



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

(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:
• **ZAMFIRESCU STELA FILOFTEIA,
BD.TOMIS NR.267, BL.T 4, SC.A, ET.1,
AP.6, CONSTANȚA, CT, RO;**
• **DOBRIN NICOLAE, ALEEA PAJUREI
NR.9, BL.FE 6, SC.A, ET.1, AP.7,
CONSTANȚA, CT, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**FLORIN VARO GHIURU, IOAN LADOȘI,
IULIAN ROMAN, ANDREA HETTIG,
MARIUS ZĂHAN, VASILE 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) **METODĂ DE EVALUARE MORFOLOGICĂ A UNUI MATERIAL
SEMINAL DE BERBEC**



RO 127850 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de evaluare morfologică a spermei de berbec și țap
(celule spermatiche de berbec și de țap), în vederea utilizării acestuia în tehnici de reproducție
3 asistată, cu aplicabilitate în domeniul medicinei veterinare.

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

11 Documentul Florin Varo Ghiuru, Ioan Ladoși, Iulian Roman, Andrea Hettig, Marius
Zăhan, Vasile Miclea "*Antioxidant Medium for Mangalita Boar Semen Cryopreservation*",
13 **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**, 67(1-2)/2010 se referă la stabilirea
condițiilor tehnice ale crioconservării indispensabile a spermei de vier, pentru ameliorarea
15 eficienței porcului nativ de Mangalița. Obiectivul acestui studiu a fost de a determina dacă acidul
ascorbic este capabil să îmbunătățească respectiva calitate a spermatozoizilor crioconservați
17 din porci de Mangalița. Ejaculatul de la porcul de Mangalița și PIC (ca comparație) spermă de
porc congelată într-un extender suplimentat cu 200 μM acid ascorbic (vitamina C), 400 μM
19 Trolox® (o vitamină E hidrosolubilă analog), 200 + 400 μM vit. C + vit. E, 200 + 200 μM vit. C
+ vit. E sau fără suplimentare a fost decongelat și apoi a fost evaluată motilitatea spermato-
21 zoizilor. Tratamentul cu 200 + 400 μM vit. C + vit. E are efectul cel mai benefic asupra motilității
spermatozoizilor de Mangalița după congelate-decongelare printre concentrațiile testate ($P <$
23 0,05), iar documentul Marius Zăhan, Vasile Miclea, Florin Ghiuru, Iulian Roman, Alexandru
Rusu, Ileana Miclea, Manuel Mihăilescu, "*The Influence of Freezing on Some Rare Breeds*
25 *Boar Semen Cryopreservation*", **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**,
67(1-2)/2010 se referă la cercetări în crioconservarea materialului seminal de vier, aplicarea de
27 îngheț-dezghet (FT) a materialului seminal în programe de inseminare artificială comercială (AI)
este încă limitată. Principalele surse de material seminal utilizate în AI sunt păstrarea materia-
29 lului 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 de
31 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
33 Mangalița Roșu și crioconservarea materialului seminal de vier de Bazna.

35 Dezavantajul principal al metodelor cunoscute este faptul că specimenul final conține
foarte puține celule spermatiche.

37 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.

39 Metoda de evaluare morfologică a unui material seminal de berbec, în vederea utilizării
acestuia în tehnici de reproducție asistată, conform invenției, elimină dezavantajele menționate
41 prin aceea că:

43 - celulele spermatiche solitare se diluează cu tampon Tris în proporție de 1:2 (v/v) la pH 6,9,
omogenatul se centrifughează la 800 g la temperatura camerei, timp de 15 min, se îndepăr-
tează supernatantul prin aspirare cu o trompă cu vid;

45 - sedimentul se resuspendă într-un mediu de prefixare format din cacodilat 1M; zaharoză
1M și glutaraldehidă 2,7%, la temperatura de +5°C, care se menține timp de 2 h, după care
47 suspensia se supune unei a doua centrifugări la rece, la 800 g, timp de 15 min, și la 1300 g,

RO 127850 B1

timp de 10 min, după care supernatantul este îndepărtat prin decantare, iar sedimentul de celule spermatice este plasat în tampon cacodilat 1M, zaharoză 1M, fără glutaraldehidă, și porționat în specimene cu latura de 0,5 mm;	1
- specimenele sunt fixate cu acid osmic 2%, dizolvat în apă bidistilată, timp de 1 h, la +4°C, și specimenele oxidate sunt spălate de două ori cu tampon codilat rece;	3
- specimenele rezultate sunt deshidratate în băi seriate de alcool etilic cu concentrație de 30%, 50% și 70%, iar a doua baie de alcool etilic 70% se realizează contrastarea în acetat de uraniu 0,5% și acid fosfotungstic 1% la temperatura camerei, timp de 14 h, după care se continuă deshidratarea speciimenelor la temperatura camerei, cu alcool etilic de concentrație de 90%, 95%, în 2 băi de alcool 100% și 2 băi de propilen oxid;	5
- specimenele de celule spermatice sunt impregnate cu un amestec de impregnare format din DDSA, MNA și DMP 30 în proporție de 1/1 cu propilen oxid, la temperatura camerei, timp de 16 h, și sunt plasate în capsule transparente, care sunt umplute cu rășini epoxidice, în care sunt menținute 3 h la temperatura camerei, și apoi sunt menținute 72 h în termostat, la temperatura de 67°C, iar speciimenele polimerizate astfel rezultate sunt secționare, colorate și analizate la un microscop electronic.	7
Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:	9
- se obține rapid un material biologic de tip celule spermatice de berbec și țap, care prezintă un prognostic de evaluare adecvat pentru utilizarea acestora în tehnici de reproducție;	11
- crește densitatea celulelor care se examinează cu efect asupra preciziei diagnosticului morfologic al celulelor;	13
- se reduce perioada de lucru cu cel puțin 1,5 h;	15
- se elimină centrifugările repetate, care deteriorează celulele, metoda folosind numai 2 operații de centrifugare.	17
Se dă în continuare un exemplu de realizare a metodei conform invenției.	19
Exemplu	21
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:	23
- colectare și diluție;	25
- prefixare;	27
- fixare;	29
- deshidratare;	31
- includere în rășini epoxidice.	33
Etapa 1	35
<i>Colectarea și diluția spermei</i>	37
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 min. Supernatantul este îndepărtat prin aspirare cu o trompă de vid. Prin această operațiune este îndepărtată plasma seminală.	39
Etapa 2	41
<i>Prefixare în tampon cacodilat 1 M cu glutaraldehidă (GA) 2,7%</i>	43
Sedimentul rezultat este resuspendat în mediu prefixator, format din tampon cacodilat 1 M, zaharoză 1 M și GA 2,7%, la temperatura de +5°C. Se omogenizează și se menține la temperatura de +4°C timp de 2 h. Omogenatul prefixat se centrifughează la 800 g, care constituie a doua centrifugare, timp de 15 min, și încă 10 min la 1300 g. Operațiunea se realizează cu o	45

RO 127850 B1

1 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
3 tampon cacodilat 1 M și zaharoză 1 M, 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
5 0,5 mm. Lichidul de spălare este îndepărtat și, prin aceleași manopere, se efectuează a 2-a
spălare, ce are rolul de a îndepărta excesul de fixator.

7 **Etapa 3**

Fixarea în acid osmic 2%

9 Specimenele cu celule spermatice sunt plasate în tuburi mici de sticlă, ce conțin 2 ml
de mediu fixator rece, format din acid osmic (OsO_4) 2% (m/v), dizolvat în apă bidistilată. Fixarea
11 propriu-zisă se face timp de 1 h la +4°C. În acest interval specimenele devin negre datorită
oxidării lor de către acidul osmic, iar aceasta arată că fixarea s-a făcut bine. Fixatorul este
13 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
15 cacodilat rece. Fiecare spălare durează câte 5 min.

17 **Etapa 4**

Deshidratarea speciimenelor

19 Pentru deshidratare se folosesc băi seriate de alcool etilic rece, în concentrație de 30%,
50% și 70%. În fiecare baie de alcool speciimenele se țin câte 10 min. În această fază a
deshidratării se face contrastarea speciimenelor în a doua baie de alcool etilic 70%, care conține
21 0,5% acetat de uranil și 1% acid fosfotungstic. Contrastarea se face la temperatura camerei,
timp de 14 h, după care se continuă deshidratarea speciimenelor la temperatura camerei, cu
23 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 min.

25 **Etapa 5**

Includerea în rășini epoxidice

27 Specimenele cu celule spermatice sunt plasate în amestec Epon 812 (format din DDSA,
MNA și DMP 30, ca agent de polimerizare) în proporție de 1/1 cu propilen oxid. Impregnarea
29 se face la temperatura camerei, timp de 16 h, după care sunt preluate și plasate în capsule
transparente. Capsulele sunt umplute cu EPON 812 pur, menținute 3 h la temperatura camerei
31 și 72 h în termostat încălzit la temperatura de 67°C. La sfârșitul polimerizării speciimenele de
culoare neagră se află în vârful capsulei. Speciimenele astfel pregătite sunt supuse evaluării din
33 punct de vedere al calităților morfologice.

Aprecierea morfologiei celulelor spermatice

35 Profilul morfologic al spermatozoizilor a fost apreciat prin caracterizarea modificărilor
apărute la nivelul integrității membranei celulare la toate structurile (cap, acrozom, piesă
37 intermediară, piesă principală și piesă terminală). Au fost analizate cel puțin 200 de celule pe
secțiuni seriate.

Aprecierea motilității spermatozoizilor înainte de procesare

39 Motilitatea s-a apreciat prin tehnica evaluării manuale în preparat umed, la microscopul
41 optic (x 100 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-
43 nigrozină (**Baril și colab., 1993**).

Procentul spermatozoizilor cu anomalii

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

RO 127850 B1

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 datorată tratamentului, și nu manipulărilor frecvente ale celulelor prin centrifugare.

Revendicare

1
3 Metodă de evaluare morfologică a unui material seminal de berbec, **caracterizată prin aceea că va consta din următoarele etape:**

5 - celule spermatice solitare se diluează cu tampon Tris în proporție de 1:2 (v/v) la pH 6,9, omogenatul se centrifughează la 800 g la temperatura camerei, timp de 15 min, se îndepărtează supernatantului prin aspirare cu o trompă cu vid;

7 - sedimentul se resuspendă într-un mediu de prefixare, format din cacodilat 1 M, zaharoză 1 M și glutaraldehidă 2,7%, la temperatura de +5°C, care se menține timp de 2 h, după care suspensia se supune unei a doua centrifugări la rece, la 800 g, timp de 15 min, și la 11 1300 g, timp de 10 min, după care supernatantul este îndepărtat prin decantare, iar sedimentul de celule spermatice este plasat în tampon cacodilat 1 M, zaharoză 1 M, fără glutaraldehidă, și porționat în specimene cu latura de 0,5 mm;

13 - specimenele sunt fixate cu acid osmic 2%, dizolvat în apă bidistilată, timp de 1 h la 15 +4°C, și specimenele oxidate sunt spălate de două ori cu tampon codilat rece;

17 - specimenele rezultate sunt deshidratate în băi seriate de alcool etilic cu concentrație de 30%, 50% și 70%, iar în a doua baie de alcool etilic de 70% se realizează contrastarea în 19 acetat de uranil 0,5% și acid fosfotungstic 1%, la temperatura camerei, timp de 14 h, după care se continuă deshidratarea speciemenelor la temperatura camerei, cu alcool etilic de concentrație de 90%, 95%, în 2 băi de alcool 100% și 2 băi de propilen oxid;

21 - specimenele de celule spermatice sunt impregnate cu un amestec de impregnare format din DDSA, MNA și DMP 30 în proporție de 1/1 cu propilen oxid, la temperatura camerei, 23 timp de 16 h, și sunt plasate în capsule transparente, care sunt umplute cu rășini epoxidice, care sunt menținute 3 h la temperatura camerei și apoi sunt menținute 72 h în termostat, la 25 temperatura de 67°C, iar specimenele polimerizate astfel rezultate sunt secționare, colorate și analizate la un microscop electronic.

