

ПРИМЕНЕНИЕ ВЕЩЕСТВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ В СОСТАВЕ КРИОКОНСЕРВАНТОВ ГАМЕТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Георгий БОРОНЧУК, Ион БАЛАН, Юлия КАЗАКОВА, Мелания БУКАРЧУК, Николай РОШКА

Институт физиологии и санокреатологии АН Молдовы

A fost studiat rolul substanțelor de diversă polaritate (glucide și aminoacizi) la crioconservarea spermei de taur și cocoș. Au fost stabiliți factorii care influențează gameții animalelor experimentale. S-a stabilit că glucidele monosaharidice în procesul crioconservării spermei de taur au proprietatea de a stabiliza interacțiunile intermoleculare atât în complexe glicolipidice, cât și în cele glicoproteice. În același timp, o dată cu creșterea conținutului verigilor monomerică au crescut și indicii morfofiziologici ai materialului deconservat. Experiențele au stabilit că rezultatul crioconservării în prezența substanțelor de diferită polaritate este direct dependent de schimbările superficiale multiple din membranele plasmatică ale gameților.

In the experiment it was studied the role of substances with different polarity (glucide and amino acid) at the cryopreservation of bull's semen and of cock's semen. It was established the factors which influence the gametes of experimental animals. It was summed up that the glucide was well studied monosaharid in the cryopreservation process of bull's semen which has the property to stabilize the intermolecular interactions both in the glycolipids complexes and in those glycoproteinic. At the same time with the increase of the content's monomeric links the morphophysiological indices of deconserved material also increase. The experiments established that the cryoconservative result of the substances with different polarity was able to understand the proceeding from the changes of superficial load of the plasmatic membranes of gametes.

В решении криобиологических проблем большое значение отводится криоконсервантам. Однако они могут быть разработаны на основе экспериментальных исследований, выполненных на различных уровнях организации биологических объектов с использованием веществ, отличающихся механизмом их действия. В связи с этим целью исследования было изучение влияния разнополярных веществ на морфобиологические показатели деконсервированных гамет быка и петуха.

Материал и методы исследований

Объектом исследования служило семя быков черно-пестрой и петухов Род-Айрландской пород. Оптимальный состав и концентрацию компонентов криозащитных сред при замораживании геномов животных определяли путем смешивания изотонических растворов исследуемых веществ по арифметическому или геометрическому ряду по В.К. Милованову [4].

Качество семени определяли по физиологическим показателям – подвижности, продолжительности жизни, абсолютному показателю выживаемости гамет [4]. Морфологические изменения гамет изучали путем оценки состояния их акросом с использованием фазоконтрастной микроскопии.

Результаты и их обсуждение

Стабилизация функциональной полноценности генома животных является одной из важнейших криобиологических проблем. Одним из перспективных подходов в данном направлении представляется введение в состав сред таких компонентов, которые обеспечивали бы возможность образования новых биоконструкций между компонентами мембран и синтетических сред. В этом плане было изучено влияние аминокислот, относящихся к различным группам, на показатели оттаянного семени петуха (табл. 1).

Таблица 1

Влияние аминокислот на качество деконсервированного семени петуха, n=5

Аминокислоты (АК)	Подвижность оттаянных гамет, в баллах
Аланин	3,8 ± 0,136
Аргинин	4,4 ± 0,119*
Аспарагиновая кислота	3,9 ± 0,209
Валин	4,6 ± 0,112*
Среда без АК (контроль)	3,9 ± 0,111

*Различия статистически достоверны.

Данные показывают, что после замораживания семени петуха в средах, содержащих испытуемые аминокислоты, подвижность гамет колеблется в пределах $3,8 \pm 0,13$ – $4,6 \pm 0,11$ баллов. Наиболее высокий исследуемый показатель – при использовании аргинина и валина. Следовательно, эти аминокислоты могут применяться для стабилизации межмолекулярных взаимодействий при криоконсервации семени петуха.

Высокая эффективность аргинина при криоконсервации гамет петуха согласуется с данными В.А. Наука [5], проводившего опыты с гаметами быков, и может быть объяснена тем, что в физиологическом интервале рН 6-8 боковые цепи аргинина заряжены положительно. В случае пространственной сближенности положительно (аргинин) и отрицательно (поверхность гамет) заряженные группы благодаря электростатическому притяжению через ионную связь образуют комплексы между компонентами поверхностных мембран и аргинином, что положительно сказывается на сохранении физиологических показателей гамет после оттаивания.

Относительно валина, согласно данным С.А. Шерман и др. [7], его крупные неполярные остатки спрятаны в глубине белковой глобулы. Притом боковые группы этих остатков являются гидрофобными, что препятствует взаимодействию валина с водой и образованию крупных кристаллических структур льда, которые могли бы привести к механическому повреждению криоконсервируемых объектов.

Учитывая исключительную роль биоконструкций в функционировании биологических мембран [2], в проведенных опытах изучено влияние моносахаров, являющихся основными компонентами гликоконъюгатов мембран (глюкоза входит в состав гликолипидов и гликопротеидов, ксилоза – в состав протеогликанов, маноза – в состав гликопротеидов, галактоза – в состав гликопротеидов, протеогликанов и гликолипидов) [1], на физиологические показатели криоконсервированного семени быка (табл.2).

Таблица 2

Результативность моносахаридов при криоконсервации семени быка, n=5

Наименование углеводов	Подвижность оттаянных гамет, в баллах	Продолжительность жизни оттаянных гамет, в часах	АПВ, у.е.
Глюкоза (контр.)	$3,9 \pm 0,19$	$5,6 \pm 0,26$	$14,1 \pm 1,58$
Ксилоза	$1,7 \pm 0,37^*$	$4,4 \pm 0,34^*$	$5,7 \pm 1,13^*$
Маноза	$2,6 \pm 0,19^*$	$5,4 \pm 0,60$	$8,6 \pm 1,08^*$
Галактоза	$1,7 \pm 0,34^*$	$4,4 \pm 0,68$	$5,5 \pm 0,85^*$

*Различия статистически достоверны.

Из представленных данных следует, что наиболее ярко выраженная стабилизация подвижности гамет после оттаивания, продолжительности их жизни и абсолютного показателя выживаемости была достигнута в случае использования среды на основе глюкозы. Включение данного препарата в состав среды для разбавления и замораживания семени быка позволило достичь статистически достоверной разницы между изучаемыми показателями при применении аналогичных сред на основе ксилозы, манозы и галактозы. Более ярко эти изменения выражены в подвижности и абсолютном показателе выживаемости гамет. Следовательно, не все моносахара обладают одинаковыми криозащитными свойствами.

Повышение физиологических показателей после деконсервации гамет быка, сохраненных под защитой глюкозы, обусловлено тем, что она является мощным осмотическим стабилизатором [3]. По мнению О.В. Мельниковой [3], механизм действия указанного моносахара, по-видимому, реализуется через изменение состояния цитоплазматических компонентов клетки, повышая тем самым ее сохранность после низкотемпературного воздействия.

Полученные данные показывают, что повышение устойчивости гамет к неблагоприятным условиям криоконсервации во многом зависит от стабилизации надмолекулярных структур (гликолипидов и гликопротеидов).

В следующей серии опытов была изучена криозащитная эффективность углеводов. Одной из их основных структурных особенностей является наличие гликозидных связей. При этом количество гликозидных остатков углеводов может определять их криопротекторный эффект. Эффективность моно-, ди- и трисахаридов в случае консервации семени быка представлена в таблице 3.

Таблица 3

Применения моно-, ди- и трисахаридов при криоконсервации семени быка, n=5

Кол-во гликозидных остатков	Наименование углеводов	Показатели оттаянного семени:			
		подвижность, в баллах	выживаемость, в часах	АПВ, у.е.	кол-во интактных акросом, %
1	Галактоза	2,0 ± 0,34	4,5 ± 0,73	3,9 ± 1,63	29,0 ± 6,42
2	Лактоза	3,3 ± 0,34	7,5 ± 0,55	11,7 ± 0,60	27,0 ± 6,28
2	Мальтоза	3,8 ± 0,27	6,8 ± 0,73	11,2 ± 1,40*	27,5 ± 6,31
2	Сахароза	4,0 ± 0,28	9,7 ± 0,83*	16,4 ± 1,90	38,5 ± 6,88
3	Раффиноза	4,0 ± 0,31	8,7 ± 0,67	16,4 ± 1,62	30,0 ± 6,48

*Различия достоверны по сравнению с моносахаридом.

Полученные результаты убеждают в том, что ди- и трисахара более эффективны при замораживании семени быка в сравнении с моноуглеводами.

В данном опыте помимо физиологических показателей семени быка было изучено морфологическое состояние акросом после оттаивания исследуемого объекта. Важность исследования состояния акросомного аппарата обусловлена тем, что акросома, являясь значительно оводненным гликопротеидным, гидрофильным легко набухающим и растворимым в воде комплексом [9], может быть уязвимой в результате действия экстремальных факторов на различных технологических этапах. Прежде всего, повышенное содержание воды указывает на повышенный отрицательный, поверхностный заряд акросомальных мембран.

Из результатов таблицы 3 следует, что наилучшие показатели по сохранению акросом гамет быка получены в случае применения сахарозы. Видимо, этот углевод способен нейтрализовать отрицательный заряд акросом, создавая тем самым оптимальные условия для сохранения морфологических структур гамет быка.

Из данных таблицы 3 также следует, что на качество оттаянного семени петуха влияет не только количество моносахаридных остатков в молекуле углевода, но и особенности физиолого-биохимической и физической ситуации, складывающейся в криобиологической системе в процессе консервации геномов сельскохозяйственных животных.

Учитывая тот факт, что репродуктивные клетки различных видов животных отличаются вариабельностью физиологических и биохимических показателей [8], а следовательно – и различной устойчивостью к температурному стрессу [6], аналогичные исследования были проведены на семени петуха (табл.4).

Таблица 4

Влияние моно-, ди- и трисахаридов на качество семени петуха, n=5

Кол-во гликозидных остатков	Наименование углеводов	Подвижность гамет (в баллах)	
		после разбавления	после оттаивания
1	Глюкоза	7,1 ± 0,09	4,9 ± 0,19
2	Сахароза	7,1 ± 0,44	4,5 ± 0,22
2	Лактоза	6,0 ± 0,35	4,6 ± 0,20
2	Мальтоза	7,8 ± 0,22	5,8 ± 0,12*
3	Раффиноза	6,7 ± 0,22	4,6 ± 0,24

*Различия достоверны по сравнению с моносахаридом.

Из данных таблицы следует, что лучшие результаты по восстановлению функциональной активности семени петуха после консервации получены при использовании мальтозы. Лактоза и раффиноза на этот раз оказались малоэффективными, следовательно при подборе углеводов недостаточно информации о количестве гликозидных остатков в молекуле углевода. Необходимо располагать многогранной информацией о подбираемом компоненте.

Таким образом, углеводы могут быть использованы в качестве эффективных компонентов сред, однако в каждом конкретном случае необходимо подбирать оптимальные варианты.

Выводы:

1. Полярность ингредиентов синтетических сред оказывает существенное влияние на криобиологические показатели сохраненных объектов вследствие межмолекулярного их взаимодействия через ионные связи с элементами плазматических мембран.
2. Способность аминокислот образовывать биоконплексы или препятствовать образованию крупных кристаллов льда повышает эффективность криоконсервации геномов животных.
3. Механизмы криопротекторного эффекта полярных соединений могут реализовываться путем становления межмолекулярных взаимодействий в криобиологических системах.
4. Криопротекторный эффект неполярных соединений наиболее ярко выражен при одновременной стабилизации липидных и протеидных гликоконъюгатов.
5. При создании новых криоконсервантов необходимо учитывать их физико-химические свойства и видоспецифичность консервируемого материала.

Литература:

1. Болдырев А.А. Введение в мембранологию. - Москва: Изд-во МГУ, 1990. - 208 с.
2. Борончук Г.В., Балан И.В. Криомембранология. - Кишинев: Типогр. АН Молдовы, 2003. - 336 с.
3. Мельникова О.В., Бондаренко Т.П. Модифицирующее действие глюкозы на чувствительность эритроцитов к температурному и осмотическому стрессу // Физико-химические процессы в криобиологических системах. - Харьков, 1991, с.68-78.
4. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение сельскохозяйственных животных. - Москва: Изд. с-х литературы и плакатов, 1962. - 696 с.
5. Наук В.А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации. - Кишинев: Штиинца, 1991. - 200 с.
6. Фурдуй Ф.И., Чокінэ В.К., Вуду Г.А. и др. Гаметогенез как начальный этап закладки генетических основ здоровья // Известия АНМ. - 2002. - №4. - С.30-39.
7. Шерман С.А. и др. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул. - Минск: Наука и техника, 1989. - 239 с.
8. Balan I., Boronciuc Gh. Modificările lipidelor membranice în ciclul congelarea-decongelarea spermei animalelor agricole. Luc. șt. - Chișinău: UASM, 2005, vol.13, p.215-218.
9. Nicolov I., Nestorova J., Hristov M. et al. Investigation of the semenogram and morphological changes of he-goat spermatozoa during equilibration // Macedonian Journal of reproduction. - 1996. - Vol.2. - No1. - P.75-78.

Prezentat la 15.01.2007