

# Оценка реактогенности препаратов, полученных на основе фотоинактивированных живых вакцин против бруцеллеза и туляремии, на организменном уровне.

## Ч.1. Использование метода LASCA

О.В.Ульянова, С.С.Ульянов, Пенчен Ли, Чиньминь Луо

*Описан новый способ фотоинактивации бактерий с целью получения прототипов вакцинных препаратов против особо опасных инфекций. Реактогенность новых профилактических препаратов изучалась с использованием метода анализа контраста динамических спеклов (метод LASCA). Проведенные экспериментальные исследования показывают, что бактериальные взвеси, облученные в разных режимах фотоинактивации, не оказывают негативного действия на микроциркуляцию крови у лабораторных животных.*

**Ключевые слова:** спеклы, контраст, LASCA, микроциркуляция крови, мониторинг, бруцеллез, туляремия.

### 1. Введение

В настоящее время для вакцинации используют живые, убитые, химические и рекомбинантные вакцины. Все они, к сожалению, не лишены недостатков. К рекомбинантным вакцинам относится новый класс вакцин, полученных различными методами генной инженерии. Для их создания используются рекомбинантные белки, липополисахариды, фрагменты белков или липополисахаридов патогенных микробов, синтезированные в клетках лабораторных штаммов бактерий, вирусов, дрожжей. Многие рекомбинантные вакцины вызывают иммунный ответ, недостаточный для индукции длительного специфического иммунитета. По всей вероятности причина заключается в том, что такие препараты содержат мономерную форму белка с линейными, а не конформационными эпитопами, которые и являются иммуногенными. Живые вакцины получают из дивергентных или аттенуированных штаммов микроорганизмов, обладающих ослабленной вирулентностью для человека, но содержащих полноценный набор антигенов. При введении живых вакцин в организме человека происходит размножение и генерализация микроорганизмов, стимулирующих выраженный иммунный ответ. Вакцинальный процесс отличается от инфекционного доброкачественным течением. Однако при использовании живых вакцин сохраняется вероятность их реверсии в вирулентную форму, что может стать причиной заболевания вакцинируемого.

**О.В.Ульянова.** Национальный исследовательский Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И.Вавилова, Россия, 410012 Саратов, Театральная пл., 1; e-mail: ulianovaov@mail.ru

**С.С.Ульянов.** Национальный исследовательский Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; e-mail: ulianov@sgu.ru

**Pengcheng Li, Qingming Luo.** Huazhong University of Science and Technology, 1037 Luoyu Rd., Wuhan, China 430074

Поступила в редакцию 25 февраля 2011 г.

Инактивированные вакцины являются достаточно стабильными и безопасными, т. к. не могут вызвать реверсию. Эти вакцины, как правило, менее иммуногенны, и поэтому требуется применение нескольких доз (бустерные иммунизации), что зачастую обуславливает определенный уровень их реактогенности.

Как показывает практика, в большинстве случаев частота осложнений при вакцинации тем выше, чем больше ее эффективность. Поэтому совершенствование методов получения вакцин, безопасных для организма в целом и для иммунной системы в частности, является на сегодняшний день актуальной задачей.

Цель настоящих исследований – изучение принципиальной возможности создания нового класса вакцинных препаратов на основе фотоинактивированных бактерий против особо опасных инфекций (таких как туляремия и бруцеллез). Предварительный анализ протективных свойств прототипов профилактических препаратов проведен в работе [1]. В частности, было показано, что фотоинактивированные клетки бактерий *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и *Brucella abortus* 19 ВА сохраняют антигенную структуру при определенных режимах облучения в присутствии фотосенсибилизатора в малой концентрации. Данная статья посвящена исследованию реактогенных свойств этих препаратов на организменном уровне с использованием когерентно-оптических методов.

### 2. Материалы и методы

В работе использовали вакцинные штаммы грамотрицательных бактерий *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 (НПО «Микроген», Омск). Клетки *F. tularensis* 15 культивировали при температуре  $T = 37^\circ\text{C}$  в течение 48 ч на FT агаре с pH 7.0 (ГНЦ «Прикладная микробиология и биотехнология», пос. Оболенск), клетки *B. abortus* 19 ВА выдерживали в термостате при той же температуре в течение 5 суток на эритроцит агаре с pH 7.2 (НПО «Питательные среды», Махачкала).

Взвесь бактерий готовили в физиологическом растворе из двухсуточной агаровой культуры. На взвесь, в которую добавили экзогенный фотодинамический краситель (метиленовый синий), воздействовали излучением светодиодов ( $\lambda = 650$  нм). Обработку бактерий проводили на установке для инактивации микроорганизмов [2]. Установка была собрана на основе стандартного планшета для иммуноферментного анализа со съемными стрипами. Каждая лунка планшета снабжена индивидуальным светодиодом ( $\lambda = 650$  нм). Концентрацию фотосенсибилизатора варьировали от 0.0005 % до 0.05 %, мощность излучения – от 0.2 до 1.4 мВт. Время облучения бактериальной взвеси изменялось в широких пределах: от 2 до 360 мин. После облучения взвесь высевали на плотную питательную среду и культивировали при  $T = 37^\circ\text{C}$  в течение 14 суток.

При проведении эксперимента в 96 лунок планшета вносили по 0.1 мл метиленового синего. Затем в каждую лунку добавляли 0.1 мл взвеси, содержащей  $10^9$  микробных клеток (м.к.) в 1 мл культуры *F. tularensis* 15 или *B. abortus* 19 ВА. Планшет помещали на установку для фотоинактивации, закрывали крышкой для предотвращения контаминации воздушной микрофлорой. Жизнеспособность культуры оценивали по количеству выросших колоний.

Параллельно с опытом проводили три контрольных исследования. В первом осуществляли контроль количества микробных клеток. Из пробирки, содержащей  $10^3$  м.к./мл *F. tularensis* 15 или *B. abortus* 19 ВА, высевали 0.1 мл взвеси на плотную питательную среду, посева культуры в термостате при  $T = 37^\circ\text{C}$  и затем учитывали количество выросших колоний. Во втором исследовании определяли влияние метиленового синего на количество микробных клеток. В этом случае облучение исключалось. Как уже отмечалось, метиленовый синий вносили в лунки планшета по 0.1 мл. В эти же лунки добавляли по 0.1 мл взвеси культуры *F. tularensis* 15 или *B. abortus* 19 ВА из пробирки, содержащей  $10^9$  м.к./мл. После экспозиции, соответствующей условиям эксперимента, культуру высевали на плотную питательную среду и культивировали в термостате при  $T = 37^\circ\text{C}$ . В третьем исследовании осуществляли контроль облучения культуры. В этом случае исключали действие фотосенсибилизатора и учитывали только воздействие облучения на бактерии. В лунки планшета вместо фотосенсибилизатора вносили по 0.1 мл физиологического раствора затем по 0.1 мл бактериальной взвеси ( $10^9$  м.к./мл), сохраняя таким образом объем (0.2 мл) облучаемой взвеси. Длительность и мощность облучения соответствовали опыту. Препараты с концентрацией  $10^9$  м.к./мл вводили лабораторным животным внутримышечно в количестве 0.5 мл. Предварительно животным для наркоза вводили нембутал по стандартной схеме. Наблюдения за животными проводились в течение часа после введения препаратов.

Реактогенность фотоинактивированных бактериальных взвесей для морских свинок определяли по изменению церебрального кровотока животных при внутримышечном введении 0.5 мл взвеси, содержащей  $10^9$  м.к./мл облученных или интактных культур вакцинных штаммов туляремии или бруцеллеза соответственно. Для изучения изменений церебрального кровотока использовали относительно недавно разработанный метод анализа контраста динамических спеклов (в англоязычной литературе

он называется LASCA [3–13]). Подробный обзор исследований в этой области представлен в статье [14].

Метод LASCA позволяет визуализировать микросуды головного мозга *in vivo*, не проводя трепанацию черепа лабораторных животных. Детальное описание использованной в экспериментах установки содержится в статье [15].

Существуют две модификации метода LASCA. Первая основана на анализе единичной реализации статических спеклов [3]. При этом вся реализация спекл-поля разбивается на небольшие области, как правило, размером  $5 \times 5$  или  $7 \times 7$  пикселей. Для каждой из выделенных областей вычисляется локальное значение контраста статических спеклов, после чего строится изображение. В настоящей работе использовалась вторая модификация метода LASCA, основанная на обработке динамических спеклов [16]. Детальное сравнение обоих подходов к обработке спеклов проведено в работе [5].

Принцип обработки спекл-полей при использовании динамического метода LASCA состоит в следующем. В каждой точке динамической спекл-структуры вычисляется контраст динамических спеклов по формуле

$$V = \frac{\sqrt{\langle (I - \langle I \rangle)^2 \rangle}}{\langle I \rangle} = \frac{\sigma_I}{\langle I \rangle}, \quad (1)$$

где  $I$  – мгновенная интенсивность динамических биоспеклов;  $\sigma_I$  – стандартное отклонение флуктуаций интенсивности; угловые скобки означают усреднение по времени. Очевидно, что чем ниже контраст, тем выше локальная скорость кровотока.

Как правило, методами LASCA исследуется микроциркуляция крови в головном мозгу белых крыс. Тем не менее чрезвычайно важно отметить, что изучение церебрального кровотока у морских свинок представляет собой значительно более сложную задачу. Толщина костных тканей головы морских свинок намного больше, чем у белых крыс, что заметно ухудшает качество регистрируемых изображений. Обычно голова крысы фиксируется на установке с помощью жестких креплений. Однако использование такой техники эксперимента при исследовании микроциркуляции крови у морских свинок приводит к негативным результатам. Более толстая костная ткань головы морских свинок претерпевает большую деформацию при ее фиксации на установке. Это вызывает дополнительную динамику спеклов и, как следствие, ухудшение отношения сигнал/шум. Кроме того, морские свинки существенно крупнее белых крыс. Большая глубина дыхания у морских свинок может вызывать значительные смещения головы животного во время проведения измерений.

С целью повышения чувствительности метода алгоритм обработки динамических изображений был существенно модифицирован [17]. На первом этапе обработки между каждыми двумя последовательно зарегистрированными изображениями спекл-полей вычисляли двумерную кросс-корреляционную функцию. Положение максимума этой функции позволяет с высокой точностью определить взаимное смещение изображений. На следующем этапе проводили корректировку смещений изображений спекл-полей, вызванных дыханием лабораторного животного. Затем в каждой точке зарегистрированных двумерных изображений вычисляли контраст (временной) динамических спеклов с последующим по-

строением его двумерного распределения. При построении изображения визуализируемых микрососудов проводили усреднение по 300 кадрам динамического спекл-поля, зарегистрированного с помощью монохромной CMOS-камеры Phoenix 1280 USB DC (MuTech, США). Поле зрения составляло  $6 \times 6$  мм, увеличение оптической системы равнялось 1.6, пространственное разрешение – 5.8 мкм. При корректировке положения отдельных кадров в областях, где наблюдается движение эритроцитов, контраст спеклов также будет снижен. Очевидно, что в этом случае двумерное распределение контраста спеклов полностью отражает структуру капиллярной сети. По оценкам, данная усовершенствованная методика позволяет проводить визуализацию микрососудов головного мозга размером  $\sim 15$  мкм [17].

В эксперименте для мониторинга изменений, происходящих в церебральном кровотоке, вычисляли коэффициент корреляции изображений визуализированных микрососудов головного мозга до и после введения препаратов, полученных на основе фотоинактивированных бактериальных взвесей. Поскольку в эксперименте коэффициент корреляции принимал значения, близкие к единице, то помимо статистической обработки проводилось дополнительное визуальное сравнение анализируемых изображений.

Исследования проводились в научной бактериологической лаборатории Национального исследовательского Саратовского государственного университета им. Н.Г.Чернышевского.

### 3. Мониторинг изменений микроциркуляции крови лабораторных животных при введении бактериальных взвесей, облученных в различных режимах фотоинактивации

На рис.1 и 2 показаны усредненные по времени изображения спекл-полей, распределения средневариационного отклонения временных флукуаций интенсивности биоспеклов (б) и контраста динамических спеклов (в) в плоскости изображения.

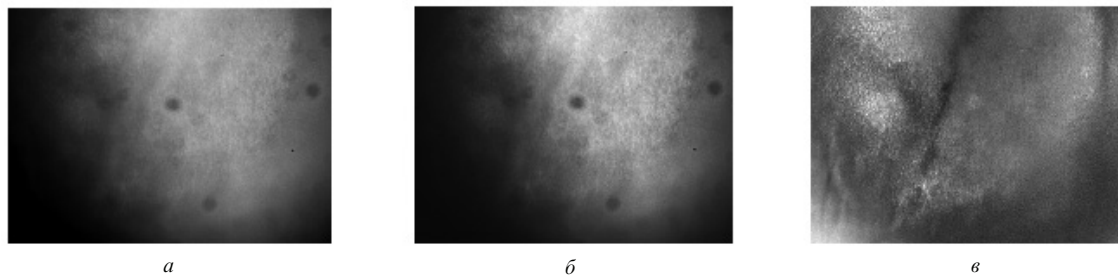


Рис.1. Визуализация сосудов головного мозга морской свинки до введения фотоинактивированных бактериальных клеток: усредненные по времени динамические спеклы (а), а также пространственные распределения средневариационного отклонения временных флукуаций интенсивности биоспеклов (б) и контраста динамических спеклов (в) в плоскости изображения.

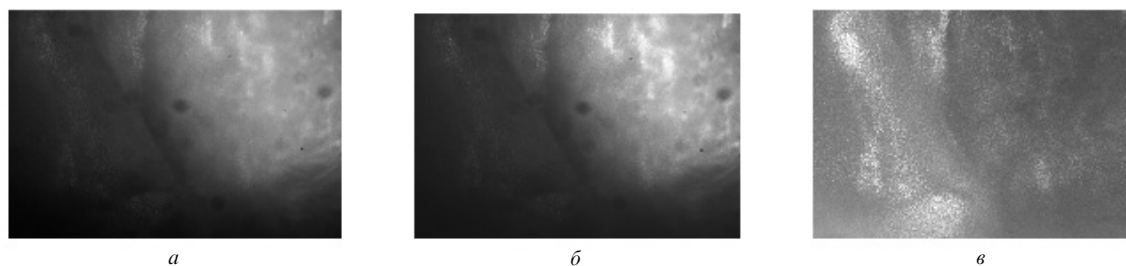


Рис.2. Визуализация сосудов головного мозга морской свинки после введения фотоинактивированных клеток *F. tularensis* 15: усредненные по времени динамические спеклы (а), а также пространственные распределения средневариационного отклонения временных флукуаций интенсивности биоспеклов (б) и контраста динамических спеклов (в) в плоскости изображения.

ного отклонения временных флукуаций интенсивности и контраста спеклов до и после введения облученной взвеси клеток вакцинного штамма туляремии соответственно. Пространственное распределение контраста спеклов в плоскости изображения отражает пространственное расположение глубокозалегающих сосудов головного мозга. Изображения усредненных спеклов и пространственное распределение средневариационного отклонения временных флукуаций интенсивности биоспеклов являются менее информативными и отражают в первую очередь не расположение микрососудов в капиллярной сети головного мозга, а поверхностные неровности костной ткани головы исследуемого животного.

Сравнивая рис.1 и 2, можно заметить, что поле зрения на них смещено. Этот эффект обусловлен смещением животных в процессе дыхания. Как уже отмечалось, устранить его в эксперименте крайне сложно.

Визуальное сопоставление изображений показывает, что топология капиллярной сети до и после введения взвеси фотоинактивированных клеток *F. tularensis* 15 практически идентична. Изменений количества микрососудов с интенсивным кровотоком не наблюдалось. Это означает, что реактогенное действие изучаемого препарата на организм морских свинок невелико.

Аналогичные результаты были получены при исследовании реактогенного действия, вызываемого взвесью фотоинактивированных клеток вакцинного штамма бруцеллеза. На рис.3 представлены соответствующие рис.1 изображения, зарегистрированные после введения препарата, полученного на основе клеток *B. abortus* 19 ВА. Каких-либо заметных изменений в топологии кровеносной сети обнаружено не было.

В ходе эксперимента было отмечено, что морские свинки легко перенесли подкожное введение необлученных и облученных культур *F. tularensis* 15 и *B. abortus* 19 ВА в высоких концентрациях. При этом не наблюдалось заболевания биопробных животных или снижения их ак-

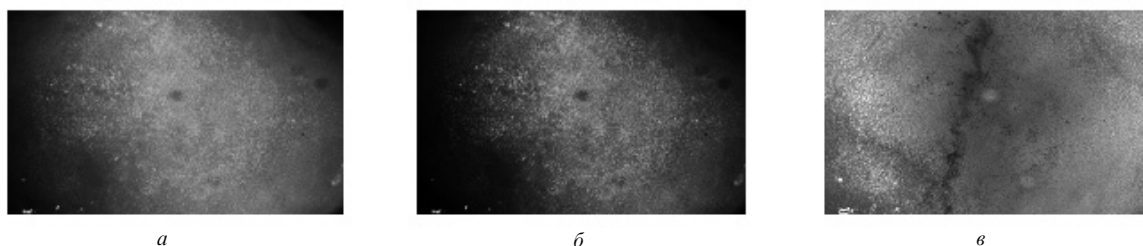


Рис.3. Визуализация сосудов головного мозга морской свинки после введения фотоинактивированных клеток *B. abortus* 19 ВА: усредненные по времени динамические спеклы (а), а также пространственные распределения среднеквадратичного отклонения временных флуктуаций интенсивности биоспеклов (б) и контраста динамических спеклов (в) в плоскости изображения.

тивности. Таким образом, можно сделать вывод о том, что в результате фотоинактивации низкокогерентным светом не происходит повышения реактогенности вакцинных штаммов.

#### 4. Заключение

Мониторинг изменений кровотока в микрососудах головного мозга морских свинок показал, что топология капиллярной сети до и после введения взвеси фотоинактивированных клеток вакцинных штаммов туляремии и бруцеллеза практически идентична. Изменений количества микрососудов с интенсивным кровотоком не наблюдалось. Это означает, что реактогенное действие изучаемых препаратов на сосуды головного мозга невелико. В результате проведенных исследований было выявлено, что внутримышечное введение экспериментально полученных бактериальных взвесей не оказывает длительного негативного воздействия на морских свинок.

Исследования поддержаны РФФИ (грант № 06-04-39016), государственным Фондом естественных наук Китая (грант № 30711120171), Государственными контрактами № 02.442.11.7243 и 02.740.11.0879.

1. Ульянова О.В., Ульянов С.С. *Вестник Саратовского государственного университета им. Н.И.Вавилова*, **4**, 17 (2007).

2. Ульянова О.В., Ульянов С.С. Патент РФ № 77278. Приоритет от 25.06.2008.
3. Briers J.D., Webster S. *J. Biomed. Opt.*, **2**, 174 (1996).
4. Dunn A.K., Bolay H., Moskowitz M.A., Boas D.A. *J. Cerebral Blood Flow Metabolism*, **21**, 195 (2001).
5. Li P., Ni S., Zhang L., Zeng S., Luo Q. *Opt. Lett.*, **31**, 1824 (2006).
6. Dunn A.K., Devor A., Bolay H., Andermann M.L., et al. *Opt. Lett.*, **1**, 28 (2003).
7. Haiying Cheng, Qingmig Luo, Qian Liu, Qian Lu, Hui Gong, Shaogun Zeng. *Phys. Med. Biol.*, **49**, 1347 (2004).
8. Leahy M.J., Nilsson G.E. *Handbook of Photonics for Biomedical Science* (New York: CRC Press, 2010).
9. Duncan D.D., Kirkpatrick S.J., Wang R.K. *J. Opt. Soc. Am. A*, **1**, 9 (2008).
10. Yuan S., Devor A., Boas D.A., Dunn A.K. *Appl. Opt.*, **10**, 1823 (2005).
11. Vulker A., Zakharov P., Weber B., Buck F., Scheffold F. *Opt. Express*, **24**, 9782 (2005).
12. Forrester K.R., Stewart C., Tulip J., Leonard C., Bray R.C. *Med. Biol. Eng. Comput.*, **6**, 687 (2002).
13. Tan Y.K., Liu W.Z., Yew Y.S., Ong S.H., Paul J.S. *Proc. Int. Conf. on Image Processing (ICIP)* (Washington: IEEE, 2004).
14. Draijer M., Hondebrink E., van Leeuwen T., Steenbergen W. *Lasers Med. Sci.*, **4**, 639 (2009).
15. Ульянова О.В., Ульянов С.С., Ли Пенчен, Луо Чиньминь. *Оптика и спектроскопия*, **6**, 972 (2009).
16. Briers D. *J. Physiol. Meas.*, **22**, R35 (2001).
17. Ulyanov S., Ganilova Yu., Zhu D., Qiu J., Li P., Ulianova O., Luo Q. *Europhys. Lett.*, **82**, 1 (2008).