

CZU: 619:616.69-008.8:636.52/.58

IMPACTUL ACȚIUNII ANTIOXIDANȚILOR STEROIZI ASUPRA STĂRII MORFO-FUNCȚIONALE A SPERMATOZOIZILOR DE COCOȘ LA CRIOCONSERVARE

I. BALAN ¹, Gh. BORONCIUC ², N. ROȘCA ², I. MEREUȚA ²,
V. BUZAN ², Iu. CAZACOV ², M. BUCARCIUC ²

¹Universitatea Agrară de Stat din Moldova

²Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al Academiei de Științe a Moldovei

Abstract. Steroidal glycosides possess antioxidative endogenous properties on the peroxidation processes in biological products. Therefore, steroidal glycosides could represent one of the solutions for maintaining of morphological and physiological functions of spermatozoa. The researches aimed to study the influence of the steroidal glycosides as antioxidants, on cock sperm sanogenity in the cryoconservation process. The following physiological and morfological indices of sperm were assessed: the mobility, the pathological forms and acrosome integrity of spermatozoa. The obtained results established the optimal concentration of the - Lilia-H and Treozida-Lilia in the composition of synthetic media used for cock sperm cryoconservation. The antioxidative effect of the researched steroidal glycosides was confirmed by maintaining the morphological-functional status of the spermatozoa and diminution of the gamete pathology.

Key words: Cocks; Sperm; Antioxidant; Cryoconservation; Steroidal glycosides

Rezumat. Glicozidele steroidale posedă proprietăți antioxidative endogene la derularea proceselor de peroxidare în produsele biologice. Prin urmare, glicozidele steroidale ar putea reprezenta una dintre soluții pentru menținerea funcțiilor morfologice și fiziologice ale spermatozoizilor. Cercetările efectuate au vizat studierea influenței glicozidelor steroidale ca antioxidanți asupra sanogenității spermei de cocoș în procesul de crioconservare. S-au utilizat metode de evaluare a indicilor fiziologici și morfologici: mobilitatea, formele patologice și integritatea acrozomală a spermatozoizilor. Rezultatele obținute au stabilit concentrația optimă a - Lilia-H și Treozida-Lilia în compoziția mediilor sintetice pentru crioconservarea spermei de cocoș. Efectul antioxidativ al glicozidelor steroidale studiate a fost confirmat prin menținerea statutului morfo-funcțional al spermatozoizilor și reducerea patologiilor gameților.

Cuvinte cheie: Coccoși; Spermă; Atioxidant; Crioconservare; Glicozide steroidale

INTRODUCERE

Glicozidele steroidale reprezintă o clasă importantă de substanțe naturale din grupa saponinelor, care atrag atenția cercetătorilor datorită spectrului larg de activitate biologică și securitate ecologică. În medicina tradițională glicozidele steroidale se folosesc ca preparate antiinflamatoare, fungicide, contraceptive, antibiotice și citotoxice. Este cunoscut că aceste substanțe diminuează nivelul colesterolului în sânge și au proprietăți cu acțiune antioxidativă. Totodată, proprietățile de stimulare a creșterii și a fitoimunității caracterizează glicozidele steroidale drept adaptogeni naturali (Tolkačeva, N. et al. 2011).

Soluționarea problemei ce ține de crioconservarea spermei animalelor domestice este strâns legată de studierea componentelor structurali ai gameților. În acest sens, o atenție deosebită se acordă lipidelor, ca elemente necesare, integrale și esențiale ale membranelor biologice. Anume compoziția lipidică a membranelor determină un șir de funcții esențiale ale celulei. Fluiditatea membranelor, clasterizarea proteinelor receptoare, formarea și caracteristica materialului supramembranic depind de conținutul și structura lipidelor (Furdui, F. et al. 2013).

În același timp, metabolismul lipidelor, activitatea enzimelor lipiddependente, viteza proliferării și permeabilitatea membranei sunt determinate de nivelul de peroxidare a lipidelor (Boronciuc, Gh. et al. 2008; Khan, R. 2011). Dereglarea intensității acestui proces poate cauza patologii celulare și concomitent poate influența derularea mecanismelor homeostaziei structural-biochimice și a fenomenelor criodeteriorării celulelor reproductive (Balan, I. 2013).

Reieșind din cele menționate, scopul cercetărilor efectuate a fost studierea posibilităților de menținere a proprietăților funcționale și de stabilizare a structurilor morfologice ale spermatozoizilor la folosirea antioxidanților în componența mediilor crioprotectoare.

MATERIAL ȘI METODĂ

În experiențe a fost utilizată sperma de cocoș și vier, recoltată prin metodele tradiționale acceptate. Ejaculatele recoltate au fost analizate prin folosirea metodelor general acceptate pentru determinarea volumului, concentrației, supraviețuirii și mobilității, în limitele de mișcare fiziologică, a spermatozoizilor vii. Mobilitatea rectilinie a spermatozoizilor s-a determinat la temperatura confortogenă. Temperatura experimentală a fost reglată cu ajutorul mășutei electrice speciale a microscopului.

Crioconservarea spermei s-a realizat conform schemelor clasice de conservare, în formă de pastile la temperatura azotului lichid. Decongelarea spermei s-a efectuat în baia cu apă, la temperatura de 40° C.

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

Pentru determinarea spermatozoizilor cu acrozomele întegre și deteriorate a fost folosită colorarea spermatozoizilor vii cu colorantul fluorescent – tiazinul roșu. Pentru analiză s-au utilizat mediile sintetice, prevăzute pentru diluarea și conservarea spermei de cocoș, care au fost suplimentate cu fluorocromele – etadionbromida și tiozinul roșu în concentrație de 10⁶ Mol și, respectiv, de 5x10⁴– 5x10⁵ Mol.

Analiza statistică a datelor experimentale obținute s-a efectuat conform criteriilor parametrice Student. Concluziile principale reflectate în lucrare sunt bazate pe diferențele statistic autentice între loturi. Rezultatele sunt exprimate prin valori medii, indicându-se și gradul de eroare standard. Pragul de semnificație prezentat este P<0,05.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Ameliorarea fertilității masculine constituie o preocupare majoră a cercetărilor din domeniul conservării spermei de cocoș din ultimele decenii (Balan, I. 2013). Problemele de fertilitate cauzate de performanțele slabe ale efectivului masculin ar putea fi depășite, conform studiilor antioxidanților, prin protecția integrității morfologice a membranelor spermatozoizilor și creșterea viabilității lor (Khan, R. 2011).

Pornind de la această ipoteză, în experiențele montate s-a analizat eficacitatea antioxidanților în componența mediului crioprotector pentru sperma de cocoș. Incluziunea în componența acestui mediu a substanțelor biologice active are un caracter secundar și se folosește în cazul dereglărilor pronunțate ale homeostaziei celulelor. De exemplu, antioxidanții se utilizează pentru preîntâmpinarea peroxidării lipidelor din structurile membranare ale spermatozoizilor, în care enzimele care reglează peroxidarea lipidelor au o activitate scăzută. În acest scop, în componența mediilor pentru crioconservarea spermei păsărilor se folosește inhibitorul fosfodiesterazei și a enzimei descompunerii c-adenozinmonofosfatului (c-AMP). S-a demonstrat că influența dirijată a c-AMP, una din principalele nucleotide care aprovizionează bioenergia celulei pentru mobilitatea și supraviețuirea spermatozoizilor, se reflectă pozitiv asupra rezultatelor crioconservării materialului seminal (Linnik, T. et al. 2010).

În calitate de compuși antioxidanți au fost utilizate glicozidele steroide, iar eficacitatea utilizării lor pentru crioprotecția materialului seminal de cocoș se prezintă conform datelor din tabelul 1.

Tabelul 1. *Dinamica gametopatiilor și mobilitatea spermatozoizilor crioconservați de cocoș în funcție de concentrația glicozidului steroid – Lilia-H*

Nr. crt.	Concentrația antioxidanților, mg%	Conținutul gametopatiilor, %	Mobilitatea spermatozoizilor decongețați, puncte
1.	5	27,0 ± 1,16	4,75 ± 0,230
2.	2,5	27,3 ± 1,60	4,92 ± 0,261
3.	1,25	26,5 ± 2,39	5,17 ± 0,183
4.	0,624	24,7 ± 1,06	5,58 ± 0,165
5.	0,312	23,2 ± 0,72	6,08 ± 0,168*
6.	0,156	23,8 ± 1,04	5,92 ± 0,168*
7.	0,078	25,5 ± 1,09	5,58 ± 0,166
8.	0,039	26,7 ± 1,05	5,33 ± 0,115
9.	0 - martor	26,7 ± 0,69	5,17 ± 0,115

*Diferențele sunt statistic autentice în comparație cu lotul martor.

Datele tabelului 1 denotă eficiența includerii preparatului Lilia-H la stabilizarea mobilității gameților de cocoș după decongelare. Concentrația optimă a glicozidului steroid a constituit 0,312 și 0,156 mg%. Celelalte concentrații, de la 5 până la 0,039 mg%, nu influențează mobilitatea spermei de cocoș după decongelarea ei.

Este important a menționa că utilizarea produsului Lilia-H nu manifestă acțiune asupra ratei de gametopatii, ceea ce poate fi explicat prin specificul și proprietățile fizico-chimice ale antioxidantilor.

Având în vedere că componența lipidică a membranelor plasmatiche determină, în mare măsură, activitatea funcțională a celulelor, iar fluiditatea membranelor, formarea și arhitectura matricelui exocelulare depind de componența și structura lipidelor care se supun procesului fiziologic normal de peroxidare, putem afirma că acțiunea neutră a preparatului Lilia-H asupra componenților structurali ai gameților se încadrează în limitele fiziologice admisibile. În condiții fiziologice normale, există un echilibru adecvat între reacțiile de oxidare specifică și antioxidanți (Agarwal, A. et al. 2005).

Diminuarea concentrației antioxidantului de la 5 mg% până la 0 mg% a contribuit la majorarea mobilității spermatozoizilor decongețați și, concomitent, la unele diminuări nesemnificative ale ei, ultimele fiind consecințe ale peroxidării lipidelor, cu producerea în mod constant a produselor care influențează negativ capacitatea de fertilizare a spermei (Surai, P. 2005).

Valoarea maximă antioxidantivă s-a stabilit la utilizarea fracției sumare Lilia-H în concentrație de 0,312 mg%. Utilizarea acestui preparat împreună cu componenții mediului crioprotector pentru sperma de cocoș permite majorarea indicelui studiat cu 17,6%.

Posibilitatea inducerii peroxidării lipidelor, care afectează structura și funcția membranelor celulare, a determinat studierea glicozidelor steroide concomitent cu diverse componente bioactive ale mediului sintetic pentru crioconservarea spermei de cocoș în cadrul mecanismelor de crioprotecție și criodeteriorare a spermatozoizilor.

În acest scop, cercetările privind influența compușilor bioactivi din seria „Lilia” au continuat prin studiul acțiunii substanței Treozida-Lilia în aceleași condiții experimentale. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2. *Dinamica gametopatiilor și mobilitatea spermatozoizilor crioconservați de cocoș în cazul utilizării glicozidului steroid – Treozida-Lilia*

Nr. crt.	Concentrația antioxidantilor, mg%	Conținutul gametopatiilor, %	Mobilitatea spermatozoizilor decongețați, puncte
1.	5	18,3 ± 0,46*	5,75 ± 0,121
2.	2,5	17,5 ± 0,68*	6,25 ± 0,234*
3.	1,25	18,5 ± 0,97*	6,08 ± 0,216
4.	0,624	20,8 ± 0,91	5,58 ± 0,154
5.	0,312	24,0 ± 1,50	5,33 ± 0,115
6.	0,156	25,8 ± 1,04	5,25 ± 0,112
7.	0,078	26,3 ± 0,92	5,42 ± 0,091
8.	0,039	27,2 ± 0,66	5,33 ± 0,115
9.	0 - martor	27,7 ± 0,54	5,42 ± 0,215

*Diferențele sunt statistic autentice în comparație cu lotul martor.

Datele din tabelul 2 constituie rezultate autentice privind starea morfologică și funcțională a spermatozoizilor de cocoș sub influența Treozidei-Lilia. În particular, concentrația optimă a preparatului este de $3,15 \times 10^{-5}$ g/100 ml mediu. Utilizarea acestui remediu permite de a majora mobilitatea spermatozoizilor cu mai mult de 15% comparativ cu indicii analogici din grupul martor, unde antioxidantul nu a fost utilizat.

În același timp, concentrația antioxidantului în limitele 5–1,25 mg% a micșorat semnificativ numărul formelor patologice ale spermatozoizilor, de la $27,7 \pm 0,54\%$ în lotul martor până la $17,5 \pm 0,68\%$ în varianta experimentală ce include Treozida-Lilia în concentrație de 2,5 mg% în componența mediului.

Prin urmare, activitatea antioxidantivă a glicozidelor steroide depinde nu numai de componența chimică a lor, dar, practic, și de particularitățile specifice ale obiectului supus crioconservării.

Astfel, analiza studierii influenței glicozidelor steroide (Tab. 1, 2) asupra stării morfo-funcționale a spermei de cocoș permite de a concluziona că glicozidele steroide studiate, preparatele Lilia-H și Treozida-Lilia s-au dovedit a fi deosebit de eficiente la stabilizarea integrității morfologice și activității funcționale

ale spermatozoidelor în procesul crioconservării spermei de cocoș. Remediu Lilia-H nu a modificat semnificativ numărul gametopatiilor, în schimb a produs creșterea mobilității gameților deconservați. Produsul Treozida-Lilia, la rândul său, a redus considerabil dinamica patologiilor pe de o parte, și a sporit mobilitatea rectilinie a spermatozoidelor pe de altă parte. Ultimele modificări pot fi explicate în raport cu concepțiile contemporane, conform cărora peroxidarea lipidelor (POL) decurge în cazul apariției radicalilor specifici în sistemul biologic, iar formarea lor și a produselor (POL) inițiază schimbări profunde de natură biochimică și fiziologo-structurală în obiecte biologice la diferite niveluri de organizare a lor (Boronciuc, Gh. et al. 2008; Malo, C. et al. 2010b). Datorită electronilor necuplați, radicali liberi atât ai oxigenului, cât și ai lipidelor se includ în procesele biochimice și provoacă reacții nespecifice de extragere a hidrogenului din compușii chimici și, în același timp, ei servesc ca intermediatori ai inițierii și derulării reacțiilor de oxidare a lipidelor (Misro, M. et al. 2004). Prin urmare, inhibarea acestor reacții poate fi realizată datorită interacțiunii cu radicalii de ambele forme. În conformitate cu aceasta sunt necesari antioxidanți cu o eficacitate înaltă, fapt ce a fost constatat la studierea activității antioxidante a preparatului Treozida-Lilia în procesul de crioconservare a spermei de cocoș.

Metabolismul lipidelor, activitatea fermenților lipiddependenți, viteza proliferării membranelor depind de nivelul POL, care este un proces fiziologic normal. În același timp, ca consecință a peroxidării extinse a lipidelor, reacțiile de POL în mod constant produc produse, care influențează negativ capacitatea de fertilizare a spermei (Agarwal, A. et al. 2005; Surai, P. 2005). În condiții fiziologice normale, există un echilibru adecvat între reacțiile de oxidare specifică și antioxidanți (Furdui, F. et al. 2013).

Un rol semnificativ în procesul fecundării oocitelor îl are aparatul acrozomal al spermatozoidelor, cele mai sensibile structuri ale cărora sunt membranele acrozomale, care accelerează modificările de structură și componența lor. În legătură cu aceasta au fost efectuate experiențe cu privire la determinarea influenței glicozidelor steroidice asupra proprietăților de păstrare a structurilor morfologice la nivelul acrozomului. Rezultatele cercetărilor sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 3. Acțiunea glicozidelor steroidice asupra integrității acrozomului spermatozoidelor congelați-decongelați de cocoș

Nr. ctr.	Denumirea antioxidantului	Concentrația antioxidantului, mg%	Integritatea acrozomului spermatozoidelor, %
1.	Lilia-H	0,624	45,8 ± 1,04
		0,312	45,3 ± 1,16
		0,156	45,7 ± 1,01
		0 - martor	44,7 ± 0,46
2.	Treozida-Lilia	5,0	48,7 ± 1,18
		2,5	50,8 ± 1,03*
		1,25	49,5 ± 1,14*
		0 - martor	45,1 ± 0,34

* Diferența este statistic autentică în comparație cu lotul martor

Din datele tabelului 3 rezultă că după crioconservarea spermei, integritatea acrozomului spermatozoidelor de cocoș s-a păstrat cel mai bine în cazul când în componența mediului a fost inclusă substanța Treozida-Lilia în concentrații de 2,5–1,25 mg%. Aceste date demonstrează eficacitatea antioxidantului menționat la stabilizarea structurilor morfologice ale spermatozoidelor de cocoș. De asemenea arată că în procesul de crioconservare a spermei de cocoș bariera fiziologică a antioxidantilor poate fi dereglată, ceea ce implică folosirea suplimentară a antioxidantilor în componența mediilor sintetice.

Analiza rezultatelor expuse permite de a remarca că antioxidanții în componența mediilor crioprotectoare inhibă peroxidarea „radicalilor” liberi din spermă. Lipidele biocomplexelor membranice sunt implicate în procesul peroxidării într-o măsură mai mică, datorită prezenței legăturilor puternice în componența structurală a biocomplexelor. La peroxidarea lipidelor din spermă pot fi prezenți radicali liberi sau lipide intercalate în biocomplexe prin intermediul legăturilor slabe. În acest fel, probabil, se produce peroxidarea preponderentă a lipidelor și, prin urmare, peroxidarea la acest nivel este inactivată de către antioxidanți.

Astfel, rezultatele obținute permit de a menționa că antioxidanții cercetați sunt preparate eficiente pentru crioconservarea spermei. Includerea acestora în componența mediilor crioprotectoare pentru materialul seminal permite de a majora indicii fiziologici și morfologici ai spermatozoidelor deconservați.

CONCLUZII

1. Fortificarea integrității morfologice și stabilizarea funcțională a spermei de cocoș în condiții de crioconservare poate fi obținută prin utilizarea în calitate de crioprotector a glicozidelor sterioide Lilia-H și Treozida-Lilia.

2. S-a stabilit că dintre glicozidele sterioide studiate, cel mai eficient la stabilizarea integrității morfologice și activității funcționale ale spermatozoizilor în procesul crioconservării spermei de cocoș s-a dovedit a fi Treozida-Lilia, care a redus considerabil dinamica patologiilor și a sporit mobilitatea rectilinie a spermatozoizilor.

3. Concentrația optimală a glicozidelor sterioide studiate în componența mediilor pentru crioconservarea spermei de cocoș diferă semnificativ, ceea ce determină variabilitatea activității antioxidative a lor.

4. Antioxidanții utilizați ca substanțe biologice active în procesul crioconservării manifestă proprietăți selective privind stabilizarea indicilor morfo-funcționali ai spermatozoizilor de cocoș, în conformitate cu doza și durata de acțiune a lor.

5. Procesul de crioconservare a spermei de cocoș poate deregla bariera fiziologică a proceselor antioxidative, ceea ce predetermină folosirea suplimentară a antioxidanților în componența mediilor sintetice.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. AGARWAL, A., PRAKARAN, S.A., 2005. Oxidative stress and antioxidants in male fertility: a difficult balance. In: Iranian Journal of Reproductive Medicine, vol. 3, no. 1, pp. 1-8. ISSN 1680-6413.

2. BALAN, I., 2013. Teoria și practica crioconservării spermei de cocoș și tehnologiei reproducerii descendenților sănătoși: autoref. tz. doct. hab. în șt. biologice. Chișinău. 46 p.

3. BORONCIUC, Gh., BALAN, I., 2008. Structurno-funkcional'nye i biohimičeskie izmeneniâ v biologičeskikh sistemah pri kriokonservacii. Chișinău. 633 p. ISBN 978-9975-62-243-1.

4. FURDUI, F. i dr., 2013. Temperaturozavisimye reakcii v processe kriokonservacii. Chișinău. 608 p. ISBN 978-9975-62-337-7.

5. KHAN, R.U., 2011. Antioxidants and poultry semen quality. In: World's Poultry Science Journal, vol. 67, pp. 297-308. ISSN 0043-9339.

6. LINNIK, T.P., MARTYNIUK, I.N., 2010. Podhody k sozdaniu kriozashitnyh sred pri kriokonservirovanii spermyptic. V: Problemy kriobiologii, t. 20, nr. 1, s. 109-122. ISSN 2307-6143.

7. MALO, C. et al., 2010. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). In: Cryobiology, vol. 61, no. 1, pp. 142-147. ISSN 0011-2240.

8. MISRO, M.M. et al., 2004. Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative stress in subjects presenting a normal semen profile. In: International Journal Andrology, vol. 27, pp. 82-87. ISSN 1439-0272.

9. SURAI, P.F., 2005. Mineral and anti-oxidants. In: Redefining Mineral Nutrition. Nottingham University Press, pp. 147-177. ISBN 978-19047-613-03.

10. TOLKAČEVA, N.V. i dr., 2011. Stroenie osnovnogo steroidnogo glicozida socvetij *allium cyrillii* (*alliaceae*). V: Učenze zapiski Tavričeskogo Nac. Un-ta. im. V.I. Vernadskogo, Seria „Biologjâ, himiâ”, t. 24(63), nr. 2, s. 390-395. ISSN 1606-3716.

Data prezentării articolului: 25.08.2014

Data acceptării articolului: 12.11.2014