

ROLUL GLUCIDELOR ÎN STABILIZAREA STĂRII MORFOFUNCȚIONALE A SPERMEI DE COCOȘ ÎN PROCESUL DE CRIOCONSERVARE

Ion BALAN

Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al AȘM

Carbohydrates are energy substrate for spermatozoa, which determine the need to include them in composition of the medium, both for hypothermic preservation as well as for super hypothermic of the sperm. The investigations undertaken in this paper had proposed to analyse physicochemical properties of carbohydrates on morphofunctional state of rooster spermatozoa in cryoconservation process of sperm. Experimental data have established that the inclusion of maltose in protective medium for rooster sperm contribute to maintain morphological state of spermatozoa and significantly reduces the concentration of their pathological forms. Stabilization of mobility, longevity and absolute index of rooster sperm survival is possible by using isotonic solutions of carbohydrates in the composition of synthetic medium for rooster sperm. The cryoconservation process of rooster sperm, diluted in cryoprotective medium, supplemented with solutions of nonelectrolyte in optimal concentration generate maintaining at a significant level of the functional index of rooster spermatozoa by using maltose and their decrease in case of use of lactose for this purpose.

Introducere

Glucidele reprezintă substratul energetic pentru spermatozoizi, ceea ce determină necesitatea includerii lor în componența mediilor, atât pentru păstrarea hipotermală, cât și superhipotermală a spermilor [1-4]. În plus, glucidele sunt reglatori puternici ai osmozei mediului intra- și extracelular. Un interes deosebit reprezintă capacitatea glucidelor, îndeosebi a dizaharidelor, de a menține activitatea spermatozoizilor crioconservați, în lipsa crioprotectorilor stabiliți [5]. Există ipoteze care relevă că glucidele au o influență stabilizatoare asupra membranelor celulare, formând legături hidrogene puternice între grupele hidrofiele ale glucidelor și grupele polare ale fosfolipidelor. Concomitent se consideră că dizaharidele sunt mai eficiente decât monoglucidele în activitatea lor protectoare, datorită influenței asupra compușilor membranei citoplasmatică. Efectul crioprotector al glucidelor asupra spermatozoizilor este înregistrat și în cazul mediilor sintetice hipertonică ($450-550 \text{ m}^{\text{Osmol}}$) la viteze mari de răcire ($100-300^{\circ}/\text{min}$) [6].

În contextul celor expuse, prezentele cercetări au vizat studierea proprietăților fizico-chimice ale glucidelor asupra stării morfofuncționale a spermatozoizilor de cocoș în procesul de conservare a spermei.

Material și metode

În investigații s-a folosit sperma de cocoș, care a fost recolectată prin metoda de masajare, cu folosirea spermerezervorului din sticlă în corespundere cu cerințele „Instrucțiunii pentru însămânțarea artificială a păsărilor”.

Ejaculatele recolectate au fost apreciate prin folosirea metodelor general acceptate pentru determinarea indicilor morfofuncționali ai spermei. Prin metodele de apreciere a indicilor fiziologici am urmărit scopul să determinăm în materialul seminal numărul de spermatozoizi într-o unitate de volum (indicele concentrației celulelor), numărul spermatozoizilor vii cu mișcare rectilinie (indicele mobilității) și durata timpului de supraviețuire a lor la anumită temperatură (indicele longevității). Indicii studiați au fost determinați la temperaturi confortogene potrivit aplicării parametrilor etapelor tehnologice de manipulare a spermei.

Congelarea și decongelarea spermei s-a realizat conform schemelor clasice de crioconservare în formă de pastile la temperatura azotului lichid cu particularitățile specifice pentru sperma de cocoș.

Estimarea formelor patologice în spermă constă în determinarea numărului de spermatozoizi cu aspect anormal în rezultatul examenului morfologic al acestora. Valoarea acestui indice a fost studiată prin metoda microscopiei luminescente.

Analiza statistică a datelor experimentale s-a efectuat cu folosirea criteriilor parametrice după Student. Concluziile sunt bazate pe diferențele statistic autentice între loturi [7]. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm eroare standard. Pragul de semnificație prezentat: $P < 0,05$.

Rezultate și discuții

La crioconservarea spermei animalelor agricole în componența mediilor protectoare se utilizează zaharidele: mono-, di- și trizaharidele [4,8,9]. Folosirea pe larg a zaharidelor în componența mediilor pentru diluarea și congelarea spermei se explică prin faptul că zaharidele în componența mediilor provoacă diminuarea conductibilității spermei, care contribuie la micșorarea aglutinării spermatozoizilor produse de pierderea sarcinii electrostatice. Deplasarea de către zaharide a potențialului de oxidoreducere de asemenea influențează benefic asupra materialului seminal [3,4].

Este cunoscut că toate glucidele au eutectică scăzută, vâscozitate înaltă la temperaturile mai joase de 0°C și influențează asupra formei și dimensiunilor canalelor în apa neînghețată.

În același timp, glucidele asigură în mediul extern și intern presiunea osmotică corespunzătoare spermatozoizilor și, totodată, servesc ca substrat energetic al celulelor, în condițiile aerobe și anaerobe; stabilizează complexe proteolipidice ale membranelor celulare și structura citoscheletului; manifestă activitate protectoare asupra spermatozoizilor, înlocuind complet sau parțial crioprotectorii acceptați [3]. Concomitent, mecanismul de acțiune al unor zaharide, în particular al glucozei, se realizează prin modificările stării componentelor citoplasmatici ai celulei, realizând astfel o sporire a integrității ei după acțiunile temperaturilor joase și ultrajoase [10].

Reieșind din cele expuse, au fost efectuate cercetări ale influenței glucidelor asupra stării morfofuncționale a materialului seminal de cocoș. La etapa inițială a investigațiilor s-a studiat acțiunea hidraților de carbon asupra structurilor morfologice ale spermatozoizilor (*a se vedea* Tabelul).

Tabel

Influența glucidelor asupra gametopatiilor în sperma de cocoș

Nr. ctr.	Componența mediilor sintetice	Spermatozoizi cercetați	Spermatozoizi întregi		Spermatozoizi patologici	
			Bucăți	%	Bucăți	%
1.	Glucoză-glicerină-gălbenuș	300	221	73,7 ± 1,27	79	26,3 ± 1,27
2.	Lactoza-glicerină-gălbenuș	300	170	36,7 ± 1,43*	130	43,3 ± 1,43*
3.	Rafinoză-glicerină-gălbenuș	300	215	71,7 ± 1,69	85	28,3 ± 1,69
4.	Maltoză-glicerină-gălbenuș	300	238	79,8 ± 1,16*	62	22,2 ± 1,16*
	În total (media)	1200	844	70,3 ± 1,32	356	29,7 ± 1,32

*Diferența este autentică în comparație cu media experienței.

Datele prezente în Tabel demonstrează că numărul grupelor glicozidice în molecula hidraților de carbon (glucoza, lactoza, rafinoza, maltoza), spre deosebire de materialul seminal de taur în aceleași condiții [4,9], nu manifestă influență asupra conținutului de forme patologice ale spermatozoizilor.

În acest caz, rata gametopatiilor este, practic, determinată nu de numărul grupelor glicozidice în moleculă, dar de proprietățile fizico-chimice ale glucidului experimentat, întrucât lactoza și maltoza sunt dizaharide. În mediul cu lactoza gametopatiile în materialul seminal de cocoș constituie 43,3±1,43%, iar, în condiții similare, includerea maltozei în componența mediilor contribuie la majorarea semnificativă a spermatozoizilor întregi până la 79,8±1,16%. Una dintre cauzele înregistrării acestor devieri poate fi faptul că monoglucidele se caracterizează în exclusivitate prin legături hidrogeno conform tipului, geometriei și energiei care le formează. Mecanismul acțiunii lor se realizează la stabilizarea apei prin modificarea stării componentelor citoplasmice ale celulei, sporind păstrarea ei după influența factorilor de crioconservare [10]. Într-o măsură mai mică posedă astfel de proprietăți di- și trizaharidele, cum sunt lactoza, maltoza și rafinoza.

Având în vedere că glucidele, paralel cu proteinele și lipidele, sunt componente principale ale biomembranelor, un interes deosebit prezintă informația cu privire la apartenența interacțiunilor structurale ale lor. De exemplu, glucoza face parte din componența glicolipidelor și glicoproteidelor, xiloza – a proteoglicanilor și glicopro-

teidelor, manoză – a glicoproteidelor și galactoză este compus al tuturor trei glicoconjugate [11]. În acest caz, proprietățile membranelor se determină, preponderent, nu de orice interacțiune specifică între componente, dar de proprietățile fizice ale rezistenței structurii bistratate, viscozitatea regiunii glucidice și polaritatea grupelor implicate [12]. Rezistența membranelor biologice depinde în mare măsură de gradul saturării sau nesaturării resturilor acizilor grași ai fosfolipidelor, care condiționează viscozitatea necesară a componentei glucidice în componența stratului bilipidic în cazul influenței temperaturilor hipotermice. Astfel, în baza mecanismelor de crioprotecție poate fi considerată aptitudinea glucozei în stabilirea biocomplexelor de natură glicoproteică și glicolipidă în membrane (sunt obținute unele dintre cele mai bune rezultate la stabilizarea morfologiei spermatozoidelor de cocoș). Glucoza este substanța stabilizatoare a proteinelor; prin urmare, stabilizează structura citoscheletului la acțiunea factorilor deterioratori în procesul crioconservării [3]. Totodată, drept confirmare a acestui fenomen servește stabilizarea biocomplexelor glicoproteice la includerea în componența mediului crioprotector a manozei [4], diminuează calitatea spermei decongelate.

Ameliorarea rezultativității crioconservării spermei este reală în rezultatul perfecționării mediilor crioprotectoare prin utilizarea procedurilor tehnologice eficiente pe baza cercetărilor experimentale, efectuate la diferite niveluri de organizare a obiectelor biologice. Potrivit priorității rolului biocomplexelor în activitatea membranelor plasmatică, în experiențele ulterioare am studiat acțiunea monozaharidelor, componente principale ai derivatelor glucidice ale membranelor asupra indicilor fiziologici ai spermei de cocoș.

În particular, în experiențe separate a fost determinată eficacitatea neelectroliților în componența mediilor crioprotectoare pentru diluția și congelarea spermei de cocoș. Pentru aceasta, în calitate de neelectroliți au fost utilizate soluții izotonice de glucoză, zaharoză, maltoză și rafinoză. La prima etapă sperma de cocoș s-a diluat cu soluțiile enumerate și a fost determinată eficacitatea glucidelor după indicii fiziologici ai spermatozoidelor (mobilitatea, longevitatea, indicele absolut al supraviețuirii (IAS)). Rezultatele experimentale sunt prezentate în Figura 1.

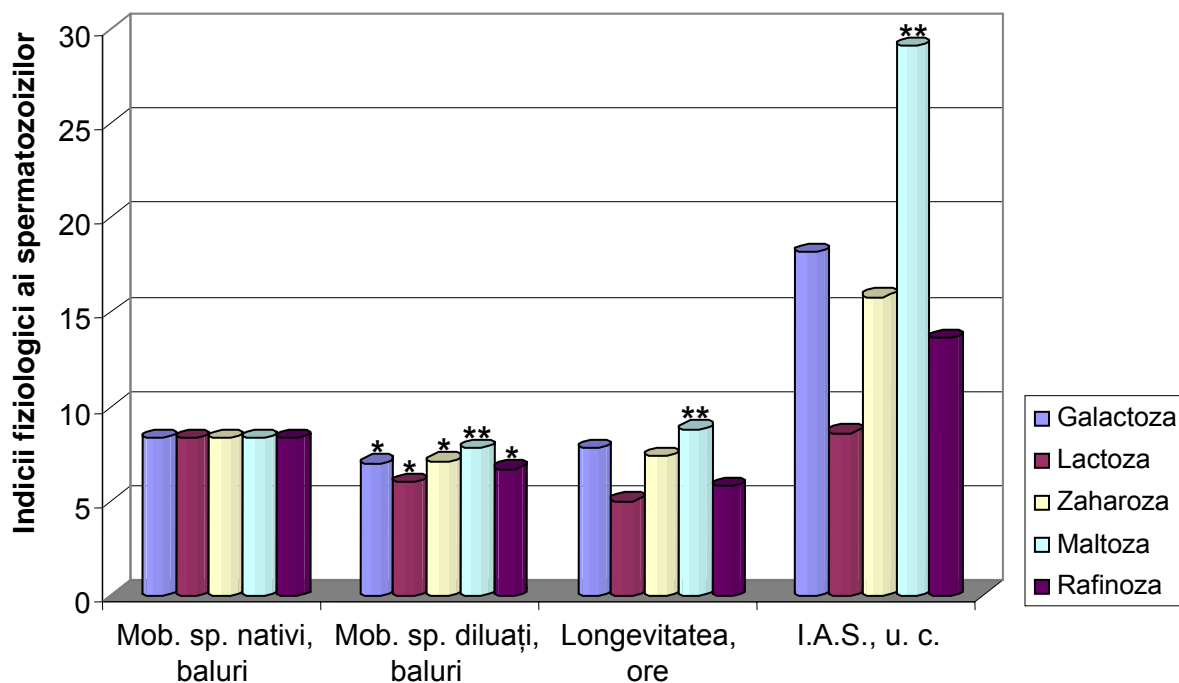


Fig.1. Eficacitatea zaharidelor în componența mediilor sintetice pentru sperma de cocoș.

* Diferențele sunt statistic autentice în comparație cu sperma nativă.

** Diferențele sunt statistic autentice în comparație cu varianta aplicării lactozei.

Datele prezentate în Figura 1 relevă că utilizarea soluțiilor izotonice de hidrați de carbon pentru diluarea spermei de cocoș contribuie la menținerea calității spermei. De exemplu, micșorarea mobilității spermatozoizilor diluați se produce la nivelul la care se asigură viabilitatea înaltă a spermiiilor. Excepție constituie soluția izotonică de maltoză, care a asigurat cel mai înalt indice al spermatozoizilor diluați. Longevitatea și indicele absolut de supraviețuire a spermatozoizilor sunt cele mai minore în varianta de utilizare a lactozei și cele mai majore la utilizarea maltozei.

Efectul folosirii neelectrolitilor ca componente ale mediilor pentru diluarea și păstrarea spermei de cocoș poate fi lămurit prin faptul că neelectrolitii contribuie la diminuarea electroconductibilității și la stabilizarea presiunii osmotice [4].

În continuare, soluțiile izotonice de neelectroliti au fost utilizate pentru crioconservarea spermei de cocoș. Acțiunea neelectrolitilor a fost evaluată conform mobilității spermatozoizilor. Rezultatele sunt prezentate în Figura 2.

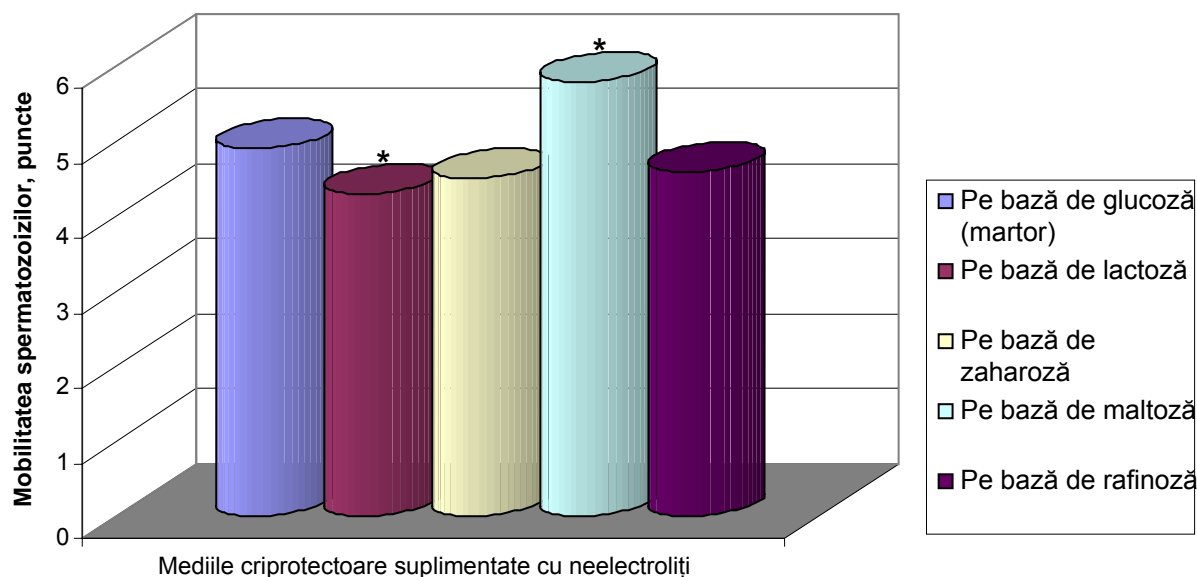


Fig.2. Eficacitatea glucidelor la crioconservarea spermei de cocoș.

*Diferențele sunt statistic autentice în comparație cu lotul martor.

Datele din Figura 2 denotă că folosirea soluțiilor izotonice de neelectroliti pentru crioconservarea spermei de cocoș permite a obține mobilitatea gameților în limitele $4,3 \pm 0,19$ și $5,8 \pm 0,12$ puncte. În cazul utilizării maltozei în componența mediului crioprotector au fost înregistrate cele mai înalte rezultate ($5,8 \pm 0,122$ baluri). Includerea lactozei în componența mediului a dus la diminuarea mobilității spermatozoizilor. La experimentarea celorlalte glucide au fost stabilite rezultate practic identice cu cele din varianta martor.

Influența pozitivă a di- și trizaharidelor poate fi argumentată prin faptul că primele, interacționând cu moleculele de apă, formează legături puternice care contribuie la structurarea apei, iar dizaharidele, prioritar, influențează pozitiv integritatea capului spermatozoizilor în comparație cu monoglucidele [3]. Mai mult, di- și trizaharidele provoacă o mai mare scădere a punctului de cristalizare a apei [13]. Printre ele, cu aceleași proprietăți se întâlnesc și zaharide reduse.

Astfel, prezența glucidelor în componența mediilor crioprotectoare pentru sperma de cocoș inițiază inhibarea procesului de peroxidare a lipidelor din membrane și diminuarea acumulării produselor toxice ale acestui proces. În rezultat, se ameliorează calitatea materialului seminal decongelat și selectiv se stabilizează indicii fiziologici ai spermatozoizilor de cocoș.

Concluzii

1. S-a stabilit că includerea maltozei în componența mediilor protectoare pentru sperma de cocoș contribuie la menținerea stării morfologice a spermatozoizilor și semnificativ micșorează concentrația formelor patologice ale spermatozoizilor.

2. Stabilizarea mobilității, longevității și indicelui absolut de supraviețuire a spermatozoizilor de cocoș este posibilă prin utilizarea soluțiilor izotonice de hidrați de carbon în componența mediilor sintetice pentru sperma de cocoș.

3. Procesul de crioconservare a spermei de cocoș diluate în mediul crioprotector, suplimentat cu soluții de neelectroliți în concentrații optime, provoacă menținerea la un nivel semnificativ a indicilor funcționali ai spermatozoizilor de cocoș la utilizarea maltozei și diminuarea lor, în cazul folosirii în acest scop a lactozei.

Referințe:

1. Wishart G.J. Liquid semen storage: current status and where do we go from here? // Proceedings of the 22nd World's Poultry Congress, Istanbul, Turkey, 2004, p.1801.
2. Курбатов А.Д. Крiоконсервация спермы птиц. Крiоконсервация спермы с-х животных. - Ленинград: Агропромиздат, 1988, с.195-250.
3. Линник Т.П., Мартынюк И.Н. Подходы к созданию крiозащитных сред при крiоконсервации спермы птиц // Проблемы крiобиологии, 2010, Том 20, №1, с.109-122.
4. Наук В.А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при крiоконсервации. - Кишинев: Штиинца, 1991.
5. Sztejn J.M., Noble K., Farley J.S., Mobraaten, L.E. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation // Cryobiology, 2001, vol.41, no.1, p.28-39.
6. Woelders H. et al. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective // Poultry Science, 2006, vol.85, p.216-222.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. - Москва: Высшая школа, 1980.
8. Blesbois E. Current status in avian semen cryopreservation // World's Poultry Science Journal, 2007, vol.63, p.213-222.
9. Борончук Г.В., Балан И.В. Структурно-функциональные и биохимические изменения в биологических системах при крiоконсервации. - Chișinău: Tipografia AȘM, 2008.
10. Мельникова О.В., Бондаренко Т.П. Модифицирующее действие глюкозы на чувствительность эритроцитов к температурному и осмотическому стрессу. - În: Физико-химические процессы в крiобиологических системах. - Харьков, 1991, с.68-78.
11. Болдырев А.А. Введение в мембранологию. - Москва: Изд-во МГУ, 1990.
12. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Липидный бислой биологических мембран. - Москва: Наука, 1982.
13. Пушкаръ Н.С. и др. Крiопротекторы. - Киев: Наукова думка, 1978.

Prezentat la 15.06.2012