilat 1M, zaharoză 1M, fără glutaraldehidă, este porționat în specimene cu latura de 0,5 mm. În a treia etapă specimenele sunt fixate cu acid osmic 2% dizolvat în apă bidistilată, timp de 1 oră la +4°C. După fixare specimenele oxidate sunt spălate de două ori cu tampon cacodilat rece. În a patra etapă acestea sunt deshidratate în băi seriate de alcool etilic, în concentrație de 30%, 50% și 70%. În a doua baie de alcool etilic 70% se realizează contrastarea în acetat de uranil 0,5% și acid fosfotungstic 1%, la temperatura camerei, timp de 14 ore, după care se continuă deshidratarea speciemenelor, la temperatura camerei cu alcool etilic în concentrație de 90%, 95%, în 2 băi de alcool 100% și 2 băi de propilen oxid. În a 5-a cincea etapă, specimenele cu celule spermaticice sunt impregnate cu un amestec de impregnare format din DDSA, MNA și DMP30 în proporție de 1/1 cu propilen oxid, la temperatura camerei timp de 16 ore și sunt plasate în capsule transparente care sunt umplute cu rășină epoxidică în care sunt menținute 3 h la temperatura camerei și apoi se mențin 72 ore în termostat la temperatura de 67°C. Specimenele polimerizate rezultate astfel sunt secționare, colorate și analizate la un microscop electronic.