

Оценка реактогенности препаратов, полученных на основе фотоинактивированных живых вакцин против бруцеллеза и туляремии, на тканевом уровне. Ч.2. Использование метода спекл-микроскопии высокого пространственного разрешения

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

Метод спекл-микроскопии был адаптирован для оценки реактогенности прототипов вакцинных препаратов против особо опасных инфекций. Предложена теория, описывающая механизм формирования выходного сигнала спекл-микроскопа сверхвысокого пространственного разрешения. Проведенные экспериментальные исследования показывают, что бактериальные взвеси, облученные в разных режимах фотоинаktivации, не оказывают негативного действия на микроциркуляцию крови у лабораторных животных.

Ключевые слова: спекл-микроскопия, микроциркуляция крови, мониторинг, бруцеллез, туляремия.

1. Введение

Существенные изменения характера движения крови могут возникать при использовании различных профилактических препаратов. Изучение таких изменений, происходящих, например, в сосудах брюжейки морских свинок, могут быть положены в основу скрининга этих препаратов или исследования их реактогенности.

В настоящее время для диагностики состояния микрососудов и движения крови в них используется дифракция сфокусированных когерентных пучков. Впервые лазерный доплеровский микроскоп был применен для измерений потоков крови в отдельном сосуде ретины глаза в начале семидесятых годов прошлого века [1, 2]. В работах [3, 4] рассмотрены статистические свойства биоспеклов, формирующихся при рассеянии света в одиночном кровеносном микрососуде [5, 6]. Статьи [7, 8] посвящены исследованию статистических характеристик биоспеклов, формирующихся при дифракции остросфокусированных лазерных пучков. Процесс формирования спекл-модулированных биоспеклов и их статистические характеристики были рассмотрены в работе [9].

Следует отметить, что дифракция сфокусированных когерентных пучков достаточно часто используется в измерительных системах (спекл-микроскопы [10], доплеровские микроскопы [2], измерители скорости ретинального кровотока [1] и др). Изучение микрососудов с помощью лазеров требует прецизионной фокусировки пуч-

ка для обеспечения необходимого пространственного разрешения оптической системы. В этом случае формируются спеклы при малом числе рассеивателей. Количество работ, специально посвященных изучению спекл-полей этого типа весьма невелико. Вместе с тем многие явления, сопровождающие образование таких спеклов, нуждаются в более детальном анализе. Разработка классических методов спекл-микроскопии и анализ выходных характеристик спекл-микроскопа приведены в [10–12]. Представленные в этих работах результаты получены в предположении о гауссовой статистике спекл-полей. Однако при исследовании микрососудов с размерами, меньшими размера эритроцита, требуется фокусировка лазерного пучка в пятно, диаметр которого соизмерим с длиной волны света. Столь острая фокусировка пучка может быть достигнута при использовании 90-кратного микроскопа с числовой апертурой 1.25.

В данной работе проведена модификация спекл-микроскопа для достижения предельно возможного пространственного разрешения и предложена теория, описывающая механизм формирования выходного сигнала спекл-микроскопа сверхвысокого пространственного разрешения.

2. Спекл-микроскопия высокого пространственного разрешения

Очевидно, что при рассеянии сфокусированного лазерного пучка на движущемся фазовом экране имеет место изменяющаяся во времени фазовая модуляция интенсивности дифрагированного пучка. В результате появляются временные флуктуации интенсивности рассеянной волны в дальней зоне дифракции. Уравнение (в приближении скалярной теории дифракции) для флуктуаций амплитуды динамического спекл-поля в дальней зоне при нормальном падении сфокусированного гауссова пучка на движущийся фазовый экран может быть записано в следующем виде [13]:

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.

$$U_s\left(\frac{vt}{\lambda}\right) = \text{const} \int_{-\infty}^{\infty} U_0\left(\frac{vt}{\lambda} - \alpha\right) G(\alpha) d\alpha, \quad (1)$$

где

$$G(\alpha) = \exp\left(-\frac{2\pi i X_0}{Z_0} \alpha\right) \exp\left(-\frac{\alpha^2}{W_0^2}\right); \quad (2)$$

t – время; v – скорость потока крови, имитируемого движущимся фазовым экраном; X_0 – координата точки наблюдения флуктуаций поля, нормированная на длину волны лазерного излучения λ ; Z_0 – расстояние между рассеивающей плоскостью и плоскостью наблюдения; W_0 – радиус перетяжки пучка; $U_0(vt/\lambda)$ – амплитуда поля в рассеивающей плоскости при освещении экрана плоской волной. Все величины, входящие в выражения (1) и (2), являются безразмерными: параметры, имеющие размерность длины, нормированы на λ , а амплитуды поля в уравнениях – на амплитуду поля в центре перетяжки сфокусированного гауссова пучка.

Очевидно, что при рассеянии света в сосудах с диаметрами порядка размера эритроцита в дифракционной картине присутствует зеркальная компонента, доминирующая над рассеянным полем. Несложно показать (похожие выкладки были приведены в [13]), что выражение для корреляционной функции флуктуационной компоненты интенсивности поля может быть записано следующим образом:

$$\Psi_I\left(\frac{vt}{\lambda}\right) \propto \exp\left[-\frac{(vt/\lambda)^2}{2W_0^2 + L_c^2}\right], \quad (3)$$

где L_c – длина корреляции пространственных неоднородностей экрана, имитирующего поток крови в микрососуде.

Следует отметить, что, строго говоря, соотношение (3) справедливо только для гауссовой статистики спекл-полей, которая не наблюдается в случае малого числа рассеивателей. Прямое численное моделирование и проверка гипотезы о виде распределения показывают, что статистика флуктуаций интенсивности рассеянного поля в дальней зоне (спеклы, формирующиеся в спекл-микроскопе высокого пространственного разрешения) подчиняется m -распределению Накагами [14]. Однако справедливость выражения (3) полностью подтверждается данными компьютерного моделирования даже в тех случаях, когда упрощающие предположения, использованные при его выводе, перестают выполняться.

Важно подчеркнуть, что время корреляции флуктуаций интенсивности зависит не только от скорости рассеивающего объекта, но еще и от радиуса перетяжки пучка и длины корреляции пространственных неоднородностей рассеивающего экрана.

Принцип работы спекл-микроскопа высокого пространственного разрешения состоит в следующем. Пучок излучения He–Ne-лазера ($\lambda = 633$ нм, $P = 1$ мВт) с помощью 90-кратного микрообъектива остро фокусируется на исследуемый микрососуд в пятно малого радиуса (порядка длины волны излучения). Поток крови в микрососудах вызывает модуляцию интенсивности остро-сфокусированного пучка в плоскости перетяжки. Это приводит к формированию динамических спеклов в дальней зоне дифракции. Для регулирования интенсив-

ности освещения использовался вращающийся аттенуатор NDC-100C-4M (Mounted Continuously Variable ND Filter Thorlab, США). Детектирование динамики биоспеклов проводилось с помощью кремниевого фотодетектора PDA 10A (Thorlab, США) и предварительного усилителя. Площадь детектора составляла 0.78 мм², полоса частот – 150 МГц, характеристика шума – 5.5×10^{-11} Вт/Гц^{1/2}. Усиленный сигнал поступал на линейный вход двухканальной платы АЦП (NI USB-5133, 8 бит, полоса 50 МГц; National Instruments, США), которая была подключена к компьютеру через USB-порт.

В состав спекл-микроскопа помимо лазера входят источник белого света и оптическая система формирования изображения, включающая в себя микроскоп Биолам (ЛОМО, Россия) и монохромную цифровую CMOS-камеру WinCamD (DataRay, США) с разрешением 1024×1024 пикселей. Камера была подключена к компьютеру через второй USB-порт и позволяла проводить визуальное наблюдение потоков крови в капиллярах и определять положение контура сосуда в реальном режиме времени.

Спектральные функции флуктуаций интенсивности биоспеклов, как правило, имеют сложную форму и могут содержать один или несколько локальных максимумов. Их появление может быть обусловлено пульсирующим характером потоков крови в микрососудах или сокращениями стенок сосудов. Мерой скорости микроциркуляции крови в уединенном сосуде является ширина спектра флуктуаций интенсивности динамических спеклов, формирующихся при рассеянии гауссова пучка, сфокусированного на исследуемый микрососуд. Косвенной характеристикой скорости кровотока служит среднеквадратичное отклонение σ выходного сигнала спекл-микроскопа: чем больше σ , тем выше скорость микроциркуляции крови.

3. Оценка реактогенности бактериальных взвесей после их облучения в различных режимах фотоинактивации

3.1. Оценка безвредности

Проверку безвредности действия культур вакцинных штаммов туляремии и бруцеллеза, необлученных и облученных низкокогерентным светом ($\lambda_0 = 650$ нм, $\Delta\lambda = 10$ нм, $P = 0.2$ мВт), проводили путем их введения группе морских свинок. Для этого взвеси двухсуточных бактериальных культур вносили в лунки планшета прибора (по 250 мкл в каждую) и облучали клетки туляремийной вакцины в течение шести, а бруцеллезной – в течение трех часов.

Степень безвредности *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 до и после облучения определяли на морских свинках согласно работам [15, 16]. Для этого животным подкожно вводили *B. abortus* 19 ВА в дозе 2×10^9 микробных клеток (м.к.) в 1 мл и *F. tularensis* 15 в дозе 5×10^9 м.к./мл и проводили наблюдение в течение 15 и 30 дней соответственно.

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

3.2. Изучение методами спекл-микроскопии на тканевом уровне изменения микроциркуляции крови лабораторных животных при введении фотоинактивированных бактериальных взвесей

Как уже упоминалось, спектральные функции флуктуаций интенсивности биоспеклов обычно имеют сложную форму и могут содержать один или несколько локальных максимумов.

Характерный вид выходного сигнала спекл-микроскопа представлен на рис.1,*а*. Спектр флуктуаций интенсивности (соответствующий выходному сигналу, показанному на рис.1,*а*) приведен на рис.1,*б*.

Спекл-микроскоп использовался для оценки нарушения микроциркуляции крови в уединенном сосуде, вызванных действием фотоинактивированных клеток вакцинных штаммов. На брыжейку морских свинок методом аппликации наносили бактериальные взвеси вакцинных штаммов возбудителей туляремии и бруцеллеза, прошедших лазерную обработку. Концентрация взвеси составляла 10^9 м.к./мл. Наблюдение проводили в течение 40 мин после аппликации препаратов.

Как показали экспериментальные исследования, при нанесении на брыжейку взвеси клеток вакцинного штамма туляремии, прошедших лазерную обработку, практически сразу возникали изменения характера кровотока: он существенно замедлялся, вплоть до полной его остановки. Сосуды при этом переходили в состояние престаза. Такой эффект наблюдали при воздействии вакцинных штаммов, облученных в разных режимах фотоинактивации при различных концентрациях фотосенсибилизатора. Если в норме исследуемому сосуду соответствовала ширина спектра выходного сигнала 160 Гц, то после применения препарата ширина спектра сразу уменьшалась до 10 Гц. Это свидетельствует о замедлении кровотока в 16 раз. Динамика кровотока (изменение скорости движения крови со временем) представлена на рис.2,*а*. Аналогичную динамику демонстрирует среднеквадратичное отклонение σ выходного сигнала спекл-микроскопа, нормированного на среднеквадратичное отклонение сигнала, зарегистрированного непосредственно после применения препарата (*б*), выходной сигнал спекл-микроскопа, демонстрирующий нерегулярный характер кровотока с 28-й по 29-ю секунду после применения препарата (*в*), а также выходной сигнал спекл-микроскопа длительностью 1 с, зарегистрированный через 5 мин после применения препарата (регулярность кровотока восстановлена) (*г*).

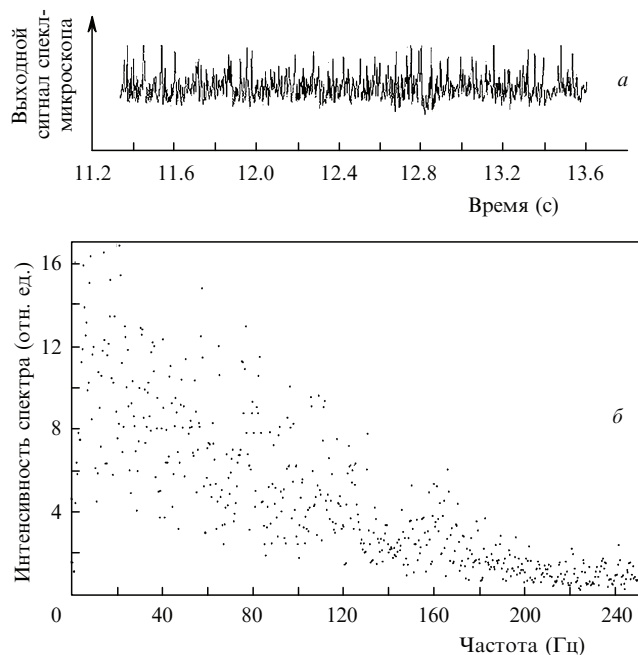


Рис.1. Результаты исследования микрососуда крови в исходном состоянии: типичный выходной сигнал спекл-микроскопа длительностью 2 с (с 11-й по 13-ю секунду наблюдения) (*а*) и спектр выходного сигнала спекл-микроскопа (*б*).

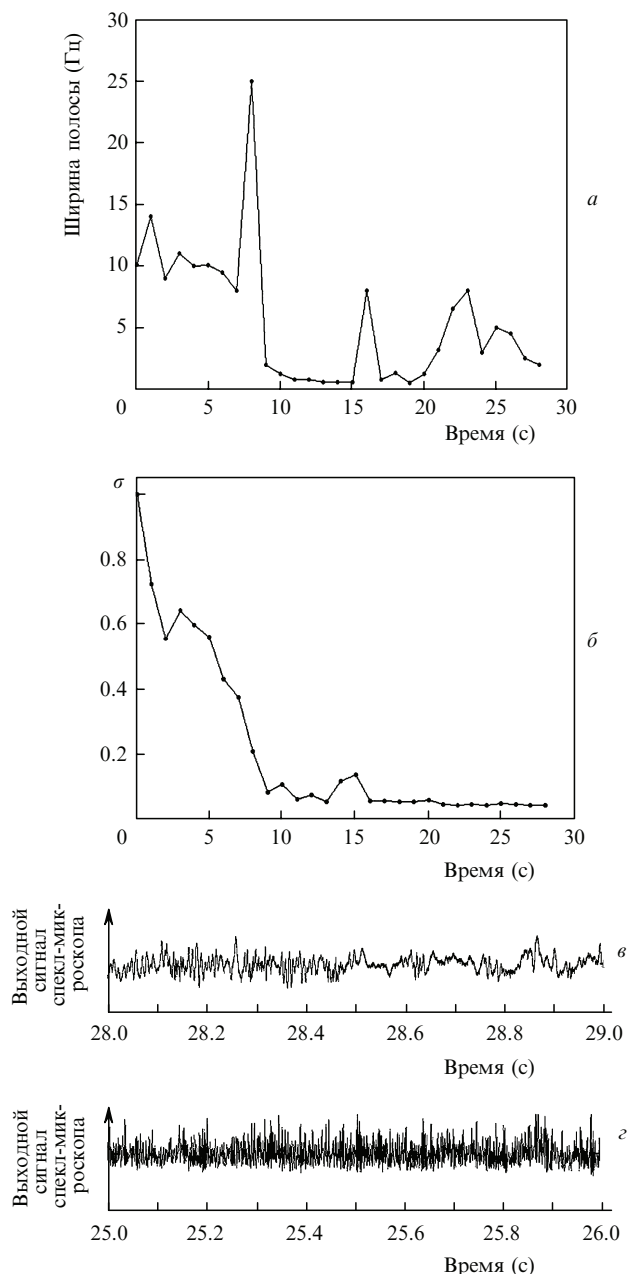


Рис.2. Динамика кровотока после нанесения на брыжейку морской свинки фотоинактивированных клеток *F. tularensis* 15: временные зависимости ширины полосы частот выходного сигнала спекл-микроскопа (*а*) и среднеквадратичного отклонения σ выходного сигнала спекл-микроскопа, нормированного на среднеквадратичное отклонение сигнала, зарегистрированного непосредственно после применения препарата (*б*), выходной сигнал спекл-микроскопа, демонстрирующий нерегулярный характер кровотока с 28-й по 29-ю секунду после применения препарата (*в*), а также выходной сигнал спекл-микроскопа длительностью 1 с, зарегистрированный через 5 мин после применения препарата (регулярность кровотока восстановлена) (*г*).

тичное отклонение σ выходного сигнала спекл-микроскопа (рис.2,*б*). Из рис.2,*б* видно, что кровоток практически полностью останавливается (как правило, это происходит на 10-й секунде после воздействия препарата). Затем через некоторое время (~ 5 с), кровоток возобновляется, но приобретает нерегулярный характер (рис.2,*в*). Примерно через 5 мин кровоток опять становится регулярным (рис.2,*г*), оставаясь при этом замедленным по сравнению с исходным состоянием. Скорость кровотока

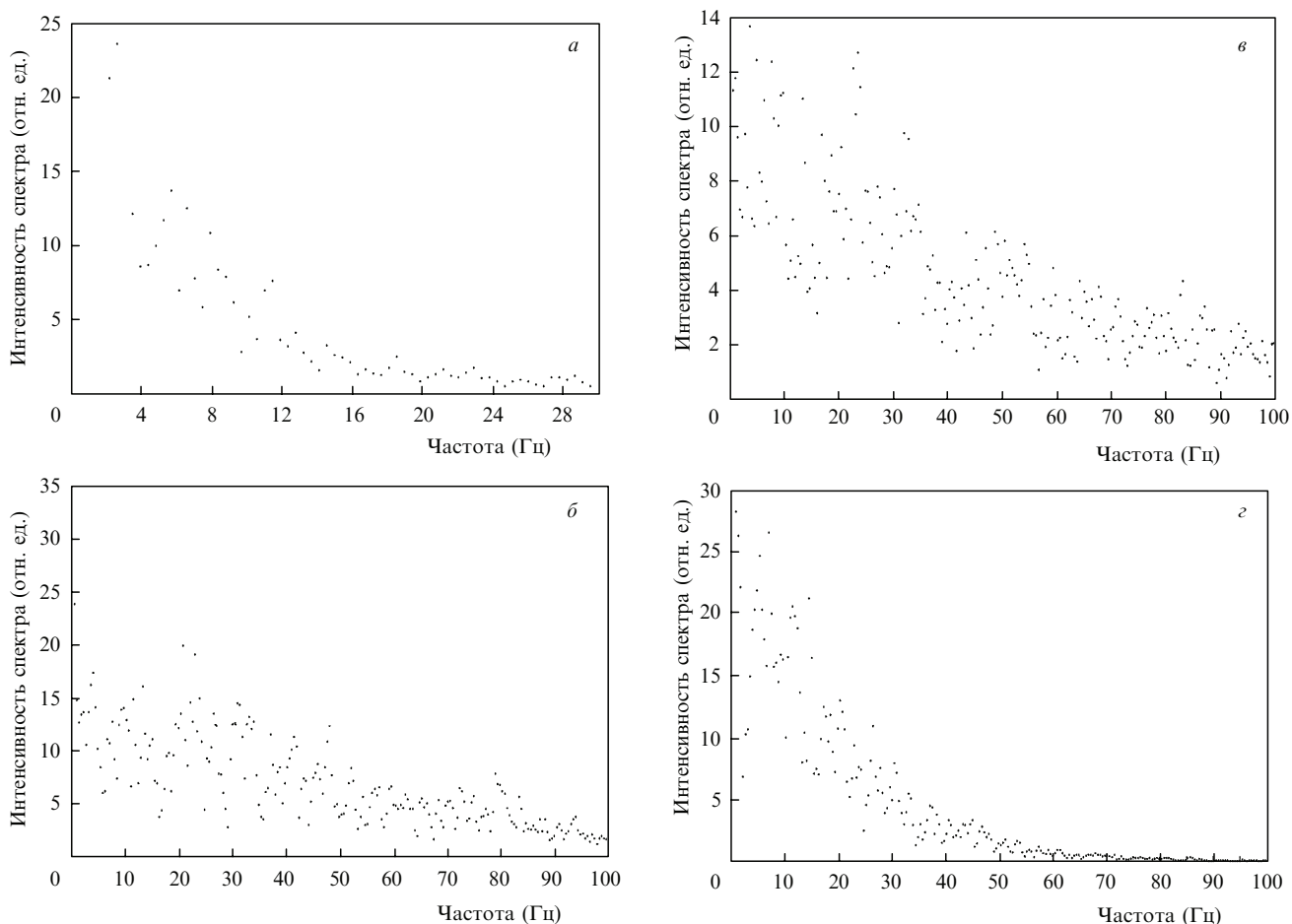


Рис.3. Спектры выходного сигнала спекл-микроскопа, зарегистрированного до аппликации фотоинaktivированных клеток *B. abortus* 19 ВА на брыжейку морской свинки (а), а также через 1 (б), 2 (в) и 3 мин (з) после применения препарата. Ширина спектра 9 (а), 45 (б), 40 (в) и 20 Гц (з).

восстанавливается до исходных значений через 10 мин после применения препарата.

Проведенные опыты позволяют сделать вывод о том, что вакцинный штамм возбудителя туляремии сохраняет после фотоинaktivации реактогенность для ткани кровеносных сосудов. Однако вызываемые им изменения кровотока находятся в пределах допустимой нормы, поскольку нарушения микроциркуляции, обусловленные действием препарата, имеют обратимый характер – кровоток полностью нормализуется в течение 10 мин.

Как показали экспериментальные исследования, после аппликации фотоинaktivированных клеток бруцеллеза на брыжейку морской свинки скорость кровотока не только не уменьшалась (как в случае с туляремиными бактериями), а, наоборот, значительно увеличивалась. Так, например, если ширина спектра выходного сигнала спекл-микроскопа до воздействия препарата составляла 9 Гц (рис.3,а), то после аппликации фотоинaktivированных бактериальных клеток бруцеллеза она увеличивалась до 45 Гц (рис.3,б, в). Это свидетельствует о пятикратном увеличении скорости кровотока, которое происходит из-за значительного уменьшения просвета сосуда. Именно в этом и состоит реактогенное действие препарата на сосудистую ткань. С течением времени ширина спектра и, следовательно, скорость кровотока постепенно уменьшаются (рис.3,з). Кровоток полностью восстанавливает нормальные показатели через 5–7 мин после применения препарата.

4. Заключение

Проведенные исследования показывают, что спекл-микроскопия обладает значительно большей чувствительностью и информативностью, чем метод анализа контраста спеклов (LASCA), применительно к задачам оценки реактогенности профилактических препаратов.

С помощью метода спекл-микроскопии выполнена оценка воздействия фотоинaktivированной взвеси бактерий вакцинного штамма туляремии на микроциркуляцию крови в уединенном сосуде брыжейки. Установлено, что при использовании препарата наблюдалось замедление кровотока. Настоящие эксперименты позволяют сделать вывод о том, что вакцинный штамм возбудителя туляремии после фотоинaktivации в течение двух часов остается реактогенным для сосудистой ткани. Однако нарушения микроциркуляции, вызванные действием препарата, носят обратимый характер.

После аппликации инаktivированных клеток вакцинного штамма бруцеллеза на брыжейку морской свинки скорость кровотока значительно увеличилась (в ряде случаев наблюдалось ее пятикратное увеличение). Это происходит вследствие значительного уменьшения просвета сосуда (именно в этом и состоит реактогенное действие препарата). С течением времени ширина спектра и, следовательно, скорость кровотока постепенно уменьшаются, и он полностью восстанавливает нормальные показатели через 5–7 мин после аппликации фотоинaktivированной бактериальной взвеси.

Методом спекл-микроскопии удалось определить не только продолжительность реактогенного действия фотоинaktivированных вакцин для сосудистой ткани, но и его характер. По мнению авторов, совершенно очевидно, что туляремийная и бруцеллезная вакцины, прошедшие фотоинaktivацию, возбуждают нервные окончания разных отделов нервной системы. Туляремийная вакцина действует на парасимпатическую нервную систему, вызывая дилатацию сосудов брыжейки. В свою очередь, бруцеллезная вакцина возбуждает нервные окончания симпатического отдела нервной системы, о чем свидетельствует четко выраженная констрикция сосудов брыжейки.

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. Riva C.E. *Invest. Ophthalmol.*, **11**, 936 (1972).

2. Mishina H.A. *Opt. Commun.*, **11**, 99 (1974).
3. Aizu Y. *Opt. Laser Technol.*, **4**, 205 (1991).
4. Aizu Y. *J. Biomed. Opt.*, **3**, 227 (1998).
5. Aizu Y. et al. *Opt. Commun.*, **5**, 269 (1989).
6. Aizu Y. *Opt. Laser Technol.*, **4**, 205 (1991).
7. Ulyanov S.S. *Opt. Eng.*, **10**, 2850 (1995).
8. Ulyanov S.S. *Opt. Lett.*, **20**, 1313 (1995).
9. Ulyanov S.S. *J. Biomed. Opt.*, **3**, 237 (1998).
10. Ulyanov S.S. *Physiol. Meas.*, **22**, 681 (2001).
11. Tuchin V.V. *J. Biomed. Opt.*, **1**, 106 (1999).
12. Ulyanov S.S. et al. *Lasers Med. Sci.*, **1**, 31 (1997).
13. Galanzha E.I. et al. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics* (Bellingham: SPIE Press Monograph, 2002, p. 875).
14. Ulyanov S. *J. Opt. Soc. Am. A*, **9**, 2207 (2008).
15. ГОСТ 18589-73. *Вакцина живая сухая против бруцеллеза в сельскохозяйственных животных из штамма № 19* (М., 1973).
16. *Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба. Методические указания. МУ 3.3.1.2161-07* (М., 2007).