



MD 1460 Y 2020.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1460** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *A61D 19/02* (2006.01)
A23K 10/16 (2016.01)
A23K 20/142 (2016.01)
A23K 20/147 (2016.01)
A23K 20/158 (2016.01)
A23K 20/163 (2016.01)
A61K 35/748 (2015.01)
A61P 15/08 (2006.01)

**(12) BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului

(21) Nr. depozit: s 2019 0037
(22) Data depozit: 2019.03.26

(41) Data publicării cererii: 2020.09.30

(45) Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului:
2020.10.31, BOPI nr. 10/2020

(71) Solicitanți: INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE BIOTEHNOLOGII ÎN ZOOTEHNIE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI
BIOTEHNOLOGIE, MD

(72) Inventatori: DARIE Grigore, MD; ROTARI Doina, MD; MAȘNER Oleg, MD; BRADU Nina,
MD; RUDIC Valeriu, MD; DJUR Svetlana, MD; CHIRIAC Tatiana, MD;
CHISELIȚA Oleg, MD

(73) Titulari: INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE BIOTEHNOLOGII ÎN ZOOTEHNIE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI
BIOTEHNOLOGIE, MD

(54) Procedeu de stimulare a spermatogenezei la berbeci in extrasezon**(57) Rezumat:**

1
Invenția se referă la zootehnie, în special la stimularea spermatogenezei la berbeci in extrasezon și poate fi utilizată pentru păstrarea, ameliorarea și utilizarea eficientă a genofondului autohton.

Procedeul de stimulare a spermatogenezei la berbeci in extrasezon include hrănirea berbecilor cu nutreț, ce

2
conține un adaos de bioprodus pe bază de extracte din biomasa de *Spirulina platensis* CNM-CB-02 in cantitate de 0,5-5 g per 0,5 kg de nutreț, care se administrează berbecilor în cantitate de 0,5 kg/cap in perioada mai-iunie, zilnic timp de 45-50 zile.

Revendicări: 1

MD 1460 Y 2020.10.31

(54) Method for stimulating spermatogenesis in rams in the inter-season**(57) Abstract:**

1
The invention relates to animal husbandry, in particular to the stimulation of spermatogenesis in rams in the inter-season, and can be used to preserve, improve and effectively use the local gene pool.

The method for stimulating spermatogenesis in rams in the inter-season involves feeding rams with feed containing a

2
biopreparation additive based on extracts from *Spirulina platensis* CNM-CB-02 biomass in an amount of 0.5-5 g per 0.5 kg of feed, which is administered to rams in an amount of 0.5 kg/head during the May-June period, daily for 45-50 days.

Claims: 1

(54) Способ стимуляции сперматогенеза у баранов в межсезонье**(57) Реферат:**

1
Изобретение относится к животноводству, в частности к стимуляции сперматогенеза у баранов в межсезонье, и может быть использовано для сохранения, улучшения и эффективного использования местного генофонда.

Способ стимуляции сперматогенеза у баранов в межсезонье включает кормление

2
баранов кормом, содержащим добавку биопрепарата на основе экстрактов из биомассы *Spirulina platensis* CNM-CB-02 в количестве 0,5-5 г на 0,5 кг корма, вводимого баранам в количестве 0,5 кг/голову в период май-июнь, ежедневно в течение 45-50 дней.

П. формулы: 1

Descriere:

5 Invenția se referă la zootehnie, în special la reproducția ovinelor, și poate fi utilizată în scopul stimulării spermatogenezei la berbeci în extrasezon, pentru păstrarea, ameliorarea și utilizarea eficientă a genofondului autohton.

10 În condițiile actuale de intensificare a sistemului de exploatare a ovinelor, unul din obiectivele bio-economice deosebit de importante îl reprezintă transformarea caracterului de policiclicitate sezonieră în policiclicitate anuală, pentru a putea recolta, conserva și depozita material seminal de calitate de la berbeci pe tot parcursul anului calendaristic (Miclea V. Însămânțarea artificială. Animalele de fermă. Argonaut, Cluj-Napoca, 2003, p. 65-66).

15 Unul dintre factorii de bază, ce determină stimularea sistemului reproductiv la animalele de interes zootehnic cu perioadă reproductivă sezonieră este anotimpul anului, care determină cantitatea și calitatea materialului biologic (spermei) și în final utilizarea rațională a fondului genetic valoros. Berbecii manifestă libidoul și pot efectua monta pe durata întregului an, dar numărul și calitatea ejaculatelor ce se pot obține de la ei variază în dependență de anotimp și chiar lună. Astfel, datorită temperaturilor suboptimale asociate cu durată zilei-lumină apare o reducere a calității spermei la berbeci și se diminuează dorința de împerechere până la dispariția ei (Dărăban S. Tehnologia creșterii ovinelor. Risoprint, Cluj-Napoca, 2006, p. 24-27; Zăhan M. Conservarea resurselor genetice în zootehnie. Accent, Cluj-Napoca, 2017, p. 67).

20 Actualmente sunt cunoscute diverse metode de stimulare a sistemului reproductiv și spermatogenezei la animalele de interes zootehnic cu perioadă reproductivă sezonieră, care prevăd utilizarea în rația furajeră a unor componente deosebite, așa ca sângele altor animale, pupele uscate a viermilor de mătase, sau unor ingrediente ca biomasa uscată de drojzii, fânul de lucernă, făina de pește (Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. М., Сельхозгиз, 1962, p. 128-129) și injectarea preparatelor hormonale, care provoacă stres masculilor și duce la diminuarea calității ejaculatelor.

25 Se cunoaște un procedeu de stimulare a funcției reproductive la animale, care prevede suplینirea rației furajere de bază a masculilor cu icre ale aricilor de mare *Strongylocentrotus pallidus* și *Strongylocentrotus nudus* în cantitate respectiv de 0,3-0,6 și 0,08-0,21 g/kg masă corporală timp de 10-30 zile [1]. Astfel, la utilizarea acestui procedeu, spre final, volumul ejaculatelor obținute de la masculi constituie în medie 0,6±0,04 ml, cu 35 2,18±0,1 miliarde spermatozoizi per mililitru, cu o mobilitate de 74,4±3,7 %, dintre care 29,1±2,0 % posedă mișcare rectilinie.

40 Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că el nu asigură reglarea spermatogenezei la masculi cu reproducție sezonieră și nu asigură obținerea ejaculatelor de calitate, care pot fi supuse protocolului de coservare în extrasezon, în scopul exploatării raționale a fondului genetic valoros.

45 Cea mai apropiată soluție pentru stimularea spermatogenezei la animalele de interes zootehnic este utilizarea la tauri a extractului din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 în soluție fiziologică, cu concentrația de 5 mg/ml, în doză de 0,1...0,4 ml/100 kg de masă vie, timp de 10 zile [2]. Astfel, la utilizarea acestui procedeu a sporit volumul ejaculatului, mobilitatea celulelor spermatice și concentrația celulelor spermatice în ejaculat. Dezavantajul acestui procedeu constă în stresarea reproducătorilor pe durată injectării preparatului, ce poate afecta negativ spermatogeneza și necesitatea manipulărilor suplimentare pentru executarea lui.

50 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de stimulare a spermatogenezei la berbeci în extrasezon, care asigură sporirea nivelului cantitativ și calitativ al materialului seminal colectat de la reproducători cu potențial genetic valoros.

55 În literatura de specialitate termenul „extrasezon” este tractat ca repaus sexual. Ovinele fiind specia cu manifestarea funcției de reproducție sezonieră – toamna, sezon care este determinat de nivelul și dinamica zilei-lumină, respectiv a temperaturii. De aceea, sezonul de reproducție este septembrie-noiembrie, când are loc monta lor, în restul lunilor masculii se află în repaus sexual.

5 Esența invenției constă în aceea că se propune un procedeu de stimulare a spermatogenezei la berbeci în extrasezon, care include hrănirea berbecilor cu nutreț, ce conține un adaos de bioprodus pe bază de extracte din biomasa de *Spirulina platensis* CNM-CB-02 în cantitate de 0,5-5 g per 0,5 kg de nutreț, care se administrează berbecilor în cantitate de 0,5 kg/cap în perioada mai-iunie, zilnic timp de 45-50 zile, totodată bioprodusul conține, la 1 kg de talc: extract de aminoacizi și oligopeptide 3,5-5 g; extract de fosfolipide 3,5-5 g; extract de proteoglicani, inclusiv polizaharide sulfatate 3,5-5 g; extract proteic 3,5-5 g; extract de mixoxantofilă 0,75-1,25 g.

10 Efectul pozitiv este cauzat de suplینirea rației furajere de bază cu bioprodus complex, care stimulează epiteliul germinativ, spermatogeneza, secreția glandelor anexe ale aparatului genital, instinctul genezic la masculi, majorând cantitatea și calitatea materialului seminal obținut de la berbeci în extrasezon.

15 În plus, procedeu intensifică funcția de reproducție la berbeci în extrasezon, determinând majorarea așa-numitei "rate de reproducție", indicele de bază în aprecierea eficienței de utilizare a reproducătorilor de mare valoare zootehnică.

20 Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea volumului ejaculatului spre sfârșitul experimentului cu 0,3 ml, ce constituie 50% față de martor, a concentrației spermatozoizilor în ejaculat cu 0,3-0,64 miliarde/ml sau 13,8-29,3% față de martor, mobilității spermatozoizilor cu 7,4-17,9% și a numărului spermatozoizilor cu mișcări rectilinii cu 15,8-38,5% față de martor.

Implementarea invenției va permite:

- folosirea eficientă a fondului genetic ovin și obținerea unui număr sporit de descendenți cu potențial genetic valoros;
- obținerea de ejaculate în cantitate mai mare și de calitate bună cu capacitate fecundantă sporită de la berbeci în extrasezon;
- conservarea materialului seminal obținut de la berbeci în extrasezon care va permite crearea băncii de spermă de la berbeci cu potențial genetic valoros;
- folosirea materialului seminal conservat în ameliorarea raselor de oi crescute în țară și schimb internațional de gene valoroase.

30 Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

35 Se prepară nutrețul combinat destinat pentru furajarea berbecilor și în componența lui se adaugă suplimentar bioprodusul complex, obținut prin extracție fracționată cu diferiți solvenți din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02, în așa cantități ca în norma zilnică de furajare a berbecilor să se conțină 0,5 g de bioprodus. Berbecilor în extrasezon (mai-iunie, când temperatura crește peste 25°C) li se administrează zilnic câte 0,5 kg de nutreț care conține 0,5 g de bioprodus complex, timp de 45-50 zile.

Bioprodusul complex se obține prin îmbibarea treptată a talcului (1 kg) cu diferite extracte:

40 a) 350-500 ml de extract de aminoacizi și oligopeptide cu concentrația de substanță uscată de 10 mg/ml (1%);

45 Extractul se obține prin extragerea repetată din biomasa de spirulină timp de 1 oră cu etanol de 75% în raport de 1:1 (m/v), prelucrarea supernatantului cu hexan în raport de 4:1 (v/v). Soluția hidroetanolică obținută se standardizează până la concentrația de 10 mg/ml de substanță uscată;

b) Extract de fosfolipide 3,5-5g;

50 Extractul se obține prin înghețarea-dezghetarea și omogenizarea biomasei de spirulină, extragerea acesteia cu alcool etilic de 96% într-un raport de volum respectiv de (1...2):10, la temperatura de 60°C timp de 60 min, distilarea alcoolului, dizolvarea extractului cu un amestec de cloroform și etanol luate în raport de volum de 95:5 și sedimentarea fosfolipidelor cu acetonă la temperatura de 0°C (MD 130 Y 2010.01.31);

c) 350-500 ml de extract de proteoglicani, inclusiv polizaharide sulfatate, cu concentrația de substanță uscată de 10 mg/ml (1%);

55 Extractul se obține prin extragere din biomasa de spirulină cu apă distilată în raport de 1:45 (m/V) la temperatura de 90°C, timp de 2 ore. După centrifugare timp de 10 min, la 4800 rot./min, la supernatant se adaugă soluție de 1% de bromură de cetiltrimetilamoniu pentru precipitarea polizaharidelor cu centrifugare repetată la aceiași parametri. Precipitatul obținut se spală cu soluție saturată de acetat de sodiu în alcool de 95%, apoi repetat cu alcool de 96%. Precipitatul se solubilizează în apă purificată și se standardizează până la

concentrația de 10 mg/ml de substanță uscată (Ratana Chaiklahan ș.a. Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and its antioxidant capacity. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 58, p. 73-78);

5 d) 350-500 ml de extract proteic cu concentrația de substanță uscată de 10 mg/ml (1%);

Extractul se obține din biomasa tulpinii cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 prin extragere cu soluție alcoolică de 20-30%, centrifugarea cu separarea sedimentului, care se usucă la temperatura de 40-45°C, apoi se efectuează extragerea cu soluție de NaOH de 0,45% timp de 60 min la agitare, centrifugarea, separarea sedimentului, extragerea repetată a substanțelor biologice active cu soluție de NaOH de 0,45% timp de 30 min la agitare, după centrifugare supernatantele obținute se unesc și se supun dializei până la pH 7,5-8,5 cu obținerea extractului proteic. Soluția obținută se standardizează până la concentrația de 10 mg/ml de substanță uscată (MD 3158 F1 2006.10.31);

15 e) Extract de mixoxantofilă 0,75-1,25g;

Extractul se obține prin extragerea repetată a mixoxantofilei din biomasă cu soluție hidroetanolică de 70-96%, cu separarea biomasei prin centrifugare și unificarea extractelor obținute, la care se adaugă hidroxid de kalium de 40%, în raport de 3:1 față de cantitatea de biomasă supusă extracției, se menține 4-6 ore și se adaugă hexan, după care prin decantare se separă fracția etanolică cu conținut de mixoxantofilă, care se diluează cu apă până la concentrația alcoolului etilic de 45-50%, se centrifughează la 6000 rot./min, iar cristalele obținute se spală cu soluție de etanol de 45-50% și se usucă (MD 4360 B1 2015.07.31).

Talcul imbibat cu extracte se usucă la temperatura de 45-50°C timp de 24-48 de ore.

25 În varianta martor volumul ejaculatului este de 0,6±0,04 ml, numărul spermatozoizilor de 2,18±0,1 miliarde/ml, mobilitatea de 74,4±3,7% și spermatozoizi cu mișcări rectilinii de 29,1±2,0%, iar în varianta experimentală volumul ejaculatului este de 0,9±0,02 ml (cu 50% mai mare), concentrația spermatozoizilor de 2,82±0,1 miliarde/ml (cu 29,3% mai mare), mobilitatea spermatozoizilor cu 17,9% și spermatozoizi cu mișcări rectilinii cu 38,5% mai mult.

Exemplul 2

30 Se prepară nutrețul combinat destinat pentru furajarea berbecilor și în componența lui se adaugă suplimentar bioprodusul complex, obținut conform exemplului 1 prin extracție fracționată cu diferiți solvenți din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02, în așa cantități ca în norma zilnică de furajare a berbecilor să se conțină 5 g de bioprodus. Berbecilor în exstrasezon (mai-iunie, când temperatura crește peste 25°C) li se administrează zilnic câte 0,5 kg de nutreț care conține 5 g de bioprodus timp de 45-50 zile.

40 În varianta martor volumul ejaculatului este de 0,6±0,04 ml, numărul spermatozoizilor de 2,18±0,1 miliarde/ml, mobilitatea de 74,4±3,7% și spermatozoizi cu mișcări rectilinii de 29,1±2,0%, iar în varianta experimentală volumul ejaculatului este de 0,9±0,04 ml (cu 50% mai mare), concentrația spermatozoizilor de 2,48±0,1 miliarde/ml (cu 13,8% mai mare), mobilitatea spermatozoizilor cu 7,4% și spermatozoizi cu mișcări rectilinii cu 15,8% mai mult.

Tabel

Spermograma la berbeci la suplinirea rației furajere de bază cu bioprodus complex din *S. platensis* CNM-CB-02 în concentrație de 0,5-5 g la 0,5 kg de furaj

Rație furajeră	Concentrația spermei, miliarde/ml	%	Volumul ejaculatului, ml	%	Spermatozoizi mobili, %	%	Spermatozoizi cu mișcări rectilinii, %	%
La sfârșitul experimentului								
Martor	2,18±0,1	100	0,6±0,04	100	74,4±3,7	100	29,1±2,0	100
+Bioprodus 0,5g	2,82±0,1	129,3	0,9±0,02	150	87,7±2,2	117,9	40,3±2,0	138,5
+Bioprodus 5g	2,48±0,1	113,8	0,9±0,04	150	79,9±2,7	107,4	33,7±2,4	115,8

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. RU 2197253 C2 2003.01.27
2. MD 3226 F1 2007.01.31

(57) Revendicări:

Procedeu de stimulare a spermatogenezei la berbeci în extrasezon, care include hrănirea berbecilor cu nutreț, ce conține un adaos de bioprodus pe bază de extracte din biomasa de *Spirulina platensis* CNM-CB-02 în cantitate de 0,5-5 g *per* 0,5 kg de nutreț, care se administrează berbecilor în cantitate de 0,5 kg/cap în perioada mai-iunie, zilnic timp de 45-50 zile, totodată bioprodusul conține, la 1 kg de talc: extract de aminoacizi și oligopeptide 3,5-5 g; extract de fosfolipide 3,5-5 g; extract de proteoglicani, inclusiv polizaharide sulfatate 3,5-5 g; extract proteic 3,5-5 g; extract de mixoxantofilă 0,75-1,25 g.