

РЕСУРСОЗБЕРІГАЮЧІ ЕЛЕКТРОТЕХНОЛОГІЇ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОГО ВИРОБНИЦТВА

УДК 614.89:537.868

ЕЛЕКТРОМАГНІТНІ ТЕХНОЛОГІЇ В ПРОЦЕСІ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ

Кунденко М. П.¹, Кравченко П. О.¹, Кунденко О. М.², Анне Енсен²

¹Харківський національний технічний університет сільського господарства імені Петра Василенка,
²BAEKGGAARD DRIFT APS (Виндеруп, Данія)

Запропоновано використовувати ультразвукові коливання як ефективний спосіб збільшення кріорезистивності біологічних об'єктів і пошук способів додаткового кріозахисту їх структур.

Постановка проблеми. Рішення продовольчої проблеми в Україні в значній мірі пов'язане з методом штучного запліднення тварин. Широке використання метода штучного запліднення в тваринництві визнається ефективною кріоконсервацією спермій в рідкому азоті. Незважаючи на те, що питанню кріоконсервації спермій тварин приділено чималу увагу, все ж основною проблемою залишається зниження біологічно повноцінних спермій в процесі кріообробці.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Процеси заморожування і подальшого відігрівання надають шкідливої дії на біологічні об'єкти (спермії, ембріони). Основними чинниками впливу на ступінь пошкодження структури біологічних об'єктів є: величина кристалів, тривалість перебування клітин в гіпертонічних середовищах, внутрішньоклітинна кристалізація, зневоднення клітин, рекристалізація, агрегація і денатурація клітинних білків. У результаті впливу всіх цих факторів у клітин виникають первинні кріоушкодження, такі як зміна форми, об'єму, порушення цілісності мембрани, зміна конформації макромолекул та інші. Такі первинні кріоушкодження можуть стати причиною вторинних ушкоджень, що розвиваються в клітинах у різний час після розморожування.

Мета статті. Дослідити можливі механізми впливу ультразвукових хвиль з метою оптимізації умов низькотемпературного консервування таких біологічних об'єктів як сперма сільськогосподарських тварин.

Основні матеріали дослідження. В результаті досліджень було встановлено, що додавання в сперму бика жовтка курячого яйця сприяє підвищенню стійкості спермій до температурного шоку. Початком яєчного жовтка є фосфоліпіди і ліпопротеїди. Механізм захисної дії ліпідів полягає в тому, що жовток "розріджує" плазмалоген спермій і оберігає його від затвердіння при зниженні температури. Обробка жовтком сперми тварин вельми значно змінює якісний склад мембрани. Виходячи із загального плану будови молекул ліпідів, можна пояснити механізм адсорбції цих речовин на поверхню мембрани.

Водно-солеві розчини ліпідів мають ламелярну або міцелярну структуру, яка характеризується мінімальною площею дотику гідрофобних частин молекул з водою і, таким чином, найменшою вільною енергією системи. При зростанні концентрації ліпідів (\approx до 50%) в присутності заряджених молекул білків спостерігається полішарова будова ліпідних розчинів, коли розчин представляє набір бішарових ліпідних

плівок, простір між якими, можливо, заповнений молекулами білка і розчинником.

Як відомо, до фосфорної групи фосфоліпідів часто приєднується азотомісна складова, внаслідок чого формується полярна голівка з подвійним зарядом (+ -), яка при фізіологічних значеннях рН може бути електрично нейтральною. Молекули таких сполук (фосфорілхолін, фосфорілсерін, фосфорілетаноламін і т. п.) мають дипольний момент. Наявність чітко вираженого дипольного моменту в молекулі ліпідів і електричного заряду на мембрані клітини дозволяє припустити значну участь в ефекті фортифікації мембран електричних взаємодій, в яких клітинна мембрана відіграє роль зарядженого центру, де адсорбуються молекули ліпідів розчинів. Товщина захисного шару на плазматичній мембрані буде зростати дискретно на величину, рівну товщині одного бішару, тобто і з навколишнім клітку розчином, і з поверхнею мембрани клітини молекули ліпідів стикаються полярними "голівками".

Так як довжина таких молекул коливається в межах 25 ... 35 А, товщина захисного шару буде збільшуватися при утворенні ще одного адсорбуючого шару на 40 ... 60 А. Слід зазначити, що впорядкованість адсорбції зі збільшенням кількості шарів буде погіршуватися. Внаслідок екранування заряду клітини попередні шарами, що впорядковує його значення, він буде знижуватися, зросте розрихленість наступних шарів і молекули ліпідів будуть займати більшу площу, ніж в більш глибоких шарах; ступінь свободи їх з кліткою зросте, і вони будуть легше переходити в розчин [1, 2]. При концентрації жовтка в розчиннику до 60% максимальна товщина оболонки на поверхні мембрани не перевищує величину 250 ... 300 Å.

Поряд з удосконаленням таких традиційних підходів, як визначення для кожного біологічного об'єкта кріозахисних середовищ і режимів кріоконсервації, вивчаються можливості використання фізичних факторів, якими можна зупинити вплив на кріолабільні структури біологічних систем.

Одним з таких фізичних факторів є ультразвук низької інтенсивності. Якщо реакції біологічних об'єктів на ультразвукові коливання вивчені добре на молекулярному, клітинному і тканинному рівнях, то можливості впливу ультразвукових хвиль на біологічні об'єкти, що знаходяться в кріоконсервованому середовищі вивчені недостатньо. Ефект збільшення кріорезистивності отриманий на вельми обмеженому

наборі біологічних об'єктів: статевих клітинах і без'ядерних клітинах крові [1, 2]. Необхідно підвищити ефективність способів заморожування і відігрівання біологічних об'єктів (спермії, ембріони) і виявити підходи до використання ультразвукових хвиль при кріоконсервації біологічних об'єктів. Істотним питанням при цьому є можливість фізико-математичного опису взаємодії ультразвукових хвиль в кріоконсервуючому середовищі, що містить біологічні об'єкти. Оскільки, при наявності ультразвукових хвиль в кріоконсервуючому середовищі виникають дифузійні процеси, де перенесення і власне молекулярні руху частинок взаємно перекривають один одного, і поділ їх експериментальним шляхом є надзвичайно важке завдання. Аналіз численних експериментальних результатів [3, 4] показує, що процес масопередачі визначається дифузією, що виникає внаслідок наявності різниці концентрації частинок між шаром середовища, що безпосередньо примикає до поверхні біологічного об'єкту і товщею середовища. З математичної точки зору цей факт виражається так званім законом Фіка [1]: дифузійний потік частинок середовища до поверхні об'єкту прямо пропорційний градієнту концентрації частинок на його поверхні. Як впливає з ряду експериментів, потік частинок середовища при наявності ультразвукових хвиль зростає. Відповідно до закону Фіка це можливо в тому випадку, якщо ультразвукові хвилі можуть збільшувати коефіцієнт молекулярної дифузії (коефіцієнт пропорційності в законі Фіка) або градієнт концентрації на поверхні біологічного об'єкту. Аналіз результатів літературних досліджень дозволяє зробити висновок про те, що коефіцієнту дифузії практично не змінюється в електромагнітному полі з акустичною частотою. Отже, повинен бути збільшений градієнт концентрації частинок середовища на поверхні біологічного об'єкту. Фізичною причиною такого збільшення є мікропотоки в малій околиці біологічних об'єктів, що виникають при впливі ультразвукових хвиль на кріоконсервуючі середовища. Це призводить до того, що у поверхні біологічного об'єкту утворюється прикордонний шар частинок середовища з щільністю, що відрізняється від щільності кріоконсервуючого середовища до впливу ультразвукових хвиль. Слід очікувати, що такий шар в околиці поверхні біологічного об'єкту може підвищити його кріорезистивність.

Проведений аналіз показує, що підвищення виживаності спермій тварин при кріоконсервації за допомогою стабілізуючих добавок очевидно можна підвищити при використанні факторів акустичної або електромагнітної природи. Застосування даних факторів вимагає розробки методу і технічних засобів контролю за їх впровадженням в технологічний процес кріоконсервації спермій тварин.

При дослідженні стану біологічних об'єктів, що знаходяться під впливом різних фізичних факторів, важливе значення має вибір методу для контролю стану біологічних об'єктів в даний час. Взаємодія фізичних факторів з біологічними системами пов'язано з їх фізичними і хімічними змінами. Під цими змінами слід розуміти: нагрів біооб'єктів, розрив хімічних зв'язків, зміна забарвлення, зміна електрофізичних властивостей, біологічну реакцію на вплив. Таким чином,

для вимірювання параметрів біологічних об'єктів можна застосовувати такі методи: світлові, теплофізичні, електрофізичні, фізико-хімічні. З численних методів вимірювання параметрів біологічних об'єктів увагу заслуговують дієлькометричні методи. Дієлькометрія біологічних об'єктів пов'язана з дослідженнями: діелектричної проникності розбавлених гетерогенних систем з урахуванням впливу форми частинок, неоднорідностей включень; концентрованих систем з урахуванням впливу структури, взаємної поляризації включень (шарувата модель, модель сферичних включень); часів релаксації гетерогенних систем, що враховують критичні частоти, релаксацію вільних і зв'язаних зарядів проводять релаксуючих частинок. [5]. Вимірювання діелектричних характеристик біополімерів в широкому частотному діапазоні дозволили виявити багато фізичних параметрів макромолекул і їх фрагментів: розподіл зарядів на поверхні макромолекул, поляризацію і характеристики їх іонного оточення в розчині, виміряти дипольні моменти амінокислот і пептидів, виділити області дисперсії практично для всіх компонентів розчинів біополімерів і надмолекулярних комплексів. КВЧ-дієлькометрія була використана для визначення гідратації макромолекул білків і нуклеїнових кислот. Методом дієлькометрії на вологих зразках лізоциму була доведена гетерогенність гідратного оточення і визначено час релаксації пов'язаної квазізв'язаної води. Для крові і сперми тварин методом дієлькометрії були встановлені різні характеристики зарядженої поверхні, обсяг і товщина оболонки. Для сперми бика була визначена зона дисперсії діелектричної проникності і час релаксації хв., ємність мембрани і її товщина. За зміною діелектричної проникності було розглянуто перехід від макромолекул до надмолекулярних систем і до макромолекулярних комплексів в функціонально-активних клітинах. Вивчення ДП речовин в залежності від температури, частоти, вологості, тиску, ядерного випромінювання, газового середовища тощо дає інформацію про структуру речовини, типах поляризації і видах втрат, розмірах молекул і атомів, про резонансні частоти власних коливань. Застосування методів дослідження ДП до біологічних об'єктів дає одну з можливостей вивчення особливостей структури біологічних систем і їх складу, деяких характеристик води, пов'язаних з молекулами клітини, відкриває можливості вивчення біологічних мембранних систем, за величиною ДП крові можна судити про різні патологічні зміни в організмі тварин і людини. У процесах управління кліткою фізичними полями істотну роль грає динаміка всіх структурних елементів системи, тому велике значення має її водний компонент. Очевидно, що при будь-якому елементарному акті зв'язування змінюється гідратне оточення взаємодіючих систем. Біологічна активність макромолекул, а також білковоліпідних і нуклеїново-білкових комплексів визначається їх хімічною і просторовою структурою, її динамічними можливостями, при цьому в ряді випадків дуже невеликі конформаційні переходи, під дією фізичних факторів, грають ключову роль у механізмах біологічної дії макромолекул. Функціонування біологічних об'єктів на всіх рівнях організації повинне супроводжуватися зміною їх гідратного оточення, зв'язуванням

льненням або додатковим зв'язуванням молекул води з одного типу симетрії решітки глобули в інший.

З огляду на керуючу роль води в біологічних системах, можна очікувати, що регуляція функцій клітин повинна супроводжуватися конформаційними змінами як транспортних систем, так і макромолекулярних комплексів клітини і призводити до значних змін діелектричної проникності.

Проведений аналіз робіт [6] показав, що точність вимірювань ДП залежить від стабільності частоти генератора і добротності вимірювального резонатора. Апаратура, призначена для вимірювання змін діелектричних параметрів рідини, повинна забезпечувати не тільки необхідний рівень підведеної потужності і частоти сигналу, але і задовольняти високим вимогам по стабільності частоти, ступеню придушення дискретних складових в спектрі вихідного сигналу, габаритам, надійності, економічності і терміну служби. Результати чисельного аналізу показують, що для інформаційного впливу на біологічний ефект, необхідні джерела випромінювання в діапазоні 70-75 ГГц з нестабільністю, рівнем фазових шумів 120-130 дБ / Гц на частоті відбудови від несучої частоти 10 кГц і ослабленням дискретних складових в спектрі вихідного сигналу на 40-50 дБ.

Проведені експериментальні дослідження дозволяють стверджувати, що визначення оптимальних параметрів акустичних коливань для впливу на мікрооб'єкти тварин перед їх криоконсервацією необхідно проводити зі зміни ДП криоконсервуючого середовища резонаторним способом з використанням розробленої установки на основі відкритих резонаторів, утворених сферичним і плоским дзеркалами, з параметрами: апертура дзеркал 60 мм; радіус кривизни сферичного дзеркала 110 мм; відношення $L / R = 0,579$; відстань від осі дзеркал до щілин зв'язку 9,4 мм; резонансна частота 74,278 ГГц; навантажена добротність резонаторів $Q = 4120$. Для додаткової селекції спектра коливань в резонаторі, в плоскому дзеркалі необхідно використовувати відрізок круглого хвилеводу з розмірами: діаметр хвилеводу 24 мм; довжина 12,268 мм; тип хвилі в хвилеводі TM_{01} . Створення стабілізованого за частотою генератора на лавинно-пролітний діод для вимірювальної установки можливо на основі лейкосапфірового напівдискового резонатора з параметрами: діаметр 20 мм; товщина 2 мм; добротність 20000. В розробленій установці для визначення параметрів акустичних коливань необхідно використовувати генератор на діоді 2A757A з параметрами: вихідна частота генератора $74,2780 \pm 0,004$ ГГц; вихідна потужність генератора 50 ... 60 мВт; діапазон перебудови частоти генератора 2%; придушення побічних гармонік вихідного сигналу не менш 40 дБ; довгострокова нестабільність частоти генератора за 1 с.

Висновки. Метод діелькометрії в даний час дозволяє визначати параметри гідратного оточення біополімерів і їх компонентів (кількість води, міцно пов'язаної в структурі, кількість води, пов'язаної на узліссі макромолекули); вивчати зміни конформації при різних факторах впливу (фізіологічно активних добавках, температурі і т. п.); ідентифікувати функціонально значущі зміни конформації при взаємодіях мак-

ромолекул в модельних системах (наприклад, фермент-субстратному зв'язуванні); досліджувати функціонально значущі зміни конформацій компонентів клітин у функціонально активному стані (наприклад, при ліганд-рецепторній взаємодії); виявляти роль просторової структури в досліджуваному біологічному процесі; знаходити специфічні внутрішньо-молекулярні взаємодії, що призводять до конкретних конформаційних перебудов; досліджувати процеси функціонування біополімерів в тканинах.

Список використаних джерел

1. Граменецкий Е. М. Прижизненная окраска клеток и тканей / Е. М. Граменецкий. - Л.: Медизд., 1963. - 161 с.
2. Shwan H. P. Microwave radiation: biophysical considerations and standards criteria / H. P. Shwan // IEEE Trans. Biomed End, 1972. - Vol. 19. - № 4. - P. 304-312.
3. Кунденко Н. П. Особенности распространения ультразвука в биологической среде / Н. П. Кунденко // Вісник ТДАТУ. - 2011. - Вип. 11. - Том 4. - С. 181-186.
4. Кунденко Н. П. Акустическая технология в технологическом процессе воспроизводства животных / Н. П. Кунденко, А. Д. Черенков // Вісник ТДАТУ. - 2012. - Вип. 2. - Том 1. - С. 232-240.
5. Кунденко Н. П. Исследования криоконсервации микрообъектов крупного рогатого скота / Н. П. Кунденко // Вісник національного технічного університету "ХПІ". - 2011. - Вип. 34/2012. - С. 156-160.
6. Кунденко Н. П. Анализ системы контроля за обработкой микрообъектов животных акустическими колебаниями / Н. П. Кунденко // Энергосбережение. Энергетика. Энергоаудит. - 2012. - № 08/102. - С. 64-68.

Аннотация

ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ПРОЦЕССЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Кунденко Н. П., Кравченко П. А.,
Кунденко А. Н., Анне Енсен

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

Abstract

ELECTROMAGNETIC TECHNOLOGIES IN THE PROCESS OF CRYOPRESERVATION

N. Kundenko, P. Kravchenko, A. Kundenko, Anne Jensen

It is proposed to use ultrasonic vibrations as an effective way to increase the cryoresistivity of biological objects and to find ways of additional cryoprotection of their structures.