

ASPECTE MEMBRANO-STRUCTURALE ÎN PĂSTRAREA BIODIVERSITĂȚII PRIN CRIOCONSERVARE

Ion BALAN

Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al AȘM

Preserving organism biodiversity is possible by genepool cryoconservation, which is followed by fundamental researches to elucidate the mechanism of cryodestruction and cryoprotection in different level of organization of biological objects, including in the spermatozoa's membrane structures. First, at lipids level, which are essential and integral components of membrane and perform important functions in the viability of biological objects – energy source, biological active substance.

Our researches focused on determining of lipids in rooster and boar spermatozoa membrane in cryoconservation process.

The results have elucidated lipid spectrum in rooster and boar spermatozoa plasma membrane in cryoconservation process. Experimentally was established a significant decrease of the cholesterol:phospholipids proportion value in the freezing-defrosting process of the rooster sperm. It was ascertained that increase of the cholesterol:phospholipids proportion in the cryoconservation process of boar sperm is predetermined by the cholesterol and phospholipids interactions of the synthetic mediums and structural elements of the plasma membrane.

Introducere

În ultimii ani, impactul antropogen asupra mediului ambiant a dus la diminuarea biodiversității, care poate atrage în lanț dispariția continuă a altor organisme vii. În legătură cu aceasta, capătă o semnificație deosebită păstrarea genofondului tuturor organismelor existente. Actualmente, rata dispariției speciilor este mai avansată față de măsurile întreprinse de protecție a mediului, iar pentru reorientarea acestei tendințe este necesară, paralel cu alte măsuri, păstrarea genofondului prin crioconservare.

În același timp, este remarcabil faptul că metodele criobiologice, din motive instabile și reduse ale proprietăților bioobiectelor la crioconservare, sunt insuficiente pentru soluționarea problemelor abordate. Prin urmare, recomandabile sunt cercetările fundamentale de elucidare a mecanismelor de criodistrucție și crioprotecție a celulelor sexuale. Investigații cu impact sunt necesare la diferite niveluri de organizare a obiectelor biologice, inclusiv în structurile membranare ale spermatozoizilor [1-3].

Unul dintre compușii membranelor sunt lipidele, rolul specific al cărora constă în faptul că ele sunt principalele elemente structurale și funcționale ale membranelor biologice și servesc ca surse energetice pentru spermatozoizi [4]. De asemenea, rolul lipidelor în funcționarea normală a biomembranelor se determină de starea lor fizică, de permeabilitatea selectivă, recepția, interacțiunile intercelulare, transportul biologic, reglarea activității fermenților membranodependenți și de alte procese importante [3,5].

Este cunoscut că lipidele formează nu doar baza structurală a membranelor celulare, determinând gradul de viscozitate, difuzia laterală și asimetria bilaterală, dar sunt și substanțe biologice active, care îndeplinesc funcția compușilor sistemului de transducție a semnalelor, ai modulatorilor activității enzimatică și ai proprietăților de recepție [2,5].

Lipidele sunt printre componentele majore ale membranelor spermatozoizilor, implicate într-o serie de procese [6], în diferite stadii ale reacțiilor de maturizare, capacitație și acrosomale, într-o serie de modificări biochimice și funcționale care se desfășoară în procesul de pregătire sau producere a fecundării [7].

În contextul celor expuse, în prezentul studiu ne-am propus drept scop determinarea conținutului lipidelor din membranele spermatozoizilor în procesul de crioconservare.

Material și metode

În investigații obiectul de cercetare a fost sperma de cocoș și de vier. Ejaculatele recolectate au fost apreciate prin folosirea metodelor general acceptate pentru determinarea indicilor morfofuncționali ai spermei.

Congelarea și decongelarea spermei s-a realizat conform schemelor clasice de crioconservare în formă de pastile la temperatura azotului lichid, cu unele modificări specifice pentru varietățile de spermă.

Extragerea și divizarea lipidelor generale ale membranelor plasmatică s-a petrecut ținându-se cont de proporția 30 mlrd de spermatozoizi în sistemul cloramin:metanol:apă distilată, iar conținutul lor în extract s-a determinat conform metodei lui Bragdon [8].

Identificarea fracțiilor lipidice din spermatozoizi în procesul crioconservării spermei s-a efectuat prin utilizarea metodelor cromatografiei microanalitice.

Analiza statistică a datelor experimentale a fost făcută potrivit criteriilor parametrice după Student. Concluziile sunt bazate pe diferențele statistice autentice între loturi. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm eroare standard. Pragul de semnificație prezentat: $P < 0,05$.

Rezultate și discuții

Lipidele membranelor biologice, particularitățile compoziției lor structurale au un rol deosebit în reacțiile compensatoare la echilibrarea condițiilor mediului, ceea ce permite a influența asupra stării indicilor funcționali ai spermatozoizilor.

Numeroase date demonstrează că la crioconservarea spermei are loc modificarea lipidelor și proteinelor din spermatozoizi, iar criorezistența spermatozoizilor este condiționată în mare măsură de componența membranei plasmatică și de proprietățile ei fizico-chimice [3,9].

Organizarea structurală și activitatea funcțională a biomembranelor se determină în mare parte de particularitățile componentelor structurali, în particular, de caracteristicile structural-funcționale ale lipidelor membranice, participante în funcțiile vitale ale spermatozoizilor. În acest caz, prezintă interes stabilitatea conținutului chimic al membranelor plasmatică și schimbările lui în procesul crioconservării spermei de cocoș.

Reieșind din cele expuse, cercetările noastre au vizat lipidele din membrane, deteriorările spermatozoizilor și posibilele condiții de crioprotecție a lor. Rezultatele determinării conținutului de lipide din biomembranele spermatozoizilor de cocoș în procesul de crioconserare sunt prezentate în Figura 1.

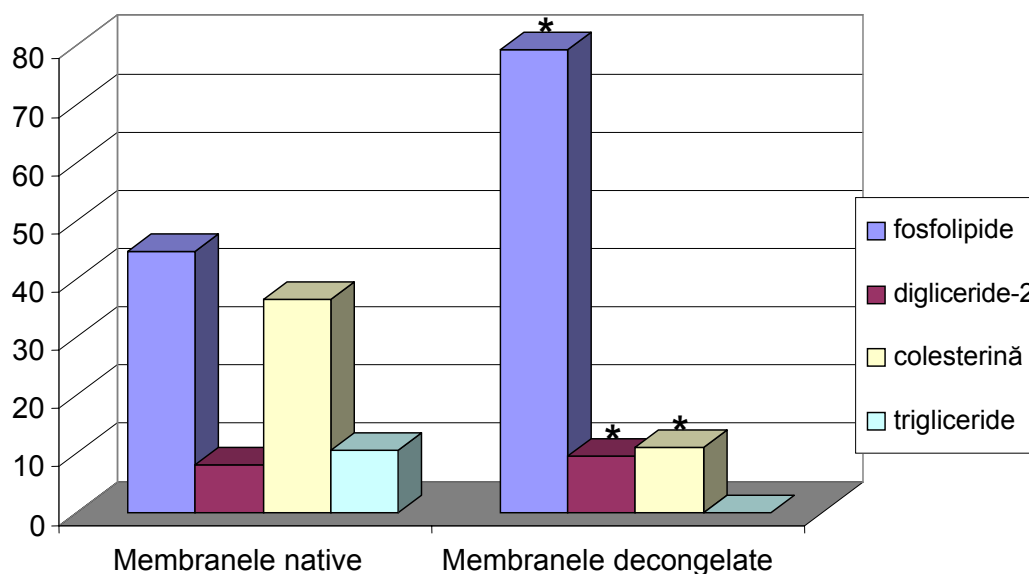


Fig.1. Lipidele membranelor spermatozoizilor de cocoș la crioconservare.

*Diferințele sunt statistic autentice între indicii membranelor native și cele congelate-decongelate.

Datele din Figura 1 ne permit să constatăm că componența lipidică a membranelor spermatozoizilor de cocoș este prezentată în principiu de fosfolipide, gliceride și colesterină, care sunt supuse schimbărilor semnificative sub acțiunea temperaturilor scăzute. De exemplu, este evidențiată diferența autentică între conținutul de fosfolipide în membranele spermatozoizilor nativi și congelați-decongelați. În rezultatul prelucrării tehnologice a spermei de cocoș (diluare, refrigerare, congelare și decongelare), conținutul fosfolipidelor în membranele spermatozoizilor se majorează: de la $44,8 \pm 0,05\%$ în membranele native până la $79,4 \pm 0,26\%$ în cele congelate-decongelate.

Conținutul digliceridei-2 și al trigliceridelor în spermatozoizi în procesul crioconservării spermei de cocoș la fel se supune schimbărilor criogenice. În particular, conținutul digliceridei-2 se majorează autentic în membranele deconserate ale spermatozoizilor – de la $8,04 \pm 0,150$ până la $9,53 \pm 0,173$. Paralel, în procesul de congelare și decongelare a spermei de cocoș are loc scăderea bruscă a conținutului de trigliceride. Din punct de vedere chimic, moleculele trigliceridelor sunt asemănătoare cu cele ale fosfolipidelor, iar deosebirea esențială dintre ele constă în faptul că fosfolipidele nu reprezintă sursă energetică pentru organism, fiind componenți structurali principali ai membranelor celulare [10].

Din conținutul total de lipide, colesterolul constituie $36,5 \pm 0,29\%$ în membranele plasmatiche ale spermatozoizilor nativi, iar prelucrarea criotehnologică a spermei duce la diminuarea concentrației ei până la $11,1 \pm 0,25\%$. Diferențele sunt statistic autentice.

În faza lipidică a membranelor, ca component esențial persistă colesterolul, al cărui metabolism în celule are un caracter integrativ datorită afinității ei majorate [11]. Colesterolul modifică atracțiile dintre lanțurile carbohidrate ale lipidelor [12] și participă în procesul de reorganizare a structurilor membranare [13].

În același timp, este cunoscut că de conținutul colesterolului depinde temperatura de trecere fazică a lipidelor [3,14]. Temperatura de trecere fazică a lipidelor depinde nu doar de conținutul colesterolului, dar și de valoarea raportului colesterol:fosfolipide. În literatura de specialitate datele privind interdependența dintre raportul colesterol: fosfolipide și rezistența spermatozoizilor la șocul termic sunt insuficiente. Ipoteza șocului termic a fost dezvoltată în numeroase cercetări [3,9,15], care au demonstrat că procesul temperaturo-dependent, care derulează la nivelul membranelor celulare la congelare, este tranzația fazică a lipidelor, fiind considerată ca etapă inițială în mecanismul șocului termic. Prevederile ipotezei bine concordă cu criodeteriorările determinate de tranzația fazică a lipidelor, însă nu reflectă modificarea altor componente ale sistemelor criobiologice.

Concomitent, coraportul colesterolului cu fosfolipidele în membranele plasmatiche determină, în mare măsură, fluiditatea și sensibilitatea membranelor [16]. Termorezistența membranelor, stabilită anterior, și raportul colesterol:fosfolipide sunt legate reciproc între ele, fapt demonstrat de datele prezentate în figurile 2 și 3.

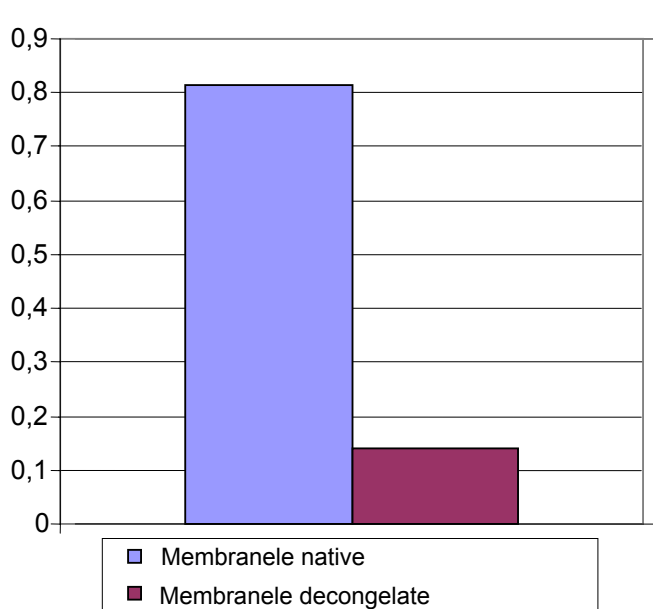


Fig.2. Raportul colesterol:fosfolipide în membranele plasmatiche ale spermatozoizilor de cocoș la crioconservare.

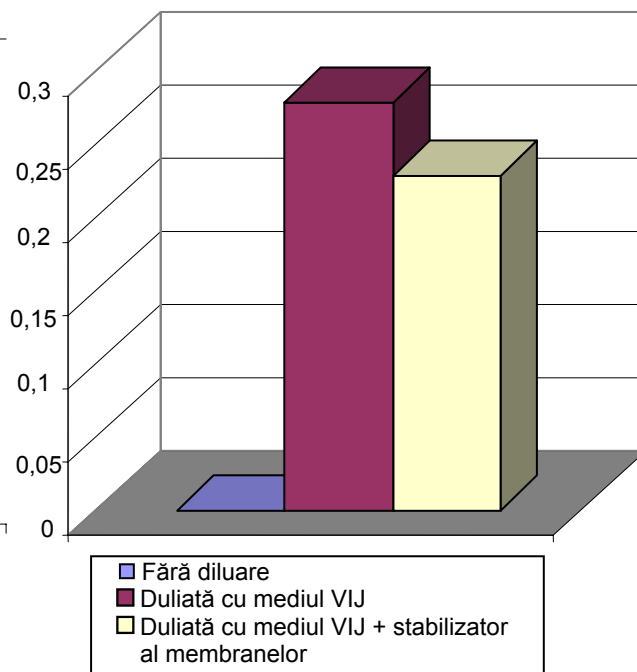


Fig.3. Raportul colesterol:fosfolipide în membranele plasmatiche ale spermatozoizilor de vier la crioconservare

Datele prezentate în figurile 2 și 3 denotă că raportul colesterol:fosfolipide din membranele spermatozoizilor de cocoș sunt supuse transformărilor semnificative sub acțiunea temperaturilor negative. Valoarea acestui

indice scade de la 0,815 până la congelare la 0,139 după decogelarea spermei de cocoș și sporește semnificativ în membranele spermatozoizilor de vier până la 0,279 la diluarea spermei cu mediul sintetic VIJ și până la 0,229 la diluarea spermei cu mediul VIJ la includerea în concentrații optime a stabilizatorului membranelor.

Conform [Blesbois 1], fluiditatea membranelor în materialul seminal proaspăt recoltat s-a dovedit a fi proporțională cu raportul colesterină:fosfolipide și, astfel, scăderea coraportului menționat servește ca un bun indicator anticipat al proprietăților materialului seminal pentru crioconservare, obținut de la diverși masculi din aceeași specie.

Modificarea cantitativă evidentă a raportului colesterină:fosfolipide are și un rol important adaptiv în funcționarea membranelor celulare [17], inclusiv a mecanismelor de adaptare, care modifică componența membranelor la scăderea temperaturii. Având în vedere că conținutul acestor legături se află în corelație directă cu conținutul colesterinei [18], putem menționa că factorii crioconservării influențează mai puternic, comparativ cu lipidele la care pot fi adaptate membranele și, în rezultat, are loc modificarea structurilor membranelor.

În contextul celor expuse, având în vedere criorezistența diferită a spermei de cocoș și de vier, respectiv, ca una dintre cele mai înalte și una dintre cele mai joase, în scop de analiză comparativă, un interes deosebit reprezintă și componența lipidică a membranelor plasmatice ale spermatozoizilor de vier la crioconservare. Rezultatele cercetării spectrului lipidic în sperma de vier și modificarea lui în procesul de crioconservare sub influența factorilor de mediu sunt prezentate în Figura 4.

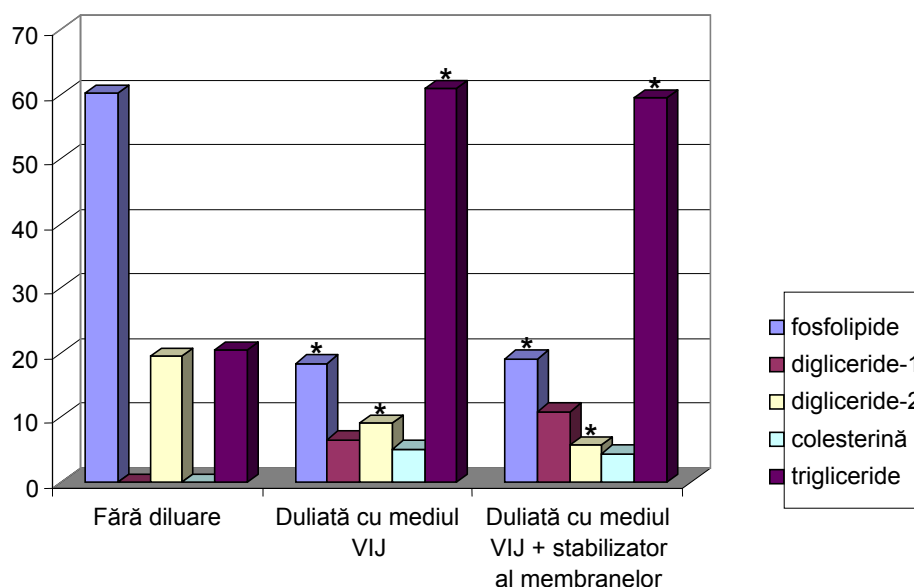


Fig.4. Lipidele membranelor spermatozoizilor de vier la crioconservare.

*Diferințele sunt statistic autentice între indicii variantelor I-II, I-III.

Analiza comparativă a densitogramelor lipidelor din biomembranele spermatozoizilor de cocoș și de vier (figurile 3 și 4) demonstrează, în principiu, proprietățile deosebite ale componenței lipidice. În rezultatul densimetrii fotoplastinelor prelucrate cu componenți lipidici ai spermilor de cocoș sunt stabilite limitele de înaintare a fosfolipidelor, digliceridei-2 și colesterinei, la vier – a fosfolipidelor, digliceridei-2 și a trigliceridelor. Conținutul fosfolipidelor și al digliceridei-2 semnificativ diferă între spermatozoizii speciilor cercetate ($P < 0,001$ și $P < 0,01$, corespunzător). O particularitate caracteristică este absența digliceridei-1 și scăderea semnificativă a conținutului de trigliceride în spermatozoizii de cocoș după congelare și decongelare, iar în spermii de vier, în condiții similare, respectiv – a digliceridei-1 și a colesterinei.

Astfel, datele obținute demonstrează că procesul de crioconservare provoacă modificarea fizico-chimică a componenței lipidice a membranelor. Aceste modificări ale diversității lipidelor în direcția micșorării sau sporirii conținutului lor pentru fiecare în parte pot fi explicate prin interacțiunea colesterinei cu alte componente de natură lipidică sau proteică [5]. În acest caz, sporirea conținutului de fosfolipide poate fi determinată prin formarea complexelor colesterino-fosfolipidice, care coincide și cu rezultatele diminuării colesterinei. Scăderea

conținutului de colesterină în procesul crioconservării spermei de cocoș se demonstrează prin micșorarea numărului legăturilor duble [18], care pot fi deteriorate sub influența factorilor de congelare-decongelare a obiectului studiat.

Concluzii

1. Au fost determinate limitele de înaintare a fosfolipidelor, digliceridei-1 și 2, colesterinei, trigliceridelor și s-a determinat spectrul lipidelor în membranele plasmatiche ale spermatozoizilor de cocoș și de vier în procesul de crioconserare.

2. Experimental este marcată majorarea autentică în membranele spermatozoizilor, după congelarea și decongelarea lor, a conținutului de fosfolipide și scăderea conținutului de digliceridă-2 și de trigliceride în sperma de cocoș.

3. S-a stabilit scăderea semnificativă a valorii raportului colesterină:fosfolipide în procesul congelării și decongelării spermei, influențând la deplasarea trecerilor fazice ale lipidelor membranelor spermatozoizilor, predeterminată și de conținutul înalt al colesterinei în membrane.

4. S-a constatat că sporirea raportului colesterină:fosfolipide în procesul de crioconserare a spermei de vier este predeterminată de interacțiunile dintre colesterina și fosfolipidele mediilor sintetice și elementele structurale ale membranei plasmatiche.

Referințe:

1. Blesbois E. et al. Cryopreservation of avian spermatozoa and predictors of ability to freezing // Les actes du BRG, 2006b, vol.6, p.415-431.
2. Goni F.M. et. al. Molecular and acell Biology of Lipids // Biochim. Biofiz. Acta, 2008, vol.1781, p.11-12.
3. Борончук Г.В., Балан И.В. Структурно-функциональные и биохимические изменения в биологических системах при криоконсервации. - Chișinău: Tipografia AȘM, 2008.
4. Yoneda A., Suzuki K., Mori T. et al. Effects of delipidation and oxygen concentration on *in vitro* development of porcine embryos // Journal of Reproduction and Development, 2004, vol.50, p.287-295.
5. Шишкина Л.Н., Шевченко О.Г. Липиды эритроцитов и их функциональная активность // Успехи современной биологии, 2010, Том 130, № 6, с.587-602.
6. Alvarez J.G. and Storey B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa // Molecular Reproduction and Development, 1995, vol.42, p.334-346.
7. Коуанаги F. et. al. Acrosome reaction of cock spermatozoa incubated with the perivitelline layer of the hen's ovum // Poultry Science, 1988, vol.67, p.1770-1774.
8. Скороход В.И., Стефаник М.Б. Методы исследования липидов в органах и тканях животных. - Львов, 1983.
9. Наук В.А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации. - Кишинев: Штиинца, 1991.
10. Скатков С.А. Полиненасыщенный фосфатидилхолин и мужская фертильность // Проблемы репродукции, 2003, №1, с.84-91.
11. Халилов Э.М., Тарховская Т.И., Ипатова О.М. и др. Мембранные белки и фосфолипиды как эффекторы обратного транспорта холестерина // Биомедицинская химия, 2006, № 2, с.113-123.
12. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. - СПб: Питер Пресс, 1995.
13. Карпунин Д.В., Акимов С.А., Фролов В.А. Формирование пор в плоских липидных мембранах, содержащих лизолипиды и холестерин // Биологические мембраны, 2005, Том 22, № 5, с.429-432.
14. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей.- Киев: Урожай, 1978.
15. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. - Киев: Наукова думка, 1982.
16. Horvath G. & Seidel G.E. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-beta-cyclodextrin // Theriogenology, 2006, vol.66, p.1026-1033.
17. Смирнов Л.П., Богдан В.В. Липиды в физиолого-биохимических адаптациях эктотермных организмов к абиотическим факторам среды. - Москва: Наука, 2007.
18. Титов В.Н., Лисицин М.Д. Содержание спиртов холестерина в плазме крови зависит от количества двойных связей жирных кислот в пуле липидов липопротеинов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2006, №11, с.521-524.

Prezentat la 15.06.2012