

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей  
и благополучия человека  
Федеральное бюджетное учреждение науки  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ  
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ (ФБУН ГНЦ ПМБ)

---

УТВЕРЖДАЮ  
директор ФБУН ГНЦ ПМБ  
академик РАН, доктор медицинских  
наук, профессор

  
И.А. Дятлов  
"17" декабря 2018 г.

**ОТЧЕТ ОБ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ИСПЫТАНИЯХ**

«Исследования антибактериальной активности в отношении маститогенной флоры и цитотоксического действия *in vitro* аппарата резонансно-волновой ДМВ-терапии «Акватон» по договору №174-н/2018 от 18.05.2018 г., заключенному между ФБУН ГНЦ ПМБ и ООО «ТЕЛЕМАК-НАУКА».

Оболенск 2018

## Список исполнителей

Руководитель темы  
Доктор ветеринарных наук, профессор

Э.А. Светоч

Ответственный исполнитель темы  
кандидат биологических наук, старший  
научный сотрудник

М.Г. Теймуразов

Ведущий инженер-микробиолог,  
кандидат медицинских наук,

О. Ю. Манзенюк

Младший научный сотрудник

М.А. Марьин

Исполнители:

Младший научный сотрудник

А.А. Абаимова

Лаборант-исследователь

О.И. Тазина

## Содержание

Обозначения и сокращения.....	4
Обоснование и задачи исследования .....	6
Регулирующие стандарты.....	6
<b>1. Материалы и методы</b>	
1.1. Исследуемый аппарат.....	7
1.2. Информация о микроорганизмах.....	7
1.3. Дозы и схема облучения аппаратом «Акватон В».....	8
1.4. Учет результатов.....	9
1.5. Клеточные культуры и МТТ тест.....	13
<b>2. Результаты.....</b>	<b>13.</b>
<b>3. Заключение и выводы.....</b>	<b>18.</b>
<b>4. Список литературы .....</b>	<b>19</b>
5. Приложение 1	

### Обозначения и сокращения

ОМЧ	общее микробное число
MRSA	Метициллин-резистентные <i>Staphylococcus aureus</i>
КОЕ	Колониеобразующая единица
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ГКПМ-Оболенск	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ФБУН ГНЦ ПМБ)

*Ключевые слова:* аппарат низкоинтенсивной микроволновой ДМВ - терапии «Акватон», микроволны, бактерицидное действие, цитотоксическое действие, культура клеток.

Объектом исследования является аппарат низкоинтенсивной микроволновой терапии «Акватон», микроволновое излучение с частотой 1 ГГц.

Область применения – ветеринария, биотехнология

## Обоснование

В настоящее время остро стоит вопрос лечения и профилактики маститов у коров. Известно, что острой и подострой формами маститов болеют от 5 до 40% дойного поголовья коров. При этом зачастую у половины всего поголовья выявляют скрытые (субклинические) формы мастита, что, в конечном итоге, приводит к значительному снижению качества молока, а также, потерям в удое и вследствие этого экономическим потерям. Бессистемное применение антибиотиков для лечения маститов приводит к снижению неспецифической резистентности организма, развитию иммуносупрессивных состояний и, как следствие, продлению развития субклинического мастита. Развивается резистентность микрофлоры к антибиотику, и появляется необходимость в подборе новых, более сильных препаратов с широким спектром действия. Поэтому вопрос о поиске и применении безопасных аналогов лекарственных средств, способных снизить или исключить количество используемых антибиотиков, является одним из самых актуальных и широко изучаемых на сегодняшний день [1-2].

Ранее было показано, что действие аппарата «Акватон» оказывает обезболивающий и противовоспалительный эффект. Есть исследования, указывающие на антимикробную активность резонансно-волновой ДМВ терапии в отношении ряда микроорганизмов [3-5].

При использовании аппаратов «Акватон» отмечались эффекты активизации ряда адаптационно-защитных и компенсаторных процессов. Эти эффекты были обусловлены, по всей вероятности, в основном антиоксидантным, а также иммуномодулирующим влиянием на местные и общие механизмы регуляции [6-8].

Полученные экспериментальные результаты будут направлены на доказательства выраженного антимикробного действия аппарата «Акватон» на этиологических возбудителей мастита коров (в т.ч. в субклинической форме). Информация, полученная в результате данного исследования, не будет дублировать результаты других проводимых ранее исследований. В ходе исследовательских испытаний должны быть решены следующие задачи:

1. Выбрана генерируемая частота и экспозиция, генерируемая аппаратом резонансно-волновой ДМВ терапии «АкватонВ», необходимая для выявления бактерицидного/бактериостатического эффекта в опытах *in vitro* на бактерии рода *Staphylococcus* (грамположительная микрофлора), основного возбудителя мастита у коров (острая, хроническая и субклиническая форма);

2. Проведена оценка наличия бактерицидного/бактериостатического эффекта низкоинтенсивного электромагнитного излучения (НЭИ) с заранее выбранными

параметрами в отношении «планктонных культур» бактерий рода *Staphylococcus in vitro* на моделях;

3. Выбрана генерируемая частота и экспозиция, необходимая для выявления бактерицидного/бактериостатического эффекта аппарата «АкватонВ» на бактерии рода *Escherichia* (грамотрицательная микрофлора), вызывающие мастит коров (острая, хроническая и субклиническая форма);

4. Проведена оценка наличия бактерицидного/бактериостатического эффекта, генерируемого аппаратом «АкватонВ», в отношении «микст-культур» «планктонных культур», состоящих из стафилококков и эшерихий в опытах *in vitro*.

5. Проведена оценка возможного цитотоксического действия, генерируемого аппаратом резонансно-волновой ДМВ-терапии «АкватонВ».

### **Регулирующие стандарты**

Все процедуры в исследовании выполнялись согласно утвержденному письменному Плану исследования.

Все работы проводились в соответствии со следующей нормативно-технической документацией:

1. ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010. Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам;
2. Клинические рекомендации: Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия-2015-02, утвержденные на Расширенном совещании Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (Москва, 22.05.2015 г.);
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (2006), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 16th edn. Informational Supplement M100-S16, Wayne, PA;
4. ISO/TC 34/SC 9 – Микробиология;
5. Санитарные правила «Порядок учета, хранения, передачи и транспортировки микроорганизмов I-IV групп патогенности» СП 1.2.036-95;
6. ИСО/МЭК 17025-99 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»;
7. СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

## 1. Материалы и методы

### 1.1. Аппарат

Аппарат резонансно-волновой ДМВ-терапии «Акватон В» (ООО «Телемак», г. Саратов), принцип действия которого основан на открытом сотрудниками Саратовского филиала ИРЭ РАН «резонансно-волновом» эффекте состояния водных сред [9].

### 1.2. Выбор видов и количества микроорганизмов

Для достижения цели и поставленных задач были использованы виды *Staphylococcus aureus* (этиологически ответственен за 20-30% всех маститов) и *Escherichia coli* (до 15% всех маститов). Всего было использовано 4 культуры золотистого стафилококка, в т.ч.: *S. aureus ATCC1707 MRSA* (метициллин устойчивый), депонированный в ГКПМ-Оболенск и три культуры *S. aureus*, выделенные из молока маститных коров. Также, в работе использовали 2 культуры *E. coli* в т.ч. *E. coli O157 П.1*, не образующие шига-токсинов, и культура выделенная из молока маститных коров. В таблице 1 представлена характеристика используемых в эксперименте штаммов микроорганизмов.

Таблица 1. Характеристика штаммов.

Название штамма и источник получения	Источник хранения
<i>S. aureus ATCC1707 MRSA</i> , метициллин устойчивый стафилококк, полученный из американского музея коллекционных культур	ГКПМ-Оболенск
<i>E. coli O157 П.1</i> не образующий шига токсинов	ГКПМ-Оболенск
<i>S. aureus Tb101</i> , штамм выделен из молока коровы с острым маститом	лабораторная коллекция
<i>S. aureus Tb108</i> , штамм выделен из молока коровы с острым маститом	лабораторная коллекция
<i>S. aureus Yl2020</i> , штамм выделен из молока коровы с хроническим маститом	лабораторная коллекция
<i>E. coli 4157</i> , серотип O26, штамм выделен из молока коровы с хроническим маститом	лабораторная коллекция

### 1.3. Дозы, схема и способ облучения

Проверка бактерицидного/бактериостатического эффект аппарата «Акватон» на микроорганизмы проводилась со следующими параметрами (программа MODE1, LEVEL1, 45 минут, расстояние до облучаемого объекта -1см).

Аппаратом «Акватон» были обработаны суспензии микроорганизмов в физиологическом растворе, свежем и нестерилизованном молоке со следующими

концентрациями  $10^2$  КОЕ,  $10^4$  КОЕ,  $10^6$  КОЕ,  $10^8$  КОЕ. Перед облучением были отобраны аликвоты суспензий каждого разведения для последующего посева на плотные питательные среды в качестве контроля сравнения с опытными образцами. Объемы обрабатываемых суспензий микроорганизмов равнялись 50 мл. Опытные и контрольные образцы титровали методом десятикратных разведений до  $1 \times 10^1$  с последующим высевом по 0,1 мл каждого разведения на чашки Петри (по 3 чашки на каждое разведение) с питательной средой ГРМ №1 и последующим равномерным распределением по поверхности питательной среды стерильными шпателями.

Также были облучены газоны тест-культур микроорганизмов, выросших на питательной среде №1 ГРМ (трехкратные повторы). В качестве контроля сравнения использовались газоны тест-культур микроорганизмов на плотной питательной среде без обработки аппаратом «Акватон» в тех же концентрациях, что и опытные образцы.

В таблице 2 представлен дизайн исследований.

Таблица 2. Оценка антибактериальной активности аппарата «Акватон» в опытах *in vitro*.  
Перечень тест-штаммов.

Микроорганизмы	Концентрация микроба, КОЕ/мл	аппарат «Акватон»		Контроль сравнения без облучения аппаратом «Акватон»
		частота	экспозиция	
Суспензии стафилококков (4 штамма)/ в физиологическом растворе	$10^2$	режим 1	45 мин	+
	$10^4$	режим 1	45 мин	+
	$10^6$	режим 1	45 мин	+
	$10^8$	режим 1	45 мин	+
Суспензии стафилококков (4 штамма)/ в нестерилизованном, свежем молоке	$10^2$	режим 1	45 мин	+
	$10^4$	режим 1	45 мин	+
	$10^6$	режим 1	45 мин	+
	$10^8$	режим 1	45 мин	+
Газон культур стафилококков (4 штамма), на плотной питательной среде ГРМ №1	$10^2$	режим 1	45 мин	+
Суспензии эшерихии (два штамма)/ в физиологическом растворе	$10^2$	режим 1	45 мин	+
	$10^4$	режим 1	45 мин	+
	$10^6$	режим 1	45 мин	+
	$10^8$	режим 1	45 мин	+
Суспензии эшерихии (два штамма)/ в нестерилизованном свежем молоке	$10^2$	режим 1	45 мин	+
	$10^4$	режим 1	45 мин	+
	$10^6$	режим 1	45 мин	+
	$10^8$	режим 1	45 мин	+



Суспензии эшерихии (два штамма), в физиологическом растворе	10 <sup>2</sup>	режим 1	45 мин	+
	10 <sup>4</sup>	режим 1	45 мин	+
	10 <sup>6</sup>	режим 1	45 мин	+
	10 <sup>8</sup>	режим 1	45 мин	+
Газон культур эшерихий (2 штамма), на плотной питательной среде ГРМ №1	10 <sup>2</sup>	режим 1	45 мин	+

### 1.3. Учет результатов

Чашки Петри с произведенными посевами тест-микроорганизмов опытных и контрольных образцов всех концентраций помещали в термостат при 37°C и культивировали в течение 18-48ч. Учет результатов проводился визуально, путем подсчета выросших колоний на трех параллельных чашках каждого разведения. Результаты заносились в протокол исследования и проводился анализ путем сравнения с контрольными образцами.

### 1.4. Клеточные культуры

В экспериментах по оценке возможного цитотоксического действия аппарата «Акватон» использовали человеческую перевиваемую линию эпителиальных клеток HeLa S3. Клеточная линия приобретена у Американской коллекции типовых культур ATCC (American Type Culture Collection). Перед использованием культуру клеток тестировали на жизнеспособность с помощью раствора трипанового синего, а также на отсутствие бактериальной и грибковой контаминации, наблюдаемой при осмотре культуральных флаконов под световым микроскопом.

#### 1.4.1. Питательные среды и условия культивирования. Пробоподготовка.

В качестве среды для культивирования линии HeLa S3 использовали среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с содержанием 2мМ L-глутамина и 10% инактивированной фетальной бычьей сыворотки (все Gibco, Thermo Fisher, США). Клетки выращивали в 75 см<sup>2</sup> культуральных флаконах (Corning, США) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C, не превышая 70%-80% конфлюэнции. При подготовке к экспериментам использовали стандартную методику пересева адгезивных клеток: с поверхности флакона со сформированным клеточным монослоем убирали питательную среду и вносили раствор трипсина-ЭДТА 0,05% (раствор трипсина 0,05%, ЭДТА - 0,53 мМоль в растворе Хенкса, не содержащем солей кальция и магния). Через 10 мин убирали раствор трипсина-ЭДТА и отделяли клетки от пластиковой подложки аккуратным постукиванием по флакону. Затем во флакон вносили 5-8 мл питательной среды и доводили концентрацию клеточной

суспензии до  $2 \times 10^5$  кл/мл. Подсчет клеток производили с помощью автоматического счетчика клеток TC20™ (Bio-Rad, США). Полученную суспензию клеток в среде помещали в лунки 96-луночных планшетов по 100 мкл в каждую лунку. Таким образом каждая лунка содержала  $2 \times 10^4$  клеток. Для исследования воздействия микроволнового излучения, генерируемого аппаратом «Акватон», спустя 4, 24, 48 и 72 часа после облучения, подготовили 12 культуральных планшетов. При учете результатов для каждого из 4-х временных интервалов было предусмотрено 3 планшета:

- 1) Один 96-луночный планшет, содержащий 36 заполненных клеточной суспензией лунок в виде квадрата 6 x 6 лунок под облучение в течение 15 минут;
- 2) Один 96-луночный планшет, содержащий 36 заполненных клеточной суспензией лунок в виде квадрата 6 x 6 лунок под облучение в течение 45 минут;
- 3) Один 96-луночный планшет, содержащий 30 заполненных клеточной суспензией лунок и 30 лунок, заполненных ростовой питательной средой без клеток.

Подготовленные планшеты оставляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Panasonic, Япония) на ночь для кондиционирования и адгезии клеток.

Примечание: все планшеты были засеяны одновременно клеточной суспензией из одного пассажа для максимального единообразия (качественного и количественного) клеточного содержимого в каждой лунке.

#### 1.4.2. Воздействие на клеточную линию HeLa S3 аппаратом «Акватон»

Спустя 12 часов 8 опытных планшетов по очереди переносили в ламинарный шкаф (Nuairе, Великобритания), открывали и помещали под излучающую часть аппарата «Акватон». Расстояние от плоскости излучающей поверхности до верхней плоскости планшетов составляло 1 см, при этом все исследуемые лунки находились строго под излучателем (рис. 1). Аппарат «Акватон» включали, настраивали на режим MODE1 LEVEL1 и нажимали кнопку «старт». Четыре планшета поочередно облучали в течение 15 минут, другие 4 – в течение 45 минут. Если аппарат заканчивал работу раньше установленного времени, кнопку «старт» нажимали повторно, до тех пор, пока не истечет время по таймеру. Для достоверности результатов эксперимента 4 контрольных планшета также были выдержаны в течение 45 мин открытыми на рабочей поверхности

ламинарного шкафа, но не подвергались облучению. После воздействия аппаратом планшеты с клетками убирали в CO<sub>2</sub>-инкубатор.

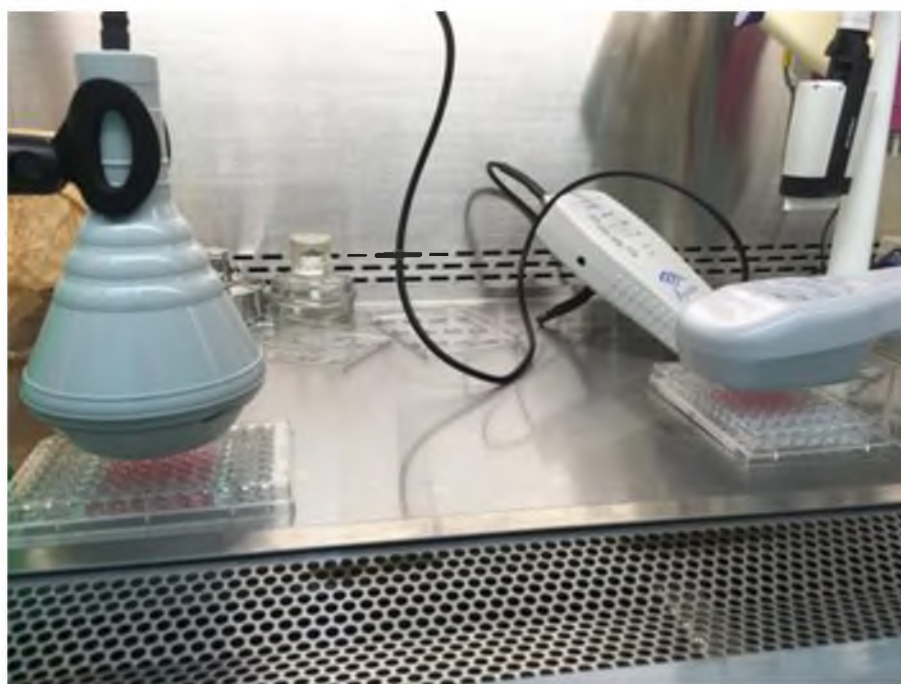


Рис. 1. Проведение процедуры облучения аппаратом «Акватон-В» планшетов с клеточной культурой HeLa S3

#### 1.4.3. Цитотоксический тест МТТ

Цитотоксическое действие аппарата «Акватон» оценивали по изменению суммарной активности митохондриальных клеточных дегидрогеназ в микротесте МТТ. Фотометрический метод МТТ является одним из наиболее общепринятых методов оценки цитотоксичности и основан на способности дегидрогеназ митохондрий восстанавливать желтую растворимую соль МТТ (3-(4,5-диметитиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид), в результате чего в цитоплазме клеток накапливаются гранулы нерастворимого формазана пурпурного цвета [10]. Таким образом, количество окрашенных клеток и степень пурпурного окрашивания их цитоплазмы коррелирует с общей жизнеспособностью клеточного монослоя. По результатам измерений оптической плотности клеточного лизата при длине волны 540 нм (ОП<sub>540</sub>) в лунках планшетов через 4, 24, 48 и 72 ч, находившихся под излучателем работающего аппарата «Акватон» в течение 0, 15 и 45 минут, делали вывод о цитотоксическом действии прибора.

В различные сроки инкубации (4, 24, 48 и 72 ч) в лунки добавляли по 10 мкл стокового раствора МТТ и инкубировали в течение 4 ч. Раствор МТТ был приготовлен разбавлением навески из набора Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular

Probes V13154, Thermo Fisher, США) в 1 мл фосфатно-солевого буфера. Затем аккуратно отбирали 85 мкл содержимого лунок и лизировали клеточный монослой добавлением 175 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, Sigma-Aldrich, США). Для обеспечения полного лизиса клеток и равномерного растворения кристаллов формазана каждый ряд в 96-луночных планшетах тщательно перемешивали пипетированием с помощью многоканального дозатора. Оптическую плотность клеточного лизата измеряли при длине волны 540 нм на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США).

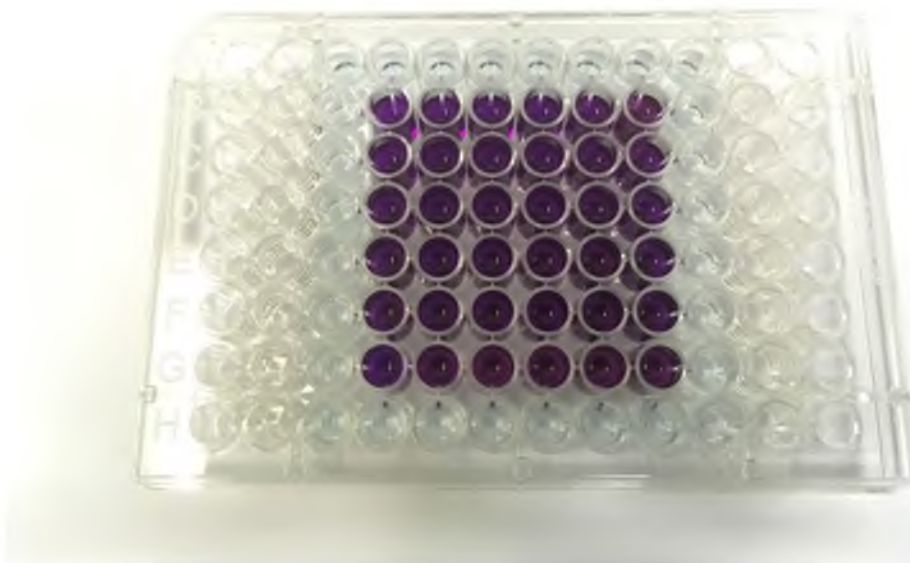


Рис. 2. Экспериментальный 96-луночный планшет после проявки в микротесте МТТ.

Относительная жизнеспособность (относительно контрольных лунок, не подвергнутых микроволновому излучению аппарата «Акватон») клеток в каждой опытной лунке была рассчитана по следующей формуле:

$$v = \frac{ОП_{540(опыт)}t_i - \overline{ОП_{540(среды)}}t_i}{ОП_{540(контроль)}t_i - \overline{ОП_{540(среды)}}t_i} \cdot 100\% \quad (1),$$

где

$v$  – относительная жизнеспособность клеток в данной опытной лунке;

$ОП_{540(опыт)}t_i$  – оптическая плотность клеточного лизата, измеренная в данной опытной лунке при длине волны 540 нм, после инкубации  $i$  часов;

$\overline{ОП_{540(среды)}}t_i$  – усредненное значение оптической плотности лунок, содержащих только ростовую среду клеток, измеренное при длине волны 540 нм после инкубации  $i$  часов;

$\overline{O\bar{I}540(опыт)}_i$  – усредненное значение оптической плотности клеточного лизата в контрольных лунках, измеренное при длине волны 540 нм после инкубации  $i$  часов.

$i = 4, 24, 48$  и  $72$

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного сервиса GraphPad Prism (<https://www.graphpad.com/>)

## 2. Результаты

Оценка бактерицидного действия аппарата «Акватон»

В таблице 2 представлены данные бактерицидного/бактериостатического эффекта аппарата «Акватон» на суспензии микроорганизмов в физиологическом растворе.

Табл.2 Оценка бактерицидного/бактериостатического эффекта аппарата «Акватон» по отношению к суспензиям тест-штаммам *S. aureus*, *E. coli* в физиологическом растворе

№№	микроорганизм	КОЕ/мл опытной группы (среднее)	КОЕ/мл контрольной группы (среднее)
1	<i>S. aureus ATCC1707</i>	$1,2 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$
2	<i>S. aureus ATCC1707</i>	$1,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
3	<i>S. aureus ATCC1707</i>	$1,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
4	<i>S. aureus ATCC1707</i>	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$
5	<i>S. aureus Tb101</i>	$0,5 \times 10^2$	$0,8 \times 10^2$
6	<i>S. aureus Tb101</i>	$0,5 \times 10^4$	$0,8 \times 10^4$
7	<i>S. aureus Tb101</i>	$0,8 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$
8	<i>S. aureus Tb101</i>	$0,6 \times 10^8$	$0,6 \times 10^8$
9	<i>S. aureus Tb108</i>	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^2$
10	<i>S. aureus Tb108</i>	$1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
11	<i>S. aureus Tb108</i>	$1 \times 10^6$	$0,9 \times 10^6$
12	<i>S. aureus Tb108</i>	$1,2 \times 10^8$	$0,8 \times 10^8$
13	<i>S. aureus Yl2020</i>	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^2$
14	<i>S. aureus Yl2020</i>	$0,8 \times 10^4$	$0,5 \times 10^4$
15	<i>S. aureus Yl2020</i>	$0,5 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$
16	<i>S. aureus Yl2020</i>	$0,5 \times 10^8$	$1 \times 10^8$

17	<i>E. coli</i> O157 П.1	$0,8 \times 10^2$	$0,8 \times 10^2$
18	<i>E. coli</i> O157 П.1	$1,0 \times 10^4$	$0,8 \times 10^4$
19	<i>E. coli</i> O157 П.1	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
20	<i>E. coli</i> O157 П.1	$1,4 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
21	<i>E. coli</i> 4157	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^2$
22	<i>E. coli</i> 4157	$1,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
23	<i>E. coli</i> 4157	$1,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
24	<i>E. coli</i> 4157	$1,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$

Данные, приведенные в Табл.2 свидетельствуют о том, что при облучении суспензии микробов в физиологическом растворе аппаратом «АкватонВ» режим1 и времени облучения 45 мин не происходит гибели взятых в опыт штаммов микроорганизмов – возбудителей мастита коров.

В таблице 3 представлены данные бактерицидного/бактериостатического эффекта аппарата «Акватон» на суспензию микроорганизмов в свежем нестерилизованном молоке.

Табл.3 Оценка бактерицидного/бактериостатического эффекта аппарата «Акватон» по отношению к суспензиям тест-штаммам *S. aureus*, *E. coli* в свежем нестерилизованном молоке.

№№	микроорганизм	КОЕ опытной группы (среднее)	КОЕ контрольной группы (среднее)
1	<i>S. aureus</i> ATCC1707	$0,8 \times 10^2$	$0,9 \times 10^2$
2	<i>S. aureus</i> ATCC1707	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$
3	<i>S. aureus</i> ATCC1707	$1,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
4	<i>S. aureus</i> ATCC1707	$1,1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$
5	<i>S. aureus</i> Tb101	$0,8 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$
6	<i>S. aureus</i> Tb101	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$
7	<i>S. aureus</i> Tb101	$1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
8	<i>S. aureus</i> Tb101	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
9	<i>S. aureus</i> Tb108	$0,8 \times 10^2$	$0,8 \times 10^2$
10	<i>S. aureus</i> Tb108	$0,6 \times 10^4$	$0,8 \times 10^4$
11	<i>S. aureus</i> Tb108	$0,8 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$

12	<i>S. aureus Tb108</i>	$0,6 \times 10^8$	$0,5 \times 10^8$
13	<i>S. aureus Yl2020</i>	$1,1 \times 10^2$	$1 \times 10^2$
14	<i>S. aureus Yl2020</i>	$0,5 \times 10^4$	$0,8 \times 10^4$
15	<i>S. aureus Yl2020</i>	$0,5 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$
16	<i>S. aureus Yl2020</i>	$0,2 \times 10^8$	$0,5 \times 10^8$
17	<i>E. coli 157 П.1</i>	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^2$
18	<i>E. coli 157 П.1</i>	$1,1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$
19	<i>E. coli 157 П.1</i>	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
20	<i>E. coli 157 П.1</i>	$1,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
21	<i>E. coli 4157</i>	$0,5 \times 10^2$	$0,5 \times 10^2$
22	<i>E. coli 4157</i>	$0,5 \times 10^4$	$0,5 \times 10^4$
23	<i>E. coli 4157</i>	$0,4 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$
24	<i>E. coli 4157</i>	$0,4 \times 10^8$	$0,5 \times 10^8$

В таблице 4 представлены данные бактерицидного/бактериостатического эффекта аппарата «Акватон» по результатам проведенных экспериментов посеянных на плотную питательную среду тест-микробов.

Табл.4 Оценка бактерицидного/бактериостатического эффекта аппарата «Акватон» по отношению к тест-штаммам *S. aureus*, *E. coli* на плотной питательной среде.

№№	микроб	КОЕ опытной группы (среднее)	КОЕ контрольной группы (среднее)
1	<i>S. aureus ATCC1707</i>	$0,8 \times 10^2$	$0,9 \times 10^2$
2	<i>S. aureus Tb101</i>	$0,8 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$
3	<i>S. aureus Tb108</i>	$0,8 \times 10^2$	$0,8 \times 10^2$
4	<i>S. aureus Yl2020</i>	$1,1 \times 10^2$	$1 \times 10^2$
5	<i>E. coli 157 П.1</i>	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^2$
6	<i>E. coli 4157</i>	$0,5 \times 10^2$	$0,5 \times 10^2$

Таким образом, облучение суспензий низкочастотным электромагнитным излучением 1 ГГц в течение 45 мин не вызывало гибели бактерий *S. aureus* и *E. coli* в физиологическом

растворе, нестерилизованном молоке и на плотной питательной среде в концентрации от  $\sim 1 \times 10^2$  -  $\sim 1 \times 10^8$  КОЕ/мл. Статистически различий в концентрации микроорганизмов опытных (облученных) и контрольных (необлученных) образцов ни в одном из вариантов не установлено.

## 2.2 Оценка цитотоксического действия аппарата «Акватон»

В ходе экспериментов было проведено 12 микротестов МТТ, по результатам которых получены значения ОП<sub>540</sub> клеточных лизатов (см. табл. 1 Приложение1): по формуле (1) были рассчитаны показатели жизнеспособности клеток HeLa S3 в каждой лунке культуральных планшетов. На основании полученных значений составлена таблица 5, в которой отражены усредненные показатели жизнеспособности эпителиальных клеток HeLa S3.

Таблица 5. Усредненные значения относительной жизнеспособности клеточной популяции HeLa S3 в эксперименте с аппаратом «Акватон»

Период инкубации после воздействия аппаратом "Акватон"	Относительная жизнеспособность клеток HeLa S3 (среднее значение), $\pm v$ , %	
	Воздействие в течение 15 минут	Воздействие в течение 45 минут
4	103,21	112,02
24	108,39	111,51
48	103,54	105,19
72	98,99	105,59

Данные, полученные после обработки результатов измерений ОП<sub>540</sub>, были загружены в программу GraphPad Prism 7.0 для построения кривых, характеризующих жизнеспособность клеточного монослоя после различных периодов инкубации (рис. 3). Для построения пределов погрешности выбран интервал значений, в пределах которого с доверительной вероятностью 95% находится истинное среднее значение выборки (доверительный интервал CI-95%).



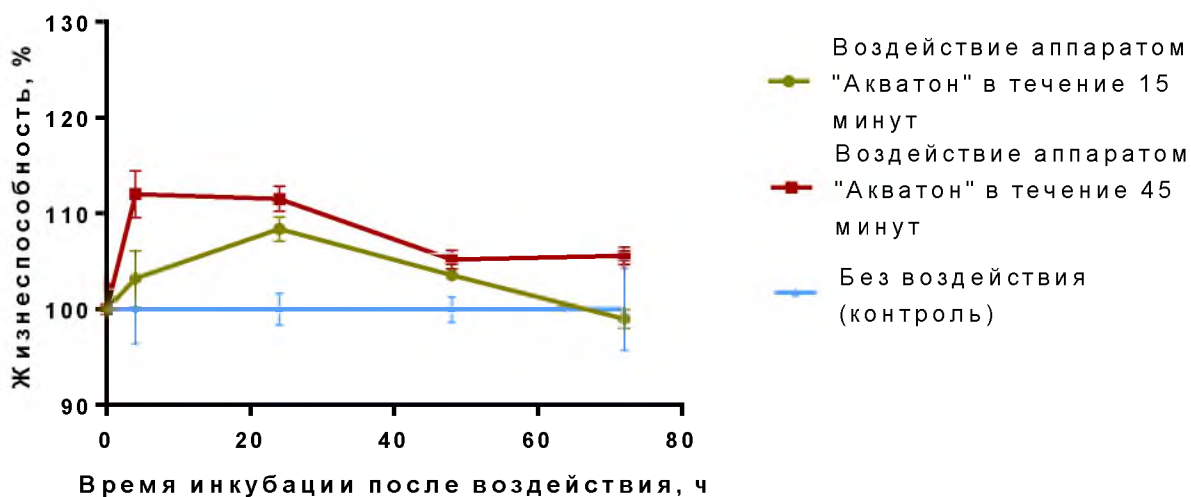


Рисунок 3. Жизнеспособность культуры клеток HeLa S3 через 4, 24, 48 и 72 часа после воздействия на них аппаратом «Акватон» в течение 15 и 45 минут.

Если значение жизнеспособности в опыте выше 100%, то можно судить о позитивном изменении состояния клеточной культуры после облучения: клетки увеличивают свою метаболическую активность и/или их количество увеличивается (возрастает пролиферативная активность).

Таблица 6. Среднее изменение жизнеспособность клеток HeLa S3 на протяжении всего периода наблюдения,  $\Delta\bar{v}$ , и изменение жизнеспособности клеток в после периода инкубации  $t_i, (\bar{v}_{t_i} - 100\%)$ .

Показатель	Значение показателя, %	
	Воздействие в течение 15 минут	Воздействие в течение 45 минут
$\Delta\bar{v}$	3,53	8,58
$\bar{v}_{4ч} - 100\%$	3,21	12,02
$\bar{v}_{24ч} - 100\%$	8,39	11,51
$\bar{v}_{48ч} - 100\%$	3,54	5,19
$\bar{v}_{72ч} - 100\%$	-1,01	5,59

Цветом выделены значения, превышающие среднее ( $\Delta\bar{v}$ ).

На Рис. 3 показано, что графики жизнеспособности не пересекаются с контрольной линией и между собой в доверительных интервалах средних значений жизнеспособности, измеренных через 24 часа после двух опытов с облучением планшетов в течение 15 и 45 минут. Следовательно, различия, наблюдаемые при обработке результатов, носят значимый характер, а время инкубации - 24 часа – оптимальное для определения жизнеспособности клеток после воздействия аппаратом «Акватон». В последующих тестах достаточно замерять жизнеспособность клеток не ранее чем через 24 часа.

### **Заключение и выводы**

1. При облучении аппаратом «Акватон В» нами не было установлено статистически значимых различий в концентрации микроорганизмов опытных и контрольных образцов ни в одном из вариантов модельных групп микроорганизмов.
2. Цитотоксического эффекта аппарата «АкватонВ» в отношении клеточной культуры HeLa S3, при воздействии в течение 15 и 45 минут в режиме MODE1 LEVEL1 не отмечено.
3. Аппарат «АкватонВ» оказывал положительное влияние на клетки HeLa S3. Об этом свидетельствует увеличение жизнеспособности клеток, подвергнутых микроволновому облучению при выбранных режимах по сравнению с контрольными образцами. Жизнеспособность клеток увеличилась в среднем на 4% после облучения в течение 15 минут и на 9% после облучения в течение 45 минут. Наиболее значимые различия результатов определения показателей жизнеспособности для периодов облучения 15 и 45 минут отмечались при инкубации планшетов с клетками в течение 24 часов после облучения.

## Список литературы

1. Ивашура, А.И. Система мероприятий по борьбе с маститами коров/ А.И. Ивашура. - М.: Росагропромиздат, 1991. - 240 с.
2. Демидова, Л.Д. Ветеринарно-санитарные основы борьбы с маститом коров и повышение санитарного качества молока: Автореф. ... дисс. доктора вет. наук. М.- 1997.-С.49.
3. Семиволос, А.М. Сравнительная оценка эффективности лечения коров при субклинической форме мастита различными лекарственными препаратами/А.М. Семиволос, Е.А. Студникова //Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова.-2013.-№2.- С.40-41. (0,13/ 0,1 п.л.)
4. Абдессемед, Д. Диагностика и терапия субклинического мастита у лактирующих коров / Д. Абдессемед, А.В. Авдеенко // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2014. - № 3.- С.-3-6.
5. Багманов, М.А. Терапия и профилактика патологии органов размножения и молочной железы у коров/ М.А. Багманов, Н.Ю. Терентьева, Р.Н. Сафиуллов: Монография. – Казань, 2012. – 187 с.
6. Балковой, И.И. Биологические принципы лечения электромагнитным полем УВЧ коров при мастите / И.И. Балковой, В.Н. Иноземцев, А.Г. Самоделкин // Ветеринария. - 1993. - № 6. - С. 40-43.
7. Howard W.H., Gill R., Leslie K.E., Lissemore K. Monitoring and controlling mastitis on Ontario dairy farms // Can. J. Agr. Econom., 1991. - V. 39. - P. 299-318.
8. V.G.Sunkari, B.Aranovitch, N.Portwood, A.Nikoshkov. Electromagnetic Biology and Medicine.Effects of a low-intensity electromagnetic field on fibroblast migration and proliferation. 30(2): 80-85, 2011 DOI: 10.3109/15368378.2011.566774
9. Регистрационное удостоверение № ФСП 2011\10932
10. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. – 1983. – V.65. – P.55-63

Приложение 1

Таблица 1. Измеренные значения оптической плотности клеточных лизатов и среды (фона) в микротестах МТТ

		Инкубация 4 часа после эксперимента				Инкубация 24 часа после эксперимента				Инкубация 48 часов после эксперимента				Инкубация 72 часа после эксперимента			
Значения ОП540	Облучение в течение 15 минут	Облучение в течение 45 минут	Контроль (без облучения)	Среда без клеток (фон)	Облучение в течение 15 минут	Облучение в течение 45 минут	Контроль (без облучения)	Среда без клеток (фон)	Облучение в течение 15 минут	Облучение в течение 45 минут	Контроль (без облучения)	Среда без клеток (фон)	Облучение в течение 15 минут	Облучение в течение 45 минут	Контроль (без облучения)	Среда без клеток (фон)	
	2,18	2,789	2,412	0,359	3,26	3,544	2,905	0,163	3,647	3,658	3,279	0,153	3,427	3,613	3,615	0,169	
	2,5	2,34	1,72	0,416	3,291	3,371	3,02	0,16	3,627	3,718	3,32	0,142	3,354	3,533	3,525	0,157	
	2,615	2,652	2,657	0,362	3,397	3,28	3,352	0,169	3,512	3,674	3,309	0,142	3,312	3,459	3,642	0,161	
	2,168	2,767	2,559	0,41	3,358	3,495	3,066	0,156	3,526	3,67	3,278	0,14	3,351	3,385	3,532	0,162	
	2,407	2,791	2,571	0,341	3,344	3,305	3,036	0,159	3,538	3,666	3,465	0,147	3,26	3,218	3,675	0,16	
	2,584	2,347	2,406	0,464	3,405	3,569	3,165	0,148	3,532	3,475	3,459	0,146	3,395	3,394	3,662	0,141	
	2,238	2,834	2,542	0,418	3,352	3,514	3,115	0,168	3,636	3,605	3,446	0,176	3,425	3,569	3,562	0,155	
	2,642	2,755	2,43	0,385	3,206	3,341	3,275	0,158	3,609	3,736	3,497	0,161	3,239	3,526	3,464	0,156	
2,766	2,698	2,507	0,429	3,447	3,236	3,404	0,157	3,598	3,709	3,627	0,163	3,333	3,393	3,559	0,163		

2,695	2,807	2,463	0,363	3,199	3,346	3,315	0,154	3,522	3,603	3,653	0,143	3,249	3,319	3,565	0,145
2,733	2,758	2,447	0,391	3,341	3,338	3,128	0,16	3,594	3,655	3,624	0,154	3,155	3,38	3,608	0,156
2,202	2,704	2,109	0,387	3,409	3,497	3,135	0,165	3,602	3,56	3,364	0,152	3,39	3,477	3,609	0,153
2,496	2,853	2,437	0,384	3,31	3,532	3,185	0,165	3,553	3,456	3,319	0,176	3,314	3,553	3,456	0,16
2,485	2,681	2,537	0,407	3,541	3,527	3,25	0,152	3,571	3,719	3,467	0,158	3,128	3,512	3,177	0,149
2,614	2,695	2,409	0,396	3,477	3,532	2,992	0,152	3,519	3,64	3,328	0,149	3,176	3,367	2,828	0,143
2,356	2,655	2,388	0,371	3,42	3,543	3,284	0,155	3,61	3,665	3,524	0,146	3,287	3,471	3,098	0,144
2,6	2,574	2,341	0,358	3,561	3,473	2,9	0,163	3,55	3,657	3,38	0,16	3,025	3,396	3,314	0,148
2,578	2,597	2,412	0,42	3,517	3,532	3,114	0,16	3,474	3,436	3,363	0,155	3,155	3,441	3,622	0,149
2,59	2,747	2,452	0,392	3,304	3,592	3,016	0,156	3,546	3,662	3,218	0,17	3,345	3,523	2,661	0,154
2,712	2,427	2,496	0,426	3,368	3,406	3,026	0,155	3,537	3,686	3,519	0,164	3,253	3,483	3,199	0,154
2,439	2,741	2,568	0,412	3,469	3,492	3,038	0,147	3,503	3,706	3,54	0,163	3,205	3,333	3,029	0,148
2,664	2,659	2,41	0,374	3,45	3,46	3,079	0,159	3,557	3,613	3,401	0,157	3,214	3,444	3,307	0,151

Таблица 1. Продолжение.

Инкубация 4 часа после эксперимента				Инкубация 24 часа после эксперимента				Инкубация 48 часов после эксперимента				Инкубация 72 часа после эксперимента				
Облучение в течение	Облучение в течение 45	Контроль (без облучения)	Среда без клеток (фон)	Облучение в течение 15	Облучение в течение 45	Контроль (без облучения)	Среда без клеток (фон)	Облучение в течение 15	Облучение в течение 45	Контроль (без облучения)	Среда без клеток (фон)	Облучение в течение 15	Облучение в течение 45	Контроль (без облучения)	Среда без клеток (фон)	

	15 мину т	минут			минут	минут			минут	минут			минут	минут		
Значения ОП540	2,313	2,719	2,346	0,374	3,38	3,527	3,135	0,153	3,602	3,644	3,592	0,15	3,201	3,463	2,848	0,143
	2,562	2,632	2,239	0,391	3,46	3,588	2,956	0,159	3,539	3,48	3,57	0,161	3,156	3,46	3,544	0,138
	2,58	2,804	2,478	0,374	3,379	3,446	3,068	0,164	3,674	3,643	3,382	0,18	3,329	3,51	2,499	0,156
	2,379	2,677	2,528	0,377	3,403	3,534	2,846	0,154	3,584	3,411	3,484	0,172	3,185	3,527	2,946	0,147
	2,436	2,76	2,399	0,372	3,412	3,293	3,066	0,163	3,574	3,646	3,495	0,179	3,25	3,295	3,498	0,155
	2,506	2,755	2,381	0,333	3,464	3,127	3,16	0,157	3,55	3,646	3,583	0,173	3,154	3,513	2,928	0,144
	2,507	2,517	1,937	0,345	3,256	3,528	3,166	0,146	3,566	3,532	3,478	0,18	3,185	3,551	2,551	0,153
	2,569	2,601		0,398	3,357	3,455	3,143	0,152	3,575	3,65	3,483	0,173	3,228	3,592	2,973	0,148
	2,618	2,9			3,023	3,503			3,573	3,722			3,23	3,45		
		2,784			3,257	3,429			3,46	3,629			3,236	3,509		
		2,907			3,3	3,445			3,528	3,45			3,204	3,416		
		2,853			3,384	3,542			3,457				3,207	3,46		
		2,689			3,192				3,608				3,26	3,469		
		2,319			3,237				3,672				3,237	3,487		