

УДК 614.89:537.868

Н.П.КУНДЕНКО, канд.техн.наук,доц., ХНТУСХ, Харьков

ИССЛЕДОВАНИЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ МИКРООБЪЕКТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

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

Ключові слова: кювета, акустичні коливання, температура, життєздатність.

Проведены экспериментальные исследования воздействие 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 .

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.

Keywords: ditch, acoustic fluctuations, temperature, viability.

1. Введение

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

Цель исследований: определение параметров низко- интенсивных акустических колебаний для воздействия на микрообъекты КРС перед их криоконсервацией, которые обеспечивали бы устойчивость микрообъектов к низким температурам и повышали их оплодотворяемость после размораживания.

2. Основные материалы исследования

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

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

Разбавленную сперму (температура $31 \pm 1,8^{\circ}\text{C}$) охлаждают при $2,5^{\circ}\text{C}$ в течение 4 ч и замораживают до минус 80°C на фторопластовых пластинках с лунками в специальных емкостях, заполненных жидким азотом. Наносят сперму на охлажденную пластину с помощью охлажденных шприцев или полиэтиленовой капельницы. После выдержки пластины в течение 1...2 мин над жидким азотом и затем в жидком азоте 10...15 мин, пластину поднимают до верхнего уровня емкости, охлажденной лопаткой, сгребают гранулы в охлажденный контейнер или марлевый мешочек и хранят их до момента использования.

Оттаять замороженную сперму нужно быстро, чтобы не образовались кристаллы, которые, как указывалось, губительно действуют на спермии. Для оттаивания спермы необходима водяная баня и специальный разбавитель. Последний представляет собой разбавитель, который применяется для хранения спермы при температуре $2...5^{\circ}\text{C}$, но замороженный в форме гранул на фторопластовой пластине объемом 0,4...0,5 мл. Этот разбавитель можно долго хранить, и он лучше защищает сперму после оттаивания от неблагоприятных факторов внешней среды. Желточный разбавитель нужно оттаивать также быстро, как и сперму (при температуре $+38...40^{\circ}\text{C}$), чтобы он не потерял своих защитных свойств.

Методика оттаивания спермы в желточном растворе состоит в следующем:

- в водяной бане, имеющей температуру $45...50^{\circ}\text{C}$, помещают сухой, стерильный, пенициллиновый флакон (больше 50°C нельзя, иначе желток свернется);

- после нагревания флакона до температуры $42...23^{\circ}\text{C}$, в него помещают 2...3 гранулы желточного разбавителя (чтобы объем среды был 0,8...1,0 мл);

- как только сперма оттаяет – немедленно использовать.

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.

Подобная методика пользования фотоэлектроколориметром излагается в руководстве, прилагаемом к прибору, и в инструкции по организации и

технологии работы станций по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных.

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 260х380); блок сопряжения и синхронизации; телекамера КТ-5; персональный компьютер (процессор Inter 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.

В работе оптико-электронной системы заложен принцип дифференциального анализа различных сведений об эякуляте (концентрация, скорость движения, интенсивность вращения) и получения интегрального показателя коррелирующего с оплодотворяемостью.

Значения оптимальных параметров низкоинтенсивных акустических колебаний (частота, мощность, экспозиция), для воздействия на гранулы с микрообъектами 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 0,325кГц – 2,250кГц; диапазон изменения мощности 50дБ – 80дБ; величина источника питания 1,5 -15В; величина тока питания 0,2 – 1,4мА.

Значения факторов и их интервалы варьирования наведены в табл.1 и 2.

Таблица 1 - Значения факторов в эксперименте

Интервал и уровень факторов	Частота, кГц	мощность, мкВт	Экспозиция, с
	x_1	x_2	x_3
Нулевой уровень – $x_i = 0$	1,4	1,0	300
Интервал варьирования – λ_i	0,5	0,2	100
Верхний уровень – $x_i = +1$	1,9	1,1	400
Нижний уровень – $x_i = -1$	0,9	0,9	200

Таблица 2 - Данные для построения плана второго порядка

Число факторов, K	Число точек ядра	Число звездных точек, N_a	Число нулевых точек, N_0	Звездные точки, a	Число опытов, N
3	8	6	6	1,682	20

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:

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

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 мВт; 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 мВт; 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 табл. 3.

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%.

Таблица 3 - Результаты исследований спермием после их криоконсервации

	Повторности	Кол-во животных	Средние кол-во животных спермиев
Опыт	1	5100000	5095000
	2	5080000	
	3	5110000	
	4	5090000	
Контроль	1	1740000	1740000
	2	1680000	
	3	1800000	
	4	1740000	

Производственные испытания с микрообъектами КРС, облученных акустическими колебаниями, были проведены в хозяйстве «Колос» Волчанского района под руководством сотрудников управления ветеринарной медицины этого района.

Из анализа полученных данных следует, что в опыте родилось на 57,7% телят больше чем в контроле, а вес новорожденных телят в опыте превосходил контрольных на 5...6 кг. Также установлено, что время вставания на ноги в опытной группе составляло 24...26 мин, а в контрольной 40...42 мин.

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 кишечнo-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.

3. 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.

Список литературы: 1. *Stephens R.J., Hart C.P., Torbit C.A., Edmonds P.D.* Responsible subcellilal alteration on heratocytes resulingy from ultrasound. *Ultrasound in Med. Biol.*, 1980, v.6, №3, p. 239-249/ 2. *Webster D.F., Pond G.B., Dyson M., Harvey W.* Role of cavitation in the “in victro” stimulation of protein synthesis in human fibroblasts. *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 эмбироны животных / *И.А. Сасимова, Ю.Е. Мегель* // Общегосударственных научно-производственный журнал. 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.

Поступила в редколлегию 12.06.2012