



MD 4513 C1 2018.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4513** (13) **C1**
(51) Int.Cl.: *A01N 1/02* (2006.01)
A61D 19/02 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2016 0126 (22) Data depozit: 2016.11.21</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.09.30, BOPI nr. 9/2017</p>
<p>(71) Solicitanți: INSTITUȚIA PUBLICĂ "INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE BIOTEHNOLOGII ÎN ZOOTEHNIE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ", MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p> <p>(72) Inventatori: DARII Grigorie, MD; HAREA Vasile, MD; CIBOTARU Elena, MD; BRADU Nina, MD; DJENJERA Irina, MD; RUDIC Valeriu, MD; CHIȘELIȚA Oleg, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; DJUR Svetlana, MD</p> <p>(73) Titulari: INSTITUȚIA PUBLICĂ "INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE BIOTEHNOLOGII ÎN ZOOTEHNIE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ", MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p>	

(54) Mediu de protecție pentru crioconservarea materialului seminal de berbeci

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la criobiologie, și anume la un mediu de protecție pentru crioconservarea materialului seminal de berbeci.

Mediul de protecție, conform invenției, conține 0,8 g glucoză, 2,8 g citrat de sodiu, 20 ml gălbenuș de ou, 7 ml glicerină, 0,05 mg antibiotic Spermosan-3 de 50 mii unități,

2
5...10 ml soluție de BioR de 5 mg/ml și apă bidistilată până la 100 ml.

Rezultatul constă în păstrarea parametrilor calitativi ai spermatozoizilor după crioconservare și decongelare.

Revendicări: 1

MD 4513 C1 2018.04.30

(54) Protective medium for cryopreservation of ram seminal material**(57) Abstract:**

1

The invention relates to cryobiology, namely to a protective medium for cryopreservation of ram seminal material.

The protective medium, according to the invention, comprises 0.8 g of glucose, 2.8 g of sodium citrate, 20 ml of egg yolk, 7 mL of glycerin, 0.05 mg of Spermosan-3 antibiotic of

2

50 thousand units, 5...10 mL of BioR solution of 5 mg/mL and bidistilled water up to 100 mL.

The result is the preservation of the qualitative parameters of spermatozooids after cryopreservation and thawing.

Claims: 1

(54) Защитная среда для криоконсервации семенного материала баранов**(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к криобиологии, а именно к протекторной среде для криоконсервации семенного материала баранов.

Протекторная среда, согласно изобретению, содержит 0,8 г глюкозы, 2,8 г цитрата натрия, 20 мл яичного желтка, 7 мл глицерина, 0,05 мг антибиотика Спермосан-

2

3 50 тысяч единиц, 5...10 мл раствора BioR 5 мг/мл и бидистиллированную воду до 100 мл.

Результат состоит в сохранении параметров качества сперматозоидов после криоконсервации и оттаивания.

П. формулы: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Invenția se referă la criobiologie, și anume la un mediu de protecție pentru crioconservarea materialului seminal de berbeci.

Invenția poate fi aplicată pentru crioconservarea, păstrarea, studierea și utilizarea eficientă a genofondului animal autohton de interes științific și biotehnologic.

10 Sunt cunoscute medii de protecție pentru crioconservarea materialului seminal de berbeci (ГЦЖ) ce conțin glucoză, citrat de sodiu, gălbenuș de ou și antibiotice [ГОСТ 14746-69. Среда глюкозо-цитратно-желточная для хранения спермы (ГЦЖ)].

Însă, neajunsul acestor medii de protecție constă în mobilitatea și mișcarea rectilinie scăzută a spermatozoizilor. Este demonstrat că crioconservarea afectează mobilitatea și capacitatea de fecundare a spermatozoizilor, reduce fuziunea intercelulară și rata penetrării ovocitelor.

15 Se cunoaște tehnica de congelare 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]. S-a demonstrat că speciile de oxigen reactive (ROS) blochează mobilitatea și metabolismul oxidativ al spermatozoizilor, reducând fuziunea intergametică și rata penetrării ovocitelor [Bailey J.L. et al. 2000 Jurnal of Andrology, 21, p.1-7]. Dintre antioxidanții studiați cele mai bune efecte asupra calității spermatozilor crioconservați le are vitamina E sau analogi ai acesteia, rezultatele obținute indicând o îmbunătățire a mobilității, viabilității și a integrității acrosomale [Breininger E. et al. 2005, Theriogenology, 63, p. 2126-2135].

25 Se cunosc avantajele însămânțării artificiale cu spermă congelată la animalele de interes zootehnic, însă la berbeci e complicat de a obține o viabilitate și fecunditate acceptabilă a spermatozoizilor comparativ cu alte specii.

30 Cea mai apropiată soluție pentru mediul de protecție revendicat pentru crioconservarea materialului seminal de berbeci este mediul cu următoarea compoziție: 0,8 g glucoză, 2,8 g citrat de sodiu, 20 ml gălbenuș de ou, 5 ml glicerină, 0,05 mg antibiotice - 50 mii de unități, până la 100 ml apă distilată [1].

La crioconservarea materialului seminal de berbeci pe acest mediu de protecție, în condiții proximale, numărul spermatozoizilor mobili cu mișcare rectilinie după crioconservare și decongelare constituie $42,2 \pm 9,5\%$ și, respectiv, $19,7 \pm 6,6\%$.

35 Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că compoziția chimică a mediului nu asigură o protecție adecvată materialului seminal de berbeci. Din cauza deteriorării integrității membranelor și degradării ADN-ului pe durata crioconservării și decongelării, scade esențial numărul spermatozoizilor mobili și al celor cu mișcare rectilinie, ce diminuează calitatea spermei.

40 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu de protecție pentru crioconservarea materialului seminal de berbeci care să asigure sporirea numărului spermatozoizilor mobili și al celor cu mișcare rectilinie după crioconservare și decongelare.

45 Mediul de protecție pentru crioconservarea materialului seminal de berbeci, conform invenției, conține 0,8 g glucoză, 2,8 g citrat de sodiu, 20 ml gălbenuș de ou, 7 ml glicerină, 0,05 mg antibiotic Spermosan-3 de 50 mii unități, 5...10 ml soluție de BioR de 5 mg/ml și apă bidistilată până la 100 ml.

Antibioticul (Spermosan) - 50 mii de unități [ГОСТ-22636-77. Спермосан-3. Технические условия. Denumirea eng. Spermosan-3. Specifications (rețeta nr.5)].

Preparatul BioR (5 mg/ml) [MD 545 F1 1996.05.31].

50 Efectul pozitiv se datorează suplینirii mediului de protecție cunoscut cu BioR, care manifestă acțiune antioxidantă, de stabilizare a membranelor celulare și de stimulare a regenerării țesuturilor, ce oferă spermatozoizilor o protecție suplimentară, contribuind astfel la majorarea numărului spermatozoizilor mobili și a celor cu mișcare rectilinie după crioconservare și decongelare. Substanța dată influențează pozitiv asupra parametrilor calitativi ai spermatozoizilor.

55 Rezultatul constă în păstrarea parametrilor calitativi ai spermatozoizilor după crioconservare și decongelare, și anume sporirea cu 22,0...37,4% a numărului spermatozoizilor mobili și cu 16,7...35,5% a celor cu mișcare rectilinie față de cea mai

apropiată soluție (tab.1), datorită includerii în mediul crioprotector a BioR-ului, ce conține amestec de aminoacizi și oligopeptide, posedă acțiune antioxidantă, de stabilizare a membranelor celulare și de stimulare a regenerării țesuturilor, ce anihilează efectul negativ al temperaturilor joase și formelor reactive de oxigen, care afectează spermatozoidii în timpul crioconservării și decongelării.

Implementarea invenției va permite:

- păstrarea eficientă și durabilă în azot lichid a materialului seminal de berbeci cu menținerea fecundității, funcționalității și morfologiei spermatozoidilor la parametrii optimi;

- utilizarea materialului seminal crioconservat pentru crearea băncilor de spermă de berbeci din rase autohtone;

- folosirea materialului seminal crioconservat autohton în biotehnologiile de producție *in vitro*, în vederea producerii embrionilor;

- producerea și comercializarea materialului seminal de berbeci în Republica Moldova.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Se recoltează și se analizează materialul seminal, fiecare probă constituind ejaculat recoltat de la berbeci reproducători. Materialul seminal se transferă în mediul de protecție lichid cu următoarea componență: 0,8 g glucoză, 2,8 g citrat de sodiu, 20 ml gălbenuș de ou, 7 ml glicerină, 0,05 mg antibiotic (Spermosan-3) - 50 mii de unități, 5...7 %/V BioR (5 mg/ml), apă bidistilată până la 100 ml. Suspensia obținută cu activitatea spermatozoidilor de minim 80% se divizează câte 0,2 ml pe plăci de fluorpolimer și timp de 1 min se prelucrează cu vapori de azot. Probele se congelează brusc în formă de granule la temperatura de minus 196°C. Decongelarea probelor se realizează în fiole sterile pe baia de apă la +42°C, timp de 15 s. După decongelare materialul seminal se păstrează în termostat la temperatura de +37°C și la anumite intervale de timp (după necesitate) se apreciază numărul spermatozoidilor mobili și al celor cu mișcare rectilinie [Замораживание и использование спермы баранов-производителей (рекомендации). Под ред. Г. Зайцева. Москва, Агропромиздат, 1989, p. 19] cu ajutorul programului "CEROS" [Version 12 CEROS - Sperm Analysis System. Hamilton Thorne Biosciences. suport@hamiltonthorne.com].

În varianta martor numărul spermatozoidilor mobili și al celor cu mișcare rectilinie este de 42,2±9,5% și, respectiv, 19,7±6,6%, iar în varianta propusă de 51,5...58,0% și, respectiv, 24,0...26,3%, adică cu 22,0...37,4% și, respectiv, 21,8...33,5% mai mult față de martor.

Exemplul 2

Se recoltează și se analizează materialul seminal, fiecare probă constituind ejaculat recoltat de la berbeci reproducători. Materialul seminal se transferă în mediul de protecție lichid cu următoarea componență: 0,8 g glucoză, 2,8 g citrat de sodiu, 20 ml gălbenuș de ou, 7 ml glicerină, 0,05 mg antibiotic (Spermosan-3) - 50 mii de unități, 8...10 %/V BioR (5 mg/ml), apă bidistilată până la 100 ml. Suspensia obținută cu activitatea spermatozoidilor de minim 80% se divizează câte 0,2 ml pe plăci de fluorpolimer și timp de 1 min se prelucrează cu vapori de azot. Probele se congelează brusc în formă de granule la temperatura de -196°C. Decongelarea probelor se realizează în fiole sterile pe baia de apă la +42°C, timp de 15 s. După decongelare materialul seminal se păstrează în termostat la temperatura de +37°C și la anumite intervale de timp (după necesitate) se apreciază numărul spermatozoidilor mobili și al celor cu mișcare rectilinie [Замораживание и использование спермы баранов-производителей (рекомендации). Под ред. Г. Зайцева. Москва, Агропромиздат, 1989, p. 19] cu ajutorul programului "CEROS" [Version 12 CEROS - Sperm Analysis System. Hamilton Thorne Biosciences. suport@hamiltonthorne.com].

În varianta martor numărul spermatozoidilor mobili și al celor cu mișcare rectilinie este de 42,2±9,5% și, respectiv, 19,7±6,6%, iar în varianta propusă de 55,0...56,0% și, respectiv, 23,0...26,7%, adică cu 30,3...32,7% și, respectiv, 16,7...35,5% mai mult față de martor.

Numărul spermatozoidilor mobili și al celor cu mișcare rectilinie se exprimă în procente față de valorile inițiale.

Tabel 1

Numărul spermatozoizilor de berbec mobili și al celor cu mișcare rectilinie după crioconservare și decongelare pe mediul de protecție cu BioR (5 mg/ml) în diferite concentrații

5

		Spermatozoizi mobili, %	Spermatozoizi cu mișcare rectilinie, %
Mediu + BioR (5 mg/ml) în diferite concentrații, (%/V)	Martor	42,2±9,5	19,7±6,6
	1%	45,5±13,5	16,0±6,0
	2%	55,3±5,7	22,7±3,3
	3%	49,0±23,0	17,5±9,5
	4%	52,3±10,4	21,3±7,6
	5%	53,0±12,0	24,0±7,0
	6%	58,0±2,1	26,3±2,7
	7%	51,5±4,5	24,5±0,5
	8%	55,0±6,1	26,7±5,6
	9%	56,0±7,0	23,0±3,0
	10%	56,0±4,4	26,7±8,1

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Милованов В. К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение сельскохозяйственных животных. Москва, Издательство сельскохозяйственной литературы, 1962, p. 499-503

(57) Revendicări:

Mediu de protecție pentru crioconservarea materialului seminal de berbeci, care conține 0,8 g glucoză, 2,8 g citrat de sodiu, 20 ml gălbenuș de ou, 7 ml glicerină, 0,05 mg antibiotic Spermosan-3 de 50 mii unități, 5...10 ml soluție de BioR de 5 mg/ml și apă bidistilată până la 100 ml.