

МЕТОДЫ КРИОРЕЗИСТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ В ПРОЦЕССЕ ВОСПРОИЗВОДСТВА ЖИВОТНЫХ.

Кунденко Н.П., д.т.н.

(Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства им. П.Василенка)

Предложено использовать ультразвуковые колебания как средства увеличения криорезистивности биологических объектов и поиск способов дополнительной криозащиты их структур.

Постановка проблемы. Решение продовольственной проблемы в Украине в значительной степени связано с методом искусственного осеменения животных. Широкое использование метода искусственного осеменения в животноводстве во много определяется эффективностью криоконсервации спермиев в жидком азоте. Несмотря на то, что вопросу криоконсервации спермиев животных уделено достаточно большое внимание, всё же основной проблемой остаётся снижение биологически полноценных спермиев в процессе криообработки.

Цель статьи. Исследовать возможные механизмы воздействия ультразвуковых волн с целью оптимизации условий низкотемпературного консервирования таких биологических объектов как сперма сельскохозяйственных животных.

Основные материалы исследования. Важной проблемой является всестороннее изучение возможностей увеличения криорезистивности биологических объектов и поиск способов дополнительной криозащиты их структур. Процессы замораживания и последующего отогрева могут оказывать сильное повреждающее действие на биологические объекты (спермии, эмбрионы и т.п.). В результате исследований было установлено, что добавление в сперму быка желтка куриного яйца способствует повышению устойчивости спермиев к температурному шоку.

Действующим началом яичного желтка являются фосфолипиды и липопroteиды. Механизм защитного действия липидов состоит в том, что желток «разжижает» плазмалоген спермиев и предохраняет его от затвердевания при понижении температуры. Обработка желтком спермы животных весьма значительно меняет качественный состав мембраны.

Исходя из общего плана строения молекул липидов, можно объяснить механизм адсорбции этих веществ на поверхность мембраны. Водно-солевые растворы липидов имеют ламеллярную или мицеллярную структуру, которая характеризуется минимальной площадью соприкосновения гидрофобных частей молекул с водой и, таким образом, наименьшей свободной энергией системы.

При возрастании концентрации липидов (\approx до 50%) в присутствии заряженных молекул белков наблюдается полислоное строение липидных раство-

ров, когда раствор представляет набор бислойных липидных пленок, пространство между которыми, возможно, заполнено молекулами белка и растворителем.

Как указано в работе [4], к фосфорной группе фосфолипидов часто присоединяется азотсодержащее основание, вследствие чего формируется полярная головка с двойным зарядом (+ -), которая при физиологических значениях рН может быть электрически нейтральной. Молекулы таких соединений (фосфорилхолин, фосфорилсерин, фосфорилэтанолламин и т.п.) имеют дипольный момент.

Наличие четко выраженного дипольного момента в молекуле липидов и электрического заряда на мембране клетки позволяет предположить значительное участие в эффекте фортификации мембран электрических взаимодействий, в которых клеточная мембрана играет роль заряженного центра, где адсорбируются молекулы липидов растворов.

Следовательно, различные типы взаимодействий: Ван-дер-Ваальса, ориентационные, дисперсионные, электростатические и другие приведут к перераспределению молекул липидов между раствором и клеточной мембраной, таким образом, что часть липидных молекул адсорбируется на поверхности клетки и вся система приходит в более устойчивое энергетическое состояние с меньшим значением свободной энергии.

Толщина защитного слоя на плазматической мембране будет возрастать дискретно на величину, равную толщине одного бислоя, т.е. и с окружающим клетку раствором, и с поверхностью мембраны клетки молекулы липидов соприкасаются полярными «головками». Так как длина таких молекул колеблется в пределах 25...35 Å, толщина защитного слоя будет увеличиваться при образовании еще одного адсорбирующего слоя на 40...60 Å.

Следует отметить, что упорядоченность адсорбции с увеличением количества слоев будет ухудшаться. Вследствие экранировки заряда клетки предыдущими слоями, упорядочивающее его значение будет снижаться, возрастет разрыхленность последующих слоев и молекулы липидов будут занимать большую площадь, чем в более глубоких слоях; степень свободы их с клеткой возрастет, и они будут легче переходить в раствор. Другими словами, энергия связи с поверхностью клетки каждого последующего слоя будет ниже, чем предыдущего, что приведет, в конце концов, к эффекту насыщения, когда толщина мембраны уже не будет возрастать, несмотря на дальнейшее увеличение концентрации липидов в окружающем растворе [2]. При концентрации желтка в разбавителе до 60% максимальная толщина оболочки на поверхности мембраны не превышает величину 250...300 Å [3].

Наряду с совершенствованием таких традиционных подходов, как определение для каждого биологического объекта криозащитных сред и режимов криоконсервирования, изучаются возможности использования физических факторов, оказывающих обратимо модифицирующее воздействие на криолабильные структуры биологических систем. Одним из таких физических факторов является ультразвук низкой интенсивности. Если реакции биологических объектов на ультразвуковые колебания изучены хорошо на молекулярном, клеточ-

ном и тканевом уровнях, то возможности влияния ультразвуковых волн на биологические объекты, находящиеся в крио-консервирующей среде, изучены недостаточно. Эффект увеличения криорезистивности получен на весьма ограниченном наборе биологических объектов: половых клетках и безъядерных клетках крови.

Необходимо повысить эффективность способов замораживания и отогрева биологических объектов (спермии, эмбрионы и т.п.) и выявить подходы к использованию ультразвуковых волн при криоконсервировании биологических объектов. Поскольку, при наличии ультразвуковых волн в криоконсервирующей среде возникают диффузионные процессы, где перенос и собственно молекулярные движения частиц взаимно перекрывают друг друга, и разделение их экспериментальным путём представляет собой чрезвычайно трудную задачу.

Анализ многочисленных экспериментальных результатов [1] показывает, что процесс массопередачи определяется диффузией, возникающей вследствие наличия разности концентрации частиц между слоем среды, непосредственно примыкающей к поверхности биологического объекта и толщиной среды.

Анализ результатов приведенных в [1] позволяет сделать вывод о том, что коэффициент диффузии практически не изменяется в звуковом поле. Следовательно, должен увеличиваться градиент концентрации частиц среды на поверхности биологического объекта. Физической причиной такого увеличения являются микропотоки в малой окрестности биологических объектов, возникающие при воздействии ультразвуковых волн на криоконсервирующую среду. Это приводит к тому, что у поверхности биологического объекта образуется пограничный слой частиц среды с плотностью, отличающейся от плотности криоконсервирующей среды до воздействия ультразвуковых волн. Следует ожидать, что такой слой в окрестности поверхности биологического объекта может повысить его криорезистивность.

При исследовании состояния биологических объектов, находящихся под воздействием различных физических факторов, немаловажное значение имеет выбор метода для контроля состояния биологических объектов в данное время. Взаимодействие физических факторов с биологическими системами связано с их физическими и химическими изменениями.

Из многочисленных методов измерения параметров биологических объектов внимания заслуживают диэлькометрические методы.

В ряде работ отмечены большие возможности диэлектromетрии для анализа молекулярных механизмов взаимодействия биополимеров [4,5]. Диэлектromетрия позволила зафиксировать изменение диэлектрических характеристик при N-F-переходе в растворе сывороточного альбумина человека [5]. Таким образом, метод диэлектromетрии дает возможность подойти к исследованию проблемы по повышению жизнеспособности спермиев животных при их криообработке с помощью акустического поля.

Выводы. На основании теоретических и экспериментальных исследований предложена низкоинтенсивная акустическая технология для воздействия на микрообъекты животных КРС (спермии, эмбрионы) перед их криоконсервацией с целью повышения выхода жизнеспособных спермиев после криоконсервации,

повышения их оплодотворяющей способности и снижения количества спермиев в спермодозах для искусственного осеменения

Список литературы

1 Кунденко Н.П. Математическое моделирование процесса воздействия акустического поля на крио-консервирующую среду с биологическим объектом / Н.П. Кунденко. // Вісник Харківського національного технічного університету сільського господарства імені Петра Василенка .– 2011. - Вип 117– С.140-142.

2. Кунденко Н.П. Особенности распространения ультразвука в биологической среде / Н.П. Кунденко // Вісник ТДАТУ .– 2011. - Вип 11. том 4– С.181-186.

3. Grant E. N. The structure of water neighboring proteins, peptides and aminoacids as deduced from dielectric measurements / E. N Grant. – Ann. Nev. York. Acad. Sci., 1965. – 125. – P. 418-427.

4. Кунденко Н.П. Исследования криоконсервации микрообъектов крупного рогатого скота / Н.П. Кунденко. // Вісник національного технічного університету "ХП" .– 2011. - Вип 34/2012– С.156-160.

5. Harvey S. R. The state of surface bound water on lysozyme / S. R. Harvey Doct. diss., Dartmouth college. – Hanover New Hampshire, 1971. – 124 p.

Анотація

Методи кріорезистивності біологічних об'єктів в процесі відтворення тварин

Кунденко М.П.

Запропоновано використовувати ультразвукові коливання, як засіб збільшення кріорезистивності біологічних об'єктів та пошук способів додаткової криозахисту їх структури.

Abstract

Methods of kriorezistivnosti of biological objects in the process of reproduction of zoons.

N. Kundenko

It is suggested to use ultrasonic vibrations, as a mean of increase of kriorezistivnosti biological ob"ektiv and search of methods of additional kriozakhistu of their structure.