
TEZA DE DOCTORAT

Recoltarea și evaluarea ovocitelor de iapă în vederea fertilizării *in vitro*

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand **Aryan Hussam**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Ioan Ștefan Groza**



Cercetările efectuate în cadrul prezentei teze de doctorat s-au canalizat spre câteva axe prioritare:

- evaluarea și identificarea celor mai performante tehnici de recoltare a ovocitelor de iapă, în sezon și extrasezon după sacrificare;
- îmbunătățirea metodelor de apreciere morfologică și selecție a ovocitelor de iapă în vederea maturării *in vitro* prin introducerea morfocitometriei;
- evaluarea gradului de maturare după cultivarea *in vitro* în funcție de aspectele morfologice și morfocitometrice;
- pregătirea materialului seminal utilizat în cadrul protocolului fertilizării *in vitro* a ovocitelor de iapă;
- aprecierea ratei de fertilizare *in vitro* a ovocitelor de iapă.

FACTORII CARE AFECTEAZĂ RATA RECOLTĂRII OVOCITELOR DE IAPĂ

Scopul acestei anchete a fost de a verifica numărul mediu de foliculi preovulatori, diametrului mediu al acestora într-un grup mare de iepe și de a investiga dacă dimensiunea lor este afectată de vârsta animalelor.

Cercetările au fost efectuate în perioada 2010 - 2011 pe un număr de 240 de ovare recoltate de la 120 de iepe sacrificate.

Ovarele au fost recoltate de două ori pe lună, 10 ovare de fiecare dată, la un interval de două săptămâni. Animalele au provenit din gospodăriile populației fiind aduse la abator în vederea sacrificării.

Foliculii au fost măsurăți cu ajutorul unui liniar și au fost încadrați în funcție de dimensiunea lor în 4 categorii: categoria 1: foliculi < 1 cm; categoria 2: foliculi între 1-2 cm; categoria 3: foliculi între 2-3 cm; categoria 4: foliculi > 3 cm.

Influența sezonului asupra greutatei ovarului, diametrului foliculilor, rata recoltării și numărului mediu de foliculi existenți pe ovar

La nivelul ovarului drept s-au înregistrat următoarele valori medii pentru fiecare categorie de foliculi:

- categoria 1 (foliculi < 1 cm): cel mai mic diametru a fost înregistrat (0,32 cm) în luna decembrie, iar cel mai mare diametru a fost înregistrat (0,83 cm) în luna februarie;
- categoria 2 (foliculi între 1-2 cm): cel mai mic diametru a fost înregistrat (1,2 cm) în luna noiembrie iar cel mai mare diametru a fost înregistrat (1,87 cm) în luna aprilie;
- categoria 3 (foliculi între 2-3 cm): cel mai mic diametru a fost înregistrat (2,1 cm) în luna noiembrie iar cel mai mare diametru a fost înregistrat (2,87 cm) în luna mai;
- categoria 4 (foliculi > 3 cm): cel mai mic diametru a fost înregistrat (3,0 cm) în luna noiembrie iar cel mai mare diametru a fost înregistrat (4,92 cm) în luna aprilie.

Valorile medii obținute la nivelul ovarului stâng în ceea ce privește dimensiunea foliculilor pentru fiecare categorie sunt următoarele:

- categoria 1 (foliculi < 1 cm): cel mai mic diametru a fost înregistrat (0,27 cm) în luna decembrie iar cel mai mare diametru a fost înregistrat (0,85 cm) în luna aprilie;

- categoria 2 (foliculi între 1-2 cm): cel mai mic diametru a fost înregistrat (1,1 cm) în luna noiembrie iar cel mai mare diametru a fost înregistrat (1,84 cm) în luna mai;
- categoria 3 (foliculi între 2-3 cm): cel mai mic diametru a fost înregistrat (2,2 cm) în luna decembrie iar cel mai mare diametru a fost înregistrat (2,63 cm) în luna iunie;
- categoria 4 (foliculi > 3 cm): cel mai mic diametru a fost înregistrat (3,1 cm) în luna decembrie iar cel mai mare diametru a fost înregistrat (4,63 cm) în luna iulie.

Referitor la numărul mediu de foliculi existenți pe ovar datele relevate de experiment sunt următoarele:

- ovarul drept: cel mai mic număr (2,4 foliculi/ovar) a fost înregistrat în luna decembrie iar cel mai mare număr (5,6 foliculi/ovar) a fost înregistrat în luna aprilie;
- ovarul stâng: cel mai mic număr (2,7 foliculi/ovar) a fost înregistrat în luna noiembrie iar cel mai mare număr (4,7 foliculi/ovar) a fost înregistrat în luna mai.

În ceea ce privește numărul de ovocite recoltate/lună, valorile medii au fost următoarele:

- ovarul drept: cel mai mic număr de ovocite recoltate (0,2 ovocite/lună) s-a înregistrat în luna decembrie iar cel mai mare număr (1,5 ovocite/lună) în luna mai;
- ovarul stâng: cel mai mic număr de ovocite recoltate (0,1 ovocite/lună) s-a înregistrat în luna noiembrie iar cel mai mare număr (1,1 ovocite/lună) în luna martie.

Luând în considerare greutatea medie a ovarelor s-au constatat la nivelul ovarului drept următoarele rezultate: cea mai mică greutate a fost înregistrată (62,13 g) în luna ianuarie iar cea mai mare greutate a fost înregistrată (105,5 g) în luna aprilie. Pentru ovarul stâng valorile sunt următoarele: cea mai mică greutate a fost înregistrată (57,3 g) în luna noiembrie iar cea mai mare greutate a fost înregistrată (102,12 g) în luna aprilie.

Efectul vârstei iei asupra diametrului foliculului preovulator

Valorile medii semnalate pe perioada cercetărilor în ceea ce privește diametrul foliculilor, în funcție de vârsta animalelor, sunt următoarele:

- categoria 1 (foliculi < 1 cm): cel mai mare diametru mediu (0,8 cm) a fost înregistrat la ieele din grupa 3 (vârsta între 8-10 ani) iar cel mai mic diametru mediu (0,2 cm) a fost înregistrat la ieele din grupa 7 (19 ani);
- categoria 2 (foliculi între 1-2 cm): cel mai mare diametru (1,7 cm) a fost semnalat la ieele ce aparțin grupei 2 (vârsta între 5-7 ani) iar cel mai mic diametru (1,2 cm) a fost sesizat la ieele din grupa 7 (19 ani);
- categoria 3 (foliculi între 2-3 cm): cel mai mare diametru (2,8 cm) a fost observat la ieele din prima grupă (4 ani) iar cel mai mic diametru (2 cm) a fost înregistrat la ieele din grupa 4 (vârsta între 11-13 ani);
- categoria 4 (foliculi > 3 cm): cel mai mare diametru (4,78 cm) a fost obținut la ieele din grupa 1 (4 ani) iar cel mai mic diametru (3,12 cm) a fost înregistrat la ieele din grupa 6 (vârsta între 17-19 ani).

RECOLTAREA OVOCITELOR DE IAPĂ DE LA ANIMALELE SACRIFICATE

Scopul acestui capitol a constat în evaluarea și identificarea celor mai performante tehnici de recoltare a ovocitelor de iapă în vederea fertilizării in vitro. De asemenea am urmărit realiyarea unei evaluări morfologice a ovocitelor de iapă și clasificarea acestora în funcție de aspectele structurale.

Cercetările au fost efectuate în perioada 2009 – 2015 pe un număr de 752 de ovare recoltate de la 376 de iepe cu vârsta cuprinsă între 4 și 19 de ani, și un număr de 150 de ovare de la 75 iepe cu vârsta de 2 ani și mai mică de 2 ani, imature din punct de vedere sexual.

Recoltarea ovocitelor de iapă prin metoda aspirației foliculilor - S-au folosit ace de seringă cu un diametru de 18G atașate la o seringă de 20 ml și tuburi sterile de sedimentare necesare pentru menținerea lichidului folicular la o temperatura constantă de 22 °C.

Recoltarea ovocitelor de iapă prin raclarea foliculilor - Cu ajutorul unor lame de bisturiu sterile s-a realizat secționarea foliculilor cu un diametru mai mare de 1 cm și raclajul superficial în interiorului foliculului.

Rezultate privind recoltarea ovocitelor de iapă prin metoda aspirării foliculilor de suprafață

Din totalul de 752 ovare luate în studiu, 424 de ovare au fost recoltate în sezon și 328 de ovare au fost recoltate în extrasezon, alcătuindu-se astfel două loturi experimentale:

- **lotul I:** alcătuit din 424 de ovare de iapă colectate în sezon de reproducție, din care s-au obținut 720 de ovocite din 1688 de foliculi, rata recoltării fiind de 42,61%, cu o medie o medie de 1,69 ovocite/ovar;
- **lotul II:** alcătuit din 328 de ovare de iapă recoltate în extrasezon, din care s-au obținut 224 de ovocite de iapă din 1136 de foliculi, rata recoltării fiind de 19,7%, cu o medie de 0,70 ovocite/ovar.

În urma examenului morfologic ovocitele recoltate s-au clasificat după cum urmează:

- **lotul I:** din cele 720 de ovocite recoltate, 576 de ovocite (80%) au fost cultivabile;
- **lotul II:** din cele 224 de ovocite recoltate, 112 de ovocite (50%) au fost cultivabile.

Rezultate privind recoltarea ovocitelor de iapă prin metoda raclării foliculilor

Din totalul de 752 ovare luate în studiu, 424 de ovare au fost recoltate în sezon și 328 de ovare au fost recoltate în extrasezon, alcătuindu-se astfel două loturi experimentale:

- **lotul I:** alcătuit din 424 de ovare de iapă colectate în sezon de reproducție, din care s-au obținut 432 de ovocite din 1688 de foliculi, rata recoltării fiind de 25,5%, cu o medie o medie de 1,01 ovocite/ovar;
- **lotul II:** alcătuit din 328 de ovare de iapă recoltate în extrasezon, din care s-au obținut 176 de ovocite de iapă din 1136 de foliculi, rata recoltării fiind de 15,4%, cu o medie de 0,53 ovocite/ovar.
- **lotul I:** din cele 432 de ovocite recoltate, 256 de ovocite (59,25%) au fost cultivabile;
- **lotul II:** din cele 176 de ovocite recoltate, 120 de ovocite (68,18%) au fost cultivabile.

RECOLTAREA OVOCITELOR DE IAPĂ DE LA NIVELUL OVIDUCTULUI

Studiul și-a propus propune recoltarea ovocitelor de la nivel oviductal de la iepi abatorizate, evaluarea și clasificarea lor, precum și corelarea studiului morfologic cu gradul de maturare în procesul de selecție a celor apte pentru fertilizarea in vitro.

Cercetările au fost realizate în perioada 2009 - 2015 pe un număr de 60 de oviducte de iapă recoltate de la animalele abatorizate.

Din totalul de 30 de aparate genitale luate în studiu, 30 de oviducte au fost recoltate în sezon (februarie, martie, aprilie) și 30 de oviducte au fost recoltate în extrasezon (septembrie, octombrie, noiembrie), constituindu-se astfel două loturi experimentale:

- **lotul I alcătuit din** 30 de oviducte recoltate în sezon de reproducție de la nivelul cărora s-au obținut 22 de ovocite, rata recoltării fiind de 0,73 ovocite/oviduct;
- **lotul II alcătuit din** 30 de oviducte recoltate în extrasezon de reproducție de la nivelul cărora nu s-au obținut ovocite, rata recoltării fiind 0 ovocite/oviduct.

Studiul morfologic a permis stabilirea stadiilor de dezvoltare a ovocitelor recoltate și clasificarea lor în următoarele categorii:

- ovocite cultivabile – 12 ovocite (54,55%) din numărul total de ovocite obținute;
- ovocite necultivabile sau degenerate – 8 ovocite (36,36%);
- ovocite mature – 2 ovocite (9%) din numărul total de ovocite recoltate.

CULTIVAREA IN VITRO A OVOCITELOR DE IAPĂ

Acest studiu și-a propus evaluarea unor medii și soluții utilizate în vederea maturării in vitro a ovocitelor de iapă pe durată medie și corelarea studiului morfologic cu gradul de maturare în procesul de selecție a celor apte pentru fertilizarea in vitro.

Cercetările au fost realizate în perioada 2009 - 2015 pe un număr de 930 de ovocite de iapă recoltate din ovarele animalelor sacrificate în abatoarele din Vințu de Jos (Alba Iulia) și Cetina (Baia Mare).

Cultivarea in vitro pe termen mediu a ovocitelor de iapă

În vederea maturării *in vitro* a ovocitelor de iapă am folosit plăci sterile cu 12 compartimente, în fiecare dintre acestea adăugându-se câte 1 ml mediu de cultivare, tehnică realizată sub hotă sterilă.

Cu ajutorul unei pipete fine cu un diametru de 50 μl am plasat 5 - 6 ovocite în mediul de cultură. Plăcuțele astfel pregătite au fost introduse la incubator pentru o perioadă de 24/28 ore la o temperatură de 38,2 - 38,5 °C și atmosferă cu 5,3% CO₂.

Un număr de 765 ovocite (82,25%) au fost încadrate în clasa ovocitelor "cultivabile" care au fost supuse maturării *in vitro*, restul de 165 ovocite (17,75%) clasate în categoria celor "necultivabile", fiind excluse din protocol.

Cultivarea pe termen mediu s-a realizat pe un număr de 765 de ovocite din categoria celor "cultivabile", în cinci medii de cultură după cum urmează:

- 175 ovocite au fost cultivate în mediul compus din mediul **DMEM-F12** suplimentat cu 10% ser replacement;

- 150 ovocite au fost cultivate în mediul compus din mediul **TCM-199** suplimentat cu 10% FCS, 25mM HEPES, 1mM Piruvat de sodium, 1% glutamine, 1% AA, 10 µg/ml FSH, 2 µg/ml LH, 500 µl antibiotice;
- 137 ovocite au fost cultivate în mediul compus din mediul **TCM-199** suplimentat cu 5% SOF, 5% FCS, 1% glutamine, 1% A.A, 500 µl antibiotic;
- 145 ovocite au fost cultivate în mediul compus din mediul **SOF** suplimentat cu 10% FCS, 1% glutamine, 1% AA, 500 µl antibiotice;
- 158 ovocite au fost cultivate în **lichid folicular pur**.

APRECIEREA MORFOCITOMETRICĂ ŞI CLASIFICAREA OVOCITELOR DE IAPĂ DUPĂ CULTIVARE

Capitolul de faţă şi-a propus îmbunătăţirea sistemului de apreciere morfologică a ovocitelor de iapă prin introducerea în practica current în scopul selectării lor pentru fertilizarea in vitro, a evaluărilor morfocitometrice. Aceste evaluări permit stabilirea parametrilor morfologici şi morfocitometrici după maturare.

De asemenea am urmărit elaborarea unei noi clasificări a ovocitelor în funcţie de criteriile morfocitometrice evaluate, stabilind astfel pretabilitatea pentru fertilizarea in vitro.

Cercetările au fost realizate în perioada (2009 - 2015) pe ovare provenite de la iepe sacrificate în abatoarele din localitatea Vinţu de jos, jud. Alba şi localitatea Baia Mare, jud. Maramureş. Recoltarea ovocitelor de iapă s-a realizat prin intermediul a trei metode prezentate anterior, obţinându-se (930) ovocite, din care un număr de (765) ovocite (82.25 %) au fost încadrate în clasa ovocitelor "cultivabile" şi supuse maturării *in vitro*.

Examenul morfologic - Cultivarea *in vitro* a ovocitelor de iapă s-a realizat pentru un număr de 765 ovocite recoltate şi încadrate în categoria "cultivabile". Mediile de cultură au fost preparate după formule originale.

Examenul morfocitometric - Analiza morfocitometrică s-a realizat cu softul **Motic Image Plus** al microscopului cu inversie, luându-se în studio grosimea zonei pelucida şi a expansiunii cumulusului după maturare, diametrul ovocitei, apriţia şi dimensiunea primului globul polar.

Pe bază aspectelor morfologice, ovocitele s-au încadrat în două clase de calitate:

- **ovocite mature** (celulele cumulus expandate, citoplasma omogenă sau ușor granulată, prezența primului globul polar, spațiul perivitelin uniform, zona pelucida integră);

- **ovocite degenerate** (pierderi totale sau parțiale de celule cumulus, citoplasma puternic granulată, vacuolizată, spațiu perivitelin neuniform, zona pelucida ruptă).

Analiza morfocitometrică prin care s-au realizat măsurători precise şi de mare finețe ale structurilor ovocitare ne-au permis completarea examenului morfologic efectuat anterior, ceea ce a condus la reîncadrarea ovocitelor cultivate în patru clase de calitate.

Din totalul 765 ovocite cultivate pe termen mediu, 197 ovocite (25,75%) au fost încadrate în clasa „**mature excelente**”, 108 ovocite (14,11%) au fost încadrate în clasa

„mature” bune, 203 ovocite (26,53%) ovocite în clasa „imature”, restul 257 ovocite (33,59%) fiind considerate “degenerate”.

FERTILIZAREA IN VITRO A OVOCITELOR DE IAPĂ

Capitolul și-a propus studiul influenței aprecierii morfologice a ovocitelor asupra protocolului de fertilizare in vitro. Implicit, cercetarile au vizat îmbunătățirea tehnicilor de pregătirea materialului seminal, a ovocitelor utilizate în cadrul protocolului fertilizării in vitro cât și evaluarea unor medii și soluții utilizate în cultivarea embrionilor suplimentate în mod original. De asemenea am evaluat importanța studiul morfologic corelat cu stadiul de dezvoltare în procesul de stabilire a viabilității embrionului.

Cercetările a fost realizate în perioada 2009-2013 în cadrul Laboratorului de Biotehnologii al Disciplinei de Reproducție, Obstetrică și Ginecologie Veterinară al Facultății de Medicină Veterinară Cluj-Napoca.

Pregătirea materialului seminal pentru fertilizarea in vitro

În vederea capacitării spermatozoizilor s-au decongelat paiete cu material seminal prin plasarea acestora în apă caldă la 37 °C timp de 40 de secunde.

Selecția spermatozoizilor s-a realizat prin intermediul metodei Swim-up descrisă de (Choi și col., 2003). folosind 2 ml mediu standardizat – mediul Sperm TALP (minitube, Germania) care s-a echilibrat anterior prin incubarea la temperatura de 39 °C și 5% CO₂, timp de 2 ore. Sedimentul s-a resuspendat în 800 μl Sperm TALP, încălzit anterior, iar tuburile astfel pregătite s-au incubat timp de 1 ora în vederea capacitării spermatozoizilor

Pregătirea mediilor pentru fertilizarea in vitro

Pornind de la compoziția unui mediu consacrat în literatură de specialitate pentru fertilizarea ovocitelor de iapă – mediul TALP (Tyrod's Albumin Lactate Pyruvate Medium), s-au preparat în mod original medii de cultură.

Protocolul de fertilizare in vitro a ovocitelor de iapă

În vederea punerii în contact a ovocitelor cu spermatozoizii am utilizat sistemul de fertilizare în micropicătură: în plăcile de cultură s-au plasat 15-20 ovocite/ picătură și 0,5 μl material seminal (concentrația de 1,3 x 10⁶ spermatozoizi/ml). Parametri cultivationali respectați au fost: temperatura de 39 °C, 5% CO₂, 90% umiditate, timp de 24 ore.

Protocolul de fertilizare ICSI a ovocitelor de iapă

Injectarea spermatozoidului s-a realizat sub controlul strict al microscopului invers și a micromanipulatorului. Suspensia de spermatozoizi diluată cu 5% PVP în 0,9% soluție salină se pregătește și se dispune în trei picături, 2 rotunde și una elongate, astfel:

- prima picătură (10 μl) se utilizează la spălarea pipetei (PVP salin (polyvinylpyrrolidone));
- a doua picătură (10 μl) cuprinde suspensia de spermă în PVP salin;
- a treia picătură elongată (150 μl) a fost cu TCM 199 tamponat cu HEPES cu 1mg/ml BSA pentru ovocite.

După acoperirea picăturilor cu ulei mineral, se trece la plasarea în interiorul acestora a câte 6 ovocite denudate. Un spermatozoid a fost preluat din picătura cu

spermatozoizi prin aspirarea cozii și depus în picătura cu ovocite ce urmau să fie injectate.

Cultivarea *in vitro* a ovocitelor de iapă fertilizate

După efectuarea vortexării, mediul de fertilizare a fost înlocuit prin trei spălări succesive cu mediul necesar cultivării embrionare, două medii de cultură suplimentate și îmbogățite în mod original cu diferite substanțe, menite să asigure dezvoltarea corespunzătoare *in vitro* a ovocitelor fertilizate până în stadiul de blastocist tânăr.

Plăcuțele cu presupușii zigoți au fost introduse la incubator pentru 24 ore, la 39 °C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% umiditate.

Rezultatele fertilizării *in vitro* a ovocitelor de iapă sunt redată în tabelul 1:

Tabelul 1

Rezultatele fertilizării *in vitro* a ovocitelor de iapă

Mediu FIV	Ovocite/mediu	Ovocite fertilizate	Ovocite nefertilizate	Ovocite degenerate
F I	105	48 45,72%	23 21,90%	34 32,38%
F II	85	32 37,64%	26 30,58%	27 31,76%
F III	80	24 30%	22 27,5%	34 42,5%

Rezultatele fertilizării ovocitelor de iapă cu metoda ICSI sunt prezentate în tabelul 2.

În protocolul de fertilizare am utilizat 35 ovocite în clasa „mature” pe baza **examenului morfologic** completat cu **examenul morfocitometric**.

Tabelul 2

Rezultatele fertilizării *in vitro* prin metoda ICSI a ovocitelor de iapă

Mediu ICSI	Ovocite/mediu	Ovocite fertilizate	Ovocite nefertilizate	Ovocite degenerate
F	35	23 65,71%	3 8,57%	9 25,72%

Rezultatele cultivării *in vitro* a embrionilor de iapă

Pentru cultivarea *in vitro* s-au selectat câte 127 ovocite fertilizate, care prezentau citoplasmă omogenă, zona pelucida integră, cei doi globuli polari și cei doi pronuclei (femel și mascul).

Rezultatele obținute în urma fertilizării *in vitro* și metoda ICSI a ovocitelor de iapă mature este următoarea:

- în mediul **CI**, în care s-au cultivat 62 ovocite fertilizate, s-au obținut 38 embrioni integri (61,29%) și 24 embrioni degenerați (38,71%);
- în mediul **CII**, în care s-au cultivat 65 ovocite fertilizate au rezultat 48 embrioni integri (73,48%) și 17 embrioni degenerați (26,52%).

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI PRACTICE

În urma cercetărilor efectuate în perioada 2009-2015 și a interpretării rezultatelor obținute, s-au formulat următoarele concluzii:

1. rezultatele obținute după realizarea măsurătorilor au permis încadrarea foliculilor în 4 categorii de calitate: categoria 1 (foliculi < 1 cm), categoria 2 (foliculi între 1-2 cm), categoria 3 (foliculi între 2-3 cm), categoria 4 (foliculi > 3 cm);

2. s-au aplicat două metode de recoltare a ovocitelor de la nivelul ovarelor animalelor abatorizate: metoda de aspirare a foliculilor și metoda de raclarea a foliculilor;

3. s-a aplicat o nouă metodă de recoltare a ovocitelor, de la nivelul oviductului animalelor abatorizate, prin spălare oviductului folosind soluție PBS,

4. numărul de ovocite cultivabile prin metoda de aspirare a fost de 688 de ovocite din 944 de ovocite recoltate, rata fiind de 72,88%;

5. numărul de ovocite cultivabile prin metoda raclării a fost de 376 de ovocite din 608 de ovocite recoltate cu o rată de 61,84%;

6. numărul de ovocite recuperate de la nivelul oviductului animalelor sacrificate este redus (22 ovocite);

7. caracterele morfologice stabilite după cultivare prin intermediul stereomicroscopului și microscopului invers, au permis încadrarea ovocitele în două clase de calitate: 305 ovocite „mature” (39,86%), 460 ovocite „degenerate” (60,14%);

8. măsurătorile morfocitometrice efectuate după cultivare, completate de examenul morfologic, ne-au permis reîncadrarea ovocitelor în patru clase de calitate: 197 ovocite „mature excelente” (25,75%), 108 ovocite „mature bune” (14,11%), 203 ovocite „imature” (26,53%), 257 ovocite „degenerate” (33,59%);

9. din cele 305 ovocite obținute după maturare „*in vitro*” un număr total de 270 ovocite a fost folosite pentru fertilizare „*in vitro*”, restul de 35 ovocite au fost folosite pentru fertilizare cu metodă ICSI;

10. comparând rezultatele fertilizării „*in vitro*” a ovocitelor de iapă mature, a căror grad de maturare s-a stabilit doar prin examen morfologic se evidențiază cele obținute în mediul F I, unde procent de fertilizare a fost de 45,72% (48 ovocite), urmat de mediile F II și F III, unde procentele de fertilizare au fost de 37,64% (32 ovocite) și respective 30% (24 ovocite);

11. comparând rezultatele fertilizării ICSI a ovocitelor de iapă mature, a căror grad de maturare s-a stabilit doar prin examen morfologic, procentul de fertilizare a fost de 65,71% (23 ovocite), cel mai mic procent de ovocite nefertilizate a fost de 8,57% (3 ovocite), iar procentul de ovocite degenerate după fertilizare a fost 25,72% (9 ovocite);

12. rezultatele obținute în urma fertilizării *in vitro* prin metoda ICSI a ovocitelor de iapă mature, clasificarea embrionilor este următoarea: în mediul **CI** compus din SOF, BSA, piruvat, acid lactic și glutamină, în care s-au cultivat 62 ovocite fertilizate, s-au obținut 38 embrioni integri (61,29%) și 24 embrioni degenerați (38,71%), în mediul **CII** (DMEM-F12, 10% FCS, antibiotice), în care s-au cultivat 65 ovocite fertilizate au rezultat 48 embrioni integri (73,48%) și 17 embrioni degenerați (26,52%);

13. procentele de embrioni încadrați în stadiul de 2-8 celule a fost mai mare în mediul **CI**, 28,95 % (11 embrioni) decât în mediul **CII** - 27,1 % (13 embrioni);

RECOMANDĂRI PRACTICE

În urma rezultatelor obținute în acest studiu se pot enunța următoarele recomandări practice:

1.cercetările noastre privind recoltarea ovocitelor de iapă prin intermediul două metode, de aspirare a foliculilor vizibili pe suprafața ovarului respective, raclare foliculilor ne permite să recomandăm utilizarea în cercetare a doua metode datorită avantajelor pe care le prezintă: calitatea ovocitelor recuperate este superioară celor identificate prin metoda aspirării, chiar dacă din punct de vedere cantitativ numărul lor a fost ușor scăzut (fără semnificație statistică);

2.recomandăm utilizarea pentru diverse biotehnologii (FIV, CIV, crioconservare) doar a ovocitelor de iapă mature care prezintă următoarele caracteristici morfometrice: diametrul ovocitei de minim 110 μm, compactarea și expandarea cumulusului la o dimensiune de peste 40 μm, membrana pelucida integră cu o grosime de minim 13 μm, citoplasma omogenă, spațiul perivitelin uniform;

3.recomandăm pentru cultivarea embrionilor preveniți din fertilizarea *in vitro* a ovocitelor de iapă folosirea mediului DMEM-F12 suplimentat 10% FCS, antibiotice, menite să asigure dezvoltarea corespunzătoare embrionară;

4.pentru o mai bună eficientizare a protocolului de fertilizare *in vitro* și în scopul obținerii unor rezultate superioare, recomandăm utilizarea pentru această tehnică doar a ovocitelor mature a căror grad de maturare s-a stabilit pe baza examenului morfologic coroborat cu examenul morfocitometric.