

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОЙ ОБРАБОТКИ ИНКУБАЦИОННЫХ ЯИЦ НА БАКТЕРИАЛЬНУЮ ОБСЕМЕНЕННОСТЬ ПОВЕРХНОСТИ СКОРЛУПЫ

Миленин Д.Н.

Научный руководитель – д. т. н. проф. Лисиченко Н.Л.;
Харьковский национальный технический университет
сельского хозяйства им. П. Василенко,
кафедра автоматизированных электромеханических систем,
61052 Украина, г. Харьков, ул. Энгельса, 19,
тел.: (066) 181-68-79, e-mail: milenin@fromru.com

Решение задачи повышения выводимости молодняка птицы в значительной мере зависит от снижения бактериальной обсемененности инкубационного яйца. Для уничтожения этих микроорганизмов используют ультрафиолетовое излучение, озонирование или химические препараты. В последнее время в птицеводстве активно используется доинкубационная лазерная обработка яиц с целью активизации развития зародыша (Миленин Д.Н. и др., 2011, 2012). При этом одновременно активизируется и микрофлора на поверхности яйца, что необходимо учитывать при дальнейших процессах обеззараживания.

Целью настоящей работы является определение влияния экспозиции лазерного облучения на количество колоний бактерий на поверхности скорлупы яйца.

Эксперименты проводились на бактериях *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*, которые наиболее часто встречаются на поверхности инкубационных яиц. Указанные модельные объекты использовались для приготовления раствора необходимой концентрации и для дальнейшего подсчета числа бактериальных колоний после облучения этого раствора.

Одинаковые объемы обсемененной жидкости облучались низкоинтенсивным лазерным излучением с длиной волн 405 (сине-фиолетовым), 532 (зеленым), 660 нм (красным) и экспозицией до 120 сек. Затем эти образцы высевались в питательную среду, а по истечению времени подсчитывалось количество выживших колоний *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что наиболее благоприятный результат для обоих видов бактерий был получен при воздействии на них красным светом с длиной волны 660 нм. Наиболее эффективная экспозиция для *Escherichia* составила 5 сек., а для *Salmonella typhimurium* – 10 сек.

EFFECT OF HATCHING EGGS LASER TREATMENT ON BACTERIAL CONTAMINATION OF THE SHELL

Milenin D

Scientific advisor – Dr. Techn. Sc. Prof. Lysychenko N.L.;
Kharkov National Technical University of Agriculture name of Vasilenko,
Department of automated electromechanical systems,
61052 Ukraine, Kharkov, Engels Street 19,
tel.: (066) 181-68-79, e-mail: milenin@fromru.com

The article examines the influence of laser radiation on the revitalization process microflora (*Escherichia u Salmonella typhimurium*) on the surface of hatching eggs.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ОСВЕЧИВАНИЯ КРАСНЫМ И ИНФРАКРАСНЫМ НИЗКОИНТЕНСИВНЫМ ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Москвин С.В., *Ключников Д.Ю., **Антипов Е.В.,
*Волчков С.Е., Киселева О.Н.

ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины ФМБА РФ»,
Россия, г. Москва, тел.: +7-916-987-9095, e-mail: 7652612@mail.ru;
*ГБУЗ «Самарский областной центр планирования
семьи и репродукции», Россия, г. Самара;
**НОУ ВПО Медицинский институт «РЕАВИЗ», г. Самара

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) давно привлекают внимание исследователей и практических врачей с точки зрения их возможного использования для заместительной или восстановительной терапии заболеваний, генной или клеточной инженерии. МСК – мультипотентные стромальные клетки, способные к дифференцировке в различные типы клеток тканей – остеобласты, хондроциты, адипоциты, миоциты, гепатоциты, кардиомиоциты и др. МСК человека сохраняют способность к пролиферации и дифференцировке при культивировании *in vitro*, а также при реимплантации, что обуславливает их высокую значимость в клинической практике. Есть данные о возможности получения из МСК нейрональных предшественников с последующей дифференцировкой их в клетки нервной ткани (нейроны, астроциты, олигодендроциты). Известно, что МСК секретируют почти все основные провоспалительные цитокины и ростовые факторы. Если будут найдены условия для расширения мультипотентности МСК до плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток, в регенеративно-пластической медицине автоматически разрешатся многие проблемы этического, морального, религиозного и юридического характера.

Один из известных способов неспецифического регулирования клеточной активности МСК на этапе предварительного культивирования *in vitro* - воздействие низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ). В известных исследованиях использовали НИЛИ с разной длиной волны (405, 633, 635, 647, 660, 664, 804, 808, 810, 830 и 1064 нм), генерируемое в непрерывном режиме; при этом средняя мощность и плотность мощности (ПМ) чаще всего были минимальны. Оценивались, в основном, дифференцировка и особенности деления клеток.

Однако пока не проведено ни одного исследования результатов воздействия импульсного НИЛИ, особенно красного или инфракрасного, наиболее распространенных в современной лазерной терапии ввиду их высокой эффективности. Не изучались перспективы частотной модуляции НИЛИ при облучении МСК.

Цель нашей работы - оценка влияния импульсного инфракрасного (длина волны 904 нм) и красного (635 нм) НИЛИ, в том числе с использованием многочастотного режима, на морфологию, жизнеспособность, пролиферативную активность и скорость роста МСК *in vitro*.

Материалы и методы. В эксперименте использовалась адгезивная культура МСК (4 пассажа), полученных из ткани пуповины донора, давшего информированное согласие. Забор, транспортировка и обработка материала проводилась в течение 24 часов с момента родов. МСК получены методом эксплантов с последующим культивированием фрагментов.

Культивирование проводили в течение 6 суток на стандартных питательных средах: Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification with NaHCO_3 (Sigma-Aldrich, Германия), 2мМ L-глутамина («ПанЭко», Россия), 10% сыворотки плодов коровы (MSC FBS, Gibco, Австралия). МСК культивировали на чашках Петри площадью 11,78 cm^2 (EasyGrip™, Beckton Dickinson, USA). Также использовали: раствор Дальбекко (DPBS, «Биолот», Россия), раствор трипсина-ЭДТА («ПанЭко», Россия), центрифужные пробирки объемом 50 мл (CentriStar™, Corning Incorporated, Мексика) и серологические пипетки объемом 25 и 10 мл (Falcon, Beckton Dickinson, США). Жизнеспособность клеток (отношение числа живых к числу мертвых) оценивали автоматически на анализаторе клеток Vi-Cell XR (Beckman Coulter, USA).

Исследование проводилось в 5 группах, при 3 чашках (повторениях) в каждой группе. Опытные группы освещались НИЛИ (параметры представлены в табл. 1), время экспозиции 5 мин. на 1 чашку. Контрольные чашки не подвергались воздействию НИЛИ.

Применяли аппарат лазерный терапевтический «Лазмик-ВЛОК» (РУ № РЗН 2014/1410 от 06.02.2014); его матричные излучающие головки, имеющие 8 лазерных диодов, расположенных в два ряда, обеспечивали относительно равномерную засветку почти эллиптической области 5×7 см с расстояния 7 см от поверхности чашек (рис. 1).

Таблица 1

Параметры НИЛИ при освещении опытных групп

Шифр головки	Название головки	Длина волны, нм	Длительность импульса, нс	Мощность в импульсе, Вт*	Частота, Гц	Средняя мощность, мВт*	ПМ, мВт/ cm^2	ПЭ, мДж/ cm^2
О1	МЛ-904-80	904	108	78	1500	13	0,05	15
ОЛ	МЛ-904-80	904	108	66	Режим ЛАЗ-МИК®	38	0,14	42
К1	МЛ-635-40	635	144	42	1500	9	0,03	9
КЛ	МЛ-635-40	635	144	41	Режим ЛАЗ-МИК®	33	0,12	36

* - со всей поверхности, от 8 лазерных диодов

На чашки диаметром 3,5 см приходилось около 10% падающей световой энергии. Исходя из этого, рассчитывалась ПМ и плотность энергии (ПЭ) для каждого варианта освещения. Требование к равномерному освещению всей поверхности плашки (лунки) связано с тем, что в этом случае обеспечивается лучший эффект, чем при локальном, точечном воздействии НИЛИ на часть культуры клеток. В режиме многочастотной модуляции ЛАЗМИК® использовалась сложная многочастотная модуляция НИЛИ.

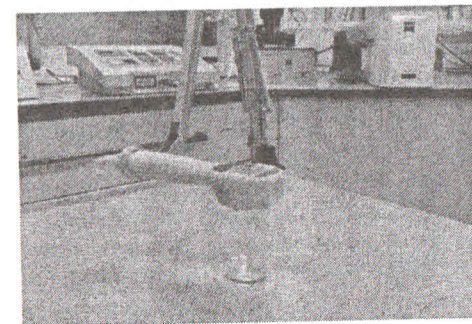


Рис. 1. Освещение чашки Петри с культурой МСК.

Непосредственно перед освещением МСК исследуемых и контрольной групп были инокулированы в количестве $3,7 \times 10^3$ живых клеток/ cm^2 поверхности культуральной посуды в каждую чашку Петри. Дальнейшее культивирование осуществлялось при условиях +37°C, CO_2 5% в течение 5 дней. Визуальное наблюдение за морфологией и ростом культу-

ры проводилось ежедневно методом световой микроскопии до достижения монослоя в одной из групп. После этого проводился подсчет общего количества клеток в каждой группе. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы SigmaPlot version 11.0.

Результаты и обсуждение. Начиная с 1-го дня культивирования на всех исследуемых чашках можно было наблюдать МСК, находящиеся на разных стадиях деления. При оценке клетки всех групп были идентичными, обладали высокой степенью адгезии к пластику, имели веретенообразную или треугольную формы. При изучении морфологии отдельных клеток на 1-е сутки культивирования можно было заметить, что подавляющая часть клеток имела схожие признаки – цитоплазма светлая, хорошо структурированная, края четкие, ядра с 1-2 ядрышками, без каких-либо нетипичных включений.

При дальнейшем культивировании отмечался относительно равномерный рост культуры МСК по всей поверхности пластика. Значимых изменений в морфологии клеток изучаемых и контрольной групп выявлено не было. На 5-й день культивирования морфологическая картина не изменилась и являлась типичной для культуры МСК: межклеточные контакты плотные, клетки достигают монослоя во всех группах. Разница в размерах клеток в разных группах и во все дни культивирования отсутствовала.

Таким образом, в процессе культивирования не было выявлено различий в морфологии МСК между контролем и опытными группами; жизнеспособность клеток в группах также не отличалась.

С 1-го по 5-й день культивирования количество клеток в поле зрения оценивалось визуально, с учетом показателя % монослоя на поверхности культуральной посуды, как в ручном, так и в автоматическом режиме. На рис. 2 представлено количество клеток в поле зрения через сутки после освечивания. Во всех опытных группах наблюдается превышение количества клеток относительно контроля, в наибольшей степени – в группе ОЛ (904 нм, режим модуляции ЛАЗМИК®). Но эти выводы требуют дальнейшего уточнения и подтверждения.

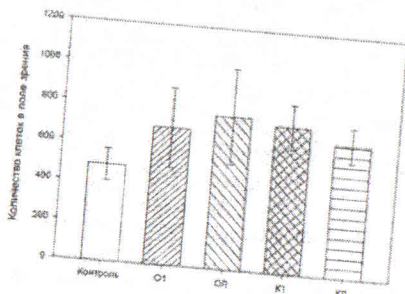


Рис. 2. Количество клеток в поле зрения на 1-е сутки после освечивания.

Оценка монослоя (площадь, занимаемая клетками) визуально проводилась в течение 5 суток культивирования (рис. 3). Общий характер изменений был идентичен для всех клеток, но в опытных группах, подвергшихся освечиванию, более выражен рост в первые 3 дня, что свидетельствует о стимулировании внутриклеточных процессов на первом этапе деления.

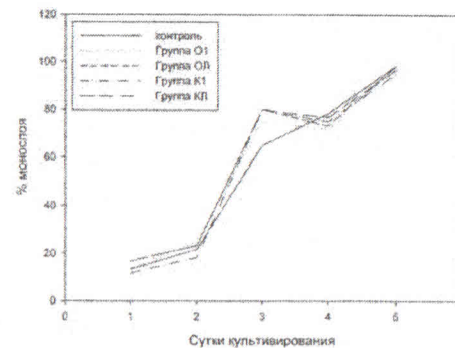


Рис. 3. Процентная доля площади, занятая монослоем МСК, в зависимости от срока культивирования.

Из представленных графиков, к сожалению, невозможно сделать однозначный вывод в пользу того или иного режима, поскольку для оптимизации параметров воздействия необходима большая детализация режимов и их комбинаций.

Выводы. Результаты предварительного изучения возможного влияния импульсного инфракрасного и красного НИЛИ (в том числе с использованием многочастотного режима) на морфологию, жизнеспособность, пролиферативную активность и скорость роста МСК *in vitro* показали, что при используемых энергетических и временных параметрах воздействия их морфология и жизнеспособность не меняются. В тоже время в период с 1-го по 3-й день культивирования наблюдается небольшое превышение количества клеток относительно контроля после освечивания инфракрасным (длина волны 904 нм) импульсным НИЛИ в режиме многочастотной модуляции ЛАЗМИК®.

Необходимо проведение дополнительных исследований для оптимизации параметров лазерного воздействия (длина волны, мощность, время и пр.) с возможным расширением методики освечивания МСК не только предварительно, в культуре, но также и после имплантации *in vivo*.