

УДК614.89:537.868

Система контроля параметров биологических объектов после обработки низкоинтенсивным акустическим полем в процессе криоконсервации

Н.П. Кунденко, А.Н. Кунденко, И.Н. Шинкаренко

*Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства
им. П. Василенка (г. Харьков, Украина) n.p.kundenko@inbox.ru*

В статье в результате проведенного анализа отечественных и зарубежных публикация показано, что для увеличения выхода жизнеспособных микрообъектов (спермии, эмбрионы) после их криоконсервации, необходимо спермодозы и дозы с эмбрионами животных обрабатывать низкоинтенсивными акустическим полем до их криоконсервации. Для оптимизации условий низкотемпературной консервации спермодоз животных, с целью повышения устойчивости микрообъектов животных к низким температурам, необходимо провести теоретические исследования в зависимости от мощности и частоты акустических волн. Анализы по повышению жизнеспособности спермиев и эмбрионов животных при их криообработке, с помощью низкоинтенсивного акустического поля, следует проводить на основе резонансного метода диэлькометрии в диапазоне миллиметровых волн. Обоснована необходимость, создание высокочувствительной системы диэлькометрии в технологическом процессе криоконсервации микрообъектов животных возможно с применением высокостабильного источника излучений КВЧ диапазона на основе диэлектрического резонатора с колебаниями «шепчущей галереи».

Ключевые слова: клетка, биообъект, спермия, молекулы, криоконсервирования, ультразвук, генератор, структура, резонатор, частота.

Актуальность задачи. Решение продовольственной проблемы в Украине требует проведения неотложных мер по воспроизводству животных. Одним из перспективных направлений решения такой проблемы является использование метода искусственного осеменения животных. Искусственное осеменение животных позволяет использовать генетический материал от потомства выдающихся самок и самцов-улучшителей, который хранится в жидком азоте при температуре -1960С. В то же время, несмотря на то, что методы криоконсервации микрообъектов животноводства довольно изучены, все же проблема повышения их устойчивости к низким температурам и оплодотворяемости остается пока нерешенной

Уже на стадии охлаждения возникают конформационные изменения липопротеидных комплексов биомембран, которые в дальнейшем усиливаются при кристаллизации и деконсервации, и проявляются появлением трансмембранных дефектов.

Они вызывают нарушение проницаемости мембран, целого комплекса биохимических изменений, что приводит к снижению биологической полноценности спермиев и даже их гибель.

В этой связи 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.). Основными факторами влияющими на степень повреждения структуры биологических объектов являются: величина кристаллов льда, продолжительность пребывания клеток в гипертонических средах, внутриклеточная кристаллизация, обезвоживание клеток, рекристаллизация, агрегация и денатурация клеточных белков. В результате влияния всех этих факторов у клеток возникают первичные криоповреждения, также, как изменение формы, объема, нарушение целостности мембраны, изменение конформации макромолекул и др. Такие первичные криоповреждения могут стать причиной вторичных повреждений, развивающихся в клетках в различное время после замораживания.

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

Основные материалы исследования. 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 липопротеиды. Механизм защитного действия липидов состоит в том, что желток «разжижает» плазмалоген спермиев и предохраняет его от затвердевания при понижении температуры. Обработка желтка 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 растворов, когда раствор представляет набор бислойных липидных пленок, пространство между которыми, возможно, заполнено молекулами белка и растворителем.

К фосфорной группе фосфолипидов часто присоединяется азотсодержащее основание, вследствие чего формируется полярная головка с двойным зарядом (\pm), 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 А, толщина защитного слоя будет увели-

чиваться при образовании еще одного адсорбирующего слоя на 40 - 60 А.

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 [3]. При концентрации желтка в разбавителе до 60% максимальная толщина оболочки на поверхности мембраны не превышает величину 250 - 300 Å [2].

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, клеточном 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. Существенным вопросом при этом является возможность физико-математического описания взаимодействия ультразвуковых волн с криоконсервирующей средой, содержащей биологические объекты. 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 толщей среды. С математической точки зрения этот факт выражается так называемым законом Фика : диффузионный поток частиц среды к поверхности объекта прямо пропорционален градиенту концентрации частиц на его поверхности. Как следует из ряда экспериментов [1, 2], поток частиц среды при наличии ультразвуковых волн возрастает. Согласно закону Фика это возможно в том случае, если ультразвуковые волны могут увеличивать коэффициент молекулярной диффузии (коэффициент пропорциональности в законе Фика) или градиент концентрации на поверхности биологического объекта.

Анализ результатов 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.

Проведенный анализ показывает, что повышение выживаемости спермиев животных при криоконсервации с помощью стабилизирующих добавок очевидно можно повысить при использовании факторов акустической или электромагнитной природы. Применение данных факторов требует разработки метода и технических средств контроля по их внедрению в технологический процесс криоконсервации спермиев животных.

Из многочисленных методов измерения параметров биологических объектов внимания заслуживают диэлькометрические методы [4].

Диэлькометрия биологических объектов связана с исследованиями: диэлектрической проницаемости разбавленных гетерогенных систем с учетом влияния формы частиц, неоднородностей включений; концентрированных систем с учетом влияния структуры, взаимной поляризации включений (слоистая модель, модель сферических включений); времен релакса-

ции гетерогенных систем, учитывающих критические частоты, релаксацию свободных и связанных зарядов проводящих релаксирующих частиц. Изучаются также системы релаксирующих проводящих частиц в изолирующей среде, поверхности раздела, пленочные эффекты, капиллярно-пористые системы, рассматривается двойной электрический слой.

В ряде работ отмечены большие возможности диэлектromетрии для анализа молекулярных механизмов взаимодействия биополимеров [4]. Диэлектromетрия позволила зафиксировать изменение диэлектрических характеристик при N-F-переходе в растворе сывороточного альбумина человека.

Для крови и спермы животных методом диэлектromетрии были установлены различные характеристики заряженной поверхности, объем и толщина оболочки. Для спермы быка была определена зона дисперсии диэлектрической проницаемости и время релаксации $2,6 \times 10^{-6}$ мин., емкость мембраны $0,668 \times 10^{-6}$ пФ/см² и ее толщина -37А.

В процессе контроля за обработкой микрообъектов животных акустическими колебаниями нами был выбран метод измерения сдвига резонансной частоты ОР [5, 6] при помещении в его объем ячеек с различными образцами. Функциональная схема системы измерения приведен на рис. 1, а общий вид экспериментальной установки представлен на рис. 2.

В качестве репера будем использовать эталонный резонатор, в который помещается ячейка с исходным веществом. Применение эталонного резонатора позволяет также исключить влияние нестабильности частоты задающего генератора 1, в качестве которого используется ЛПД четырехмиллиметрового диапазона длин волн, на результаты измерений. А для измерения сдвигов резонансной частоты будем использовать частотно-модулированный (ЧМ) сигнал, пропускаемый через резонатор. Частота генератора 1 может перестраиваться по линейному закону в диапазоне $f_{ЭГ} \pm 75$ МГц с помощью варактора 2, включенного в цепь обратной связи генератора. Для этого на варактор подается пилообразное напряжение. А чтобы получить абсолютный масштаб частоты на ЛПД подается еще модулирующее напряжение частотой $F = 60$ МГц от высокочастотного генератора Г4-107. Для контроля частоты этого генератора в схему включен универсальный малогабаритный частотомер ЧЗ-57.

Это приводит к появлению в спектре излучения ЛПД боковых частот, отстоящих на величину F от несущей. Вследствие частотной модуляции сигнала генератора 1 сигнал на выходе эталонного резонатора будет иметь вид трех узких пиков.

ционным измерительным аттенуатором 7, волномером 8, детектором 9, широкополосным усилителем 10 (УЗ-29) и осциллографом 11 (С1-75). В четвертом плече направленного ответвителя установлена согласованная нагрузка 12. Сигнал с выхода направленного ответвителя поступает на двойной волноводный тройник 13, где разделяется пополам. Одна часть сигнала возбуждает эталонный резонатор, а другая – измерительный. Оба резонатора идентичны. Они образованы сферическими и плоскими зеркалами, апертуры которых равны 60 мм. Радиусы кривизны R сферических отражателей равны 110 мм. Диаметры круглых волноводов, расположенных в центрах плоских зеркал, равны 24 мм. Элементы связи обоих резонаторов представляют собой плавные переходы с пониженного сечения $3,6 \times 0,14$ мм на основное сечение волновода $3,6 \times 1,8$ мм. Расстояния, на котором они расположены относительно центров сферических зеркал, определяются максимальным значением напряженности электрического поля возбуждаемых в обоих резонаторах колебаний ТМ₀₁₃₇ и равны 9,4 мм.

Первоначально в оба резонатора на поршни в круглых волноводах помещаются измерительные ячейки 14, имеющие одни и те же геометрические размеры. В момент резонанса сигнал с выхода эталонного резонатора через поляризационный измерительный аттенуатор 7 поступает на детекторную секцию 9. Далее сигнал с выхода широкополосного усилителя 10 (УЗ-29) заводится на осциллограф 11. Аналогичным образом сигнал с выхода измерительного резонатора через поляризационный измерительный аттенуатор 7, детекторную секцию 9, широкополосный усилитель 10 (УЗ-29) также поступает на осциллограф 11. Путем механической перестройки одного из резонаторов добиваемся совпадения их резонансных частот. Благодаря этому мы исключаем всякие механические неточности, связанные с изготовлением резонаторов. В качестве следующего шага заменяем ячейку 14 в измерительном резонаторе на ячейку 15, вещество в которой имеет другие электрофизические параметры. Следовательно, резонансная частота измерительного ОР станет другой. И ее сдвиг относительно частоты эталонного резонатора можно оценить на экране осциллографа, поскольку мы знаем абсолютный масштаб частоты благодаря боковым меткам. Для более точного определения сдвига резонансной частоты измерительного ОР в схему включены дополнительные элементы.

Границы девиации несущей частоты ЛПД определяются резонансами эталонного резонатора, которые возникают в тот момент, когда несущая или одна из боковых частот спектра

ЛПД будут равны частоте его вынужденных колебаний $f_{ЭР}$. Сигнал от эталонного резонатора поступает на варактор 2, что в итоге приводит к противоположному направлению изменения несущей частоты. Следовательно, величина девиации частоты ЛПД равна частоте модуляции F , поступающей от генератора высокочастотных сигналов Г4-107. В том случае, когда частота ЛПД проходит полосу пропускания измерительного резонатора, на усилитель 9 поступает сигнал, имеющий форму частотной характеристики резонатора. Первая производная этого сигнала обращается в нуль в момент совпадения несущей частоты ЛПД с частотой вынужденных колебаний измерительного резонатора. Поэтому в измерительную схему включено устройство дифференцирования частотной характеристики 16. Далее сигнал поступает на дискриминатор 17, в котором вырабатывается напряжение, пропорциональное расстоянию между репером и точкой, в которой изменяется знак первой производной частотной характеристики измерительного резонатора. Это напряжение и характеризует изменение резонансной частоты ОР с ячейкой 15. Все сигналы поступают на блок управления 18, к которому подключается персональный компьютер и генератор синхронизирующих импульсов 19.

Выводы. Метод диэлектростерии дает возможность подойти к исследованию проблемы по повышению жизнеспособности спермиев животных при их криообработке с помощью акустического поля.

Для контроля за обработкой на микрообъектах КРС перед их криоконсервацией, которые обеспечивали бы устойчивость микрообъектов к низким температурам и повышали их оплодотворяемость после размораживания акустическими колебаниями, необходимо использовать метод измерения сдвига резонансной частоты ОР.

Литература

1. Кунденко Н.П. Особенности распространения ультразвука в биологической среде / Н.П. Кунденко // Вісник ТДАТУ. – 2011. – Вип. 11. Том 4. – С. 181 - 186.
2. Кунденко Н.П. Теоретический анализ микротоков при наличии акустических колебаний / Н.П. Кунденко // Вісник національного технічного університету «ХПІ». – 2011. – Вип. 58. – С. 158 - 161.
3. Кунденко Н.П. Застосування акустичних полів в сільському господарстві / Н.П. Кунденко // Вісник Харківського національного технічного університету сільського господарства імені Петра Василенка. – 2010. – Вип. 102. – С. 123 - 124.

4. Кунденко Н.П. Анализ системы контроля за обработкой микрообъектов животных акустическими колебаниям / Н.П. Кунденко // Энергосбережение. Энергетика. Энергоаудит. – 2012. – №8(102). – С. 64 - 68.

5. Кунденко Н.П. Исследование оптического резонатора в отрезке круглого волновода / Н.П. Кунденко // Вісник Харківського національ-

ного технічного університету сільського господарства ім. П. Василенка. – 2012. – Вип. 130. – С. 106 - 108.

6. Кунденко Н.П. Определение добротности открытой резонансной системы в режиме слабой связи / Н.П. Кунденко // Энергосбережение. Энергетика. Энергоаудит. – 2012. – №11(105). – С. 66 - 71.

Анотація

Система контролю параметрів біологічних об'єктів після обробки низкоінтенсивним акустичним полем в процесі криоконсервації

М.П. Кунденко, О.М. Кунденко, І.М. Шинкаренко

В статті в результаті проведеного аналізу вітчизняних і зарубіжних публікацій доведено, що для збільшення виходу життєздатних мікрооб'єктів (спермії, ембріони) після їх криоконсервації, потрібно спермодози і дози з ембріонами тварин обробляти низкоінтенсивним акустичним полем до їх криоконсервації. Для оптимізації умов низькотемпературної консервації спермодоз тварин, з метою підвищення стійкості мікрооб'єктів тварин до низьких температур, необхідно провести теоретичні дослідження залежно від потужності і частоти акустичних хвиль. Аналізи по підвищенню життєздатності спермів і ембріонів тварин при їх криообробці, за допомогою низкоінтенсивного акустичного поля, слід проводити на основі резонансного методу дієлькометрії в діапазоні міліметрових хвиль. Обґрунтована необхідність, створення високочутливої системи дієлькометрії в технологічному процесі криоконсервації мікрооб'єктів тварин можливо із застосуванням високостабільного джерела випромінювань КВЧ діапазону на основі діелектричного резонатора з коливаннями «шепочучої галереї».

Ключові слова: клітина, біооб'єкт, спермія, молекули, криоконсервування, ультразвук, генератор, структура, резонатор, частота.

Abstract

The control system parameters of biological objects after processing low-intensity acoustic field in the process of cryopreservation

N.P. Kundenko, O.N. Kundenko, I.N. Shinkarenko

In the article, as a result of the analysis domestic and foreign publishing proved that to increase the yield of viable micro-objects (sperm, embryos) after cryopreservation is necessary semen doses and dose animal embryos to handle low-intensive acoustic field before cryopreservation. To optimize the conditions of the low-temperature preservation of animal semen doses, in order to increase the stability of microscopic animals to low temperatures, it is necessary to conduct theoretical research, depending on the power and frequency of the acoustic waves. Tests to improve the vitality of the sperm and embryos of animals in their cryotreatment, using low-intensity acoustic field should be based on the resonance method dielkometria millimeter wave. Necessity, the creation of a highly sensitive dielkometrias system in the process of cryopreservation of microscopic animals possible with the use of a highly stable source of EHF radiation on the basis of the dielectric resonator with the vibrations of "whispering gallery".

Keywords: cell, biological object, sperm molecule, cryopreservation, ultrasound, generator, structure, resonator, frequency.

Представлено від редакції: І.А. Фурман / Presented on editorial: I.A. Furman

Рецензент: Г.А. Ляшенко / Reviewer: G.A. Lyashenko

Подано до редакції / Received: 18.09.2015