



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00686

(22) Data de depozit: 26.09.2012

(41) Data publicării cererii:
30.08.2013 BOPI nr. 8/2013

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN
CLUJ-NAPOCA, CALEA MĂNĂȘTUR
NR.3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• ZĂHAN MARIUS, STR.EROILOR NR.92A,
BL.C5, AP.8, FLOREȘTI, CJ, RO;

• VARO-GHIURU FLORIN, STR.UZINEI DE
APĂ NR.36, LUDUȘ, MS, RO;
• MICLEA VASILE, STR. SINAIA NR. 10,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• ROMAN IULIAN, STR.1 MAI NR.73,
ALEXANDRIA, TR, RO;
• MICLEA ILEANA, STR.SINAIA NR.10,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• HETTING ANDREEA, STR.AGOSTON
NR.89, CAREI, SM, RO

(54) MEDIU DE CONGELARE PENTRU MATERIALUL SEMINAL
DE VIER

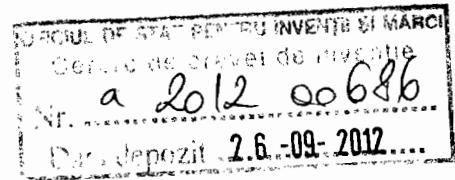
(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un mediu de congelare a materialului seminal de vier, destinat conservării de lungă durată, prin congelare. Mediul conform invenției este alcătuit din mediul A, care conține 20% gălbenuș de ou în soluție 11% lactoză, 100 UI/ml penicilină și

100 mg/ml streptomycină, și mediul B, având aceeași compoziție, la care se adaugă 9% glicerol, 1,5% Equex STM, 200 μM acid ascorbic și 400 μM Trolox.

Revendicări: 1





DESCRIERE

Invenția se referă la un „mediu de congelare pentru materialul seminal de vier”, utilizat în vederea conservării de lungă durată cu păstrarea principalilor parametri morfologici și funcționali optimi fecundației *in vivo* și *in vitro*.

Se cunosc avantajele însămânțării artificiale (IA) cu spermă congelată la animalele de fermă, însă în ciuda eforturilor de a obține o fertilitate și o prolificitate acceptabilă rezultatele sunt consecvent mai scăzute la suine în comparație cu alte specii. Factorul limitant al succesului aplicării crioconservării în programele comerciale de IA la suine este reprezentat de diminuarea calității spermei post-congelare datorită socului termic, stresului osmotic, formării cristalelor de gheață, alterării integrității membranelor și a receptorilor, sau degradării ADN-ului. Dacă la acestea se adaugă predispoziția spermatozoizilor de vier la degradare/stres oxidativ datorată conținutului ridicat de acizi grași nesaturați și fosfolipide, nivelul relativ scăzut de antioxidanți din plasma seminală, efectul oxidativ a crioconservării și amplificarea efectului nociv al peroxidului de hidrogen în prezența gălbenușului de ou din diluant, rezultă o reală problemă reprezentată de speciile de oxigen reactiv (ROS).

În prezent se cunoaște și se aplică tehnica de congelare descrisă de Westendorf și modificată de diferiți autori, cu mediul „LEY” care conține lactoză, gălbenuș de ou, glicerol și Orvus es Paste (Westendorf P., L. Richter, H. Treu, 1975, *Deutsche Tierarzt. Wschr.*, 82: 261-267), fără a atinge pragul comercial datorită problemelor menționate. În scopul reducerii acestora, adăugarea de antioxidanți la mediile de congelare a spermatozoizilor are efecte benefice, stresul oxidativ fiind considerat un factor major al infertilității, ca rezultat al dezechilibrului dintre ROS și antioxidanți. S-a demonstrat că ROS blochează mobilitatea și metabolismul oxidativ al spermatozoizilor, reducând totodată fuziunea inter-gametică și rata penetrării ovocitelor (Bailey J.L. *et al.* 2000, *Journal of Andrology*, 21, 1-7). Dintre antioxidanții studiați cele mai remarcabile efecte asupra calității spermatozoizilor de vier crioconservați le are vitamina E sau analogi ai acesteia, rezultatele obținute indicând o îmbunătățire a procentului mobilității, viabilității și a integrității acrosomale (Peña F.J. *et al.* 2004, *Zigote*, 12: 117-124; Breininger E. *et al.* 2005, *Theriogenology*, 63: 2126-2135; Satorre M.M. *et al.* 2007, *Theriogenology*, 68: 958-965; Yeon-Ji Jeong *et al.* 2009, *Cryobiology*, 58: 181-189).



Invenția constă în utilizarea unui amestec specific de antioxidanți care rezolvă problema tehnică de echilibrare a ROS din sperma crioconservată, cu efecte pozitive asupra parametrilor calitativi ai spermatozoizilor, crescând fertilitatea și prolificitatea consecutiv IA. Mediul de congelare cu acid ascorbic (vitamina C) și Trolox (analog al vitaminei E în formă hidrosolubilă) oferă o protecție spermatozoizilor prin detoxifierea și reducerea stresului oxidativ. Concentrațiile acestor antioxidanți permit creșterea procentului viabilității și mobilității totale și rectilinii, protejează membranele spermatice și acrozomale, precum și integritatea ADN-ului.

Avantajele care se pot obține în urma aplicării invenției se regăsesc în:

- conservarea pe timp nelimitat, în azot lichid, a materialului spermatic de vier cu păstrarea calității morfologice și funcționale în parametrii optimi;
- utilizarea materialului spermatic crioconservat pentru întocmirea băncilor de germoplasmă la suine;
- folosirea materialului spermatic crioconservat în IA pe scară largă și în operațiunile de import-export (la nivel comercial);
- utilizarea materialului spermatic crioconservat în biotehnologiile de reproducție precum fecundația *in vitro* (FIV) și injecția intracitoplasmatică a spermatozoizilor (ICSI) în vederea producerii *in vitro* a embrionilor suini.

Mediul de congelare cuprinde mediul A și mediul B. Pentru constituirea mediului A se cântăresc 8,8 g lactoză și se adaugă apă pură până se obțin 80 ml (soluție 11 % lactoză) la care se adaugă 20 ml gălbenuș de ou proaspăt, 10.000 UI Penicilină și 10 mg Streptomicină. Mediul astfel obținut se utilizează atât pentru diluarea spermatozoizilor, cât și pentru prepararea mediului B. Pentru producerea a 100 ml mediu B, în 89 ml mediu A se adaugă 9 ml glicerol, 1,5 ml Equex STM (echivalent Orvus es Paste), 200 μ M acid ascorbic și 400 μ M Trolox. După recoltarea și analiza materialului seminal, aceasta se spală prin centrifugare, iar depozitul se resuspendă în părți egale în mediul A, apoi în mediul B (astfel încât concentrația finală a spermatozoizilor să fie de 1×10^9 per ml, iar cea a glicerolului de 3 %), se ambalează în paiete de 0,5 ml și se congelează conform protocolului descris de Westendorf (1975) și modificat de diferiți autori. Analiza calitativă a invenției a presupus efectuarea a două experimente de evaluare *in vitro* și *in vivo* a calității morfo-funcționale a spermatozoizilor.



Pentru aceasta au fost prelucrate prin congelare un număr de 25 ejaculate, decongelarea realizându-se într-o baie marină la 50°C timp de 12 secunde. În primul experiment, după decongelare spermatozoizii au fost păstrați la termostat la 37°C timp de 30 minute, după care s-au determinat următorii parametri: mobilitatea, integritatea membranei plasmatică și acrozomală. Potrivit rezultatelor, mobilitatea medie a spermatozoizilor post-congelare a fost de 63,62% în timp ce integritatea membranei plasmatică a fost de 33,5% iar cea acrozomală de 78,75%.

Al doilea experiment privind evaluarea *in vivo* prin însămânțare artificială a scoafelor cu doze reconstituite din materialul seminal crioconservat în șase paiete și diluat în 100 ml diluant BTS (având o concentrație de 3×10^9 spermatozoizi per doză), a condus la obținerea unui rate a fecundației de 80% și a unei prolificități medii de 8,25 purcei per scoafă.

Invenția poate fi utilizată pentru extinderea IA la suine cu material seminal congelat, permițând întreținerea în efectiv a unui număr mai mic de vieri și astfel un management mai eficient al sectorului industrial de creștere. Totodată se eficientizează comerțul internațional și fluxul de gene de mare valoare. În ameliorare, prin crioconservarea materialului seminal putem crește intervalul dintre generații al unor vieri utilizând spermatozoizii acestora mulți ani chiar după moartea lor și reducând astfel rata consangvinizării. Nu în ultimul rând invenția stimulează crearea și/sau dezvoltarea unor bănci de gene, prin intervenția directă asupra funcționalității etapei finale a acesteia.



REVENDICĂRI

Mediul de congelare a materialului seminal de vier care conține lactoză, gălbenuș de ou, glicerol, Orvus es Paste, vitamina C și vitamina E și este caracterizat prin aceea că este constituit din mediul A având următoarea compoziție: 80 ml soluție 11% lactoză în apă pură, 20 ml gălbenuș de ou, 10000 UI Penicilină, 10 mg Streptomicină; și mediul B, având următoarea compoziție: 89 ml mediu A, 9 ml glicerol, 1,5 ml Equex STM (echivalent Orvus es Paste), 200 μ M acid ascorbic și 400 μ M Trolox (analog al vitaminei E).

