

популяцию в равновесном состоянии по закономерности Кастла – Харди – Вайнберга.

Список литературы: 1. *Алтухов, Ю. П.* Генетические процессы в популяциях [Текст]: изд. третье, перер. и дополн./ *Ю. П. Алтухов*– М.: ИКЦ “Академкнига”. – 2003. – 431с. 2. Учебный пакет. Состояние мировых генетических ресурсов животных. Поддержка развития Доклада страны при подготовке первого Доклада по Состоянию Мировых генетических Ресурсов животных. – FAO, 2001. – (без нумерации с.). 3. *Сокрут, В. И.* Генетические особенности свиней селекции Днепропетровского СХИ по группам крови [Текст] / *В. И. Сокрут, В. Т. Сметанин, С. П. Безенко* // Свиноводство. – К.: Урожай, 1986. – № 42. – С. 30-34. 4. *Сметанин, В. Т.* Генофонд многоплодных маток свиней селекции ДСХИ по микросателлитным локусам ДНК, выявленным при помощи ISSR-PCR [Текст] / *В. Т. Сметанин, А. И. Кузьменко* // Вісник Полтавської державної аграрної академії. – 2004. – № 4. – С. 69-71. 5. *Безенко, С. П.* Генетико-популяционные характеристики свиней по группам крови. [Текст] / *С. П. Безенко* // Породы свиней: ВАСХНИЛ. – М.: Колос, 1980. – С.133-148.

Поступила в редколлегию 11.03.2011

УДК 537.31:57.043

В.А. ШИГИМАГА, канд. сельхоз. наук, ст. н. с., зав. лабораторией репродуктивной биологии Институт животноводства, пгт. Кулинич
Ю.Е. МЕГЕЛЬ, доктор техн. наук, проф., зав. каф.
Национальный технический университет сельского хозяйства
им. П. Василенко г. Харьков,

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОВОДИМОСТИ ООЦИТОВ И ЭМБРИОНОВ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СРЕДЫ

Предложен метод определения проводимости 0,3М маннита, ооцитов и двухклеточных эмбрионов под действием импульсного электрического поля при различной температуре. Получена обратная зависимость напряженности электропробоя мембран клеток от температуры среды.

Ключевые слова: проводимость, температура, ооцит, эмбрион, электропробой

Запропоновано метод визначення провідності 0,3М маніту, ооцитів та двохклітинних ембріонів під дією імпульсного електричного поля при різній температурі. Отримана зворотна залежність напруженості електропробою мембран клітин від температури середовища.

Ключові слова: провідність, температура, ооцит, ембріон, електропробій

The method of conductivity determination of 0,3M mannitol, oocytes and two-cell embryos under action of the impulse electric field at different temperature is suggested. Inversely association of electro-breakdown field strength of cell membranes with the temperature is obtained.

Keywords: conductivity, temperature, oocyte, embryo, electric breakdown

Введение

В технологии клонирования животных для реконструкции эмбрионов широко применяется метод электрослияния. Он основан на известном явлении пробоя мембран в импульсном электрическом поле [1]. Электрослияние клеток обычно проводят в диэлектрических средах, таких, как маннит или различные

сахара [2,3], чтобы свести к минимуму влияние проводимости среды на электропроводящие свойства клетки. При этом важно подобрать оптимальные технологические параметры слияния для различных клеток [3]. Несмотря на то, что основной механизм влияния температуры среды на состояние мембраны клетки известен [4,5], углубленное исследование этого варьируемого технологического параметра, практически не проводилось. Исследовать влияние температуры среды на клетку удобно по изменению ее проводимости, а критерием этого целесообразно выбрать напряженность электропробоя мембраны, поскольку при электрослиянии пробивается место контакта мембран сливаемых клеток, т.е. мембрана может служить своеобразным "датчиком" влияния температуры среды. В качестве простого и недорогого модельного объекта исследования можно взять ооциты и эмбрионы мыши. В предыдущих исследованиях [6,7] установлено, что проводимость этих объектов связана с параметрами импульсного напряжения, которое прикладывается к их мембране. В связи с этим целью работы было исследование проводимости этих клеток в импульсном электрическом поле в зависимости от температуры диэлектрической среды. Полных аналогов исследования проводимости и электропробоя мембран эмбриональных и половых клеток животных в импульсном поле в разных условиях диэлектрической среды в доступной литературе авторами не обнаружено. Поэтому в контексте вышеизложенного такая работа становится актуальной.

Метод определения проводимости

Определение проводимости клеток и диэлектрической среды, в качестве которой был взят 0,3М маннит (SIGMA) на деионизованной воде, проведено с помощью аппаратуры и способа, разработанных и подробно описанных ранее [6-8]. Объекты исследования располагались в капле на предметном стекле микроскопа между двумя соосными микроэлектродами и подвергались воздействию линейно возрастающего по амплитуде импульсного напряжения. Вначале определена проводимость маннита при разной температуре в импульсном поле с возрастающей напряженностью, затем при таком же воздействии определены проводимости клеток при разных температурах в среде маннита. В качестве критерия влияния температуры среды на проводимость клеток была взята напряженность поля в момент электропробоя клеточной мембраны. Значение этой величины вычислялось графоаналитическим способом в области резкого роста зависимости проводимости клетки от напряженности [9]. Вычисленные напряженности пробоя мембран клеток с целью сравнения нанесены на один график в зависимости от температуры маннита. Все вычисления и построение графиков выполнены с помощью программного пакета Microsoft Excel 2002. В экспериментах использованы ооциты и двухклеточные эмбрионы мыши, полученные по стандартной методике [10].

Результаты исследования

Установлено, что проводимость 0,3М маннита практически не зависит от напряженности поля в диапазоне 0-3,5 кВ/см при всех исследованных температурах. В то же время его проводимость растет с температурой при любой напряженности из указанного диапазона, рис.1.

Температурная зависимость проводимости 0,3М маннита линейно аппроксимирована с наклоном 0,18 мкСм/см·°С. Это свидетельствует о том, что увеличение температуры даже при одновременном росте напряженности поля не приводит к электростимулируемой диссоциации маннита в водном растворе, т. е. он в этих условиях остается хорошим диэлектриком. Общий вывод можно сделать такой. Температурная зависимость проводимости 0,3М маннита подчиняется обычному закону для жидких диэлектриков при достаточно низкой напряженности поля [11] со средним коэффициентом около 2,5%/°С. Кроме того, при 5-кратном увеличении температуры проводимость маннита растет всего вдвое и это можно считать несущественным в сравнении с проводимостью клетки

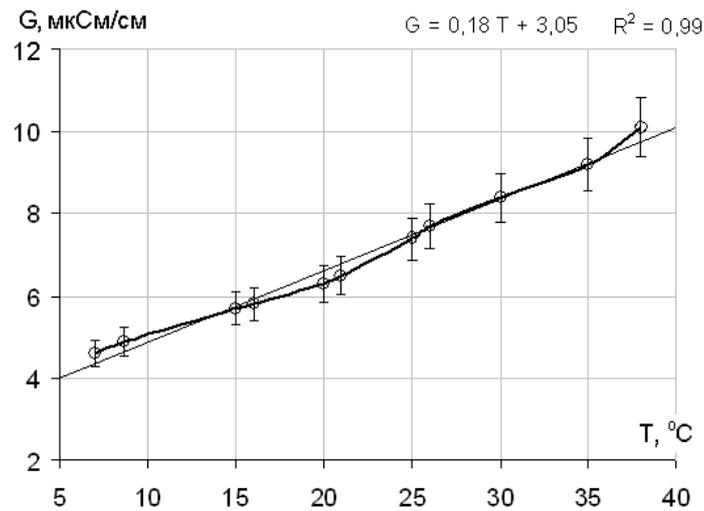


Рис. 1 - Проводимость 0,3М маннита в зависимости от температуры

Определены проводимости ооцитов и двухклеточных эмбрионов в зависимости от напряженности поля при разных температурах в 0,3М манните. На рис.2 и 3 показаны средние по 3 клеткам зависимости проводимости (за вычетом проводимости маннита) [12]. Максимальная ошибка средних не превышала 10% и, чтобы не загромождать графики, не приведена.

На рис.2 видно, что, начиная с температуры 17°С, все ооциты показали резкий рост проводимости при соответствующей напряженности, что отвечает электропробой мембраны. Напряженность пробоя ооцитов с ростом температуры среды уменьшается, причем, при 10°С пробоя не происходит совсем.

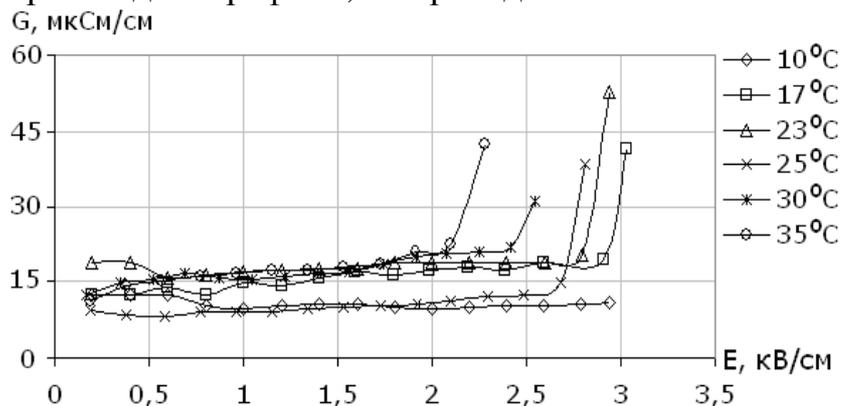


Рис.2 – Семейство температурных зависимостей проводимости ооцитов от напряженности поля в 0,3М манните

Одним из наиболее вероятных объяснений этому может служить то, что мембрана клетки представляет собой жидкокристаллическую структуру [5], липидные компоненты которой претерпевают фазовый переход между 10 и 17°С.

Ближе к 10°C липиды мембраны малоподвижны, ее лабильность незначительна [5,13] и, следовательно, пробой невозможен даже при максимальном значении напряженности поля. При охлаждении до температур ниже 10°C мембрана попросту "замерзает", приобретая свойства двумерного кристалла [5], поэтому при температуре ниже 10°C электрослияние клеток млекопитающих невозможно [3].

Проводимость эмбрионов так же, как и ооцитов, существенно зависит от температуры, но, в отличие от них, значения напряженности пробоя для эмбрионов несколько выше, рис.3. Скорее всего, это связано с размерами клеток, поскольку бластомеры эмбрионов, имея меньший диаметр, чем ооциты, пробиваются труднее последних [3].

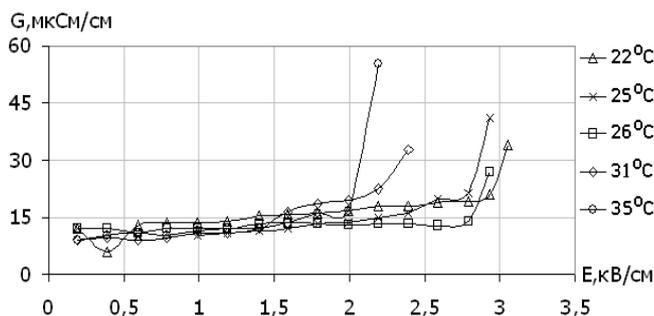


Рис.3 - Семейство температурных зависимостей проводимости двухклеточных эмбрионов от напряженности поля в 0,3 М манните

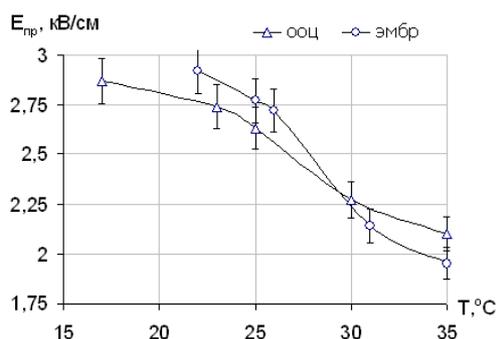


Рис.4 - Зависимость напряженности пробоя мембран ооцитов и эмбрионов от температуры в 0,3 М манните

Из температурных зависимостей проводимости клеток (рис.2,3) графоаналитическим методом [9] получены напряженности пробоя их мембран при соответствующих температурах и нанесены на общий график, рис.4.

Из рис.4 видно, что обе зависимости $E_{пр}(T)$ нелинейны и имеют точку перегиба, которая может означать существование оптимальной температуры среды для воздействия на клетку импульсным полем с целью пробоя. Эта температура приблизительно равна 27°C . Известно, что при температуре выше 30°C репарация электропор мембраны после обратимого пробоя ускоряется благодаря термолабильности [3]. Поэтому, несмотря на снижение напряженности пробоя с ростом температуры, электропоры затягиваются быстрее, чем пробиваются. При снижении температуры все происходит наоборот. Своеобразная конкуренция этих процессов и отображается на рис.4, где точка их равновесия является точкой перегиба. Повышение температуры приводит к увеличению подвижности липидов в мембране [4,5], а это непосредственно сказывается на стабильности пор, и, значит, на скорости их репарации. И наоборот, снижение температуры приводит к уменьшению подвижности липидов мембраны, что способствует повышению ее прочности, стабилизации образовавшихся пор и снижению вероятности разрыва (пробоя) [4,5,13].

Таким образом, влияние температуры среды на клетки во время действия на них импульсного поля приводит к существенному изменению напряженности пробоя мембраны, что можно использовать для оптимизации различных технологий электроманипуляции с клетками.

Автор благодарит ст.н.с. Смольянинову и н.с. Колесникову А.А. за помощь

в работе с клетками.

Выводы

1. Температурная зависимость проводимости 0,3М маннита подчиняется линейному закону с коэффициентом 2,5%/°С.

2. Проводимость ооцитов и двухклеточных эмбрионов мыши нелинейно зависит от температуры, которая связана с напряженностью электропробоя мембраны клеток обратной зависимостью.

Список литературы: 1. *Чайлахян Л.М.* Электростимулируемое слияние клеток в клеточной инженерии/*Л.М.Чайлахян, Б.Н.Вепринцев, Т.А.Свиридова, В.А.Никитин* //Биофизика.-1987.-Т.32.-№ 5.-С.874–887. 2. *Chang D.C.* Guide to Electroporation and Electrofusion/ *D.C.Chang, B.M.Chassy, J.A.Saunders, A.E.Sowers* -San Diego.-Academic Press, 1992.-581p.3. Zimmermann U. Electromanipulation of cells / U.Zimmermann, G.A.Neil.–N.Y.:CRC Press, -1996.-375p. 4. *Антонов В.Ф.* Биофизика мембран / *В.Ф.Антонов* //Соросовский образовательный журнал.-М.-1996. с.4-12. 5. Фазовые переходы липидов в мембранах/ Режим доступа : \www/URL: http://foroff.phys.msu.su/phys/med/kin/kt_03fa.pdf 6. Спосіб визначення провідності рідких середовищ: пат. 20187 Україна: G01R 27/22 / *Шигимага В.О.*; заявл.10.07.06; опубл.15.01.07, Бюл.№ 1.-3с. 7. *Шигимага В.А.* Определение проводимости эмбриональных клеток животных /*В.А. Шигимага* //Проблемы бионики.-Харьков.-2003.-вып.59.-с.60-64. 8. *Шигимага В.О.* Апаратура для електрозлиття та вивчення провідності клітин/ *В.О. Шигимага* //Вісник ХДТУСГ. -Харків.-2001.-Вип.6.-с.386-389. 9. *Шигимага В.А.* Графоаналитические методы определения параметров необратимого импульсного пробоя мембраны клетки (ч.1) / *В.А. Шигимага* //Бионика интеллекта.–2007.– Вып.2 (67). – С. 84 – 87. 10. *Манк М.* Биология развития млекопитающих. Методы /Пер. с англ. под ред. М. Манк.- М.: Мир.-1990.- 406с. 11. Краткий справочник по химии /Под ред. *Пилипенко А.Т.*–Киев.-1987.-828с. 12. *Шигимага В.А.* Кондуктометрия клеток животных в средах с произвольной проводимостью/ Вестник НТУ «ХПИ»//Сб. трудов «Новые решения в современных технологиях».-Харьков:НТУ (ХПИ), 2010.-№57.-С.100-104.13. Глава 9. Биомембраны и биоэнергетика / Сайт о химии.- Режим доступа :\www/URL: <http://www.xumuk.ru/biologhim/136.html>.

Поступила в редколлегию 15.03.2011