

УДК 636.2:612.64.089.67:534.29

С. Н. ПАЙТЕРОВ

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УЛЬТРАЗВУКА РАЗЛИЧНЫХ
ИНТЕНСИВНОСТЕЙ И РЕЖИМОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ
В ТЕХНОЛОГИИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ**

*Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству, Жодино, Республика Беларусь,
e-mail: payterov@yandex.by*

(Поступила в редакцию 19.07.2013)

Ультразвуковые методы нашли широкое применение не только в клинической диагностике, лабораторных исследованиях, но и при лечении различных заболеваний. Некоторые клетки, суспендированные в водной среде и не имеющие прочной мембраны, разрушаются под действием ультразвука уже при интенсивностях, используемых в терапии (0,05–0,4 Вт/см²). К числу таковых относятся клетки крови и сперматозоиды. Пороги и скорость их разрушения зависят как от концентрации клеток в суспензии, температуры среды, частоты и интенсивности ультразвука, так и от прочности мембран и, следовательно, от типа клеток и состояния организма – донора этих клеток. Разрушение клеток в ультразвуковом поле происходит только в том случае, если интенсивность ультразвука превышает значения, совпадающие с порогами кавитации в воде (0,3 Вт/см²). Акустические потоки, возникающие в докавитационном режиме (0,05 Вт/см²), способны лишь «смыть» макромолекулы с поверхности мембран. Увеличение интенсивности ультразвука до значений, превышающих порог кавитации, приводит к появлению в среде пульсирующих газовых пузырьков, порождающих микропотоки. Клетки радиусом 5–10⁻⁶ м, попавшие в поле этих микропотоков, могут испытывать сдвиговые усилия, значительно превышающие значения, при которых начинают разрушаться мембраны. Разрушение клеток начинается не сразу после включения ультразвука и заканчивается не мгновенно после его выключения: чем выше интенсивность данного воздействия, тем короче промежутки времени между моментом его включения и началом процесса разрушения клеток, и тем длительнее последствие, когда ультразвук уже выключен, а клетки продолжают разрушаться. В поисках причин такого последствия были исследованы изменения в морфологии эритроцитов и сперматозоидов, подвергнутых ультразвуковому воздействию в суспензии, и обнаружены «дыры» в цитоплазматических мембранах, через которые содержимое клеток вытекает в окружающую среду [1, 2].

Точные измерения распределения интенсивностей позволили выявить добавочные максимумы (лепестки) интенсивности. Распределение интенсивностей в поле зависит и от соотношения размеров излучателя с длиной волны ультразвука, и от свойств самого излучающего элемента, и от способа его крепления в излучателе. Таким образом, даже в идеальных условиях поле в ближней зоне излучателя весьма неоднородно, и максимальные значения интенсивности могут в 3–4 раза отличаться от средних значений. Это следует учитывать при определении порогов физико-химического и биологического действия ультразвука. Ультразвуковая волна, распространяясь в среде, теряет часть своей энергии. Эта энергия частично переходит в теплоту, а частично передается массе вещества в виде механического импульса, что приводит в жидких средах к возникновению регулярных течений, которые называются акустическими и легко возникают в неоднородном ультразвуковом поле. При данном воздействии важно учитывать течения в пограничном слое у поверхности препятствий (клетки), помещенных в ультразвуковое поле. В последнем случае характерные масштабы акустических потоков определяются толщиной акустического пограничного

слоя, где амплитуда колебания частиц жидкости меняется от 0 у самой поверхности до 0,63 амплитуды в свободном объеме. Отношение разности скоростей на границах слоя к его толщине (градиент скорости) в биологической среде может достигать весьма значительной величины. Например, при интенсивности ультразвука 1 Вт/см^2 и частоте 1 МГц градиенты скорости $104\text{--}105 \text{ с}^{-1}$. Этого более чем достаточно для разрыва клеточных мембран, нарушений внутриклеточной структуры, для дегградации вирусов, молекул ДНК, РНК [3].

Общепринятый интервал интенсивностей ультразвука, используемого в физиотерапии, – $0,05\text{--}1 \text{ Вт/см}^2$, реже до $2\text{--}3 \text{ Вт/см}^2$. В исключительных случаях, например при обеспложивании животных, ее повышают до 10 Вт/см^2 . При интенсивностях ниже $0,05 \text{ Вт/см}^2$ ультразвук практически не эффективен при лечении, а при интенсивностях, превышающих 1 Вт/см^2 , может вызвать нежелательные эффекты, такие как подавление физиологических функций организма, перегрев тканей, деструкция клеток и клеточных органелл. Ультразвук низких (терапевтических) интенсивностей практически не меняет активности ферментов в растворе, поэтому его влияние непосредственно на активность того или иного фермента не может служить первичным актом взаимодействия ультразвука с биологической системой.

Если белки иммобилизованы, т. е. связаны с поверхностью клеточных мембран, то ультразвук даже малых интенсивностей ($0,05 \text{ Вт/см}^2$, $0,88 \text{ МГц}$) заметно увеличивает скорость ферментативных реакций. Этот эффект обусловлен ультразвуковыми микропотоками, перемешивающими тонкие слои жидкости у поверхности носителя и облегчающими диффузию субстрата к ферменту. При интенсивности ультразвука $0,2\text{--}1,0 \text{ Вт/см}^2$, $0,88 \text{ МГц}$ наряду с фрагментацией наблюдаются более тонкие изменения, выражающиеся в уменьшении прочности связей между нуклеиновыми кислотами и белками в нуклеопротеидных комплексах. Этот эффект наблюдается не только при облучении ультразвуком суспензии нуклеопротеидов в среде, но и при ультразвуковой обработке одной только водной среды с последующим субсидированием в ней нуклеопротеидных частиц. В основе этого факта, очевидно, лежит химическое взаимодействие между нуклеопротеидными комплексами и долгоживущими химически активными частицами, возникающими в водной среде под действием ультразвука [1, 4].

Таким образом, изменение проницаемости клеточных мембран – универсальная реакция на ультразвуковое воздействие, независимо от того, какой из факторов ультразвука, действующих на клетку, превалирует в том или ином случае. Нарушение состава внутриклеточной среды и микроокружения клетки не может не отразиться на скорости биохимических реакций с участием ферментов, весьма чувствительных к содержанию в среде тех или иных ионов, продуктов ферментативных реакций и некоторых других веществ.

Пороговой для биологического действия ультразвука является такая его интенсивность (при прочих неизменных его параметрах – частоте, времени и режиме воздействия), ниже которой не меняется проницаемость клеточных мембран, а следовательно, не начинаются регуляторные и репаративные процессы в клетках, направленные на ликвидацию последствий, вызванных указанными изменениями. Судя по данным ряда исследователей [2, 3], пороговая интенсивность не превышает $0,01 \text{ Вт/см}^2$. Очевидно, что данный порог и является истинным порогом биологического действия ультразвука. Оценить его проще всего по электропроводности тканей, изменения которых можно наблюдать при интенсивностях ультразвука более $0,01 \text{ Вт/см}^2$.

Влияние ультразвука на биосистемы проявляется на всех уровнях организации, начиная с молекулярного и кончая организменным, и зависит как от параметров, характеризующих ультразвуковое поле, так и от свойств среды и состояния системы. Реакция биосистем на ультразвук тем более сложна и трудно предсказуема, чем сложнее механизм ее функционирования, чем выше ее структурная организация.

Можно заключить, что в медицине и ветеринарии ультразвук в основном используется с целью стимуляции и активизации жизненных процессов в тканях, репарации клеток.

Цель исследований – изучение ультразвукового воздействия различных режимов и интенсивностей обработки на зародыши крупного рогатого скота для установления параметров их физиологической безопасности и эффективности.

Влияние ультразвукового воздействия различной интенсивности, режимов воздействия и продолжительности на морфологический и качественный состав интактных эмбрионов

Показатель	1										2										3																		
	Время воздействия ультразвука, мин.																																						
	непрерывный										импульсный										непрерывный										импульсный								
Показатель	Режим воздействия																																						
	непрерывный										импульсный										непрерывный										импульсный								
	Интенсивность воздействия ультразвука, Вт/см ²																																						
	0,05	0,2	0,4	0,05	0,2	0,4	0,05	0,2	0,4	0,05	0,2	0,4	0,05	0,2	0,4	0,05	0,2	0,4	0,05	0,2	0,4	0,05	0,2	0,4	0,05	0,2	0,4	0,05	0,2	0,4	0,05	0,2	0,4	0,05	0,2	0,4			
Подвергнуто культивированию, <i>n</i>	15	14	15	15	15	15	16	15	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15			
Пригодно к пересадке, <i>n</i>	15	8	2	13	10	3	14	9	2	14	9	2	14	9	2	14	9	2	14	9	2	14	9	2	14	9	2	14	9	2	14	9	2	14	9	2			
Качественный состав, <i>n</i> (%):	9 (60,0)	2 (14,3)	0	8 (61,5)	2 (13,3)	0	8 (53,3)	2 (12,5)	0	6 (42,9)	2 (13,3)	0	6 (42,9)	2 (13,3)	0	2 (15,4)	1 (6,7)	0	2 (15,4)	1 (6,7)	0	2 (15,4)	1 (6,7)	0	2 (15,4)	1 (6,7)	0	2 (13,3)	0	2 (13,3)	0	2 (13,3)	0	2 (13,3)	0	0			
отлично	4 (26,7)	4 (28,6)	0	4 (30,8)	5 (33,3)	1 (6,7)	3 (13,3)	5 (31,3)	1 (6,7)	5 (35,7)	4 (26,7)	0	5 (35,7)	4 (26,7)	0	5 (38,4)	3 (20,0)	0	5 (38,4)	3 (20,0)	0	5 (38,4)	3 (20,0)	0	5 (38,4)	3 (20,0)	0	5 (33,3)	0	5 (33,3)	0	5 (33,3)	0	0	0	0			
хорошо	2 (13,3)	2 (14,3)	2 (13,3)	1 (7,7)	3 (20,0)	2 (13,3)	3 (20,0)	3 (18,8)	1 (6,7)	3 (21,4)	3 (20,0)	2 (16,7)	2 (15,4)	3 (20,0)	2 (16,7)	2 (15,4)	3 (20,0)	0	2 (15,4)	3 (20,0)	0	2 (15,4)	3 (20,0)	0	2 (15,4)	3 (20,0)	0	4 (26,7)	3 (25,0)	1 (9,1)	3 (25,0)	1 (9,1)	3 (25,0)	1 (9,1)	1 (9,1)	1 (9,1)			
удовлетворительно	0	6 (42,9)	13 (86,7)	0	5 (33,3)	12 (80,0)	1 (6,7)	6 (37,5)	13 (86,7)	0	6 (40,0)	10 (83,3)	4 (30,8)	8 (53,3)	11/100	4 (26,7)	9 (75,0)	10 (90,9)	4 (26,7)	9 (75,0)	10 (90,9)	4 (26,7)	9 (75,0)	10 (90,9)	4 (26,7)	9 (75,0)	10 (90,9)	4 (26,7)	9 (75,0)	10 (90,9)	4 (26,7)	9 (75,0)	10 (90,9)	4 (26,7)	9 (75,0)	10 (90,9)			
неудовлетворительно	4,47±	3,14±	2,13±	4,54±	3,27±	2,27±	4,20	3,19±	2,20±	4,21	3,13±	2,17±	3,38±	2,80±	2,0	3,33±	2,25±	2,09±	3,33±	2,25±	2,0	3,33±	2,25±	2,0	3,33±	2,25±	2,0	3,33±	2,25±	2,0	3,33±	2,25±	2,0	3,33±	2,25±	2,0			
Средний балл	0,19	0,21	0,09	0,21	0,28	0,15	±0,26	0,28	0,14	±0,21	0,29	0,11	0,31	0,26	0,26	0,27	0,13	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27			
Сохранность, %	100	60,0	13,3	100	66,7	20,0	93,3	60,0	13,3	100	60,0	13,3	80,0	46,7	0	73,3	33,3	6,7	73,3	33,3	0	73,3	33,3	0	73,3	33,3	0	73,3	33,3	0	73,3	33,3	0	73,3	33,3	0			

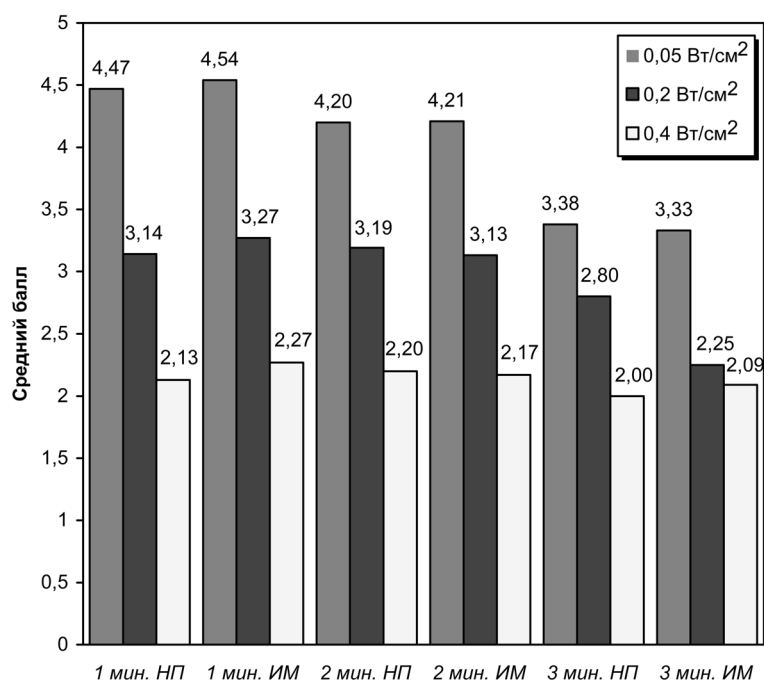
** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Объекты и методы исследования. Исследования проводили в РСУП «Племенной завод Кореличи» Гродненской, РУСП «Племенной завод «Красная звезда» Минской и РСУП «Брест-племпредприятие» Брестской областей в 2000–2001 гг. Для установления оптимального и безопасного порога воздействия ультразвука на зародыши крупного рогатого скота использовали физиотерапевтический генератор ультразвуковых волн УЗТ 1.01Ф. Из зародышей отличного и хорошего качества были сформированы опытные группы, по 11–15 эмбрионов в каждой, для изучения влияния ультразвука интенсивностью 0,05; 0,2 и 0,4 Вт/см² соответственно, при этом частота ультразвука составляла 0,88 МГц, экспозиция – 1; 2 и 3 мин. в непрерывном и импульсном режиме для каждой из групп. Предельные значения интенсивности установлены следующие: при положении переключателя 0,05 Вт/см² – 0,02–0,08 Вт/см², 0,2 Вт/см² – 0,1–0,3 Вт/см², 0,4 Вт/см² – 0,2–0,6 Вт/см². Используемые в опыте величины ультразвука дискретны и определены производителем данного прибора.

Эмбрионы находились в среде Дюльбекко с добавлением 20%-ной эмбриональной сыворотки в чашках Петри. Ультразвуковую головку излучателя погружали в среду с находящимися в ней эмбрионами на 1–2 мм. Сохранность эмбриоматериала после 2-часового культивирования в термостате при 37 °С служила объективным основанием для последующего использования режимов ультразвукового воздействия в дальнейших исследованиях

Результаты и их обсуждение. Исследования показали, что увеличение времени озвучивания эмбриоматериала от 1 до 3 мин. негативно влияет на его сохранность после культивирования (таблица). Так, при использовании интенсивности ультразвука в предельных значениях 0,02–0,08 Вт/см² частотой 0,88 МГц в непрерывном режиме в течение 1 мин. при озвучивании эмбрионов отмечен наибольший средний балл (4,47). Увеличение времени их обработки до 2–3 мин. при данном протоколе воздействия приводит к снижению качества зародышей – на 0,27 и 1,09 балла соответственно. Аналогичная тенденция наблюдалась при использовании импульсного режима (2 мс) воздействия на эмбрионы крупного рогатого скота при интенсивности ультразвука в предельных значениях 0,02–0,08 Вт/см², частотой 0,88 МГц в течение 1 мин. Средний балл зародышей составил 4,54, что на 0,33 и 1,21 балла выше по сравнению с эмбрионами, которых подвергали озвучиванию 2 и 3 мин. соответственно.

Увеличение интенсивности ультразвука от 0,05 до 0,2–0,4 (в предельных значениях (0,1–0,3)–(0,2–0,6) соответственно) Вт/см² негативно отразилось на сохранности биоматериала после его



Динамика качественного состава интактных эмбрионов в зависимости от интенсивности ультразвука и продолжительности их обработки

обработки. Качественные показатели эмбриоматериала оказались достоверно ниже по сравнению с протоколом ультразвука интенсивностью $0,05 \text{ Вт/см}^2$: в непрерывном и импульсном режиме при продолжительности ультразвуковой обработки 1 мин. – на 1,33–2,34 и 1,27–2,27 балла, при воздействии ультразвука 2 мин. – 1,01–2,0 и 1,08–2,04 балла и при ультразвуковой обработке 3 мин. – 0,58–1,38 и 1,08–1,24 балла соответственно. Также установлено (рисунок), что средний балл зародышей, подвергавшихся действию ультразвука интенсивностью $0,2 \text{ Вт/см}^2$, находился в пределах 3,27–2,25, интенсивностью $0,4 \text{ Вт/см}^2$ – в пределах 2,27–2,0 балла, что свидетельствует об отрицательном влиянии ультразвука указанных характеристик на сохранность эмбриоматериала.

Можно заключить, что ультразвук частотой 0,88 МГц интенсивностью $0,02\text{--}0,08 \text{ Вт/см}^2$ в непрерывном или импульсном (2 мс) режимах продолжительностью 1 мин. не оказывает негативного влияния на морфологию и качественный состав зародышей крупного рогатого скота.

Увеличение продолжительности ультразвукового воздействия до 2–3 мин. снижает качество биоматериала независимо от применяемой для обработки клеток интенсивности воздействия.

Повышение интенсивности ультразвука до 0,2–0,4 (в предельных значениях (0,1–0,3)–(0,2–0,6 соответственно) Вт/см^2 приводит к гибели части клеток и снижению жизнеспособности оставшихся зародышей.

Выводы

1. Применение ультразвукового воздействия частотой 0,88 МГц, интенсивностью 0,05 (в предельных значениях $0,02\text{--}0,08 \text{ Вт/см}^2$ в непрерывном или импульсном (2 мс) режиме в течение 1 мин. позволяет сохранить жизнеспособность интактных зародышей крупного рогатого скота на достаточно высоком уровне (4,47–4,54 балла), что достоверно выше (на 2,22–2,47 балла) ($P < 0,01$) по сравнению с интенсивностью ультразвука 0,2–0,4 (в предельных значениях (0,1–0,3)–(0,2–0,6 соответственно) Вт/см^2 .

2. Ультразвук частотой 0,88 МГц интенсивностью 0,2–0,4 (в предельных значениях (0,1–0,3)–(0,2–0,6) соответственно) Вт/см^2 в непрерывном или импульсном (2 мс) режиме в течение 2 или 3 мин. оказывает негативное влияние на жизнеспособность и качество зародышей крупного рогатого скота. Средний балл эмбриоматериала после воздействия ультразвука данных технических характеристик на уровне 3,27–2,00 свидетельствует о необходимости исключить данные режимы воздействия из дальнейших исследований.

Литература

1. Акопян, В. Б. Лечит ультразвук / В. Б. Акопян. – М.: Колос, 1983. – 112 с.
2. Акопян, В. Б. Механизм биологического действия ультразвука / В. Б. Акопян // Основы применения низкочастотного ультразвука в сельском хозяйстве: курс лекций / Моск. вет. акад. – М., 1988. – С. 7–14.
3. Makiontosh, I. J. Relationship between intensity of ultrasound and induction of chromosome aberration / I. J. Makiontosh, D. A. Davey // Br. J. Radiol. – 1972. – Vol. 45. – P. 92–93.
4. The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound / M. A. Dinno [et al.] // Phys. Med. Biol. – 1989. – Vol. 34. – P. 1543–1552.

S. N. PAITSERAU

EFFICIENCY OF THE USE OF ULTRASOUND OF DIFFERENT INTENSITIES AND EXPOSURE MODES IN THE EMBRYO TRANSFER TECHNOLOGY

Summary

The research shows that ultrasound with frequency of 0.88 MHz and intensity of $0.02\text{--}0.08 \text{ W/cm}^2$ in a continuous or pulsed mode for 1 minute doesn't have a negative impact on cattle embryos. It is harmless and optimal, and influences the embryo material in order to speed up the repair process and vital functions.