

УДК 614.89:537.868

ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ АКУСТИЧЕСКИХ КОЛЕБАНИЙ НА ПРОЦЕССЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Кунденко Н.П., к.т.н.,

Кунденко А.Н. магистр.

Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенко

Тел: (057)712-28-33

Аннотация—проведены экспериментальные исследования воздействия акустических колебаний на эмбрионы с целью повышения их устойчивости к низким температурам и повышения жизнеспособность полученного потомства КРС.

Ключевые слова –кювета, акустические колебания, температура, жизнеспособность.

Постановка проблемы. 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 [1,2]. В результате влияния всех этих факторов у клеток возникают первичные криоповреждения, также, как изменение формы, объёма, нарушение целостности мембраны, изменение конформации макромолекул и др. Такие первичные криоповреждения могут стать причиной вторичных повреждений, развивающихся в клетках в различное время после размораживания. В этой связи важной проблемой является всестороннее изучение возможностей увеличения криорезистивности биологических объектов и поиск способов дополнительной криозащиты их структур.

Анализ последних исследований. Для повышения устойчивости спермиев к температурному шоку в качестве криозащитного вещества в сперму добавляют желток куриного яйца. Желток куриного яйца содержит лецитин и липопротеины. Они создают на поверхности спермиев адсорбирующий слой, предохраняющий спермии от холодового шока, который действует на жизнедеятельность спермиев до температуры -51°C , т.е. пока в сперме сохраняется жидкая фаза. Для защиты

спермиев от холодого удара применяют лактозо-желточную среду следующего состава: вода дистиллированная – 100 мл; лактоза – 11,5 г; желток – куриного яйца – 20 мл; глицерин – 5 мл.

Формулирование цели статьи. Определение параметров низкоинтенсивных акустических колебаний для воздействия на микрообъекты КРС перед их криоконсервацией, которые обеспечивали бы устойчивость микрообъектов к низким температурами повышали их оплодотворяемость после размораживания.

Основная часть. Для определения концентрации спермиев был применен фотоэлектроколориметрический метод. В качестве фотоэлектроколориметра был использован прибор ФЭК-Н.

Принцип работы этого прибора основан на том, что через кювету со спермой пропускают пучок световых лучей определенной силы, который затем попадает на селеновый фотоэлемент, соединенный с гальванометром. Через гальванометр проходит электрический ток, величина которого обратно пропорциональна мутности (оптической плотности) спермы, т.е. концентрации спермиев.

Для проведения исследования приготавливают 3,5%-ный раствор лимоннокислого натрия на дистиллированной воде, фильтруют его через бумажный фильтр и разливают в хорошо вымытые и просушенные флаконы из под пенициллина по 9,9 мл в каждый флакон. Микропипеткой набирают точно 0,1 мл исследуемой спермы и смешивают ее с раствором лимоннокислого натрия в одном из флаконов, разбавляя таким образом сперму в 100 раз.

Для контроля и оценки степени влияния акустических колебаний на жизнедеятельность спермиев до замораживания и после размораживания была использована оптико-электронная система[3].

В состав оптико-электронной системы входят следующие элементы и блоки: микроскоп Р-11; термостатирующий столик; ПЗС матрица типа К 1200 ЦМ7 (число ячеек 260x380); блок сопряжения и синхронизации; телекамера КТ-5; персональный компьютер (процессор Intel Core 2 Duo E6550); видеокарта NVidia GeForce 8800GT; винчестер Seagate ST325 256 Gb; материнская плата Asus P5k; накопитель со сменным носителем ASUS DRW-1612BL; монитор 172Т; операционная система Windows XP SP3.

Значения оптимальных параметров низкоинтенсивных акустических колебаний (частота, мощность, экспозиция) для воздействия на гранулы с микрообъектом и животных перед их криоконсервацией, были определены на основе многофакторного эксперимента, в котором в качестве отклика облученных спермиев была взята величина сдвига резонансной частоты измерительного резонатора с микрообъектами животных в гранулах (диаметр 5мм, высота 3мм) относительно резонансной частоты (74,280ГГц) опорного резонатора.

В эксперименте был использован источник акустических колебаний SMB-17CC с техническими характеристиками: диапазон частот 0,325-2,250кГц; диапазон изменения мощности 50-80дБ; величина источника питания 1,5-15В; величина тока питания 0,2-1,4 мА.

После проведения изменений и расчетов получено уравнение регрессии

$$Y = 9,3 + 4,6x_1 + 2,5x_2 + 2,24x_3 + 4,4x_1x_2 + 5,4x_1x_3 + 2,4x_2x_3 + 4,4x_1^2 + 0,9x_2^2 + 3,4x_3^2, \quad (1)$$

где Y – разность частот между измерительным и опорным резонаторами;

x_1 – частота акустических колебаний;

x_2 – мощность акустических колебаний;

x_3 – время облучения микрообъектов животных.

Проверка значимости коэффициентов регрессии проводилась при уровне значимости $\alpha = 0,01$ по критерию Стьюдента [4, 5]. Все коэффициенты в уравнении (1) оказались значимыми.

На основании проверки данного уравнения на адекватности по критерию Фишера [4] сделан вывод, что уравнение описывает реальный процесс, и, следовательно, позволяет оценить характер влияния каждого из 3 факторов на функцию отклика. Кроме того, стало возможным практическое использование полученной модели для прогнозирования значения выходного сигнала области варьирования параметров x_i . Для нахождения оптимальных параметров процесса решена система уравнений, полученных приравниванием к нулю значений градиентов компонентов, вычисленных по выражению

$$\frac{\partial Y}{\partial x_i} = b_i + 2b_{ii}x_i + \sum_{j=1}^n b_{ij}x_j = 0 \quad (2)$$

где x_i, x_j – кодированное значение фактора, по которому берется производная, и взаимодействующего с ним, соответственно;

b_i, b_{ii}, b_{ij} – коэффициенты уравнения регрессии.

Для уравнения (1) после дифференцирования была получена система уравнений:

$$\begin{cases} \frac{\partial y}{\partial x_1} = 4,64 + 4,4x_2 + 5,4x_3 + 8,8x_1 = 0; \\ \frac{\partial y}{\partial x_2} = 2,5 + 4,4x_1 + 2,4x_3 + 1,8x_2 = 0; \\ \frac{\partial y}{\partial x_3} = 2,24 + 5,4x_1 + 2,4x_2 + 6,8x_3 = 0. \end{cases} \quad (3)$$

В результате решения системы уравнений (3) были получены следующие значения фактора в экстремально точке $x_1 = -0,8$; $x_2 = 0,3$;

$x_3 = 0.2$, что соответствует таким значениям натуральных параметров: частота акустических колебаний 1 кГц, мощность 1,03 мкВт; время воздействия на микрообъекты животных 320 с.

В лабораторном эксперименте использовали гранулы с 6 млн. спермиев, которые подвергались до криоконсервации воздействию акустическими колебаниями с параметрами: частота 1 кГц; мощность 1 мкВт; экспозиция 320 с. В контроле гранулы со спермиями акустическими колебаниями не обрабатывались. После криообработки и оттаивания гранул проводили исследования на оптико-электронной системе по определению живых спермиев. Результаты исследований приведены в таблице 3.

Таблица 3– Результаты исследований спермием после их криоконсервации

Повторности		Количество спермиев животных	Среднее количество спермиев животных
Опыт	1	5100000	5095000
	2	5080000	
	3	5110000	
	4	5090000	
Контроль	1	1740000	1740000
	2	1680000	
	3	1800000	
	4	1740000	

Результаты измерений (табл.3) показали, что обработка гранул со спермиями акустическими колебаниями приводит к увеличению толщины защитного слоя на плазматической мембране и устойчивости спермиев к низким температурам. Процент выхода живых спермиев в опыте составил около 80%, а в контроле всего 30%.

Важным показателем жизнеспособности новорожденных телят является снижение веса первые 3...6 дней после рождения. В ходе эксперимента было выявлено, что потери массы тела на одного теленка в первые 5 дней жизни составили 1,5% для опытной группы и 5,8% для контрольной. Специалистами ветеринарной медицины были зарегистрированы случаи болезни телят кишечно-желудочными и легочными заболеваниями. Заболеваемость телят в опытной группе составила 10,2%, а в контрольной 44%. Смертность телят после 20 дней жизни составила в контрольной группе 36,8%, а в опытной выжили все телята.

В результате производственного эксперимента было установлено, что прибыль от внедрения акустической технологии в данном хозяйстве составила 57 тыс. грн.

Выводы. Производственный опыт с эмбрионами животных показал, что воздействие акустических колебаний на эмбрионы повышает их устойчивость к низким температурам и повышает жизнеспособность полученного потомства КРС. В результате производственного эксперимента с эмбрионами было установлено, что прибыль от внедрения акустической технологии составила 35,7 тыс. грн.

Литература

1. Responsible subcellular alteration on heratocytes resuliny from ultrasound / *R.J.Stephens, C.P.Hart, C.A.Torbit, P.D.Edmonds* // *Ultrasound in Med. Biol.* – 1980. – V.6, №3. – P.239-249.
2. Role of cavitation in the “in vitro” stimulation of protein synthesis in human fibroblasts / *D.F. Webster, G.B. Pond, M. Dyson, W.Harvey* // *Ultrasound in Med. Biol.* – 1978. – V.4, №4.–P.343-351.
3. *Сасимова И.А.* Обоснование оптико-электронной системы для оценки степени влияния ЭМП на эмбрионы животных / *И.А. Сасимова, Ю.Е. Мегель* // *Энергосбережение. Энергетика. Энергоаудит.* – 2008. – № 9. – С.18-24.
4. *Богданович А.И.* Расчеты в планировании экспериментов / *А.И. Богданович.* – Л.: ЛТА, 1978. – 10 с.
5. *Винарский М. С.* Планирование эксперимента в технологических исследованиях / *М.С. Винарский.* – К.: Техника, 1975. – 168 с.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ АКУСТИЧНИ КОЛИВАННЯ НА ПРОЦЕСИ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ

Кунденко М.П., Кунденко О.М.

Анотація

Проведені експериментальні дослідження дії акустичних коливань на ембріони з метою підвищення їх стійкості до низьких температур і підвищення життєздатності отриманого потомства ВРХ.

RESEARCHES OF INFLUENCE OF ACOUSTIC FLUCTUATIONS ON CRYOPRESERVATION PROCESSES

N. Kundenko, A. Kundenko

Summary

Pilot studies impact of acoustic fluctuations on embryos for the purpose of increase of their stability to low temperatures and increases viability of the received posterity of KRS are carried out.